

**2nd FESCC SYMPOSIUM  
FOR BALKAN REGION**

**New Diagnostic Tools and Quality  
in Laboratory Medicine**

**NOVI SAD, 17–18. October 2006.**



## VELIČINA ČESTICA KAO DIJAGNOSTIČKO SREDSTVO

V. Blaton KU-Leuven

Odeljenje kliničke hemije  
Az StJan Av Rudderhove 10, 8000 Brugge (Be)  
Drugi FESCC Simpozijum za balkanski region,  
18. oktobar, Novi Sad, Srbija

Prvi korak u separaciji i identifikaciji klasa serumskih lipoproteina bilo je ultracentrifugiranje. Goffman i Lindgren su prvi razdvojili serumske lipoproteine u klase različitih gustina na osnovu gradijenata gustine. Njima je pošlo za rukom da okarakterišu veličinu čestica i da ih dovedu u vezu sa rizikom za koronarno-srčane događaje. Morali smo do sada da čekamo da bismo bolje razumeli povezanost između fizičkih parametara molekula i rizika za nastanak bolesti. Izazov za budućnost je da se istraži uticaj fizičkih parametara čestica na razvoj bolesti, da se pronađe metoda za dijagnostičke mogućnosti, i takođe, da se istraže putevi za tretman. Epidemiološke studije pokazale su pozitivnu vezu između koncentracija ukupnog holesterola i mortaliteta usled koronarnih srčanih bolesti (CHD). Ukupan holesterol ne predviđa tačno rizik za nastanak CHD kod mnogih pacijenata; odluka o tretmanu zasniva se na LDL-holesterolu, ali takođe može biti potrebno uzeti u obzir heterogenost LDL-a. LDL čestice male gustine su više aterogene od onih veće gustine, dok flotacione LDL čestice i oksidovani LDL takođe povećavaju aterogeničnost. Heterogenost LDL okarakterisana je prema različitim fizičkim osobinama LDL čestica: veličini lipoproteina, flotacionoj brzini i gustini. Razmatraju se osobine nekih uobičajenih metoda ispitivanja pomoću kojih se obično karakterišu LDL podfrakcije. Gradijent gel elektroforeza koja koristi uslove bez denaturacije obično se upotrebljava za karakterizaciju distribucije veličine LDL čestica. Visokoeфикасна gel-filtraciona hromatografija i nuklearna magnetna rezonantna (NMR) spektroskopija od nedavno se primenjuju za određivanje veličine LDL čestica. Nekoliko različitih metoda ultracentrifugiranja na gradijentu gustine koje koriste analitičke ultracentrifuge upotrebljavaju se za karakterizaciju flotacione brzine LDL-a. Nekoliko metoda koje se zasnivaju na diskontinualnim gradijentima soli koriste se za određivanje LDL podklasa na osnovu gustine. Ove različite metode određivanja podklasa LDL-a pokazuju visok stepen korelacije, uprkos

## PARTICLE DIMENSION AS A DIAGNOSTIC TOOL

V. Blaton KU-Leuven

Department of Clinical Chemistry,  
Az StJan Av Rudderhove 10, 8000 Brugge (Be)  
2nd FESCC Symposium for the Balkan Region,  
October 18, Novi Sad, Serbia

The first step in the separation and identification of serum lipoprotein classes was ultracentrifugation. Goffman and Lindgren were the first to separate the serum lipoproteins in different density classes based on density gradients. They were able to characterize the particle sizes and to relate them to the risk of coronary heart events. We had to wait till now to understand more about the relationship between the physical parameters of the molecules and the risk of disease. It is a challenge for the future to explore the influence of the physical parameters of a particle on the development of a disease, to find the methods for diagnostic possibilities and also to explore the ways for treatment. Epidemiological studies have shown a positive relationship between total cholesterol concentrations and mortality due to coronary heart disease. Total cholesterol does not accurately predict the risk of CHD in many patients; the decision about treatment is based on LDL-cholesterol, but may also need to take into account the LDL heterogeneity. Small dense LDL particles are more atherogenic than large, buoyant LDL particles, and LDL-ox also increase atherogenicity. LDL heterogeneity is characterized according to the different physical properties of LDL particles: lipoprotein size, flotation rate and density. Features of some common assays used to characterize LDL subfractions are discussed. Gradient gel electrophoresis using no denaturing conditions is commonly used to characterize the LDL particle size distribution. High-performance gel-filtration chromatography and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy have been recently applied for the determination of LDL particle size. Several different methods of density gradient ultracentrifugation have been used to characterize LDL flotation rate using the analytical ultracentrifuge. Several methods based on discontinuous salt gradients are used to determine LDL subclasses based on density. These various methods of determining LDL subclasses show a high degree of correlation, despite the fact that they measure different physical properties of

činjenici da mere različite fizičke osobine LDL-a. Sve metode za merenje lipoproteina zahtevaju izvođenje dve sekvencijalne operacije: separaciju lipoproteina da bi se njegov nivo izmerio zasebno od drugih, dok bi se kvantifikacija pojedinih važnih pogodnosti postigla izbegavanjem separacionog koraka, naročito kada se kvantifikuju lipoproteinske podklase. Kako su podklase lipoproteina veoma slične jedna drugoj po veličini, gustini i sastavu, njihova separacija je težeg reda veličine nego separacija glavnih lipoproteinskih klasa. Postoje važne prednosti korišćenja spektroskopske analize lipoproteinskih podklasa. Nova procedura će iskoristiti ono što se čini prirodnim, ali se generalno ne uvažava – protonske NMR spektroskopske razlike ispoljene od strane lipoproteinskih čestica različite veličine. Taj novi proces sada je uglavnom potpun. Korišćenjem posvećenog intermedijarnog polja (360 MHz) NMR analizatora, rutinska kvantifikacija 15 različitih podklasa VLDL, LDL i HDL postiže se za oko jedan minut. Kao što se može očekivati od metode koja ne koristi reagense i zahteva minimalnu manipulaciju uzorka, tačnost i preciznost su isto tako dobre ili bolje nego one postignute sa najboljim alternativnim procedurama. Uz efikasnost NMR procesa, prvi put će biti moguće sprovođenje istraživačkih studija na velikim populacijama, kako bi se ispitala veza između podklasa i CHD događaja, kao i drugih bolesti, i procenio uticaj raznih režima tretmana na nivoe podklasa i klinički ishod. Bitni koncepti osnovne NMR analize lipoproteinskih podklasa sasvim su jednostavni i ne zahtevaju veliko poznavanje u NMR spektroskopije. Kvantifikacija je postignuta u procesu od tri stupnja koji se sastoji od merenja NMR spektra plazme ili seruma, posle koga sledi kompjuterska dekonvolucija podataka spektra i izračunavanje koncentracija podklasa. Za stupanj merenja koji se izvodi automatski na netretiranom uzorku plazme ili seruma (0,5 mL) potrebno je manje od jednog minuta. Stupnjevi dekonvolucije i izračunavanja, koji se izvode na digitalizovanim podacima uz korišćenje softvera za specijalizovane analize koji radi *off-line* na personalnim kompjuterima, zahtevaju samo nekoliko sekundi. Otkrivanje neprimećenog rizika je najvažniji zadatak. Ključna uloga LDL-a u CVE i patogenezi CHD dobro je prihvaćena, kao i korisnost snižavanja LDL-a kod pacijenata sa visokim rizikom. Ostaje sporno da li koristiti najbolje merenje za LDL da bi se identifikovali svi pojedinci koji će imati korist od terapije. Mnoge studije pokazale su da su, pri postojećem nivou LDL-a, pojedinci sa pretežno malim LDL česticama iskusili veći rizik nego oni sa LDL česticama veće veličine. Trenutno nije razjašnjeno da li su mali molekuli LDL-a suštinski više aterogeni nego oni veći zato što, pri datom nivou LDL-a, pojedinci sa malom veličinom LDL čestica imaju veći ukupan broj čestica. Broj čestice LDL-a meren uz pomoć nuklearne magnetne rezonance dosledno se pokazuje kao snažan, nezavistan prediktor CHD.

LDL. All methods of measuring lipoproteins require the performance of two sequential operations: separation of the lipoprotein to be measured from the others, and quantification of several important benefits would be gained by avoiding the physical separation step, particularly when quantifying lipoprotein subclasses. Because the subclasses of a lipoprotein are so closely similar to one another in size, density, and composition, their separation is an order of magnitude more difficult than the separation of major lipoprotein classes. There are major advantages in using spectroscopic lipoprotein subclass analysis. The new procedure would exploit what appeared to be natural, but remained generally unappreciated – proton NMR spectroscopic differences exhibited by lipoprotein particles of different sizes. The new process is now largely complete. Using a dedicated intermediate-field (360 MHz) NMR analyzer, routine quantification of 15 different subclasses of VLDL, LDL and HDL is achieved in about one minute. As might be expected from a method that uses no reagents and requires minimal sample manipulation, accuracy and precision are as good as, or better than, those achieved by the best alternative procedures. With the efficiency of the NMR process, it will be possible for the first time to conduct research studies of large populations in order to examine subclass associations with CHD events and other diseases, and to assess the impact of various treatment regimens on subclass levels and clinical outcomes. The basic concepts underlying NMR lipoprotein subclass analysis are quite simple and require no background in NMR spectroscopy to be understood. Quantification is achieved in a three-step process consisting of measurement of the plasma or serum NMR spectrum followed by computer deconvolution of the spectral data and calculation of the subclass concentrations. The measurement step which is performed automatically on untreated plasma or serum specimens (–0.5 mL) takes less than one minute. The deconvolution and calculation steps, which are performed on the digitized data using specialized analysis software running *off-line* on a personal computer, require just a few seconds. Discovering the unseen risk is the most important task. The key role of LDL in CVE and in the pathogenesis of CHD is well accepted, as is the benefit of lowering LDL in high risk patients. What remains controversial is whether we are using the best measure of LDL to identify all individuals who would benefit from therapy. Many studies have shown that, at given level of LDL-c, individuals with predominantly small LDL particles experience greater risk than those with larger-size LDL. It is not clear at the moment whether small LDL molecules are inherently more atherogenic than large ones because, at a given level of LDL-c, individuals with small LDL particle size have more LDL particles in total. Particle number of LDL measured by nuclear magnetic resonance has consistently been shown to be a strong, independent predictor of CHD.

### PRIMENA TEHNIKE SELDI-TOF-MS U PROFILISANJU PROTEINA: PREDNOSTI I ZAMKE

J. A. P. Bons<sup>1</sup>, W. K. W. H. Wodzig<sup>1</sup>,  
D. de Boer<sup>1</sup>, M. Drent<sup>2</sup>,  
M. P. van Dieijen-Visser<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Odeljenje za kliničku hemiju  
<sup>2</sup>Respiratorna medicina,  
Centar za kontrolu sarkoidoze,  
Univerzitetska bolnica »Maastricht«,  
Maastricht, Holandija

Profilisanje proteina seruma tehnikom Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) čini se kao veoma važno dijagnostičko sredstvo za čitav niz bolesti. Senzitivnost i specifičnost koje se postižu ovom novom tehnologijom često su superiorne u odnosu na rezultate postignute uz pomoć drugih biomarkera. Međutim, njihova reproduktivnost i standardizacija još uvek su problematične. Objasnimo tehniku SELDI-TOF-MS i razmotriti neke važne aspekte u izučavanju proteoma, kako pre tako i posle analize, kao i postupke za kontrolu kvaliteta. U ovom pregledu takođe su predstavljeni i naši podaci o otkrivanju biomarkera za postavljanje dijagnoze sarkoidoze.

### APPLICATION OF SELDI-TOF-MS IN PROTEIN PROFILING: PROMISES AND PITFALLS

J. A. P. Bons<sup>1</sup>, W. K. W. H. Wodzig<sup>1</sup>,  
D. de Boer<sup>1</sup>, M. Drent<sup>2</sup>,  
M. P. van Dieijen-Visser<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Clinical Chemistry  
<sup>2</sup>Respiratory Medicine,  
Sarcoidosis Management Centre,  
University Hospital Maastricht, Maastricht,  
The Netherlands

Serum protein profiling by Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) appears to be an important diagnostic tool for a whole range of diseases. Sensitivities and specificities obtained with this new technology often seem superior to those obtained with current biomarkers. However, reproducibility and standardization are still problematic. The present review explains the SELDI-TOF-MS technique and discusses some important aspects for proteomics studies, like pre- and post-analytical aspects and quality control procedures. Own data about biomarker discovery for the diagnosis of sarcoidosis are also presented in this review.

### PRIMENA 2D-HPLC SISTEMA ZA RAZDVAJANJE PROTEINA

I. Levreri<sup>1</sup>, L. Musante<sup>2</sup>,  
A. Petretto<sup>3</sup>, D. Cuccabitta<sup>3</sup>,  
G. Candiano<sup>2</sup>, G. Melioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Laboratorio Centrale di Analisi  
<sup>2</sup>Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia,  
U.O. di Nefrologia  
<sup>3</sup>Laboratorio di Spettrometria di Massa,  
Core facility, Istituto Scientifico  
Giannina Gaslini, Genova, Italy

The ProteomeLab™ PF 2D sistem za frakcionisanje proteina je brz, poluautomatski 2D-HPLC aparat koji koristi dve različite metode za razdvajanje plazma serumskih proteina: jonoizmenjivačku hromatografiju koja koristi širok opseg pH u prvoj dimenziji i neporoznu reverzno-faznu hromatografiju u drugoj dimenziji. Samo zbog toga što je ova metodologija nedavno predstavljena u laboratorijama za proteomikane, malo se zna o karakteristikama PF 2D frakcionisanja proteina u humanom serumu. Da bi se procenila primena sistema u okvirima kliničke laboratorije, analizirane su osobine razdvajanja zasnovanog na jonoizmenjivačkoj hromatografiji. Posle frakcionisanja proteina humanog seruma na linearnom gra-

### APPLICATION OF 2 D-HPLC SYSTEM FOR PLASMA PROTEIN SEPARATION

I. Levreri<sup>1</sup>, L. Musante<sup>2</sup>,  
A. Petretto<sup>3</sup>, D. Cuccabitta<sup>3</sup>,  
G. Candiano<sup>2</sup>, G. Melioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Laboratorio Centrale di Analisi  
<sup>2</sup>Laboratorio di Fisiopatologia dell'Uremia,  
U.O. di Nefrologia  
<sup>3</sup>Laboratorio di Spettrometria di Massa,  
Core facility, Istituto Scientifico Giannina  
Gaslini, Genova, Italy

The ProteomeLab™ PF 2D protein fractionation system is a rapid, semi-automated, 2 D-HPLC instrument that uses two different methods to separate plasma serum proteins: ion-exchange chromatography using a wide range of pH in the first dimension and non-porous reverse-phase chromatography in the second dimension. Because this methodology has only very recently been introduced in proteomic laboratories, little is known about the characteristics of PF 2D fractionation of human serum proteins. To evaluate the system's application in a clinical laboratory setting, the characteristics of the ion-exchange chromatography-based separation were analyzed. Following fractionation of human serum proteins on a li-

dijentu pH (u opsegu od 8,5 do 4,0), svaka frakcija je sakupljena u hladnom modulu aparata. Različite frakcije iz prve dimenzije su zatim zajedno objedinjene i stavljene na klasičnu aparaturu za 2D gel elektroforezu. Dobijene različite tačke su zatim proverene preko Swiss-Prot baze podataka. Ukupno 36 proteina humanog seruma je identifikovano u različitim PF 2D proizvedenim frakcijama. Pojedine važne osobine separacionog sistema su bile zapažene. Različite elucione frakcije sadržale su različite proteine što pokazuje pouzdanost sistema za frakcionisanje. Proteini su takođe frakcionisani prema teoretskoj izoelektričnoj tački ( $pI$ ). To je bilo u skladu sa dokazom da velika većina imunoglobulina, okarakterisana sa alkalnim  $pI$ , nije bila zadržana u koloni i bila je eluirana u nevezanoj frakciji. Ovakav rezultat takođe naglašava praktičnu prednost: eluirane frakcije od pH 8 do pH 4 sadržale su zapravo proteine seruma bez prisustva imunoglobulina. Ovaj nalaz podržava neposrednu upotrebu PF 2D sistema u kliničkim procedurama, gde bi trebalo veliki broj proteina jasno identifikovati da bi se omogućila procena drugih manje prisutnih, ali potencijalno važnih, tipova.

near gradient of pH (ranging from 8.5 to 4.0), each fraction was collected in a cool module of the instrument. Different fractions obtained from the first dimension were then pooled together and loaded on classic 2D gel electrophoresis instrumentation. The different spots obtained were then checked against the Swiss-Prot Database. A total of 36 human serum proteins were identified in different PF 2D-generated fractions. Some important features of the separation system were observed. Different eluted fractions contained different proteins, thus demonstrating the reliability of the fractionation system. The proteins were also fractionated according to the theoretical isoelectric point ( $pI$ ). This was consistent with the evidence that the vast majority of immunoglobulins, characterized by an alkaline  $pI$ , were not retained by the column and were eluted in the unbound fraction. This outcome also underlies a practical advantage: fractions eluted from pH 8 to pH 4 contained virtually immunoglobulin-depleted serum proteins. This finding supports an immediate use of the PF 2D system in a clinical setting, where abundant proteins should be clearly identified in order to enable evaluation of other less abundant, but potentially relevant, species.

