

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

STAŠA REP

DIPLOMSKA NALOGA
VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO
VŠŠ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

STAŠA REP

**KLINIČNI POMEN DOLOČANJA KONCENTRACIJE METABOLITOV ADRENALINA IN
NORADRENALINA V PLAZMI PRI BOLNIKI Z NEUROBLASTOMOM (SLO)**

**CLINICAL SIGNIFICANCE OF DETERMINING THE CONCENTRATION OF METABOLITE
LEVELS OF ADRENALINE AND NORADRENALINE IN PATIENTS WITH NEUROBLASTOMA
(ENG)**

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je strokovno – raziskovalna študija laboratorijske biomedicine na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Diplomsko delo je bilo opravljeno v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Laboratorijske meritve sem sama oziroma so zaposleni opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo.

Staša Rep

Ljubljana, september 2015

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar

Mentor: prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Rok Frlan

ZAHVALA

Za strokovno vodenje, nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag.farm.

Iskreno se zahvaljujem svoji družini, materi Mirjani Rep in očetu, Milanu Rep, ki sta mi omogočila študij in mi z vso ljubeznijo in potrpljenjem stala ob strani v vseh lepih in slabih trenutkih.

Diplomsko delo posvečam svoji družini.

*“Once you decide on your occupation you must **immerse yourself in your work**. You have to **fall in love with your work**. **Never complain about your job**. You must **dedicate your life to mastering your skill**. That's the secret to success, and is the key to being regarded honorably.”*

Jiro dreams of sushi

KAZALO

POVZETEK	6
SEZNAM OKRAJŠAV	8
1. UVOD	10
1.1. SREDICA NADLEDVIČNE ŽLEZE	10
1.2. IZLOČANJE HORMONOV SREDICE	11
1.2.1. ADRENALIN	11
1.2.2. NORADRENALIN	12
1.2.3. DOPAMIN	13
2. MEHANIZEM DELOVANJA HORMONOV (KATEHOLAMINOV)	14
3. METABOLIZEM KATEHOLAMINOV	15
3.1. BIOSINTEZA KATEHOLAMINOV	15
3.2. METABOLIZEM KATEHOLAMINOV	15
4. MOTNJE V DELOVANJU NADLEDVIČNIH ŽLEZ	17
4.1. FEOKROMOCITOM	17
4.2. NEUROBLASTOM	18
5. DIAGNOSTIKA	21
5.1. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA	22
6. NAMEN DELA	25
7. EKSPERIMENTALNI DEL	26
7.1. OPIS SKUPINE PACIENTOV	26
7.2. METODE ZA DOLOČANJE METANEFRIKOV IN NORMETANEFRIKOV V PLAZMI	26
7.2.1. ELISA TEST	26
7.3. OPREMA – VSEBINA KOMPLETA	27
7.3.1. REAGENTI ZA PRIPRAVO VZORCA:	27
7.3.2. REAGENTI ZA ELISA:	28
7.3.3. OSTALI MATERIALI IN OPREMA, KI NISO PRILOŽENI V KOMPLETU	29
7.3.4. PREGLEDNICA – STANDARDI ZA IZVEDBO TESTA ELISA	29
7.4. ODVZEM VZORCA	29
7.5. PRIPRAVA VZORCA	30
7.5.1. PRIPRAVA REAGENTOV	30
7.5.2. PRECIPITACIJA	30
7.5.3. ACILACIJA	31
7.6. IZVEDBA TESTA	31
7.6.1. PRIPRAVA REAGENTOV	31
7.6.2. METANEFRIK ELISA	31
7.6.3. NORMETANEFRIK ELISA	32
7.7. IZRAČUN REZULTATOV	33

7.8. ZNAČILNOSTI TESTA	33
7.8.1. REFERENČNE VREDNOSTI	33
7.8.2. VREDNOTENJE REZULTATOV IN OPREDELITEV NEKATERIH VALIDACIJSKIH PARAMETROV	33
7.8.2.1. OBČUTLJIVOST	34
7.8.2.2. PONOVLJIVOST V SERIJI IN IZVEN SERIJE	35
7.8.2.3. SPECIFIČNOST	35
8. REZULTATI	37
8.1. IZRAČUNI	37
8.1.1. POVPREČJE VSEH BOLANIH - RESNIČNO OZIROMA PRAVILNO POZITIVNIH (PP)	40
8.1.2. POVPREČJE VSEH ZDRAVIH - RESNIČNO OZIROMA PRAVILNO NEGATIVNIH (PN)	41
8.1.3. POVPREČJE VSEH MERITEV	41
8.2. PONOVLJIVOST V SERIJI IN IZVEN SERIJE	41
8.2.1. POVPREČJE MERITEV	42
8.2.1. STANDARDNI ODKLON	42
8.2.2. KOEFICIENT VARIACIJE	43
9. RAZPRAVA	44
10. SKLEP	48
11. LITERATURA	49
12. PRILOGE	52
12.1. PREGLEDNICE	52
12.2. TABELE	57

POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kako specifične in občutljive so določite plazemskih kateholaminov oziroma metabolitov pri pacientih z motnjami v delovanju nadledvične žleze. Sodelovali smo pri zadnjih vzorčenjih, medtem ko sem podatke o spolu in starosti s potrjeno diagnozo dobila na Pediatrični kliniki Ljubljana iz kartotek pacientov. Ob delu v laboratoriju smo pridobili ostale rezultate iz katerih smo izračunali specifičnost in občutljivost po formulah.

Metodo smo ovrednotili z analizo natančnosti glede na ponovljivost v in izven serije, rezultate meritev preiskovanih vzorcev pa z diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo ter pozitivno in negativno napovedno vrednostjo. Dokazali smo, da je določitev normetanefrina in metanefrina z ELISA testom izredno občutljiv in specifičen test. Občutljivost imunokemijskega testa je kar 100 odstotna, prav tako pa ga spremlja visoka stopnja specifičnosti - 94-odstotna. Diagnostika prostih metanefrinov v plazmi ni primerna kot rutinski test, vendar je njegova uporaba primerna, kadar testiranje urina ne zagotavlja jasne rezultate. Med 133 preiskovanci je bilo 6 resnično (pozitivno) bolnih, ostalih zdravih pa 121. Negativno napovedane vrednosti testa so bile dobre; lažno negativnih je bilo 8 in resnično negativnih 121, kar nakazuje, da je malo verjetno, da je imela katera oseba od teh nevroblastom. 100% občutljiv test da malo negativnih rezultatov, tj. malo resnično bolnih, ki jih test ne prepozna in jih označi kot zdrave. Naša metoda je 94% specifična, kar pomeni, da je test pri 94 % bolnikov, ki nimajo bolezni negativen, pri ostalih 6 %, ki prav tako nimajo bolezni, pa je lažno pozitiven. Pacientov s potrjeno diagnozo je bilo 6, tj. tistih resnično pozitivnih. Vse študije so pokazale, da ima EIA metoda, s katerim merimo metanefrine in normetanefrine v plazmi, boljše karakteristične lastnosti kot diagnostika kateholaminov, ki jih opravimo v urinu. Vse raziskave kažejo, da imajo imunokemijske metode več kot 90-odstotno občutljivost ter izredno visoko specifičnost. Da bi zagotovili še večjo natančnost metode, bi v prihodnje razmislili o formiranju referenčnih območjih metabolitov kateholaminov tj. normetanefrinov in metanefrinov, ki bi se delili na starost otrok, pri tem pa bi upoštevali razlike med spoloma. Referenčne vrednosti bi tako bile ustvarjene z analizo bioloških vzorcev referenčnih oseb, pri katerih ne moremo potrditi bolezni, ki bi lahko vplivala na spremembo rezultata laboratorijske preiskave. Iz referenčnih vrednosti bi tako izračunali referenčna območja, ki bi v primeru normalne porazdelitve predstavljala 95 % vrednosti. V literaturi je na splošno zelo malo podatkov o

referenčnih vrednostih za metanefrine in normetanefrine. Ločene vrednosti glede na spol in starost otrok so potrebne, saj mejne vrednosti kažejo na značilne razlike med ženskami in moškimi.

SEZNAM OKRAJŠAV

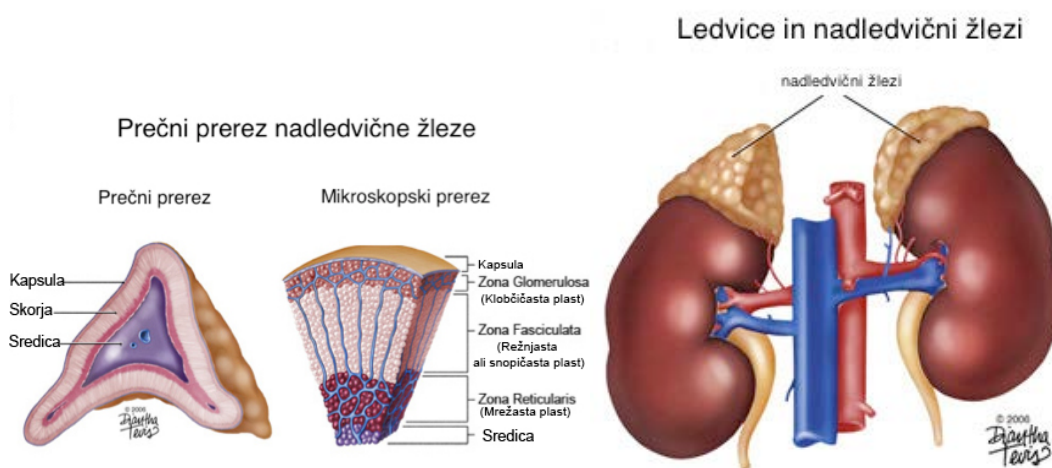
- **Ab1** - primarna protitelesa (angl.: Antibody)
- **Ag - Ab1** - kompleks antigen - protitelo (angl.: complex antigen - antibody)
- **AP** - alkalna fosfataza (angl.: Alkaline phosphatase)
- **β-GAL** - β-D-galaktozidaza (angl.: Beta-galactosidase)
- **cAMP** - ciklični adenzin monofosfat (angl.: Cyclic Adenosine Monophosphate)
- **COMT** - katehol-*O*-metil transferaza (angl.: Catechol-O-methyl transferase)
- **CT** - računalniška tomografija (angl.: Computed Tomography)
- **CŽS** - centralno živčni sistem
- **DOPA** - L-dihidroksi-fenilalanin (angl.: L-dihydroxy-Phenylalanine)
- **E** - epinefrin, adrenalin (angl.: epinephrine)
- **EDTA** - etilendiamintetraocetna kislina (angl.: Ethylenediaminetetraacetic acid)
- **EIA** - encimsko imunska metoda (angl.: Enzyme Immuno Assay)
- **ELISA** - encimsko imunski test (angl.: Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- **HPLC** - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography)
- **HRP** - hrenova peroksidaza (angl.: HorseRadish Peroxidase)
- **HVA** - homovanilinska kislina (angl.: Homovanillic Acid)
- **LOD** - meja zaznavnosti (angl.: limit of detection)
- **LOQ** - meja določljivosti (angl.: limit of quantitation)
- **MAO** - monoaminooksidaza (angl.: Monoamine oxidase)

- **MHPG** - 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol (angl.: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglycol)
- **MIBG** – *meta*-jodobenzilguanidin (angl.: metaiodobenzylguanidin)
- **MN** - metanefrin (angl.: metanephrine)
- **MRI** - slikanje z magnetno resonanco (angl.: Magnetic Resonance Imaging)
- **NE** - noradrenalin (angl.: noradrenaline)
- **NMN** - normetanefrin (angl.: normetanephrine)
- **OD** - optična gostota (angl.: Optical Density)
- **RIA** - radioimunološka metoda (angl.: Radioimmunoassay)
- **RSD** - relativni standardna deviacija ali relativni standardni odmik (angl.: relative standard deviation)
- **RTG** - rentgen (angl.: radioisotope thermoelectric generator)
- **TH** - tirozin-hidroksilaza (angl.: Tyrosine-Hydroxylase)
- **TLC** - tankoplastna kromatografija (angl.: Thin Layer Chromatography)
- **UK** - umeritvena krivulja (angl.: calibration curve)
- **UZ** - ultrazvok (angl.: Ultrasound)
- **VMA** - 3-metoksi-4-hidroksi-mandljeva kislina oz. vanilil mandljeva kislina (angl.: Vanillylmandelic acid)
- **KIKKB** - Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo

1. UVOD

1.1. SREDICA NADLEDVIČNE ŽLEZE

Sredica nadledvične žleze (medulla) je del neuroendokrinega sistema in je po svoji histološki zgradbi zgrajena iz živčnih celic, medtem ko skorjo nadledvične žleze (cortex) sestavljajo trije tipi žlezni celic oz. plasti. Skorja nadledvične žleze je pod nadzorom hipofiznih hormonov, medtem ko je sredica pod neposrednim nadzorom živčevja. Sredica, ki je ektodermalnega izvora, se poleg svoje histološke zgradbe razlikuje tudi po funkciji, saj je zanjo značilno, da je prostor nastajanja kateholaminov ter nekaterih peptidov.⁽¹⁾ Kromafine celice izdelujejo kateholamina adrenalin in noradrenalin (pa tudi nakatere vazoaktivne peptide, vključno z enkefalini). V sredici nadledvične žleze so tudi ganglijske celice (simptični sistem), ki so razpršene po tkivu sredice. Izločanje adrenalina in noradrenalina je pod kontrolo preganglionarnih (holinergičnih) simpatičnih nevronov.



Slika 1: Nadledvična žleza

Nadledvična žleza (glandula suprarenalis), ki sta parni endokrini žlezi, se nahajata nad ledvicami. Celice nadledvične sredice tvorijo in hranijo svoje peptidne hormone in jih sproščajo zgolj v majhnih količinah. Pri telesnih in duševnih naporih oziroma stresu pa se ti hormoni pod vplivom avtonomnega živčnega sistema izločajo v velikih količinah. Ob sprostitvi adrenalin in noradrenalin vplivata na metabolne procese v celicah in delujeta kot katalizatorja, ki mobilizirata proste maščobne kisline iz založnih tkiv ter glukozo in mlečno kislino iz glikogena.⁽²⁾ Delujeta na srčno mišico in gladke mišice v žilah, povečata tonus (napetost) žilja, pospešita celično presnovo ogljikovih hidratov in maščob, pospešita srčni

utrip, povečata tonus sfinktrov (mišic zapiralk) in pripravita organizem na boj ali beg. Sproščanje hormonov sproži živčno vzbujenje v odgovor na fizični ali mentalni stres preko kateholaminov in kortikosteroidov, vključno s kortizolom in adrenalinom. Hormoni se v tem primeru vežejo na posebne receptorje v plazemski membrani celice, imenovane adrenoreceptorji. Aktivnost sredice nadležičnih žlez uravnava hipotalamus.^(2,3)

1.2. IZLOČANJE HORMONOV SREDICE

Sredica (Medulla) izloča v kri nevrohormone adrenalin, noradrenalin in dopamin, ki spadajo v skupino kateholaminov in so derivati aminokislina tirozina.⁽⁴⁾ Čeprav je njihovo nastajanje značilno za sredico nadležične žleze, lahko ti nastajajo tudi v postganglijskih vlaknih simpatičnega živčnega sistema. Ob ustreznem dražljaju se sproščajo z eksocitozo. Signal za sprostitvev pride preko centralnega živčnega sistema, kot mediator služi acetilholin v preganglionarnih vlaknih.

