

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ALEKSANDRA ZOREC

**PRIMERJAVA ENCIMSKOIMUNSKJE IN RADIOIMUNSKJE
METODE ZA DOLOČANJE KATEHOLAMINOV V PLAZMI**

**COMPARISON OF ENZYME-LINKED IMMUNO SORBENT
ASSAY AND RADIOIMMUNOASSAY FOR
DETERMINATION OF CATECHOLAMINES IN PLASMA**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala v Laboratoriju za analitiko hormonov in tumorskih markerjev Kliničnega inštituta za kemijo in biokemijo v Ljubljani pod okriljem mentorja doc. dr. Milana Skitka, mag. farm., spec. med. biok. in somentorja dr. Aleša Jerina, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

Svojo zahvalo namenjam ljudem, ki so s svojim sodelovanjem neposredno ali posredno pripomogli k nastanku pričujočega dela.

Mentorju doc. dr. Milanu Skitku, mag. farm., spec. med. biok. za kritično presojo in pregled dela. Posebna zahvala dr. Alešu Jerinu, univ. dipl. kem., spec. med. biok., ki me je s svojim znanjem, svetovanjem in izkušnjami usmerjal pri izdelavi diplomske naloge. Hvala Stanki Cankar, dipl. inž. lab. biomed., za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Zahvala velja domačim, ki so mi omogočili študij in me potrpežljivo podpirali. Zahvaljujem se tudi bratu Danielu, ki mi je pomagal s koristnimi nasveti.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Milana Skitka mag. farm., spec. med. biok. in somentorja dr. Aleša Jerina univ. dipl. kem., spec. med. biok.

Ljubljana, 2008

Aleksandra Zorec

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Sollner Dolenc, mag. farm.
Član diplomske komisije: doc. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

KAZALO

Kazalo vsebine

KAZALO.....	III
Kazalo vsebine.....	III
Kazalo slik.....	V
Kazalo tabel.....	V
Kazalo grafikonov.....	V
Kazalo enačb.....	VI
POVZETEK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	VIII
1. UVOD.....	1
1.1. Splošno o endokrinih žlezah.....	1
1.2. Hormoni.....	2
1.2.1. Splošno o hormonih.....	2
1.2.2. Razvrstitev hormonov po zgradbi.....	2
1.2.3. Sinteza in sekrecija hormonov.....	3
1.2.4. Prenos hormonov.....	4
1.2.5. Metabolizem hormonov.....	5
1.2.6. Delovanje hormonov na celični ravni.....	5
1.3. Nadledvična žleza.....	7
1.3.1. Steroidni hormoni skorje nadledvične žleze.....	7
1.3.2. Hormoni sredice nadledvične žleze.....	10
1.3.3. Motnje v delovanju nadledvičnih žlez.....	14
1.4. Metode, s katerimi lahko določimo kateholamine.....	17
1.4.1. Encimskoimunski metoda (ELISA).....	17
1.4.2. Radioimunološka metoda (RIA).....	18
1.4.3. Fluorometrijske metode z etilendiaminom.....	18
1.4.4. Kromatografske metode (HPLC).....	19
1.5. Odvzem vzorca.....	19
2. NAMEN DELA.....	20
3. METODE IN MATERIALI.....	21
3.1. ELISA.....	21
3.1.1. Reagenti za ekstrakcijo in acilacijo.....	22
3.1.2. Reagenti za encimskoimunski test.....	23
3.1.3. Dodaten material in oprema.....	23
3.1.4. Postopek.....	24

3.2.	RIA	26
3.2.1.	Reagenti	27
3.2.2.	Material.....	28
3.2.3.	Navodila za postopek.....	28
3.2.4.	Postopek	30
3.3.	Statistično vrednotenje metod	32
4.	REZULTATI	37
5.	RAZPRAVA.....	47
6.	SKLEP	50
7.	VIRI.....	51
7.1.	Literatura	51
7.2.	Viri slik.....	52

Kazalo slik

Slika 1: Shema endokrinih žlez	1
Slika 2: Razvrstitev hormonov po zgradbi	2
Slika 3: Prenos hormonov	4
Slika 4: Shema nadledvične žleze	7
Slika 5: Histološki prikaz nadledvične žleze	8
Slika 6: Sinteza kateholaminov	11
Slika 7: Adrenalin	12
Slika 8: Noradrenalin	13
Slika 9: Dopamin	13
Slika 10: Analizator ADALTIS Personal Lab	21
Slika 11: 1470 Wallac Wizard gama števec	26

Kazalo tabel

Tabela 1: Reagenti za ekstrakcijo in acilacijo	22
Tabela 2: Reagenti za encimskoimunski test	23
Tabela 3: Reagenti za radioimunski test	27
Tabela 4: Priprava liofiliziranih in koncentriranih komponent	29
Tabela 5: Primerjava koncentracij med metodama za adrenalin	43
Tabela 6: Pregled rezultatov za adrenalin	44
Tabela 7: Primerjava koncentracij med metodama za noradrenalin	45
Tabela 8: Pregled rezultatov za noradrenalin	46

Kazalo grafikonov

Grafikon 1: Umeritvena krivulja za adrenalin (ELISA metoda)	38
Grafikon 2: Umeritvena krivulja za noradrenalin (ELISA metoda)	38
Grafikon 3: Umeritvena krivulja za adrenalin (RIA metoda)	41
Grafikon 4: Umeritvena krivulja za noradrenalin (RIA metoda)	41
Grafikon 5: Prikaz regresijske premice za adrenalin s 95% mejami odstopanja in napovedi	44
Grafikon 6: Prikaz regresijske premice za noradrenalin s 95% mejami odstopanja in napovedi	46

Kazalo enačb

Enačba 1: Koncentracija hormona v plazmi.....	5
Enačba 2: Aritmetična sredina.....	32
Enačba 3: Varianca.....	32
Enačba 4: Standardna deviacija.....	32
Enačba 5: Koeficient variacije.....	32
Enačba 6: Koeficient korelacije po Pearsonu.....	33
Enačba 7: Vzorčna porazdelitev razlik dveh povprečij.....	36
Enačba 8: Izračun umeritvene krivulje.....	40

POVZETEK

Kateholamini so skupni naziv za aktivne amine, kateri vsebujejo benzenski obroč z dvema hidroksilnima skupinama (katehol). Hormoni so: adrenalin (epinefrin), noradrenalin (norepinefrin) in dopamin. Nastajajo v kromafinskih celicah nadledvične žleze in nevronih simpatikusa (NA). Sproščanje kateholaminov povzroči živčni impulz (strah, jeza, stres).

Tvorba kateholaminov poteka prek tirozina, ki ga dobimo iz hrane ali pa nastane v glavnem v jetrih iz fenilalanina. Ključni encim je tirozin-hidroksilaza, katerega proizvod je dihidroksifenilalanin ali dopa. Po delovanju dekarboksilaze dobimo dopamin, po učinkovanju dopamin-beta-hidroksilaze pa noradrenalin. Skoraj izključno v sredici nadledvične žleze pa pod vplivom encima feniletanolamin-N-metiltransferaze nastaja iz noradrenalina adrenalin. Kateholamini so spravljeni v mešičkih v končičih simpatičnih postganglionarnih nevronov ali v sredici nadledvične žleze. Ob ustreznem dražljaju se sproščajo z eksocitozo. Signal za sprostitvev pride preko centralnega živčnega sistema. Kot mediator služi acetilholin v preganglionarnih vlaknih.

Po sprostitvi je razgradnja kateholaminov hitra, večinoma že na mestu sprostitve. Glavni mehanizem je ponovni prehod v živčno celico, kjer sledi razgradnja z encimom monoaminooksidazo. Del kateholaminov se razgradi izven živčnega sistema s pomočjo encima katehol-amin-O-metiltransferaze. Le del kateholaminov prehaja v plazmo in se izloča z urinom, deloma konjugiran s sulfati.

Kateholamine določamo pri diagnostiki feokromocitoma in nevroblastoma. Feokromocitom je tumor kromafinskih celic, ki povečajo izločanje adrenalina, noradrenalina ali obeh. Neuroblastom je smrtna maligna bolezen, ki jo povzroči tumor živčnega sistema.

V tej diplomski nalogi smo izmerili koncentracijo kateholaminov v plazmi pri 31 pacientih različnega spola in z dvema različnima metodama. Metodi smo med seboj primerjali in tako želeli ugotoviti, katera metoda je boljša, zanesljivejša, enostavnejša za rokovanje in zdravju manj škodljiva. Ti dve metodi sta:

- radioimunska metoda, pri kateri gre za tekmovanje kateholaminov med preiskovančevim neoznačenim in radioaktivno označenim vzorcem, za vezavna mesta na protitelesih;
- encimskoimunska metoda je zdravju neškodljiva, saj ne uporabljamo radioaktivnega izotopa za označevanje.

Rezultati so pokazali, da metodi ne dajeta enakovrednih rezultatov. Razlika je vidna pri izmerjenih koncentracijah kateholaminov pri preiskovancih, saj so vrednosti pri encimskoimunski metodi bistveno višje. Ugotovili smo, da je radioimunska metoda veliko bolj občutljiva in specifična.

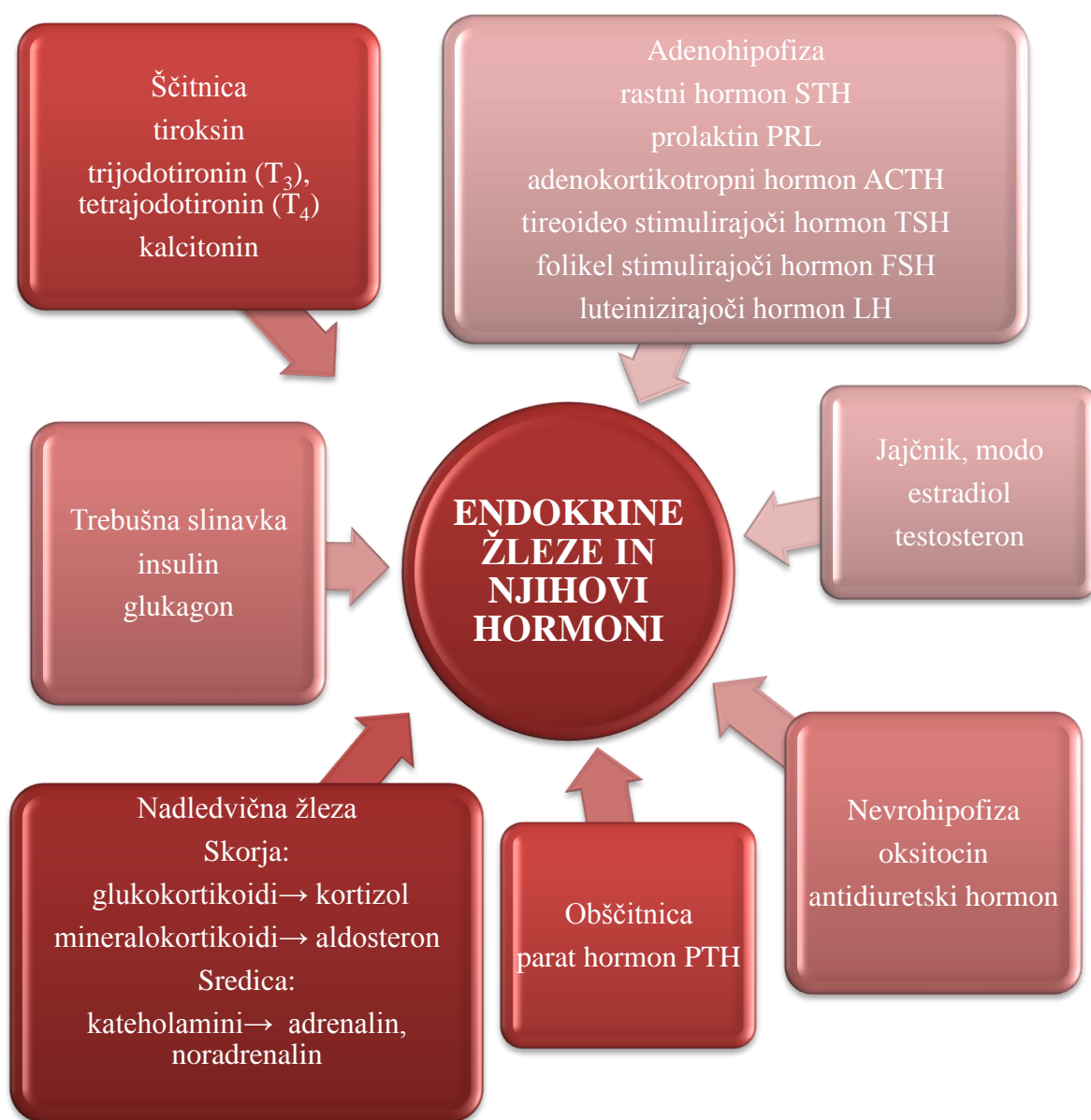
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	adrenalin
ACTH	adenokortikotropni hormon
Ag	antigen
ATP	adenozin trifosfat
COMT	katehol-O-metiltransferaza
CT	računalniška tomografija
CŽS	centralni živčni sistem
DHEA	dehidroepiandrosteron
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DOPA	dihidroksifenilalanin
FSH	folikel stimulirajoči hormon
hCG	humani horiogonadotropin
HVA	homovanilinska kislina
LH	luteinizirajoči hormon
MAO	monoamin oksidaza
mRNA	sporočilna ribonukleinska kislina
MRS	magnetno resonančno slikanje
MSH	melanocyte stimulirajoči hormon
NA	noradrenalin
PRL	prolaktin
PTH	parathormon
STH	somatotropin
T₃	trijodtironin
T₄	tiroksin
TSH	ščitnico stimulirajoči hormon
VMA	vanilin mandljeva kislina
μl	mikroliter

1. UVOD

1.1. Splošno o endokrinih žlezah

Endokrini sistem predstavlja skupina organov (žleze z notranjim izločanjem), ki tvorijo hormone in jih sproščajo v kri. Hormoni vplivajo na delovanje različnih delov telesa. Najpomembnejši organi endokrinega sistema so hipotalamus, hipofiza, ščitnica, obščitnice, otočki v trebušni slinavki, nadledvični žlezi, modo (testisa) in jajčnika (ovarija) (slika 1). Med nosečnostjo deluje kot endokrini organ tudi posteljica (1).



Slika 1: Shema endokrinih žlez

1.2. Hormoni

1.2.1. Splošno o hormonih

Hormon je snov, ki jo endokrina žleza ali nek drug organ sprošča v krvni obtok. Po krvi potuje do celic, kjer izzove značilen učinek. Večina hormonov je beljakovin, ki jih sestavljajo aminokislinske verige, različnih dolžin. Drugi hormoni so steroidi, izpeljanke holesterola (slika 2). Značilnost hormonov je, da imajo že v majhnih količinah velik učinek. Hormoni se vežejo na receptorje, ki so na površini ali v notranjosti celice. Delovanje celice se pod vplivom vezanega hormona pospeši, upočasni ali kako drugače spremeni.

Hormoni nadzorujejo telesno rast in razvoj, reprodukcijo in spolne lastnosti, vplivajo na gospodarjenje z energijo in tekočinami ter na koncentracijo soli in glukoze v krvi. Nekateri hormoni vplivajo le na posamezne organe, drugi na celotno telo (1, 2).