## PROTEINSKI MIKROREDOVI U DIJAGNOZI I ISTRAŽIVANJU ALERGIJSKIH OBOLJENJA

*R. Hiller*

*Centre for Proteomic and Genomic Research  
c/o Institute for Infectious Disease & Molecular  
Medicine, University of Cape Town,  
Cape Town, South Africa*

Mikroredovi proteina predstavljaju jedan od osnovnih postulata moderne proteomike, kako u cilju sistematizacije, tako i radi sistemske analize funkcija, interakcija i količine proteina. Mogućnost analiziranja uzoraka u minijaturnom obliku podstakla je napore za razvijanje novih dijagnostičkih pristupa u lečenju raka, autoimunih oboljenja i alergija. U ovom radu biće razmotrena najnovija dostignuća u razvoju proteinskih mikroredova za profilisanje IgE antitela u dijagnozi alergijskih oboljenja tipa 1.

## PROTEIN MICROARRAYS FOR DIAGNOSIS AND RESEARCH OF ALLERGIC DISEASES

*R. Hiller*

*Centre for Proteomic and Genomic Research  
c/o Institute for Infectious Disease & Molecular  
Medicine, University of Cape Town,  
Cape Town, South Africa*

For both the systematic as well as for the system-wide analysis of protein function, interaction and abundance, protein microarrays represent one of the pillars underlying modern high-throughput Proteomics. The prospect of analysing samples in a highly parallel while miniaturized fashion has fuelled efforts to develop novel diagnostic applications in the cancer, autoimmune or allergy field. Here, I discuss recent advancements in the development of protein microarrays for the profiling of IgE antibodies in the diagnosis of Type 1-related allergic diseases.

**BIOMARKERI OBOLJENJA:  
PRISTUP ZASNOVAN NA DOKAZIMA***S. Ignjatović, N. Majkić-Singh**Institut za medicinsku biohemiju,  
Klinički centar Srbije i Farmaceutski fakultet  
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija*

Medicina zasnovana na dokazima (EBM) pri donošenju odluka o nezi pacijenata kombinuje individualnu kliničku veštinu sa najboljim raspoloživim kliničkim dokazima iz sistematičnih istraživanja. Klinička veština odlikuje se tačnošću u proceni i stiče se učenjem, kliničkim iskustvom i praksom. Klinički dokazi dobijaju se iz kliničkih istraživanja koja su usmerena na pacijenta, a koja ispituju tačnost i preciznost dijagnostičkih testova i biomarkera, efikasnost i sigurnost terapijskih postupaka i pouzdanost prognostičkih indikatora. Kombinacija kliničke veštine i dokumentovanih dokaza omogućava sigurniju, efikasniju i pouzdaniju negu pacijenta. Vodiči zasnovani na dokazima najčešće se koriste kao dodatne alatke pri donošenju medicinskih odluka. Formulisanje preporuka zasnovanih na dokazima predstavlja vodeći princip u pripremi vodiči. U razvoju preporuka koje uključuju laboratorijske testove i biomarkere treba primeniti sistematsku i standardizovanu metodologiju koja je prilagođena laboratorijskoj medicini. Postoji veliki broj mogućnosti za primenu i evaluaciju laboratorijskih testova u dobrim kliničkim ispitivanjima. Još su veće mogućnosti za uspostavljanje korelacija između različitih laboratorijskih postupaka i kliničkih nalaza, ishoda i dijagnoza, kao i za korišćenje uzoraka koji su skladišteni za ova ispitivanja. Era medicine zasnovane na dokazima zahteva od eksperata koji donose medicinske odluke proučavanje naučne literature kako bi se obezbedio visok kvalitet dokaza o korisnosti i tačnosti dijagnostičkih testova. Ovakva vrsta dokaza potrebna je više nego ikad zato što lista dijagnostičkih testova raste eksponencijalno i u dinamama koje dolaze na nju će biti dodato još više biomarkera, proteomike i aplikacija profiliranja ekspresije gena.

**BIOMARKERS OF DISEASES:  
AN EVIDENCE-BASED APPROACH***S. Ignjatović, N. Majkić-Singh**Institute of Medical Biochemistry,  
Clinical Center of Serbia and School  
of Pharmacy, University of Belgrade,  
Belgrade, Serbia*

Evidence-based medicine (EBM) combines individual clinical expertise with the best available clinical evidence from systematic research in making decisions about the care of individual patients. Clinical expertise is the proficiency and judgment that individual clinicians acquire through knowledge, clinical experience, and practice. Clinical evidence comes from patient-centered clinical research which investigates the accuracy and precision of diagnostic tests and biomarkers, the efficacy and safety of therapeutic regimens, and the reliability of prognostic indicators. The powerful combination of clinical expertise and documented evidence results in safer, more efficacious and accurate care of the patient. Evidence-based guidelines are commonly used tools for supporting medical decisions. Formulating evidence-based recommendations has become a leading principle in guideline development. In laboratory medicine, guidelines provide recommendations on the use of a wide range of tests in detecting or predicting a target condition, for staging and monitoring a disease, and for decisions to initiate, modify, or terminate treatments. Systematic, standardized, and explicit methodology, adapted to laboratory medicine, should be followed when developing recommendations involving the use of laboratory tests and biomarkers. There are many opportunities for the application and evaluation of laboratory tests in good clinical trials. There are even greater opportunities for correlating various laboratory procedures with the clinical findings, outcomes and diagnoses, and using the stored samples collected for those studies. In this era of evidence-based medicine, clinicians and other decision-makers turn to the scientific literature for high-quality evidence about the usefulness, precision, and accuracy of diagnostic tests. Such evidence is needed more than ever because the list of diagnostic tests is growing exponentially, and even more biomarkers, proteomics, and applications of gene expression profiling will be added in the years to come.

## **B-TIP NATRIURETSKIH PEPTIDA KAO MOĆNIH MARKERA U KARDIOLOŠKIM BOLESTIMA – ANALITIČKI I KLINIČKI ASPEKTI**

A. Hammerer-Lercher<sup>1</sup>, B. Puschendorf<sup>1</sup>, J. Mair<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Clinical Biochemistry,  
Innsbruck Biocenter, Innsbruck Medical  
University, Innsbruck, Austria

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine,  
Clinical Division of Cardiology,  
Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

Među svim natriuretskim peptidima i neurohormonima, za B-tip natriuretski peptid (BNP) i njegov N-terminalni prohormonski fragment (NT-proBNP) je pokazano da su najbolji i najmoćniji markeri za identifikaciju pacijenata sa akutnom i hroničnom srčanom insuficijencijom (SI). Potpuno automatizovana određivanja BNP i NT-proBNP ahtevaju samo 15–20 minuta za dostizanje rezultata testa tako da je moguće »turn-around« vreme manje od 60 minuta, kao što se zahteva od strane vodiča kardioloških društava. In vitro stabilnosti BNP i NT-proBNP su dovoljne za rutinsku upotrebu. Većina komercijalno dostupnih testova, sem ako su sublicencirani, koriste različita antitela. Ovo se može objasniti da uopšteno, BNP i NT-proBNP određivanja sa različitim testovima pokazuju bliske korelacije, ali se ne slažu u apsolutnim vrednostima. Ova određivanja nisu dosada standardizovana i primena različitih kalibracionih materijala može doprineti različitim rezultatima. Prema tome, referentni opsezi zavise od testa koji se koristi, i moraju biti određeni za svaki test posebno. Povećanje vrednosti sa godinama možda je u vezi sa rastućom frekvencijom subkliničke renalne ili kardiološke disfunkcije kod starijih osoba. Estrogeni stimulišu produkciju natriuretskih peptida kod žena, a referentni opsezi zavise od pola od adolescencije do menopauze. Odmah nakon rođenja, nivoi BNP i NT-proBNP su znatno viši kod novorođenčadi nego kod njihovih majki. Visoka biološka varijacija natriuretskih peptida mora se uzeti u obzir pri interpretaciji serije rezultata BNP i NT-proBNP. Prema tome, samo znatne promene BNP i NT-proBNP u toku praćenja pacijenta su u vezi sa promenama kliničkog statusa SI. Zaključak svih vodećih studija je da su BNP i NT-proBNP kod pacijenata sa hroničnom SI pre markeri za »isključenje« nego za »potvrdu« zbog ograničenih kardioloških specifičnosti. Pacijenti sa akutnom SI obično pokazuju više nivoa BNP i NT-proBNP nego pacijenti sa hroničnom SI. Najveća efikasnost testiranja BNP i NT-proBNP je pokazana kod pacijenata prisutnih na urgentnom odeljenju sa akutnom dispneom ili kod pacijenata sa simptomima koji ukazuju na hroničnu SI. Mnoge studije ukazuju da kratkoročna i dugoročna prognoza kod SI može biti procenjena određivanjem BNP i NT-proBNP. Ovi hormoni su nezavisni prediktori letalnog ishoda ili hospitalizacije zbog SI. Natriuretski peptidi su povećani kod svih bolesti koje utiču na kardijalnu ili renalnu funkciju i ravnotežu tečnosti. BNP i NT-proBNP su ta-

## **B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDES AS POWERFUL MARKERS IN CARDIAC DISEASES – ANALYTICAL AND CLINICAL ASPECTS**

A. Hammerer-Lercher<sup>1</sup>, B. Puschendorf<sup>1</sup>, J. Mair<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Clinical Biochemistry,  
Innsbruck Biocenter, Innsbruck Medical  
University, Innsbruck, Austria

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine,  
Clinical Division of Cardiology,  
Innsbruck Medical University, Innsbruck, Austria

Among all natriuretic peptides and neurohormones, B-type natriuretic peptide (BNP) and its N-terminal prohormone fragment (NT-proBNP) have been shown to be the best and most powerful markers to identify patients with acute and chronic heart failure (HF). The fully automated BNP and NT-proBNP assays require only 15–20 min to achieve a test result so that a turn-around time of less than 60 min is possible, as requested by the guidelines of the cardiological societies. The in-vitro stabilities of BNP and NT-proBNP are sufficient for routine use. Most of the commercially available assays, except if they are sublicensed, use different antibodies. This may explain that in general, BNP and NT-proBNP assays show close correlations, but do not agree in absolute values. The assays have not been standardized so far and the application of various calibration materials may contribute to different results. Thus, reference ranges are dependent on the assay used, and reference ranges have to be determined for each assay separately. The increasing values with age may be related to the increasing frequency of subclinical renal or cardiac dysfunction in the elderly. Estrogens stimulate the natriuretic peptide production in females, and reference ranges depend on sex from adolescence to menopause. Immediately after birth, BNP and NT-proBNP levels are substantially higher in neonates than in their mothers. The high biological variation of natriuretic peptides must be considered when interpreting serial BNP and NT-proBNP results. Therefore, only marked BNP or NT-proBNP changes during follow-up are related to changes in the clinical HF status. A conclusion of all major studies is that in patients with chronic HF BNP and NT-proBNP are rather rule-out than rule-in markers because of limited cardiac specificities. Patients with acute HF usually show higher BNP and NT-proBNP levels than patients with chronic HF. The greatest efficiency of BNP and NT-proBNP testing was demonstrated in patients presenting to the emergency department with acute dyspnoea or in outpatients with symptoms suggesting chronic HF. Many studies indicate that short- and long-term prognosis in HF can be assessed by BNP or NT-proBNP determination. These hormones are independent predictors of death or HF hospitalizations. Natriuretic peptides are increased in all diseases affecting the cardiac or renal function and fluid balance. BNP and NT-proBNP are markers of cardiac dysfunc-



kođe markeri kardijalne disfunkcije i kod pacijenata sa renalnom insuficijencijom, ali se tu moraju koristiti više vrednosti granica odlučivanja. Smanjene koncentracije BNP i NT-proBNP kod gojaznih nisu potpuno razumljive i kontradiktorni izveštaji su nađeni u literaturi. U zaključku, određivanje BNP i NT-proBNP je moćan test za isključenje SI. Osim toga, ovi markeri su korisna dopuna standardnim kliničkim ispitivanjima pacijenata sa suspektom ventrikularnom disfunkcijom.

tion in patients with renal failure as well, but higher decision limits have to be used. Decreased BNP and NT-proBNP concentrations in obesity are not fully understood and controversial reports are found in the literature. In summary, BNP or NT-proBNP determination is a powerful test for ruling out HF. Furthermore, these markers are a useful addition to the standard clinical investigations of patients with suspected ventricular dysfunction.

### **KOMPLEKSIRANI PSA I SERUM HER-2/neu: NOVI SERUMSKI MARKERI U LEČENJU RAKA PROSTATE I RAKA DOJKE**

*R. Neumann*

*European Scientific Affairs, Bayer Healthcare,  
Odeljenje za dijagnostiku, Leverkusen, Nemačka*

Rak prostate je najčešći oblik raka kod muškaraca, a rak dojke najčešće maligno oboljenje kod žena. Zahvaljujući napretku u razumevanju biologije tih kancera, lečenje i razvoj novih dijagnostičkih sredstava koji se kreću u pravcu »personalizovane medicine« trenutno su podvrgnuti kliničkom ispitivanju. Ovaj članak opisuje unapređenu ulogu jednog oblika antigena specifičnih za prostatu (prostate-specific antigen, PSA), takozvanog »kompleksiranog PSA« (cPSA), u otkrivanju raka prostate, i uz to predstavlja pregled publikacija na temu kliničke vrednosti novih testova koji otkrivaju izvanćelijski deo molekula HER-2 u serumu pacijentkinja sa rakom dojke. Na osnovu navedenih publikacija, pokazaće se da kompleksirani PSA ima manje ograničenu specifičnost u odnosu na druge izoforme PSA koji se trenutno uglavnom primenjuju u dijagnostikovanju raka prostate, kao i to da HER-2<sup>neu</sup> iz seruma daje informacije o tačnom statusu HER-2, pružajući na taj način podatke klinički važne za potencijalno unapređivanje lečenja pacijentkinja sa rakom dojke.