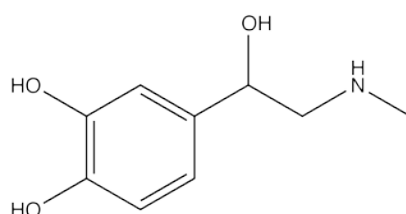
Izločanje kateholaminov lahko uravnavamo na dva načina:

- ✚ **lokalno na nivoju sproščanja:** kateholamini preko presinaptičnih receptorjev zaviralno vplivajo na lastno sproščanje,⁽⁵⁾
- ✚ **centralno:** stimulus iz centralnega živčevja kot posledica integracije različnih vplivov preko simpatičnega živčevja povzroči sproščanje kateholaminov v efektornih organih.⁽⁵⁾

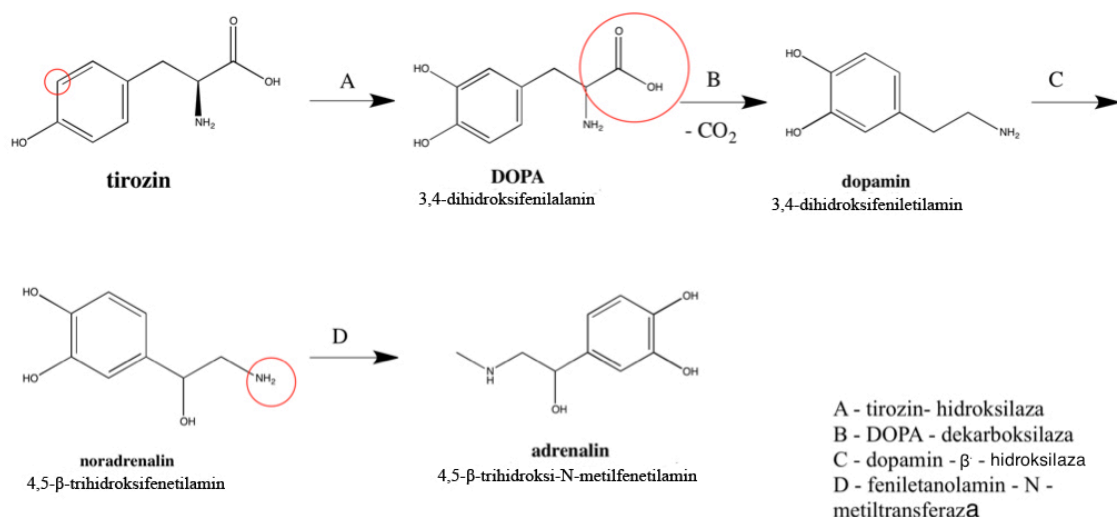
1.2.1. ADRENALIN

Adrenalin (angl.: Epinephrine, Slika 2) je hormon, ki nastaja v sredici nadležične žleze, kot neurotransmitor pa ga izločajo tudi živčni končiči. V organizmu se sintetizira iz aminokislina tirozina, kar je razvidno iz Slike 3. Adrenalin se veže na adrenergične receptorje⁽⁶⁾ v celični membrani tarčne celice, za katere je značilno, da se kot receptorski proteini povežejo z G – proteinom. To sproži serijo reakcij znotraj celice, posledica katerih je povečan nastanek sekundarnega obveščevalca cAMP. Ta lahko povzroči različne učinke, zato je delovanje adrenalina odvisno od tipa adrenergičnega receptorja. Epinefrin lahko npr. povzroči tako konstrikcijo (α adrenoceptorji) kot dilatacijo (β -adrenoceptorji) žil – odvisno od tkiva.^(7, 8) Pomemben je za normalno delovanje organizma in ohranjanje homeostaze, ob stresu iz okolja ali nizki koncentraciji glukoze v krvi pa se njegovo izločanje poveča. Adrenalin v splošnem povzroči kontrakcijo srčne mišice in relaksacijo bronhialnih mišic ter mišic prebavnega trakta, s stimulacijo glikogen fosforilaze poviša

razgradnjo glikogena v jetrih in z aktivacijo lipaze poveča sproščanje maščobnih kislin iz triacilglicerolov, poveča izločanje glukagona, inhibira glikogen sintazo in izločanje inzulina. Bistveni rezultati so povišan krvni pritisk in frekvenca srca, preusmeritev krvi iz visceralnih organov v mišičje, bronhodilatacija in zvišanje ravni glukoze v krvi. Adrenalin je močan vazopresor in bronhodilatator ter pomembno reanimacijsko zdravilo. V medicini se uporablja predvsem pri intenzivnejši anafilaksiji, srčnih zastojih, pa tudi za nadziranje krvavitve in v kombinaciji z lokalnimi anestetiki.^(9,10)



Slika 2: Strukturna kemijska formula adrenalina



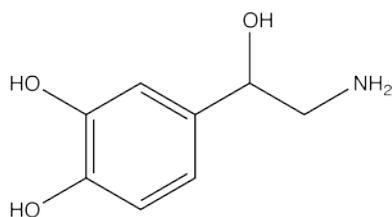
Biosinteza kateholaminov

Slika 3: Biosinteza kateholaminov

1.2.2. NORADRENALIN

Noradrenalin (angl.: Norepinephrine, Slika 4) je hormon in živčni prenašalec, ki ga izloča nadledvična žleza, skupaj z adrenalinom in dopaminom. V telesu se sintetizira v sredici nadledvične žleze iz tirozina preko več encimsko kataliziranih reakcij (Slika 3).

Noradrenalin je eden izmed stresnih hormonov, ki se sprošča zlasti v stresnih razmerah in je poleg serotonina eden najpomembnejših “hormonov sreče”. Ob enem pa povzroča budnost ter je prisoten pri obrambi telesa v stresnih situacijah. Telo pripravi na “boj ali beg”, tako da pospeši srčni utrip, poveča dovod krvi do skeletnih mišic ter pospeši glikogenolizo. V zdravstvu se uporablja kot zdravilo v primeru septičnega, kardiogenega ali anafilaktičnega šoka, pri zastrupitvi z vazodilatanti (snovmi, ki širijo žile) in ob prenizkem krvnem tlaku. Ponavadi se daje intravensko v zelo nizkih odmerkih, saj lahko v nasprotnem primeru pride do okvar črpalne sposobnosti srca. Za preprečevanje krvavitve med operacijami ga uporabljajo tudi lokalno. ⁽¹¹⁾



Slika 4: Strukturna kemijska formula noradrenalina

1.2.3. DOPAMIN

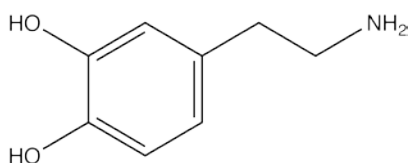
Dopamin (angl.: Dopamine) spada med biogene amine in je derivat aminokislone tirozina, ki se s procesom hidroksilacije sintetizira v DOPA-o preko tirozin hidroksilaze, temu pa sledi dekarboksilacija DOPA, ki jo katalizira encim DOPA dekarboksilaza. (Slika 5, Slika 3). V nekaterih živčnih celicah se sinteza nadaljuje do noradrenalina in adrenalina, ki sta prav tako živčna prenašalca. Nastaja v nadledvični žlezi in centralnem živčnem sistemu, večinoma v celicah “substantie nigre” in ventrosegmentalnega jedra, ki sta v strukturi srednjih možganov. Dopamin je prav tako nevrottransmitor, ki aktivira dopaminske receptorje D1, D2, D3, D4 in D5. V nevronih se dopamin po sintezi shranjuje v vezikle. Dopamin se prenaša po možganih po 4 glavnih dopaminergičnih poteh:

- Mezkortikalni
- Mezolimbčni
- Nigrostriatni
- Tuberoinfundibularni

Ko prenese živčni impulz, se dopamin vrne v presinaptično celico, ter ponovno sodeluje pri prenosu signala ali pa ga katehol-*O*-metil transferaza razgradi v homovanilinsko

kislino. Encimska razgradnja lahko poteče tudi v sinaptični reži, pri čemer sodeluje monoaminoksidaza. ⁽⁸⁾

Dopamin je glavni prenašalec v živcih, ki povezuje jedro bazalnih ganglijev v možganih in nadzira prostovoljno gibanje. Poškodba teh živcev oz. nezadostna tvorba dopamina v dopaminergičnih celicah, specifično v predelu "substantie nigre", je vzrok simptomov Parkinsonove bolezni. ^(4, 8) Osnovni razlog za razvoj bolezni je degeneracija (propad) živčnih celic v bazalnih ganglijih in s tem zmanjšana koncentracija dopamina.



Slika 5: Strukturna kemijska formula dopamina

2. MEHANIZEM DELOVANJA HORMONOV (KATEHOLAMINOV)

Kateholamini delujejo na CŽS, srce in krvni obtok ter na metabolizem ogljikovih hidratov in lipidov. Njihovi učinki delujejo na vse organe, kateri stimulirajo simpatikus z vezavo na α in β -adrenergične receptorje. α -adrenergični receptorji so specifični za adrenalin in noradrenalin, ki za svoj prenos potrebujejo kalcijeve ione (Ca^{2+}), medtem ko so β -adrenergični receptorji specifični za adrenalin in za prenos signala uporabljajo adenilat ciklazni sistem.

Noradrenalin je glavni hormon cirkulacije in povzroča vazokonstrikcijo (razen v koronarnih žilah), povečanje krvnega tlaka, srčnega utripa in konstrikcijo srca. Nevroni, ki proizvajajo noradrenalin v možganih, so vključeni v regulacijo sanj, razpoloženja in patologijo depresije. Noradrenalin se veže na α_1 , α_2 , β_1 adrenergične receptorje.

Adrenalin v majhnih količinah širi žile in deluje na krvni obtok in na metabolizem ogljikovih hidratov in lipidov. Z vezavo na β -adrenergične receptorje povzroča glikogenolizo in lipolizo, zavira izločanje inzulina in povzroča povečanje koncentracije glukoze v krvi. Zaradi glikogenolize se v mišicah povečuje koncentracija laktata, medtem ko se zaradi lipolize povečuje koncentracija prostih maščobnih kislin v serumu. Adrenalin se veže na α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , in β_3 adrenergične receptorje.

Dopaminu se danes pripisuje fiziološka vloga v perifernem avtonomnem živčnem sistemu, čeprav so mu v preteklosti pripisovali, da nastopa kot inhibitor pri sintezi adrenalina in noradrenalina. Specifični receptorji za dopamin se nahajajo v koronarnih krvnih žilah, ledvicah in drugih organih. Deluje vazokonstriksijsko in povzroča hipertonijo.^(8,12)

Aktivacija kateholaminskih hormonov poteka preko adrenergičnih receptorjev, ki so sklopljeni s proteinom G.

3. METABOLIZEM KATEHOLAMINOV

3.1. BIOSINTEZA KATEHOLAMINOV

Kateholamini so biogeni amini, ki imajo na benzenov obroč pritrjeno alikilaminsko verigo ter dve hidroksilni skupini. Zaradi svoje kateholne zgradbe kateholamini kažejo lastnosti alkoholov, aminov in fenolov.⁽¹³⁾ Sintetizirajo se iz tirozina, ki ga encim tirozin hidroksilaza pretvori v 3,4-dihidroksifenilalanin (*DOPA*), iz katerega z encimom *DOPA* – dekarboksilaza nastane 3,4-dihidroksifeniletamin (*dopamin*). Ta se prenese v granule simpatičnih živčnih končičev in v jedro nadledvične žleze, kjer se s hidroksilacijo na β -položaju stranske verige z encimom dopamin- β -hidroksilazo pretvori v 4,5, β -trihidroksifenetilamin (*noradrenalin*), ki se skladišči v granulah. V jedru nadledvične žleze se noradrenalin sprosti iz granul in z encimom feniletanolamin-*N*-metiltransferazo (PNMT), ki katalizira prenos metilne skupine iz *S*-adenozilmetionina na noradrenalin⁽¹³⁾, pretvori v 4,5, β -trihidroksi-*N*-metilfenetilamin (*adrenalin*)⁽¹³⁾ (Slika 3).

Kateholamini se po živčni stimulaciji sproščajo iz sekrecijskih granul z eksocitozo. Kemična stimulacija je vezana na prisotnost acetilholina in pretok kalcijevih ionov, proces pa zahteva še energijo v obliki ATP. Po končanem učinkovanju se kateholamini hitro odstranijo z mesta delovanja. Inaktivirajo se na različne načine:

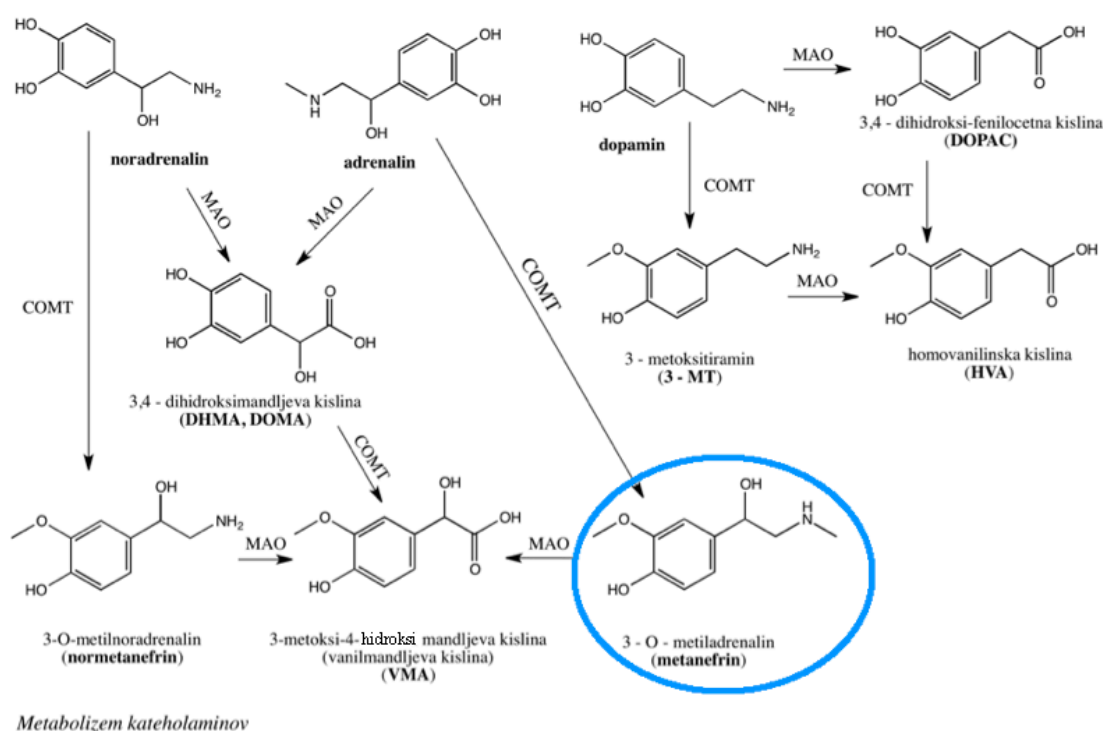
- s ponovnim privzemom v granule,
- s pretvorbo v metabolite,
- ali pa se izločijo kot proste ali konjugirane aminokisliline⁽¹³⁾

3.2. METABOLIZEM KATEHOLAMINOV

Za kateholamine je veljalo, da se presnavljajo na lokacijah, oddaljenih od njihovih območij za sintezo in sproščanje, ko enkrat vstopijo v zunajcelično tekočino ali celo v krvni obtok.

