

SAŽECI
3. HRVATSKOG KONGRESA
MEDICINSKIH BIOKEMIČARA

Abstracts
3. Croatian Congress
of Medical Biochemists

Glavni odbor Hrvatskog društva medicinskih biokemičara predložio je ovaj rad za IFCC-AVL nagradu. Rad je surstan među deset najboljih radova mladih znanstvenika na 17. kongresu IFCC - World Lab 1999. u okviru kojeg je održano i predavanje.

IFCC/P1

MOGUĆA ULOGA OSTEOGENOG PROTEINA-1 U ISHEMIČNOM I NEFROTOKSIČNOM ZATAJENJU BUBREGA

The Role of Osteogenic Protein-1 in Ischemic and Nephrotoxic Acute Renal Failure

'Rogić D, ²Vukićević S, ²Bašić V, ¹Stavljenič-Rukavina A

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ²Zavod za anatomiju "Drago Perović" Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Osteogeni protein-1 (OP-1) ili koštani morfogenetski protein-7 (BMP-7) po primarnoj strukturi član je proteinske obitelji transformirajućeg činitelja rasta- β (TGF- β). Iako prvobitno otkriven zbog svojstva poticanja rasta kosti, nizom pokusa na životinjskim modelima dokazana je neophodnost prisutnosti ovog proteina za normalan embrionalan razvoj bubrega. Miševi s OP-1 nulmutacijom umiru unutar prvog dana postnatalnog života uslijed potpunog ispada bubrežne funkcije.

Uzimajući u obzir izrazitu regenerativnu moć bubrega, postoji mogućnost da bi OP-1 mogao djelovati i postnatalno, kao faktor rasta u procesu regeneracije oštećenog bubrega u odraslih. U ovoj studiji ispitano je djelovanje sistemski apliciranog ljudskog rekombinantnog osteogenog proteina-1 u životinjskom modelu (štakori) ishemičnog i ne-

frotoksičnog bubrežnog zatajenja. Ishemično-reperfuzijsko oštećenje bilo je izazvano zatvaranjem bubrežne arterije spojnicom tijekom 60 minuta, nakon čega je spojnica uklonjena i ponovno ustavljen normalan protok krvi kroz bubreg. Nefrotoksično oštećenje bilo je izazvano dvama različitim nefrotoksičnim agensima: živinim kloridom (4mg/kg tjelesne težine) i cis-platinom (6 mg/kg). Osteogeni protein-1 bio je apliciran u koncentraciji od 250 ug/kg, svaka 24 sata. Prva injekcija OP-1 aplicirana je bilo prije nastupa oštećenja (profiliakički pristup), bilo u određenom vremenskom razmaku nakon oštećenja (terapijski pristup). Uzorci krvi uzimani su svaka 24 sata iz orbitalnog pleksusa, a 24-satni urin sakupljan je u metaboličkim kavezima. Farmakokinetičke studije bio raspoloživosti OP-1 učinjene su enzymskim imunotestom (Creative Biomolecules, USA). Stopa smrtnosti u ishemičnom i nefrotoksičnom modelu bila je značajno niža u životinja koje su primale OP-1. Rezultati biokemijskih analiza u svim ispitanim modelima pokazuju značajno sniženje ureje, kreatinina, fosfora i kalija u skupini životinja tretiranoj s OP-1, naspram kontrolne skupine. Ostale biokemijske i histokemijske analize pokazuju kako: 1) OP-1 poboljšava hemodinamska svojstva bubrega, vidljivo iz viših vrijednosti brzine glomerularne filtracije, izražene preko klirensa kreatinina, 2) smanjuje površinu bubrega zahvaćanu nerkrozom i apoptozom. Rezultati ovih pokusa pokazuju povoljno djelovanje osteogenog proteina-1 u smislu ublaženja oštećenja, te poticanja oporavka bubrega nakon akutnog zatajenja različitih etiologija.

Članici HDMB, Suzani Borović, dodijeljena je stipendija IFCC-a za izradu dijela ovog eksperimentalnog rada na Karl-Franzens sveučilištu, Graz, Austrija.

IFCC/P2

MONITORING INFLUENCE OF SURGICAL STRESS ON FORMATION OF HYDROXYL RADICALS IN VIVO

Praćenje utjecaja operativnog stresa na stvaranje hidroksilnih radikala in vivo

Borović S, Meinitzer A, Lončarić I, Sabolović S, Žarković N, Wildburger R, Tillian M, Stipančić I.

Institut "Ruder Bošković", Zavod za molekularnu medicinu, Laboratorij za diferencijaciju stanica i tkiva, Zagreb

Hydroxyl radical is one of the most harmful reactive oxygen species (ROS), which are formed in excess during oxidative stress (shock, sepsis, trauma, surgery, hypoxia, ischemia-reperfusion, etc.). It is known that surgery can cause formation of high amount of ROS, but the influence of surgery and ischemia-reperfusion on hydroxyl radical formation in cancer bearing organisms is

not defined, yet. For measurement of hydroxyl radical indirect methods are used determining aromatic acids hydroxylation products. Hydroxyl radical forms stable adducts with salicylic acid through aromatic hydroxylation generating 2,3-dihydroxybenzoic acid (2,3-DHBA) and 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA). These products can be separated and quantified by HPLC method with electrochemical detection.

Modified method for 2,3-DHBA determination was developed using per os or intravenous application of acetylsalicylic acid in normal and tumour bearing rats. Results obtained have shown increased formation of hydroxyl radical during surgical stress and ischemia-reperfusion injury, both in healthy animals and tumour bearing animals. Thus, monitoring hydroxyl radical in plasma seems as a suitable model to evaluate oxidative stress induced by surgery and its influence on cancer and the entire organism.

The author would like to thank IFCC for providing Professional Scientific Exchange Scholarship.

Sekcijska tema: S-01

Laboratorij u otkrivanju i praćenju posljedica rata
Laboratory in the Monitoring of War Consequences

S-01/1

**VODOOPSKRBA NA PODRUČJU SISKA I
BANOVINE TIJEKOM DOMOVINSKOG
RATA**

**Water Supply in the Area of Sisak and
Banovina during the Patriotic War in
Croatia**

¹Šmit Z, ²Kodrić-Šmit M.

¹Zavod za javno zdravstvo grada Zagreba, Zagreb, ²Zavod za
javno zdravstvo Županije sisačko-moslavačke, Sisak

U radu je iznesen pregled djelatnosti vezanih
uz ispitivanje uzoraka vode za piće tijekom i na-
kon agresije na području Siska i Banovine.

Posebice je dan osvrt na djelatnosti tijekom
rujna 1991. godine neposredno prije napada na
gradove Petrinju i Sisak, kada je opskrba vodovod-
nom vodom zbog specifičnosti otvorenog vodoza-
hvata i smještaja magistralnog voda bila izravno
ugrožena.

U kriznom periodu nedostatak svih neophod-
nih reagensija uvjetovao je da su se kod najveće
učestalosti ispitivanja, tijekom prelaska na stari
pogon za kondicioniranje vode za piće, uz ostatni
klor i pH-vrijednost mogli kontrolirati cijanidi,
toksični metali, amonijak, plinsko-kromatografski
profil ("otisak prsta") i organohalidi.

S-01/2

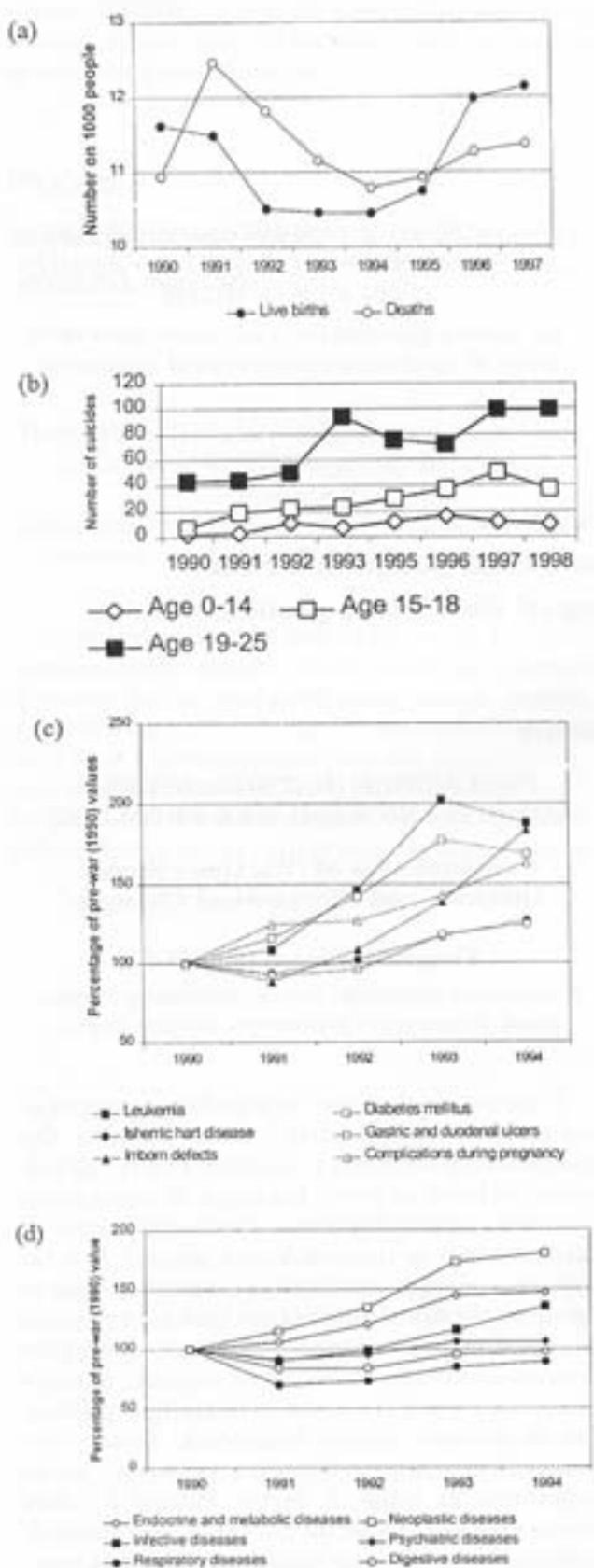
**POSLJEDICE (RATNOG) STRESA:
BOLESTI I BIOKEMIJSKE PROMJENE**

**Consequences of (Wartime) Stress:
Diseases and Biochemical Changes**

Flögel M, Lauc G, Dumić J.

Farmaceutsko-biohemski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za biohemiju i molekularnu biologiju, Zagreb

Fiziološki mehanizmi prilagođeni su potreba-
ma čovjeka u praskozoru ljudske povijesti. Čovjeku-lovcu u suočenju s opasnom zvijeri nije bilo
presudno boriti se protiv bakterija ili virusa (imu-
ni sustav), probavljati hranu (probavni sustav) ili
razmnožavati se (reproaktivni sustav). Svu ra-
spoloživu energiju usmjerio je u sustave nužne za
trenutnu obranu. Jednako tako ljudski organizam
izložen stresu preraspodjeljuje svoje energijske
izvore u očekivanju nadolazeće opasnosti: aktivira
motoričke i osjetilne sustave do krajnjih granica,
dok su probavni sustav, imunološki sustav i re-
proaktivni sustav privremeno prigušeni, jer su
nepotrebni za bijeg ili borbu. Potraje li takvo
stanje predugo, dolazi do oštećenja suprimiranih
sustava. Ubrzani ritam današnjeg života za mnoge
predstavlja stres, a obrambeni sustav, predvi-
den da se aktivira samo u iznimnim situacijama,
radi daleko iznad svojih mogućnosti. Posljedice su
brojne bolesti suvremenog čovjeka.



Učinci ratnog stresa na (a) smrtnost, (b) suicidalnost i (c, d) bolesti vezane uz promjene u endokrinom, imunom i kardiovaskularnom sustavu.

Posljednjih godina nedvojbeno je utvrđeno da su stres i njegove posljedice najopasnija epidemija koja prijeti zapadnom svijetu. Istraživanja u SAD pokazuju da 50 – 60% stanovništva doživi barem jedan traumatski dogadjaj, a 40% njih doživi traumu prije navršene tridesete godine života. Brojna epidemiološka i eksperimentalna ispitivanja dovode u vezu stres s pojmom i razvojem brojnih bolesti, od jednostavnih virusnih infekcija i čira na želucu, do dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti i tumora. Izloženost trudnica stresu može dovesti do porasta spontanih pobačaja, zaostajanja u rastu ploda koji je vidljiv i u drugoj generaciji. Procjenjuje se da su gotovo dvije trećine svih posjeta liječniku posljedica stresa, a da se ukupne štete koje američka industrija trpi zbog stresa kreću između 150 i 300 milijardi dolara godišnje.

U Hrvatskoj ne postoji statistika izloženosti stresu. Međutim, veliki dio hrvatskog pučanstva bio je izložen osobito teškim traumama tijekom Domovinskog rata (izloženost ratnim djelovanjima, progonstvo, smrt bližnjih, razoreni domovi i obiteljski životi, nezaposlenost i neizvjesnost te gospodarski problemi). Analiza dostupnih podataka u Zavodu za javno zdravstvo RH jasno je pokazala ranjivost čovjeka na intenzivan stres i razotkrila pogubne posljedice ratnog stresa na zdravlje hrvatskog pučanstva (a-d).

U laboratorijskim ispitivanjima biokemijskih promjena izazvanih stresom posebno se ističu promjene u sastavu i glikozilaciji serumskih glikoproteina. Laboratorijski modeli stresa na kulturama stanica i animalnim modelima omogućili su i mjerjenje promjena u ekspresiji i distribuciji ugljikohidratnih receptora - lektina te enzima koji sudjeluju u procesima glikozilacije, što potvrđuje važnu ulogu glikobioloških mehanizama u odgovoru na stres.

S-01/3

PRIMJENA ANALIZE DNA U HUMANOJ IDENTIFIKACIJI

Use of DNA Analysis in Human Identification

Juričić I.

Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske, Centar za kriminalistička vježtačenja "Ivan Vučetić", Zagreb

Primjena analize kromosomske DNA u humanoj identifikaciji započela je utvrđivanjem polimorfizma restriktivnih fragmenata (RFLP), ali se

tek razvojem multilokus proba (MLPs) napravio velik iskorak. Originalnim multilokus probama 33,15 i 33,6 Jeffreys-a i dr. moguće je detektirati velik broj hibridizacijskih vrpc ("DNA fingerprinting"). Osim genetski istovjetnih blizanaca, vjerojatnost da dvije, srodstvom nevezane, osobe iskažu isti profil se kreće od $0,2\text{--}2,4 \times 10^{-9}$ do 5×10^{-9} .

Probleme obrade podataka, relativno velike količine uzorka, a naročito kvalitete DNA pokušalo se riješiti uvođenjem lokus specifičnih proba (SLPs).

1991. godine počinje novo razdoblje primjene analize DNA u humanoj identifikaciji uvođenjem, na PCRu zasnovanih, sustava kratkih ponavlja-

jućih sekvenci (STRs), čime su riješeni problemi obrade podataka, količine uzorka, a naročito kvalitete izolirane DNA. PCR produkte veličine 100 - 350 bp vrlo je lako razdvojiti na denaturiranom poliakrilamidnom (19:1) gelu, a multi PCR omogućuje amplifikaciju do 15 različitih STR sustava u istoj reakcijskoj smjesi. Daljnji napredak se očekuje od "DNA-čipa" ("DNA-chip").

Mitochondrijska DNA (mt-DNA) se nasljeđuje po majci i prenosi 5 generacija na generaciju preko ženskih srodnika, a u identifikaciji se koristi kad analiza kromosomske DNA nije moguća, tim više što su učestale mutacije uvjetovale prihvatanje konsenzusne sekvene.

Sekcijska tema: S-02 Lijekovi i farmakogenetika Drugs and Pharmacogenetics

S-02/1

CLINICAL ASPECTS OF POLYMORPHIC DRUG METABOLISM IN HUMANS Klinički aspekti polimorfnog metabolizma lijekova u čovjeka

Schwab M.

Dr Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology, Stuttgart, Germany

Most drugs are metabolized to some extent, which results in detoxification and elimination of the drug or activation of the prodrug. Enzymes responsible for human drug metabolism show wide interindividual variation in their protein expression or catalytic activity. Pharmacogenetics deals with clinically significant hereditary variation in responses to drugs. Two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions transmitted as single factors altering the way drugs act on the body (altered drug action) or altering the way the body acts on drugs (altered drug metabolism).

Pharmacogenetic conditions can occur as rare defects or as a polymorphism defined as a monogenic trait existing in the population in at least two phenotypes (and presumably at least two genotypes), neither of which is rare, i.e. the rarest phenotype still occurs at a frequency of more than 1 %.

Three phenotypes can be distinguished: extensive metabolism (EM), poor metabolism (PM) associated with accumulation of drugs caused by mutation and (or) deletion of both alleles, and ultrarapid metabolism (UM) resulting in increased drug metabolism.

There is good evidence for some drug classes that polymorphic expression of metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 and Cytochrome P450 2D6, 2C19, 2C9) has provided an explanation why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the "standard and safe" dose of these drugs.

S-02/2

FARMAKOGENETIKA I KLINIČKI LABORATORIJ Pharmacogenetics and Clinical Laboratory

Topić E.

Klinički Zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Farmakogenetika je novija grana farmakoloških znanosti koja proučava vezu između genetske predispozicije pojedinca i njegove sposobnosti da metabolizira neki lijek ili neki strani spoj. Razlike

u metabolizmu lijeka mogu dovesti do teške toksičnosti ili neuspjeha terapije uslijed promjene odnosa između doze i koncentracije farmakološki aktivnog lijeka u krvi, a rezultat su genetske promjene, polimorfizmi, enzima uključenih u metabolizam lijeka.

Genetski se polimorfizam na temelju sposobnosti metaboliziranja lijekova povezuje s tri vrste fenotipova. Fenotip ekstenzivnog metabolizma (extensive metabolizer, EM) lijeka znakovit je za normalnu populaciju; fenotip slabog metabolizma (poor metabolizer, PM) udružen je s nakupljanjem specifičnih supstrata lijeka u organizmu, a predstavlja autosomno recessivno svojstvo nastalo mutacijom i/ili delecijom oba alela odgovorna za fenotipsku ekspresiju; fenotip ultraekstenzivnog metabolizma (ultra-extensive metabolizer, UEM) rezultira povećanim metabolizmom lijeka uslijed amplifikacije gena koje proizlazi iz autosomno dominantnog svojstva.

Metode molekularne biokemije razvijene u kliničkim laboratorijima su novo dijagnostičko sredstvo koje omogućuje otkrivanje alelskih mutacija te prepoznavanje homozigotnih ili heterozigotnih nosioca mutantnih gena. Prednost molekularne dijagnostike na području farmakogenetike je upravo činjenica da rezultati farmakogenetske analize osiguravaju podatak o genotipskim/fenotipskim osobinama ispitanika glede njegove sposobnosti metaboliziranja lijeka prije samog početka terapije, te tako omogućuju odabir optimalne doze. Usto prepoznavanje PM odnosno UEM fenotipa za određeni enzim omogućuje da se načini odabir istovrsnog lijeka koji se metabolizira drugim enzimom te tako spriječe neželjene reakcije ili terapijske pogreške uslijed premale ili prevelike doze lijeka.

S-02/3

ENZIMI CITOKROM P450 (ENZIMI CYP): ZNAČAJ ZA TOKSIČNE UČINKE KSENOBIOTIKA

Cytochromes P450 (CYPs): Role in Toxicity of Xenobiotics

Rendić S.

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za farmaceutsku kemiju, Zagreb

Članovi superporodice (nadporodice) enzima citokrom P450 (enzimi CYP) smatraju se odgovornima za aktivacije brojnih lijekova i drugih kemij-

skih tvari u toksične produkte i intermedijere reakcijama biotransformacija, kod čega je od posebnog značaja aktivacija prokarcinogenih u karinogene tvari. Prokarcinogene tvari su, među ostalim, sastojci koji nastaju obradom ili su zagađivači hrane (heterociklički amini, pesticidi, nitrozamini, policiklički aromatski ugljikovodici) koji se biološkim aktivacijama, katalitičkim učinkom enzima CYP, prevode u toksične produkte. Toksičnost lijekova i kemikalija biološkim aktivacijama često ima učinak na jetru, jer je jetra kvantitativno najvažnije mjesto u organizmu na kojem se odvijaju reakcije biotransformacija, ali mogu doći do izražaja i u mnogim organima i tkivima. Prema tome će biološka aktivacija neke tvari u toksične produkte ovisiti o kvalitativnom i kvantitativnom sadržaju enzima CYP (tzv. "profil enzima CYP") u stanicama. Pojava toksičnih učinaka i tumorских oboljenja u nekim organima ili tkivima, kao posljedica izloženosti kemijskim tvarima, često se povezuje sa specifičnim "profilom enzima CYP" ne samo u pojedinim organima nego i prisutnim različitim vrstama stanica. U predavanju će se prikazati saznanja o mogućoj povezanosti "profila enzima CYP", pojave toksičnih učinaka u specifičnim organima i tkivima, te mogućoj fiziološkoj ulozi ovih enzima.

S-02/4

GENETIKA I SREDSTVA OVISNOSTI: PRIMJER VIŠESTRUKIH INTERAKCIJA LIJEKA I NASLJEDJA

Genetics and Addiction: An Example of Multiple Interaction of Drug and Heredity

Lacković Z.

Zavod za farmakologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Sredstva ovisnosti kao i brojni lijekovi koji se rabe u psihijatriji i neurologiji mijenjaju funkciranje našeg mozga i nema čvrste granice između lijekova i "droga" i mehanizmi njihova djelovanja su isti ili slični. Za nastanak ovisnosti posebno se smatra značajnim mezolimbički dopaminergički sustav koji oblikuje tzv. centre ugode. Npr. u "knockout" miševa koji nemaju D2 dopaminergičke receptore, opijati više ne stvaraju osjećaj ugode. Istraživanja gena za ovaj receptor u ovisnika, a nalazi su najuvjerljiviji za alkoholičare, pokazuju da postoje genetske razlike u odnosu na

većinu drugih ljudi. Naime, dok A1 alel za D2 receptor nalazimo u oko 20% ukupne populacije, u teškim alkoholičara njegova zastupljenost iznosi oko 70%. Razlike između gena (A1 i A2 alel) se nalaze na regulacijskom dijelu i posljedično je u alkoholičara "PET-scanom" nadeno smanjenje broja D2 receptora u mozgu. Dok je to primjer na-

slijeda koji potiče nastanak ovisnosti, postoje i suprotni primjeri. Među Japancima i nekim drugim narodima Dalekog istoka učestaliji je alel ADH2-2 koji u njih stvara acetaldehid dehidrogenazu vrlo niske aktivnosti, koja vrlo sporo razgraduje acetaldehid. Posljedično, pri uzimanju i vrlo malih količina alkohola oni se osjećaju loše.

Sekcijska tema: S-03

Molekularna dijagnostika: standardizacija, procjena kakvoće, automatizacija

Molecular Diagnostics: Standardisation, Quality Control and Automatisation

S-03/1

QUALITY ASSESSMENT IN MOLECULAR GENETICS

Osiguranje kakvoće u molekularnoj genetici

Ramsden S.

Regional Molecular Genetics Laboratory, UK NEQAS and EMQN, Manchester, United Kingdom

Clinical Molecular Genetics represents an emerging discipline with a wide range of diagnostic applications. With the rapid development of molecular technology scientists working in the area of inherited human diseases realised the requirement for a highly interpretative external quality assessment (EQA) scheme. An EQA scheme can be used to measure the quality of the whole analytical process including DNA/RNA extraction, genotype analysis, interpretation and risk analysis. Most disciplines may not assess the interpretation of results; however, in molecular genetics this aspect is increasingly regarded as an essential part of the laboratory process and requires assessment accordingly.

A number of national quality assessment schemes have been developed in Europe for this purpose namely in the UK, Holland, Ireland and Germany. In addition a disease specific EQA scheme has been run on a Europe-wide basis for a number of years for cystic fibrosis. Based largely on the experience acquired from these schemes we are currently developing the European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) to supplement and extend the services already available. In this

manner we are aiming to offer peer reviewed quality assessment to centres where it has not previously been available. The rarity of most single-gene disorders questions the viability of disease specific EQA schemes unless a European or International scheme is considered.

There is a wealth of diagnostic experience present in centres across Europe. By organising disease specific best practice meetings the EMQN is, in addition, aiming to draw up guidelines on internal quality assurance.

This presentation will discuss the means by which quality assessment is currently achieved and best practice offered in the molecular analysis of inherited human diseases and the progress made so far by the EMQN.

S-03/2

QUALITY CONTROL PROGRAM IN MOLECULAR DIAGNOSTICS

Program procjene kakvoće u molekularnoj dijagnostici

Sertić J, Zadro R.

Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, University of Zagreb, School of Medicine and University Hospital Zagreb, Zagreb

Increasing interest in molecular diagnosis is a result of scientific knowledge in molecular medicine acquired by DNA methodology. In most countries clinical laboratories offer molecular genetic diagnostic tests. These centres are faced with the

problems, found in other diagnostics, of standardization, quality controls and response time. The techniques used in the analysis of genetic information require special emphasis and a clear definition in preanalytical and analytical steps. A variety of controls should be implemented to determine quality of single steps during nucleic acid analysis. As in conventional clinical chemistry internal and external quality control can be distinguished. Internal quality control is related to preparation of test materials (DNA/RNA), cDNA synthesis, amplification and evaluation test results. External quality control includes methodological proficiency testing to control the elementary analytical steps in molecular genetic testing and application-based proficiency testing which is suitable for frequent diagnostic problems, e.g., CFTR mutations in cystic fibrosis, dystrophin gene mutations in muscular dystrophy type Duchenne/Becker, factor V Leiden mutation in thrombophilia, $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency, mutations in apoB100 and LDL receptor genes, apo E polymorphism and other.

In some EU countries there are co-ordinated attempts to address quality issues in the areas of standards, management and external Quality Assessment (EQA).

For this reason Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University Clinical Hospital, has Reference Laboratory for Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics which was the first in Croatia to perform the following external quality control programs:

- European concerted action on cystic fibrosis Quality control ECCACF 1994-1996-1997.
- European Molecular Genetics Quality Network EMQN Duchenne Muscular Dystrophy European EQA 1995.

The results of the first large ECCACF quality assessment (136 laboratories participated) was published in the European Journal of Human Genetics this year. The development of a consensus testing strategy for molecular diagnostic laboratories for rare or regional-specific mutations in expert centres in combination with quality controls should improve molecular diagnosis of these disorders.

S-03/3

STANDARDISATION AND QUALITY CONTROL OF VIRAL NAT METHODOLOGY *

Standardizacija i procjena kakvoće u molekularnoj dijagnostici virusnih bolesti

Grahovac B.

Croatian Institute of Transfusion Medicine, Zagreb

The advantage of NAT is its ability to detect a virus during the window period or seronegative stages of infections and to act as a marker for viremia, and to detect viruses in products made from large pools of plasma. Only nucleic acid-based direct detection system has the capacity to shorten the window period significantly. In the USA this reduction is estimated to be 11 days for HIV, 51 days for HCV, and 25 days for HBV. True immunity may also be differentiated from persistent infection in the presence of autoantibody.

Recent outbreaks of hepatitis C after administration of gammaglobulin and of hepatitis A after infusion of clotting factor preparations have triggered discussion about screening of plasma pools with NAT. The screening of plasma pools by PCR showed the presence of HCV-RNA in 8% and 52% of plasma pools from Europe and USA, respectively. The plasma product manufacturers, anticipating future regulation, have introduced viral NAT testing of plasma minipools to screen out the contaminated units.

In 1995, the WHO International Working Group of the Standardisation of Gene Amplification Technique for the Virological Safety Testing of Blood and Blood Products (SOGAT) has declared as the first priority the development and characterisation of an international WHO-standard for viral NAT blood safety testing. Such primary reference preparations can be used for calibration of secondary standards in many laboratories.

Since 1992, four international collaborative studies for the detection of HBV-DNA, HCV-RNA and CMV-DNA have been organised by the EUROHEP and ESCV working groups. These proficiency studies were conducted for the characterisation of reference standards and testing the performance of the laboratories. It has been demonstrated that half of the participating laboratories generated false positive or false negative NAT results. Only 16%-23% of the participants reported faultless results, whereas another 21%-29% missed a weakly positive sample (Table 1).

Table 1. Performance of laboratories on EUROHEP/ESCV reference panels in 4 collaborative studies (undiluted samples, dilution series)

Performance	HCV-RNA 1992 (N=22)	HBV-DNA 1993 (N=43)	HCV-RNA 1994 (N=136)	CMV-DNA 1995 (N=63)
Faultless	16%	23%	16%	19%
Only weakly pos. missed	23%	21%	29%	24%
Total sufficient quality	39%	44%	45%	43%
False pos./neg. results	61%	56%	55%	57%

Professional viral diagnostic or blood safety NAT laboratories have therefore included a number of weakly positive and negative samples in each test run to control the sensitivity and specificity of their test service.

The participation in external quality assessment schemes, like EUROHEP proficiency studies, has proved to be very useful for such laboratories, offering them the possibility to test their own NAT performances. The World Viral Quality Control (VQC) organisation continued the EUROHEP/ESCV activities, and in 1997 approximately 100 laboratories participated in the international VQC proficiency programmes for the detection of HCV-RNA, HBV-DNA, HIV-RNA and CMV-DNA. Quality control panels consisted of strongly positive and negative samples, and half log dilutions of genotyped VQC plasma standards.

A collaborative study performed by the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) was undertaken to examine the sensitivity and reproducibility of HCV-RNA PCR assays of plasma pools in order to establish a reference sample for HCV PCR testing of plasma pools. Samples consisting of an HCV-RNA positive donation diluted tenfold in an HCV-RNA negative cryosupernatant were sent to 16 participating laboratories. Results of the in-house assay indicated that a 10⁻¹ dilution of a positive donation could be used as a reference sample, as this was the highest dilution of the positive donation detected in all assays. The results obtained with a commercially available assay, designated for use with single-donation plasma or serum (Roche Amplicor™ HCV test), were not so clear-cut and the assay appeared to be ten fold less sensitive than the in-house assays.

Table 2 shows detection rates at a 10-fold dilution of PELISPY run control (this is a 1:1000 dilution of the EUROHEP type 1 standard and contains 3600 geq/ml), when using in-house PCR, regular AMPLICOR or AMPLICOR with a modified sample preparation.

Table 2. Detection rate of PELISPY HCV-RNA run control (EUROHEP genotype 1 standard, 3600 geq/ml)

Method	Number of positive at PELISPY dilution (geq/ml)			
	undiluted 3600	1 : 10 360	1 : 100 36	1 : 1000 4
In house	100% 25/25	72% 85/118		
AMPLICOR	89% 209/235	46% 42/92		
AMPLICOR	100%	91%		
mod.	71/71	50/55		
AMPLICOR	100%	100%	100%	60%
enhanced	5/5	5/5	5/5	5/5

mod. AMPLICOR : 100 µl Prot.K/organic extraction

enh. AMPLICOR : 2 ml glass milk extraction

Many laboratories that use PCR for testing HCV contamination of plasma pools or plasma mini-pools try to enhance the sensitivity of the PCR method by increasing the plasma extraction volume. One approach to achieve this goal with moderate enhancement is ultracentrifugation of the plasma and the other is the use of alternative sample extraction protocols, with the glass milk protocol by Organon Teknica, capable of 100-fold AMPLICOR PCR sensitivity enhancement.

The realistic guidelines for blood safety testing by using the sensitive NAT assays should be established. The 1997 VQC proficiency programme, in which a large number of laboratory worldwide test the half log dilution of the genotyped VQC and EUROHEP standards, may be an instrument to address this issue. The collaborative VQC proficiency study results will be used for characterisation of the VQC standards and validation of NAT methods used by the laboratories.

For the first time, an official institution, the Paul Ehrlich Institute from Germany, imple-

mented in 1997 the guidelines for obligatory use of NAT testing in order to control red blood cell concentrates which should be negative for HIV, HCV and HBV genomes. They demand that the candidate NAT methods, designed for individual blood donations (i.e. PCR) should be set up to the detection limits of 2000 geq/ml for HCV, 1000 geq/ml for HIV and 500 geq/ml for HBV.

* Izvadak iz predavanja "Quality control of confirmation testing and PCR for viral infectious markers", održanog za sudionike European School of Transfusion Medicine u Dubrovniku, 23.-26. travanj 1998.

S-03/4

AUTOMATIZACIJA U CITOGENETSKOJ MOLEKULARNOJ DIJAGNOSTICI Automation in Cytogenetic Molecular Diagnostics

Mrsić S.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Citogenetika je znanstvena disciplina koja istituje morfologiju i dinamiku kromosoma. Istraživanjem kromosoma i kromosomskih poremećaja nastaje se otkriti zakonitosti i bioško značenje njihove pojave u malignim bolestima. Rezultati ispitivanja nailaze na praktičnu primjenu u dijagnostici i praćenju tijeka bolesti. Identifikacija kromosomskih regija bitnih za razvoj bolesti omogućila je ispitivanje molekularnih mehanizama maligne transformacije. Osnova citogenetike je stanična kultura kojom se dobivaju metafazni kromosomi potrebni za analizu. Unatoč napretku medicine kultivacija stanica još uvijek je manualna metoda koja zahtijeva vrijeme, znanje i stručnost. Nove molekularne metode u citogenetici kao što su FISH, SKY, M-FISH te CGH praćene su specifičnim kompjutorskim programima koji se koriste u analizi kromosomskih poremećaja. Automatizacija u citogenetici može se podijeliti u dva dijela: analiza metafaza te analiza signala. Naime, nakon kultivacije stanica potrebno je analizirati metafaze na predmetnom stakalcu. Kako su u većini slučajeva metafaze rijetke njihovo lociranje i analiza može trajati satima. Automatizacija je rezultirala dramatičnom uštedom vremena u pronađenju i analiziranju metafaza. Uvođenjem računala te stvaranjem veze između računala i mikroskopa traženje metafaza potpuno je automatizirano. Računalo samo s pomoću automatskog

fokusa na mikroskopu analizira ponudena predmetna stakale te stvara galeriju metafaza za kasniju analizu. Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) je tehnika molekularne genetike koja omogućava vizualizaciju i time izravnu identifikaciju specifičnih DNA i m-RNA sekvenci (dijelova gena, gena, specifičnih kromosomskih regija i cijelih kromosoma) u stanici. S pomoću ove metode mogu se iskoristavati ne samo metafazni kromosomi već i interfazne jezgre. Metoda FISH temelji se na specifičnoj hibridizaciji dviju komplementarnih sekvenci, što je i jedno od osnovnih načela molekularne genetike. Upotrebom različitih proba dobivaju se i signali različite veličine. Svaki signal koncentrira se u području specifične regije kromosoma (npr. centromera). Za svaki nalaz potrebno je analizirati od 200 do 400 interfaznih jezgara, a u nekim slučajevima i više. Uvođenjem kompjutatora te specifičnih programa koji služe za analizu slike i signala dobilo se na kvaliteti, ali i na broj analiza.

S-03/5

PRIMJENA COBAS AMPLICOR SUSTAVA U MOLEKULARNOJ DIJAGNOSTICI HEPATITIS C VIRUSA

Application of Cobas Amplicor System in Molecular Diagnostic of Hepatitis C Virus

Bingulac-Popović J, Grahovac B.

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

Primjena molekularno-bioških metoda u laboratorijskoj dijagnostici zahtjeva standardizaciju metoda koja obuhvaća provjeru reproducibilnosti, specifičnosti i osjetljivosti postupka, a u svrhu provedbe kontrole kvalitete metoda. To je bilo moguće postići jedino uvođenjem automatizacije u molekularnu dijagnostiku. Roche Diagnostic Systems razvio je poluautomatizirani COBAS AMPLICOR sustav koji se rabi za dijagnostiku krvlju prenosivih bolesti - virusa hepatitisa B i C, kvalitativno i kvantitativno.

Sustav automatizira tri procesa: PCR umnožavanje specifične, ciljne nukleinske kiseline u uzorku; hibridizaciju umnoženog produkta na oligonukleotidne probe specifične za ciljnu sekvencu; kolorimetrijsku detekciju specifičnog PCR produkta. Unos uzorka i reagensa vrši se s pomoću barcode čitača, a rezultati se automatski ispisuju.

Sustav COBAS Amplicor je u primjeni u HZTM oko godinu dana. Za to vrijeme učinjeno je više od 1000 kvalitativnih i više od 300 kvantitativnih

BIOCHEMIA MEDICA god. 9, br. 1-2, 1999.

određivanja hepatitis C virusa u uzorcima seruma ili plazme bolesnika. Uvođenjem interne kontrole (IC) u kvalitativne analize možemo utvrditi prisutnost inhibicijskih supstanci koje interferiraju u PCR umnožavanju. Reproducibilnost i osjetljivost kvalitativnog određivanja HCV-RNA u uzorku definirana je na ≤2000 virusnih kopija/ml.

Kvantifikacija HCV-RNA omogućena je uporabom QS-internog standarda, s poznatim brojem virusnih kopija koji se koamplificira uz ciljnu virusnu RNA. Broj kopija HCV-RNA u ml serumu određuje se usporedbom uzorka i internog standarda. Za kvantitativnu metodu osjetljivost i reproducibilnost procjenjuje se na ≤1000 virusnih kopija/ml, koje je moguće utvrditi u 100% slučajeva s pomoću AMPLICOR HCV MONITOR testa. Linearnost metode je u području između 1000 i 500 000 HCV-RNA kopija/ml.

S-03/6

MOLEKULARNE DIJAGNOSTIČKE METODE U MIKROBIOLOGIJI Molecular Diagnostic Methods in Microbiology

Plečko V.

