

S0 – Predkongresni simpozij – Laboratorijska medicina u 21. stoljeću, S0-1

Centri izvrsnosti u kliničkoj kemiji i laboratorijskoj medicini

Müller Mathias

Institute of Laboratory Diagnosis, Emperor Franz Josef Hospital, Beč, Austrija

Postoji suglasje o tome da medicinski laboratoriji trebaju biti centri izvrsnosti u dijagnostičkom procesu kroz trajnu komunikaciju s kliničarima i bolesnicima. Međutim, iako polaze s vrlo bliskih polazišta (naime, bolesnika), liječnici i laboratorijski stručnjaci se tijekom radnog dana obično uvelike razilaze zbog nedostatka komunikacije i uzajamnog uvažavanja. To se može opisati kao dinamični kaotični proces gdje se zapravo bliske početne točke eksponencijalno razilaze. S jedne strane, liječnici kao oni koji spašavaju živote ne znaju što zapravo mogu očekivati od medicinskog laboratorija i koja je korist od njihovih zahtjeva za laboratorijske pretrage. Stoga njihova očekivanja često ostaju bez odgovora pa su liječnici često skloni ne uzimati laboratorij i njegovo osoblje sasvim ozbiljno. S druge strane, upravljanje kvalitetom, kontrola kvalitete i unutarnji proces optimiranja sve više postaju za mnoge kliničke kemičare prvenstveni cilj njihovog rada. Tako se zanemaruje činjenica da se 93% laboratorijskih pogrešaka događa u prijeanalitičkom ili poslijeanalitičkom dijelu dijagnostičkog procesa. Danas samo 7% grješaka nastaje u specifičnim laboratorijskim procesima. Potrebna je bolja organizacija i učinkovitost laboratorija kako bi se smanjio broj radilišta i rabili konsolidirani suvremeni analizatori, te tako izbjeglo ili na najmanju mjeru svelo cijepanje uzoraka i raspodjela poduzoraka. Tako će laboratorijska služba moći poboljšati vrijeme potrebno od primitka uzorka do izdavanja nalaza, te bolje iskoristiti raspoloživo osoblje. Reorganizacija temeljnog slijeda radnih operacija omogućava primjenu novih tehnologija i inovacija u dijagnostičkom laboratoriju. Organizacija laboratorija može se definirati kao "činiti pravu stvar na ispravan način". Izgledi da se prava stvar učini na ispravan način su veći ako su u laboratorijima ugrađeni ne samo kontrolni sustavi za tehnički proces, nego i kontrolni sustavi za tumačenje rezultata te za donošenje odluka (postavljanje dijagnoze). Kroz učinkovitost unutarnjih operacija može se poboljšati kvaliteta skrbi za bolesnika, pojačavanjem interakcije s bolesnicima i kliničarima (npr. pribivanje kliničkim vizitama i sastancima). Laboratorijski stručnjaci će morati izgraditi mrežu od laboratorija prema kliničkim odjelima uza strogo utvrđene odgovornosti uključujući

S0 – Precongress symposium – Laboratory medicine in the 21st century, S0-1

Centers of excellence in clinical chemistry and laboratory medicine

Müller Mathias

Institute of Laboratory Diagnosis, Emperor Franz Josef Hospital, Vienna, Austria

There is agreement that medical laboratories have to be Centers of Excellence in the diagnostic process by continuous communication with clinicians and patients. However, during the clinical working day, physicians and laboratorians, although they are starting from very close points (namely, the patient), usually diverge intensely due to the lack of communication and mutual appreciation. This can be defined as a dynamic chaos-process when two arbitrarily close starting points diverge exponentially. On the one hand, physicians being in the role of life-savers, do not know what they can really expect from the medical laboratory and what is the benefit of their lab requests. Therefore, their expectations are often not answered and the physicians tend to take the laboratory and its staff not really serious. On the other hand, for many of the clinical chemists quality management, quality control, internal process optimization become ever more the primary goal in their doing. Thereby, the fact is neglected that 93% of laboratory errors occur either in the preanalytical or postanalytical part of the diagnostic process. Nowadays, only 7% of errors occur in laboratory specific processes. Improved laboratory organization and efficiency are necessary to reduce the number of work-stations and to use consolidated modern analyzers to avoid or minimize sample splitting, distribution of subsamples. Thus, the laboratory service can improve the turnaround times and use the personnel more efficiently. Reorganization of the basic workflow allows for implementation of new technologies and innovations in the diagnostic laboratory. Laboratory organization can be defined as "doing the right thing right". The chance of doing the right thing right is greater if not only technical process control systems but also control systems for data interpretation and for decision (diagnosis) making are implemented in the laboratories. By efficiency of internal operations, the quality of patient care can be improved by extending the interaction with patients and clinicians (e.g., attending clinical rounds and clinical staff meetings). Laboratorians will be obliged to build a network from the laboratory to clinical departments with a strict responsibility including diagnostic strategies, specimen collection, transportation, measurement,

dijagnostičke strategije, prikupljanje uzoraka, prijenos uzoraka, mjerenje, sastavljanje izvješća i tumačenje rezultata pomoću računalnih *on-line* sustava. Oni moraju biti ravnopravni partneri kliničarima u višedisciplinskom modelu usklađene skrbi. Dobro zamišljena (re)organizacija laboratorija, gdje su liječnici i laboratorijski stručnjaci povezani i djeluju zajednički, povećava dijagnostičku vrijednost laboratorija kao dijagnostičkog centra izvrsnosti. Uz ovakav koncept laboratorijski stručnjaci neće biti samo uspješni upravljači ljudskim, novčanim i radnim resursima, nego će isto tako davati stručno dijagnostičko mišljenje u okviru skrbi za bolesnika, kako bi se održali u okruženju usredotočenom na kliniku i bolesnika koje traži interdisciplinsko poznavanje velikih načela fiziologije i patofiziologije, kao i spremnost za prihvaćanje odgovornosti za donešene odluke, što sve proizlazi iz takvih aktivnih interaktivnih odnosa.

E-mail: mathias.mueller@wienkav.at

S0-2

Integracija i konsolidacija laboratorijskih specijalnosti – povezivanje laboratorija s odjelima i područjem

Bonini Pierangelo

Laboratorio S.p.A. Università Vita-Salute San Raffaele, Milano, Italija

Laboratorijska medicina sastoji se od mnoštva različitih disciplina: Kliničke biokemije, Kliničke mikrobiologije, Kliničke molekularne laboratorijske biologije, Hematologije itd. Ove discipline imaju različitu kulturalnu osnovu, ali se u smislu praktičnog organiziranja kao pomoć medicinskim strukama mogu ujediniti u Odjel laboratorijske medicine. Puno je valjanih razloga za spajanje različitih disciplina u jedinstven odjel. Zapravo, Odjel laboratorijske medicine 1) poboljšava organizaciju službe za bolesnika (upravljanje službom za uzimanje uzoraka, priprema i dostavljanje laboratorijskih nalaza itd.); 2) olakšava kontakt s bolesnicima; 3) olakšava objedinjavanje različitih analiza za istoga bolesnika na znatno bolji način u vidu "medicinskih bioloških biljega"; 4) olakšava povezivanje između LIS (laboratorijski informacijski sustavi) i HIS (bolnički informacijski sustavi), te teži ka stvaranju HER (elektronski zdravstveni zapis). Sve to pak poboljšava kvalitetu usluge za bolesnika i snižava troškove. Promjena u scenariju zdravstvenih sustava širom svijeta pogoduje objedinjavanju različitih kliničko laboratorijskih disciplina u Odjel laboratorijske medicine. Pritom u obzir treba uzeti slijedeće: 1) troškovi tehnologije te potrebna visoko specifična

reporting and interpretation of results with on-line computer systems. They have to be adequate partners to clinicians in a multidisciplinary model of coordinated care. A well considered laboratory (re)organization, in which physicians and laboratorians are connected and brought together, increases the diagnostic value of the laboratory as a diagnostic center of excellence. With such a concept, the laboratorians will not only be successful managers of human, fiscal and operational resources but will also provide patient care diagnostic expertise in order to survive in a clinical and patient oriented environment that demands interdisciplinary knowledge of the great principles of physiology and pathophysiology as well as readiness to accept the responsibility for the decisions made, resulting from such active interactions.

E-mail: mathias.mueller@wienkav.at

S0-2

Integration and consolidation of lab specialties – linking lab to the wards and territory

Bonini Pierangelo

Laboratorio S.p.A. Università Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy

Laboratory Medicine is composed of many different disciplines: Clinical Biochemistry, Clinical Microbiology, Clinical Molecular Biology Laboratory, Hematology, etc. These disciplines have a different cultural background but, from the practical organization of medical assistance, they can be unified in a Department of Laboratory Medicine. There are many good reasons for connecting the various discipline into a unique department. In fact, a Department of Laboratory Medicine 1) improves organization of the service for the patient (management of the blood sampling service, preparation and delivery of lab reports etc.); 2) facilitates contacts with patients; 3) facilitates integration of various analytes in a single patient into a more elaborated concept of "medical biomarkers"; 4) facilitates connection between the LIS (Laboratory Information Systems) and HIS (Hospital Information Systems) and trend towards the creation of HER (Electronic Health Record). All these points result in improvement of the quality of service for patient and reduction of costs. The change of the scenario in health care systems all over the world adds something more in favor of the integration of various clinical laboratory disciplines into a Department

specijalistička znanja u novim područjima laboratorijske medicine (npr. molekularna biologija) postaju preprekom za manje laboratorije i širom svijeta dovode do promjena u organizaciji laboratorija, od stapanja manjih laboratorija do pretvaranja manjih laboratorija u centre za uzimanje krvi koji te uzorke šalju na obradu u veće laboratorije (laboratorijska služba). Cilj ove nove organizacije laboratorija je s jedne strane potreba za dostupnosti usluge što bliže mjestu stanovanja ili rada bolesnika, a s druge strane iskorištavanje prednosti što ih pružaju sofisticirane i skupe tehnologije i znanja koja su financijski nedostupna manjim laboratorijima; 2) velik napredak u nekim područjima biomedicinskih znanosti (poglavito poznavanje genetičke osnove mnogih bolesti te mogućnost zaustavljanja ili odgađanja nastupa bolesti kroz odgovarajuće promjene načina života i prehrambenih navika) otvaraju vrata novoj razdoblju prediktivne/preventivne medicine gdje će, kako se očekuje, laboratorijska medicina imati važnu ulogu. Napredak u farmakogenomici drugi je važan vid personalizirane medicinske pomoći. Kako bi laboratorijska medicina preživjela ove velike promjene i uspješno se suočila s izazovima budućnosti potrebne su znatne promjene u njezinu ustroju, uza stvaranje mreže kliničkih laboratorija organiziranih u odjele, dobro povezane s istraživačkim institutima, koja će isto tako biti sposobna iskoristiti prednosti što ih donosi napredak u informacijskoj tehnologiji i digitalna revolucija. Opisuje se iskustvo bolnice San Raffaele u ovom području.

E-mail: bonini.pierangelo@hsr.it

S0-3

Trajna izobrazba: zalag za budućnost struke

Blaton Victor

KU-Leuven, Department of Clinical Chemistry, Brugge, Belgija

Kad se govori o kvaliteti u kliničkoj i laboratorijskoj medicini, težište se obično stavlja na analitički proces. Međutim, dobra stručna kvaliteta započinje najboljom izobrazbom. U pokušaju opisa obrazovanja i usavršavanja u laboratorijskoj medicini u Europi i u staroj Europskoj Uniji zabilježene su velike razlike u načinu usavršavanja ovih stručnjaka. Taj pregled je pokazao kako manje od jedne trećine

of Laboratory Medicine. In this respect, the following points should be taken in consideration: 1) the costs of technology as well as the need of very deep specialist competences in the new areas of laboratory medicine (e.g., molecular biology) are becoming prohibitive for small laboratories and provoke, all over the world, various changes in the organization of laboratories ranging from consolidation of small laboratories to the transformation of small laboratories into blood sampling centers referring patient samples to be processed at a larger laboratory (lab service). The aim of this new organization of laboratories is the need to keep the service as close as possible to where the patients live and/or work on the one hand, and to take advantage of the sophisticated and expensive technologies/competences not affordable in a small lab on the other hand; 2) the great progress in some areas of biomedical sciences (mainly the knowledge of the genetic background of many diseases as well as the possibility of stopping or delaying the onset of a disease through an appropriate change in lifestyle/dietary habits) open the door for a new era of predictive/preventive medicine where laboratory medicine is expected to play a major role. The progress in pharmacogenomics is another important aspect of the personalization in medical assistance. For laboratory medicine to survive these major changes and to successfully face the challenges of the future, major structural changes are needed with creation of a network of clinical laboratories, organized in departments, well linked to research institutes and able to take advantage also from the progress in information technology and digital revolution. The experience of the San Raffaele in this area will be reported.

E-mail: bonini.pierangelo@hsr.it

S0-3

Continuing Education; A pledge of the Profession Future

Blaton Victor

KU-Leuven, Department of Clinical Chemistry, Brugge, Belgium

When quality is referred to in clinical and laboratory medicine, the focus is mainly on the analytical process. However good professional quality starts with the best education.

In an attempt to describe the training and education aspects of Laboratory medicine in Europe and in the old European Union, it was noticed that large differences ex-

zemalja članica i ustanova članica FESCC/IFCC poklanja dužnu pozornost obrazovanju ili ga nudi. Ishod nije donio ujednačene uvjete, jer svaka zemlja regulira zdravstvo na svoj način, ovisno o svom vlastitom povijesnom razvoju, potrebama, društvenim pogledima i financijskim mogućnostima. Iz svih tih preglednih istraživanja izveli smo neke zaključke. Potrebno je propisno fakultetsko obrazovanje prije pristupanja izobrazbi za određeno zvanje, te se čini neophodnim postojanje regulirane izobrazbe u zvanju. Programi izobrazbe zahtijevaju zlatni standard koji će služiti kao vodilja za izobrazbu za dotično zvanje; uključena bi trebala biti i izobrazba iz upravljanja, dok bi ispiti mogli pomoći u poboljšanju kvalitete tog obrazovanja. Trajna izobrazba danas predstavlja pravi izazov i glavni zadatak u našoj struci. Koji su ciljevi naše trajne izobrazbe? Prvenstvena namjera je učiniti laboratorijskog stručnjaka još stručnijim na postojećem radnom mjestu; to je istodobno proces zamišljen kao pomoć laboratorijskim stručnjacima da se prilagođavaju promjenama i u njima sudjeluju. Europa ima dugu tradiciju i povijest obrazovanja, fakulteta, visokih škola i sveučilišta, kroz stoljeća, a znanost i biokemija također se diče najdužom tradicijom. FESCC se ovim tradicijama služi za podučavanje u struci kroz ljetne škole i tečajeve. FESCC je isto tako kao cilj postavio prikupljanje i širenje smjernica i modela za poslijediplomsko obrazovanje i akreditaciju. Uz to, cilj je okupiti medicinsko i znanstveno poslijediplomsko obrazovanje laboratorijskih specijalista u suradnji s UEMS. Tješnji kontakt među nacionalnim društvima rezultirao je usporedivim programima za poslijediplomsko obrazovanje te vrlo sličnim sadržajem i praktičnim radom u struci. Tijekom posljednjih deset godina provedene su mnoge aktivnosti na području sustava kvalitete medicinskih laboratorija, uz potporu nadolazećeg međunarodnog standarda ISO pod naslovom Upravljanje kvalitetom za medicinski laboratorij. ISO 15189 je dokument od velike važnosti za kvalitetan razvoj sustava kvalitete i akreditacije medicinskih/kliničkih laboratorija. FESCC organizira trajne Poslijediplomske tečajeve iz kliničke kemije, poglavito u IU Centru u Dubrovniku. FESCC je zaokupljen harmonizacijom naše struke u Europi u skladu sa SZO, osobito u području izobrazbe, usavršavanja i akreditacije, što će omogućiti fleksibilnost unutar Europe. Harmonizacija izobrazbe u Europi je težak zadatak; lakše će biti postići ujednačenost izobrazbe. Standardni nastavni plan treba postati minimalnim zahtjevom za lokalnu primjenu. Poslijediplomska izobrazba u laboratorijskoj medicini treba biti opća uz naknadno subspecijalističko usavršavanje. Naša struka je multidisciplinske naravi i mi moramo okupljati medicinske stručnjake i znanstvenike te jedni i drugi trebaju proći zajedničku izobrazbu. IFCC i FESCC trebaju zajednički raditi na standardiziranim smjernicama za izobrazbu. Budući skupovi koji će se baviti ne-

isted in the way professionals are being trained. A survey showed that less than one third of the different Member Societies and corporate members of FESCC/IFCC paid real attention to, or offered education. The outcome did not give a uniform pattern, since every country regulates health care in its own way, according to its own historical development, needs, social vision and their own financial possibilities. From all surveys we have been drawn a number of conclusions. Proper university training is required before entering vocational training and regulated vocational training seems to be necessary. The training programmed needs a golden standard indicative guide to the vocational training, management training should be included and examinations may help in improving the quality of the education.

Continuous education is now a days a real challenge and a main task in our profession. What are the goals of our continuous education? The primary purpose is to make laboratory professional more competent in their existing employment, it is at the same time a process designed to assist laboratory professionals to adapt to and to take part in changes. Europe has a long tradition and history in educations, schools, colleges and universities for centuries and also science and biochemistry have longest traditions. FESCC (The Forum of the European Societies in Clinical Chemistry) is using these traditions to teach the profession in summer schools and courses.

The aim of FESCC is also to collect and to disseminate guidelines and models for postgraduate training and accreditation. The goal is also to get together the medical and scientific postgraduate training of laboratory specialist in co-operation with UEMS. Closer contacts between the national societies have resulted in comparable programs for postgraduate training and close similarity of contents and practice of the profession. During the last ten years many activities have taken place in the field of quality systems of medical laboratories and supported the forthcoming international ISO standard. "Quality management for the medical laboratory". ISO 15189 is a document of great importance for the development of quality of quality systems and accreditation of medical/clinical laboratories.

FESCC organize continuous Postgraduate courses in clinical chemistry especially in the IU-centre of Dubrovnik. FESCC is occupied with the harmonization of our profession in Europe in accordance with WHO, especially in education, training and accreditation enabling flexibility within Europe.

Harmonization of education in Europe is difficult; equivalence of training may be more achievable. A standard syllabus should be a minimum requirement for local use. Post graduate training in laboratory medicine should be general with sub-specialty training later on. Our profession has a multidisciplinary aspect and we need medi-

riješenim pitanjima i osigurati plodne rasprave trebali bi dovesti do novih inicijativa za budućnost.

E-mail: victor.blaton@skynet.be

S0-4

Simpozij s razlogom

Topić Elizabeta

Klinički zavod za kemiju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Svako razdoblje razvoja medicinske biokemije i profesije u pojedinoj zemlji obilježavaju nove spoznaje, napredak znanosti i struke, ali i osobe. Jedno od drugog je često nemoguće odvojiti. Ovaj je simpozij organiziran u povodu 40 godina znanstvenog rada jednoga od zaslužnih članova Hrvatskoga društva medicinskih biokemičara, no umjesto o osobi u ovom prilogu simpoziju biti će više riječi o razvoju znanstvene podloge medicinske biokemije i njenom razvoju u Hrvatskoj tijekom tog razdoblja. Razvoj biomedicinske znanosti je neprijeporno u tom razdoblju pokazao eksponencijalni rast u nizu područja važnih za medicinsku praksu. Kronične nezarazne bolesti: dijabetes, bolesti srca i krvnih žila, cerebrovaskularne bolesti, rijetke nasljedne bolesti, okolišnim čimbenicima uzrokovane bolesti uz maligne su tijekom svih proteklih 40 godina bile izazov znanstvenicima u traganju za etiološkim čimbenicima, pronalascima dijagnostičkih metoda za njihovo rano prepoznavanje ili prepoznavanje rizičnih čimbenika koji do njih dovode, kao i ustrajnom traženju novih metoda liječenja. Ako je dijabetes već sredinom šezdesetih godina prošloga stoljeća prepoznat kao javnozdravstveni problem u Hrvatskoj, to se s pravom može pripisati iznimnom timu stručnjaka i znanstvenika na čelu s profesorom Zdenkom Škrabalom, u kojem se njeguje multidisciplinarnost i zato je razumljivo da se medicinska biokemija i stručnjak iz toga područja u takovom timu razvija do prepoznatog znanstvenika u slijedećih 15 godina. Dr. Ana Stavljenić-Rukavina je svojim znanstvenim radom u tom prestižnom timu razvijala nove metode za otkrivanje dijabetesa i komplikacija te bolesti, koje su prepoznate u međunarodnim razmjerima. Sudjelovanjem u European Group for the Study of Diabetes Epidemiology Svjetske zdravstvene organizacije i međunarodnim projektima poput Multinational Study of Vascular Complications in Diabetes, opet u multidisciplinarnom timu Zavoda za dijabetes "Vuk Vrhovac", uza znanstveni iskorak učinila je medicinsku biokemiju nezaobilaznom u razvoju dijabetologije. Metabolički

cals and scientist together and both medical and science graduates should have a common training IFCC and FESCC have to work together on standardized guidelines on education. There will be further meetings to address unsolved questions and fruitful discussions should lead to new initiatives for the future.

E-mail: victor.blaton@skynet.be

S0-4

A symposium with a reason

Topić Elizabeta

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Every period in the development of medical biochemistry and profession in a particular country is characterized by new concepts, advancement in the science and profession as well as by some outstanding personalities. It is frequently quite difficult to consider them in separate. The present symposium has been organized to celebrate 40 years of the professional work of one of the deserving members of the Croatian Society of Medical Biochemists, however, this contribution is focused on the development of the scientific background of medical biochemistry and its development in Croatia during the respective period of time. In this period, biomedical sciences definitely showed exponential growth in a number of areas highly relevant for medical practice. Besides malignant diseases, chronic noncommunicable diseases, i.e. diabetes, cardiovascular diseases, cerebrovascular diseases, some rare hereditary diseases and diseases caused by environmental factors have posed a challenge to scientists throughout the 40-year period, in terms of searching for etiologic factors, development of diagnostic methods for their early detection or for identification of the causative risk factors, and persistent search for novel methods of treatment. The fact that diabetes was recognized as a public health problem in Croatia as early as in mid-1960s can definitely be attributed to the extraordinary team of professionals and scientists fostering multidisciplinary work, headed by Professor Zdenko Škrabalo. Thus, it is quite understandable that medical biochemistry and the respective professional had developed within such a team into a renowned scientist in the next 15 years. Dr. Ana Stavljenić-Rukavina's scientific work in this prestigious team was focused on the development of novel methods for the detection of diabetes and its complications, which have been duly recognized at the international level. With her active participation in the work of the European Group for the Study of Diabetes Epidemiology of the World Health Organization and through international projects such as Multinational Study of Vascular Complications in

sindrom u tom razdoblju nije bio poseban klinički entitet, ali u većini radova iz toga razdoblja može se zaključiti kako je bio prepoznat, premda se nazivao komplikacijom dijabetesa (hiperlipidemija, adipozitet, kardiovaskularne komplikacije). Tijekom svih 40 godina znanstvenoga rada dr. Ana Stavljenić-Rukavina bavi se epidemiologijom i etiološkim čimbenicima tih stanja primjenjujući najsuvremenije metode u datom razdoblju, od biokemijskih do molekularno bioloških i genetičkih, a niz znanstvenih projekata ima za rezultat vrijedne radove u svjetskoj bibliografiji. Vrijedi zabilježiti otkriće nove mutacije na genu za LDL receptor (mutacija Zagreb). Punih se 25 godina znanstvenoga rada u KBC i Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sustavno provode projekti kojima je kao i danas u središtu znanstvenog interesa traganje za utvrđivanjem rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti kao jednog od značajnih javnozdravstvenih problema u globalnom smislu. Poznato je da znanstvenici ne poznaju granice u istraživanju i kadgod je moguće tragaju u širim okvirima za spoznajama koje mogu unaprijediti njihovo uže područje interesa. Tako i Ana Stavljenić-Rukavina uz metabolizam lipida, ugljikohidrata u području dijabetologije i kardiologije ulazi u područje metaboličkih bolesti i nasljednih bolesti općenito, kako zbog istih ili sličnih metoda istraživanja, tako i zbog međusobne povezanosti poremećaja metabolizma. A etiološki i okolišni čimbenici razvoja nekih kliničkih entiteta poput endemske nefropatije su dodatni izazov znanstveniku sa širim pogledom na nerazjašnjene bolesti poput ove. Za razvoj biomedicinskih znanosti je zaslužna u velikom dijelu suvremena tehnologija. U svakom od razdoblja iz radova je vidljivo da je primijenjena tehnologija i metode u projektima Ane Stavljenić-Rukavina u suglasju s onima najsuvremenijim u svjetskim razmjerima, pa je upravo zbog toga bilo moguće da izvrsno opremljeni laboratorij u kojem su mnoge tehnike bile primijenjene prije nego u drugim znanstvenim institutima iskoristi iste za razvoj drugih područja biomedicinskih znanosti (protočna citometrija, plinsko masena spektrometrija, molekularna dijagnostika). Konačna bilanca ovih 40 godina znanstvenog rada su 22 znanstvena projekta, 320 znanstvenih radova od kojih 117 u časopisima koji se citiraju u CC ili drugim časopisima namijenjenih indeksaciji. Više stotina citata navedenih radova, brojna predavanja na svjetskim i domaćim kongresima sigurno nisu potpuni iskaz, no iznad svega stoji činjenica o doprinosu Ane Stavljenić-Rukavina prepoznatljivosti naše biomedicinske znanosti u svjetskim okvirima.

E-mail: elizabeta.topic@zg.htnet.hr

Diabetes, again in the multidisciplinary team from the Vuk Vrhovac Institute of Diabetes, along with her scientific breakthrough, she has made medical biochemistry an imperative in the development of diabetology. At that time, metabolic syndrome had not yet been established as a specific clinical entity, however, the majority of the then studies suggest that it was recognized but was referred to as complications of diabetes (hyperlipidemia, adiposity, cardiovascular complications). Throughout her 40-year scientific work, Dr. Ana Stavljenić-Rukavina was dealing with the epidemiology and etiologic factors of these conditions, using the latest methods at a particular time, from biochemistry through molecular biology and genetics, while a number of her scientific projects have resulted in valuable contributions to the international bibliography. The discovery of new mutations on the LDL receptor gene (Zagreb mutation) should be noted. During her 25-year scientific work at Zagreb University Hospital Center, projects focused on the risk identification for the development of cardiovascular diseases as one of the major public health problems worldwide, still of utmost scientific interest to the present, were systematically conducted. Scientists are known to disregard any borders in their research and to search for the concepts that may promote their close field of interest across a broad scope of activities. So, besides the lipid and carbohydrate metabolism in the fields of diabetology and cardiology, Ana Stavljenić-Rukavina tackled the field of metabolic diseases and hereditary diseases in general, both for the identical or similar methods of research and for the interrelationship among metabolic disorders. The etiologic and environmental factors for the development of some clinical entities such as endemic nephropathy pose an additional challenge to the scientist considering some as yet obscure diseases like this one. The development of modern biomedical sciences is greatly based on the current technological advancements. All her papers from any period reveal that the technology and methods used in her projects were consistent with the latest achievements at the time in the world. It was the basis for the excellently equipped laboratory, where many techniques were applied earlier than at some other scientific institutes, to be employed for the development of other fields of biomedical sciences (flow cytometry, gas mass spectrometry, molecular diagnosis). The 40 years of the scientific work of Dr. Ana Stavljenić-Rukavina have resulted in 22 scientific projects and 320 scientific papers, 117 of them in CC journals and other indexed periodicals. Hundreds of these papers citations, numerous lectures held at international and Croatian congresses certainly cannot fully reflect her scientific merits, however, the contribution made by Ana Stavljenić-Rukavina to the visibility of the Croatian biomedical science at the international level is a self-evident fact.

E-mail: elizabeta.topic@zg.htnet.hr

S1 – Harmonizacija u laboratorijskoj medicini, S1-1**Značenje međunarodnog razumijevanja konceptata i širom svijeta prihvaćenog nazivlja u kemijskom mjeriteljstvu**

De Bievre Paul

Neovisni savjetnik za kemijsko mjeriteljstvo, Kasterlee, Belgija

Opis rezultata kemijskih mjerenja mora sadržavati nedvosmislene i dosljedne koncepte i pojmove kao što su mjerna veličina, metrološka sljedljivost, mjerna nesigurnost, usporedivost rezultata mjerenja, nesigurnost ciljnog mjerenja itd., kako bi se omogućila valjana usporedba rezultata mjerenja. Tome još nije tako, što su tijekom proteklog desetljeća pokazale brojne radionice širom svijeta, a kemijska literatura na to stalno ukazuje. Koncepti i pojmovi su bitni kako bi međunarodna trgovina ljudskom i životinjskom hranom bila poštena, prekogranična primjena ekoloških propisa jednaka za sve uključene strane, razmjena rezultata kliničkih mjerenja postala stvarnost, a prekogranično tumačenje mjernih rezultata bilo moguće, ispravno shvaćeno i uzajamno prihvaćeno. Slično tome, njihov prijevod s jednog jezika, engleskog, na 30-40 drugih jezika treba provesti i nedvosmisleno utvrditi. Zemlje u kojima je engleski u redovnoj uporabi nisu još u potpunosti shvatile kako imaju znatnu prednost pred zemljama gdje takvi prevedeni pojmovi koji opisuju koncepte još možda nisu dostupni, a kamoli shvaćeni i prihvaćeni. Ove su zemlje stoga u znatno nepovoljnijem položaju u svim slučajevima gdje su uključena kemijska mjerenja. Opisuju se neke nejasnoće u definicijama i pojmovima, koje ukazuju na važnost revizije Međunarodnog rječnika osnovnih i općih pojmova u mjeriteljstvu (VIM), koja je u tijeku (1997.-2006.), osobito stoga što će kemijsko mjerenje prvi put u povijesti biti uključeno u VIM:

- 'mjerna veličina', 'mjerna jedinica' i 'mjerna ljestvica'
- 'rezultat mjerenja', 'metrološka usporedivost'
- 'metrološka sljedljivost'
- (uklj. 'do SI'),
- 'mjerna nesigurnost', 'ciljna mjerna nesigurnost'

Zaključuje se kako je sadašnja revizija VIM od velike važnosti za ispravno razumijevanje unutar i između mjernih zajednica širom svijeta.

E-mail: paul.de.bievre@skynet.be

S1 – Harmonization in laboratory medicine, S1-1**Meeting the need of intercontinentally understood concepts and associated intercontinentally agreed terms for Metrology in Chemistry (MiC)**

De Bievre Paul

Independent Consultant on Metrology in Chemistry (MiC), Ex-Adviser to the Director IRMM BE-2460 GEEL

Unambiguous and consistent concepts and terms such as measurand, metrological traceability, measurement uncertainty, comparability of measurement results, target measurement uncertainty, etc. must govern the description of results of chemical measurements in order to enable a valid comparison of measurement results. That is not yet the case as numerous workshops over the last decade have shown worldwide and as chemical literature continuously displays. For international trade in food and feed to be fair, for border-crossing implementation of environmental regulations to be the same for all parties concerned, for interchangeability of results of clinical measurements to become a reality, for any border-crossing interpretation of measurement results in chemistry to become possible, well understood and mutually accepted, concepts and terms are essential. Similarly, their translations from one language, English, to 30-40 other languages must be realized and fixed unequivocally. Countries using English as common language have not yet fully realized that they are at a considerable advantage over countries where such translated terms describing concepts may not yet be available, let alone understood and accepted. These countries are therefore at a considerable disadvantage in all cases where chemical measurements are involved. A number of ambiguities in the definitions and terms are described, which illustrate the importance of the ongoing revision (1997-2006) of the International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM), especially since chemical measurement will enter the VIM for the first time in history:

- 'measurand', 'measurement unit' and 'measurement scale'
- 'measurement result' 'metrological comparability'
- 'metrological traceability'
- (incl 'to the SI'),
- 'measurement uncertainty', 'target measurement uncertainty'

It is concluded that the ongoing revision of the VIM is of primordial importance for good understanding within and between the measurement communities worldwide.

E-mail: paul.de.bievre@skynet.be

S1-2

Harmonizacija medicinsko biokemijskih pretraga u Hrvatskoj

Čvorišćec Dubravka

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Osiguranje točnosti i usporedivosti rezultata laboratorijskih pretraga preduvjet je za definiranje jedinstvenih referentnih intervala ili granica odluke i njihovu primjenu na različitim lokacijama ili u različitom vremenu. Ostvarenje usporedivosti rezultata laboratorijskih pretraga omogućilo bi sveopću primjenu kliničkih smjernica temeljenih na dokazima te bi značajno doprinjelo poboljšanju kvalitete zdravstvene skrbi. Loša usporedivost rezultata laboratorijskih pretraga nastaje zbog razlika u analitičkim metodama i njihovim aplikacijama na različite instrumente ili zbog razlika u kalibracijskim postupcima i kalibratorima. Osobito se to odnosi na analite koji su heterogeni u humanim uzorcima i koji se obično mjere nekom od imunokemijskih tehnika. Posljednjih su godina pokrenuti mnogi nacionalni i međunarodni projekti standardizacije i harmonizacije rezultata laboratorijskih pretraga. Najveći utjecaj na to imalo je donošenje Europske direktive za dijagnostička medicinska sredstva *in vitro* (IVD 98/79/EC) i međunarodnih norma ISO 17511 i ISO 18153 za njenu provedbu te slijedom toga prihvaćanje koncepta mjeriteljske sljedivosti u u laboratorijskoj medicini. Sljedljivost rezultata laboratorijskih pretraga prema međunarodno priznatim i prihvaćenim referentnim materijalima i mjernim postupcima smatra se ključnim elementom u osiguranju točnosti i usporedivosti rezultata laboratorijskih pretraga. HKMB je krajem 2003. godine pokrenula nacionalni projekt harmonizacije laboratorijskih pretraga iz područja medicinske biokemije, analitičke toksikologije i laboratorijske imunologije. U njegovoj provedbi sudjeluju predstavnici referentnih centara Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi za određena područja laboratorijske medicine i Radne skupine za izradu preporučenih metoda HKMB. Prvim dijelom projekta bile su obuhvaćene opće medicinsko-biokemijske pretrage.

U svrhu njihove harmonizacije preporučene su analitičke metode i ciljevi analitičke kontrole kao osnovni preduvjet za primjenu jedinstvenih referentnih intervala i preporučenih vrijednosti. Dokument "Harmonizacija laboratorijskih nalaza u području opće medicinske biokemije" objavljen je na www.hkmb.hr i u priručniku "Organizacija i upravljanje u medicinskom laboratoriju", Zagreb: Medicinska naklada i HKMB, 2004. U tijeku je drugi dio projek-

S1-2

Harmonization of medical biochemistry tests in Croatia

Čvorišćec Dubravka

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Assurance of accuracy and comparability of laboratory test results is a precondition for definition of common reference intervals or decision limits and their application at various sites or time. Implementation of comparability of laboratory test results would enable general application of evidence-based clinical guidelines and contribute substantially to the improved quality of healthcare. Poor comparability of laboratory test results is due to differences in analytical methods and their applications on various instruments, or to differences in calibration procedures and calibrators. This particularly refers to analytes that are heterogeneous in human samples and are usually measured by some immunochemistry technique. During the past several years, many national and international projects have been launched on standardization and harmonization of laboratory test results. This mostly occurred due to the issuance of the European Directive on *In Vitro* Diagnostic Medical Devices (IVD 98/79/EC) and international standards ISO 17511 and ISO 18153 regulating its implementation, and consequently the acceptance of the concept of measuring traceability in laboratory medicine. Traceability of laboratory test results is, according to the internationally recognized and accepted reference materials and measuring procedures, considered the key element in ensuring accuracy and comparability of laboratory test results. At the end of 2003, the Croatian Chamber of Medical Biochemists (CCMB) initiated a national project of harmonization of laboratory tests in the fields of medical biochemistry, analytical toxicology, and laboratory immunology. Representatives of reference centers of the Croatian Ministry of Health and Social Welfare participate in its implementation together with members of the CCMB Working Group for Elaboration of Recommended Methods. The first part of the project comprised general medical biochemistry tests. For the purpose of their harmonization, analytical methods and analytical control targets have been recommended as an essential prerequisite for the application of common reference intervals and recommended values. A document entitled *Harmonization of Laboratory Results in General Medical Biochemistry* has been published on www.hkmb.hr and in the manual *Organization and Management in*

ta kojim su obuhvaćene specijalističke i visokodiferentne pretrage.

E-mail: dcvor@kbc-zagreb.hr

S1-3

Mjeriteljska sljedljivost i mjerna nesigurnost – mjeriteljski pogled na rezultat

Gašljević Višnja

Hrvatsko mjeriteljsko društvo, Zagreb, Hrvatska

Mjeriteljstvo je znanost o mjerenjima te obuhvaća sva područja znanosti i tehnologija, pa tako i područje zdravlja ljudi. Suvremeno društvo pod pritiskom globalizacije traži točne, pouzdane, ali prije svega usporedive rezultate. Važan alat za dokazivanje usporedivosti je osiguravanje sljedljivosti rezultata, odnosno dokazano i kvantitativno povezivanje mjernih rezultata s SI jedinicom u kojoj je rezultat iskazan ili s međunarodno utvrđenom referencom. Posljednjih deset godina postignuti su značajni uspjesi na međunarodnom planu u uspostavi sljedljivosti na području mjeriteljstva u kemiji, uključujući mjerenja u kliničkoj kemiji. Napravljena je baza podataka pouzdanih referentnih materijala višeg reda te mjernih postupaka pod okriljem Dogovora o metru i sporazuma o međusobnom priznavanju (CIPM MRA), te popis potencijalnih referentnih laboratorija. Na nižim razinama točnosti temeljni je preduvjet osiguravanja sljedljivosti nabavka referentnih materijala dokazane sljedljivosti te s iskazom mjerne nesigurnosti. Mjerna nesigurnost drugo je temeljno svojstvo rezultata, a označava raspon vrijednosti unutar kojega se nalazi mjerena veličina. Međunarodne norme ISO/IEC 17025 i ISO 15189 zahtijevaju da laboratoriji procjenjuju mjerne nesigurnosti svojih rezultata. Procjena mjerne nesigurnosti zahtijeva detaljno poznavanje mjernoga procesa, uočavanje svih izvora pogrešaka te njihovo kvantificiranje. Podaci potrebni za procjenu dobivaju se iz mjera kontrole kvalitete rezultata (npr. kvantitativnih podataka za kratkoročnu i dugoročnu varijabilnost te sustavnu pogrešku), iz validacijskih podataka, kataloških podataka o opremi (npr. vaga, volumetrijska mjerila), iz certifikata (npr. nesigurnost kalibratora), ali i iz svih drugih izvora koji nam te informacije mogu dati. Laboratorij je odgovoran osigurati prikladnost mjerne nesigurnosti koju ostvaruje u svojim mjernim procesima. Prevelika mjerna nesigurnost dovodi u pitanje mogućnost donošenja ispravne odluke

Medical Laboratory, published by Medicinska naklada and CCMB, Zagreb, 2004. Currently, the second part of the project is under way, encompassing specialized and highly specialized laboratory tests.

E-mail: dcvor@kbc-zagreb.hr

S1-3

Metrological traceability and measurement uncertainty – metrological view of the result

Gašljević Višnja

Croatian Society of Metrology, Zagreb, Croatia

Metrology is a field of knowledge concerned with measurement, which covers all fields of science and technologies including the field of human health. The contemporary society, pressured by globalization, requires accurate and reliable but above all comparable results. An important tool to achieve comparability is ensurance of result traceability. It means proved and quantitative relating of the measurement results to either the respective SI unit in which the measurement result is given, or to the internationally defined reference. In the last ten years great success has been achieved at the international level in the establishment of traceability in the field of metrology in chemistry, including measurements in clinical chemistry. A database of the reliable reference material of a higher order and a database of the reference measurement procedures have been established under the auspices of the CIPM MRA (Mutual Recognition Agreement), along with a list of potential reference laboratories. At lower levels of accuracy, the basic prerequisite for providing traceability is procurement of the reference material on proved traceability and with the measurement uncertainty statement. Measurement uncertainty is the second basic property of results. It denotes the span of values which the measurand value falls within. The ISO/IEC 17025 and ISO 15189 international standards require from laboratories to evaluate the measurement uncertainties of their results. This means thorough knowledge of the measuring process, recognition of all error sources, and their quantification. Data required for the evaluation are received from the quality control results (e.g., quantitative data for short- and long-term variability and bias), validation data, catalog data on equipment (e.g., balance, volumetric apparatus), certificates (e.g., uncertainty of calibrator), and from all other sources of this type of information. Laboratory is supposed to ensure the

koja se temelji na tim rezultatima, npr. postavljanje točne dijagnoze ili procjene učinkovitosti liječenja. Mjerna nesigurnost znatno manja od očekivane može pak ukazivati na mogući problem učinkovitosti mjernoga procesa.