Dejstvo je, da večina presnove kateholaminov poteka v isti celici, kjer se proizvajajo amini. Pomembno je, da se večina te presnove pojavi neodvisno od zunajceličnega sproščanja - eksocitoze, in tako se le majhen delež kateholaminskih metabolitov tvori iz kroženja kateholaminov.⁽¹⁴⁾ Kateholamini se presnavljajo z oksidacijo amino skupine z encimom monoaminooksidazo (MAO) in z metiliranjem s katehol-*O*-metil transferazo (COMT).⁽⁴⁾ Z delovanjem katehol-*O*-metiltransferaze na hidroksilne skupine na tretjem položaju benzenskega obroča iz noradrenalina nastane normetanefrin, iz adrenalina metanefrin, iz dopamina pa 3-metoksitiramin. Z delovanjem monoaminooksidaze (MAO) iz metanefrina in normetanefrina nastane 3-metoksi-4-hidroksi-mandljeva kislina, VMA. Z delovanjem MAO nastane končni produkt metabolizma dopamina in sicer homovanilinska kislina (HVA).

V kolikor najprej deluje MAO, iz noradrenalina in adrenalina nastane 3,4-dihidroksimandljeva kislina, ki se ob prisotnosti COMT pretvori v končni produkt metabolizma noradrenalina in adrenalina, ki je VMA. Z delovanjem MAO na dopamin nastane 3,4-dihidroksifenilacetna kislina, kjer ob ponovnem delovanju istega encima dobimo končni produkt metabolizma dopamina, ki je HVA⁽¹⁵⁾ (Slika 6).



Slika 6: Metabolizem kateholaminov

4. MOTNJE V DELOVANJU NADLEDVIČNIH ŽLEZ

Čeprav imajo kateholamini glavno vlogo v mnogih fizioloških procesih kot so stres, padec tlaka ali volumna krvi, pomanjkanje hormonov ščitnice, kongestiven zastoj srca in aritmije, se njihovo merjenje primarno uporablja v diagnostiki nevrokromafinih tumorjev feokromocitoma, paraglioma in nevroblastoma. Koristni so tudi v psihiatriji, ko se poleg noradrenalina meri tudi njegov metabolit 3-metoksi-4-hidroksifenilglikol (MHPG), kateri nastane kot vmesni produkt metabolizma noradrenalina in je glavni njegov metabolit v možganih.

4.1. FEOKROMOCITOM

Feokromocitom je tumor sredice nadledvične žleze, ki običajno zraste iz celic sredice nadledvične žleze (85 %), lahko pa tudi iz celic simpatičnega živčevja oz. ganglijev (15 %).⁽¹⁶⁾ Diagnozo postavimo z določitvijo plazemskih prostih metanefrinov, ki so najbolj senzitivni. V potrditvene namene pa uporabljamo določitve kateholaminov (adrenalina, noradrenalina) v 24-urnem urinu ter njihovih metabolitov (metanefrini, normetanefrini, vanililmandljeva kislina) v urinu in plazmi.⁽¹⁾ Konsenza glede najboljšega testa še vedno ni. Zdi se smiselno, da pri bolnikih z majhno verjetnostjo feokromocitoma uporabimo za presejanje določitev kateholaminov in njihovih metabolitov v 24-urnem urinu, saj je to test z največjo specifičnostjo (do 97 %) in istočasno povsem sprejemljivo občutljivostjo (91-97 %). Pri bolnikih z visokim kliničnim sumom na feokromocitom določimo plazemske proste metanefrine in normetanefrine, saj s tem zagotovimo najvišjo možno občutljivost (97 – 99 %).⁽¹⁶⁾ Negativno napovedane vrednosti testa so visoke in z negativnimi plazemskimi metanefrini zanesljivo izključimo feokromocitom, razen pri tumorjih, ki izločajo le dopamin ali pa so v zgodnji predklinični fazi. Specifičnost je slabša (85-89 %). Pri bolnikih starejših od 60 let pa pade specifičnost celo na 77 %.⁽¹⁷⁾

Ob izključitvi motečih dejavnikov (metildopa, nifedipin ipd.) in ob znatno povišani koncentraciji sečnih kateholaminov in njihovih metabolitov, lahko začnemo takoj z lokalizacijsko diagnostiko. Pri lokalizaciji si pomagamo z ultrazvokom (UZ), računalniško tomografijo (CT) in nuklearno medicinsko scintigrafijo, ki so kot metode neinvazivne slikovne funkcijske diagnostike značilne pri bolnikih s tumorji nevroektoderma. Preiskava z MIBG je zelo specifična (95-100 %) in manj senzitivna (cca. 80 %).⁽¹⁾



Slika 7: Feokromocitom

4.2. NEVROBLASTOM

Nevroblastom je periferni primitivni nevroepitelijski tumor oz. maligni tumor simpatičnih živčnih celic, ki lahko iz neznanega vzroka vznikne kjerkoli v simpatičnem živčnem sistemu. Je najpogostejši ekstrakranialni tumor, zelo raznoličen tako v biološkem kot tudi v kliničnem obnašanju. Je tumor otrok, večinoma mlajših od 5 let.

Pri novorojenčkih nevroblastom predstavlja kar 54 % vseh oblik raka. Približno pri polovici dojenčkov se nevroblastom odkrije v prvih 4 mesecih oziroma 16 % v prvem mesecu življenja. Toda incidenca nevroblastoma pri dojenčkih je verjetno podcenjena, ker mnogi nevroblastomski tumorji spontano minejo, preden jih odkrijemo. To dokazujejo tudi odkritja v rutinskih obdukcijah dojenčkov, umrlih zaradi drugih vzrokov v prvih mesecih življenja. ⁽¹⁸⁾

Tumor, ki dozori v benigni ganglionevrom, torej nevroblastomski tumor pa so, sicer majhne, našli 40-krat pogosteje, kot bi pričakovali, če upoštevamo klinično jasno izražene primere. Povprečna starost ob diagnozi je 2 leti. Letna incidenčna stopnja je 10 novo zbolelih na milijon otrok. Za nevroblastom je značilno, da raste zelo hitro, in zaseva hematogeno in limfogeno v kostni mozeg, kosti, jetra, orbito, podkožje in možgane. Lahko je prirojen in metastazira v placento. 75 odstotkov nevroblastomov vznikne v abdomnu, polovica od teh v sredici nadledvičnice, druga polovica pa v paravertebralnih avtonomnih ganglijih. Večinoma vznikne sporadično, čeprav je možen pojav nevroblastoma z avtosomno dominantnim dedovanjem, za katerega je značilno, da so nevroblastomi multipli.

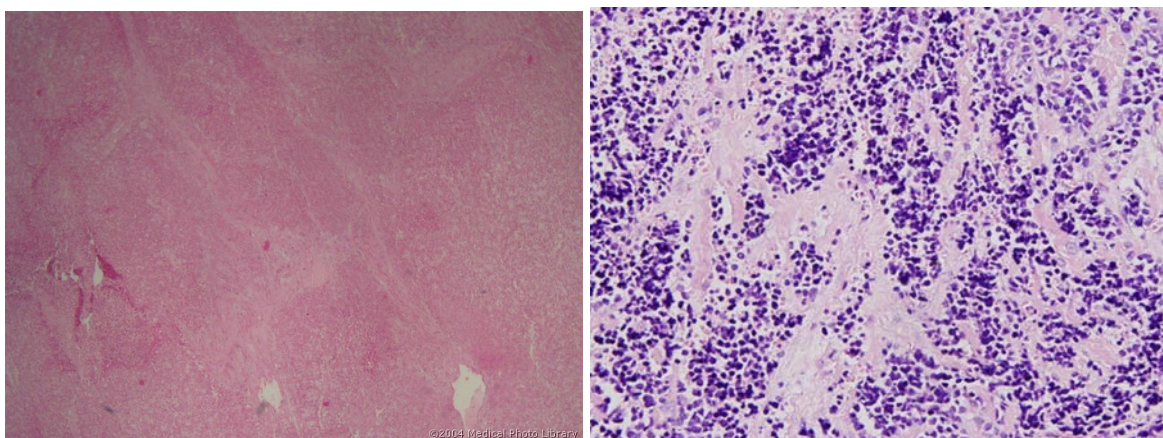
POGOSTOST

Obsega 9 % vseh malignih tumorjev v otroštvu in je najpogostejši tumor pri dojenčkih in drugi najpogostejši solidni tumor v otroštvu. Nekoliko pogostejši je pri dečkih. Polovica tumorjev se pojavlja do drugega leta starosti, več kot 75 % pa do četrtega leta.

Na Pediatrični kliniki v Ljubljani so v letih 1970-1993 zdravili 79 otrok z nevroblastomom. 42 je bilo dečkov in 37 deklic. Povprečna starost bolnikov je bila 28,3 mesecev (od 1-118 mesecev).⁽¹⁹⁾

PATOLOGIJA

Nevroblastom iz neznanega vzroka vznikne iz živčnih celic, ki tvorijo simpatične ganglije in sredico nadledvične žleze. Tumorji simpatičnega živčevja se lahko delijo v dve skupini: v feokromocitne ali v simpatoblastne tumorje. Med zadnje štejemo nevroblastom, ganglionevrom in ganglionevroblastom. Nevroblastom je makroskopsko dobro omejen tumor, trše konsistence, pogosto prerašča pseudokapsulo in se širi v okolico (Slika 8). Mikroskopsko so za nevroblastom značilne drobne okrogle celice, ki delajo rozete, in neurofibrile, ko je tumor dobro diferenciran (Slika 9). Ganglionevrom je zrela benigna oblika nevroblastoma. Ta tumor ne metastazira, lahko pa se po kirurški odstranitvi ponovno pojavi in tudi precej poveča. Je trše strukture in bolj inkapsuliran. Sestavljajo ga velike zrele ganglijske celice z veliko citoplazme in velikimi jedri. Ganglionevroblastom uvrščamo po malignosti med nevroblastom in ganglionevrom.⁽¹⁹⁾



Slika 8: Makroskopska slika nevroblastoma

Slika 9: Mikroskopska slika nevroblastoma

Pri otrocih mlajših od enega leta, lahko tumor izgine ali dozori v benigni ganglionevrom. Starost bolnikov kot kraj nastanka nevroblastoma sta ob odkritju bolezni, pomemben prognostičen faktor. Otroci mlajši od enega leta, preživijo v 74 %, med 12. in 23. mesecem

v 26 %, v starosti preko dveh let pa le v 12 %. Spontano izginotje nevroblastomov je najpogostejše pri otrocih, mlajših od 6 mesecev. Slabi prognostični faktorji so tudi nepopolna kirurška odstranljivost tumorja, povišanje LDH, levkopenija, histološka prisotnost nediferenciranega tkiva v tumorju in zvečanje aktivnosti za nevrone specifične enulaze (NSE) prek 100 ng/mL seruma. ⁽¹⁹⁾

Stadij bolezni je neodvisen od starosti bolnikov in kraja tumorja. Bolniki z lokaliziranim tumorjem (I. in II. stadij) imajo dobro prognozo in preživelost 80 %. Otroci z lokalno napredovalnim tumorjem (III. stadij) lahko pričakujejo 37 %, otroci z metastazami pa le 5-7 % preživelost. Bolniki, pri katerih je tumor v IV.-S stadiju, imajo kljub oddaljenim metastazam preko 80 % preživelost. ⁽¹⁹⁾

STADIJ NEVROBLASTOMA

Po kliničnih, radioloških in kirurških merilih razdelimo nevroblastom po Evansu v štiri stadije: ⁽¹⁹⁾

Tabela 1.

Stadij	
Stadij 0.	Nevroblastom <i>in situ</i> .
Stadij I.	Tumor je omejen na organ, iz katerega je vzniknil in je popolnoma kirurško odstranljiv.
Stadij II.	Tumor raste zunaj organa, kjer je vzniknil, vendar ne raste prek srednje linije, ipsilateralne bezgavke so lahko zajete.
Stadij III.	Tumor raste zunaj organa, prek mediane linije, regionalne bezgavke so lahko zajete obojestransko.
Stadij IV.	Prisotne so oddaljene metastaze v kosteh, kostnem mozgu, možganih, koži, jetrih, pljučih, mehkem tkivu ali v oddaljenih bezgavkah.
Stadij IV-S.	Bolniki s tumorjem v I. ali II. stadiju, ki imajo tudi metastaze v jetrih, koži ali kostnem mozgu, vendar ne v kosteh.

V preiskavi Pediatrične klinike v Ljubljani je tako od 79 otrok z nevroblastomom imelo 26 bolnikov tumor še v lokalizirani obliki (13 v I. stadiju in 13 v II. stadiju). Pri preostalih 53

bolnikih je bolezen že napredovala (17 v III. stadiju, 36 bolnikov pa je imelo IV. stadij bolezni).⁽¹⁹⁾

5. DIAGNOSTIKA

Pri motnjah v delovanju nadledvičnih žlez za ugotavljanje in lokalizacijo tumorjev uporabljamo različne slikovne diagnostične metode. Za kirurga so tako najpomembnejša vprašanja, na katera lahko odgovorijo slikovne preiskave: *Ali je organ izvora nadledvičnica in ima tumor morfološke značilnosti nevroblastoma, ali pa obstaja metastatska bolezen in ali je tumor resektabilen.*⁽²⁰⁾

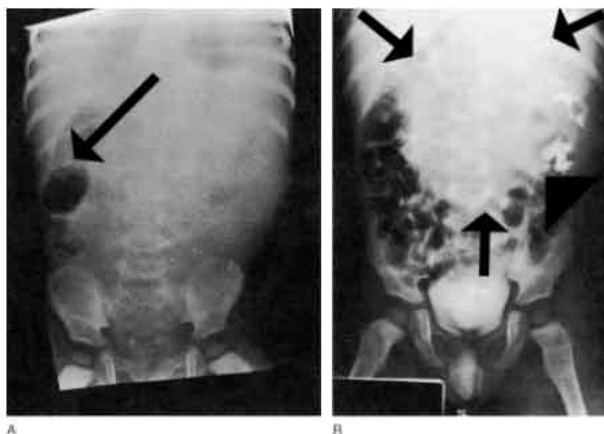
Mesto primarnega tumorja in prisotnost morebitnih oddaljenih metastaz lahko določimo z rentgenskim slikanjem, UZ, CT in radioizotopi.⁽¹⁹⁾ Za oddaljene metastaze so potrebne še slikovna scintigrafija z jodom 131-MIBG, scintigrafija skeleta, biopsija kostnega mozga z več mest.