1.2.2. Razvrstitev hormonov po zgradbi

GLIKOPROTEINI	POLIPEPTIDI	STEROIDI	AMINOKISLINE IN AMINI
<ul style="list-style-type: none">•FSH•LH• HCG• TSH	<ul style="list-style-type: none">•ACTH•angiotenzin•kalcitonin•holecistokinin•eritropoetin•gastrin•rastni hormon•insulin•somatomedin•MSH•oksitocin•PTH•prolaktin•somatostatin•vazopresin	<ul style="list-style-type: none">•aldosteron•kortizol•estradiol•progesteron•testosteron•vitamin D	<ul style="list-style-type: none">•adrenalin•noradrenalin•T₄•T₃

Slika 2: Razvrstitev hormonov po zgradbi

1.2.3. Sinteza in sekrecija hormonov

Polipeptidni in aminski hormoni

Hormoni nastajajo na dva načina. Peptidni hormoni se tvorijo na poliribosomih, katerih mRNA ima posebno signalno sekvenco, ki se nato zbirajo v cisterne endoplazemskega retikuluma. Na novo nastali hormon je kompleksna molekula, ki vsebuje signalno beljakovino. Imenujemo ga prehormon. Ta se v endoplazemskem retikulumu pod vplivom encimov cepi, loči se signalna beljakovina. Nastali hormon lahko ima že dokončno aktivno obliko. Nekaterim hormonom pa so po odcepitvi signalne beljakovine potrebne še dodatne spremembe, npr. dodatek sladkorja za dokončno obliko glikoproteinskih hormonov. Po odcepitvi signalne beljakovine imajo nekateri hormoni še vedno dodatne čezmerne aminokisliline, ki se nato odcepijo v Golgijevem aparatu, kamor potujejo prvobitni hormonski polipeptidi. Take polipeptidne hormone pred cepitvijo v Golgijevem aparatu imenujemo prohormone. Iz Golgijevega aparata pridejo hormoni v aktivni obliki in se uskladiščijo v sekrecijskih granulah. V njih nato čakajo, da se v primernem trenutku prek eksocitoze sprostijo iz celice. Zaloge polipeptidnih hormonov in kateholaminov v sekrecijskih granulah zadoščajo za nekaj ur ali celo nekaj dni.

Značilnost kateholaminske sinteze je v tem, da sinteza dopamina iz tirozina poteka v citoplazmi. Dopamin se nato uskladišči v sekrecijskih granulah, v katerih se zatem dopamin pretvori v noradrenalin. Sprememba noradrenalina v adrenalin je možna samo v sredici nadledvične žleze. Kateholamini se sproščajo iz celice po fuziji granul s celično membrano, ki ji sledi eksocitoza (1, 3).

Steroidni hormoni

Temeljna sestavina za tvorbo vseh steroidov je holesterol. Proces sinteze steroidov vključuje naslednje reakcije:

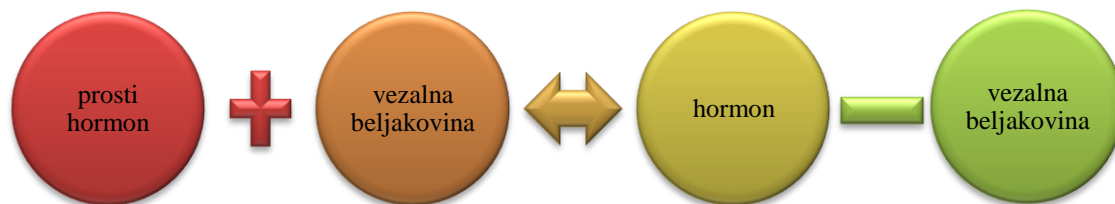
- cepitev stranskih verig (pod vplivom dezmolaz),
- konverzijo hidroksilne skupine v ketone ali ketonov v hidroksilne skupine (pod vplivom -dehidrogenaz),
- dodatek skupine OH (hidroksilacija),
- tvorbo dvojnih vezi (dehidrogenacija),
- dodatek vodikovega iona za redukcijo dvojne vezi (saturacija).

Proces steroidogeneze je mnogo bolj zapleten od tvorbe polipeptidnih ali aminskih hormonov. Tako je npr. za tvorbo estradiola iz holesterola potrebno kar 9 encimov, torej 9 ustreznih genov. Zato se steroidni hormoni tudi ne tvorijo v malignih ali drugih celicah. Izven specifičnih endokrinih organov. Mesto tvorbe steroidnih hormonov v celici so citoplazma, endoplazemski retikulum in mitohondrij. Steroidni hormoni se v celici ne kopičijo. Hitrost izločanja steroidnih hormonov je enaka hitrosti sinteze.

Hitrost tvorbe steroidov je odvisna od tvorbe in aktiviranja encimov, ki so udeleženi v biosintezi steroidov. Začetna spodbuda za tvorbo steroidnih hormonov je vezava tropnih hormonov na receptorje v celični membrani. Ko se tropni hormon veže na receptor v celični membrani, se aktivira adenilat-ciklaza, ki omogoči pretvorbo ATP v cAMP. Pri visoki koncentraciji cAMP v celici se aktivirajo proteinske kinaze, ki omogočijo pretvorbo holesterola v steroide. Za normalen potek sinteze steroidov je pomembna tudi zadostna koncentracija kalijevih ionov (1).

1.2.4. Prenos hormonov

Hormoni potujejo z mesta izločanja do ciljne celice po krvi, limfi ali medcelični tekočini. Peptidni hormoni so večinoma topni v vodi in potujejo nevezani. Steroidni in ščitnični hormoni potujejo v plazmi, vezani na posebne beljakovine ali pa prosti. Prostih, nevezanih steroidov in ščitničnih hormonov je malo in so vedno v ravnotežju z vezano frakcijo (slika 3).



Slika 3: Prenos hormonov

Aktiven je samo prosti hormon. Vezani hormoni so zaloga hormonov; lahko se takoj sprostijo in delujejo na ustreznih mestih. Razmerje med količino vezanega in prostega hormona v plazmi je odvisno od:

- koncentracije hormona,
- koncentracije vezalne beljakovine,
- afinitete hormona do vezalne beljakovine.

Transportne beljakovine so lahko specifične (TBG ali globulin beta) ali pa nespecifične (albumin).

Radioimunsko določene koncentracije hormona v plazmi zajamejo celotno koncentracijo vezanih in prostih hormonov (1).

1.2.5. Metabolizem hormonov

Koncentracija hormona v plazmi je odvisna od hitrosti njegovega izločanja in matabolizma.

Enačba 1: Koncentracija hormona v plazmi

$$PH = \frac{SR}{MCR}$$

PH – koncentracija hormona v plazmi

SR – hitrost izločanja hormona

MCR – hitrost metaboličnega očistka hormona

Hormoni se razgrajujejo v celicah, kjer delujejo, ali v ledvicah in jetrih. Samo manjše količine hormonov se izločajo z urinom ali žolčem brez predhodne metabolične pretvorbe.

Sprememba hitrosti metaboličnega očistka ali izločanja hormona ne spremeni njegove plazemske koncentracije, ker v obeh primerih takoj ukrepajo mehanizmi uravnavanja hormonov in popravijo »napako«. Pri hujših boleznih jeter ali ledvic so procesi razgradnje hormonov počasnejši, plazemske koncentracije hormonov pa višje. Te takoj zavrejo izločanje regulacijskega tropnega hormona, hitrost izločanja se zmanjša in plazemska koncentracija hormona se zopet ustali na normalni (1,4).

1.2.6. Delovanje hormonov na celični ravni

Hormoni delujejo na celico tako, da se vežejo na specifične makromolekule, ki so na celični membrani ali v citoplazmi. Posebne makromolekule, ki prepoznavajo hormone, imenujemo receptorje. Določeni receptorji imajo do določenih hormonov veliko afiniteto in majhno kapaciteto. Tako je možen natančen odgovor ciljne celice na manjše količine hormona.

Peptidni hormoni delujejo prek receptorjev na celični membrani, steroidni in ščitnični hormoni pa prosto vstopajo v celico, kjer se vežejo na receptorje v citoplazmi.

Število receptorjev za polipeptidne hormone in kateholamine uravnavajo sami polipeptidni hormoni in kateholamini. Pri visoki koncentraciji hormonov v plazmi (zvišana tvorba in dodajanje sintetičnega hormona) se število receptorjev zmanjša. Obstaja torej negativna povezava med koncentracijo hormonov v plazmi in številom celičnih receptorjev (1).

Delovanje peptidnih hormonov na celični ravni

Peptidni hormoni se vežejo na ustrezne receptorje na površini celice. Nastali kompleks hormon-receptor aktivira encim adenilat-ciklazo v celični membrani. Aktivirana adenilat-ciklaza omogoča pretvorbo ATP v cAMP v citoplazmi, cAMP se veže na proteinske kinaze in jih aktivira. Proteinske kinaze so sestavljene iz regulacijske in katalitične podenote. Po vezavi cAMP se katalitične podenote sprostijo in začne se fosforilacija beljakovin, ki ji sledi biološki celični odgovor. Ciklični AMP je v procesu, kjer je hormon prvi glasnik (first messenger), drugi glasnik (second messenger). Intenzivnost celičnega odgovora na hormon je odvisna od števila receptorjev na površini celice in koncentracije ter aktivnosti cAMP. Vsi peptidni hormoni ne delujejo prek celičnega glasnika cAMP. Za nekatere hormone so celični glasniki kalcijevi ioni (1).

Delovanje steroidnih hormonov na celični ravni

Steroidni hormoni prosto vstopajo v celico (difuzija), kjer se v citoplazmi vežejo na receptorje. Kompleks hormon-receptor nato preide v celično jedro in se veže na celično DNA. Nastane glasnik (mRNA), ki potuje do ribosoma, čemur sledi sinteza novih beljakovin. Biološka aktivnost hormona traja samo toliko časa, dokler je kompleks hormon-receptor vezan na DNA. Nekateri steroidni hormoni difundirajo skozi celično membrano v citoplazmo, kjer se pretvorijo v aktivnejše oblike hormona, vežejo na citoplazmatske receptorje in preidejo v jedro (1).

Delovanje ščitničnih hormonov na celični ravni

Ščitnični hormoni vstopajo v celico, kjer se vežejo na citoplazmatsko vezalno beljakovino in tako koncentrirajo v celici. Nato se hormon ponovno loči od vezalne beljakovine in prost vstopi v celično jedro ali pa se veže na receptor v mitohondrijih ter tako modificira procese v celici (1).

1.3. Nadledvična žleza

V telesu imamo dve nadledvični žlezi; vsaka leži na vrhu ene ledvice (slika 4). Notranji del žleze (sredica ali medula) izloča hormone, kot je npr. adrenalin, ki vpliva na krvni tlak, srčni utrip, izločanje znoja ali druge funkcije, ki jih sicer uravnava simpatično živčevje. Zunanji del (skorja ali korteks) izloča več različnih hormonov, npr. kortikosteroide, androgene (moški spolni hormoni) in mineralokortikoide, ki uravnavajo krvni tlak ter raven soli in kalija v telesu. Nadledvične žleze izločajo več hormonov, ki med seboj delujejo po principu povratne zanke. Hipotalamus tvori kortikotropin sproščujoči hormon, ki spodbuja izločanje kortikotropina iz hipofize, slednji pa vpliva na izločanje kortikosteroidov iz nadledvičnih žlez. Če hipofiza in hipotalamus ne izločata dovolj hormonov, lahko tudi nadledvični žlezi prenehata delovati (1, 3, 5).

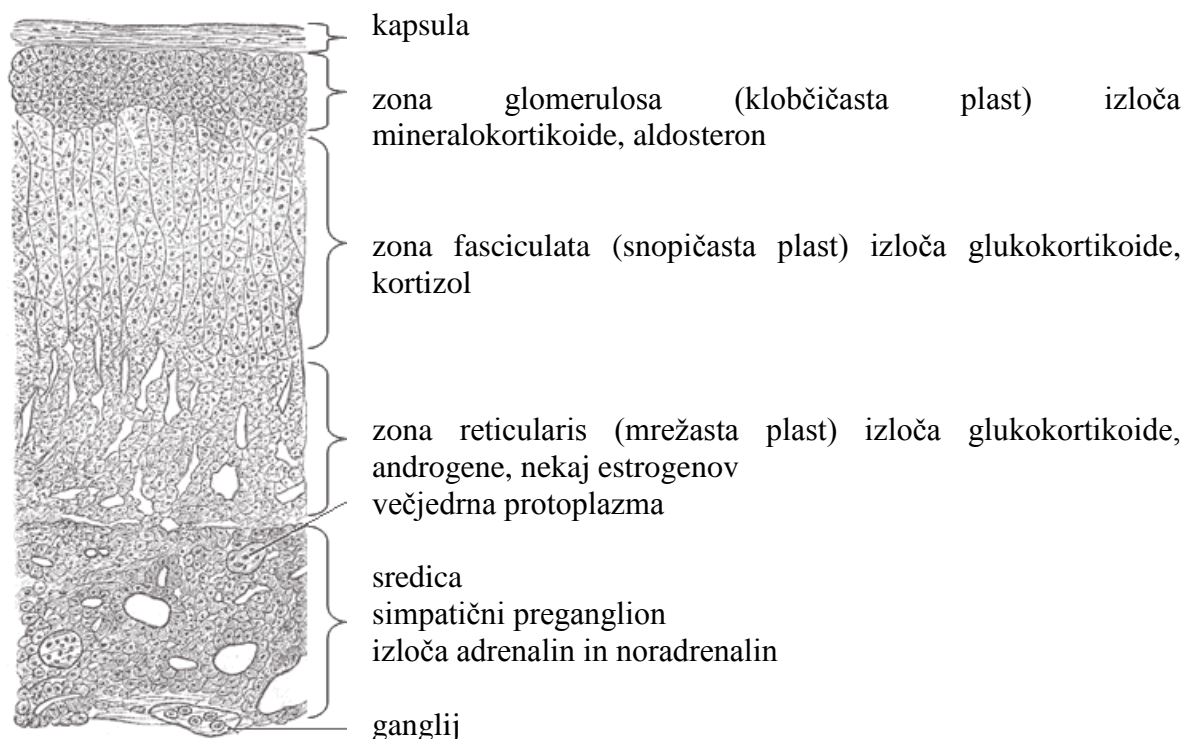


Slika 4: Shema nadledvične žleze

1.3.1. Steroidni hormoni skorje nadledvične žleze

Vsem steroidnim hormonom je kemično skupen ciklopentanoperhidrofenantrenski obroč. Funkcijsko steroide, ki jih tvori skorja nadledvične žleze, uvrstimo v skupine (slika 5):

- **glukokortikoide**, ki jih glede na število C-atomov označujemo kot C-21 steroide;
- **spolne hormone**, pretežno androgene (C-19 steroide);
- **mineralokortikoide** (C-21 steroide).



Slika 5: Histološki prikaz nadledvične žleze

Sinteza steroidov

Sinteza steroidov se začne s holesterolom, nadaljnja pot in končni proizvod pa sta odvisna od encimskih sistemov tkiv. V skorji nadledvične žleze razločujemo histološko tri cone (glomerulozo, fascikulato, retikularis), funkcionalno pa se cone fascikulata in retikularis prepletata. Vsem trem conam skorje nadledvične žleze so skupni encimi 3-beta-dehidrogenaza, 11-beta-hidroksilaza ter 21-alfa-hidroksilaza. Izključno cone glomeruloza vsebuje 18-aldolazo, cone fascikulata in retikularis pa imata še 17-hidroksilazo. Glavni predstavnik glukokortikoidov pri človeku je kortizol. Glavni nosilec mineralokortikoidne aktivnosti je aldosteron. Količinsko najpomembnejši nadledvični androgen je dehidroepiandrosteron (DHEA) (1).

Plazemski prenos

Skorja nadledvične žleze nima sposobnosti skladiščenja hormonov, ki se zato takoj po sintezi sproščajo v kri, kjer se nahajajo prosti ali pa vezani na prenašalne beljakovine (1).