Zavod za kliničku i molekulsku mikrobiologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Molekularne mikrobiološke dijagnostičke metode danas se koriste za karakterizaciju mikroorganizama za koje su metode kultivacije složene, izuzetno skupe ili ne postoje. Time je mikrobiološka dijagnoza brža i dostupnija. Značajna

primjena molekularnih metoda je i u genotipizaciji mikroorganizama istog fenotipa (npr. praćenje i kontrola bolničkih infekcija) te dokazu virulentnih sojeva na osnovi genetskih obilježja (npr. izdvajanje rizičnih skupina bolesnika za razvoj određenih bolesti). Metode mogu biti hibridizacijske (vezanje probe obilježene radioaktivno ili enzimski za određenu ciljnu molekulu; reakcija može biti na krutom nosaču, u tekućini ili pak in situ.)

Cijeli niz molekularnih metoda koristi amplifikaciju bilo ciljnih molekula (npr. polymerase chain reaction - PCR, strand displacement amplification - SDA), amplifikaciju probe (npr. ligase chain reaction - LCR) ili signala (branch DNA - bDNA). Time se postiže veća osjetljivost u odnosu na hibridizacijske tehnike. PCR je 10 - 100 X osjetljiviji od hibridizacijskih tehnika. Zbog visoke osjetljivosti amplifikacijskih metoda potrebna je posebna organizacija rada i zaštitne mjere koje se moraju provoditi tijekom cijelog postupka da se izbjegne kontaminacija ispitivanog uzorka nukleinskom kiselinom iz drugog izvora te mogući lažno pozitivan rezultat testa. Kontrola kvalitete se provodi neprekidno i u svakom dijelu postupka.

PCR i bDNA su molekularne tehnike kojima je moguća i kvantitativna detekcija određenih mikroorganizama, tj. specifičnih sekvenci, što je bitno u određenim indikacijama (npr. praćenje učinka terapije u bolesnika oboljelih od HCV, HBV ili HIV infekcije).

Sve se ove metode neprestano usavršavaju i usporeduju kako medusobno tako i sa standardnim klasičnim metodama u određenim specifičnim indikacijama. U rutinskoj primjeni koriste se one metode koje imaju znatne prednosti u odnosu na klasične.

Sekcijska tema: S-04 Dijagnostika uz bolesničku postelju Point of Care Testing

S-04/1

RELEVANCE OF POCT OF CRITICALLY ILL PATIENTS IN THE ANESTHESIOLOGY AND INTENSIVE CARE UNITS

Značenje testiranja uz bolesničku postelju u jedinicama intenzivne njage i anesteziologije

Maresz ZS.

Nova Biomedical, Vienna, Austria

POCT (Point-of-care-testing) has allowed significantly improved turnaround times in remote

sites. This helps make rapid decision and apply proper patient therapy. In this study, performed in Austrian hospitals, the relevance of various lab tests has been estimated.

All Austrian hospitals with intensive care units were asked to answer the following questions: which tests are performed at the admission time, after 24h, which tests gave unexpected results, influenced diagnosis and or therapy changes.

Blood gas analysis followed by Na and K were most frequently performed tests at the admission time. Hb derivatives were rarely tested.

Unexpected results were found in 10% of all cases. Potassium with 20% of unexpected results and over 85% of relevance (therapy change) was in the first place. Magnesium and oxygen saturation have given less expected results but with 100% relevance. Slight medical consequences were caused by the unexpected results of bilirubin, GPT, leukocytes and osmolality. Controls performed after 24h showed that the number of unexpected results was dramatically reduced, with only rare relevance. However, potassium and pO₂ still showed the highest rate of consequent therapy changes.

The results indicate the tests which are mostly relevant and should be performed at POC and which have minimal influence on therapy changes and can be done in central lab even when the results are available with delay.

S-04/2

BIOSENZORI U KLINIČKOJ KEMIJI: NAČELA RADA I PRIMJENA

Biosensors in Clinical Chemistry: Principles and Application

¹Grabarić BS, ²Mandić Z.

¹Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za kemiju i biokemiju, Zagreb. ²Pliva, Istraživanje i razvoj, Zagreb

Kemijski i biokemijski senzori imaju važnu ulogu u proširenju znanstvenih spoznaja i unapredjenju tehnološkog razvoja primjenom laboratorijskih, terenskih i procesnih mjerena već gotovo čitavo stoljeće, od ranih radova Kohlrauscha (1885) i Nernsta (1889) na dvoselektronim elektrokemijskim celijama i ionsko-selektivnim redoks-elektrodama pa do danas najuspješnijeg kemijskog senzora - membranske staklene ili pH elektrode (Cremer, 1906), te drugih svakodnevno primjenjivanih nemodificiranih i modificiranih elektroda kao što su kapajuća živina elektroda (Heyrovsky J, 1922), kisikova elektroda (Clark, 1956) i ostalo.

Do pred dvadesetak godina istraživanja su bila usmjerena više na primjenu kemijskih i biokemijskih senzora nego na razvoj novih senzora, vjerojatno i zbog toga što su ti senzori u potpunosti zadovoljavali tadašnji stupanj tehnološkog razvoja popratne instrumentacije. No sve veći zahtjevi za

pouzdanim, osjetljivijim i selektivnijim određivanjima sve teže odredivih analita u sve složenijim matricama, potakli su interdisciplinarni pristup u razvoju novih senzorskih sustava, posebno na području biomedicine, kliničke kemije i biotehnologije. Interdisciplinarnost tih istraživanja povezala je mikroelektroniku, optoelektroniku, znanost o materijalima, elektrokemiju, spektrometriju, biokemiju, fiziku, automatizaciju i kemometriku i dr., te dala kao rezultat nove kemijske i biokemijske senzore. Jednako tako su spoznaje o selektivnim kemijskim interakcijama kovinskih i drugih iona s krunastim spojevima, kriptandima, kaliksarenima, sferandima i dr., te o biokemijskim interakcijama enzim-supstrat, hormon-receptor i antigen-protutijelo omogućile ugradnju tih visokoosjetljivih i selektivnih sustava kao dijela za specifično prepoznavanje određenih analita od strane kemijskih i biokemijskih senzora, a signal koji nosi kemijsku i biokemijsku informaciju pretvoren je najčešće u električni signal s pomoću elektrokemijskih, optokemijskih, piezoelektričnih i inih transduktora.

U ovom pregledu bit će prikazana podjela biokemijskih senzora, osnovna načela njihovog djelovanja i odabrane primjene dosad razvijenih najuspješnijih biosenzora s posebnim naglaskom na njihova sadašnja i buduća potencijalna primjena u kliničkoj kemiji i biomedicini.

S-04/3

ODREDIVANJE UZ BOLESNIKA: DIO KLINIČKO LABORATORIJSKE

DIJAGNOSTIKE ILI KONKURENCIJA

Near Patient testing: Part of Clinical Laboratory Diagnostics or Competition

Rumenjak V.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra, Zagreb

Izraz "određivanje uz bolesnika" odnosi se na sve biokemijske testove koji se ne provode u medicinsko-bioteknološkom laboratoriju već tamo gdje je, i kada, bolesniku potrebno. Izrazi sličnog značenja u stranoj literaturi su: near-patient testing, bedside testing, decentralized testing i, najčešće, point of care.

Određivanje uz bolesnika posljednjih nekoliko godina zauzima sve značajnije mjesto osobito u

jedinicama intenzivne njegi. Uredaji na osnovi mikroelektroda omogućuju vrlo brzo dobivanje rezultata elektrolita, glukoze, ureje, hematokrita u malom volumenu pune krvi uz zadovoljavajuću preciznost i točnost. Pritom, broj mogućih određivanja neprestano se širi, svaka analiza koja ima utjecaj na medicinski tretman može postati dio određivanja uz bolesnika.

Najvažniji argument za uvođenje određivanja uz bolesnika je nužnost što bržeg dobivanja rezultata u svrhu praćenja učinka i potrebne korekcije terapijskog postupka kod kritičnih bolesnika. Neka su istraživanja tako potvrdila da je uvođenje određivanja uz bolesnika značajno unaprijedilo rad hitne medicinske službe te smanjilo potrošnju nekih krvnih derivata. Prema rezultatima drugih istraživanja, određivanje uz bolesnika skratio je boravak bolesnika u jedinicama intenzivne skrbi. Pored toga, ekonomski razlozi prisiljavaju mnoge laboratorije da rade s manjim brojem osoblja, čime se produžuje analitičko vrijeme, a što je dodatni razlog za uvođenje određivanja uz bolesnika.

Unatoč ovim, ali i drugim pojedinačnim razlozima koji govore u prilog uvođenja određivanja uz bolesnika, neka pitanja ostaju neriješena i pred-

met su brojnih istraživanja. Jedno od važnih pitanja je bilježenje rezultata pretraga koje još uvek nije automatsko, a što može dovesti do gubitka podataka neophodnih u cijelovitom praćenju bolesnika. Sljedeće je pitanje osoblja koje će provoditi određivanje uz bolesnika: liječnici i medicinske sestre u bolnicama imaju primarnu zadaću neposredne brige oko bolesnika i dodatno opterećivanje određivanjima uz bolesnika može imati za rezultat smanjenje kvalitete takvog rezultata. Dakako, zbog toga je potrebna i čvrsta provedba kontrole kvalitete. Konačno, općenito je poznato da je cijena određivanja uz bolesnika oko 2-3 puta veća od cijene određivanja u centralnom laboratoriju, što zahtijeva preciznu procjenu koji će se testovi određivati uz bolesnika.

Zbog svih otvorenih pitanja kao i zbog osiguranja kontrole kvalitete medicinski biokemičari trebaju imati aktivnu ulogu u provođenju određivanja uz bolesnika. Ne bi se smjelo dogoditi da se u bolnicu uvodi određivanje uz bolesnika bez stručnog sudjelovanja i nadzora medicinskih biokemičara. Samo na taj način može se postići puna dijagnostička i ekonomska učinkovitost određivanja uz bolesnika i opravdati njegovo uvođenje.

Sekcijska tema: S-05

Bolesti bubrega i njihovi eksperimentalni modeli Kidney Diseases and their Experimental Models

S-05/1

THE DIAGNOSTIC STRATEGY OF URINE PROTEIN DIFFERENTIATION

Dijagnostički pristup za razlikovanje proteinurija

Ivandie M.

Institute of Clinical Chemistry, Municipal Hospital Bogenhausen, München, Germany

The differentiation of single marker proteins in urine has found increasing dissemination over the past years as a new strategy for screening and monitoring renal and non-renal disorders. By quantitative measurement of up to seven analytes in urine in combination with a dipstick screening, proteinuria, hematuria and leucocyturia can be assigned to prerenal, glomerular and tubular, and postrenal causes [1-4].

This diagnostic strategy supports a step-by-step evaluation of patients as outlined in Fig. 1.

EXCLUSION OF AN ACTIVE RENAL PARENCHYMAL DISEASE

The dipstick fields for blood (pseudoperoxidase) and leucocyte esterase are used to exclude a hematuria/myoglobinuria and leucocyturia. Urine albumin has been introduced as a sensitive indicator of glomerular dysfunction. α_1 -Microglobulin has been recommended as a marker of tubular reabsorption. The concentration of total proteins in urine serves as a plausibility control when it is compared to the sum of single proteins. All quantitative analytes are referred to urine creatinine to diminish their variability in urine caused by changes in diuresis.

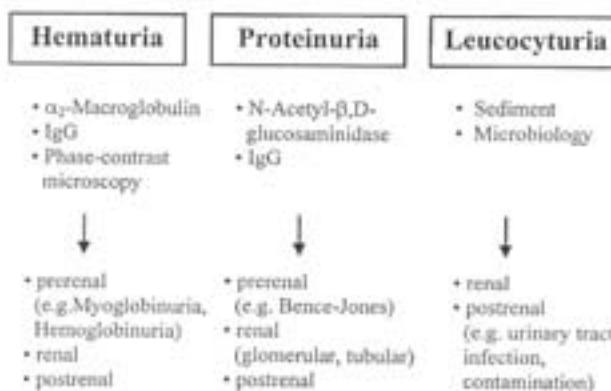
If the dipstick screening is negative and the quantitative analytes are within their reference

1. Exclusion of an Active Renal Disease

- Total protein
- Albumin
- α_1 -Microglobulin
- Creatinine
- Hemoglobin pseudoperoxidase
- Leucocyte esterase

↓ results outside reference ranges

2. Differentiation



ranges, an active renal parenchymal disease can be excluded with high certainty. If this first diagnostic step reveals pathological results, proteinuria, hematuria or leucocyturia can be further differentiated by means of protein analysis or other methods.

DIFFERENTIATION OF PROTEINURIA

Prerenal Proteinuria

A prerenal proteinuria should be suspected when a "protein gap" is detected using the ratio of total protein to the sum of albumin and α_1 -microglobulin: if the sum of the single proteins accounts for less than 30% of total protein excretion, a prerenal cause for this protein gap should be considered. Using the dipstick result for hemoglobin/myoglobin and immunofixation, a Bence-Jones-proteinuria of a patient with a monoclonal gammopathy can be distinguished from myoglobinuria (rhabdomyolysis, muscle trauma) or hemoglobinuria after intravasal hemolysis. A protein gap in combination with highly elevated excretion of tubular markers can be found in urine samples of children with an inborn tubulopathy (e.g. De Toni-Debre-Fanconi-syndrome) [5].

Renal Proteinuria

Renal proteinuria can be described quantitatively and qualitatively according to its glomerular

and tubular shares using albumin and α_1 -microglobulin. Based on these marker proteins, a renal proteinuria can be classified as due to a tubulo-interstitial nephropathy or a primary/secondary glomerulopathy.

Given the same albuminuria, excretion of α_1 -microglobulin is on an average higher in patients with tubulo-interstitial nephropathies than with glomerulopathies because of the impaired tubular reabsorption. The higher urine concentrations of the tubular marker in patients with secondary glomerulopathies in comparison with primary glomerulopathies indicate a stronger and different involvement of the interstitial space in the underlying glomerular disease (e.g. fibrosis of tubules in diabetic glomerulosclerosis).

In case of a glomerulopathy with nephrotic albuminuria ($>3 \text{ g/g}$ creatinine), an increase of α_1 -microglobulin in urine is caused at least partly by an "overload" of the tubule system due to an excessive glomerular proteinuria. Therefore, there is always an elevated concentration of this tubular marker protein when a nephrotic albuminuria is found. A significant tubular proteinuria, on the other hand, can also be interpreted as caused by an involvement of the renal interstitium in the originally glomerular disease, for instance, if there is an interstitial fibrosis in a case of glomerulonephritis.

In order to decide how much of the excretion of α_1 -microglobulin is due to a structural tubular damage, the tubular marker can be "corrected" using the exponential formula $\alpha_1\text{-microglobulin}_{\text{corrected}} = 4.7 \times e^{-0.00022 \cdot \text{albu-}}_{\text{measured}}$

This formula was derived from excretion patterns of selected patients with glomerulonephritis whose renal interstitial space was devoid of major histopathological findings [6]. It approximately describes the lower margin of the cluster of primary glomerulopathies with a nephrotic albuminuria.

If the corrected value of α_1 -microglobulin is within the reference range, then this tubular proteinuria is assumed to result from an overload of the tubule system. Concentrations of α_1 -microglobulin $>14 \text{ mg/g}$ creatinine are interpreted as showing an involvement of the renal interstitium in glomerulopathy, a constellation having a poorer prognosis.

In tubulo-interstitial nephropathies, an acute pathological process can be distinguished from a chronic disease by considering N-acetyl- β ,D-glucosaminidase (NAG), an enzyme of proximal tu-

bular cells: in acute tubular disorders (e.g. caused by nephrotoxic antibiotics), the excretion of NAG usually exceeds 20 U/g creatinine, if α_1 -microglobulin is >40 mg/g creatinine. Chronic tubulo-interstitial diseases are characterised by increased α_1 -microglobulin without a major increase in NAG [3, 4].

Differentiation of Hematuria

A differentiation of a prerenal, renal and postrenal cause of a positive pseudoperoxidase dipstick is possible by means of urine protein differentiation, if there is a significant albumin excretion (>100 mg/L) [1,2]. At lower albuminuria, phase-contrast microscopy should be used to look for signs of renal hematuria such as dysmorphic erythrocytes, especially acanthocytes, and erythrocyte casts.

A prerenal cause of the positive dipstick result should be considered if a "protein gap" is found. Additional tests can exclude or confirm hemoglobinuria or myoglobinuria as possible causes. Differentiation of renal and postrenal hematuria is based on the observation that α_2 -macroglobulin (molecular weight 720 kD) and IgG (molecular weight 150 kD) pass the glomerular filter under physiological conditions only in traces because of their molecular size.

Therefore, hematuria can be classified as being of renal origin by comparing the excretion of IgG and α_2 -macroglobulin in relation to albumin: a ratio of IgG to albumin < 0.2 (mg/mg) and an α_2 -macroglobulin/albumin-ratio 0.02 (mg/mg) are found in case of glomerular hematuria. In case of postrenal bleeding, the ratios of IgG and α_2 -macroglobulin to albumin in urine are similar to those in plasma (α_2 -macroglobulin/albumin > 0.02 and IgG/albumin > 0.2).

Differentiation of Leucocyturia

According to the urine protein pattern, a renal cause of leucocyturia can be distinguished from a postrenal source of the positive dipstick result for leucocyte esterase.

A contamination is probable if a normal urine protein pattern is combined with a positive leucocyte dipstick. Whereas in case of postrenal leucocyturia the excretion of albumin and IgG might be slightly elevated, renal involvement in an inflammatory process of the urinary tract should be considered when significant mixed proteinuria (total protein > 150 mg/g creatinine, albumin > 100 mg/g creatinine, α_1 -microglobulin > 14 mg/g creatinine) is found.

Based on this knowledge base, an expert system has been developed to assure an interpreta-

tion of urine diagnostics of high and constant quality [7]. This Urine Protein Expert System (UPES) has been proven to be a useful tool for routine evaluation of adult and pediatric patients [5]. More information about UPES and the diagnostic strategy of urine protein differentiation can be found on the Internet at [8].

REFERENCES

1. Guder W G, W. Hofmann. Differentiation of Proteinuria and Hematuria by Single Protein Analysis in Urine. Clin Biochem 1993; 26: 277-82
2. Hofmann W., B. Rossmüller, W G. Guder, H.H. Edel. A New Strategy for Characterizing Proteinuria and Hematuria from a Single Pattern of Defined Proteins in Urine. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30: 707-12
3. Guder W.G, W Hofmann. New strategies in screening urine for exclusion and differentiation of renal diseases by analyzing individual proteins. Jugoslov Med Bihem 1997, 16 (2): 69-75
4. Guder W G, M. Ivandic, W. Hofmann. Physiopathology of proteinuria and laboratory diagnostic strategy based on single protein analysis. Clin Chem Lab Med 1998; 36 (12): 935-9
5. Lun A., M. Ivandic, F. Priem, G. Filler, M. Kirschstein, J.H.H. Ehrlich, W.G. Guder. Evaluation of pediatric nephropathies by a computerised Urine Protein Expert System (UPES). Ped Neph 1999; accepted for publication
6. Hofmann W., H. Edel, W G. Guder. A mathematical equation to differentiate overload proteinuria from tubulo-interstitial involvement in glomerular diseases. Clin Nephrology 1995; 1 : 28-31
7. Ivandic M., W Hofmann, W G. Guder. Development and evaluation of a urine protein expert system. Clin Chem 1996; 42: 8 1214-22
8. World Wide Web: <http://www.zait.uni-bremen.de/upes/main.htm>

S-05/2

RANA DIJAGNOSTIKA ENDEMSKE NEFROPATIJE

Early Diagnosis of Endemic Nephropathy

Čvorišće D.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Endemska nefropatija je kronična bolest bubrege nepoznate etiologije, s visokom prevalencijom u zemljopisno ograničenom području zapadne Brodske Posavine. Patohistološka ispitivanja bubrežnih tubuli s reakcijom intersticija, dok su glomerularne promjene sekundarnog karaktera.

Tubulointersticijskim ozljedama mogu se objasniti simptomi bolesti, a to su tubularna proteinurija te smanjena sposobnost za koncentriranje i zakiseljavanje mokraće. U istom zemljopisnom području postoji i povećana incidencija karcinoma bubrežnog pelvisa i uretera.

Dijagnostika endemske nefropatije i otkrivanje bolesti u populaciji povezani su s velikim teškoćama: u fazi azotemije ili uremije teško je razlikovati endemsку nefropatiju od drugih kroničnih intersticijskih nefropatija i ne postoji specifična pretraga za rano otkrivanje endemske nefropatije. Laboratorijske pretrage koje su posljednjih desetljeća korištene za dijagnostiku endemske nefropatije su kreatinin u serumu, hemoglobin u krvi i proteini u mokraći (SSA i/ili test traka i LMW test i/ili β_2 -mikroglobulin). U svrhu ranog otkrivanja endemske nefropatije ispitivani su i drugi proteinski biljezi pojedinih dijelova nefrona: albumin, lizozim, α_1 -mikroglobulin, AAP, LD, NAG, THP, intestinalna alkalna fosfataza i tkivno-nespecifična alkalna fosfataza. Na temelju dobivenih rezultata i današnjeg medicinskog znanja preporuka je da se za rano otkrivanje endemske nefropatije koriste sljedeće pretrage: mjerjenje albumina, α_1 -mikroglobulina i NAG te otkrivanje leukocita i eritrocita s pomoću test trake u mokraći.

S-05/3

BOLESTI I NJIHOVI EKSPERIMENTALNI MODELI

Diseases and their Experimental Models

Slijepčević M.

Institut Ruder Bošković, Zavod za molekularnu medicinu,
Zagreb

Brojni su razlozi koji opravdavaju neophodnost uporabe eksperimentalnih modela za proučavanje raznih bolesti. Primjerice, za mnoge nije sasvim poznata etiologija ili patogeneza, a kod drugih se još uvijek traga za preciznijim dijagnostičkim i uspješnijim terapijskim sredstvima. Naravno da se nikad ne smije zanemariti poznata činjenica da se rezultati dobiveni na eksperimentalnim modelima (razne pokusne životinje, njihova tkiva ili stanice u kulturi te niži jednostanični ili višestanični organizmi) gotovo nikad ne podudaraju u cijelosti s reakcijama ljudskog organizma. Stoga je važno, ako je ikako moguće prvo odabrat takvu vrstu pokusne životinje koja je anatomski i fiziološki najbliža čovjeku. Zatim, takve životinje u kojima

će se za stanovitu bolest javiti gotovo isti simptomi kao i u ljudi. U načelu, sva opažanja na modelu koja se mogu objektivno sigurno utvrditi i koja su visoko reproducibilna temelj su očekivanja da se tako nešto može zbivati i u čovjeku. Zato zakonske odredbe za postupke pri procjeni novih lijekova predviđaju obvezatna pretklinička ispitivanja na više vrsta životinja glede:

- a) učinkovitosti ispitivanog pripravka i
- b) njegove eventualne toksičnosti.

Takva ispitivanja osim na razini cijele životinje još se izvode i na staničnoj i molekularnoj razini. Iz svega proizlazi da samo takva složena ispitivanja mogu poslužiti za ispravnu procjenu smije li se i ima li opravdanja ići u sljedeći zakonom propisani krug ispitivanja na kliničkoj razini.

Ali istraživači u sferi pretkliničkih ispitivanja dužni su se također pridržavati Zakona o dobrobiti životinja te biti specifično izobražni kako bi takva ispitivanja mogli primjereno obaviti. U prvom redu trebaju dobro poznavati anatomsко-fiziološke osobine životinja na kojima rade te znati sve o njihovom uzgoju i uvjetima držanja. Zatim moraju podrobno poznavati načine skupljanja uzoraka od zdravih i bolesnih životinja koji će biti uspješni samo ako se istraživač služi pravilnim propedetičkim zahvatima kojima će s jedne strane izbjegi nanošenje boli životinji, a s druge strane spriječiti prijenos infekcije (na ljude ili životinje, odnosno zagaditi kulturu stanica) te osigurati potrebnu kvalitetu i održivost uzoraka. U tu svrhu potrebno je poznavati različite metode uspavljivanja glede primjene i vrste narkotika, jer to itekako može utjecati na rezultate. Zatim, mora se dobro poznavati postupke primjene ispitivanih supstanci bilo peroralnim ili parenteralnim putem. Tu naročito dolaze do izražaja anatomsко-fiziološke karakteristike različitih vrsta eksperimentalnih životinja. Nadalje, bitno je poznavati načine neškodljivog uklanjanja ostataka tkivnih uzoraka da ne dode do širenja bolesti, ugroženosti operatera te zagodenja okoliša. Pogotovo je neophodna kvalitetna izobrazba za izvođenje autopsije i uzimanje uzoraka tkiva bilo za bakteriološka ili histološka ispitivanja. Pogotovo je važno strogo se pridržavati sterilnosti u postupku uzimanja tkiva bilo za kasnija ispitivanja u kulturi tkiva ili za presadijanje u žive primatelje. Pažljivo vodenje dokumentacije koje započinje preciznim obilježavanjem životinja i kaveza te formiranjem pokusnih skupina s podacima o vrsti i vremenskim razmacima tretmana uvjet je bez kojeg ne možemo računati na kvalitetu ispitivanja i primjenu rezultata. Paralelno s tim istodobno stalno mora biti uskladena zakonska regulativa glede osoba koje izvode po-

kus, ali i glede poštivanja "prava životinja". Predavanje će biti popraćeno primjerima *in vitro* i *in vivo* modela, osobito glede šećerne bolesti.

S-05/4

ENDEMSKA NEFROPATIJA: ŽIVOTINJSKI MODEL INDUCIRAN OKRATOKSINOM A

Endemic Nephropathy: Animal Model Induced by Ochratoxin A

Žanić-Grubišić T.

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za medicinsku biokemiiju i hematologiju, Zagreb

Okratoksin A je široko rasprostranjeni mikotoksin, nadan u hrani biljnog (maksimalno do 27,5 mg/kg) i životinjskog podrijetla (maksimalno do 67 µg/kg). To je tek jedan od oko 400 mikotoksina čijem su djelovanju izloženi i čovjek i životinje. Okratoksi su derivati izokumarina koji je povezan preko karboksilne skupine amidnom vezom s fenilalaninom. Njegova sličnost s fenilalaninom upućuje na mogućnost interakcija s različitim enzimskim sustavima. Akumulira se u bubrežima i tkivima s većim sadržajem lipida. Istraživanja na prokariotima, eukariotima, pokusnim životnjama, te staničnim kulturama pokazuju da djeluje nefrotoksično, genotoksično, karcinogeno, imunosupresivno, a upliće se i u koagulaciju krvi.

Zbog izraženog nefrotoksičnog djelovanja često se koristi u eksperimentalnim modelima istraživanja mehanizama razvoja patoloških promjena u bubrežnim bolestima, poglavito u ispitivanjima vezanim uz endemsку nefropatiju. Zbog opisanih sličnosti kliničkih i biokemijskih promjena u bolesnika s endemskom nefropatijom i onih koje nastaju djelovanjem okratoksina A na eksperimentalnim životnjama, okratoksin A je najčešće ispitivan kao mogući uzrok ove bolesti. U literaturi su opisani različiti pristupi u stvaranju eksperimentalnih modela koji se temelje na primjeni akutne i visoke doze toksina. U svrhu imitiranja prirodne izloženosti mi smo razvili vlastiti model koji se zasniva na primjeni svakodnevnih

niskih doza kroz razdoblje od najmanje mjesec dana. Učinak okratoksina A prati se određivanjem molekularno-bioloških i biokemijskih pokazatelja u krvnom serumu, mokrači, te izoliranim stanicama i staničnim organelama podrijetlom iz bubrega, jetre, mozga, pankreasa.

S-05/5

PROTEINI STANIČNOG SKELETA "IN VIVO" S POMOĆU ZELENOG FLUORESCENTNOG PROTEINA

Cytoskeletal Proteins *in vivo* via Green Fluorescent Protein

Barišić K.

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za medicinsku biokemiiju i hematologiju, Zagreb

Sve do nedavno u istraživanju staničnog skeleta korištene su imunofluorescentne tehnike koje podrazumijevaju rad s fiksiranim stanicama. Mikroinjiciranje pročišćenih i fluorescentno označenih proteina omogućilo je vizualizaciju staničnog skeleta *in vivo*, ali je sam postupak povezan s brojnim tehničkim poteškoćama. Primjena zelenog fluorescentnog proteina (GFP) posljednjih je godina otvorila nove horizonte u ispitivanjima staničnog skeleta: proteini su postali vidljivi zahtijevajući fluorescentnom obilježivaču (GFP-tag), čime je omogućeno promatranje dinamičke strukture staničnog skeleta *in vivo*.

Gen za GFP je izoliran iz meduze (*Aquorea victoria*). Gen kodira protein od 238 aminokiselinskih ostataka koji nakon pobudivanja kod 395 nm emitira svjetlost kod 508 nm. Proteini staničnog skeleta označavaju se GFP-om tako da se gen koji kodira protein od interesa fuzionira s genom za GFP. Rekombinantnom DNA transfektiraju se stanice, a pozitivni klonovi se izoliraju na osnovi ekspresije fuzijskog proteina koji fluorescira. Na modelnom organizmu *Dictyostelium discoideum* ispitivani su proteini staničnog skeleta, aktin i koronin, tijekom kemotaksije, citokineze i fago-citoze.

Sekcijska tema: S-06
Oksidansi i antioksidansi
Oxidants and Antioxidants

S-06/1

**SLOBODNI RADIKALI U ZDRAVLJU I
BOLESTI**
Free Radicals in Health and Diseases

¹Stavljenić-Rukavina A, ¹Granić P, ²Žunić J.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ²Županijska opća bolnica, Karlovac

Oksidacijsko oštećenje stanica i organela nastalo kao rezultat biokemijskih procesa pod utjecajem slobodnih radikala prema današnjem je shvaćanju uzrokom mnogih bolesti. Slobodnim radikalima nazivamo atome i molekule s jednim ili više nesparenih elektrona, a među njima su najčešći superoksidni, potom hidroksilni radikali, dušik-oksidni i peroksidni radikali. Radikali nastaju tijekom metaboličkih procesa u stanju zdravlja, sudjeluju u uklanjanju patogenih bakterija, kod međustaničnog prijenosa signala, a i za vrijeme procesa koje kataliziraju cikloksigenaze i lipooksigenaze.

U nefiziološkim uvjetima njihovo pojačano stvaranje posljedica je ionizirajućeg zračenja, izlaganja UV svjetlu, pojačane fizičke aktivnosti, ishemije, nekih lijekova ili toksičnih spojeva. Preddilekcijska mjesta njihova djelovanja su membranski lipidi i lipoproteini, proteini, DNA, te ugljikohidrati. Specifična oksidacija lipida ili lipidna peroksidacija usko je povezana s razvojem ateroskleroze jer je uklanjanje oksidiranog LDL iz cirkulacije onemogućeno normalnim putem preko LDL-receptora, već se on zadržava u plazmi povećavajući propusnost endotela krvnih žila i uzrokujući upalni odgovor na mjestima gdje se nakuplja u obliku pjenastih tvorbi. Na razini DNA slobodni radikali mijenjaju ekspresiju gena preko čimbenika transkripcije. Slobodni radikali mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva proteina, mijenjaju enzimsku aktivnost tako da uklanjaju aktivno mjesto enzima. Također je nađeno da mijenjaju strukturu ugljikohidratnih skupina hormonskih receptora, strukturu drugog glasnika, kao i složenih polisaharida. U fiziološkoj ravnoteži protuteža djelovanju slobodnih radikala su prirodni antioksidansi koje posjeduje ljudski organizam poput metaloproteina ceruloplazmina, albumina, transferina, feritina ili mioglobina koji koče nastanak slobodnih radikala. Jednom stvorenim slobodni

radikali uklanjaju se specifičnim enzimima poput superoksid dismutaze, glutation peroksidaze, katalaze i drugih metaloenzima. U njihovom uklanjanju sudjeluju također glutation, vitamini C i E, karotenoidi, flavonoidi i metaboliti bilirubin i mokraćna kiselina. Na razini DNA štetno djelovanje slobodnih radikala popravljuju specifični enzimi DNA polimeraza i DNA ligaza. Najučestalije bolesti za koje je dokazana povezanost sa slobodnim radikalima su aterosklerozu i njene posljedice, dijabetes, multipla skleroza, a značajno doprinose pogoršanju stanja šoka. U ovom pregledu obraditi će se značenje slobodnih radikala i prirodnih antioksidansa u najčešćim bolestima.

S-06/2

ULOGA ŽELJEZA U NEOPLAZMI
The Role of Iron in Cancer

Poljak-Blaži M.

Institut "Ruder Bošković", Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb

Željezo sudjeluje u nekoliko bioloških reakcija i esencijalno je za sve žive organizme. S druge strane željezo i spojevi koji sadrže željezo mogu djelovati karcinogeno, citostatski i citotoksično. Vrlo mala količina slobodnog željeza, ako postoji u organizmu, pobudjuje Fentonovu reakciju, produkt koji su slobodni vodikovi radikali (OH^-), nakon čega uslijede brojne peroksidacijske reakcije. Za stanicu je vrlo opasna peroksidacija lipida zbog koje dolazi do oštećenja bioloških membrana i smrti stanice. Osim toga stvoreni OH^- radikali mogu izazvati točkaste mutacije i druga oštećenja na DNA molekuli. Na taj način željezo sudjeluje u inicijaciji tumora. Željezo pospješuje rast i diobu tumorskih stanica jer je neophodan nutritivni element. Napredovanje tumora željezo izaziva i tako što suprimira imunološki sustav domaćina. U posljednjih nekoliko decenija karcinogena uloga željeza pokazana je brojnim laboratorijskim i kliničkim istraživanjima. U oboljelih od hemokromatoze u organizmu se povećavaju rezerve željeza, a u svih se oboljelih tijekom života razviju tumori i neka druga kronična oboljenja. Desetgodišnje istraživanje u kojem je praćeno 14 000 ispi-

tanika pokazala je da se tumor razvije u onih ispitanika koji su imali povećane rezerve željeza. Razvoju tumora skloniji su pušači, ili oni koji su izloženi prirodnim ili tvorničkim spojevima željeza ili pak u hrani uzimaju tvari koje pojačano oslobadaju željezo iz feritina. Feritin je protein koji uskladištava višak željeza u stanici, a povezuju ga i s razvojem anemija kroničnih bolesti (AKB). AKB se često javlja u nositelja tumora i drugim kroničnim oboljenjima. Pri nalazu AKB uglavnom organizmu ne nedostaje željezo pa je primjena pripravaka željeza kontraindicirana. Parametri koji pokazuju poremetnje u metabolizmu željeza, npr. slobodno željezo, ukupni kapacitet vezanja željeza, zasićenje transferina i feritin su u nekim tumorskim oboljenjima dobar prognostički pokazatelj. Citostatsko i citotoksično svojstvo nekih spojeva željeza moglo bi se iskoristiti u liječenju tumora (vlastita iskustva koja će biti pokazana). Naime, tumorska stanica treba povećanu razinu oksidacijskog stresa, ali ne posjeduje stanične antioksidanse kojima bi se zaštitila od prekomjernog oksidacijskog stresa.

S-06/3

UKUPNI ANTIOKSIDACIJSKI STATUS - BILJEG OKSIDACIJSKOG STRESA

Total Antioxidant Status - a Marker of Oxidative Stress

Vukelić N.

Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Višegodišnja istraživanja na području slobodnih radikala i antioksidansa dovela su do otkrića primarnog uzorka čitavog niza akutnih i kroničnih bolesti - napada slobodnih radikala na različita tkiva koji dovode do oksidacijskog oštećenja staničnih komponenti i biomolekula. Slobodni radikali su nestabilne i vrlo reaktivne molekule koje se neprekidno stvaraju u tijelu tijekom biokemijskih redox-reakcija. Toksičnom djelovanju slobodnih radikala suprotstavlja se složeni antioksidacijski mehanizam obrane. Postojanje ravnoteže između nastanka slobodnih radikala i njihovog uklanjanja pomoću sustava obrane uvjet je normalne funkcije stanica, a poremećaj ravnoteže dovodi do oksidacijskog stresa i nastanka bolesti. U ovom radu prikazani su rezultati određivanja ukupnog antioksidacijskog sustava obrane u bolesnika s ishemičnom bolešću srca, akutnim pankreatitisom i u kroničnih alkoholičara. Ishemična bolest srca vodeći je uzročnik smrtnosti i obolijeva-

nja u razvijenim zemljama. Sve je više dokaza o značajnoj ulozi slobodnih radikala u etiologiji i patogenezi bolesti srca i nastanku ateroskleroze. Vrijednosti ukupnog antioksidacijskog sustava određivane su višekratno tijekom prvih 120 sati bolesti. Dobiveni rezultati statistički su značajno niži u svim točkama mjerjenja u usporedbi s kontrolnom skupinom. Sve veći broj bolesti uzrokovanih uzimanjem alkohola ukazuje da je alkoholizam ne samo značajan socijalni nego i medicinski problem. Kronično uzimanje alkohola izaziva oštećenje svih organa, a najteža i najčešća su oštećenja jetre - glavnog organa metabolizma alkohola. Mechanizam toksičnog djelovanja alkohola je pojačano stvaranje slobodnih radikala i poremećaj ravnoteže između oksidansa i antioksidansa. Vrijednosti ukupnog antioksidacijskog mehanizma obrane u bolesnika koji su dobrovoljno pristupili programu odvikavanja bile su statistički značajno niže za cijelo vrijeme liječenja u usporedbi s kontrolnom skupinom. Treću skupinu ispitanika činili su bolesnici s akutnim pankreatitisom gdje su oksidacijski stres i oksidacijska modifikacija važan patogenetski činitelj nastanka bolesti. Vrijednost ukupnog antioksidacijskog sustava određivana je jednokratno u početnoj fazi bolesti i statistički je značajno niža u usporedbi s kontrolnom skupinom. Rezultati određivanja ukupnog antioksidacijskog sustava obrane u sve tri skupine bolesnika ukazuju na značajno smanjenu sposobnost antioksidacijskog mehanizma obrane. Iako je antioksidacijski obrambeni sustav složen i sastoji se od više komponenti koje djeluju na raznim mjestima i protiv različitih vrsta slobodnih radikala, dugotrajna izloženost oksidacijskom stresu s vremenom dovodi do iscrpljenja, odnosno potrošnje antioksidansa. Određivanje ukupnog antioksidacijskog sustava obrane koristan je laboratorijski pokazatelj postojanja oksidacijskog stresa, odnosno funkcionalne sposobnosti obrambenog sustava.