### **COMPLEXED PSA AND SERUM HER-2/neu: NEW SERUM MARKERS FOR THE MANAGEMENT OF PROSTATE AND BREAST CANCER**

*R. Neumann*

*European Scientific Affairs, Bayer Healthcare,  
Diagnostics Division, Leverkusen, Germany*

Prostate cancer is the most common type of cancer in men, and breast cancer the most common malignancy in women. Based on the improvements in understanding the biology of these cancers, treatment and ongoing development of new diagnostic tools aiming towards »personalized medicine« are under clinical evaluation. This article describes the improved value of one of the immunodetectable forms of the prostate-specific antigen (PSA), the so-called »complexed PSA« (cPSA), in detecting prostate cancer, and also presents an overview of publications on the clinical value of a new immunoassay detecting the extracellular part of the HER-2 molecule in serum of breast cancer patients. Based on the publications cited, it will become obvious that complexed PSA improves the limitations of the specificity of PSA isoforms currently mainly applied to diagnose prostate cancer, and that serum HER-2<sup>neu</sup> offers information about the actual HER-2 status thus adding information clinically relevant to the probability of optimizing therapy of breast cancer patients.

### **KLINIČKA VREDNOST BIOHEMIJSKIH MARKERA ZA REMODELIRANJE KOSTIJU U ISPITIVANJU BOLESTI KOŠTANOG METABOLIZMA**

*J. J. Stepan*

*Odeljenje za internu medicinu 3, Univerzitet  
»Charles«, Medicinski fakultet, Češka republika*

Koštani markeri su veoma korisno dijagnostičko sredstvo, mada je njihova klinička upotreba ograničena specifičnim tehničkim i analitičkim aspektima, kao i njihovom pre-analitičkom varijabilnošću. Koš-

### **CLINICAL VALUE OF THE BIOCHEMICAL MARKERS OF BONE REMODELING IN THE ASSESSMENT OF BONE METABOLIC DISEASES**

*J. J. Stepan*

*Department of Internal Medicine 3,  
Charles University, Faculty of Medicine,  
Prague, Czech Republic*

Bone markers have been useful research tools, with their clinical utility limited by their specific technical and analytical aspects and pre-analytical variability. Bone markers reflect different aspects of the

tani markeri, za razliku od mineralne gustine kosti, ukazuju na posebne aspekte kvaliteta kostiju, te stoga nude zasebnu i prognostičku perspektivu u ispitivanju promena mineralne gustine kosti i smanjivanju rizika od fraktura. Smanjenje nivoa koštanih markera usko je povezano sa smanjenjem rizika od frakture vratnih pršljenova usled korišćenja raloksifena, rizedronata i alendronata. Posle anaboličke terapije teriparatidom, ubrzano formiranje koštanih markera je jasan pokazatelj reakcije gustine minerala proteina. Postoje brojne mogućnosti za korišćenje ovih markera u kratkoročnom praćenju toka lečenja osteoporoze, pored merenja mineralne koštane gustine, kako bi se otkrili pacijenti koji ne reaguju na terapiju. Upotreba koštanih markera u svakodnevnoj kliničkoj praksi zahteva standardizaciju merenja i programa kontrole kvaliteta kako bi se smanjile varijacije u podacima iz različitih laboratorija, definisali kriterijumi za ubrzani metabolizam kostiju u pogledu referentnih vrednosti, i postiglo preciznije određivanje markera u pogledu geografskih oblasti i rasa, kao i u različitim klimatskim uslovima.

### **KVALITET UZORKA I NJEGOV UTICAJ NA KLINIČKO ODLUČIVANJE**

*D. Mirković, M. Dajak, Z. Šumarac, S. Ignjatović*

*Institut za medicinsku biohemiju,  
Klinički centar i Farmaceutski fakultet,  
Beograd, Srbija*

Medicinsko tumačenje kliničko-laboratorijskih rezultata je komparativni proces odlučivanja u kome se laboratorijski podaci pojedinca porede sa referentnim vrednostima izvedenim na osnovu ispitivanja referentne populacije. Ovakvo tumačenje čini proces odlučivanja uslovno jednostavnim. Nedostatak znanja o kvalitetu uzorka i osobinama biološkog materijala pravi raskorak između laboratorije i lekara-kliničara. Određivanje kontrolnog materijala je bitno za analitički proces. Važan problem u ovom slučaju je odsustvo pravog uzorka i njegova promenljivost. Kontrola kvaliteta se obavlja obradom veštačkog materijala, uz nadu da će isti verno odslikati karakteristike biološkog materijala pacijenta. U ovom radu bliže ćemo se upoznati sa problemima vezanim za uzorak i njegov kvalitet. Kroz primere iz literature i sopstveno iskustva, govorićemo više o:

- lipemiji, turbiditetu, hemolizi i ikteričnom biološkom materijalu;
- efektu uparivanja uzorka;
- kalibraciji;
- stabilnosti analita;
- pravilnom i pogrešnom korišćenju referentnih intervala;
- statističkom prikazivanju i pogrešnoj interpretaciji rezultata;
- interferenciji lekova.

quality of bone than BMD and, therefore, may add an independent, predictive value to the assessment of changes in bone mineral density and reductions in the risk of fracture. The decrease in bone marker levels is strongly related to the reduction in vertebral fracture risk through raloxifene, risedronate and alendronate. After anabolic therapy with teriparatide, early increases in bone formation markers are strong predictors of BMD responses. There are potential advantages of using markers for monitoring anti-osteoporosis treatment in the short term, in addition to the bone mineral measurements, to identify non-responders or non-compliance. The transition of biochemical bone markers into everyday clinical practice requires standardization of assays and quality control programs to reduce large inter-laboratory variations of data, defining criteria of a high bone turnover in terms of reference values, either young adult or age-matched, and better characterization of the markers across geographic areas and races and under various clinical conditions.

### **THE QUALITY OF THE SAMPLE AND ITS IMPACT ON CLINICAL DECISION MAKING**

*D. Mirković, M. Dajak, Z. Šumarac, S. Ignjatović*

*Institute of Medical Biochemistry,  
Clinical Centre of Serbia and Faculty  
of Pharmacy, Belgrade, Serbia*

The medical interpretation of clinical laboratory data is a comparative decision-making process in which a laboratory test result for an individual is compared with a reference interval, derived from a reference population. This sentence seems to describe an easy situation. Lack of knowledge about the quality of the sample and the special issues of the biological material creates a gap between the laboratory and the clinician. To measure quality control material is important for the analytical process. The major concern in this field is the absence of a real sample and its commutability. We perform quality control with artificial samples and hope they will successfully mimic real patients' material. In this paper we will move much closer to the issues concerning the samples and their quality. With a lot of examples from literature and own investigation, we will learn more about:

- lipemia, turbidity, hemolysis and icterus,
- volume displacement effect,
- calibration,
- stability of the analytes,
- use and misuse of reference intervals,
- statistical presentation and misleading interpretation,
- special cases of drug interferences.

Finally, we have to investigate better the sample and the preanalytical process to provide reliable re-

Takođe, potrebno je bolje proučavanje uzorka i preanalitičkog postupka kako bi se obezbedila pouzdanost rezultata. Konsultacije su važno sredstvo koje otvara proces komunikacije, što omogućava da laboratoriju prikažemo kliničaru na nov način. Postoji potreba za prikazivanjem laboratorijskih rezultata na način koji svi njeni korisnici razumeju. Brzi i pouzdani rezultati određivanja, kombinovani sa komentarom i mogućnošću komunikacije, nude odgovarajući nivo laboratorijskog rada. Znanje i širenje istog vodi ka višem nivou laboratorijskog rada, u cilju pouzdanijeg zbrinjavanja pacijenata.

### ISO 15189 I PROGRAMI ZA POREĐENJA IZMEĐU LABORATORIJA

*J. Hejsek*

*Bio-Rad Laboratorije  
Nad ostrovem 7, Prag 147 00  
Češka Republika*

Novi standard ISO 15189, posebno osmišljen za kliničke laboratorije, izdat 2003. godine, svakoj akreditovanoj laboratoriji pruža jedinstvenu mogućnost da na međunarodnom nivou poredi svoje usluge sa bilo kojom drugom akreditovanom laboratorijom u svetu. Isto to garantuju i multilateralni sporazumi između akreditovanih organizacija širom sveta. ISO 15189 sadrži 23 Preduslova za kvalitetan sistem (*Quality System Essentials, QSE*) koje laboratorija mora da ispuni. Za kontrolu kvaliteta najvažniji je *QSE 5.6* – »Zagarantovan kvalitet u postupcima istraživanja«. Svi potrebni preduslovi iz te oblasti biće navedeni u prezentaciji. Prilikom akreditacije laboratorija, važna uloga pridaje se programima za poređenje između laboratorija. Postoje dve vrste programa za međulaboratorijsko poređenje: *EQA*, i poređenje poznatih rezultata laboratorije sa rezultatima srodnih laboratorija, koji se mogu sprovesti svakodnevno ili na mesečnom nivou. Tokom prezentacije razmotrićemo važnost oba ova programa u odnosu na ISO 15189. Kompanija *Bio-Rad laboratorije* trenutno nudi širok izbor programa koji laboratorijama mogu pomoći u ispunjavanju preduslova potrebnih za ISO 15189. Ima programa sa bazom na internetu koji se lako koriste, kao i usavršenijih verzija koje podržavaju sistem Totalne greške (*Total Error*) zasnovan na biološkim varijacijama. Najnoviji i najsavremeniji među njima primenjuje program *Westgard EZ Rules*, koji laboratorijama može pomoći pri izboru najpogodnijeg *Westgard* pravila, kao i velikog broja materijala za kontrolu kvaliteta za svaku analiziranu supstancu – u slučaju da laboratorija unapred precizira zahtevani kvalitet.

sults. The consultation is an important tool which opens a field of communication and will help us to present the laboratory in a new way to the clinician. There is a strong need to show the value of a laboratory that understands its customers. A rapid and reliable test result combined with a comment or a consultation will add value to the work of the laboratories. Knowledge and sharing the knowledge will result in high quality laboratory work, providing safer patient care.

### ISO 15189 AND INTERLABORATORY COMPARISON PROGRAMS

*J. Hejsek*

*Bio-Rad Laboratories  
Nad ostrovem 7, Praha 147 00  
Czech Republic*

In 2003, the new ISO 15189 standard especially developed for clinical laboratories was published. It gives the accredited laboratory a unique option of comparing internationally its services with any other accredited laboratory in the world. This is also guaranteed by the multilateral agreements of accredited organisations throughout the world. ISO 15189 comprises 23 Quality System Essentials which the laboratory has to comply with. For quality control, the most important one is *QSE 5.6* – *Assuring Quality of Examination Procedures*. All the essential requirements of this chapter are mentioned in the presentation. Very important role in the accreditation of a laboratory is given to the interlaboratory comparison programs. There are two types of such comparison programs: *EQA* and comparison of lab's known results with its peer group – which can be performed either daily or on a monthly basis. Importance of both in relation to ISO 15189 is discussed in the presentation. *Bio-Rad* laboratories currently offer a wide range of programs which can help laboratories to comply with ISO 15189 requirements. There are easy, internet-based programs and other, more sophisticated versions which can also work with Total Error based on biological variation approach. The newest state-of-the-art program applies *Westgard EZ Rules* Program which can help laboratory to choose the optimal *Westgard* Rules and number of quality control materials for each analyte – in case laboratory specifies the required quality.



**XV KONGRES  
MEDICINSKE  
BIOHEMIJE I  
LABORATORIJSKE  
MEDICINE**

**NOVI SAD, 17–21. oktobar 2006.**

**XV CONGRESS  
OF MEDICAL  
BIOCHEMISTRY  
AND LABORATORY  
MEDICINE**

**NOVI SAD, 17–21. October 2006.**



**PLENARNE SEKCIJE**

**PLENARY SESSIONS**





**Sekcija 1**  
**GENOM I PROTEOM**

**Session 1**  
**GENOM AND PROTEOM**



*Jugoslav Med Biohem 25: 433–435, 2006*

*Plenarne sekcije  
Plenary sessions*

**MODULATORI TARGET MESTA GENOMSKE  
I PROTEOMSKE REDOKS ĆELIJSKE  
SIGNALIZACIJE U KANCEROGENEZI:  
NOVE DIJAGNOSTIČKE I TERAPIJSKE  
MOGUĆNOSTI**

*D. Pavlović, G. Kocić, T. Jevtović Stoimenov*

*Institut za biohemiju,  
Medicinski fakultet Niš, Srbija*

U složenom putu prenosa signala kroz ćeliju delovanjem faktora spoljašnje sredine, pokreće se transmisija signala kroz specifičnu komunikaciju, interakciju protein-protein (fosforilacija, defosforilacija, asocijacija, disocijacija, oksidacija, glikacija, nitrozilacija, proteoliza) koja određuju biološki odgovor ćelije. Mnogi putevi prenosa signala kroz ćeliju kao što su JAK-STAT, MAP, PKC-kinazna kaskada, NF- $\kappa$ B put transdukcije signala, podležu *down* regulaciji posredovanoj N-acetil-cisteinom i redukovanim glutationom, dok opadanje koncentracije GSH i prisutan redoks stres iniciraju njihovu aktivaciju. Aktivirani redoks signalni putevi su medijatori mitogenih efekata u kancerogenezi. Dve vrste gena, koji inače čine samo jedan mali deo genoma humane ćelije, ostvaruju ključnu ulogu u kancerogenezi. Disfunkcija protoonkogeni i tumor supresor gena dovodi do poremećaja u regulaciji puteva prenosa signala koji kontrolišu ćelijski ciklus, apoptozu, stabilnost genoma, diferencijaciju i morfogenezu. Promene u ovim važnim fiziološkim procesima odgovorne su ne samo za inicijaciju i promociju maligne transformacije ćelije već i za dalju progresiju tumora. Slobodni radikali i njihovi oksidativno modifikovani produkti dovode do aktiviranja kritičnih senzornih mesta u proteomu signalnih puteva koji kontrolišu ćelijsku proliferaciju, apoptozu i promenu ćelijskog fenotipa. Stoga je veoma važno definisanje terapijskih indikacija primene antioksidanata i drugih modulatora target mesta redoks ćelijske signalizacije genomike i proteomike kao složene mreže multifaktorijske onkogene kolaboracije u procesu kancerogeneze.

**REDOX CELL SIGNALING GENOMICS  
AND PROTEOMICS TARGET PLACE  
MODULATORS IN KANCEROGENESIS:  
NEW DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC  
POSSIBILITIES**

*D. Pavlović, G. Kocić, T. Jevtović Stoimenov*

*Institute of Biochemistry,  
Faculty of Medicine, Niš, Serbia*

Within the complex process of signal transduction through the cell under the influence of external factors, signal transmission is initiated through a specific communication, protein-protein interaction (phosphorylation, dephosphorylation, association, dissociation, oxidation, glycation, nitrosylation, proteolysis), determining the biologic response of the cell. Many of the cellular signal transduction pathways, such as JAK-STAT, MAP, PKC-kinase cascade, NF- $\kappa$ B signal transduction pathway, undergo down regulation mediated by N-acetyl-cystein and reduced glutathione, while the decline of GSH concentration and redox stress initiate their activation. Activated redox signaling pathways are the mediators of mitogenic effects in cancerogenesis. Two types of genes, comprising only a small part of the human cell genome, have a key role in cancerogenesis. Proto-oncogene and tumor suppressor gene dysfunction induce disturbances in the regulation of signal transmission pathways which control the cell cycle, apoptosis, genome stability, differentiation and morphogenesis. Alterations in these important physiologic processes are responsible not only for the initiation and promotion of malignant transformation of the cell, but for further tumor progression as well. Free radicals and their oxidatively modified products induce activation of critical sensory loci in the signal pathway proteoma, controlling cellular proliferation, apoptosis and cellular phenotype alteration. Therefore, it is vital to define the therapeutic indications for antioxidants and other modulators of target places of redox cell signaling genomics and proteomics as they are all part of a complex network of multifactorial oncogene collaboration in the process of cancerogenesis.