Delovanje na periferna tkiva

Glukokortikoidi

Glukokortikoidne receptorje najdemo praktično v jedrih celic vseh tkiv. Glukokortikoidi zagotavljajo uravnovešen metabolizem ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin, pogojujejo normalnemu delovanju ledvic in zagotavljajo ustrezen glomerulni pretok in učinek antidiuretičnega hormona, permisivno delujejo na reaktivnost žilja na kateholamine, zagotavljajo omejitev vnetnih in alergičnih reakcij (6).

Mineralokortikoidi

Približno 60% mineralokortikoidne aktivnosti pri človeku opravi aldosteron, dodatnih 30% prispevajo glukokortikoidi, preostalo pa je posledica drugih steroidnih hormonov z mineralokortikoidno aktivnostjo (kortikosteron, 18- hidroksikortikosteron). Aldosteron po vezavi na membranske receptorje sproži proces proteinske sinteze, katere končni produkt so encimi, potrebni za delovanje natrij-kalijeve črpalke. Delovanje natrij-kalijeve črpalke povzroči izstopanje natrija v izvencelični prostor in tako vzdržuje njegovo osmolalnost in volumen. Hkrati se povečuje električni potencial med svetlino in tubularnimi celicami v ledvicah, kar povzroča pospešeno izločanje kalijevih in vodikovih ionov. Aldosteron ne učinkuje le na celice ledvičnih tubulov, temveč tudi na celice drugih sekretornih tkiv (žleze slinavke, znojnice, žleze prebavnega trakta) (6).

Androgeni

Direktna biološka aktivnost androstendiona, DHEA in DHEA-S je majhna, zato služijo kot prekurzorji za aktivnejše androgene hormone (testosteron, dihidrotestosteron) (6).

1.3.2. Hormoni sredice nadledvične žleze

Simpatokromafini sistem vključuje simpatični živčni sistem in kromafino tkivo, katerega glavni ostanek v postnatalnem življenju je sredica nadledvične žleze. Njegov proizvod so **kateholamini** (adrenalin, noradrenalin in dopamin).

Kateholamini so snovi, ki vsebujejo benzenski obroč in delujejo na adenoreceptorje.

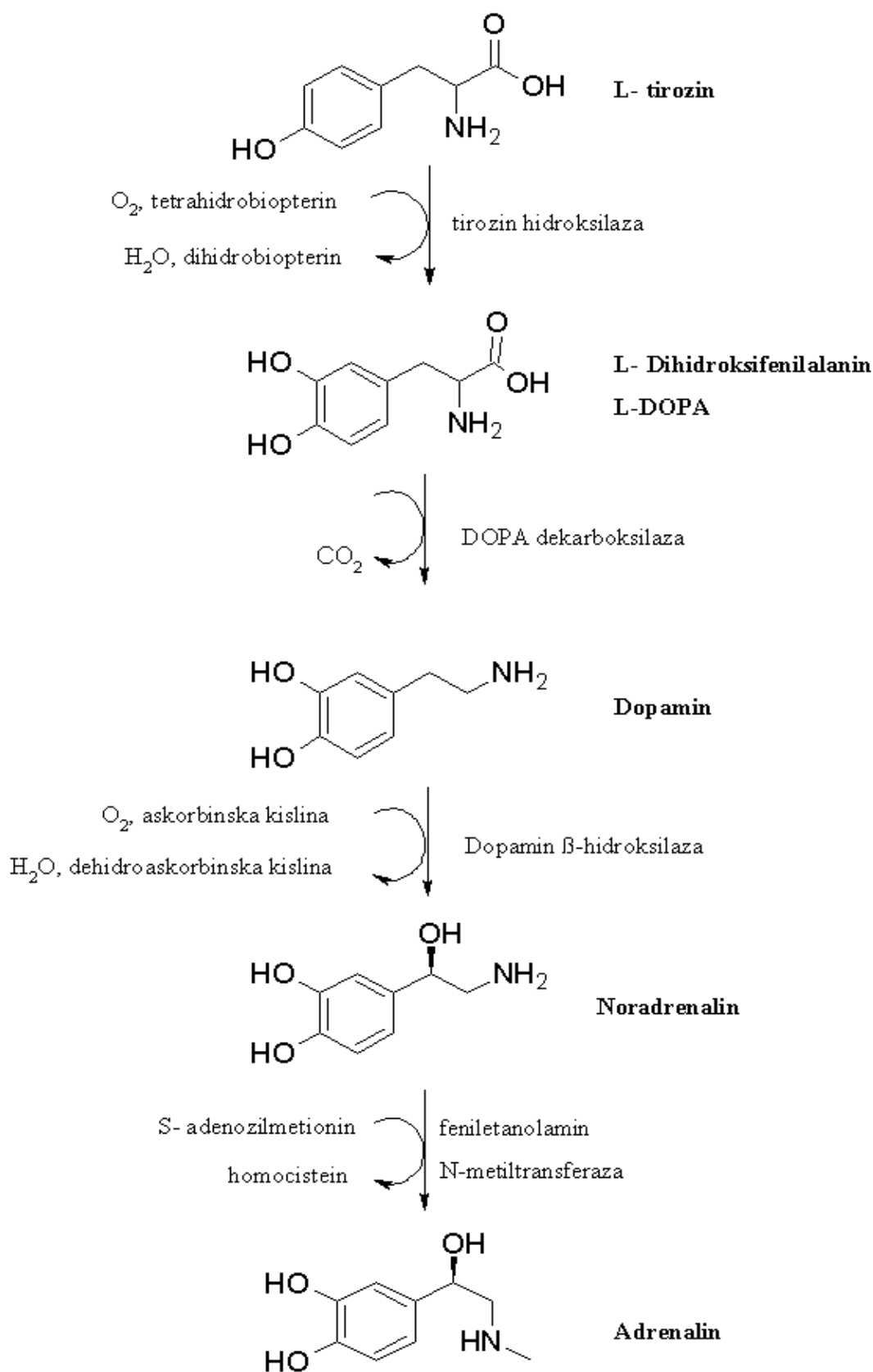
Farmakološko najpomembnejši so noradrenalin, adrenalin in izoprenalin (sintetični derivat noradrenalina). Večji kot je njihov agonistični potencial za določen receptor, večji je tudi njihov učinek na ta receptor. Tako imajo na alfa receptorje največji učinek adrenalin in noradrenalin, na beta receptorje pa izoprenalin (1, 7).

Sinteza kateholaminov

Kateholamini se sintetizirajo iz L-tirozina, ki se pretvori v DOPO (dihidroksifenilalanin), ki se najprej pretvori v dopamin, iz njega nastane noradrenalin, iz tega pa adrenalin (slika 5). Noradrenalin je v visokih koncentracijah shranjen v sinaptičnih veziklih postanglionarnih sinaptičnih nevronov skupaj z ATP, kromograninom in dopamin- β hidroksilazo. Nevrotransmitor se skupaj s temi snovmi sprosti iz končiča z eksocitozo, ki je uravnavana s Ca^{2+} . Samo sproščanje je uravnavano z negativno povratno zvezo preko presinaptičnih alfa2 receptorjev, ki inhibirajo adenilat-ciklazo in tako preko znižanja cAMP preprečijo odpiranje Ca^{2+} kanalčkov (predvsem na adrenergičnih in holinergičnih nevronih). Transmittorna akcija se v večini zaključi s ponovnim privzemom noradrenalina v živčne končiče. ATP, ki se skupaj z noradrenalinom sprosti iz živčnih končičev, je mediator za zgodnjo fazo krčenja gladke mišice kot odgovor na simpatično aktivnost. Protein kromogranin skupaj z ATP pomaga pri zadrževanju noradrenalina v sinaptičnem veziklu do zlitja v sinapso.

Glavni mehanizem inaktivacije je ponovni privzem noradrenalina v živčne končiče. Noradrenalin in adrenalin, ki krožita po telesu, se razgrajujeta z intracelularnima encimoma MAO (monoamino oksidaza) in COMT (katehol-O-metil transferaza), zato imajo pri tej razgradnji prenašalci kateholaminov v celico ključno vlogo. MAO metabolizira kateholamine v aldehide, ki jih na periferiji razgradi aldehydna dehidrogenaza do karboksilnih kislin. MAO lahko oksidira tudi druge monoamine. Encim, ki je vezan na membrano mitohondrijev, se nahaja predvsem v noradrenergičnih živčnih končičih (malo NA prostega v citosolu). Inhibirajo pa ga različna zdravila, ki delujejo na centralni živčni sistem (CŽS). V sinaptičnem nevronu MAO nadzoruje količino dopamina in noradrenalina.

COMT katalizira reakcijo metilacije $-OH$ skupine na kateholih. Najdemo ga v živčnem pa tudi v drugih tkivih. Glavni končni metabolit adrenalina in noradrenalina je vanililmandljeva kislina (VMA) (končni produkt COMT-a), ki se izloči z urinom (3).



Slika 6: Sinteza kateholaminov

Uravnavanje izločanja

Uravnavanje izločanja razdelimo v dve skupni:

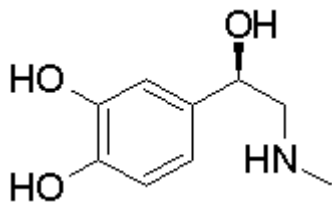
- **lokalno** na nivoju sproščanja: kateholamini prek presinaptičnih receptorjev zaviralno vplivajo na lastno sproščanje,
- **centralno**: stimulusi iz centralnega živčevja kot posledica integracije različnih vplivov prek sinaptičnega živčevja povzročajo sproščanje kateholaminov v efektornih organih (1).

Delovanje na periferna tkiva

Kateholamini se na nivoju celic vežejo na membranske receptorje, ki jih delimo v alfa, beta in dopaminergične. Noradrenalin deluje prvenstveno kot neurotransmitor, kajti šele 10- kratne bazalne vrednosti v plazmi privedejo do pomembnejših hemodinamičnih in presnovnih učinkov. Noradrenalin in adrenalin delujeta na alfa in beta receptorje, vendar ima adrenalin do njih večjo afiniteto. Dopamin deluje kot neurotransmitor v centralnem živčnem sistemu: receptorji D₁ se nahajajo pretežno v osrednjem živčevju, receptorji D₂ pa v hipofizi. Skupaj s preostalima dvema kateholaminoma ima pomembno vlogo kot modulator nevroendokrinega sistema. Dopaminergični receptorji se nahajajo tudi na periferiji: zaviralni, presinaptični receptorji na noradrenergičnih živčnih končičih in postsinaptičnih receptorjih v ledvicah, karotidnem telescu, perifernih arterijah ter delih prebavil, rotil in sečil (1, 3).

Adrenalin

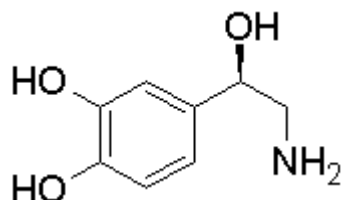
Adrenalin je hormon in živčni prenašalec, ki ga izloča nadledvična žleza in posreduje pri pretvorbi glikogena v glukozo. Njegova glavna naloga je prilagajanje srčnega krvnega obtoka in metabolizma na stresne obremenitve. Adrenalin poveča med drugim pulz, srčni minutni volumen in krvni obtok. Skozi izločanje adrenalina nastajata sladkor in maščoba za povečano potrebo po energiji (1, 3, 8).



Slika 7: Adrenalin

Noradrenalin

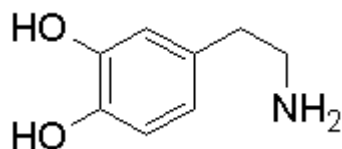
Noradrenalin je živčni prenašalec simpatičnega živčevja ter hormon, ki ga izloča sredica nadledvične žleze. Spada med kateholamine. Njegova kemijska formula je $C_8H_{11}NO_3$. Deluje zlasti na gladko mišičje žil dovodnic, kjer po vezavi na adrenergične receptorje povzroči njihovo skrčenje ter posledično porast krvnega tlaka. Sprošča se iz simpatičnih živčnih končičev. Vpliva tudi na osrednje živčevje in sicer na predele, odgovorne za zvečano pozornost in impulzivnost. Sprošča se zlasti v stresnih razmerah, zato spada med stresne hormone. Telo pripravi na »boj ali beg« (pospeši se srčni utrip, glikogenoliza, glukoneogeneza,..). V osrednjem živčevju se sprošča v predelu srednjih možganov. Noradrenalin se v telesu proizvaja v sredici nadledvične žleze iz aminokisliline tirozin z več encimsko vodenimi reakcijami. Najprej nastane z oksidacijo iz tirozina dihidroksifenilalanin (L-DOPA), le-ta se nato dekarboksilira do živčnega prenašalca dopamina. Dopamin se z β oksidacijo pretvori v noradrenalin. Iz noradrenalina lahko z metiliranjem aminskega dušika nastane adrenalin, kar katalizira encim N-metiltransferaza. (1, 3, 9).



Slika 8: Noradrenalin

Dopamin

Dopamin ima v avtonomnem živčnem sistemu in na periferiji veliko manjši pomen. V manjših dozah selektivno stimulira specifične dopaminske D1 receptorje in povzroča vazodilatacijo v ledvicah. V večjih odmerkih dopamin stimulira β 1 receptorje in tako povzroča pozitivni kronotropni in inotropni učinek. Še v večjih odmerkih pa stimulira tudi α 1 receptorje krvnih žil in povzroča vazokonstrikcijo (3).



Slika 9: Dopamin

1.3.3. Motnje v delovanju nadledvičnih žlez

Kronična odpoved skorje nadledvične žleze

Odpoved nadledvične žleze je lahko posledica primarne okvare nadledvičnih žlez (primarna insuficienca, Addisonova bolezen) ali izpada tropnega hipofiznega hormona (sekundarna insuficienca). Če gre za pomanjkanje ali izpad hipotalamičnega sprostilnega hormona CRF, govorimo o terciarni insuficienci. Primarna insuficienca nadledvičnih žlez je posledica tuberkuloze in avtoimunskega adrenalitisa (1).

Akutna odpoved skorje nadledvične žleze

Akutna odpoved nadledvične žleze lahko nastane v sklopu že znanega kroničnega obolenja pri večjih stresih, lahko pa je tudi prvi pojav nadledvične odpovedi. Povzroči jo lahko tudi septično stanje s posledično krvavitvijo v nadledvično žlezo, redkeje metastaze in infekcije (1).

Cushingov sindrom

Cushingov sindrom je skupek kliničnih in laboratorijskih znakov, katerih vzrok je čezmerno izločanje kortizola in njegovega neposrednega in posrednega delovanja na različna tkiva. Etiopatogenetično pa je lahko posledica:

- čezmernega izločanja endogenega ACTH (centralni, hipotalamično-hipofizni Cushingov sindrom);
- ektopičnega ACTH (paraneoplastični sindromi ob bronhialnem karcinomu, karcinomu pankreasa);
- avtonomnega izločanja kortizola zaradi modularne hiperplazije, adenoma ali karcinoma nadledvičnih žlez;
- čezmernih odmerkov sintetičnih glukokortikoidnih preparatov ali redkeje čezmernih doz ACTH (adenokortikotropni hormon) (1).

Primarni aldosteronizem

Primarni aldosteronizem (Connov sindrom) je bolezensko stanje, za katero je značilna avtonomna hiperprodukcija aldosterona z vsemi posledicami njegovega delovanja. Njegova patomorfološka osnova je lahko adenom ali obojestranska hiperplazija nadledvičnih žlez (1).

Hiporeninemični hipoaldosteronizem

Z nazivom hiporeninemični hipoaldosteronizem označujemo sicer heterogeno skupino disfunkcij skorje nadledvične žleze, pri kateri je plazemska aktivnost renina znižana, znižana je tudi koncentracija aldosterona v plazmi ob normalnem izločanju kortizola (1).