S-06/4

ANTIOKSIDANSI I HEMODIJALIZA

The Antioxidants in Hemodialysis

¹Salamunić I, ²Juretić D.

¹Odjel za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Split, Split. ²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku biokemiiju i hematologiju, Zagreb

Kroničnu bolest bubrega često prate i brojne komplikacije kao što su aterosklerozna bolesti srca, polineuropatije i amiloidoza. Nastanak komplika-

cija se može povezati i s povećanim stvaranjem slobodnih radikala. Različita ispitivanja ukazuju da je hemodijaliza (HD), postupak liječenja bolesnika s kroničnim zatajenjem (KZB), usko povezana s oksidacijskim stresom. Oksidacijski stres nastaje zbog povećanog stvaranja slobodnih radikala i oksidansa ili smanjenja količine i/ili aktivnosti činitelja antioksidacijskog sustava. Unatoč različitim tvrdnjama prevladava stav da je u bolesnika s KZB koji se liječe HD izražen oksidacijski stres, i da je sadržaj antioksidansa kod uremičnih bolesnika značajnije niži u odnosu na zdravu populaciju. Rezultati naših ispitivanja staničnih i izvanstaničnih antioksidansa u bolesnika s KZB pokazali su da se antioksidacijski kapacitet u eritrocitima i krvnoj tekućini mijenja tijekom HD. Katalitička koncentracija superoksid dismutaze u eritrocitima prije HD je povećana u odnosu na kontrolnu skupinu (KS), dok se vrijednosti nakon HD približavaju vrijednostima KS. Katalitička koncentracija glutation peroksidaze u eritrocitima smanjena je u odnosu na KS prije i poslije HD. Promjene koncentracija preventivnih antioksidansa, transferina, ceruloplazmina, haptoglobina i hemopeksina različite su u odnosu na KS prije i poslije HD. Koncentracije albumina, mokraće kiseline i bilirubina su različite u odnosu na KS kako prije tako i poslije HD. U kontaktu krvi i dijalizne membrane dolazi do različitih medureakcija: adhezija, agregacija i aktivacija stanica, transformacija proteina i slično. Različite vrste membrane mogu utjecati na promjenu aktivnosti antioksidansa, prvenstveno na stanične, iako tijek promjene pojedinog antioksidansa ostaje isti u odnosu na određivanja prije i poslije HD. Imajući u vidu da se bolesnici s KZB dijaliziraju godinama i da se za dijalizu koriste različite vrste membrane dokazana neravnoteža u sustavu oksidansi-antioksidansi može dovesti do oštećenja staničnih membrana, što dovodi do poremećaja u funkciji stanice i poremećenoj fluidnosti membrane. Upravo dva očigledna stanja u tih bolesnika su anemija i ateroskleroza koje mogu nastati i zbog promjena u svojstvima membrane eritrocita, odnosno stijenki krvnih žila.

S-06/5

ANTI-GANGLIOZIDNA I ANTI-MAG PROTUTIJELE U BOLESTIMA PERIFERNIH ŽIVACA

Anti-Gangliozide and Anti-MAG Antibodies in Peripheral Nerve Diseases

Trbojević-Ćepe M.

Zavod za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Bolesti perifernih živaca (neuropatije) po etiologiji mogu biti nasljedne, metaboličke, toksične, neoplastične, upalne i autoimune, često sa sličnim kliničkim simptomima. Različiti neuropatiski sindromi imaju različite prognoze i zahtijevaju različiti medicinski i terapijski postupak. Autoimune neuropatije su često povezane s prisutnošću protutijela (At) na takozvane "mijelinske antigene" (gangliozide, mijelinu pridruženog glikoproteina (MAG) i dr.). Samoj bolesti je često prethodila infekcija određenim virusima i bakterijama ili je dokazana prisutnost monoklonske gamapatije. Autoimuna reakcija u kojoj se oštećuju periferni živi najvjerojatnije je potaknuta unakrsnom antigeničnošću između epitopa na zaraznim klicama ili malignim stanicama i živčanim stanicama domaćina.

Svrha rada bilo je, odrediti titar anti-gangliozidnih i anti-MAG At u skupini neuroloških bolesnika s akutnim (n=22) i sporo progresirajućim (N=44) mono- i polineuropatijama. Procijeniti također vrijednost navedenih određivanja u diferencijalnoj dijagnostici različitih neuropatiskih sindroma.

Korišteni su komercijalni EIA testovi (Bühlmann Laboratories AG, Ch), Anti-GM1 i anti-GD1b (IgG/IgM), anti-MAG (IgM).

Umjereni do visoki titrovi anti-gangliozidnih At dokazani su kod multifokalnih motornih neuropatija s blokom provodljivosti (MMN), a niski do umjereni titrovi kod bolesti donjeg motornog neurona (LDMN), te akutnih i kroničnih upalnih polineuropatija (Guillain-Barréov sindrom, CDIP i dr.). Također je potvrđena povezanost između nalaza monoklonskih (anti-MAG) gamapatija i progresivne slabosti donjih ekstremiteta.

Autoimune neuropatije su uglavnom izlječive bolesti, stoga ih je vrlo važno razlikovati od niza neurodegenerativnih bolesti nepoznate etiologije. Srednji/visoki titrovi anti-gangliozidnih At ukazuju na upalnu/autoimunu patogenezu neuropatije (primjerice, MMN, LDMN ili CDIP) i uglavnom isključuju dijagnozu amiotrofične lateralne skleroze (ALS), teške i neizlječive degenerativne neuropatije.

Sekcijska tema: S-07**Trombofilna stanja: laboratorijska dijagnostika i kontrola terapije****Thrombophilic Status: Laboratory Diagnostics and Therapy Control****S-07/1****TESTS FOR HEREDITARY THROMBOPHILIA: WHICH? HOW? WHOM? WHEN?**

**Testovi za nasljednu trombofiliju: koji?
kako? komu? kada?**

Stegnar M.

University Medical Centre, Department of Angiology,
Ljubljana, Slovenia

Venous thrombosis is a serious health problem with an incidence of approximately 1 : 1 000 adults per year. It is associated with several conditions or risk factors such as surgery and trauma, immobilisation, pregnancy and delivery, and with the use of oral contraceptive pills. Familial clustering of venous thrombosis suggests also genetic causes for its development. Patients with inherited defects which increase risk for venous thrombosis, i.e. with inherited thrombophilia, are at greater risk for thrombosis in association with risk factors for thrombosis. Therefore, it is reasonable to detect patients with inherited thrombophilia and to recommend measures for thrombosis prevention. The first line of tests for laboratory diagnosis of inherited defects involved in the pathogenesis of thrombosis should include the most prevalent ones (resistance to activated protein C, G20210A polymorphism in the prothrombin gene) and those strongly associated with thrombosis (antithrombin III activity, protein C activity and free protein S antigen).

If resistance to protein C is established, gene analysis for factor V R506Q would confirm the diagnosis. If no defects are detected with this first line of tests, laboratory diagnosis could be expanded to determination of fibrinogen, thrombin time, plasminogen, heparin cofactor II, and measurement of homocysteine concentration. Lupus anticoagulants are also frequently determined although this condition is acquired and not inherited. Tests for fibrinolysis are usually not performed, because at present these tests are not useful in evaluation of risk for thrombosis in individual patient.

Tests for hereditary thrombophilia are performed in patients with venous thrombosis, espe-

cially in young patients, in those with recurrent thrombosis, in patients with strong familial history of thrombosis and in patients with thrombosis at unusual sites. If possible also first degree relatives are investigated, especially if thrombophilic defect is detected in the patient. Laboratory testing is not performed during acute thrombotic event, because several hemostatic factors are altered and such results are difficult to interpret. Testing is also not performed during anticoagulant treatment which decreases antithrombin III, or during coumarin treatment which decreases protein C and S. It is recommended that a test for thrombophilia should be performed at least ten days after termination of anticoagulant treatment. Assessment of resistance to activated protein C before introduction of oral contraceptive pills, before surgery or hospitalisation is at present not recommended because of high costs for such testing.

S-07/2**MOLEKULARNA OSNOVA TROMBOFILIIJE****Molecular Genetics of Thrombophilia****Zadro R.**

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Trombofilija je klinički naziv za stanje povećane sklonosti trombozi. Tromboza može biti arterijska i venska, urođena i stečena ili kombiniranog tipa, a posljedica je poremećene ravnoteže između regulacijskih proteina zgrušavanja i fibrinolize. Pored stečenih čimbenika rizika (operacijski zahvat, trudnoća, imobilizacija itd.) zadnjih godina postalo je očito da su genetski čimbenici važni u patogenezi bolesti jer se tromboza često pojavljuje među članovima iste obitelji. Tako je danas poznato da mutacije u genima koji kodiraju pojedine regulacijske proteine zgrušavanja i fibrinolize dovode do promijenjene strukture i funkcije tih proteina.

Nasljedna trombofilija donedavno se smatrala posljedicom poremećaja jednog gena jer su pore-

mećaji gena koji uzrokuju nedostatak proteina C, proteina S ili antitrombina otkriveni u obiteljima s nasljednom trombofilijom. Tako je do 1992. godine laboratorijsko ispitivanje nasljedne trombofilije bilo ograničeno na mjerjenje razine antitrombina, proteina C i proteina S. Nedostatak tih proteina nadan je u svega 5-10% ispitivanih slučajeva. U zadnjih 5 godina toj skupini nasljednih čimbenika priključeni su FV Leiden, hiperhomocisteinemija i FII 20210A kojima se objašnjava oko 60% obiteljskih trombofilija.

Godine 1993. opisana je rezistencija na aktivirani protein C (APC rezistencija) za koju se danas zna da je najčešći uzrok obiteljske trombofilije. U većini slučajeva APC rezistencija je rezultat točkaste mutacije u genu za faktor V, tj. faktor V Leiden. Zamjena arginina glutaminom na položaju 506 dovodi do rezistencije na proteolitičko cijepanje aktiviranim proteinom C. Faktor V Leiden nasljeđuje se autosomno dominantnim putem. Javlja se kod 3-7% bijelaca, kod 20% bolesnika s venskom trombozom i kod 50% članova izabranih obitelji s trombofilijom. Relativni rizik od venske tromboze kod heterozigota je 5-7 puta veći, a kod homozigota 80 puta veći nego u općoj populaciji. Apsolutni rizik veći je u prisutnosti stečenih čimbenika kao što su trudnoća, imobilizacija, operacijski zahvat ili uporaba oralnih kontraceptiva.

Takoder je utvrđeno da je hiperhomocisteinemija rizični faktor za vensku i arterijsku trombozu. Hiperhomocisteinemija može biti uzrokovana nasljednim nedostatkom jednog od enzima u metabolizmu metionina ili nedostatkom kofaktora (folna kiselina, vitamini B6 i B12). Iako je veza između hiperhomocisteinemije i povećanog rizika za arterijsku trombozu otvorena poznata, u zadnjih nekoliko godina došlo se do saznanja o ulozi hiperhomocisteinemije u venskoj trombozi. Umjereno povišene vrijednosti nadene su kod 10% bolesnika s prvom epizodom venske tromboze kao i skupini bolesnika s ponovljenim epizodama venske tromboze.

Poort i suradnici su 1996. godine objavili da je zamjena guanina adeninom na položaju 20210 na 3' kraju dijela gena za protrombin koji se ne prepisuje povezana s povišenim aktivnostima protrombina i povećanim rizikom za vensku trombozu.

Drugi nasljedni poremećaji koji su opisani su ili rijetki ili nije dokazana čvrsta povezanost, a uključuju promjene u genu za trombomodulin, povišene koncentracije fibrinogena, FVIII, FXII, fibrinolitički sustav (plazminogen, aktivator tkivnog plazminogena, inhibitor aktivatora plazminogena), glikoprotein bogat histidinom, heparinski kofaktor II.

Danas se zna da je nasljedna trombofilija složen genetski poremećaj uzrokovani segregacijom dvaju ili više promijenjenih gena (poznatih ili nepoznatih) u jednoj obitelji i da kliničko očitanje tromboze zahtjeva prisutnost više genetskih ili stečenih uzroka ili kombinacije istih. Prisutnost više poremećaja povećava rizik tromboze i zahtjeva iscrpno pretraživanje i ustanovljavanje uzročnika trombofilije.

S-07/3

TESTOVI PROBIRANJA U TROMBOFILNIH BOLESNIKA Screening Tests in Thrombophilic Patients

¹Kos B, ²Lenz B.

¹Odjel za medicinsku biokemiiju Kliničke bolnice Osijek, Osijek. ²Zavod za transfuzijsku medicinu Kliničke bolnice Osijek, Osijek

Trombofilija bi se mogla definirati kao "familijarni ili stečeni poremećaj hemostaze koji vodi u trombozu".

Glavni trombofilni testovi probiranja u određivanju nasljednog poremećaja hemostaze su: faktor V Leiden, antitrombin III, protein C, protein S, fibrinogen, hiperhomocisteinemija, a kod stečenih poremećaja su antifosfolipidna protutijela i hiperhomocisteinemija.

Mogućnost korištenja tih testova trebala bi se izvoditi u specijaliziranim laboratorijima.

Od preliminarnih testova hemostaze treba učiniti PV, aPTV, TV, fibrinogen te procjenu fibrinolitičkog sustava (plazminogen, FDP, D-dimere).

Prikaz slučaja:

Bolesnik P.J., muškarac, 27 god. Liječen pod dijagnozom: Febris e causa ignota, Ileus paralyticus, Embolia pulmonum, Phlebothrombosis v. femoralis sin.

U testovima hemostaze AT III 40%, protein C 62%, fibrinogen 4.7g/L, D-dimeri 2000-4000. Liječen je visokim dozama heparina, Kybernitom (AT III) u ponavljanim bolus dozama i nakon 10 dana tog tretmana preveden u peroralnu antikoagulacijsku terapiju. Nakon akutne epizode tromboze određivani su nasljedni trombofilni testovi probiranja koji su normalni (FVL, AT III, Protein C, hiperhomocisteinemija). Potvrđeno je stoga da se radi o stečenoj trombofiliji kao rezultat upalnog stanja.

S-07/4

**ANTIFOSFOLIPIDNA PROTUTIJEVA
(LUPUS ANTIKOAGULANT)**

Antiphospholipid Antibodies (Lupus Anti-coagulant)

Bernt T.

Zavod za kliničku biokemiju i biologiju reprodukcije Klinike za ženske bolesti i porode Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Veza između antifosfolipidnih protutijela (aPL) i povećane sklonosti trombozi, učestalom spontanom pobačajima i trombocitopeniji definira se kao sindrom antifosfolipidnih protutijela (APS). Iako je ta veza uočena prvi put u osoba sa sistemskim lupusom (sekundarni APS), danas su aPL protutijela dokazana i u "zdravih" osoba bez znakova autoimunih oboljenja (primarni APS).

Usprkos čitavog niza istraživanja u zadnjih desetak godina još do sada nisu jasni patogeni mehanizmi koji doprinose razvoju tromboze u osoba s pozitivnim aPL protutijelima, odnosno lupus antikoagulantom i antikardiolipin protutijelima kao najčešće izvedenim testovima. APL protutijela su heterogena skupina protutijela P za koje se smatralo donedavno da se vežu na anionske fosfolipide. Iako odgovarajući epitop još nije do kraja definiran, zadnjih godina se pretpostavlja da se vežu na kompleksne antigene sastavljene od proteina plazme koji su vezani na odgovarajuću fosfolipidnu površinu. Najpoznatiji proteini koji vežu fosfolipide odnosno antigeni su beta 2-GPI protrombin kao i protein C, protein S, trombomodulin i aneksin V. Upravo zbog široke biološke heterogenosti aPL protutijela postoje brojne nejasnoće u razumijevanju antifosfolipidnog sindroma. Lupus antikoagulanti su skupina imunoglobulina koja in vitro produžuju testove koagulacije ovisne o fosfolipidima, a bez izravnog su utjecaja na same čimbenike zgrušavanja. Do danas ne postoji jedinstveno prihvaćeno mišljenje o načinu prokoagulačkog djelovanja lupus antikoagulanta, odnosno antifosfolipidnih protutijela. Vidljivo je da određivanje lupus antikoagulanta, odnosno antifosfolipidnih protutijela predstavlja značajan problem kako za kliničare, tako i za laboratorijsku dijagnostiku. Stoga bi daljnja istraživanja trebalo usmjeriti na standardizaciju testova kojima se selektivno identificiraju aPL protutijela. Osim to-

ga ne postoji niti opće prihvaćena terapija tromboembolijskih komplikacija u osoba s APS, što ukazuje da i klinička istraživanja treba usmjeriti u pronalažanje najučinkovitijeg liječenja ovoga sindroma.

S-07/5

**THROMBOEMBOLIC COMPLICATIONS
ASSOCIATED WITH THE PROTHROMBIN
COMPLEX CONCENTRATES**

Tromboembolijske komplikacije povezane s koncentratima protrombinskog kompleksa

**¹Josic Dj, ²Hellstern P, ³Klöcking HP,
¹Schwinn H.**

¹Octapharma, Vienna, Austria. ²Klinik Ludwigshafen, Ludwigshafen, Germany. ³Klinik FSU Jena, Erfurt, Germany

Prothrombin complex concentrates (PCCs) contain the plasma derived clotting factors II, VII, IX and X as well as Protein Z and the inhibitors Protein C and S. They are used primarily in cases of acquired disorders in hemostasis. The PCCs containing primarily the plasma derived clotting factors II, IX and X have been mainly used for treatment of hemophilia B. They are now being replaced by highly purified concentrates of factor IX.

The PCCs have been associated with thromboembolic complications, including myocardial infarction and disseminated intravascular coagulation (DIC). Thrombogenicity of such concentrates has chiefly been attributed to activated clotting factors or procoagulant phospholipid. The methods prescribed in the European Pharmacopoeia for assessing the thrombogenicity of PCC, nonactivated partial thromboplastin (CNAPTr) and thrombin fibrinogen clotting time (TFCT), are rather poor predictors of in vivo events in man. Therefore PCCs continue to carry the risk of inducing thrombosis or DIC. This has been confirmed by several cases of fatal thrombosis complications, which occurred after infusion of PCCs.

In this paper factors are discussed that may be involved in thromboembolic complications, following the use of PCCs. Measures are suggested which are likely to reduce thrombogenicity to a minimum.

Sekcijska tema: 02
Lijekovi i farmakogenetika
Drugs and Pharmacogenetics

02/P1

**DETEKCIJA DROGA U MOKRAĆI
KVALITATIVNOM I KVANTITATIVNOM
METODOM**

Detection of Narcotics in Urine by Qualitative and Quantitative Method

¹Blazinić F, ¹Cesar I, ¹Dragoje I,
²Samoščanec K, ²Topić E.

¹Psihijatrijska bolnica Vrapče, Zagreb, ²Klinički zavod za kemijsku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Pretraživanje uzoraka mokraće na kanabinoidi i opijate, čija je zloupotraža najčešća i u našoj populaciji, provedeno je kvalitativnom metodom s pomoću brzih testova koji se temelje na imuno-loskoj reakciji i vizualnom očitavanju. U svakom uzorku s pozitivnom reakcijom na određenu drogu koncentracija droge je mjerena fluoroimunopolarizacijskom metodom (FPIA).

U 300 uzoraka mokraće ispitanih Frontline test-trakama pozitivna reakcija na kanabinoidne dobivena je u 35 uzoraka (11,6%). Od toga, u 25 uzoraka (71,1%) koncentracija kanabinoida bila je >50 ng/ml. U istom uzorku pozitivan nalaz opijata nadjen je u 30 uzoraka (10%), a koncentracija >300 ng/ml nadena je u 20 uzoraka (66,6%).

900 uzoraka mokraće testirano je Insta Test One Step (Cortez Diagnostics) test pločicama, također na kanabinoidne i opijate. Pozitivan nalaz kanabinoida nadjen je u 227 (25,2%) uzoraka, a od toga je FPIA metodom potvrđen pozitivan nalaz (>50 ng/ml) u 173 uzorka (76,2%). Pozitivan nalaz opijata nadjen je u 110 (12,2%) uzoraka mokraće, a od toga je FPIA metodom potvrđen nalaz (>300 ng/ml) u 81 uzorku (73,6%).

Rezultati pokazuju da pretraživanje droga u mokraći brzim testovima ima opravdanja iz ekonomskih razloga, međutim svaki pozitivni test valja provjeriti pouzdanim metodom (FPIA, GCMS, HPLC).

02/P2

**USPOREDBA FPIA I EIA METODA ZA
MJERENJE OPIJATA I KANABINOIDA U
MOKRAĆI**

**Comparison of FPIA and EIA Methods for
Urinary Determination of Opiates and
Cannabinoids**

Lovrić M, Bilić A, Granić P.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Usporedeni su rezultati mjerenja opijata i kanabinoida testovima koji koriste fluoroimunonefmijsku polarizacijsku metodu (FPIA) na TDx/FLx analizatoru tvrtke Abbott i enzimimunokemijsku metodu (EIA) na analizatoru Olympus AU 600. FPIA metoda koristi kalibracijsku krivulju od 6 kalibratora (opijati 0-1000 ng/ml i kanabinoidi 0-150 ng/ml) i dobivena koncentracija se izdaje kao numerička vrijednost. EIA metoda koristi graničnu (cut-off) vrijednost (opijati 300 ng/ml i kanabinoidi 50 ng/ml), a dobiveni rezultat se izdaje kao pozitivan ili negativan. Uzorci mokraće koji su pristigli u naš laboratorij sa zahtjevom za mjerenje opijata i kanabinoida analizirani su jednom i drugom metodom. Ukupno je analizirano 75 uzorka mokraće. Dobivena je podudarnost rezultata opijata i kanabinoida koji su bili iznad granične

vrijednosti EIA metode s rezultatima dobivenim FPIA metodom. Rezultati opijata od 200-300 ng/ml i kanabinoida u području od 25-50 ng/ml su bili pozitivni mjerjenjem FPIA metodom (zbog niže granične vrijednosti), dok su isti bili negativni mjerjenjem EIA metodom. Ispitana je i osjetljivost EIA metode u graničnom području na 4 uzorka u 10 opetovanih mjerjenja i pokazano je da je EIA metoda osjetljiva u graničnom području.

02/P3

OPIJATI, KANABINOIDI: USPOREDBA TRIJU IMUNOKEMIJSKIH METODA**Opates and Cannabinoids: Comparison of Three Immunochemical Methods**

Predovan G.

Centralni laboratorij Opće bolnice, Zadar

U našem se laboratoriju pretrage na sredstva ovisnosti rade već 5 godina. Počeli smo na TDxFLx-u (semikvantitativna, imunokemijska metoda), a danas imamo još dvije kvalitativne imunokemijske metode (Olympus AU 600 i trake tvrtke Syva). One nam služe za isključivanje negativnih rezultata. Pozitivne i suspektne rezultate provjeravamo na TDxFLx-u. U vremenu od 1. 10. 1998. god. do 15. 5. 1999. god. analizirano je oko 300 uzoraka mokrače na 1-7 parametara. Nakon 70 uzoraka mokrače analiziranih paralelno s 2-3 metode za opijate odlučili smo da su kvalitativne metode dovoljno pouzdane za isključivanje negativnih rezultata. Nakon stečenih iskustava s opijatima napravili smo samo 30 uzoraka mokrače s 2-3 metode za kanabinoide i odlučili isto kao kod opijata, tj. da više ne moramo provjeravati negativne rezultate. Kod kanabinoida smo imali jasnu situaciju: svi pozitivni rezultati s Olympus-a ili trake potvrđeni su i na TDx-u. Kod opijata smo imali drugačiju situaciju: manji broj pozitivnih rezultata s Olympus-a ili trake nije se potvrdio kao pozitivan na TDx-u. Na TDx-u smo dobili vrijednosti koje padaju u područje između vrijednosti za osjetljivost testa i graničnih vrijednosti (cut-off), tj. u ono područje koje smatramo "tragom". Olympus reagens i trake ne uzrokuju problem s MXBKG parametrom kao TDx, tj. takve smo mokrače potvrđivali kao negativne.

02/P4

UPORABA DROGA PROCIJENJENA TESTOVIMA PROBIRANJA U RAZDOBLJU OD 1994. DO 1998. GODINE**Drug Abuse Assessed by Screening Tests During the 1994-1998 Period**

Lovrić M, Granić P, Stavljenić-Rukavina A.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Učestala uporaba droga, osobito među mladim stanovništvom, sve više postaje značajan društveni problem. Nema sasvim pouzdanih podataka o uzimanju pojedinih sredstava ovisnosti, a podaci zdravstvenih ustanova ukazuju samo na broj osoba lječenih zbog predoziranja. Prikazani rezultati toksikološkog probiranja obuhvaćaju razdoblje zadnjih 5 godina (1994.-1998.).

Uzorci su analizirani testom općeg probiranja tankoslojnom kromatografijom (TOXI-LAB), a pozitivni nalazi analizirani su ciljanim probiranjem semikvantitativno na TDx analizatoru koji koristi FPIA tehnologiju. Svaki pozitivan nalaz potrebno je potvrditi (HPLC, GC-MS). Obradom rezultata u razdoblju od 1994. do 1998. godine zapažen je značajan porast ukupnih analiza toksikološkog probiranja (za 116%), a značajno je povećan broj pozitivnih nalaza droga (od 4,1 do 12,1%). U 1994. godini zapaženo je učestalije korištenje kanabinoida i opijata, dok se u 1997. i 1998. godini uz spomenute droge koriste amfetamini i metadon.

02/P5

LABORATORIJSKO PRAĆENJE NEMEDICINSKE UPORABE DROGA I LIJEKOVA**Laboratory Follow-up of Non-Medical Use of Drugs and Narcotics**

Fišić E, Bilić-Zulle L, Matica J, Aralica M, Dvornik Š.

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka

Opojne droge su prirodne ili sintetske tvari koje djeluju na središnji živčani sustav, a dužom uporabom izazivaju psihičku i fizičku ovisnost. Opojne droge obuhvaćaju narkotike u užem smislu.

slu (npr. opijati), depresore središnjeg živčanog sustava (npr. barbiturati), centralne ekscitatore (npr. kokain), psihotonike (npr. amfetamin), sedative (npr. meprobamat) i halucinogene (npr. kanabis). Cilj rada je prikazati naše rezultate laboratorijskog praćenja zloupotreba droga i lijekova s obzirom na njihovu vrstu i učestalost u trogodišnjem razdoblju (1996.-1999. god.), od kako smo uveli ove analize za bolničke potrebe. Obradili smo 196 slučajeva zlouporabe droga i lijekova. Ispitanici su bile osobe od 15 do 32 godine. Odredivali smo koncentracije amfetamin/metamfetamina, barbiturata, kokaina, kanabinoida, opijata, benzodiazepina i metadona u mokraći metodom FPIA na analizatoru TDX (Abbott).

Od ukupnog broja određivanja najveći postotak odnosio se na benzodiazepine (42%), slijede kanabinoidi (19%), opijati (15%), amfetamin/metamfetamin (8%), barbiturati (7%), metadon (5%) i kokain (4%). Kod određivanja benzodiazepina uočen je najveći broj pozitivnih rezultata (47%), dok je najmanje pozitivnih rezultata dobiveno pri određivanju kokaina (4,8%).

Prema našim rezultatima u nemedicinskoj uporabi droga najviše su korišteni benzodiazepini i kanabinoidi, što se može objasniti njihovom relativno lakom dostupnošću.

su dva ili više puta tijekom 15 mjeseci proveli laboratorijsku kontrolu terapije valproičnom kiselinom.

Rezultati ispitivanja pokazali su da se vrijednosti valproične kiseline za veći dio ispitanika (85,8%) nalaze unutar terapijskog raspona (346-693 $\mu\text{mol/L}$), dok manji dio ispitanika (14,2%) ima vrijednosti niže od terapijskog raspona. Izmjerene vrijednosti AST, ALT, GGT i ureje nalaze se unutar referentnih vrijednosti. Vrijednosti amonijaka između dječaka i djevojčica ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p=0,075$) i u 89,3% slučajeva nalaze se u referentnom rasponu. U 10,7% slučajeva dobivene vrijednosti amonijaka ($sv=69,2 \pm 13,4 \mu\text{mol/L}$) više su od referentnog raspona ($m=14,7-55,3 \mu\text{mol/L}$; $z=11,8-48,2 \mu\text{mol/L}$).

U skupini bolesnika koji su se više puta tijekom određenog vremena ponavljali vrijednosti valproične kiseline ne pokazuju ($p=0,121$) statistički značajnu razliku ($p=0,012$) i obično su u korelaciji s koncentracijom valproične kiseline.

Dobiveni rezultati pokazuju da uporaba valproične kiseline dovodi do porasta vrijednosti amonijaka uz referentne vrijednosti ostalih mjernih parametara. S obzirom na povezanost koncentracije valproične kiseline i vrijednosti amonijaka preporuča se redovita kontrola terapijskog raspona lijeka.

02/P6

VRIJEDNOSTI AMONIJAKA U DJECE S EPILEPSIJOM LIJEĆENE VALPROIČNOM KISELINOM

Ammonia Values in Epileptic Children Treated by Valproic Acid

Trogrlić M, Honović L, Bangov-Balić J.

Centralni laboratorij Opće bolnice, Pula

Valproična kiselina je lijek iz skupine antiepileptika koji se često rabi u liječenju širokog spektra konvulzija u dječjoj dobi. Uporaba ovog lijeka, osim gastrointestinalnih nuspojava, dovodi često i do jetrene disfunkcije najčešće povezane uz metabolizmom karnitina i amonijaka.

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj valproične kiseline na vrijednost amonijaka i nekih biokemijskih parametara (AST, ALT, GGT, ureja) koji ukazuju na funkciju jetre.

Skupinu ispitanika činilo je 84 bolesnika dječje dobi (do 12 godina). Skupina je podijeljena prema spolu, te unutar te podjele na one bolesnike koji

02/P7

PRIMJENA GC-MS U DETEKCIJI SREDSTAVA INTOXIKACIJE

Application of GC-MS as an Intoxication Detection Method

¹Samošćanec K, ²Blazinić F.

¹Klinički Zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

²Psihijatrijska bolnica Vrapče, Zagreb

Kvalitativna i kvantitativna analiza biološkog uzorka potvrđuje prisutnost sredstva ovisnosti, a prisutnost metabolita ukazuje da je organizam apsorbirao sredstvo. Prvi korak u pretraživanju uzorka uključuje testove probiranja (enzimimuno metoda EMIT, radioimuno metoda RIA, metoda fluorescentne polarizacije FPIA). Pozitivni rezultat testova probiranja treba potvrditi mnogo specifičnijom i osjetljivijom metodom. Takvom se smatra plinska kromatografija/masena spektrometrija (GC/MS).

Plinska kromatografija/masena spektrometrija (GC/MS) spaja visoku sposobnost razdvajanja

plinskog kromatografa s visokom osjetljivošću i specifičnošću masene spektrometrije. Način mjenjenja GC/MS ovisi o vrsti pretrage i najmanjoj koncentraciji droge koja čini identifikaciju pozitivnom. Za probiranje nepoznatog sredstva intoksikacije najbolji način je praćenje svih iona u uzorku (total ion monitoring, TIM) koji pruža potpuni maseni spektar iona. Nepoznato sredstvo intoksikacije identificira se automatskim probiranjem prema bazi podataka. Program usporeduje masene spektre droge sa spektrima pohranjenim u bazi podataka. Za prepoznavanje neophodna je podudarnost u tri glavna iona.

Ako je poznato da je sredstvo intoksikacije prisutno u vrlo niskoj koncentraciji, koristi se tehnika praćenja odabralih iona (selected ion monitoring, SIM) kojom spektrometar prati samo određene, karakteristične ione u uzorku. SIM tehnika značajno povećava osjetljivost, ali i smanjuje specifičnost identifikacije uzorka.

U cilju poboljšanja pretrage prije same plinske kromatografije preporuča se derivatizacija uzorka koja, iako produžuje vrijeme analize kao i cijenu rada, ima niz prednosti. Derivatizacija povećava specifičnost, osjetljivost, preciznost i linearnost određivanja, te smanjuje mogućnost pogreške tijekom identifikacije.

02/P8

PROVJERA TOKSIČNOSTI BILJNOG PRIPRAVKA "FERO-LEKO ANTIDIJABETIS"

Toxicity Assessment of the Herbal Preparation "Fero-Leko Antidiabetis"

¹Petlevski R, ²Hadžija M, ³Slijepčević M,
²Vuković L, ¹Juretić D.

Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku biokemijsku i hematologiju, Zagreb.

¹Institut "Ruder Bošković", Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb

Biljni pripravak "Fero-Leko Antidiabetis" zaštićen patentom pod brojem P-9801091 Zagreb, Hrvatska, dobiven je ekstrakcijom u etilnom alkoholu, zatim ishlapljivanjem alkohola te liofilizacijom iz sljedećih biljnih droga: Centaurii herba, Cichorii herba, Juniperi fructus, Millefolii herba, Myrtilli Folium, Phaseoli pericarpium, Taraxaci radix, Urticae herba, Urticae radix, Valeriane radix, Mori folium.

Hipoglikemijski učinak biljnog pripravka "Fero-Leko Antidiabetis" utvrđen je u dijabetičnih

CBA miševa tijekom šestomjesečnog tretmana *per os* u dozi od 0,7-1,0 mg/25 g miša. Dijabetes je izazvan 0,5% aloksanom u dozi od 75 mg/kg tjelesne težine miša.

U svrhu provjere eventualne hepatotoksičnosti ovoga biljnog pripravka u kontrolnoj, zdravoj skupini CBA miševa i skupini zdravih CBA miševa tretiranih tim biljnim pripravkom određivana je katalitička koncentracija ukupne glutation S-transferaze (GST) u jetri te aspartat aminotransferaze (AST) i alanin aminotransferaze (ALT) u serumu. U svrhu provjere eventualne nefrotoksičnosti određivana je koncentracija ureje i kreatinina u serumu te je napravljen histološki pregled jetre i bubrega.

Rezultati nisu pokazali statistički značajnih razlika između ove dvije skupine glede katalitičke koncentracije GST u jetri, AST i ALT u serumu te koncentracije ureje i kreatinina u serumu.

Na mikrofotografijama parenhima jetre i bubrega nisu uočene lezije ili nekroza jetrenog i bubrežnog parenhima.

Dobiveni rezultati pokazuju, uz hipoglikemijski učinak, netoksičnost biljnog pripravka "Fero-Leko Antidiabetis".

02/P9

ISPITIVANJE BIOLOŠKE EKVIVALENCIJE PRIPRAVAKA ACIKLOVIRA NA ZDRAVIM DRAGOVOLJCIMA

Examination of Biologic Equivalence of Acyclovir Preparations on Healthy Volunteers

Lalić Z, Wolf-Ćoporda A, Lovrić Z, Macolić-Sarinić V, Bilušić M.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Zavod za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

U križanom i randomiziranom pokusu na 25 zdravih dragovoljaca muškog spola ispitana je biološka ekvivalencija 2 oralna pripravka aciklovira (Aciklovir prizvoda Belupo i Zovirax prizvođača Glaxo Wellcome), oba u dozi od 400 mg.

Ispitanici su prije pokusa detaljno internistički pregledani, funkcija organa važnih za farmakokinetiku aciklovira je provjerena nizom biokemijskih i hematoloških mjerjenja kako bi se iz pokusa moglo isključiti ispitanike kod kojih bi bolest ili poremećaj mogli utjecati na rezultate.

Uzorci krvi su ispitancima uzeti prije doze lijeka te 0,5, 1, 1,33, 1,67, 2, 2,33, 2,67, 3, 3,5, 4, 5, 6, 8, 12 i 24 sata nakon doze. Nakon odvajanja stanica, plazma je pohranjena u hladnjak na -21°C do određivanja koncentracije aciklovira tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC), uz detekciju mjerjenjem fluorescencije.

Za statističku usporedbu koncentracija u svim vremenskim razmacima nakon doze lijeka, vrijednosti vršnih koncentracija ($0,502 \pm 0,100$ mg/L, odnosno $0,509 \pm 0,201$ mg/L, $p < 0,05$), vremena do vršnih koncentracija ($1,48 \pm 0,25$ h, odnosno $1,39 \pm 0,42$ h, $p < 0,05$) i površina ispod koncentracijskih krivulja ($2,768 \pm 1,224$ mg.h/L, odnosno $2,871 \pm 0,936$ mg.h/L, $p < 0,01$), korištena je analiza variancije.

Ispitani i referentni pripravci ne pokazuju statistički značajne razlike u osnovnim čimbenicima biološke jednakovaljanosti (vršne koncentracije, vremena do vršnih koncentracija i površine ispod koncentracijskih krivulja).

Koncentracije pripravaka u fazi eliminacije gotovo su identične.

Na osnovu navedenih rezultata unatoč velikih interindividualnih razlika među ispitanicima može se zaključiti da su ispitivani pripravci bioekivalentni.

02/P10

GENOTIPIZACIJA CITOKROMA P-450 CYP2D6 U BOLESNIKA NA TERAPIJI PSIHOAKTIVNIM LIJEKOVIMA

Cytochrome P-450 CYP2D6 Genotyping in Patients on Psychoactive Drug Therapy

¹Topić E, ¹Štefanović M, ¹Ivanisević AM,
²Blazinić F, ²Čulav J, ²Škočilić Ž.

¹Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb.