Kalcinacije so na pregledni sliki trebuha vidne pri 50 % nevroblastomov nadledvične žleze.

Slikovne diagnostične metode:⁽¹⁹⁾

- 1. Ultrazvočna preiskava** – UZ trebuha nam pokaže primarni tumor in njegovo lokalno razraščanje. Lahko je kalciniran in leži dokaj centralno v abdomnu. Pogosto je možno tumor razmejiti od ledvice in vsaj orientacijsko oceniti žilna razmerja. Potrebno je oceniti morebitno prizadetost jeter in retroperitonealnih bezgavk.
- 2. Računalniška tomografija** – CT prsne votline, trebušne votline nam da še dodatne informacije o primarnem tumorju in o metastazah.⁽¹⁹⁾ Običajno je ob takšnih preiskavah potrebna tudi aplikacija kontrastnih sredstev, pri otrocih pa pogosto tudi sedacija ali anestezija.⁽²⁰⁾
- 3. Rentgen:**
 - **RTG slika prsnih organov:** Pri bolnikih s trebušnim tumorjem je natančen pregled zadnjega mediastinuma pomemben, saj se tumor lahko širi skozi prepono v prsni koš.
 - **RTG okostja:** Moramo opraviti pri vsakem bolniku z nevroblastomom, ker so metastaze v kosteh tako pogoste. Najpogostejše so v lobanji in v diafizah dolgih cevastih kosti. Razporeditev kostnih metastaz je največkrat obojestranska in simetrična. Za metastaze je značilna osteoliza s periostalno reakcijo.

4. **Slikanje z magnetno resonanco** – MRI preiskava prsne in trebušne votline predstavlja metodo, ki je najbolj uporabna za diagnozo in oceno stopnje razširjenosti tumorja. MRI lahko bolje oceni širitev v spinalni kanal, metastaze v kostnem mozgu in žilno vraščanje,
- Za odkrivanje metastaz v jetrih in bezgavkah sta CT in MRI enakovredni metodi.⁽²⁰⁾
5. **Scintigrafija skeleta** je potrebna, kadar na navadnem rentgenskem posnetku metastaz v kosteh ne najdemo.⁽¹⁹⁾
6. **Scintigrafija z jodom 131 M-IBG** - uporabljamo za prikaz primarnega tumorja in njegovih metastaz z radioizotopnim preparatom MIBG, kot začetno metodo za oceno stopnje razširjenosti bolezni.^(19,20)



Slika 10: MRI posnetek novorojenčka: **A:** bela področja kalcifikacije (puščica) kažejo na neuroblastom; **B:** intravenozni urogram kaže levo ledvico (puščica), ki je potisnjena stran zaradi kancerogene mase (tri puščice, ki kažejo na maso); ledvica je obarvana s kontrastom belo.

Metode za določanje kateholaminov:

1. Encimskoimunska metoda (EIA)
2. Radioimunološka metoda (RIA)
3. Fluorometrijske metode
4. Kromatografske metode

5.1. LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA

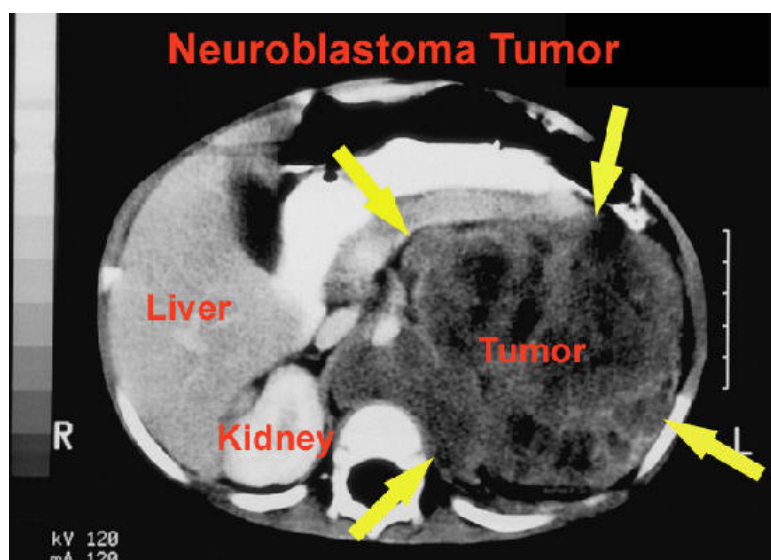
Popolna krvna slika je največkrat normalna, dokler tumor ne metastazira. V kolikor je tumor že zajel kostni mozeg ali pa je prišlo do krvavitve v tumorju se pojavi slabokrvnost.

V kolikor se pojavijo metastaze v jetrih se pojavi trombocitopenija in nagnjenost h krvavitvam. Koagulacijski faktorji se sintetizirajo v jetrih in delujejo kot antikoagulanti, ki posredno aktivirajo trombocite, ki tvorijo strdke na mestu poškodbe. Punkcija kostnega mozga je potrebna pri vsakem sumu na nevroblastom s tumorskimi markerji v tkivu, indeks DNA, onkogen N-myc in delecija kromosoma 1p. Pri bolnikih z nevroblastomom je pozitivnih približno 70 % punkcij. Pogosto najdemo tumorske celice v kostnem mozgu brez znakov za kostne metastaze. ⁽¹⁹⁾

Izločanje kateholaminov:

Za postavitev diagnoze so potrebni klinični pregled in laboratorijske preiskave z določitvijo tumorskih markerjev v serumu in urinu, kot so kateholamini in njihovi metaboliti, feritin, nevronska specifična enolaza (NSE), laktat dehidrogenaza (LDH). ⁽¹⁹⁾

95 % bolnikov z nevroblastomom ima v seču povečano izločanje dveh metabolitov kateholaminov: vanilmandljeve kisline (VMA), homovanilinske kisline (HVA) ali oboje. Prav tako je značilen povišan noradrenalin ter dopamin. Kateholamini in njihovi metaboliti se izločajo kot prosti ali konjugirani kot sulfati in glukoronidi. Kljub temu pa večina bolnikov nima zvečanega krvnega tlaka.



Slika 11: Nevroblastom

Laboratorijske preiskave:

1. krvna slika
2. kateholamini + metabolitika kateholaminov v 24 urnem urinu
3. nevronske specifična enolaza
4. citologija kostnega mozga (zasevki v kostni mozeg)

Metanefrini se določajo s HPLC ter imunokemijsko, spektrofotometrično, fluorometrijsko in radioencimsko metodo.

6. NAMEN DELA

Skupini 133 otrok želimo določiti koncentracijo metanefrinov in normetanefrinov v plazmi in ugotoviti, v kakšnem odstotku se ujemajo s klinično sliko. Če vzamemo, da imajo vsi pacienti potrjeno diagnozo na osnovi drugih diagnostičnih postopkov, potem lahko pogledamo, v koliko primerih naš parameter pokaže zvišano vrednost.

Obravnavali bomo izključno samo pediatrično populacijo na Pediatrični kliniki Ljubljana. Vzorce smo zbirali približno 5 let ter sodelovali pri zadnjih vzorčenjih. Podatke o spolu in starosti s potrjeno diagnozo bomo dobili na Pediatrični kliniki Ljubljana, ostale rezultate pa bomo dobili pri laboratorijskem delu. Specifičnost in občutljivost bomo izračunali po formulah.

Želimo ugotoviti, kako specifične in občutljive so določitve plazemskih kateholaminov oziroma metabolitov pri pacientih z motnjami v delovanju nadledvične žleze in kako se metoda obnaša glede na ponovljivost izven in v seriji.

7. EKSPERIMENTALNI DEL

7.1. OPIS SKUPINE PACIENTOV

Obravnavana skupina pacientov so otroci iz Pediatrične klinike Ljubljana, za katere je ali pa še ni postavljena diagnoza nevroblastoma. Število preiskovancev je 133, med njimi 54 deklet, ter 79 fantov. Povprečna starost deklet je 12.88 let, medtem ko je povprečna starost fantov 15.17 let. Glede na redkost diagnoze nevroblastoma smo za oblikovanje skupine zbirali vzorce približno 5 let. Sodelovali smo pri zadnjih vzorčenjih, medtem ko smo podatke o starosti in spolu dobili na Pediatrični kliniki Ljubljana iz kartotek pacientov.

7.2. METODE ZA DOLOČANJE METANEFRINOV IN NORMETANEFRINOV V PLAZMI

7.2.1. ELISA TEST

Encimskoimunski test⁽²¹⁾ (angl. ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je imunoabsorpcijski test, ki temelji na specifični interakciji antigen - protitelo. Je eden najbolj občutljivih in specifičnih imunskih testov, ki za oznako uporablja encim in se uporablja za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu.

Za določanje specifičnih protiteles v vzorcu se uporablja posredna ali indirektna ELISA, medtem ko se za določanje prisotnosti antigenov uporabi direkten ali sendvič ELISA test. Oba testa se izvajata v mikrotitrskih ploščah.

Pri obeh metodah je na koncu reakcije dodan kromogen substrat, na katerega deluje encim, ki povzroči spremembo barve substrata. Najpogosteje uporabljeni encimi so hrenova peroksidaza (HRP), alkalna fosfataza (AP), β -D-galaktozidaza (β -GAL), *p*-nitrofenil fosfataza. Detekcijo nastalih kompleksov preiskovanega protitelesa ali preiskovanega antigena določamo spektrofotometrično.

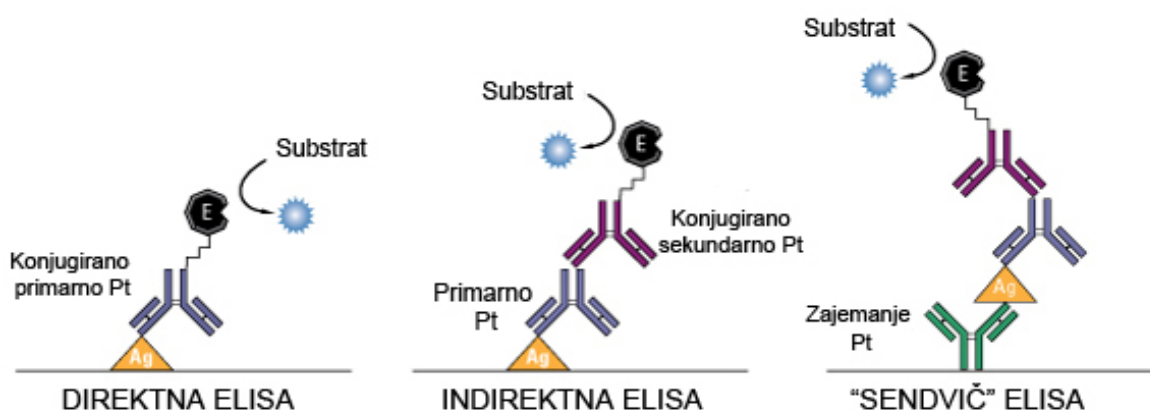
DIREKTNA ELISA - SENDVIČ

- Antigen iz preiskovanega vzorca vežemo na znano primarno protitelo. Nato po končani inkubaciji speremo nosilec s pufrom, da odstranimo nevezane antigene. Dodamo protitelesa označena z encimom, specifična na vezan antigen. Vsebnost antigena v preiskovanem serumu ustreza količini nastalega kompleksa protitelo - konjugiran antigen.⁽²²⁾ Ponovno speremo ploščo s pufrom, da bi odstranili nevezana protitelesa, na koncu pa dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo. Intenzivnost barve detektiramo, in

določimo aktivnost encima, ki je obratno sorazmerna koncentraciji antigena. Večja je aktivnost encima, tem manjša je koncentracija antigena in obratno.

INDIREKTNA ALI POSREDNA ELISA

- Na trdne nosilce, na katerem je vezan znan antigen, dodamo vzorec v katerem so preiskovana primarna protitelesa. Ta reagirajo z vezanim antigenom. Ostala nevezana protitelesa speremo s puflom. Nato dodamo z encimom konjugirane antiimunoglobuline, ki se vežejo na že vezana protitelesa. Ponovno speremo nevezana označena protitelesa. Dodamo substrat, ki ob prisotnosti encima razvije barvo. Količino protiteles lahko določimo s stopnjo razgradnje substrata. Razgrajen substrat je obarvan produkt, ki ga detektiramo spektrofotometrično.



Slika 12: Določanje protiteles z ELISA metodami

7.3. OPREMA – VSEBINA KOMPLETA

7.3.1. Reagenti za pripravo vzorca:

Tabela 2

MATERIAL	OZNAKA	KOLIČINA	VOLUMEN IN VSEBINA
Aciliran reagent	ACYL – REAG	2 steklenički	2.5 mL, liofiliziran;
Aciliran pufer	ACYL – BUFF	1 steklenička	4 mL, Pripravljen za uporabo, Tris-HCl-pufer;
Standardi 1 – 6	CAL 1 – 6	6 stekleničk	vsak 1.75 mL,

			liofiliziran;
Kontrola 1 & 2	CON 1 & 2	2 steklenički	vsak 1.75 mL, liofiliziran;
Precipitator (oborilo) 1	PRECI1	1 steklenička	6 mL, Pripravljen za uporabo;
Precipitator (oborilo) 2	PRECI2	1 steklenička	6 mL, Pripravljen za uporabo;
Centrifugirne epruvete	PRECI-TUBE	100 kosov	/
Rekacijska oz. mikrotitrna plošča	ACYL – PLATE	1plošča z 96 vdolbinicami	/

7.3.2. Reagenti za ELISA:

Tabela 3

MATERIAL	OZNAKA	KOLIČINA	VOLUMEN IN VSEBINA
MT - trakovi	STRIPS-MN; STRIPS-NMN	2 x 12 trakov	2 x 12 trakov
Metanefrin antiserum	AS-MN	1 steklenička	3 mL , Pripravljen za uporabo, izvor: zajec, modro obarvan
Normetanferin antiserum	AS-NMN	1 steklenička	5.5mL, Pripravljen za uporabo, izvor: zajec, rumeno obarvan
Encim konjugat	CONJ	1 steklenička	21 mL, Pripravljen za uporabo, anti-zajec IgG-POD konjugat
Pralni puffer (angl. Wash buffer)	WASH	2 steklenički	20 mL, Koncentriranega razdreči z distilirano vodo do 500 mL
Substrat	SUB	1 steklenička	21 mL , TMB raztopina pripravljena za uporabo;
Stop raztopina (angl. Stop solution)	STOP	1 steklenička	21 mL , Pripravljena za uporabo, vsebuje 0.3 M žveplove kisline
Topilo (angl. Solvent)	SOLVENT	1 steklenička	6mL , Pripravljen za uporabo, vsebuje aceton

			* topilo reagira z mnogo plastičnimi materiali vključno s plastičnimi pladnji; topilo ne reagira z normalnimi pipetnimi nastavki in s steklenimi napravami;
Lepilna folija	FOIL	2 kosa	Pripravljena za uporabo;

7.3.3. Ostali materiali in oprema, ki niso priloženi v kompletu

- Pipete (20, 25, 50, 100 μ L in 400 μ L)
- Vodoravni stresalnik (400 – 500 rpm)
- Spiralnik mikrotitrskih plošč
- Centrifuga
- Vortex mešalec
- Mikrotitrski fotometer
- Distilirana voda

7.3.4. Preglednica – Standardi za izvedbo testa ELISA

Tabela 4

Standard	1	2	3	4	5	6
Normetanefrini (pg/mL)	0	20	60	200	700	3,000
Metanefrini (pg/mL)	0	20	60	200	700	3,000

7.4. ODVZEM VZORCA

Analiziramo lahko le vzorce odvzete z EDTA. Vzorci odvzeti s heparinom ali citratom niso primerni, zaradi interakcije z metaboliti in jih ne analiziramo. Antikoagulantna kot sta natrijev citrat in heparin preprečujeta pretvorbo fibrinogena v fibrin in tako preprečujejo strjevanje krvi. Fizični in psihični stres navadno povzroči veliko povečanje koncentracije kateholaminov. Zato je priporočljivo, da bolnika pustimo počivati za 20 do 30 minut po venepunkciji in šele nato zberemo vzorec krvi. Hemolitične in predvsem lipemične vzorce se ne sme uporabljati za analizo, ker lahko rezultirajo kot lažno nizke vrednosti.