E-mail: visnja.gasljevic@hmd.htnet.hr

S1-4

Mjerna nesigurnost u EQA

Libeer Jean Claude

Scientific Institute of Public Health, Bruxelles, Belgija

U primjeni je nekoliko vrsta ciljnih vrijednosti, ovisno o tipu EQA: vrijednosti referentne metode (RMV), usuglašene vrijednosti za koje postoji opći konsenzus, usuglašene vrijednosti za koje postoji opći konsenzus ovisno o metodi, te konsenzus ekspertnih laboratorija.

1. RMV kao ciljna vrijednost ISO 17025 je standard za ispitne i kalibracijske laboratorije. Suprotno tome, ISO 15189 odnosi se samo na pretrage u medicinskim laboratorijima. Zahtjevi za referentne mjerne laboratorije u kliničko laboratorijskoj medicini navode se u standardu ISO 15195.

Točka 5.6 govori kako svaki izdani mjerni rezultat treba biti praćen izjavom o nesigurnosti koja je procijenjena i izražena prema GUM. Izvješće o potvrdi takvog materijala sadrži referentnu mjernu vrijednost, izjavu o sljedljivosti potvrđene vrijednosti i proširenoj nesigurnosti potvrđene vrijednosti, njezinu razinu vjerodostojnosti te primijenjeni čimbenik pokrivenog raspona.

2. Usuglašena vrijednost ekspertnih laboratorija kao ciljna vrijednost. Kako ekspertni laboratoriji ne izvještavaju o standardnim nesigurnostima i ne podliježu neovisnom vrednovanju (npr. od strane tijela za akreditaciju laboratorija), standardna nesigurnost pripisane vrijednosti procijeniti će se na isti način kao za usuglašenu vrijednost dobivenu od sudionika.

3. Usuglašena vrijednost dobivena od sudionika. Standard ISO 13528 (statističke metode za primjenu kod ispitivanja stručnosti usporedbom među laboratorijima) daje pristup za izračunavanje standardne nesigurnosti na osnovi grubog prosjeka rezultata što ih objave sudionici. Ograničenja ovoga pristupa su to što: a) stvarni konsenzus među sudionicima može izostati i b) konsenzus može biti pristran uslijed opće primjene

adequacy of measurement uncertainty which is carried out in their measuring processes. An excessive measurement uncertainty calls into question the possibility of making the right decision based on these results (it refers to making a precise diagnosis or estimating therapeutic efficacy). Measurement uncertainty which is considerably lower than expected might indicate a potential problem in the efficiency of the measuring process.

E-mail: visnja.gasljevic@hmd.htnet.hr

S1-4

Measurement uncertainty in EQA

Libeer Jean Claude

Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

Depending on the EQA scheme design, several types of target values are used: reference method values (RMV), overall consensus values, method dependent consensus values, and consensus of expert laboratories.

1. RMV as target value ISO 17025 is a standard for testing and calibration laboratories. On the contrary, ISO 15189 only addresses testing in medical laboratories. The requirements for reference measurement laboratories in clinical laboratory medicine are given in the ISO 15195 standard.

Clause 5.6 states that each reported measurement result shall be accompanied by an uncertainty statement estimated and expressed according to GUM. The report of certificate of such a material will contain the reference measurement value, a statement on the traceability of the certified value and the expanded uncertainty of the certified value, its level of confidence, and coverage factor used.

2. Consensus value of expert laboratories as target value
As expert laboratories normally do not report standard uncertainties and are not validated independently (e.g., by a laboratory accreditation body), the standard uncertainty of the assigned value shall be estimated in the same way as for the consensus value from participants.

3. Consensus value from participants
The ISO 13528 standard (statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons) gives an approach for the calculation of the standard uncertainty based on the robust average of the results reported by the participants. The limitations of this approach are that: (a) there may be no real consensus amongst participants; and (b) the consensus

krive metodologije i ta se pristranost neće odraziti na standardnu nesigurnost.

U EQA se granice prihvaćanja obično izražavaju kao SD ili kao utvrđene granice oko ciljne vrijednosti. Ako je nesigurnost mala (RMV, velika skupina sudionika), tada su praktične posljedice EQA male. Granice prihvaćanja neće se značajno promijeniti uzme li se u obzir nesigurnost ciljne vrijednosti. Međutim, u malim skupinama nesigurnost ciljne vrijednosti može biti važna i treba ju dodati granicama prihvaćanja. U buduću će biti važno da organizacije EQA pridaju pozornost mjernoj nesigurnosti i primijene ju kadgod se to pokaže znakovitim za njihov sustav.

E-mail: jean-claude.libeer@iph.fgov.be

may be biased by the general use of faulty methodology and this bias will not be reflected in the standard uncertainty.

Acceptance limits in EQA are usually expressed as SD or fixed limits around a target value. If the uncertainty is small (RMV, large group of participants), then the practical consequences in EQA are small. The acceptance limits will not change significantly if uncertainty of the target value is taken into account. However, in small groups, the uncertainty of the target value may be important and must be added to the acceptance limits. In the future, it will be important that EQA organizations pay attention to measurement uncertainty and apply them when relevant in their schemes.

E-mail: jean-claude.libeer@iph.fgov.be

S2 – Simpozij 2 – TROMBOCITI 2006, S2-1

Uloga trombocita u bolesti

Zupančić-Šalek Silva

Odjel za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Trombociti su mali fragmenti stanice koja ne sadrži jezgru i osnovna su sastavnica primarne hemostaze. Oni imaju važnu ulogu ne samo u stvaranju normalnog hemostatskog ugruška, nego i u stvaranju patološkog tromba, osobito unutar arterija gdje je područje visokog tlaka. Trombociti cirkuliraju pasivno unutar vaskulature koja je obložena endotelnim slojem. Početni korak pri ozljedi krvne žile i prekida endotelnog sloja je snažna interakcija trombocita na mjestu ozljede vaskulature ili subendotelnog područja putem specifičnih trombocitnih receptora. Nakon adhezije trombociti postaju aktivirani, mijenjaju oblik, luče sadržaj granula i agregiraju jedan na drugi pa tako stvaraju primarni hemostatski tromb, a pružaju i katalitičnu površinu za pojačanje zgrušavanja krvi. Cirkulirajući trombociti ispunjavaju mnoge kritične funkcije u održavanju hemostaze, i to adheziju na mjestu ozljede, aktivaciju koja olakšava odgovor na ozljedu, lučenje kemijskih medijatora hemostatskog odgovora, agregaciju putem vezanja fibrinogena. Trombociti imaju središnju ulogu u primarnoj, ali i u sekundarnoj hemostazi, jer pružaju fosfolipidnu površinu (kofaktor) na kojoj se odvija nekoliko ključnih koagulacijskih reakcija. Važnost trombocita u stvaranju dovoljne količine trombina i stvaranju tromba dokazna je u više modela, kao što su ispitivanja na bolesnicima s hemofilijom. Ispitivanja u kojima su se rabila antitrombocitna sredstva pokazala su kako stvaranje trombina varira izravno s funkcijom trombocita. U

S2 – Symposium 2 – PLATELETS 2006, S2-1

The role of platelets in disease

Zupančić-Šalek Silva

Department of Hematology, University Department of Medicine, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Platelets are small anucleated cell fragments, which are essential components of primary hemostasis. They play an important role not only in the formation of a normal hemostatic plug but also in the formation of a pathologic thrombus, particularly within arteries subjected to high shear stress. Platelets circulate passively as they traverse vascular tree lined by intact endothelial cells. As an initial step, following blood vessel injury and disruption of the endothelial layer, platelets avidly interact with altered vascular surfaces or exposed subendothelial matrix *via* specific platelet receptors. Following adhesion they become activated, change shape, secrete granule contents and aggregate to each other to form a primary hemostatic plug and to provide a catalytic surface to enhance blood coagulation. Circulating platelets fulfill many critical functions in the maintenance of hemostasis, including adhesion to the sites of vascular injury, activation that amplifies the response to injury, secretion of chemical mediators of the hemostatic response, and aggregation *via* fibrinogen binding. Platelets play a central role in primary as well as in secondary hemostasis by providing a phospholipid (cofactor) surface on which several key coagulation reactions can take place. The importance of platelets for adequate thrombin generation and clot formation has been well established in a variety of model systems, including studies in patients with hemophilia. Studies utilizing antiplatelet agents demonstrate that

bolesnika s hemofilijom modulirajući učinak trombocita na stvaranje trombina je veći što je niža razina faktora, pa tako razlike između pojedinaca u funkciji trombocita mogu imati modificirajuću ulogu u kliničkom fenotipu takovih bolesnika. Trombociti mogu biti nenormalni bilo kvantitativno (trombocitopenija ili trombocitoza) ili kvalitativno. Trombocitopenija može rezultirati povećanim krvarenjem, a može biti različitog uzroka. Najčešći uzrok je imunološki posredovan ili izazvan lijekovima, ili je pak rezultat poremećaja u koštanoj srži itd. Nasljedni polimorfizmi gena trombocitnih glikoproteina mogu promijeniti njihovu antigeničnost, reguliraju razinu njihove izraženosti i moduliraju njihove funkcijske značajke pa stoga imaju važan utjecaj na izgled trombocita. Novo područje ljudske genomike je otkrivanje polimorfizama trombocitnih glikoproteina kao rizika za arterijsku trombozu. Ima dokaza kako integrin beta 3PI A2 alela, GPIb Met 145 (VNTR A ili B) alela, a osobito integrin alfa 1 (807T) doprinose riziku od akutnog infarkta miokarda u mladih osoba i u dijabetičnoj retinopatiji. Još uvijek je potrebno klinički utvrditi je li rizik kumulativan ili sinergističan uključujući trombocitne rizike, uz već dokazane rizične koagulacijske proteine. Trombociti su također uključeni u proces upale, ali ne pasivno kao cilj upalnih medijatora oslobođenih iz leukocita, osobito faktora koji aktiviraju trombocite. Oni također imaju aktivnu ulogu u upali oslobađanjem trombocitnog faktora 4 (PF4), beta-tromboglobulina (bTG), trombocitnog faktora rasta (PDGF) i faktora koji oslobađa histamin (HRF), a koji su snažni amplifikatori aktivnosti bazofila, mastocita i neutrofila. Trombociti su uključeni u početno stvaranje ateroma, moduliranje različitih upalnih odgovora te doprinose endotelnoj disfunkciji uz svoju klasičnu ulogu u trombozi i koagulaciji.

E-mail: zvonko.salek@zg.htnet.hr

S2-2

Nasljedni poremećaji funkcije trombocita

Cattaneo Marco

Unita di Ematologia e Trombosi, Spedale San Paolo, Università di Milano, Milano, Italija

Nasljedni poremećaji funkcije trombocita obuhvaćaju nenormalnosti 1) trombocitnih receptora za adhezivne bjelančevine, 2) trombocitne receptore za topljive agoniste, 3) putove prijenosa signala i 4) prokoagulantne fosfolipide.

thrombin generation varies directly with platelet function. In hemophilia patients, the modulating effect of platelets on thrombin generation increases at lower factor levels, and interindividual differences in platelet function may play role in modifying the clinical phenotype in such patients. Platelets may be abnormal either quantitatively (thrombocytopenia or thrombocytosis) or qualitatively. Thrombocytopenia may result in increased bleeding but has many causes. The most frequent cause is immune mediated, or drug induced, as the result of bone marrow disorders, etc. Inherited polymorphisms within platelet membrane glycoprotein genes can alter their antigenicity, regulate their expression levels, and modulate their functional properties, and therefore they have a profound impact on the antigenic makeup of the platelets. The new area of human genomics is detection of platelet glycoprotein polymorphisms in the risk of arterial thrombosis. There is already substantial evidence that the integrin beta3 PIA2 allele, the GPIb Met145 (VNTR A or B) alleles and especially the integrin alfa2 allele 1 (807T) contribute to the risk of acute myocardial infarction or stroke in younger individuals and diabetic retinopathy. There is still the need of clinical risk assessment to evaluate the cumulative or synergistic effects of these platelet risk factors together with the defined coagulation protein risk factors. Platelets are also involved in inflammation but not with a passive role, as a target for inflammatory mediators released by leukocytes, in a particular platelet activating factor. They also have an active role in inflammation by the release of their own intracellular platelet factor 4 (PF4), beta-thromboglobulin (bTG), platelet-derived growth factor (PDGF) and histamine-releasing factor (HRF), which are potent amplifiers of basophil, mast cell and neutrophil activity. Platelets are involved in the initiation of atheroma, modulate various inflammation responses, and contribute to endothelial dysfunction in addition to their classic role in thrombosis and coagulation.

E-mail: zvonko.salek@zg.htnet.hr

S2-2

Inherited disorders of platelet function

Cattaneo Marco

Unita di Ematologia e Trombosi, Spedale San Paolo, Università di Milano, Milan, Italy

Inherited disorders of platelet function include abnormalities of 1) platelet receptors for adhesive proteins, 2) platelet receptors for soluble agonists, 3) signal transduction pathways, and 4) procoagulant phospholipids. Ab-

de. Nenormalnosti trombocitnih receptora za adhezivne bjelančevine uključuju nenormalnosti kompleksa GP Ib-V-IX (Bernard-Soulierov sindrom obilježen makrotrombocitopenijom i odsutnošću aglutinacije trombocita izazvanom ristocetinom, te trombocitni tip von Willebrandove bolesti, udruženih kako bi pojačali funkcijski fenotip trombocitnog GPIba, pojačanom sklonošću za vWF, što dovodi do vezanja najvećih vWF multimeri za mirujuće trombocite i njihovo uklanjanje iz cirkulacije) i Glanzmannovu trombasteniju uzrokovanu oštećenjima GPIIb/IIIa koju u aktiviranim trombocitima veže adhezivne glikoproteine koji premošćuju susjedne trombocite, osiguravajući agregaciju trombocita. Ostale, manje česte nenormalnosti uključuju nenormalnosti GP Ia/IIa ili GPVI, obje obilježene selektivnom poremetnjom odgovora trombocita na kolagen. Nenormalnosti trombocitnih receptora za topljive agoniste uključuju nenormalnosti receptora tromboksana A2 te nenormalnosti receptora P2Y12 za ADP. Ovo potonje stanje obilježeno je oštećenjem trombocitne funkcije koje sliči onomu uzrokovanom prototrombocitnim lijekom klopidogrelom. Nenormalnosti trombocitnih granula uključuju nenormalnosti delta granula (deficijencija delta zaliha), nenormalnosti alfa granula (sindrom sivih trombocita i Quebec trombocitni poremećaj) te deficijenciju zaliha alfa i delta granula. Pojam 'primarni nedostatak sekrecije' obuhvaća sve one nepotpuno definirane nenormalnosti lučenja trombocita koje nisu udružene s deficijencijama trombocitnih granula. Širenjem našega poznavanja patofiziologije trombocita ova će se heterogena skupina koja okuplja većinu bolesnika s prirođenim poremećajima trombocitne funkcije sve više smanjivati, jer će iz nje otpadati bolesnici s bolje utvrđenim biokemijskim nenormalnostima odgovornim za njihovo oštećenje trombocita. Nenormalnosti putova prijenosa signala obuhvaćaju nenormalnosti puta arahidonata/tromboksana A2, nenormalnosti stimulacijske G-protein alfa podjedinice i druga oštećenja koja još nisu tako dobro opisana. Scottov sindrom je rijetka bolest krvarenja udružena s održavanjem asimetrije lipidnog dvosloja u membranama krvnih stanica, uključujući trombocite, što dovodi do smanjenog stvaranja trombina. Teške ispade krvarenja treba liječiti transfuzijama trombocita, što se vidi kod bolesnika s BSS ili Glanzmannovom trombastenijom. Rekombinanti Faktor VIIa je dobra no prilično skupa alternativa transfuzijama trombocita kod refraktornih bolesnika. U svim drugim okolnostima treba primijeniti antifibrinolitičke kao što je traneksembična kiselina ili analog vazopresina, dez-mopresin.

E-mail: marco.cattaneo@unimi.it

normalities of the platelet receptors for adhesive proteins include abnormalities of the GP Ib-V-IX complex (Bernard-Soulier syndrome, characterized by macrothrombocytopenia and absence of platelet agglutination induced by ristocetin, and platelet-type von Willebrand's disease, associated to gain of function phenotype of the platelet GPIba, increased avidity for vWF, leading to the binding of the largest vWF multimers to resting platelets and their clearance from the circulation) and Glanzmann's thrombasthenia caused by defects of GPIIb/IIIa, which in activated platelets binds adhesive glycoproteins that bridge adjacent platelets, securing platelet aggregation. Other, less frequent abnormalities include abnormalities of GP Ia/IIa or GPVI, both characterized by selective impairment of platelet responses to collagen. Abnormalities of the platelet receptors for soluble agonists include abnormalities of thromboxane A2 receptor and abnormalities of the P2Y12 receptor for ADP. The last condition is characterized by a platelet function defect that resembles that caused by the antiplatelet agent clopidogrel. Abnormalities of platelet granules include abnormalities of delta-granules (delta-storage pool deficiency), abnormalities of alpha-granules (gray platelet syndrome and Quebec platelet disorder), and alpha- and delta- granules storage pool deficiency. The term 'primary secretion defect' indicates all those ill-defined abnormalities of platelet secretion not associated with platelet granule deficiencies. With the progression of our knowledge in the platelet pathophysiology, this heterogeneous group, which lumps together the majority of patients with congenital disorders of platelet function, will become progressively thinner, losing those patients with better defined biochemical abnormalities responsible for their platelet defect. Abnormalities of the signal-transduction pathways include abnormalities of the arachidonate/thromboxane A2 pathway, of the stimulatory G-protein alpha-subunit and other defects, less well characterized. The Scott syndrome is a rare bleeding disorder associated with maintenance of the asymmetry of the lipid bilayer in the membranes of blood cells, including platelets, leading to reduced thrombin generation. Platelet transfusions should be used in severe bleeding episodes, which may be seen in patients with BSS or Glanzmann thrombasthenia. Recombinant Factor VIIa is a good, albeit rather expensive alternative to platelet transfusions in refractory patients. Anti-fibrinolytic agents, such as tranexamic acid, or the vasopressin analog desmopressin should be used in all other circumstances.

E-mail: marco.cattaneo@unimi.it

S2-3

Testovi ispitivanja funkcije trombocita

Coen Herak Desiree

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Trombociti (Trc) sudjeluju u održavanje normalne hemostaze adhezijom na mjestu ozljede krvne žile lučenjem sadržaja iz granula, agregacijom i stvaranjem primarnoga hemostatskog ugruška. Za njeno održavanje je, uz normalan broj Trc, neophodna i njihova normalna funkcija. U prošlosti se ispitivanje funkcije Trc rabilo isključivo za mjerenje i praćenje sposobnosti Trc u adheziji i agregaciji. Vrijeme krvarenja kojim se mjeri adhezija Trc *in vivo* dugi je niz godina bio jedini test za ispitivanje funkcije Trc. Uvođenje optičke agregacije Trc 1962. godine uvelike je doprinjelo boljoj dijagnostici funkcije Trc i ta je metoda ubrzo postala "zlatni standard" kao i najčešća metoda koja se rabi za ispitivanje funkcije Trc dosad. Agregacija Trc omogućuje ispitivanje međudjelovanja između receptora i liganda neophodnih za održavanje hemostaze *in vivo* mjerenjem učinka agonista na aktivaciju Trc *in vitro* i međusobno povezivanje Trc. Unatoč tome, metoda ne može u potpunosti oponašati sve aspekte normalne funkcije Trc. Uporaba lumiagregometra je još više poboljšala ispitivanje funkcije Trc, jer uz mjerenje agregacije Trc omogućuje i istodobno praćenje lučenje sadržaja iz gustih granula. U nekoliko posljednjih godina razvijeno je nekoliko novih testnih sustava za ispitivanje funkcije Trc u punoj krvi kako bi što bolje *in vitro* imitali procese koji se događaju nakon ozljede krvne žile *in vivo*, a poglavito radi ispitivanja aktivacije Trc u fiziološkim uvjetima brzine protoka krvi u arterijama. To su: PFA 100, Impact Cone i Platelet Analyzer, sustav VerifyNow, Plateletworks, Hemostasis Analysis System, modifikacije tromboelastografije, kao i različiti testovi protočne citometrije. Tradicionalno se ispitivanje funkcije Trc najčešće rabilo za ispitivanje uzroka krvarenja. Kako Trc imaju značajnu ulogu u hemostazi i trombozi, sve je veće zanimanje za ispitivanje funkcije Trc radi praćenja učinka suvremene antiagregacijske terapije te mogućnost utvrđivanja hiperaktivnosti Trc kao mogućeg pretkazatelja sklonosti trombozi. Iako su danas dostupne različite laboratorijske metode, ne postoji niti jedan test kojim je moguće otkriti sve poremećaje funkcije Trc. Svaki od ovih testova mjeri različite aspekte funkcije Trc pa je stoga jedini mogući pristup uporaba kombinacije testova odgovarajućih za svaki pojedini slučaj.

E-mail: desireecoen@yahoo.com

S2-3

Platelet function tests

Coen Herak Desiree

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Both normal platelet number and function are essential for maintaining normal hemostasis through adhesion to the site of injury, secretion of granule contents, aggregation and participation in the primary hemostatic plug formation. In the past, platelet function tests were used to measure and monitor the platelet ability to adhere and aggregate. For many years, the bleeding time that enables measurement of platelet adhesion *in vivo* was the only available test of platelet function. The introduction of light transmission aggregation (LTA) in 1962 has greatly improved the ability to test platelet function accurately. It has become the "gold standard" and by far the most common method of assessing platelet function. Although platelet aggregation studies evaluate some important receptor-ligand interactions required for hemostasis *in vivo* by measuring the ability of the agonist to cause *in vitro* platelet activation and platelet-platelet binding, LTA does not mimic accurately all aspects of normal platelet function. The use of a lumiaggregometer has additionally improved platelet function testing since it offers the possibility to detect both platelet aggregation and dense granule secretion at the same time. In the last few years a number of new assay systems have been developed in an attempt to mimic or stimulate the processes that occur during vessel wall damage, particularly to study shear-induced platelet activation: PFA-100, Impact Cone and Platelet Analyzer, VerifyNow system, Plateletworks, Hemostasis Analysis System, modifications of thromboelastography technology (e.g., platelet mapping system) and various flow cytometric tests. The main use of platelet function tests has been traditionally to determine the cause of abnormal bleeding. However, as platelets play a key role in both hemostasis and thrombosis, it is becoming increasingly important to monitor the efficacy of modern antiplatelet therapy and to identify platelet hyperactivity as a possible predictor of thrombotic tendency. Nowadays, although multiple laboratory procedures can be used, there is no single test that can identify all potential defects of platelet function. Each of these tests measures different aspects of platelet function and the only possible approach is to use a combination of tests that are suitable for particular circumstances.

E-mail: desireecoen@yahoo.com

S2-4

Evaluacija trombocita protočnom citometrijom

Batinić Drago

Zavod za imunologiju, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Osobite biološke značajke i mnogobrojne funkcije trombocita čine te stanice zanimljivima, ali i vrlo složenima za istraživanje. Stoga analiza trombocita zahtijeva niz specifičnih testova koji trebaju biti standardizirani za svaku od sastavnica ili funkcija trombocita. Tijekom zadnja dva desetljeća protočna je citometrija postala jedno od najvažnijih analitičkih oruđa u istraživanjima trombocita. To je jedina tehnika koja omogućuje određivanje i kvantifikaciju različitih strukturnih i funkcijskih značajka trombocita, uključujući strukturne i specifične aktivacijske biljege, kao i interakciju trombocita s drugim tipovima stanicama. Protočna je citometrija stoga omogućila bolje razumijevanje patologije trombocita u različitim patološkim stanjima i bolestima. Postoje brojne studije o primjeni protočne citometrije trombocita u medicinskom laboratoriju, bilo kao uspostavljene ili kao potencijalne dijagnostičke metode. Najviše spominjani testovi u tom smislu uključuju slijedeće: a) dijagnostiku specifičnih poremećaja trombocita (kao što je urođeni manjak površinskih biljega i bolest nakupljanja); b) kvantifikaciju IgG vezanog za trombocite u cilju razlikovanja autoimune trombocitopenije od drugih stanja i za otkrivanje aloimunizacije; c) mjerenje aktivacije trombocita, uključujući određivanje aktiviranih trombocita u cirkulaciji, kao i određivanje hiper- i hiporeaktivnosti trombocita; d) praćenje učinka anti-trombocitnih spojeva; e) određivanje retikuliranih trombocita s ciljem praćenja trombopoeze; i f) primjenu u bankama krvi. Treba, međutim, istaknuti da unatoč svoje svestranosti, protočna citometrija trombocita (a osobito funkcijska procjena trombocita) još uvijek nije našla široku kliničku primjenu zbog poteškoća u optimizaciji i standardizaciji testova. U ovom trenutku pravi izazov predstavlja pretvorba čisto istraživačkih protočnocitometrijskih postupaka u praktične postupke koji bi u konačnici postali standardni laboratorijski testovi s klinički korisnom informacijom. Odnedavno dostupni komercijalni kitovi za protočnocitometrijsku analizu trombocita s oznakom IVD (kao npr. test za praćenje specifičnih antagonista ADP-receptora i test za dijagnostiku kvantitativnih poremećaja trombocitnih glikoproteina) dobar su primjer tih nastojanja.

E-mail: drago.batinic@zg.t-com.hr

S2-4

Evaluation of platelets by flow cytometry

Batinić Drago

Department of Immunology, Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Distinctive biological features and manifold functions make the platelets very interesting cells but difficult to study. Therefore, the analysis of platelets requires a series of specific tests standardized for each of the platelet component and/or function. During the last two decades, flow cytometry has become one of the major analytical tools in platelet research. It is the only technique capable of detection and quantitative measurement of many different aspects of platelet structure and function, including structural and specific activation markers as well as interactions with other cells. Flow cytometry has also yielded a better understanding of platelet pathology in various pathologic conditions and diseases. There have been many studies dealing with the use of platelet flow cytometry, either as established or as contemplated (potential) applications in medical laboratory. The most cited assays include the following: (a) diagnosis of specific platelet disorders (such as inherited surface marker deficiencies and storage pool disease); (b) quantification of platelet-associated IgG in order to differentiate immune thrombocytopenia from other conditions, and for detection of alloimmunization; (c) measurement of platelet activation, including activated platelets in circulation and platelet hyper- or hyporeactivity; (d) monitoring of anti-platelet agents; (e) detection of reticulated platelets for thrombopoiesis monitoring; and (f) blood bank applications. In spite of its versatility, platelet flow cytometry (especially evaluation of platelet function) has not found widespread clinical application due to difficulties in optimization and standardization of the assays. The current challenge is to translate purely research flow cytometry assays into more practical procedures that will ultimately become standard laboratory tests with clinically useful information. Recent commercially available flow cytometry kits with IVD mark (such as the test for monitoring of specific platelet ADP receptor antagonists and the test for diagnosis of quantitative platelet glycoprotein abnormalities) are good examples of these endeavors.

E-mail: drago.batinic@zg.t-com.hr

S3 – Simpozij 3 – LABORATORIJSKA MEDICINA ZASNOVANA NA DOKAZIMA, S3-1

Laboratorijska medicina zasnovana na dokazima: poboljšanje ishoda

Price Chris

Gost-Profesor iz Kliničke biokemije, University of Oxford, Oxford, UK

Poput medicine zasnovane na dokazima (EBM), laboratorijska medicina zasnovana na dokazima (EBLM) može se promatrati kao formalniji pristup laboratorijskim vidovima kliničke prakse. Rečeno je kako je EBM "znanstveno sredstvo za poboljšanje kvalitete, čak i ako njegova primjena zahtijeva kombinaciju znanstvenih činjenica s vrijednosnim prosudbama i troškovima različitih vrsta liječenja". Naglašava se kako postoje zamke u smislu razlika u vrijednosnim prosudbama kad se strogo tumači provedeno kliničko istraživanje. Neki ukazuju na izazove što ih postavlja odmak od istraživanja prema provedbi. Također se ukazuje na to da će praksa zasnovana na dokazima potisnuti kliničku ekspertizu i primorati praktičare na pristup skrbi prema određenom protokolu. Govori se da bi se tako mogla izgubiti vještina potrebna za primjenu dostupnih dokaza u vidu pretrage ili zahvata u kontekstu okolnosti kod svakog pojedinog bolesnika. Nasuprot ovoj kritici stoji činjenica da se najbolja praksa može postići samo kroz razumijevanje snage i slabosti dokaza. Tako je poznat utjecaj EBM na primarnu skrb kroz razvoj smjernica i standarda kvalitete, kao i na odlučivanje o raspodjeli sredstava za intervencije, ali se isto tako pokazuje kako to ne mora uvijek biti važno, poglavito u vidu sukoba s kliničarom obvezom pružanja skrbi i u odnosu na bolesnikovu individualnost. Stoga treba postići ravnotežu između donošenja odluka na osnovi znanstvenih podataka i vrednovanja s jedne strane, te naglašene nesigurnosti i razlike u vrijednostima. Smatra se kako je utjecaj na kirurgiju bio pozitivan, ali se ukazuje na pretjerano oslanjanje na randomizirane kliničke pokuse i na ograničenja u generaliziranju dobivenih nalaza. Također se ukazuje na implikacije što ih primjena obaviještenih odluka na osnovi EBM ima u svezi s bolničkom upravom, a kao primjer se navode programi liječenja bolesti i kliničkog slijeda postupaka kakav se rabi u njemačkom zdravstvenom sustavu. Dok su neke od ovih napomena jednako primjenjive i na laboratorijsku medicinu, može se svakako kazati da su pitanja u EBLM ipak drukčija. Međutim, osnovni ciljevi poboljšane kvalitete podataka (dijagnostička točnost) i poboljšane uporabe podataka (poboljšani ishodi) ostaju isti. Jedna od glavnih prednosti prihvaćanja koncepta i kulture EBLM je to što pomiče usredotočenost laboratorijskog stručnjaka od znanosti i tehnologije pretrage prema uporabi rezultata

S3 – Symposium 3 – EVIDENCE BASED LABORATORY MEDICINE, S3-1

Evidence-Based Laboratory Medicine: delivering improved outcomes

Price Chris

Visiting Professor in Clinical Biochemistry, University of Oxford, Oxford, UK

Evidence-Based Laboratory Medicine (EBLM), like evidence-based medicine (EBM) can be seen as a more formal approach to the laboratory aspects of clinical practice. It has been said that EBM is "a scientific tool for quality improvement, even though its application requires the combination of scientific facts with value judgements and the costing of different treatments". It has pointed out that there are pitfalls in the variation of value judgements when interpreting rigorously conducted clinical research. Several people have pointed out the challenges of moving from research to implementation. It has also been suggested that evidence based practice will stifle clinical expertise and force practitioners into a protocol driven approach to care. It has been suggested that may take away the skill required to place the evidence available on the use of a test or procedure into the context of the individual patient's circumstance. The opposing view to this criticism is the fact that only through understanding of the strengths and weaknesses of the evidence will best practice be achieved. Thus whilst it has been recognised that EBM has had an impact in primary care through the development of guidelines and quality standards, as well as influencing the decision making on allocation of resources for interventions, it has also been suggested that it may not always be relevant, particularly with respect to conflict with the clinician's duty of care and respect for patient's individuality. Thus there is a balance to be achieved between science informed and value based decision making and stressing the merits of uncertainty and the value difference. There is a belief that the impact on surgery has been positive but suggest that there is an over-reliance on the randomised controlled trial, and the limitations of generalisability of findings. It is also noted that there are implications when using EBM informed decisions in relation to hospital management, an example being the disease management programmes and clinical pathways employed in the German health care system. Whilst some of these comments are equally applicable to laboratory medicine it can also be argued that the issues in EBLM may be somewhat different. However, the basic objectives of improved quality of data (diagnostic accuracy) and improved use of data (improved outcomes) remain the same. One of the key benefits to adopting the

pretrage. To pak u osnovi mijenja odnos između kupca i pružatelja laboratorijskih medicinskih usluga.

E-mail: Chris1price2@aol.com

S3-2

Racionalna dijagnostika u koagulaciji

Griesmacher Andrea

Central Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnosis,
University Hospital of Innsbruck, Innsbruck, Austrija

Hemofilija – U slučaju problema s krvarenjem bazične rutinske parametre kao što su aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (APTV), protrombinsko vrijeme (PV), fibrinogen i broj trombocita treba izvesti kao prvi korak, zajedno s temeljitom anamnezom. Aktivnost određenog pojedinačnog faktora treba mjeriti tek onda kad odgovarajući bazični parametar pokaže patološki rezultat. Ako je potrebno, valja utvrditi inhibirajuća protutijela. Sumnja li se na disfunkciju trombocita, tada funkciju trombocita treba ispitati primjenom kombinacije kolagena, epinefrina i ADP kao stimulansa. U hitnim slučajevima može se primijeniti rotacijska tromboelastografija koja omogućava analizu stvaranja ugrušaka (stvaranje fibrina) u stvarnom vremenu, kako bi se brzo dobio pregled bolesnikova stanja koagulacije.

Trombofilija – Probir na trombofiliju preporuča se u slučaju juvenilne tromboze (<45 god), ponavljajuće tromboze, obiteljske trombofilije i opetovanog gubitka fetusa. I dalje se raspravlja o tome je li takav probir koristan prije primjene oralnih kontraceptivnih sredstava. Uz rutinske parametre APTV, PV, fibrinogen i ATIII dijagnostika trombofilije treba obuhvatiti mjerenje aktivnosti FVIII, FIX, FXI i FXII, kao i određivanje razine homocisteina u krvi. Štoviše, treba motriti put proteina C pomoću odgovarajućih testova koji predstavljaju vrlo osjetljivo sredstvo za probir sustava proteina C. Rezistenciju APC, Prot C i Prot S treba mjeriti samo u pozitivnim uzorcima radi identificiranja i potvrde deficijencije. Na raspolaganju su dvije vrste testova za otkrivanje antifosfolipidnih protutijela: lupus antikoagulantni (LA) testovi, gdje se sposobnost plazme za *in vitro* inhibiciju stvaranja ugrušaka testira tzv. LA protutijelima: Dilute Russell vrijeme zmijskog otrova, vrijeme zgrušavanja kaolina, test tkivne inhibicije tromboplastina; i specifični ELISA za otkrivanje antifosfolipidnih protutije-

concepts and culture of EBLM is that it shifts the focus of the laboratory professional away from the science and technology of the test toward the utility of the test result. This in its turn fundamentally changes the relationship between the purchaser and the provider of laboratory medicine services.

E-mail: Chris1price2@aol.com

S3-2

Rational diagnosis in coagulation

Griesmacher Andrea

Central Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnosis,
University Hospital of Innsbruck, Innsbruck, Austria

Hemophilia – In case of bleeding problems, basic routine parameters such as activated partial thromboplastin time (aPTT), prothrombin time (PT), fibrinogen and platelet count have to be performed as the first step together with profound history. A particular single factor activity should only be measured when the corresponding basic parameter shows a pathological result. If necessary, inhibiting antibodies have to be identified. If platelet dysfunction is suspected, platelet function should be tested using combinations of collagen, epinephrine and ADP as a stimulant. In emergency cases, rotational thromboelastography allowing for real-time analysis of clot formation (fibrin formation) can be used to get a quick overview of the patient's coagulation situation.

Thrombophilia – Screening for thrombophilia is recommended in case of juvenile thrombosis (<45 a yrs), recurrent thrombosis, familial thrombophilia and recurrent fetal loss. Whether such a screening is useful before the use of oral contraceptives remains under discussion. Besides the routine parameters of aPTT, PT, fibrinogen and ATIII, the diagnosis of thrombophilia should include the measurement of FVIII, FIX, FXI and FXII activities as well as determination of homocysteine levels in the blood. Moreover, the protein C pathway should be screened using appropriate test kits, which are very sensitive tools for screening the protein C system. APC-resistance, Prot C and Prot S should only be measured in positive samples for identification and confirmation of the deficiency. Two types of tests are available for the detection of antiphospholipid antibodies: lupus anticoagulant (LA) tests, in which the capacity of plasma for *in vitro* inhibition of clot formation is tested by the so-called LA antibodies: Dilute Russell viper venom time, kaolin clotting time, tissue thromboplastin inhibition test; and specific ELISA

la. Za identificiranje antifosfolipidnih protutijela prednost treba dati specifičnom ELISA pred često prilično slabo definiranim antikoagulantnim testovima. Na raspolaganju su odgovarajući testovi ELISA za probir i identifikaciju. U osoba koje boluju od autoimunih bolesti bez tromboembolijskih ispada u anamnezi probir treba provesti samo na prisutnost antifosfolipidnih protutijela. Kako ova protutijela mogu utrošiti supstrat za faktore koagulacije, mogu tako dovesti do produženja testa, poglavito APTV. Stoga u slučaju neobjašnjivog produženja APTV treba u obzir uzeti antifosfolipidna protutijela. Ukratko, valja naglasiti kako se danas bolesti hiperkoagulabilnosti mogu ispravno dijagnosticirati odgovarajućim laboratorijskim pretragama u otprilike 80% osoba koje boluju od tromboembolije.

E-mail: Andrea.Griesmacher@TILAK.at

S3-3

Mjere dijagnostičke točnosti: značenje i primjenjivost u praksi

Šimundić Ana-Maria

Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Kvantitativni pokazatelji, tj. mjere dijagnostičke točnosti su dijagnostička osjetljivost i specifičnost, pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti, omjer vjerojatnosti (engl. *likelihood ratio*), površina ispod krivulje ROC (engl. *area under the curve*, AUC), Youdenov indeks i dijagnostički omjer izgleda (engl. *diagnostic odds ratio*, DOR). S obzirom na njihovo značenje i primjenjivost mogu se podijeliti u dvije skupine: mjere diskriminacije i mjere predikcije. Mjere diskriminacije daju uvid u sposobnost nekog dijagnostičkog postupka da razluči između dva stanja (osobe s bolešću i bez nje), dok mjere predikcije rabimo kako bismo utvrdili vjerojatnost da u neke osobe možemo postaviti/isključiti dijagnozu na temelju rezultata laboratorijskog postupka. Mjere dijagnostičke točnosti često se tumače kao fiksna obilježja nekog dijagnostičkog postupka, dobivena kao rezultat istraživanja i primjenjiva u svakodnevnoj praksi. No, čak i kad je dijagnostička točnost ispitana istraživanjem provedenim u skladu s postojećim preporukama (smjernice STARD), treba znati da kvantitativni pokazatelji dijagnostičke točnosti značajno variraju u ovisnosti o relevantnom kliničkom kontekstu. Mnogi su uzroci varijabilnosti rezultata analize dijagnostičke točnosti: način

to detect antiphospholipid antibodies. For identification of antiphospholipid antibodies specific ELISA should be preferentially used instead of the often rather poorly defined anticoagulant tests. Appropriate ELISA for screening and identification are available. Patients suffering from autoimmune diseases without thromboembolic events in their history should only be screened for the presence of antiphospholipid antibodies. Since these antibodies may consume the substrate for coagulation factors, they can lead to prolongation, especially of aPTT. Therefore, antiphospholipid antibodies should be taken into consideration in case of an unexplainable prolongation of aPTT. In summary, it should be stressed that currently, hypercoagulability disorders can be correctly diagnosed in approximately 80% of patients suffering from thromboembolism using appropriate laboratory tests.

E-mail: Andrea.Griesmacher@TILAK.at

S3-3

Measures of diagnostic accuracy: interpretation and transferability into practice

Šimundić Ana-Maria

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Quantitative measures of diagnostic accuracy are sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, likelihood ratio, area under the curve (AUC), Youden index and diagnostic odds ratio (DOR). Given their interpretation and applicability, the measures of diagnostic accuracy fall into two categories: measures of discrimination and measures of prediction. Measures of discrimination assess the power of the test to discriminate between individuals with and without target condition, while measures of prediction are used to estimate the probabilities of target condition (health/disease) in individuals who have a particular test result (negative/positive). Measures of diagnostic accuracy are often interpreted and thought of as fixed attributes of a certain diagnostic procedure, obtained through the diagnostic accuracy study and applicable in routine clinical practice. However, even when such studies are designed to meet all of the methodological criteria (STARD statement), it should be stated that the measures of diagnostic accuracy may significantly vary depending on the relevant clinical context. There are many sources of this variability: exclusion/inclusion criteria, test characteristics and threshold used, the ratio

postavljanja/isključivanja dijagnoze, značajke samog dijagnostičkog postupka, brožani odnos ispitivanih skupina (bolesnika i zdravih ispitanika) itd. Ovo predavanje daje pregled standardnih i nekih manje poznatih mjera dijagnostičke točnosti s naglaskom na njihovo tumačenje i primjenjivost u praksi.