²Psihijatrijska klinika Vrapče, Zagreb

U oksidacijskom metabolizmu velikog dijela psihotaktivnih lijekova značajnu ulogu ima polimorfni izoenzim CYP2D6. Njegovih šest mutantnih alela (null aleli *3, *4, *5, *6, *7, i *8) kodiraju neaktivne enzimske molekule. Nosilac dva mutantna alela predstavlja sporometabolizirajući (poor metabolizer, PM) fenotip dok se nosilac samo jednog oštećenog alela smatra srednjemetabolizirajući (intermediate metabolizer, IM) fenotip. Prepoznavanje bolesnika s inaktivnim varijantama

CYP2D6 omogućuje sigurniji odabir lijeka i uspješnije liječenje.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učestalost null alela u skupini zdravih (n=64) i u skupini psihiatrijskih bolesnika (n=68) metodom multipleks alel specifične PCR. U kontrolnoj skupini nadjeni su mutantni aleli 2D6 *3 (1,6%), *4 (14,1%) i *6 (0,8%), dok su u skupini bolesnika nadjeni samo 2D6 *4 (19,9%) i *6 (3,7%) aleli, ($\chi^2 p=0,025$). U skupini zadovoljavajućeg terapijskog odgovora (n=36) nadeno je 22,2% 2D6*4 alela i 4,2% 2D6*6 alela. Predvidivi fenotip pokazao je 36,1% IM i 8,3% PM. Statistički značajna razlika 2D6*4 alela (33,3%, $\chi^2 p=0,045$) i predvidivog fenotipa (33,3% IM i 16,7% PM, $\chi^2 p=0,002$) nadena je u skupini pojačano doziranih bolesnika (n=6). Skupina bolesnika s manjom dozom (n=12) pokazala je razliku prema zadovoljavajućem doziranju samo za predvidivi fenotip (50,0% IM i 0% PM, $\chi^2 p<0,001$) dok se frekvencije alela 2D6*4 (20,8%) i *6 (4,2%) nisu statistički značajno razlikovale.

02/P11

GENOTIPIZACIJA "NULL ALELA" CITOKROMA P450 CYP2D6 KOD BOLESNIKA S KARCINOMIMA GLAVE I VRATA S POMOĆU MULTIPLEX - ALEL SPECIFIČNE LANČANE REAKCIJE POLIMERAZE

Genotyping the Cytochrome P450 CYP2D6 Null Alleles in Head and Neck Cancer Patients by Multiplex Allele Specific PCR

¹Štefanović M, ¹Ivanisević AM, ¹Topić E,
²Čurčić L

¹Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb.

²Klinika za otorinolaringologiju Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti moguću povezanost genotipa Citokroma P-450 CYP2D6 i njegovih najčešćih "null alela" (CYP2D6*3, *4, *5, *6, *7 i *8) s učestalošću tumora glave i vrata (engl. Head and Neck Cancer - HNC). Poznato je da osobe s oba inaktivna alela slabo metaboliziraju mnoge učestalo propisivane lijekove, ali i neke karcinogene (sporometabolizirajući - engl. Poor metabolizer phenotype - PM). Nosioci samo jednog oštećenog alela (dok je drugi funkcionalan) smatraju se srednjemetabolizirajući (eng. Intermediate metabolizer phenotype - IM). Multiplex - alel specifičnom lančanom reakcijom polimeraze

genotipizirali smo 64 zdrave osobe i 39 bolesnika (HNC). Rezultati ispitivanja pokazali su da kod pronadjenih alela (3, *4 i *6) njihove frekvencije u zdravim iznose redom 1,6%, 14,1% i 0,8%. Među njima 4,7% ih je imalo PM, a 23,4% IM fenotip. U skupini bolesnika za pronadene alele *3 i *4 frekvencije su iznosile 2,8% i 19,4%, i u njoj nismo pronašli ni jednog nosioca PM fenotipa, no 44,4% ih je bilo IM fenotipa. Statistički obradeni rezultati pokazali su značajnu razliku za frekvencije genotipa (χ^2 test; $p=0,001$) kao i predviđeni fenotip (χ^2 test; $p=0,001$).

Na osnovu naših preliminarnih rezultata zaključujemo da PM fenotip pokazuje zaštitnu ulogu i vjerojatno slabijim metabolizmom pojedinih kancerogenih tvari daje svoj doprinos obrani od nastanka tumora glave i vrata.

je oko 7% među bijelcima, zahtijevaju više doze lijekova da bi dosegli terapijsku koncentraciju u plazmi. Te osobe često imaju alele s dvostrukim, ili u nekim slučajevima amplificiranim funkcionalnim CYP2D6 genima, koji uzrokuju prekomernu ekspresiju CYP2D6 enzima. Dijagnosticiranje takvog stanja pomaže da se izbjegne terapijski neuspjeh u UM kada se CYP2D6 supstrati propisuju u standardnim dozama.

U ovom radu željeli smo ustanoviti zastupljenost UM genotipa u Hrvatskoj. Analizirali smo 100 uzoraka genomske DNA iz krvi osoba koje koriste lijekove-supstrate CYP2D6 enzima. Primjenili smo Long-PCR metodu za detekciju alela s duplicitiranim CYP2D6 genima.

02/P12

DETEKCIJA UDVOSTRUČENIH CYP2D6 GENA LONG PCR METODOM

Detection of Doubled CYP2D6 Gene by Long PCR Method

¹Božina N, ¹Mikolji I, ¹Granić P, ¹Stavljeničić Rukavina A.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Citokrom P450 (CYP) enzim debrisokin 4-hidroksilaza kodiran genom CYP2D6 na kromosomu 22 metabolizira različite vrste lijekova kao što su triciklički antidepresivi, neuroleptici, selektivni serotonininski inhibitori, beta blokatori, antiaritmici i drugi. Enzim je izrazito polimorf. U bijelaca uz divlji gen (CYP2D6*1) istraženo je još petnaestak različitih alela CYP2D6 koji su povezani s nedostatnom, smanjenom, normalnom ili pojačanom enzimskom aktivnošću.

5-10% bijelaca pokazuju potpuni izostanak CYP2D6 enzimske aktivnosti zbog naslijeda dva mutantna CYP2D6 nul-alela. Te osobe imaju oslabljeni metabolizam CYP2D6 supstrata (navedenih lijekova). Liječenje standardnim dozama lijekova može dovesti do viših koncentracija lijekova u plazmi uz povećani rizik nuspojava i toksičnosti.

Na drugoj strani raspona metaboličkog kapaciteta je ultrabrzi metabolizam (UM) kao rezultat vrlo jake enzimske aktivnosti. Osobe s UM, kojih

02/P13

ANALIZA OTROVANJA OD 1995. DO 1997. U REPUBLICI HRVATSKOJ

Analysis of Poisoning During the 1995-1997 Period in Croatia

Lovrić Z, Plavšić F.

Hrvatski zavod za teksikologiju, Zagreb

U izvješću su analizirani podaci o primljenima u hrvatske bolnice zbog otrovanja kroz period 1995. do 1997. godine te podaci o umrliima zbog otrovanja tijekom 1997. godine. Godišnje se u bolnice prima oko 1.700 osoba zbog otrovanja. Izdvajaju se posebno podaci o visokoj učestalosti otrovanja djece dobi do 4 godine koji sudjeluju s 18% među primljenima u bolnice, a traju se lijekovima i kućnim kemikalijama. Druga posebna skupina odnosi se na dječake dobi 10-14 godina koji sudjeluju s 40% u svim otrovanjima alkoholom koja su liječena u bolnicama, a također se posebno ističe dobna skupina 15-30 godina zbog izrazito visoke učestalosti otrovanja sredstvima ovisnosti. Upozorava se i na relativno velik broj bolničkih dana po otrovanju te na činjenicu da dnevno u Hrvatskoj leži 40 otrovanih osoba. Podaci o smrtnosti posebno su značajni u odnosu na zastupljenost pojedinih otrova u dijagnozama. Tijekom 1997. godine umrlo je zbog otrovanja 141 osoba. Otrovanja ugljičnim monoksidom čine čak 22% od svih otrovanja sa smrtonosnim ishodom, a na drugom mjestu s 18,5% je heroin i to pretežno kod mladih žena. Ta dva i drugi prikazani podaci zahtijevaju intervenciju u javnosti.

*Sekcijska tema: 03***Molekularna dijagnostika: standardizacija, procjena kakvoće, automatizacija****Molecular Diagnostics: Standardisation, Quality Control and Automatisation**

03/P1

ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) GENE POLYMORPHISM: THE IMPORTANCE OF I ALLELE IN COMPETITIVE OARSMEN

Polimorfizam gena za angiotensin konvertirajući enzim: važnost I alela u veslača

¹Pleština S, ²Jelaković B, ³Miličić D, ¹Sertić J,
¹Stavljenić-Rukavina A.

¹Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center Zagreb

²Division of Nephrology and Arterial Hypertension, Department of Internal Medicine, Clinical Hospital Center Zagreb

A specific marker that influences human physical performance has not been identified. Candidate genes with potential significance in control of cardiovascular adaptation to exercise might be found in the renin angiotensin system (RAS) which plays a key role in the regulation of both cardiac and vascular physiology. ACE gene is an important component of RAS. ACE gene has been cloned and the gene effect shown to be associated with an insertion/deletion (I/D) polymorphism of an Alu element in intron 16. An insertion allele of the gene was associated with an insertion/deletion (I/D) polymorphism using PCR in 34 oarsmen who were compared with suitably matched control population. Rowing was selected because it is an endurance sport. Results of the ACE genotyping showed that 16 (47.1%) oarsmen were homozygous for II allele, 6 (17.6 %) were homozygous for DD allele and 12 (35.3%) were heterozygotes, while in control group there were 8 II (24%), 8 DD (24%) and 18 ID genotypes (52%). The frequency of the II allele in oarsmen was 0.65 ($p < 0.05$ vs the control group). Compared with the control group the oarsmen had an excess of ACE I allele and the ACE II genotype. The findings suggest that insertion allele of the ACE gene may be responsible for their outstanding sport results.

03/P2

LIPOPROTEIN LIPASE GENE POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH HYPERTRIGLYCERIDEMIA

Polimorfizam gena za lipoprotein lipazu u bolesnika s hipertrigliceridemijom

¹Mikačić D, ²Kunović B, ³Miličić Z, ⁴Pašić A,
⁵Zrinski-Topić R, ⁵Sertić J,
⁵Stavljenić-Rukavina A.

¹Department of Chemistry and Biochemistry, Zagreb University School of Medicine, Zagreb, ²Zagreb Health Center, Zagreb, ³"Vuk Vrhovac" Institute for Metabolic diseases, Zagreb, ⁴Department of Dermatology, Clinical Hospital Center, Zagreb, ⁵Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Clinical Hospital Center, Zagreb, Croatia

Lipoprotein lipase (LPL) plays a major role in the lipoprotein metabolism. Several LPL gene polymorphisms have been found to be associated with lipid disorders, atherosclerosis, cardiovascular and cerebrovascular disease, and their genetic defects still remain partially unknown. An association between LPL deficiency and Pvu II polymorphic site within the intron between exons 6 and 7 at the gene locus in French-Canadian population and in Japanese population. In this study we investigated genotype distribution of LPL polymorphism in 138 Caucasian patients with hypertriglyceridemia. We determined the Pvu II polymorphisms by PCR and restriction fragment length polymorphisms.

The heterozygous genotype for Pvu II with cut (+/-) was more frequent in our study patients (+/-=48.5%, +/-=22.5). The homozygote genotype was found in 29%. We also compared Pvu II genotype lipid level between Pvu II homozygotes and heterozygotes but we did not find significant differences. The plasma triglycerides expressed as mean (SD) in mmol/L were 5.2 for homozygotes and 4.8 for heterozygotes. In addition, in patients without Pvu II restriction site (-/-) we found lower level of triglycerides (SD=3.1 mmol/L).

In conclusion, we report on increased frequency of homozygous and heterozygous Pvu II

genotype in hypertriglyceridemic patients. This finding might prove useful in detection of individuals most probably susceptible to the development of hypertriglyceridemia, and may be a useful marker to analyse this genetic defect in patient families.

03/P3

MUTATIONAL ANALYSIS OF THE MAJOR PERIPHERAL MYELIN PROTEIN ZERO GENE AND CONNEXIN 32 GENE IN CROATIAN PATIENTS

Analiza mutacija gena za glavni periferni mijelinski protein nula i koneksin 32 u bolesnika u Hrvatskoj

¹Gršković B, ²Mitrović Z,
¹Stavljenić-Rukavina A.

¹Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center Zagreb, Croatia. ² Department of Neurology, Zagreb University School of Medicine and Clinical Hospital Center Zagreb

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the most common inherited disorder of the peripheral nervous system. CMT 1B form is characterized by mutations affecting the major peripheral myelin protein (MPZ) zero gene located at chromosome 1q21.3-q23. In the X-linked dominant form (CMTX) mutations have been found in the connexin 32 gene (Cx32) mapped to Xq13 that encodes a gap junction protein. In this study we examined 100 patients divided according to neurophysiological criteria into the CMT 1B or CMT X forms. We investigated exons 1 and 2 of the MPZ gene for the presence of mutations using single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. The coding region of the Cx32 gene was analyzed by polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism techniques. SSCP analysis of exon 1 of the MPZ gene showed an altered mobility pattern in two related patients. No alteration was found in exon 2 of the MPZ gene. Also, no mutation was established in the fragment I of the Cx32 gene. Detection of new mutations has a significant role in molecular diagnostics of inherited peripheral neuropathies and in developing new tools for their identification.

03/P4

BRADYKININ RECEPTOR B2 GENE POLYMORPHISM AND ESSENTIAL HYPERTENSION

Polimorfizam gena za bradikinin receptor B2 i esencijalna hipertenzija

Ferenčak G, Jelaković B, Sertić J, Kuzmanić D, Čvorović D, Stavljenić-Rukavina A.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Bradykinin receptor B2 gene (BDKRB2) is a candidate gene for the molecular marker of inherited predisposition to essential hypertension (EH). It encodes a G-protein linked receptor and there are four known polymorphic sites within the gene. In exon 2 the transition C>T at position 181 of cDNA results in substitution of arginine by cysteine at codon 14 (R14C) of the protein. In the promoter region the transition T>C at position 58 upstream is possible, but its effects are still unknown. We investigated the association of these two polymorphisms with EH.

The subjects were divided into two groups: normotensives (N=80) and hypertensives (N=80). The polymorphic sites were analyzed using PCR/SSCP and RFLP. The C and T alleles at both sites were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium and their frequencies were similar to those published for South German population. No significant differences in the distribution of the genotypes between the two groups were found. Further analysis of the remaining two polymorphic sites is needed in order to rule out this gene as a molecular marker in EH.

03/P5

GENETIC FACTORS OF ATHEROSCLEROSIS IN CROATIA

Genetski faktori ateroskleroze u Hrvatskoj

Zrinski Topić R, Užarević B, Sučić M, Ćubrilo-Turek M, Skodlar J, Stavljenić-Rukavina A.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Hypercholesterolemia is one of the most important risk factors for development of atherosclerosis. It occurs as a consequence of one or more

concurrent genetic disorders which change the LDL-receptor-mediated catabolism of atherogenic lipoproteins. This work presents the first results of a study of molecular basis of hypercholesterolemia conducted in Croatia. The study included 416 hypercholesterolemic subjects with total cholesterol and LDL-cholesterol values of >6.7 mmol/L and >4.9 mmol/L, respectively. The presence of molecular changes in LDL-receptor gene was examined by the PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) method, while the presence of Apo B 3500 mutation was examined by the PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) method. Results show that 18.8% of hypercholesterolemic patients have one or more mutations on the LDL-receptor gene. Only one case of hypercholesterolemia caused by Apo B 3500 mutation has been found so far in Croatian population. In addition to clinical application, results of this study contribute to establishment of the "gene map" of risk factors for atherosclerosis in Croatia and indirectly influence the procedures of primary and secondary prevention of cardiovascular diseases.

03/P6

PCR IN SITU - METODA IZBORA U DIJAGNOZI I PRAĆENJU LIJEĆENJA AKUTNIH LEUKEMIJA - PRIKAZ DVA SLUČAJA

PCR Insitu - a Method of Choice in Diagnosis and Follow-up of Acute Leukemia - Presentation of Two Cases

**'Giadrov-Kuveždić K, ¹Sučić M, ¹Boban D,
¹Marković-Glamočak M, ¹Ries S, ¹Stavljenić-
Rukavina A, ²Labar B.**

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i ²Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Citomorfološki nalaz i citokemijske značajke zločudnih stanica u koštanoj srži i perifernoj krvi bolesnika s akutnom leukemijom ključni su u postavljanju dijagnoze i određivanju podtipa akutne leukemije. Daljnji dijagnostički postupak su imunofenotipizacija u protočnom citometru za dokaz staničnih antigena i konvencionalna citogenetika kojom se određuju kromosomske abnormalnosti. S pomoću lančane reakcije polimeraze (engl. PCR-polymerase chain reaction) određuju

se promjene na razini gena, specifične za pojedine leukemijske podtipove. U većine bolesnika u kojih se nakon liječenja postigne potpuna klinička i morfološka remisija (manje od 5% zločudnih stanica u koštanoj srži i nestanak u perifernoj krvi) u koštanoj srži i dalje postoji manji broj zločudnih stanica, tj. minimalna ostanata bolest. Ona ponekad čini samo 10⁻¹² unutar populacije normalnih stanica koštane srži, a tako malen broj stanica nemoguće je otkriti konvencionalnom citomorfološkom analizom koštane srži. PCR tehnika umnažanjem odsječka molekule DNA ili RNA omogućuje otkrivanje malog broja zločudnih hematopoetskih stanica pa je neizostavna metoda pri praćenju liječenja akutnih leukemija. Iako je PCR visoko osjetljiva metoda, ona zahtjeva uništenje stanice da bi se izolirala stanična DNA tako da rezultat nije moguće pridružiti određenom tipu stanice ili tkiva. In situ hibridizacija je visoko specifična metoda gdje hibridizacijom obilježene probe komplementarne odsječku DNA ili RNA možemo dokazati promjene na razini gena u intaktnoj stanici, ali nedovoljno osjetljiva jer je potrebno više kopija genske sekvene za vizualizaciju rezultata. Kombinacijom PCR-a i in situ hibridizacije nastaje PCR in situ, metoda kojom je moguće umnažati željenu gensku sekvenu u intaktnoj stanici. Cilj prikaza bio je analizirati PCR in situ tehnikom genske promjene u pojedinim tipovima akutne leukemije u dvije bolesnice, na citološkom razmazu koštane srži u akutnoj fazi bolesti, nakon provedene citostatske terapije i transplantacije koštane srži. U bolesnice A dijagnosticirana je akutna mijeloična leukemija podtipa M2, a konvencionalnim PCR-om dokazan je AML1/ETO fuzijski gen, nastao translokacijom (8;21). U bolesnice B dijagnosticirana je akutna mijeloična leukemija podtipa M4 s eozinofilima, a PCR-om je dokazan CBfβ/MYH11 fuzijski gen nastao inverzijom kromosoma 16. Uzorci koštane srži za citološke razmaze uzeti su pri postavljanju dijagnoze, pri ulasku u prvu potpunu remisiju, te dva mjeseca nakon, kod bolesnice A, autologne transplantacije koštane srži, a kod bolesnice B nakon transplantacije perifernim matičnim hematopoetskim stanicama. Nakon izvođenja RT in situ PCR-a dokazani su prijepisi fuzijskih gena u obje bolesnice pri postavljanju dijagnoze, a također i pri ulasku u remisiju, međutim prijepisi nisu dokazani nakon transplantacije koštane srži. Rezultati su usporedeni s rezultatima dobivenim konvencionalnim PCR-om, uz potpunu korelaciju rezultata, tako da se može zaključiti da je PCR in situ pouzdana morfološka molekularna metoda pri dijagnozi i praćenju liječenja akutnih leukemija.

03/P7

**PRIMJENA KAPILARNE
ELEKTROFOREZE U ANALIZI STR
SUSTAVA**

**Use of Capillary Electrophoresis in the
Analysis of STR Systems**

'Abramović MK, ²Kunović B.

¹Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske, Centar za kriminalistička vještacanja "Ivan Vučetić", Zagreb. ²Dijagnostički laboratorij Doma zdravlja Centar, Zagreb

Sustav kratkih ponavljačih sekvenci (STR-short tandem repeat) prihvaci su kao standard u humanoj DNK identifikaciji. Najjednostavniji način analize STR sustava bila je elektroforeza na denaturiranom poliakrilamidnom gelu (poliakrilamid: bis = 19:1), nakon čega slijedi vizualizacija amplificiranih alela bojenjem u otopini AgNO_3 . Uvođenje kapilarne elektroforeze znatno je poboljšalo osjetljivost, preciznost i brzinu analize. Obilježavanje PCR produkata jednom od fluorescentnih boja (S-FAM, JOE, NED i ROX) omogućilo je istovremenu analizu alela koji se međusobno preklapaju po svojoj veličini, pri čemu je zadovoljavajuća rezolucija dobivena u detekciji alela koji se razlikuju za samo jedan bazni par. Usporedba rezultata analize STR sustava dobivenih klasičnom elektroforezom na PAG-u i kapilarnom elektroforezom ukazuje da bi kapilarna elektroforeza trebala biti metoda izbora.

03/P8

**UČESTALOST CSF1PO, TPOX, TH01,
F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820 i
D13S317 ALELA U HRVATSKOJ
POPULACIJI**

**The Distribution of the CSF1PO, TPOX,
TH01, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539,
D7S820 and D13S317 Alleles in the
Croatian Population**

'Makar A., ²Kunović B.

¹Ministarstvo unutarnjih poslova Republike Hrvatske, Centar za kriminalistička vještacanja "Ivan Vučetić", Zagreb.
²Dijagnostički laboratorij Doma zdravlja Centar, Zagreb

Ispitivanje učestalosti alela kratkih ponavljačih sekvenci (STR - Short Tandem Repeats) u hrvatskoj populaciji vršeno je na CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S820

i D13S317 genskim lokusima. Analizirani uzorci krvi potječu od zdravih osoba koje nisu u krvnom srodstvu, nasumično odabranih u hrvatskoj populaciji.

DNA je izolirana iz krvi izuzete s EDTA upotrebom fenol:kloroform:izoamilnog alkohola (25:24:1). Za amplifikaciju alela korišteni su primeri tvrtke "PROMEGA" uz upotrebu Platinum-Taq DNA polimeraze tvrtke "LIFE TECHNOLOGIES". Identifikacija amplificiranih alela vršena je na denaturiranom poliakrilamidnom (19:1) gelu, a za vizualizaciju korištena je otopina AgNO_3 .

Dobivene učestalosti ispitivanih genskih lokusa kreću se u okviru vrijednosti zabilježenih za ostale bijele populacije Europe i SAD-a i predstavljaju polazište za forenzičke i identifikacijske analize unutar hrvatske populacije.

03/P9

**DETECTION OF BORRELIA
BURGDORFERI SENSU LATO DNA BY
POLYMERASE CHAIN REACTION**

**Utvrđivanje *Borrelia burgdorferi*
sensu lato DNA pomoću polimerazne
lančane reakcije**

**'Grahovac B, ²Šitum M, ¹Marković S, ²Furač I,
³Kubat M, ¹Balija M, ¹Grgićević D.**

¹Croatian Institute of Transfusion Medicine, Zagreb.

²Department of Dermatology, ³Institute of Forensic Medicine, School of Medicine, University of Zagreb, Zagreb

Lyme disease is a zoonosis caused by *Borrelia burgdorferi* (Bb), a spirochete borne by hematogenic Arthropoda, i.e. Ixodidae ticks. Bb can be divided into at least eight species. *Bb sensu stricto* is most often associated with arthritis, *B.garinii* is associated with neurologic symptoms, and *B.afzelii* with erythema chronicum migrans (ECM) and acrodermatitis chronica. Several thousand LB cases occur in Europe every year (about 0.1%-0.2% per year). The infection is endemic in woody areas of western and central Croatia. The prevalence of antibodies to Bb in Croatia was 44% in the group from the high risk zone, 8% from the low risk zone, 43% among forestry workers, and 10% in the general population.

In this study the nested PCR method developed in our laboratory by amplifying of the flagellin and rRNA genes was evaluated, and sera from

several groups involved in Bb epidemiology, such as forestry workers from endemic and non-endemic LB zones (82 and 20, respectively), patients with erythema migrans (40) and 50 blood donors were screened. To define the genospecies, we performed SSCP screening to demonstrate possible heterogeneity of PCR products followed by cycle sequencing and phylogenetic analysis of the sequence data.

Out of 82 forestry workers 31 (37.8%) were IFA positive, while 4 out of 82 had ECM but were PCR negative; 27 out of 31 IFA positive individuals showed no LB symptoms but 6 of 31 (22%) were PCR positive. Out of 51 IFA negative forestry workers, all but one were ECM and PCR positive, while 7 of 51 (14%) were PCR positive and LB symptom negative. In the second group of forestry workers, 3 were IFA positive, but all were PCR negative. In the group of 40 ECM patients, 10 (25%) patients were PCR positive and 8 of 10 IFA positive. Only 3 out of 50 (6%) blood donors were IFA positive, but only one (2%) was PCR positive. The phylogenetic analysis of sequence data revealed all amplified samples to belong to the *Borrelia afezelii* strain.

03/P10

USPOREDBA MOLEKULARNIH METODA RFLP I DEIA U GENOTIPIZACIJI VIRUSA HEPATITISA C

Genotyping of Hepatitis C Virus-Comparison of RFLP and DEIA Methods

**Babić I, Bingulac-Popović J, Dražić V,
Grašovac B, Balija M, Grgičević D.**

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

Ovim istraživanjem željeli smo usporediti dvije molekularne metode, tj. RFLP (restriction fragment length polymorphism) i DEIA (DNA enzyme immunoassay) koje rabimo za utvrđivanje genotipa kod HCV-RNA pozitivnih ispitanika. RFLP metoda obuhvaća enzimsko cijepanje umnoženog 5' nekodirajućeg dijela genoma hepatitis C virusa s pomoću restriktivskih enzima, dok se DEIA metoda temelji na hibridizaciji umnoženog dijela Core regije virusnog genoma s odgovarajućim oligonukleotidnim probama specifičnim za pojedine genotipove.

HCV-RNA je izolirana iz 140 µL seruma s pomoću QIAamp kita (QIAQEN, Njemačka). Nakon provedene reverzne transkripcije (Gene-

AMP RNA-PCR kit, Perkin Elmer), virusna cDNA umnožena je nested PCR-om uz oligonukleotidne začetnike za dvije regije genoma: 5' nekodirajuću i Core. RFLP metodom načinjeno je enzimsko cijepanje uz restriktivne enzime: Rsal, Hae III i BstUI (Boehringer, Njemačka). DEIA metoda (DiaSorin, Biomedica) sadrži 9 oligonukleotidnih proba specifičnih za genotipove: 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, 3a, 4, 5 i 6. Istraživanjem je obuhvaćen 51 ispitanik. Svi uzorci cDNA su uspješno umnoženi u 5'NK regiji (osjetljivost metode 100%), dok 12 uzorka nije bilo moguće umnožiti u Core regiji (osjetljivost 81%), što je u skladu sa spoznajama o visokoj konzerviranosti nukleotida u 5' NK regiji HCV genoma. Visoka podudarnost rezultata između dvije metode utvrđena je za genotipove 1a, 1b i 3a, koji su i najčešći u hrvatskoj populaciji. Za određivanje genotipova 2 i 4, metoda izbora je DEIA, budući da RFLP metoda pokazuje slabu mogućnost razlučivanja ova dva genotipa. S pomoću DEIA metode bolje se mogu razlikovati miješane infekcije s različitim genotipovima virusa hepatitisa C.

03/P11

DOKAZIVANJE NPM-ALK TRANSKRIPTA KOD NON-HODGKIN LIMFOMA

Detection of NPM-ALK Transcript in Non-Hodgkin's Lymphomas

**¹Kozić S, ¹Grašovac B, ²Ostojić S, ²Kušec R,
²Jakšić B.**

¹Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb.

²Hematočki odjel Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Anaplastični limfom velikih stanica (ALCL) predstavlja oko 25% svih non-Hodgkin limfoma (NHL) u djece i adolescenata i oko 5% u odrasloj skupini NHL bolesnika. Po REAL klasifikaciji to su tumori T ili 0 fenotipa, koji pokazuju ekspresiju CD30 antiga. Zločudne stanice ovog limfoma prvenstveno infiltriraju tkivo limfnih čvorova, a mogu se naći i u mekim tkivima, gastrointestinalnom sustavu i koštanoj srži. U gotovo trećini slučajeva ALCL-a nadan je kromosomski poremećaj nastao balansiranom translokacijom (2;5) (p23;q35). Gen Sq35 NPM (nukleofosmin) uključen je u regulaciju staničnog ciklusa, a gen 2p23 ALK je onkogen koji se tek aktivacijom eksprimira u protein s aktivnošću tirozin-kinaze. Translokacijom ALK gen prelazi s drugog na peti kromosom i veže se na NPM gen tvoreći NPM-ALK kimerični gen. NPM-ALK gen kodira hibridni pro-

tein od 80 kD koji pokazuje aktivnost tirozinkinaze.

Cilj rada bio je utvrditi postoji li translokacija (2,5) u skupini od 27 bolesnika dobne skupine od 22-79 godina, kojima je morfološki i imunohistokemijski dijagnosticiran non-Hodgkin limfom. 24 bolesnika su morfološki definirani kao ALCL, 2 bolesnika kao velikostanični NHL i jedan kao imunoblastični limfom. Iz ekstrahiranih limfnih čvorova izolirana je RNA, reverznom transkripcijom prevedena u cDNA, i s pomoću PCR reakcije u dva koraka (nested PCR) umnožavani su kontrolni geni β -aktin, unutarstanični dio ALK gena i kimerični gen NPM-ALK.

β -aktinom smo dokazali zadovoljavajuću kvalitetu izolirane RNA i transkribirane cDNA svih uzoraka, a parcijalnim umnožavanjem ALK gena dokazali smo prisutnost ALK gena u svim ispitivanim uzorcima. Postojanje NPM-ALK transkripta dokazali smo u jednom uzorku ALCL i kod dva uzorka velikostaničnog NHL, što čini 11% ispitivanih non-Hodgkin limfoma.

03/P12

GENOTIPIZIRANJE MTHFR I APO E U ISPITANIKA S ATEROSKLEROZOM KAROTIDA

MTHFR and APO E Genotyping in Patients with Carotid Atherosclerosis

¹Zuntar I, ¹Topić E, ¹Antoljak N, ²Demarin V, ²Vuković V.

¹Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb.

²Klinika za neurologiju Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Ateroskleroza je vodeća bolest krvnih žila s okolišnim i genetskim utjecajem. MTHFR (metilentetrahidrofolat reduktaza) ima važnu ulogu u metabolizmu homocisteina, a njegov gen nalazi se na prvom kromosomu. Mutacija C677T povezuje se s pojavnosću ateroskleroze. Apo E je polipeptid sa značajnom ulogom u metabolizmu lipida i razvoju ateroskleroze krvnih žila. Njegov se gen nalazi na 19. kromosomu, a polimorfizam je označen zamjenom aminokiselina Arg i Cys na mjestima 112 i 158 (E2: Cys 112/Cys 158, E3: Cys 112/Arg 158 and E4: Arg112/Arg 158). Cilj ovog ispitivanja je da se ispita povezanost apo E i MTHFR genotipa s aterosklerotskom bolesti karotida. MTHFR i apo E genotip određeni su metodom PCR-RFLP u skupini zdravih dobrovoljaca (n=67)

i 40 bolesnika s dijagnosticiranom stenozom karotida (color doppler; stenoza >50%). U podskupini SC s apo E 3/4 i 2/3 genotipom (n=20) nadeno je 50%, a u podskupini zdravih ispitanika (n=19) 28% ispitanika s apo E 3/4 i 2/3 genotipom. U navedenim podskupinama SC i zdravih nadena je podjednaka raspodjela zdravog i heterozigotno-mutiranog MTHFR genotipa. Statističkom obradom rezultata nije nadena značajna razlika ($p>0.05$, χ^2 -test) za apo E i MTHFR genotipove i alele u skupini bolesnika u odnosu na zdrave dobrovoljce. Preliminarni rezultati upućuju na potrebu daljnog istraživanja MTHFR i apo E genotipa uključujući veliki broj ispitanika kako zdravih tako i ispitanika s aterosklerozom krvnih žila bez obzira na njegino mjesto.

03/P13

GENOTIPIZACIJA CYP2D6 *3 I *4 MUTACIJA METODOM PCR-SSCP PCR-SSCP Genotyping of CYP2D6 *3 and *4 Mutations

¹Ivanišević AM, ¹Štefanović M, ¹Topić E.

¹Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) je metoda detekcije poznatih i nepoznatih mutacija koja se temelji na promjeni sekundarne strukture definiranog ulomka jednolančane DNA.

Cilj ovog rada je bio optimirati PCR-SSCP metodu detekcije CYP2D6 *3 i *4 mutacija korištenjem GMA™ gelova u Elchrom Scientific SEA 2000 elektroforetskom sustavu, opremljenim elementom za izmjenu topline i pumpom za laminarni protok, koji omogućuju održavanje jednolice temperature po čitavoj površini gela.

PCR-SSCP analiza je izvedena na 45 uzoraka prethodno genotipiziranih metodom PCR-RFLP. Eksoni IV i V (*4 i *3 aleli) CYP2D6 gena su umnoženi i denaturirani na 95 °C 5 minuta. Napon je bio 45 V, a temperatura pufera 8 °C tijekom noći (18 h).

Naši rezultati pokazuju reproducibilne i uniformne obrasce vrpcu na gelu za mutante i divlje tipove CYP2D6 *3 i *4 genotipova. Unutar skupine zdravih ispitanika za CYP2D6 *3 je pronađeno 2,0% heterozigota i 98% divljeg tipa, a za CYP2D6 *4 68,2% divljeg tipa, 29,5% heterozigota i 2,3% homozigota. Svaki uzorak prethodno genotipiziran metodom PCR-RFLP jednoznačno je

potvrđen metodom PCR-SSCP (100% podudarnost). Zbog odličnih značajki GMA™ gelova i mogućnosti kontrole temperature u Elchrom Scientific SEA 2000 elektroforetskom sustavu metoda je pouzdana, jednostavna za izvođenje i ekonomski konkurentna.

03/P14

POLIMORFIZAM GENA ZA PARAOXONAZU I APO E U BOLESNIKA S KARDIOVASKULARnim BOLESTIMA Genetic Polymorphism of Paraoxonase and APO E in Cardiovascular Patients

¹Ivanišević AM, ¹Topić E, ¹Štefanović M.

¹Zuntar I, ²Nikolić V, ³Čubrilo-Turek M.

¹Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb.

²Klinika za kardiologiju Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb. ³Interna klinika Opće bolnice "Sveti duh", Zagreb

Genetski polimorfizam paraoksonaze na kodonu 192 predstavlja supstituciju glutamina (A alel)

u arginin (B alel). Molekularna osnova polimorfizma gena za Apo E proizlazi iz zamjene dvaju aminokiselina (Arg i Cys na mjestima 112 i 158) te prema tome razlikujemo sljedeće alele: E2-Cys 112/Cys 158, E3-Cys 112/Arg 158 i E4-Arg112/Arg 158. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati distribucije genotipova za paraoksonazu (PON1) i Apo E u zdravoj populaciji i u bolesnika s kardiovaskularnim bolestima, te ispitati povezanost pojedinih alela s razvojem kardiovaskularnih bolesti. Ispitivanje je obavljeno na skupini od 51 bolesnika s koronarnom bolesti i 70 zdravih ispitanika. Frekvencije genotipova su se statistički značajno razlikovale za PON1 ($p=0,017$, χ^2 -test), dok je genotipizacijom Apo E razlika za frekvencije genotipova bila na granici statističke značajnosti ($p=0,064$, χ^2 -test). Unutar skupine heterozigota (E2/3, E3/4) za Apo E, frekvencija B alela bila je 46,7% što se statistički značajno razlikuje od kontrolne skupine ($p=0,009$, χ^2 -test). Naši rezultati ukazuju da bi polimorfizmi gena za PON1 i Apo E mogli predstavljati neovisni faktor rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Kako bismo potvrdili naše hipoteze, potrebno je nastaviti istraživanje na većem broju ispitanika.

Sekcijska tema: 05

Bolesti bubrega i njihovi eksperimentalni modeli Kidney Diseases and their Experimental Models

05/P1

ZNAČAJ ODREDIVANJA SERUMSKOG CISTATINA C U PROCJENI GLOMERULARNE FILTRACIJE U DJECE Serum Cystatin C Measurement in Assess- ment of Glomerular Filtration in Children

¹Tešija A, ¹Zubčić A, ¹Antoljak N, ²Đelmiš J,
¹Topić E.

¹Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb.

²Klinika za pedijatriju Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Cistatin C, protein male molekularne mase, stvara se u gotovo svim tjelesnim stanicama, a izlučuje iz organizma glomerularnom filtracijom (GF). S obzirom da je njegova koncentracija u serumu neovisna o mišićnoj masi već isključivo o stupnju filtracije u glomerulima, bolji je biljev GF u odnosu na serumski kreatinin. Ovim radom

željeli smo ispitati značaj odredivanja serumskog cistatina C u skupini od 84 djeteta, dobnog raspona od 1 mjesec do 14 godina. U svih ispitanika je s pomoću klirensa Tehnecija DTPA izmjerena GF, a u serumu odredena koncentracija cistatina C i kreatinina. Razina cistatina C određena je na automatskom analizatoru Olympus AU 600 turbidimetrijskom metodom na polistirenskim česticama (reagens tvrtke DAKO A/S, Danska) Statička obrada rezultata učinjena je s pomoću SigmaStat i Excel programa, a korišteni su sljedeći testovi: opisna statistika, Pearsonova korelacija, te ROC analiza dijagnostičke pouzdanosti (engl. receiver operator curve). Raspon GF je bio od 60 do 145 ml/min. Vrijednosti cistatina C i kreatinina značajno su korelirale s GF ($r_{cyst-CGF}=0,66$; $r_{creat-CGF}=0,72$, $p<0,001$). Nije nađena korelacija između dobi i cistatina C, dok su vrijednosti kreatinina značajno povezane s dobi ($r=0,33$, $p<0,001$). Dijagnostička pouzdanost odredivanja GF, mjerena kao površina ispod ROC krivulje, bila je veća za cistatin C nego za kreatinin (0,751 i 0,613). Ovi

preliminarni rezultati upućuju na važnost određivanja cistatina C kao pouzdanog biljega u ranim fazama poremećaja bubrežne funkcije. Posebno je prikladan u pedijatriji jer zamjenjuje dosadašnje metode određivanja GF koje koriste 24-satnu mokraću ili intravenznu primjenu radioaktivnih tvari.

