

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
VSŠ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

VESNA GAŠPER

DOLOČEVANJE KATEHOLAMINOV V URINU
S TEHNIKAMA HPLC IN ELISA

DETERMINATION OF URINE CATECHOLAMINES
BY TECHNIQUES HPLC AND ELISA

DIPLOMSKA NALOGA

GRADUATION THESIS

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega študija laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Hormonskem laboratoriju in Laboratoriju za diagnostiko specialnih tekočin v Ljubljani na Japljevi ulici 2, ter v Urinskem laboratoriju na Polikliniki v Ljubljani, Njogoševa cesta 4, pod mentorstvom doc. dr. Milana Skitka, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom pred. dr. Aleša Jerina, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

IZJAVA

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

Vesna Gašper

Predsednica diplomske komisije:izr. prof. dr. Janja Marc

Mentor: doc. dr. Milan Skitek

Somentor: pred. dr. Aleš Jerin

Članica diplomske komisije: doc. dr. Anamarija Zega

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Milanu Skitku, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorju pred. dr. Alešu Jerinu, univ. dipl. kem., spec. med. biokem. za usmerjanje in pomoč pri nastajanju diplomskega dela. Prav tako sodelavcem v Hormonskem laboratoriju in Laboratoriju za diagnostiko specialnih tekočin v Ljubljani na Japljevi ulici 2, za pomoč pri praktični izvedbi diplomske naloge.

Zahvalo namenjam tudi vodji diagnostičnega laboratorija Adria lab, mag. Mojci Bilač Krašnja, spec. med. biokem. in celotnemu kolektivu za izkušnje ter znanje, vso izkazano podporo in življenjske nasvete.

Zahvaljujem se tudi vsem domačim za vzpodbudo, optimistične in kritične nasvete, besede ter dejanja v preteklih letih.

KAZALO

1. POVZETEK	1
2. UVOD	2
2.1 ZNAČILNOSTI KATEHOLAMINOV.....	3
2.2 HORMONSKO DELOVANJE.....	3
2.3 DELITEV RECEPTORJEV.....	4
2.4 ALFA IN BETA RECEPTORJI.....	4
2.4.1 Podvrste beta receptorjev.....	5
2.5 OPIS NADLEDVIČNE ZLEZE.....	5
2.5.1 Steroidni hormoni.....	6
2.5.2 Peptidni hormoni.....	7
2.6 ORGANI ENDOKRINEGA SISTEMA.....	7
2.7 BOLEZNI ODPOROČNIH VREDNOSTI KATEHOLAMINOV.....	7
2.7.1 Feokromocitom.....	8
2.7.2 Nevroblastom.....	8
2.7.3 Shizofrenija.....	9
2.8 ZNAČILNOSTI ADRENALINA.....	9
2.9 ZNAČILNOSTI NORADRENALINA.....	10
2.10 ZNAČILNOSTI DOPAMINA.....	11
2.11 BIOSINTEZA KATEHOLAMINOV.....	12
2.12 RAZGRADNJA KATEHOLAMINOV.....	13
2.13 BIOLOŠKI VZORCI.....	15
2.13.1 Plazma.....	15
2.13.2 Urin.....	16
3. DOLOČANJE KATEHOLAMINOV	17
3.1 ENCIMSKO IMUNSKI TEST ELISA.....	17
3.1.1 Določanje protiteles.....	18
3.1.2 Določanje antigenov.....	19
3.1.3 Kompetitivni način določanja antigenov.....	20
3.2 TEKMOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI.....	21
3.2.1 Tipi tekočinske kromatografije.....	21
3.2.2 Ločevanje komponent.....	23
3.2.3 Princip testa.....	24
3.2.4 Postopek testa.....	25
3.3 SESTAVNI DELI HPLC SISTEMOV.....	25
3.3.1 Črpalke.....	26
3.3.2 Injektor.....	26
3.3.3 Kolone in polnila.....	27
3.3.4 Detektorji.....	28
3.3.5 Instrumentalna oprema.....	29
4. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	31
5. MATERIALI IN METODE	32
5.1 VZORČENJE IN SHRANJEVANJE KLINIČNIH MATERIALOV.....	32
5.2 OPREMA IN REAGENTI ZA ELISA TEST.....	32
5.2.1 Priprava reagentov za ELISA test.....	34
5.3 IZVEDBA ELISA TESTA.....	36
5.3.1 Postopek ekstrakcije in acilacije za ELISA test.....	36
5.3.2 Postopek določanja adrenalina z ELISA.....	37
5.3.3 Postopek določanja noradrenalina z ELISA.....	38
5.4 OPREMA IN REAGENTI ZA HPLC.....	39
5.4.1 Kalibracija aparature HPLC.....	40
5.4.2 Priprava kontrol za HPLC.....	40
5.4.3 Priprava vzorcev za HPLC.....	41
6. REZULTATI	43
6.1 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV.....	47

7. RAZPRAVA	52
8. SKLEP	57

KAZALO SLIK

SLIKA 1: PRIKAZ NAHAJANJA NADLEDVIČNE ŽLEZE	6
SLIKA 2: STRUKTURNA KEMIJSKA FORMULA ADRENALINA	9
SLIKA 3: STRUKTURNA KEMIJSKA FORMULA NORADRENALINA	10
SLIKA 4: STRUKTURNA KEMIJSKA FORMULA DOPAMINA	11
SLIKA 5: BIOSINTEZA KATEHOLAMINOV	13
SLIKA 6: RAZGRADNJA KATEHOLAMINOV	14
SLIKA 7: MIKROTITRSKA PLOŠČICA	18
SLIKA 8: SHEMA TESTA ELISA ZA DOLOČANJE PROTITELES	19
SLIKA 9: SHEMA TESTA ELISA ZA DOLOČANJE ANTIGENA	20
SLIKA 10: PRIKAZ REZULTATA DOLOČANJA KOMPONENT VZORCA.....	23
SLIKA 11: OSNOVNE ZNAČILNOSTI HPLC GRAFA	24
SLIKA 12: DETEKCIJA ADRENALINA IN NORADRENALINA S SHEMA OKSIDACIJE IN REDUKCIJE.....	25
SLIKA 13: SHEMATSKI PRIKAZ SESTAVE TER POTEK VZORCA V APARATURI HPLC	30
SLIKA 14: APARATURA PERSONAL LAB ZA IZVEDBO TESTA ELISA	32
SLIKA 15: HPLC SURVEYOR Z ELEKTROKEMIJSKIM DETEKTORJEM	39
SLIKA 16: GRAFIČNI PRIKAZ UJEMANJA REZULTATOV ADRENALINA	45
SLIKA 17: GRAFIČNI PRIKAZ UJEMANJA REZULTATOV NORADRENALINA	46
SLIKA 18: PASSING & BABLOK- REGRESIJA METODE HPLC IN ELISA ZA ADRENALIN	50
SLIKA 19: PASSING&BABLOK- REGRESIJA METODE HPLC IN ELISA ZA NORADRENALIN	50
SLIKA 20: BLAND & ALTMANOV PRIKAZ PRIMERJAVE DOLOČITVE NORADRENALINA.....	51
SLIKA 21: BLAND & ALTMANOV PRIKAZ PRIMERJAVE DOLOČITVE ADRENALINA	51

KAZALO TABEL

PREGLEDNICA 1: REFERENČNE VREDNOSTI ADRENALINA IN NORADRENALINA	16
PREGLEDNICA 2: STANDARDI ZA IZVEDBO TESTA ELISA	33
PREGLEDNICA 3: REAGENTI ZA EKSTRAKCIJO IN ACILIRANJE.....	34
PREGLEDNICA 4: SESTAVA KOMERCIALNIH REAGENTOV ZA TEST ELISA	35
PREGLEDNICA 5: SPECIFIKACIJE KALIBRATORJEV ZA METODO HPLC.....	40
PREGLEDNICA 6: VREDNOSTI NORMALNE KONTROLE I	41
PREGLEDNICA 7: VREDNOSTI PATOLOŠKE KONTROLE II	41
PREGLEDNICA 8: REZULTATI KONCENTRACIJE ADRENALINA	43
PREGLEDNICA 9: REZULTATI KONCENTRACIJE NORADRENALINA.....	44
PREGLEDNICA 10: DOLOČITEV MEDIANE V POSAMEZNIH MERITVAH NA POSAMEZNI APARATURI	47
PREGLEDNICA 11: SPEARMANOV KORELACIJSKI KOEFICIENT MED METODO HPLC IN ELISA	48

PREGLEDNICA 12: REZULTATI UPORABE WILCOXONOVEGA TESTA ZA ADRENALIN	48
PREGLEDNICA 13: REZULTATI UPORABE WILCOXONOVEGA TESTA ZA NORADRENALIN	49
PREGLEDNICA 14: ENAČBA PREMICE PASSING & BABLOK REGRESIJE.....	49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Razlaga
Ab	protitelo (angl.: Antibody)
AC	adenilat-ciklaza
Ag	srebro (angl.: Silver)
Amberlite® CG-50	šibko kislja kationska izmenjalna smola (angl.: Weekly Acidic Cation Exchange Resin Powder)
ATP	adenozin-trifosfat (angl.: Adenosine-triphosphate)
cAMP	ciklični adenzin monofosfat (angl.: Cyclic Adenosine Monophosphate)
Cl	klor (angl.: Chlorine)
COMT	katehol-O-metil transferaza (angl.: Catechol-O-methyl transferase)
CT	računalniška tomografija (angl.: Computed Tomography)
CŽS	centralno živčni sistem
DAG	diacilglicerol
DBH	dopamin-β-hidroksilaza (angl.: Dopamine-β-Hydroxylase)
DOPA	L-dihidroksi-fenilalanin (angl.: L-dihydroxy-Phenylalanine)
EDA	etilen diamine (angl.: Ethylenediamine)
ELISA	encimsko imunski test (angl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
GC	plinska kromatografija (angl.: Gas Chromatography)
GIT	gastrointestinalni trakt
HCl	klorovodikova kislina (angl.: Hydrochloric acid)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography)
HVA	homovanilijeva kislina (angl.: Homovanillic Acid)
IP3	inositol trifosfat
IR	infrardeči detektor (angl.: Infrared Detector)
M	molarnost ali molarna koncentracija
MAO	mono-amino-oksidaža (angl.: Monoamine oxidase)
MRI	magnetno resonančna preiskava (angl.: Magnetic resonance imaging)
PNMT	feniletanolamin-N-metiltransferaza (angl.: Phenylethanolamine-N-Methyltransferase)
REM	hitro premikajoče oči (angl.: Rapid Eye Movement)
RTG	rentgen
TH	tirozin-hidroksilaza (angl.: Tyrosine-Hydroxylase)
TMB	raztopina tetra
UZ	ultrazvok
VMA	vanilin mandljeva kislina (angl.: Vanillylmandelic acid)

1. POVZETEK

Kateholamini, kot s skupnim imenom imenujemo adrenalin (epinefrin), noradrenalin (norepinefrin) in dopamin, imajo v človeškem organizmu pomembno vlogo, kot živčni prenašalci in hormoni. Sintetizirajo se iz aminokislina L-tirozin. Nastajajo v kromatofinih celicah sredice nadledvične žleze, centralno živčnem sistemu in neuronih simpatikusa. Sprostitev kateholaminov povzroči živčni impulz kot je strah, jeza, stres. Visoke ravni kateholaminov v krvi so povezane s stresom, ki nam v današnjem ritmu življenja predstavlja velikega sovražnika za naše zdravje. Kateholamini delujejo s pomočjo vezave na alfa in beta adrenoreceptorje, ki se nahajajo v membrani tarčnih celic npr. gladkih mišic v žilni steni, miokardu, bronhijih. Vplivajo na koncentracijo glukoze v krvi, pospešujejo glikogenolizo in lipolizo. Delujejo hitro in v zelo nizkih koncentracijah dosežejo močne učinke. Adrenalin, noradrenalin in dopamin imajo podobno kemijsko strukturo in so derivati dihidroksibenzena (katehola). Glede na lastnosti spadajo po kemijski strukturi med peptidne, po načinu delovanja pa med efektorne hormone. Določanje kateholaminov v praksi poteka z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) in sicer v plazmi ali v naključnem oziroma zbranem 24-urnem urinu.

Namen diplomske naloge je ugotoviti primerljivost določanja koncentracije kateholaminov v urinu z encimsko imunsko tehniko ELISA, v primerjavi s tehniko HPLC za določevanje kateholaminov v urinu. V primeru dobro primerljivih rezultatov med omenjenima metodama, bi dražjo HPLC metodo zamenjali s cenejšo ELISA tehniko. Po navodilih in protokolu smo zbirali urinske vzorce. Analizirali smo 30 vzorcev v dveh serijah po 15 in določili koncentracijo adrenalina in noradrenalina z metodo HPLC in ELISA. Rezultate smo analitično in statistično obdelali ter prikazali tudi grafično ujemanje pridobljenih vrednosti z ELISA in HPLC tehniko. Po statistični obdelavi in pregledu rezultatov smo ugotovili nenormalno porazdeljene vrednosti, zato smo uporabili neparametrične statistične teste. Ker smo primerjali dve metodi smo med drugimi uporabili tudi Blant & Altmanov test s katerim smo ugotovili sipanje rezultatov noradrenalina in adrenalina. Srednja vrednost razporeditve rezultatov pri noradrenalina znaša $72.2 \pm 43\%$, pri adrenalina pa $96 \pm 89\%$. Po končanih meritvah in statistični obdelavi smo prišli do rezultata, ki nakazuje slabše ujemanje rezultatov dobljenih z ELISA testom v primerjavi s HPLC tehniko.

2. UVOD

Adrenalin (angl.: epinefrine) in noradrenalin (angl.: norepinefrine) skupaj z dopaminom tvorijo skupino kateholaminov, ki imajo pomembno vlogo živčnih prenašalcev in hormonov. Kateholamini sodelujejo pri mnogih procesih v človeškem organizmu. Posredujejo splošne fiziološke spremembe, ki telo pripravijo na fizično aktivnost (odziv za boj ali beg). Zvišujejo utrip srca, povečujejo minutni volumen srca, zvišujejo krvni tlak, usmerjajo kri k mišicam, povečujejo razgradnjo in zmanjšujejo sintezo glikogena. Povečujejo tudi glukoneogenezo, ki poteka v jetrih v manjši meri tudi v ledvicah. Visoke ravni kateholaminov v krvi so povezane s stresom, ki je kot naš najboljši prijatelj pomagal preživeti ljudem skozi tisočletja in je v današnjem sodobnem svetu postal razlog za številne bolezni. Kadar naše sposobnosti niso v popolnem ravnovesju z zahtevami iz okolja, se sproži stresna reakcija, ki privede organizem v stanje najvišje pripravljenosti kar povzroči odstopajoče ravni kateholaminov. Dlje časa trajajoče patološke vrednosti kateholaminov nakazujejo na resna obolenja kot so: feokromocitom, shizofrenija, nevroblastom, manične depresivne bolezni. Kateholamini so torej pomemben pokazatelj dogajanja v telesu in kot taki pomembni pri klinični diagnostiki. Telesni tekočini primerni za določevanje sta plazma z dodatkom EDTA in urin (naključni in 24-urni).

Pri svojem že dvoletnem delu v diagnostičnem laboratoriju lahko na podlagi izkušenj in prakse zatrdim pomembnost pravilno odvzetega kliničnega materiala, pravilno pipetiranje vzorcev, saj predanalitske napake vplivajo na rezultat. Zato smo se pri zbiranju vzorcev za izvedbo naloge držali priporočenih navodil za zbiranje in shranjevanje kliničnega materiala. V rutini se za določevanje kateholaminov uporablja večinoma HPLC tehnika, ki jo odlikujejo hitrost, občutljivost, velika ločljivost. Ker pa se pri HPLC tehniki pojavlja tudi ekonomsko vprašanje nas je zanimalo kakšno analitično vrednost ima dosti cenejša encimsko imunska metoda ELISA v primeru določevanja kateholaminov v urinu. V diplomski nalogi smo si zadali cilj ugotoviti primerjavo dobljenih rezultatov analitov določenih z metodo ELISA in HPLC. Naloge smo se lotili s predpostavko, da bi v primeru ujemajočih rezultatov, HPLC tehniko določanja kateholaminov zamenjali s cenejšo ELISA tehniko.

2.1 ZNAČILNOSTI KATEHOLAMINOV

Kateholamini so snovi, ki vsebujejo benzenski obroč in delujejo na adrenoreceptorje. Sintetizirajo se iz amino kisline L-tirozin, ki se pretvori v DOPO (dihidroksifenilalanin), ki se naprej pretvori v dopamin, iz njega nastane noradrenalin, iz tega pa adrenalin. Izločajo se v plazmo vendar pa imajo tu kratko življenjsko dobo, saj je njihov razpolovni čas le okoli 1 do 2 minuti nato se izločijo naprej v jetra in ledvica.

Pomembna hormona, ki zavirata delovanje kateholaminov v krvnem obtoku sta mono-amino oksidaza (MAO) in katehol-O-metil transferaza (COMT). Produkt delovanja teh dveh encimskih sistemov je nastanek metanefrina iz adrenalina in nastanek normetanefrina iz noradrenalina. Oba produkta se lahko konjugirata s sulfatom ali glukoronidom in izločita z urinom iz telesa. Končna metabolna razgradnja metanefrina in normetanefrina je vanilin mandljeva kislina (VMA). Dopamin deluje kot nevrohormon tudi na celice adenohipofize, kjer zmanjšuje izločanje prolaktina. Obratno steroidi vplivajo na funkcijo kateholaminov v CZS (centralno živčnem sistemu) prek delovanja na sintezo, razgradnjo, sproščanje in aktivacijo njihovih receptorjev. Estrogeni pa zvišujejo nivo kateholaminov v CZS in s tem morda delujejo zaščitno v preprečevanju psihičnih motenj. Kateholamini spadajo po svoji strukturi med peptidne hormone, ki se naprej delijo na derivate aminokislin, po delovanju pa med efektorne hormone.

2.2 HORMONSKO DELOVANJE

Hormon je snov, ki jo endokrini 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.