E-mail: am.simundic@gmail.com

S3-4

Uvođenje EBLM u svakodnevni rad

Rogić Dunja

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

“U izobilju znanstvenih dokaza, praksa i dalje gladije” (1), citat je koji ponajbolje opisuje stvarno stanje praktične primjene saznanja i načela laboratorijske medicine temeljene na dokazima (engl. *evidence based laboratory medicine*, EBLM). Među svim granama medicine upravo laboratorijska medicina posebno je podložna svim raspoloživim pogreškama u smislu prevelike, premale ili sasvim neprimjerene primjene. Razlog tome je s jedne strane nedovoljna obaviještenost i izobrazba kliničara uz poslovično slabu komunikaciju s laboratorijem, a s druge strane nepostojanje bilo kakvih administrativnih ograničenja opsega i učestalosti traženja laboratorijskih pretraga. Smjernice koje predstavljaju krajnji domet EBLM rijetko se spontano primjenjuju u svakodnevnom radu. Kako uvesti načela medicine temeljene na dokazima ili, kraće, kako upotrebu laboratorija učiniti racionalnom? Nažalost, jednoznačan odgovor ne postoji, ali brojne studije ukazuju na različitu razinu učinkovitosti pojedinih intervencija. Najmanji utjecaj zabilježen je za predavanja, tečajeve i jednosmjernu pismenu prepisku na relaciji laboratorij-kliničko osoblje, a bez mehanizma kasnije provjere i rasprave o učinku. Bolji rezultati opaženi su kod višekratne osobne komunikacije i redovitih audita upotrebe laboratorija. Pritom značajnu ulogu ima javno iznošenje usporedbe broja traženih laboratorijskih pretraga među pojedinim kliničarima iste struke. Zanimljiva pojava, poznatija kao Hawthorneov učinak, nerijetko se javlja kod većine projekata koji pokušavaju promijeniti ponašanje kliničara prema traženju laboratorijskih pretraga – učinak projekta vidljiv je onoliko dugo koliko postoji svijest o postojanju projekta i mogućim posljedicama. Jedan od učinkovitijih pristupa problemu u tercijarnim ustanovama svakako bi bilo osnivanje povjerenstva za uporabu dijagnostičkih resursa, u koje se moraju jednako uključiti eminentni kliničari i laboratorij-

of individuals with/without target condition (health/disease), etc. This lecture reviews some standard and some less well known measures of diagnostic accuracy with special emphasis on their interpretation and applicability in routine practice.

E-mail: am.simundic@gmail.com

S3-4

Introducing EBLM to practice

Rogić Dunja

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

“Practice famine amidst the evidence glut” (1); this citation quite accurately describes the current state of affairs concerning the introduction of latest laboratory medicine research evidence into practice. Among medical specialties, laboratory medicine is particularly prone to all kinds of incorrect approaches such as overuse, underuse and misuse. The reasons for this situation are multifactorial, including insufficient clinicians’ education in laboratory medicine, the lack of proper communication between the ward and the laboratory as well as the lack of any administrative barriers linked to the extent and frequency of laboratory test utilization. Guidelines, the final fruit of evidence based medicine endeavors, seldom actually make a breakthrough into everyday life. So, what are the means of introducing EBLM into practice? There is no single answer to this question, but numerous studies have shown that various types of interventions tend to produce variable impact, meaning that some interventions are more effective than the others. The least effective seem to be courses, lectures and one-sided written communication which laboratory professionals send to wards, without any feedback or follow up. Better results have been recorded with regular personal communication and audits. Peer comparison among clinicians with similar case mix has also proven to be quite influential. An interesting phenomenon, known as Hawthorne’s effect, has been shown in many studies – the effect of intervention lasts only as long as the physicians are aware of the project going on, or in other words, that the test ordering is being monitored. One of promising approaches within hospitals and similar institutions would certainly be to establish a diagnostic resource utilization committee, which should consist of eminent physicians and laboratory professionals. Also, good results have been recorded when

ski stručnjaci. Također, povoljni rezultati dobivaju se unošenjem promjena na uputnicama – one pretrage koje se ne nalaze na uputnici i potrebno ih je tražiti ispisivanjem imena pretrage redovito se traže daleko rjeđe. Ako postoji sustav elektronskog naručivanja pretraga, mogućnosti uvođenja načela EBLM znatno se povećavaju, npr. ispisivanjem omjera vjerojatnosti (engl. *likelihood ratio*, LR) ili ograničavanjem mogućnosti učestalog traženja pojedinih pretraga. U zaključku, sve dosad provedene studije slažu se u jednom – ne postoji magična formula, ali upornim djelovanjem na razinama koje su se pokazale učinkovitim moguće je unijeti značajne promjene koje za sobom nose bolju kvalitetu zdravstvene skrbi i značajne uštede.

1. Glasziou P, Haynes B. *The paths from research to improved health outcomes*. *ACP Journal Club* 2005;142:8-10.

E-mail: dunjarogic@hotmail.com

S3-5

Pravni i etički problemi u laboratorijskoj medicini

Blecher Melvin

Law Offices of Dr. Melvin Blecher, and Georgetown University Medical Center, Washington, DC, SAD

Istraživači u medicini rutinski upotrebljavaju preostale uzorke tjelesnih tekućina i tkiva izvorno uzetih od bolesnika zbog medicinskih razloga. Zakonski problemi mogu nastati kada takvo istraživanje dovede do komercijalno vrijednih proizvoda i metoda, npr. vlasništvo nad uzorcima nakon što se oduzmu od bolesnika. Mogući su i drugi zakonski problemi, npr. trebaju li istraživači bolesniku odati takvu komercijalizaciju i moraju li s bolesnikom podijeliti moguću tako ostvareni profit. Biti će govora o iskustvu s takovim pitanjima u Sjedinjenim Državama. Bolesnikove "privatne" medicinske zapise uključujući rezultate kliničko laboratorijskih pretraga mogu dobiti osiguravajuća društva i poslodavci koji plaćaju stanovito zdravstveno osiguranje za svoje bolesnike, a to ide na štetu bolesnika. Police osiguranja i zaposlenje mogu se uskratiti onima čiji medicinski zapisi ukazuju na mogućnost budućeg pogoršanja zdravstvenog stanja. Američki zakoni kojima bi se spriječilo ovakvo zadiranje u privatnost uvelike su neučinkoviti.

E-mail: MBiplaw@comcast.net

changes were introduced in the request forms – the tests which were not offered on the form, and as such had to be hand written separately on the form, tended to be considerably less often requested. Electronic test requisition obviously offers more opportunities for introducing EBLM, such as writing LRs and post test probabilities or introducing barriers in the frequency of particular test ordering. In conclusion, all studies dealing with inappropriate laboratory use admit that there is no magic bullet, but by applying interventions that have proven to be most effective, changes can be introduced with beneficial effect on the quality of care and cost containment.

1. Glasziou P, Haynes B. *The paths from research to improved health outcomes*. *ACP Journal Club* 2005;142:8-10.

E-mail: dunjarogic@hotmail.com

S3-5

Legal and ethical issues in laboratory medicine

Blecher Melvin

Law Offices of Dr. Melvin Blecher, and Georgetown University Medical Center, Washington, DC, USA

Medical researchers routinely use left-over specimens of body fluids and tissues initially taken from patients for medical reasons. Legal issues may arise when such research leads to commercially valuable products and methods, e.g., the ownership of the specimens after they are removed from the patient. Other related legal issues may also arise, e.g., whether the researchers must divulge such commercialization to the patient and must share with the patient any profits realized. The U.S. experience with these issues will be considered. A patient's "private" medical records, including the results of clinical laboratory tests, can be obtained by health care insurance companies and employers who provide health care coverage to their employees, to the disadvantage of the patient. Insurance policies and employment may be denied to those whose medical records suggest the possibility of future ill health. National laws to prevent such invasion of privacy have largely been ineffective in the U.S.

E-mail: MBiplaw@comcast.net

**S4 – Simpozij 4 – AUTOMATIZACIJA I NOVE
TEHNOLOGIJE, S4-1****Konsolidacija i automatizacija laboratorija**

Savoca Reto

County Hospital Aarau, Aarau, Švicarska

Laboratoriji u Europi suočeni su sa sve većim ekonomskim pritiskom: sve više pretraga treba provesti sa sve manjim brojem osoblja. Kliničari traže sve kraće vrijeme za pojedine pretrage, jer trebaju ubrzati donošenje kliničkih odluka i što je moguće više skratiti vrijeme čekanja za bolesnika. Uz to, treba održati ili čak poboljšati već vrlo visoku razinu analitičke kvalitete. Svim ovim zahtjevima ne može se udovoljiti konvencionalnim sredstvima, pa se stoga razvija automatizacija prijeanalitičkih i poslijeanalitičkih procesa. Val automatizacije koji je započeo u Japanu zapljusnuo je Sjedinjene Države ranih devedesetih. Nekad vrlo skupe, automatizirane sustave danas si mogu priuštiti čak i laboratoriji srednje veličine. Slijedom toga, velik broj europskih laboratorija započeo je s optimiranjem radnog procesa i uvođenjem automatiziranih sustava. U ovom prikazu daje se pregled najvažnijih pitanja u svezi s pripremom automatizacije, kao što su analiza radnog procesa, optimiranje procesa, planiranje prostornog rasporeda, konsolidacija i integracija. Objasniti će se razlika između neprekidne i automatizacije s prekidima, kao i između potpune automatizacije laboratorija i modularne automatizacije. Opisati će se neke najvažnije mogućnosti za skraćivanje vremena od primitka uzorka do izdavanja nalaza, kao i za smanjenje osoblja potrebnog za pojedine radnje. Na koncu će se objasniti neke moguće zamke na koje se može naići tijekom i nakon uvođenja automatizacije, kako bi se slušateljstvu omogućilo da izbjegne najčešće pogreške tijekom pripreme i provedbe automatizacije.

*E-mail: reto@savoca.ch***S4-2****Razvoj i primjena modularnog
informacijskog sustava u laboratorijskoj
dijagnostici**

Štefanović Mario

Klinički zavod za kemiju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Suradnjom stručnjaka Zavoda i tvrtke Samson informatika iz Zagreba razvijen je Laboratorijski informatički sustav (LIS) koji se osniva na MS SQL bazi podataka, te informa-

**S4 – Symposium 4 – AUTOMATION AND NEW
TECHNOLOGIES, S4-1****Laboratory consolidation and automation**

Savoca Reto

County Hospital Aarau, Aarau, Switzerland

The laboratories in Europe are facing an increasing economic pressure: more tests have to be performed with less staff. Clinicians require shorter turnaround times because clinical decisions need to be expedited and patient waiting time must be minimized. Finally, a very high level of analytical quality has to be maintained or even improved. All these demands cannot be met with conventional means and therefore automation of preanalytical and postanalytical processes has been developed. A wave of automation originating from Japan has swept over to the United States in the early nineties. Once very expensive, automation systems are now affordable even for medium size laboratories. Consequently, a large number of European laboratories have started to optimize their workflow and implement automation systems. This presentation will give an overview of the most important issues concerning the preparation of automation such as workflow analysis, process optimization, floor layout planning, consolidation and integration. The difference between continuous and discontinuous automation as well as between total lab automation and modular automation will be explained. Some of the most important possibilities to decrease turnaround times and to minimize the assignment of personnel will be outlined. Finally, some possible pitfalls during and after the implementation of automation will be elucidated to allow the audience to avoid the most common mistakes during preparation and implementation of automation.

*E-mail: reto@savoca.ch***S4-2****Development and application of modular
information system in laboratory diagnosis**

Štefanović Mario

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

A Laboratory Information System (LIS) has been developed by collaboration of Institute professionals and Samson informatika Co., which is based on MS SQL database

tičkom programskom paketu KLINLAB. Taj sustav je omogućio informatizaciju laboratorija, uspostavu mrežnog sustava unutar laboratorija, elektroničku vezu između administrativnog i analitičkog rada laboratorija, povezivanje laboratorijskih i kliničkih odjela za elektronički prijenos podataka te prijenos podataka u obračunsku službu bolnice. Upotrebom korisničkog imena i lozinke za svaki pristup u LIS sustav je višestruko osiguran pri kontroli upisa, rada analizatora i ispisa nalaza te pristupu i pohrani podataka.

Biološki uzorak bolesnika nakon ulaska u laboratorij dobiva naljepnicu s bar kodom, tj. zapisom koji ga povezuje s relevantnim podacima o bolesniku, kao i zahtjevom za laboratorijsku obradu. U LIS je uključen i automatizirani sustav za distribuciju uzoraka Olympus OLA 2500, koji uzorak s bar kodom distribuira na pojedina radilišta laboratorija. Na tim radilištima analize se izrađuju na analizatorima koji su također umreženi s LIS-om i nakon završetka analize rezultate spremaju u bazu podataka. Rezultati analiza koje se izrađuju ručno ili na neumreženim analizatorima ručno se upisuju u program. Završen nalaz je nakon autorizacije od strane laboratorijskog stručnjaka automatski dostupan za ispis nalaza ili za pregled na kliničkim odjelima. Veza između LIS i kliničkih odjela ostvarena je putem optičkog mrežnog sustava na razini bolnice. Na kliničkim odjelima instaliran je i dodatni informatički program nazvan Preglednik nalaza i omogućava uvid u nalaz bolesnika koji je upravo završen, kao i pregled prijašnjih nalaza istoga bolesnika. Program KLINLAB također daje uvid u poslovanje i procjenu kvalitete rada Zavoda, a zapis u bazi podataka ostaje trajan tijekom vremena predviđenog zakonom. LIS je tako pripremljen da se jednostavno može uklopiti i u bolnički informatički sustav. Uz LIS unutar bolnice, Zavod putem web stranice (www.kbsm.hr/klinkemija) i elektroničke pošte (kbsm.kzk@post.htnet.hr) ostvaruje i izravnu komunikaciju između stručnjaka Zavoda i javnosti, odgovarajući na sve pojedinačne upite.

E-mail: mstefan6@vip.hr

S4-3

Biosenzori: jučer, danas i sutra

Milardović Stjepan

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Biosenzori su male naprave koje sadrže biološki element (enzim, antitijelo, mikroorganizame, DNA, RNA) pogodno imobiliziran na površini pretvorničkog elementa (mjerne

and KLINLAB program package. This system has enabled laboratory computerization, establishment of the network system within the laboratory, electronic connection between the administrative and analytical laboratory activities, connection of laboratory and clinical departments to the electronic data transfer, and data transfer to the Hospital accounting department. Through the usage of username and password for entering the application, LIS has been provided with multiple protection, control of data entry, analyzer performance, report printing, and data storage. On entering the laboratory, the patient's biological sample is allocated a bar code, i.e. a record that links the sample with all relevant data on the patient and test requests. LIS also includes a system of automatic sample distribution by Olympus OLA 2500, which distributes bar-coded samples to particular workplaces. At these workplaces analyzers that are included in the LIS network perform the analyses, and after the analysis has been finished, results are put to the database. Results that are obtained manually or on analyzers not included in the LIS network have to be entered manually into the program. Upon authorization by the responsible laboratory professional, the complete finding is electronically accessible for printing or for viewing by clinical departments. The connection between LIS and clinical departments is realized through the fiberoptic network system at the Hospital level. At clinical departments of the Hospital, additional software entitled Laboratory Finding Browser allows for an insight into the current patient's findings as well as in his/her previous findings. The program also offers information on the Institute business issues and performance quality assessment, the records being stored for a time period warranted by legal provisions. LIS has been so designed as to be easily incorporated in the Hospital computer system. In addition to in-house LIS, the Institute has developed direct communication between Institute professionals and the population at large, answering all individual queries by Institute's web site (www.kbsm.hr/klinkemija) and e-mail (kbsm.kzk@post.htnet.hr).

E-mail: mstefan6@vip.hr

S4-3

Biosensors: past, present and future

Milardović Stjepan

School of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Biosensors can be defined as small compact analytical devices incorporating biologically-derived sensing element (enzyme, antibody, microorganisms, RNA, DNA)

elektrode). Zadatak biosenzora je selektivno mjerenje promjene koncentracije analita na način da je signal odziva proporcionalan koncentraciji pojedinačnog analita ili više njih. Razvoj biosenzora može se promatrati s više aspekata: s obzirom na odabir biološkog elementa, s obzirom na odabir raznih vrsta pretvorničkih elemenata, s obzirom na tehnologiju izvedbe, s obzirom na način ostvarenja mjerenja kao protočnog ili neprotočnog mjerenja injektiranjem u protok (FIA, SIA), mjerenja uz primjenu mikrofluidnih platforma (biočip) i sl. te s obzirom na način komuniciranja redoks centra enzima i mjerene elektrode. Svaki od predloženih aspekata promatranja vrlo je zanimljiv, a predstavlja metode i načine koji su učinjeni ili se čine u svrhu konstrukcije biosenzora što idealnijih svojstava. U ovom predavanju pokazati će se kratak pregled načina konstrukcije glukoznog biosenzora tijekom 50 godina te konstrukcije koje se izvode u današnje vrijeme kao i potencijalne buduće konstrukcije. Odabran je način prezentacije razvoja glukoznog senzora s obzirom na način ostvarivanja veze amperometrijske elektrode i redoks centra glukoza-oksidaze i to: a) za direktan prijenos elektrona između redoks centra i mjerne elektrode, b) za prijenos elektrona primjenom difuzijskog medijatora, c) za prijenos elektrona ostvaren električnim kontaktom enzima i medijatorom funkcionalizirane elektrode, d) za prijenos elektrona ostvaren električnim kontaktom enzima s medijatorom funkcionaliziranom sol-gel matricom i e) buduće izvedbe kontakta redoks centra enzima te mjerne elektrode uz pomoć nanočestica.

E-mail: stjepan.milardovic@fkit.hr

S4-4

Pretrage uz bolesnika – automatizacija i integracija

Rumenjak Vlatko

Opća bolnica Sveti Duh, Zagreb, Hrvatska

Pretrage uz bolesnika razvijene su zbog potrebe da rezultati analiza ključnih za preživljavanje kritičnih bolesnika budu što prije na raspolaganju liječniku, dok ih laboratorijsko osoblje prepoznaje kao prikladne za brze rezultate u krajnjim situacijama, a ne kao zamjenu za rezultate dobivene u laboratoriju. Tehnološki napredak nastavlja se u smjeru poboljšanja robustnosti ovih uređaja u rukama osoba koje nisu primarno osposobljene za rad u laboratoriju. Na primjer, trake za određivanje glukoze temelje se na elektrokemijskim mjerenjima i znatno su manje osjetljive na varijacije u hemoglobinu i drugim optičkim interfe-

integrated within a physicochemical transducer. The aim of a biosensor is to produce a continuous electronic signal proportional to single analyte concentration or proportional to the concentration of a related group of analytes. Development of biosensors can be considered from many different points of view including: the type of chosen biological element, different types of transducers applied, different sensor technology, measurement techniques such as batch, flow-through (flow injection analysis, FIA or sequential injection analysis, SIA), or measurements by microfluidic platforms as in case of biochip design measurements, and finally electron transfer between the enzyme redox center and transducer. Each of the mentioned aspects can be very interesting due to the methods and procedures used in order to produce the biosensor of excellent performance. In this lecture, a concise review of the glucose biosensor design during the last fifty years will be presented. Presentation of glucose biosensor development will include models which describe different options applied to obtain electrical contact between the enzyme redox center (glucose-oxidase) and amperometric transducer, and will be focused on: a) directed, non-mediated electron transfer between the enzyme and electrode, b) electron transfer provided by diffusion mediators, c) electrical connecting of dissolved enzymes at mediator-functionalized electrode, d) electrical connecting of enzymes in mediator-functionalized sol-gel matrices, and e) some perspectives of electron transfer future design based on nanotechnology.

E-mail: stjepan.milardovic@fkit.hr

S4-4

Point-of-care testing – automation and integration

Rumenjak Vlatko

Sveti Duh General Hospital, Zagreb, Croatia

Point-of-care testing (POCT) has developed out of the need for clinicians to have rapid tests and viewed by laboratory personnel as suitable only for rapid test results in extreme situations, not as a substitute for results generated in the laboratory. Technological advances continue to improve the robustness of these devices in hands of nonlaboratory users. For example, glucose strips are based on electrochemical measurements and are less sensitive to variation in hemoglobin levels and other optical interferences which occurred with optical measurements. The miniaturization of electrochemical

rentima od ranijih optičkih instrumenata. Minijaturizacija elektrokemijskih senzora i napredak imunokemijske tehnologije na čvrstom nosaču rezultirala je eksplozijom kvalitativnih i kvantitativnih sustava u području acido-baznih uređaja, koagulacije, opće kliničke kemije do imunoanaliza. Napredak u tehnikama dokazivanja i u proizvodnji antitijela doveo je do golemog unaprjeđenja u sustavima za pretrage uz bolesnika. Područje srčanih biljega ima najbrži porast pretraga uz bolesnika. Novi kvantitativni sustavi uključuju određivanje troponina i elektrokemijskom imunometodom, te imunofluorescentno određivanje cTnI i CKMB. S prodorom ovih uređaja na tržište bolesnici s boli u prsima dobivaju mogućnost dijagnostike koja je gotovo jednaka rezultatima u laboratoriju. Tijekom posljednjih nekoliko godina tehnologija ovih uređaja suočena je s dva pristupa. Jedan je nastojanje da se različite tehnologije integriraju u jednom instrumentu stvarajući visoko funkcionalni uređaj. Drugi pristup je integracija mnoštva različitih testova u jednu platformu.

Informatička potpora u kontroli i pohranjivanju rezultata pretraga uz bolesnika razvijena je posljednjih desetak godina. Današnji sustavi uključuju mnoge funkcije neophodne za laboratorijski rad uključujući pregled potreba instrumenta, očitavanje rezultata, indentifikaciju korisnika. Preko priključaka ovi se uređaji priključuju i na LIS. Tako se sve informacije mogu skupiti na jednom mjestu. Slijedeća razina je integriranje svih informacija i indentifikacija promjena o tijeku bolesti, što će kliničarima omogućiti donošenje odluke. Druga razina je povezivanje kliničara s testiranjem bolesnika u kući u smislu stvaranja virtualne bolnice.

E-mail: vlatko.rumenjak@zg.htnet.hr

S4-5

e-Zdravstvo za sigurnost bolesnika pomoću informacijskih tehnologija

Gouget Bernard

Conseiller Santé Publique, Fédération Hospitaliere de France, Paris, Francuska

Primjena informacijske tehnologije u zdravstvenoj skrbi brzo se povećava i novija postignuća u bežičnim i mrežnim tehnologijama već značajno utječu na današnje e-zdravstvene i medicinske usluge. E-Zdravstvo opisuje primjenu informacijskih i komunikacijskih tehnologija u čitavom nizu funkcija koje imaju učinka na zdravstveni sektor i mogu poboljšati pristup zdravstvenoj skrbi te povećati kakvoću i učinkovitost ponuđenih usluga.

sensors and advances in the immunologic solid-phase technology have resulted in an explosion of qualitative and quantitative POCT systems ranging from acid-base systems, coagulation, general chemistry and immunoassays. Advances made in detection techniques and antibodies have brought about tremendous improvements in POCT systems. Cardiac markers appear to be one of the major growth areas for POCT. New quantitative systems include a troponin I electrochemical immunoassay, and cTnI and CKMB based on immunofluorescence technology. With penetration of these quantitative immunoassays, patients with chest pain will get an as sensitive marker as performed in the laboratory. Over several years, POCT technology has faced two distinct approaches. One effort has integrated disparate technologies into a single reader creating a highly functional system. The other approach is based on the integration of many different test types into a single platform.

Software tools needed for the control and data management have developed during the past ten years. Today's POCT data management systems integrate many tools necessary for laboratory oversight including inventory management, reader performance and identification of users. The next step will be to integrate this information and identify changes in the course of disease to aid the clinician in decision making. The next level is to connect the clinician with patient home testing in terms of virtual hospital.

E-mail: vlatko.rumenjak@zg.htnet.hr

S4-5

e-Health for achieving patient safety through information technologies

Gouget Bernard

Conseiller Santé Publique, Fédération Hospitaliere de France, Paris, France

The use of information technology in health care is intensifying rapidly and the recent advances in wireless and network technologies have already made a significant impact on current e-health and medical services. e-Health describes the application of information and communication technologies across the whole range of functions that affect the health sector and can improve access to healthcare and boost the quality and effective-

E-Zdravstvena rješenja obuhvaćaju proizvode, sustave i usluge koje prelaze jednostavne internetske aplikacije. Mnoge zemlje pozivaju na široko prihvaćanje mobilnih računalnih i sustava medicinskih senzora i komunikacijskih tehnologija za zdravstvenu skrb u slijedećem desetljeću. Mnogo je primjera uspješnih dostignuća e-Zdravstva uključujući usluge zdravstvene informacijske mreže, telemedicine i telebiologije, usvajanje elektroničkih medicinskih zapisa, nosive i prenosive sustave motrenja i zdravstvene portale te mnoga druga tehnološki zasnovana informacijska i komunikacijska sredstva kao pomoć u prevenciji, dijagnostici, liječenju, zdravstvenom motrenju i promjenama načina života. Uz digitaliziranje informacija što ih pružatelji usluga rabe u skrbi za bolesnike unutar organizacija, te kliničari, bolesnici i oni koji kroje zdravstvenu politiku očekuju siguran elektronički prijenos odgovarajućih informacija među organizacijama. Razvoj industrijskih standarda za mogućnost zajedničkog rada, koji omogućavaju protok kliničkih i administrativnih podataka među ključnim nositeljima interesa, pokazao se je katalizatorom dokazujući svoju važnost u poticanju IT investicija u zdravstvenoj skrbi i olakšavajući zdravstvenu reformu. Viđenje e-Zdravstva uvelike potiče potreba za što većom djelotvornošću, smanjenje medicinskih grješaka, povećanje medicinskih i znanstvenih mogućnosti, te za štednjom sredstava. Zdravstveni stručnjaci aktivno planiraju provedbu e-Zdravstva u praksi. Daljnji će razvoj ići u smjeru personaliziranih zdravstvenih sustava. Sve veća dostupnost, minijaturizacija, rad uređaja, povećane količine podataka i očekivano okupljanje bežične komunikacije i mrežne tehnologije oko mobilnih zdravstvenih sustava ubrzati će razvoj i uvođenje mobilnih zdravstvenih uređaja, sustava i usluga u idućem desetljeću. To će pak snažno utjecati na neke od postojećih laboratorijskih i zdravstvenih služba i preoblikovati će neke od mehanizama postojećih putova pružanja zdravstvene skrbi. Danas, uz bežične tehnologije, elektroničke medicinske zapise mogu procjenjivati stručnjaci s bilo kojeg mjesta spajanjem na informacijski sustav dotične ustanove. Zahvaljujući mobilnoj tehnologiji liječnicima opće prakse biti će daleko dostupniji podatci iz povijesti bolesti, laboratorijski rezultati, farmaceutski podatci, podatci iz osiguranja i oni o medicinskim sredstvima, čime se poboljšava kvaliteta skrbi i pozornost usmjerena ka bolesniku, a sve to radi sigurnosti bolesnika. Biti će riječi o novijim dostignućima u ovom novom području zdravstvene skrbi, uz podroban prikaz brzo nadolazećih promjena u zdravstvenoj politici u pitanjima financija, kliničke kvalitete, organizacije, te pravnim, tehničkim pitanjima i onima koja se odnose na očuvanje privatnosti.

E-mail: b.gouget@fhf.fr

ness of the services offered. e-Health solutions include products, systems and services that go beyond simply Internet-based applications. Many countries are calling for widespread adoption of mobile computing, medical sensor systems and communication technologies for health care within the next decade. There are many examples of successful e-Health developments including health information networks, telemedicine and telebiology services, adoption of electronic medical records (EMRs), wearable and portable monitoring systems, and health portals and many other information and communication technology-based tools assisting prevention, diagnosis, treatment, health monitoring, and lifestyle management. In addition to digitising the information that providers use to care for their patients within organizations; clinicians, patients, and policymakers are looking ahead to securely sharing appropriate information electronically among organizations. The development of industry standards for interoperability, enabling the flow of clinical and administrative data among key stakeholders, has proved to be a catalyst in demonstrating its importance for encouraging health care IT investment and facilitating health care reform. The perception of e-Health appears to be largely driven by the need of increasing efficiency, reduction of medical error, increasing medical and scientific capabilities, and saving money. Health professionals are actively planning for implementation of e-Health in their practices. The next evolution will be towards personalized healthcare systems. The increased availability, miniaturization, performance, enhanced data rates and the expected convergence of wireless communication and network technologies around mobile health systems will accelerate the deployment of mobile health devices, systems and services within the next decade. These will have a powerful impact in some of the existing laboratory and health services and will reshape some of the mechanisms of the existing healthcare delivery routes. Today with wireless technologies, EMRs could be assessed by professionals from any given location by connection to the institution's information system. General practitioners' access to patient history, laboratory results, pharmaceutical data, insurance information, and medical resources would be enhanced by mobile technology, thereby improving the quality of care and greater attention to patient safety. The presentation will address the recent developments in this emerging area of healthcare areas and also include an in-depth look at rapidly emerging policy changes related financial, clinical quality, organizational, legal, technical, and privacy-related issues.

E-mail: b.gouget@fhf.fr

SA – Simpozij ABBOTT – KARDIOVASKULARNE BOLESTI, SA-1**Kliničko značenje testova za troponin poboljšane osjetljivosti**

Venge Per

Department of Medical Sciences, Clinical Chemistry, University of Uppsala, Uppsala, Švedska

Test na srčane troponine u krvi postao je zlatim standardom u biokemijskom otkrivanju oštećenja miokarda, a može se mjeriti kao troponin T ili I. Visoka osjetljivost ovih testova omogućila je redefiniranje infarkta miokarda i osigurala nam snažno prediktivno sredstvo u bolesnika s oštećenjem miokarda. Tako je više studija jasno pokazalo povezanost razina srčanih troponina s kratkoročnim i dugoročnim ishodom u bolesnika s akutnim koronarnim sindromima, tj. infarktom miokarda ili nestabilnom anginom. U prethodnim smo studijama uspoređivali kliničku uspješnost nekoliko testova za srčane troponine i utvrdili kako se njihova stvarna klinička osjetljivost bitno razlikuje usprkos sličnostima u funkcijskom osjetljivosti. U studiji FRISC II, u velikoj skupini osoba s ne-Q-valnim infarktom miokarda ili nestabilnom anginom pretraga na srčani troponin I jednim testom identificirala je oko 10% više bolesnika sa slabim ishodom negoli drugi testovi. Naši rezultati ukazuju na kvalitativne razlike među testovima za srčane troponine. Kako bismo dodatno ispitali ovo zapažanje, izmjerili smo plazmatske razine srčanih troponina u skupini zdravih osoba (skupina SWISCH) podjednake dobi i spola kao skupina bolesnika FRISC II. Dobiveni rezultati pokazali su dobnu povezanost sa značajno povišenim razinama u starijoj skupini i ukazali na to da bi 99. percentila URL za osobe ispod 60 godina starosti trebala iznositi polovicu one utvrđene u prethodnim izvješćima. Ovi su rezultati ponovno pokazali velike razlike između pojedinih testova. Pitanje na koje rezultati studije SWISCH nisu mogli dati odgovor bilo je jesu li blago povišene razine uočene u nekih zdravih osoba povezane s bilo kakvim kliničkim posljedicama. Nastojeći naći odgovor na to, izmjerili smo razine cTnI u serumu pomoću testova AccuTnI (Beckman Coulter) i Liaison (Diasorin) u 1221 muškarca u dobi od 70 godina (studija ULSAM) koji su bili praćeni u prosjeku 10,4 godine; 835 ovih muškaraca smatrali su se zdravima u vrijeme uzorkovanja krvi. Razine cTnI mjerene pomoću testa AccuTnI jednako su pokazale snažnu povezanost sa smrću od svih uzroka i sa smrću od kardiovaskularne bolesti. Taj je odnos bio manje očit kad je primijenjen test Liaison. Jedine očite razlike između testa AccuTnI i drugih testova za cTnI bile su razlike u konfiguraciji protutijela. Tako je test AccuTnI jedinstven po tome što

SA – Symposium ABBOTT – CARDIOVASCULAR DISEASES, SA-1**Clinical importance of troponin assays with enhanced sensitivity**

Venge Per

Department of Medical Sciences, Clinical Chemistry, University of Uppsala, Uppsala, Sweden

The assay of cardiac troponins in blood has become the gold standard in the biochemical detection of myocardial injury and may be measured either as troponin T or I. The high sensitivities of the assays have allowed for redefinition of myocardial infarction and also provided powerful predictive tools in patients with myocardial injury. Thus, several studies have clearly shown the relationship of cardiac troponin levels to both short term and long term outcome in patients with the acute coronary syndromes, i.e. myocardial infarction or unstable angina. In previous studies we compared the clinical performance of several cardiac troponin assays and found that in spite of similarities in functional sensitivities the actual clinical sensitivities differed substantially. In a large cohort of subjects with non-Q-wave myocardial infarction or unstable angina, the FRISC II study, the assay of cardiac troponin I using one assay identified about 10% more patients with poor outcome than other assays. Our results suggested qualitative differences between cardiac troponin assays. To investigate this further, we assayed plasma levels of cardiac troponins in a cohort of healthy subjects. This cohort (SWISCH) was matched according to sex and age to the FRISC II cohort patients. The results showed a relationship to age with significantly elevated levels in the elderly cohort and suggested that the 99th percentile URL for subjects below 60 years of age should be half of that defined in previous publications. The results again showed great between-assay differences. The question that could not be answered by the SWISCH results was whether the slightly elevated levels seen in some healthy subjects were related to any clinical consequences. In an attempt to answer this, we measured serum cTnI levels by the AccuTnI (Beckman Coulter) and Liaison (Diasorin) assays in 1221 70-year-old men (the ULSAM study) that had been followed for a mean of 10.4 years; 835 of these men were regarded healthy at the time of blood sampling. The cTnI levels as measured by the AccuTnI assay uniquely showed a strong relationship to all-cause death and to death from cardiovascular disease. This relationship was less obvious with the Liaison assay. The only obvious differences between the AccuTnI assay and other cTnI assays were differences in antibody configurations. Thus,

uključuje protutijelo na epitop 41-49 u molekuli cTnI, pa smo stoga pretpostavili kako je ta razlika bila vjerojatno razlog za razlike u kliničkoj uspješnosti. Zato je za nas bilo veoma važno kad je Abbott izišao s poboljšanim testom za cTnI koji uključuje ovo protutijelo. U studiji koju smo proveli u drugoj skupini osoba s ne-Q-valnim infarktomiokarda ili nestabilnom anginom (studija GUSTOIV) analizirali smo razine srčanih troponina pomoću više različitih testova u uzorcima oko 700 osoba. Rezultati su potvrdili prijašnje podatke iz skupine FRISC i pokazali kako je ovaj Abbottov test dostigao kliničku uspješnost testa AccuTnI, dajući tako daljnju potporu našem zapažanju o važnosti uključenja u test monoklonskog protutijela usmjerenog protiv epitopa 41-49. Naši podatci naglašavaju jedinstvenu kvalitetu nekih testova u identificiranju osoba s lošom prognozom, te isto tako pokazuju kako visoka funkcijska osjetljivost nekog testa ne mora uvijek značiti i njegovu visoku kliničku osjetljivost. Naši podatci također pokazuju kako se klinička iskoristivost testova na troponine širi, pa bi sukladno tome trebalo revidirati i kliničku obradu.

E-mail: per.venge@akademiska.se

SA-2

Abbottovi srčani biljezi u dijagnostici i motrenju

Herzig Birgit

Abbott, Njemačka

Test Troponin-I, te testovi BNP, CK-MB i Myoglobin dostupni su za Abbottove instrumente AxSYM i Architect. Uz to, testovi Homocystein i D-dimer dostupni su za instrument AxSYM. Izvršna klinička osjetljivost testa TnI na instrumentu Architect može se pripisati monoklonskim protutijelima koja su upotrebljena u ovom testu (James S i sur., Clin Chem 2006.). I test Troponin-I za Architect i onaj za AxSYM rabe ista tri monoklonska protutijela koja su sva usmjerena prema stabilnom dijelu molekule troponina. Za razliku od dijagnostičkih biljega za akutni koronarni sindrom (Troponin-I, CK-MB i Myoglobin), natriuretski peptid tip B (BNP) je moćan biljeg koji pomaže u dijagnostici srčanog zatajenja. Prof. Mueller i sur. (N Engl J Med 2004.) su u prospektivnoj randomiziranoj kontroliranoj studiji potvrdili kako se može uštedjeti 26% troškova uz primjenu pretrage BNP u uspoređi sa standardnom dijagnostikom bez pretrage BNP. U ovu su studiju bila uključena 452 bolesnika srednje dobi od 71 godine koji su došli na hitni prijam s akutnom

the AccuTnI assay uniquely includes an antibody against the epitope 41-49 in the cTnI molecule and we therefore postulated that this difference was the likely reason for the differences in clinical performance. It was therefore of great interest to us when Abbott launched their upgraded assay of cTnI with the inclusion of this particular antibody. In a study in another cohort of subjects with non-Q-wave myocardial infarction or unstable angina, i.e. the GUSTOIV-study, we analyzed the levels of cardiac troponins with several different assays in samples of some 700 subjects. The results confirmed previous data on the FRISC cohort and also showed that the Abbott assay had acquired clinical performance of the AccuTnI assay, lending further support to our notion on the importance of the inclusion of the monoclonal antibody directed against the epitope 41-49 in the assay. Our data emphasize the unique quality of some assays in identifying subjects with unfavorable prognosis and also show that a high functional sensitivity of an assay need not always translate into a high clinical sensitivity. Our data also imply that the clinical utility of troponin assays is broadened and the clinical management should be revised accordingly.

E-mail: per.venge@akademiska.se

SA-2

Abbott cardiac markers in diagnosis and monitoring

Herzig Birgit

Abbott, Germany

The Troponin-I assay as well as the BNP, CK-MB and Myoglobin assays are available on both the AxSYM and Architect instruments from Abbott. In addition, the Homocysteine and the D-dimer assays are available on the AxSYM instrument. The excellent clinical sensitivity of the Architect TnI assay can be attributed to the monoclonal antibodies that are used in the assay (James S *et al.*, Clin Chem 2006). Both the Architect and AxSYM Troponin-I assays utilize the same three monoclonal antibodies, which are all directed to the stable part of the troponin molecule. In contrast to the diagnostic markers for acute coronary syndrome (troponin-I, CK-MB and myoglobin), a powerful marker to aid in the diagnosis of heart failure is the B-type natriuretic peptide (BNP). Prof. Mueller *et al.* (N Engl J Med 2004) confirmed in a prospective, randomized, controlled study that 26% of cost could be saved if BNP testing is performed compared to standard diagnosis without BNP testing. This study enrolled 452 patients, mean

dispnejom. Uz to, Mueller je pokazao da se stopa prijma u bolnicu smanjila za 10%, a medijan boravka u bolnici za 3 dana u skupini s BNP. Abbottovi testovi za BNP pružaju brzu i potpuno automatiziranu metodu za određivanje razina BNP. Prijelomna vrijednost (*cut-off*) od 100 pg/mL rabi se u svim dobnim skupinama za isključivanje srčanog zatajenja. Dok se molekula aktivnog BNP izlučuje putem receptora neutralne endopeptidaze i izlučivanja, molekula inaktivnog NT-proBNP se izlučuje putem bubrega. To pak dovodi do znatno manje ovisnosti BNP o dobi i bubregu (McCullough i sur., *Rev Cardiovasc Med* 2003.). Uz BNP, može se primijeniti test D-dimer na AxSYM kao pomoć u diferencijalnoj dijagnostici bolesnika s dispnejom kako bi se razlikovali srčani od plućnih uzroka. D-dimer je biljeg koagulacije koji odražava stupanj obrtaja trombina. Test D-dimer na AxSYM može se rabiti za isključivanje sumnjive venske tromboembolije, kako duboke venske tromboze tako i plućne embolije, s visokom negativnim prediktivnom vrijednošću (NPV=98,9%). Rezultat testa D-dimer dobiva se u kratkom vremenu od 15 minuta. Ukratko, srčani testovi na uređajima Architect i AxSYM daju izvrsne rezultate u kratkom vremenu, koji su dobiveni na pouzdanim i potpuno automatiziranim instrumentima.