Adrenogenitalni sindrom (kongenitalna adrenalna hiperplazija)

Adrenogenitalni sindrom je posledica vrste encimskih okvar v steroidogenezi kortizola. Motnja je prirojena in se prenaša avtosomno recesivno. Pomanjkljiva sinteza kortizola vodi prek negativne povratne zveze do hipersekrecije ACTH. Posledica je hiperplazija nadledvičnih žlez in povečano izločanje različnih steroidov, ki nastajajo v metabolni poti pred okvarjenim encimom (1).

Virilizirajoči tumorji nadledvične žleze

Virilizirajoči tumorji nadledvične žleze se večinoma pojavijo v generativnem obdobju ženske. V endokrinem sistemu zasledimo zmerno zvišanje koncentracije testosterona v plazmi in visoke koncentracije DHEA in DHEA-S v plazmi ter povečano izločanje 17- ketosteroidov v urinu (1).

Sindrom funkcionalne androgenizacije

Sindrom funkcionalne androgenizacije imenujemo stanje, ko pri ženski ugotovimo zmerno zvišanje koncentracije enega ali več androgenih hormonov v plazmi, klinično pa kombinacije naslednjih znakov:

- motnje v reprodukciji (sterilnost oz. subfertilnost (zmanjšana plodnost), menstrualne motnje z anovulacijskimi cikli);
- hujše oblike aken rezistentnih proti lokalnemu zdravljenju, androgena alopecija (bolezen pri kateri izpadejo lasje in dlake);
- hirsutizem, seboreja (povečano in bolezensko spremenjeno izločanje loja iz lojnic)

(1).

Feokromocitom

Feokromocitom je tumor kromafinih celic nadledvičnih žlez, ki izločajo čezmerne količine kateholaminov, ki povzročajo zvišanje krvnega tlaka in vrsto drugih bolezenskih znakov. Pri 20 odstotkov feokromocitomov se kromafine celice razvijejo zunaj nadledvičnih žlez, v katerih so običajno. Rakavih je samo 5 odstotkov feokromocitomov v nadledvičnih žlezah, pa kar 30 odstotkov tistih, ki nastanejo zunaj njih. Za feokromocitomom zbolijo manj kot 1 na 100 prebivalcev. Zbolevajo moški in ženske, najpogosteje med 30. in 60. letom. Ker so feokromocitomi navadno zelo majhni, največkrat ne pritiskajo na okolno tkivo; zdravnik jih tudi ne otipa. Kljub temu še lahko takoj majhen feokromocitom izloča dovolj kateholaminov, da sprožijo številne težave. Kateholaminski hormoni (adrenalin, noradrenalin, dopamin in DOPA) idr. povzročajo zvišan krvni tlak, poleg tega pa še druge simptome, ponavadi povezane z ogrožajočimi okoliščinami, ki sprožijo napad panike.

Nekateri bolniki s feokromocitomom imajo redko dedno bolezen, zaradi katere so nagnjeni k tumorjem v različnih endokrinih žlezah, npr. ščitnici, obščitnicah in nadledvičnih žlezah. Feokromocitom se lahko pojavi tudi pri ljudeh z von Hippel-Lindauovo boleznijo, pri kateri se nenormalno razrastejo žile in tvorijo benigne tumorje, ter pri ljudeh z neurofibromatozo (von Recklinghausonovo boleznijo), pri kateri na živcih nastajajo mesnati tumorji.

S preiskavami, kot sta računalniška tomografija (CT) ali magnetnoresonančno slikanje (MRS), ugotovimo, kje je tumor. To lahko ugotovimo tudi z vbrizganjem radioaktivnih snovi, ki se nabirajo v tumorju. (1, 3, 10).

Nevroblastom

Maligni tumorji nevrokromafinega tkiva sredice nadledvične žleze se pojavljajo pri otrocih. Približno 80% teh neoplazem odkrijejo pri otrocih mlajših od 15 let. Za nevroblastom je značilna hitra rast in metastaziranje v vse organe. Pojav teh tumorjev je povezan s povečano produkcijo kateholaminov in njihovih presnovkov. Značilno za nevroblastome je povečano izločanje dopamina, noradrenalina, VMA in HVA (3, 11).

1.4. Metode, s katerimi lahko določimo kateholamine

1.4.1. Encimskoimunska metoda (ELISA)

Temelj tega testa je odkritje, da lahko pritrdimo na protitelesa in antigene različne encime, tako da se reaktivnost protiteles ne spremeni. Kvantitativno lahko določamo protitelesa in antigene (6).

Določevanje protiteles

Specifična protitelesa, ki so v vzorcu seruma, inkubiramo z ustreznim antigenom, pritrjenim na trdni podlagi. Ta je lahko dno plastične epruvete ali dno jamice mikrohematoglutinacijske plošče. Protitelesa se vežejo s pritrjenim antigenom. Ko s spiranjem odstranimo vse snovi, ki niso reagirale, dodamo z encimom konjugirane antiimunoglobuline, ki se vežejo s pritrjenimi protitelesi. Količino vezanih konjugiranih antiimunoglobulinov, ki je proporcionalna količini protiteles v preiskovanem serumu, lahko določimo s stopnjo razgradnje substrata. Navadno je razgrajeni substrat obarvan ali pa daje barvno reakcijo po dodatku kromogena. Stopnjo razgradnje lahko ocenimo s prostim očesom ali s spektrofotometrom. S tem testom lahko določimo specifična protitelesa IgG ali IgM. Najbolj uporabljeni encimi za konjugiranje so peroksidaza in alkalna fosfataza (6).

Določevanje antigena

Direktna tehnika

V prvi stopnji, ki je imunska reakcija, se veže antigen iz preiskovanega seruma na del specifičnih protiteles, ki so pritrjena na steno epruvete. Po končani inkubaciji odstranimo serum in speremo epruvete. V drugi stopnji, ki je tudi imunska reakcija, dodamo z encimom konjugirane antigene, ki se vežejo na nezasedena protitelesa na steni epruvete. Količina nastalega kompleksa protitelo-konjugirani antigen je mera vsebnosti antigena v preiskovanem serumu. V tretji stopnji, ki je indikatorska, dodamo substrat, ki se razgradi. Razgrajeni substrat je lahko že sam obarva ali pa se obarva po dodatku kromogena. Intenzivnost tega barvila ustreza aktivnosti encima. Čim večja je aktivnost encima, tem manjša je koncentracija antigena in obratno (6).

Kompetitivna tehnika

V prvi stopnji inkubiramo v epruveti vzorec seruma (v katerem je antigen, ki ga določujemo) in z encimom konjugiran antigen. Dno epruvete je prekrito s protitelesi. V tej stopnji poteka imunska reakcija, v kateri tekmujeta preiskovani antigen in konjugirani antigen za razpoložljivo majhno količino protiteles. Razmerje teh dveh antigenov, pritrjenih na protitelesa, je sorazmerno razmerju teh antigenov v inkubacijski raztopini. Količina kompleksa protitelo-konjugirani antigen je mera za količino antigena v preiskovanem serumu. S temeljitim spiranjem odstranimo vse reagente, ki niso reagirali. V drugi stopnji dodamo indikatorski sistem. Ta je odvisen od encima, s katerim je konjugiran antigen. Barvno reakcijo izmerimo s fotometrom.

Ker gre pri tej izvedbi encimsko imunske reakcije za tekmovanje antigenov za razpoložljiva protitelesa, bo z encimom konjugiranega antigena vezanega tem manj, čim več antigena bo v preiskovanem vzorcu. Intenzivnost barvne reakcije (encimska aktivnost) bo torej s porastom koncentracije preiskovanega antigena v vzorcu pojemala. Z umeritveno krivuljo, ki jo izdelamo s standardi znanih koncentracij, lahko kvantitativno določimo koncentracijo preiskovanega antigena (6).

1.4.2. Radioimunološka metoda (RIA)

Z RIA lahko izmerimo zelo majhne količine antigenov ali haptenov (do 10^{-10} g). Za radioaktivno zaznamovanje navadno uporabljamo ^{125}I . Načelo tega testa je tekmovanje radioaktivnega zaznamovanega antigena (Ag^+) in nezaznamovanega antigena (v preiskovanem vzorcu) za določeno (majhno) količino protiteles (Ab). Z merjenjem radioaktivno zaznamovanega antigena, vezanega v kompleks ($\text{Ab}\cdot\text{Ag}^+$), lahko dobimo podatke o količini antigena v preiskovanem vzorcu. Čim več radioaktivno zaznamovanega antigena se veže s protitelesi, tem manjša je količina antigena v preiskovanem vzorcu. Ali: čim manjša je količina nezaznamovanega antigena, tem večje je razmerje med vezanim in prostim radioaktivnim antigenom. Ena najpomembnejših stopenj v radioimunski metodi je ločitev vezanega in prostega antigena. Na voljo so različne metode: adsorpcija antigena na trdno fazo, kromatografija, elektroforeza in precipitacija z antiimunoglobulini.

Količino preiskovanega antigena določimo iz umeritvene krivulje. To izdelamo tako, da vzamemo določeno količino protiteles (določeno razredčino) in določeno količino radioaktivno zaznamovanega antigena ($\text{Ab} + \text{Ag}^+$) ter dodajamo vrsto različnih (znanih) količin antigena. Za vsako dodano količino antigena določimo količino vezanega radioaktivnega antigena in iz tega razmerje vezanega in prostega antigena (V/P). Ta postopek ponovimo z različnimi razredčinami protiteles. Tako dobimo umeritveno krivuljo. Antigen v neznanem vzorcu določimo tako, da dodamo preiskovani vzorec standardni mešanici ($\text{Ab} + \text{Ag}^+$). Izmerimo razmerje med vezanim in prostim radioaktivnim antigenom (V/P) ter odberemo neznano količino antigena v preiskovanem vzorcu iz umeritvene krivulje (4, 6).

1.4.3. Fluorometrijske metode z etilendiaminom

Princip te metode je, da se adrenalin oksidira v adenokrom, kateri kondenzira z etilendiaminom in pri izhajanju vode in vodika nastane fluorescentna spojina. Noradrenalin se oksidira v noradenokrom, kateri kondenzira z dvema molekulama etilendiamina in ustvari fluorescentno kondenzacijsko spojino (2).

1.4.4. Kromatografske metode (HPLC)

Komponente (topljenec) raztopimo in jih nato pod visokim pritiskom (do 200 barov) potiskamo skozi (kovinsko) kolono s pomočjo mobilne faze. Kolona je napolnjena z delci polnila (običajno velikost $<10\mu\text{m}$), ki so prekriti s stacionarno fazo. Z izbiro ustreznih faz in ostalih pogojev, dosežemo separacijo večkomponentne mešanice v nekaj minutah. Pri HPLC je bistvenega pomena izbira stacionarne in mobilne faze. Sestavo (polarnost) mobilne faze lahko med separacijo tudi programirano spreminjamo – ta način imenujemo gradientno izpiranje za razliko od izokratskega, pri katerem ostane polarnost mobilne faze (lahko tudi večkomponentna) v času separacije nespremenjena.

Z razvojem črpalk za visoke pritiske in konstantne pretoke brez pulziranja, tehnologije kolon in različnih detektorjev, je postala HPLC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih in anorganskih spojin. Odlikujejo jo: hitrost, občutljivost, ločljivost, majhna množina vzorca in večkratna uporaba kolone (12).

1.5. Odvzem vzorca

Plazma

Fizični in psihični stres privede do povečanja vrednosti kateholaminov v plazmi. Bolnik naj miruje v ležečem položaju vsaj 30 minut (2-3 krat povečane vrednosti v stoječem položaju). Bolnik 4 ure pred odvzemom ne sme jesti, piti kave ali čaja in kaditi. Kri odvezamo s predhodno vstavitvijo katetra (venska punkcija poveča vrednosti). Upoštevati moramo cirkadialni ritem (največji je dopoldan). Plazma mora biti odvzeta z EDTA (etilendiamin tetraacetna kislina) ali heparinom. Prenos mora biti na ledu in do analize mora biti zamrznjena. Vzorce, ki so motni, lipemični, hemolizirani, moramo zbistriti s centrifugiranjem pred izvedbo analize. Vzorce, ki so preveč hemolizirani, lipemični ali kontaminirani, ne testiramo (13).

2. NAMEN DELA

Namen tega diplomskega dela je preizkusiti metodo ELISA za določanje kateholaminov (adrenalin, noradrenalin) v plazmi in jo primerjati z že dolgo vpeljano radioimunsko metodo (RIA) za določanje kateholaminov v plazmi ali urinu. Pri tej metodi smo želeli pridobiti informacijo, ali lahko encimskoimunska metoda zamenja ročno izvedeno radioimunsko metodo. Razlog zamenjave metode je ta, da se pri RIA uporablja radioaktivni izotop ^{125}I , ki je zdravju škodljiv. V analizo smo vzeli 31 vzorcev preiskovancev. Vzorcem smo izmerili koncentracijo kateholaminov v plazmi z dvema metodama (RIA in ELISA). Pri preiskovancih smo z RIA metodo izmerili precej nizko vsebnost kateholaminov, zato smo hoteli na analizatorju ADALTIS, Personal Lab preveriti njegovo odzivnost, specifičnost, občutljivost in na ta način pridobiti informacijo o primerljivosti merjenih vrednosti.

3. METODE IN MATERIALI

3.1. ELISA

Princip metode

Analizna oprema nudi material za kvantitativno merjenje adrenalina, noradrenalina in dopamina v urinu in plazmi. Adrenalin, noradrenalin in dopamin so izločeni z uporabo cis-diol specifičnim gelom, potem aciliramo do N-aciladrenalina, N-acilnoradrenalina in N-acildopamina in po tej encimski spremembi med postopkom detekcije v N-acilmetanefrine, N-acilnormetanefrine, N-acil-3-metoksitromine. Za encimsko imunski test bomo uporabili mikrotitrsko ploščico. Adrenalin in noradrenalin določimo posamezno, saj so omejeni za vezanje na trdno fazo mikrotitrsko ploščice. Acilirani kateholamini iz vzorcev in trdna faza omejujejo tekmovalne kateholamine za določeno število obvezne vezave z antiserumom. Ko je sistem v ravnovesju, proste antigene in proste antigenske-antiserumske komplekse odstranimo s spiranjem. Vezano protitelo na trdo fazo kateholaminov odkrijemo s kunčjimi anti-protitelesi IgG-peroksidazo, za konjugacijo uporabimo TMB substrat. Reakcijo nadzorujemo pri valovni dolžini 450 nm, kjer je količina protiteles vezana na trdno fazo kateholaminov obratno sorazmerna s koncentracijo kateholaminov v vzorcu.

ADALTIS Personal Lab je avtomatski, namizni analizator (slika 10). Programska oprema je Microsoft Windows 98, ki usklajuje komunikacijo z analitikom. Sistem se upravlja preko zunanjega računalnika. Do glavnega menija sistema lahko dostopamo z »ukazi« (dostop do delovnih listov, rezultatov, kontrole kakovosti, priprave reagentov, zagon analize).