Vzorci plazme lahko shranimo pri 2 - 8 ° C do 6 ur. Vzorce lahko shranimo pri - 20 ° C najmanj 6 mesecev.

7.5. PRIPRAVA VZORCA

Priprava standardov, vzorcev plazme in kontrol je enaka tako za metanefrin in normetanefrin in morajo biti opravljeni le enkrat.

7.5.1. PRIPRAVA REAGENTOV

STANDARDI IN KONTROLE

Standarde in kontrole raztopimo z 1,75 ml distilirane vode z vsako in previdno premešamo. Pripravljene raztopine in kontrole se lahko hrani zamrznjene na -20 ° C in se lahko odtajajo samo enkrat.

ACILIRANI REAGENT

Vsebinsko ene stekleničke raztopimo z 2,5 ml topila in premešamo na stresalniku za 5 minut. Acilirani reagent je potrebno pripraviti tik pred uporabo. Če sta potrebni obe steklenički, združimo raztopljene vsebine obeh stekleničk.

- Acilirani reagent reagira z mnogimi plastičnimi materiali, vključno s plastičnimi pladnji. Topilo ne reagira z običajnimi pipetnimi nastavki in steklenimi napravami.

- Opozorilo

Topilo je nestanovitno in raztopljeni acilirani reagent izhlapi hitro. Uporaba pladnja z veliko površino skupaj z večstopenjsko pipeto za pipetiranje aciliranega reagenta odsvetujemo. Namesto tega uporabimo Eppendorf multipipete z rumenimi nastavki, napolnimo brizgo neposredno iz stekleničke z raztopljenim aciliranim reagentom in dodamo 20 µL.

7.5.2. PRECIPITACIJA

Vsi reagenti morajo doseči sobno temperaturo.

1. V vsako epruveto odpipetiramo po 400 µL standardov, kontrol in vzorcev plazme;
2. Odpipetiramo 50 µL oborila 1 v vse epruvete;
3. Odpipetiramo 50 µL oborila 2 v vse epruvete;
4. Epruvete skrbno zapremo in dobro premešamo (vortex).

5. Inkubiramo 60 minut pri sobni temperaturi.
6. Centrifugiramo za 10 minut z najmanj 3000 x g.

Vzamemo 100 μ L supernatanta za acilacijo.

7.5.3. ACILACIJA

1. Odpipetiramo po 100 μ L supernatanta v posamezne vdolbinice reakcijske plošče za acilacijo;
2. Odpipetiramo 25 μ L aciliranega pufru in ga dodamo v vse vdolbinice.
3. Raztopimo aciliran reagent, kot je opisano zgoraj, in mešamo 5 minut.
4. Odpipetiramo 20 μ L pripravljenega aciliranega reagenta v vse vdolbinice in takoj nadaljujemo s korakom 5.
 - *Opozorilo*
 - Topilo je nestanovitno in raztopljeni aciliran reagent izhlapi hitro. Uporaba pladnja z veliko površino skupaj z večstopenjsko pipeto za pipetiranje aciliranega reagenta odsvetujemo. Namesto tega uporabimo Eppendorf multipipete z rumenimi nastavki, napolnimo brizgo neposredno iz stekleničke z raztopljenim aciliranim reagentom in dodamo 20 μ L.
5. Postavimo na krožni stresalnik pri 400-500 vrtljajih na minuto in inkubiramo 15 minut pri sobni temperaturi. Ne pokrivamo vdolbinic oz. mikrotitrne plošče. Vzeli smo 50 μ L za Metanefrin in 20 μ L za Normetanefrin testa ELISA.

7.6. IZVEDBA TESTA

7.6.1. PRIPRAVA REAGENTOV

Koncentrat pralni pufer

Pripravimo koncentrat pralni pufer z redčenjem ene stekleničke koncentrata z destilirano vodo do končnega volumna 500 mL.

7.6.2. METANEFRIN ELISA

Reagenti in vzorci morajo doseči sobno temperaturo. Postopek delamo kot je priporočeno v dvojniku. (isto 6.3.)

1. Odpipetiramo po 50 μ L aciliranega standarda, kontrole in pacientovega vzorca v posamezne vdolbinice.
2. Odpipetiramo 25 μ L metanferin antiseruma v vse vdolbinice.

3. Pokrijemo z lepilno folijo in inkubiramo vsaj 15 do 20 ur pri 2 – 8 ° C.
4. Zavržemo ali aspiriramo vsebino iz vdolbinic in temeljito speremo z 300 µL pripravljenim vodnim pufrom. Ponovimo izpiranje še dvakrat. Odstranimo preostalo tekočino z dotikom obrnjene plošče na čisti vpojni papir.
5. Odpipetiramo po 100 µL encima konjugata v vse vdolbinice mikrotitrne plošče.
6. Inkubiramo 30 minut pri sobni temperaturi na rotacijskem stresalniku s 400-500 rpm.
7. Pranje: Ponovimo 4. korak.
8. Odpipetiramo po 100 µL substrata v vse vdolbinice mikrotitrne plošče.
9. Inkubiramo od 25 do 35 minut pri sobni temperaturi na orbitalnem stresalniku, z 400-500 rpm, po možnosti v temi.
10. Odpipetiramo 100 µL raztopine Stop v vse vdolbinice in stresemo ploščo na hitro.
11. Preberemo optično gostoto pri 450 nm (referenčna valovna dolžina med 570 in 650 nm) v mikroplošče fotometra.

7.6.3. NORMETANEFRIN ELISA

Reagenti in vzorci morajo doseči sobno temperaturo. Priporočljivi so duplikati.

1. Odpipetiramo po 20 µL aciliranega standarda, kontrole in pacientovega vzorca v posamezne vdolbinice.
2. Odpipetiramo 50 µL Normetanefrin antiseruma v vse vdolbinice.
3. Pokrijemo z lepilno folijo in inkubiramo vsaj 15 do 20 ur pri 2 – 8 ° C.
4. Zavržemo ali aspiriramo vsebino iz vdolbinic in temeljito speremo s 300 µL pripravljenega vodnega pufra. Ponovimo izpiranje še dvakrat. Odstranimo preostalo tekočino z dotikom obrnjene plošče na čisti vpojni papir.
5. Odpipetiramo po 100 µL encima konjugata v vse vdolbinice mikrotitrne plošče.
6. Inkubiramo 30 minut pri sobni temperaturi na rotacijskem stresalniku s 400-500 rpm.
7. Pranje: Ponovimo 4. korak.
8. Odpipetiramo po 100 µL substrata v vse jamice.
9. Inkubiramo od 25 do 35 minut pri sobni temperaturi na orbitalnem stresalniku, s 400-500 rpm, po možnosti v temi.

10. Odpipetiramo 100 μL raztopine Stop v vse vdolbinice in stremo ploščo na hitro.
11. Odčitamo optično gostoto pri 450 nm (referenčna valovna dolžina med 570 in 650 nm).

7.7. IZRAČUN REZULTATOV

Na pollogaritemskem grafu se koncentracija standardov (x-osi, logaritemska) izrisuje glede na njihovo ustrezno optično gostoto (y os, linearna). Alternativno optično gostoto vsakega standarda in vzorca lahko povežemo z optično gostoto ničnega standarda in jo izrazimo kot razmerje OD / OD_{max} in nato nanesemo na os y. Koncentracija kontrol in vzorcev se lahko bere neposredno iz standardne krivulje s pomočjo njihove povprečne optične gostote.

7.8. ZNAČILNOSTI TESTA

7.8.1. REFERENČNE VREDNOSTI

Spodnje referenčne vrednosti jemljemo le kot smernico. Orientacijske ref. vrednosti, ki jih predlaga proizvajalec reagentov, so bile ob uvedbi metode v laboratorij preverjene in ustrezajo, zato na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo uporabljajo enake mejne vrednosti kot jih priporoča proizvajalec reagentov.

Tabela 5

Plazma Metanefrini	
Ž	M
(0,06 - 0,37) pmol/L = (11,834 - 72,975) ng/L	(0,08 - 0,52) pmol/L = (15,778 - 102,56) ng/L

Plazma Normetanefrini	
Ž	M
(0,11 - 0,42) pmol/L = (20,152 - 76,946) ng/L	(0,11 - 0,53) pmol/L = (20,152 - 97,098) ng/L

7.8.2. VREDNOTENJE REZULTATOV IN OPREDELITEV NEKATERIH VALIDACIJSKIH PARAMETROV

Z validacijo metode zagotavljamo verodostojnost analiznih rezultatov in primerljivost, ob enem pa zagotovimo, da je metoda, ki smo jo uporabili pri svojem delu primerna in izpolnjuje vse zahteve, ki so predpisane za določeno analitsko metodo. Zahteve so podane s standardi, ali pa so predpisane s tehnično specifikacijo. Metodo smo ovrednotili z analizo natančnosti glede na ponovljivost v in izven serije, rezultate meritev

preiskovanih vzorcev pa z diagnostično specifičnostjo in občutljivostjo ter pozitivno in negativno napovedano vrednostjo. ⁽²³⁾

7.8.2.1. OBČUTLJIVOST

Občutljivost metode (Tabela 7) je definirana z mejo detekcije in z odzivom signala. **Mejo detekcije** oziroma **mejo zaznavnosti** (angl.: limit of detection, LOD) določimo iz trikratnega odmika slepe raztopine ($3S_{s,t}$), ob upoštevanju občutljivosti instrumenta (b_1) pri določeni valovni dolžini in je spodnja meja koncentracije, ki je še zanesljiva. Koncentracijo merjenega elementa ni mogoče kvantitativno določiti in je enaka povprečnemu signalu slepe raztopine, ki smo mu prišteli tri standardne odklone sklepe raztopine. ⁽²³⁾

Meja določljivosti (angl.: limit of quantitation, LOQ) je najnižja koncentracija standardne raztopine, ki smo jo izmerili in gre za najnižjo točko umeritvene krivulje, ki jo še lahko določimo z zadovoljivo točnostjo in natančnostjo. Je razlika v koncentraciji vzorca, ki ustreza najmanjši spremembi signala instrumenta, da jo z metodo še lahko uspešno zaznamo. Določimo in izrazimo jo z naklonom umeritvene krivulje. ⁽²³⁾ Bolj občutljiva je metoda, katere odziv je večji – merilo občutljivosti je naklon umeritvene premice, ki jo dobimo, če povežemo točke na grafu, ki prikazuje odzive za različne količine tistega, kar določamo.

$$X_{LOD} = \frac{3 S_{s,t}}{b_1}$$

Enačba 1: meja zaznavnosti (LOD)

Tabela 6: Definicija občutljivosti

OBČUTLJIVOST (angl.: sensitivity)	
kalibracijska občutljivost (angl.: calibration sensitivity)	= naklon UK
analitična občutljivost (γ) (angl.: analytical sensitivity)	= $\gamma = \frac{m}{s_y}$

Tabela 7

Slepa raztopina - 3 x	Metanefrini	Normetanefrini
S.D.	10 pg/mL = 10 ng/L	15 pg/mL = 15 ng/L

7.8.2.2. PONOVLJIVOST V SERIJI IN IZVEN SERIJE

Pripravili smo pool plazem (angl.: pool), tako, da skupaj zmešamo več vzorcev (vzorci smo zbirali iz ostankov biološkega materiala, ko so bile naročene analize že opravljene). Pool št. 1 smo zbrali iz vzorcev, kjer smo pričakovali nizke koncentracije. Pool št. 2 pa smo zbrali iz vzorcev, kjer smo pričakovali visoke koncentracije. Vsak pool smo razdelili na 40 alikvotov po 1 mL (20 od njih smo jih zamrznili na -30 °C, ostale pa smo analizirali v seriji).

Za ponovljivost izven serije smo vsak dan odmrznili 1 alikvot zamrznjenega poola 1 in 2 in izvedli analizo 20 vzorcev tekom 20 dni.