E-mail: birgit.herzig@abbott.com

SA-3

Novi srčani biljezi akutnog koronarnog sindroma

Honović Lorena

Medicinsko-biokemijski laboratorij, Opća bolnica Pula, Pula, Hrvatska

Akutnim koronarnim sindromom (AKS) određena su stanja od nestabilne angine, preko ne-ST akutnog infarkta do ST-akutnog infarkta miokarda s izraženom nekrozom miokarda. Najčešća etiologija uključuje pet osnovnih uzoraka: rupturu plaka s akutnom trombozom, progresivnu mehaničku opstrukciju, upalu, sekundarnu nestabilnu anginu uslijed anemije ili hipertiroidizma, dinamičku opstrukciju uslijed vazokonstrukcije. Značajnu ulogu u dijagnostici i liječenju AKS imaju biokemijski srčani biljezi. Godinama temeljena na uporabi biljega nekroze miocita, klinička primjena srčanih biljega posljednjih je desetak godina doživjela značajnu transformaciju i nastoji mjerljivim parametrima obuhvatiti sve faze AKS. Uza opće prihvaćene biljege nekroze sve veća važnost pripada biljezima upale, ishemije miokarda i biljezima srčane funkcije. Bilo sustavna ili lokalna, upala definira stabilnost ili nestabilnost ate-

age 71 years, presenting to emergency department with acute dyspnea. In addition, Mueller showed the hospital admission rate to be reduced by 10% and median length of hospital stay by 3 days in the BNP group. The Abbott BNP assays provide rapid and fully automated methods to determine BNP levels. A cut-off of 100 pg/mL to rule out heart failure is used for all age groups. Whereas the active BNP molecule is cleared *via* neutral endopeptidase and clearance receptors, the inactive NT-proBNP molecule is renally excreted. This leads to much less age and renal dependence for BNP (McCullough *et al.*, *Rev Cardiovasc Med* 2003). In addition to BNP, the AxSYM D-dimer assay can be used to aid in differential diagnosis of dyspnea patients, distinguishing cardiac from pulmonary causes. D-dimer is a coagulation marker that reflects the degree of thrombin turnover. The AxSYM D-dimer assay can be used to rule out suspected venous thromboembolism, both deep vein thrombosis and pulmonary embolism with a high negative predictive value (NPV=98.9%). The D-dimer assay has a quick turnaround time of 15 minutes. Overall, the Architect and AxSYM cardiac assays are proven to have excellent assay performance. Quick assay results can be obtained on reliable and fully automated instruments.

E-mail: birgit.herzig@abbott.com

SA-3

New biochemical markers of acute coronary syndrome

Honović Lorena

Laboratory of Medical Biochemistry, Pula General Hospital, Pula, Croatia

Acute coronary syndrome (ACS) refers to conditions of unstable angina, non-ST myocardial infarction and ST acute myocardial infarction with pronounced necrosis. The most common pathology of ACS includes five major causes: plaque obstruction, inflammation, secondary unstable angina due to severe anemia or hyperthyroidism, and dynamic obstruction due to coronary vasoconstriction. Biochemical markers play a pivotal role in the diagnosis and management of patients with ACS. Clinical use of biochemical markers of cardiac diseases has been significantly modified over the last ten years, and today includes parameters for complete evaluation of ACS. Along with necrosis biomarkers, the biomarkers of inflammation, cardiac ischemia and ventricular overload have been firmly established in clinical studies. Local or systemic inflammation is a major contributor to plaque

rosklerotskog plaka pa se biljezi ove faze bolesti ispituju kao rani biljezi AKS, odnosno biljezi nestabilnosti plaka. Iako nedovoljno istraženi, tu se spominju C reaktivni protein, mijeloperoksidaza, transmembranski protein trombocita-CD40 ligand, monocitni hemoatraktant protein-1 (MCP-1), plazma protein A udružen s trudnoćom (PAPP-A), kolin, interleukin 6. Središnji fiziološki proces u AKS je miokardijalna ishemija pa specifični biljeg mora razlikovati akutni infarkt miokarda (AIM) od neishemijskog oštećenja miokarda. Veliku mogućnost primjene u toj fazi imaju ishemijom modificirani albumin (IMA), glikogen fosforilaza-BB (GP-BB), nevezane slobodne masne kiseline (FFAu). Među srčanim biljezima najispitivaniji su biljezi infarkta miokarda, odnosno nekroze. Nekroza je praćena otpuštanjem strukturnih proteina i staničnih makromolekula u srčani intersticijum kao posljedica oštećenja stanične membrane. Kako je pravodobno prepoznavanje AIM važno za prognozu i liječenje, određivanje biljega nekroze indicirano je u svih bolesnika sa suspektnim AKS. Najznačajniji biljezi ove skupine su mioglobin, CKMB mass, srčani troponini T i I, ali se nove nade polažu u određivanje tropomiozina i aktina. Skupinu biljega srčane funkcije čine natriuretski peptidi i to tipa B (BNP) i N terminalni dio istog prohormona (NT-proBNP).

E-mail: lhonovic@inet.hr

S5 – Simpozij 5 – TUMORSKI BILJEZI I MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA ZLOĆUDNIH TUMORA, S5-1

Granice nutrigenomike i prevencija raka

Vučenić Ivana

University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD and American Institute for Cancer Research, Washington, DC, SAD

Prehrambene navike mogle bi utjecati na incidenciju raka. Velik broj bioaktivnih sastavnica u hrani udružen je sa zaštitom od raka. Bioaktivne sastavnice hrane mogle bi istodobno mijenjati više od jednog procesa raka uključujući metabolizam karcinogena, hormonsku ravnotežu, proliferaciju, stanično signaliziranje, kontrolu staničnog ciklusa, diferencijaciju, apoptozu, angiogenezu i metastazu. Utvrđeno je kako genetska raznolikost i genetska osnova pojedine osobe imaju ulogu u sklonosti ka razvoju raka. Nutrigenomika je ispitivanje načina na koji bioaktivne sastavnice u prehrani djeluju uzajamno s genima i njihovim proizvodima, te kako genetska raznolikost može uvjetovati

instability. The group of investigated markers of inflammation include C-reactive protein, myeloperoxidase, CD 40 ligand, monocyte chemoattractant protein-1, pregnancy-associated plasma protein, and interleukin-6. From the group of biomarkers of myocardial ischemia several biomarkers are under investigation. These are ischemia-modified albumin, unbound free fatty acids, whole blood choline, and glycogen phosphorylase isoenzyme BB. Among markers of cardiac disease the best known are markers of myocardial necrosis, which include structural proteins and other intracellular macromolecules such as myoglobin, cardiac troponin T and I, creatine kinase MB mass, actin and tropomyosine. Because the recognition of acute myocardial infarction (AMI) is important for the prognosis and management, determination of necrosis biomarkers is indicated in all patients with suspect ACS. For risk assessment in patients with a clinical syndrome constituent, the measurement of B-type natriuretic peptide or N-terminal pro BNP may prove useful.

E-mail: lhonovic@inet.hr

S5 – Symposium 5 – TUMOR MARKERS AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF MALIGNANT TUMORS, S5-1

Frontiers in nutrigenomics and cancer prevention

Vučenić Ivana

University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD and American Institute for Cancer Research, Washington, DC, USA

Dietary habits may influence cancer incidence. A large number of bioactive components in food are associated with cancer protection. Bioactive food components may modify simultaneously more than one cancer process including carcinogen metabolism, hormonal balance, proliferation, cell signaling, cell-cycle control, differentiation, apoptosis, angiogenesis, and metastasis. It has been recognized that genetic variation and individual genetic background play a role in susceptibility to cancer. Nutrigenomics is the study of how bioactive components in the diet interact with genes and their products, and how genetic variations may cause people to respond differently

vati da ljudi različito odgovaraju na nutrijente iz prehrane. Ispitivanje interakcije između prehrane i genoma pojedine osobe, te odgovora dotične osobe na različite vrste prehrane daje važne informacije o onima u kojih odgovor nastupa te onima u kojih odgovor izostaje, a time pomaže identificirati one koji će imati najviše koristi. Tehnike koje se rabe u prehrambenoj genomici slične su onima koje se primjenjuju u suvremenom molekularno genetičkom istraživanju. Međutim, da bismo u potpunosti shvatili ulogu prehrane u karcinogenizi i identificirali one koji hoće ili neće odgovoriti na prehrambenu intervenciju, uz nutrigenomiku je neophodna istraživačka suradnja u područjima prehrambene epigenetike, prehrambene transkriptomike, proteomike i metabolomike, vodeći računa o tome da etnička pripadnost, kulturna okolina i drugi čimbenici utječu na genetsku raznolikost i odgovor na prehrambene čimbenike, te na izraženost važnih gena. Znanja dobivena iz studija udruženosti bioaktivnih sastavnica hrane i rizika za razvoj raka, na osnovi genotipa pomoći će u izradi individualiziranih prehrambenih intervencija za sprječavanje, pa čak i liječenje raka.

E-mail: ivucenic@umaryland.edu

S5-2

Genomika i proteomika u onkologiji

Pavelić Jasminka

Zavod za molekularnu medicinu, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

U prošlih smo nekoliko desetljeća bili svjedoci golemog napretka u istraživanju genoma i proteoma u području molekularnog profiliranja - onkologiji. Otprilike 30.000 gena kodira za čak do deset milijuna proteina koji u (pre)malignim stanicama (de)reguliraju fiziološke procese. S obzirom na tako velik broj gena/proteina njihove promjene koje vode zloćudnoj preobrazbi su iznimno složene i teško ih je "mjeriti" tradicionalnim metodama. Mjerenje ekspresije gena cDNA mikročip tehnologijom, kao i globalno profiliranje proteina pojedinog uzorka daju složenu sliku promjena unutar stanice. Ovakve tehnologije omogućuju analizu ekspresije tisuća gena i proteina odjednom, čime istraživači raspoložu informacijama o brojnim promjenama koje su uzrok zloćudne promjene. Uz to, ovakva istraživanja daju informacije koje se mogu upotrijebiti za molekularno profiliranje tumora, što pak može rezultirati točnijom klasifikacijskom shemom kao i identifikacijom niza gena koji se mogu iskoristiti za bolju prognozu i predviđanje ishoda liječenja. Nije ni zanemari-

to food nutrients. The study of the interaction between nutrition and an individual's genome and the response of the individual to different diets provides important clues about responders and non-responders and helps indicate who will benefit most. Techniques used in nutritional genomics are similar to those used in modern molecular genetic research. However, to fully understand the role of nutrition in carcinogenesis and to identify those who will and will not respond to dietary intervention, a collaborative research in the areas of nutritional epigenetics, nutritional transcriptomics, proteomics and metabolomics are necessary in addition to nutrigenomics, taking into account that ethnicity, cultural environments and other factors influence the genetic variability and response to nutritional factors, and the expression of important genes. The knowledge gained in studies of the associations among bioactive food components and cancer risk based on genotype will help designing individualized nutritional intervention to prevent and even treat cancer.

E-mail: ivucenic@umaryland.edu

S5-2

Genomics and proteomics in cancer

Pavelić Jasminka

Department of Molecular Medicine, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

The past decade has seen great advances in genome and proteome research in the field of molecular profiling - oncology. Approximately 30,000 genes code for up to ten million proteins which (de)regulate physiological processes in premalignant/malignant cells. Due to such a huge number of genes/proteins, their alterations that can lead to cancer formation are dramatically complex and are difficult to measure by traditional methods. The measurement of gene expression by cDNA microarray technology, as well as global protein profiling of a particular specimen give an integrated genome-proteome picture of the changing function. Such approaches enable analysis of expression levels of thousands of genes and proteins at once, providing the researchers with information on a variety of changes that underlay malignant transformation. In addition, they give information that can be used for molecular profiling of tumors, which can result in a much more detailed classification schemes as well as in the identification of potential gene

va identifikacija molekularnih "meta" na temelju kojih se može zasnivati razvitak novog, prema svakom oboljelom "iskrojenog" liječenja. Do sada je cDNA mikročip tehnologija upotrebljena za identifikaciju gena uključenih u sklonost razvoju nasljednih oblika raka, kao što su BRCA1/2 i APC. Analizom meduloblastoma otkriveni su geni uključeni u procese adhezije stanica i njihovu mobilnost (PDGFR i *Ras/mitogen activated protein kinase* - MAPK geni). Slično tome, ekspresija proteina Wnt5a prati sposobnost metastaziranja melanoma kože. S obzirom na točniju klasifikaciju tumora i klinički ishod bolesti najbolji su rezultati postignuti u području zloćudnih tumora krvotvornog tkiva (leukemije i limfomi) i tumora dojke u osoba mlađih dobnih skupina. Usporedno sa spomenutim, nije zanemarivo ni kreiranje novih lijekova. S obzirom na to da su mnogi oblici konvencionalnog liječenja nespecifični, novi oblici liječenja usmjereni osobito na dokidanje aktivnosti proteina sve su više u središtu istraživanja. Prema tome, proteomske analize predstavljaju izravniji način analiziranja uzoraka sa svrhom kreiranja ciljanog liječenja. Sve u svemu, tehnike analize genoma i proteoma postale su moćno oruđe za proučavanje tisuća gena i proteina odjednom. Iako ćemo na rutinsku primjenu ovih tehnika još pričekati, njihovo će uključivanje u kliničke protokole biti od velikog značenja ne samo za oboljele, nego i za društvo u cjelini.

E-mail: jpavelic@irb.hr

S5-3

Aktivacija signalnih molekula u karcinogenezi

Rumora Lada

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Zagreb, Hrvatska

Tijekom posljednjeg desetljeća bazična istraživanja raka svojim su rezultatima dovela do značajnih napredaka u našem razumijevanju biologije i genetike raka. Jedna od najznačajnijih spoznaja bila je ona da programirana smrt stanice (apoptoza) i geni koji su uključeni u ovaj proces snažno utječu na maligni fenotip. Apoptoza je prirodan proces uklanjanja neželjenih stanica, poput onih s potencijalno štetnim mutacijama ili s poremećenom kontrolom tijekom staničnoga ciklusa. Poremećaji u procesu apoptoze mogu utjecati na osjetljivu ravnotežu između proliferacije stanica i njihovog umiranja, što može dovesti do razvoja različitih bolesti pa i raka. Kod mnogih tipova tumora

signature sets that can be applied to both the prognosis and prediction of treatment outcome. In addition, also of great importance is identification of molecular targets that allows the development of new tailored antitumor treatments. So far, cDNA array based gene profiling has been used to identify a number of genes involved in inherited predisposition to disease such as BRCA1/2 and APC. Analysis of medulloblastomas revealed PDGFR and the Ras/MAPK genes as those responsible for cell adhesion and mobility. Similarly Wnt5a is a molecule whose expression is highly correlated with metastatic potential in melanoma. Regarding prediction and tumor classes the best achievements were obtained in leukemias, lymphomas and breast tumors from young patients. In parallel stands also changing the treatment and management of patients. As many conventional therapies are limited by the lack of specificity, novel targeted therapies mostly based on aberrant protein signaling have come into focus. Thus, proteomic analysis represents a more direct way of analyzing cancer samples for selected or targeted therapies. Altogether, the genome-proteome techniques have become a powerful tool for the study of thousands of genes and proteins at once. Although routine application of these technologies in clinical practice will take some time, their inclusion into clinical protocols will be of great benefit not only for patients but also for the community at large.

E-mail: jpavelic@irb.hr

S5-3

Activation of signaling molecules in carcinogenesis

Rumora Lada

Department of Medical Biochemistry and Hematology, School of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

In the last decade, basic cancer research has produced remarkable advances in our understanding of cancer biology and cancer genetics. Among most important of these advances is the realization that programmed cell death (apoptosis) and the genes that control it have a profound effect on the malignant phenotype. Apoptosis is a natural process of removing unwanted cells such as those with potentially harmful mutations or alterations in the cell-cycle control. Deregulation of apoptosis can disrupt the delicate balance between cell proliferation and cell death, and can lead to diseases such as cancer. In many cancers pro-apoptotic proteins have inactivating

prisutne su inaktivirajuće mutacije u pro-apoptičnim proteinima ili je potaknuta ekspresija anti-apoptičnih proteina, što dovodi do nekontroliranog rasta tumora i do nemogućnosti stanice da odgovori na stresne poticaje, na štetne mutacije i na oštećenja DNA. Izbjegavanje stanice da umre programiranom smrću prepoznato je danas kao jedna od šest najvažnijih promjena u fiziologiji stanice koje dovode do malignoga rasta i značajka je većine, ako ne i svih tipova tumora. Provode se brojna istraživanja kako bi se što potpunije razjasnio mehanizam apoptoze, a sve u svrhu pronalazanja novih biokemijskih biljega koji bi se mogli rabiti u ranom dijagnosticiranju tumora te razvijanja novih terapijskih pristupa u liječenju različitih vrsta tumora, a koji bi bili manje toksični i mutageni od već postojećih.

Istražuju se različite molekule koje sudjeluju u procesu apoptoze, poglavito receptori smrti koji se nalaze na površini stanice i potiču apoptozu, Bcl-2 proteini koji imaju značajnu ulogu u mitohondrijskom putu apoptoze, kaspaze koje su glavni izvršitelji procesa apoptoze te endogeni inhibitori kaspaza. Tijekom predavanja govoriti će se o nekim od ovih potencijalno obećavajućih signalnih molekula koje bi mogle imati važnu ulogu u dijagnostici i/ili liječenju različitih vrsta tumora.

E-mail: lrumora@pharma.hr

S5-4

Sustav aktivatora urokinaznog plazminogena: bogat izvor tumorskih biljega

Sorić Jasna

Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, Hrvatska

Sustav aktivatora urokinazog plazminogena (sustav uPA) sastoji se od serinske proteaze uPA, receptora (uPAR) i dva inhibitora: inhibitor aktivatora plazminogena 1 (PAI 1) i inhibitor aktivatora plazminogena 2 (PAI 2). Sustav uPA ima važnu ulogu u biološkim procesima kao što su fibrinoliza, upalni procesi, stvaranje aterosklerotičnih plakova, pregradnja matriksa, tumorska invazija, angiogeneza i metastaziranje. Vezanje uPA za njegov receptor započinje proteolitičnu kaskadu koja pretvara plazminogen u plazmin. Plazmin preko svojih vlastitih proteolitičnih funkcija razgrađuje izvanstanične sastavnice bazalne membrane i aktivira druge sastavnice kao što su metaloproteinaze. Neovisno o svojoj katalitičnoj aktivnosti, uPAR je uključen i u stanično signaliziranje, interakciju s integrinima, stanično kretanje, adheziju, invaziju i angiogenezu. Prekomjerna ekspresija uPA, uPAR ili PAI 1 je značajka malignosti i

mutations or the expression of anti-apoptotic proteins is up-regulated, leading to the unchecked growth of the tumor and the inability to respond to cellular stress, harmful mutations and DNA damage. The evasion of programmed cell death has been recognized today as one of the six essential alterations in cell physiology that dictate malignant growth and is a hallmark of most, and maybe all types of cancer. An intense research effort is uncovering the underlying mechanisms of apoptosis in order to discover new biochemical markers that could be used for early diagnosis of cancer, and to produce new therapies that are less toxic and mutagenic than current treatment regimens. Apoptosis targets that are currently being explored for cancer diagnosis and drug discovery include death receptors triggering apoptosis from the cell surface, Bcl-2 proteins as the gatekeepers of the mitochondrial pathway, caspases as the executioner enzymes, or endogenous caspase inhibitors. Some of these potentially promising signaling molecules in cancer diagnosis and treatment will be discussed.

E-mail: lrumora@pharma.hr

S5-4

The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumor markers

Sorić Jasna

School of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

The urokinase plasminogen activator (uPA) system consists of the serine protease uPA, receptor (uPAR), and the two inhibitors, plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1) and plasminogen activator inhibitor 2 (PAI 2). The uPA system has an important role in biological processes including fibrinolysis, inflammation, atherosclerotic plaque formation, matrix remodeling, tumor invasion, angiogenesis, and metastasis. Binding of uPA with its receptor initiates a proteolytic cascade that results in the conversion of plasminogen to plasmin. Plasmin through its own proteolytic function degrades the extracellular basement membrane components and activates others such as metalloproteinases. Independent of the catalytic activity, uPAR is also involved in cell signaling, interactions with integrins, cell motility, adhesion and invasion, and angiogenesis. Overexpression of uPA, uPAR or PAI 1

korelira s progresijom tumora i metastaziranjem. U skladu s njihovom ulogom u diseminaciji tumora, visoke koncentracije uPA, PAI 1 i uPAR u mnogim vrstama raka koreliraju s lošim ishodom bolesti. Prognostička vrijednost uPA i PAI 1 kod bolesnica s rakom dojke koje imaju negativne limfne čvorove aksile proglašena je valjanom, rabeći i prospektivno randomizirajuće ispitivanje i udruženu analizu. Ispitivanje uPA i PAI 1 može stoga pomoći u identificiranju bolesnica s nisko rizičnim negativnim statusom limfnih čvorova aksile za koje je nepotrebna adjuvantna kemoterapija. Međutim, kod bolesnica s rakom dojke i negativnim limfnim čvorovima aksile, ali s visokim koncentracijama uPA i PAI 1 u primarnom tumoru adjuvantna kemoterapija je potrebna. Mjerenje uPA sastavnica, naročito kod bolesnica s rakom dojke, pruža mogućnost da se pomogne u individualiziranom vođenju bolesnica. Predklinička proučavanja su pokazala da ili inhibicija katalitične aktivnosti uPA ili sprječavanje vezanja uPA za njegov receptor smanjuju rast tumora, angiogenezu i metastaze. Strategije koje blokiraju uPA ili njegov receptor kako bi se poremetila njihova interakcija ili neovisno djelovanje uPAR uključuju antisensnu tehnologiju, monoklonska protutijela, citotoksične antibiotike i sintetske inhibitore uPA. Ciljana terapija je cilj budućeg liječenja tumora, a sustav uPA je dobar kandidat za takvu terapiju.

E-mail: jsoric@pharma.hr

S5-5

Pregled najnovijih smjernica za tumorske biljege

Sturgeon Catherine

Department of Clinical Biochemistry, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Velika Britanija

Sve je veći pritisak za pružanjem zdravstvene skrbi zasnovane na "najboljoj praksi". To poglavito vrijedi za medicinu karcinoma, gdje su dijagnostički postupci često invazivni, a liječenje skupo. Stoga je više skupina izradilo smjernice kako bi se potakla sve bolja primjena tumorskih biljega. Među njima je nedavno objavljen nacrt smjernica Američke akademije za kliničku biokemiju (NACB), koje su sad dostupne za raspravu na mreži (www.nacb.org), a usredotočene su na kliničke i laboratorijske aspekte primjene tumorskih biljega. Kako kvaliteta rezultata odražava događaje tijekom triju faza analize, primjereno je zahtjeve za svaki razmatrati zasebno. Prijeanalitički zahtjevi: implikacije zahtjeva za pretragu na tumorske biljege za bolesnika treba razmotriti prije postavljanja zahtjeva, kada

is a feature of malignancy and is correlated with tumor progression and metastasis. Consistent with their role in cancer dissemination, high levels of uPA, PAI 1 and uPAR in multiple cancer types correlate with adverse patient outcome. The prognostic value of uPA and PAI 1 in axillary node-negative breast cancer patients was recently validated using both a prospective randomized trial and pooled analysis. Assay of uPA and PAI 1 may thus help identify low risk node negative patients for whom adjuvant chemotherapy is unnecessary. However, for lymph node negative breast cancer patients with high levels of uPA and PAI 1 in primary tumor adjuvant chemotherapy is necessary. The measurement of uPA components, especially in breast cancer, therefore has the potential to help with individualized patient management. Preclinical studies show that either inhibition of uPA catalytic activity or prevention of uPA binding to its receptor reduces tumor growth, angiogenesis and metastasis. Strategies that target uPA or its receptor with the aim to disrupt the interaction between the two or the ligand independent action of uPAR include antisense technology, monoclonal antibodies, cytotoxic antibiotics, and synthetic inhibitors of uPA. Targeted therapy is a goal of future cancer treatment and the uPA system is a likely candidate for such therapy.

E-mail: jsoric@pharma.hr

S5-5

An overview of recent guidelines on tumor markers

Sturgeon Catherine

Department of Clinical Biochemistry, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, UK

There is an increasing pressure to provide health care based on "best practice". This is particularly true in cancer medicine, where diagnostic procedures are often invasive, and therapy expensive. A number of groups have therefore developed guidelines with the aim of encouraging improved use of tumour markers. Among these are recently published draft guidelines from the American National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), which are now available for comment on the web (www.nacb.org) and which focus on both clinical and laboratory aspects of tumour marker use. As the quality of results reflects events during the three phases of analysis, it is convenient to consider the requirements of each separately. Pre-analytical requirements: the implications for

treba odabrati najvažniji tumorski biljeg. Kad se izdaje zahtjev, pažljivo treba razmotriti vrijeme uzimanja uzorka, kao i mogući utjecaj drugih vrsta liječenja i lijekova (npr. prethodno liječenje mišjim monoklonskim protutijelima) i/ili drugih medicinskih stanja (npr. PSA kod prostatitisa) na rezultate. Uzeti uzorak (serum, plazma itd.) treba uvijek zadovoljavati zahtjeve proizvođača testa. Analitički zahtjevi: testovi trebaju uvijek ispunjavati utvrđene zahtjeve za kvalitetu u smislu Unutarnje kontrole kvalitete (IQC) (zadovoljavajući objektivne kriterije za prihvatljivost rezultata za propisno utvrđene IQC uzroke) i Vanjske kontrole kvalitete (EQA) (postizanje zadovoljavajućeg rada za uzorke klinički značajne koncentracije, idealno također procjenjujući "stabilnost" testa). Isto tako, laboratoriji trebaju na najmanju mjeru svesti mogućnost pogreške poput one uzrokovane "hvatanjem" visokih doza. Poslije-analitički zahtjevi: usredotočenost pozornosti na to kako se rabe rezultati može ohrabriti učinkovitiju kliničku primjenu pretraga na tumorske biljege. Važni su odgovarajući referentni rasponi, zajedno s nuputkom o tome što čini značajnu ili klinički važnu promjenu. U slučaju AFP i hCG poželjno je izračunavanje poluživota. Kad se mijenja metoda, laboratorij treba napomenuti je li za očekivati da to utječe na tumačenje trenda u rezultatima biljega.

E-mail: C.Sturgeon@ed.ac.uk

the patient of requesting a tumor marker test should be considered before making the request, at which time the most relevant tumour marker should be selected. When making the request, careful consideration must also be given to specimen timing, as well as to the possible influence on results of other treatment and medication (e.g., previous treatment with mouse monoclonal antibodies) and/or other medical conditions (e.g., prostatitis for PSA). The specimen taken (serum, plasma, etc.) should always meet the requirements of the assay manufacturer. Analytical requirements: assays should meet defined quality requirements for both Internal Quality Control (IQC) (fulfilling objective criteria for acceptability of results for appropriately constituted IQC samples) and External Quality Assessment (EQA) (achieving satisfactory performance for specimens of clinically relevant concentration, ideally also assessing assay "stability"). Laboratories should also minimise the possibilities of error such as that caused by high dose "hooking". Post-analytical requirements: focusing attention on how the results are used can encourage more effective clinical use of tumour marker tests. Appropriate reference ranges, together with advice as to what constitutes a significant or clinically relevant change, are important. For AFP and hCG, calculation of the half-life may be desirable. When method changes are made, the laboratory should highlight whether it is likely to have affected interpretation of the trend in marker results.

E-mail: C.Sturgeon@ed.ac.uk

S6 – Simpozij 6 – PEDIJATRIJSKA LABORATORIJSKA MEDICINA, S6-1

Laboratorijska dijagnostika septičnih stanja u djece

Kohse Klaus

Institute of Laboratory Medicine, Klinikum Oldenburg, Njemačka

Bez obzira na sav napredak u medicini, dijagnostika septičnih stanja u djece, osobito novorođenčadi, i dalje predstavlja izazov za kliničare i laboratorijske znanstvenike. Zbog iznimno malog volumena krvi dostupnog za dijagnostičke svrhe samo u malim količinama nedonoščad ispod 1000 g čini podskupinu kojoj valja posvetiti osobitu pozornost. Već dugo i dobro utvrđen proteinski biljeg za otkrivanje i motrenje sepse, CRP, čini se "presporim", jer mu koncentracije rastu tek nakon što upalno stanje traje duže od 24 h. Citokini koji se oslobađaju ranije u tijeku upalnoga procesa, npr. interleukini 6 ili 8, postupno preuzimaju ulogu dijagnostičkih parametara izbora; međutim,

S6 – Symposium 6 – PEDIATRIC LABORATORY MEDICINE, S6-1

Laboratory diagnosis of septic states in children

Kohse Klaus

Institute of Laboratory Medicine, Klinikum Oldenburg, Germany

Regardless of all medical progress, the diagnosis of septic states in children, especially in newborns, remains a challenge to clinicians and laboratory scientists. Due to their extremely small blood volume which is available for diagnostic purposes only in minute amounts, preterm newborns below 1000 g represent a subgroup to which special attention has to be paid. The long-time well-established marker protein for the detection and monitoring of a sepsis, CRP, appears to be too "slow" since concentrations rise only after the inflammatory state has persisted for more than 24 h. Cytokines released earlier during the course of an inflammatory process, e.g.,

njihova je uporaba ograničena zbog nepostojanja visoko točnih i preciznih mehaniziranih metoda koje bi se mogle provoditi u rutinskom laboratoriju u kratkom vremenu do dobivanja nalaza kroz svih 24 sata i uz primjenu uzoraka volumena manjeg od 50 µL sreuma ili plazme. Interleukin 8, koji se može pouzdano odrediti primjenom samo 10 µL krvi, obećava kao biljeg septičnih stanja, ali za njega nema potpuno automatizirane metode. U novije vrijeme uvedeno je više POCT aplikacija semikvantitativnih metoda za određivanje citokina. Međutim, njihovu pouzdanost tek treba u potpunosti dokazati. Upravo se ispituje korisnost proteina koji veže lipopolisaharide (LBP). Uloga prokalcitonina (PCT) je proturječna u novorođenčadi zbog brze promjene njegove koncentracije tijekom prvih sati života. Osobito je važno otkrivanje uzročnika sepse, tj. (najčešće) bakterijskog patogena. Molekularne metode mogle bi uskoro postati moguće alternative klasičnim mikrobiološkim tehnikama za otkrivanje, identificiranje, pa čak i za ispitivanje osjetljivosti mikroorganizama.

E-mail: kohse.klaus@klinikum-oldenburg.de

interleukins 6 or 8, have gradually occupied the role of the diagnostic parameters of choice; however, their use is limited by the lack of highly accurate and precise mechanised methods which can be performed in a routine laboratory with short turnaround times 24 hours a day using sample volumes below 50 µL serum or plasma. Interleukin 8, which may reliably be determined using only 10 µL blood, shows promise as a marker of septic states, but no fully automated method is available. A number of POCT applications of semiquantitative methods for cytokine determinations have recently been introduced. Their reliability, however, has not yet been proven sufficiently. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) is currently under investigation for its usefulness. The role of procalcitonin (PCT) is discussed controversially in newborns due to the rapid change of its concentrations during the first hours of life. Of special importance is the detection of the causative agent of the sepsis, i.e. the (mostly) bacterial pathogen. Molecular methods may soon emerge as potential alternatives to classic microbiology techniques for the detection, identification and even susceptibility testing of microorganisms.

E-mail: kohse.klaus@klinikum-oldenburg.de

S6-2

Izazovi novorođenčakog probira

Fumić Ksenija

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Novorođenački probir podrazumijeva sustavno pretraživanje cjelokupne populacije novorođenčadi određenog dijela ili cijele države na one bolesti koje su dostupne liječenju, a koje se klinički ne mogu dovoljno rano prepoznati. Da bi se neka bolest uvrstila u nacionalni program novorođenačkog probira, preporuka je zadovoljiti uvjete Svjetske zdravstvene organizacije koje su još 1968. godine postavili Wilson i Junger: razumno visoka učestalost, dostupnost liječenju, nemogućnost rane kliničke dijagnoze, prikladan laboratorijski test te povoljan odnos troškova programa prema ekonomskoj koristi od ranog otkrivanja i liječenja. No, ovisno o ekonomskim mogućnostima i zdravstvenoj politici nekih zemalja, u nacionalne programe novorođenačkog probira postupno su se uvodile i bolesti koje samo djelomice zadovoljavaju prije navedene uvjete: nedostatak biotinidaze, galaktozemija, cistična fibroza, neuroblastom, Duchenneova mišićna distrofija i

S6-2

The challenges of neonatal screening

Fumić Ksenija

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Neonatal screening implies systematic screening of the entire neonate population in a part of or in a country as a whole for the diseases eligible for treatment which cannot be clinically recognized early enough. For a disease to be included in the national program of neonatal screening, the requirements posed by the World Health Organization and originally proposed by Wilson and Junger as early as 1968 should be met: reasonably high prevalence, treatment availability, impossible early clinical diagnosis, appropriate laboratory test, and favorable ratio of the program cost to economic benefits of early detection and treatment. However, diseases that have only partially met the above criteria, e.g., biotinidase deficiency, galactosemia, cystic fibrosis, neuroblastoma, Duchenne's muscular dystrophy, and many others have been gradually included in the national programs of neonatal screening, depending on the economic resources and health policy

brojne druge. Prije deset godina počelo je i uvođenje tandemске spektrometrije masa (MS-MS) u programe novorođenačkog probira. Ta moćna tehnologija omogućila je otkrivanje specifičnih metabolita iz suhe kapi krvi za preko 30 nasljednih metaboličnih bolesti, ali samo mali dio njih je moguće i odgovarajuće liječiti. Mogućnost te tehnologije koristi se na razne načine i u pokusnim programima novorođenačkog probira lizosomskih bolesti nakupljanja. Programi novorođenačkog probira predstavljaju važan dio preventivne medicine. U Republici Hrvatskoj zasad je takav program organiziran za nasljednu metaboličnu bolest fenilketonuriju i konatalnu hipotireozu. U posljednje vrijeme nove tehnologije stvorile su mogućnosti za proširenje tog programa, ali mišljenja stručnjaka o toj problematici u pojedinim državama još se bitno razlikuju. Na njih utječu razlike u organizaciji zdravstvenog sustava, kulturni i vjerski običaji, te utjecaj javnog mišljenja i nevladinih organizacija. Valja napomenuti kako već i sama mogućnost pre-simptomatske dijagnostike otvara niz ozbiljnih etičkih dilema i potrebno je u raspravu aktivno uključiti sve koji skrbe za takve bolesnike u pojedinoj državi.

E-mail: ksenija.fumic@zg.htnet.hr

S6-3

Neonatalna hiperbilirubinemija i Gilbertov sindrom

Furlan Danijela

Splošna bolnišnica Novo mesto, Slovenija

Hiperbilirubinemija je stanje povišene koncentracije bilirubina u krvi. Ovdje govorimo o patološkoj nekonjugiranoj neonatalnoj hiperbilirubinemiji kad koncentracija bilirubina u serumu prelazi 220 $\mu\text{mol/L}$. Toksični bilirubin, koji je lipofilan i može slobodno prolaziti kroz krvno-moždanu barijeru, ugrožava život novorođenčeta. Nekonjugirana hiperbilirubinemija može biti rezultat prirođenog poremećaja funkcije enzima glukuronizacije. Ako je aktivnost uridin difosfat glukuronil transferaze smanjena na 20%-50%, govorimo o Gilbertovu sindromu (GS). GS je uzrokovano polimorfizmom gena UGT1A1 u promotorskoj regiji. Izraženost gena je smanjena zbog insercije dodatnog TA para u element A(TA)₆TAA, tako da nastaje A(TA)₇₋₈TAA. Fototerapija je najuspješniji oblik liječenja neonatalne hiperbilirubinemije, ali može biti praćena nuspojavama. Kako bismo optimirali trajanje ozračivanja, pratili smo sniženje serumske koncentracije bilirubina za vrijeme ozra-

of particular countries. Some ten years ago, tandem mass spectrometry (MS-MS) was initially introduced in the program of neonatal screening. This powerful technology has enabled identification of specific metabolites from a dry blood drop for more than 30 hereditary metabolic disorders of which only a minor part can be properly treated. The opportunities offered by this technology have also been used in a number of modes in the pilot programs of neonatal screening for lysosomal storage diseases. The programs of neonatal screening are an important segment of preventive medicine. In Croatia, such a program has been launched for the hereditary metabolic disease phenylketonuria and perinatal hypothyroidism. Novel technologies have lately opened the possibility of program expansion, however, expert opinions on the issue still greatly vary among different countries, being influenced by differences in the structure of health care system, cultural and religious conventions, public opinion, and non-governmental structures. It should be noted that the very possibility of presymptomatic diagnosis opens an array of serious ethical issues, thus the respective debate should actively include all those providing care for these patients in a particular country.

E-mail: ksenija.fumic@zg.htnet.hr

S6-3

Neonatal hyperbilirubinemia and Gilbert syndrome

Furlan Danijela

Novo Mesto General Hospital, Novo Mesto, Slovenia

Hyperbilirubinemia is a state of increased bilirubin concentration in blood. We talk about pathological non-conjugated neonatal hyperbilirubinemia when the bilirubin concentration in serum exceeds 220 $\mu\text{mol/L}$. Toxic bilirubin, which is lipophilic and can freely pass through the blood-brain barrier, threatens the life of newborn infants. Non-conjugated hyperbilirubinemia can be the result of congenital impaired function of the glucuronization enzyme. If the activity of the uridine diphosphate (UDP) glucuronyl transferase is decreased to 20%-50%, we talk about Gilbert syndrome (GS). GS is caused by the gene UGT1A1 polymorphism at the promotor region. Expression of the gene is decreased due to an insertion of additional TA pair into the A(TA)₆TAA element, so that A(TA)₇₋₈TAA is formed. Phototherapy is the most successful treatment of neonatal hyperbilirubinemia, but side effects can occur. In order to optimize the duration

čivanja pomoću dviju laboratorijskih metoda. Cilj nam je isto tako bio procijeniti učestalost GS u slovenskoj populaciji. Koncentracija bilirubina određivala se je primjenom Jendrassik-Grofove (JG) metode (ukupni bilirubin) i modificirane kapilarne elektroforeze (CE) (nekonjugirani bilirubin) u 27 novorođenčadi podijeljene u tri skupine prema trajanju ozračivanja (4, 8 i 12 sati). Nakon izolacije DNA plazme, polimorfizam gena UGT1A1 određen je u 236 zdravih odraslih osoba u segmentu DNA umnoženom pomoću PCR primjenom SSCP analize. Osmotna fototerapija dovela je do statistički značajnog sniženja vrijednosti bilirubina prema objema metodama: uz JG metodu 17,3% ($p < 0,01$) i uz CE 17,8% ($p = 0,048$). Nakon 12 sati ozračivanja sniženje koncentracije bilirubina bilo je također statistički značajno: uz JG 20,0% ($p = 0,029$) i uz CE 26,2% ($p = 0,012$). Incidencija TA polimorfizma u slovenskom pučanstvu sukladna je prosječnoj učestalosti u bjelačkoj populaciji. Mi smo utvrdili 13,9% homozigota s genotipom 7/7, 47,8% heterozigota s genotipom 6/7 i 37,7% osoba s genotipom 6/6. Studije dokazivanja polimorfizma u novorođenčadi s hiperbilirubinemijom još su u tijeku. Na osnovi rezultata dobivenih dvjema laboratorijskim metodama preporučamo 8-satnu fototerapiju za postizanje statistički značajnog sniženja koncentracije bilirubina. Kako je enzim UDP glukuronil transferaza uključen u glukuronizaciji određenih lijekova, dokazivanje GS je vrlo važno u slučaju novorođenčadi s hiperbilirubinemijom.

E-mail: danijela.furlan@sb-nm.si

of irradiation we studied the serum bilirubin concentration decrease during irradiation using two laboratory methods. Our objective was also to assess the prevalence of GS in the Slovenian population. In 27 newborn infants divided into three groups on the basis of the duration of irradiation (4, 8 and 12 hours), we determined the concentration of bilirubin using the Jendrassik-Grof (JG) method (total bilirubin) and modified capillary electrophoresis (CE) (non-conjugated bilirubin). After plasma DNA isolation, the UGT1A1 gene polymorphism was determined in 236 healthy adults in the DNA segment multiplied by PCR using the Single Strand Conformation Polymorphism analysis. The 8-hour phototherapy resulted in a statistically significant decrease in bilirubin values as assessed by either method: a decrease by 17.3% ($p < 0.01$) by JG method and by 17.8% ($p = 0.048$) by CE. After 12 hours of irradiation the decrease in the bilirubin concentration was also statistically significant: 20.0% ($p = 0.029$) by JG method and 26.2% ($p = 0.012$) by CE. The incidence of TA polymorphism in the Slovenian population was found to be consistent with the average prevalence in the Caucasian population in general. We detected 13.9% of homozygotes with 7/7 genotype, 47.8% of heterozygotes with 6/7 genotype, and 37.7% of individuals with 6/6 genotype. The studies of the polymorphism detection in newborns with hyperbilirubinemia are still in progress. Considering the results obtained by use of two laboratory methods, we recommend 8-hour phototherapy to achieve a statistically significant decrease in the bilirubin concentration. Because the UDP glucuronyl transferase enzyme takes part in the glucuronization of certain medications, detection of GS is of utmost importance in newborns with hyperbilirubinemia.