Hormoni se vežejo na receptorje, ki so na površini ali v notranjosti celice, nadzorujejo telesno rast in razvoj, reprodukcijo in spolne lastnosti, vplivajo na koncentracijo soli in glukoze v krvi (18). Ker posredujejo izrazito močno delovanje izkazujejo učinek že pri zelo nizkih koncentracijah. V nasprotju z zelo hitrim prenosom informacij po živčnih celicah, lahko signal preko hormonov potuje več sekund ali celo ur, preden doseže po krvi ciljno mesto. Da pa lahko hormon v neki celici povzroči določeno spremembo, mora le-ta posedovati ustrezne receptorje. Večina hormonov deluje preko sekundarnih obveščevalcev.

2.3 DELITEV RECEPTORJEV

Receptor je kemična skupina na makromolekuli ali celici, ki se selektivno veže z različno stopnjo specifičnosti s komplementarno molekulo ali celico (na primer encimski receptor za substrat, celični receptorji za hormone) (3).

Receptorje delimo na tri pomembne kategorije:

- beljakovine na površini celične membrane (govorimo o perifernih membranskih receptorjih),
- beljakovine, ki celično membrano prebadajo (transmembranski receptorji),
 - metabotropni receptorji, ki so na notranjosti celice sklopljeni s proteinom G ali z encimom tirozin-kinazo,
 - ionotropni receptorji, ki so neposredno povezani z ionskim kanalčkom,
- znotrajcelične beljakovine, kot na primer receptorji za steroidne hormone-ti receptorji lahko po navadi prehajajo membrano celičnega jedra ter delujejo na izražanje genov in na ta način izzovejo biološki odgovor.

Aktivacija kateholaminskih hormonov poteka preko adrenergičnih ali adrenoreceptorjev, ki so sklopljeni s proteinom G (5,6).

2.4 ALFA IN BETA RECEPTORJI

Poznamo dve vrsti alfa in dve vrsti beta receptorjev. Te receptorje najdemo po telesu v večini tkiv. Nekatera tkiva imajo oba tipa receptorjev druga samo en tip. Adrenalin in noradrenalin pa se vežeta na ta dva tipa receptorjev. Zanje je značilno, da so sklopljeni z G-proteinom.

Razdelitev in opis alfa in beta receptorjev:

- **Alfa1-receptorji:** aktivirajo fosfolipazo C, ta sproži nastanek IP₃ in DAG, ki delujeta kot sekundarna obveščevalca in zvišujeta intracelularno koncentracijo Ca²⁺ ionov. S tem je sprožena vazokonstrikcija gladkih mišic, relaksacija globokih mišic GIT, sekrecija žlez slinavk in povečana jetrna glikogenoliza,
- **Alfa2-receptorji:** inhibirajo adenilatno ciklazo in tako vplivajo na padec koncentracije cAMP (ciklični adenozin monofosfat) v celici. S tem je inhibirano izločanje nevrottransmitterjev, sprožena kontrakcija vaskularnih gladkih mišic in

relaksacija gladkih mišic v GIT, inhibirajo izločanje inzulina in pospešijo agregacijo trombocitov,

- **Beta-receptorji:** stimulirajo adenilatno ciklazo in tako zvišajo koncentracijo cAMP v celici, v možganih se nahajajo predvsem na postsinaptičnih nevronskih membranah.

2.4.1 Podvrste beta receptorjev

Poznamo več podvrst beta receptorjev:

- **beta1:** najdemo jih pretežno v srcu, kjer delujejo pozitivno inotropno in kronotropno,
- **beta2:** povzročajo bronho- in vazodilatacijo, relaksacijo visceralnih gladkih mišic (tudi GIT), mišični tremor, in jetrno glikogenolizo, rahlo povečajo izločanje adrenergičnih nevrotransmiterjev, inhibirajo izločanje histamina iz mastocitov,
- **beta 3:** nahajajo se samo v maščevju, kjer regulirajo energijski metabolizem (29).

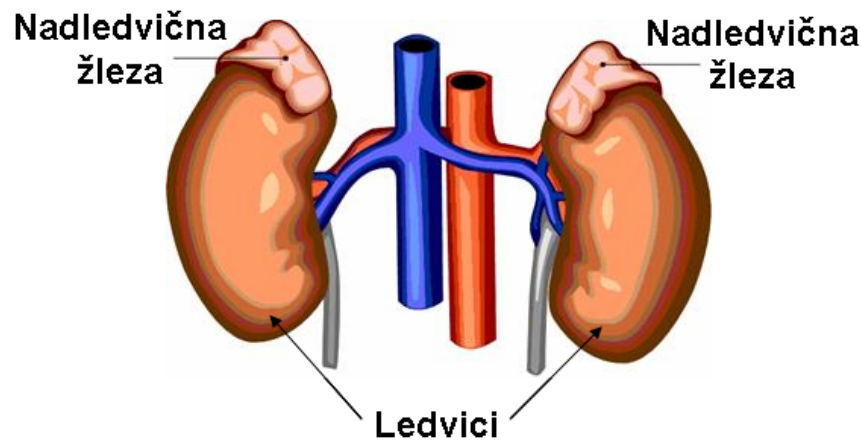
2.5 OPIS NADLEDVIČNE ŽLEZE

Nadledvični žlezi, tudi suprarenalni (lat.: *glandula suprarenalis*), sta parni endokrini žlezi, ki se nahajata nad ledvicami (slika 1). Nadledvični žlezi sta glavni organ, ki skrbi za odgovor telesa na stres preko izločanja kortikosteroidov in kateholaminov vključno s kortizolom. Sestavljeni sta iz dveh delov vsaka pa proizvaja svoje hormone. Zunanji del se imenuje skorja ali korteks (angl.: Cortex) sestavljena iz lipidne ovojnice in proizvaja steroidne hormone. Notranji del je sredica (angl.: Medulla) in proizvaja adrenalin in noradrenalin. Nadledvični žlezi se med seboj razlikujeta po histološki zgradbi in po funkciji. Celice sredice nadledvičnih žlez so po zgradbi in funkciji podobne živčnim celicam simpatičnega živčnega sistema (8,5).

Skorja nadledvičnih žlez izloča specifične hormone glede na tip žleznih celic (plasti):

- klobučasta plast (lat.: *glomerulosa*), celice so cilindrične ali piramidalne, izločajo mineralokortikoide (aldosteron),
- režnjasta, tudi snopičasta plast (lat.: *fasciculata*), je srednja plast, celice so poliedrične oblike, urejajo se v snopiče izločajo (glukokortikoide, kortizol, kortikosteron in spolne hormone),

- mrežasta plast (lat.: *reticularis*) je najbolj notranja plast, leži ob sredici žlez, celice so manjše, mrežasto razporejene izloča (glukokortikoide, kortizol, kortikosteron in spolne hormone) (9).



Slika 1: Prikaz nahajanja nadledvične žleze

2.5.1 Steroidni hormoni

Izhodna spojina za sintezo steroidnih hormonov je holesterol. Biosinteza poteka v skorji nadledvične žleze, spolnih žlezah in placenti, prav tako tudi v nekaterih neklasičnih endokrinih tkivih kot so možgani. Steroidni hormoni prehajajo skozi membrano iz celice in se v krvi vežejo na proteinske prenašalce (specifične prenašalce ali albumin). Delujejo na tarčne celice (tiste, ki imajo receptorje za steroidne hormone). Iz organizma se izločajo z urinom kot glukoronidi ali sulfati (28). Kortikosteroidi so vpleteni v fiziološke mehanizme, kot so odziv na stres, imunski odziv in uravnavanje vnetja, presnove ogljikovih hidratov in beljakovin in uravnavanje elektrolitov v krvi .

V skupino steroidnih hormonov spadajo:

- **glukokortikoidi** (kortizol) uravnavajo presnovo ogljikovih hidratov, lipidov in beljakovin ter z zaviranjem sproščanja fosfolipidov ter dejavnosti eozinofilcev, delujejo protivnetno,
- **mineralokortikoidi** (aldosteron) nadzirajo raven vode in elektrolitov tako, da spodbujajo reabsorbcijo natrija v ledvicah,
- **spolni hormoni** (estradiol, testosteron).

Na osnovi kortikosteroidov so narejena nekatera zdravila za zdravljenje raka in večina protivnetnih zdravil za zdravljenje astme.

2.5.2 Peptidni hormoni

Delujejo tako, da se vežejo na membrano celice, s čimer povzročijo spremembo položaja G-proteina, kar aktivira znotrajcelični protein AC (adenilat-ciklaza). Encim AC pa omogoča sintezo cAMP, ta pa nato omogoča aktivacijo različnih adenin-kinaz. Peptidne hormone proizvajata hipotalamus in hipofiza. So vodotopni in ne prehajajo preko celične membrane. Skladiščijo se v veziklih zato imajo hiter učinek, ki je močan in kratkotrajen saj je njihova razpolovna doba kratka. Peptidni hormoni ne potrebujejo prenašalca.

2.6 ORGANI ENDOKRINEGA SISTEMA

Najpomembnejši organi endokrinega sistema so hipotalamus, hipofiza, ščitnica, obščitnice, otočki v trebušni slinavki, nadledvični žlezi, modi (testisi) in jajčnika (ovarija). Med nosečnostjo deluje kot endokrini organ tudi posteljica. Hipotalamus sprošča številne hormone, ki spodbujajo ali zavirajo sproščanje hipofiznih hormonov. Nekateri hipofizni hormoni delujejo neposredno na ciljne organe, drugi pa posredno. Nekateri endokrine žleze niso pod nadzorom hipofize in se posredno ali neposredno odzivajo na raven določenih snovi v krvi:

- celice trebušne slinavke izločajo insulin glede na raven glukoze in maščobnih kislin,
- celice obščitnice se odzivajo na raven kalcija in fostata v krvi,
- sredico nadledvičnih žlez k delovanju neposredno spodbuja parasimpatično živčevje.

2.7 BOLEZNI Odstopajočih vrednosti kateholaminov

Če hipofiza ali hipotalamus ne izločata dovolj hormonov, lahko tudi nadledvični žlezi prenehata delovati. Zaradi zmanjšane ali pretiranega izločanja hormonov nadledvične žleze lahko pride do resnega obolenja. Visoke ravni kateholaminov v krvi so povezane s stresom. Kateholamini posredujejo splošne fiziološke spremembe, ki telo pripravijo na fizično aktivnost (odziv za boj ali beg). Nekateri značilni učinki so zvečana hitrost bitja srca, zvišan krvni tlak pride do sprememb v intermedianem metabolizmu ogljikovih hidratov in lipidov. Stimulacija nadledvične žleze poveča vrednost glukoze in encimov

skeletne miškulature. Kateholamini so pomembni pri prebujanju (noradrenalin sodeluje pri fazi spanja s hitro premikajočimi očmi REM). Bolezni, ki jih povzročajo odstopajoče vrednosti kateholaminov so:

- feokromocitom,
- shizofrenija,
- nevroblastom,
- degenerativne srčne bolezni,
- manične – depresivne motnje.

2.7.1 Feokromocitom

Feokromocitom je tumor kromafinih celic nadledvičnih žlez, ki izločajo čezmerne količine kateholaminov. Feokromocitomi so zelo majhni in jih zdravnik tudi ne otipa, kljub temu pa izločajo dovolj kateholaminov, da sprožijo številne težave. Klinično se kaže s hipertenzivnimi epizodami ali stalno hipertenzijo, ortostatsko hipotenzijo, prekomernim potenjem, bledico, hujšanjem, tresenjem. Značilna je kombinacija hipertenzije, glavobola, palpitacij in potenja (23). V psihičnem statusu izstopa anksioznost (24). Diferencialno diagnostično so na prvem mestu panične atake, čeprav bolniki s feokromocitom le redko povsem ustrezajo kriterijem za panično motnjo. Podobne so lahko tudi klimakteričnim težavam, še posebej, če jih spremlja porast tlaka. Napadi epilepsije z žariščem v diencefalonu so izjemna redkost.

Feokromocitom dokažemo s pomočjo merjenja kateholaminov v urinu lahko tudi v serumu. Pri lokalizaciji si pomagamo z ultrazvokom (UZ) in računalniško tomografijo (CT). Zdravljenje je kirurško potrebna je nekaj tedenska predoperativna priprava (24).

2.7.2 Nevroblastom

Nevroblastom je pogost tumor v otroštvu. Ti tumorji izvirajo iz nezrelih celic nevrnalne cevi v simpatičnem živčnem sistemu, ki teče vzdolž hrbtenice. Te tumorje zato najdemo kjerkoli vzdolž te verige, toda najpogosteje v bližini nadledvične žleze ter v prsni votlini. Vsako leto v Veliki Britaniji postavijo to diagnozo približno 100 otrokom. Vsako leto zbolijo za nevroblastomom eden na 100.000 otrok v ZDA. Večina jih je mlajših od 5 let. Nekateri otroci se z nevroblastomom že rodijo, vendar se znaki bolezni pokažejo šele kasneje, redke primere pa odkrije ultrazvok že v maternici. Sam vzrok nastanka nevroblastoma ni znan.

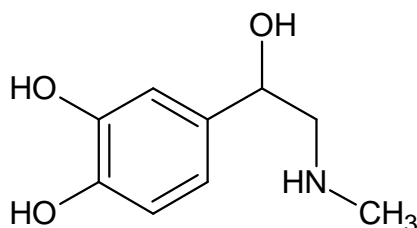
Nevroblastom predstavlja 7 do 10% vseh rakov otroštva ter 50% vseh malignih bolezni, ki se pojavljajo pri dojenčkih in mlajših otrocih. Dečki zbolijo nekoliko pogosteje kot deklice. Iz neznanega razloga imajo dojenčki z nevroblastomom veliko večjo možnost ozdravitve kot starejši otroci. Pri postavljanju diagnoze se uporabljajo preiskave kot so: UZ, rentgen (RTG), CT, MRI, pregled kostnega mozga in krvne preiskave (18).

2.7.3 Shizofrenija

Shizofrenija je resna duševna motnja, za katero so značilni izguba stika z resničnostjo (psihoza), halucinacije, blodnje (zmotna prepričanja), izkrivljeno mišljenje in slabšanje delovnega in družbenega funkcioniranja. Shizofrenija je po vsem svetu velik zdravstveni problem, saj jo ima le malo manj kot 1% ljudi. Je bolj razširjena od Alzheimerjeve bolezni, sladkorne bolezni ali multiple skleroze (18).

2.8 ZNAČILNOSTI ADRENALINA

Adrenalin ima molsko maso 183.204 g/mol. Slika 2 prikazuje strukturno kemijsko formulo adrenalina.



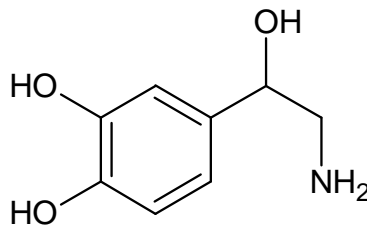
Slika 2: Strukturna kemijska formula adrenalina

Adrenalin (angl.: Epinephrine) je najpomembnejši produkt biosinteze kateholaminov iz aminokislina L- tirozina (slika 5). Adrenalin ima največji učinek na alfa receptorje, saj je tudi njegov agonistični potencial za ta receptor večji. Adrenalin večkrat poimenujemo tudi hormon pobega ali boja, saj sodeluje pri odzivu telesa na stresne situacije. Pospešuje glikogenolizo v jetrih in skeletnih mišicah. Končni metabolit pri razgradnji adrenalina je 3-metoksi-4-hidroksimandelična kislina (VMA) (končni produkt COMT-a), ki se izloči z urinom. Aktivacija kateholaminskih hormonov poteka preko adrenergičnih ali adrenoreceptorjev, ki so sklopljeni s proteinom G (5,6). Adrenalin pripravi telo, da odreagira v stresnih situacijah s tem, da aktivira mehanizme, potrebne za hitre reakcije: zvišuje utrip srca, povečuje minutni volumen srca, zvišuje krvni tlak, usmerja kri k

mišicam. Povečuje razgradnjo in zmanjšuje sintezo glikogena. Povečuje tudi glukoneogenezo, ki poteka v jetrih v manjši meri tudi v ledvicah.

2.9 ZNAČILNOSTI NORADRENALINA

Noradrenalin (angl.: Norepinephrine) je živčni prenašalec simpatičnega živčevja. Hormon, ki se izloča v sredici nadledvične žleze. Njegova strukturna kemijska formula je prikazana na sliki 3. Od adrenalina se strukturno razlikuje po odsotnosti metilne skupine na amskem dušiku. Spada med kateholamine, njegov naravni stereoizomer je L(-)-R-noradrenalin (25).



Slika 3: Strukturna kemijska formula noradrenalina

Poleg serotonina je to eden najpomembnejših »hormonov za srečo«. Noradrenalin poživlja možgane, predvsem pa spodbuja sposobnost zaznavanja, daje motivacijo in energijo. Prav tako učinkuje kot antidepresiv (25). Novejše raziskave so pokazale, da v stresnih situacijah noradrenalin izboljšuje miselno zbranost, ter poskrbi za optimizem in evforijo. Zaradi njega še posebno intenzivno doživljamo in se spominjamo veselih dogodkov in močnih čustev.

Noradrenalin je v visokih koncentracijah shranjen v sinaptičnih veziklih postganglionarnih sinaptičnih nevronov skupaj z ATP (adenozin trifosfat), kromograninom in dopamin- β hidroksilazo. Nevrotransmitor se skupaj s temi snovmi sprosti iz končiča z eksocitozo, ki je uravnana s Ca^{2+} ioni. Samo sproščanje je uravnvano z negativno povratno zvezo preko presinaptičnih alfa2 receptorjev, ki inhibirajo adenilatno ciklazo in tako preko znižanja cAMP preprečijo odpiranje Ca^{2+} kanalčkov (predvsem na adrenergičnih in holinergičnih nevronih). Transmitorska 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. Noradrenalin in adrenalin, ki krožita po telesu, se razgrajujeta z intracelularnima

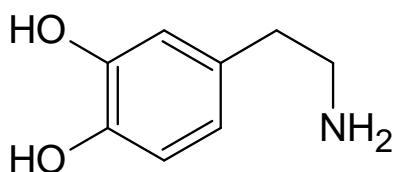
encimoma MAO (monoamino-oksidaža) in COMT (katehol-O-metil transferaza), zato imajo pri tej razgradnji prenašalci kateholaminov v celico ključno vlogo.