Slika 10: Analizator ADALTIS Personal Lab

3.1.1. Reagenti za ekstrakcijo in acilacijo

Tabela 1: Reagenti za ekstrakcijo in acilacijo

STANDARD A	Adrenalin 0 nmol/L Noradrenalin 0 nmol/L 1 x 1 ml
STANDARD B	Adrenalin 5,458 nmol/L Noradrenalin 23,644 nmol/L 1 x 1 ml
STANDARD C	Adrenalin 21,832 nmol/L Noradrenalin 94,576 nmol/L 1 x 1 mL
STANDARD D	Adrenalin 87,328 nmol/L Noradrenalin 378,304 nmol/L 1 x 1 mL
STANDARD E	Adrenalin 349,312 nmol/L Noradrenalin 1513,2 nmol/L 1 x 1 mL
STANDARD F	Adrenalin 1397,248 nmol/L Noradrenalin 6052,8 nmol/L 1 x 1 mL
KONTROLA 1	1 x 1 mL
KONTROLA 2	1 x 1 mL
ACILACIJSKI PUFER	1 x 20 mL
ACILACIJSKI REAGENT	2 x 1,5 mL
PUFER ZA ANALIZO	Vsebuje 1 M HCl 2 x 4 mL
PUFER ZA EKSTRAKCIJO	2 x 4 mL
PLOŠČA ZA EKSTRAKCIJO	2 x 48 jamic, prevlečene z boratnim gelom
HCl	Vsebuje 0,025 M HCl Rumeno obarvano 1 x 20 mL

3.1.2. Reagenti za encimskoimunski test

Tabela 2: Reagenti za encimskoimunski test

ENCIM	Liofiliziran Vsebuje katehol-O-metiltransferazo 6 x 1 mL
KOENCIM	Vsebuje S-adenozil-L-metionin 3 x 0,75 mL
ENCIMSKI PUFER	2 x 4 mL
ANTISERUM ZA ADRENALIN	Kunčji Modro obarvano 1 x 6 mL
ANTISERUM ZA NORADRENALIN	Kunčji Rumeno obarvano 1 x 6 mL
MIKROPLOŠČICA ZA ADRENALIN	
MIKROPLOŠČICA ZA NORADRENALIN	
KONCENTRIRANI SPIRALNI PUFER	Redčimo z destilirano vodo do končnega volumna 500 mL 3 x 50 mL
KONJUGIRANI ENCIM	Kunčja Pt konjugirana s peroksidazo
SUBSTRAT	Vsebuje raztopino tetrametilbenzena (TMB)
RAZTOPINA STOP ADHEZIVNA FOLIJA	Vsebuje 0,25 M žveplovo kislino

3.1.3. Dodaten material in oprema

- pipete Eppendorf Reference, nastavljive, 10–100 μ L, 100–1000 μ L;
- mikrotitrna ploščica za spiranje;
- EIA čitalec, sposoben branja absorbance pri 450 nm;
- tresalnik Scientific industries inc.
- destilirana voda in
- mešalnik Vortex.

3.1.4. Postopek

Priprava spiralnega pufra

Koncentriran spiralni pufer zredčimo z destilirano vodo do končnega volumna 500 ml. Zredčen spiralni pufer hranimo na temperaturi 2-8°C.

Priprava encimske raztopine

Encimska raztopina mora biti pripravljena pred analizo (ne več kot 10–15 minut).

Priprava vzorcev, ekstrakcija in acilacija

1. Pipetiramo 20 μL standarda (1–6), 20 μL kontrole na ekstrakcijsko ploščo. Dodamo 500 μL destilirane vode, da uravnamo volumen. Nato dodamo po 600 μL vzorcev plazme za ekstrakcijo adrenalina in noradrenalina.
2. Pipetiramo 50 μL analiznega pufra.
3. Pipetiramo 50 μL ekstrakcijskega pufra.
4. Ploščo prekrijemo z adhezivno folijo in inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi na tresalniku (600 r/min).
5. Odstranimo adhezivno folijo. Takoj odlijemo tekočino in ploščo popivnamo na papirnati brisači.
6. Pipetiramo 1 mL razredčenega spiralnega pufra, pokrijemo z adhezivno folijo in inkubiramo 5 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
7. Odstranimo adhezivno folijo, odlijemo tekočino in ploščo popivnamo na papirnati brisači.
8. Ponovimo 6. stopnjo, odlijemo tekočino in popivnamo ploščo.
9. Pipetiramo 150 μL acilacijskega pufra.
10. Pipetiramo 25 μL acilacijskega reagenta.
11. Inkubiramo ploščo, brez folije, 15 minut na sobni temperaturi na tresalniku (600 rpm).
12. Odlijemo tekočino in ploščo popivnamo. (Glej točko 5.)
13. Pipetiramo 1 mL destiliranega spiralnega pufra.
14. Ploščo inkubiramo s folijo, 10 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
15. Odlijemo tekočino in ploščo popivnamo. (Glej točko 5.)
16. Pipetiramo 200 μL HCl.
17. Pokrijmo ploščo z adhezivno folijo in inkubiramo 10 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm). **Po tem koraku tekočine ne odlijemo.**

Encimskoimunska metoda za določanje adrenalina

1. Pipetiramo 25 μL pravkar pripravljene encimske raztopine.
2. Pipetiramo 75 μL ekstrakcijskega standarda, kontrole in vzorce pacientov.
3. Inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
4. Pipetiramo 50 μL antiseruma za adrenalin.
5. Inkubiramo 2 uri na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
6. Vsebinsko zavržemo in vdolbinice temeljito speremo s 300 μL destiliranega spiralnega pufra. Proces spiranja ponovimo 2-krat.
7. Pipetiramo 100 μL encimskega konjugata.
8. Inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi na tresalniku (600 rpm)
9. Izsesamo/zavržemo in spiramo 3-krat.
10. Pipetiramo 100 μL substrata.
11. Inkubiramo 20–30 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm). Ne smemo izpostavljati svetlobi.
12. Dodamo 100 μL raztopine stop, mikrotitrsko ploščico položimo na tresalnik, da se raztopina homogeno porazdeli.
13. Odčitamo absorbanco raztopine v roku 10 minut. Absorbanco merimo pri valovni dolžini 620 nm – 650 nm.

Encimsko imunska metoda za določanje noradrenalina

1. Pipetiramo 25 μL pravkar pripravljene raztopine.
2. Pipetiramo 15 μL standarda za ekstrakcijo, kontrolo in vzorce pacientov.
3. Inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
4. Pipetiramo 50 μL antiseruma za noradrenalin.
5. Inkubiramo dve uri na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
6. Tekočino zavržemo in spiramo z 300 μL koncentriranim spiralnim pufrom. Spiranje ponovimo dvakrat.
7. Pipetiramo 100 μL encimskega konjugata.
8. Inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm)
9. Tekočino izsesamo, zavržemo in spiramo trikrat.
10. Pipetiramo 100 μL substrata.
11. Inkubiramo 20 – 30 minut na sobni temperaturi, na tresalniku (600 rpm).
12. Odčitamo absorbanco raztopine v roku 10 minut. Absorbanco merimo pri valovni dolžini 620–650 nm.

3.2. RIA

Princip metode

Načelo RIA je tekmovanje radioaktivno zaznamovanega antigena (Ag^+) in nezaznamovanega antigena (Ag) za določeno (majhno) količino močno afinitetnih protiteles. Zaznamovani antigen bomo zmešali s protitelesi. Antigena mora biti toliko, da ravno še nasiti vezišča na protitelesih. Nato dodajamo čedalje večje količine nezaznamovanega antigena. In nato obe vrsti antigena tekmujeta za razpoložljiva vezišča na protitelesih. Naraščajoče koncentracije nezaznamovanega antigena izrinejo več in več zaznamovanega antigena z vezišč. Z merjenjem količine prostega zaznamovanega antigena v raztopini lahko določimo koncentracijo nezaznamovanega antigena. Čim več radioaktivnega zaznamovanega antigena se veže s protitelesi, tem manjša je količina antigena v preiskovanem vzorcu. Dejansko koncentracijo v vzorcu dobimo s pomočjo standardne krivulje.

Preiskovani vzorec in vzorec označen z ^{125}I , dodamo v epruvete, kjer so vezana sekundarna protitelesa, na katera so že vezana primarna protitelesa. Po precipitaciji in centrifugiranju se radioaktivnost izmeri z gama števcem (slika 11).



Slika 11: 1470 Wallac Wizard gama števec

3.2.1. Reagenti

Tabela 3: Reagenti za radioimunski test

INDIKATOR ZA NORADRENALIN	Indikator za noradrenalin ¹²⁵ I, raztopljen Vsebuje < 0,1% NaN ₃ moder zamašek
INDIKATOR ZA ADRENALIN	Indikator za adrenalin ¹²⁵ I, raztopljen Vsebuje < 0,1% NaN ₃ Rdeč zamašek
ANTISERUM ZA NORADRENALIN	Raztopljen Kunčji antiserum Vsebuje < 0,1% NaN ₃ Moder zamašek
ANTISERUM ZA ADRENALIN	Raztopljen Kunčji antiserum Vsebuje < 0,1% NaN ₃ Rdeč zamašek
PRECIPITACIJSKI ANTISERUM	Kunčji antiserum PEG fosfatni pufer Vsebuje < 0,1% NaN ₃
KALIBRATORJI A-F	Standard A-F Noradrenalin 0.0, 0.590, 1.770, 5.900, 17.700, 59.00 nmol/L Adrenalin 0.0, 0.160, 0.550, 1.650, 5.500, 16.500 nmol/L
KONTROLA 1 + 2 ACILACIJA ZA NORADRENALIN	Vsebuje acilacijski reagent V polivinilasti vrečki s sušilom Za detekcijo noradrenalina
ACILACIJA ZA ADRENALIN	Vsebuje acilacijski reagent V polivinilasti vrečki s sušilom Za detekcijo adrenalina
MIKROPLOŠČICA ZA EKSTRAKCIJO EKSTRAKCIJSKI PUFER	24 vdolbinic Prevlečena z boratnim afinitetnim pufrom
HCl	0,05 M HCl Rumeno obarvano
COMT RAZTOPLJEN	Vsebuje katehol-O-metiltransferazo (prašičja jetra) Vsebuje < 0,1% NaN ₃
KOENCIM ENCIMSKI PUFER	Vsebuje S-adenozil-L-metionin
KALIBRACIJSKI PUFER	Vsebuje tris pufer, HCl
ADHEZIVNA FOLIJA	1,0 M NaOH Vijolično obarvan

3.2.2. Material

- pipete Eppendorf Reference, nastavljive, 10–100 μL , 100–1000 μL ;
- sistem za izsesavanje;
- 0,1 M HCl, za redčenje vzorcev (kateri morajo biti redčeni);
- tresalnik Scientific industries inc.
- mešalnik Vortex;
- vodna kopel, 37°C;
- centrifuga ; $\geq 1500 \times g$;
- Gamma števec;
- bidestilirana ali deionizirana voda;
- papirnate brisače, nastavki za pipete in ura štoparica

3.2.3. Navodila za postopek

1. Vsako neprimerno rokovanje z vzorci ali sprememba postopka lahko vpliva na rezultate. Prikazan pipetiran volumen, čas inkubacije, temperatura morajo biti strogo izvedeni glede na navodila. Pipete in naprave morajo biti kalibrirane.
2. Postopek ne sme biti prekinjen. Reagenti, material in načrt morajo biti pripravljene v ustreznem času. Omogočimo, da so reagenti in vzorci na sobni temperaturi (18–25°C). Vsako stekleničko je potrebno pred uporabo blago pretresti, vendar se reagenti ne smejo speniti.
3. Izogniti se moramo kontaminaciji reagentov, pipet in stekleničk. Za vsak reagent, standard ali vzorec uporabljamo nov nastavek pipete. Ne smemo zamenjati zamaškov stekleničk.
4. Priporočeno je označevanje epruvel.
5. Zaradi vlažnosti pustimo vrečko z materialom na sobni temperaturi. Odpremo jo šele čez čas. Neuporabljene stekleničke vrnemo nazaj v vrečko za odstranitev.
6. Centrifugalna sila ni enakovredna obratom na minuto, ampak jo je treba preračunati (odvisnost polmera centrifuge).

Tabela 4: Priprava liofiliziranih in koncentriranih komponent

REDČENE KOMPONENTE	Z	RAZREDČILO	OPOMBA	HRANITEV	STABILNOST
INDIKATOR	3 mL	bidest. voda	Pripravimo 15 min pred postopkom. Zmešamo brez penjenja.	$\leq -20^{\circ}\text{C}$	Do izteka roka uporabnosti
ANTISERUM	2,75 mL	bidest. voda	Pripravimo 15 min pred postopkom. Zmešamo brez penjenja.	$\leq -20^{\circ}\text{C}$	Do izteka roka uporabnosti.

VZORCI	REDČENJE	Z	OPOMBA
URIN	> najvišji standard	0,1 M HCl	Redčimo na 1 : 16 pred ekstrakcijo.
PLAZMA	> najvišji standard	Ekstrakcijski pufer	Vzamemo manj kot 1 mL za ekstrakcijo in dopolnimo z ekstrakcijskim pufrom.

3.2.4. Postopek

1. DAN

Ekstrakcija standardov, vzorcev in kontrole (ekstrakcijska plošča)

1. Pipetiramo 1 mL standarda, kontrole in plazme in 25 μ L vzorcev urina na ekstrakcijsko ploščo. Vzorcem urina dodamo bidestilirano vodo, da izenačimo volumne.
2. Pipetiramo 500 μ L ekstartkijskega pufra.
3. Pipetiramo 100 μ L pufra standarda (v standard in kontrolo). Sprememba barve v vijolično.
4. Prekrijemo z adhezivno folijo in inkubiramo 30 minut na sobni temperaturi (18–25°C) na tresalniku (600 rpm).
5. Med inkubacijo si označimo epruvete za acilacijo: T (totalna acilacija), NSV (nespecifična vezava), Bo (standard A), Standardi B-F, vzorci. Acilacijskih stekleničk za noradrenalin, adrenalin (rdeča barva), ne smemo mešati. To lahko vodi do napačnih rezultatov. Uporabimo različne barve za označevanje.
6. Odstranimo adhezivno folijo, spraznimo ploščo in tekočino odstranimo s papirnato brisačo.
7. Pipetiramo 2 mL bidestilirane vode.
8. Ploščo pokrijemo z adhezivno folijo. Mešamo 5 minut na sobni temperaturi (18–25°C), na tresalniku (600 rpm). Pljuskanje ne vpliva na rezultate.
9. Odstranimo adhezivno folijo in takoj odstranimo tekočino na papirnato brisačo.
10. Pipetiramo 300 μ L 0,05 M HCl.
11. Inkubiramo 15 minut na sobni temperaturi (18–25°C), na tresalniku, brez adhezivne folije.
12. Med inkubacijo pripravimo COMT encimsko raztopino.

COMT (Katehol-O-metiltransferaza) encimska raztopina mora biti pripravljena vsaj 15 min pred postopkom.

COMT raztopimo v 0,5 mL bidestilirane vode in mešamo. Potem odpipetiramo 0,5 mL raztopine koencima k 1 mL encimskega pufra in dodamo k COMT, da dobimo končni volumen 2 mL. (COMT encimska raztopina). Če je potrebno pripraviti večji volumen od 2 mL, združimo vsebino vseh stekleničk in premešamo pred postopkom. Raztopina mora biti premešana. Če ne uporabimo celotne raztopine COMT, jo zamrznemo pri –20°C (brez raztopine koencima in encimskega pufra). Raztopina COMT je stabilna, pri teh pogojih, 1–2 meseca.

Radioimunska metoda za določanje noradrenalina

1. Pipetiramo 25 μL COMT encimske raztopine v epruveto (izločimo T).
2. Pipetiramo 25 μL ekstrakcijskega standarda, kontrole in vzorce v individualne epruvete. Pipetiramo 25 μL 0,05 M HCl v NSV epruvete. Epruvete zapremo z zamaški. Mešamo na Vortex mešalu. Za pipetiranje uporabimo ploščo za ekstrakcijo v poziciji pljuskanja.
3. Inkubiramo 60 minut na 37°C.
4. Med inkubacijo obnovimo indikator in antiserum.
5. Pipetiramo 50 μL indikatorja ^{125}I za noradrenalin.
6. Pipetiramo 50 μL antiseruma za noradrenalin (izločimo T in NSV). Mešamo na Vortex mešalu.
7. Epruvete zapremo z zamaški. Inkubiramo čez noč (15–20 ur) na 2–8°C.