05/P2

CISTATIN C KAO MJERA GLOMERULARNE FILTRACIJE

Cystatin C - Marker of the Glomerular Filtration Rate

Mladina B, Salamunić I, Dujmov I, Ivelja N.

Odjel za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Split, Split

Određivanje endogenog kreatinina u serumu i određivanje kreatinin klirensa koriste se kao rutinski testovi za utvrđivanje glomerularne filtracije. Poznato je da ovi testovi imaju kako fiziološka tako i predanalitička i analitička ograničenja. Za cistatin C, protein male molekularne mase (13250 D), tvrdi se da je bolji pokazatelj glomerularne filtracije od kreatinin klirensa. Cistatin C se sintetizira u svim stanicama s jezgrom, filtrira u glomerulima i reapsorbira u proksimalnim tubulima.

Cilj rada je utvrditi u kojoj mjeri je određivanje cistatina C pouzdaniji pokazatelj glomerularne filtracije od određivanja endogenog kreatinina u serumu i klirensa kreatinina. Cistatin C u serumu odredivali smo imunonefeliometrijskom metodom (Behring), a kreatinin u serumu i u mokraći metodom po Jaffeu. Za kreatinin klirens utvrđili smo raspon od 0,10 do 1,99 ml/sek, a za cistatin C od 0,57 do 7,0 mg/l. Dobiveni koeficijent korelacije iznosi -0,7637.

Cistatin C može biti dobra zamjena za određivanje kreatinin klirensa, jer je prikladan za ispitanika, te analitički pouzdan.

05/P3

ODREĐIVANJE VRSTE PROTEINURIJE ILI POJEDINAČNIH BILJEGA PROTEINURIJE?

Determination of the Type of Proteinuria or Individual Markers of Proteinuria?

Matišić D, Miloš M, Rogić D, Čvorović D.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Glavni simptom bolesti bubrega je proteinurija. Donedavno se proteinurija procjenjivala prema stupnju proteinurije (određivanje ukupnih prote-

ina) i vrsti proteinurije (elektroforeza proteina u mokraći na acetat celulozi). Međutim, zbog nemogućnosti ranog otkrivanja proteinurije kao ni jasnog razlikovanja glomerulopatija i tubulopatija dosadašnjim metodama predložena je nova strategija za isključivanje i razlikovanje proteinurija.

Naime, određivanjem specifičnih biljega pojedinih dijelova nefrona, kao što su albumin (biljeg integriteta glomerulare membrane), imunoglobulin G (biljeg selektivnosti glomerularne membrane), te α_1 -mikroglobulin (biljeg funkcije proksimalnog tubula) moguće je rano otkrivanje proteinurije kao i razlikovanje vrsta proteinurije.

Analizom 54 uzorka 24-satne mokraće napravljena je usporedba između određivanja vrste proteinurije i određivanja pojedinih proteinskih biljega nefrona.

Procjenom dobivenih rezultata dosadašnjim metodama od 54 uzorka nadeno je 27 fizioloških proteinurija, 14 glomerularnih proteinurija, 1 tubularna proteinurija i 12 miješanih proteinurija. Međutim, procjenom rezultata dobivenih pojedinačnim određivanjem biljega proteinurije nadeno je da 5 od 27 uzoraka mokraće s fiziološkom proteinurijom ima povišene vrijednosti i albumina i α_1 -mikroglobulina.

Također su uočene i razlike u vrijednostima albumina, α_1 -mikroglobulina i imunoglobulina G kod glomerularnih i tubularnih proteinurija određenih elektroforezom na acetat-celulozi.

S obzirom na osjetljivost i specifičnost navedenih biljega proteinurije predložena nova strategija trebala bi biti metoda izbora u programima pretraživanja za isključivanje proteinurije te razlikovanje glomerulopatija i tubulopatija.

05/P4

INCIDENTALNI I SIMPTOMATSKI KARCINOM BUBREGA - ZNAČAJ KLINIČKIH, HISTOPATOLOŠKIH PARAMETARA I PARAMETARA STANIČNOG CIKLUSA

Clinical, Histopathological and Flow Cytometric Differences between Incidental and Symptomatic Renal Cell Carcinomas

¹Užarević B, ²Katušin D, ¹Petrovečki M, ³Mlinac-Lucić M, ¹Marušić M, ²Mareković Z.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb, ²Zavod za urologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, ³Odjel za urologiju i patologiju Opće bolnice Karlovac, Karlovac.

¹Zavod za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primjena ultrazvuka, CT i drugih dijagnostičkih tehniki omogućila je otkrivanje, osim simptomatskih, i incidentalnih karcinoma bubrega koji

nisu bili praćeni specifičnim kliničkim simptomima. Klinički, histopatološki parametri, te stanični ciklus i proliferacijska aktivnost tumorskih stanica obrađeni su u 63 bolesnika operiranih od karcinoma bubrega u Općoj bolnici Karlovac u razdoblju od 1986. do 1996. U 23 (36,5%) bolesnika incidentalno je otkriven karcinom bubrega, ultrazvukom (20 bolesnika), urografijom (2 bolesnika) i CT (1 bolesnik), dok je u 40 bolesnika dijagnosticiran simptomatski karcinom bubrega. Incidentalni karcinomi bubrega bili su manjeg promjera ($p<0,001$), nižeg histopatološkog stupnja ($p=0,022$) i duljeg ukupnog preživljjenja ($p=0,002$). Histopatološki stupanj, ploidni status i proliferacijska aktivnost tumorskih stanica pokazali su se kao dobar pojedinačni prognostički pokazatelj (univarijatna analiza), a samo histolopatološki stupanj tumora prema multivarijatnoj analizi.

Prema posljednjim istraživanjima 25-53% karcinoma bubrega čine incidentalni karcinomi bubrega. Je su li to rano otkriveni karcinomi bubrega ili novi manje zločudan oblik ovih tumora? Možda će daljnja istraživanja otkriti ulogu incidentalnih tumora kao i najbolji pristup liječenja ovih tumora.

05/P5

UČINAK REKOMBINANTNOG HUMANOG ERITROPOETINA NA AGREGACIJU TROMBOCITA U BOLESNIKA NA HEMODIJALIZI

Effect of Recombinant Human Erythropoietin on the Aggregation of Platelets in Hemodialysis Patients

Škaro Librenjak Lj, ¹Pauković Sekulić B,
²Salamunić I.

¹Klinika za unutarnje bolesti Kliničke bolnice Split, Split.
²Odjel za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Split, Split

Kronično zatajenje bubrega označava progresivno i trajno propadanje nefrona što dovodi do zatajenja svih bubrežnih funkcija: ekskrecijske, endokrine i metaboličke. Poremećene su funkcije gotovo svih organa i organskih sustava, pa su tako nazočni i poremećaji u hemostazi što se klinički očituje pojačanom sklonosću krvarenju ili trombozama.

Otkriće gena za eritropoetin omogućilo je sintezu rekombinantnog humanog eritropoetina. Eri-

tropoetin je glavni čimbenik u regulaciji eritropoeze, ali prema podacima brojnih istraživanja, eritropoetin je i jedan od humorálnih čimbenika koji pridonosi razvoju i dozrijevanju megakarocita i oslobadanju novih metabolički aktivnijih trombocita.

Cilj rada bio je ispitati učinak rekombinantnog humanog eritropoetina kod 19 uremičnih bolesnika na hemodijalizi tijekom prva dva tjedna liječenja eritropoetinom.

Odredivani su brojčana koncentracija trombocita, prosječni volumen trombocita (MPV), širina distribucije trombocita (PDW) i agregacija trombocita ADP-om i adrenalinom. Uočen je porast brojčane koncentracije trombocita, ali nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti prije liječenja eritropoetinom. Također nisu zabilježene promjene MPV i PDW ($p>0,05$). U testovima nakupljanja trombocita po Bomu inducirane in vitro ADP-om i adrenalinom nije bilo statistički značajne razlike u odgovoru druge faze nakupljanja prije i nakon osmog odnosno petnaestog dana liječenja eritropoetinom ($p>0,05$).

Dobiveni rezultati pokazuju da eritropoetin kod naše skupine bolesnika u prva dva tjedna liječenja ne povećava agregabilnost trombocita niti dovodi do povećanja brojčane koncentracije trombocita. Ovi rezultati su sukladni s rezultatima onih autora koji nisu uočili promjene agregabilnosti trombocita u samom početku liječenja eritropoetinom.

05/P6

VRIJEDNOSTI UKUPNIH GLIKOZAMINOGLIKANA U MOKRAĆI OSOBA S UROLITIJAŽOM

Value of the Total Glycosaminoglycans Excretion in the Urine of Renal Stone Formers

Šerić V.

Odjel za medicinsku biokemijsku Kliničke bolnice Osijek,
Osijek

Glikozaminoglikani ili mukopolisaharidi su spojevi građeni od jednostavnih šećera, aminosćera i uronskih kiselina. Karakterizira ih linearna makromolekula nastala povezivanjem nekoliko identičnih disaharidnih jedinica. Glikozaminoglikani su najzastupljeniji u vezivnom tkivu

i sluznim tvarima tijela. U bubrežima predstavljaju osnovu sluznice mokraćnog sustava, ali se također nalaze i ispod glomerularne membrane, Bowmanove čahure, tubularnih i peritubularnih kapilara i arteriola. Mokraćni mjeđuh prekriven je pločama glikokaliksa u kojima glikozaminoglikani čine osnovnu komponentu. Oni su odgovorni za održavanje elektronegativnosti površine zbog svog visokog anionskog naboja za koji su odgovorne sulfatne skupine zbog kojeg imaju ulogu i u procesu nakupljanja u bubrežnim stanicama. Smanjena koncentracija glikozaminoglikana u mokraći može odražavati njihov smanjeni udio u glikokaliksu s posljedičnim smanjenjem elektronegativnosti i smanjenjem funkcionalne sposobnosti membrane u zaštiti od infekcija i priječenju stvaranja kamenaca. Niske koncentracije glikozaminoglikana povezuju se sa stvaranjem mokraćnih kamenaca.

U ovom radu određivana je koncentracija ukupnih glikozaminoglikana u prvoj jutarnjoj mokraciji 20 osoba s bubrežnim kamencima i 20 zdravih osoba koje nisu imale problema s bubrežnim kao ni s bolestima kostiju, koji su predstavljeni kontrolnu skupinu. Mokraća je centrifugirana nakon čega je koncentracija ukupnih glikozaminoglikana određena metodom s karbazolom. Izlučivanje glikozaminoglikana prikazano je u odnosu na kreatinin u mokraciji. Koncentracija kreatinina mjerena je enzimatskom PAP metodom firme Boehringer Mannheim. Statistička analiza pokazuje statistički značajnu razliku između ove dvije skupine. Vrijednosti glikozaminoglikana su značajno niže kod osoba s bubrežnim kamencima u odnosu na kontrolnu skupinu ($p<0,001$). Rezultati potvrđuju da glikozaminoglikani igraju ulogu u stvaranju kamenaca.

05/P7

PROGNOŠTIČKI ZNAČAJ ODREĐIVANJA PIIP-A U NEKIM BOLESTIMA

Prognostic Significance of PIIIP Determination in Some Diseases

Jagić V, Ivanković S, Lazić J, Dravinska Ž.

Zavod za medicinsko-laboratorijsku dijagnostiku Opće bolnice "Sveti Duh", Zagreb

Prokolan III peptid (PIIP) je komponenta vezivnog tkiva, koja se može naći u povišenim koncentracijama u serumu tijekom pojačane aktivnosti fibroblasta i odlaganja kolagena u orga-

nizmu. Njegova koncentracija je povišena u svim stanjima pojačanog stvaranja vezivnog tkiva, tj. ožiljka. Uloga PIIIP u dijagnozi i prognozi jetrenih bolesti i poslijoperacijskih ožiljaka je već potvrđena i dokazano je da je ona u korelaciji s veličinom i kvalitetom ožiljka.

U ispitivanju plućnih bolesnika uključili smo 22 bolesnika s astmom koja je trajala dulje od 5 godina, 18 bolesnika s KOPB i 20 zdravih davača. Rezultati ispitivanja su pokazali da koncentracija prokolan III peptida u krvi bolesnika s astmom bila $0,41 \pm 0,17$ U/ml, u bolesnika s KOPB $0,35 \pm 0,12$ U/ml i $0,79 \pm 0,25$ U/ml, u kontrolnoj skupini.

Rezultati ispitivanja bolesnika s akutnim infarktom miokarda pokazali su da postoji statistički značajna razlika PIIIP-a između akutne faze i 14. i 42. dana nakon AIM. PIIIP 14 dana nakon AIM je u pozitivnoj korelaciji s veličinom infarkta. 42 dana nakon AIM bolesnici bez simptoma imali su normalan PIIIP, dok je u 7 bolesnika s postinfarktnom anginom pektoris, PIIIP i dalje bio povišen uz normalan CK. Zaključujemo da je PIIIP dobar biljeg stvaranja postinfarktnog ožiljka i u dobroj je korelaciji s veličinom infarkta. Naši rezultati su pokazali da bi se mogao koristiti kao dobar pokazatelj fibroziranja miokarda i u slučajevima kada enzimi u serumu još uvijek ne pokazuju njegovo oštećenje.

U skupini od 70 bolesnika liječenih kroničnom intermitentnom hemodializom, vrijednosti PIIIP-a kretale su se od 1,4 do 11,5 U/ml. Unutar ove skupine bolesnika izdvojili smo 28 bolesnika koji su imali veće vrijednosti od 3,0 U/ml. U ovoj izdvojenoj skupini bolesnika u odnosu na preostalih 42 bolesnika vrijednosti ureje, kreatinina i urata bile su veće, što u izvjesnom smislu govori o prognostičkoj vrijednosti PIIIP-a u ovih bolesnika. U skupini bolesnika kod kojih je dokazana prisutnost HBsAg i HBcAt vrijednosti PIIIP-a kretale su se iznad referentnih granica, a u troje bolesnika bile su krajnje visoke. Koncentracija prokolan III peptida u serumu bila je određena kompletnom kemikalijom RIA PIIIP Behringwerke AG. Načelo određivanja temelji se na dvostupnjenom sendvič pokusu.

Upotrijebljena protutijela su vrlo specifična za PIIIP. Križna reakcija ovih protutijela s proteinima bazalne membrane je vrlo mala i ne utječe na rezultate određivanja PIIIP-a. Prednost određivanja PIIIP u serumu bolesnika je što se serum može pohraniti na -20 °C, te jednokratnim odmrzavanjem seruma odrediti koncentracija PIIIP i nakon dužeg vremenskog perioda.

Naša ispitivanja koncentracije PIIIP-a u navedene tri bolesti pokazale su da je PIIIP koristan pokazatelj u ocjeni stanja i prognoze ovih bolesti.

05/P8

CRP VRIJEDNOSTI KOD PIJELONEFRITISA U DJECE CRP Values in Pyelonephritis of Children

Pavela J, Fijačko M, Cetina N, Šerić V,
Wagner J.

Odjel za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Osijek,
Osijek

C-reaktivni protein (CRP) jedan je od mnogih ako ne i najosjetljiviji pozitivan protein akutne faze. Danas je najpoznatiji laboratorijski parametar upale, čije je određivanje uvedeno u svakodnevnu kliničku praksu. Indikacije za određivanje CRP su pretraživanje upalnog stanja, razlikovanje bakterijskih od virusnih infekcija, kontrola odgovora na antibiotsku terapiju i drugo.

Stoga je cilj ovog rada bio odrediti parametre upale (CRP, SE-sedimentacija eritrocita, Lkc-broj leukocita) u djece s pijelonefritisom. Pratilo se kretanje ovih parametra u dvije točke na početku bolesti i nakon primijenjene terapije. Ispitano je 33 djece.

Vrijednosti CRP su odredene turbidimetrijski - testovima firme Boehringer Mannheim. SE je odredena Seditainer sustavom firme Greiner, a Lkc su odredeni elektronskim brojačem stanica Coulter STKS. Dobiveni podaci obrađeni su Studentovim t-testom.

Srednja vrijednost CRP na početku bolesti (CRP_1) iznosila je 76,56 (13,2-172,4) mg/L sa standardnom devijacijom (SD) 49,09, dok je vrijednost CRP nakon terapije (CRP_2) iznosila 1,40 (0,1-4,0) mg/L, a SD je 1,34.

Srednja vrijednost SE₁ je iznosila 58,42 (15-25) mm/h s SD 24,05, a SE₂ 17,12 (6-35) mm/h s SD 7,96. Srednja vrijednost Lkc₁ je bila 19,19 (8,8-38,7) x10⁹/L a SD 7,35 i Lkc₂ 8,09 (5-16) x10⁹/L s SD 2,38.

Naši podaci pokazuju da postoji veliki raspon vrijednosti CRP na početku bolesti, za razliku od leukocita, dok nakon primjene terapije raspon vrijednosti CRP je najmanji. Rezultati pokazuju da je CRP najpouzdaniji parametar uspjeha terapije jer upravo kod CRP dolazi do jasnog sniženja čak do područja referentnih vrijednosti, dok leukociti i sedimentacija također pokazuju tendenciju pada vrijednosti, ali još uvijek iznad referentnih vrijednosti.

05/P9

UČINAK OKRATOKSINA-A NA APOPTOZU, NEKROZU I RAZINU STANIČNOG ATP-a U RK 13 I LLC-PK1 BUBREŽnim STANICAMA

Effect of Ochratoxin-A on Apoptosis, Necrosis and Cellular ATP Level in RK 13 and LLC-PK1 Renal Cells

¹Petrik J, ²Koszegi T, ¹Begonja A, ¹Bilopavlović N, ¹Juretić D, ²Kellermayer M, ¹Ćepelak I, ¹Žanić-Grubišić T, ¹Pepelnjak S.

¹Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju i Zavod za mikrobiologiju, Zagreb. ²Medicinski fakultet, Institut za kliničku kemiju, Pečuh, Madarska

Okratoksin A (7-karboksi-5-kloro-3,4-dihidro-8-hidroksi-3-metilizokumarin) je sekundarni metabolit pojedinih vrsta plijesni roda Aspergillus, Penicillium te Eurotium. Toksin je svjetski javno zdravstveni problem, kontaminira hranu biljnog i životinjskog podrijetla te tako može ugrožavati zdravlje ljudi i životinja. Okratoksin A djeluje kao nefrotoksični, hepatotoksični, genotoksični i karcinogeni činitelj, upliće se u mehanizam koagulacije krvi, te djeluje imunosupresivno.

Cilj ovog rada je ispitati učinak okratoksina A na staničnu smrt i koncentraciju ATP-a budući da preživljavanje stanica u znatnoj mjeri ovisi o razini unutarstaničnog ATP-a. Morfološka karakterizacija i određivanje katalitičke koncentracije laktat-dehidrogenaze poslužit će za ispitivanje nekrotičkih odnosno apoptotičkih promjena u kulтивiranim zečjim i svinjskim bubrežnim stanicama (RK 13 i LLC-PK 1).

Uzgajali smo bubrežne stanice u RPMI mediju obogaćenom s 10% fetalnim govedim serumom, na 37 °C i uz 5% CO₂. Stanice su zatim tretirane tijekom 24 sata s okratoksinom A (2,5-25 µg/ml medija).

Povećanjem koncentracije okratoksina A značajno se smanjuje broj živih RK 13 i LLC-PK 1 stanica. Koncentracije OTA od 5 (g rezultiraju smanjenjem broja RK-13 živih stanica na 50%, a LLC-PK 1 smanjenjem na 8% prema odgovarajućim kontrolnim uzorcima, što ukazuje na veću osjetljivost LLC-PK 1 u odnosu na RK 13.

Aptotoza je kod LLC-PK 1 stanica prisutna u većoj mjeri (204 apoptotičke stanice na 1000 u odnosu na 133 apoptotičkih kod RK 13 stanica također na 1000 stanica).

U obje stanične linije došlo je do promjena unutarstaničnog ATP-a, u RK 13 stanicama razina ATP-a smanjuje se na 80%, a u LLC-PK 1 stanicama povećava na 146% u odnosu na kontrolu kod koncentracije okratoksina A od 5 µg/ml medija.

LLC-PK 1 stanice pokazuju veće otpuštanje laktat-dehidrogenaze u medij pod djelovanjem okratoksina A nego RK 13 stanice, što ukazuje na veću zastupljenost nekrotičkih promjena u LLC-PK 1 stanicama.

Sekcijska tema: 06

Oksidansi i antioksidansi Oxidants and Antioxidants

06/P1

VRIJEDNOSTI ANTI o-LDL PROTUTIJELA I VITAMINA E U TRAUMATSKOM ŠOKU

Anti o-LDL Antibody and Vitamine Values
in Traumatic Shock

Granić P, Lovrić M, Žunić J, Zrinski-Topić R,
Stavljenić-Rukavina A.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Stanje traumatskog šoka dovodi do povećanja koncentracije slobodnih radikala koji su odgovorni za nastanak o-LDL. o-LDL je imunogen, te imuni sustav reagira stvaranjem protutijela (o-LAB).

Vitamin E je vrlo važan za uklanjanje štetnog utjecaja slobodnih radikala prekidajući lančanu reakciju lipidne peroksidacije. Međutim, pri oksidacijskom stresu (traumatskom šoku) narušava se ravnoteža oksidansa/antioksidansa, pri čemu se antioksidansi iscrpljuju.

Cilj ovog rada je bio istražiti promjene u koncentraciji o-LAB i vitamina E kod bolesnika u stanju traumatskog šoka i njihovu međusobnu povezanost. Ispitivanja su načinjena kod 31 ranjenika neposredno po primitku u bolnicu, odnosno prije početka liječenja, te kod 30 zdravih ispitanika.

Titar o-LAB-a je određen komercijalnim testom o-LAB ELISA, a vitamin E HPLC metodom.

Rezultati su pokazali da je titar protutijela u ranjenika za više od 30% manji u odnosu na kontrolnu skupinu. Vitamin E je kod bolesnika u stanju šoka bio manji za oko 70% u odnosu na kontrolnu skupinu.

Međutim, nema korelacije između vrijednosti o-LAB-a i vitamina E u traumatskom šoku.

06/P2

GLYCOPROTEIN EXTRACT OF EISENIA FOETIDA AS ANTIOXIDANT

Pročišćeni glikoprotein iz *Eisenia foetida*
kao antioksidans

¹Grdiša M, ²Popović M, ³Hrženjak T.

¹Division of Molecular Medicine, Rudjer Bošković Institute, Zagreb. ²Department of Biology, Faculty of Veterinary Medicine, Zagreb

Antioxidants defend the body from damage of DNA, proteins and lipids. These types of damages are major contributors to aging and to the degenerative diseases such as: cancer, cardiovascular disease, immune-system decline, brain dysfunction, and cataracts.

The glycoprotein extract of *Eisenia foetida* (G-90) exhibited many biological functions: proliferative, adhesive, fibrinolytic and anticoagulative. An effect of G-90 as an antioxidant was investigated in cultured human fibroblasts and epithelial cells. After treatment of the cells with H_2O_2 for 4 h, G-90 completely recovered the cells and stimulated their growth. Ascorbic acid, a known antioxidant, recovered the growth of the cells to about 70%. When cells were incubated with G-90 24 h before treatment with H_2O_2 , the oxidative damage of the cells did not occur. Thus, G-90 had an apparent protective effect on the toxicity of H_2O_2 . When cells were incubated in the medium containing both antioxidant (G-90) and H_2O_2 , G-90 completely protected cells from oxidative damage and stimulated their growth. With this function G-90 could have a role in wound healing and tissue repair.

Sekcijska tema: 07

Trombofilna stanja: laboratorijska dijagnostika i kontrola terapije

Thrombophilic Status: Laboratory Diagnostics and Therapy Control

07/P1

OSJETLJIVOST APC REZISTENCIJE U OTKRIVANJU HETEROZIGOTA I HOMOZIGOTA ZA F V LEIDEN

Sensitivity of APC Resistance in Detection of Heterozygotes and Homozygotes for F V Leiden

¹Brkljačić V, ¹Zadro R, ²Coen D,
¹Stavljenič-Rukavina A.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ²Centralni laboratorij Klinike za traumatologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Važan mehanizam u regulaciji aktivacije zgrušavanja je sustav proteina C. Komponente ovog sustava su protein C i njegov kofaktor protein S koji proteolitički inaktiviraju F V i F VIII. Poremećaj u putu zgrušavanja proteina C često se raspoznaće kao heterozigotni ili homozigotni rizik za venske tromboze čiji su uzroci manjak proteina C ili proteina S ili slab antikoagulacijski odgovor na aktivirani protein C (APC rezistencija). 95% APC rezistencije uzrokovano je točkastom mutacijom u genu za F V na položaju 1691 (F V Leiden). Ova mutacija prijeći proteolitičku inaktivaciju F V s aktiviranim proteinom C. Osnova za molekularnu analizu F V Leiden je laboratorijsko određivanje APC rezistencije.

U ispitivanju je bilo uključeno 104 bolesnika s obiteljskom ili idiopatskom trombozom. Svim bolesnicima određen je omjer APC/FV i F V Leiden. Zbog veće osjetljivosti reagensa na F V u uzorku, APC omjer određen je uz dodatak F V deficijentne plazme koagulacijskom metodom s testovima tvrtke Behring na instrumentu Behring Coagulation Timer. F V Leiden određen je tehnikom lančane reakcije polimeraze cijepanjem umnoženih ulomaka restriktivskim enzimom Hind III (Greengard, Thromb Res 1995;80:441-3).

Analizom dobivenih rezultata kod 8,4% (93) bolesnika nadjeni su omjer APC/F V 2,3-4,1 i negativan F V Leiden; 9,6% (10) bolesnika nositelji su F V Leiden uz omjer APC/F V 1,3-2,1, a jedan bolesnik je homozigot za F V Leiden uz dobiven omjer APC/F V 1,9.

S obzirom na naše ispitivanje nositelji F V Leiden su bolesnici čiji je omjer APC/F V < 2,1. Određivanje APC rezistencije važan je pokazatelj trombofilije u genetski uvjetovanoj venskoj trombozi.

07/P2

UČESTALOST MUTACIJE 20210 G→A U GENU ZA PROTROMBIN U POPULACIJI BOLESNIKA S VENSKOM TROMBOZOM U HRVATSKOJ

Prevalence of the Prothrombin 20210 G→A Gene Mutation Among Croatian Patients with Venous Thromboembolism

¹Zadro R, ²Coen D, ³Honović L, ¹Banfić Lj,
⁴Kozulić M.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ²Centralni laboratorij Klinike za traumatologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. ³Centralni laboratorij Opće bolnice Pula, Pula. ⁴Guest Elchrom Scientific, Cham, Švicarska

Mutacija u genu za protrombin 20210 G→A, uvrštena nedavno medu rizične čimbenike venske tromboze, nađena je u približno 6% bolesnika s tom bolesti. Laboratorijska dijagnostika ovog poremećaja osniva se isključivo na analizi DNA. U ovom radu ispitana je učestalost ove mutacije medu 149 bolesnika s najmanje jednom pojmom venske tromboze (47 muškaraca, 102 žene) te u skupini 46 zdravih ispitanika (12 muškaraca, 34 žene).

Polimerazna lančana reakcija izvedena je prema Poort-u i sur. (Blood 1996;88:3698) uz elektroforetsku detekciju produkata na gelovima Spreadex (Guest Elchrom Scientific, Cham, Švicarska). Dodatno je u istim skupinama ispitanika izvršeno pretraživanje ostalih poznatih nasljednih i steničnih čimbenika rizika tromboze (lupus antikoagulant, FVIII, FXII, antitrombin, protein C, protein S, plazminogen, ukupni i slobodni protein S, APC rezistencija i FV Leiden). Medu svim ispitanicima pronađen je heterozigotni oblik FII 20210A kod 7 bolesnika (4,7%) i 1 zdravog ispitanika. Izolirani nedostatak antitrombina (n=3), proteina

C (n=5), proteina S (n=5) naden je kod 13 bolesnika (8,7%). Kod 14 od 149 bolesnika (9,4%) naden je FV Leiden (13 heterozigota, 1 homozigot). Kod 30 bolesnika (20%) nadene su visoke vrijednosti FVIII (n=23), pozitivan lupus antikoagulant (n=5) i snižena aktivnost FXII (n=2) kao jedini čimbenik rizika. Dodatno kod 2 bolesnika (1,3%) nadeno je više od 1 poremećaja: heterozigotni oblici FII 20210A i FV Leiden kod jednog bolesnika te FV Leiden i nedostatak proteina C kod drugog bolesnika. U zaključku, učestalost FII 20210A povećana je kod bolesnika s venskom trombozom i slična je već objavljenim rezultatima. Dodatno nadeni poremećaji u istoj skupini ispitanika podržavaju preporuku za cijelokupnom laboratorijskom obradom kod svih bolesnika sa sklonošću trombozi.

07/P3

ANALIZA TROMBELASTOGRAMA (TEG) U BOLESNIKA S DUBOKOM VENSKOM TROMBOZOM (DVT)

Thromboelastogram Analysis in Patients with Deep Venous Thrombosis

Raić B, Koprčina M, Stančić V, Gaćina P.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti
Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Duboka venska tromboza (DVT) te posljedična tromboembolija zbog svoje učestalosti spadaju u sam vrh medicinskih i bioloških problema. Iako rezultati laboratorijskih analiza nisu odlučujući u dijagnostici DVT-a, njihovo značenje u prosudjivanju koagulabilnosti dodatni je pokazatelj koji omogućuje tumačenje tih složenih procesa. To vrijedi osobito za analize koje daju uvid u ukupnu koagulabilnost kao što je metoda trombelastografije (TEG).

Ispitivanjem je obuhvaćeno 40 bolesnika; 26 žena i 14 muškaraca u dobi od 28-50 godina s jasno izraženim znakovima DVT-a. Kod ispitanih bolesnika DVT nije bila posljedica malignih bolesti.

TEG parametri određuju pojedine faze mehanizma zgrušavanja i fibrinolize u uzorcima plazme ispitanika odredivali smo "klasične" i "matematičke" TEG parametre.

"Klasični" TEG parametri: (broj bolesnika: 40)

	"r"(min.)	"k"(min.)	"ma"(mm)
x _{sd}	5,96	2,11	70,9
±sd	±0,83	±0,15	±1,52

"Matematički TEG parametri (broj bolesnika: 40)

	r [*] (min)	k [*] (min)	X _r [*] (min)	y _r ^{**} (mm)	A ^{**}	a ^{**}	tg a ^{**}	X _a [*] (min)	β ^{**}	tg β ^{**}
x	4,9	43,8	3,3	11,02	150	69,58	7,06	35,43	167,29	-0,02
±sd	0,35	1,41	0,4	0,35	30	2,41	3,6	2,79	5,65	0,2

(*) mjereni TEG parametri

(**) računani TEG parametri

Na osnovi dobivenih rezultata TEG parametara možemo zaključiti:

1. I "klasičnim" i "matematičkim" TEG parametrima procjenjujemo hiperkoagulabilnost.
2. "Matematički" TEG su u većem postotku u području hiperkoagulabilnosti (80-97,5%).
3. "Matematički" parametri β i $\text{tg}\beta$ daju uvid u područje fibrinolize (12,6).
4. "Matematički" TEG parametri potpunije označuju i mehanizam zgrušavanja i fibrinolize u procjeni trombofilija.

07/P4

ODREDIVANJE KONCENTRACIJE D-DIMERA U TRAUMATIZIRANIH BOLESNIKA

Determination of D-Dimers in Traumatic Patients

Bronić A, Coen D, Pavić M, Zoran M.

Centralni laboratorij Klinike za traumatologiju, Zagreb

Traumatizirani bolesnici spadaju u skupinu bolesnika kod kojih često dolazi do poremećaja ravnoteže stvaranja fibrina (koagulacija) i njegove razgradnje (fibrinoliza). Razlog je ozljeda tkiva (aktivacija puta zgrušavanja), mobiliziranje proteina akutne faze i pad koncentracije čimbenika neophodnih za održavanje ravnoteže koagulacija / fibrinoliza. Oko 20% traumatiziranih bolesnika razvije duboku vensku trombozu.

Molekulski biljezi fibrinolize pogodni su za otkrivanje hiperkoagulabilnosti i rizika nastanka tromba. Ispitali smo 86 bolesnika, 36 muškaraca i 50 žena. Dob bolesnika bila je od 21 do 89 godina (x = 55). Koncentracija D-dimera određivana je imunometrijski (sendvič tehnika), reflektometrom NycoCard Reader II.

Od ukupnog broja bolesnika 40 je bilo s prijelom bedrene kosti, 13 su bile opeklne veće od 30% površine tijela, prijelom potkoljenice imalo je 19 bolesnika, a 14 je bilo politrauma. Pri dolasku 74% bolesnika ima povišene koncentracije D-dimera. Najviše koncentracije zabilježene su u skupini politraume (3,2 mg/L), slijede prijelom bedrene kosti (2,96 mg/L), prijelom potkoljenice (1,1 mg/L) i opeklne (0,6 mg/L).

Porast koncentracije D-dimera ukazuje na snažnu aktivaciju procesa fibrinolize. Traumatizirani bolesnici su visoko rizična skupina bolesnika s tendencijom razvijanja tromboembolijske bolesti, stoga je praćenje razine D-dimera korisno u procjeni progresije trombofilije.

07/P5

THE STUDY OF PLATELET AGGREGATION PROFILES IN CD1 MICE

Agregacija trombocita u CD1 miševa

¹Glojnarić I, ²Zadro R.

¹PLIVA Research Institute, Pharmacology Department, Zagreb. ²Clinical Hospital Center, Zagreb, University School of Medicine, Clinical Institute of Laboratory Diagnosis, Zagreb

In this study, we compared the effects of different agonists on platelet aggregation in mice, establishing the best procedures from blood sampling to the aggregation shape interpretation.

The experiment was carried out on 14 male and 16 female drug naive CD1 mice. The study of aggregation profiles was performed in platelet-rich plasma samples with 3 agonists: adenosine diphosphate (ADP) 2 μM, ristocetin 1 mg/ml and arachidonic acid 1.5 mM. The monitoring lasted for 6 minutes. The results were expressed as a percentage of aggregation relative to platelet poor plasma.

The percentage of maximal aggregation induced with 1.5 mM arachidonic acid ranged over 79-98% in male mice and 79-100% in female mice. The response to 1 mg/ml ristocetin was 3-75% in male mice and 12-79% in female mice, while with 2 μM ADP the maximal aggregations were 13-71% in male mice and 46-80% in female mice. Aggregation with the various agents using 2 or 3 samples from the same animal showed that the

aggregation response to arachidonic acid was greater than to the other agonists involved.

Obviously, induction of platelet aggregation with 1.5 mM arachidonic acid gives the best response in the CD1 mice population and can be used as the primary aggregation agonist.

07/P6

DETERMINATION OF REFERENCE INTERVALS FOR PROTHROMBIN TIME (PT) AND ACTIVATED PARTIAL THROMBOPLASTIN TIME (APTT) IN CD1 MICE

Određivanje referentnog intervala za protrombinsko vrijeme i aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme u CD1 miševa

Glojnarić I.

PLIVA Research Institute, Pharmacology Department, Zagreb

The aim of our study was to determine the reference intervals for the two coagulation tests: prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) in CD1 mice.

Reference sample group comprised 50 male and 50 female drug naive CD1 mice. Measurements were performed using Behring coagulation reagents, and the results were expressed as clotting time in seconds. Collected values were partitioned into subclasses according to sex and displayed graphically in histograms. Reference PT values ranged from 7.0 to 18.2 sec for female mice, while for the male mice values ranged from 5.7 to 14.7 sec. The range of reference of APTT values was 22.1-45.1 sec for female mice and for male mice it was 22.6-35.7 sec. The coefficients of variations were within the acceptable range (6.75-10.08%). The histograms were visually inspected for skewness, kurtosis and bi- or poly-modality. The outliers were identified and discarded, the reference limits were calculated (mean value ±2 standard deviations) and, finally, the reference intervals were defined.

The reference intervals determined were as follows: for male CD1 mice, PT reference interval was 6.9-9.1 sec; APTT reference interval was 21.6-33.6 sec. For female CD1 mice PT reference interval was 7.2-9.6 sec and APTT reference interval was 22.1-31.9 sec.

Posterska podsekcija: 08-1
Bolesti hematopoetskog sustava
Diseases of Hematopoetic System

08-1/P1

**EVALUACIJA REZULTATA
DIFERENCIJALNE KRVNE SLIKE IZ
KAPILARNE KRVI NA COULTER-
COUNTER S-PLUS JR**

Evaluation of Results of Differential Analysis of Capillary Blood on Coulter-Counter S-Plus Jr.

Getaldić B, Raić B, Stanić V, Koprčina M.

Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti
Kliničke bolnice "Seestre milosrdnice", Zagreb

Za kapilarnu krv, koja je česti uzorak u hematološkom laboratoriju, nema podataka o procjeni pouzdanosti diferencijalne krvne slike učinjene na Coulterovim automatskim analizatorima.

Referentna metoda za usporedbu rezultata manualno/vizualnom metodom i automatskim analizatorom je H-20-T protokol koji je prihvatio U.S. NCCLS i NCSLH. Cilj našeg rada bio je ispitati pouzdanost rezultata klasifikacije leukocita dobivenih na Coulter-ovom analizatoru iz uzorka kapilarne krvi. Uzorci kapilarne krvi bili su od dvije skupine ispitanika a) zdravih - bez oznaka na nalazu diferencijalne krvne slike (N=50), b) bolesnika Zavoda za hematologiju (N=50).