## ANTIOKSIDATIVNI BIOMARKERI I KANCEROGENEZA

S. B. Pajović, Z. S. Saičić, S. Pejić,  
J. Kasapović, V. Stojiljković, D. T. Kanazir

Laboratorija za molekularnu biologiju  
i endokrinologiju, Institut za nuklearne nauke  
»Vinča«, Beograd, Srbija

Nastanak kancera odvija se u tri glavne faze (inicijacija, promocija i progresija) koje uključuju oksidativni stres. Oksidativni stres definiše se kao narušavanje ravnoteže između nivoa prooksidanata i antioksidanata, u pravcu povećanja nivoa prooksidanata, što za posledicu ima nastanak ireverzibilnih oštećenja ćelija. Da bismo procenili nivo oksidativnog stresa u krvi pacijentkinja sa dijagnozom različitih formi transformacije uterusa, ispitivali smo nivo lipidne peroksidacije i aktivnost antioksidativnih enzima. Prikupljeni su uzorci krvi zdravih žena i pacijentkinja i u njima je određivana aktivnost enzima: superoksid dismutaze, katalaze, glutation peroksidaze, glutation reduktaze, kao i nivo lipidnih hidroperoksida. Rezultati pokazuju da promene ispitivanih parametara variraju u zavisnosti od vrste enzima i dijagnoze. Međutim, može se uopšteno reći da je zapaženo sniženje antioksidativne aktivnosti i povećanje nivoa lipidne peroksidacije. Pored toga, nivo lipidnih hidroperoksida je negativno korelisan sa aktivnošću superoksid dismutaze i glutation peroksidaze i pozitivno korelisan sa aktivnošću katalaze. Dobijeni rezultati takođe pokazuju da je narušavanje antioksidativnog statusa u krvi izraženije kod pacijentkinja sa premalignim (hiperplazija) i malignim (adenokarcinom) lezijama, u poređenju sa pacijentkinjama kod kojih su benigne promene uterusa dijagnostikovane kao polip ili miom.

## ZNAČAJ »TISSUE MICROARRAY« TEHNIKE U DIJAGNOSTICI I PROGNOSTICI NE-HODGINSKIH LIMFOMA, B ĆELIJSKOG POREKLA

G. Marjanović<sup>1</sup>, Lj. Veličković<sup>2</sup>, V. Marjanović<sup>3</sup>,  
L. Mačukanović-Golubović<sup>1</sup>, M. Milenović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika za hematologiju i kliničku imunologiju,  
Klinički centar – Niš, Srbija

<sup>2</sup>Institut za patologiju, Klinički centar  
– Niš, Srbija

<sup>3</sup>Klinika za dečiju hirurģiju i ortopediju,  
Klinički centar – Niš, Srbija

Nova tehnologija »tissue microarray« (TMA) omogućava brzu i ekonomičnu analizu stotine markera na istom setu uzoraka. Najznačajniji nedostatak TMA tehnologije je mala količina tkiva koje se analizira, što je nepogodno kod heterogenih tkiva kao što su lim-

## ANTIOXIDATIVE BIOMARKERS AND CANCEROGENESIS

S. B. Pajović, Z. S. Saičić, S. Pejić,  
J. Kasapović, V. Stojiljković, D. T. Kanazir

Laboratory of Molecular Biology  
and Endocrinology, Vinča Institute of  
Nuclear Sciences, Belgrade, Serbia

Cancer development includes three major steps, initiation, promotion and progression, in which oxidative stress is involved. Oxidative stress is defined as an imbalance between the levels of prooxidants and antioxidants in favour of the former and resulting in irreversible cell damage. We examined the lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in women diagnosed with different forms of uterine cell transformations in order to evaluate the extent of oxidative stress in the blood of such patients. Blood samples of healthy subjects and gynecological patients were collected and subjected to assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and lipid hydroperoxides. The results show that alterations of the measured parameters vary with the enzyme type and diagnosis. However, both reduction in antioxidants and elevation of lipid peroxidation were observed in general. In addition, lipid hydroperoxide levels were negatively correlated with superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities, as well as positively correlated with catalase activity. The obtained results also show that perturbation of the antioxidant status is more pronounced in blood of patients with premalignant (hyperplastic) and malignant (adenocarcinoma) lesions, compared to those with benign uterine changes such as polypus and myoma.

## SIGNIFICANCE OF THE »TISSUE MICROARRAY« TECHNIQUE IN DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF B NON HODGKIN'S LYMPHOMAS

G. Marjanović<sup>1</sup>, Lj. Veličković<sup>2</sup>, V. Marjanović<sup>3</sup>,  
L. Mačukanović-Golubović<sup>1</sup>, M. Milenović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Hematology and Clinical Immunology,  
Clinical Center »Niš«, Niš, Serbia

<sup>2</sup>Institute of Pathology,  
Clinical Center »Niš«, Niš, Serbia

<sup>3</sup>Clinic of Child Surgery and Orthopedia,  
Clinical Center »Niš«, Niš, Serbia

The novel technology of tissue microarray (TMA) allows rapid and cost-effective analysis of hundreds of markers on the same set of specimens. Limited amounts of tissue that could be analyzed and the problem of tissue heterogeneity are the major draw-

fomi. Ovaj nedostatak je nadmašen velikim prednostima koje se ogledaju u homogenosti, efikasnosti i ekonomičnosti imunohistohemijske analize TMA uzoraka. U Ne-Hodginskim limfomima TMA detekcija transkripcionih faktora imunoglobulinskog gena Oct1 i Oct2 i njihovog koaktivatora BOB1 je naročito značajna za razlikovanje T-ćelijama bogatog B-ćelijskog limfoma od klasine-Hodgkinove bolesti, nodularno limfocitno predominantnog Hodgkinovog limfoma i plazmablastnih limfoma. Predviđanje preživljavanja obolelih od pojedinih podtipova difuznog B limfoma krupnih ćelija upotrebom TMA bilo je kompatibilno sa rezultatima cDNK »microarray« analiza. Detekcija p53 tumor supresorskog gena i Ki-67 proliferacionog antigena od velikog je prognostičkog značaja za brojne podtipove ne-Hodginskih limfoma. Uprkos činjenici da je ekspresija p53 i Ki-67 veoma heterogena, stepen poklapanja na TMA u odnosu na klasične imunohistohemijske isečke iznosila je 90% za p53 i 92% za Ki-67 što je dovoljno za svakodnevni rad. Nesumnjivo je da će široka upotreba TMA postati integralni deo svakodnevne kliničke ali i istraživačke prakse u laboratorijama.

backs of the TMA technique for immunohistochemical characterization of lymphomas. These problems do not outweigh the enormous advantages of TMA, namely the cost- and time-saving, and the mostly homogeneous results of immunohistochemistry. In Non Hodgkin's lymphomas (NHL), TMA detection of Oct1 and Oct2 immunoglobulin transcription factors and their coactivator BOB1 showed particularly useful in distinguishing T-cell-rich B-cell lymphomas from classical Hodgkin's disease, nodular lymphocyte predominant Hodgkin's lymphoma and plasmablastic lymphomas. Outcome prediction for subtypes of diffuse large B-cell lymphomas, using a TMA panel with CD10, Bcl-6 and MUM1, was comparable to results of cDNA microarray analysis. Detection of p53 tumor suppressor gene and Ki-67 proliferation antigen is important for the prognosis of many NHL subtypes. In spite of their heterogeneity in expression, TMA showed 90 and 92% concordance rate, with conventional tissue sections for p53 and Ki-67 respectively, and that could be sufficient for routine practice. There is no doubt that the widespread use of TMAs will become an integral part of daily practice in research and routine clinical laboratories.



**Sekcija 2**  
**SLOBODNE TEME**

**Session 2**  
**FREE ORAL**  
**PRESENTATION**





*Jugoslav Med Biohem 25: 439–444, 2006*

*Plenarne sekcije  
Plenary sessions*

**UMERENI HIPOTIROIDIZAM:  
KLINIČKI PROBLEM U ZDRAVOJ  
URBANOJ POPULACIJI INDIJE**

*V. Thakur*

*Odeljenje laboratorijske medicine,  
Bolnica i medicinski  
istraživački centar »Batra«, Nju Delhi, Indija*

Blažim oblikom hipotireoidizma naziva se kliničko stanje u kome dolazi do povećanog lučenja hormona koji stimulišu tireoideu, i to bez promena nivoa hormona koji ona luči. Takvo stanje se često javlja kod osoba starijih od 50 godina, a češće je kod žena nego kod muškaraca. Uprkos činjenici da može izazvati ozbiljan hipotireoidizam, mišljenja o tome da li treba tragati za blažim oblicima poremećaja rada tireoidee kod zdravog stanovništva bez izraženih simptoma su različita. Američka Asocijacija za tireoideu podržava takve preglede; radna grupa američke Službe za preventivu, međutim, takve preglede ne podržava. Iz nerazvijenih zemalja se ne može dobiti jasna slika jer raspolažu zanemarljivim brojem podataka iz te oblasti. Stoga je za sada nemoguće osmisliti kliničke principe za uvođenje kontrole rada tireoidee ili početak njenog lečenja. Postoje uverljivi dokazi da hipotireoidizam može ubrzati koronarne arterijske bolesti. U ovoj studiji pregledali smo 678 zdravih ljudi bez simptoma iz srednjeg i višeg ekonomskog staleža (526 muškaraca i 152 žene) i otkrili da kod značajnog broja postoji blaži oblik hipotireoidizma (13%,  $n = 88$ ). Srednje vrednosti TSH bile su znatno veće u toj grupi pacijenata nego kod pacijenata sa normalnim radom tireoidee ( $8,66 \pm 4,39$  IU/mL vs.  $2,18 \pm 0,93$  IU/mL,  $p < 0,000$ ). Koncentracije fT3 i fT4 bile su u normalnim granicama, iako je koncentracija fT4 bila znatno niža nego kod pacijenata sa normalnim radom tireoidee ( $13,99 \pm 2,87$  pmol/L vs.  $15,6 \pm 2,47$  pmol/L,  $p < 0,00$ ). Našli smo znatno veći broj TMT pozitivnih slučajeva kod grupe sa smanjenom funkcijom tireoidee ( $p < 0,00$ ). Tokom 12 meseci praćenja slučajeva pozitivnih na TMT otkrili smo da je 55% pacijenata dobilo pravo koronarno arterijsko oboljenje. Pacijenti sa smanjenim radom tireoidee dobijali su blaže doze tiroksina. Terapeutske priručnici u zapadnim zemljama preporučuju lečenje pojedina kod kojih je količina TSH u serumu veća od 10 mIU/mL. Međutim, nije sasvim izvesno da li će takav pristup biti uspešan. Kad su u pitanju poremećaji koji nisu precizno definisani i kod kojih prednosti i

**MILD HYPOTHYROIDISM:  
A CLINICAL PROBLEM IN HEALTHY  
URBAN POPULATION OF INDIA**

*V. Thakur*

*Department of Laboratory Medicine,  
Batra Hospital and Medical  
Research Center, New Delhi, India*

Mild hypothyroidism is a term used for describing a clinical condition where small elevations in thyroid stimulating hormone are seen without any change in the thyroid hormone levels. The condition is quite common in elderly over the age of 50 and prevalent in women. Despite the fact that this condition can lead to overt hypothyroidism, controversy continues whether asymptomatic healthy population should be screened for mild thyroid dysfunction. American Thyroid Association supports the screening; however, US Preventive Services task force does not support screening. The picture is unclear from developing countries, which only have scanty data available on this subject. Thus, devising clinical guidelines in this scenario for initiating hypothyroid screening or initiating its treatment is impossible. There is compelling evidence that hypothyroidism could precipitate coronary artery disease. In a research study, we screened 678 healthy asymptomatic individuals from mid to high socioeconomic strata (526 males and 152 females) and revealed a substantial percentage of population having mild hypothyroidism (13%,  $n = 88$ ). The mean TSH levels were significantly higher in this group of patients when compared with euthyroids ( $8,66 \pm 4,39$  IU/mL vs.  $2,18 \pm 0,93$  IU/mL,  $p < 0,000$ ). fT3 and fT4 concentrations were within normal limits, although the fT4 concentration was significantly lower than in euthyroids ( $13,99 \pm 2,87$  pmol/L vs.  $15,6 \pm 2,47$  pmol/L,  $p < 0,00$ ). We found a significantly higher number of TMT positive cases in the hypothyroid group ( $p < 0,00$ ). In the 12 months of follow-up of TMT positive cases, we managed to find that 55% of patients developed frank CAD. The hypothyroid patients were treated with mild doses of thyroxine. Therapeutic guidelines in the Western countries recommend treatment in individuals with serum TSH levels higher than 10 mIU/mL. But there is gross clinical uncertainty if this approach will really benefit. In disorders for which the definition of the condition is imprecise and the benefits and risks of treatment are not clearly established, patient prefer-

mane lečenja nisu jasno utvrđene, u donošenju odluke o lečenju presudnu ulogu ima stanje pacijenta. Sve u svemu, smatramo da treba nastaviti sa istraživanjem metaboličkih faktora, kao što su visokosenzitivni C reaktivni protein i homocistein, jer mogu poslužiti za rano predviđanje koronarnih arterijskih bolesti kod ovog sindroma. Počeli smo sa radom na HsCRP i homocisteinu, ali iz našeg centra još uvek nema novih podataka.

### **CIRKULIŠUĆI sCD40 LIGAND U KARDIOVASKULARNIM BOLESTIMA I INFLAMATORNIM STANJIMA**

*S. Stanković<sup>1</sup>, M. Ilić<sup>1</sup>, Z. Vasiljević<sup>2</sup>,  
B. Vujisić-Tešić<sup>2</sup>, N. Majkić-Singh<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institut za medicinsku biohemiju,  
Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija*

<sup>2</sup>*Institut za kardiovaskularne bolesti,  
Klinički centar Srbije, Beograd, Srbija*

CD40L, glikoprotein membrane tipa II, sastavljen od 261 amino-kiseline, član familije faktora nekroze tumora (TNF), identifikovan je inicijalno na ćelijama imunološkog sistema (aktiviranim CD4+ ćelijama, mastocitima, bazofilima, eozinofilima i NK ćelijama). CD40 je konstitutivno eksprimiran na B ćelijama, makrofagama i dendritičnim ćelijama. CD40L i CD40 su takođe prisutni na endotelnim ćelijama, glatkim mišićnim ćelijama, monocitima i makrofagama. Više od 95% cirkulišućeg CD40L nalazi se u trombocitima. CD40L i sCD40L imaju strukturne domene koji omogućavaju brojne funkcije: vezivanje za CD40 receptor preko TNF homologog domena, vezivanje za glikoprotein IIb/IIIa preko lizin-arginin-glutamat motiva, izazivanje signalnih reakcija koje su posledica vezivanja CD40L za receptor i njegovih rastvorljivih produkata cepanja. Funkcije trombocitnog CD40L posledica su interakcije ovih domena. Kada se eksprimira na površini trombocita i izloži ćelijama koje nose CD40, CD40L trombocita ima mogućnost iniciranja različitih inflamatornih odgovora, uključujući ekspresiju adhezionih receptora, ekspresiju tkivnog faktora i oslobađanje hemokina. Cirkulišući sCD40L ima proinflamatornu i protrombotičku aktivnost. Povećane koncentracije sCD40L utvrđene su u kardiovaskularnoj bolesti i brojnim inflamatornim stanjima, kao što su reumatoidni artritis, anemija srpastih ćelija ili sistemski eritemski lupus. Naša iskustva sa određivanjem sCD40L vezana su za njegovo određivanje kod pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom, mitralnom regurgitacijom i akutnim pankreatitisom. Iako dobijeni rezultati naizgled nemaju direktan uticaj na kliničku praksu, farmakološko delovanje na interakciju CD40-CD40L dalo je zadovoljavajuće rezultate kod različitih patoloških stanja.

ences play a critical role in treatment decisions. Overall, we feel that metabolic factors like high sensitive C reactive protein and homocystein should be further investigated as early predictors of coronary artery disease in this syndrome. We have now started working on HsCRP and homocystein, but no data is yet available from our center.