Radioimunska metoda za določanje adrenalina

1. Pipetiramo 50 μL COMT encimske raztopine v epruveto (izločimo T).
2. Pipetiramo 100 μL ekstrakcijskega standarda, kontrole in vzorcev v individualne epruvete. Pipetiramo 100 μL 0,05 M HCl v NSV epruvete. Epruvete zapremo z zamaški in mešamo na Vortex mešalu. Za pipetiranje uporabimo ploščo za ekstrakcijo v poziciji pljuskanja.
3. Inkubiramo 60 minut na 37°C.
4. Med inkubacijo obnovimo antiserum in indikator.
5. Pipetiramo 50 μL indikatorja ^{125}I za adrenalin.
6. Pipetiramo 50 μL antiseruma za adrenalin (izločimo T in NSV). Mešamo na Vortex mešalu.
7. Epruvete zapremo z zamaški. Inkubiramo čez noč (15–20 ur) na 2–8°C.

2. DAN

Naslednji postopek, ki mora biti izveden, za noradrenalin in adrenalin.

1. Pred uporabo premešamo precipitacijski antiserum. Pipetiramo 1 mL precipitacijskega antiseruma v epruvete. Mešamo na Vortex mešalu.
2. Pokrijemo epruvete z zamaški. Inkubiramo 15 min na sobni temperaturi. (18–25°C).
3. Centrifugiramo na 3000 x g (zaželeno na 3000 x g). Temperatura ne sme presegati 18–25°C.
4. Odlijemo iz epruвет.
5. Po eni minuti štejemo v gama števcu.

3.3. Statistično vrednotenje metod

Aritmetična sredina

Dobimo jo tako, da seštejemo vrednosti spremenljivke vseh enot in vsoto delimo s številom enot; nanjo vpliva vrednost statističnega znaka vsake enote.

Enačba 2: Aritmetična sredina

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Varianca

Varianca je osnovna mera variacije, podobno kot je aritmetična sredina osnovna mera za srednjo vrednost. Varianca je povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine.

Enačba 3: Varianca

$$s^2 = \frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n - 1}$$

Standardna deviacija ali standardni odklon

Standardno deviacijo dobimo tako, da izračunamo kvadratni koren variance.

Enačba 4: Standardna deviacija

$$s = \sqrt{\frac{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n}}{n - 1}}$$

Koeficient variacije

Koeficient variacije dobimo tako, da podamo mero variacije v odnosu na ustrezno srednjo vrednost.

Enačba 5: Koeficient variacije

$$\text{KV \%} = \frac{s}{\bar{X}} * 100$$

Mediana ali centralna vrednost

Je tista vrednost spremenljivke, od katere ima polovica enot manjše, polovica pa večje vrednosti spremenljivke.

Linearna regresija

Za premico, ki jo s to metodo dobimo po podatkih iz vzorca, je značilno, da je vsota odklonov posameznih točk od nje manjša kot od katerekoli druge možne premice.

Enačba premice: $y = a + bx$, kjer sta x in y koordinati posamezne točke na premici. a predstavlja odsek na ordinati, medtem ko b pomeni naklon premice, ki ga pri regresijski premici imenujemo tudi regresijski koeficient.

Korelacija

Kadar imamo podatke o dveh naključnih kvantitativnih spremenljivkah, od katerih nobene ne izberemo sami v naprej, ne moremo govoriti o odvisnosti ene od druge, ampak le o njuni medsebojni povezanosti. Za analizo te povezanosti uporabljamo metodo korelacije.

Korelacija se razlikuje glede na smer povezanosti in zato govorimo o pozitivni in negativni korelaciji. Pozitivna je, kadar vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativna pa, kadar vrednost ene spremenljivke pada, če vrednost druge narašča.

Koeficient korelacije po Pearsonu

Koeficient korelacije po Pearsonu lahko uporabljamo, kadar sta spremenljivki približno normalno porazdeljeni. Označujemo ga z r . Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vse vrednosti med -1 in $+1$. Vrednost -1 dobimo, če gre za maksimalno negativno korelacijo, vrednost $+1$ pa pri maksimalni pozitivni korelaciji. Če je koeficient enak nič, pomeni, da med obema spremenljivkama ni povezanosti.

Enačba 6: Koeficient korelacije po Pearsonu

$$r = \frac{N\sum XY - \sum X \sum Y}{\sqrt{[N\sum X^2 - (\sum X)^2][N\sum Y^2 - (\sum Y)^2]}}$$

Kontrola kakovosti

Namen kontrole kakovosti, je odkrivanje napak, obenem pa predstavlja del dobre laboratorijske prakse. Da se preveri kakovost dobljenih rezultatov, se izvajajo testi za občutljivost, natančnost, specifičnost in pravilnost. Kontrole se testirajo istočasno z vsako testno izvedbo in se z njimi ravna enako kot s pacientovimi vzorci. Kontrola vzorcev mora biti v skladu s pravilnikom. Uporabljamo kontrole normalnih in patoloških vrednosti.

Karakteristika analize**Kalibracija za ELISA metodo**

Koncentracija, ki jo določimo, mora ležati znotraj meje, ki je določena s postopkom. Protokol ima zajete ciljne vrednosti. Če ne dosežemo vrednosti navedene kontrole, rezultati niso natančni in postopek je treba ponoviti.

Vezava antiseruma, encimskega konjugata in aktivacija encima so odvisne od temperature. Če se vrednosti ekstinkcije spreminjajo, termostat ni uporaben. Višja je temperatura, višja je vrednost ekstinkcije. Ustrezna odstopanja veljajo tudi za čas inkubacije. Optimalna temperatura za encimsko imunski test je med 18–22°C.

Pričakovane vrednosti za ELISA metodo

Referenčna območja dajo samo smernice. Priporočeno je, da si vsak laboratorij osnuje svoje normalne vrednosti.

	ADRENALIN	NORADRENALIN
PLAZMA	< 0,55 nmol/L	< 3,55 nmol/L

Analitična občutljivost za ELISA metodo

Občutljivost je definirana kot najnižja koncentracija, ki jo metoda lahko dovolj pravilno določi.

	ADRENALIN	NORADRENALIN
PLAZMA	0,06 nmol/L	0,26 nmol/L

Analitična specifičnost za ELISA metodo

Specifičnost kaže sposobnost analitične metode, da v zmesi kemijsko podobnih snovi izmeri samo koncentracijo preiskovanega analita.

SUBSTANCA	NAVZKRIŽNA REAKCIJA %	
	NORADRENALIN	ADRENALIN
Metanefrini	< 0,003	0,64
Normetanefrini	0,48	0,0009
3-Metoksitiramin	< 0,003	< 0,0007
Fenilalanin	< 0,003	< 0,0007
Dopamin	0,2	< 0,0007
Tirozin	< 0,003	< 0,0007
Homovanilna kislina	< 0,003	< 0,0007
Vanililmandljeva kislina	< 0,003	< 0,0007

Pričakovane vrednosti za RIA metodo

Rezultati sami po sebi niso edini razlog za poljubne terapevtske posledice. Rezultati morajo biti vzajemni s kliničnimi opazovanji in diagnostičnimi preizkusi. Zdrave osebe prikazujejo naslednje vrednosti:

	ADRENALIN	NORADRENALIN
PLAZMA	< 0,55 nmol/L	< 3,55 nmol/L

Priporočeno je, da vsak laboratorij osnuje svoje lastno območje normalnih vrednosti.

Kontrola kakovosti za RIA metodo

Dobro laboratorijsko delo zahteva redno uporabo kontrolnih vzorcev za zagotavljanje kvalitete rezultatov. Kontrolni vzorec mora skozi popolnoma enak proces kot preiskovani vzorec. Priporočljivo je, da se rezultati analizirajo z enakimi in statistično primerljivimi metodami.

Analitična občutljivost za RIA metodo

Definirana je kot najnižja koncentracija, ki jo metoda lahko dovolj natančno določi. Je vrednost, ki se razlikuje od ničelnega standarda s statistično značilno razliko oziroma presega ničelni standard za dve standardni deviaciji.

	ADRENALIN	NORADRENALIN
PLAZMA	0,044 nmol/L	0,141 nmol/L

Analitična specifičnost za RIA metodo

Specifičnost kaže sposobnost analitične metode, da v zmesi kemijsko podobnih snovi izmeri samo koncentracijo našega analita. Specifičnost nam prikazuje navzkrižne reakcije. Molekule, ki reagirajo navzkrižno, so tiste, ki so podobne ligandu po strukturi, tako da so sposobne vezave na protitelesa.

SUBSTANCA	NAVZKRIŽNA REAKCIJA %	
	NORADRENALIN	ADRENALIN
Noradrenalin	100	0,6
Adrenalin	< 0,03	100
Dopamin	0,09	< 0,001
Normetanefrini	0,38	0,006
Metanefrini	< 0,003	0,98
3-metoksi-tiramin	< 0,002	< 0,001
Oktopamin	< 0,005	< 0,001
OH₃CH₃O-fenilpiruvat	< 0,002	< 0,001
Adenokrom	< 0,002	0,06
Sinefrin	< 0,001	0,15

Ponovljivost (natančnost) metode

Ponovljivost obeh metod smo preverili z večkratnim merjenjem kontrole med dvema serijama. Manjši je koeficient variacije, bolj natančna je metoda.

Primerjava dveh odvisnih vzorcev

Preskus temelji na vzorčni porazdelitvi aritmetičnih sredin pri isti populaciji. Ničelna domneva trdi, da je povprečje populacije, iz katere je vzet vzorec, enak povprečju znane populacije in da je morebitna razlika naključna, $H_0 : \mu = \mu_0$

Enačba 7: Vzorčna porazdelitev razlik dveh povprečij

$$Z_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$$

Analiza z Wilcoxonovim testom predznačenih rangov

Test je neparametrična alternativa za test t pri analizi razlike med dvema skupinama parnih podatkov. Tudi pri njem obravnavamo samo razlike pri posameznem paru. Ničelna domneva trdi, da je mediana razlik v parih v celotni populaciji enaka nič. Če ničelna domneva drži, mora biti med parnimi meritvami približno enako pozitivnih in negativnih razlik.

4. REZULTATI

IZRAČUN REZULTATOV

ELISA

Koncentracije standardov:

Adrenalin

A = 0 nmol/L; B = 5,55 nmol/L; C = 21,83 nmol/L; D = 87,33 nmol/L; E = 349,312 nmol/L; F = 1397,28 nmol/L

Noradrenalin

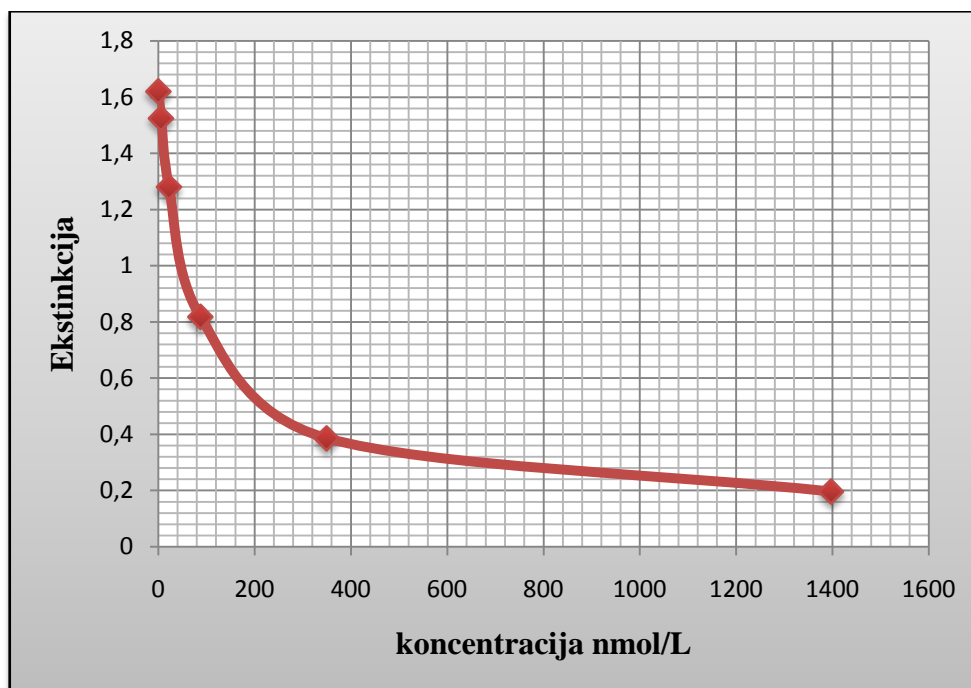
A = 0 nmol/L; B = 23,64 nmol/L; C = 94,58 nmol/L; D = 378,30 nmol/L; E = 1513,22 nmol/L; F = 6052,86 nmol/L

Izračunamo povprečne absorbance neznanih standardov in kontrol. Krivuljo narišemo tako, da vzdolž y-osi podamo vrednosti absorbance in vzdolž x-osi vrednosti koncentracije v nmol/L. Določimo koncentracijo kontrole in neznanko standardne krivulje .

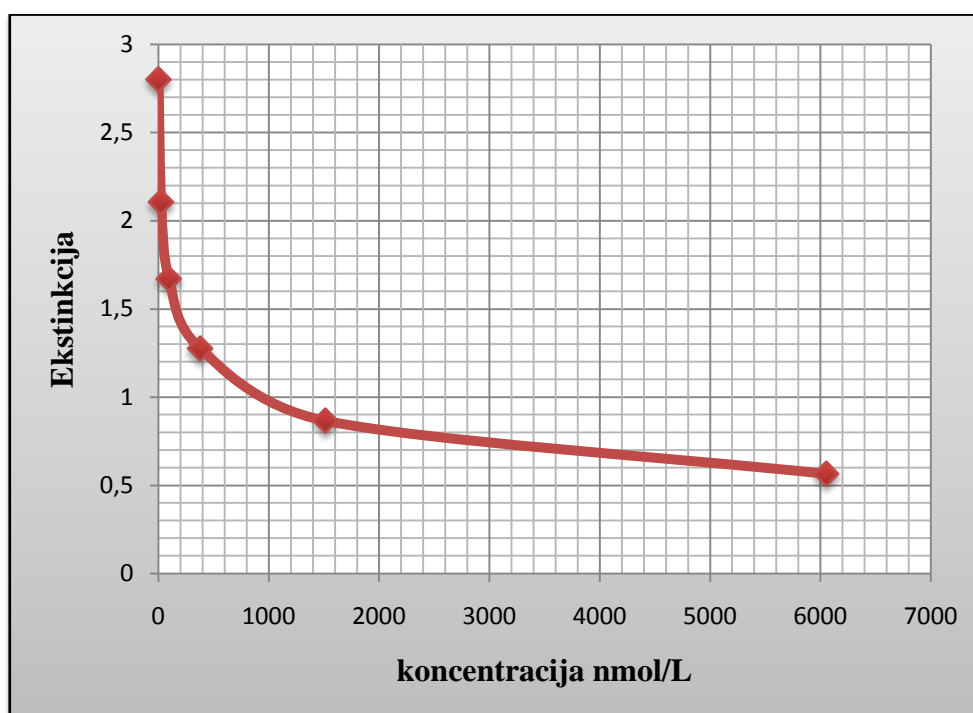
Koncentracijo vzorcev plazme moramo deliti s 30.

Kvantitativno določanje

Umeritveno krivuljo koncentracij adrenalina in noradrenalina v vzorcih dosežemo tako, da na y-os vnesemo vrednosti ekstinkcije 6 standardov in na x-os vrednosti ustreznih koncentracij v nmol/L.