MAO metabolizira kateholamine v aldehide, ki jih na periferiji razgradi aldehidna dehidrogenaza do karboksilnih kislin. MAO lahko oksidira tudi druge monoamine. Encim, ki je vezan na membrano mitohondrijev, se nahaja predvsem v noradrenergičnih živčnih končičih.

Noradrenalin deluje zlasti na gladko mišičje odvodnic, v gastrointestinalnem traktu, kjer po vezavi na adrenergične receptorje, na obe podvrsti alfa in beta, povzroči njihovo skrčenje ter posledično porast krvnega tlaka. Vpliva tudi na osrednje živčevje in sicer na predele, odgovorne za zvečano pozornost in impulzivnost. Biosintezo noradrenalina prikazuje slika 5 (8).

2.10 ZNAČILNOSTI DOPAMINA

Dopamin (angl.: Dopamine) spada v skupino kateholaminov. Najvišjo koncentracijo zasledimo v centralnem živčnem sistemu, kjer opravlja vlogo kot primarni živčni prenašalec. Njegova strukturna kemijska formula je prikazana na sliki 4.



Slika 4: Strukturna kemijska formula dopamina

Nevrone v katerih se nahaja dopamin kot živčni prenašalec, imenujemo dopaminergični nevroni. Nahajajo se v osrednjem živčevju zlasti v srednjih možganih.

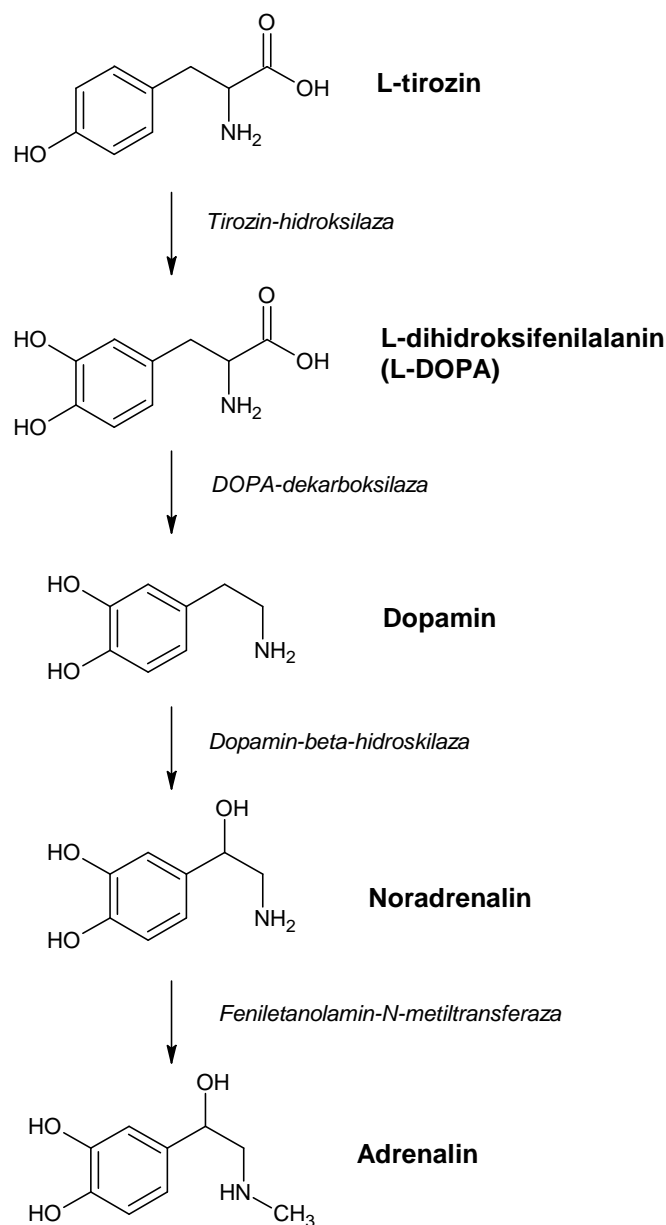
Večino dopamina se sintetizira v centralnem živčnem sistemu, del pa tudi v sredici nadledvične žleze. Dopamin spodbuja mišljenje, če ga je veliko lahko vodi v prekomerno domišljijo, pomanjkanje pa povzroča nemotiviranost in brezvoljnost (8).

Med drugim dopamin vpliva na ekstrapiramidalno motoriko. Pomemben je pri razvoju psihoz, pri uravnavanju hormonskega sistema ter pri uravnavanju prekrvavljenosti trebušnih organov. Kot drugi kateholamini se tudi dopamin sintetizira iz aminokislina L-tirozina (slika 5). Končni produkt dopamina pa je homovanilijeva kislina (HVA).

Določanje koncentracije dopamina v plazmi z dodatkom EDTA je nekoliko oteženo, saj moramo zelo paziti na kakšen način odvzamemo vzorec, saj se pri pacientu, ko ga zbodemo z iglo, lažno povišajo vrednosti dopamina, saj z odvzemom povzročimo stresno situacijo pacientu. Zato je boljše, če se pacient umiri pred postopkom, mi pa odvzamemo vzorec z vstavitvijo katetra v veno (8). V urinu merimo končni produkt razgradnje dopamina in sicer HVA, ki je bolj obstojna, pridobitev vzorca pa je lažja in prijetnejša za pacienta. Dopamin v urinu lahko določujemo tako s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti HPLC metodo kot tudi s plinsko kromatografijo (GC).

2.11 BIOSINTEZA KATEHOLAMINOV

Slika 5 prikazuje biosintezo kateholaminov iz aminokislina L- tirozina. Celotna biosinteza poteka v sredici nadledvične žleze. Aminokislina L-tirozin se pretvori v dihidroksifenilalanin (L-Dopa) pod vplivom encima tirozin-hidroksilaze (TH). Dihidroksifenilalanin (L-Dopa) se pod vplivom encima DOPA-dekarboksilaze naprej pretvori v dopamin, ta se pod vplivom encima dopamin- β -hidroksilaze pretvori v noradrenalin iz njega pa pod vplivom encima feniletanolamin-N-metiltransferaze (PNMT) v adrenalin.



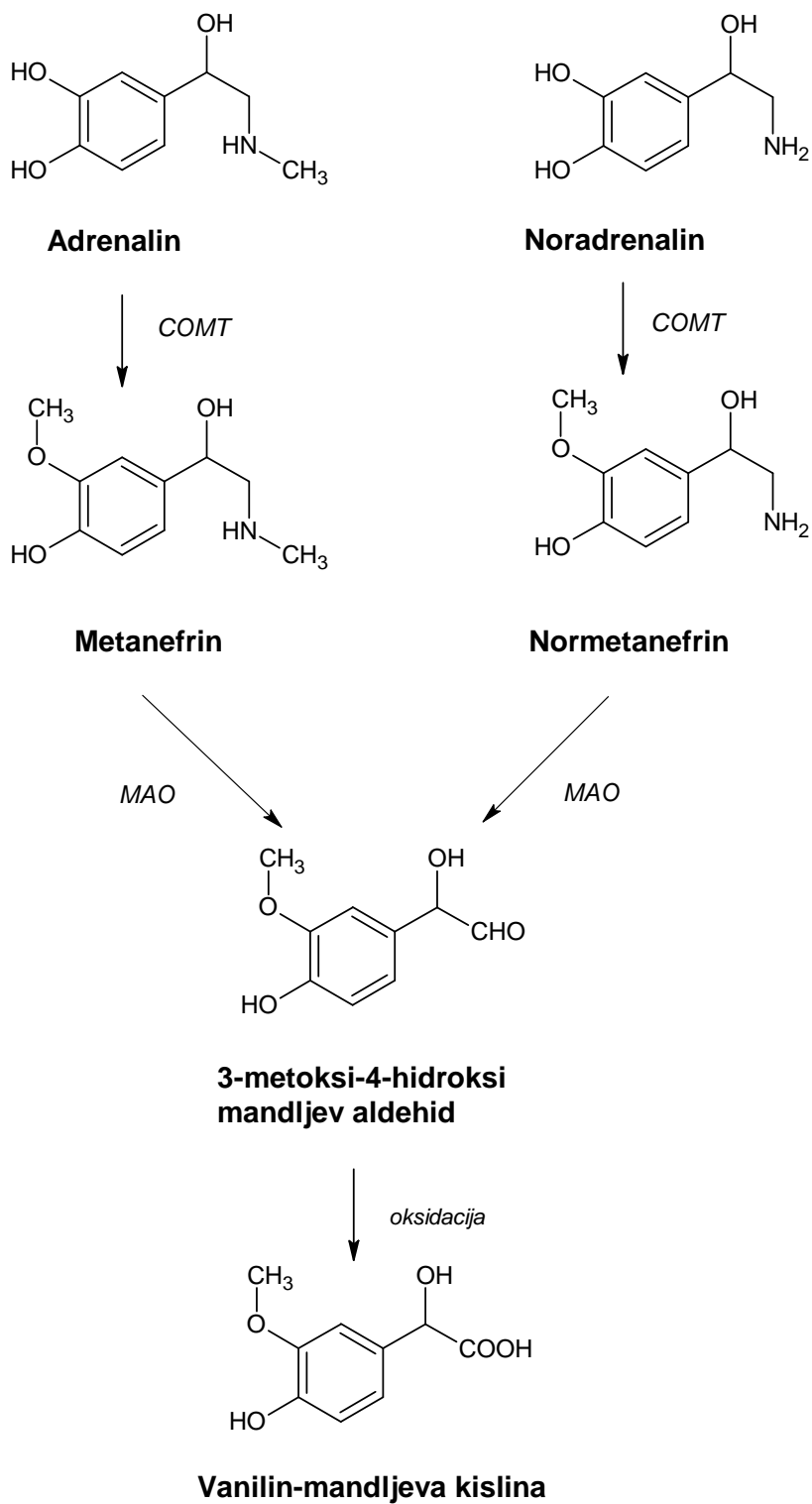
Slika 5: Biosinteza kateholaminov

2.12 RAZGRADNJA KATEHOLAMINOV

Noradrenalin, ki ga izločijo živčni končiči učinkuje le nekaj sekund. Po končanem izločanju se noradrenalin odstranjuje iz mesta na tri načine (slika 6):

- z aktivnim procesom reabsorpcije v adrenergične nevrone (tako se odstrani 50-80 % izločenega noradrenalina),
- z difuzijo v okolno telesno tekočino in nato v kri (v krvi deluje 10-30 sekund, nato s procesom difuzije preide v tkiva),

- z encimsko razgradnjo (pod vplivom MAO in COMT).



Slika 6: Razgradnja kateholaminov

2.13 BIOLOŠKI VZORCI

Biološki vzorci v katerih določujemo kateholamine sta urin in plazma. Odvzem vzorcev izvršimo po protokolu in navodilih za odvzem biološkega materiala. Kri odvzamemo v epruveto z dodatkom antikoagulanta EDTA. Za odvzem urina uporabimo sterilni lonček, kamor zberemo naključni urin, ali sterilno posodo, kamor zbiramo 24-urni urin, ki mu dodamo 10 mL 6M HCl. Koncentracija hormonov se s časom spreminja, pri odvzemu vzorca je med vzroki za spremembe potrebno upoštevati dnevni ritem izločanja ter pulzno izločanje zaradi različnih vplivov kot so: hrana, spanje, stres, itd. Poleg priprave preiskovanca in pravilnega postopka odvzema je zato pomembna tudi ustrezna izbira časa odvzema vzorca. Posebnosti pri odvzemu krvi, se pojavljajo pri določanju kateholaminov v plazmi, kjer ima priprava preiskovanca in postopek odvzema zelo velik vpliv na rezultat. Na plazemsko koncentracijo poleg časa odvzema vplivajo še stresni dogodki (psihični stres in fizična aktivnost), ki zvišajo vrednost kateholaminov. Pri zbiranju in analizi vzorcev pa prihaja tudi do napak, ki jih delimo v dve veliki skupini in sicer naključne in sistematične. Napake, ki jih lahko zagrešimo pri zbiranju podatkov se sicer razlikujejo glede na vrsto podatka in glede na način kako smo podatke dobili. Naključne napake nastanejo zaradi premajhne natančnosti merskih metod, ali zaradi človeške napake. Napake te vrste sicer povečujejo variiranje podatkov, na končni rezultat statistične obdelave pa navadno ne vplivajo, saj se po zakonu o velikih številih med seboj izničijo in se pri velikem številu njihov vpliv izgubi. Drugače je s sistematičnimi napakami. Te so posledica konstantnih vzrokov, ki sistematično delujejo na vrednosti ali pristranost osebja, ki sodeluje pri zbiranju podatkov. Učinek sistematičnih napak se z večanjem števila enot ne izniči, ampak se sešteva. Napake te vrste lahko popolnoma spremenijo sliko in iz takih podatkov lahko izvajamo popolnoma napačne sklepe. Zato moramo poskušati vse, da do takih napak ne bi prišlo.

2.13.1 Plazma

Vzorci odvzeti v epruvete z dodatkom EDTA so primerni za določevanje kateholaminov v plazmi.

Pomembno pri odvzemu je, da se preiskovanci vsaj 20-30 minut pred odvzemom sprostijo in umirijo, saj fizični in psihični stres povišujeta raven kateholaminov v krvi. Štiri ure pred odvzemom bolnik ne sme jesti, piti kave ali čaja in kaditi. Po vstavitvi katetra preiskovanec

najprej leži 30 minut, šele zatem se izvede odvzem vzorca. Vzorec mora bit prinešen v laboratorij na ledu v 30 minutah po odvzemu. Hemolitični in zelo lipemični vzorci niso primerni za preiskave, saj je vrednost kateholaminov lažno znižana.

Plazmo lahko hranimo 6 ur na temperaturi od 2-8 °C, če želimo shranjevati plazmo dlje časa (do 6 mesecev) jo zamrznemo pri – 20 °C.

2.13.2 Urin

Za analizo lahko uporabimo naključni urin ali pa zbiramo 24-urni urin. Zbranemu urinu dodamo 10-15 mL 6M HCl, kot konzervans in preprečimo direktni stik s svetlobo. Premešamo in odvezamemo reprezentativni vzorec za analizo. Pri pacientih z motnjami v delovanju ledvic mora biti poleg določanja kateholaminov določena tudi koncentracija kreatinina, saj parameter nakazuje na pravilno delovanje ledvic. Urinski vzorci so lahko shranjeni do 6 mesecev pri – 20 °C.

Referenčne vrednosti se čez dan spreminjajo zato upoštevamo biološke ritme. V preglednici 1 so podane vrednosti za posamezen analit izmerjen v urinu.

Preglednica 1: Referenčne vrednosti adrenalina in noradrenalina

	Adrenalin	Noradrenalin
Urin	0-109.3 nmol/dan	88-473.4 nmol/dan
Plazma	< 0.3 nmol/L	0.6-2.4 nmol/L

3. DOLOČANJE KATEHOLAMINOV

Za določanje kateholaminov se v praksi uporablja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), ki je kromatografski proces in temelji na ponavljajoči adsorpciji in desorpciji komponent vzorca, raztopljenih v mobilni fazi. V uporabi so tudi druge tehnike vendar v zelo majhni meri sploh pri rutinskem določanju kateholaminov. Druge tehnike so predvsem radioencimska metoda, kjer določujemo dopamin v plazmi z dodatkom EDTA, Radioencimska metoda, ki za svoje delovanje uporablja encim COMT (katehol-O-metil transferaza), ki katalizira prenos metilne skupine na hidroksilno skupino kateholnega receptorja. V nadaljevanju postopka se kateholamini ekstrahirajo iz vzorca plazme in ločijo s tankoplastno kromatografijo.

Za določanje adrenalina in noradrenalina v plazmi je poznana metoda s pomočjo etilendiamina (EDA), ki spada med fluorometrične metode. Pri tej metodi gre za ekstrakcijo kateholaminov iz plazme najprej s pomočjo kolon aluminijevega oksida in nato s pomočjo kolon šibko kisle kationske izmenjalne smole v prahu (Amberlit® CG-50) z visoko vsebnostjo karboksilnih skupin. EDA se doda zbranemu eluatu, ki je pomešan s kateholamini. Fluorescentne delce izmerimo s pomočjo flurometra pri dveh različnih valovnih dolžinah (510 nm in 580 nm) iz katerih izračunamo koncentracijo določenega analita (8).

3.1 ENCIMSKO IMUNSKI TEST ELISA

Načelo metode ELISA (angl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) je, da uporabimo encim, ki nam služi kot oznaka. Encim, konjugiran s protitelesom reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Pri ELISA tehniki uporabljamo različne encime npr. alkalno fosfatazo, peroksidazo in p-nitrofenil fosfatazo. Če te encime pomešamo s primernim substratom, dajo obarvan reakcijski produkt.

ELISA tehnika je ena izmed najbolj uporabnih metod za določanje prisotnosti antigenov ali specifičnih protiteles v testiranih vzorcih. Kadar v vzorcu določamo specifična protitelesa, govorimo o posredni (indirektni) ELISI, kadar pa določamo prisotnost antigena, govorimo o sendvič ELISI. Testi se izvajajo na mikrotitrskih ploščicah (slika 7). Poznamo številne izvedbe ELISA testa s katerim lahko kvalitativno in kvantitativno določimo protitelesa ali antigene. V nadaljevanju bodo opisane posamezne metode testa ELISA.

Temelj ELISE je odkritje, da lahko pritrdimo na protitelesa in antigene različne encime tako, da se reaktivnost protiteles ne spremeni (3). Test ELISA, ki je bil prvič opisan leta 1971 (Engval Perlman, 1971) spada med heterogene encimskoimunske teste. Pri heterogenih ELISA testih so z encimom označeni antigeni ali protitelesa. Poznamo več izvedb in načinov določanja analita z ELISA tehniko.