E-mail: danijela.furlan@sb-nm.si

S6-4

Laboratorijska dijagnostika alergijskih bolesti

Dodig Slavica

Dječja bolnica Srebrnjak, Referalni centar Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi za kliničku alergologiju djece, Zagreb, Hrvatska

Među kroničnim dječjim bolestima alergijske su bolesti najčešće. Uglavnom se očituju simptomima na gornjim (rinitis) i donjim (astma) dišnim putovima, te na koži (atopijski dermatitis, urtikarija, angioedem) i probavnom sustavu (ezofagitis, gastroenterokolitis). Mogu biti različitih stupnjeva težine: od blagih atopijskih (ekcem, rinitis, as-

S6-4

Laboratory diagnosis of allergic diseases

Dodig Slavica

Srebrnjak Children's Hospital, Reference Center for Clinical Pediatric Allergology of the Croatian Ministry of Health and Social Welfare, Zagreb, Croatia

Allergic diseases are the most common chronic diseases in childhood, which can manifest on upper (rhinitis) and lower (asthma) airways, skin (atopic dermatitis, urticaria, angioedema) and gastrointestinal system (esophagitis, gastroenterocolitis). The severity of allergic diseases can vary from mild atopic (eczema, rhinitis, asthma) or malab-

tma) i malapsorpcijskih simptoma (dijareja, blago usporan rast djeteta) do akutne, za život opasne anafilaksije. Alergijski hod označava postupan prelazak simptoma alergijskih bolesti s jednog organskog sustava na drugi: u najranijoj dobi na probavnom sustavu, potom na koži; od 3. godine na donjim dišnim putovima; u školskoj dobi odnosno pubertetu na gornjim dišnim putovima. Zahtjevi što se postavljaju medicinskim biokemičarima odnose se na odabir pretraga koje bi trebale:

1. odrediti vrstu alergijske reakcije dokazivanjem humoralnih i staničnih posrednika alergijske reakcije. Primjenjuje se određivanje:
 - koncentracije ukupnog IgE
 - broja eozinofilnih i bazofilnih granulocita (test degranulacije), funkcija limfocita
 - koncentracija ECP
 - membranskih biljega bazofilne aktivacije, CD63 i CD45
 - oslobođenoga histamina iz bazofilnih granulocita.
2. otkriti pokretače alergijske reakcije određivanjem:
 - koncentracije specifičnih IgE (katkad i specifičnih IgG) na uzročne alergene
 - koncentracije antiglijadinskih (AGA-IgA,G), endomizijalnih (EMA-IgA) antitijela, te IgA-antitijela na tkivnu transglutaminazu (IgA-tTG) u djece sa celijakijom.
3. procijeniti klinički tijek reakcije (rana, kasna, produljena) određivanjem:
 - postojećih medijatora: triptaza (rana reakcija), ECP (kasna reakcija)
 - sintetiziranih posrednika alergijske reakcije: leukotrijena nakon izlaganja bazofilnih granulocita uzročnim alergenima (CAST).
4. omogućiti praćenje uspješnosti specifične imunoterapije određivanjem:
 - koncentracije specifičnih IgG
 - koncentracije blokirajućih podrazreda IgG4.
5. odrediti dijagnostičku djelotvornost određivanja pojedinih humoralnih ili staničnih posrednika alergijske reakcije određivanjem:
 - dijagnostičke osjetljivosti
 - dijagnostičke specifičnosti
 - pozitivne i negativne prediktivne vrijednosti.

E-mail: slavica.dodig@zg.t-com.hr

sorption (diarrhea) to acute, life-threatening anaphylaxis. Allergic march describes the chronologic progression from one clinical manifestation of allergy to the next one. Early life allergy under 3 years of age usually involves the gastrointestinal system, from 3 years on the skin, and thereafter up to puberty it involves lower airways (asthma). As asthma begins to stabilize, allergic rhinitis (upper airways) becomes a common manifestation of allergic disease in adolescents. Clinical chemist must be capable to implement such analyses that can:

1. define the type of allergic reaction (IgE-mediated, non-IgE mediated) – by determination of:
 - concentration of total IgE,
 - number of eosinophil granulocyte, basophil granulocyte (degranulation test), lymphocyte function tests,
 - concentration of ECP,
 - markers of basophilic activation, CD63 and CD45,
 - histamine release from activated basophil granulocytes.
2. find out the triggers of allergic reaction – by determination of:
 - concentration of allergen-specific IgE (sometimes allergen-specific IgG),
 - concentration of antigliadin antibodies (AGA-IgA,G), anti-endomysial antibodies (EMA-IgA), and human tissue transglutaminase IgA (IgA-tTG) in children with celiac disease.
3. assess the clinical course of allergic reaction (early, late, extended) – by determination of:
 - primary mediators: tryptase (early reaction), ECP (late reaction),
 - secondary mediators: leukotrienes after exposure of basophil granulocyte to provocative allergens (CAST).
4. monitoring of specific immunotherapy – by determination of:
 - concentration of specific IgG,
 - concentration of IgG4 as blocking antibodies.
5. estimate diagnostic efficiency of particular humoral and cellular mediators of allergic reaction – by determination of:
 - diagnostic sensitivity,
 - diagnostic specificity,
 - positive and negative predictive value.

E-mail: slavica.dodig@zg.t-com.hr

S6-5

Proteomski i genski biljezi autoimunih bolesti u djece

Berecki Igor

Odjel za dječje bolesti, Klinička bolnica Osijek, Osijek, Hrvatska

Iako je etiopatogenetski koncept autoimunosti poznat već pola stoljeća, čak i uz enormnu ekspanziju biomedicinske tehnologije zadnjih dvadesetak godina, autoimune bolesti su još uvijek i kliničarima i biokemičarima svojevrsna "zona sumraka", često predstavljajući zamršeni dijagnostički i terapijski izazov. Klasični dijagnostički pristup autoimunosti, još davno utemeljen na imunološkim i serološkim tehnikama (raznovrsnim metodama detektiranja cirkulirajućih autoantitijela i prikaza njihove imunopatološke interakcije sa oboljelim stanicama i tkivima), zahtijeva korištenje složenih dijagnostičkih algoritama čija kumulativna senzitivnost, specifičnost i prediktivnost često ne dosižu klinički zadovoljavajuću razinu pouzdanosti.

Brzo i precizno uspostavljanje ispravne dijagnoze autoimune bolesti u pedijatrijskih bolesnika je zaseban imperativ, jer pravovremena i ispravna dijagnoza ne znači samo brzo započinjanje adekvatnog terapijskog postupka, nego i priliku za sekundarnu i tercijarnu prevenciju komplikacija i kroničnih posljedica sistemnih ili organskih autoimunih bolesti u djece.

Napredak kliničkih spoznaja o etiopatogenezi autoimunih bolesti, potpomognut uvođenjem suvremenih tehnika analize pojedinačnih humanih gena, ljudskog genoma u cijelosti, kao i razumijevanjem neposredne povezanosti proteinskih produkata ljudskih gena (proteoma) sa kliničkom ekspresijom autoimunih bolesti, omogućio je razvijanje novih analitičkih postupaka koji u sebi objedinjavaju dostignuća i biokemijske i genetičke tehnologije, a sa ciljem preciznog definiranja genskih i proteinskih biljega involviranih u patogenezu autoimunosti. Štoviše, definiranje točnih genetskih, genomskih i proteomskih biljega autoimunih bolesti u djece nije samo od neposredne dijagnostičke vrijednosti u prepoznavanju već razvijene slike bolesti, nego ima i visoku prediktivnu vrijednost u autoimunih bolesti, jer one načelno imaju dugotrajnu asimptomatsku, prekliničku fazu.

Perspektivno, takvi biljezi bi mogli služiti i kao sredstvo biokemijsko-genetičkog probira potencijalnih pedijatrijskih bolesnika unutar zdrave populacije. Naposljetku, laboratorijsko prepoznavanje genetičkih uzroka autoimunih bolesti u svjetlu snažnog razvoja novih tehnologija sekvencijske analize humanog genoma i genetskog dizajniranja rekombinantnih proteina, otvara neslućene mogućnosti u sve izvjesnijoj budućoj primjeni specifične genske terapije autoimunih bolesti u djece.

E-mail: berecki.igor@kbo.hr

S6-5

Proteomic and genetic markers of autoimmune diseases in children

Berecki Igor

Department of Pediatrics, Clinical Hospital Osijek, Osijek, Croatia

Although the etiopathogenic postulates of autoimmunity have been established almost a five decades ago, autoimmune diseases still present a kind of "twilight zone" for clinicians and biochemists, being a complex diagnostic and therapeutic challenge in spite of tremendous expansion of biomedical technologies during the recent years. Classical diagnostic approach to autoimmunity, based on immunological and serological techniques (including numerous methods of circulating antibodies detection and their interactions with affected cells and tissues), engages the complicated diagnostic algorithms, often with a questionable degree of cumulative sensitivity, specificity and positive predictive value.

It is a clinical necessity to establish a fast and accurate diagnoses in pediatric patients suffering from the autoimmune diseases, because the early and correct diagnoses enables not only the adequate therapeutic measures, but also the opportunity for secondary and tertiary prevention of complications and chronic consequences of the systemic or organ-specific autoimmune diseases in children.

The still expanding clinical knowledge about the etiopathogenesis of the autoimmune diseases, facilitated by introducing of the novel techniques for analysis of individual genes and the whole human genome, together with the understanding of etiological links between the peptide products of human genes (proteoms) and clinical expression of the autoimmune diseases, have lead to development of new analytic procedures based on biochemical and genetic accomplishments, aiming to precisely define the genetic, genomic and proteomic markers involved in autoimmune pathogenesis. Moreover, the accurate genetic, genomic and proteomic autoimmune markers definition could not only be of the immediate diagnostic value, but could also be highly predictive for the autoimmune diseases which usually have a long asymptomatic preclinical period.

In the future, these markers will probably be the useful tool for the biochemical and genetic screening of autoimmune diseases among the healthy pediatric population. Finally, propelled by enormous development of new technologies of human genome sequential analysis and genetic design of recombinant proteins, recognition of the genetic causes of autoimmunity will open a huge variety of possibilities for designing of specific gene therapy for autoimmune diseases in children.

E-mail: berecki.igor@kbo.hr

S7 – Simpozij 7 – GENSKJE BOLESTI – NOVI PROFILI PRETRAGA, S7-1**Osiguranje kvalitete – EQA**

Neumaier Michael

Institute of Clinical Chemistry, Mannheim Medical Faculty of the University of Heidelberg, Njemačka

Molekularni testovi našli su put do kliničkog laboratorija. Sve više dijagnostičkih laboratorija rabi sve veći broj genetičkih pretraga. Za razliku od posljednjih godina, danas je to dopunjeno sve većim izborom komercijalnih setova i dijagnostičkih testova. Nadalje, u skoroj budućnosti biti će dostupni višeparametrijski sustavi testova, koji će laboratorijskim znanstvenicima omogućiti dobivanje desetaka i stotina genotipova iz samo jednog uzorka. Uz genotipiziranje, rutinski je dostupna kvantitativna analiza genske ekspresije, kao i epigenetičko profiliranje. Bez obzira na pitanje etičkih, zakonskih i socijalnih implikacija široko rasprostranjenog genetičkog testiranja, osiguranje kvalitete mora biti središnje pitanje u nadolazećim godinama, jer se je pokazalo kako se nedostaci u genetičkom testiranju mogu utvrditi u prijeanalitičkoj, analitičkoj i poslijeanalitičkoj fazi ispitivanja. Valja ustanoviti i unutarnje protokole i vanjske programe procjene kvalitete (EQAP) za genetički laboratorij. U posljednjih 10 godina donešeno je više EQAP u području humane genetike i kliničke kemije za provjeru dijagnostičkih testova u laboratorijima sudionicima. Prikazati će se izvori za takve EQAP. Nedavno je ustanovljen metodološki program EQAP (EQUAL) unutar programa EU FP6, koji se bavi procjenom kvalitete u genotipiziranju, kvantitativnoj PCR i sekvencioniranju DNA. Čini se kako metodološki, tj. tehnički problemi nisu rijetki u području genetičkog testiranja usprkos široko dostupnim sastavnicama laboratorijskih setova, te mogu dovesti do pogrešnih rezultata. EQUAL je otišao korak dalje nudeći radionice za izobrazbu i semestralnu poduku za one koji postižu slabije rezultate u okviru programa EQUAL. Nakon izobrazbe sudionici su bili daleko uspješniji na slijedećem EQAP, dokazujući kako procjena analitičke i dijagnostičke sposobnosti treba biti važno mjesto u kontekstu genetičkog testiranja (i vjerojatno u svim područjima laboratorijskih znanosti). Uz raspravu će se prikazati primjeri za gore navedeno.

*E-mail: michael.neumaier@ikc.ma.uni-heidelberg.de***S7 – Symposium 7 – GENETIC DISEASES – NEW TEST PROFILES, S7-1****Quality assurance – EQA**

Neumaier Michael

Institute of Clinical Chemistry, Mannheim Medical Faculty of the University of Heidelberg, Germany

Molecular testing has found its way into clinical laboratory. An increasing number of genetic tests are being used by a rapidly growing number of diagnostic laboratories. In contrast to recent years, this is now complemented by a growing number of commercial kits and diagnostic tests. Furthermore, the very near future will bring multiparametric test systems allowing the laboratory scientist to obtain dozens and hundreds of genotypes from a single specimen. Next to genotyping, quantitative gene expression analysis and epigenetic profiling are also routinely available. Regardless of the question of ethical, legal and social implications of wide-spread genetic testing, quality assurance has to be a central issue in the coming years, since it has been shown that failures in genetic testing can be identified in preanalytical, analytical and postanalytical investigational steps. Both internal schemes and external quality assessment programs (EQAPs) need to be defined for the genetic lab. Over the last 10 years, a number of EQAPs have been established in the area of human genetics and clinical chemistry challenging diagnostic tests in the participating labs. Sources for such EQAPs will be given. Very recently, a methodological EQAP program (EQUAL) has been established within the EU FP6 program dealing with quality assessment in genotyping, quantitative PCR and DNA sequencing. It appears that methodological, i.e. technical problems are not uncommon in the genetic testing area despite the widely available laboratory kit components and can lead to failures in the results. EQUAL has gone one step beyond offering training workshops and sessions to under-achievers in the EQUAL program. Following training, the participants scored significantly higher in the next EQAP demonstrating that the assessment of analytical and diagnostic proficiency should be an important issue in the context of genetic testing (and probably in all areas of laboratory sciences). Examples will be given and discussed.

E-mail: michael.neumaier@ikc.ma.uni-heidelberg.de

S7-2

Molekularni i biokemijski profili pretraga za nasljedne bolesti

Sertić Jadranka

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Danas postoji više od 3000 poznatih nasljednih bolesti koje uzrokuju mutacije u DNA kodu. Srećom sve su te bolesti u općoj populaciji rijetke, no znakovite za određene etničke skupine i mogu se očitovati u djetinjstvu, ali i odrasloj dobi. U većini slučajeva liječenje nije moguće ili je ograničenog dometa, a očekivani životni vijek i kvaliteta života su ozbiljno ugroženi. Navedene se bolesti uobičajeno prenose autosomno-recesivnim, dominantnim ili X-vezanim nasljeđivanjem, a u njihovim ispitivanjima rabe se genetika, genomika i proteomika. Ispitivanje nositelja i prijenatalna dijagnostika za ove bolesti uglavnom nisu mogući konvencionalnim metodama ili su obilježeni ograničenom točnošću i osjetljivošću. Nasuprot tome, molekularno ispitivanje nukleinskih kiselina (DNA, RNA) primjenom analize ulomaka, sekvenciranjem i *chip* tehnologijom, uz obvezno sudjelovanje u međunarodnim kontrolama (EMQN), visoko je osjetljivo i pouzdano u prijenatalnoj i poslijenatalnoj dijagnostici za slijedeće nasljedne poremećaje: cistična fibroza, spinalna mišićna atrofija, mišićna distrofija tipa Duchenne, miotonična distrofija I i II, nasljedne motorne i senzorne neuropatije (CMT, HNPP), sindrom fragilnog X, Friedreichova i spinocerebelarne ataksije, Huntingtonova koreja, hemokromatoza, deficit alfa-1-antitripsina, hiperkolesterolemija, muška neplodnost, prirođena agenezija *ductus deferens* i genodermatoze. Modernu laboratorijsku dijagnostiku nasljednih bolesti čine profili koji uključuju biokemijske i molekularne pretrage; tako, na primjer, kod X-vezane mentalne smetnje profil laboratorijskih pretraga čine T4, TSH, amino i organske kiseline u mokraći, citogenetika i molekularna genetika fragilnog X-kromosoma; kod cistične fibroze određuju se kloridi u znoju i mutacije u genu CFTR; kod mišićne distrofije profil pretraga uključuje CK i analizu gena i proteina; kod spontanih pobačaja to su LH, T4, TSH, FSH, SHBG, estradiol, prolaktin, kardiolipinska protutijela, lupus anti koagulant i analiza kromosoma; kod muške neplodnosti FSH, LH, prolaktin, testosteron, SHBG i FAI, status željeza, citogenetička analiza kromosoma i molekularna genetika koja uključuje mikrodeleciju kromosoma Y (regije AZFa, b i c), te probir na mutacije gena CFTR za cističnu fibrozu; kod hemokromatoze kao najčešće nasljedne bolesti profil pretraga obuhvaća željezo, TIBC, feritin i DNA pretrage

S7-2

Molecular and biochemical test profiles for hereditary disorders

Sertić Jadranka

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Currently there are over 3000 known hereditary genetic diseases caused by mutations in the DNA code. Fortunately, they all are rare in the general population, yet common in specific ethnic groups where they may manifest in childhood but also during adult age. In most cases, treatment is either unavailable or of limited benefit, and life expectancy and quality of life are severely compromised. These conditions are typically transmitted by autosomal recessive, dominant or X-linked inheritance, and their investigation involves genetics, genomics and proteomics. Carrier testing and prenatal diagnosis for these conditions by conventional methods are either unavailable or of limited accuracy and sensitivity. In contrast, molecular analysis of nucleic acids (DNA, RNA) that includes fragment analysis, sequencing and chip technology, and obligatory international quality control (EMQN), is extremely sensitive and reliable in prenatal and postnatal diagnosis of the following hereditary disorders: cystic fibrosis, spinal muscular atrophy, Duchenne muscular dystrophy, myotonic dystrophies I and II, hereditary motor and sensory neuropathies (CMT, HNPP), fragile X syndrome, Friedreich's and spinocerebellar ataxias, Huntington's chorea, hemochromatosis, alpha-1-antitrypsin deficiency, hypercholesterolemia, male infertility, congenital agenesis of ductus deferens, and genodermatoses. Modern laboratory diagnosis consists of profiles that include biochemical and molecular tests. Thus, e.g., laboratory test profile for X-linked mental handicap involves T4, TSH, urine for amino and organic acids, cytogenetics and molecular genetics of fragile X chromosome; cystic fibrosis profile includes determination of sweat chlorides and CFTR gene mutations; muscular dystrophy profile includes CK and analysis of dystrophin gene and protein; recurrent miscarriage profile (female) includes LH, T4, TSH, FSH, SHBG, estradiol, testosterone, prolactin, cardiolipin antibodies, chromosome analysis and lupus anticoagulant; male infertility profile includes FSH, LH, prolactin, testosterone, SHBG and FAI, iron status, cytogenetic chromosome analysis, and molecular genetics that involves Y chromosome microdeletion (AZFa, b and c regions), and screening for CFTR gene mutations for cystic fibrosis; test profile for hemochromatosis as the

mutacija C282Y, H63D; kod duboke venske tromboze pretrage KKS, kardiolipinska protutijela, faktor II (G20210A), faktor V Leiden (G1691A). Profili biomarkera za nasljedne bolesti danas su ključni dio laboratorijske dijagnostike, jer pružaju informacije na staničnoj i biokemijskoj razini pri identifikaciji nositelja, dijagnostici oboljelog fetusa te u dijagnostici ovih bolesti u odrasloj dobi.

E-mail: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

most frequent hereditary disease comprises iron, total iron binding capacity, ferritin, and DNA tests for C282Y and H63D mutations; deep vein thrombosis screening includes FBC, cardiolipin antibodies, factor II prothrombin mutation (G20210A) and factor V Leiden mutation (G1691A). Biomarker profiles for hereditary diseases are currently the essential part of laboratory diagnosis as they provide information at both cellular and biochemical level during carrier identification, diagnosis of an affected fetus, and diagnosis of the above disorders at adult age.

E-mail: jadranka.sertic@kbc-zagreb.hr

S7-3

Uloga protrombotičnih rizičnih čimbenika u cerebrovaskularnim bolestima u djece

Zadro Renata

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Cerebrovaskularne bolesti (CVB) u dječjoj dobi su relativno rijetke s učestalošću od 2,3/100.000 na godinu, ali se ubrajaju u deset vodećih uzroka smrti. Za nastanak cerebrovaskularnih događaja poznati su rizični čimbenici bez genetičke podloge, a unatoč iscrpnim ispitivanjima etiološki čimbenik ili udruženi uzročnici ostaju nepoznati u 20–50% slučajeva. Dobro ustanovljeni genetički poremećaji povezani s moždanim udarom su anemija srpastih stanica, Fabrijeva bolest, MELAS, *moya-moya*, homocistinurija i nasljedni poremećaji metabolizma lipida. Postoje također podaci koji upućuju na važnost protrombotičnih poremećaja zbog promjena na razini gena koji reguliraju čimbenike zgrušavanja i fibrinolize. Iako su različiti genetički poremećaji proteina koji reguliraju sustav zgrušavanja i fibrinolize (FV Leiden, PT 20210A, nedostatak antitrombina, proteina C i proteina S) ustanovljeni kao rizični čimbenici za nastanak venske tromboze u odraslih, povezanost tih čimbenika s razvojem arterijske tromboze nije dokazana. Kako se rezultati ispitivanja u odraslih ne mogu preslikati na dječju dob zbog fiziološke razlike u hemostazi, učestalosti tromboze i uključenosti pojedinih rizičnih čimbenika, u posljednje vrijeme sve je veće zanimanje za utvrđivanje moguće genetičke podloge za nastanak CVB u djece. Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazali su na povezanost nekoliko genetičkih rizičnih čimbenika tromboze s moždanim udarom: izolirani nedostatak proteina C, FV Leiden, PT20210A, MTHFR C677T i povišene vrijednosti lipoproteina(a). Za ostale trombofilne čimbenike poput PAI-1 4G/4G, FV HR2 haplotipa, nedostatka proteina

S7-3

The role of prothrombotic risk factors in children with cerebrovascular disease

Zadro Renata

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Although relatively rare in childhood, cerebrovascular diseases (CVD) are among the ten leading causes of death in children, with an incidence of 2.3/100,000 per year. Non-genetic risk factors responsible for the occurrence of cerebrovascular events are widely known, whereas the etiologic factor or combined causative agents remain obscure in 20%–50% of cases despite exhaustive investigations. The well established genetic disorders associated with stroke are: sickle cell anemia, Fabry disease, MELAS, *moya-moya* disease, homocystinuria and familial lipid abnormalities. There also are data indicating the importance of prothrombotic abnormalities due to defects in the coagulation and fibrinolytic system. Although various genetic disorders of the proteins regulating coagulation system and fibrinolysis (FV Leiden, PT 20210A, antithrombin, protein C and protein S deficiency) have been established as risk factors for the occurrence of venous thrombosis in adults, the correlation between these factors and the development of arterial thrombosis is not conclusive. As results of studies in adults cannot be valid for the child's age due to physiologic difference in hemostasis, thrombosis frequency and involvement of individual risk factors, a growing interest has recently been observed in determination of the possible genetic basis of CVD in children. The results show that several genetic coagulation defects can be associated with stroke including isolated protein C deficiency, PT20210A, FV Leiden, methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR C677T polymorphism) and elevated lipoprotein(a). Other factors

S i antitrombina nije dokazano da su povezani s povećanim rizikom moždanog udara u djece. Udruženost rizičnih čimbenika povezanih s nastankom moždanog udara najčešće uključuje FV Leiden i nedostatak proteina C, FV Leiden i povišenu vrijednost lipoproteina(a) ili MTHFR C677T. Također je pokazano da je prisutnost genetičkih rizičnih čimbenika povezana s ponovljenim moždanim udarom kod 3,3% do 19% djece. Učestalost genetičkih čimbenika razlikuje se također prema dobi, geografskom području i etiologiji moždanog udara. U zaključku, genetički čimbenici igraju značajnu ulogu u genezi moždanog udara u djece, a genetička ispitivanja kod djece mogu dati važne informacije za terapiju, prevenciju i ishod moždanog udara u djece.

E-mail: rzadro@mef.hr

S7-4

Patobiokemija karcinoma

Neumaier Michael

Institute of Clinical Chemistry, Mannheim Medical Faculty of the University of Heidelberg, Njemačka

Kolorektalni karcinom (CRC) je jedan od vodećih uzroka smrti od malignih bolesti u zapadnim civilizacijama. Tijekom posljednjih desetljeća incidencija CRC je u porastu. CRC je isto tako među najbolje istraženim karcinomima, bitan za naše razumijevanje razvoja neoplazije. Osobito je pokazano kroz uredan slijed genetskih defekata kako će se neoplazija razvijati i napredovati u potpun karcinom i metastaze (višestupanjska karcinogeneza, prema B. Vogelsteinu). Međutim, manje se zna o ranim fazama tumorskog razvoja koje prethode genetskim defektima kritičnih gena "vratar" ili "njegovatelja" poput wnt-signaliziranja/APC odnosno hMLH1/hMSH2. Danas postaje jasno da bi ovi dugo vremena smatrani prvim uzrocima mogli imati preteče u smislu negenetičkih defekata predstavljenih epigenetičkim pojavnostima poput genske metilacije ili drugih mehanizama koji utječu na razvojnu ili tkivno-specifičnu gensku izraženost zbog zasad nepoznatog razloga. Nas su zanimala najranija poznata tumorska oštećenja, te smo opisali izraženost staničnih adhezijskim molekula CEACAM tijekom diferencijacije stanica sluznice kolona. Primjerice, utvrdili smo kako je izraženost CEACAM1 regulirana naniže ili se gubi u velike većine vrlo ranih tumorskih stadija. Gubitak CEACAM1 zapaža se s istom učestalošću i u hiperplastičnim i u neoplastičnim tumorskim entitetima, te nastupa prije mutacije APC. Isto tako, gubitak CEACAM1 se zapaža u ranom i uznapredo-

including plasminogen activator inhibitor 4G/4G, Factor V HR2 haplotype, protein S and antithrombin deficiency alone have not demonstrated an increased risk of pediatric stroke. Frequent combinations of genetic risk factors associated with stroke include FV Leiden and protein C deficiency, FV Leiden and elevated lipoprotein(a) or MTHFR C677T polymorphism. It has also been shown that genetic risk factors are associated with stroke recurrence in 3.3%-19% of children. The frequency of genetic factors differs according to age, geographic region, and stroke etiology. In conclusion, genetic factors play a greater role in the genesis of stroke in children than in adults, and genetic studies in children could provide important information regarding the treatment, prevention and outcome in children and adults with stroke.

E-mail: rzadro@mef.hr

S7-4

Cancer pathobiochemistry

Neumaier Michael

Institute of Clinical Chemistry, Mannheim Medical Faculty of the University of Heidelberg, Germany

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of death from malignancy in western civilizations. During the last decades, the incidence of CRC has increased. CRC is also one of the best studied cancers and has been seminal to our understanding of the development of neoplasia. Specifically, it has been shown that through an orderly sequence of genetic defects neoplasia will develop and progress to full-fledged cancer and metastasis (multistep carcinogenesis according to B. Vogelstein). However, not much is known about the early steps of tumor development preceding the genetic defects of critical gatekeeper or caretaker genes like wnt-signaling/APC or hMLH1/hMSH2, respectively. It is becoming clear now that these long-thought first causes may have precedents in terms of non-genetic defects represented by epigenetic phenomena like gene methylation or other mechanisms influencing developmental or tissue-specific gene expression for some as yet unknown reason. We have been interested in the earliest tumor lesions known and have characterized expression of the CEACAM cellular adhesion molecules during the differentiation of colonic mucosa cells. For example, we find that CEACAM1 expression is down-regulated or lost in the great majority of very early tumor stages. CEACAM1 loss is observed at equal frequencies in both hyperplastic and neoplastic tumor entities, and occurs prior to APC mutations. Also,

valom adenomu, kao i kod CRC, no čini se da nije uzrokovan genetičkim mutacijama u samom genu. Zanimljivo je da je gubitak CEACAM1 pokazuje jednaku učestalost u tumorima CIN (wnt-signalizirajući defekti) i MSI (defekti u popravku krivo sparenih baza). Sveukupno, rezultati dobiveni za molekule u obitelji CEACAM ukazuju na to da bi molekularni defekti važni za razvoj tumorskih oštećenja mogli prethoditi fiksnim genetičkim mutacijama koje su se smatrale primarnim prvim uzrokom u višestupanjskoj karcinogenezi. Prikazati će se eksperimentalni rezultati koji upućuju na biološke funkcije kojima molekule CEACAM iskazuju svoja svojstva tumorske supresije.

E-mail: michael.neumaier@ikc.ma.uni-heidelberg.de

S8 – Simpozij 8 – BILJEZI BOLESTI KRVOŽILNOG SUSTAVA, S8-1

Genetske i okolinske odrednice upalnih biljega: rezultati u Skupini Stanislas

Visvikis-Siest Sophie

Inserm, U525, Equipe 4, EA 4003, University of Nancy I, Nancy, Francuska

Upala je biološki proces koji leži u osnovi više kroničnih bolesti, uključujući rak i srčanožilne bolesti. Ispitali smo varijabilnost intermedijarnog fenotipa upale uzrokovanu genetskim, biološkim i okolinskim (pojedinačnim i obiteljskim) čimbenicima. Ispitivanja su provedena u podzorcima ispitne skupine Stanislas Family Cohort. Kvantifikacije su provedene primjenom proteinskog biočipa (evidence®) ili klasičnog ELISA testa. Genotipiziranje je provedeno mnogostrukim oruđem. Određivali smo biološke i okolinske čimbenike upletene u varijabilnost plazmatskih koncentracija IL-8 i MCP-1 (2 kemokina) te EGF i VEGF (2 faktora rasta) među pojedincima u navodno zdravih odralih osoba i djece. Uz to, opisane su referentne vrijednosti ovih četiriju količina. Također smo pokazali kako opća nasljednost EGF iznosi 26,9%, te da ju u potpunosti objašnjava obiteljska okolina. Polimorfizam 61A>G u EGF nije bio udružen s plazmatskom koncentracijom ovoga peptida. Kod VEGF smo utvrdili da genetika objašnjava 60,6% varijacije u koncentraciji, kao i sveukupnu opću nasljednost. Međutim, tri polimorfizma VEGF koje smo ispitivali, 460C>T, 405G>C i 936C>T, nisu imali učinka na koncentraciju VEGF u plazmi. Uz to, pokazali smo kako je polimorfizam 252A>G u genu LTA udružen s porastom koncentracije MCP-1 u plazmi. Konačno smo utvrdili odnose između novih upalnih biljega i klasičnog upalnog biljega, hs-CRP. Našli smo da broj leukocita i trombocita,

CEACAM1 loss is observed in early and advanced adenomas as well as in CRC, but appears not to be caused by genetic mutations in the gene itself. Interestingly, CEACAM1 loss is equally frequent in CIN (wnt-signaling defects) and MSI (DNA mismatch repair defects) tumors. Taken together, the results obtained for molecules in the CEACAM family suggest that molecular defects important for the development of tumor lesions can precede fixed genetic mutations that have been held as primary first causes in the multistep carcinogenesis. Experimental results that suggest biological functions by which CEACAMs exert their tumor-suppressing properties will be presented.

E-mail: michael.neumaier@ikc.ma.uni-heidelberg.de

S8 – Symposium 8 - MARKERS OF VASCULAR DISEASES, S8-1

Genetic and environmental determinants of inflammatory markers: results from the Stanislas Cohort

Visvikis-Siest Sophie

Inserm, U525, Equipe 4, EA 4003, University of Nancy I, Nancy, France

Inflammation is a biological process underlying several chronic diseases, including cancer and cardiovascular disorders. Therefore, we investigated the variability of intermediate phenotype of inflammation due to genetic, biological and environmental (individual and familial) factors. Studies were conducted on subsamples of the Stanislas Family Cohort. Quantifications were done either by using a protein biochip (evidence®) or classic ELISA test. Genotyping was performed with a multiplex tool. We determined biological and environmental factors involved in the interindividual variability of plasma IL-8 and MCP-1 (2 chemokines) and EGF and VEGF (2 growth factors) concentrations in supposedly healthy adults and children. In addition, reference values of these four quantities were described. We also showed that general heritability of EGF was 26.9%, and that it was explained in total by familial environment. The 61A>G polymorphism of EGF was not associated with plasma concentration of this peptide. Concerning VEGF, we found that genetics explained 60.6% of the concentration variance and overall general heritability. However, the three VEGF polymorphisms we tested, i.e. 460C>T, 405G>C and 936C>T, had no effect on plasma VEGF concentration. In addition, we showed that the 252A>G polymorphism of the LTA gene was associated with an increase in plasma MCP-1 concentration. Finally, we determined relations

te koncentracije orozomucida, haptoglobina, IL-6 i ICAM-1 koreliraju s koncentracijom hs-CRP, dok koncentracije IL-8, IL-18, MCP-1, EGF, VEGF, IGF-1, IGFBP-3, TNF- α , TNF-RII te selektina E, L i P nisu korelirale s koncentracijom hs-CRP u fiziološkim uvjetima. Svi ovi rezultati pomoći će nam u tumačenju bioloških rezultata dobivenih u bolesnika te u razumijevanju regulacije ovih količina u fiziološkim uvjetima. Štoviše, naši rezultati potvrđuju složenost regulacije upalnoga procesa i mreže citokina.

E-mail: Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr

between the emerging inflammatory markers and a classic inflammatory marker, hs-CRP. We found that leukocyte and platelet counts, and orosomucoid, haptoglobin, IL-6 and ICAM-1 concentrations correlated with the concentration of hs-CRP, whereas IL-8, IL-18, MCP-1, EGF, VEGF, IGF-1, IGFBP-3, TNF-alpha, TNF-RII and selectins E, L and P concentrations did not correlate with hs-CRP concentration in physiological conditions. All these results will help us in the interpretation of biological results of patients and in the understanding of the regulation of these quantities in physiological conditions. Moreover, our results confirm the complexity of the regulation of the inflammatory process and the cytokine network.

E-mail: Sophie.Visvikis-Siest@nancy.inserm.fr

S8-2

Infarkt miokarda i hemostaza

Prüller Florian

Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics,
University Hospital Graz, Austrija

Infarkt miokarda (IM) predstavlja veliko opterećenje za zdravstvo kako u razvijenim tako i u novonastalim državama. Utvrđen je širok raspon rizičnih čimbenika, kao što su dob, spol, pretilost, pušenje, hipertenzija i razine kolesterola. Daljnja istraživanja bavila su se prognostičkom vrijednošću promijenjenih koncentracija hemostatskih sastavnica, kao što su fibrinogen i čimbenik aktiviranja trombocita (PAF). Protrombotski stadiji poput manjka proteina C i S, rezistencije aktiviranog proteina C ili anti-fosfolipidna protutijela odgovorni su za IM mlađe dobi. Napredak u razumijevanju genoma otkrio je višestruke polimorfizme gena kandidata povezane s upalom i metabolizmom lipida, kao i s hemostazom i trombozom. Patofiziološki se ateroskleroza opisuje kao proces koji je u tijeku, potaknut promijenjenim metaboličkim stanjima kao što su visoke razine LDL-kolesterola. Struktura arterijskih žila drastično se mijenja kroz godine i desetljeća. Ovi procesi su dobro dokumentirani i razjašnjeni. Ruptura aterosklerotskih plakova otkriva kolagenska vlakna, uzrokujući aktiviranje trombocita i time stvaranje tromba. Blokada žile nastupa kroz nekoliko sekunda. Sve veća usredotočenost na aktiviranje i inhibiciju trombocita obogatiti će već utvrđene primarne i sekundarne terapijske strategije kao što su inhibitori COX i HMG-CoA. Statini jasno smanjuju aterosklerotski rizik snižavanjem razina kolesterola u serumu i možda moduliranjem koagulacijskog sustava. Aspirin nepovratno deaktivira arahidonski metabolizam i suzbija sintezu tromboksana A₂, što dovodi do smanjene

S8-2

Myocardial infarction and hemostasis

Prüller Florian

Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics,
University Hospital Graz, Austria

Myocardial infarction (MI) poses a major health burden in industrialized and emerging countries. A broad range of risk factors have been established such as age, sex, obesity, cigarette smoking, hypertension, and cholesterol levels. Further insight considered changed concentrations of hemostatic components such as fibrinogen and platelet-activating factor (PAF) to be of prognostic value. Prothrombotic stages like protein C and S deficiency, activated protein C resistance or antiphospholipid antibodies are blamed for early age MI. Progression in understanding genome has unveiled multiple candidate gene polymorphisms to be related to inflammation and lipid metabolism as well as to hemostasis and thrombosis. Pathophysiological understanding describes atherosclerosis as an ongoing process triggered by altered metabolic conditions such as high LDL-cholesterol levels. Over years to decades, the structure of arterial vessels is severely changed. These processes are well documented and understood. Rupture of atherosclerotic plaques uncovers collagen fibers, causing platelet activation and therefore thrombus formation. This blockage of the vessel takes place within seconds. The increased focus on platelet activation and inhibition will enrich the established primary and secondary therapeutic strategies such as COX- and HMG-CoA inhibitors. Statins clearly reduce atherosclerotic risk by lowering serum cholesterol levels and possibly modulating the coagulation system. Aspirin inactivates irreversibly the arachidonic metabolism and suppresses

funkcije trombocita. Nove generacije protutrombocitnih sredstava već su dostupne za kliničku primjenu: inhibitori fosfodiesteraze, tienopiridini i antagonisti receptora glikoproteina IIa-IIIb. Ispituju se nove terapijske strategije poput antagonista trombinskih receptora, koji imaju moćan antitrombotski učinak u arterijskom trombu bogatom trombocitima, suzbijajući sposobnost trombina da proizvodi fibrin. Tkivni faktor (TF), ključni pokretač koagulacijske kaskade, oslobađa se iz endotelnih stanica, krvožilnih glatkomišićnih stanica i monocita. Suzbijanje djelovanja TF čini se privlačnim ciljem u liječenju akutnog koronarnog sindroma. Potrebna su daljnja istraživanja radi rješavanja novonastalih problema uzrokovanih otpornošću na aspirin i klopidogrel, te kako bi se osigurale bolje dijagnostičke i terapijske strategije u liječenju IM.

E-mail: florian.prueller@klinikum-graz.at

S8-3

NT-proBNP je vrijedan biljeg za kongestivno srčano zatajenje s dijagnostičkom i prognostičkom primjenom

Bashirians George

Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY, SAD

Lijeva ventrikulska disfunkcija (LVD) može nastati kao dio koronarne srčane bolesti, arterijske hipertenzije, bolesti zalistaka i primarne bolesti miokarda. Kongestivno srčano zatajenje (CHF) je klinički sindrom uzrokovan poremećajem srčane crpne funkcije. Za dijagnosticiranje LVD primjenjuju se klinički testovi i tehnike slikovnog prikaza, međutim, ta je dijagnoza djelomice subjektivna, dugotrajna i skupa. Natriuretski peptid tipa B (BNP) je jedan od četiriju natriuretskih hormona koji reguliraju krvni tlak, ravnotežu elektrolita i tekućinski volumen u odgovoru na tlačno preopterećenje. Biološki neaktivan prohormon, proBNP, uglavnom se luči iz lijeve srčane klijetke te se u tom procesu cijepa u fiziološki aktivni BNP i N-terminalni fragment NT-proBNP. Nekoliko je studija objavilo kako se BNP i NT-proBNP mogu rabiti za dijagnosticiranje kliničkih problema udruženih s LVD. Mi smo procijenili kliničku upotrebu NT-proBNP pomoću testa VITROS® NT-proBNP kao srčanog biljega uspoređujući koncentraciju NT-proBNP iz 484 uzorka dobivenih od osoba s dijagnozom CHF ili bez nje. Test VITROS® NT-proBNP uz VITROS® ECI/ECiQ Immunodiagnostic System i uporabu tehnologije Intellicheck® je brz, potpuno automatizirani test za NT-proB-

thromboxane A2 synthesis leading to a decreased platelet function. New classes of antiplatelet agents have already become available for clinical use: phosphodiesterase inhibitors, thienopyridines and glycoprotein IIa-IIIb receptor antagonists. New therapeutic strategies are under investigation such as thrombin receptor antagonists, which exert potent antithrombotic effect in platelet-rich arterial thrombus by inhibiting the ability of thrombin to generate fibrin. Tissue factor (TF), a key initiator of the coagulation cascade, is released from endothelial cells, vascular smooth muscle cells and monocytes. Inhibition of TF action seems to be an attractive target for the treatment of acute coronary syndrome.