Grafikon 1: Umeritvena krivulja za adrenalin (ELISA metoda)



Grafikon 2: Umeritvena krivulja za noradrenalin (ELISA metoda)

Ponovljivost (natančnost) metode

Referentne vrednosti za kontrolo:

ADRENALIN

K₁ (0,91 – 2,54) nmol/L

K₂ (2,91 – 8,73) nmol/L

n = 2

NORADRENALIN

K₁ (3,85 – 10,95) nmol/L

K₂ (11,8 – 35,4) nmol/L

	ADRENALIN	NORADRENALIN
ARITMETIČNA SREDINA	K ₁ = 2,09 K ₂ = 6,36	K ₁ = 9,21 K ₂ = 34,3
KOEFICIENT VARIACIJE (%)	K ₁ = 29,2 K ₂ = 0,89	K ₁ = 46,6 K ₂ = 35,0

RIA

Najprej izračunamo aritmetično sredino za vsako paralelno skupino vzorca (radioaktivnost epruvete merjene z gama števcem). Umeritvena krivulja predstavlja razmerje med cpm vrednostmi izmerjenimi v vsaki epruveti s standardi (B) in cpm vrednostmi ničelnega standarda (B₀).

S pomočjo dobljene vrednosti izračunamo B/B₀ koeficient za vsak kalibrator in neznani vzorec s formulo :

Enačba 8: Izračun umeritvene krivulje

$$B/B_0 \% = \frac{CPM \left(\frac{\text{kalibrator}}{\text{vzorec}} \right) - CPM (NSB)}{CPM (B_0) - CPM (NSB)} \times 100$$

$$B_0/T\% = \frac{CPM (B_0) - CPM (NSB)}{CPM (T)} \times 100 \quad NSB/T\% = \frac{CPM (NSB)}{CPM (T)} \times 100$$

B - standard

B₀ - ničelni standard

NSB – non-specific binding (nespecifična vezava)

T – total activity (popolna vezava)

B₀/T% - razmerje med ničelnim standardom in popolno vezavo

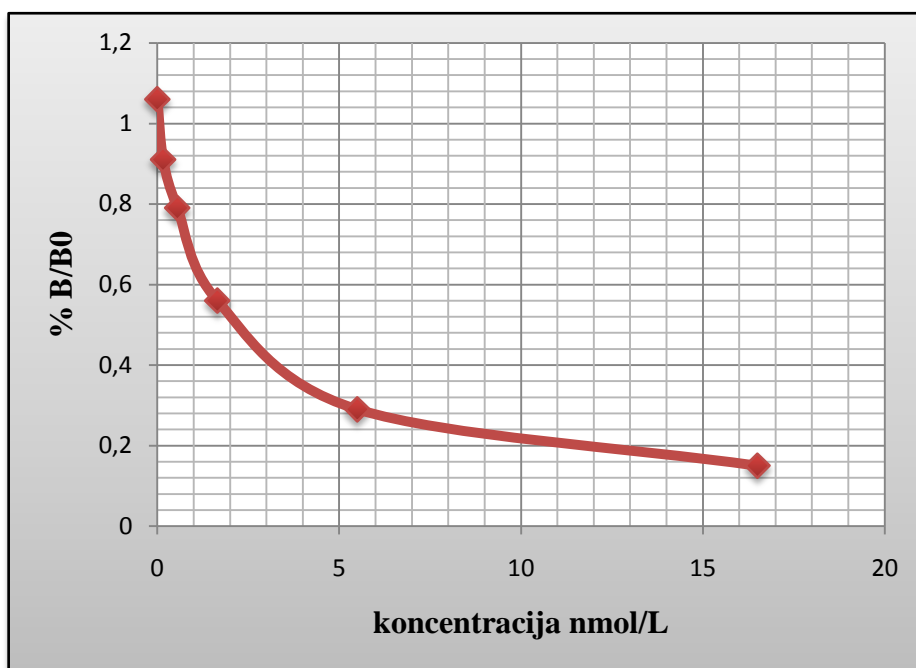
NSB/T% - razmerje med nespecifično in popolno vezavo

Izris umeritvene krivulje

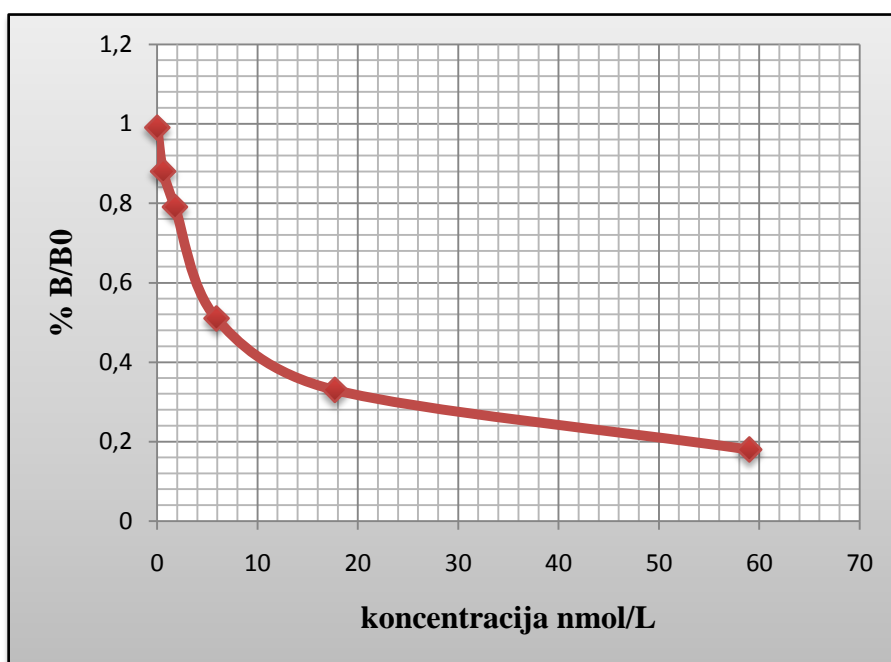
Vrišemo odziv vzorca v že znano umeritveno krivuljo. Le-to dobimo s predhodno izmerjenimi odzivi kalibratorjev z že znano koncentracijo T (vneseni na ordinatno os) ter standardnimi mejami različne koncentracije T (vneseni na abscisno os). Koncentracije vzorcev plazme beremo iz standardne krivulje. Vrednost koncentracije, ki je bila dobljena iz redčenega vzorca, moramo pomnožiti s faktorjem redčenja.

Referentne vrednosti

	ADRENALIN	NORADRENALIN
PLAZMA	0,0015–16,37 nmol/L	0,1418–59,11 nmol/L



Grafikon 3: Umeritvena krivulja za adrenalin (RIA metoda)



Grafikon 4: Umeritvena krivulja za noradrenalin (RIA metoda)

Ponovljivost (natančnost) metode

Referentne vrednosti za kontrolo:

ADRENALIN

NORADRENALIN

K₁ (0,61 – 1,14) nmol/L

K₁ (2,12 – 3,19) nmol/L

K₂ (2,25 – 4,35) nmol/L

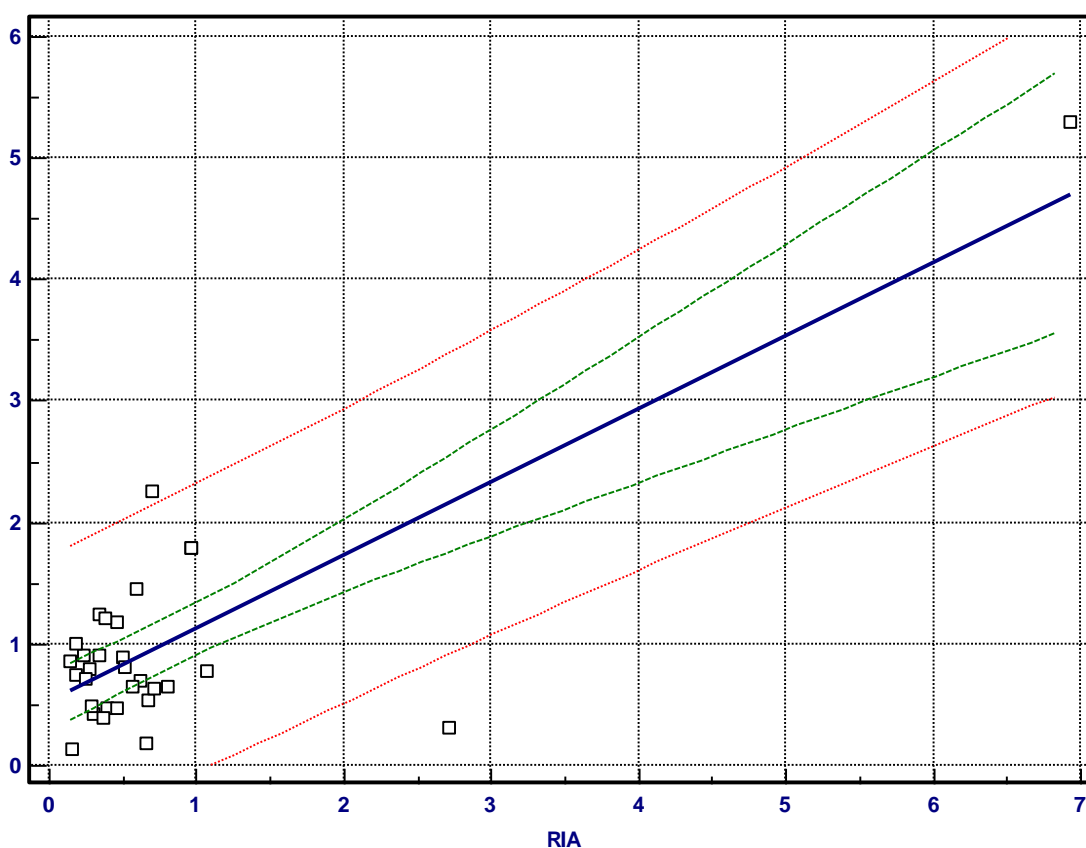
K₂ (5,55 – 10,7) nmol/L

n = 2

	ADRENALIN	NORADRENALIN
ARITMETIČNA SREDINA	K ₁ = 0,85	K ₁ = 2,45
KOEFICIENT VARIACIJE (%)	K ₂ = 2,90	K ₂ = 9,01
	K ₁ = 5,75	K ₁ = 7,18
	K ₂ = 11,2	K ₂ = 26,9

Tabela 5: Primerjava koncentracij med metodama za adrenalin.

PRIMERJAVA ADRENALIN VZORCI	ELISA nmol/L	RIA nmol/L
1.	0,74	0,19
2.	0,89	0,24
3.	0,41	0,31
4.	0,99	0,18
5.	1,44	0,60
6.	1,79	0,97
7.	0,85	0,14
8.	1,23	0,35
9.	0,78	0,28
10.	1,17	0,46
11.	1,20	0,38
12.	2,25	0,70
13.	0,89	0,35
14.	0,71	0,25
15.	0,69	0,62
16.	0,65	0,57
17.	0,46	0,40
18.	0,64	0,81
19.	0,78	1,08
20.	0,17	0,66
21.	0,39	0,37
22.	0,48	0,29
23.	0,88	0,51
24.	0,80	0,52
25.	1,79	0,97
26.	0,31	2,72
27.	0,52	0,68
28.	0,62	0,72
29.	0,13	0,30
30.	0,46	2,98
31.	5,30	6,94



Grafikon 5: Prikaz regresijske premice za adrenalin s 95% mejami odstopanja in napovedi

Število vseh preiskovancev: 31
 $Y = 0,52 (\pm 0,12) + 0,60 (\pm 0,08) X$
 $r = 87,5$

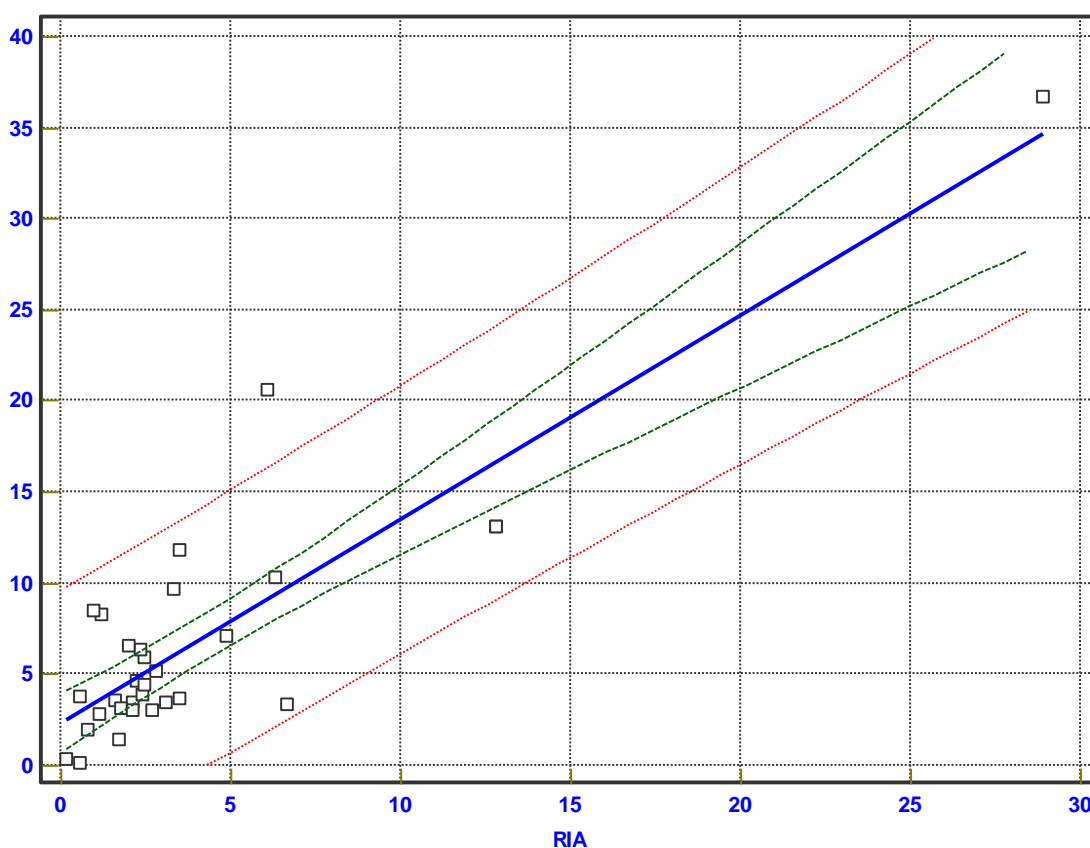
Tabela 6: Pregled rezultatov za adrenalin

	ARITMETIČNA SREDINA (s 95% mejami odstopanja)	MEDIANA (s 95% mejami odstopanja)	STANDARDNA DEVIACIJA	WILCOXONOV TEST
RIA	0,770 (0,31 – 1,22)	0,47 (0,34 – 0,66)	1,24	Z = -2,49 P = 0,01
ELISA	0,980 (0,64 – 1,33)	0,78 (0,60 – 0,92)	0,94	

$P < 0,001$

Tabela 7: Primerjava koncentracij med metodama za noradrenalin

PRIMERJAVA NORADRENALIN	ELISA nmol/L	RIA nmol/L
VZORCI		
1.	1,92	0,79
2.	3,44	2,10
3.	5,16	2,82
4.	9,61	3,32
5.	5,90	2,45
6.	13,0	12,8
7.	2,73	1,16
8.	3,79	0,57
9.	6,34	2,33
10.	3,31	6,69
11.	3,83	2,41
12.	4,59	2,23
13.	2,95	2,73
14.	1,43	1,74
15.	6,50	2,04
16.	11,7	3,53
17.	3,56	1,60
18.	4,36	2,46
19.	7,07	4,88
20.	3,39	3,08
21.	0,12	0,57
22.	20,5	6,07
23.	3,70	3,51
24.	10,2	6,34
25.	13,0	12,8
26.	8,23	1,18
27.	3,14	1,76
28.	8,51	0,98
29.	0,30	0,17
30.	2,98	2,14
31.	36,6	28,9



Grafikon 6: Prikaz regresijske premice za noradrenalin s 95% mejami odstopanja in napovedi

Število preiskovancev: 31

$$Y = 2,29 (\pm 0,78) + 1,12 (\pm 0,12) X$$

$r = 0,87$

Tabela 8: Pregled rezultatov za noradrenalin

	ARITMETIČNA SREDINA (s 95% mejami odstopanja)	MEDIANA (s 95% mejami odstopanja)	STANDARDNA DEVIACIJA	WILCOXONOV TEST
RIA	4,07 (2,05 – 6,09)	2,41 (1,76 – 3,36)	5,51	Z = - 4,17 P < 0,0001
ELISA	6,85 (4,26 – 9,44)	4,36 (3,38 – 7,30)	7,05	

P < 0,001

5. RAZPRAVA

Kateholamini so kemične spojine, derivati aminokislina tirozin. Vsebujejo kateholno in aaminsko skupino. Nekateri od njih so biogeni amini. Tvorba kateholaminov poteka prek tirozina, ki ga dobimo iz hrane, ali pa nastane v jetrih iz fenilalanina. Ključni encim je tirozin-hidroksilaza, katerega proizvod je dihidroksifenilalanin. Po delovanju dekarboksilaze dobimo dopamin, po učinkovanju dopamin-beta hidroksilaze pa noradrenalin. V sredici nadledvične žleze pa pod vplivom encima feniletanolamin-N-metiltransferaze iz noradrenalina nastaja adrenalin. Kateholamini so spravljeni v mešičkih v končičih simpatičnih postganglionarnih nevronov ali v sredici nadledvične žleze. Ob ustreznem dražljaju se sproščajo z eksocitozo. Signal za sprostitvev pride preko centralnega živčnega sistema, kot mediator služi acetilholin v preganglionarnih vlaknih.