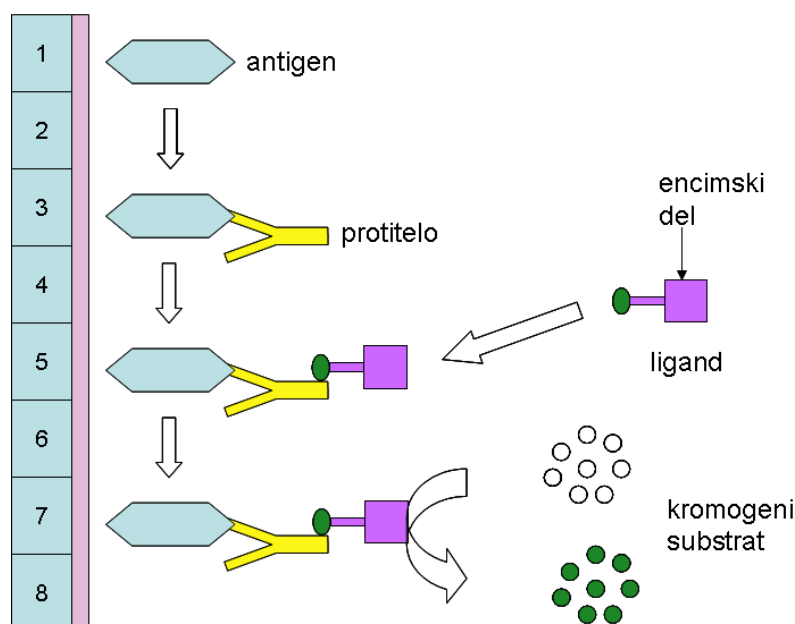
3.1.1 Določanje protiteles

Specifična protitelesa odkrijemo in kvantitativno določimo z indirektnim testom ELISA Serum ali kak drug vzorec, v katerem je primarno protitelo, damo v mikrotitrsko jamico, prekrito z antigenom in pustimo, da reagira z vezanim 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.

Obarvan produkt reakcije merimo v posebnem, v ta namen pripravljenem spektrofotometru za merjenje v mikrotitrskih ploščicah (slika7), ki lahko izmeri absorbanco 96 vdolbinic v manj kot eni minuti (3). S testom določanja protiteles lahko določimo specifična protitelesa IgG ali IgM. Najbolj uporabljeni encimi za konjugiranje so peroksidaza in alkalna fosfataza (4).



Slika 7: Mikrotitrsko ploščica



Slika 8: Shema testa ELISA za določanje protiteles

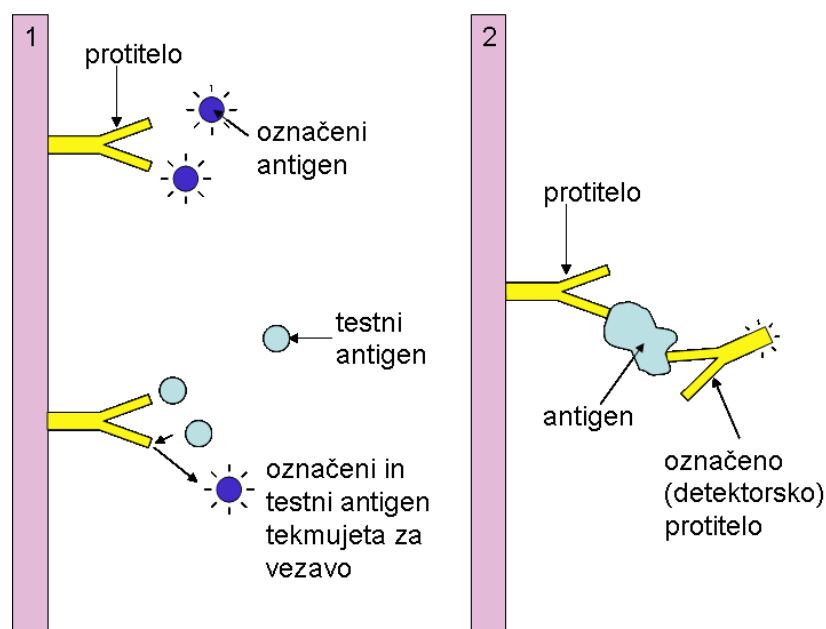
Posamezne stopnje na sliki 8 prikazujejo postopek določanja analita: (1) vezava antigena, (2) spiranje, (3) vezava testnih protiteles, (4) spiranje, (5) vezava liganda, (6) spiranje, (7) dodatek kromogenega substrata, (8) razvijanje barve.

3.1.2 Določanje antigenov

Metodo določanja antigenov lahko imenujemo tudi direktna ali sendvič tehnika. V prvi stopnji, ki je imunska reakcija, se veže antigen iz preiskovanega seruma, na del specifičnih protiteles, ki so pritrjena na steno epruvete oziroma na mikrotitrsko vdolbinico. Po končani inkubaciji odstranimo serum in speremo epruvete. V drugi stopnji 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 obarvan 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 (4). Direktna (sendvič) metoda (slika 9) je primernejša za merjenje koncentracij večjih molekul, predvsem velikih beljakovinskih antigenov in različnih protiteles (10).

3.1.3 Kompetitivni način določanja antigenov

Kompetitivni način je bolj uveljavljen pri radioimunskem določevanju in ga pogosteje uporabljamo za merjenje koncentracije antigenov. Posebej primeren je za merjenje majhnih molekul. Prvič so ga uporabili v šestdesetih letih 20.stoletja za merjenje koncentracije humanega inzulina(10). 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 specifičnimi 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 vzorcu. 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 za razpoložljiva protitelesa, bo z encimom konjugiranega antigena vezanega tem manj, čim več antigena bo v preiskovanem vzorcu (slika 9). 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 vzorca (4, 3).



Slika 9: Shema testa ELISA za določanje antigena

Za prikaz imunskih kompleksov na trdni fazi se uporabljajo radioizotopi, encimi, fluorescenčna barvila, kemoluminiscenčni reagenti in podobno. S temi testi lahko kvantitativno določamo zelo majhne količine biološko ali farmakološko pomembnih substanc.

3.2 TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE LOČLJIVOSTI

HPLC (angl.: High Performance Liquid Chromatography) je separacijska tehnika za ločevanje komponent v vzorcih. Pri tekočinski kromatografiji mobilna faza teče skozi stacionarno fazo v določeni smeri. Pri tem poteka kromatografski proces, ki je rezultat ponavljajoče adsorpcije in desorpcije komponent vzorca, raztopljenih v mobilni fazi. Ta proces poteka med potovanjem mobilne faze vzdolž HPLC kolone. Do separacije pride zaradi različnih termodinamskih lastnosti topljencev. Topljenci, ki imajo večjo afiniteto do mobilne faze, potujejo hitreje in zato pridejo iz kolone hitreje kot topljenci, ki se zadržujejo v stacionarni fazi. Eluirajo se v vrstnem redu po velikosti porazdelitvenih koeficientov glede na stacionarno fazo. Porazdelitev je posledica relativnih velikosti molekularnih sil med molekulami topljenca in molekulami obeh faz. Močnejše so sile med molekulami topljenca in molekulami v stacionarni fazi, počasneje se topljenec eluira.

Molekularne sile delimo na tri tipe:

- disperzivne sile,
- polarne sile ,
- ionske sile.

Pri reverzno-faznih nosilcih prevladuje disperzivna selektivnost, mobilna faza mora biti polarna in bistveno manj disperzivna (12).

Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je tekočina nizke viskoznosti. Stacionarne faze so porozni mikrodenci iz različnih substanc, najpomembnejši so silika gel, hidro oksidi, porozni organski polimeri, lasersko obdelani aluminij in v zadnjem času tudi porozni grafit. Te sorbente kemično modificiramo z vezavo ligandov na njihovo površino ali jih impregniramo s tekočim filmom (13).

3.2.1 Tipi tekočinske kromatografije

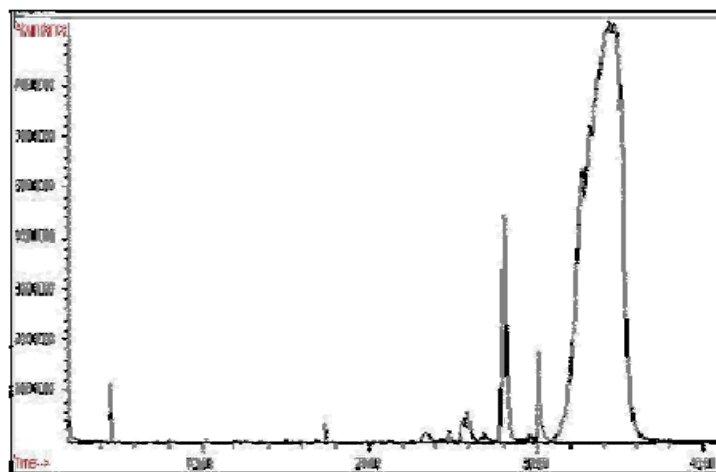
Pri tekočinski kromatografiji ločimo več tipov kromatografij. Najpomembnejši tipi so:

- **adsorpcijska kromatografija:** kjer je stacionarna faza trden adsorbent (silikagel, Al_2O_3), porozna stekla, aktivno oglje). Tudi TLC lahko glede na mehanizem separacije uvrščamo v to zvrst kromatografije,
- **porazdelitvena kromatografija:** topljenec je porazdeljen med tekočo mobilno in tekočo stacionarno fazo, ki je vezana na inertnem nosilcu. Porazdelitveno kromatografijo delimo na »normalno« in »reverznofazno« kromatografijo. Pri prvi je stacionarna faza polarna in mobilna faza nepolarna. Pri reverznofazni kromatografiji pa so pogoji obrnjeni; stacionarna faza, ki je običajno vezana na nosilcu, je nepolarna. Separacijo izvajamo s polarno mobilno fazo,
- **ionska kromatografija:** osnova kromatografskega procesa je ionska izmenjava med ionskimi skupinami v izmenjevalcu in proti-ioni vzorca. Za stacionarne faze uporabljamo umetne organske in anorganske smole (kationske in anionske izmenjevalce),
- **izločitvena kromatografija:** stacionarna faza mora biti kemično inertna. Separacijo pogojujejo fizikalne značilnosti stacionarne faze in molekul v vzorcu. Manjše molekule prodrejo v mrežo polimerne stacionarne faze, srednje velike se zadržujejo manj časa v koloni, največje pa potujejo skozi kolono brez retenzije. Ta kromatografija se uporablja za separacijo visokomolekularnih spojin in biomolekul od manjših.

Informacija, ki jo daje kromatografski eksperiment, je vsebovana na kromatogramu (slika 10) kjer je koncentracija ali masni profil komponent vzorca zapisana kot funkcija gibanja mobilne faze.

Kromatogram nam daje informacije o:

- kompleksnosti vzorca (število pikov),
- kvalitativni sestavi vzorca (položaj pikov),
- količini posamezne komponente v vzorcu (površina pikov),
- kvaliteti kolone (število teoretskih podov).



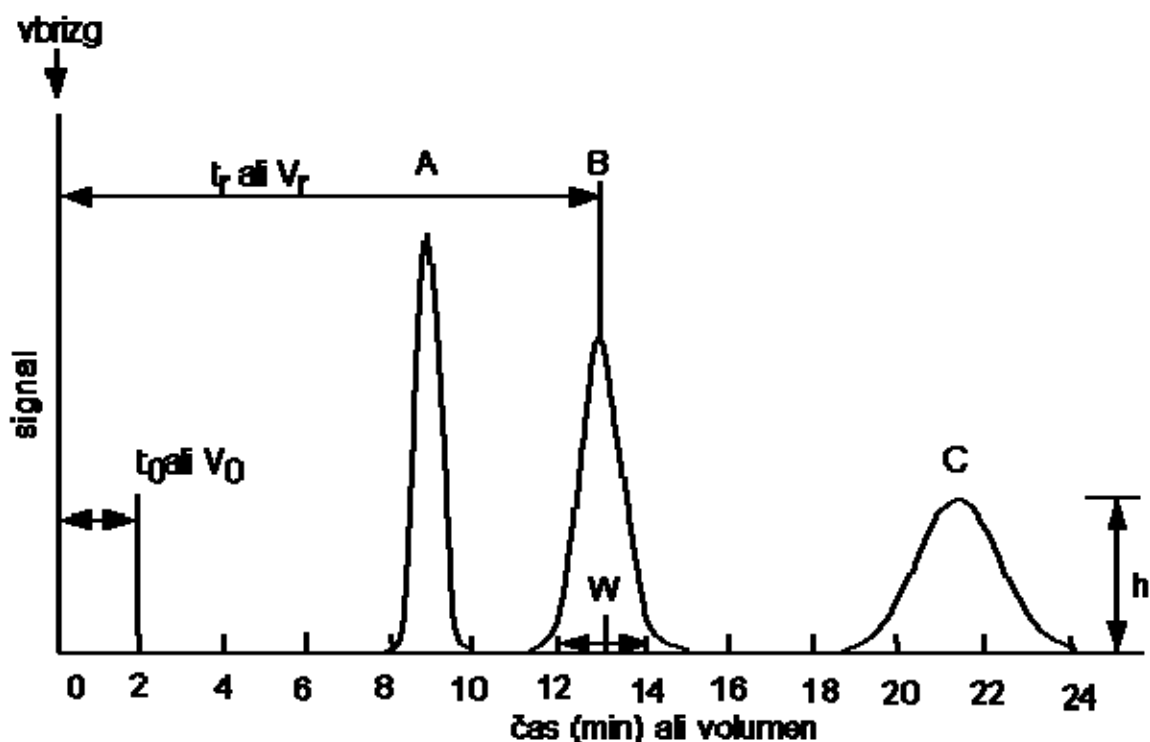
Slika 10: Prikaz rezultata določanja komponent vzorca

Interpretacija rezultatov zahteva poznavanje termodinamskih, kinetičnih in transportnih pojavov, ki potekajo med kromatografsko separacijo. Vse to omogoča izvedbo čim učinkovitejše separacije kompleksnih mešanic in tudi izvedbo ustreznih fizikalno-kemičnih meritev. Teorija kromatografske separacije, ki je bila najprej postavljena za plinsko kromatografijo, olajša razumevanje tekočinske kromatografije. Med obema tehnikama so določene rezlike, predvsem je pri tekočinski kromatografiji viskoznost mobilne faze večja in difuzivnost topljenca manjša. Cilj kromatografije je učinkovita separacija. Kvaliteta separacije je definirana z ločljivostjo dveh pikov in je funkcija treh kromatografskih parametrov:

- retenzije ali kapacitivnega faktorja pika,
- selektivnosti med dvema komponentama,
- učinkovitosti ali števila teoretskih podov.

3.2.2 Ločevanje komponent

Molekule vzorca se pri prehodu skozi kolono določen čas zadržujejo v mobilni fazi in določen čas v stacionarni fazi. Zadrževanje v posameznih fazah je posledica različnih kemijskih in fizikalnih interakcij in povzroči ločbo komponent na koloni. Kromatografsko ločevanje temelji na enem ali več retenzijskih mehanizmih (slika 11). Ločljivost je razmerje razdalj med sosednjima pikoma in vsoto širine pikov.



Slika 11: Osnovne značilnosti HPLC grafa

Osnove teoretski pojmov separacije na koloni:

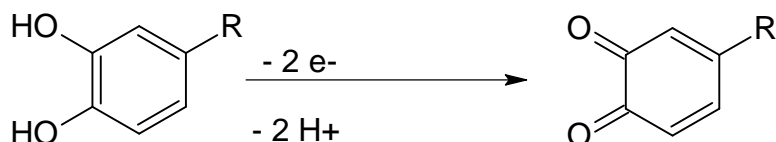
- retenzijski čas (t_r) - čas zadrževanja komponente na koloni,
- retenzijski volumen (V_r),
- število teoretskih podov (N) – zmogljivost kolone,
- kapacitivnost kolone,
- porazdelitveno razmerje kolone (k'),
- selektivnost (α).

3.2.3 Princip testa

HPLC je separacijska metoda, kjer se sestavine vzorca fizično ločijo med seboj na osnovi primarne afinitete posameznih substanc do mobilne faze (zmes topil, v kateri se topijo in z njo potujejo skozi kolono) in stacionarne (mirujoče) faze.

S pomočjo črpalke črpamo mobilno fazo do injektorja, ki nato aplicira vzorec skupaj z mobilno fazo na kolono. Princip določevanja temelji na uporabljenem elektrokemijskem detektorju.

Specifičnost in selektivnost elektrokemijskega detektorja temelji na dejstvu, da so se samo komponente v adrenalinu, noradrenalinu in dopaminu zmožne reducirati oziroma oksidirati na delovni elektrodi. Elektrokemijska pretvorba posamezne substance na delovni elektrodi vodi do korelacije sproščanja oziroma dodajanja elektronov (slika 12) glede na to ali poteče oksidacija ali redukcija. Tok, ki priteče do celice je proporcionalen koncentraciji analita, ki gre skozi celico. To posamezno detektor izriše krivuljo, ki nakazuje retencijski čas na kromogramu.



Slika 12: Detekcija adrenalina in noradrenalina s shemo oksidacije in redukcije

3.2.4 Postopek testa

Vsi vzorci, kontrole in standardi so označeni s črtnimi kodami, ki jih aparat prepozna in mu omogočajo prepoznavanje vsebine. V kolikor se čitalec pokvari, je možno kodo vnesti ročno.

Postopek testa v aparaturi:

- injiciranje kalibratorjev,
- injiciranje kontrol, po pregledu dobljenih rezultatov, ki nakazujejo na pravilno delovanje aparature začnemo z:
- injiciranjem vzorcev,
- vzorec potuje skozi kolono,
- na osnovi primarne afinitete posameznih substanc do mobilne faze se sestavine ločijo,
- detektor izmeri elektrokemijski potencial, ki je proporcionalen koncentraciji določenega analita v vzorcu.