Uzorce smo analizirali na analizatoru (srednja vrijednost tri određivanja) i vizualno/manualnom metodom (srednja vrijednost 4 nezavisna diferenciranja). Dobivene rezultate klasificirali smo prema protokolu H-20-T koji određuje preciznost brojača. Rezultati našeg ispitivanja pokazali su da je: postotak slaganja normalnih rezultata Al = 82%, lažno normalni FN = 4% i lažno abnormalnih FA=14%. Koeficijent korelacije za granulocite vizualno/manualnom metodom i analizatorom r=0,928, za limfocite r=0,980 i za mononuklearne stanice r=-0,154. Iz rezultata možemo zaključiti:

- da su nalazi diferencijalne krvne slike učinjene iz uzorka kapilarne krvi na Coulterovom analizatoru S- Plus JR u potpunosti prihvatljivi ukoliko nema oznaka sumnje;
- da postoji prihvatljiva korelacija postotka limfocita i granulocita

- da je znakovito povišen broj nalaza s lažno povišenim vrijednostima mononuklearnih stanica.
- da je svaki uzorak s oznakom sumnje potrebno mikroskopski provjeriti.

08-1/P2

**RAZLIKE U PARAMETRIMA KRVNE
SLIKE PRI ODREĐIVANJU IZ
MICROTAINERA I VACUTAINERA U
RUTINSKOM RADU**

Differences in Parameters of Blood Count During Microtainer and Vacutainer Routine Determinations

Kardum A, Maravić A.

Medicinsko-biokemijski laboratorij A. Kardum i A. Maravić,
Valpovo

Metodom slučajnog odabira uzeli smo od 95 različitih bolesnika uzorke i venske i periferne krvi koristeći pritom zatvoreni sustav Becton Dickinson, i to vacutainer od 3 ml K₂EDTA za vensku i microtainer s EDTA za perifernu krv.

Uzorci su uzeti za određivanje krvne slike i analizirani su zajedno s ostalim uzorcima toga dana. Analizu smo radili na osamparametarskom hematološkom brojaču Coulter AcTS. Svaki uzorak analiziran je u duplikatu, a parametri izraženi kao srednja vrijednost.

Cilj našega rada bio je odrediti i prikazati odstupanje pojedinih parametara krvne slike uzete u microtainer od istih parametara iz venskog uzorka.

Za svaki parametar smo odredili postotak odstupanja i njegovu apsolutnu vrijednost te minimalnu, maksimalnu i srednju vrijednost apsolutne vrijednosti odstupanja. Grafički smo prikazali odnos pojedinačnih parametara dobivenih određivanjem iz microtainera i vacutainera, a odstupanja smo prikazali preko histograma učestalosti odstupanja po parametrima.

Srednja vrijednost apsolutne vrijednosti odstupanja za leukocite iznosila je 4,87; za eritrocite 4,07; za hemoglobin 4,35; za hematokrit 4,03 i za trombocite 3,98%. Prosječno odstupanje eritrocitnih konstanti iznosilo je 0,95%.

Zbog dokazanih razlika preporučamo da se na nalaže navede vrsta uzorka ili da se krvna slika zbog što točnijeg praćenja parametara kod istog bolesnika uvijek uzme na isti način.

08-1/P3

IZOENZIMI LDH U INFEKCIOSNOJ MONONUKLEOZI**LDH Isoenzymes in Infective Mononucleosis****Tadijanović M, Pandak N.**

Biokemijski laboratorij Opće bolnice "Dr. Josip Benčević", Slavonski Brod

Infekcionska mononukleoza (IM) akutna je i najčešće benigna balest uzrokovana Epstein-Barrovim virusom iz roda Herpes. Bolest se očituje serološkim promjenama: povećane su vrijednosti mononuklearnih stanica u 90% slučajeva, aktivnost AST u 70% slučajeva i LDH vrijednosti u 100% slučajeva. Glavni izoenzimi LDH 1, 2 i 3 povećavaju vrijednosti ukupnog LDH, dok se samo u 30% slučajeva može naći povišena LDH5 frakcija (jetrena).

Broj mononuklearnih stanica u krvi normalizira se u svih bolesnika nakon 5 tjedana, vrijednosti AST nakon 10 tjedana, a vrijednosti LDH 1, 2 i 3 rasle su i nakon 14 mjeseci od pojave prvih simptoma.

Rezultati pokazuju da je utjecaj jetre na povećanje vrijednosti slab i kratkotrajan. Proliferacija limfoidnih stanica tkiva vjerojatno je odgovorna za glavno povećanje LDH vrijednosti kroz duži period.

Određivanje izoenzima LDH i AST pruža nam korisnu informaciju o patološkim procesima u tkivu jer je osobito važno koliko se dugo zbiva proliferacija limfoidnih stanica u tkivu u bolesnicima sa seropozitivnom IM. Na taj način stidimo bolesnika, jer ne možemo stalno uzimati bioptički materijal.

Praktično značenje rezultata očituje se u tome što je određivanje izoenzima LDH test koji je osjetljiv duži period nego AST test. Kako je povećanje LDH karakteristično za nekomplikirane slučajeve, potrebno je kontrolirati bolesnike u kojih se povećava LDH vrijednosti.

08-1/P4

VRIJEDNOST ODREDIVANJA FERITINA U PROCJENI AKTIVNOSTI NEKIH AUTOIMUNIH BOLESTI POVEZANIH S ANEMIJOM

Role of Ferritin Determination in Evaluation of Activity of some Autoimmune Diseases Associated with Anemia

**Romić Ž, ¹Morović-Vergles J, ²Poljak-Blaži M,
¹Petrovečki M.**

¹Centralni laboratorij Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb, ²Institut Ruđer Bošković, Zavod za molekularnu medicinu, Zagreb

Feritin nastaje u jetri poticajem različitih interleukina (IL-1, IL-6, IL-11) i leukemija inhibišućeg čimbenika. Kao i C-reaktivni protein (CRP) pripada skupini proteina akutne faze upale. U radovima je opisano da feritin ima različito biološko djelovanje pa je tako poznato da inhibira stvaranje E-rozeta, smanjuje mogućnost fagocitoze granulocita i inhibira stvaranje protutijela u B-limfocitima. Feritin je ujedno i važan čimbenik regulacije granulomijelopoeze. Feritin sadrži i prenosi željezo koje, među ostalim, katalizira stvaranje toksičnih hidroksilnih radikalova.

Zbog navedenog djelovanja povećano stvaranje feritina može uzrokovati oštećenje tkiva u bolesnika s autoimunim bolestima. U ovom smo pilot-istraživanju upravo kod takvih bolesnika s dokazanim aktivnošću bolesti i anemijom tipičnom za kroničnu bolest mjerili koncentraciju feritina, transferina, slobodnog željeza i TIBC.

Istraživanje je obuhvatilo 4 bolesnika s nefritisom (sedimentacija eritrocita, SE 8-36 mm/lh, Erc 3,3-3,4x10¹²/L, Hb 93-108 g/L, Hct 0,28-0,31 L/L; CRP negativni), 5 bolesnika s reumatoidnim artritisom (SE 35-83 mm/lh, Erc 3,3-4,7x10¹²/L, Hb 102-120 g/L, Hct 0,28-0,36 L/L, CRP pozitivni) i 3 bolesnika s reaktivnim artritisom (SE 60-105 mm/lh, Erc 3,8-4,7x10¹²/L, Hb 118-136 g/L, Hct 0,35-0,4 L/L; CRP pozitivni). Koncentracija feritina je u bolesnika s nefritisom iznosila 100-126 µg/L (Fe 3-8,3 µmol/L, TIBC 60-69 µmol/L, transferin 1,7-2 g/L), a u bolesnika s reumatoidnim artritisom 59-340 µg/L (Fe 5,2-12 µmol/L, TIBC 45-62 µmol/L, transferin 1,2-1,7 g/L), a u bolesnika s reaktivnim artritisom 316-511 µg/L (Fe 5,6-15,6 µmol/L, TIBC 60-75 µmol/L, transferin 1,3-2,1 g/L).

Razina feritina u serumu nije povišena u bolesnika s nefropatijom, ali su veće vrijednosti pronađene u bolesnika s reumatoidnim i reaktivnim artritisom. Usto, pronađena je razmjerna povezanost razine feritina i brzine sedimentacije eritrocita. U kasnijim ponavljanim mjeranjima koncentracija feritina bila je niža uz istodobno smanjivanje bolesti nakon započetog liječenja, što uka-

zuje da bi se feritin mogao upotrijebiti kao biljeg za praćenje tijeka kroničnih autoimunih bolesti povezanih s anemijom.

08-1/P5

ZNAČAJ IMUNOFENOTIPIZACIJE U POTVRDI B-KRONIČNE LIMFOCITNE LEUKEMIJE (B-CLL) PANELOM PREPORUČENIH MONOKLONALNIH PROTUTIJELA

**Flow Cytometric Immunophenotyping in B-Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL)
Importance of Recommended Panel of Monoclonal Antibodies (MoAbs)**

¹Kardum MM, ¹Šiftar Z, ¹Nazor A, ²Kardum-Skelin I, ²Jakšić O, ²Marić-Bešić K, ²Jakšić B.

¹Zavod za kliničku hemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb. ²Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Koristeći specifična monoklonska protutijela usmjerena na odgovarajuće stanične površinske antigene, metodom imunofenotipizacije dokazuje se pripadnost hematopoetskih stanica nekoj od staničnih linija uz otkrivanje prisutnosti/odsutnosti pojedinih površinskih antigena razlikujući tako normalne od maligno promijenjenih stanica. Imunofenotipizacijska potvrda klinički utvrđene dijagnoze B-kronične limfocitne leukemije (B-CLL) metodom protočne citometrije podrazumijeva potvrdu visokog izražaja biljega CD5 na B-limfocitima (CD5+/B-ly) uz monoklonski izražaj lakih lanaca imunoglobulina (κ ili λ) i snažnu pozitivnost aktivacijskog biljega B-limfocita CD23.

Cilj istraživanja bio je utvrditi dostatnost preporučenog panela (American Society of Hematology, Working group on Chronic Lymphocytic Leukemia and Myeloma) specifičnih monoklonskih protutijela u imunofenotipizacijskoj potvrdi B-CLL. Ispitivani panel obuhvaćao je sljedeća protutijela: CD19, CD20, CD5, CD23, te specifična monoklonska protutijela na laki lance (κ ili λ) uz dodatak biljega CD22, CD24 i HLA D/DR. Analiza je učinjena na ukupno 238 uzoraka periferne krvi (PK) i koštane srži (KS) bolesnika s klinički potvrđenom dijagnozom B-CLL (108 bolesnika; 52

ž / 56 m prosječne dobi 62,5 g). Izražaji staničnih površinskih biljega (CD) na uzorcima PK i KS prikazani su kao srednje vrijednosti (%) dobivenih pozitivnosti (*u postocima, %*) i navedeni u tablici.

Iako primarni panel preporučuje upotrebu monoklonskih protutijela na B-stanične antigene CD19 i/ili CD20, zaključujemo da je u nedostatku istih u ispitivani panel moguće uključiti i CD24, odnosno HLA D/DR radi visoke pozitivnosti i usporedivosti njihovih izražaja u različitim tumorskim odjeljcima (KS i PK). Pozitivan izražaj biljega CD5+/B-ly veći je i snažniji ukoliko se odreduje uz biljeg CD20, dok slab izražaj biljega CD22 ne opravdava njegovu primjenu u slučajevima B-CLL. Veličine ispitivanih leukemijskih populacija (%) kao i izražaji svakog pojedinog staničnog površinskog biljega u različitim su tumorskim odjeljcima (PK i KS) u potpunosti usporedivi u dobivenim srednjim vrijednostima izražaja. Iako je njihova pozitivnost jača i izraženija u uzorcima KS no u uzorcima PK, njihovi visoki izražaji mogli bi ukazivati na dostatnost imunofenotipizacije periferne krvi u rutinskoj dijagnostici B-CLL kao lakše dostupnog materijala za uzorkovanje.

08-1/P6

ZNAČAJ STANIČNOG MEMBRANSKOG BILJEGA AKTIVACIJE CD23 (mCD23) I NJEGOVOG TOPLJIVOGLIKA (sCD23) U B-KRONIČNOJ LIMFOCITNOJ LEUKEMIJI (B-CLL)

The Correlation of the Membrane activation Antigen CD 23 (mCD23) Expression and its Soluble Form (sCD23) in B-Chronic Lymphocytic Leukemia (B-CLL)

¹Kardum MM, ¹Šiftar Z, ¹Nazor A, ²Jakšić O, ²Kušec R, ²Jakšić B.

¹Zavod za kliničku hemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb. ²Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Membranski biljeg aktivacije B-limfocita CD23, (mCD23), sudjeluje u prijenosu i oblikovanju signala neophodnih u procesu njihove diferencijacije upravljujući i njihovim rastom. Proteoličkom razgradnjom mCD23 nestaje s membrane B-limfocita, oslobada se u serum uz nastajanje

Uzorci (broj)	Izražaj (%)	Veličina leuke-mijske popu-lacije	CD 19	CD 20	CD 22	CD 23	CD 24	HLA D/DR	CD5+ na B-limfocitima	κ -laci lanci	λ -laci lanci	CD5+ CD19+	CD5+ CD20
KS (106)	(X)	85,0	84,9	78,7	28,6	54,6	74,1	87,6	73,7	64,4	32,2	73,3	92,2
PK (138)	(X)	84,0	85,7	75,2	23,3	57,3	68,4	88,8	69,9	50,0	32,7	67,9	71,1

produkta razgradnje - topljivog oblika CD23 (sCD23). Povišene vrijednosti sCD23 uočene su u serumima oboljelih od B-CLL neposredno nakon postavljanja dijagnoze, odnosno u razdoblju kada je bolest klinički aktivna.

Cilj rada bio je otkriti i proučiti međuovisnost mCD23 i njegovog solubilnog oblika sCD23 u bolesnika s B-CLL. Imunofenotipizacijom B-leukemijskih stanica od 145 oboljela od B-CLL (66 ž/79 m; prosječne dobi 61 godina) izdvojena su 43 s pozitivnim imunofenotipizacijskim izražajem mCD23 ($\geq 20\%$) i nakon terapijskog tretmana, te neuobičajenom kliničkom slikom B-CLL u serumima kojih su odredene vrijednosti sCD23 (CD23 ELISA Kit, SEROTEC, England). Pozitivna višestruka regresijska analiza uz mCD23 kao ovisnom veličinom, osim sCD23, obuhvatila je sljedeće ispitivane varijable: a/ kliničke (dob, veličinu ukupne tumorske mase, veličinu limfnog čvora, klinički utvrđene stadije bolesti prema Rai i Binetu, apsolutni broj leukocita i limfocita u trenu uzorkovanja, i b/ imunofenotipizacijske (izražaje staničnih površinskih biljega CD 19, CD20 i CD5 na B-limfocitima (CD5+/B). Dobiveni koeficijenti korelacije i razine vjerojatnosti (uz koeficijent pozitivne korelacije $r=+1,00$ i statističku značajnost $p<0,050$) prikazani su u tablici.

Kao ovisna veličina, mCD23 ne pokazuje statistički značajnu povezanost sa sCD23, kao niti s jednim kliničkim parametrom, osim granične statističke značajnosti s veličinom limfnog čvora. Izražaj biljega mCD23 ovisan je i slijedi porast izražaja drugih biljega na B-leukemijskim stanicama (CD19, CD20, CD5+/B) što ukazuje da je mCD23 biljeg novoaktiviranih, "dugoživućih" B-leukemijskih stanica u B-CLL. Uočene visoke koncentracije sCD23 u svih ispitivanih uzoraka najvjerojatnije su posljedica povećane razgradnje membranskog oblika ovog biljega u B-CLL, što bi ukazivalo na mogući obrnuto razmjeran odnos medu njima. Stoga je neophodno sCD23 dovesti u svezu s kliničkim karakteristikama B-CLL i istražiti njegov mogući značaj i ulogu kao prognostičkog faktora koji bi mogao ukazivati na raspodjelu i veličinu tumorske mase u progresiji ovog oblika B-limfoproliferacijske bolesti.

mCD 23 (ovisna veličina)	sCD 23	sCD 23	sCD 23	sCD 23	Apsolutni broj		Klinički stadiji				
					leukocita	limfocita	Veličina tumorske mase	Rai	Binet	Veličina limfnog čvora	Dob (godine)
<i>p</i>	,1112 NS	,0083	,0005	,0034	,0985 NS	,0813 NS	,1225 NS	,9103 NS	,5629 NS	,0592 NS	,9608 NS
<i>r</i>	0,26	0,42	0,54	0,49	0,28	0,29	0,26	0,02	0,01	0,31	0,01

cision. Good relationship between cost, performance together with the volume of blood ($70\mu\text{l}$) needed for analysis predestinates this system for use by private doctors and is a very effective means to achieve better patient care at the Point of Care hematology testing.

08-1/P8

ZNAČAJ ENDOTELINA U RAZLIČITIM STUPNJEVIMA DEKOMPENZACIJE BOLESNIKA S ALKOHOLNOM CIROZOM JETRE

Endothelin in Various Degrees of Alcoholic Liver Cirrhosis Patients

Antoljak N, Peran N, Topić E.

Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Endotelin (ET) je snažan vazokonstriktivni peptid koji sadrži 21 aminokiselinu. Sintetizira se i izlučuje iz endotelijalnih stanica u obliku preproendotelina, nakon čega nastaje intermedijarni produkt, veliki endotelin. Najznačajniji je učinak endotelina na kardiovaskularnu i bubrežnu funkciju. Povišenje razine ET I zapaženo je u nizu bolesti povezanih s poremećajem sistemske cirkulacije, posebice u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre (ALC).

Cilj rada je bio odrediti značaj mjerjenja ET I u blaže i teže dekompenziranih bolesnika s alkoholnom cirozom jetre.

ET I je mjerena u plazmi 42 zdrava dobrovoljca i 28 bolesnika s dekompenziranom alkoholnom cirozom jetre. Bolesnici su uključeni na osnovu biokemijskih i kliničkih kriterija. Razina ET I mjerena je s pomoću ELISA ET I-21 testa (Biomedica, Graz, Austria) s pragom osjetljivosti $0,05 \text{ pmol/l}$. Statistička analiza učinjena je s pomoću SigmaStat Jendel i Excel kompjutorskog programa. Razlike između podskupina testirane su Studentovim t-testom ili Mann-Whitneyevim testom, korelacije između biokemijskih pokazatelja i ET I s pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacijske, a klinička pouzdanost ROC analizom.

Razine ET I su bile značajno više u skupini bolesnika nego u zdravim ispitanika (ciroze 0,6, raspon 0,4-0,95; vs. zdravi ispitanici 0,1, raspon 0,1-0,6 pmol/l, $p<0,001$). Značajna korelacija nadena je između stupnja dekompenzacije (temeljene na Child-Pughovoj klasifikaciji) i ET I vrijednosti. Razine ET I su značajno više u bolesnika skupine Child C nego u skupini B ($p=0,0003$). Razine ET I bile su više u bolesnika s prisutnim ascitesom, no ta razlika nije statistički značajna.

Klinička pouzdanost ET I je vrlo visoka u bolesnika s alkoholnom cirozom jetre ($r=0,912$), tako da može biti koristan biljež razvijenih vaskularnih promjena i cirkulacijskog poremećaja u tih bolesnika.

Posterska podsekcija: 08-2

Bolesti jetre

Liver Diseases

08-2/P1

PNEUMOTORAKS, BOLEST JETRE, ATOPIJA, ASTMA I EMFIZEM PLUĆA U BOLESNIKA S MANJKOM ALFA-1-ANTITRIPSINA

Pneumothorax, Liver Disease, Atopia, Asthma and Pulmonary Emphysema in Patients With Alpha-1-Antitrypsin Deficiency

Dodig S, Živčić J, Raos M, Bela Klancir S, Žuntar I, Tešija A, Topić E.

¹Specijalna bolnica za bolesti dišnog sustava djece i mladeži, Zagreb.

²Klinički zavod za kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

Alfa-1-antitripsin (α -1-AT) je glikoprotein kojeg stvaraju hepatociti i u manjoj mjeri alveolarni makrofagi. Djeluje kao izvanstanični inhibitor

proteaza, prvenstveno neutrofilne elastaze, ali i drugih serinskih proteaza koje mogu potjecati iz leukocita, alveolarnih makrofaga i mikroorganizama. α -1-AT inaktivira proteolitičku aktivnost proteaza. U nedostatku antiproteaza proteolitički enzimi izazivaju leziju elastinskih vlakana te tako uništavaju alveolarne membrane.

Prikazana su dva bolesnika s nedostatkom α -1-AT. Kod prvog bolesnika, 4-godišnje djevojčice, bolest se u tijeku akutne respiracijske infekcije očitovala masivnim pneumotoraksom desno. Elektroforezom je ustanovljen manjak alfa-1-globulinske frakcije bjelančevina, a koncentracija α -1-AT u serumu iznosila je $0,53 \text{ g/L}$. Fenotipizacijom i genotipizacijom dokazana je u djevojčice varijanta PiZZ, a u roditelja i mladega brata varijanta PiMZ. Utvrđene su i povećane katalitičke koncentracije aminotransferaza i kolinesteraze, što uka-

zuje na bolest jetre. Drugi bolesnik je bio s koncentracijom α -l-AT od 0,50 g/L (fenotipizacija i genotipizacija nisu učinjene jer bolesnik - prognanik nije zbog rata došao na obradu). Budući da su i ostali članovi obitelji imali smanjenu količinu α -l-AT, moglo bi se zaključiti da se radi o jednoj od nasljednih varijanti nedostatka α -l-AT. Bolesnik je istodobno imao atopijske bolesti, perudnu hunjavicu i astmu.

08-2/P2

**CINK I CINK-VEZUJUĆI ENZIMI
TIJEKOM RANOГ PERIODA
KOMPENZACIJSKOG RASTA JETRE**
**Zinc and Zinc-Binding Enzymes During
Early Period of Compensatory Liver
Growth**

¹Domitrović R, ¹Milin Č, ²Verbanac D,
²Stasić-Radošević B.

Zavod za kemiju i biokemijsku Medicinsku fakultetu Sveučilišta u Rijeci, Rijeka, ¹Pliva, Istraživački institut, Zagreb, ²Zavod za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci, Rijeka

Kompenzacijski rast jetre je strogo kontroliran proces proliferacije parenhimske i neparenhimske stanice. Nastaje kao odgovor na različita oštećenja tkiva jetre, uključujući i parcijalnu hepatektomiju. Kompenzacijski rast jetre predložen je kao model za proučavanje proliferacije, procesa s kojim se na osobit način susrećemo kod rasta tumora.

U pokusu su korišteni mužjaci Balb-c miševa starosti 2,5-3,5 mjeseca. Miševi su žrtvovani 24 i 48 sati (rani period kompenzacijskog rasta) nakon 1/3 parcijalne hepatektomije, odnosno lažne hepatektomije (kontrolna skupina). U plazmi, jetri, timusu, slezeni, bubregu i mišiću odredena je koncentracija cinka, a u jetri katalitička koncentracija alkalne fosfataze i 5'-nukleotidaze.

Cink je, preko brojnih enzima i metaloproteina, uključen u procese rasta i razvoja. U ranom periodu kompenzacijskog rasta jetre kod miševa dolazi do "pomaka" cinka iz plazme u jetru. Smanjenje koncentracije cinka u plazmi je najveće nakon 48 sati, a prati ga porast koncentracije cinka u jetri. Porast koncentracije cinka u timusu najveći je 24 sata nakon parcijalne hepatektomije. Navedene promjene nisu opažene u slezeni, bubregu i mišiću. Koncentracija cinka odredena je s pomoću ICP spektrometra.

Katalitička koncentracija alkalne fosfataze i 5'-nukleotidaze u jetri mijenja se tijekom ranog perioda rasta jetre sukladno porastu koncentracije cinka u jetri. Alkalna fosfataza katalizira veliki

broj hidrolitičkih i fosforilacijskih reakcija. Njezina je katalitička koncentracija u jetri povećana 48 sati nakon parcijalne hepatektomije. Navedeni porast smatra se prvenstveno posljedicom uključenosti ovog enzima u pretvorbu fosforilkolina u kolin te ekskreciju kolina u žuč, proces koji je pojačan tijekom kompenzacijskog rasta jetre.

Katalitička koncentracija alkalne fosfataze određena je u postmitohondrijskoj frakciji korištenjem standardnog testa prema Bowersu i McCombu.

U organizmu 5'-nukleotidaza sudjeluje prvenstveno u razgradnji purinskih i pirimidinskih nukleotida. Smatra se da kao dio sustava razgradnje RNA, omogućuje pojačanu biosintezu proteina nakon parcijalne hepatektomije. Katalitička koncentracija ovog kataboličkog enzima u jetri smanjena je 48 sati nakon parcijalne hepatektomije. Katalitička koncentracija 5'-nukleotidaze određena je u postmitohondrijskoj frakciji optičkim testom, metodom po Arkestejnju.

08-2/P3

**DVOGODIŠNJI PREGLED HBsAg
REAKTIVNOSTI U DAVATELJA KRVI
HRVATSKEGA ZAVODA ZA
TRANSFUZIJSKU MEDICINU (1997-1998.)
HBsAg Eia Test Reactivity in Blood Donors
of Croatian Institute of Transfusion Medi-
cine: Biannual Survey**

*Mihaljević I, Lovrić M, Pirc-Tiljak D, Balija M,
Grgičević D.*

Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb

HBsAg test je jedan od 4 obvezna testa kojima se ispituje krv davatelja na prisutnost biljega krvlju prenosivih bolesti (HBsAg, anti HCV, anti TP i anti HIV 1/2). Nakon uvodenja EIA testova s visokim vrijednostima cut off-a (CO) poput testa na anti HCV i anti HIV 1/2, promijenjeni su evaluacijski kriteriji reaktivnosti u HZTM. Tako se reaktivnim smatraju svi davatelji krvi čiji uzorak krvi pokazuje optičku gustoću (OD) veću od $0,85 \times CO$, što znači da se reaktivnima smatraju i svi uzorci unutar sive negativne zone (15% ispod CO vrijednosti). Na taj način umjetno se povećava osjetljivost testa, odnosno sigurnost krvi za transfuziju.

Primjena ovog pravila na HBsAg test kod kojeg je vrijednost CO vrlo niska (CO-0,030) dovodi do veće incidencije lažno pozitivnih rezultata.

U HZTM u ispitivanju HBsAg koriste se ravno-pravno testovi dva proizvođača, Ortho Clinical Diagnostic i Abbott Laboratories. 1998. promijenjen je dugogodišnji Abbott-ov test Auszyme novom poboljšanom generacijom, tzv. Auszyme dinamic.

Svrha rada je ispitati učinak promjene HBsAg testa na karakteristike HBsAg reaktivnosti i provjeriti opravdanost korištenja sive negativne zone u evaluaciji HBsAg reaktivnosti.

U periodu 1997.-1998. ispitano je ukupno 138965 doza krvi od čega 70294 u 1997., a 68671 u 1998. Algoritam potvrđivanja HBsAg uključivao je retestiranje istim testom u duplikatu, zatim drugim HBsAg testom i dodatnim HBV biljegom anti-HBc te isto iz novog uzorka krvi davatelja nakon 2 tijedna.

U 1998. zabilježen je porast HBsAg inicijalno reaktivnih (IR) davatelja krvi od 64% u odnosu na 1997. Istovremeno je zabilježen pad opetovanja reaktivnih (RR) u dvostrukom testiranju IR istim testom sa 46% u 1997. na svega 19% u 1998. Razlog tome je smanjena potvrdljivost Abbott-ovog testa u svim zonama reaktivnosti, dok Ortho-v HBsAg test pokazuje porast nepotvrdenih reaktivnosti u zoni visokih reaktivnosti.

Reaktivnost u sivoj negativnoj zoni predstavlja 30% ukupne početne HBsAg EIA reaktivnosti davatelja krvi HZTM u 1997.-1998. godini. Kako dodatna testiranja uzorka s reaktivnošću u sivoj negativnoj zoni nisu potvrdila hepatitis B virus (HBV) infekciju, treba razmotriti korisnost sive negativne zone u evaluaciji HBsAg reaktivnosti davatelja krvi u EIA testu. Konačnoj odluci pridonjela bi uporaba testa na HBV-DNA.

08-2/P4

REZULTATI JETRENIH BIOPSIJA I PATOLOŠKIH MONOETILGLICINKSILIDIDNIH (MEGX) TESTOVA

Results of Liver Biopsies and Pathological Monoethylglycinexylidide (MEGX) Tests

¹Zupančić M, ¹Sedmak M, ¹Logar-Car G,
²Ferlan-Marolt V.

¹Pedijatrična klinika, Ljubljana, Slovenija. ²Institut za patologiju, Medicinska fakulteta, Ljubljana, Slovenija

Kod djece s kliničkom slikom jetrene ciroze koja čekaju na transplantaciju jetre usporedivali smo rezultate patoloških MEGX testova s rezultatima histoloških biopsija jetre. Našu skupinu činilo je dvanaestero djece stare od 3,5 mjeseca do 18,5 godina.

Desetero djece imalo je ekstrahepatičnu bili-jarnu artreziju, ageneziju ili hipoplaziju, a dvoje djece kronični hepatitis.

Monoetilglicinksilid nastaje oksidacijskom N-deetilacijom uz pomoć jetrenog citokroma P₄₅₀ IIIA₁ sustava. Uzorke krvi za određivanje koncentracije MEGX uzeli smo prije i po aplikaciji lidokaina, (1

mg/kg tjelesne težine) u vremenskom intervalu od 0', 15', 30', 60', 120' i 240'. Koncentracije MEGX u serumu odredili smo s FPIA metodom na analizatoru FL/TD_x (Abbott).

Histološke pripravke obojili smo hematoksi-linom, eozinom i TR (trichrom Mason). Vrijednost MEGX testa $\leq 34 \mu\text{g/L}$ po 15 minuta definirali smo kao patološki rezultat.

U skupini djece s kliničkom slikom jetrene ciroze i patološkim MEGX testom, koji čekaju na transplantaciju jetre dokazali smo da histološka slika jetre u 50% primjera pokazuje sliku jetrene fibroze, a u 50% slučajeva sliku jetrene ciroze.

08-2/P5

N-ACETIL- β -D-GLUKOZAMINIDAZA U SERUMU ALKOHOLIČARA

N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Serum of Alcoholics

¹Ivić Ž, ²Juretić D, ³Tešija A, ³Topić E.

¹Dom zdravlja Garešnica, Garešnica. ²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku biokemijsku i hematologiju, Zagreb. ³Klinički zavod za hemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

N-acetil- β -D-glukozaminidaza (NAGA) je lizosomska hidrolaza prisutna u serumu zdravih osoba u niskim katalitičkim koncentracijama. Čini je skupina glikoproteinskih izoenzima koji se prema razlici u naboju molekule razdjeljuju u dva glavna oblika, NAGA-A i NAGA-B. S obzirom da se danas NAGA smatra jednim od biljega alkoholizma, cilj ovog rada bio je potvrđivanje vrijednosti određivanja njezine katalitičke koncentracije u serumu.

Katalitička koncentracija NAGA i njezinih izoenzima u serumu određivana je spektrofluorometrijskom metodom uz prethodno razdvajanje izoenzima NAGA-A i NAGA-B toplinskim inaktivacijom. Katalitičke koncentracije određivane su u 39 uzorka kontrolne skupine ispitanika, 19 uzorka skupine ispitanika s postavljenom dijagnozom ciroze jetre i 15 uzorka skupine ispitanika alkoholičara.

Rezultati određivanja pokazali su statistički značajnu razliku između katalitičkih koncentracija NAGA u skupini s cirozom jetre ($20,55 \pm 19,99 \text{ U/L}$) i skupini alkoholičara ($16,78 \pm 11,30 \text{ U/L}$) u odnosu na kontrolnu skupinu ($11,87 \pm 6,56 \text{ U/L}$). Također, utvrđeno je statistički značajno povišenje katalitičkih koncentracija NAGA i njezinih izoenzima u skupini s cirozom jetre i skupini alkoholičara u odnosu na kontrolnu skupinu.

Odnos katalitičkih koncentracija NAGA-A i NAGA-B (izražen u postocima od ukupne NAGA) statistički je značajno različit između kontrolne i

skupine alkoholičara, iz čega slijedi da se u skupini alkoholičara odnos izoenzima promjenio pa je u laboratorijskoj dijagnostici alkoholizma važno kako određivanje ukupne katalitičke koncentracije NAGA tako i njezinih izoenzima.

08-2/P6

ANTIGENA SPECIFIČNOST ANCA KOD BOLESNIKA S AUTOIMUNIM HEPATITISOM

Antigenic Specificities of ANCA in Patients with Autoimmune Hepatitis

¹Kozmar A, ¹Malenica B, ²Vucelić B, ²Ostojić R,

²Krenarić Ž.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ²Zavod za gastroenterologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

U zadnje vrijeme istraživanja su pokazala da bolesnici s nekim hepatobilijarnim bolestima imaju antineutrofilna citoplazmatska protutijela

(ANCA) koja su drugačije specifičnosti od onih povezanih sa sistemskim vaskulitisima. Mi smo ispitali učestalost i antigenu specifičnost ANCA kod tih bolesnika. Prisutnost ANCA je ispitana metodom indirektne imunofluorescencije na ljudskim granulocitima fiksiranim etanolom. Cito-plazmatski (cANCA), perinuklearni (pANCA) i atipični (aANCA) uzorak fluorescencije se smatra pozitivnim. Metoda Western blota je korištena za otkrivanje autoprotutijela koja karakteriziraju različite tipove autoimunog hepatitisa (AIH). Antigena specifičnost je analizirana metodom ELISA koristeći mijeloperoksida (MPO), lakoferin (LF) i katepsin G kao antigene. ANCA je otkrivena kod 17% (7/42) bolesnika s AIH, 6% (1/17) bolesnika s PBC i 7% (2/30) bolesnika sa SBC. Među bolesnicima s AIH ANCA su selektivno nađena kod 50% (6/12) bolesnika s tipom 1 AIH. Anti-MPO protutijela su nađena kod 33% (4/12), anti-LF kod 17% (2/12) i anti-katepsin G kod 8% (1/12) uzoraka seruma tih bolesnika. Ovi rezultati ukazuju da ANCA mogu biti korisni pri diferencijalnoj dijagnozi različitih tipova AIH.

Posterska podsekcija: 08-3 Bolesti kardiovaskularnog sustava Cardiovascular System Diseases

08-3/P1

UKUPNI HOMOCISTEIN KAO MOGUĆI ČIMBENIK RIZIKA CEREBROVASKULARNOGA OBOLJENJA

Total Homocysteine As a Possible Risk Factor of the Cerebrovascular Insufficiency

¹Vrhovski-Hebrang D, ¹Preden-Kereković V,
¹Flegar-Meštrić Z, ²Januš D, ²Hebrang A, ²Grga A,

¹Zavod za kliničku hemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb. ²Klinički zavod za radiologiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb. ³Odjel za vaskularnu kirurgiju Kirurške klinike Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Brojna epidemiološka istraživanja pokazala su da je umjereno povišena koncentracija ukupnoga homocisteina u plazmi/serumu nezavisno čimbenik za razvoj ateroskleroze koronarnih, moždanih i perifernih krvnih žila.

Cilj rada bio je pokazati u kojoj se mjeri homocisteinemija može smatrati nezavisnim čimbenikom rizika ateroskleroze moždanih arterija u ispitanih u kojih je angiografijom dokazano posto-

janje ateroskleroze u odnosu na kontrolnu skupinu, u kojoj je angiografijom isključeno postojanje ateroskleroze moždanih arterija.

Ispitivanjem je obuhvaćeno 75 ispitanih koji su prije angiografskog zahvata bila oduzeta krv za mjerjenje ukupnoga homocisteina, ukupnoga kolesterolja, triglicerida, HDL-kolesterolja, te LDL-kolesterolja.

Koncentracija homocisteina određena je FPIA imunokemijskim određivanjem na IMX analizatoru. Koncentracija ukupnoga kolesterolja, triglicerida, te direktnog HDL-kolesterolja određena je enzimskom PAP metodom na biokemijskom analizatoru Olympus AU-600. LDL-kolesterol određen je primjenom Friedewaldove formule. Čimbenici rizika ateroskleroze prikazani su i kao indeks ateroskleroze (LDL-kolesterol/HDL-kolesterol) te omjer ukupnoga kolesterolja/HDL-kolesterol.

Statističkom analizom utvrđeno je da nema značajne povezanosti koncentracija ukupnog homocisteina s dobi ispitanih, indeksom tjelesne

težine i s koncentracijama lipidnih sastojaka seruma kako u skupini bolesnika tako ni u kontrolnoj skupini. Dobiveni rezultati lipidnih sastojaka seruma izraženi kao medijan i 0,050-0,950 udjeli neparametarskih distribucija prikazani su u tablici.

Sastojak	Mjera	Kontrolna skup. (n=35)	Ispitanici (n=42)	p (ispitanici n/ kontrolna skup.)
Ukupni homocistein	µmol/L	12,1 (6,9-18,7)	12,8 (7,7-31,5)	N.S.
Triacilglicerol	mmol/L	1,8 (0,7-4,0)	1,8 (0,7-3,4)	N.S.
Ukupni kolesterol	mmol/L	5,8 (3,1-7,7)	5,9 (3,8-7,6)	N.S.
HDL-kolesterol	mmol/L	1,1 (0,6-1,5)	0,9 (0,6-1,4)	N.S.
LDL-kolesterol/HDL-kolesterol	-	3,5 (1,5-5,2)	3,9 (2,5-6,2)	N.S.
Ukupni kolesterol/HDL-kolesterol	-	5,3 (3,1-8,5)	5,9 (3,9-9,1)	N.S.

Dobiveni preliminarni rezultati, obzirom na ograničene promjene na velikim arterijama mozga, pokazali su da je umjereno povećana koncentracija ukupnoga homocisteina mogući nezavisan čimbenik rizika cerebrovaskularnoga obojenja.

08-3/P2

DOSADAŠNJA ISKUSTVA O DIJAGNOSTIČKIM MOGUĆNOSTIMA TROPONINA I

Past Experience on Diagnostic Possibilities of Troponin I

Krajnović V, Šimunović Z.