Po sprostitvi je razgradnja kateholaminov hitra, večinoma že na mestu sprostitve. Glavni mehanizem je ponovni prehod v živčno celico, kjer sledi razgradnja z encimom monoaminooksidazo. Del kateholaminov se razgradi izven živčnega sistema, in sicer največ s pomočjo encima katehol-O-metiltransferaze. Le del kateholaminov prehaja v plazmo in se izloča z urinom, deloma konjugiran s sulfati.

Uravnavanje izločanja razdelimo v dve skupini: lokalno na nivoju sproščanja (kateholamini prek presinaptičnih receptorjev zaviralno vplivajo na lastno sproščanje) in centralno (dražljaji iz centralnega živčevja kot posledica integracije različnih vplivov prek sinaptičnega živčevja povzročajo sproščanje kateholaminov v efektornih organih).

Visoke ravni kateholaminov so povezane s stresom. Kateholamini posredujejo splošne fiziološke spremembe, ki telo pripravijo na fizično aktivnost (boj ali beg).

Adrenalin je hormon in živčni prenašalec, ki ga izloča nadledvična žleza, in posreduje pri pretvorbi glikogena v glukozo. Njegova glavna naloga je prilagajanje srčnega krvnega obtoka in metabolizma na stresne obremenitve. Adrenalin poveča med drugim pulz, srčni minutni volumen in krvni obtok. Skozi izločanje adrenalina nastajata sladkor in maščoba za povečano potrebo po energiji.

Noradrenalin je živčni prenašalec simpatičnega živčevja ter hormon, ki ga izloča sredica nadledvične žleze. Deluje zlasti na gladko mišičje žil dovodnic, kjer po vezavi na adrenergične receptorje povzroči njihovo skrčenje ter posledično porast krvnega tlaka. Sprošča se iz simpatičnih živčnih končičev. Vpliva tudi na osrednje živčevje in sicer na predele, odgovorne za zvečano pozornost in impulzivnost. Sprošča se zlasti v stresnih razmerah, zato spada med stresne hormone. Telo pripravi na »boj ali beg« (pospeši se srčni utrip, glikogenoliza, glukoneogeneza,...). V osrednjem živčevju se sprošča v predelu srednjih možganov.

Feokromocitom je tumor kromafinega nevroektodermalnega tkiva. Klinično se kaže s hipertenzivnimi epizodami ali stalno hipertenzijo, prekomernim potenjem, bledico, hujšanjem, tresenjem. Značilna je kombinacija hipertenzij, glavobola, palpitacij in potenja.

Nevroblastom je tumor otrok, večinoma mlajših od pet let. Lahko vznikne kjerkoli v simpatičnem živčnem sistemu. 75% nevroblastomov vznikne v abdomnu, polovica od teh v sredici nadledvične žleze. Za nevroblastom je značilna hitra rast in metastaziranje v vse organe. Pojav teh tumorjev je povezan s povečano produkcijo kateholaminov in njihovih presnovkov. Za nevroblastome je značilno povečano izločanje dopamina, noradrenalina, VMA in HVA.

V tem diplomskem delu smo preizkusili encimskoimunsko metodo (ELISA) za določanje kateholaminov v plazmi in jo primerjali z radioimunsko metodo (RIA). Dobili smo informacijo, ali lahko encimskoimunska metoda zamenja ročno izvedeno radioimunsko metodo. Razlog zamenjave metode je ta, da se pri RIA uporablja radioaktivni izotop ^{125}I , ki je zdravju škodljiv.

V analizo smo vzeli 31 vzorcev preiskovancev. Vsem smo izmerili koncentracijo kateholaminov v plazmi z obema metodama.

Odvzem vzorca mora biti pravilen. Bolnik je miroval v ležečem položaju vsaj 30 minut, saj se ob spremembi položaja (iz ležečega v pokončnega) lahko vrednost poveša 2–3 krat. 4 ure pred odvzemom bolnik ne sme jesti, piti kave ali čaja in kaditi. Kri je bila odvzeta s predhodno vstavitvijo katetra (venska punkcija poveča vrednosti). Upoštevati smo morali cirkadialni ritem. Plazma je bila odvzeta z EDTA ali heparinom. Prenos je bil na ledu in do analize je bila plazma zamrznjena.

Prva metoda, ki smo jo preizkušali, je metoda RIA, ročna metoda, pri kateri smo uporabili radioaktivni reagent ^{125}I . Pri tej metodi smo določili kateholamine kvantitativno v plazmi.

Princip RIA metode je v kompetitivnem odnosu med kateholamini v vzorcu preiskovanca in kateholamini označenimi z ^{125}I za prosta vezavna mesta na protitelesih. Protitelesa so pritrjena na steni epruvete. Po določenem inkubacijskem času in precipitaciji, smo presežek odsesali in s tem prekinili kompeticijo. Radioaktivnost smo izmerili z gama števcem.

Drugi aparat, s katerim so bile izvedene meritve, je analizator ADALTIS Personal Lab. Analizna oprema nudi material za kvantitativno merjenje kateholaminov v urinu in plazmi. Adrenalin, noradrenalin in dopamin so izločeni z uporabo cis-diol specifičnim gelom, potem aciliramo do N-aciladrenalina, N-acilnoradrenalina in N-acildopamina in po tej encimski spremembi med postopkom detekcije v N-acilmetanefrine, N-acilnormetanefrine, N-acil-3- metoksitromine.

Za encimsko-imunski test smo uporabili mikrotitrsko ploščico. Adrenalin in noradrenalin smo določili posamezno, saj so omejeni za vezanje na trdno fazo mikrotitrsko ploščice. Ko je bil sistem v ravnovesju, smo proste antigene in proste antigenske-antiserumske komplekse odstranili s spiranjem. Vezano protitelo na trdo fazo kateholaminov smo odkrili s kunčjimi anti-protitelesi IgG-peroksidazo, za konjugacijo smo uporabili TMB substrat. Reakcijo smo nadzorovali pri valovni dolžini 450 nm, ker je količina protiteles vezana na trdno fazo kateholaminov, obratno sorazmerna s koncentracijo kateholaminov v vzorcu.

Razlika med obema metodama je, da so pri radioimunski metodi protitelesa vezana na stene epruвет in prebitek nevezanih protiteles smo izsesali, pri encimskoimunski metodi pa je prebitek protiteles v isti reakcijski posodici.

Pri RIA metodi smo za izračun rezultatov potrebovali umeritveno krivuljo, ki smo jo pridobili s pomočjo kalibratorjev z različno vsebnostjo kateholaminov in izmerili radioaktivnost z gama števcem. S pomočjo ustreznega programa na računalniku se nam leta po merjenju izriše.

Umeritveno krivuljo računalnik pripravi po tem, ko določi: srednjo vrednost cpm za vsak par epruвет posebej (ker se izvaja v dvojnikih), srednjo vrednost cpm standardov (B) in jih deli s srednjo vrednostjo cpm največjega standarda (B_0), nato pa pomnoži s 100 ter poda razmerje $B/B_0\%$ (odstotek relativne vezave). Umeritveno krivuljo nariše računalnik tako, da na x-os nanaša koncentracije standardov, na y-os pa odstotke relativne vezave. Iz umeritvene krivulje smo lahko direktno brali koncentracije vzorcev.

Namen kontrole kakovosti je odkrivanje napak, obenem pa predstavlja del dobre laboratorijske prakse. Kontrolo kakovosti smo preverili s testi za občutljivost, natančnost, specifičnost in pravilnost. Kontrole smo testirali istočasno kot pacientove vzorce.

Specifičnost kaže sposobnost analitične metode, da v zmesi kemijsko podobnih zmesi izmeri samo koncentracijo preiskovanega analita. Vrednosti, ki so bile izmerjene z gama števcem, se bistveno razlikujejo od koncentracije izmerjene na analizatorju ADALATIS Personal Lab, različna specifičnost metod bi lahko bila eden od razlogov za to razliko.

Ponovljivost (natančnost) metode smo preverili z večkratnim merjenjem kontrole. Rezultati so pokazali, da je metoda RIA bolj natančna.

Variranje podatkov lahko povzroča več vrst dejavnikov: napake pri meritvah zaradi aparature, napake zaradi delovnih razmer v laboratoriju, napake zaradi netočnosti metode, zaradi nečistosti ali nestabilnosti reagentov, genetski dejavniki, starost, spol, prehrana, zdravstveno stanje ipd.

Povezanost metod smo ocenili s korelacijskim koeficientom (r), ki nam pove, kako regresijska premica povezuje posamezne točke.

V našem primeru je za 31 vzorcev, pri katerih smo določili koncentracijo kateholaminov z gama števcem in analizatorjem ADALITS Personal Lab, statistični izračun pokazal sledeče:

ADRENALIN: $r = 0,79$

NORADRENALIN: $r = 0,87$

Domnevo o razliki med povprečjema vzorca in populacije s testom z smo preverili z računanjem. Ker je verjetnost manjša kot stopnja tveganja, za katero smo se odločili, zavrnilo ničelno domnevo in sprejmemo osnovno domnevo, ki trdi, da se vzorec značilno razlikuje od populacije. Tako lahko z manj kot 0,1% tveganjem zavrnilo ničelno domnevo in sprejmemo osnovno domnevo, da se metodi med seboj značilno razlikujeta.

Ničelna domneva pri Wilcoxonovem testu trdi, da je mediana razlik pri parih v celotni populaciji enaka nič. V našem primeru to ne drži, saj bi moralo biti med parnimi meritvami približno enako pozitivnih in negativnih razlik. Ker je dobljena vrednost manjša od kritične, lahko ničelno domnevo zavrnilo in sprejmemo osnovno domnevo.

Tako smo v primeru adrenalina, kot tudi noradrenalina dobili z ELISA metodo značilno višji rezultat.

6. SKLEP

Za določanje koncentracije kateholaminov (adrenalin, noradrenalin) smo uporabili dve različni metodi. Želeli smo ugotoviti, ali lahko njune izmerjene vrednosti primerjamo med seboj.

Kateholamine smo določili z radioimunsko metodo in nato še z encimskoimunsko metodo. Želeli smo ugotoviti, ali lahko encimskoimunska metoda zamenja radioimunsko metodo, saj le-ta uporablja radioaktivni izotop.

Na podlagi dobljenih rezultatov, izmerjenih z vsako posamezno metodo, lahko zaključimo, da encimskoimunska metoda ne more zamenjati že dolgo vpeljana, preverjeno, zanesljivo radioimunsko metodo, saj le-ta daje veliko boljše rezultate, zaradi večje občutljivosti, specifičnosti, čeprav je rokovanje s slednjo toliko slabše za zdravje laboratorijskega delavca.

7. VIRI

7.1. Literatura

1. Kocijančič A: Endokrinologija, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1987: 8-20, 201-235
2. Štraus B: Medicinska biokemija, Jumena, Zagreb, 1988: 634-645
3. Bhagavan N V: Medical biochemistry, 4th Edition, Harcourt/Academic Press, San Diego, 2002: 722-767
4. Vozelj M: Temelji imunologije, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2000: 47-62, 75-85, 111-114
5. http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenal_gland
6. Vozelj M: Imunologija enciklopedijski priročnik, Ministrstvo za znanost in tehnologijo ter Medicinska fakulteta v Ljubljani, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1996: 28-29, 83, 300-301
7. http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenal_medulla
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Epinephrine>
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Norepinephrine>
10. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pheochromocytoma>
11. <http://en.wikipedia.org/wiki/Neuroblastoma>
12. Laurence D R: Klinička farmakologija, Jumena, Zagreb, 1990: 491-492
13. Furlan D: Vzorci-od bolnika do laboratorija, Splošna bolnišnica Novo mesto, Novo mesto, 2006: 3-19
14. Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Adrenaline, Noradrenaline and Dopamine in plasma and urine, Germany
15. Radio immunoassay for the in-vitro-diagnostic quantitative determination of Noradrenalin and adrenalin in human plasma and urine, Germany
16. Beckett G, Walker S, Rae P, Ashby P: Clinical Biochemistry, 7th Edition, Blackwell Publishing, USA, 2005: 221-240
17. Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L: Biochemistry, 5th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2002: 101-102
18. Goldsby R A, Kindt T J, Osborne B A, Kuby J : Immunology, New York, 2002: 76-151
19. <http://www.gmi-inc.com/BioTechLab/Wallac%20Wizard%201470%20gamma%20counter.htm>
20. <http://www.adaltis.com/content/product/instruments/personalLAB/default.aspx>
21. Adamič Š: Temelji biostatistike, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani- Inštitut za biomedicinsko informatiko, Partizanska knjiga, TOZD, Ljubljana, 1980: 10-37, 48-52, 59- 64, 78-80, 88-89, 114-125
22. Šeliga R, Šifrer F: Statistika in verjetnost, Moderna organizacija v sestavi FOV Kranj, Kranj, 1992: 34-38, 46-56, 92-110
23. Berkow R, Beers M H, Fletcher A J: Veliki zdravstveni priročnik, Mladinska knjiga, 2000: 694-695, 712-715
24. Burkhardt D: Laboratorijski izvidi, Mavrica, d.o.o., Celje, 1998: 133-141
25. Pocajt M, Širca A: Anatomija in fiziologija za medicinske šole, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1997: 264

26. Pretnar J, Glonar L: Hematologija, Srednja šola za farmacijo in zdravstvo, Ljubljana, 1989: 3-6, 108-112
27. Stušek P: Biologija človeka, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 2001: 43-59

7.2. Viri slik

Slika 4: http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/images/illu_adrenal_gland.jpg

Slika 5: http://en.wikipedia.org/wiki/Adrenal_cortex

Slika 11: <http://www.gmi-inc.com/BioTechLab/Wallac%20Wizard%201470%20gamma%20counter.htm>