Further research is necessary to handle the emerging clinical problems caused by aspirin and clopidogrel resistance, and to provide better diagnostic and therapeutic strategies to treat MI.

E-mail: florian.prueller@klinikum-graz.at

S8-3

NT-proBNP is a useful marker for congestive heart failure with diagnostic and prognostic applications

Bashirians George

Ortho Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA

Left ventricular dysfunction (LVD) can occur as part of coronary heart disease, arterial hypertension, valvular disease and primary myocardial disease. Congestive heart failure (CHF) is a clinical syndrome caused by impairment of the cardiac pumping function. Clinical tests and imaging procedures are used to diagnose LVD, however, the diagnosis is partially subjective, time consuming and costly. B-type natriuretic peptide (BNP) is one of four natriuretic hormones that regulate blood pressure, electrolyte balance and fluid volume in response to pressure overload. The biologically inactive prohormone, proBNP, is secreted mainly by the left ventricle of the heart and, in this process, is cleaved into physiologically active BNP and the N-terminal fragment NT-proBNP. Several studies have reported that BNP and NT-proBNP can be used for the diagnosis of clinical problems associated with LVD. We assessed clinical utility of NT-proBNP using VITROS® NT-proBNP assay as a cardiac marker by comparing the NT-proBNP concentration of 484 samples from individuals diagnosed with and without CHF. VITROS NT-proBNP combined with VITROS® ECI/ECiQ Immunodiagnostic System using Intellicheck® Technology is a rapid, fully auto-

NP u ljudskom serumu i plazmi. Rezultate za NT-proBNP analizirali smo prema odgovarajućim dogovorenim pragovima kako bismo procijenili učinkovitost ovoga biljega. Naši rezultati su pokazali kako postoji povezanost između težine kliničkih znakova i simptoma CHF i koncentracija NT-proBNP. Medijan koncentracija NT-proBNP u bolesnika svrstanih prema klasifikaciji NYHA kao I.-IV. iznosio je 741, 917, 1870, odnosno 1665 pg/mL. Usporedba kliničke osjetljivosti i specifičnosti provedena je pomoću ROC analize. Izračunato područje ispod krivulje iznosilo je 0,950. Ovako visoka vrijednost potvrđuje da ovaj test ima dobru sposobnost razlikovanja između bolesnih i referentnih skupina. Naši rezultati isto tako pokazuju kako test ima visoku negativni prediktivnu vrijednost, te se očekuje da rezultati za NT-proBNP u bolesnika s CHF prelaze dogovorene pragove u 97,4–100% vremena. U zaključku, potvrđujemo da je NT-proBNP koristan srčani biljeg i može se učinkovito rabiti kao pomoć u dijagnostici osoba sa sumnjom na CHF.

E-mail: gbashir1@ocdus.jnj.com

S8-4

Genska podloga bolesti krvožilnog sustava

Ferenčak Goran

Medicinski fakultet i KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Ateroskleroza je multifaktorska bolest uzrokovana međudjelovanjem nasljednih i čimbenika okoliša. Vodeći je uzrok smrtnosti i smanjene radne sposobnosti u razvijenom svijetu. Neka od njenih temeljnih svojstava i dalje su slabo poznata. Iako mnogi rizični čimbenici utječu na njen razvoj, ateroskleroza je proces koji se češće događa na određenim mjestima u cirkulaciji i uzrokuje zasebne kliničke manifestacije. Ateroskleroza koronarnih arterija često uzrokuje infarkt miokarda i anginu pectoris. Kad zahvati arterije koje opskrbljuju središnji živčani sustav, uzrokuje moždanu kap i prolaznu moždanu ishemiju. U perifernoj cirkulaciji uzrokuje intermitentnu klaudikaciju i gangrenu. Na molekularnoj razini ateroskleroza je proces u kojem sudjeluju mnogi važni (patofiziološki) mehanizmi, poput metabolizma lipoproteina, koagulacije i upale. Mutacije gena uključenih u bilo koji od tih mehanizama mogu rezultirati viškom ili nedostatkom ključnih proteina i tako narušiti homeostatsku ravnotežu. Intermedijerni fenotipovi poput hipertenzije, dijabetesa, pušenja i debljine također djeluju i na taj način mijenjaju ukupni rizik za pojavu i napredovanje bolesti. Budući da je koronarna bolest

mated assay for NT-proBNP in human serum and plasma. NT-proBNP results were analyzed against appropriate decision thresholds to assess the effectiveness of the marker. Our results showed that there was a relationship between the severity of the clinical signs and symptoms of CHF and NT-proBNP concentrations. The median NT-proBNP concentrations in patients classified as New York Heart Association classification I-IV were 741, 917, 1870 and 1665 pg/mL, respectively. The comparison of clinical sensitivity and specificity was performed using a Receiver Operator Curve. The area under the curve was calculated to be 0.950. This high value confirmed the assay to have a good capability of differentiating between the diseased and reference cohorts. Our results also showed the assay to have a high negative predictive value and NT-proBNP results in patients with CHF are expected to exceed decision thresholds 97.4%-100% of the time. In conclusion, we confirm that NT-proBNP is a useful cardiac marker and can be effectively used as an aid in the diagnosis of individuals suspected of having CHF.

E-mail: gbashir1@ocdus.jnj.com

S8-4

Genetic background of cardiovascular disease

Ferenčak Goran

School of Medicine, University of Zagreb, and Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Atherosclerosis is a multifactorial disease caused by interaction of hereditary and environmental factors. It is the leading cause of death and work disability in industrialized countries. Some of its fundamental characteristics remain unknown. Although its development is influenced by numerous risk factors, atherosclerosis is a process which takes place more frequently at specific locations within the circulation thus causing separate clinical manifestations. Atherosclerosis of coronary arteries frequently causes myocardial infarction and angina pectoris. Once the arteries supplying the central nervous system are affected, it results in stroke and transitory brain ischemia. In peripheral circulation it results in intermittent claudication and gangrene. At the molecular level, atherosclerosis is a process which involves many important (pathophysiological) mechanisms such as lipoprotein metabolism, blood clotting and inflammation. Mutations in the genes involved in any of these mechanisms may result in excess or lack of key proteins and thereby lead to imbalanced homeostasis. Intermediate phenotypes such as high blood pressure, diabetes, smoking and obe-

srca poligenski uvjetovana, svaka pojedina mutacija ili polimorfizam pridonijeti će tek umjereno ili u maloj mjeri ukupnom riziku. Na konačan rizik utjecati će i interakcije među genima, kao i interakcije između gena i okoline.

E-mail: gferen@email.t-com.hr

S8-5

Diferencijalna dijagnostika i prognostički biljezi moždanog udara

Vukasović Ines

Klinički zavod za kemiju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Moždani udar (MU) je vrlo heterogena bolest. Velike su razlike među bolesnicima s obzirom na težinu i podtip MU. Tehnike slikovnog prikaza su temelj pravilnog prepoznavanja i liječenja, jer do 25% slučajeva s kliničkom slikom MU čine stanja koja oponašaju MU. Stoga se intenzivno istražuju novi biokemijski pokazatelji koji bi bili nadopuna tehnikama slikovnog prikaza i pomogli u razlučivanju radi li se o MU ili ne, radi li se o ishemijskoj ili hemoragijskoj, ishemijskoj ili tranzitornoj ishemijskoj ataki, koliki je stupanj penumbre i površina oštećenja, ako se potvrdi ishemijska i razmatra terapija trombolizom, mogu li se predvidjeti komplikacije, intracerebralna hemoragija ili maligni edem mozga. Do danas su proučavani brojni biokemijski pokazatelji, oni podrijetlom iz neurona ili glija stanica, posrednici upalne reakcije, no nisu zaživjeli u kliničkoj praksi, jer nisu pokazali dovoljnu dijagnostičku točnost. Imali su relativno nisku osjetljivost i specifičnost, i relativno bi se kasno otkrili u sistemskoj cirkulaciji (nakon 6-12 sati). Metaloproteinaze matriksa (MMP) i njihovi inhibitori (TIMP) imaju važnu, ali različitu ulogu u pojedinim fazama i podtipovima MU. U akutnom MU djeluju štetno, dok u već razvijenom MU imaju učinka u procesima oporavka. Kako je u više radova potvrđena dijagnostička učinkovitost MMP-9 u akutnom MU, ispitivali smo promjene u koncentraciji odabranih MMP (-2, -9) i TIMP (-1, -2) u cirkulaciji bolesnika s različitim podtipovima MU podijeljenih prema klasifikaciji Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP). Obuhvaćeno je 126 bolesnika s akutnim ishemijskim MU i 124 kontrolna ispitanika. U bolesnika je ustanovljena niža koncentracija MMP-2, omjera MMP-2/TIMP-2 ($p < 0,001$) i viša koncentracija TIMP-2 ($p < 0,001$) nego u kontrolnih ispitanika. Koncentracija MMP-9 i omjer MMP-9/TIMP-1 su bili viši u bolesnika s potpunim cirkulacijskim infarktom prednje cirkulacije (TACI) nego u bolesnika s drugim podtipovima MU prema

sity also contribute and alter the overall risk of onset and progression of the disease. Since coronary heart disease is a polygenic disease, each mutation or polymorphism adds to the total risk only moderately. The final risk is influenced by gene interactions as well as by gene-environment interactions.

E-mail: gferen@email.t-com.hr

S8-5

Differential diagnosis and prognostic markers of stroke

Vukasović Ines

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Human stroke is a very heterogeneous disease. Stroke varies widely in severity and may present different subtypes. Imaging is the mainstay of identifying stroke type because it is not possible to distinguish ischemia from hemorrhage reliably on clinical grounds alone. Stroke mimics comprise even 25% of cases presenting as a stroke. Consequently, establishing a rapid and accurate diagnosis has recently emerged as a pivotal issue. The new biochemical markers may in the future be used in combination with neuroimaging techniques to help the diagnosis and other crucial issues raised during the acute phase of stroke: these include early distinction between ischemic and hemorrhagic stroke, transient ischemic attack and established stroke, the degree of ischemic penumbra, the extent of definitive brain tissue damage, the measurable effects of thrombolytic therapies, and the prognosis and risk of complications, intracerebral hemorrhage and malignant edema. Previously studied plasma markers, mainly neuronal and glial markers of stroke, inflammation mediators, have not found application in routine clinical practice. They display a relatively low sensitivity and specificity, and their serum/plasma concentrations tend to increase rather late in the course of brain injury (beyond 6 to 12 hours). Matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitors (TIMPs) play a key but different role in different stroke phases and stroke types. In the acute phase of stroke MMPs have a detrimental effect, whereas in established stroke MMPs participate in the healing process. Several recent publications have suggested MMP-9 as a reliable marker in the differential diagnosis of stroke. Our aim was to determine modulation of serum levels of selected MMPs (-1, -2) and TIMPs (-1, -2) in stroke types subdivided according to Oxfordshire Community Stroke Project (OCSP) classification. The study

klasifikaciji OCSF ($p=0,0019$ odnosno $p=0,0065$) i kontrolnih ispitanika ($p<0,0001$ odnosno $p=0,0024$). Negativna je korelacija uočena između koncentracije MMP-2 s MMP-9 i omjerom MMP-9/TIMP-1 u svim podtipovima MU osim u TACI. Analiza ROC je pokazala podjednaku dijagnostičku točnost koncentracije MMP-9 i Barthelova indeksa u diferencijalnoj dijagnozi TACI. Visoki je omjer MMP-9/TIMP-1 (omjer izgleda 3,263) povezan s TACI. Na temelju naših rezultata zaključujemo da omjer MMP-9/TIMP-1 može pružiti dodatnu informaciju s ciljem boljeg praćenja bolesnika i to kao pokazatelj proširenosti infarkta.

E-mail: ines.vukasovic@gmail.com

included 126 patients with acute stroke within the first 24 hours of symptom onset, and 124 healthy volunteers. The stroke group had lower MMP-2 concentration and MMP-2/TIMP-2 ratio ($p<0.001$) but higher TIMP-2 ($p<0.001$) than controls. The level of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio were higher in patients with total anterior circulation infarct (TACI) than in patients with other stroke subtypes according to OCSF classification ($p=0.0019$ and $p=0.0065$, respectively) or controls ($p<0.0001$ and $p=0.0024$, respectively). A negative correlation of MMP-2 levels with MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 ratio was recorded in all stroke subtypes except for TACI. The Receiver Operating Characteristic analysis showed a similar discriminating power for MMP-9 levels and Barthel index in the differential diagnosis of TACI. High MMP-9/TIMP-1 ratio (odds ratio 3.263) was associated with TACI. Our results demonstrate that the MMP-9/TIMP-1 ratio may provide information to help in assessing stroke patients in the future as a baseline biomarker of the infarct extent.

E-mail: ines.vukasovic@gmail.com

S8-6

Vrijednost kardiovaskularnih biljega kod morbidne pretilosti

Hermann-Arnhofer Katharina

Department of Anesthesia and Intensive Care/ Bloodbank, Hospital Hietzing, Beč, Austrija

S porastom indeksa tjelesne mase (BMI) proporcionalno raste volumen krvi i ejekcijska frakcija, što dovodi do hipertenzije i hipertrofije stijenke lijeve klijetke (LVH). U asimptomatskih pretilih osoba je dijagnosticiranje ovih patologija složeno, jer ehokardiografija ne spada među rutinske pretrage u ovih osoba. Rano dijagnosticiranje LVH osigurava brzo liječenje u pretilih osoba i time znatno poboljšava stopu smrtnosti. Sve je više dokaza za to da pretilost može aktivirati reninsko-angiotenzinski i neurohumoralni sustav kroz bubrežnu disfunkciju praćenu povišenim lipidima i netolerancijom glukoze. To je pak udruženo s višim razinama triglicerida, povišenim LDL-C, niskim HDL-C i aterogenim LDL, pa predstavlja stvaran i potencijalan rizik za kardiovaskularnu bolest (CVD). Inzulinska rezistencija je povezana s nizom metaboličnih abnormalnosti, uključujući dijabetes, dislipoproteinemiju, hipertenziju i ateroskleroza, protrombotična stanja s vrlo visokim rizikom za koronarnu bolest. Kao primjer, uveli smo razine BNP podrijetlom iz lijeve ventrikulske mase.

S8-6

Value of cardiovascular markers in morbid obesity

Hermann-Arnhofer Katharina

Department of Anesthesia and Intensive Care/Bloodbank, Hospital Hietzing, Vienna, Austria

With the increasing body mass index (BMI), blood volume and ejection fraction rise in the same manner, leading to hypertension and hypertrophy of the left ventricular wall (LVH). Diagnosing pathologies in the asymptomatic obese is complicated, as echocardiography is not part of the routine checkup in these individuals. Especially the early onset diagnosis of LVH ensures an immediate treatment of the obese and therefore markedly improves the mortality rate. There is increasing evidence that obesity may activate renin-angiotensin and neurohumoral systems through renal dysfunction, accompanied by increased lipids, and glucose intolerance. It is associated with higher levels of triglycerides, elevated LDL-C, low HDL-C and atherogenic LDL, posing actual and potential risk for cardiovascular disease (CVD). Insulin resistance is related to a constellation of metabolic abnormalities, including diabetes, dyslipoproteinemia, hypertension, and atherosclerosis, prothrombotic states which are at a very high risk of coronary disease. As an example, I introduce

Razine BNP koreliraju s ehokardiografski potvrđenom LVH i klasifikacijom NYHA u pretilih bolesnika. Mi rabimo BNP kao parametar probira u osoba s morbidnom pretilošću. Ispitali smo 61 bolesnika s morbidnom pretilošću (52 žene/9 muškaraca srednje dobi od 41,15±10,13 godina) s BMI od 45,27±6,1 kg/m². Skupina od 57 osoba normalne tjelesne težine podjednake dobi i spola služila je kao kontrolna skupina (BMI 22,58±3,14 kg/m²). Nakon 8-satnog razdoblja gladovanja odredili smo BNP (normalna vrijednost <250 fmol/L), te glukozu i profil lipida. BNP smo mjerili pomoću BNP-ELISA (Biomedica, Beč).

E-mail: katharina.hermann@wienkav.at

BNP levels deriving from the left ventricular mass. BNP levels correlate with echocardiography verified LVH and NYHA-classification in the obese patient. We use BNP as a screening parameter in the morbidly obese. We examined 61 patients suffering from morbid obesity (52 female/ 9 male; aged 41.15±10.13 years) with a BMI of 45.27±6.1 kg/m². A group of 57 normal-weight age- and sex-matched individuals served as controls (BMI 22.58±3.14 kg/m²). After an 8-hour fasting period, BNP (normal value <250 fmol/L), the glucose and lipid profile were determined. BNP was measured with BNP-ELISA (Biomedica, Vienna).

E-mail: katharina.hermann@wienkav.at

S9 – Simpozij 9 – KOŠTANI BILJEZI, S9-1

Koštani biljezi i njihova primjena u kliničkoj dijagnostici

Palicka Vladimir

Institute of Clinical Biochemistry and Diagnosis, School of Medicine, Charles University, Hradec Kralove, Republika Češka

Broj kliničkih slučajeva osteoporoze brzo se povećava širom svijeta. SZO predviđa da će se incidencija osteoporotičkih fraktura (proksimalni femur) povisiti više nego dvostruko kroz slijedećih 50 godina (u zemljama EU, 414.000 Fx u 2000. godini, uz očekivani porast na 972.000 u 2050. godini). Svaki prijelom umnožava rizik od naknadnih prijeloma, poglavito kralježnice. Odrasla koštana premodeliranja, što je najbolji predskazatelj osteoporoze i rizika od frakture može procijeniti pomoću:

- mjerenja mineralne gustoće kostiju (BMD) pomoću DXA
- histomorfometrije kostiju
- posebnih metoda slikovnog prikaza i naknadnih biopsija
- mjerenja koštanih biljega u krvi i/ili mokraći

Danas se od biljega koštane resorpcije najviše rabe CTx i NTx, dok se od biljega koštane sinteze najviše upotrebljavaju aktivnost ALP, te koncentracije osteokalcina i PINP. Nova znanstvena dostignuća u patobiokemiji i patofiziologiji donose primjenu novih biljega, uglavnom iz obitelji interleukina (OPG, RANK, RANKL itd.). Glavne prednosti primjene koštanih biljega su slijedeće:

- širok spektar biljega
- laka dostupnost
- brz odgovor na terapiju
- cijena (biljezi su relativno jeftini)

S9 – Symposium 9 – BONE MARKERS, S9-1

Bone markers and its use in clinical diagnosis

Palicka Vladimir

Institute of Clinical Biochemistry and Diagnosis, School of Medicine, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

The number of clinical cases of osteoporosis is growing rapidly worldwide. WHO has estimated the incidence of osteoporotic fractures (proximal femur) to increase more than twice during the next 50 years (EU countries 414,000 Fx in 2000, expected to rise to 972,000 in 2050). Every fracture multiplies the risk of subsequent fractures, of the spine in particular. The reflection of bone remodeling, which is the best predictor of osteoporosis and fracture risk, can be estimated by:

- measurement of bone mineral density (BMD) by use of DXA
- bone histomorphometry
- special imaging methods and subsequent biopsies
- measurement of bone markers in blood and/or urine

CTx and NTx are bone resorption markers most widely used today. Concerning markers of bone synthesis, the activity of ALP and concentrations of osteocalcin or PINP are most frequently used. New scientific developments in the pathobiochemistry and pathophysiology propose the use of new markers, mostly from the interleukin family (OPG, RANK, RANKL, etc.). The main advantages of the use of bone markers re:

- broad spectrum of markers
- easy access
- quick response to therapy
- price (markers are relatively inexpensive)

Glavni nedostaci uporabe koštanih biljega su slijedeći (u analitičkom dijelu):

- nema sljedljivosti
- nema standardizacije
- visoka razina nesigurnosti mjernih postupaka
- visoka varijabilnost

(u biološkom dijelu):

- nema specifičnosti
- visoka biološka varijabilnost

Glavni ciljevi (i pitanja) kod primjene koštanih biljega su slijedeći:

- razvoj novih biljega koji će koštani metabolizam odražavati bolje od klasičnih
- bolje razumijevanje podloge koštane resorpcije i sinteze
- specifičan odraz učinaka lijekova pomoću biljega koji najbolje odgovaraju određenoj vrsti liječenja
- bolja prediktivna vrijednost

E-mail: palicka@lfhk.cuni.cz

S9-2

Koštani biljezi u hiperparatiroidizmu

Vrkić Nada

Klinički zavod za kemiju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Jedna od komplikacija hiperparatiroidizma je metabolična koštana bolest. Primarni se hiperparatiroidizam liječi kirurškim zahvatom, nakon čega odmah slijedi normalizacija koštanog metabolizma koja se može pratiti padom koštanih biljega u krvi i u mokraći. Složenije je naravi metabolična koštana bolest bubrežna osteodistrofija koja se javlja u 70% do 100% kroničnih bubrežnih bolesnika kada se glomerularna filtracija snizi ispod 60 mL/min. Bubrežna koštana bolest javlja se u jednom od tri oblika koji se lako mogu transformirati jedan u drugi. Najčešći je sekundarni hiperparatiroidizam s ubrzanom koštanom pregradnjom, potom miješani oblik te, poglavito u starijih bolesnika, adinamična koštana bolest s osteomalacijom (usporeni koštani metabolizam). Od bubrežne osteodistrofije pate gotovo svi bolesnici na hemodijalizi, što im izrazito povećava pobol i smrtnost. Kalcitriol i kalcijeve soli suprimiraju parathormon, ali ubrzavaju vaskularnu kalcifikaciju, kardiovaskularni pobol, adinamičnu koštanu bolest i sklonost frakturama. Metoda histomorfometrije zlatni je standard u dijagnostici koštane lezije, no invazivna je, skupa, ograničena samo na kost zdjelice i nije rutinska. Stoga je primjena biokemijskih biljega važna u dijagnostici i kontroli liječenja bubrežne osteodistrofije. Fragmenti kolagena – biljezi koštane pregradnje filtriraju se insuficijentnim

The main disadvantages of the use of bone markers are (in the analytical part):

- no traceability
- lack of standardization
- high uncertainty of measurement procedures
- high variability

(in the biological part):

- no specificity
- high biological variability

The main targets (and questions) in the use of bone markers are:

- development of new markers, reflecting bone metabolism better than classic ones
- better understanding of the backgrounds of bone resorption and synthesis
- specific reflection of drug effects by use of markers according to type of therapy
- better predictive value

E-mail: palicka@lfhk.cuni.cz

S9-2

Bone markers in hyperparathyroidism

Vrkić Nada

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Metabolic bone diseases develop as a complication of primary and secondary hyperparathyroidism. Patients with primary hyperparathyroidism are surgically treated, which results in normalization of bone metabolism, as indicated by bone markers. Bone disease observed in 75%-100% of patients with chronic renal failure is more complex, as the glomerular filtration rate falls below 60 mL/min. Renal bone disease can be subdivided into three groups which are not fully separate entities and may easily transform from one to another. Hyperparathyroid (high-turnover) bone disease is most frequently followed by mixed osteodystrophy and low-turnover osteodystrophy (osteomalacia and adynamic bone disease). The resulting abnormalities in bone and mineral metabolism play a significant role in the morbidity and mortality of chronic renal failure patients. Nearly all patients requiring chronic maintenance dialysis therapy develop abnormal bone histology. Calcitriol and calcium salt are used to suppress PTH and improve osteomalacia but these agents predispose to the development of vascular calcification, cardiovascular morbidity, low-turnover bone disease and fracture. Urinary markers of collagen breakdown are filtered by the glomeruli and chronic renal failure patients cannot effectively clear it, which results in

glomerulima pa su njihove serumske razine povišene. Istodobno je pojačana i koštana izgradnja. Sadržaj biljega razgradnje u krvi i mokraći važan je podatak kojim se procjenjuje aktivnost osteoklasta te usmjerava kliničare u izboru i kontroli učinkovitosti terapije. Biljezi izgradnje dobro koreliraju s promjenama mineralne gustoće kostiju i prednjače vremenski pred denzitometrijom. Klinička ispitivanja ističu osteokalcin i N-terminalni propeptid prokolagena P1NP za procjenu aktivnosti osteoblasta i predviđanje gubitka koštane mase. Povišen serumski osteokalcin odražava smanjeni bubrežni klirens ili metaboličnu koštanu bolest, ili pak oboje. Klirens intaktnog P1NP posredovan je endotelnim stanicama jetre pa je njegov serumski sadržaj neovisan o bubrežnoj disfunkciji i zato najobjektivniji pokazatelj koštane dinamike u uremičnim bolesnika. U zaključku, biokemijski koštani biljezi vrijedan su klinički pokazatelj koštane pregradnje i dinamike cjelokupne koštane mase, što otvara stvarne mogućnosti da bi danas nenadomjestiva biopsija kostiju mogla naći zamjenu u dijagnostici razlikovanja ubrzane od usporene koštane pregradnje.

E-mail: nvrkic@gmail.com

S9-3

Razvojna dinamika biljega koštane pregradnje na primjeru adolescentne anoreksije nervoze

Jurčić Zvonimir

Klinika za dječje bolesti, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Sticanje optimalnog mineralnog sadržaja kostiju tijekom dječje i adolescentne dobi ovisno je o međusobnom djelovanju prehrambenih i hormonskih činitelja, te općenito načina života. Za razliku od stabilnih koštanih dimenzija u odraslih, razvojne promjene odnose se na veličinu i geometriju kostiju, a mineralni sadržaj ovisan je o kronološkoj dobi, ali prije svega o koštanoj zrelosti i stadiju pubertetskog razvoja. U vrijeme prije puberteta biljezi osteogeneze i razgradnje kostiju održavaju se na jednoj konstantnoj razini s koncentracijama koje su više nego u odraslih, ali niže nego u dojenčadi, te nisu spolno ovisne. Tijekom puberteta odvijaju se dvije važne pojave: ubrzani longitudinalni rast i pojačana mineralizacija kostiju. U djevojčica najveće ubrzanje rasta odvija se u ranom pubertetu (P1-P3), a mineralno nakupljanje je najveće u kasnim fazama (P3-P4), kada se postiže glavnina koštanog

elevated serum levels. Besides, a developed bone disease affects bone formation and breakdown. Bone resorption markers are used in an attempt to assess the extent of osteoclastic bone resorption as well as guidance in selecting therapy and therapeutic response monitoring. Bone formation markers correlate with changes in the bone mineral density *per year*. Especially, N-terminal propeptide of type I procollagen P1NP and osteocalcin provide better discrimination and indices of osteoblast function in hemodialysis patients and thus are clinically useful for predicting bone loss. P1NP marker may provide a more reliable assay for bone formation, particularly in uremic patients, because specific receptor-mediated clearance of intact P1NP occurs by hepatic endothelial cells and is unaffected by renal dysfunction. An elevated level of osteocalcin reflects either reduced renal clearance or metabolic bone disease, or an interaction of both conditions. Bone markers are important clinical tools in patient management and would be useful, as they may replace the invasive methods (bone biopsy and histomorphometry remains the gold standard) that are required to distinguish between the high and low bone turnover.

E-mail: nvrkic@gmail.com

S9-3

Developmental dynamics of bone turnover markers: an example of adolescent anorexia nervosa

Jurčić Zvonimir

University Department of Pediatrics, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

The acquisition of optimal mineral bone content during childhood and adolescence depend on the interaction of dietary and hormonal factors and lifestyle in general. In contrast to stable bone dimensions in adults, developmental changes refer to bone size and geometry, while bone mineral content depends on chronologic age and primarily on bone maturity and stage of pubertal development. During the prepubertal period, the markers of osteogenesis and bone degradation are maintained at a constant level with concentrations exceeding those in adults but lower than those measured in infants, and are not sex dependent. Two important phenomena occur during puberty: accelerated longitudinal growth and enhanced bone mineralization. In female children, the highest rate of growth acceleration occurs in early puberty (P1-P3), while highest mineral accumulation is recorded

miraza. Mineralizacija se usporenim tempom nastavlja nakon spolne i koštane zrelosti, te negdje krajem drugog desetljeća postiže oko 90% vršne koštane mase. Tijekom pubertetskog modeliranja i remodeliranja kostiju biljezi anabolizma i katabolizma su povišeni, a u vrijeme postizanja vršne koštane mase oba procesa su u ravnoteži. Najviše koncentracije osteokalcina (OC) u djevojčica postižu se s 12 godina života, a zatim se već s 15-16 godina dostižu vrijednosti odraslih. Slična dinamika opisana je i za resorpcijske biljege. Anoreksija nervoza (AN) tipično se javlja u vrijeme kada se očekuju sticanja glavne koštane miraza, pa je deficit koštane mase ocijenjen s DEXA veći u adolescentnoj nego adultnoj AN. U akutnoj fazi bolesti prevladava teška pothranjenost uz konstelaciju adaptivnih metaboličnih i hormonskih promjena, prije svih hipogonadotropni hipogonadizam. U predpubertetskoj pojavi pubertet je odgođen, bolest u vrijeme puberteta usporiti će pubertetski razvoj, uključujući zasotatak u rastu i smanjenu mineralizaciju kostiju. Pojava nakon menarhe rezultirati će sekundarnom amenorejom. AN je tipičan primjer neravnoteže koštane pregradnje, obilježene smanjenim stvaranjem i pojačanom resorpcijom kosti, što se bioemijski odražava sniženim koncentracijama biljega osteogeneze poput OC, PINP (N-propeptid prokolagena 1) uz povećanje koncentracije resorpcijskih biljega poput CTX (C-telopeptid kolagena 1) ili NTX (N-telopeptid kolagena 1). Unatoč napretku koje je donijelo određivanje biljega koštane pregradnje, bilo u fiziološkim procesima modeliranja i remodeliranja ili u kostima zahvaćenim bolešću, interpretacija rezultata neće uvijek biti laka, osobito u nedostatku razvojnih, referentnih podataka u vršnjaka.

E-mail: nvrkic@gmail.com

S9-4

Gustoća kostiju i koštani biljezi u adolescentica s anoreksijom nervozom

Balenović Antonija

Klinika za onkologiju i nuklearnu medicinu, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Anoreksija nervoza je kompleksni poremećaj kod kojega dolazi do smanjenja unosa kalcija, gubitka težine, te posljedično brojnih metaboličnih i endokrinih poremećaja uključujući primarnu ili sekundarnu amenoreju, te gu-

in later phases (P3-P4) when most of the bone dowry is acquired. Mineralization is continued at a slower pace after sexual and bone maturity to reach some 90% of the peak bone mass towards the end of the second decade of life. During the pubertal bone modeling and remodeling, the anabolism and catabolism markers are increased to reach balance at the time of attaining peak bone mass. In female children, the highest osteocalcin concentration (OC) is achieved at age 12 to reach adult values as early as age 15-16. Resorption markers follow a similar dynamics. Anorexia nervosa (AN) typically occurs at the time of the expected acquisition of the majority of bone dowry, thus the bone mass deficit evaluated by DEXA is greater in adolescent AN than in adult AN. The acute stage of the disease is predominated by severe malnutrition associated with an array of adaptive metabolic and hormonal changes, primarily hypogonadotropic hypogonadism. In case of prepubertal manifestation, the onset of puberty is delayed, while the disease concurrence with puberty will slow down pubertal development, including growth retardation and reduced bone mineralization. The disease manifestation after menarche results in secondary amenorrhea. AN is a typical example of bone turnover imbalance, characterized by a decreased bone formation and enhanced bone resorption, which is biochemically reflected by decreased concentrations of the markers of osteogenesis, e.g., OC, PINP (procollagen 1 N-propeptide), and increased concentrations of bone resorption markers such as CTX (collagen 1 C-telopeptide) or NTX (collagen 1 N-telopeptide). In spite of the advancement brought along by determination of the markers of bone turnover, either in the physiological processes of modeling and remodeling, or in bone involved by a disease, interpretation of the results may not always be easy, especially when reference developmental data on peer groups are lacking.

E-mail: nvrkic@gmail.com

S9-4

Bone density and bone markers in female adolescents with anorexia nervosa

Balenović Antonija

University Department of Oncology and Nuclear Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Anorexia nervosa is a complex disorder characterized by reduced calcium uptake, weight loss, and consequentially numerous metabolic and endocrine impairments including primary or secondary amenorrhea and loss of bone

bitak koštane mase. Osteopenija i osteoporozna su česte komplikacije koje mogu dovesti do klinički značajno povišenog rizika za nastanak fraktura kasnije u životu. Cilj studije bio je utvrditi koštanu gustoću (BMD), te serumske koncentracije inzulinu sličnog faktora rasta (IGF-I), biljega koštane izgradnje (osteokalcin, OC) i razgradnje (C-terminalni telopeptid tipa 1 kolagena, CTX) u adolescentica s anoreksijom nervozom s obzirom na duljinu trajanja bolesti. U analizu je bilo uključeno 28 bolesnica u aktivnoj fazi bolesti srednje dobi od $15,1 \pm 2,4$ godina ($\chi \pm SD$) sa sekundarnom amenorejom ($\chi \pm SD$ $9,6 \pm 9,2$ mjeseci) i indeksom tjelesne mase (BMI u kg/m^2) od $15,8 \pm 2,1$ ($\chi \pm SD$). Vrijednosti BMD L-kralježnice uspoređene su s normalnim vrijednostima za istu dob, spol i rasnu pripadnost (Z-skori; Hologic QDR400) i unutar tjedan dana mjerene serumske vrijednosti IGF-I, OC i CTX. S obzirom na trajanje bolesti bolesnice su podijeljene u skupinu A (≤ 12 mjeseci) i skupinu B (>12 mjeseci). U skupini B zabilježen je veći broj bolesnica sa sniženim vrijednostima Z-skora (63% vs. 10%), te je utvrđena značajna negativna korelacija vrijednosti Z-skora s duljinom trajanja bolesti ($r = -0,58$; $p = 0,001$). Trajanje bolesti pozitivno je koreliralo s duljinom amenoreje ($r = 0,89$; $p = 0,000$) i dobi bolesnica ($r = 0,64$; $p = 0,000$). Srednja dob bolesnica u skupini A bila je $14,2 \pm 1,9$ godina, a u skupini B $17,2 \pm 2,2$ godine ($p = 0,002$). Skupine se nisu razlikovale prema vrijednosti koštanih biljega, IGF-I i BMI, a nije utvrđena ni korelacija između duljine trajanja bolesti i navedenih parametara. Zabilježena je značajna negativna korelacija između vrijednosti IGF-I i biljega razgradnje (CTX) ($r = -0,49$; $p = 0,008$). Zaključeno je kako je duljina trajanja bolesti značajno utjecala na vrijednosti koštane gustoće u adolescentica s anoreksijom nervozom, što je rezultiralo nižim vrijednostima Z-skora u bolesnica s duljim trajanjem poremećaja. Nije utvrđena razlika u vrijednostima biljega koštane pregradnje, što je moguće posljedica značajne razlike u dobi među skupinama. Bolesnice s kraćim trajanjem bolesti bile su značajno mlađe, kada su i fiziološke vrijednosti koštanih biljega povišene, što otežava tumačenje nalaza koštanih biljega kod poremećaja koštanog metabolizma. Niže vrijednosti IGF-I korelirale su s povišenim vrijednostima biljega razgradnje, što ukazuje na ulogu IGF-I u etiopatogenezi osteoporozne

E-mail: drneli@hotmail.com

mass. Osteopenia and osteoporosis are frequent complications that may lead to clinically significant increase in the risk of fractures later in life. The aim of the study was determine bone mineral density (BMD) and serum concentrations of insulin-like growth factor (IGF-I), bone synthesis marker (osteocalcin, OC) and bone resorption marker (collagen type 1 C-terminal telopeptide, CTX) in female adolescents with anorexia nervosa according to the duration of the disease. The study included 28 patients in the active stage of the disease, mean age 15.1 ± 2.4 years ($\chi \pm SD$) with secondary amenorrhea ($\chi \pm SD$, 9.6 ± 9.2 months) and body mass index (BMI in kg/m^2) of 15.8 ± 2.1 ($\chi \pm SD$). BMD values of L-spine were compared with normal values for the respective age, sex and ethnicity (Z-score: Hologic QDR400), and serum levels of IGF-I, OC and CTX were measured within a week. According to disease duration, patients were divided into group A (≤ 12 months) and group B (>12 months). Results showed a greater proportion of patients with decreased Z-score values in group B than in group A (63% vs. 10%) and a significant negative correlation of Z-score value with the disease duration ($r = -0.58$; $p = 0.001$). Duration of the disease showed positive correlation with the duration of amenorrhea ($r = 0.89$; $p = 0.000$) and patient age ($r = 0.64$; $p = 0.000$). The mean patient age was 14.2 ± 1.9 and 17.2 ± 2.2 years in group A and B, respectively ($p = 0.002$). There was no between group difference according to bone marker values, IGF-I and BMI, and no correlation between the disease duration and these parameters. A significant negative correlation was recorded between IGF-I and bone resorption marker (CTX) ($r = -0.49$; $p = 0.008$). In conclusion, duration of the disease had a significant effect on the values of bone density in adolescents with anorexia nervosa, which resulted in decreased Z-score values in patients with prolonged duration of the disorder. There was no difference in the values of bone resorption marker, which may have been due to the significant between group age difference. Patients with a shorter duration of the disorder were significantly younger, when the physiological values of bone markers are known to be higher, thus posing difficulty on interpreting the results on bone markers in bone metabolism impairment. Lower values of IGF-I correlated with increased values of bone resorption markers, suggesting a role of IGF-I in the etiopathogenesis of osteoporosis.

E-mail: drneli@hotmail.com

S9-5

Osteoporoza u reumatoidnom artritisu

Pavela Jasna

Odjel za medicinsku biokemiju, Klinička bolnica Osijek, Osijek, Hrvatska

Reumatoidni artritis (RA) je upalna bolest koja je obilježena sinovitisom, razgradnjom hrskavičnog tkiva i subhondralnom erozijom kosti. Osteoporoza koja se javlja u RA posljedica je više rizičnih čimbenika kao što su upala, imobilizacija, uporaba kortikosteroida itd. Progresija bolesti u vidu oštećenja zgloba je vrlo teško predvidiva i varira od bolesnika do bolesnika. Nekoliko studija je pokazalo da klinički znakovi bolesti kao i radiološka mjerenja često nisu dobri prediktivni čimbenici erozije zgloba. Ti nalazi upućuju na potrebu pronalaska biokemijskog parametra koji će pouzdano odražavati dinamiku tkivnog metabolizma u RA, koji će dobro korelirati s radiografijom te biti dobar prognostički pokazatelj napredovanja bolesti. Cilj je bio utvrditi koji biljeg koštanog metabolizma najbolje korelira s osteopenijom u RA. U radu smo obradili 26 bolesnika s dijagnozom RA i 20 zdravih kontrolnih osoba. Određivali smo slijedeće biljege koštanog metabolizma: serumski osteokalcin pomoću ELISA (Quidel), amino terminalni propeptid kolagena tip 1 (PINP) pomoću ECLIA (Roche) kao biljezi koštane izgradnje, te beta C-terminalni telopeptid (CTx) pomoću ECLIA (Roche) kao biljeg koštane resorpcije. Određivani su i C-reaktivni protein (CRP; Olympus) kao biljeg upale te ciklički citrulinirani peptid (CCP) protutijela pomoću ELISA (Euroimmun) kao serološki biljeg RA. Nije nađena statistički značajna razlika između skupine bolesnika (P) i kontrolne skupine (C) za osteokalcin ($4,958 \pm 1,30$ ng/mL (P), $4,672 \pm 1,64$ ng/mL (C)); i PINP ($49,600$ ng/mL ($29,525-62,197$) (P), $41,235$ ($29,710-73,980$) (C). Statistički značajna razlika nađena je za beta-CTx ($0,445 \pm 0,26$ ng/mL (P), $0,302 \pm 0,19$ ng/mL (C). Također nije nađena korelacija između beta-CTx i CRP ($p > 0,050$) te beta-CTx i CCP ($p > 0,050$). Iako dobiveni rezultati ne pokazuju značajnu razliku između dviju ispitivanih skupina osim za beta-CTx, potrebna su daljnja ispitivanja uključujući i biljege metabolizma hrskavičnog tkiva (COMP, PIINP) i sinovitisa (YLK-40, PIINP) kako bi se otkrio dovoljno osjetljiv i specifičan biokemijski pokazatelj razaranja zgloba.