7.8.2.3. SPECIFIČNOST

Analizna specifičnost (angl.: specificity) je sposobnost metode, da meri lastnost elementa v mešanici točno in specifično in nanj ne vpliva nobena druga komponenta. Ujemanje rezultatov med analizo osnovnega vzorca in analizo vzorca, kateri so bile dodane nečistoče ali ostale moteče snovi je merilo za določanje specifičnosti metode. Metoda, ki je popolnoma selektivna, imenujemo specifična. ⁽²³⁾

Testirali so naslednje navzkrižne reaktivnosti, ki jih je testiral proizvajalec - Laboratorij DLD Diagnostika GMBH v Hamburgu:

Tabela 8**Metanefrin**

Spojina	Navzkrižna reakcija %
Metanefrin	100
Normetanefrin	0.102
3 – Metoksi – tiramin	0.002
Adrenalin	0.019
Noradrenalin	< 0.001
Dopamin	< 0.001
L – Dopa	< 0.001
Tiramin	< 0.001

Tirozin	< 0.001
Homovanilinska kislina	< 0.001
Vanilmandljeva kislina	< 0.001

Normetanefrin

Spojina	Navzkrižna reakcija %
Normetanefrin	100
Metanefrin	0.010
3 – Metoksi – tiramin	0.024
Adrenalin	0.002
Noradrenalin	0.020
Dopamin	0.002
L – Dopa	< 0.001
Tiramin	< 0.001
Tirozin	< 0.001
Homovanilinska kislina	< 0.001
Vanilmandljeva kislina	< 0.001

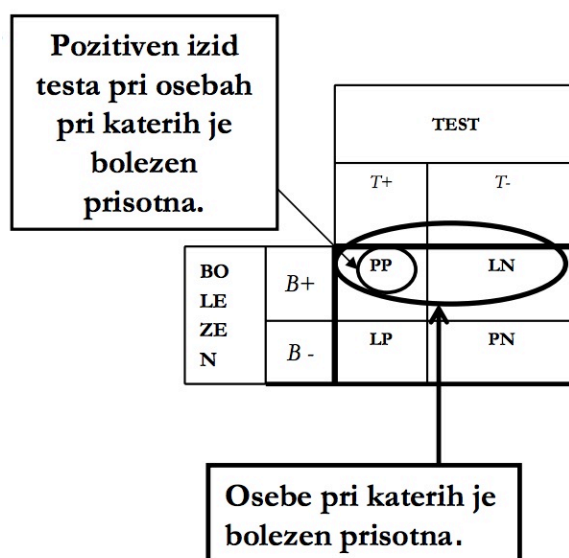
Navzkrižna reaktivnost ali navzkrižna reakcija je največkrat le laboratorijska in je posledica tehničnih omejitev določenih laboratorijskih preiskav. Izvid testa z navzkrižno spojino je pozitiven zaradi podobne kemijske strukture dveh spojin, vendar bolnik v resnici nima težav, če se sreča z navzkrižno spojino. V nekaterih primerih pa gre za klinično pomembno navzkrižnost.⁽²⁴⁾

8. REZULTATI

8.1. IZRAČUNI

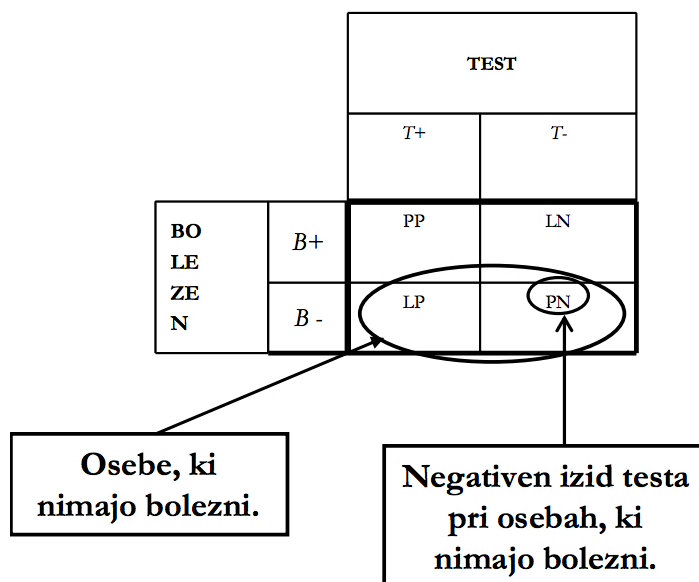
Občutljivost testa je sposobnost testa, da za pozitiven vzorec poda pozitiven rezultat. **Diagnostična ali klinična občutljivost** definira delež oseb, pri katerih je bolezen prisotna in je rezultat testa pozitiven oziroma gre za verjetnost pozitivnega izida testa pri osebah, ki so resnično bolni. V kolikor s testom dobimo negativen rezultat, čeprav ga pričakujemo, je ta lažno negativen. Večja je diagnostična občutljivost, manjše je število lažno negativnih rezultatov. ^(25,26)

Kadar z metodo dobimo pozitiven rezultat pravimo, da je metoda občutljiva, kar pomeni, da vzorci resnično vsebujejo merjen parameter. V našem primeru je metoda 100 % občutljiva.

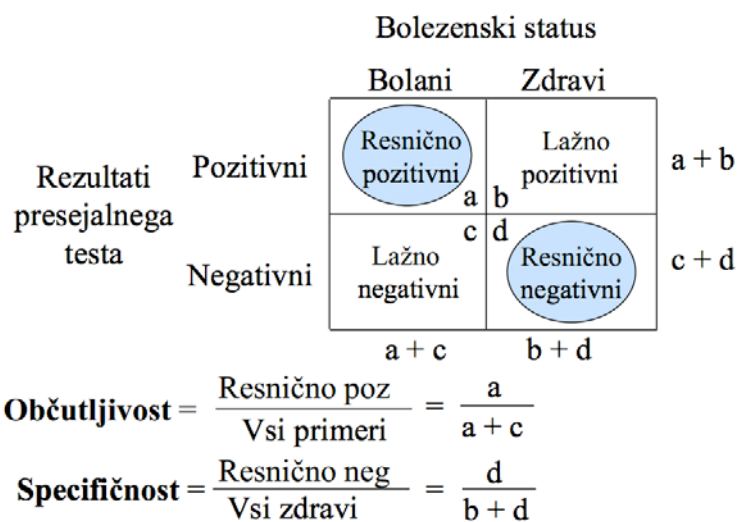


Slika 13: Občutljivost diagnostičnega testa

Specifičnost testa je sposobnost testa, da za negativen vzorec poda negativen rezultat. **Diagnostična ali klinična specifičnost** definira delež oseb, ki niso bolane in je rezultat testa negativen oziroma gre za verjetnost negativnega izida testa pri osebah, ki nimajo bolezni. Pri določanju specifičnosti predvidevamo, da v vzorcu ni iskane sestavine in predstavlja delež resnično negativnih bolanih. V kolikor dobimo s testom pozitiven rezultat, je ta lažno pozitiven. Večja je diagnostična specifičnost, manjše je število lažnih pozitivnih rezultatov. ^(25,26)



Slika 14: Specifičnost diagnostičnega testa



Slika 15: Enačbe presejalnega testa/bolezenski status

		TEST	
		<i>Pozitiven</i> (T+)	<i>Negativen</i> (T-)
B O L E Z E N	<i>Prisotna</i> (B+)	PP Pravilno pozitiven izid	LN Lažno negativen izid
	<i>Odsotna</i> (B-)	LP Lažno pozitiven izid	PN Pravilno negativen izid

Slika 16: Vrednotenje diagnostičnega testa

Osebe A so resnično pozitivne (PP) - bolezen je prisotna.

A = Resnično pozitivni = BOLANI: 5 (ženski) + 1 (moški) = 6

Osebe B so lažno pozitivne (LP) - niso v resnici bolane, vendar je test pozitiven.

B = Lažno pozitivni = ZDRAVI: 4 (ženski) + 4 (moški) = 8

Osebe C so lažno negativne (LN) - so bolane, vendar nam preiskava tega ne pokaže.

C = Lažno negativni = BOLANI: 0

Osebe D so resnično negativne (PN) - bolezen ni prisotna.

D = Resnično negativni = ZDRAVI: 45 (ženski) + 74 (moški) = 119

vsi primeri A | C 6 | 0 6

vsi zdravi B | D 8 | 119 127

$$\text{Diagnostična občutljivost (\%)} = \frac{\text{st.resnično pozitivni(A)} + 100}{\text{st.resnično pozitivni(A)} + \text{st.lažno negativni(C)}} = \frac{6}{6+0} = 1 \cdot 100\% = 100\%$$

$$\text{Diagnostična specifičnost (\%)} = \frac{\text{st.resnično negativni(D)} + 100}{\text{st.lažno pozitivni(B)} + \text{st.resnično negativni(D)}} = \frac{119}{8+119} = 0.94 \cdot 100\% = 94\%$$

$$\text{Pozitivna napovedana vrednost (\%)} = \frac{\text{st.resnično pozitivni(A)} + 100}{\text{st.resnično pozitivni(A)} + \text{st.lažno pozitivni(B)}} = \frac{6}{6+8} = 0.43 \cdot 100\% = 43\%$$

$$\text{Negativna napovedana vrednost (\%)} = \frac{\text{st.resnično negativni(D)} + 100}{\text{st.resnično negativni(D)} + \text{st.lažno negativni(C)}} = \frac{119}{119+0} = 1 \cdot 100\% = 100\%$$

Pozitivna napovedna vrednost (PNV) predstavlja verjetnost, da bi oseba, ki ima pozitiven rezultat testa, resnično imela bolezen in je odvisna od pogostosti bolezni v preiskovani populaciji. Pozitivna napovedna vrednost testa je definirana kot kvocient med resnično pozitivnimi in vsemi pozitivnimi, tako resničnih in lažnih. Izražamo jo v deležu in nam pove delež pravih pozitivnih rezultatov. Pozitivna napovedna vrednost je majhna, če gre za majhno pogostost neke bolezni. ^(25,26)

Negativna napovedna vrednost (NNV) predstavlja verjetnost, da pri osebi, ki ima negativen rezultat testa, ne gre za bolezen in je prav tako odvisna od pogostosti bolezni v preiskovani populaciji. Negativna napovedna vrednost je definirana kot kvocient med resnično negativnimi in vsemi negativnimi, tako resničnih kot lažnih. Izražamo jo v deležu in nam pove delež pravih negativnih rezultatov. Negativna napovedna vrednost zelo zanesljivo napove odsotnost bolezni, če gre za majhno pogostost neke bolezni. ^(25,26)

8.1.1. POVPREČJE VSEH BOLANIH - resnično oziroma pravilno pozitivnih (PP)

Preglednica I: Pacienti s potrjeno diagnozo - ženski spol

1	36	Normalna	81	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
7	59	Normalna	207	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
24	35	Normalna	95	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
43	41	Normalna	79	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
44	17	Normalna	118	Visoka	Resnično pozitiven

Preglednica II: Pacienti s potrjeno diagnozo - moški spol

2	169	Visoka	228	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
---	-----	--------	-----	--------	----------------------------------------

Tabela 9

p-meritev	MN	p-meritev	NMN	SPOL
	37.6		116	Ž
	169		228	M

8.1.2. POVPREČJE VSEH ZDRAVIH - resnično oziroma pravilno negativnih (PN)

Tabela 10

p-meritev	MN	p-meritev	NMN	št.meritev (vključno s ponavljajočimi)	SPOL
	18.50		23.98	78	Ž
	19.02		27.93	52	M

Povprečje meritev vseh resnično negativnih preiskovancev, vključno s ponavljajočimi meritvami, ustrezajo intervalu referenčnih vrednosti.

8.1.3. POVPREČJE VSEH MERITEV

Tabela 11

p-meritev	MN	p-meritev	NMN	SPOL
	22.89		55.39	Ž
	20.80		29.09	M

8.2. PONOVLJIVOST V SERIJI IN IZVEN SERIJE

Analiza 20-ih vzorcev v **seriji** je dala rezultate kot so prikazani v tabeli 12.

Tabela 12

metabolit	Pool	v	\bar{x}	S.D.	K.V.
MN	Pool 1	20	52	4.9	9.4 %
	Pool 2	20	270	17.4	6.4 %
NM	Pool1	20	65	5.5	8.5 %
	Pool2	20	263	11.8	4.5 %

Analiza 20-ih vzorcev **izven serije** je dala rezultate kot so prikazani v tabeli 13.

Tabela 13

metabolit	Pool	v	\bar{x}	S.D.	K.V.
MN	Pool1	20	54	7.2	13.3 %
	Pool2	20	260	22.4	8.62 %
NM	Pool1	20	70	8.3	11.9 %
	Pool2	20	265	18.3	6.91 %

Natančnost (angl.: precision) je podrobneje opredeljena s ponovljivostjo in pove, kako dobljeni rezultati meritev iz neodvisnih preskusov pri predpisanih pogojih med seboj nihajo znotraj skupine naših meritev. Natančnost je opredeljena kot stopnja skladnosti in jo določimo tako, da izmerimo več meritev realnega vzoca (ali standardnih raztopin ali referenčnih materialov). Natančnost analizne metode izražamo kot relativno standardno deviacijo (RSD) oziroma kot koeficient variabilnosti (CV) v odstotkih. ^(23,25,26)

Ponovljivost (angl.: repeatability) je natančnost dobljena iz rezultatov meritev pri pogojih ponovljivosti, t.j. pri pogojih, ko isti izvajalec v kratkih časovnih razmakih z isto metodo, na enakem poskusnem materialu, na isti opremi in v istem laboratoriju dobi neodvisne testne rezultate. ^(23,25,26)

Da bi zagotovili natančnost metode in opredelili diagnostično pomembnost testa, smo izmerili več analiz znotraj enega laboratorija in primerjali kako rezultati meritev znotraj skupine meritev med seboj nihajo. Vzorci v in izven serije so naši kontrolni vzorci. Metodo smo prenesli v laboratorij in preizkusili kakšna je ponovljivost metode na način, da smo rezultate meritev primerjali znotraj skupine vzorcev v in izven serije. Metodo, ki jo ocenjujemo na podlagi rezultatov, pridobljenih iz analiz izvedenih v različnih laboratorijih, imenujemo medlaboratorijska ponovljivost. Na podlagi rezultatov lahko izračunamo povprečno vrednost in RSD vsakega od laboratorijev.

8.2.1. POVPREČJE MERITEV

Povprečje (Enačba 2) je podatek, ki ga dobimo z izračunom srednje vrednosti večjega števila podatkov in je definiran kot kvocient med vsoto vseh meritev in številom meritev, kjer je i indeks ponovitev in x_i vrednost posameznih ponovitev.

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Enačba 2: povprečje meritev

8.2.1. STANDARDNI ODKLON

Standardni odklon (standardna disperzija) je enota za merjenje odklonov, merilo, s katerim je mogoče izmeriti razpršenost enot in odstopanje od povprečne porazdelitve

vrednosti. Posamezne vrednosti, ki so razporejene okoli aritmetične sredine oz. se kopičijo okoli neke srednje točke, pomenijo majhno variacijo oz. manjšo razpršenost enot. Ta vrednost predstavlja točko koncentracije podatkov okoli aritmetične sredine in so tako realen pokazatelj vrednosti populacije. V kolikor pa je odklon večji od srednje vrednosti kaže na veliko razpršenost enot v sami populaciji in pomeni, da populacije ne moremo natančno izraziti zaradi prevelikih razlik med enotami. Disperzijo populacije ali vzorca podamo z varianco, ki jo računamo kot povprečja kvadratov odklonov med aritmetično sredino in posameznimi vzorci. S standardnim odklonom tako na bolj natančen način predstavimo homogenost populacij, medtem, ko sama srednja vrednost pokaže vrednost populacije kot celoto, zabriše pa razlike med členi. Izračunamo ga po enačbi 3:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Enačba 3: standardni odklon meritev

kjer so: \bar{x} - povprečna vrednost meritev

x_i - vrednost posameznih meritev

n - število meritev

8.2.2. KOEFICIENT VARIACIJE

Koeficient variacije ali relativni standardni odmik (RSD) je standardni odmik izražen v deležu glede na povprečno vrednost meritev. Relativni standardni odmik (Enačba 4) izražamo v odstotkih in se nanaša na natančnost metode, ki nam pove, kakšno je sipanje meritev okoli prave vrednosti in kakšna je velikost razlik med rezultati, ki jo dobimo s ponavljanjem poskusa na istem vzorcu. Manjši je koeficient variacije oziroma razlika med rezultati, bolj natančna je metoda. ⁽²³⁾

$$K.V. (RSD) = \frac{s}{\bar{x}} * 100 \%$$

Enačba 4: koeficient variacije

9. RAZPRAVA

V naši študiji kažejo rezultati presejalnega testa 6 resnično pozitivno bolanih. Obravnavana skupina pacientov so otroci iz Pediatrične klinike Ljubljana, za katere moramo s pomočjo diagnostike postaviti diagnozo nevroblastoma. Število preiskovancev je 133, med njimi 54 deklet ter 79 fantov. Povprečna starost deklet je 12.88 let, medtem ko je povprečna starost fantov 15.17 leti.