### **CIRCULATING sCD40 LIGAND IN CARDIOVASCULAR DISEASE AND INFLAMMATORY CONDITIONS**

*S. Stanković<sup>1</sup>, M. Ilić<sup>1</sup>, Z. Vasiljević<sup>2</sup>,  
B. Vujisić-Tešić<sup>2</sup>, N. Majkić-Singh<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Institute of Medical Biochemistry,  
Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia*

<sup>2</sup>*Institute of Cardiovascular Diseases,  
Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia*

CD40L, 261-amino acid type II membrane glycoprotein, member of the tumor necrosis factor (TNF) family, was originally identified on the cells of the immune system (activated CD4+ cells, mast cells, basophils, eosinophils, and natural killer cells). CD40 is constitutively expressed on B cells, macrophages and dendritic cells. CD40L and CD40 are also present on several cells of the vasculature, including endothelial cells, smooth muscle cells, monocytes and macrophages. More than 95% of the circulating CD40L exists in platelets. CD40L and sCD40L are known to have structural domains that allow these proteins to have multiple functions. First, the TNF homology domain allows for binding to the receptor, CD40. Second, the lysine-arginine-glutamic acid motif allows for binding to glycoprotein IIb/IIIa. Third, the trimeric structure of CD40L and its soluble cleavage product allow for the induction of signaling reactions when bound to receptors. The functional activities of platelet CD40L are reflective of these multiple domains. When expressed on the surface of platelets and exposed to CD40-bearing vascular cells, platelet-associated CD40L is capable of initiating various inflammatory responses, including expression of inflammatory adhesion receptors, expression of the tissue factor, and release of chemokines. Soluble CD40L is also proinflammatory and has prothrombotic activity. Although recent studies have described increased levels of sCD40L in cardiovascular diseases and a broad spectrum of inflammatory conditions, such as rheumatoid arthritis, sickle cell anemia or systemic lupus erythematosus, we will present our experience with sCD40L in acute coronary syndrome, mitral regurgitation and acute pancreatitis. Although our findings do not currently affect clinical practice, pharmacological manipulation of the CD40-CD40L axis proved effective in various pathological states.

## PARAMETRI HEMOSTAZE U PACIJENATA KOD KOJIH JE INDIKOVANA KORONARNA ENDARTERECTOMIJA

V. Subota, S. Mandić-Radić,  
I. Petrović, Đ. Radak

*Institut za medicinsku biohemiju VMA,  
Institut za KVB »Dedinje«,  
Zavod za zdravstvenu zaštitu radnika MUP,  
Beograd, Srbija*

Dok se tradicionalni pristup predviđanju arterijske okluzije oslanja na faktore rizika koji su vezani za lipide i način života, mnoge epidemiološke studije potvrđuju da visok rizik za aterosklerozu predstavljaju aktivirana fibrinoliza i koagulacija. Hronična inflamacija igra značajnu ulogu u inicijaciji i progresiji ateroskleroze. Cilj našeg rada bio je da se uporede promene parametara hemostaze u odnosu na povišeni nivo C-reaktivnog proteina (CRP), kao markera sistemske inflamacije. Proučavana grupa obuhvatila je 50 pacijenata podeljenih u dve grupe od po 25 pacijenata, G1 (CRP 5 mg/L) i G2 (CRP 5 mg/L). Nije bilo pacijenata sa poremećajima hemostaze i perifernim vaskularnim bolestima. Ispitivani su parametri lipidnog statusa: trigliceridi, ukupni holesterol, HDL, LDL, Lp(a) i apolipoproteini A i B. Od parametara hemostaze određivani su: fibrinogen, protein C, koagulacioni faktor VII, D-dimer, 2-antiplazmin, plazminogen, inhibitor aktivatora plazminogena -1, Von Willebrand faktor, fibrin monomer, agregacija trombocita sa ADP i epinefrinom kao agonistima, i broj trombocita. Korišćene su standardne metode i komercijalni reagensi. Rezultati su upoređivani između grupa i pokazali su da su lipidni parametri bili u okviru referentnog opsega, dok su FVII, D-d, PAI-1 i fibrinogen bili značajno povećani ( $p < 0,001$ ) u G2. Nije bilo značajnih razlika između ostalih parametara hemostaze, iako su svi oni bili povećani u G2. Ovi nalazi ukazuju da, i pored regulisanih ostalih faktora rizika, aktivirana fibrinoliza i koagulacija kao posledice sistemske inflamacije predstavljaju dodatni rizik koji može dovesti do nepovoljnog ishoda i daljih komplikacija.

## NATRIURETSKI PEPTIDI – OCENA DIJAGNOSTIČKOG DOPRINOSA ODREĐIVANJA MOŽDANOG NATRIURETSKOG PEPTIDA

R. Kovačević, M. Mirić, O. Stojanović

*Institut za kardiovaskularne bolesti »Dedinje«,  
Beograd, Srbija*

Srčane pretkomore i komore sintetišu i izlučuju nekoliko natriuretskih hormona, uglavnom kao odgovor na povećanje intrakardijalnog pritiska. Srčani hormoni,

## HAEMOSTATIC PARAMETERS IN PATIENTS TO BE SUBJECT TO CORONARY ENDARTERECTOMY

V. Subota, S. Mandić-Radić,  
I. Petrović, Đ. Radak

*Institute of Medical Biochemistry MMA,  
Institute of CVD »Dedinje«,  
Health Care Institute for Employees of  
the Ministry of Internal Affairs, Belgrade, Serbia*

While traditional approaches to predicting arterial occlusion rely on behavioural and lipid related risk factors, the concept that impaired fibrinolysis and coagulation are risk factors for atherosclerosis is strongly supported by many epidemiologic studies. Chronic inflammation plays an important role in the initiation and progression of atherosclerosis. The aim of our study was to compare the changes in haemostatic parameters in relation to elevated levels of C-reactive protein (CRP), as a systemic inflammation marker. The studied population comprised 50 patients divided into two groups, G1, consisting of 25 patients (CRP 5 mg/L), and G2 (CRP 5 mg/L). There were no patients with haemostatic disturbances and peripheral vascular diseases. The parameters of lipid status: triglycerides, total cholesterol, HDL, LDL, Lp(a) and apolipoproteins A and B, were determined. The haemostatic parameters: fibrinogen, protein C, coagulation factor VII, D-dimer, 2-antiplasmin, plasminogen, plasminogen activator inhibitor -1, Von Willebrand factor, fibrin monomer, platelets aggregation with ADP and epinephrine as agonists, and the number of platelets were measured. Standard methods and commercial reagents were used. The results were compared between the groups and showed that lipid parameters were within the recommended range, but FVII, D-d, PAI-1 and fibrinogen were significantly increased ( $p < 0,001$ ) in G2. There were no significant differences in the other parameters of haemostasis, but all of them were elevated in G2. With other risk factors in control, these findings indicate that impaired fibrinolysis and coagulation as consequences of inflammation are additional risk factors for an unfavourable outcome and further complications.

## NATRIURETIC PEPTIDES – EVALUATION OF THE DIAGNOSTIC CONTRIBUTION OF BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE

R. Kovačević, M. Mirić, O. Stojanović

*Institute of Cardiovascular Diseases »Dedinje«,  
Belgrade, Serbia*

Both atria and ventricles synthesize and secrete several natriuretic peptide hormones – largely in response to increased intracardiac pressure. The pro-

atrijumski natriuretski peptid (ANP) i moždani natriuretski peptid (BNP) i njihovi prohormonski »metaboliti« doprinose kardiovaskularnoj homeostazi. Natriuretski peptidni sistem najviše se aktivira u ventrikularnoj disfunkciji. Merenje koncentracije moždanog natriuretskog peptida (BNP-a) u plazmi može koristiti u postavljanju dijagnoze srčane insuficijencije. Cilj istraživanja bilo je utvrđivanje dijagnostičkog doprinosa određivanja BNP-a u plazmi u poređenju sa dijagnostičkim doprinosom rendgen snimka i ultrazvučnog pregleda u dijagnostikovanju srčane insuficijencije. Koncentracije BNP-a u plazmi određivane su imunofluorescentnim testom (POCT Triage, BIOSITE Laboratories) kod 62 bolesnika sa srčanom insuficijencijom (dobi  $55,82 \pm 9,09$  godina, 74,19% muškaraca, ishemijskom  $n=30$  i dilatativnom kardiomiopatijom  $n=32$ , NYHA funkcionalnom klasom II  $n=33$ , i klasom III  $n=29$ , LVEF  $27,77 \pm 4,35\%$ ). Ocena dijagnostičkog doprinosa merenja koncentracije BNP-a u komparaciji sa dijagnostičkim doprinosom rendgenskog snimka grudnog koša i eho dijagnostikom utvrđivana je diskriminatornom analizom vrednosti LVEF (parametri eho dijagnostike), kardiotorakalnog indeksa (parametri rendgen dijagnostike) i koncentracije BNP-a, sa težinom bolesti prema NYHA klasifikaciji. Rezultati diskriminatorne analize potvrđuju da klasifikovanje bolesnika prema NYHA klasifikaciji sa verovatnoćom  $p=0,903$  zavisi od vrednosti LVEF, odnosno da eho dijagnostička metoda tačno određuje težinu oboljenja prema NYHA klasifikaciji u 90,3% slučajeva. Rezultati diskriminatorne analize pokazuju da klasifikovanje bolesnika prema NYHA klasifikaciji sa verovatnoćom  $p=0,806$  zavisi od vrednosti kardiotorakalnog indeksa, odnosno da rendgen dijagnostička metoda tačno određuje težinu oboljenja prema NYHA klasifikaciji u 80,6% slučajeva. Rezultati diskriminatorne analize potvrđuju da klasifikovanje bolesnika prema NYHA klasifikaciji sa verovatnoćom  $p=0,871$  zavisi od vrednosti BNP-a, odnosno da merenje njegove koncentracije, kao dijagnostička metoda, tačno određuje težinu oboljenja prema NYHA klasifikaciji u 87,1% slučajeva. Rezultati diskriminatorne analize navedenih parametara ukazuju na to da je veći dijagnostički doprinos eho dijagnostike (90,3% ispitanika klasifikovano korektno) od merenja koncentracije BNP-a (87,1% ispitanika klasifikovano korektno), dok je dijagnostički doprinos rendgen snimanja manji (80,6% ispitanika klasifikovano korektno).

ducts of the heart, atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), and possibly their prohormone »metabolites«, contribute to cardiovascular homeostasis. The natriuretic peptide system is activated to its highest level in ventricular dysfunction. Plasma concentration of BNP could be of use in the diagnosis of heart failure. Our aim was to determine the diagnostic contribution of BNP plasma measurement in comparison with the diagnostic contribution of X ray imaging and ultrasound examination in the diagnostics of heart failure. Plasma concentration of BNP was measured by the POCT Triage immunofluorescent assay (BIOSITE Laboratories) in 62 heart failure patients (aged  $55.82 \pm 9.09$  years, 74.19% male,  $n=30$  ischemic,  $n=32$  dilated cardiomyopathy,  $n=33$  NYHA functional class II,  $n=29$  class III, LVEF  $27.77 \pm 4.35\%$ ). Assessment of the diagnostic contribution of BNP plasma concentration measurement in comparison with the diagnostic contribution of chest X ray image and ECHO methods was determined using discriminatory analysis of LVEF (echo diagnostic parameters), cardiothoracic index (X ray parameters) and BNP plasma concentration, with severity of disease expressed according to the NYHA classification. Results of discriminatory analysis confirmed that gradation of patients using the NYHA classification with probability  $p=0.903$  depends on the LVEF value, that is, the echo diagnostic method correctly classifies the severity of disease according to the NYHA classification in 90.3% of cases. Results of discriminatory analysis showed that classification of patients according to the NYHA with the probability  $p=0.806$  depends on the value of the cardiothoracic index, that is, the X ray diagnostic method correctly classifies the severity of disease according to the NYHA classification in 80.6% of cases. Results of discriminatory analysis confirmed that classification of patients according to the NYHA with probability  $p=0.871$  depends on the BNP value, that is, measurement of BNP plasma concentration correctly classifies the severity of disease in 87.1% of cases. Results of discriminatory analysis of the mentioned parameters showed that the echo diagnostic contribution (90.3% of patients classified correctly) was larger than the contribution of BNP measurement (87.1% of patients classified correctly), while the diagnostic contribution of X ray images was lower (80.6% of patients classified correctly).

## TARTARAT-REZISTENTNA KISELA FOSFATAZA I OSTEOKALCIN KOD PACIJENATA SA OSTEOPOROZOM I OSTEOPENIJOM

J. Mehanović Nikolić<sup>1</sup>, J. Laloš-Miljuš<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zavod za biohemiju, Medicinski fakultet  
Univerziteta u Banjoj Luci

<sup>2</sup>Klinički centar Banja Luka

Mjerenjem katalitičke aktivnosti kisele fosfataze rezistentne na tartarat (TRKP) u serumu procjenjuje se osteoklastična aktivnost, pošto je koštane ćelije secerniraju tokom resorpcije. Osteokalcin je nekola genski peptid koji učestvuje u procesu mineralizacije kostiju. Korišten je u ranom prepoznavanju primarne osteoporoze. Cilj je bio da se utvrdi da li postoji razlika u katalitičkoj aktivnosti TRKP, kao i u serumskoj koncentraciji osteokalcina, u ispitanika sa osteoporozom i osteopenijom. Prva grupa (n=60) imala je T-scor mineralne gustine kosti (BMD)  $\leq -2,3$ , što se, prema standardima WHO, definiše kao osteoporoza. Druga grupa (n=60) imala je T-scor između  $-0,4$  i  $-1,7$ , što prema standardima WHO odgovara smanjenoj koštanoj masi (osteopeniji). Katalitička aktivnost TRKP mjerena je kinetičkom metodom firme BIOMERIEUX (Njemačka), na analizatoru Mira Cobas plus (Njemačka), BMD je određen ultrazvučnom tehnikom, a koncentracija osteokalcina tehnikom ECL, firme ROCHE (Njemačka), na analizatoru Elecsys 2010 (Njemačka). Rezultati ukazuju na značajno povećanje katalitičke aktivnosti TRKP u serumu ispitanika sa osteoporozom, u odnosu na grupu sa osteopenijom ( $p < 0,001$ ). Za osteokalcin je utvrđena statistički značajna razlika između dvije grupe ispitanika ( $p < 0,01$ ). Smatramo da određivanje katalitičke aktivnosti TRKP u serumu, kao i koncentracije osteokalcina, uz druge biohemijske markere koštane pregradnje, može da unaprijedi dijagnostiku osteoporoze.

## TARTRATE-RESISTANT ACID PHOSPHATASE AND OSTEOCALCIN IN PATIENTS WITH OSTEOPOROSIS AND OSTEOPENIA

J. Mehanović Nikolić<sup>1</sup>, J. Laloš-Miljuš<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, School of Medicine,  
University of Banja Luka, Bosnia and Herzegovina

<sup>2</sup>Clinical Center, Banja Luka,  
Bosnia and Herzegovina

A way to estimate the activity of osteoclasts is to measure the catalytic activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), as bone cells secrete it during resorption. Osteocalcin (OC) is a non-collagen peptide involved in the bone mineralization process. It is used in the early diagnosis of primary osteoporosis. The aim of our work was to determine if there was a difference in both the catalytic activity of the TRAP and the serum concentration of OC in patients affected by osteoporosis and osteopenia. The bone mineral density T-score (BMD) of the first group of patients (n=60) was not higher than  $-2.3$ , defined by the WHO as osteoporosis. The T-score of the second group (n=60) was found to be between  $-0.4$  and  $-1.7$ , defined by the WHO as osteopenia. The catalytic activity of TRAP was determined by the kinetic method proposed by the BIOMERIEUX Company (Germany), using a Mira Cobas plus analyzer (Germany). The BMD was determined by an ultrasound technique. The ROCHE ECL technique and the Elecsys 2010 analyzer (Germany) were used to measure the OC concentration. The results show a significant increase in the catalytic activity of TRAP in the osteoporosis patients sera when compared with the group with osteopenia ( $p < 0.001$ ). Statistically significant difference was found between the groups in the case of OC ( $p < 0.01$ ). We conclude that the TRAP catalytic activity in serum, as well as OC concentration measurement, together with other biochemical markers of bone turnover, can be useful in the diagnosis of osteoporosis.