3.3 SESTAVNI DELI HPLC SISTEMOV

V primerih, ko zaradi večje učinkovitosti separacije uporabljamo stacionarne faze z velikostjo delcev 10 μm ali manj, je potrebno raztopljeni vzorec potiskati skozi kolono

skupaj z mobilno fazo pod visokim pritiskom (100- 400 barov). Za potiskanje topila skozi kolono uporabljamo črpalke. Ti pogoji nam omogočajo, da dosežemo separacijo večkomponentne mešanice v nekaj minutah. Vsi prej našteti načini separacije v tekočinski kromatografiji so uporabni tudi v HPLC (12).

Z razvojem črpalk za visoke pritiske, ki omogočajo konstantne pretoke brez pulziranja in z razvojem tehnologije izdelave kolon ter različnih detektorjev je postala HPLC ob GC nepogrešljiva metoda za separacijo in določevanje večine organskih in anorganskih spojin. Odlikuje se po hitrosti, občutljivosti, ločljivosti majhni množini vzorca ter večkratni uporabi kolone in je zato že povsem izpodrinila klasično tekočinsko kromatografijo.

HPLC je v osnovi sestavljen iz: ene ali več črpalk, injektorja, kolone, enega ali več detektorjev različnih tipov in recorderja ali integratorja.

3.3.1 Črpalke

Za gradientno izpiranje potrebujemo gradientno črpalko z vgrajenim mikroračunalnikom za kontrolo gradienta. Sodobni HPLC sistemi so opremljeni z računalnikom in ustrezno programsko opremo, ki omogoča kontrolo procesa ter zbiranje in obdelavo podatkov.

Za dobro ponovljivost meritev je zelo pomemben pretok mobilne faze. Ta mora biti čimbolj konstanten. Na prvi pogled to ne predstavlja problema, vendar, ker ločba poteka pod velikim pritiskom, več kot 100 atmosfer, je enakomerno, dolgotrajno delovanje črpalke, neodvisno od pritiska, težko dosegljiva zahteva. Za verodostojnost meritev moramo neprestano kontrolirati pretok mobilne faze, oziroma parametre, ki so od pretoka odvisni, npr. retenzijske čase pikov.

3.3.2 Injektor

Pomemben del HPLC sistema je injektor. Od njega zahtevamo ponovljivost injiciranja, tako za ročne kot avtomatske injektorje, namenjene posameznemu injiciranju ali velikim serijam. Vzorec je potrebno nanesti na kolono naenkrat, ne da bi vplivali na stacionarno fazo. Zaradi preprečevanja širitve pikov mora biti injektor nameščen blizu začetka separacijske kolone. Med injiciranjem prihaja zaradi visokih pritiskov mobilne faze do obrabe tesnil in injektorji lahko pričnejo popuščati, kar povzroči slabo ponovljivost injiciranja.

Pri ročnem injiciranju običajno hitro opazimo te napake, težje jih odkrijemo v avtomatskih sistemih, zlasti kadar so injektorji nameščeni na težko dostopnih mestih.

Izbira stacionarne in mobilne faze je pri HPLC zelo pomembna. Sestavo mobilne faze med separacijo lahko spreminjamo- ta način separacije imenujemo gradientno izpiranje. Pri izokratskem izpiranju ostane polarnost mobilne faze nespremenjena.

3.3.3 Kolone in polnila

Najpomembnejši del kromatografa je kolona. Ta mora biti ustrezne kvalitete, enakomerno polnjena, brez praznih prostorov, brez kanalov v sorbensu in s priključki, ki omogočajo spajanje s sistemom brez mrtvega volumna. Kolone za HPLC so običajno iz nerjavnega jekla (za pritiske do 700 barov), za nižje tlake (pod 10 barov) pa lahko uporabimo steklene ali teflonske kolone. Z zmanjševanjem delcev nosilca (10 μm in manj) se je razvila HPLC saj so taki delci nudili prevelik upor pretoku mobilne faze. Za zagotavljanje pretoka skozi kolono, polnjeno s takimi delci, je potreben pritisk, ki ga zagotavljajo črpalke. Take kolone dajejo za faktor 100 x večjo učinkovitost v primerjavi s klasično LC. Večja učinkovitost je imela za posledico zmanjšanje dolžine kolon (15-25 cm), premer teh polnjenih analitskih kolon je 4-6 mm. Seveda pa se razvoj ni ustavil na tej stopnji, v prizadevanjih za še večjo učinkovitost se je premer kolon zmanjševal (20).

Kolone razdelimo v razrede glede na premer v:

- klasične analitske kolone: premer 4-6 mm,
- semi mikro kolone: s premerom 1-2 mm,
- mikro kolone s premerom < 1 mm in jih delimo dalje na:
 - gosto polnjene mikro kolone: premer kolone 0.2 -1 mm, premer delcev polnila 5-30 μm ,
 - rahlo polnjene mikro kolone, premer kolone 50-200 μm , premer delcev polnila 10-100 μm ,
 - kapilarne kolone: premer 10-60 μm , brez polnila, stacionarna faza je nanešena na steni kapilare (21).

Mikro kolone zahtevajo HPLC sistem z zelo nizkim mrtvim volumenom, medtem ko semi mikro kolone lahko uporabljamo na običajnem HPLC sistemu.

Miniaturizacija kolon daje vrsto prednosti:

- majhna poraba topila,

- krajši analizni časi,
- visoka učinkovitost,
- majhna poraba vzorca,
- večja občutljivost pri isti količini vzorca.

Popolnoma porozni delci relativno velikih premerov se uporabljajo v tekočinski kromatografiji nizkih pritiskov. Ta polnila imajo veliko kapacitivnost, vendar nudijo slabo učinkovitost in zahtevajo dolge separacijske čase. Zaradi prisotnosti relativno velikih por in neugodne porazdelitve velikosti delcev, molekule zelo počasi prehajajo skozi kolono.

Z razvojem tehnologije priprave faz so se porozna zrnata polnila zamenjala s poroznimi okroglimi delci iz silikagela s premerom manjšim od 10 μm . Nova polnila nudijo večjo učinkovitost, krajši čas separacije, brez zmanjšanja kapacitivnosti. Popolnoma porozne delce pripravimo iz številnih substanc kot so: silikagel, porozni organski materiali in porozni grafit. Te faze se nadalje modificirajo z različnimi alkil-nitrilnimi, fenilnimi in amino-skupinami.

Selektivnost nekega kromatografskega sistema je po definiciji postavljena kot razlika med polarnostjo mobilne in stacionarne faze (20).

3.3.4 Detektorji

Po končani ločbi komponente ovrednotimo s pomočjo detektorja. Danes imamo na razpolago vrsto detektorjev, ki za identifikacijo in kvantifikacijo uporabljajo različne fizikalno kemijske lastnosti ločenih komponent. Detektorje razdelimo v skupine glede na njihove značilnosti in uporabnost:

- **UV-VIS detektor:** temelji na vzburjanju valenčnih elektronov, ki prehajajo na višji nivo, UV svetlobo absorbirajo komponente, ki imajo konjugirane dvojne vezi. Elektrone vzbudimo z elektromagnetnim valovanjem,
- **fluorometrični detektor:** temelji na vzburjanju atomov/molekul z elektromagnetnim valovanjem. Pomembno pri postopku je, da molekule, ki ne fluorescirajo označimo s heterocikličnimi spojinami zlasti z več konjugiranimi dvojnimi vezmi. Ker je detektor občutljiv na pH območje, moramo zagotoviti ustrezen pufer,

- **refraktometrični detektor:** temelji na merjenju lomnega količnika, saj se snop svetlobe pri prehodu v različne gostote spojin lomi, je univerzalni HPLC detektor,
- **IR detektor:** temelji na nihanju vezi. Po obsevanju vzorca vezi zanihajo v substanci, ki jo določamo,
- **elektrokemijski detektor:** temelji na oksidaciji oziroma redukciji npr.(adrenalin, noradrenalin in dopamin). Poznamo amperometrijske, kolorimetrične za merjenje elektronske prevodnosti, potenciometrijske, konduktometrične.

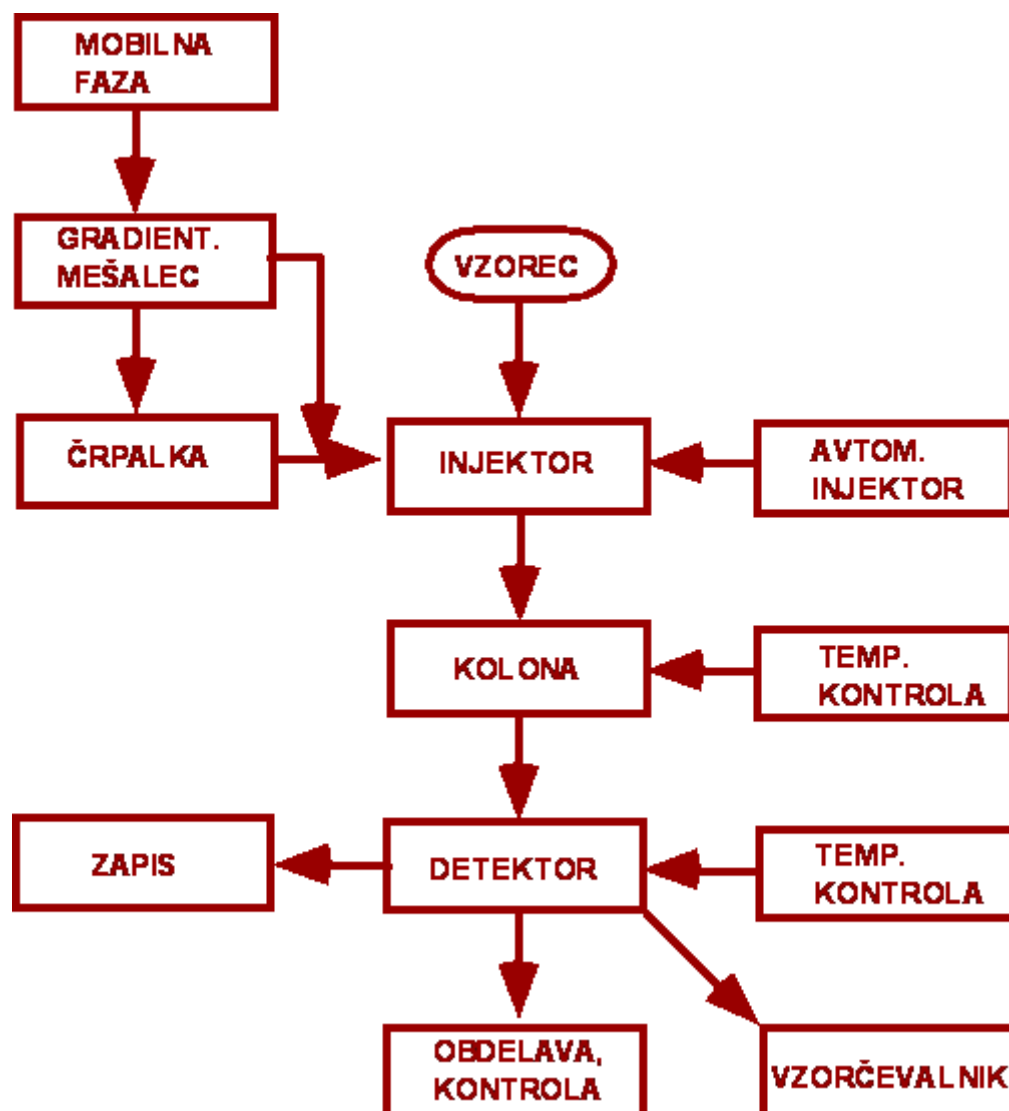
Elektrokemijski detektor deluje na principu spremembe potenciala analita, pri katerem poteče redukcija oziroma oksidacija. Sestavljen je iz delovne elektrode, ki je ponavadi steklena ogljikova elektroda ter iz referentne elektrode, ki jo sestavljata člena Ag/AgCl. Konstanten električni tok, ki ga dovajamo na elektrokemijski detektor, se pod vplivom redukcije oziroma oksidacije, ki poteka v vzorcu, poveča oziroma zmanjša. Spremembo izmeri delovna elektroda, ki na detektor pošlje odziv signala. Linearno odvisnost prikazujeta višina pika in koncentracije elektroaktivnega analita. Pri določevanju kateholaminov smo uporabljali elektrokemijske detektorje zaradi redukcijskih in oksidativnih lastnosti, ki jih imata adrenalin in noradrenalin (12).

3.3.5 Instrumentalna oprema

Vsak HPLC sistem ima pet osnovnih elementov, ki so povezani v celotni aparat (slika 13):

1. posodo z mobilno fazo,
2. črpalko, ki ustvarja pritisk od nekaj atmosfer do nekaj sto atmosfer,
3. injektor za vnos vzorca v sistem,
4. kolono, kjer poteka ločba,
5. detektor za ovrednotenje ločene komponente.

Sodobni HPLC sistemi so vodeni z računalnikom. Povezava med enotami sistema poteka preko digitalne komunikacije, ker ima vsak sistem vgrajen svoj računalnik in komunikacijski vmesnik. Detektorji so opremljeni z analogno digitalnimi pretvorniki (ADC), ki signal pretvorijo v številke in jih pošiljajo v računalnik (26).



Slika 13: Shematski prikaz sestave ter potek vzorca v aparaturi HPLC

Prednosti uporabe HPLC tehnike je velika ločljivost, hitrost, občutljivost, ponovljivost, primerna za kvantitativno uporabo, možnost avtomatizacije in široka uporabna vrednost.

4. NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen naše naloge je bil ugotoviti primerljivost določanja koncentracije kateholaminov v istih vzorcih z dvema različnima metodama. Z encimsko imunsko metodo (ELISA), in s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ki jo uporabljajo za vsakodnevno diagnostično dejavnost. Dobljene rezultate smo želeli primerjati med seboj in ugotoviti ali bi lahko tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ki je dokaj draga, zamenjali s cenejšim encimsko imunskim testom (ELISA), ugotoviti smo želeli korelacijo med rezultati dobljenimi z ELISA in HPLC metodo.

Delovne hipoteze:

- predpostavljali smo, da bodo določitev kateholaminov s pomočjo ELISA metode primerljive vrednostim s HPLC metodo, ki je uporabljena v rutini za namen določanja koncentracije kateholaminov,
- v primeru primerljivih rezultatov po statistični obdelavi le-teh, bi HPLC zamenjali s cenejšo metodo ELISA.

V ta namen bomo:

- zbrali 30 vzorcev za določitev kateholaminov v urinu,
- zbrane vzorce analizirali z dvema metodama: z ELISA testom in HPLC metodo, v roku 1 meseca po začetku zbiranja vzorcev,
- s statističnimi testi, ki jih bomo izbrali glede na porazdelitev dobljenih rezultatov (normalna oziroma nenormalna porazdelitev), bomo primerjali metodi med seboj in ugotovili kakšno je ujemanje rezultatov dobljenih z ELISA testom v primerjavi s HPLC metodo.

5. MATERIALI IN METODE

5.1 VZORČENJE IN SHRANJEVANJE KLINIČNIH MATERIALOV

V raziskavo smo vključili 30 vzorcev urina pacientov. Pri določitvi adrenalina smo zajeli 13.3% vzorcev s povišano in 86.7% z normalno koncentracijo pri določitvi noradrenalina pa 26.7% vzorcev s povišano in 73.3% z normalno koncentracijo. Za analizo smo uporabili zbrani 24-urni urin, ki smo mu dodali 10 mL konzervansa 6M HCl in preprečili direktni stik s svetlobo. Ker smo vzorce zbirali en mesec, smo jih hranili v plastičnih epruvetah v zamrzovalniku pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pred uporabo smo vzorce odmrznili pri sobni temperaturi in jih previdno premešali.

Delali smo v dveh serijah, v vsaki seriji po 15 vzorcev. V teh vzorcih smo določevali koncentracijo adrenalina in noradrenalina. Primerjali smo dve metodi: tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), ki jo uporabljajo za vsakodnevno diagnostično dejavnost in encimsko imunsko tehniko (ELISA). Z obema metodama smo določevali koncentracijo adrenalina in noradrenalina v zbranih vzorcih ter opredelili primerljivost dobljenih rezultatov.

5.2 OPREMA IN REAGENTI ZA ELISA TEST



Slika 14: Aparatura PERSONAL LAB za izvedbo testa ELISA

Za izvedbo ELISA testa smo uporabili aparaturo PERSONAL LAB proizvajalca Adaltis (slika 14) in komercialno pripravljene komplete (3 CAT EIA BA 10-1600) proizvajalca Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG, Nordhorn za določitev koncentracije adrenalina in noradrenalina.

Komercialno pripravljene kompleti proizvajalca Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG vsebujejo:

- mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami kjer poteka reakcija,
- standarde od A do F (vsak po 1 mL) preglednica 2,
- kontroli 1 in 2 (1 mL),
- aciliran pufer (20 mL) in aciliran reagent (2 krat po 1.5 mL) ,
- ekstrakcijski in spiralni pufer (2 krat po 4 mL),
- klorovodikova kislina (20 mL) preglednica 2,

Preglednica 2: Standardi za izvedbo testa ELISA

Vrsta standarda	Vsebina standarda in količina
STANDARD A	0 nmoL/L (adrenalin), 0 nmol/L (noradrenalin) 1 x 1 mL pripravljen za uporabo
STANDARD B	5.458 nmoL/L (adrenalin), 23.644 nmoL/L (noradrenalin) 1 x 1 mL, pripravljen za uporabo
STANDARD C	21.832 nmoL/L (adrenalin), 94.576 nmoL/L (noradrenalin) 1 x 1 mL, pripravljen za uporabo
STANDARD D	87.328 nmoL/L (adrenalin), 378.304 nmoL/L (noradrenalin) 1 x 1 mL, pripravljen za uporabo
STANDARD E	349.312 nmoL/L (adrenalin), 1513.2 nmoL/L (noradrenalin) 1 x 1 mL, pripravljen za uporabo
STANDARD F	1397.248 nmoL/L (adrenalin), 6052.8 nmoL/L (noradrenalin) 1 x 1 mL, pripravljen za uporabo

Kontrolo postopka predstavljajo v test vključeni standardi z znano koncentracijo analita. Z njim računalnik izriše umeritveno krivuljo, ki nam služi kot mejna kontrola in nam prikaže pravilnost izmerjenih rezultatov. Na ta način zagotovimo pravilno delovanje aparata, saj izmerjene rezultate primerjamo z znanimi podanimi vrednostmi.