Občutljivost imunokemijskega testa je kar 100 odstotna, ki jo prav tako spremlja visoka stopnja specifičnosti (94 odstotna), kar pomeni, da je test pri 94 % bolnikov, ki nimajo bolezni negativen, pri ostalih 6 %, ki prav tako nimajo bolezni, pa je lažno pozitiven. Dobili smo povsem iste rezultate pri vseh upoštevanih študijah in dokazali, da je določitev NM in MN z ELISA testom izredno občutljiv in specifičen test, ki za analizo potrebuje manjšo količino vzorca in je tako prijaznejši do pacienta. Po končanih meritvah smo prišli do rezultata, da je ELISA test za določanje prostih normetanefrinov in metanefrinov v plazmi zelo dober kvantitativen test napram ostalim že znanim biokemijskim testom, ki se uporabljajo za določanje metanefrinov in normetanefrinov. Vse študije so tako pokazale, da ima EIA metoda, s katero merimo metanefrine in normetanefrine v plazmi, boljše karakteristične lastnosti kot diagnostika kateholaminov, ki jo opravimo v urinu. Vse raziskave kažejo, da imajo imunokemijske metode več kot 90 odstotno občutljivost ter izredno visoko specifičnost.

Preiskava prostih metanefrinov v plazmi je zagotovo tudi bolj občutljiva in specifična metoda, kot preiskava, za katero je potrebno zbirati 24-urni urinski vzorec. Ker je test prostih metanefrinov v plazmi zelo občutljiv, feokromocitomi oz. ostala maligna obolenja pri otrocih kot je nevroblastom pa redka, lahko dobimo več lažno pozitivnih kot resnično pozitivnih. Zato diagnostika prostih metanefrinov v plazmi ni primerna kot rutinski test za splošno populacijo. Njegova uporaba je primerna, kadar testiranje urina ne zagotavlja jasne rezultate. Če ima oseba le zmerno povišane metanefrine, lahko zdravnik glede na oceno prejetih zdravil, prehrane in stopnjo stresa oceni, ali morda obstajajo interference, ki motijo samo preiskavo. Zdravila, ki lahko povzročijo lažno pozitivne vrednosti, so triciklični antidepressivi, antagonisti alfa in beta adrenergičnih receptorjev, zaviralci monoaminoooksidaze, simpatikomimetiki in stimulantni. Pomembno je, da se pacient vzdrži teh zdravil 1-2 tedna pred odvzemom vzorca. V kolikor sumimo na lažno pozitivne vrednosti, lahko pacienta ponovno testiramo, morda skupaj s 24-urnim zbiranjem urina na

kateholamine in/ali testiranje metanefrinov, da se ugotovi, ali so metanefrini še vedno povišani. Če je tako, se lahko odredi še slikanje, če ne, potem je malo verjetno, da ima oseba nevroblastom ali feokromocitom ipd.

Negativno napovedane vrednosti testa so sicer dobre. To pomeni, če so koncentracije metanefrinov in normetanefrinov v krvi normalne, potem je malo verjetno, da ima oseba feokromocitom, nevroblastom ali katero od ostalih malignih bolezni. Če so vrednosti povišane pri nekom, ki je imel v preteklosti že diagnosticiran nevroblastom, gre lahko za znak, da se tumor ponavlja.

Študije, ki so se v preteklosti že ukvarjale z vprašanjem, ali presejalni testi vplivajo na umrljivost ter kakšen je optimalen postopek, so vendarle temeljnega pomena.

Naš namen je ugotoviti primerljivost rezultatov določanja normetanefrinov in metanefrinov v plazmi pri podobnih diagnozah tj. malignih obolenjih pri otrocih, s študijami, v katerih so v preteklosti že obravnavali občutljivost in specifičnost testov. Nevroblastom pri otrocih je pomembno odkriti pravočasno, še predno se razvije v stadij 4.

V raziskavi na Japonskem in v Kanadi, so dokazali, da se je incidenca nevroblastoma v prvem letu starosti znatno povečala, ko so poizkusno uvedli presejalni test za določanje teh snovi v urinu v starosti od 3 tednov do 6 mesecev; pri otrocih starih nad enim letom pa se incidenca ni spremenila. ⁽¹⁸⁾

Tuja študija, ki je primerjala metanefrine in normetanefrine v plazmi napram plazemski koncentraciji kateholaminov in urinski ekskreciji kateholaminov, metanefrinov in vinilmandljeve kisline, pri kateri so bile plazemske koncentracije normetanefrinov in metanefrinov kar 97 odstotne od vseh 38 primerov, katerim je bil potrjen feokromocitom, kaže, da je občutljivost testa, v katerem se določajo metanefrini in normetanfrini v plazmi bistveno boljša kot pri vseh drugih biokemijskih testih, katerih občutljivost je bila komaj 47 - 74 odstotna. Visoko občutljivost meritev normetanefrinov in metanefrinov v plazmi je spremljala visoka stopnja specifičnosti (96 odstotna). V študji so prav tako izmerili vsoto metanefrinov in normetanefrinov v urinu in ugotovili, da lahko boljšo občutljivost dobimo s frakcioniranimi kromatografskimi meritvami normetanefrinov in metanefrinov. Meritve

metanefrinov v urinu pa lahko rutinsko določimo potem, ko sulfatno konjugirane metanefrine hidroliziramo v proste metanefrine. Ker sulfatno konjugirani metanefrini predstavljajo več kot 95 odstotkov obeh prostih in konjugiranih metanefrinov, meritve metanefrinov v urinu odražajo različne metabolite kateholaminov kot meritve prostih metanefrinov. Prosti metanefrini se tvorijo v veliki meri v kromafinem tkivu, ki je ektodermalnega izvora iz nevrčnih letav (modificirane postganglijske celice simpatika) s katehol-*O*-metil-transferazo, medtem ko se metanefrini, konjugirani s sulfatom, sintetizirajo s pomočjo monoamin sulfotransferaze, encimom, ki se koncentrira v črevesju. Zato malo verjetno je, da bi frakcionirane meritve metanefrinov v urinu imele višjo občutljivost od meritev plazemske normetanefrinov in metanefrinov v prosti obliki. Prav tako je študija pokazala, da so visoke vrednosti metanefrinov v plazmi bolj občutljive kot visoke vrednosti epinefrina v plazmi ali urinu pri odkrivanju tovrstnih tumorjev. Če povzamemo, so meritve normetanefrinov in metanefrinov v plazmi zelo občutljiv test za odkrivanje malignih tumorjev pri bolnikih z družinsko nagnjenostjo do teh tumorjev. Raziskava je pokazala, da so meritve normetanefrinov in metanefrinov v plazmi uporabne pri presajanju pri pacientih s familiarno predispozicijo teh tumorjev. Tistim pacientom, ki so imeli majhne tumorje, so standardni biokemijski preizkusi pogosto dali lažne negativne rezultate. Zato so testi, ki imajo boljšo in večjo občutljivost pri meritvah normetanefrinov in metanefrinov v plazmi pomagali pri omejitvah lažno negativnih rezultatov. ⁽²⁷⁾

Spet druga študija je raziskovala občutljivost testov za ugotavljanje prostih metanefrinov v plazmi pri otroškem feokromocitomu. Določili so referenčna območja biokemičnih meritev normetanefrinov, metanefrinov in epinefrina v plazmi in urinu. Skupina 158 zdravih odraslih (starost 18-72) je služila kot primerjalna skupina. Pediatrični referenčni razponi so bili uporabljeni za preučitev uporabnosti različnih diagnostičnih testov pri 45 otrocih ocenjenih za feokromocitom (starost 8-17, 38 s von Hippel-Lindau sindromom), katere tumorje so našli na 12 pacientih. Zgornje referenčne meje za E in MN so bile višje, za NMN pa nižje pri otrocih kot pri odraslih. Fantje so imeli višje plazemske vrednosti E in MN in večje urinsko izločanje vseh štirih aminov kot dekleta. Prosti metanefrini v plazmi so prikazali diagnostični test z vrednostmi za občutljivost v (100 %) in specifičnost (94 %), ki so bili enaki ali višji od tistih v drugih testih. Ugotovitve kažejo, da prosti metanefrini v plazmi zagotavljajo občutljivo orodje za odkrivanje feokromocitoma pri otrocih.

Referenčna območja je potrebno deliti na starost, kot tudi upoštevati razlike med spoloma.⁽²⁸⁾

Meritve izločanja kateholaminov ali metanefrinov v urinu že dolgo predstavljajo zlate standarde za biokemijsko odkrivanje in potrjevanje feokromocitoma. Vendar pa 24-h urinski vzorec ne more biti vedno zanesljivo zbran, in se kaže v problematičnosti zbiranja vzorca, še posebej je to problematično pri otrocih. Korekcije urinskih zbirkov kateholaminov ali metanefrinov pri ekskreciji kreatinina lahko porajajo pomisleke glede zbiranja urina v celoti, vendar zaradi odvisnosti kreatinina od prehrane, mišične mase, telesni dejavnosti in dnevnih spremembah, lahko takšne korekcije nadalje zavedejo interpretacijo rezultatov. Razlike v urinskih zbirkah in plazemskih koncentracijah kateholaminov in metanefrinov med otroki in odraslimi predstavljajo druge morebitne zapletene dejavnike pri diagnozi otroškega feokromocitoma.⁽²⁸⁾

Študija prav tako ugotavlja, da je uporaba računalniške tomografije (CT), magnetne resonance (MRI) in MIBG scintigrafije običajno rezervirana za bolnike s pozitivnimi rezultati biokemičnih preiskusov. Prav tako se uporabljajo tudi kot del periodičnega pregleda pri bolnikih z MEN 2 in VHL sindromom. Zaradi stranskih učinkov sevanja kot tudi uporabo potrebe po pomirjevalih, te študije slikanja niso idealni testi pri otroški populaciji. Biokemijska testiranja ostajajo tako bistvenega pomena.⁽²⁸⁾

Meritve plazemskih prostih metanefrinov, normetanefrinov (NMN) in metanefrinov (MN), ki so *O*-metilirani metaboliti noradrenalina (NE) in adrenalina (E), predstavljajo nedavno razviti in obetaven test za diagnozo feokromocitoma. V raziskavi so ugotovili uporabnost plazme prostih metanefrinov za diagnostiko feokromocitoma pri otrocih, pri katerih se poraja sum nanj. Pomembno je, da je študija vključevala vzpostavitev pediatričnih referenčnih območjih in retrospektivno analizo, v kateri se sprašuje ali bi lahko ta referenčna območja privedla do boljšega diagnosticiranja, kot tista referenčna območja, ki jih uporabljamo za odrasle.⁽²⁸⁾

10. SKLEP

- Število preiskovancev je 133, med njimi 54 deklet ter 79 fantov.
- Rezultati presejalnega testa so 6 resnično (pozitivno) bolnih, ostalih zdravih pa 121.
- Negativno napovedane vrednosti testa so dobre; lažno negativnih je 8 in resnično negativnih 121, kar nakazuje, da je malo verjetno, da ima katera oseba od teh nevroblastom.
- V dveh primerih so bile vrednosti metanefrinov oz. normetanefrinov povišane in so kazale na lažno pozitivne vrednosti. Pacientoma je bila odrejena ponovna preiskava, pri čemer smo potrdili, da gre za lažne vrednosti in te ustrezajo referenčnim vrednostim.
- Resnično pozitivnih tj. tistih s potrjeno diagnozo je 6. Pri enem pacientu, ki je imel potrjeno diagnozo nevroblastoma, se je pri ponovni preiskavi ugotovilo, da gre za lažno pozitiven rezultat.
- Študija je pokazala, da daje EIA metoda z ELISA testom, s katerim merimo metanefrine in normetanefrine v plazmi, boljše karakteristične lastnosti kot diagnostika kateholaminov, ki jih opravimo v urinu. Imunokemijska metoda ima 100 odstotno občutljivost, ki jo spremlja 94 odstotna specifičnost.
- Metoda je 100 % občutljiva, da malo negativnih rezultatov, tj. malo resnično bolnih, ki jih test ne prepozna in jih označi kot zdrave. Naša metoda je 94 % specifična, kar pomeni, da je test pri 94 % bolnikov, ki nimajo bolezni, negativen, pri ostalih 6 %, ki prav tako nimajo bolezni, pa je lažno pozitiven.
- Povprečna vrednost metanefrinov pri petih pacientkah s potrjeno diagnozo je v mejah referenčnih vrednosti in sicer 37.6 ng/L, medtem ko je povprečna vrednost normetanefrinov s potrjeno diagnozo 116 ng/L.
- Pacient s potrjeno diagnozo moškega spola je bil en sam. Vrednost metanefrinov znaša 169 ng/L, medtem ko vrednost normetanefrinov znaša kar 228 ng/L, kar kaže na izrazito odstopanje obeh vrednosti napram referenčnim vrednostim za paciente moškega spola.

11. LITERATURA

1. **Preželj Janez, Pfeifer Marija:** Bolezni endokrinih žlez: Interna medicina, 2005: 793-896, Ljubljana
2. **Stušek Peter:** Biologija človeka: (za gimnazije), 1.izd., 1.natis, Ljubljana: DZS, 2001
3. **Anselme Bruno:** Biologija človeka: anatomija, fiziologija, zdravje, 1.izd., 1.natis, Ljubljana: DZS, 1999
4. **Baynes John W.:** Medical biochemistry, 2nd ed., Philadelphia: Mosby, cop. 2005: 574-77
5. **Kocijančič Andreja:** Endokrinologija, 1.natis, Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1987
6. Prosojnice predavanja Adrenergični sistem in učinkovine, Farmaceutvska kemija III
7. **McPhee Stephen J.:** Pathophysiology of disease: An introduction to clinical medicine, 5th ed., New York:Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2006: 327-37
8. Neuroscience.2nd edition,Sinauer Associates, Inc. 2001, The biogenic amines
9. http://web.squ.edu.om/med-Lib/MED_CD/E_CDs/anesthesia/site/content/v02/020503r00.htm
10. Encyclopædia Britannica: Epinephrine and norepinephrine
11. <http://www.iscid.org/encyclopedia/Norepinephrine>
12. **Simpatomimetiki:** Učinkovine z delovanjem na adrenergični sistem, Ljubljana 2006.
13. **Glavač Sabina:** Preskus HPLC metode za določanje metanefrinov v urinu in določitev orientacijskega referentnega območja, Ljubljana, 2001, Diplomsko delo
14. **Eisenhofer Graeme, Kopin Irwin J., Goldstein David S. :** Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine: Pharmacological Reviews, 2004: 331-349
15. **Čvorišček Dubravka, Čepelak Ivana:** Štrausova medicinska biokemija, Zagreb: Medicinska naklada, 2009
16. **Kocjan Tomaž:** Diagnostika in zdravljenje feokromocitoma, Ljubljana, Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove, Klinični center Ljubljana, Zbornik, 2005: 59-63