## NEOPHODNOST PRIDRŽAVANJA STANDARDNIM USLOVIMA PRI PREGLEDU URINA (SEDIMENTA)

S. Đ. Jovanović, N. Prišić, M. Janković

*Hemolab, Medicinska laboratorija,  
Sremska Kamenica, Novi Sad, Srbija*

U radu je dokazana neophodnost pridržavanja standardnim uslovima pri kompletnom pregledu urina, odn. sedimenta. Analizom 31 patološkog uzorka prvog jutarnjeg urina upoređene su razlike u broju izbrojanih elemenata (ćelije okruglog epitela, epitelne ćelije, leukociti, sveži eritrociti, izlučeni eritrociti i hijalini cilindri) u količinama od 5 i 10 ml urina. Ostali parametri kao što su oksalati, amorfni urati i fosfati, bakterije i sluz su takođe praćeni, ali nisu brojčano evidentirani. Dobijeni su sledeći rezultati (ukupan broj elemenata): okrugli epitel – 3 (5 ml) prema 14 (10 ml); epitelne ćelije – 78 (5 ml) prema 132 (10 ml); leukociti – 202 (5 ml) prema 385 (10 ml); sveži eritrociti – 38 (5 ml) prema 63 (10 ml); izlučeni eritrociti – 14 (5 ml) prema 29 (10 ml); hijalini cilindri – 1 (5 ml) prema 6 (10 ml). Budući da su razlike između 5 i 10 ml kod 6 »kritičnih« parametara uglavnom dvostruke, smatrali smo da nema potrebe za statističkom obradom podataka. Jasno je da ovi rezultati imaju dijagnostički i terapijski značaj za sve koji se bave ovom problematikom.

## THE NECESSITY OF ADHERING TO STANDARD CONDITIONS IN URINE (SEDIMENT) INVESTIGATIONS

S. Đ. Jovanović, N. Prišić, M. Janković

*Hemolab, Medicinska laboratorija,  
Sremska Kamenica, Novi Sad, Serbia*

The necessity to appreciate the standard conditions (10 ml) in complete urine (sediment) investigations is approved in the paper. In 31 pathologic samples of the first morning urine, the differences in the number of investigated parameters (round epithelial cells, plate epithelial cells, leukocytes, erythrocytes, segregated erythrocytes, hyalin cylinders) are compared in the samples of 5 and 10 ml of urine. Other parameters like oxalates, amorph urates and phosphates, bacteria and mucus, are monitored as well, but not presented in numbers. Following results have been achieved (total number of elements): round epithel cells – 3 (5 ml) to 14 (10 ml); plate epithelial cells – 78 (5 ml) to 143 (10 ml); leukocytes – 202 (5 ml) to 385 (10 ml); fresh erythrocytes – 38 (5 ml) to 63 (10 ml); segregated erythrocytes – 14 (5 ml) to 228 (10 ml); hyalin cylinders – 1 (5 ml) to 6 (10 ml). Taking into account that differences between 5 and 10 ml in 6 »critical« parameters are nearly double, statistic evaluation of data seemed to be unnecessary. The results are of major diagnostic and therapeutic importance for everyone involved in the matter.

**Sekcija 3**  
**SAVREMENI ASPEKTI**  
**ATEROTROMBOTSKE**  
**BOLESTI**

**Session 3**  
**CURRENT ASPECTS**  
**OF THE**  
**ATHEROTHROMBOTIC**  
**DISEASE**





Jugoslav Med Biohem 25: 447–450, 2006

Plenarne sekcije  
Plenary sessions**LIPIDI I ATEROSKLEROZA**M. Đerić<sup>1</sup>, E. Stokić<sup>2</sup>, B. Vučković<sup>1</sup>,  
S. Kojić-Damjanov<sup>1</sup>, V. Čabarkapa<sup>1</sup><sup>1</sup>Institut za laboratorijsku medicinu  
<sup>2</sup>Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti  
metabolizma,  
Klinički centar – Novi Sad, Novi Sad, Srbija

Lipidi imaju značajnu ulogu u aterogenezi, počev od inicijalnih promena, te se danas najviše razmatra njihova prediktivna vrednost za koronarnu bolest srca, kao i mogućnosti novih terapijskih pristupa. Centralno mesto zauzimaju LDL čestice, jer je samo za redukciju LDL-holesterola dokazano da redukuje morbiditet i mortalitet udružen sa aterosklerozom. Osim regulacije ekspresije LDL-receptora, veliki klinički značaj imaju oksidisani LDL (ox-LDL) i male guste LDL (sdLDL) koje su produkt intravaskularnog remodelovanja trigliceridima bogatih lipoproteina, dok egzaktan uloga anti-oxLDL antitela u progresiji ateroskleroze i klinički značaj ostaju nejasni. Poslednjih godina, međutim, potpunije upoznavanje bazičnih mehanizama uključenih kako u aterosklerozu, tako i u metaboličku sudbinu lipida i lipoproteina, ističe i značajnu ulogu ostalih lipoproteinskih čestica, i to, ne samo u progresiji, već i u inicijaciji ateroskleroze i aterotromboze.

**INTERAKCIJA IZMEĐU OKSIDATIVNOG STRESA I INFLAMATORNIH BIOMARKERA U ATEROSKLEROZI**V. B. Đorđević<sup>1</sup>, T. Cvetković<sup>1</sup>,  
M. Deljanin-Ilić<sup>3</sup>, V. Čosić<sup>2</sup>, L. Zvezdanović<sup>2</sup>,  
S. Kundalić<sup>2</sup>, S. Madić<sup>2</sup>, I. Stojanović<sup>1</sup><sup>1</sup>Institut za biohemiju,  
Medicinski fakultet, Niš, Srbija  
<sup>2</sup>Centar za medicinsku biohemiju,  
Klinički centar – Niš, Srbija  
<sup>3</sup>Institut za kardiovaskularne bolesti  
»Niška Banja«, Niška Banja, Srbija

Brojni rezultati pokazuju da postoji uska veza između inflamacije, oksidativnog stresa i aterosklero-

**LIPIDS AND ATHEROSCLEROSIS**M. Đerić<sup>1</sup>, E. Stokić<sup>2</sup>, B. Vučković<sup>1</sup>,  
S. Kojić-Damjanov<sup>1</sup>, V. Čabarkapa<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Laboratory Medicine  
<sup>2</sup>Clinic for Endocrinology,  
Diabetes and Metabolic Diseases,  
Clinical Center – Novi Sad, Novi Sad, Serbia

Lipids play a pivotal role in the atherogenesis, starting from initial changes. Their predictive value in coronary heart disease and development of novel therapeutic strategies is an increasingly addressed issue nowadays. LDL particles are fundamental, because reduction of LDL-cholesterol was proven to reduce morbidity and mortality associated with atherosclerosis. Besides the regulation of LDL-receptor expression, significant clinical importance is assigned to oxidized LDL (ox-LDL) and small dense LDL (sdLDL) that are generated through intravascular remodelling of triglyceride-rich lipoproteins, while the exact role of anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis propagation and their clinical significance still remain unclear. In recent years, however, better understanding of the basic mechanisms involved in atherosclerosis development, as well as in the metabolic fate of lipids and lipoproteins, emphasizes the crucial role of other lipoprotein particles not only in the propagation, but also in the initiation of atherosclerosis and atherothrombosis.

**THE INTERACTION BETWEEN OXIDATIVE STRESS AND BIOMARKERS OF INFLAMMATION IN ATHEROSCLEROSIS**V. B. Đorđević<sup>1</sup>, T. Cvetković<sup>1</sup>,  
M. Deljanin-Ilić<sup>3</sup>, V. Čosić<sup>2</sup>, L. Zvezdanović<sup>2</sup>,  
S. Kundalić<sup>2</sup>, S. Madić<sup>2</sup>, I. Stojanović<sup>1</sup><sup>1</sup>Institute of Biochemistry,  
Faculty of Medicine, Niš, Serbia  
<sup>2</sup>Centre for Medical Biochemistry,  
Clinical Centre – Niš, Serbia  
<sup>3</sup>Institute of Cardiovascular Diseases  
»Niška Banja«, Niška Banja, Serbia

A number of data demonstrated that there is a close relation between inflammation, oxidative stress

ze. Inicijalni događaj u aterogenezi je disfunkcija ili aktivacija endotela. Ona može biti izazvana mehaničkim, hemijskim, infektivnim ili imunološkim faktorima, što ukazuje da gotovo svi faktori rizika za aterosklerozu mogu dovesti do endotelne disfunkcije. To izaziva kaskadu inflamatornih reakcija u kojima učestvuju monociti, makrofagi, T limfociti i ćelije glatkih mišića. Ove ćelije i endotel nadalje proizvode adhezione molekule, citokine, faktore rasta i metalloproteinaze, prolongirajući aterogenezu. Aktivacija enzima koji proizvode oksidantse, kao što su NADPH oksidaza i azot-monoksid sintaza (NOS), dovodi do oksidativnog stresa i posledične oksidativne modifikacije LDL, a oxLDL potom može aktivirati endotelne ćelije. Oksidativno modifikovani LDL preuzimaju makrofagi putem »scavenger« receptora. Rezultat toga je akumulacija holesterola u makrofagima i stvaranje penastih ćelija koje predstavljaju bazu ateroskleroze. Čitav proces se ciklično ponavlja, dovodeći do formiranja uznapredovalih aterosklerotičnih promena koje karakteriše jezgro sačinjeno od lipida i nekrotičnog tkiva pokriveno fibroznom kapom.

and atherosclerosis. The initial event in atherogenesis is some form of endothelial dysfunction or activation. It can be triggered by mechanical, chemical, infectious or immunological insults, indicating that almost all risk factors for atherosclerosis could promote endothelial dysfunction. This triggers a cascade of inflammatory reactions, in which monocytes, macrophages, T lymphocytes and smooth muscle cells participate. These cells and the endothelium produce adhesion molecules, cytokines, growth factors and metalloproteinases, thus prolonging atherogenesis. An activation of oxidative producing enzymes such as NADPH oxidases and nitric oxide synthase (NOS) leads to oxidative stress and subsequent oxidative modification of LDL, and oxLDL can in turn activate the endothelial cells. Oxidatively modified LDL is uptaken by macrophages via scavenger receptors. This results in the accumulation of cholesterol within the macrophages and the formation of foam cells, a hallmark of atherosclerosis. The process continues with repeated cycles leading to the characteristic advanced lesions with the core of lipids and necrotic tissue which is covered by a fibrous cap.

## HEMOSTAZNI SISTEM U GENEZI ATEROTROMBOZE

A. Lučić

*Novi Sad, Srbija*

Aterosklerozu i arterijsku trombozu su dva direktno međusobno zavisna patološka procesa i stoga naziv aterotromboza na najbolji mogući način izražava suštinu ovog složenog sistemskog oboljenja. Aterotromboza u progresivnom kontinuitetu dovodi do dramatičnog narušavanja integriteta arterijskih krvnih sudova velikog i srednjeg promera i izaziva delimični ili potpuni prekid protoka krvi u obolelim krvnim sudovima. U patogenezi aterotromboze, hemostazni sistem je sa svoje tri osnovne komponente: trombocitima, koagulacijskim i fibrinoliznim činiocima, endotelnim ćelijama i dubljim strukturama unutrašnje površine zida krvnog suda, neposredno i prvenstveno odgovoran za nastanak tromboze. Osnovni preduslov nastanka arterijske tromboze je poremećaj funkcije endotela ili narušavanje njegovog integriteta. U aterotrombozi, u svim stadijumima razvoja aterosklerotskih promena na intimi krvnog suda, taj osnovni preduslov je u celosti ispunjen. Najdrastičniji pokretački činilac arterijske tromboze predstavlja ruptura vulnerabilne ili nestabilne ateromske ploče. Sadržaj krupnog lipidnog jezgra ateroma, rascepljeni tanki fibrozni pokrivač, obilje vanćelijskog matriksa, brojna prisutnost zapaljenjskih ćelija i visok sadržaj tkivnog činioca (TF) izazivaju eksplozivnu aktivaciju trombocita i koagulacijskog sistema. Signalni prenosni mehanizmi koji se pokreću vezivanjem spe-

## HEMOSTATIC SYSTEM IN ATHEROTHROMBOSIS

A. Lučić

*Novi Sad, Serbia*

Atherosclerosis and arterial thrombosis are two directly interdependent pathologic processes and the term atherothrombosis covers most fully the essence of this complex systemic disease. Atherothrombosis in continual progression leads to a dramatic disturbance of the large and medium-sized arteries integrity and provokes partial or complete blood flow interruption in the diseased vessels. In the pathogenesis of atherothrombosis, the hemostatic system with its three basic components: platelets, coagulation and fibrinolytic factors, endothelial cells and the deeper structure of the inner layer of blood vessels, is mainly and directly responsible for the occurrence and development of thrombosis. The main prerequisite of arterial thrombosis is the endothelial dysfunction, as well as a breach of the endothelial integrity. In atherothrombosis, during each phase of the development of atherosclerotic changes on the intima of the blood vessel, this basic cause is fully realized. The most powerful trigger of arterial thrombosis is the rupture of the vulnerable or unstable atherosclerotic plaque. Large lipid core of the disrupted plaque, splitting of the thin fibrous cap, high density of inflammatory cells, abundant extracellular matrix and high content of the tissue factor (TF), promote the explosive activation of platelet and clotting mechanisms. Signal transduction mechanism, initiated upon the binding

cifičnih agonista za vezne membranske receptore na površini trombocita stimulišu izlazak kalcijuma iz tubularnog sistema trombocita i izazivaju promenu oblika trombocita i pražnjenje sadržaja njihovih granula. Adhezija i aktivacija trombocita i proces njihove međusobne agregacije su direktne posledice prepoznavanja trombogenog područja u krvnom sudu od strane ovih ćelija. Budući da reaktivnost trombocita zavisi od brojnih adhezivnih međureakcija, većina glikoproteina membrane trombocita su receptori adhezivnih proteina. Po svojoj strukturi oni uglavnom pripadaju integrinima, selektinima, i glikoproteinima bogatim leucinom. Punu funkcionalnost ovih receptora omogućava njihova neposredna udruženost sa dinamičnim lipidnim skupinama, sastavljenim iz sfingolipida i holesterola, koje slobodno plutaju unutar tečne frakcije ćelijske opne trombocita. Raspad ateromske ploče izaziva i burnu aktivaciju koagulacijskog sistema pod uticajem TF-a koji u kofaktorskoj poziciji vezuje FVII/FVIIa i uvećava katalitičku aktivnost FVIIa više od milion puta. TF se u krvi nalazi vezan za cirkulišuće mikročestice stvorene u monocitima, a u značajnim količinama se oslobađa i iz aktiviranih endotelskih ćelija i ćelija u okruženju krvnog suda. P-selektin, koji se nalazi u membrani trombocitnih alfa-granula kao i u skladišnim granulama endotela, premešta se u procesu aktivacije na površinu ćelija a može se naći i u cirkulaciji. Ovaj adhezivni receptor pokreće proces stvaranja mikročestica u monocitima koje sadrže TF, istovremeno ih zadržavajući na mestu stvaranja trombina i fibrina. O posebnoj složenosti mehanizama aktivacije hemostaznog sistema govori i višestruko i različito delovanje trombina. Njegova osnovna funkcija je stvaranje fibrina, ali vezivanjem za trombomodulin on pokreće aktivaciju proteina C, a takođe stimuliše i oslobađanje tkivnog aktivatora i inhibitora aktivatora plazminogena iz endotelskih ćelija. Na taj način trombin, osim što je najuticajni pokretač aktivacije trombocita, ima i ključnu ulogu u održavanju složene ravnoteže početnih protromboznih i posledičnih antitromboznih i trombolitičkih događanja. Značajnu ulogu u aktivaciji hemostaznog sistema imaju i pokretači i medijatori zapaljenjskog procesa. Direktna posledice zapaljenja su stvaranje i oslobađanje TF-a u endotelskim ćelijama i monocitima, kao i aktivacija trombocita i P-selektina, čime se takođe stimuliše stvaranje TF. Mnogostruka povezanost hemostaznog sistema sa etiopatogeneom atherotromboze nedvosmisleno ukazuje na neophodnost da se u prevenciji i lečenju ove složene bolesti, koja pouzdano ima i zapaljenjske karakteristike, u punom obimu koriste i sve raspoložive terapijske mere koje mogu pomoći u sprečavanju, prekidi u kontroli svakog oblika aktivacije hemostaznog sistema.