5.2.1 Priprava reagentov za ELISA test

- 50 mL izpiralnega pufra razredčimo na končni volumen 500 mL
- encim pripravimo 15 minut pred uporabo, dodamo mu 1 mL destilirane vode in nežno premešamo, nato dodamo 0.3 mL koencima in 0.7 mL encimskega pufra, nežno premešamo končni volumen pripravljene raztopine je 2.0 mL
- drugi reagenti so že pripravljene za uporabo

Preglednica 3: Reagenti za ekstrakcijo in aciliranje

MATERIAL	OZNAKA	KOLIČINA	VOLUMEN
Aciliran reagent	ACYL-REAG	2 steklenički	1.5 mL pripravljen za uporabo
Aciliran pufer (tris-HCl- pufer)	ACYL-BUFF	1 steklenička	20 mL pripravljen za uporabo
Ekstrakcijski pufer	EXTRACT-BUFF	2 steklenički	4 mL pripravljen za uporabo
Reakcijski pufer	ASSAY-BUFF	2 steklenički	4 mL pripravljen za uporabo, vsebuje 1M HCl
Klorovodikova kislina (HCl)	HCl	1 steklenička	20 mL, pripravljena za uporabo, 0.025M, rumeno obarvana
Reakcijska oz. mikrotitrna ploščica	EXTRACT-PLATE	1 ploščica s 96 vdolbinicami	/
Kontrola 1	CONTROL 1	1 steklenička	1 mL pripravljena za uporabo
Kontrola 2	CONTROL 2	1 steklenička	1 mL pripravljena za uporabo

Preglednica 4: Sestava komercialnih reagentov za test ELISA

MATERIAL	OZNAKA	KOLIČINA	VOLUMEN IN VSEBINA
Encim	ENZYME	6 stekleničk	1 mL liofiliziranega encima katehol-O- metiltransferaze
Koencim	COENZYME	3 stekleničke	0.75 mL, pripravljen za uporabo, S-adenozil-L-metionin
Encimski pufer	ENZYME-BUFF	2 steklenički	4 mL, pripravljen za uporabo
Antiserum za adrenalin	ADR-AS	1 steklenička	6 mL, zajčji antiserum, pripravljen za uporabo, modro obarvan
Antiserum za noradrenalin	NAD-AS	1 steklenička	6 mL, zajčja protitelesa, pripravljena za uporabo, rumeno obarvana
Spiralni koncentriran pufer	WASH-BUFF 10x	3 stekleničke	50 mL, koncentriran
Sekundarna protitelesa, konjugirana z encimom (konjugat)	CONJUGATE	3 stekleničke	11 mL, zajčja protitelesa IgG konjugirana s peroksidazo
Substrat	SUBSTRATE	3 stekleničke	11 mL, pripravljen za uporabo, vsebuje raztopino TMB
Reagent za ustavitev reakcije	STOP- SOLN	3 stekleničke	11 mL, pripravljen za uporabo, vsebuje 0.25 M žveplovodikovo kislino
Mikrotitrna ploščica za adrenalin	ADR-MIT-STRIPS	1 ploščica	z 12 preničnimi stolpci, v vsakem je 8 vdolbinic; v vdolbinicah je trdno vezan derivatiziran adrenalin (modro obarvan)
Mikrotitrna ploščica za noradrenalin	NAD-MIT-STRIPS	1 ploščica	Z 12 preničnimi stolpci, v vsakem je 8 vdolbinic; v vdolbinicah je trdno vezan derivatiziran noradrenalin (rumeno obarvan)

Vse reagente do predpisanega datuma uporabe hranimo v hladilniku pri temperaturi 2-8 °C. Pred uporabo jih ogrejemo na sobno temperaturo, po uporabi pa zavržemo.

Potreben volumen vzorca za izvedbo ELISA testa določitve koncentracije adrenalina je 20 µL, noradrenalina pa 15 µL.

Postopek traja 4-5 ur.

Ostali pripomočki in laboratorijski inventar

- nastavljive pipete volumnov od: (10-100 µL, 100-1000 µL, 30-300 µL),
- merilec absorbance pri 450 nm,
- stresalnik (z možnostjo stresanja med 400-900 rpm),
- destilirana voda,
- vortex mešalec.

5.3 IZVEDBA ELISA TESTA

Vse vzorce urina smo testirali z encimsko imunskim testom (ELISA) na aparaturi PERSONAL LAB proizvajalca Adaltis in s tekočinsko kromatografijo (HPLC) na aparaturi SURVEYOR ECD.

5.3.1 Postopek ekstrakcije in acilacije za ELISA test

1. odpipetirali smo 20 µL standarda, 20 µL kontrole in 20 µL urinskega vzorca v pripravljene reakcijske vdolbinice na reakcijski ploščici, vsaki smo dodali 500 µL destilirane vode za izravnavo volumna,
2. odpipetirali smo 50 µL reakcijskega pufru in ga dodali v vsako napolnjeno reakcijsko vdolbinico na mikrotitrski ploščici,
3. odpipetirali smo 50 µL ekstrakcijskega pufru in ga dodali v vsako napolnjeno reakcijsko vdolbinico,
4. tako pripravljene ploščice smo zaprli s folijo in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi na stresalniku (700 rpm),
5. po 30 minutah smo odstranili folijo odlili nevezane delce in dodobra odstranili tekočino z močnejšim udarcem ploščice na papirnato brisačko,

6. odpipetirali smo 1 mL razredčenega in vnaprej pripravljenega pufra za spiranje, dodali vsem reakcijskim vdolbinicam na reakcijski ploščici in pokrili s folijo ter inkubirali 5 minut na sobni temperaturi na stresalniku (700 rpm),
7. po 5 minutah smo odstranili folijo in odlili nezreagirano tekočino in z močnejšim udarcem na papirnato brisačko odstranili še preostalo tekočino,
8. ponovili smo korak 6,
9. nato smo odpipetirali 150 μL aciliranega pufra v vse reakcijske vdolbinice,
10. nato smo odpipetirali 25 μL aciliranega reagenta v vse reakcijske vdolbinice,
11. nato smo inkubirali reakcijsko ploščico nepokrito 15 minut pri sobni temperaturi na stresalniku (700 rpm),
12. po inkubaciji smo odlili tekočino in takoj odstranili rezidualno tekočino,
13. v vsako reakcijsko vdolbinico smo dodali po 1 mL spiralnega pufra,
14. inkubirali smo reakcijsko ploščico 10 minut pri sobni temperaturi in stresalniku (700 rpm),
15. po 10 minutah smo sprali ploščico in odstranili tekočino z močnim udarcem ob papirnato brisačko,
16. odpipetirali smo 200 μL HCl v vsako reakcijsko vdolbinico, da se kateholamini eluirajo,
17. tako pripravljeno ploščico smo pokrili s folijo in inkubirali 10 minut na sobni temperaturi in stresalniku (700 rpm).

5.3.2 Postopek določanja adrenalina z ELISO

1. odpipetirali smo 25 μL sveže pripravljene encimske raztopine v reakcijske vdolbinice,
2. nato smo odpipetirali 75 μL standarda, kontrole in vzorcev v predpripravljene reakcijske vdolbinice,
3. tako pripravljeno reakcijsko ploščico smo nato inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi na stresalniku (450 rpm),

4. po tem času smo odpipetirali 50 μL antiseruma za določevanje adrenalina in ga dodali vsem napolnjenim reakcijskim vdolbinicam,
5. inkubirali smo 2 uri pri sobni temperaturi na stresalniku (450 rpm),
6. dobro smo odstranili tekočino in vsako reakcijsko vdolbinico sprali s 300 μL spiralnega pufra, postopek spiranja smo dvakrat ponovili,
7. odpipetirali smo 100 μL encimskega konjugata,
8. inkubirali smo 30 minut pri sobni temperaturi na stresalniku (450 rpm),
9. odstranili smo nezreagirane delce in 3 krat sprali,

Nadaljni koraki so potekali v aparaturi PERSONAL LAB proizvajalca Adaltis:

10. odpipetiranje 100 μL substrata v vse reakcijske vdolbinice,
11. inkubiranje 30 minut pri sobni temperaturi, ploščica je bila zavarovana pred direktno sončno svetlobo,
12. dodajanje 100 μL reagenta za ustavitev reakcije v vsako reakcijsko vdolbinico in stresanje, da se je raztopina resnično dobro porazdelila in ustavila reakcijo,
13. meritev absorbance v 10 minutah pri 450 nm.

5.3.3 Postopek določanja noradrenalina z ELISO

1. odpipetirali smo 25 μL sveže pripravljene encimske raztopine v reakcijske vdolbinice,
2. odpipetirali smo 15 μL standarda, kontrol in vzorcev v pripravljene reakcijske vdolbinice,
3. nato smo inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi na stresalniku (450 rpm) po inkubiranju smo odpipetirali 50 μL antiseruma za noradrenalin,
4. nato smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi na stresalniku (450 rpm),
5. dobro smo odstranili tekočino in vsako reakcijsko vdolbinico sprali s 300 μL spiralnega pufra, postopek spiranja smo ponovili dvakrat,
6. odpipetirali smo 100 μL encimskega konjugata,
7. inkubirali smo 30 minut pri sobni temperaturi na stresalniku (450 rpm) odstranili smo nezreagiran del in sprali trikrat, osušili smo reakcijsko ploščico z absorpcijskim materialom,

Nadaljni koraki so potekali v aparaturi PERSONAL LAB proizvajalca Adaltis:

8. odpipetiranje 100 μ L substrata v vsako reakcijsko vdolbinico,
9. inkubiranje 30 minut pri sobni temperaturi,
10. dodajanje 100 μ L reagenta za ustavitev reakcije in premešanje, da se je raztopina resnično dobro porazdelila in ustavila reakcijo,
11. meritev absorbance v 10 minutah pri 450 nm.

5.4 OPREMA IN REAGENTI ZA HPLC

Za izvedbo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) smo uporabili aparaturo SURVEYOR z elektrokemijskim detektorjem ECD (slika 15) proizvajalca Thermo Finnigan.



Slika 15: HPLC SURVEYOR z elektrokemijskim detektorjem

Komercialno pripravljene kompleti proizvajalca Clin Rep® za določevanje kateholaminov v urinu za 100 testov vsebujejo:

- **mobilno fazo** (1000 mL),
- **standardno raztopino** (10 mL),
- **IS interni standard** (3mL),
- **Kalibrator; liofiliziran** (5x8 mL),

- kolone za vzorce, 50 kosov,
- stabilizacijski reagent S (500 mL),
- eluacijski reagent E (300 mL),
- kontrola I; liofilizirana, (10x8 mL),
- kontrola II; liofilizirana, (10x8 mL).

Kontrolo postopka predstavljajo kalibratorji, katerih vrednosti so podane s strani proizvajalca Clin Rep® (preglednica 5).

Preglednica 5: Specifikacije kalibratorjev za metodo HPLC

Sestavina	Koncentracija	Retencijski čas
Adrenalin	161 nmol/L	7.26 min
Noradrenalin	1483 nmol/L	6.32 min

5.4.1 Kalibracija aparature HPLC

Kalibrator pripravimo tako, da dodamo 8.0 mL 0.2 M HCl, komercialno pripravljenemu kalibratorju ClinCal® iz kompleta proizvajalca Clin Rep® in stresamo 10 minut na stresalniku. Ko se kalibrator popolnoma raztopi je pripravljen za uporabo. Pred apliciranjem kalibratorja v aparat mu dodamo še 30 µL raztopine internega standarda (komercialno pripravljena raztopina) in 10 mL stabilizacijskega reagenta S (komercialno pripravljen reagent).

Kalibratorji so izdelani iz humanega urina, zato se ga obravnava kot potencialno kužen material. Originalno zaprt kalibrator hranimo pri 4 °C do datuma uporabe.

5.4.2 Priprava kontrol za HPLC

Kontrole ClinCheck® proizvajalca Clin Rep® se uporabljajo za notranje zagotavljanje kontrole na aparatu. Liofilizirane kontrole so pripravljene na osnovi humanega urina in zajemajo normalne ter patološke vrednosti (preglednici 6,7).

Komercialni kontroli dodamo 8.0 mL 0.2M HCl in mešamo 15 minut. Pred apliciranjem kontrole v aparat ji dodamo še 30 µL raztopine internega standarda (komercialno pripravljena raztopina) in 10 mL stabilizacijskega reagenta S (komercialno pripravljen reagent). Originalno zaprti kontroli hranimo pri 4 °C do datuma uporabe.

Preglednica 6: Vrednosti normalne kontrole I

Sestava	Srednja vrednost	Kontrolno območje	Enote
Adrenalin	93.3	74.8 – 112	nmol/L
Noradrenalin	325	260 – 390	nmol/L

Preglednica 7: Vrednosti patološke kontrole II

Sestava	Srednja vrednost	Kontrolno območje	Enote
Adrenalin	196	157 – 235	nmol/L
Noradrenalin	922	739 – 1105	nmol/L

5.4.3 Priprava vzorcev za HPLC

Za analizo HPLC smo uporabili vzorce urinov zbranih v 24-urah, z dodatkom 10 mL 32% HCl in shranjenih pri 4 °C. Če bi vzorce želeli shranjevati dlje časa uravnamo njihov pH na 1-2 in shranimo alikvot pri –20 °C. Če je vzorec moten, ga scentrifugiramo in odstranimo usedlino, nikoli pa ne dajemo motnih vzorcev v aparaturo HPLC.

Za posamezen test potrebujemo 3 mL vzorca, ki smo mu dodali 10 mL stabilizacijskega reagenta S (komercialno pripravljen reagent) in 30 µL raztopine internega standarda (komercialno pripravljena raztopina) in dobro premešamo. Preverili smo še pH urina, ki je priporočen po navodilih, od 3 do 7 v našem primeru je bil 6. Aparatura sama injicira 25 µL vzorca na reakcijsko kolono.

Pogoji merjenja s HPLC:

- na črpalki nastavimo pretočni čas, ki znaša 1.0 mL/min, tlak naj ne presega 200 barov
- analiza na kolonah poteka pri 30 °C.
- potencial na elektrokemijskem detektorju znaša 500 mV proti referentni elektrodi Ag/AgCl

Elektrokemijski detektor deluje na principu spremembe potenciala analita, pri katerem poteče redukcija oziroma oksidacija. Sestavljen je iz delovne elektrode, ki je ponavadi steklena ogljikova elektroda ter iz referentne elektrode, ki jo sestavljata člena Ag/AgCl. Elektrokemijska pretvorba posamezne substance na delovni elektrodi vodi do korelacije sproščanja oziroma dodajanja elektronov glede na to ali poteče oksidacija ali redukcija. Tok, ki priteče do celice je proporcionalen koncentraciji analita, ki gre skozi celico. To

posname detektor izriše krivuljo, ki nakazuje retencijski čas na kromogramu. Podan retencijski čas za adrenalin je 5.0 za noradrenalin pa 6.0 minut.

6. REZULTATI

V raziskavo smo vključili 30 vzorcev. Določitve smo opravljali v dveh serijah z različnimi sklopi 15 vzorcev. Zbrali smo vzorce naključnih pacientov. V urinskih vzorcih smo z dvema metodama: encimsko imunsko tehniko ELISA in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti HPLC, določali koncentracijo adrenalina in noradrenalina, ter dobljene rezultate primerjali med seboj. Rezultate smo razvrstili, kot prikazujeta preglednici 8 in 9. Z računalniškim statističnim programom MedCalc smo obdelali rezultate ter opredelili postavljene hipoteze glede na dobljene rezultate. Sliki 16 in 17 grafično prikazujeta ujemanje rezultatov določitve kateholaminov z dvema tehnikama.