E-mail: pavela.jasna@kbo.hr

S9-5

Osteoporosis in rheumatoid arthritis

Pavela Jasna

Department of Medical Biochemistry, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, inflammatory disease characterized by synovitis, cartilage degradation and subchondral bone erosion. Osteoporosis in RA is characterized by a complexity of risk factors such as inflammation, immobilization, and use of corticosteroids. The progression of joint damage is highly unpredictable and variable from patient to patient. Predictive factors based on disease activity or radiographic damage have some limitations. These consideration suggests the need of accurate, precise assays reflecting the dynamics of tissue metabolism in RA, which can be used for prognosis. The aim was to investigate the markers of bone metabolism in RA. Twenty-five patients with the diagnosis of RA and twenty age- and sex-matched healthy controls were included in the study. Serum osteocalcin was determined by ELISA test (Quidel), PINP (amino-terminal propeptide of type 1 collagen) by ECLIA (Roche) as markers of bone formation, and beta-CTx (C-terminal telopeptide) by ECLIA (Roche) as a marker of bone resorption. Also, C-reactive protein (CRP; Olympus) and CCP antibody (cyclic citrullinated peptide antibody) were determined by ELISA (Euroimmun). There was no statistically significant between group difference for osteocalcin (4.958 ± 1.30 ng/mL (P), 4.672 ± 1.64 ng/mL (C) and PINP (49.600 ng/mL ($29.525-62.197$) (P), 41.235 ng/mL ($29.710-73.980$) (C). We found a statistically significant difference only for beta-CTx (0.445 ± 0.26 ng/mL (P), 0.302 ± 0.19 ng/mL (C). There was no correlation between beta-CTx and CRP ($p > 0.050$), or between beta-CTx and CCP ($p > 0.050$). Our data suggest that only beta-CTx could be a valuable marker of bone turnover; however, joint is a complex organ and RA alters the metabolism of different tissues including bone, cartilage and synovial membrane. To evaluate the mechanisms involved in joint destruction, the markers of cartilage degradation (COMP, PIINP) and synovitis (YLK-40, PIINP) should also be determined. Also, the question is whether beta-CTx is superior as a predictive marker to the markers already in use.

E-mail: pavela.jasna@kbo.hr

S9-6

Biološke razlike u biokemijskim koštanim biljezima

Sierra Amor Rosa Isabella

Laboratorio LAQUIMS, S.C., Veracruz, Meksiko

Biološke varijacije sastoje se od intra-individualne i inter-individualne varijacije. Ove sastavnice bioloških varijacija rabe se za postavljanje specifikacija analitičke kvalitete glede otklona i nepreciznosti, za ocjenu serijskih promjena u pojedinim analitima, te za procjenu kliničke korisnosti referentnih raspona utvrđenih za dotičnu populaciju. Relativno velika varijacija iz dana u dan u izlučivanju nekih koštanih biljega mokraćom naglašava potrebu za primjenom višestrukih uzoraka kako bi se utvrdilo njihovo izlučivanje u neke osobe. Ostale biološke promjene poput menstrualnog ciklusa pokazuju porast tijekom srednjeg i kasnog folikularnog razdoblja, te pad tijekom srednjeg i kasnog lutealnog razdoblja. Ova varijacija ukazuje na to da ciklične promjene ovarijskih spolnih steroida u serumu mogu promijeniti biljege koštane resorpcije za vrijeme menstrualnog ciklusa. U trudnoći su vrijednosti u mokraći značajno porasle u trećem trimestru i ostale visoke tijekom babinja u usporedbi sa ženama bez trudnoće ili u ranoj trudnoći, pokazujući kako su to korisni biljezi za procjenu koštane resorpcije u vrijeme oko babinja. Međutim, biološka promjenjivost biljega koštane resorpcije u mokraći mjerena u zdravih žena prema ženama s osteoporozom u postmenopauzi u drugom mlazu mokraće prikupljane u tjednim razmacima kroz 5 tjedana pokazala je analitičku promjenjivost, kritične vrijednosti razlika i indeks individualnosti; stoga rutinska primjena biokemijskih koštanih biljega u mokraći u pojedine osobe ima ograničenu vrijednost ako se ove varijable ne uzmu u obzir. Prednost se daje ranim jutarnjim uzorcima; rezultati u mokraći trebaju se izražavati kao omjer kreatinina; referentni rasponi trebaju se grupirati prema spolu; treba izraziti analitičku nepreciznost ($CV \leq 9\%$), izvedenu iz biološke varijacije; također, razlika između serijskih rezultata pojedine osobe mora biti $< 50\%$ da bi bila statistički značajna; u značajnom broju bolesnika će procjena rizika za osteoporotsku frakturu zahtijevati analizu višestrukih uzoraka mokraće. Sve ove varijable i pojedinačne čimbenike treba uzeti u obzir kad se postavljaju referentni rasponi, prikupljanje uzoraka i prijeanalitički postupci.

E-mail: risierramor@yahoo.com

S9-6

Biological variation of biochemical bone markers

Sierra Amor Rosa Isabella

Laboratorio LAQUIMS, S.C., Veracruz, Mexico

Biological variation consists of intra-individual and inter-individual variation. These components of biological variation are used to set analytical quality specifications for bias and imprecision, to evaluate serial changes in individual analytes, and to assess the clinical utility of population-based reference intervals. The relatively large day-to-day variation in urinary excretion of some bone markers emphasizes the need to use multiple samples to characterize this excretion of an individual. Other biological changes such as menstrual cycle show a rise during the mid- and late follicular period, and a fall during the mid- and late luteal periods. This variation suggests that cyclic changes in serum ovarian sex steroids might modulate bone resorption markers during the menstrual cycle. In pregnancy, urinary values significantly increased in the 3rd trimester of pregnancy and remained high during the puerperium as compared with nonpregnant or early pregnant women, demonstrating that these are useful markers to assess bone resorption during peripuerperal periods. Nevertheless, the biological variability of urinary bone resorption markers measured in healthy vs. postmenopausal osteoporotic women in second flow urine collected at weekly intervals for 5 weeks showed analytical variability, critical difference values and index of individuality; therefore, the routine use of urinary biochemical bone markers in an individual patient is of limited use if these variables are not taken into consideration. Early morning specimens are preferred; results in urine should be expressed as creatinine ratio; reference intervals should be stratified according to sex; necessary analytical imprecision ($CV \leq 9\%$), derived from biological variation; also, the difference between serial results from an individual must be $> 50\%$ to be statistically significant; and assessment of risk for osteoporotic fracture would, in a significant number of patients, require analysis of multiple urine specimens. All these variables and individual factors should be considered when establishing reference intervals, sample collection and preanalytical procedures.

E-mail: risierramor@yahoo.com

**S10 – Simpozij 10 – TOKSIKOLOGIJA
I FARMAKOGENETIKA, S10-1****Novi pristup laboratorijskoj dijagnostici u
kliničkoj toksikologiji**

Wagner Jadranka

Poliklinika Sunce, Osijek, Hrvatska

Odavno se govori kako neka kemijska tvar u maloj količini može biti dodatak hrani, u umjerenoj količini lijek, dok u velikoj količini može biti otrov. Prema podacima mnogih autora, i kod nas su lijekovi na prvom mjestu kao najčešći uzroci akutnih otrovanja odrasle populacije, zatim slijede alkoholi, opijati, gljive i ostalo. Dijagnoza otrovanja temelji se na anamnezi, fizikalnom pregledu, kliničkom tijeku bolesti i selektivnim laboratorijskim pretragama. Izbor laboratorijskih pretraga ovisi o specifičnostima svakog pojedinog slučaja otrovanja, kao i o težini kliničke slike. Ne postoje nigdje na svijetu pretrage koje mogu otkriti i dokazati sve otrove. Kliničko toksikološka analitika sastoji se od metoda direktnog kvalitativnog dokaza i direktnog kvantitativnog određivanja otrova, kao i od indirektnih metoda dokaza djelovanja otrova. Glavni zadatak kvalitativne analitike je da prepozna ili isključi prisutnost jednog ili više otrova. Važnost kvalitativnog dokaza otrova za dijagnostiku u kliničkoj toksikologiji proizlazi iz iskustva da dijagnoza postavljena u vrijeme uzimanja uzorka u usporedbi s rezultatima kliničko toksikoloških ispitivanja može biti točna u 22% slučajeva, u 36% djelomice točna, te u 42% pogriješna. Negativan rezultat ukazuje na to da analit nije prisutan u klinički značajnoj koncentraciji. Svaki pozitivan nalaz dobiven testovima probiranja treba potvrditi postupkom veće specifičnosti. Testovi probiranja imaju mogućnost određivanja jedne supstance ili skupine supstancija, a uključuju: jednostavne kolorimetrijske testove, razliku osmolalnosti, imunokemijske testove, testove probiranja koji otkrivaju skupinu lijekova a uključuju tehnike razdvajanja (TLC, GC, HPLC). Kvantitativno određivanje otrova omogućava u pravilu "zaključke unatrag" o stupnju težine otrovanja. Ono često daje naznake za indikaciju terapije uklanjanja otrova, te u mnogim slučajevima dopušta djelotvornu kontrolu tijekom uklanjanja otrova. Važno je naglasiti da je za procjenu toksikoloških rezultata potrebna uska suradnja između kliničara i medicinskog biokemičara, a toksikološki rezultati tumače se uz kliničku sliku te poznavanje farmakokinetike i toksokinetike pojedinih otrova.

*E-mail: jadranka.wagner@sunce.hr***S10 – Symposium 10 – TOXICOLOGY
AND PHARMACOGENETICS, S10-1****New approach to laboratory diagnosis in
clinical toxicology**

Wagner Jadranka

Sunce Polyclinic, Osijek, Croatia

It is a well known fact that the same chemical compound used in small quantities can be considered a food additive, in moderate quantities may be a medicine, but used in large quantities can be very toxic. The main causes of acute poisoning in the population are drugs, followed by alcohol, opiates, mushrooms, etc. Diagnosis is based on history, physical examination, clinical evaluation and selective laboratory analysis. Which laboratory tests should be done vary from case to case. There is no laboratory test that could detect and confirm all toxins. Clinical toxicological analysis includes methods of direct qualitative and direct quantitative toxin measures, but also indirect methods that measure toxin activity. The main task of qualitative analysis is to determine or exclude the presence of one or more toxins. The importance of qualitative toxin detection lies in the fact that, if the diagnosis is set at the time of sample collection and compared to the results of clinical toxicological analysis, it is accurate in 22%, partially accurate in 36% and false in 42% of cases. Negative result means that the toxin is not present in a clinically relevant concentration. Each positive result should be confirmed using a test of higher specificity. Screening tests can be used to detect only one or several substances; these include simple colorimetric tests, immunochemistry based tests, GC, HPLC, TLC. Tight collaboration between clinicians and medical biochemists is needed for proper evaluation of toxicological results, and results should be interpreted using the knowledge on the specific toxin pharmacokinetics and toxokinetics.

E-mail: jadranka.wagner@sunce.hr

S10-2

Štetni utjecaj nekontrolirane suplementacije: uloga laboratorijskih analiza i nutrigenetike u anti-aging medicini

Bosotina Marin

Poliklinika Analiza, Split, Hrvatska

Produženje života i svakodnevna dostignuća u području medicinske znanosti doveli su do razvoja nove grane medicine: *anti-aging* medicine. Po definiciji *anti-aging* medicina je primjena dijagnostičkih i terapijskih metoda u cilju ranog otkrivanja, prevencije i liječenja s procesom starenja povezanih poremećaja i bolesti, što dovodi do unaprjeđenja kvalitete života i produžetka ljudskog vijeka. Obilježava ju individualizirani pristup svakom bolesniku, a uloga laboratorijskih analiza u utvrđivanju optimalne funkcije organizma je bitna. Kako je hrana osnovni izvor energije, pravilan odabir i količina namirnica nezaobilazni su čimbenik za postizanje kvalitete života. Zbog brzog tempa života i svakodnevnog stresa suvremeni čovjek često poseže za tabletama vitamina, minerala i ostalim suplementima, što može dovesti do ozbiljnog narušavanja fiziologije organizma. Uz metode koje nudi nutrigenetika (analiza DNA), na raspolaganju su i analize iz opsega rada medicinsko-biokemijskog laboratorija. Prvi je cilj dijagnosticirati "štetnu hranu": analiza DNA, test na individualne alergene i test intolerancije na hranu. Prije negoli započnemo suplementaciju na raspolaganju su na nam brojne specijalističke laboratorijske analize: antioksidansi oksidativnog stresa, analiza minerala i toksičnih elemenata u kosi, masne kiseline u eritrocitima i dr. Cilj je upozoriti na opasnost od nekontrolirane uporabe dodataka prehrani, kao i prikaz laboratorijskih analiza kojima utvrđujemo razinu vitamina, minerala, masnih kiselina i drugih oblika suplemenata. Istraživanje se provodilo na dvojaki način: na temelju dostupnih podataka iz svakodnevnog rada laboratorija i dostupne literature. Vitamin C uz niz pozitivnih kliničkih značajka izaziva probavne smetnje i sniženje razine bakra u organizmu. Velike količine kalcija dovode do gubitka apetita, mučnine, povraćanja, glavobolje, nepravilnog srčanog ritma i svrbeža. Nuspojave pretjeranog unosa željeza su porast razine slobodnih radikala u organizmu, povećan rizik od razvoja karcinoma, SLE i Huntingtonove bolesti, te kod bolesnika s reumatoidnim artritisom pogoršanje simptoma osnovne bolesti. Visoka razina vitamina A u tijelu može rezultirati pojavom porođajnih anomalija, smanjivanjem gustoće kosti i promjenom lipidograma (porast). U zaključku, nekontrolirana uporaba neprimjerene (kvantitativno i kvalitativno) suplementacije je riskantna za zdravlje bolesnika, jer su utvrđene broj-

S10-2

Side effects of uncontrolled supplementation: the role of laboratory analysis and nutrigenetics in anti-aging medicine

Bosotina Marin

Analiza Polyclinic, Split, Croatia

Prolonged life expectancy and daily achievements in the field of medical sciences have led to the development of a novel branch of medicine, anti-aging medicine. By definition, anti-aging medicine implies the use of diagnostic and therapeutic methods for early detection, prevention and treatment of impairments and disorders associated with the process of aging, thus improving the quality of life and extending life expectancy. Anti-aging medicine is characterized by individual approach to each patient, with laboratory analyses playing the crucial role in assessing the optimal body function. As food is the main source of energy, an appropriate choice and amount of foodstuffs is an unavoidable factor to achieve a favorable quality of life. Due to the fast lane life and daily stress exposure, modern man frequently reaches for tablets of vitamins, minerals and other supplements, which may severely impair the body physiology. In addition to the methods offered by nutrigenetics (DNA analysis), analyses from the scope of medical biochemistry laboratory are also available. The primary goal is to diagnose "harmful food": DNA analysis, testing for individual allergens, and testing for food intolerance. Prior to initiating supplementation, numerous specialist laboratory analyses can be performed: oxidative stress antioxidants, analysis of hair minerals and toxic elements, erythrocyte fatty acids, etc. The objective is to point to the risk associated with uncontrolled use of food additives and to present the array of laboratory tests to determine the levels of vitamins, minerals, fatty acids and other forms of supplementation. The study had a dual design: on the basis of data deriving from daily laboratory routine and from the literature. In addition to a number of favorable clinical characteristics, vitamin C may cause gastrointestinal discomforts and reduce the level of copper in the body. High amounts of calcium lead to inappetence, nausea, vomiting, headache, cardiac rhythm impairment, and pruritus. Side effects of excessive iron intake include an increased body level of free radicals, increase in the risk for the development of carcinoma, SLE and Huntington's disease, and exacerbation of the underlying disease symptoms in patients with rheumatoid arthritis. A high level of vitamin A in the body may result in birth defects, reduced bone density and lipidogram alteration (increase). In conclusion, uncontrolled

ne štetne posljedice. Prethodne laboratorijske analize te metode dostupne u okviru nutrigenetike jamče sigurnu i učinkovitu suplemenaciju.

E-mail: develop@chronolab.com

S10-3

Pasivno pušenje marihuane i pozitivna doping kontrola

Osredkar Joško

Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

Uporaba i zlorporaba društvenih droga danas su široko rasprostranjeni u društvu te nema dokaza da bi šport bio imun na tu pojavu. Kanabis je na popisu zabranjenih tvari u športu, iako njegov učinak na uspješnost još nije dokazan. Popularnost kanabisa kao društvene droge među mlađim naraštajima stavlja ga na vrh popisa spojeva koje otkrivaju antidopinški laboratoriji ovlašteni od strane Svjetske antidopinške agencije širom svijeta. Obrada rezultata analize mokraće prilično je teška za medicinske i disciplinske komisije, ne samo zbog društvene uporabe ove tvari, nego isto tako zbog tumačenja analitičkih podataka dobivenih iz uzoraka mokraće. Marihuana se često puši u raznim društvenim situacijama gdje ovu drogu ne puše svi nazočni. Stoga je moguće da nepušači pasivno udahnu dovoljno kanabinoida iz dima marihuane da bi izlučili takve količine metaboličnih proizvoda u mokraći koje se mogu otkriti. Apsorpcija delta-9 tetrahidrokanabinola (THC) iz zraka u prostoriji u dovoljnoj količini da stvori razine u plazmi koje se mogu otkriti te metaboliti u mokraći ovise o mnoštvu čimbenika, uključujući trajanje i učestalost izloženosti dimu, koncentraciji THC u zraku u prostoriji te pojedinačnoj osjetljivosti na marihuanu. Ako se kanabis uzima radi ublažavanja treme prije natjecanja ili nekog drugog stresnog događaja, radi poboljšanja učinkovitosti, takvu uporabu se više ne smije smatrati rekreacijskom, nego ju treba smatrati sredstvom dopinga. Otkako je 1989. godine Međunarodni olimpijski odbor (MOO) uključio kanabinoide u popis zabranjenih droga pod naslovom Vrste zabranjenih tvari u određenim situacijama, bilježi se visoka incidencija pozitivnih slučajeva na kanabinoide u analizi u okviru dopinške kontrole u športu. Prema znanstvenoj literaturi, malo je vjerojatno

use of (quantitatively and qualitatively) inappropriate supplementation poses a risk for patient health, since a number of associated adverse effects have been demonstrated. Previous laboratory analyses and methods available in the frame of nutrigenetics ensure safe and efficient supplementation.

E-mail: develop@chronolab.com

S10-3

Passive marijuana smoking and positive doping control

Osredkar Joško

Institute of Clinical Chemistry and Biochemistry, University Medical Centre Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

The use and abuse of social drugs is now widespread in society, and there is no evidence that sport is immune. Cannabis is on the list of prohibited substances in the practice of sports, although its performance enhancing effect has not yet been proved. Its popularity among younger generations as a social drug puts cannabis at the top of the list of compounds detected by the anti-doping laboratories accredited by the World Anti-Doping Agency worldwide. The management of the results of urine analysis is quite difficult for the medical and disciplinary committees not only because of the social use of the substance but also because of the interpretation of analytical data from urine samples. Marijuana is commonly smoked in social situations in which not all present smoke the drug. It is therefore possible that non-smokers can passively inhale enough of the cannabinoids from marijuana smoke to excrete detectable amounts of the metabolic products in their urine. The absorption of delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) from room air in a sufficient quantity to produce detectable plasma levels and of its urinary metabolites would depend on a variety of factors including duration and frequency of smoke exposure, room air concentration of THC, and individual sensitivity to marijuana. If cannabis is used to manage anxiety before a competition or another stressor event, in order to increase efficiency, this use should be no longer viewed as recreational but should be considered as a doping agent. A high incidence of positive cases for cannabinoids in analysis for doping control in sports has been observed since the International Olympic Committee (IOC) included them in the 1989 list of prohibited drugs under the title Classes of Prohibited Substances in

da bi pasivno udisanje dima marihuane u društvu osoba koje puše marihuanu, čak i u zatvorenom prostoru, moglo rezultirati sistemskim razinama THC koje dovode do pozitivnog testa mokraće.

E-mail: josko.osredkar@kclj.si

S10-3

Regresijski model za predviđanje doze varfarina iz farmakogenetskog statusa – klinička primjena

Štefanović Mario

Klinički zavod za kemiju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Varfarin je antikoagulantni lijek (racemična smjesa S- i R-enantiomera) čije se doziranje pažljivo titrira kako bi se izbjegao rizik za život ozbiljnih nuspojava poput krvarenja. Ovaj rizik barem je djelomice uzrokovan genskim polimorfizmom CYP2C9, glavnog enzima metabolizma varfarina. Uz alel divljeg tipa CYP2C9*1, najčešći mutirani aleli su CYP2C9*2 i CYP2C9*3 i oni kodiraju enzime sa svega 16%-20%, odnosno 5% aktivnosti enzima divljeg tipa. Iz genotipa se mogu procijeniti tri vrste metaboličkog fenotipa (sporometabolizirajući – PM s oba alela mutirana, srednjemetabolizirajući – IM s jednim alelom divljeg tipa i brzometabolizirajući – EM s oba alela divljeg tipa). Glavni ciljevi istraživanja bili su utvrditi višestruki regresijski model koji bi se mogao primijeniti za predviđanje optimalnog doziranja lijeka, te odrediti kliničko značenje i opravdanost genotipizacije CYP2C9 pri uvođenju i optimiranju terapije varfarinom. Metodom PCR-RFLP određen je genotip CYP2C9 u 181 bolesnika (56,4% muškaraca, srednje dobi 62 godine) koji uzimaju varfarin u dozama potrebnim za održavanje vrijednosti protrombinskog vremena unutar raspona INR 1,5-2,5). U izradu modela uključen je i doprinos drugih čimbenika (genskih polimorfizama koagulacijskih faktora II i faktora V Leiden), dobi, spola, polimorfizma gena CYP2C19 (enzim metabolizma R-varfarina), uzimanih lijekova, te različitih prisutnih dijagnoza. Ti se čimbenici u modelu nisu pokazali značajnima. Najboljim modelom višestruke linearne regresije pokazao se model koji optimalnu dozu procjenjuje iz standardne početne doze, fenotipa EM i PM, te omjera ciljne vrijednosti INR i vrijednosti INR određene 72 sata od početka terapije.

Certain Circumstances. Based on the scientific literature it is highly unlikely that passive inhalation of marijuana smoke, when in the company of marijuana smokers, even in indoor area, would result in systemic levels of THC that would produce positive urine test.

E-mail: josko.osredkar@kclj.si

S10-4

Warfarin dose prediction regression model from pharmacogenetic status – clinical application

Štefanović Mario

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Warfarin is an anticoagulant drug (racemic mixture of S- and R-enantiomers) whose dosage is carefully titrated to avoid the risk of serious side effects such as life-threatening bleeding. This risk exists at least in part due to the genetic polymorphism of CYP2C9, the major enzyme of warfarin metabolism. Besides wild type allele CYP2C9*1, the most common mutant alleles CYP2C9*2 and CYP2C9*3 code for enzymes with only 16%-20% and 5% of total wild type activity, respectively. Three types of metabolic phenotype can be derived from genotype information (poor metabolizer – PM with both alleles mutant, intermediate metabolizer – IM with one mutated allele, and extensive metabolizer – EM with both wild type alleles). The aim of the study was to find a multiple regression model that could be used for dose prediction and to assess the importance of CYP2C9 genotyping in patients receiving warfarin anticoagulant therapy. Phenotyping by PCR-RFLP method was performed in 181 patients (56.4% male, mean age 62 yrs) receiving warfarin in doses needed to maintain prothrombin time value within the INR range 1.5-2.5. The contribution of other factors (coagulation factor II (prothrombin) and factor V Leiden genetic polymorphisms), sex, age, CYP2C19 polymorphism (which is R-warfarin metabolic enzyme), influence of other medication used and of different diagnoses were also included on model assessment. These factors showed to be of no importance for the model. A model estimating optimal warfarin dose from standard dose at the beginning of therapy, patient EM and PM phenotype, and the ratio of target INR value/INR derived 72 hours of

Model unutar odstupanja ± 1 mg točno procjenjuje dozu za oko 76% bolesnika. Iz modela proizlazi da prisutnost fenotipa IM doprinosi sniženju standardne doze za 6%, a fenotipa PM za 9%. Istraživanje je potvrdilo da oštećenje gena CYP2C9 značajno smanjuje optimalnu dozu održavanja terapije varfarinom u odnosu na dozu osoba genotipa 1/1: genotip 2/2 uzrokuje smanjenje doze na 66%, a genotip 3/3 na 33% ($p=0,025$). Fenotip IM uzrokuje smanjenje doze na 88% ($p=0,008$), a PM na 55%. Vjerojatnost da će osobe s alelom CYP2C9*3 uzimati doze niže od 3 mg četiri je puta veća u odnosu na osobe bez tog alela (OR=4,14; 95%CI: 1,7-10,3). Raspodjela alela CYP2C9, genotipova i fenotipova u zdravoj populaciji u skladu je s podacima drugih autora: 11,8% alela CYP2C9*2 i 4,0% alela CYP2C9*3, genotipa 1/1 (68,8%), 1/2 (22,6%), 1/3 (8,1%), 2/2 (0,5%), a genotipa 2/3 i 3/3 (0,0%). Zaključak istraživanja je da informacija dobivena genotipizacijom CYP2C9 može ukazati na povišen rizik nuspojava pri liječenju varfarinom, a upotreba predloženog regresijskog modela može značajno unaprijediti i mogućnost procjenjivanja sigurne i optimalne doze lijeka.

E-mail: mstefan6@vip.hr

S10-5

Uloga farmakogenetičkih varijacija u liječenju depresije

Božina Nada

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb, Zagreb, Hrvatska

Unatoč razvoju farmakoterapije antidepresivima 30%-40% bolesnika nema zadovoljavajući odgovor na početno liječenje, a njihova identifikacija može potrajati do 6 tjedana. Stoga bi pouzdani biološki biljezi mogli biti dragocjeni za individualizaciju terapije. Farmakogenomička istraživanja u psihijatriji pokušavaju definirati utjecaj genetičkih polimorfizama na povoljne i nepovoljne reakcije na psihotropne lijekove. Genski kandidati za farmakogenomičke studije su geni koji kodiraju proteine izravno uključene u farmakokinetiku (enzimi koji metaboliziraju lijekove, membranski transporteri lijekova itd.) i farmakodinamiku (geni koji kodiraju ciljna mjesta lijeka: elementi putova neurotransmitora kao što su transporteri i receptori). Biotransformacija antidepresivnih lijekova je raznolika i uključuje različite enzime, među kojima su naj-

therapy initiation was recognized as the best multiple linear regression model. Within ± 1 mg deviation, this model was able to predict drug dose for about 76% of patients. In this model, IM phenotype contributed for 6% and PM phenotype for 9% decrement of standard dose. This study confirmed that in comparison to 1/1 genotype, CYP2C9 impairment significantly decreased optimal warfarin therapy maintenance dose: 2/2 genotype decreased the dose to 66%, and genotype 3/3 to 33% ($p=0.025$). IM phenotype decreased the dose to 88% ($p=0.008$) and PM to only 55%. The probability that CYP2C9*3 allele carriers would take doses smaller than 3 mg was four-fold that in non-carriers (OR=4.14; 95%CI: 1.7-10.3). The CYP2C9 allele, genotype and phenotype distribution in healthy population was consistent with data reported by other authors: 11.8% CYP2C9*2 alleles and 4.0% CYP2C9*3 alleles, genotype 1/1 (68.8%), 1/2 (22.6%), 1/3 (8.1%), 2/2 (0.5%), and genotype 2/3 and 3/3 (0.0%). Study conclusion is that information derived from CYP2C9 genotyping can indicate an increased risk of warfarin therapy side effects, and that the use of the regression model proposed can significantly improve assessment of the safe and optimal drug dose.

E-mail: mstefan6@vip.hr

S10-5

The role of pharmacogenetic variations in depression therapy

Božina Nada

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Despite advances in antidepressant pharmacotherapy, 30%-40% of patients do not respond sufficiently to the initial treatment and their identification can take up to 6 weeks. Thus, reliable biological markers could be valuable for therapy individualization. Pharmacogenomic investigations in psychiatry are attempting to define the impact that genetic polymorphisms have on positive and adverse reactions to psychotropic drugs. Candidate genes for pharmacogenomic studies are those that encode proteins directly involved in the pharmacokinetics (drug-metabolizing enzymes, membrane drug transporters, etc.) and pharmacodynamics (genes encoding drug targets: elements of neurotransmitter pathways such as transporters and receptors) of psychoactive drugs. Biotransformation of antidepressant drugs is diverse and

važniji CYP2D6, CYP2C19 i CYP3A4. P-glikoprotein što ga kodira polimorfni MDR1 (gen rezistencije na više lijekova) prepoznat je kao ključni element u reguliranju pristupa terapijskih agenasa mozgu i drugim tkivima te je stoga od farmakogenetičkog značenja. Na farmakodinamičkoj razini, polimorfni serotoninški transporter (SERT) bi, kao glavni cilj mnogih antidepresivnih lijekova, mogao biti zanimljiv predmet farmakogenetičkog istraživanja. Cilj ove studije bio je vrednovati značajnost polimorfnih varijanta CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, MDR1 i SERT kod odgovora na liječenje i nepovoljnih reakcija na lijekove u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem (MDD) koji su primali antidepresive. U studiji je sudjelovalo 114 takvih bolesnika. Farmakogenetičke analize provedene su metodama PCR-RFLP. Duplikacije CYP2D6 bile su češće u skupini rezistentnoj na lijek u usporedbi sa skupinom koja je odgovarala na lijek ($p=0,02$). Učestalost alela G2677- MDR1 bila je značajno viša u skupini rezistentnoj na lijek u usporedbi sa skupinom koja je odgovarala na lijek ($p=0,05$). Utvrđene su značajne povezanosti između alela SERTPR-L i genotipa L/L te boljeg terapijskog odgovora ($p=0,03$ i $0,04$), izmjerene Hamiltonovom ljestvicom za ocjenjivanje depresije (*Hamilton Depression Rating Scale*, HAM-D). Zaključeno je kako genetičke varijante CYP2D6, MDR1 i SERT mogu utjecati na ishod psihofarmakoterapije.

E-mail: nbozina@kbc-zagreb.hr

S11 – Simpozij 11 – AUTOIMUNE I ALERGIJSKE BOLESTI, S11-2

Smjernice za testiranje na antinuklearna antitijela (ANA)

Wiik Allan

Department of Autoimmunology, Statens Serum Institute, Copenhagen, Danska

Testiranje na autoantitijela dobiva sve važniju ulogu u kliničkoj medicini, poglavito u reumatologiji. Utvrđeno je kako među različitim autoantitijelima ona koja su usmjerena prema staničnim jezgrama i citoplazmi, ovdje skupo nazvana antinuklearna antitijela (ANA), pomažu u postavljanju ispravne dijagnoze, procjeni prognoze i planiranju praćenja u bolesnika s autoimunim upalnim reumatskim bolestima (IRD). Otkriće snažno izraženih ANA u slučaju vrlo rane bolesti kad još nedostaje većina znakoviti obilježja potpuno rasplamsale bolesti, može voditi daljnju potragu za zahvaćenim organom ili tkivom te pokazati koji se tip ili podtip bolesti razvija. Neka ANA su

involves different enzymes, among which most important are CYP2D6, CYP2C19, and CYP3A4. P-glycoprotein, coded by polymorphic MDR1 (multi-drug resistance gene) is recognized as a key element in regulating access of therapeutic agents to the brain and other tissues, and thus has pharmacogenetic relevance. At pharmacodynamic level, polymorphic serotonin transporter (SERT) as the main target of many antidepressant drugs could also be an attractive candidate for pharmacogenetic study. The aim of this study was to evaluate the significance of polymorphic variants of CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4, MDR1 and SERT for treatment response and adverse drug reactions in patients with major depression disorder (MDD) receiving antidepressant medication. The study included 114 MDD patients. Pharmacogenetic analyses were performed by PCR-RFLP methods. CYP2D6 duplications were more frequent in drug-resistant group compared to responder group ($p=0.02$). The frequency of G2677 allele of MDR1 was significantly higher in drug-resistant group compared to responder group ($p=0.05$). Significant associations between SERTPR-L allele and L/L genotype and better treatment response ($p=0.03$, and $p=0.04$, respectively) measured by Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D) score were found. It is concluded that genetic variants of CYP2D6, MDR1 and SERT may have an impact on psychopharmacotherapy outcome.

E-mail: nbozina@kbc-zagreb.hr

S11 – Symposium 11 – AUTOIMMUNE AND ALLERGIC DISEASES, S11-2

Guidelines for antinuclear antibody (ANA) testing

Wiik Allan

Department of Autoimmunology, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark

Testing for autoantibodies has attained an increasingly important role in clinical medicine, especially in rheumatology. Among the various autoantibodies those that are directed to cell nuclei and cytoplasm, here collectively called antinuclear antibodies (ANA), have been found to aid in setting correct diagnosis, estimating prognosis and planning follow-up of patients with autoimmune inflammatory rheumatic diseases (IRD). Discovery of a strongly expressed ANA in a case of very early disease where most of the characteristic features of the full-blown disease are still lacking can guide further search for organ or tissue involvement and indicate which type or subtype of the

specifična za bolest, dok je većina drugih udružena s bolešću, jer se mogu naći u više različitih IRD. Obvezno je temeljito ispitivanje kliničkih okolnosti u kojima je nađeno ANA, kako bi se mogla tumačiti njegova značajnost za dijagnostiku i kliničko planiranje. Stoga su detaljna klinička anamneza i fizikalni pregled neophodni za utvrđivanje potrebnih dijagnostičkih pretraga i prognozu. Razumno je započeti s dobivanjem uvida u tip bolesti pregledom rezultata jednostavnih laboratorijskih pretraga na prisutnost upale i imune aktivacije prije negoli se provede testiranje na autoantitijela kao što su ANA. Razumno je i isplativo započeti probirom na prisutnost ANA pomoću neke osjetljive i dokumentirane metode kao što je indirektna imunofluorescencija (IF) na staničnom supstratu HEp-2, te potom primijeniti postupni pristup kako bi se definiralo specifično ANA za dotični slučaj. U mnogim slučajevima može se izravno primijeniti ispravno tumačenje IF bojanja uočeno takvim probirom da bi se ukazalo na to koja je dijagnoza vjerojatnija te pomoglo u vođenju daljnje potrage za specifičnošću ANA. ANA se u osnovi mogu podijeliti na ona koja reagiraju s jezgrenom ovojnicom, nukleoplazmom, nukleolima, mitotskim vretenastim aparatom i citoplazmom. Tek se malobrojni poznati proteini ovih odjeljaka pretvaraju u autoantigene, najvjerojatnije zbog upalom izazvane stanične smrti tijekom koje neki antigeni podliježu poslije-translacijskoj modifikaciji. Ove modifikacije započinju aktiviranjem mnogih različitih gena, ali se zna da proizvodnjom autoantitijela koja se nalazi u nekih, ali ne u svih bolesnika s IRD, upravlja aktiviranje specifičnih gena za autoantitijela u kompleksu HLA klase II. Kad se u bolesnika nađe pozitivan rezultat testa IF ANA, važno je znati da daljnje pretrage na specifičnost antitijela treba provesti samo onda kad postoje izgledi da će ih ti testovi otkriti. U praktičnom smislu to znači da se samo srednje do jako izražena ANA usmjerena prema nukleoplazmi i citoplazmi mogu dalje diferencirati drugim testovima, kao što su dvostruka imunodifuzija, imunoblot, ELISA, pasivna hemaglutinacija itd. Čak se ni jako izražena ANA usmjerena ka jezgrenom membrani, nukleolima i mitotskom vretenu ne mogu zasad dalje diferencirati u rutinskim dijagnostičkim okolnostima. Slično tome, nije vjerojatno da će se specifična ANA moći otkriti ako je test IF ANA slabo pozitivan. Čak se ni primjenom suvremenih testnih tehnologija poput autoantigenskih multi-arrays, testova s ciljnim laserskim zrakama, testova imuno-luminiscencije itd. ne može odrediti specifičnost u takvim slučajevima. Dobro se zna da se određena ANA primjenjuju kao dijagnostički kriteriji kao dio dijagnostike IRD, kao što je u slučaju sistemskog eritematoznog lupusa (SLE), miješane bolesti vezivnog tkiva (MCTD) i Sjögrenova sindroma (SjS). U slučaju skleroderme (SSc), poli- i dermatomiozitisa (PM/DM), juvenilnog kroničnog artritisa (JCA) i sekundarnog SjS, otkriće specifičnog ANA služi kao važna potpora dijagnozi i prognozi. Kod SLE prisutnost

disease is developing. Some ANA are disease-specific whereas most others are disease-associated as they can be found in several different IRD. A thorough study of the clinical setting in which an ANA is found is mandatory to be able to interpret its significance for diagnosis and clinical planning. Thus, a detailed clinical history and physical examination is indispensable to start the work-up of diagnosis and prognosis. It is rational to start by getting an impression of the disease type by looking at simple laboratory test results for the presence of inflammation and immune activation before one looks for autoantibodies such as ANA. It is rational and cost-effective to begin with screening for the presence of ANA using a sensitive and documented method such as indirect immunofluorescence (IF) on a HEp-2 cell substrate and then to use a stepwise approach to characterize the specific ANA in question. In many cases the correct interpretation of the IF staining pattern seen by such screening can be used directly to indicate which diagnosis is more likely and to help guide further search for ANA specificity. ANA can roughly be divided into those that react with the nuclear envelope, the nucleoplasm, the nucleoli, the mitotic spindle apparatus, and the cytoplasm. Only few of the known proteins of these compartments turn into autoantigens, most likely due to inflammation-induced cell death during which some antigens get post-translationally modified. These modifications are initiated by activation of many different genes, but it is also known that the autoantibody production seen in some but not all IRD patients is governed by activation of specific autoantibody genes in the HLA class II complex. When the IF ANA test has been found positive in a patient, it is important to realize that further testing for antibody specificity should be undertaken only when assays have a chance to detect them. In practical terms, this means that only intermediately to strongly expressed ANA directed to the nucleoplasm and cytoplasm can be further differentiated by other tests such as double immunodiffusion, immunoblotting, ELISA, passive hemagglutination, etc. Even strongly expressed ANA directed to nuclear membrane, to nucleoli and to mitotic spindle cannot be characterized further in a diagnostic routine setting today. Similarly, it is unlikely that a specific ANA can be detected if the IF ANA test is weakly positive. Even the use of modern test technologies, e.g., autoantigen multi-arrays, addressable laser bead assays, immuno-luminescence tests, etc. cannot determine the specificity in cases like this. It is well known that certain ANA are used as diagnostic criteria as part of an IRD diagnosis, as is the case in systemic lupus erythematosus (SLE), mixed connective tissue disease (MCTD), and Sjögren's syndrome (SjS). In case of scleroderma (SSc), poly- and dermatomyositis (PM/DM), juvenile chronic arthritis (JCA) and secondary SjS the detection of a specific ANA serves as important support for diagnosis and prog-

ANA, anti-dsDNA, anti-Sm i anti-ribonukleoproteinskih P antitijela služi kao dijagnostički kriterij. Kod SjS prisutnost antitijela anti-SSA/Ro i/ili anti-SSB/La služi kao dijagnostički kriterij u američko-europskom nizu kriterija. Poznato je da se prisutnost antitijela anti-U1RNP rabi kao obvezni kriterij za MCTD. Kod SSc prisutnost antitijela anti-centromera, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-RNA polimeraze 1 i anti-Scl-70 znakovita je za dijagnozu, no svako je od njih udruženo s vrlo različitim kliničkim sub-sindromima (fenotipovima), koji imaju važne korelate u smislu prognoze. Ovakvi različiti klinički fenotipovi povezani s ANA nalaze se kod SLE, PM/DM, SjS i JCA. Uvijek je predstavljalo izazov kako se baviti graničnim pozitivnim serološkim rezultatima: mogu se izvesti dvije različite vrste testova i potražiti sukladnost prije negoli se izda pozitivan rezultat; klinici se može izdati nalaz uz napomenu da se taj pozitivan rezultat ne smije rabiti s jednakom pouzdanošću kao jasno pozitivan rezultat; ili se može iznova postaviti prijelomna vrijednost (*cut-off*) za pozitivnost testa tako da se samo rezultati iznad te prijelomne vrijednosti smatraju pozitivnima. Potpuno je jasno da se rezultati dobiveni uz primjenu testova solidne faze (ELISA, testovi s kapljicama, zrakama itd.) ne mogu izravno uspoređivati s onima polučanim klasičnim tehnikama (dvostruka imunodifuzija, protuimunoelktroforeza, Farrovi testovi itd.). Stoga, kad se takvi testovi solidne faze uvode u primjenu u autoimunoj dijagnostici, obvezno je provesti poslije-marketinšku studiju uz primjenu seruma bolesnika iz vlastite klinike ili klijentele. Rezultati utvrđeni u normalnih davatelja +2 ili 3 SD iznad srednje vrijednosti imaju malo ili nikakvo značenje u ovom kontekstu. Optimalno je testirati serume iz miješane populacije bolesnika s IRD uz serume bolesnika sa zaraznim bolestima (ovi potonji za testiranje na lažno pozitivne rezultate), te tada odlučiti koju prijelomnu vrijednost (*cut-off*) postaviti kako bi razlikovala bolest prototip od svih bolesti koje mogu oponašati ovu bolest (kontrolni bolesnici s kritičnom bolešću). Nakon izrade ROC i izbora dogovorene visoke razine specifičnosti, npr. 95% prema ovim kontrolnim bolesnicima, stvoren je valjani sustav testiranja. Nakon toga osjetljivost se može vidjeti iz grafikona ROC. Testovi koji se rabe za dijagnosticiranje bolesti moraju imati visoku specifičnost. Takav postupak omogućava usporedbu rezultata između različitih laboratorija i klinika. Osjetljivost nije važna za dijagnozu, ali može biti korisna kod probira, kao u slučaju testiranja na ANA pomoću IF. Izazov bi bio dokazati da se test na neko autoantitijelo može rabiti za vrlo ranu dijagnostiku, jer to zahtijeva uzorkovanje seruma pri prvom susretu sa zdravstvenim sustavom kad se bilježe prvi simptomi i nalazi. Za dokazivanje vrijednosti treba bolesnike pratiti sve dok se ne postavi konačna dijagnoza. Kako bi se osiguralo da svi korisnici u različitim kliničkim sredinama naručuju testove na autoantitijela na osnovi istih premisa, preporuča se dogovoriti primjenu algoritma za naručivanje testova, čime

nos. In SLE, the presence of ANA, anti-dsDNA, anti-Sm and anti-ribonucleoprotein P antibodies serve as diagnostic criteria. In SjS, the presence of anti-SSA/Ro and/or anti-SSB/La antibodies serves as diagnostic criteria in the American/European criteria set. It is well known that the presence of anti-U1RNP antibodies is used as a mandatory criterion for MCTD. In SSc, the presence of anti-centromere, anti-U1RNP, anti-U3RNP, anti-RNA polymerase 1 and anti-Scl-70 antibodies are all characteristic of the diagnosis, but each of them is associated with very different clinical sub-syndromes (phenotypes), which have important correlates in terms of prognosis. Such different ANA-related clinical phenotypes are found in SLE, PM/DM, SjS, and in JCA as well. It has always been a challenge how to deal with borderline positive serologic results: one can choose to run two different types of assays and look for agreement before a positive result is reported, one can give the clinic a report saying that this positive result cannot be used with the same confidence as a clearly positive result, or one can re-set the cut-off for positivity of the assay so that only results above this cut-off level are called positive. It is quite clear that results derived by use of solid phase assays (ELISA, bead assays, arrays, etc.) cannot be directly compared with those stemming from classic techniques (double immunodiffusion, counter-immunoelectrophoresis, Farr assays, etc.). Therefore, when such solid phase assays are introduced for use in autoimmune diagnosis, it is mandatory to do a post-marketing study using sera of patients from one's own clinic or clientele. Results found in normal donors +2 or 3 SD above mean value has little or no meaning in this context. It is optimal to test sera from a mixed population of IRD patients supplemented by infectious disease patient sera (the latter to test for false positives), and then decide which cut-off value should be set to discriminate a prototype disease from all the diseases which mimic this disease (critical disease control patients). After construction of receiver-operation curves (ROC) and choosing an agreed high level of specificity, e.g., 95% towards these control patients, a meaningful test system has been created. After doing this, the sensitivity can be seen from the ROC graph. Tests used for diagnosing disease have to have a high specificity. This procedure makes it possible to compare results between different laboratories and clinics. Sensitivity is of no importance for diagnosis but may be useful for screening as is the case with IF ANA testing. It is a special challenge to prove that a test for an autoantibody can be used for very early diagnosis, since it demands sampling of sera at the first encounter with the health system when the first symptoms and findings are recorded. To prove the value, one needs to follow up patients until a definitive diagnosis has been reached. To ensure that all users in various clinical settings order autoantibody tests based on the same premises, it is advised to agree on the use of

će se testiranje učiniti racionalnim i manje skupim, jer će se izbjeći zlouporaba testiranja. Takav algoritam može se sastaviti na više načina: 1. liječnik može testove naručivati na osnovi pretpostavljene dijagnoze, označavajući dijagnozu na koju sumnja, pa će se napraviti racionalni testovi povezani s tom bolešću; 2) ili liječnik može naručiti test probira, npr. IF ANA uz primjenu stanica HEp-2 te nastaviti s drugim testovima nakon što primi pozitivan rezultat, često prema određenom izgledu IF. Ako se testovi na specifična antitijela rade samo nakon jakih i srednje jakih seruma koji izazivaju nukleoplazmično ili citoplazmično bojenje, tada se uspješno mogu otkriti specifična ANA. U zaključku, ANA najvjerojatnije odražavaju narav tkivnog oštećenja, genetsku predispoziciju i možda etiologiju, i vjerojatno su udružena s dobro definiranim fenotipovima IRD koji mogu dovesti do procjene prognoze. Primjenjuju li se na ovaj način, kliničar može planirati praćenje i uvođenje terapijskih mjera kad je to optimalno za sprječavanje napredovanja bolesti. Suvremene platforme za testiranje možda su više ponovljive i lakše za izvođenje automatiziranim postupcima, ali nisu bolje. Za postizanje precizne dijagnoze na razini sub-sindroma važno je imati potporu bolesnika koji su voljni dati krv za kritično mjesno poslijemarketinsko testiranje u takvoj suradnji koja obuhvaća laboratorijske znanstvenike i kliničke specijaliste.