of a specific agonist to membrane-spanning receptors on the platelet surface, stimulates the discharge of calcium from the platelet dense tubular system and promotes the contraction of the platelet, with the subsequent release of its granule contents. The initial recognition of a damaged vessel wall involves adhesion and the activation and aggregation of platelets with each other. Because the platelet function and reactivity depend on numerous adhesive interactions, most of the glycoproteins on the platelet membrane surface are receptors for adhesive proteins. According to their structure, these glycoproteins mainly belong to integrins, selectins and leucin-rich glycoprotein family. The full effect of these receptors is obtained by its close association with dynamic assemblies of sfingolipids and cholesterol floating within the fluid fraction of the platelet membrane, which are designated by the descriptive term »rafts«. During plaque rupture, the clotting mechanism is explosively activated by the strong influence of TF which, as a cofactor, binds coagulation FVII/FVIIa and enhances the catalytic activity of FVIIa by more than one million times. In circulatory blood, TF is present on the microparticles derived from monocytes. It is also released in a large amount from the activated endothelial and subendothelial cells. P-selectin, which is localized in the membranes of platelet alpha-granules and in the storage granules of endothelial cells, upon the activation of platelets and endothelial cells translocates within seconds to the cell surface, and can also be found in circulation. This adhesive receptor has a significant role in the production and recruitment of monocyte-derived microparticles containing TF at the site of thrombin and fibrin formation. The best way to grasp the special complexity of the hemostatic system activation is to recognize the multilateral and different thrombin action. Its basic function is the catalytic transformation of fibrinogen into fibrin, but at the thrombogenic site it binds to trombomodulin, initiating the activation of protein C, and stimulates the successive release of both tissue plasminogen activator and plasminogen-activator inhibitor type 1 from endothelial cells. Thus, besides the fact that it is the main promoter of platelet activation, thrombin plays a pivotal role in maintaining the complex balance of initial prothrombotic and subsequent antithrombotic and thrombolytic pathways. Inflammatory stimuli and mediators also have a significant role in the hemostatic system activation. Direct effects of inflammation are the formation and releasing of TF-form endothelial cells and monocytes, as well as platelet and P-selectin activation. The multilateral connection of the hemostatic system with the etiopathogenesis of atherothrombosis undoubtedly points out the necessity that, in treatment of this complex disease which reliably has inflammatory characteristics as well, all available therapeutic procedures for the prevention, interruption and control of the hemostatic system activation should be used immediately and permanently.

## **INSULINSKA REZISTENCIJA I ATEROSKLEROZA**

*D. D. Micić*

*Centar za metabolička oboljenja  
u endokrinologiji,  
Institut za endokrinologiju, dijabetes  
i bolesti metabolizma,  
Klinički Centar Srbije, Beograd, Srbija*

Uvođenje abdominalne gojaznosti kao ključne komponente metaboličkog sindroma ukazalo je da disregulacija masnog tkiva može imati glavnu ulogu u patogenezi insulinske rezistencije i ateroskleroze. Suvišak masnih kiselina u cirkulaciji kreira na periferiji insulinsku rezistenciju kroz omogućavanje dodatnih supstrata i modifikovanjem nishodnog insulinskog signala. Bolesnici sa insulinskom rezistencijom imaju endotelijalnu disfunkciju sa parcijalnim ili kompletnim gubitkom balansa između vazokonstrikcije i vazodilatacije, faktora koji promovišu ili inhibiraju rast, proaterogenih i antiaterogenih i prokoagulantnih i antikoagulantnih faktora. Insulin-rezistentne osobe mogu imati parcijalni blok u delovanju insulina kroz PI(3)K putanju u skeletnim mišićima i endotelijalnim ćelijama sa očuvanom MAPK putanjom, što može delimično da objasni njihov povećani kardiovaskularni rizik.

## **INSULIN RESISTANCE AND ATHEROSCLEROSIS**

*D. D. Micić*

*Center for Metabolic Disorders  
in Endocrinology,  
Institute of Endocrinology,  
Diabetes and Diseases of Metabolism,  
Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia*

Introduction of abdominal obesity as a crucial part of the metabolic syndrome pointed out that adipose tissue dysregulation might play a main role in the pathogenesis of insulin resistance and atherosclerosis. Excess of fatty acids in circulation creates resistance in periphery insulin by the added substrate availability and by modifying insulin downstream signalling. Patients with insulin have endothelial dysfunction with a partial or complete loss of balance between vasoconstrictors and vasodilators, growth promoting and inhibiting factors, proatherogenic and antiatherogenic, and procoagulant and anticoagulant factors. Insulin resistant individuals may have a partial block to insulin action through PI(3)K pathway in skeletal muscle and endothelial cells with an intact MAPK pathway that may partially explain their increased cardiovascular risk.

**Sekcija 4**  
**BIOHEMIJSKI MARKERI**  
**OBOLJENJA**

**Session 4**  
**BIOCHEMICAL MARKERS**  
**OF THE DISEASES**



*Jugoslav Med Biohem 25: 453–458, 2006*

*Plenarne sekcije  
Plenary sessions*

## **BIOMARKERI OKSIDANTNOG STRESA U BRONHIJALNOJ ASTMI**

*V. Ćosić<sup>1</sup>, I. Stanković<sup>2</sup>, M. Rančić<sup>2</sup>,  
L. Zvezdanović<sup>1</sup>, S. Kundalić<sup>1</sup>, V. Đorđević<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Centar za medicinsku biohemiju,  
Klinički centar »Niš«, Niš, Srbija*

*<sup>2</sup>Klinika za plućne bolesti,  
Klinički centar »Niš«, Niš, Srbija*

Veruje se da oksidantni stres učestvuje u inicijaciji i razvoju bronhijalne astme (BA). Oostalom, patofiziologija BA odlikuje se ogromnom produkcijom reaktivnih kiseoničkih vrsta (ROS) i reaktivnih azotnih vrsta (RNS), uglavnom od strane inflamatornih ćelija vazdušnih puteva astmatičara. ROS i RNS igraju važnu ulogu u remodeliranju vazdušnih puteva, kao i u orkestriranju vrste inflamatornog odgovora. Oksidanti utiču na specifičnu ravnotežu Th1/Th2 citokina i zajedno sa Th2 citokinima i Th2 indukovanim ćelijama mogu uzrokovati mnoge specifičnosti tipične za astmu. Oni indukuju bronhokonstrikciju, sekreciju mukusa, deluju na vaskulaturu vazdušnih puteva i povećavaju hiperreaktivnost prema pojedinim agonistima. Ovaj članak ispituje neophodnost evaluacije oksidantnog stresa u BA korišćenjem pouzdanih biomarkera koji omogućuju podesno praćenje oksidantnog stresa. Poželjno je određivanje prooksidanata i antioksidanata, i to sistemskih i lokalnih, u specifičnim medijumima pluća kao što su bronhoalveolarni lavat (BAL), sputum, izdahnuti vazduh i kondenzat izdahnutog vazduha. Ovi biomarkeri vazdušnih puteva mogu biti reprezentativni indikatori dešavanja na površini vazdušnih puteva, na inicijalnom mestu delovanja oksidanata. Ispitivanje biomarkera važno je i za utvrđivanje mogućih ciljeva delovanja antioksidantnih suplemenata koji mogu biti u stanju da normalizuju oksidantnu/antioksidantnu ravnotežu.

## **BIOMARKERS OF OXIDANT STRESS IN BRONCHIAL ASTHMA**

*V. Ćosić<sup>1</sup>, I. Stanković<sup>2</sup>, M. Rančić<sup>2</sup>,  
L. Zvezdanović<sup>1</sup>, S. Kundalić<sup>1</sup>, V. Đorđević<sup>1</sup>*

*<sup>1</sup>Centre of Biochemistry,  
Clinical Centre »Niš«, Niš, Serbia*

*<sup>2</sup>Clinic for Lung Disease,  
Clinical Centre »Niš«, Niš, Serbia*

Oxidant stress is believed to contribute to both the initiation and development of bronchial asthma (BA). As such, the pathophysiology of BA is characterised by the large generation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), predominantly by inflammatory cells of asthmatic airways. These species play an important role in remodelling airways and in orchestrating the type of inflammatory response. Oxidants influence the specific balance of Th1/Th2 cytokines, and together with Th2-cytokines and Th2 induced cells can cause many of the features typical of asthma. They induce bronchoconstriction, mucus secretion, effects on airway vasculature, and increase airway responsiveness to several agonists. This review discusses the necessity of oxidant stress evaluation in BA using reliable biomarkers, which provide an appropriate tool for studying oxidant stress. It is desirable to determine prooxidants and antioxidant systemic and local parameters in lung specific media such as bronchoalveolar lavage (BAL), sputum, exhaled air and breath condensate. These airway biomarkers may be representative indicators which could show the processes occurring on the airway surface, the initial site of oxidation. Thus, the examination of biomarkers is essential for establishing the potential target for antioxidant supplementation that would be able to normalise the oxidant/antioxidant imbalance.

**BIOMARKERI U KARCINOMU DOJKE**

*S. Filipović, A. Filipović, I. Pejčić,  
S. Vrbić, Z. Stanojević, I. Mišić*

*Medicinski fakultet, Niš, Srbija  
Klinika za onkologiju,  
Klinički centar »Niš«, Niš, Srbija*

Rak dojke je bolest abnormalnog rasta i razvoja do tada normalnog tkiva dojke. Tumorska ćelija nastaje kada ćelija više ne prepoznaje biološke kontrolne mehanizme. Za bolje razumevanje biologije tumora, ćelijskog ciklusa, angiogeneze, apoptoze, neoplastične transformacije, fenomena progresije i metastaziranja veoma su značajni biomarkeri kao prognostički i prediktivni faktori. Biomarkeri raka dojke imaju posebnu vrednost u proceni agresivnosti bolesti i ranoj detekciji progresije.

**BIOMARKERS IN BREAST CANCER**

*S. Filipović, A. Filipović, I. Pejčić,  
S. Vrbić, Z. Stanojević, I. Mišić*

*Faculty of Medicine,  
University of Niš, Niš, Serbia  
Clinical Centre »Niš« – Clinic of Oncology,  
Niš, Serbia*

Breast cancer is a disease characterized by abnormal growth and development of normal breast tissue. When the growth and development of a normal cell no longer obey biological control mechanisms, tumour cells begin to appear. An understanding of normal biological processes relating to cell growth, such as the cell cycle, angiogenesis, and apoptosis, and of other abnormal processes, such as neo-plastic transformation, tumour progression, and metastasis, would aid not only in identifying tumour markers, but also in determining the best uses of these tumour markers for diagnosis and treatment of patients with cancer. Biomarkers are improving our understanding of the biology and management of breast cancer.

**ZNAČAJ CITOKINA U DIJAGNOSTICI AUTOIMUNSKIH OBOLJENJA**

*L. Zvezdanović<sup>1</sup>, V. Đorđević<sup>1</sup>, V. Ćosić<sup>1</sup>,  
T. Cvetković<sup>3</sup>, S. Kundalić<sup>1</sup>, A. Stanković<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Centar za medicinsku biohemiju,  
Klinički centar – Niš, Srbija*

*<sup>2</sup>Institut za prevenciju, lečenje i rehabilitaciju  
srčanih i reumatskih bolesnika »Zelengora«,  
Niška Banja, Srbija*

*<sup>3</sup>Institut za biohemiju,  
Medicinski fakultet, Niš, Srbija*

Autoimunske bolesti odlikuju se autoimunoreakcijama usmerenim protiv široko rasprostranjenih sopstvenih determinanti. Mnogi citokini učestvuju u regulisanju aktivnosti i zahvatanju organa kod različitih autoimunskih oboljenja. Poznato je da neka tkiva održavaju vrlo visoku »ulaznu barijeru« u pogledu razvoja imunoposredovane inflamacije, što vodi imunnoj privilegovanosti putem generisanja specijalizovane mikrosredine. Postoje različiti obrasci sinteze citokina u pojedinim autoimunskim oboljenjima kao što su reumatoidni artritis, dijabetes tipa 1, sistemski lupus eritematodes i multipla skleroza, pri čemu treba istaći razliku između citokina kao markera fenotipa i citokina kao medijatora inflamacije i oštećenja tkiva. U većini autoimunskih oboljenja, ravnoteža između proinflamatornih i antiinflamatornih citokina određuje stepen i proširenost infla-

**THE SIGNIFICANCE OF CYTOKINES IN DIAGNOSIS OF AUTOIMMUNE DISEASES**

*L. Zvezdanović<sup>1</sup>, V. Đorđević<sup>1</sup>, V. Ćosić<sup>1</sup>,  
T. Cvetković<sup>3</sup>, S. Kundalić<sup>1</sup>, A. Stanković<sup>2</sup>*

*<sup>1</sup>Centre of Medical Biochemistry,  
Clinical Centre – Niš, Serbia*

*<sup>2</sup>Institute for Prevention,  
Treatment and Rehabilitation of Cardiac  
and Rheumatic Patients »Zelengora«,  
Niška Banja, Serbia*

*<sup>3</sup>Institute of Biochemistry,  
Faculty of Medicine, Niš, Serbia*

Autoimmune diseases are characterized by autoimmune reactions against one's own widespread determinants. Many cytokines are involved in activity regulation and organ involvement in various autoimmune diseases. It is well known that some tissues maintain a very high »entry barrier« concerning the development of immune-mediated inflammation, which leads to the state of »immune privilege« through the generation of specialized microenvironment. There are different patterns of cytokine synthesis in particular autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis, type I diabetes, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis, and worth stressing is the difference between cytokines as phenotype markers and cytokines as inflammation and tissue damage mediators. In most autoimmune diseases the balance between proinflammatory and



macije i može voditi evidentnim kliničkim efektima. Tako je kod bolesnika sa SLE dobijen značajan porast TNF- $\alpha$  i IL-10 u svim, a posebno u neurološkoj manifestaciji bolesti. Razumevanje osnovnih mehanizama kontrole diferencijacije T ćelija predstavlja put ka strategiji modulacije fenotipa citokina i sprečavanja tkivnog oštećenja i autoimunskih bolesti i, naravno, promoviše i zaštitu od istih.

antiinflammatory cytokines determines the extent and spread of inflammation and can lead to conspicuous clinical effects. In SLE patients, for instance, we observed a significant elevation of TNF- $\alpha$  and IL-10 in all, but especially in neurologic disease form. Understanding of the fundamental mechanisms of T cell differentiation control is the road to the strategy of cytokine phenotype modulation and prevention of tissue damage and autoimmune diseases, promoting naturally the protection from them.