Preglednica 8: Rezultati koncentracije adrenalina

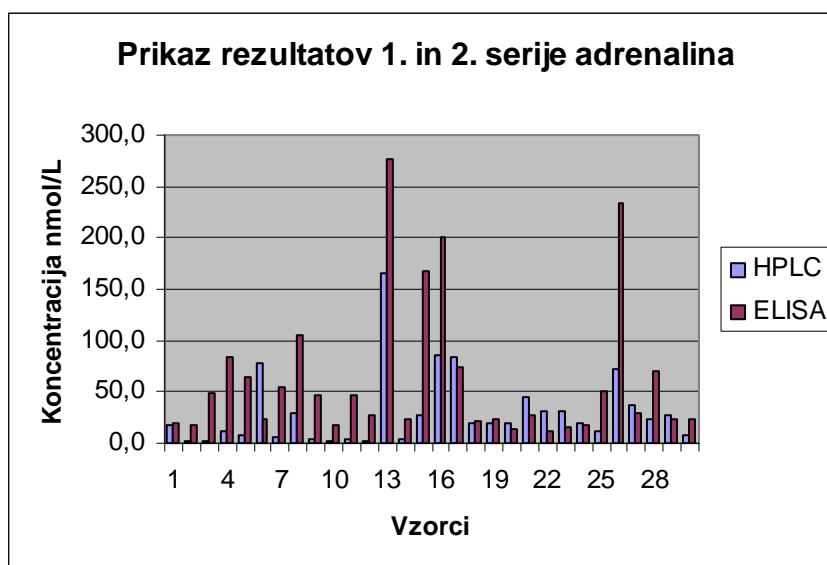
Vzorec	Adrenalin (nmol/L)	
	HPLC	ELISA
1.	17,0	18,8
2.	1,5	16,7
3.	1,9	49,5
4.	12,0	84,2
5.	7,8	63,8
6.	77,0	22,6
7.	6,6	54,7
8.	29,2	105,3
9.	4,8	47,6
10.	2,2	18,0
11.	3,7	46,8
12.	2,5	27,2
13.	166,1	277,1
14.	3,0	22,6
15.	27,9	168,2
16.	85,5	200,0
17.	83,0	73,8
18.	19,2	20,8

19.	19,2	23,6
20.	19,2	14,0
21.	45,5	27,9
22.	31,5	11,4
23.	30,2	16,0
24.	20,0	18,5
25.	11,6	50,7
26.	71,8	234,5
27.	37,9	29,7
28.	23,4	69,5
29.	27,4	22,5
30.	7,8	23,6

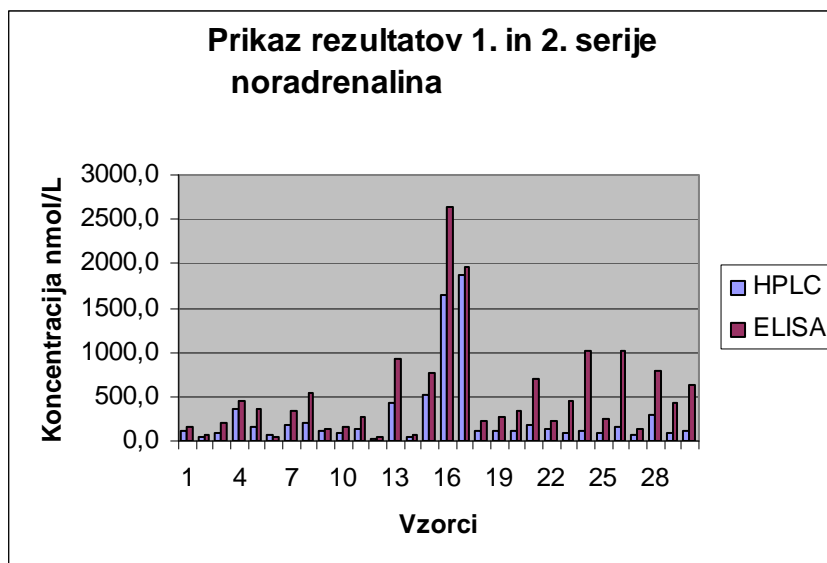
Preglednica 9: Rezultati koncentracije noradrenalina

Vzorec	Noradrenalin (nmol/L)	
	HPLC	ELISA
1.	121,6	150,3
2.	50,1	74,9
3.	96,8	195,0
4.	358,4	456,3
5.	154,1	356,9
6.	62,5	48,8
7.	181,4	327,8
8.	194,1	533,4
9.	106,6	145,7
10.	96,2	150,8
11.	130,9	263,4
12.	19,1	54,7
13.	417,3	922,5
14.	52,9	72,5
15.	508,8	771,7

16.	1635,4	2634,0
17.	1861,3	1951,6
18.	117,4	234,5
19.	117,4	272,4
20.	117,4	332,5
21.	169,7	689,1
22.	142,3	225,2
23.	81,4	453,9
24.	121,3	1019,8
25.	82,9	241,6
26.	158,3	1019,8
27.	69,2	142,5
28.	288,7	784,2
29.	100,5	423,5
30.	121,7	639,0



Slika 16: Grafični prikaz ujemanja rezultatov adrenalina



Slika 17: Grafični prikaz ujemanja rezultatov noradrenalina

6.1 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Obdelavo rezultatov smo opravili s statističnim programom MedCalc, v katerem smo podatke najprej razvrstili v preglednice ter ugotovili ali so normalno ali nenormalno razporejeni. Večina metod za statistično analizo podatkov temelji na nekaterih predpostavkah v zvezi s porazdelitvijo populacije. Domnevamo, da je vzorec vzet iz domnevno normalno porazdeljene populacije, nato pa s statistično metodo preskušamo domnevo o povprečju ali o varianci te populacije. S temi metodami torej preverjamo domneve o parametrih populacije in jih zato imenujemo tudi parametrične metode. V našem primeru imamo nenormalno porazdeljene vrednosti, zato uporabimo neparametrične statistične metode ali teste, ki so bolj primerni za oceno značilnosti, manj pa za oceno mej in intervala zaupanja. Najprej smo v zbranih rezultatih določili mediano ali centralno vrednost. Mediana je lahko v nekaterih primerih zelo uporabna srednja vrednost in bolje predstavlja statistično maso kot aritmetična sredina. To velja posebno takrat, kadar je statistična masa porazdeljena nesimetrično. Preglednica 10 prikazuje srednjo vrednost rezultatov določitve adrenalina in noradrenalina.

Preglednica 10: Določitev mediane v posameznih meritvah na posamezni aparaturi

	Adrenalin s tehniko HPLC	Adrenalin s tehniko ELISA	Noradrenalin s tehniko HPLC	Noradrenalin s tehniko ELISA
Mediana za vzorci 1-30	19.2	28.8	121.5	330.2

Kadar imamo podatke o dveh naključnih kvantitativnih spremenljivkah, od katere nobene ne izberemo sami vnaprej, ne moremo govoriti o odvisnosti ene od druge ampak le o njuni medsebojni povezanosti. Za analizo te povezanosti uporabljamo metodo korelacije, s katero poskušamo kvantificirati stopnjo povezanosti obeh spremenljivk. Preglednica 11 prikazuje izračunan korelacijski koeficient za adrenalin in noradrenalin določen z metodo HPLC in ELISA. Koeficient korelacije za neparametrično razporeditev računamo po Spearmanu in ima lahko vse vrednosti od -1 pri maksimalno negativni korelaciji pa do $+1$ pri maksimalno pozitivni korelaciji, če je koeficient korelacije enak nič, pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti. Koeficient, ki je večji kot $+1$ in manjši kot -1 kaže na napako pri računanju. Koeficient se le približuje eni od vrednosti v našem primeru pri adrenalinu znaša 0.713, pri noradrenalinu pa 0.887. Pri adrenalinu znaša 95%

interval zaupanja za korelacijski koeficient 0.476 do 0.854, pri noradrenalinu pa 0.774 do 0.945. Koeficient korelacije je merilo za stopnjo povezanosti in pove samo, kako velika je korelacija, nikakor pa ne pove, če je povezanost značilna ali ne.

Preglednica 11: Spearmanov korelacijski koeficient med metodo HPLC in ELISA

Določan analit	Vzorci	Korelacijski koeficient	95% interval zaupanja
Adrenalin	1-30	0.713	0.476-0.854
Noradrenalin	1-30	0.887	0.774-0.945

Ovrednotenje rezultatov smo nadaljevali z Wilcoxonovim testom, ki je neparametrična alternativa za *test t* pri analizi razlike med dvema skupinama parnih podatkov, obravnavali smo razlike pri posameznem paru. Ničelna domneva trdi, da je mediana razlik pri parih v celotni populaciji enaka nič. Če ničelna domneva drži, bi torej moralo biti med parnimi meritvami približno enako pozitivnih in negativnih razlik. Preglednici 12 in 13 prikazujeta število pozitivnih in negativnih razlik med parnimi meritvami, torej ničelna domneva ne drži, saj v našem primeru nimamo enako število pozitivnih in negativnih sprememb.

Preglednica 12: Rezultati uporabe Wilcoxonovega testa za adrenalin

	ELISA	HPLC
Število vzorcev	30	30
Najnižja vrednost	11.4	1.5
Najvišja vrednost	277.1	166.1
Mediana	28.8	19.2
95% koeficient zaupanja	22.5 do 60.22	7.8 do 29.8
Število poz. sprememb	9	
Število neg. sprememb	21	
t	2.993	
p	0.003	

Preglednica 13: Rezultati uporabe Wilcoxonovega testa za noradrenalin

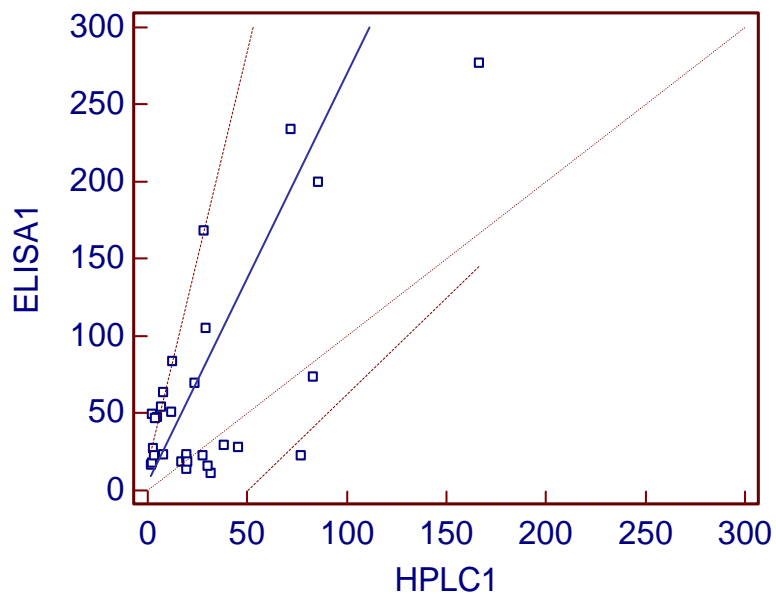
	ELISA	HPLC
Število vzorcev	30	30
Najnižja vrednost	48.0	19.1
Najvišja vrednost	2634.0	1861.3
Mediana	330.2	121.5
95% koeficient zaupanja	206.9 do 597.5	98.3 do 165.2
Število poz. sprememb	1	
Število neg. sprememb	29	
t	4.762	
p	< 0.0001	

Sliki 18 in 19 prikazujeta ujemanje oziroma odvisnost dveh slučajnih spremenljivk, v našem primeru ujemanje rezultatov dobljenih z metodo HPLC in ELISA. Podana je enačba premice, ki se podatkom najboljše prilaga, kar prikazuje preglednica 14.

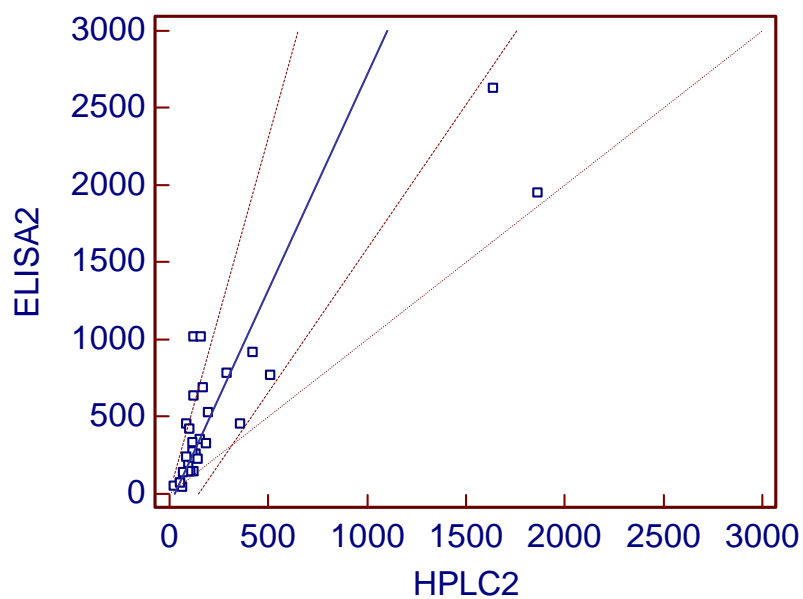
Preglednica 14: Enačba premice Passing & Bablok regresije

	Enačba premice	P
Adrenalin	$y = 5.284 + 2.645x$	$P = < 0.01$
Noradrenalin	$Y = -74.109 + 2.790$	$P = > 0.05$

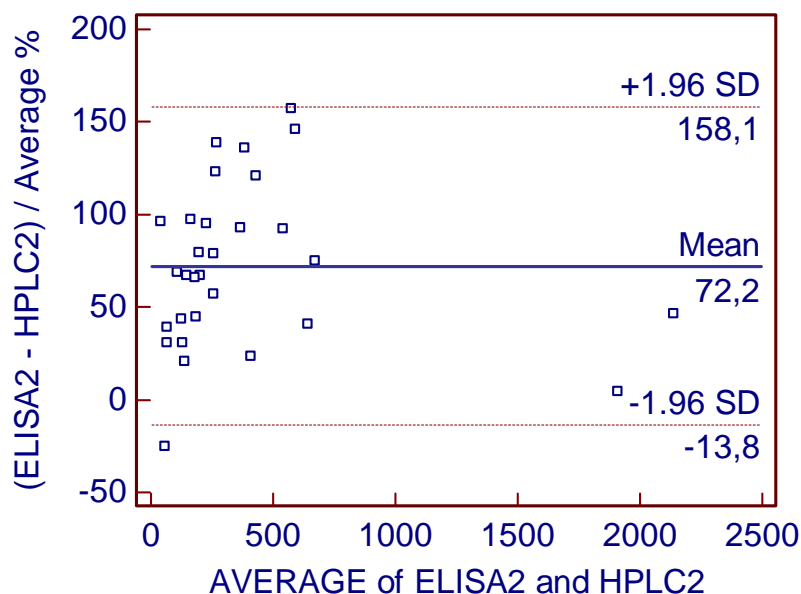
Pri uporabi Passing & Babloko-ve regresije pa lahko opazujemo linearno porazdelitev dobljenih rezultatov z dvema metodama. Graf zajema tudi 95% interval zaupanja.



Slika 18: Passing & Bablok- regresija metode HPLC in ELISA za adrenalin

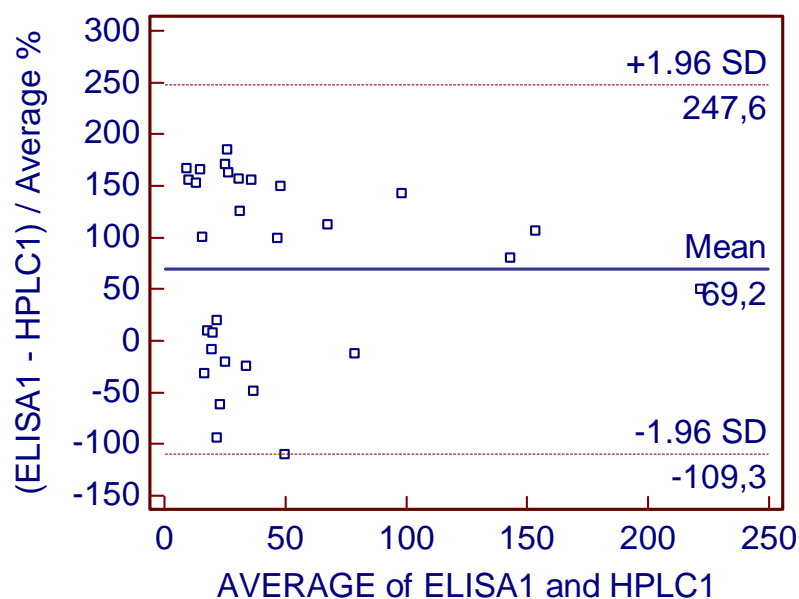


Slika 19: Passing&Bablok- regresija metode HPLC in ELISA za noradrenalin



Slika 20: Bland & Altmanov prikaz primerjave določitve noradrenalina

Kadar želimo primerjati dve metodi oziroma novo metodo z že obstoječo, nam graf po Blant & Altmanu prikazuje sipanje rezultatov dobljenih z uporabo dveh metod. Slika 20 prikazuje sipanje rezultatov noradrenalina, srednjo vrednost razporeditev rezultatov $72.2 \pm 43\%$, slika 21 pa primerjavo meritev adrenalina, kjer znaša srednja vrednost razporeditve rezultatov $96 \pm 89\%$, kar prikazuje veliko neujemanje med dobljenimi rezultati. Vzroki za to so predstavljeni v razpravi.