Centralni laboratorij Opće bolnice "Dr Josip Benčević",
Slavonski Brod

Troponin I spada uz troponin T, mioglobin i CK-MBmass, u skupinu modernih biljega akutnog infarkta miokarda. Karakteriziraju ga svojstva

koja zadovoljavaju kriterij o idealnom srčanom biljegu, a to su:

- * da ima prošireni dijagnostički proraz
- * srčano je specifičan
- * njegovo određivanje je klinički korisno
- * lagan je za izvođenje (osjetljiv, brz, jednostavan)

S određivanjem troponina I smo započeli početkom 1998. godine. Tijekom godine dana obrađeno je 300 bolesnika. Dobivene rezultate smo rasporedili prema dijagnozama za pojedine bolesnike. Na taj način smo dobili uvid u vrijednosti troponina I kod različitih stanja koronarne bolesti. Bolesnike smo podijelili u tri skupine: angina pektoris, akutni infarkt miokarda i ponovljeni infarkt miokarda.

08-3/P3

HOMOCISTEIN KAO RIZIK FAKTOR Homocysteine as a Risk Factor

Mendler S, Piškur V, Šerić V, Wagner J.

Odjel za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Osijek,
Osijek

Hiperhomocisteinemija je neovisan faktor rizika u razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Normalna aktivnost putova transmetilacije i remetilacije održava razinu homocisteina u uskom rasponu. Oslabljena enzimska funkcija kao rezultat genetske mutacije ili nedostatka esencijalnih B vitamina (B_6 i B_{12}) i folne kiseljne može dovesti do hiperhomocisteinemije. Različite bolesti utječu na koncentraciju homocisteina u bolesnika s kroničnim renalnim oštećenjem, kod kojih su aterosklerozne komplikacije vodeći uzrok smrti, povećana koncentracija homocisteina se javlja puno češće nego bilo koji konvencionalni faktor rizika.

Posterska podsekcija: 08-6
Endokrinološke bolesti
Endocrinological Diseases

08-6/P1**IGF-I U SERUMU DJECE S INZULIN
OVISNOM ŠEĆERNOM BOLEŠĆU****IGF-I in Serum of Children with Insulin-
Dependent Diabetic Disease**

¹Krpan R, ²Stipančić G, ¹Petek M,
²Kadrnka-Lovrenčić M.

¹Zavod za endokrinologiju Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb. ²Klinika za pedijatriju Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb

IGF-I je inzulinu sličan čimbenik rasta (MT 7,6 kDa). Nakon što se ekstrakcijom odvoji od veznog proteina, kvantitativno se IGF-I u serumu određuje IRMA metodom (Diagnostic Systems Laboratories, Texas).

U razdoblju od siječnja 1988. godine do prosinca 1995. godine u Klinici za pedijatriju Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice" bolnički je liječeno 168 djece zbog novootkrivene šećerne bolesti ovisne o inzulinu (IDDM). 60 bolesnika s IDDM bilo je uključeno u petogodišnje praćenje rasta i razvoja, te im je mjerena razina IGF-I u serumu. Svi 60 bolesnika su zadovoljavajuće kontrolirani, što uključuje da im je vrijednost HbA_{1c} u serumu $\leq 10\%$. U kontrolnu skupinu uključeno je 78 djece. Skupina bolesnika i kontrolnih ispitanika sukladne su po stupnju pubertetskog razvoja. Vrijednosti IGF-I izražena je kao srednja vrijednost $\pm SD$. Vrijednosti IGF-I u serumu bolesnika i kontrolnih ispitanika uspoređene su Studentovim t testom za neovisne uzorke. Između promatrane skupine bolesnika s IDDM i kontrolnih ispitanika nema značajne razlike u razini IGF-I u serumu tijekom cijelog razdoblja. Utvrđeno je da intenzivirana inzulinska terapija poboljšava metaboličku kontrolu bolesti i utječe na osnovu HORMON RASTA/IGF-I, što rezultira porastom razine IGF-I u serumu. U pubertetu i spolni hormoni dovode do pojačane sinteze IGF-I u jetri te mogu prijeći eventualni nepovoljan utjecaj metaboličke kontrole bolesti.

08-6/P2**KORELACIJA METODA ZA MJERENJE
PROTUTIJELA ŠITINJAČE****Correlation of Methods for Thyroid
Antibody Determination**

¹Posavec Lj, ¹Bukovec Ž, ²Sokolić L, ¹Marout J,
¹Petek M.

¹Endokrinoški laboratorij Kliničke bolnice "Sestre milosrdnice", Zagreb. ²Sveučilišna klinika "Vuk Vrhovac", Zagreb

Postojanje protutijela prema specifičnim proteinima štitinjače smatra se prvim opisanim auto-protutijelima, a njihovo određivanje ima važnu ulogu u dijagnostici autoimune bolesti. Antigeni prema kojima se određuju protutijela štitinjače su tiroglobulin (Tg), glukoprotein (Mr 660 kDa), mikrosomska antigen (Mikro- at), tj. mikrosomska frakcija homogenata štitinjače, odnosno smjesa integralnih membranskih proteina za koje je ustanovljena identičnost s peroksidazom štitinjače (TPO, Mr 100 kDa).

U ovom radu kod 36 bolesnika izvršena je usporedba rezultata protutijela štitinjače mjerjenih s tri različite metode. Usporedivane metode su klasična, semikvantitativna metoda pasivne hemaglutinacije SERODIA firme Fujirebio Inc., ELISA metoda firme DPC i imunofluorescencijska metoda UniCAP firme Pharmacia.

U određivanju mikrosomskih protutijela (TPO) metodama SERODIA-AMC i UniCAP-TPO dobivena je vrlo dobra korelacija s koeficijentom korelacije $R^2=0,867$, a SERODIA-AMC i DPC-PIA-TPO još bolja $R^2=0,9163$.

U određivanju tiroglobulinskih protutijela metodama SERODIA-Tg i UniCAP-, koeficijent korelacije iznosi $R^2=0,6214$, a SERODIA-TG i DPC-PIA-Tg $R^2=0,7454$.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je hemaglutinacijska metoda mjeranja protutijela štitinjače manje osjetljiva, ali za sadašnje prilike mnogo ekonomičnija.

08-6/P3

**IMUNOTURBIDIMETRIJSKO
ODREĐIVANJE HbA_{1c}**
**Immunoturbidimetric Determination of
HbA_{1c}**

**Cvitković L, Božičević S, Mesić R, Vučić M,
Ročić B.**

Sveučilišna klinika za dijabetes, endokrinologiju i bolesti
metabolizma "Vuk Vrhovac", Zagreb

Hemoglobin A_{1c} neprijeporno je ključni parametar u procjeni regulacije glikemije i rizika za razvitak kasnih komplikacija šećerne bolesti.

Cilj ovog rada je prilagodba imunoturbidimetrijskog postupka za određivanje HbA_{1c} (HbA_{1c}, Bayer Co., Tarrytown, NY, SAD) na diskretnom automatskom analizatoru (Olympus AU600, Olympus Optical Co., Tokyo, Japan).

Nakon hemolize i enzimske proteolize, u istom uzorku se mjeri HbA_{1c} (kompetitivnim imunoturbidimetrijskim postupkom) i ukupni hemoglobin (kolorimetrijski). Konačni rezultat hemoglobina A_{1c} (%) se dobije računski, iz omjera dvije mjerene komponente.

Nepreciznost u seriji, izražena koeficijentom varijacije, iznosila je 3,5, 2,9 i 2,7 % za vrijednosti HbA_{1c} 3,8, 7,2 i 11,7% (n=5), dok je nepreciznost iz dana u dan iznosila 3,2 i 2,1 % za vrijednosti HbA_{1c} 4,8 i 10,3 % (n=20).

Usporedba prilagodenog postupka, kako s kromatografijom na kationskom izmjenjivaču (Mono S Kolona, Pharmacia, Uppsala, Švedska), tako i drugom imunoturbidimetrijskom metodom (Unimate HbA_{1c}, Roche Diagnostic Products, Hoffmann-La Roche, Basel, Švicarska), pokazala je vrlo dobro slaganje rezultata u širokom rasponu vrijednosti HbA_{1c} ($r=0,989$ i $r=0,995$, n=80).

Rezultati ovog rada identificiraju automatski imunoturbidimetrijski postupak kao precizan, točan i brz analitički postupak za rutinsko mjerjenje hemoglobina A_{1c}.

08-6/P4

**LIPIDNI STATUS OSOBA SA
NOVOOTKIVENIM DIJABETESOM**
**Lipid Status of Newly Detected Diabetic
Patients**

Šerić V, Venžera Z, Wagner J.

Odjel za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Osijek,
Osijek

Sasvim je izvjesno da hiperlipoproteinemije predstavljaju jedan od najznačajnijih problema u medicini uopće. Ovakav značaj hiperlipoproteinemija proizlazi iz velike učestalosti u općoj po-

pulaciji, njihove povezanosti s nastankom ateroskleroze, odnosno kardiovaskularnih bolesti, ali i nastankom drugih poremećaja, njihovim često asimptomatskim tijekom tako da se poremećaj uočava tek kad nastanu aterosklerozne i druge lezije u organizmu. Brojna istraživanja pokazala su da u industrijski razvijenim zemljama hiperlipoproteinemije postoje u oko 10 do 15% stanovništva. Novija epidemiološka ispitivanja govore o znatno većoj učestalosti. Jasno je da na učestalost hiperlipoproteinemije utječe način ishrane i životni standard, kao i to da je učestalija u sredinama u kojima ima više gojaznih osoba i dijabetičara odnosno tamo gdje je ishrana neracionalna. Hiperlipoproteinemija se može javiti kao primarni poremećaj ili kao sekundarni poremećaj u sklopu neke druge bolesti, ali može postojati i kombinacija primarne i sekundarne hiperlipoproteinemije.

U ovom radu obradeno je 66 osoba s novo-otkrivenom šećernom bolesću koje su podijeljene u skupinu adipoznih i skupinu neadipoznih osoba. U skupini adipoznih osoba bilo je 14 žena i 19 muškaraca dok je u skupini neadipoznih bilo 15 žena i 18 muškaraca. Ispitanicima su između ostalog učinjene analize njihovog lipidnog statusa koji se sastojao u određivanju kolesterola, triglicerida, HDL-kolesterola, LDL-kolesterola, apo AI, apo B te indeksa kao što je omjer HDL-kolesterol/ukupni kolesterol i omjer HDL-kolesterol/LDL-kolesterol. Sve ove biokemijske pretrage su učinjene na biokemijskom analizatoru Hitachi 704. Kolesterol je određivan CHOD PAP metodom, trigliceridi GPO PAP metodom, HDL-kolesterol i LDL-kolesterol metodom direktnog određivanja te apo AI i apo B imunokemijskom metodom s reagensima firme Boehringer Mannheim.

Dobiveni rezultati za većinu biokemijskih pretraga lipidnog statusa bili su izvan preporučenih vrijednosti za lipidne parametre. Statističkom analizom uočene su razlike između skupine adipoznih i skupine neadipoznih osoba.

08-6/P5

**POVEZANOST NEUTROFILNE ALKALNE
FOSFATAZE I GLIKIRANOG
HEMOGLOBINA U ŠEĆERNOJ BOLESTI**
Association of Neutrophil Alkaline Phosphatase Activity and Glycosylated Hemoglobin in Diabetes Mellitus

**Fijačko M, Pavela J, Dobrošević B,
Paradinović K, Cetina N, Wagner J.**
Odjel za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Osijek,
Osijek

U dijabetesu i diabetičnoj acidozi povišena je katalitička koncentracija alkalne fosfataze neutrofila (NAP). Dugotrajni porast glukoze u krvi

modulira aktivnost NAP: u neutrofilima je smanjen omjer glikolize, nakuplja se glukoza-6-fosfat i fruktoza-6-fosfat, značajno je snižena sinteza glikogena. Nakupljanje povećanih količina supstrata NAP uključeno je u aktivaciju enzima.

Cilj rada je odrediti katalitičku koncentraciju NAP u dijabetesu i korelirati ove nalaze s HbA_{1c} -indeksom kontrole dijabetesa.

Ispitano je 58 novootkrivenih dijabetičara tipa II. Ispitanici su podijeljeni na adipozne ($BMI > 27$) i neadipozne ($BMI < 27$), te na regulirane ($HbA_{1c} < 7,5\%$) i neregulirane ($HbA_{1c} > 7,5\%$) dijabetičare. Kontrolnu skupinu čine 22 zdrave osobe koje nemaju dijabetes ili bilo koju drugu bolest, s normalnom diabetološkom krivuljom i normalnim leukocitima.

Aktivnost NAP je odredena semikvantitativnom citokemijskom metodom Kaplowa. HbA_{1c} je određen ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom (BioSystem-gotovi setovi).

Dobiveni podaci obradeni su Studentovim t-testom.

Aktivnost NAP u kontrolnoj skupini je $62,22 \pm 8,19$, a koncentracija HbA_{1c} je $5,75 \pm 0,53\%$ što je u skladu s rezultatima Kaplowa i Tsavarisa. U reguliranom dijabetesu aktivnost NAP je niža ($48,30 \pm 28,85$) u usporedbi s kontrolnom skupinom, ali nije statistički značajna. U nereguliranom dijabetesu aktivnosti NAP su više ($69,21 \pm 38,10$) u odnosu na kontrolnu skupinu, ali se značajno ne razlikuju. Između aktivnosti NAP i koncentracije HbA_{1c} nema korelacije u reguliranom i nereguliranom dijabetesu, što je protutječno rezultatima Tsavarisa. Aktivnosti NAP u skupini nereguliranih adipoznih dijabetičara su više ($72,85 \pm 40,83$) u odnosu na regulirane adipozne dijabetičare ($52,70 \pm 27,38$), ali razlika nije statistički značajna. Nema korelacije između aktivnosti NAP i koncentracije HbA_{1c} u nereguliranom adipoznom dijabetesu, dok je značajna razlika u aktivnosti NAP između adipoznog nereguliranog dijabetesa i kontrolne skupine ($p < 0,05$); slični su statistički pokazatelji i za skupinu nereguliranih neadipoznih dijabetičara.

Rezultati aktivnosti NAP naših dijabetičara nisu u skladu s rezultatima iz literature (Tsavaris), gdje je uvijek zabilježena korelacija aktivnosti NAP i koncentracije HbA_{1c} i stoga aktivnost NAP indicirana kao novi jednostavan parametar proučavanja dijabetesa.

08-6/P6

TROMBOCITNI SEROTONIN U INZULIN OVISNOJ ŠEĆERNOJ BOLESTI Platelet Serotonin in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus

Majetić-Cetina N, Kos B, Fijačko M, Wagner J.

Odjel za medicinsku biokemijsku Kliničke bolnice Osijek,
Osijek

Aterosklerozu većih krvnih žila, napose krvnih žila srca, mozga i okrajina česta je komplikacija šećerne bolesti. Njezinu razvoju pridonose poremećaji metabolizma lipida i povišen krvni tlak. U šećernoj bolesti nastaju posebni rizici za razvoj makroangiopatskih promjena: hiperglikemija, pojačano stvaranje sorbitola, glukozilacija proteina i poremećaji sustava za zgrušavanje krvi. Poremećenu aktivaciju trombocita možemo pratiti određivanjem serotoninina trombocita.

Cilj ovog ispitivanja je ispitati koncentraciju serotoninina trombocita u inzulin-ovisnoj šećernej bolesti. Naši rezultati pokazuju povišenu koncentraciju serotoninina (690 ± 185 ng/10(9)Trb: N=10) u dijabetičara uz normalan broj cirkulirajućih trombocita i sniženo nakupljanje trombocita u usporedbi s kontrolnom skupinom (422 ± 171 ng/10(9) Trb: N=10). Povišene vrijednosti serotoninina trombocita ukazuju na povećanu aktivaciju trombocita, ali nakupljanje trombocita je snižena, što je u suprotnosti s postavljenom tezom.

Stoga naši rezultati ukazuju na potrebu daljnog istraživanja na većem uzorku uz proširen profil biokemijskih parametara.

08-6/P7

VRIJEDNOSTI C-PEPTIDA U OVISNOSTI O TERAPIJI I DULJINI TRAJANJA ŠEĆERNE BOLESTI

C-Peptide Values in Dependence on Therapy and Duration of Diabetes Mellitus

Crnokrak S, Honović L, Ravnić R.

Centralni laboratorij Opće bolnice Pula, Pula

Humani C-peptid nastaje u β stanicama pankreasa kao nusprodukt enzimske razgradnje inzulina u inzulin. Tijekom tog procesa inzulin i C-peptid se oslobadaju iz prohormona i izlučuju u portalnu cirkulaciju u ekvimolarnim koncentracijama.

Zadatak i cilj ovog rada bio je utvrditi eventualnu ovisnost vrijednosti C-peptida s primjenjeno terapijom i duljinom trajanja bolesti.

Vrijednosti C-peptida i inzulina određene su u uzorcima krvi 156 dijabetičara različitog spola i

dobi. Prema vrsti terapije koju primaju, bolesnici su podijeljeni u tri skupine (dijeta n=35, tablete n=87 i inzulin n=34). Prema duljini trajanja bolesti isti bolesnici podijeljeni su u pet skupina (0-5, 5-10, 10-15, 15-20, >20 godina). Vrijednosti su određene uporabom radioimunoških metoda, a iskazane su srednjom vrijednosti (SV) ± standardna devijacija (SD). Statistički značajnom razlikom smatrana je vrijednost p<0,05.

Izmjerene vrijednosti C-peptida iznosile su: u skupini bolesnika na dijeti = 808,8±440,8 pmol/L; u skupini bolesnika na tabletama = 873,3±464,9 pmol/L, te u skupini bolesnika na inzulinu = 688,7±322,1 pmol/L. Najniže vrijednosti izmje-

rene su u skupini bolesnika na terapiji inzulinom (653±322,1 pmol/L) koji od šećerne bolesti boluju od 15 do 20 godina. Nasuprot tome, najviše vrijednosti izmjerene su u skupini bolesnika na terapiji dijetom (1233,6±453,1 pmol/L).

Kako izmjerene vrijednosti inzulina koreliraju s vrijednostima C-peptida, osobito u skupinama na dijeti i tabletama, to potvrđuje vrijednosti C-peptida kao pokazatelja lučenja inzulina. Rezultati potvrđuju potrebu određivanja C-peptida u smislu procjene aktivnosti β stanica pankreasa, osobito u skupini bolesnika na terapiji inzulinom gdje egzogeni hormon utječe na mjerene vrijednosti.

Posterska podsekcija: 08-7 Laboratorij i hitna stanja Laboratory and Emergency Status

08-7/P1

DIJAGNOSTIČKA VRIJEDNOST C-REAKTIVNOG PROTEINA U RANOM OTKRIVANJU BAKTERIJSKE INFEKCIJE NOVORODENČADI

Diagnostical Value of C-Reactive Protein in Early Diagnosis of Neonatal Infection

**'Bobetić-Vranić T, ¹Flegar-Meštrić Z, ¹Nazor A,
²Miličević D, ³Razum S, ³Kolić Z, ³Perković M.**

Zavod za kliničku hemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb, ²Odsjek za neonatologiju Klinike za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb, ³Centralni laboratorijski Opće bolnice Nova Gradiška, Nova Gradiška

Dijagnoza bakterijske infekcije, odnosno sepsa u novorodenčadi jedna je od najtežih u kliničkoj medicini. Rano otkrivanje prije svega osniva se na kliničkoj procjeni, a znakovi infekcije mogu biti vrlo nespecifični u prvih nekoliko dana života. Zbog toga se za utvrđivanje potrebe što ranijeg uvodenja antibiotičke terapije koriste i labora-

torijski parametri od kojih većina autora navodi C-reaktivni protein (CRP), broj leukocita (Lkc) i omjer nezrelih prema ukupnom broju neutrofila (N/U). Cilj ovog rada bio je ispitati dijagnostičku vrijednost CRP-a kao jednog od pokazatelja bakterijske infekcije u odnosu na broj Lkc i omjer N/U.

Ispitano je 150-oro djece u prvih tijedan dana života od kojih je u kontrolnu skupinu ušlo 88-oro djece s urednom kliničkom slikom. Skupina I od 35-oro djece imala je dokazanu perinatalnu infekciju, a skupina II od 28-oro djece imala je prisutne blaže infekte.

Statistička obrada obuhvatila je procjenu dijagnostičke vrijednosti CRP-a, broja Lkc i omjera N/U: specifičnost, osjetljivost, te pozitivnu (PPV) i negativnu (NPV) prediktivnu vrijednost. Longitudinalnim praćenjem CRP-a uz antibiotičku terapiju došlo je do pada vrijednosti, tako da su s danom otpusta bile u normali (< 5 mg/L). Rezultati provedene procjene prikazani su u tablici 1.

Iz dobivenih rezultata vidi se visok stupanj specifičnosti sva tri parametra koji dobro prate

Tablica 1. Dijagnostička vrijednost ispitivanih parametara

Parametar	Granične vrijednosti	Specifičnost (%)	Osjetljivost (%)		Prediktivnost (%)			
			Skupina I	Skupina II	Skupina I		Skupina II	
					PPV	NPV	PPV	NPV
CRP	5 mg/L	95	97	93	89	98	86	98
Lkc	21,0 x 10 ⁹ /L	79	20	7	28	71	10	74
N/U	0.2	94	23	4	62	75	16	76

urednu kliničku sliku. Najveću osjetljivost pokazuje CRP u obje skupine bolesne djece u odnosu na nisku osjetljivost broja Lkc i omjera N/U. CRP ima i najbolju pozitivnu prediktivnost (da će do infekcije doći) i negativnu prediktivnost (da do infekcije neće doći), iako i broj L i omjer N/U imaju relativno visoku negativnu prediktivnost. Zaključno možemo reći da je CRP najbolji pokazatelj u otkrivanju infekta, te učinkovitosti anti-biotičke terapije.

08-7/P2

**MOGLOBIN - RANI BILJEG U
DIJAGNOSTICI AKUTNOG INFARKTA
MIOKARDA (PRIKAZ SLUČAJA)**

**Myoglobin - Early Sensitive Marker in
Diagnostics of Acute Myocardial Infarction
(Case Report)**

Kožaj M, Rdštegorac I, Čirko S.

Centralni laboratorij Opće županijske bolnice Požeške,
Požega

Povišena vrijednost mioglobina u kombinaciji s ECG-om predstavlja najraniju potvrdu akutnog infarkta miokarda. Glavno kliničko značenje mioglobina je u tome što njegove povećane vrijednosti u krvi bolesnika s akutnim infarktom miokarda predstavljaju prvi signal. Vrijednost mioglobina pomaže u odluci za trombolitičku terapiju u ranim satima nakon infarkta. U radu je biokemijski i klinički prikazan slučaj bolesnika, koji je primljen hitno u Koronarnu jedinicu pod kliničkom slikom infarkta inferiорne regije. Bolesnik je primio streptokinazu. U zadanim vremenskim razmacima određivane su sljedeće pretrage: mioglobin, CK, CK-MB i troponin I. Stanje bolesnika se smirivalo. Vrijednosti srčanih biljega bile su u skladu sa stanjem i dijagnozom. Trećeg dana po primjeni streptokinaze dolazi do novog napadaja intratorakalne boli. Sat i po nakon pojave boli od biokemijskih pretraga jedino mioglobin pokazuje iznenadni porast sa 74,6 ng/mL na 141 ng/mL. Nakon 6 sati raste troponin I i CK-MB, nakon 10 sati CK, a LDH nakon 12 sati.

Vrijednosti mioglobina u kombinaciji s drugim srčanim biljezima (troponin I, CK, CK-MB i LDH)

odražavaju biokemijsku dinamiku područja zahvaćenog infarktom.

Na osnovu opaženih razlika u osjetljivosti između pojedinih biljega izbor biljega ovisi o starosti akutnog infarkta miokarda. Povišena vrijednost mioglobina kod bolesnika s akutnim infarktom miokarda može se otkriti unutar 2 sata nakon što je nastupio infarkt. Maksimalnu vrijednost doseže u periodu od 6-9 sati i vraća se u normalu unutar 24-36 sati.

08-7/P3

**PROCJENA DIJAGNOSTIČKE
UČINKOVITOSTI BILJEGA AKUTNOG
INFARKTA MIOKARDA**

**Assessment of Diagnostic Efficiency of the
Acute Myocardial Infarction**

Alpeza I, Jug M, Rumenjak V, Juričić Lj.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Ishemične bolesti srca (AIM) najčešći su uzrok smrtnosti i gubitka efikasnih godina života. Još u početku ovog stoljeća, AIM je smatran kao rijetko stanje koje je nespojivo sa životom. Na kraju ovog stoljeća, AIM je postao jedna od najčešćih ozbiljnih bolesti u industrijskim zemljama. Zbog toga više nije samo zdravstveni, već sve više i ekonomski problem. Glavni cilj dijagnostičkih postupaka je raspoznavanje, odnosno razlikovanje nestabilne angine pektoris, AIM i boli u ramenu koja nije srčanog podrijetla. Obično je EKG prvi objektivni test kod bolesnika koji se pojavljuju s boli u ramenu. Kod bolesnika s tipičnim simptomima i prisutnim povišenjem ST segmenta dijagnoza AIM potvrđena je u >90% slučajeva. Mjerenje aktivnosti enzima u serumu zahtijeva serijsko mjerenje promjene aktivnosti i odluka se ne donosi samo na temelju jednog mjerenja. Tradicionalna strategija uporabe biokemijskih biljega uključuje određivanje aktivnosti CK i CK-MB. Međutim, danas ovaj pristup zahtijeva reviziju zbog otkrića mnogo specifičnijih biljega. U radu je prikazana dijagnostička osjetljivost CKMB određivanog kao masa i aktivnost, te troponina I i mioglobina.

Posterska podsekcija: 08-8
Maligne bolesti
Malignant Diseases

08-8/P1

IMUNOFENOTIPIZACIJA CITOLOŠKIH PUNKTATA LIMFNIH ČVOROVA METODOM PROTOČNE CITOMETRIJE

Immunophenotyping of Lymph Node Fine-Needle Aspirates by Flow Cytometry

¹Siftar Z, ¹Kardum MM, ¹Nazor A, ¹Bobetić-Vranić T, ²Kardum-Skelin I, ²Šušterčić D.

¹Minigo H, ²Planinc-Peraica A, ²Ostojić-Kolonić S, ²Vrhovec R, ²Radić-Krišto D, ²Jakšić B.

¹Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb, ²Klinika za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Imunofenotipizacija metodom protočne citometrije koja se može uspješno provesti na ograničenom sadržaju citoloških punktata limfnih čvora upotpunjaje informaciju dobivenu citomorfološkom analizom.

Cilj rada bilo je ispitivanje valjanosti imunofenotipizacije citoloških punktata limfnih čvora metodom protočne citometrije u bolesnika kod kojih je postojala sumnja na hematološku bolest. U tu svrhu analizirano je 87 citoloških punktata i napravljena usporedba rezultata sa citomorfološkom analizom. U radu su korištena direktno konjugirana protutijela na biljege B-limfocita (anti-CD19, -CD20, -CD23, -CD10, -CD5, -FMC7, -KAPPA i -LAMBDA laki lanci imunoglobulina), T-limfocita i NK stanica (anti-CD2, -CD3, -CD4, -CD1a, -CD8, -CD5, -CD56), a prema predloženim panelima u višebojnoj analizi u protočnoj citometriji za limfoproliferacijske bolesti od strane Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis (Leukemia 1996; 10:877-895).

Rezultati dobiveni metodom protočne citometrije su interpretirani ili prema normalnim vri-

jednostima biljega stanica limfnih čvorova objavljenih od strane Bryan i sur. (Ann.N.Y Acad. Sci. 1993; 84:404-6) ili prema REAL klasifikaciji limfoidnih neoplazmi (Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms).

Na osnovi dobivenih rezultata može se zaključiti da je imunofenotipizacija citoloških punktata metodom protočne citometrije korisno dodatno dijagnostičko oruđe u razlikovanju malignih od reaktivnih proliferacija limfocita limfnog čvora, pri čemu se analiza uspješno izvodi na vrlo ograničenom sadržaju takvih uzoraka, a za bolesnika je brza i bezbolna.

Nadalje, studija je pokazala da je metoda protočne citometrije najuspješnija u postavljanju dijagnoze B-limfoproliferacijskih bolesti (B-Non Hodgkin limfom i B-kronična limfocitna leukaemija), gdje postoje strogo specifični pokazatelji malignosti (restrikcija lakin lanaca imunoglobulina), za razliku od T-limfoproliferacijskih bolesti, gdje je glavni pokazatelj nekarakteristična ekspresija ili odsutnost nekog staničnog biljega, što se ne može uvijek utvrditi. Preliminarni rezultati za skupinu Hodgkinove bolesti pokazali su potpuno neslaganje sa citomorfologijom, što bi se moglo objasniti nepostojanjem odgovarajućeg panela protutijela za tu bolest.

08-8/P2

OSJETLJIVOST PSA KAO TUMORSKOG BILJEGA

Sensitivity of PSA as a Tumor Marker

Piškur V, Mendler S, Wagner J.

Odjel za medicinsku biokemijsku Kliničke bolnice Osijek, Osijek

Prostata specifični antigen (PSA) je kalikreinu slična serinska proteaza čije je glavno mjesto izlučivanja epitel prostate. Odgovorna je za proteolizu proteina koji stvaraju gel u sjemenoj tekućini. Prevladavajući imunodetektibilni oblik PSA (tPSA) u serumu je povezan s α -1-antikimotripsinom (ACT), ali PSA postoji i kao slobodni nekompleksirani oblik (fPSA). Razvoj specifičnih dijagnostičkih testova omogućio je otkrivanje različitih oblika PSA. Utvrđeno je da je koncen-

	Nemaligna limf. cell prolif.	Maligna prolif. limfocita	B-Non Hodgkin limfom	B-kronična limfocitna leukaemija	T-Non Hodgkin limfom	Hodgkin limfom
Metoda protočne citometrije	36	45	36	3	6	0
Citomorfološka analiza	36	51	37	3	8	3
Slaganje	100 %	88 %	97 %	100 %	75 %	0 %

tracijski omjer fPSA/tPSA značajno niži u muškaraca s karcinomom prostate nego kod onih s benignom hiperplazijom prostate (BPH). Cilj rada je utvrditi može li omjer različitih oblika PSA, tj. indeks PSA, postati važan dijagnostički parametar koji će pomoći u diferenciranju benignih i malignih bolesti prostate s većom specifičnošću smanjenjem lažno pozitivnih rezultata i poboljšati prognozu bolesti.

08-8/P3

JEDNOSTAVNA METODA ODREĐIVANJA SLOBODNOG PROSTATA SPECIFIČNOG ANTIGENA (f-PSA)

A Simple Method for Determination of Free Prostate Specific Antigen (f-PSA)

Crnokrak S, Pauro M.

Centralni laboratorij Opće bolnice Pula, Pula

Skupina autora iz Japana dala je prikaz nove, jednostavnije metode za određivanje slobodnog prostata specifičnog antigena (f-PSA). PSA u serumu dolazi u obliku stabilnog kompleksa s - makroglobulinom (PSA-AMG) i α -antikimotripsinom (PSA-ACT), te u slobodnom, nevezanom obliku (f-PSA).

Imunometrijsko određivanje serumskog ukupnog PSA (t-PSA) uključuje određivanje PSA-ACT i f-PSA dok je PSA-AMG imunometrijski neodrediv. Nova, literaturno opisana metoda zasniva se na imunometrijskom određivanju f-PSA, koji je neosjetljiv na povišenje temperature, za razliku od PSA-ACT čija se aktivnost uklanja zagrijavanjem. Postupak uključuje zagrijavanje uzorka na 58 °C tijekom 30 minuta. Tim se postupkom uklanja PSA-ACT, a ostatni f-PSA se određuje bilo kojim testom za mjerjenje t-PSA.

Ovim radom usporedili smo vrijednosti f-PSA dobivene uporabom sljedeće dvije metode: metoda (A)- uključuje zagrijavanje, a potom određivanje f-PSA metodom za t-PSA (Coat-A-Count PSA IRMA; DPC); metoda (B)- uključuje određivanje f-PSA (Coat-A-Count Free PSA IRMA, DPC). Usporedili smo vrijednosti iz tri skupine uzoraka: I skupina-t-PSA < 4 µg/L (n=75); II skupina-t-PSA = 4-10 µg/L (n=25), III skupina-t-PSA > 10 g/L (n=16).

Statističkom obradom koja je uključivala pravac regresije i koeficijent korelacije dobili smo sljedeće rezultate:

- $f\text{-PSA}_{(A)} = 0,777778 f\text{-PSA}_{(B)} + 0,016667$
 $r=0,7201,$
- $f\text{-PSA}_{(A)} = 1,066947 f\text{-PSA}_{(B)} - 0,005776$
 $r=0,9373,$
- $f\text{-PSA}_{(A)} = 1,013372 f\text{-PSA}_{(B)} + 0,114756$
 $r=0,9995$

Dobiveni rezultati pokazuju da je ova nova metoda brza, jednostavna i reproducibilna, što je čini prihvatljivom i primjenjivom u svakom laboratoriju koji određuje f-PSA.

08-8/P4

PREOPERATIVNE VRIJEDNOSTI CA 15-3 U SERUMU BOLESNICA S DOBROČUDNIM I ZLOČUDNIM BOLESTIMA DOJKE

Preoperative Serum CA 15-3 Values of Patients with Benign and Malignant Breast Diseases

Biškup J, Deverić G, Petrinović R.

Centralni laboratorij Klinike za tumore, Zagreb

U Klinici za tumore ispitivali smo postoji li korelacija između razine biljega CA 15-3 u serumu, patohistološke dijagnoze (PHD) i koncentracije hormonskih receptora kod bolesnika s različitim tumorima dojke. Ispitivanje je obuhvatilo 463 bolesnika u dobi od 32 do 84 godine. Od tog broja 38 bolesnika je imalo dobročudne promjene, a preostale 425 maligne. Raspon vrijednosti CA 15-3 kod dobročudnih promjena iznosio je od 6 do 30 J/mL, sa srednjom vrijednošću 17 J/mL, dok je kod malignih promjena raspon bio od 5 do 58 J/mL sa srednjom vrijednošću 27 J/mL. Od ukupno 425 bolesnika s rakom dojke njih 216 imalo je proširenu bolest na regionalne limfne čvorove. U toj skupini povišene vrijednosti biljega imalo je njih 61 (28%) - srednja vrijednost 69 J/mL, dok se kod preostalih bolesnika (155) biljeg nalazio u granicama referentnog raspona (1-28 J/mL) sa srednjom vrijednošću od 16 J/mL.

Bez metastaza u regionalnim limfnim čvorovima bilo je 209 bolesnika, a povišene vrijednosti biljega nadene su u svega 7,7% slučajeva (srednja vrijednost 43 J/mL).

Ispitivanjem statističke značajnosti između tih dviju skupina ustanovili smo da postoji statistički značajna razlika u frekvenciji povišenosti razine biljega ($p=0,01$), dok između koncentracije CA 15-3 u serumu i koncentracije hormonskih receptora u malignom tkivu ta razlika ne postoji.

Posterska podsekcija: 08-10
Urođene greške u metabolizmu
Inborn Errors of Metabolism

08-10/P1

**DIJAGNOSTIKA ORGANSKIH ACIDURIJA
 PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM-
 SPEKTROMETRIJOM MASA-
 DVOGODIŠNJE ISKUSTVO**

Diagnosis of Organic Acidurias by Gas Chromatography- Mass Spectrometry

¹Maradin M, ²Fumić K, ²Barić I,
¹Stavljenić-Rukavina A.

¹Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb, ²Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Organske acidurije su heterogena skupina nasljednih metaboličkih bolesti koja se odlikuje vrlo šarolikom kliničkom slikom s početkom od intrauterine do odrasle dobi.

Prekomjerno nakupljanje i izlučivanje organskih kiselina nastaje zbog poremećaja mnogih metaboličkih putova. Najveći ih broj je posljedica poremećaja razgradnje aminokiselina, mitohondrijskog metabolizma, uključujući oksidaciju masnih kiselina, te poremećaja ketolize. Danas je poznato više od 60 različitih poremećaja i njihovih podtipova pa se ubrajaju u skupinu najčešćih, po život opasnih nasljednih poremećaja metabolizma. Učestalost dijagnosticiranih slučajeva je od sporadičnog otkrivanja u nedovoljno razvijenim sredinama do 1:2000 živorodene djece u europskim zemljama s dobro organiziranim programom selektivnog traganja. Povrh toga, veći dio bolesnika ostaje nedijagnosticiran.

Analiza organskih kiselina provodi se u nas plinskom kromatografijom-spektrometrijom masa nakon ekstrakcije mokraće etilacetatom i derivatizacije uz BSTFA + 1% TCMS na DB 5 kapilarnoj koloni, 30 m, ID 0,250 mm. U protekle dvije godine analizirano je 950 uzoraka i dijagnosticirano ukupno 8 organskih acidurija: glutarna acidurija tip I, glicerolurija, 2 slučaja 4-hidroksibutirične acidurije, 2-oksoglutarurna acidurija, ketolički defekt te 2 alkapturonuri. Pored odlučujuće vrijednosti u dijagnostici spomenutih bolesti pretraga je često bila bitan smjerokaz u daljnjoj dijagnostici drugih metaboličkih poremećaja.

Zaključujemo da je analiza organskih kiselina neophodna pretraga u dijagnostici brojnih naslijed-

nih metaboličkih bolesti. Broj otkrivenih bolesnika mogao bi se povećati boljim odabirom uzoraka i tješnjom suradnjom liječnika i laboratorijskog osoblja.