E-mail: aw@ssi.dk

S11-3

Autoantitijela u antifosfolipidnom sindromu

Tešija-Kuna Andrea

Klinički zavod za kemiju, KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Antifosfolipidni sindrom (APS) je autoimuni poremećaj koji se klinički očituje arterijskom ili venskom trombozom i/ili specifičnim opstetričkim komplikacijama te prisutnošću antifosfolipidnih antitijela (aPL) u serumu. aPL čine heterogenu skupinu antitijela različitih reaktivnosti, većinom usmjerenih na fosfolipid-vezujuće proteine, same ili u kompleksu s fosfolipidima kao što su kardiolipin, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin ili fosfatidilinozitol. Laboratorijski kriteriji kao dio klasifikacijskih kriterija za dijagnozu APS (kriteriji Sapporoi) trenutno uključuju prisutnost samo dvaju aPL: antikardiolipinskih antitijela (aCL) IgG i/ili IgM klase u srednjem ili visokom titru (>40 U/mL) i/ili lupus antikoagulant (LA) antitijela. aCL su

an algorithm for test ordering which will make testing rational and less expensive due to avoidance of test abuse. Such an algorithm may be constructed in several ways: 1) the doctor can order tests based on a tentative diagnosis by ticking this suspected diagnosis, and the rational tests related to it will be done, 2) or the doctor can order a screening test, e.g., IF ANA using HEp-2 cells, and go on testing after receiving a positive result, often guided by the particular IF pattern seen. If only strong and intermediately strong sera giving rise to nucleoplasmic or cytoplasmic staining are followed up by specific antibody tests, specific ANA can be detected with success. In conclusion: ANA most likely reflect the nature of tissue lesions, genetic predisposition, and perhaps etiology, and they are likely to be associated with well-defined phenotypes of IRD that can lead to an estimate of prognosis. Used in this way the clinician can plan follow-up and start therapeutic measures when it is optimal for the prevention of disease progression. Modern testing platforms may be more reproducible and easy to perform by automated procedures but are not better. To arrive at a precise sub-syndrome diagnosis it is important to have support from patients who are willing to donate their blood for critical local post-marketing testing in a collaboration that involves laboratory scientists and clinical specialists.

E-mail: aw@ssi.dk

S11-3

Autoantibodies in antiphospholipid syndrome

Tešija-Kuna Andrea

University Department of Chemistry, Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

Antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disorder characterized by arterial or venous thrombosis and/or specific obstetric complications in the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). aPLs are a heterogeneous family of autoantibodies with diverse cross-reactivities mainly directed against phospholipid-binding plasma proteins, either alone or in combination with phospholipids such as cardiolipin, phosphatidyl-serine, phosphatidyl-ethanolamine and phosphatidyl-inositol. Laboratory criteria as part of the classification criteria for APS (Sapporo criteria) currently include presence of only two aPL: anticardiolipin antibodies (aCL) IgG and/or IgM isotype in medium or high titer (>40 U/mL) and/or lupus antico-

usmjerena na kompleks beta₂-glikoproteina I (beta₂-GPI) i kardiolipina, negativno nabijenog fosfolipida iz membrane mitohondrija. Reaktivnost ovih antitijela dokazuje se beta₂-GPI-ovisnim kardiolipinskim ELISA testom. LA antitijela najčešće su usmjerena na protrombin ili beta₂-GPI, a njihova prisutnost se dokazuje funkcionalnim, o fosfolipidima ovisnom koagulacijskim testom prema protokolu definiranom kriterijima Sapporo. Kliničko značenje antitijela na ostale fosfolipid-vezujuće proteine kao što su protrombin, trombin, protein C, protein S, aneksin V, trombomodulin ili kininogen nije još u potpunosti razjašnjeno. Teorija o izravnoj ulozi aPL u patogenezi APS nalazi svoje uporište u rezultatima istraživanja na životinjskim modelima. Naime, pokazalo se da pasivni transfer aPL u normalnog miša izaziva kliničke manifestacije humanog APS. Najvjerojatniji mehanizmi kojima aPL uzrokuju trombozu mogu se podijeliti na one u kojima ova antitijela interferiraju s održavanjem koagulacijske homeostaze i one u kojima izazivaju aktivaciju endotelnih stanica, monocita i trombocita. Kako mnoge osobe s visokim titrom aPL nikada ne razviju trombozu, pretpostavlja se da je potreban utjecaj dodatnog protrombotičnog čimbenika kao što je trauma, dugotrajna imobilizacija, oralni kontraceptivi, trudnoća (hiperkoagulabilno stanje) ili infekcija koja dovodi do aktivacije endotelnih stanica. Najvjerojatniji mehanizam kojim aPL uzrokuju spontani pobačaj je interakcija s placentnim aneksinom V te aktivacija komplementa. Prema novijim istraživanjima prisutnost aPL predstavlja neovisan čimbenik rizika za aterosklerozu, najvjerojatnije posredstvom vezanja za beta₂-GPI koji se nalazi u brojnim lipoproteinskim frakcijama uključujući i oksidirani LDL.

E-mail: andrea.kuna@gmail.com

S11-4

Imunodijagnostika vaskulitisa

Kozmar Ana

Laboratory of Immunology, Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Antineutrofilna citoplazmatska autoantitijela (ANCA) su heterogena skupina cirkulirajućih antitijela protiv citoplazmatskih sastavnica neutrofila i monocita. Sukladno nedavno usuglašanim stajalištima ANCA pokazuju četiri različita imunofluorescentna uzorka na etanolom-fiksiranim ljudskim granulocitima: sjajna granulirana citoplazmatska fluorescencija s izrazitom fluorescencijom

agulant (LA). aCL targets complex of beta₂-glycoprotein-I (beta₂-GPI) and cardiolipin, the negatively charged phospholipid present in the mitochondrial membrane. aCL are detected by beta₂-GPI dependent cardiolipin ELISA test. LA activity is detected by functional phospholipid-dependent coagulation assay according to the protocol defined in Sapporo criteria. Antibodies directed against prothrombin and beta₂-GPI account for the majority of LA activity. Clinical relevance of a variety of other antibodies against different phospholipid-binding proteins such as prothrombin, protein C, protein S, annexin V, thrombomodulin and kininogen remains uncertain. Strong evidence for a direct role of aPL in the pathogenesis of APS has come from murine models. Passive transfer of aPL to normal mice can generally produce features resembling human APS. The most likely mechanisms involving aPL and leading to thrombosis can be classified as those by which aPL interferes with maintenance of coagulation homeostasis and those where antibodies induce cell-mediated events. The main cells involved are endothelial cells, monocytes and platelets. Since many individuals with high aPL titer do not develop thrombosis it seems clear that other prothrombotic factors may be needed, i.e. a "second hit" is required. These promoters of thrombosis include traumatic injury to the vascular bed, pregnancy (hypercoagulable state), prolonged immobilization, oral contraceptives, or infection leading to endothelial cell activation. The most likely mechanism by which aPL can lead to fetal loss include interaction with placental annexin V and complement activation. According to recent investigations it seems that aPL could be an independent risk factor for atherosclerosis. One of the potential mechanisms include binding to beta₂-GPI which is present in various lipoprotein fractions, including oxidized LDL.

E-mail: andrea.kuna@gmail.com

S11-4

Immunodiagnosis of vasculitis

Kozmar Ana

Laboratory of Immunology, Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Hospital Center, Zagreb, Croatia

Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) are a heterogeneous group of circulating antibodies toward the cytoplasmic constituents of neutrophils and monocytes. Recent consensus statements on testing and reporting of ANCA recognize four different immunofluorescence patterns on ethanol-fixed human neutrophils: a coarse granular cytoplasmic fluorescence with accentuation

septuma između jezgrinih segmenata – klasična citoplazmatska ili C-ANCA; tipična perinuklearna fluorescencija s djelomičnom fluorescencijom jezgre – perinuklearna ili P-ANCA; izrazita perinuklearna fluorescencija sa minimalnom fluorescencijom unutar jezgre – izrazito perinuklearna ili “atipična” a/P-ANCA; i atipična ANCA, najčešće kombinacija citoplazmatske i perinuklearne fluorescencije. C-ANCA i P-ANCA opisana su u primarnim sistemskim vaskulitisima malih krvnih žila. Ta ANCA prepoznaju proteinazu 3 (PR3-ANCA) i mijeloperoksidazu (MPO-ANCA). PR3-ANCA i MPO-ANCA znakovita su za Wegenerovu granulomatozu, mikroskopski poliangiitis, idiopatski nekrotizirajući “polumjesečasti” glomerulonefritis i Churg-Straussov sindrom. Meta-analiza podataka otkrila je da su PR3-ANCA i MPO-ANCA osjetljivi dijagnostički i biomarkeri aktivnosti bolesti u bolesnika s Wegenerovom granulomatozom i mikroskopskim poliangiitisom. Isto tako, eksperimentalni podaci *in vivo* i *in vitro* podupiru izrazitu imunopatogenetsku ulogu ANCA u vaskulitisima i glomerulonefritisima. Nasuprot tomu, a/P-ANCA su nađena u kroničnim upalnim bolestima crijeva, bolestima potpornih tkiva, autoimunim bolestima jetre, raznim infekcijama i nekim vaskulitisima izazvanim lijekovima. Ta ANCA prepoznaju različite ciljne antigene. To su katepsin G, laktoferin, aktin, tropomiozin, pokretljivi nehistski kromosomski proteini 1 i 2, baktericidni protein, lamin B1 i histon 1. Učestalost ovih antitijela varira, najčešće je niska. Osim što su korisna u diferencijalnoj dijagnozi Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa nemaju veće kliničko značenje. Da se izbjegne kriva klinička interpretacija od presudne je važnosti jasno razlikovati PR3-ANCA i MPO-ANCA kao pouzdane biomarkere pri dijagnozi i praćenju aktivnosti bolesti u bolesnika s vaskulitisima od a/P-ANCA ili autoantitijela specifičnih za neutrofile (NSA) koja prepoznaju mnoge antigene u bolesnika s kroničnim upalnim bolestima crijeva, jetre i bolestima potpornih tkiva.

E-mail: b_malenica@yahoo.com

between the nuclear lobes – classic cytoplasmic or C-ANCA; a typically perinuclear fluorescence with some nuclear extension – perinuclear or P-ANCA; pronounced nuclear rim fluorescence with minimal nuclear extension, center of nucleus unstained – very perinuclear or “atypical” a/P-ANCA; and atypical ANCA which include all other fluorescence reactivity, most commonly a combination of cytoplasmic and perinuclear fluorescence. C-ANCA and P-ANCA have been described in primary systemic small vessel vasculitides. These ANCA recognize proteinase 3 (PR3-ANCA) and myeloperoxidase (MPO-ANCA), respectively. Both PR3-ANCA and MPO-ANCA are closely associated with Wegener’s granulomatosis, microscopic polyangiitis, idiopathic necrotizing crescentic glomerulonephritis and Churg-Strauss syndrome. A meta-analysis of data showed that PR3- and MPO-ANCA are sensitive diagnostic and disease-activity biomarkers in patients with Wegener’s granulomatosis and microscopic polyangiitis. Also, both *in vitro* and *in vivo* experimental data strongly support a pathogenic role of these ANCA in vasculitis and glomerulonephritis. On the contrary, a/P-ANCA were found in patients with chronic inflammatory bowel diseases, connective tissue diseases, autoimmune liver diseases, infectious diseases and some types of drug-induced vasculitis. These ANCA have multiple antigen specificities. These include cathepsin G, lactoferrin, actin, tropomyosin, high motility groups of nonhistone chromosomal proteins 1 and 2, bactericidal permeability-increasing protein, lamin B1 and histone 1. Antibody levels of these ANCA are variable, often low. Apart from the use in the differential diagnosis between Crohn’s disease and ulcerative colitis, very limited clinical significance is ascribed to them. To avoid clinical misinterpretation, it is important to clearly distinguish PR3- and MPO-ANCA as true antineutrophil cytoplasmic antibodies which are diagnostic and disease-activity biomarkers for small vessel vasculitis, from “atypical” P-ANCA that are neutrophil-specific autoantibodies (NSA) which recognize many different autoantigens and are typically found in patients with chronic inflammatory bowel and liver disease and connective tissue diseases.

E-mail: b_malenica@yahoo.com

S11-5

Imunodijagnostika autoimunih bolesti jetre

Salamunić Ilza

Klinička bolnica Split, Split, Hrvatska

Autoimuni hepatitis (AIH) je bolest nepoznatog uzroka obilježena hipergamaglobulinemijom, cirkulirajućim serumskim autoantitijelima i najčešće dobro reagira na imunosupresivnu terapiju. Dokazivanje autoantitijela provodi se metodom indirektno imunofluorescencije (IIF), dok se za identifikaciju specifičnog antigena rabe imunokemijske metode s obilježenim reagensima. Na temelju nalaza autoantitijela u serumu AIH se danas klasificira u dva tipa. AIH I. obilježavaju antinuklearna antitijela (ANA) i/ili autoantitijela na glatku muskulaturu (AGLM), autoantitijela protiv topljivih jetrenih antigena i mikrosoma jetre i gušterače (anti-SLA/LP) te antineutrofilna citoplazmatska antitijela (ANCA) i autoantitijela protiv specifičnog asialoglikoproteinskog receptora (anti-ASGP-R). AIH II. obilježavaju autoantitijela protiv mikrosoma jetre i bubrega (anti-LKM), autoantitijela protiv jetrenog citosolnog antigena tip 1 (anti-LC1) te anti-ASGP-R. Supstrati za dokazivanje ANA su kriostatski rezovi štakorske jetre ili osjetljiviji supstrat stanične kulture HEp2 (humane epiteloidne stanice). Metode ELISA i imunoblot (IB) se rabe za dokazivanje najčešćih antigena (histona, dsDNA, centromera). AGLM se često nalaze zajedno s ANA, a glavni ciljni antigen koji prepoznaju je F-aktin. SLA/LP autoantitijela su visoko specifična za AIH i dokazuju se metodom ELISA. Ciljni antigen za anti-LKM1 je citokrom P4502D6 (CYP2D6), a usporedbe određivanja metodom IIF na kriostatskim rezovima glodavaca s metodama koje rabe rekombinantne antigene daju dobre rezultate. Anti-ASGP-R je glikoprotein specifičan za jetru, nalazi se na staničnoj membrani u 88% bolesnika s AIH, a značajno je zastupljen i u primarnoj bilijarnoj cirozi (PBC). Zbog metodoloških nedostataka ne preporuča se u rutinskoj imunodijagnostici AIH. Standardna metoda za dokazivanje ANCA je IIF na etanolom fiksiranim ljudskim granulocitima. Atipična perinuklearna ANCA odlikuju se izrazitom perifernom fluorescencijom jezgre, nalaze se u bolesnika s primarnim sklerozirajućim kolangitisom (PSC). Antimitohondrijska antitijela (AMA) znakovita su antitijela PBC.

AMA prepoznaju devet (M1 do M9) skupina mitohondrijskih antigena, a oko 95% oboljelih od PBC imaju pozitivna antitijela M2. AMA se dokazuju pomoću IIF na tkivnim preparatima štakorskog bubrega ili na stanicama HEp2, a

S11-5

Immunodiagnosis of autoimmune liver diseases

Salamunić Ilza

Split University Hospital, Split, Croatia

Autoimmune hepatitis (AIH) is a progressive, necroinflammatory liver disorder of unknown cause, characterized by hypergammaglobulinemia, liver-specific serum autoantibodies and a positive response to immunosuppressive therapy. Testing for autoantibodies can be carried out by indirect immunofluorescence (IIF) using the appropriate substrate or if the respective target antigen is known and available, by immunologic analyses. According to the pattern of autoantibodies detected in AIH, a subclassification of the disease into two types has been proposed. AIH I is characterized by the presence of antinuclear antibodies (ANA) and/or smooth muscle autoantibodies (SMA), autoantibodies against soluble liver antigen/liver-pancreas antigen (anti-SLA/LP) which may be associated with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) and autoantibodies against the asialoglycoprotein receptor (anti-ASGP-R). AIH II is characterized by the presence of autoantibodies against liver-kidney microsomal antigens (anti-LKM), against liver cytosol 1 antigen (anti-LC1) and anti-ASGP-R. ANA is readily detectable by nuclear staining of rodent tissues, HEp2 cell slides or if the respective target antigen is known and available by ELISA. SMA autoantibodies are predominantly directed against filamentary actin (F-actin). SLA/LP autoantibodies are the only antibodies which are 100% specific for AIH. The availability of cloned SLA/LP antigen now allows the development of a reliable standardized ELISA test system. Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) has been identified as the main target of LK M1. Results of comparison between anti-LKM1 detected by IIF and anti-CYP2D6 by ELISA show a very good agreement. Anti LC1 can be detected by IIF but LC1 pattern is usually masked by the concurrent presence of LKM. Thus, an ELISA using recombinant LC1 target antigen may be a more suitable assay. Anti ASGP-R antibodies are detected in 88% of AIH patients. It is believed that anti-ASGP-R represents a general marker of liver autoimmunity but is not recommended for routine use due to limitations in its detection. ANCA is detected by IIF using neutrophils as a substrate. The atypical perinuclear ANCA found in AIH and autoimmune sclerosing cholangitis (ASC) yields perinuclear staining irrespective of the type of fixation and probably reacts with nuclear membrane components. Antimitochondrial antibodies (AMA) are the

njihova specifičnost metodom ELISA ili IB s rekombinantnim antigenima.

E-mail: s_ilza@yahoo.com

serologic hallmark of primary biliary cirrhosis (PBC). Nine AMA types (M1 to M9) can be distinguished, and some 95% of PBC patients have positive M2 antibodies. AMA is detected by IIF on tissue preparations of rat kidney or on HEp2 cells, and their specificity by ELISA or IB method with recombinant antigens.

E-mail: s_ilza@yahoo.com

S12 – Simpozij 12 – ŠEĆERNA BOLEST, S12-1

Alotransplantacija otočića u bolesnika sa šećernom bolešću tip 1

Bertuzzi Federico

ISMETT, Palermo, Italija

Presadivanje otočića odnedavno se predlaže kao alternativa inzulinskoj terapiji kod odabranih skupina bolesnika sa šećernom bolešću tip 1. Glavne indikacije za presađivanje otočića su: dijabetični bolesnici tip 1 koji već uzimaju imunosupresivne lijekove zbog drugih transplantacija (bubreg, jetra), te bolesnici s nestabilnom šećernom bolešću obilježenom nestabilnom glikemijom i hipoglikemijom koje nisu svjesni. Klinički rezultati su sad uvelike poboljšani: postotak neovisnosti o inzulinu se progresivno povećava, i do 90%, prema nedavnom izvješću godinu dana od presađivanja. Pokazana je sigurnost i učinkovitost, zajedno s njihovim pozitivnim učinkom na glikometaboličku kontrolu, te proteinski i lipidni profil. Čak je i u primatelja s djelomičnom funkcijom presatka zabilježeno poboljšanje u inzulinskoj osjetljivosti, HbA_{1c} tkivnoj raspodjeli glukoze, jetrenom metabolizmu proteina i lipida te proizvodnji glukoze, te smanjenje preživljenja, stope kardiovaskularne smrtnosti, progresije debljine intime medije i izlučivanja albumina mokraćom. Preostaje razjasniti neke aspekte i riješiti neke probleme, čak i u svjetlu kliničke uspješnosti. Presadivanje otočića zahtijeva imunosupresivnu terapiju s mnoštvom nuspojava. Nadalje, funkcija presatka progresivno se smanjuje tijekom praćenja. Perspektive za godine koje dolaze uključuju poboljšanje presađivanja, utvrđivanje novih strategija za kontrolu aloautoodgovora na presadak i alternativne izvore beta stanica.

E-mail: fbertuzzi@ISMETT.edu

S12 – Symposium 12 – DIABETES MELLITUS, S12-1

Islet allotransplantation in type 1 diabetic patients

Bertuzzi Federico

ISMETT, Palermo, Italy

Islet transplantation has been recently proposed as an alternative to insulin therapy in selected cohorts of type 1 diabetic patients. The main indications for islet transplantation are: type 1 diabetic patients already on immunosuppressant therapy for other transplantations (kidney, liver), and patients with brittle diabetes, characterized by unstable glycemia and unawareness hypoglycemia. Clinical results are now greatly improved: the percentage of insulin independence is progressively increased, up to 90%, as recently reported at one year after transplantation. Safety and efficacy were shown together with their positive impact on glycometabolic control, protein, and lipid profiles. Even in recipients with a partial graft function an improvement of insulin sensitivity, HbA_{1c} tissue glucose disposal, hepatic protein and lipid metabolism and glucose production, and a decrease of patient survival, cardiovascular death rate, intima media thickness progression and urinary albumin excretion were observed. Some aspects remain to be clarified and problems to be solved, even in the light of clinical success. Islet transplantation requires immunosuppressant therapy with many side effects. Furthermore, graft function progressively declines during follow up. Perspectives for the next years include the improvement of engraftment, the identification of new strategies to control the alloautoresponse to the graft and alternative beta cell sources.

E-mail: fbertuzzi@ISMETT.edu

S12-2

Uloga upalnih čimbenika u šećernoj bolesti i komplikacijama

Ljubić Spomenka

Sveučilišna klinika „Vuk Vrhovac“, Zagreb, Hrvatska

Upalni čimbenici C-reaktivni peptid (CRP), fibrinogen i homocistein (HCl) važni su za nastanak vaskularnih komplikacija u šećernoj bolesti, jer dovode do ozljede i disfunkcije endotela, što se može smatrati čimbenikom nastanka ateroskleroze. Utvrđeno je da je CRP bolji predskazatelj kardiovaskularnih (KV) bolesti od LDL kolesterola. Povišene koncentracije CRP povezane su i sa sindromom inzulinske rezistencije. Pod utjecajem rizičnih čimbenika dolazi do nastanka multipotentnih proupalnih („primarnih“) citokina IL-1-beta i TNF-alfa, koji potiču nastanak „glasničkih“ citokina, primjerice IL-6, koji u jetri dovodi do ekspresije gena odgovornih za povećano stvaranja CRP i SAA.

Uz upalne čimbenike i dislipidemiju homocistein (HCl) je i značajan čimbenik u predviđanju KV bolesti: posjeduje protrombotičko djelovanje, povećava stvaranje kolagena i umanjuje učinak dušik oksida. U šećernoj bolesti utvrđena je povezanost HCl sa stupnjevima nefropatije, retinopatije, neuropatije i KV smrtnosti. U terapiji se mogu primijeniti folna kiselina, vitamini skupine B i statini.

Adiponektin (ADN) pripada u skupinu adipokina podrijetlom iz masnog tkiva. U istu skupinu ubrajaju se još visfatin, leptin, CRP, PAI-1, slobodne masne kiseline, IL-6, TNF-alfa, rezistin i angiotenzin (AT)-II. ADN dovodi do smanjenja upalnih procesa u stijenci krvnih žila. Kada su adipociti prepunjeni, dolazi do sniženja koncentracije ADN i porasta koncentracije rezistina, tumor TNF-alfa, IL-6 i leptina. Posljedice su inzulinska rezistencija, promjena metabolizma glukoze i lipida, upalni procesi. Utvrđena je negativna korelacija razine ADN i upalnih čimbenika. AT-II može uzrokovati sniženje koncentracije ADN djelovanjem na AT1 receptore (R). Blokodom AT1R i inhibicijom enzima konvertaze angiotenzina može doći do porasta koncentracije ADN. To je povezano i sa sniženjem koncentracija TNF-alfa koji moguće suprimira sekreciju ADN. Nefropatija je najučestalija mikrovaskularna komplikacija u osoba sa šećernom bolešću, a mikroalbuminurija je najjednostavniji i najosjetljiviji biljeg njezinog ranog otkrivanja te predskazatelj povećane smrtnosti od KV bolesti. Ne samo zbog djelovanja na sniženje krvnog tlaka, prevenciju albuminurije i dislipidemiju, nego i zbog značajnog učinka na upalne čimbenike RAS-inhibitori i statini smatraju se važnim čimbenicima u prevenciji nastanka vaskularnih komplikacija u osoba sa šećernom bolešću.

E-mail: spomenka.ljubic@gmail.com

S12-2

The role of inflammatory factors in diabetes mellitus and its complications

Ljubić Spomenka

Vuk Vrhovac University Clinic for Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases, Zagreb, Croatia

Inflammatory factors C-reactive protein (CRP), fibrinogen and homocysteine are important in the development of vascular complications in diabetes mellitus, as they can cause endothelial dysfunction, which can be considered as an initial event in atherosclerosis. It has been established that CRP is a better predictor of cardiovascular (CV) disease than LDL cholesterol. Increased CRP concentrations are also associated with the syndrome of insulin resistance. Risk factors can stimulate the production of multipotent proinflammatory („primary“) cytokines IL-1 beta and TNF-alpha. „Primary“ cytokines further stimulate the production of „messenger“ cytokines like IL-6, which can cause an increased expression of genes responsible for increased CRP and SAA production.

Besides inflammatory markers and dyslipidemia, homocysteine (HCY) is also important in the prediction of CV events. It has prothrombotic features, increases collagen production and reduces nitric oxide effect. In diabetes mellitus HCY association has been determined with nephropathy, retinopathy, neuropathy and CV mortality. Folic acid, vitamin B group and statins can be used in therapy for hyperhomocysteinemia. Adiponectin (ADN) belongs to a group of adipokines, originating from adipose tissue, together with visfatin, leptin, CRP, PAI-1, free fatty acids, IL-6, TNF-alpha, resistin and angiotensin (AT)-II. ADN leads to a reduction in blood vessel wall inflammation. When adipocytes are overfilled, there is a reduction in adiponectin and an increase in resistin, TNF-alpha, IL-6 and leptin values. The consequences are insulin resistance, glucose and lipid metabolism changes, and inflammation. A negative correlation has been established between ADN and inflammatory marker levels. AT-II can cause a reduction in ADN concentration by acting on AT1 receptors (R). AT1R blockade and ACE inhibition may lead to an increase in ADN concentration. This is also associated with reduced concentrations of TNF-alpha, which possibly suppresses ADN secretion. Nephropathy is the most common microvascular complication of diabetes, whereas microalbuminuria is a sensitive marker of its early detection and a precursor of CV diseases. Not only due to their effect on blood pressure, albuminuria and dyslipidemia, but also because of the significant effect they have on inflammatory markers, RAS-inhibitors and statins are considered to be important factors in the prevention of vascular complications in diabetes mellitus.

E-mail: spomenka.ljubic@gmail.com

S12-3

Hemoglobin A1c: kamo nakon 30 godina?

Vučić-Lovrenčić Marijana

Sveučilišna klinika za dijabetes, endokrinologiju i bolesti metabolizma, Zagreb, Hrvatska

Hemoglobin A1c (HbA1c) je u proteklih 30 godina primjene postao kliničkim standardom za procjenu metabolične kontrole i djelotvornosti terapije šećerne bolesti. Rezultati dugogodišnjih intervencijskih studija (DCCT i UKPDS) dokazali su neprijepornu vezu između kontrole glikemije i pojave kasnih komplikacija šećerne bolesti, te postavili temelj danas globalno prihvaćenog terapijskog cilja za oba tipa dijabetesa kroz vrijednost HbA1c od < 7%. Pouzdana primjena HbA1c u kliničkoj praksi bila je opterećena raznovrsnom i nestandardiziranim metodologijom, varijabilnošću kemijskih entiteta koji nastaju glikacijom molekule hemoglobina i nepostojanjem primarnog referentnog materijala. Kombinacija navedenih čimbenika rezultirala je slabom usporedivošću rezultata što je, s obzirom na samu bit kliničke primjene HbA1c (kontinuirano, doživotno praćenje kontrole glikemije), izazvalo ozbiljne implikacije u kvaliteti dijabetološke skrbi i nametnulo potrebu za standardizacijom. Međunarodna federacija za kliničku kemiju i laboratorijsku medicinu (IFCC) je 2002. g. objavila referentnu metodu za HbA1c. Zajedno s metodom definiran je analit i proizveden primarni referentni materijal. Međutim, primjena referentne metode onemogućena je značajno nižim rezultatima HbA1c u odnosu na "konvencionalne" metode. Naime, kliničke smjernice utemeljene su na rezultatima kliničkih istraživanja u kojima se rabila precizna, ali nedovoljno specifična analitička metodologija koja je postala "dogovorni standard" za HbA1c. Zahtjev za odgovarajućom primjenom kliničkih smjernica ispunjen je usklađivanjem svih metoda s globalno prihvaćenim dogovornim standardom i izražavanjem rezultata HbA1c u obliku "ekvivalenata DCCT". Moguće snižavanje apsolutnih vrijednosti HbA1c, koje bi nastalo uvođenjem referentnog sustava IFCC prepoznato je kao ozbiljna prepreka u postizanju i održavanju dobre kontrole šećerne bolesti. Stoga dijabetološka struka energično ustrajava na zadržavanju postojećih standarda. Harmonizacija određivanja HbA1c nužno podrazumijeva kombinaciju analitičkih i kliničkih zahtjeva. Stoga je predložen "treći put", odnosno izvođenje novog parametra, "prosječne glikemije", koji bi sublimirao analitičke prednosti referentnog sustava IFCC i dragocjene kliničke podatke. Transformacija vrijednosti HbA1c u jedinstveni parametar koji bi s najvećom pouzdanošću pružio objektivni uvid u kontrolu glikemije konačni je cilj ove specifične harmonizacije.

E-mail: vucic@idb.hr

S12-3

Hemoglobin A1c: 30 years later

Vučić-Lovrenčić Marijana

University Clinic for Diabetes, Endocrinology and Metabolic Diseases, Zagreb, Croatia

Within the last 30 years, hemoglobin A1c (HbA1c) has become the clinical standard for both metabolic control and therapeutic efficacy assessment in diabetes mellitus. Results of the long-term intervention trials (DCCT and UKPDS) clearly demonstrated a relationship between the mean blood glucose and incidence of late diabetic complications, and provided a background for today's globally accepted therapeutic goal for both types of diabetes, defined through HbA1c of < 7%. Reliable clinical use of HbA1c has been burdened by a variable and unstandardized methodology, different chemical entities resulting from glycation of the hemoglobin molecule, and the lack of primary reference material. A combination of the aforementioned factors has resulted in poor comparability of results which, regarding the very essence of the clinical use of HbA1c (continuous, life-long monitoring of glycemic control), has created serious implications in the quality of diabetic care and posed the need for standardization. A reference method for HbA1c has been published by the IFCC in 2002. Together with the method, an analyte has been defined and a primary reference material has been developed. However, the use of the reference method has been disabled due to significantly lower HbA1c results as compared with "conventional" methods. Namely, clinical guidelines and standards are based on the results of clinical studies, where a precise but not specific enough analytical methodology was used, which has become a "designated standard" for HbA1c. The requirement of appropriate implementation of clinical guidelines was fulfilled by the harmonization of all methods towards globally-accepted designated standard, and HbA1c results expression as "DCCT-equivalents". The possibility of lowering the absolute HbA1c values, issued by implementation of the IFCC-reference system, has been recognized as a serious hindrance in attaining and maintaining good diabetic control. Hence, diabetology specialty vigorously insists on keeping current standards. Harmonization of HbA1c determination includes implicitly a combination of both analytical and clinical requests. Thus, a "third way" has been proposed, that is, to derive a new parameter, "mean blood glucose", subliming analytical superiority of the IFCC-reference system and valuable clinical data. Transformation of the HbA1c values into a unique parameter, able to provide with utmost reliability an objective insight into glycemic control, is the ultimate goal of this specific harmonization.

E-mail: vucic@idb.hr

S12-4

Metabolički sindrom

Zjačić-Rotkvić Vanja

KB Sestre milosrdnice, Zagreb, Hrvatska

Metabolički sindrom predstavlja skup čimbenika rizika za šećernu bolest i kardiovaskularne bolesti. Iznimnim radom Reavena počinje 1988. godine moderna era metaboličkog sindroma; tada je autor opisao udruženost poremećaja tolerancije glikemije, arterijske hipertenzije, dislipidemije i debljine, što je nazvao "sindromom X", te ih povezao s postojanjem inzulinske rezistencije kao temeljnim patofiziološkim poremećajem. Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) je 1999. godine izdala svoju definiciju metaboličkog sindroma u kojoj je kao obvezna sastavnica bila poremećena tolerancija glukoze ili inzulinska rezistencija zajedno s barem dva ili više od slijedećih poremećaja: arterijskom hipertenzijom, centralnim tipom debljine i dislipidemijom. NCEP donosi svoju definiciju dvije godine kasnije s drukčijim dijagnostičkim razinama, a na kraju je i Europska studijska grupa za inzulinsku rezistenciju (EGIR) donoseći svoju varijantu doprinjela zbrci u definiciji. IDF (*International Diabetes Federation*) je 2004. godine donijela konsenzus o novoj definiciji SZO koja bi svojom jednostavnošću bila primjenjiva u kliničkim i epidemiološkim istraživanjima diljem svijeta. Budući da se inzulinsku rezistenciju teško može jednostavno i ponovljivo određivati, zaključeno je da centralni tip debljine, osobito udružen s hipertrigliceridemijom, mora svakako biti sastavnicom definicije. Opseg struka je prihvaćen kao mjerilo centralne debljine, ali se različite granične vrijednosti moraju rabiti za različite etničke skupine (za europide je gornja granica opsega struka u muškaraca 94 cm, a u žena 80 cm). Ostali parametri uključeni u definiciju su: niska razina HDL kolesterola (< od 0,9 mmol/L u muškaraca i < 1,1 mmol/L u žena), povišen krvni tlak (> 130/85 mm Hg), te hiperglikemija natašte (glikemija natašte > 05,6 mmol/L) ili prethodno dijagnosticirana šećerna bolest. Danas ne postoji jedinstven terapijski pristup metaboličkom sindromu osim modifikacije životnih navika koje se odnose na prehranu i tjelesnu aktivnost, ali treba liječiti svaku sastavnicu metaboličkog sindroma zasebno.

E-mail: ziarot@kbsm.hr

S12-4

Metabolic syndrome

Zjačić-Rotkvić Vanja

Sestre milosrdnice University Hospital, Zagreb, Croatia

The modern era of the "metabolic syndrome", a cluster of risk factors for diabetes and cardiovascular disease, began with the seminal work of Reaven and his Banting lecture in 1988. He described the association of glucose intolerance, hypertension, dyslipidemia and obesity, and termed it syndrome X with insulin resistance suggested as the unifying underlying etiologic factor. In 1999, World Health Organization (WHO) published a suggested definition with a *sine qua non* of glucose intolerance or insulin resistance together with two or more of hypertension, central obesity and dyslipidemia (raised triglycerides, lowered HDL-cholesterol). The Nation Cholesterol Education Program came out with its own definition (ATP III) 2 years later with less primacy for glucose intolerance and different cutpoints for the variables. The European Study Group for Insulin Resistance (EGIR) also produced a variant of the WHO definition. In order to clarify the situation IDF held a Consensus Meeting in 2004 to update the WHO definition and to see whether a single common clinically and epidemiologically useful definition could be agreed for use world-wide. It was agreed that insulin resistance could not be measured simply and reproducibly, and should not be included. Central obesity, particularly when associated with raised plasma triglycerides, was set as a *sine qua non*. Waist circumference, a measure of central obesity, was ethnic-specific and different cutpoints would be needed for different ethnic groups (for male Europeans 94 cm, and for female Europeans 80 cm). The other agreed components were low HDL-cholesterol (<0.9 mmol/L for male and <1.1 mmol/L for female), hypertension (>130/85 mm Hg blood pressure values) and fasting hyperglycemia or previously diagnosed diabetes (fasting glucose >5.6 mmol/L). Today we do not have specific therapy for metabolic syndrome, but we should deal with each of the component abnormalities in particular.

E-mail: ziarot@kbsm.hr