17. **Jensterle Sever Mojca, Pfeifer Marija, Sedmak Boris, Popović Peter, Volčanšek Špela, Kocjan Tomaž:** Sodobna obravnava bolnikov s feokromocitomom: Zdrav Vestn 2013: 82:419-30
18. **Benedik - Dolničar Majda:** Ali je nevroblastom pri dojenčku velik problem?, Ljubljana, Klinični center, Pediatrična klinika, Služba za onkologijo in hematologijo, 2002, Slovenska pediatrija : revija Združenja pediatrov Slovenije in Združenja specialistov šolske in visokošolske medicine Slovenije ISSN: 1318-4423.- Letn. 9, št. 2-3 (2002): 142-3
19. **Tršinar Bojan, Anžič Jožica:** Nevroblastom, Ljubljana, 1998, Zbornik predavanj XXXIV. podiplomskega tečaja kirurgije za zdravnike splošne medicine, od 5. - 7. februarja 1998.- Str. 156-64
20. **Jereb Simona:** Slikovne preiskave pri otrocih z malignimi tumorji v toraksu in abdomnu, Ljubljana: Klinični center, Pediatrična klinika, Enota za radiologijo, 2002, Slovenska pediatrija : revija Združenja pediatrov Slovenije in Združenja specialistov šolske in visokošolske medicine Slovenije ISSN: 1318-4423.- Letn. 9, št. 4 (2002): 195-8
21. **Osredkar Jože:** Izbrana poglavja iz klinične kemije: učno gradivo za študente farmacije, V Ljubljani: Fakulteta za farmacijo, 2008
22. **Gašper Vesna:** Določevanje kateholaminov v urinu s tehnikama HPLC in ELISA, Ljubljana, 2009, Diplomsko delo
23. **Manja Moder:** Validacija analizne metode : Statistične metode in merilna negotovost, Ljubljana: 5.2.1998
24. **Mihaela Zidarn:** Alergijske bolezni v dihalih, zloženka
25. **Saah AJ, Hoover DR:** "Sensitivity" and "specificity" reconsidered: the meaning of these terms in analytical and diagnostic settings, Ann Intern Med, 1997: 126: 91-94
26. **Kikelj Neža:** Pomen določanja protiteles proti protrombinu z dvema encimsko imunskima metodama, Ljubljana, 2010, Diplomsko delo
27. **Weise Martina, Merke Deborah P., Pacak Karel, Walter McClellan M., Eisenhofer Graeme:** Utility of plasma free metanephrines for detecting childhood pheochromocytoma, The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002: 1955-60

28. **Eisenhofer Graeme, Lenders Jacques W.M., Linehan W.Marston, Walter McClellan M., Goldstein David S., Keiser Harry R.:** Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2, *The New England Journal of Medicine*, 1999: 1872-79

12. PRILOGE

12.1. PREGLEDNICE

V vseh naslednjih preglednicah so pacienti označeni s tako imenovano zaporedno številko, ki se zaradi večkrat oddanih vzorcev plazme pojavlja večkrat. Nekateri pacienti so oddali kri več kot enkrat.

V preglednici so zbrane meritve 54 pacientk, katerih povprečna starost je 12.88 let in so med letoma 2007 in 2011 oddale vzorce za preiskavo p-metanefrinov in p-normetanefrinov.

Preglednica I: Pacienti ženskega spola

Zaporedna številka pacienta	P-metanefrin M(C ₁₀ H ₁₃ NO ₃)	Referenčne vrednosti p-metanefrin ž (0,06 - 0,37) pmol/l =(11,834 - 72,975) ng/l	P-normetanefrin M(C ₉ H ₁₃ NO ₃)	Referenčne vrednosti p- normetanefrin ž (0,11 - 0,42) pmol/l = (20,152 - 76,946) ng/l	
1	36	Normalna	81	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
2	11	Nizka	4	Nizka	Resnično negativen
3	12	Normalna	5	Nizka	Resnično negativen
4 (1. vzorec)	25	Normalna	33	Normalna	Resnično negativen
4 (2. vzorec)	44	Normalna	79	Visoka	Lažno pozitiven
4 (3. vzorec)	33	Normalna	38	Normalna	Resnično negativen
5	14	Normalna	28	Normalna	Resnično negativen
6	33	Normalna	36	Normalna	Resnično negativen
7	59	Normalna	207	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
8	18	Normalna	19	Nizka	Resnično negativen
9	6	Nizka	9	Nizka	Resnično negativen
10	16	Normalna	14	Nizka	Resnično negativen
11	32	Normalna	43	Normalna	Resnično negativen
12	29	Normalna	8	Nizka	Resnično negativen
13	8	Nizka	17	Nizka	Resnično negativen
14	59	Normalna	27	Normalna	Resnično negativen
15	14	Normalna	33	Normalna	Resnično negativen
16	33	Normalna	64	Normalna	Lažno pozitiven
17	5	Nizka	4	Nizka	Resnično negativen
18	29	Normalna	25	Normalna	Resnično negativen
19	38	Normalna	24	Normalna	Resnično negativen
20	12	Normalna	31	Normalna	Resnično negativen
21	8	Nizka	58	Normalna	Resnično negativen
22	17	Normalna	13	Nizka	Resnično negativen
23	9	Nizka	9	Nizka	Resnično negativen
24	35	Normalna	95	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
25	10	Nizka	7	Nizka	Resnično negativen

26	22	Normalna	60	Normalna	Resnično negativen
27	11	Nizka	39	Normalna	Resnično negativen
28	14	Normalna	53	Normalna	Resnično negativen
29	0,3	Nizka	36	Normalna	Resnično negativen
30	13	Normalna	29	Normalna	Resnično negativen
31 (1.vzorec)	12	Normalna	965	Visoka	Potrjena diagnoza - Lažno pozitiven
31 (2.vzorec)	7	Nizka	60	Normalna	Resnično negativen
32	5	Nizka	5	Nizka	Resnično negativen
33	12,4	Normalna	31,8	Normalna	Resnično negativen
34	48,0	Normalna	49,3	Normalna	Resnično negativen
35	31	Normalna	35	Normalna	Resnično negativen
36	19	Normalna	46	Normalna	Resnično negativen
37	35,3	Normalna	26,4	Normalna	Resnično negativen
38	28	Normalna	58	Normalna	Resnično negativen
39 (1.vzorec)	25,8	Normalna	58,2	Normalna	Resnično negativen
39 (2.vzorec)	45	Normalna	58	Normalna	Resnično negativen
40 (1.vzorec)	99	Visoka	46	Normalna	Lažno pozitiven
40 (2.vzorec)	18,4	Normalna	34,4	Normalna	Resnično negativen
40 (3.vzorec)	28	Normalna	42	Normalna	Resnično negativen
40 (4.vzorec)	18,4	Normalna	34,4	Normalna	Resnično negativen
41	6	Nizka	13	Nizka	Resnično negativen
42	8,0	Nizka	12,5	Nizka	Resnično negativen
43	41	Normalna	79	Visoka	Potrjena diagnoza - Resnično pozitiven
44	17	Normalna	118	Visoka	Potrjena diagnoza - Resnično pozitiven
45	19	Normalna	47	Normalna	Resnično negativen
46	56	Normalna	34	Normalna	Resnično negativen
47	12	Normalna	18	Nizka	Resnično negativen
48	11	Nizka	15	Nizka	Resnično negativen
49	13	Normalna	21	Normalna	Resnično negativen
50	14	Normalna	12	Nizka	Resnično negativen
51	6	Nizka	16	Nizka	Resnično negativen
52	11	Nizka	49	Normalna	Resnično negativen
53	12	Normalna	7	Nizka	Resnično negativen
54	16	Normalna	19	Nizka	Resnično negativen

Ž

Povprečje vseh meritev p-
metanefrin

22,887 ng/L

Povprečje vseh meritev p-
normetanferin

55,389 ng/L

V preglednici je zbrano 79 pacientov, katere povprečna starost je 15.17 let in so med letoma 2007 in 2011 oddali vzorce za preiskavo p-metanefrinov in p-normetanefrinov.

Preglednica II: Pacienti moškega spola

Zaporedna številka pacienta	P-Metanefrin M(C ₁₀ H ₁₃ NO ₃)	Referenčne vrednosti p-metanefrin M (0,08 - 0,52) pmol/L = (15,778 - 102,56) ng/L	P-Normetanefrin M(C ₉ H ₁₃ NO ₃)	Referenčne vrednosti p-normetanefrin M (0,11 - 0,53) pmol/L = (20,152 - 97,098) ng/L	
1	10	Nizka	22	Normalna	Resnično negativen
2	169	Visoka	228	Visoka	Potrjena diagnoza – Resnično pozitiven
3	25	Normalna	28	Normalna	Resnično negativen
4	14	Nizka	60	Normalna	Resnično negativen
5	11	Nizka	21	Normalna	Resnično negativen
6	13	Nizka	30	Normalna	Resnično negativen
7	21,3	Normalna	31,1	Normalna	Resnično negativen
8	13	Nizka	23	Normalna	Resnično negativen
9	9	Nizka	40	Normalna	Resnično negativen
10	31	Normalna	23	Normalna	Resnično negativen
11	10	Nizka	20	Nizka	Resnično negativen
12 (1.vzorec)	21,4	Nizka	45,8	Normalna	Resnično negativen
12 (2.vzorec)	21,4	Normalna	45,8	Normalna	Resnično negativen
13	17	Normalna	10	Nizka	Resnično negativen
14 (1.vzorec)	8,8	Nizka	51,6	Normalna	Resnično negativen
14 (2.vzorec)	8,8	Nizka	21,1	Normalna	Resnično negativen
15	15	Nizka	14	Nizka	Resnično negativen
16	13	Nizka	14	Nizka	Resnično negativen
17	12	Nizka	13	Nizka	Resnično negativen
18	7	Nizka	35	Normalna	Resnično negativen
19	3	Nizka	5	Nizka	Resnično negativen
20	16	Normalna	32	Normalna	Resnično negativen
21	13	Nizka	19	Nizka	Resnično negativen
22	11	Nizka	27	Normalna	Resnično negativen
23	7	Nizka	16	Nizka	Resnično negativen
24	6	Nizka	12	Nizka	Resnično negativen
25	11,8	Nizka	28,6	Normalna	Resnično negativen
26	37	Normalna	34	Normalna	Resnično negativen
27	47	Normalna	73	Normalna	Resnično negativen
28	15	Nizka	7	Nizka	Resnično negativen
29	25	Normalna	17	Nizka	Resnično negativen
30 (1.vzorec)	24,5	Normalna	54,0	Normalna	Lažno pozitiven
30 (2.vzorec)	24,5	Normalna	54,0	Normalna	Lažno pozitiven
31	32	Normalna	65	Normalna	Resnično negativen
32	19	Normalna	6	Nizka	Resnično negativen

33	7	Nizka	30	Normalna	Resnično negativen
34	8	Nizka	17	Nizka	Resnično negativen
35	14	Nizka	19	Nizka	Resnično negativen
36	21	Normalna	34	Normalna	Resnično negativen
37 (1.vzorec)	17	Normalna	30	Normalna	Resnično negativen
37 (2.vzorec)	10	Nizka	9	Nizka	Resnično negativen
38	5	Nizka	8	Nizka	Resnično negativen
39	26	Normalna	28	Normalna	Resnično negativen
40	6	Nizka	9	Nizka	Resnično negativen
41	19	Normalna	62	Normalna	Lažno pozitiven
42	26	Normalna	76	Normalna	Lažno pozitiven
43	9	Nizka	19	Nizka	Resnično negativen
44	11	Nizka	22	Normalna	Resnično negativen
45	9	Nizka	45	Normalna	Resnično negativen
46	17	Normalna	16	Nizka	Resnično negativen
47	44	Normalna	29	Normalna	Resnično negativen
48	57	Normalna	39	Normalna	Resnično negativen
49	13	Nizka	22	Normalna	Resnično negativen
50	11,4	Nizka	27,3	Normalna	Resnično negativen
51	31	Normalna	21	Normalna	Resnično negativen
52	14	Nizka	24	Normalna	Resnično negativen
53	8,1	Nizka	27,4	Normalna	Resnično negativen
54	42	Normalna	40	Normalna	Resnično negativen
55	26,4	Normalna	34,1	Normalna	Resnično negativen
56	17	Normalna	24	Normalna	Resnično negativen
57	4	Nizka	29	Normalna	Resnično negativen
58	14	Nizka	25	Normalna	Resnično negativen
59	16	Normalna	11	Nizka	Resnično negativen
60	39	Normalna	46	Normalna	Resnično negativen
61	16	Normalna	10	Nizka	Resnično negativen
62	12	Nizka	19	Nizka	Resnično negativen
63	9	Nizka	7	Nizka	Resnično negativen
64	43	Normalna	21	Normalna	Resnično negativen
65	16	Normalna	6	Nizka	Resnično negativen
66	24	Normalna	28	Normalna	Resnično negativen
67	17	Normalna	3	Nizka	Resnično negativen
68	19	Normalna	16	Nizka	Resnično negativen
69 (1.vzorec)	24,1	Normalna	35,2	Normalna	Resnično negativen
69 (2.vzorec)	24,1	Normalna	35,2	Normalna	Resnično negativen
70	44	Normalna	31	Normalna	Resnično negativen
71	14,9	Nizka	29,7	Normalna	Resnično negativen
72	11	Nizka	19	Nizka	Resnično negativen

73	17	Normalna	35	Normalna	Resnično negativen
74	13	Nizka	25	Normalna	Resnično negativen
75	61	Normalna	21	Normalna	Resnično negativen
76	21	Normalna	87	Normalna	Lažno pozitiven
77	8	Nizka	29	Normalna	Resnično negativen
78	15	Nizka	20	Nizka	Resnično negativen
79	14	Nizka	31	Normalna	Resnično negativen

M

Povprečje vseh meritev p-metanefrin	20,800 ng/L
Povprečje vseh meritev p-normetanferin	29,086 ng/L

12.2. TABELE

Tabela A. *t*-porazdelitev

prostostne stopinje	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,01$	$\alpha=0,001$
1	12,706	63,657	636,619
2	4,303	9,925	31,598
3	3,182	5,841	12,941
4	2,776	4,604	8,610
5	2,571	4,032	6,859
6	2,447	3,707	5,959
7	2,365	3,499	5,405
8	2,306	3,355	5,041
9	2,262	3,250	4,781
10	2,228	3,169	4,587
11	2,201	3,106	4,437
12	2,179	3,055	4,318
13	2,160	3,012	4,221
14	2,145	2,977	4,140
15	2,131	2,947	4,073
16	2,120	2,921	4,015
17	2,110	2,898	3,965
18	2,101	2,878	3,922
19	2,093	2,861	3,883
20	2,086	2,845	3,850
21	2,080	2,831	3,819
22	2,074	2,819	3,792
23	2,069	2,807	3,767
24	2,064	2,797	3,745
25	2,060	2,787	3,725
26	2,056	2,779	3,707
27	2,052	2,771	3,690
28	2,048	2,763	3,674
29	2,045	2,756	3,659
30	2,042	2,750	3,646
35	2,030	2,724	3,591
40	2,021	2,704	3,551
45	2,014	2,690	3,520
50	2,008	2,678	3,469
55	2,004	2,669	3,476
60	2,000	2,660	3,460
70	1,994	2,648	3,435
80	1,989	2,638	3,416
90	1,986	2,631	3,402
100	1,982	2,625	3,390
120	1,980	2,617	3,373
∞	1,960	2,576	3,291