## MARKERI TIREOIDNE AUTOIMUNOSTI

*N. Gligorović*

*Klinički centar Crne Gore,  
Podgorica, Crna Gora*

Autoimune tireoidne bolesti (AITB), najčešći endokrinološki poremećaj kod ljudi, dovode do oštećenja ćelija i promjene funkcije žlijezde humoralnim i ćelijski posredovanim mehanizmima. Tri glavna antigena uključena u razvoj ovih bolesti su: tireoperoksidaza (TPO), tireoglobulin (TG) i receptor tireo-stimulirajućeg hormona (TSH-R). Opisani su i drugi antigeni, ali za sada nije utvrđen njihov klinički značaj. Laboratorijski testovi koji bi se koristili za procjenu ćelijski posredovanih mehanizama kod AITB još uvijek nisu dostupni. S druge strane, procjena humoralnog odgovora, tj. određivanje tireoidnih antitijela, izvodi se u većini kliničkih laboratorija. Vrijednosti ovih parametara od značaja su za klasifikaciju, i reflektuju aktivnost i progresiju bolesti štitne žlijezde. U novije vrijeme, određivanje TPO antitijela koristi se za procjenu rizika za razvoj AITB. Mjerenje tireoidnih antitijela još uvijek prati niz problema vezanih za razlike u osjetljivosti i specifičnosti metoda, kao i odsustvo adekvatne standardizacije. Uprkos tome, njihovo određivanje od velikog je značaja za niz kliničkih situacija.

## MARKERS OF THYROID AUTOIMMUNITY

*N. Gligorović*

*Clinical Center of Montenegro,  
Podgorica, Montenegro*

Autoimmune thyroid diseases (AITD), the most common endocrine disorders affecting humans, cause cellular damage and alter the thyroid gland function by humoral and cell-mediated mechanisms. Three principal thyroid autoantigens are involved in the development of AITD: thyroperoxidase (TPO), thyroglobulin (TG) and thyroid stimulating hormone receptor (TSH-R). Other autoantigens have also been described, but as yet their diagnostic role in thyroid autoimmunity has not been established. Laboratory tests that determine the cell-mediated aspects of the autoimmune process are not currently available. However, tests of the humoral response, i.e. thyroid autoantibodies, can be assessed in most clinical laboratories. Thyroid autoantibodies are valuable for classification and reflect disease activity and progression. Lately, TPO antibodies assays have been used for assessing the risk of developing AITD. Thyroid autoantibodies measurement is hampered by method specificity and sensitivity problems, as well as suboptimal standardization. Despite that, autoantibody tests have inherent clinical utility in a number of clinical situations.

## DIJAGNOSTIKA NASLEDNIH MALIGNITETA

*K. Stankov*

*Zavod za biohemiju,  
Klinički centar – Novi Sad, Srbija*

Naše razumevanje etiologije nastanka predispozicije za nasledna oboljenja je poslednjih godina izuzetno napredovalo. Taj napredak omogućen je pre svega naglim razvojem molekularne genetike i ispitivanja genoma, kao i njihovom primenom u humanoju genetici. Malignitet je specifičan oblik kompleksnog

## DIAGNOSTICS OF HEREDITARY MALIGNANCIES

*K. Stankov*

*Department of Biochemistry,  
Clinical Center »Novi Sad«, Novi Sad, Serbia*

Significant advances have occurred in our understanding of the cancer etiology in the last decade, as a consequence of the generalized use of molecular biology techniques in human genetics. Cancer is a form of a complex genetic disease. Most forms of cancer are characterised by the accumulation of

genetskog oboljenja. Većinu tipova malignih oboljenja karakteriše akumulacija različitih genetskih alteracija koje utiču na gene sa specifičnim patogenim potencijalom, koji su specifični za svaki tip maligniteta. Kod većine malignih tumora te genetske alteracije odvijaju se na nivou somatskih ćelija, međutim neke od njih se prenose preko germinativnog epitela i imaju ulogu u naslednoj predispoziciji za nastanak maligniteta. Budući izazov u genetici maligniteta predstavlja identifikacija gena sa visokom prevalencijom alela koji doprinose smanjenju ili povećanju rizika za nastanak maligniteta.

### PRIMJENA BIOMARKERA U ISPITIVANJU ZRELOSTI PLUĆA FETUSA

*D. Popović-Pribilović, V. Miketić, G. Matović*

*Centar za kliničko-laboratorijsku dijagnostiku, Ginekološka klinika, Klinički centar Crne Gore, Podgorica, Crna Gora*

U procesu maturacije, alveolarne epitelne ćelije proizvode površinski aktivan materijal koji se sastoji uglavnom od fosfolipida, a u znatno manjoj mjeri sadrži proteine, neutralne lipide i ugljene hidrate. Pulmonalni surfaktant sintetiziraju alveolarni pneumociti tipa II i »pakuju« u vidu lamelarnih tijela. Prije porođaja, lamelarna tijela difunduju kroz bronhijalno stablo u amnionsku tečnost. Parametri koji ukazuju na zrelost pluća mogu se posmatrati i kao odnos količine surfaktanata i drugih komponenti u amnionskoj tečnosti (sfingomijelin i albumin). U ovoj studiji određivani su odnos surfaktanta prema albuminu (S/A) i broj lamelarnih tijela (LB) u amnionskoj tečnosti kao predskazivači (prediktori) zrelosti fetalnih pluća. Istraživanje je obuhvatilo 90 trudnica čija je gestaciona starost bila od 32 do 40 nedjelje. Uzorci amnionske tečnosti dobijeni su amniocentezom i filtrirani kroz specijalne filtere. Odnos S/A određivan je testom *Fetal Lung Maturity II* (FLM) na TDX aparatu (ABBOTT). Vrijednost (broj) LB određivana je na hematološkom brojaču, na kanalu za trombocite, na aparatu Cell Dyn 3700 (ABBOTT). Srednja vrijednost S/A bila je 55,11 mg/g (min = 6,96 mg/g, max = 112,00 mg/g). Odnos surfaktant-albumin manji od 39,00 mg/g ukazuje na pojavu respiratornog distres sindroma (RDS) sa vjerovatnoćom od 94%. Srednja vrijednost LB bila je  $69,4 \times 10^9/L$  (min =  $4,2 \times 10^9/L$ , max =  $199,0 \times 10^9/L$ ). Vrijednost lamelarnih tijela od  $33 \times 10^9/L$  ili manja ukazuje na pojavu RDS sa vjerovatnoćom od 93%. Odnos S/A raste sa gestacionom starošću ( $r = 0,373$ ,  $p < 0,005$ ), kao i broj lamelarnih tijela ( $r = 0,934$ ,  $p < 0,001$ ). Ova dva testa koreliraju jedan sa drugim ( $r = 0,341$ ,  $p < 0,005$ ). Kod 90 trudnica koje su se porodile u okviru 72 časa odnos surfaktant-albumin i vrijednost lamelarnih tije-

different genetic alterations affecting genes from a set of genes with pathogenic potential, which is specific for each tumour entity. While in the majority of malignant tumours these changes are somatically acquired, some mutations are transmitted through the germline and account for an inherited tumour predisposition. The next frontier in cancer genetics is to find genes with high prevalence alleles conferring a low increase or decrease of cancer risk.

### APPLICATION OF BIOMARKERS IN EVALUATION OF FETAL LUNG MATURITY

*D. Popović-Pribilović, V. Miketić, G. Matović*

*Center for Clinical-Laboratory Diagnostics, Department of Obstetrics and Gynecology, Clinical Center of Montenegro, Podgorica, Montenegro*

In the process of maturation, alveolar epithelial cells produce surface-active material (surfactant) which consists mainly of phospholipids and, although to a significantly lesser degree of neutral lipids, proteins and carbohydrate. Pulmonary surfactant is synthesized in alveolar type II granular pneumocytes and »packed« as lamellar bodies. Before delivery, the lamellar bodies diffuse through the bronchial tree into the amniotic fluid. Parameters which indicate the maturity of lungs are also observed in the ratio against the quantity of surfactant with other components of the amniotic fluid (sphingomyelin and albumin). The study concerns the determination of surfactant-to-albumin ratio and lamellar body count in the amniotic fluid as predictors of fetal lung maturity. The research involved 90 pregnant women with gestational age from 32 to 41 weeks. The samples of the amniotic fluid were obtained by amniocentesis and filtrated through special filters. The surfactant-to-albumin ratio was measured by the *Fetal Lung Maturity II* (FLM) test, on TDX instrument (ABBOTT). The lamellar body count was measured on a hematology cell counter by the platelet channel, on the Cell Dyn 3700 instrument (ABBOTT). The average value of ratio S/A was 55.11 mg/g (min = 6.96 mg/g, max = 112.00 mg/g). The surfactant-to-albumin ratio of less than 39.00 mg/g predicts respiratory distress syndrome with the probability of 79%. The average value of LB was  $69.4 \times 10^9/L$  (min =  $4.2 \times 10^9/L$ , max =  $199.0 \times 10^9/L$ ). Lamellar body concentration of  $33 \times 10^9/L$  or less predicts respiratory distress syndrome with the probability of 86%. The surfactant-to-albumin ratio increased with gestation ( $r = 0.373$ ,  $p < 0.005$ ), as did lamellar body concentration ( $r = 0.934$ ,  $p < 0.001$ ). The two tests correlated with each other,  $r = 0.341$ ,  $p < 0.005$ . In 90

la korektno ukazuju na pojavu RDS u šest slučajeva. Postoji visok stepen pozitivne korelacije između gestacione starosti i odnosa surfaktant albumin, kao i vrijednosti lamelarnih tijela.

patients delivered within 72 hours the surfactant-to-albumin ratio and the concentration of lamellar body correctly predicted six cases of respiratory distress syndrome. There was a high degree of positive correlation between gestational age and surfactant-to-albumin ratio, as well as lamellar body concentration.

## BIOHEMIJSKI MARKERI ISHODA TRUDNOĆE U FETALNOJ KRVI

A. Nikolić-Dorđević

*Institut za laboratorijsku medicinu,  
Klinički centar – Novi Sad, Srbija*

Tokom poslednjih deset godina postignut je značajan napredak u oblasti poboljšanja maternalno-fetalnog zdravlja. Biohemijska i hematološka ispitivanja fetalne krvi obuhvataju veliki broj parametara i vrše se iz umbilikalne krvi nakon dijagnostičke kordocenteze (radi genetskog ispitivanja) ili iz pre-transfuzionog uzorka fetalne krvi. U ovom radu je dat prikaz nekoliko dijagnostičkih markera analiziranih u fetalnoj krvi: endotelina-1, leptina, beta-2-mikroglobulina i inflamatornog markera interleukin-6. Endotelin-1 je vazokonstriktor na čiju indukciju utiču povećanje venskog krvnog pritiska i stanje stresa. Studija je obuhvatila uzorke pre i posle transfuzije fetalne krvi u slučajevima intrauterine transfuzije kod Rh-aloimunizovanih hemolitičkih fetalnih anemija. Povećanje fetalnog intravaskularnog volumena nakon fetalne transfuzije eritrocita sa visokim hematokritom podiže vrednosti nivoa endotelina-1 u fetalnoj krvi nakon inicijalne ali ne i nakon ponovljene transfuzije. Beta-2-mikroglobulin je proteinski molekul prisutan na ćelijskoj površini, povezan sa glavnim histokompatibilnim kompleksom. Nivo beta-2-mikroglobulina je takođe praćen u slučajevima intrauterine transfuzije kod Rh-aloimunizovanih fetalnih anemija pre i posle transfuzije. Koncentracije beta-2-mikroglobulina značajno su više kod fetusa sa prethodnom transfuzijom u odnosu na neanemične fetuse. Određivanje beta-2-mikroglobulina može se pokazati korisnim u identifikaciji fetusa sa potencijalno ozbiljnijim efektom Graft-versus-Host reakcije na ćelijske transplantate. Povećan nivo beta-2-mikroglobulina nakon transfuzije sugerira imunomodulatorni efekat intrauterine transfuzije (leukocitnih antigena donora) na fetalni imuni odgovor. Leptin je cirkulišući hormon koji koordinira unos i potrošnju energije u organizmu. U ovoj studiji, leptin je praćen u fetalnoj i maternalnoj krvi nakon genetskog »skrininga« u normalnoj euploidnoj trudnoći i trudnoći sa Daunovim sindromom. U normalnoj trudnoći, fetalne vrednosti leptina su značajno niže u odnosu na majčinu krv, ali se nivo tokom gestacije povećava. Daunov sindrom povezan je sa značajno nižim vrednostima u fetalnoj krvi. Moguće je

## BIOCHEMICAL MARKERS OF ADVERSE PREGNANCY OUTCOMES IN FETAL BLOOD

A. Nikolić-Dorđević

*Institute of Laboratory Diagnostics, Clinical Center »Novi Sad«, Novi Sad, Serbia*

Within the past decade, significant progress has been made with regard to improving maternal and newborn health. Biochemical markers in fetal blood are assessed after diagnostic cordocentesis (which was primarily collected for genetic screening), or immediately prior to fetal transfusion. Concentrations of the following diagnostic markers are measured in this study: endothelin-1, leptin, beta-2-microglobulin and the inflammatory marker IL-6. Endothelin-1 is a potent vasoconstrictor, induced by rising venous pressure and rising shear stress. Subjects involved in this study included women with anti-DRh alloimmunized pregnancies, and fetal blood sampled pre- and post-transfusions. Rapid expansion of fetal intravascular volume by intravenous transfusion of packed red blood cells with a high hematocrit enhances fetal endothelin levels. Beta-2-microglobulin is a ubiquitous cell surface protein, associated with the major histocompatibility complex. It is a potential marker of Graft-versus-Host Disease. The median concentrations of beta-2-microglobulin are significantly higher in fetuses with prior transfusions compared with non-anemic fetuses. Evaluation of fetal beta-2-microglobulin might prove useful in identifying fetuses with potentially severe Graft-versus-Host or Host-versus-Graft reaction to cell transplants. Leptin is a recently discovered circulating hormone that coordinates energy intake and expenditure in adults. Leptin levels in the umbilical cord blood positively correlate with neonatal birth weight, suggesting a role in adipose homeostasis *in utero*. In this study, leptin levels were measured in fetal and paired maternal plasma in the second half of gestation, in pregnancies complicated with Down syndrome and euploid pregnancies. In euploid pregnancies, fetal leptin levels were significantly lower than in corresponding maternal values, but increased across gestation. Down syndrome was associated with significantly lower fetal leptin levels. It is possible that lower fetal leptin levels could reflect the persistent immaturity of the pattern of placental peptide hormone synthesis in fetal Down syndrome. Recent evidence strongly implicates the inflammato-

da niže vrednosti leptina odražavaju postojeću nezrelost hormonske sinteze na nivou placente koja je prisutna u fetalnom Daunovom sindromu. Novije studije ukazuju da antiinflamatorni odgovor na intrauterinu infekciju predstavlja najznačajniji razlog prevremenog porođaja, te oštećenja fetalnih organa. Inflatatorni citokin interleukin-6 praćen je kao potencijalni marker prevremenog porođaja kod prisutne infekcije amnionske tečnosti kao najznačajnijeg faktora rizika. Vrednost IL6 >11 pg/mL označena je kao *cut-off* vrednost povezana sa povećanim rizikom prisustva sistemskog inflamatornog odgovora.

ry response to intrauterine infection in the pathogenesis of neonatal brain and lung injury. The frequency and clinical significance of systemic inflammatory responses were defined by elevated plasma interleukin-6 concentrations in fetuses with preterm labor. A fetal plasma interleukin-6 cut-off value of 11 pg/mg was used to define the presence of a systemic inflammatory response.