Slika 21: Bland & Altmanov prikaz primerjave določitve adrenalina

7. RAZPRAVA

V raziskavo smo vključili 30 vzorcev urina naključnih pacientov. Delali smo v dveh serijah v vsaki po 15 vzorcev z enomesečnim zamikom. Za analizo smo uporabili zbrani 24-urni urin, ki smo mu dodali 10 mL konzervansa 6M HCl in preprečili direktni stik s svetlobo. V vzorcih smo določali koncentracijo kateholaminov adrenalina in noradrenalina. Primerjali smo dve metodi: ELISA in HPLC, s katerima smo določali koncentracijo analitov. Zanimalo nas je ali z ELISA metodo dobimo enake rezultate kot z metodo HPLC. Za izvedbo ELISA testa smo uporabili aparaturo PERSONAL LAB proizvajalca Adaltis in komercialno pripravljene komplete (3 CAT EIA BA 10-1600) proizvajalca Labor Diagnostika Nord GmbH & Co.KG, Nordhorn, za določitev koncentracije adrenalina in noradrenalina. Za izvedbo HPLC metode pa smo uporabili aparaturo SURVEYOR ECD proizvajalca Thermo Finnigan in komercialno pripravljene komplete Clin Rep® za določevanje kateholaminov. Dobljene vrednosti kateholaminov smo statistično obdelali v računalniškem programu MedCalc. Pri vzorčenju in sprejemanju vzorcev smo upoštevali obstoječa pravila, ki narekujejo pravilno in ponovljivo delo torej pod enakimi pogoji, kot smo jih imeli ob prvi seriji, ker je to zelo težko izvedljivo skoraj nemogoče, lahko sklepamo na morebitne napake, ki bi se utegnile zgoditi zaradi tega. Napake, ki jih lahko zagrešimo pri zbiranju podatkov se sicer razlikujejo glede na vrsto podatka in glede na način kako smo podatke dobili. Vedno pa lahko napake razvrstimo v dve skupini v naključne in v sistematične. Naključne napake nastanejo zaradi premajhne natančnosti merskih metod, ali zaradi človeške napake. Pri izvedbi testa ELISA je to še posebej očitno, saj je prisotno ročno pipetiranje majhnih volumnov kar pomeni večjo možnost napak, ki jih lahko zagreši analitik. Korelacijski koeficient vzorcev prve serije, pri določevanju adrenalina, znaša 0.750, v drugi seriji pa 0.773, kar je dober približek in nakazuje na dokaj zanesljivo in primerljivo, ne samo pipetiranje, temveč obravnavo in vzorčenje celotnih vzorcev. Naključne napake sicer povečujejo variiranje podatkov, na končni rezultat statistične obdelave pa navadno ne vplivajo, saj se po zakonu o velikih številih med seboj izničijo in se pri velikem številu njihov vpliv izgubi. Drugače je s sistematičnimi napakami. Te so posledica konstantnih vzrokov, ki sistematično delujejo na vrednosti ali pristranost osebja, ki sodeluje pri zbiranju podatkov. Učinek sistematičnih napak se z večanjem števila enot ne izniči, ampak se sešteva. Napake te vrste lahko popolnoma spremenijo sliko in iz takih podatkov lahko izvajamo popolnoma napačne sklepe. Tudi pri

metodi HPLC se pri pripravi vzorcev izvaja ročno pipetiranje, vendar občutno manj kot pri ELISA tehniki. Aparatura za HPLC sama aplicira 25 μL vzorca, kar bistveno zmanjša možnost človeške napake pri rokovanju z vzorcem. Možni vzroki slabše analitične vrednosti merjenja kateholaminov z ELISA metodo so lahko tudi v uporabi že pripravljenih reagentov in dodatkov v obliki delno pripravljenih pufrov, substratov (preglednici 3,4). Zato pri vpeljavi nove analitske metode upoštevamo in preizkusimo tudi različne možne dobavitelje kontrol in pripravljenih kompletov, če ta možnost obstaja, saj se ELISA tehnika hitro razvija, izboljšuje se kvaliteta uporabljenega komercialno pripravljenega materiala. Pri našem raziskovalnem delu smo uporabili že pripravljene reagente, ki pa so bili namenjeni izključno samo za raziskovalne namene, nikakor ne za uporabo v rutini oziroma pri določevanju vrednosti analitov za preiskovance. Tudi iz tega podatka lahko sklepamo na mogoče nekoliko slabšo kvaliteto reagentov in posledično dobljeno nekoliko slabšo primerljivost rezultatov. Moramo pa omeniti, da so imunokemične metode, še posebno avtomatizirane ELISA tehnike v porastu in nenehnem razvoju in izboljšavah, vendar pa morajo metode, ki jih uporabljamo pa naj si gre za ELISA tehniko ali HPLC izpolnjevati različne zahteve glede specifičnosti, ustrezne meje detekcije, točnosti, natančnosti. Glavni vzrok, ki zmanjšuje zanesljivost rezultatov imunokemijskih metod so uporabljeni reagenti (predvsem protitelesa) in dejavniki, ki vplivajo na vezavo protiteles. Protitelesa morajo biti dovolj specifična za vezavo analita s tem se zmanjša moteč vpliv (interference) drugih snovi. Hkrati pa morajo protitelesa vezati različne oblike analita, ki ga želimo meriti. Vezavo motijo tudi hemoliza, lipemičnost in ikteričnost vzorcev. V našem primeru, ko smo analit določali iz vzorcev urina, bi lahko motile določitev adrenalin in noradrenalina, usedline v urinu, ki pa jih po pregledu vzorcev ni bilo. Pazili smo na pravilen pH urinskega vzorca, kar je še posebej pomembno pri določanju s HPLC metodo, kjer vzorec potuje z mobilno fazo in se komponente ločijo na stacionarni fazi v koloni. Pri izvedbi analize smo upoštevali vsa našeta priporočila in se držali predpisanih standardov ter obravnavali vsak vzorec, kot potencialno kužen in z etičnostjo rokovali z njim. Po končani analizi, na obeh aparaturah, smo začeli raziskovati, kolikšna je sploh biološka vrednost in kakšne rezultate nam daje ELISA tehnika, glede na metodo HPLC za namen določanja kateholaminov. Rezultate vzorcev smo vnesli v statistični program MedCalc in s pomočjo funkcijskih testov ugotovili normalno oziroma nenormalno porazdelitev rezultatov glede na razporeditev po Gaussovi krivulji. Normalna porazdelitev tudi Gaussova porazdelitev, je verjetnostna porazdelitev vrednosti statističnih

enot v statistični populaciji, ki je v grafični predstavitvi oblikovana v obliki normalne krivulje in je popolnoma podana in definirana z dvema parametroma in sicer z aritmetično sredino in s standardno deviacijo. Ugotovili smo, da naši rezultati spadajo v skupino nenormalno urejenih rezultatov, zato smo uporabili teste za to skupino. Glavna prednost neparametričnih testov je v njihovi neobčutljivosti za obliko porazdelitve populacije. Pomanjkljivost pa v tem, da je njihova moč manjša, kot moč parametričnih testov. Neparametrični testi so predvsem primerni za oceno značilnosti, manj pa za oceno mej in intervala zaupanja. Pri obdelavi podatkov smo določili mediano, ki je znašala pri določevanju adrenalina s HPLC metodo 19.2, z ELISA tehniko pa 28.8, kar nakazuje na razlike pri določanju z različnima metodama. Mediana za noradrenalin pri HPLC tehniki je bila 121.5 z ELISA tehniko pa 330.2, kar prikazuje večjo razliko v sami določitvi. Prednost mediane pred aritmetično sredino je ta, da podatki, ki močno odstopajo od ostalih podatkov manj vplivajo na njeno vrednost. Ko razporeditev podatkov ni normalna, ne moremo uporabiti metode standardnega odklona in ne t-testa, saj rezultat ni realen. Za obravnavo neparametrično razporejenih rezultatov imamo na voljo neparametrična testa, Wilcoxonov test, ki se deli še na parni in neparni Mann–Whitneyev test. Wilcoxonov test je neparametrični in temelji na predpostavki, da se povprečna ranga enega ali drugega vzorca razlikujeta samo v mejah slučajnosti, kadar sta seveda oba vzorca vzeta iz iste populacije. Ničelna domneva trdi, da je mediana razlik pri parih v celotni populaciji enaka nič. Če ničelna domneva drži, bi torej moralo biti med parnimi meritvami približno enako pozitivnih in negativnih razlik. V primeru adrenalina imamo 9 pozitivnih sprememb in 21 negativnih, v primeru noradrenalina pa samo 1 primer negativne spremembe in 29 pozitivnih. Preglednici 12 in 13 prikazujeta število pozitivnih in negativnih razlik med parnimi meritvami, torej ničelna domneva ne drži, saj v našem primeru nimamo enako število pozitivnih in negativnih sprememb. Korelacija, s katero smo ovrednotili rezultate delno nakazuje medsebojno povezanost dveh naključnih kvantitativnih spremenljivk od katere nobene ne izberemo sami vnaprej, ne govorimo o odvisnosti ene od druge temveč le o njuni medsebojni povezanosti, kar nakazuje korelacijski koeficient, ki v seriji adrenalina znaša 0.713 in je zanj podan 95% koeficient zaupanja (0.476-0.854) in v seriji določitve noradrenalina 0.887 s 95% koeficientom zaupanja (0.774-0.945). Koeficient korelacije je merilo za stopnjo povezanosti in pove samo, kako velika je korelacija, nikakor pa ne pove, če je povezanost značilna ali ne. Koeficient korelacije za neparametrično razporeditev računamo po Spearmanu in ima lahko vse vrednosti od -1 pri maksimalno negativni

korelaciji pa do + 1 pri maksimalno pozitivni korelaciji, če je koeficient korelacije enak nič pomeni, da med obema spremenljivkama ni nobene povezanosti. Določanja kateholaminov z ELISA tehniko ne moremo ovrednotiti za dobro niti kot slabo, tehnike in metode so med seboj različne, je pa seveda odvisno kaj želi naročnik (zdravnik, samoplačnik) analizirati in v kakšnem obsegu z določeno metodo. Razlika v kvaliteti metod obstaja, je pa vprašanje, kakšen postopek želimo s katero metodo izvesti, kvantitativni ali kvalitativni. Uporabljeni tehniki smo primerjali tudi s pomočjo grafa Blant & Altman, ki nam nakazuje primerjave povprečij dveh meritev. Kadar želimo primerjati dve metodi oziroma primerjati novo metodo z že obstoječo nam graf po Blant & Altmanu prikazuje razlike rezultatov dobljenih z uporabo dveh metod. Omejeni smo s standardno deviacijo, ki znaša 1.96, v našem primeru se vzorca št. 6 in 24 določitve adrenalina ne nahajata v območju dovoljene napake. Prav tako se vzorec št. 6 iz serije določanja noradrenalina ne nahaja v dovoljenem območju, kar nakazuje na preveliko odstopanje pri meritvi z ELISA testom. Vrednost okoli katerega sipajo rezultati je pri adrenalinu $69 \pm 89\%$, kar nakazuje na ekstremno odstopanje, ki jo lahko pripišemo reagentom, namenjenim samo v raziskovalne namene, motnjam imunokemijske detekcije, slabemu pipetiranju, pri noradrenalinu pa je vrednost $72.2 \pm 43\%$. Podatke smo obdelali tudi s Passing & Bablok-ovo regresijo, ki nam prikazuje linearno regresijo neodvisno od uporabljene metode. Graf prikazuje odstopanje od linearne porazdelitve pri vzorcu št. 16 in 17 v seriji adrenalina z ELISA tehniko. Prav tako v seriji določanja noradrenalina odstopajo vrednosti pri vzorcih št. 6, 17 in 13 pri določitvi z ELISA testom. Passing & Bablok-ova regresija je metoda, ki ima nalogo določiti enačbo krivulje, ki se najbolje prilega podatkom dveh spremenljivk pri istih enotah, če so podatki prikazani na korelacijskem diagramu. Teoretično so krivulje regresije lahko najrazličnejših oblik, vendar je to premica, ki poteka po najboljšem možnem prileganju vseh razpršenih vzorcev na grafu. Enačba premice za adrenalin, ki prikazuje najboljše prileganje podatkom dveh spremenljivk je $y = 5.284 + 2.645x$, za noradrenalin pa $y = - 74.109 + 2.790x$.

Ujemanje rezultatov z linearnostjo premice na Passing Babloko-vem grafu ni popolnoma ujemačoča še posebno, če pogledamo ELISA tehniko. Kažejo se močna odstopanja, ki nakazujejo na še ne dovolj razvito metodo ELISA za uporabo v diagnostične namene v našem laboratoriju pri določanju kateholaminov. ELISA tehnika ima nekaj dobrih lastnosti, saj je glede na HPLC dosti hitrejša metoda sploh za večje število vzorcev. Glede na uporabljeno število vzorcev lahko del napake pripišemo tudi manjšemu številu analiziranih vzorcev, vendar za neko minimalno gotovost in prikaz ujemanja in

uporabnosti primerjanih metod, se sklicujemo na tako imenovan pilotski projekt, ki je seveda omejen tudi z vidika financ, zato že zaradi tega in tehničnih zadržkov, kot so prostor in razpoložljivost aparatov nismo nadaljevali raziskavo z mogoče 60 ali 120 vzorci, ki bi z gotovostjo potrdili ali ovrgli postavljeno hipotezo o uporabi ELISA tehnike kot rutinski metodi za določevanje kateholaminov. Metode razdelimo v več sklopov definitivne, referenčne in delovne. Za analizo v rutini uporabljamo delovne metode, ki dosegajo vse standarde dobre delovne metode in jih uporabljamo za točno določen namen za analitiko, ki jo od nas zahteva naročnik oziroma zdravnik, določamo kvalitativno oziroma kvantitativno. Za analizo vzorcev uporabljamo metodo, ki je zanesljiva, dobra, hitra specifična, občutljiva, daje ponovljive rezultate in je primerna za naš namen analize, ki jo želimo izvesti.

8. SKLEP

V diplomski nalogi smo se spraševali, ali bi lahko z ELISA metodo dosegali rezultate pri določevanju kateholaminov, kot jih s tehniko HPLC. Ali bi HPLC metodo lahko zamenjali z ELISA tehniko in s kakšnim namenom želimo zamenjati dražjo HPLC tehniko s cenejšo ELISA tehniko? Pri postavljanju vprašanj in nadaljnem raziskovanju smo prišli do ugotovitev, ki temeljijo na praktičnih dokazih, ki smo jih podprli s statističnimi izračuni, ki ne podpirajo zamenjave tehnike HPLC z ELISA metodo. Namen določanja kateholaminov je odkrivanje bolezni kot so feokromocitom, nevroblastom in druge, za tak namen je HPLC metoda dovolj dobra in za kapaciteto vzorcev, ki se pojavljajo v laboratoriju še dovolj hitra. Ker pa se ELISA tehnike nenehno razvijajo in izpopolnjujejo ne moremo z absolutno gotovostjo trditi, da se določevanje kateholaminov v tem laboratoriju v prihodnje ne bo preneslo na ELISA tehniko. Na trg prihajajo vedno novi in izboljšani komercialni reagenti, bolj občutljivi in specifični, ki potrebujejo vedno manjšo količino vzorca, kar je prijaznejše do pacienta. S hitrim strokovnim razvojem lahko v prihodnje pričakujemo boljše in ujemajoče rezultate določanja kateholaminov z ELISA tehniko v primerjavi s HPLC metodo. Za namene določanja kateholaminov v sklopu Hormonskega laboratorija in Laboratorija za specialne tekočine v Ljubljani, je metoda HPLC dovolj dobra in se za menjavo le-te nismo odločili.

LITERATURA

1. Alonso R, Lopez-Caviella I: Gonadal steroids and neuronal function, *Neurochemical Research*, 1998: 675-688
2. Spaić Damjan: Priprava kvantitativnega ELISA testa za določanje katepsina D v bioloških vzorcih, diplomsko delo Ljubljana, 1996
3. Vozelj Marjan: Temelji imunologije, Ljubljana, 2000: 112-113-303
4. Vozelj Marjan: Imunologija, Ljubljana, 1996: 87-88
5. Landbrg L Young J: Catecholamines and the adrenal medulla. In Wilson JD, Foster DW: *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia, WB Saunders, 1985: 891-965
6. Willimas SM, Greer M: Estimation by gas chromatography of urinary homovanillic acid and vanilylmandelic acid in neuroblastoma. *Meth Med Res*, 1970: 12, 106-114
7. Weil- Malherbe H: The chemical estimation of catecholamines and their metabolites in body fluids and tissue extracts. In Glick D: *Methods of Biochemical Analysis*. New Yourk, Interscience Publishers, 1971: 119-152
8. Anderson Shauna C, Cockayne Susan: *Clinical Chemistry, Concepts and Applications*, W.B. Saunders Company, 1993: 548-550
9. Tyrell BJ, Aron DC, Forsham PH: Glucocorticoids and adrenal androgens. In Greenspan Basic and Clinical Endocrinology. Norwalk CT, 1991: 323-379
10. Kotnik Vladimir, Čurin Šerbec V, Ihan A, Jeras M, Malovrh T, Simčič S, Škoberne M, Wraber B: *Imunologija, priročnik za vaje*, Ljubljana, 2001: 27-28
11. <http://www.google.si/search?hl=sl&q=dolo%C4%8Danje+protiteles&meta=&aq=f&oq> (13.8.2009)
12. Prošek Mirko, Križman Mitja, Milivojevič Luka: *Kromatografija- seminar*, Trzin, 2004: 1-7
13. Prosen Helena: *Analiza sledov nekaterih pesticidov v pitnih in površinskih vodah s HPLC- MS*, magistrsko delo, Ljubljana, 1996
14. Skoog Douglas A, West Donald M, Holler James F, Crouch Stanley R: *Analytical Chemistry an Introduction*, United States of America, 1999: 683-689
15. Vanilja, Kukavičevka vanilja; <http://wapedia.mobi/sl/Vanilja> (12.8.2009)
16. Cemič Alenka, *Motorika predšolskega otroka*; <http://209.85.135.132/search?q=cache:zyYGBC6BYQ8J:www.studij.slo5.net/dokum>

- enti/motorikacemic.doc+ekstrapiramidalna+motorika&cd=5&hl=sl&ct=clnk&gl=si
(16.8.2009)
17. <http://www.ffa.uni-lj.si/raziskave/laboratorij-za-molekularno-diagnostiko/seznam-laboratorijskih-preiskav-in-storitev/comt-1947-ga.html> (16.8.2009)
 18. Lawrence K, Altman, Susan J Blumenthal, Philip K, Bondy, Preston V, Dilts, Douglas A Drossman, Eugene P Frenkel, Glen O Gabbard, Robert A Hoekelman, Gerarld L Mandelli, Edwina A McConnell, Victor Rossi G, Paul H. Tanser: The Merc Manual of Medical Information (home edition), Merc & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey, U.S.A, 1997: 385-694
 19. Osredkar Joško: Izbrana poglavja iz klinične kemije, Ljubljana, 2005: 15-16
 20. <http://www.kobis.si/pprogram-hplc-surveyor.html> (17.8.1009)
 21. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/homedirs/11/Predmeti/IFA/IFA4_HPLC_.pdf
(17.8.2009)
 22. Kraemer WJ, Ratamess: Hormonal responses and adaptations to resistance exercise and training. Sports Med, 2005: 339-361
 23. Young JB, Landsberg L. Pheochromocytoma. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Red Larsen Peds. Williams textbook of endocrinology, Philadelphia: W.B. Saunders, 1998: 705-728
 24. Starkman MN, Zelnik TC, Nesse RM, Cameron OG: Anxiety in patients with pheocromocytomas. Arch Intern Med, 1985: 145-248
 25. Noradrenalin, Biosinteza; <http://sl.wikipedia.org/wiki/Noradrenalin> (18.8.2009)
 26. HPLC Applications Support; <http://www.gentechscientific.com/10420.htm>
(18.8.2009)
 27. Pocajt, Širca, Anatomija in fiziologija;
<http://www2.arnes.si/~ljsszs/mainweb/gradiva/anatomija/index.html> (19.8.2009)
 28. Derivati holesterola, lipoproteini; <http://www2.mf.uni-lj.si/~zakeljm/lipoproteini.pdf>
(19.8.2009)
 29. Rebolj Klemen, Ostala psihotropna zdravila, Zaviralci beta-adrenergičnih receptorjev
<http://marela.uni-mb.si/skzp/Interno/psihofarmaki/Ostalapsihozdravila.doc>
(20.8.2009)
 30. Adamič Štefan: Temelji biostatistike, Univerza v Ljubljani, Medicinska Fakulteta, Ljubljana, 1989: 7-97