08-10/P2

**PRIKAZ SLUČAJA AKUTNE
 RABDOMIOLIZE**

A Case of Acute Rabdomyolysis

**Fišić E, Beljan B, Bilić-Zulle L, Matica J,
 Dvornik Š.**

Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka

Akutna rabdomioliza (nekrotična polimiopatija) je sindrom koji nastaje nakon infarkta ili nekroze mišića, uslijed alkoholizma, hipertermije, naporne fizičke aktivnosti te nasljednih metaboličkih bolesti mišića. Zbog opsežnog oštećenja mišićnog tkiva, katalitička koncentracija kreatin kinaze u serumu doseže i do 200 puta veću vrijednost od gornje granice referentnog raspona.

Prikazan je slučaj mladića (21 godina) kod kojeg su se nakon intenzivne sportske aktivnosti pojavili povišena tjelesna temperatura, mijalgični bolovi u čitavom tijelu, grčevi u obje natkoljenice i tamno obojena mokraća. Laboratorijski nalazi su pokazali izrazito visoke katalitičke koncentracije kreatin kinaze (CK), alanin i aspartat aminotransferaze (ALT i AST) te aldolaze u serumu.

Katalitička koncentracija AST bila je 9, ALT 3, LDH 2,5 te CK 110 puta veća od gornje granice referentnog raspona. Dva tjedna nakon izlaganja fizičkom naporu katalitičke koncentracije određivanih enzima bile su u padu, ali je još uvijek katalitička koncentracija ALT-a bila 2, CK 7 i aldolaze 4 puta veća od gornje granice referentnog raspona.

Učinjena elektromiografija pokazala je znakovе primarnog oštećenja kontraktilne mišićne supstance u svim analiziranim mišićima. S radnom dijagnozom miopatije upućuje se u Veronu (Italija) na biopsiju mišića. Nalazi biopsije ukazuju na mitohondrijsku enzimopatiju koja pri fizičkom naporu dovodi do rabdomiolize.

08-10/P3

**FENILKETONURIJA - PRIKAZ
VIŠEGODIŠNJE PRAĆENJA TRI
BOLESNIKA**

**Phenylketonuria - Long - Term Follow-up
of Three Children**

¹Kekić M, ²Dvornik Š, ²Racki V.

¹Zavod za javno zdravstvo Primorsko-goranske županije, Rijeka. ²Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka

Fenilketonuriju je prvi opisao Folling 1934. godine sa simptomima teške mentalne retardacije i raznim neurološkim promjenama. Uzrok joj je nedostatak enzima fenilalanin-4-hidroksilaze. Ovaj enzim katalizira prijelaz fenilalanina u tirozin. Pri rođenju se enzim još ne stvara, ali se normalno javlja za vrijeme biokemijske diferencijacije jetre tijekom prvih dana života. Zbog nedostatka tog enzima, fenilalanin se intenzivnije metaboli-

zira transaminacijom u fenilpiruvat, koji se izlučuje mokraćom.

Ova metabolička greška nasljeđuje se autosomno recessivno. Učestalost kod homozigota je 1:15000 novorođenčadi. Dijagnozu potvrđuje povišena koncentracija fenilalanina u serumu i prisutnost fenilpiruvata u mokraći. Pretraživanje na fenilketonuriju provodi se odmah po rođenju, te po potrebi nakon nekoliko tjedana života. Rano otkrivanje poremećaja je od velike važnosti jer je odgovarajućom prehranom, koja sadrži smanjenu količinu fenilalanina i koja se mora provoditi tijekom cijelog djetinjstva, moguće spriječiti pojавu simptoma bolesti.

U novije vrijeme bolest se potvrđuje biokemijskom analizom gena koji su odgovorni za nastanak bolesti.

U našem radu prikazali smo povijest bolesti za tri bolesnika kojima je dijagnosticirana fenilketonurija. Bolesnike smo pratili tijekom njihovih kontrolnih dolazaka na kliniku te smo prikazali karakteristične laboratorijske rezultate.

**Posterska podsekcija: 08-11
Organizacija rada MBL-a
Management of MBLs**

08-11/P1

**PROCJENA BIOKEMIJSKOG
ANALIZATORA "OLYMPUS AU 640"**

**Evaluation of the Olympus AU 640 Clinical
Chemistry Analyzer**

**Šerić V, Mendler S, Piškur V, Venžera Z,
Wagner J.**

Odjel za medicinsku biokemijsku Kliničku bolnicu Osijek,
Osijek

Olympus AU 640 je otvoreni, diskretni i selektivan biokemijski analizator s 48 fotometrijskimi kanala, odnosno 51 ukoliko su ugradene i ISE. Sustav je potpuno automatiziran i pripremljen za rutinski i hitni program s mogućnošću manualnog i automatskog ponavljanja onih pretraga čije vrijednosti su izvan granica linearnosti za pojedini analizu. Maksimalni kapacitet mu je 800 fotometrijskih analiza na sat, odnosno 1200 analiza kad radi i elektrolite na ISE. Olympus AU 640 ima ugraden posebni STAT rotor s 22 pozicije tako da STAT uzorak može biti brzo analiziran u svako

vrijeme. Evaluacija ovog aparata prema protokolu European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS) pokazala je da su varijacije u seriji i iz dana u dan bile ispod 4% za sve analizirane testove. Kontrole su provedene korištenjem komercijalnih kontrolnih seruma humanog podrijetla Precinorm U i Precipath U firme Boehringer Mannheim. Nije postojalo značajno prenošenje uzorak-uzorak odnosno reagens-reagens. Podaci o interferenciji potvrđuju poznatu činjenicu utjecaja hemolize, hiperbilirubinemije i lipemije na rezultate biokemijskih mjerjenja. Napravljena je usporedba rezultata učinjenih na dva različita analizatora (Olympus AU 640 i Hitachi 737). Oba aparat su kalibrirana istim kalibratorom C.f.a.s (Calibrator for automated system) firme Boehringer Mannheim. Za većinu pretraga korišteni su reagensi firme Olympus, osim za glukozu, alfa amilazu, kreatinin i ukupni bilirubin gdje su korišteni reagensi firme Boehringer Mannheim. Kod usporedbi dva aparata korišteni su uzorci bolesnika. Podaci su statistički obradeni metodom po Passingu i Babloku neparametrijskom regresijskom analizom. Usporedba je pokazala zadovoljavajući koeficijent korelacije.

Treba istaknuti da Olympus AU 640, osim što je brz, pouzdan i fleksibilan aparat posjeduje i niz pogodnosti što se tiče programske opreme, koje ga čine pogodnim za rad u velikim laboratorijima.

08-11/P2

**PROCJENA ANALIZATORA PRECISION
PCx ZA ODREDIVANJE GLUKOZE UZ
BOLESNIKA**
**Evaluation of the Precision PCx Analyzer
Used for Point-of-Care Glucose Determination**
Rumenjak V, Alpeza I, Juričić Lj, Matejić V.

Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb

Odredivanje glukoze je najčešća analiza koja se izvodi uz bolesnika. Može se reći da je određivanje uz bolesnika započelo s odredivanjima glukoze, a potom se, zahvaljujući razvoju tehnike i tehnologije, proširilo na ostale analize. U radu je prikazana analitička procjena uređaja Precision PCx za odredivanje glukoze u punoj krvi. Analizator je predviđen za primjenu u bolnicama i moguće je automatski prijenos podataka u laboratorijski informatički sustav. Analitička procjena vršena je u usporedbi s analizatorom NOVA Stat M (NOVA Biomedical). U ispitivanju utjecaja visokog pO₂ na izmjerene vrijednosti glukoze korišten je analizator OLYMPUS AU 400. Ispitan je i utjecaj hematokrita (do 0,8 L/L) na mjerjenje glukoze. Rezultati procjene pokazali su dobru korelaciju s analizatorom NOVA. S porastom pO₂ postoji pozitivan utjecaj kisika na izmjerene vrijednosti glukoze. Vrijednosti hematokrita između 0,2 do 0,6 L/L ne utječu na rezultate glukoze.

08-11/P3

**ODREĐIVANJE KATALITIČKE
KONCENTRACIJE α -AMILAZE:
USPOREDBA METODA I ANALITIČKA
PROCJENA MODIFICIRANE IFCC
PREPORUČENE METODE**
**Determination of α -Amylase Activity:
Method Comparison and Analytical Evaluation
of Modified IFCC Recommended Method**
¹Kranjčec B, ²Priljević K, ³Flegar-Meštrić Z,
²Šiftar Z, ³Šurina B.

¹Medicinsko-biokemijski laboratorij Opće bolnice Zabok, Zabok. ²"Herbos Dijagnostika" d.o.o., Sisak. ³Zavod za kliničku kemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Za odredivanje katalitičke koncentracije α -amilaze postoje čitav niz metoda koje se temelje na djelovanju α -amilaze na različite polimerne supstrate. 1998. g. IFCC (Skupina za enzime) je izdao preporuku o metodi za odredivanje α -amilaze s etiliden-4-nitrofenilmaltoheptaozidom (E-pNPG7) kao supstratom, tj. etiliden blokirajući supstrat (EPS).

Cilj ovog rada bila je analitička procjena i usporedba metoda za α -amilazu s tri različita supstrata. Koristili smo modificiranu preporučenu metodu IFCC-a s E-pNPG7 supstratom ("Herbos Dijagnostika", Sisak, TR-1137) s nižom koncentracijom E-pNPG7 nego što to preporučuje IFCC. Usporedna odredivanja izvršena su metodom s benziliden-4-nitrofenilmaltoheptaozidom (PNPG7, TR-1136) kao supstratom i direktnom metodom s 2-kloro-4-nitrofenilmaltotriozidom (CNPG3) kao supstratom (Olympus, Japan, OSR 6106).

Katalitička koncentracija α -amilaze određivana je na 37 °C na analizatoru Olympus AU-600. Korišteni su svježi i zamrznuti (-20 °C) humani serumi i komercijalni kontrolni serumi humanog podrijetla.

NEPRECIZNOST n = 20	Razina	E-pNPG7 U/L	PNPG7 U/L	CNPG3 U/L
		x±SD (KV %)	x±SD (KV %)	x±SD (KV %)
Nepreciznost u seriji	I	58±0,4 (0,8)	55±0,8 (1,5)	66±1,2 (1,9)
	II	410±2,4 (0,6)	386±2,5 (0,7)	378±3,1 (0,8)
Nepreciznost iz dana u dan	I	57±1,9 (3,4)	56±1,8 (3,1)	70±5,6 (8,1)
	II	420±19,3 (4,6)	420±12,9 (3,1)	431±14,1 (3,3)

Metoda	NETOČNOST											
	Control serum L1 Olympus		Control serum L2 Olympus		Precinorm E Boehringer		Precipath E Boehringer		Kontrolni serum N Herbos		Kontrolni serum A Herbos	
	deklarirana $\bar{x} \pm 2\text{SD}$	određena $\bar{x} (\% \text{ odst.})$	deklarirana $\bar{x} \pm 2\text{SD}$	određena $\bar{x} (\% \text{ odst.})$	deklarirana $\bar{x} \pm 2\text{SD}$	određena $\bar{x} (\% \text{ odst.})$	deklarirana $\bar{x} \pm 2\text{SD}$	određena $\bar{x} (\% \text{ odst.})$	deklarirana $\bar{x} \pm 2\text{SD}$	određena $\bar{x} (\% \text{ odst.})$	deklarirana $\bar{x} \pm 2\text{SD}$	određena $\bar{x} (\% \text{ odst.})$
E-pNPG7 Herbos	78±16*	76 (2,6)	443±94*	432 (2,5)	112±14	115 (2,7)	328±40	335 (2,1)	41±12*	41 (0)	334±46*	332 (0,6)
PNPG7 Herbos	78±16	74 (5,1)	443±94	436 (3,8)	112±14	117 (4,5)	328±40	339 (3,4)	54±12*	49 (9,2)	334±46*	331 (0,9)
CNPG3 Olympus	78±15*	76 (4,1)	443±94	436 (2,0)	112±14	127 (13,4)	328±40	327 (0,3)				

* deklarirana vrijednost za određeni supstrat

USPOREDNA ODREDIVANJA (n = 87)				
Metoda	Raspon U/L	nagib	odsječak	r
xE-pNPG7	18-2149			
yPNPG7	21-2014	0,940	3,0417	0,998
y ₁ CNPG3	42-1620	0,737	35,42	0,999

Dobiveni rezultati o nepreciznosti, netočnosti, kao i usporedno određivanje prikazani su u tablicama. Linearnost metode prema proizvodačima reagensa je do 2000 U/L, što je i eksperimentalno potvrđeno.

Modificirana metoda IFCC za određivanje katalitičke koncentracije α -amilaze jednostavna je i brza, lako se primjenjuje u manualnom radu i u radu na automatima.

08-11/P4

REZULTATI VANJSKE PROCJENE KAKVOĆE RADA KOAGULACIJSKIH PRETRAGA U RAZDOBLJU OD 1994. - 1999. GODINE

Results of the National External Quality Control Scheme for Coagulation Parameters: 1994- 1999

¹Parag G, ²Juretić D, ¹Flegar-Meštrić Z.

¹Zavod za kliničku hemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb.

²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,

Zavod za medicinsku biokemiiju i hematologiju, Zagreb

Povjerenstvo za vanjsku procjenu kakvoće rada Hrvatskog društva medicinskih biokemičara od 1994. godine uključuje određivanje i koagulacijskih pretraga, protrombinskog vremena (PV) i fibrinogena u uzorcima komercijalnih, liofiliziranih, kontrolnih plazmi kao normalnih i pato-

loških. Od 1997. godine u program je uključeno i određivanje aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (aPTV).

U vanjskoj procjeni kakvoće rada 1994. godine sudjelovalo je 75 laboratorija, a 1999. uključeno je 105 laboratorija. U početku je korištena manualna tehnika izvođenja koagulacijskih pretraga u 53% laboratorija, dok se danas automatski koagulometar koristi u 72% laboratorija.

Fibrinogen se određuje Clauss-ovom metodom u 90% laboratorija. Postotak zadovoljavajućih rezultata u neprekidnom je porastu (od 69% na 95% u zadnjem krugu kontrole), a medulaboratorijski koeficijent varijacije (KV) u kontinuiranom padu (od 20,22 na 8,25%).

PV u normalnoj plazmi, izražen kao omjer uzorak/normalni uzorak (PR) daje veći postotak zadovoljavajućih rezultata i manji KV u odnosu na rezultate izražene kao postotak i prikazanih u tablici.

Normalna plazma	PV izražen kao %		PV izražen kao PR	
	KV	% zadovoljavajućih rezultata	KV	% zadovoljavajućih rezultata
I-95	13,32	64	7,40	70
III-95	12,85	62	5,70	73
I-96	12,62	68	5,90	70
II-96	11,45	78	5,33	71
I-97	8,90	84	4,69	73
I-98	10,89	67	5,08	78
III-98	8,32	80	5,46	80

Rezultat za PV u patološkoj plazmi izražava se u INR. Uočena je tendencija korištenja tromboplastina visoke osjetljivosti (ISI oko 1,2) koju prati i stalni porast zadovoljavajućih rezultata prikazanih u tablici.

Patološka plazma	I-94	II-95	II-96	IV-96	II-97	III-97	IV-97	II-98	IV-98
% laboratorija koji koriste ISI ≤ 1.2	17	39	55	65	69	67	74	80	84
% zadovoljavajućih rezultata	33	60	67	61	77	80	75	9093	
KV	21.56	18.53	15.48	24.86	14.76	9.35	15.81	19.23	11.18

aPTV se određuje u 29 od 105 laboratorija. Rezultati se radi lakše usporedbe izražavaju kao omjer uzorak/normalni uzorak. KV se kreće od 14,40 do 919 %.

Tečajevi trajne edukacije i kontinuirani kontakti laboratorijski s organizatorom medulaboratorijske procjene kakvoće, kao i uvodenje automatskih koagulometara, doprinijeli su standarizaciji primjenjenih metoda i poboljšanju rezultata koagulacijskih pretraga.

08-11/P5

REFERENTNI INTERVALI ELEKTROLITA U NOVORODENČADI ODREĐENI IZ PUNE KRVI METODOM DIREKTNE POTENCIOMETRIJE

Whole Blood Reference Intervals for Electrolytes in Newborns During the First One to Three Days of Life

¹Perkov S, ¹Flegar-Meštrić Z, ²Šeper I.

¹Zavod za kliničku hemiju Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb, ²Odjel za neonatologiju Klinike za ženske bolesti i porode Kliničke bolnice "Merkur", Zagreb

Praćenje koncentracije elektrolita izuzetno je važno u prvom tjednu života novorođenčadi, jer zbog prilagodbe s fetalnog na neonatalni život dolazi do brzih promjena u homeostazi vode i

elektrolita. Cilj rada bio je odrediti referentne intervale za kalij, natrij, ionizirani kalcij i ionizirani magnezij u punoj krvi zdrave novorođenčadi. Koncentracije navedenih elektrolita odredene su metodom direktnе potenciometrije na Stat Profile Ultra C analizatoru tvrtke "Nova biomedical". Ispitivanjem je obuhvaćeno 73 potpuno zdrave novorođenčadi (37 dječaka i 36 djevojčica) u prva tri dana života. Rezultati neparametrijske statističke analize prikazani su u tablici 1. Testiranjem razlika prema spolu primjenom U-testa (Mann-Whitney), uz razinu značajnosti p=0,05 nije utvrđena statistički značajna razlika za koncentracije ispitivanih elektrolita (p>0,05) u punoj krvi zdrave novorođenčadi. Linearnom regresijskom analizom nadena je statistički značajna korelacija između tijedana gestacije i koncentracije natrija ($r=0,232$, $p=0,05$), te između porodajne duljine i koncentracije ioniziranog magnezija ($r=-0,262$, $p<0,05$).

Dobiveni referentni intervali sukladni su objavljenim rezultatima drugih autora (1,2), te njihova primjena omogućuje medicinski odgovarajući, transverzalnu procjenu koncentracije kalija, natrija, ioniziranog kalcija i ioniziranog magnezija u uzorcima pune krvi u novorođenčadi.

- Snell J, et al. Pediatric reference range for arterial pH whole blood electrolytes and glucose. (Abstract) Clin. Chem. 1993;39:1173.
- Cook LA, Mimouni FB. Whole blood ionized magnesium in the healthy neonate. J Am Coll Nutr. 1997; 16:181-3.

Tablica 1. Referentni intervali za koncentracije kalija, natrija, ioniziranog kalcija i ioniziranog magnezija u punoj krvi zdrave novorođenčadi, mmol/L

Analit	Spol	N	mmol/L-udjeli neparametarske distribucije		
			0.025	0.500	0.975
Kalij	dječaci	37	3.1	4.2	5.1
	djevojčice	36	3.3	4.1	5.2
	svi	73	3.1	4.1	5.2
Natrij	dječaci	37	134	140	145
	djevojčice	36	138	141	148
	svi	73	134	141	146
Ionizirani kalcij	dječaci	37	1.02	1.11	1.31
	djevojčice	36	1.05	1.15	1.33
	svi	73	1.05	1.13	1.31
Ionizirani magnezij	dječaci	37	0.38	0.44	0.53
	djevojčice	36	0.37	0.45	0.54
	svi	73	0.37	0.45	0.54

Posterska podsekcija: 08-12**Ostale teme****Other Topics****08-12/P1**

**ULOGA ECP-a U EVALUACIJI ASTME
UZROKOVANE GRINJAMA**
**Importance of ECP in Asthma Evaluation
Caused by Mites (*Dermatophagoides
Pteronyssinus*)**

Linarić I, Žižić V, Lokar-Kolbas R.

Biokemijski laboratorij Klinike za dječje bolesti, Zagreb

Astma je kronična upalna bolest koju karakterizira reverzibilna opstrukcija i hiperreaktivnost dišnih putova s infiltracijom tkiva mastocitima, T-limfocitima i eozinofilnim granulocitima. S obzirom da je prevalencija astme u značajnom porastu, posebno u razvijenim zemljama i predstavlja veliki zdravstveni, ali i ekonomski problem, ukazala se potreba za preciznim laboratorijskim testom koji bi se koristio u dijagnozi i praćenju bolesnika s astmom. Razvijena je vrlo osjetljiva imunometoda (CAP-System) za određivanje eozinofilnog kationskog proteina (ECP) u serumu. ECP je visoko citotoksičan protein koji se nalazi u eozinofilnim granulocitima, a izlučuje se aktivacijom eozinofila tijekom alergijske upale, posebice astme. Kako bi se pokazalo kako je povećana koncentracija ECP-a u serumu u pouzdanoj korelaciji s težinom alergijske astme, a kao posljedica povećane izloženosti prirodnim alergenima, pratila se skupina od 60-ero astmatične djece koja su u sezoni grinja -dermatophagoides pteronyssinus (9.-12. mjesec) dolazila na pregled zbog pogoršanja bolesti. Kod njih je zabilježeno naglo povećanje koncentracije ECP-a, uz stalno povišeni ukupni IgE i specifični IgE na grinje. Dobiveni rezultati određivanja ECP-a u početku bolesti i tijekom terapije kortikosteroidima ukazuju da je ECP objektivan i izravan pokazatelj težine bolesti i učinka terapije.

08-12/P2

**IMUNOGLOBULINI IgG, IgA i IgM U
DJECE S ASTMOM I PNEUMONIJOM**
**IgG, IgA and IgM Immunoglobulins in
Children with Asthma and Pneumonia**

Kršlak J, Dodig S, Živčić J, Raos M.

Specijalna bolnica za bolesti dišnog sustava djece i mladeži, Srebrnjak, Zagreb

Serumske vrijednosti imunoglobulina IgA, IgG i IgM određivane su u djece s astmom (u stanju akutne egzacerbacije astme) i pneumonijom. Koristena je metoda radijalne imunodifuzije (RID ploče, Imunološkog zavoda, Zagreb). Krv za analizu uzimana je pri prijemu djeteta u bolnicu, u vremenu od 8 do 15 sati. Ispitano je 84 djece s astmom u dobi od 2 do 14 godina i 201 dijete s pneumonijom u dobi od 7 mjeseci do 8 godina života. Djeca s pneumonijom imala su povećane vrijednosti IgA i IgM u odnosu na referentne intervale i u odnosu na djecu s astmom, a vrijednosti IgG bile su u referentnim intervalima. Djeca s astmom imala su vrijednosti IgA u referentnim intervalima, povećane vrijednosti IgM u djece s koinfekcijom, te značajno smanjene vrijednosti IgG-a u odnosu na referentne intervale. Različita serumska koncentracija imunoglobulina u djece s astmom i pneumonijom posljedica je različitih etioloških, patofizioloških i kliničkih svojstava tih dvaju entiteta.

08-12/P3

**PRIKAZ DVOSTRUKE ALBUMINEMIJE U
DVJEMA OBITELJIMA**
**A Case of Double Albuminemia in Two
Families**

**¹Dodig S, ²Čepelak I, ³Benko B, ¹Raos M,
²Branović K.**

¹Specijalna bolnica za bolesti dišnog sustava djece i mladeži, Srebrnjak, Zagreb. ²Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za medicinsku biokemiiju i hematologiju, Zagreb. ³Imunološki zavod, Zagreb

Značajka bisalbuminemije je pojavljivanje dvojne albuminskih frakcija pri elektroforetskom razdvajaju proteina u serumu. Može se pojaviti kao nasljedna osobina ili kao analitička interferencija pri primjeni nekih lijekova, poglavito penicilina. Nasljeduje se dominantnim autosomnim genom. Dvije frakcije albumina pojavljuju se u omjeru 1:1. Ukupna koncentracija bjelančevina pritom nije promijenjena. Nasljedna bisalbuminemija obično se otkriva slučajno, a nakon toga se ispituju i ostali članovi obitelji. Nalaz bisalbuminemije u elektroforezi serumu ili mokraće nije u pravilu povezan uz neku patološku promjenu.

Prikazujemo dva slučaja u djece (u dobi 4,5 mjeseca i 15 godina) s respiracijskim infektom. Postojanje bisalbuminemije potvrđeno je elektroforezom (brzi albumin imao je relativnu elektroforetsku pokretljivost 1,08) i izoelektričnim fokusiranjem u pH-gradijentnom gelu (pH 4,0 - 6,5). Vjerojatno se radi o zamjeni samo jedne aminokiseline u molekuli albumina (točkasta mutacija), čime je izmijenjen naboј molekule. Na temelju prikazanih rezultata pretraga koje smo načinili mogli bismo zaključiti da albumin nadan u Hrvatskoj ne pripada u literaturi opisanim varijantama.

08-12/P4

KRATKOTRAJNI UZGOJ CFU-GEMM U BOLESNIKA S IZRAŽENOM LIMFOCITOZOM

Short-term CFU-GEMM Culture in Patients with Pronounced Lymphocytosis

¹Petrovečki M, ²Rupčić M, ³Pejša V, ⁴Kušec R, ¹Romić Ž, ⁵Stančić V.

¹Odjel za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb. ²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ³Odjel za hematologiju Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb. ⁴Institut Ruder Bošković, Zagreb. ⁵Klinička bolnica "Sestre milosrdnice", Zagreb

Kao standarni laboratorijski postupak određivanja brojnosti neusmjerenih krvotvornih matičnih stanica (CFU-GEMM, od engl. colony forming unit, granulocyte-erythroid-monocyte-megakaryocyte) rabi se in vitro uzgoj stanica u polutekućoj podlozi s metilcelulozom i dodatkom standardiziranih koncentracija čimbenika rasta. Matične se stanice u tijeku dvotjedne inkubacije dijele i diferenciraju, stvarajući kolonije koje se nativno, pod malim povećanjem (do 40x), diferenciraju kao CFU-GM (granulocitno-monocitne), BFU-E (eritroidne, burst forming units) i CFU-GEMM.

U standardiziranom se postupku mononuklearne stanice (MNC) zasijavaju u kultivacijskoj smjesi u koncentraciji od 10^5 MNC/mL. Brojnost neusmjerenih krvotvornih matičnih stanica u zdrava odrasla čovjeka procjenjuje se na 6 CFU-GEMM/ 10^5 MNC (10.-90. percentila = 0-10) u koštanoj srži, a 3 (0-6) CFU-GEMM/ 10^5 MNC u periferijskoj venskoj krvi (projekti izraženi medijanom mjerena). U bolesnika s izraženom limfocitozom taj broj može biti znatno smanjen.

U bolesnika s kroničnom limfocitnom leukemijom (KLL) izražena je brojnost leukocita (lim-

focita) u koštanoj srži i periferijskoj krvi. Stoga smo u ovom istraživanju pokušali odrediti brojnost CFU-GEMM u dijelu od ukupno 46 bolesnika s dijagnozom KLL (23 muškaraca i 23 žene prosječne dobi 66 godina, u rasponu 37-78 god.). Broj limfocita u periferiji bio je znatno povećan i iznosio je prosječno 34,6 (6,8-179,1)/L. Zbog očekivanog smanjenja udjela CFU-GEMM, uz standardnu koncentraciju zasijavanja (10^5 MNC/mL kultivacijske smjese) rabilo smo i koncentraciju veću za pola logaritma ($3,4 \times 10^5$ MNC/mL) i koncentraciju veću za jedan logaritam (10^6 MNC/mL).

Brojnost CFU-GEMM u uzorcima koštane srži iznosila je 0 (0-2; N=24) CFU-GEMM/ 10^5 MNC pri osnovnoj koncentraciji zasijavanja, te 0,6 (0-1,9; N=19) i 0,6 (0,1-2,8; N=6) pri koncentracijama većim za pola i jedan logaritam (p=0,388; vrijednosti u zagradi - 10. i 90. percentila mjerena, te broj obradenih uzoraka). Brojnost CFU-GEMM u uzorcima periferne venske krvi iznosila je 0 (0-1; N=21) CFU-GEMM/ 10^5 MNC pri osnovnoj koncentraciji zasijavanja, te 0,7 (0-1,9; N=21) i 1,1 (0,3-5,4; N=9) pri koncentracijama većim za pola i jedan logaritam (p=0,035).

Rezultati kratkotrajnog uzgoja ukazali su da je broj CFU-GEMM/MNC u bolesnika s KLL prosječno niži od broja u zdravim ljudi, i što više, da se zasijavanjem u uobičajenoj koncentraciji od 10^5 MNC/mL usmjerene stanice CFU-GEMM niti ne mogu dokazati, vjerojatno zbog jako izraženog udjela zločudnog kloni. Istraživanje je ujedno pokazalo da s porastom koncentracije zasijavanja raste brojnost dokazanih CFU-GEMM, ali statistički značajno samo u periferijskoj krvi. Rezultati upućuju na potrebu određivanja početne koncentracije MNC pri ovakovom in vitro postupku.

08-12/P5

UPORABNA VRIJEDNOST TROMBOCITNIH POKAZATELJA Usefulness of Platelet Indexes

¹Leniček-Krleža J, ²Zadro R, ¹Nakić M, ¹Huzjak N, ³Bilić Zulle L, ²Stavljenić-Rukavina A.

¹Klinika za dječje bolesti, Zagreb. ²Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb. ³Zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Rijeka, Rijeka

Velika varijabilnost trombocitnih pokazatelja kod različitih tipova hematoloških brojača kao i nedostatna ispitana u različitim bolesnim sta-

njima gotovo ih je isključila iz uporabe među kliničara. Novija ispitivanja nastoje smanjiti ovu varijabilnost uvodenjem novih trombocitnih pokazatelja. Oni predstavljaju razliku između izmjerene i očekivane vrijednosti kao apsolutni broj, a u nazivu dobivaju podnaslov "ostatni" (npr PDW_{ostatni}). U tom kontekstu posebno je važno ispitivanje mogućnosti diferencijalne dijagnoze trombocitoza i trombocitopenija.

U našem radu pratili smo najčešće trombocitne pokazatelje: broj trombocita (Tr, PI), srednji volumen trombocita (MPV), širinu krivulje raspodjele po volumenu (PDW), te udio "velikih" trombocita u izmjerenoj populaciji (P-LCR) u tri skupine ispitanika. Prva skupina su bolesnici s opeklinama koje zahvaćaju više od 30% površine tijela koji su razvili reaktivnu trombocitozu i imaju dijagnosticiran neki od oblika malignog tumora i razvijenu trombocitopeniju. U tijeku liječenja dobivali su transfuziju koncentrata trombocita. Treća, kontrolna skupina, su bolesnici s ortopedskog odjela koji su primali transfuziju puno krvi tijekom operacijskog zahvata. Kod njih je broj trombocita bio u rasponu normalnih vrijednosti i nije dijagnosticirano ni jedno pozadinsko patološko stanje. Navedene trombocitne pokazatelje pratili smo neposredno prije i poslije transfuzije te sljedećeg dana. Svi bolesnici su djeca u dobi od 1 do 16 godina.

Zadatak nam je bio utvrditi postoji li statistički značajna razlika između broja trombocita i navedenih trombocitnih pokazatelja prije i poslije transfuzije, te izračunati "ostatne" vrijednosti istih parametara. Njihovom usporedbom pokušali smo zaključiti koji su podaci "upotrebljiviji" u kliničkom smislu.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da postoji statistički značajna razlika između broja trombocita u dvije skupine ispitanika (neparametrijska analiza varijance po Fridmanu, uz razinu vjerojatnosti $p<0,05$), dok kontrolna skupina ne pokazuje statistički značajnu razliku ni u jednom ispitivanom parametru. MPV se statistički značajno promjenio samo u skupini ispitanika s opeklinama i razvijenom reaktivnom trombocitom. Istovremeno PDW ima $p=0,07$, a L-PCR nema statistički značajnu promjenu ($p=0,339$). Onkološki bolesnici s trombocitopenijom poslije transfuzije koncentrata trombocita pokazuju značajnu promjenu jedino u broju trombocita.

Izračunavanjem istih parametara kao "ostatne" vrijednosti i statističkom obradom nije uočena drugačija statistička značajnost, te možemo reći da u ovom ispitivanju izmjerene i "ostatne" vrijednosti imaju istu kliničku "upotrebljivost".

08-12/P6

DOES SEROTONINE BLOOD LEVEL INFLUENCE SEPs WAVE COMPLEX IN HEALTHY RATS?

Da li koncentracija serotonina u krvi utječe na somatosenzorne evocirane potencijale u zdravim štakora?

¹Bjegović M, ¹Slijepčević M, ²Išgum V,
¹Čičin-Šain L, ¹Jernej B.

¹Ruder Bošković Institute, Zagreb, ²Clinical Medical Center, Department of Neurology, Zagreb

We developed the computerized model of SEP registration in experimental rodents which enabled us to repeat recording of SEP in the same animal through one hour after 5 or 15 minute intervals. Moreover, the SEPs of the same animal were controlled again two months later. Averaged SEPs from 40 registered single wave complexes were stored to memory media with accessory arithmetical data for each amplitude and latency peaks. Two groups of healthy Wistar rats of both sexes were examined. The first group of rats had lower level of blood serotonin (1.62 ± 0.03 ng/mg protein) and the second group had significantly higher serotonin level (2.29 ± 0.11 ng/mg). From the obtained results it seems that the main characteristics of the SEP wave components in the rats with lower blood serotonin level were manifestly altered. So, negative amplitudes (range from 27 to 31 ms) were 1.8 to 2.3 fold the in the rats with higher blood serotonin level. On the other hand, manifoldly higher positive peaks in the range of 22 to 35 ms were observed in the rats with lower blood serotonin level. Peak-to-peak amplitudes N-18 to P-22 for the rats with higher level of blood serotonin were shorter for about 30% and peak-to peak amplitudes for P-22 to N-24 for the same group of rats were 56% shorter. In conclusion, serotonin as an important neurotransmitter in the peripheral and the central part of nerve system obviously influence the shape of SEP wave complex.

08-12/P7

ODREDIVANJE KATALITIČKE KONCENTRACIJE PANKREATIČNE AMILAZE KOD AKUTNOG PANKREATITISA

Determination of Catalytic Concentration of Pancreatic Amylase in Acute Pancreatitis

Čorić J, Suljević E, Kalajić A.

Institut za kliničku kemiju i biokemiju, Sarajevo, BiH

U svrhu bolje dijagnostike akutnog pankreatitisa odredivali smo aktivnost pankreatične amilaze. Kontrolnu skupinu činilo je 30 zdravih osoba.

Obradeno je 25 bolesnika s dokazanim akutnim pankreatitism. Pankreatičnu amilazu odredivali smo elektroforezom na agaroznom gelu i imuno-kemijskom metodom sa selektivnom inhibicijom salivarne amilaze (Boehringer Mannheim). Rezultati aktivnosti pankreatične amilaze dobiveni elektroforezom i imuno-kemijskom metodom su međusobno usporedeni a dobiveni pravac regresije $y = 1,02x + 22,7$ i koeficijent korelacije $r = 0,97$ pokazuju dobru korelaciju rezultata.

Ispitivali smo korisnost određivanja pankreatične amilaze kod akutnog pankreatitisa. Dobili smo da je osjetljivost određivanja 92% što pokazuje da određivanje aktivnosti pankreatične amilaze doprinosi boljoj dijagnostici akutnog pankreatitisa.

08-12/P8

ZNAČAJ ODREĐIVANJA PSA

The Importance of PSA Determination

¹Dukić L, ¹Mandušić A, ²Utrobičić A, ²Markić T.

¹Medicinsko-biokemijski laboratorij, Split, ²Klinika "SALUS", Split

Prostata specifični antigen (PSA) je najznačajniji tumorski biljeg u otkrivanju i praćenju liječenja karcinoma prostate. Uobičajeni referentni ravan za ukupni PSA iznosi 0 do 4 ng/ml.

Cilj rada je utvrditi kolika je važnost određivanja razine ukupnog i slobodnog PSA.

U vremenu od svibnja 1998. do lipnja 1999. godine obradeno su 84 bolesnika urološke klinike "Salus" u dobi od 42 do 88 godina ($\bar{X} 64,6$; $SD \pm 10,9$ ng/ml) različitih radnih dijagnoza.

Ukupni PSA određivan je kod svih bolesnika, a kod 10 bolesnika određen je i slobodni PSA.

Dobivene vrijednosti za ukupni PSA iznosile su $\bar{X} 3,9$; $SD \pm 5,9$ ng/ml (s izuzetkom kod 3 bolesnika čije su vrijednosti iznosile 135, 247 i 542 ng/ml, koje nisu statistički obrađene).

Vrijednosti slobodnog PSA kretale su se od 0,4 do 3,2 ng/ml ($\bar{X} 1,5$; $SD \pm 0,8$ ng/ml), odnosno 10,5 do 38,8% od ukupnog PSA.

Kod 26 bolesnika s hipertrofijom prostate (najveća grupa) vrijednost ukupnog PSA iznosila je $\bar{X} 4,4$ ng/ml; $SD \pm 5,0$ ng/ml.

Kada se vrijednost ukupnog PSA korelirala s podacima volumena prostate, dobiveni koeficijent korelacije iznosi $r = 0,60$, što se slaže s podacima iz literature.

Na temelju dobivenih rezultata utvrđeno je da ukupni PSA u kombinaciji s drugim parametrima i dijagnostičkim postupcima omogućava sigurno uspostavljanje dijagnoze.

08-12/P9

USPOREDBA DVJU METODA ZA ODREĐIVANJE UKUPNOG KAPACITETA VEZANJA ŽELJEZA

Correlation of Two Methods for the Determination of Total Iron Binding Capacity

Kunović B, Nimac A.

Dijagnostički laboratorij Doma zdravlja "Centar", Zagreb

U radu su usporedene dvije metode za mjerenje ukupnog kapaciteta vezanja željeza: metoda adsorpcije na magnezijhidroksikarbonat i metoda na mikrokolonu.

Za usporedbu metoda uzete su dvije skupine ispitanika: sa normalnim i sniženim vrijednostima hematoloških parametara (koncentracija hemoglobina; broj eritrocita i eritrocitne konstante; vrijednost hematokrita) i normalnim i sniženim vrijednostima željeza u serumu.

Precinorm i Precipath univerzalni kontrolni serumi tvrtke Roche Diagnostics, korišteni su kao kontrolni uzorci.

Rezultati usporebe ove dvije metode na uzorcima serumu pacijenata, kao i na kontrolnim serumima pokazali su dobar stupanj podudarnosti i primjenljivosti obje metode u rutinskom radu.

Jedina je razlika, a time i prednost metoda na mikrokolonu u jednostavnosti i kraćem vremenu izvođenja.