

# Retrospektivna studija dijagnostičkih svojstava laboratorijskih postupaka za određivanje metanefrina u krvnoj plazmi i 24-satnom urinu

---

**Babić, Natalija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:529349>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Natalija Babić**

**RETROSPEKTIVNA STUDIJA  
DIJAGNOSTIČKIH SVOJSTAVA  
LABORATORIJSKIH POSTUPAKA ZA  
ODREĐIVANJE METANEFRINA U  
KRVNOJ PLAZMI I 24-SATNOM URINU**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Natalija Babić**

**RETROSPEKTIVNA STUDIJA  
DIJAGNOSTIČKIH SVOJSTAVA  
LABORATORIJSKIH POSTUPAKA ZA  
ODREĐIVANJE METANEFRIINA U  
KRVNOJ PLAZMI I 24-SATNOM URINU**

**Završni rad**

**Osijek, 2019.**

Rad je ostvaren na Odjelu za kliničku kemiju Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku,  
KBC Osijek

Mentor rada: doc. dr. sc. Željko Debeljak

Rad ima 24 stranice, 4 tablice i 10 slika.

## **PREDGOVOR**

*Prije svega hvala mome mentoru doc. dr. sc. Željku Debeljaku na vremenu, stručnom vodstvu i pomoći pri izradi završnog rada.*

*Hvala mag. Ivani Marković koja je svojim savjetima olakšala pisanje rada.*

*Posebna zahvala mojim roditeljima, sestri i dečku na strpljenju, potpori i što su se živcirali, ali i veselili skupa samnom.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Sinteza i metabolizam kateholamina .....	1
1.2.	Feokromocitom .....	2
1.3.	Dijagnostika feokromocitoma .....	2
1.4.	Laboratorijska dijagnostika feokromocioma .....	3
1.4.1.	HPLC-ECD .....	3
1.4.2.	LC-MS/MS .....	4
2.	CILJ .....	5
3.	MATERIJALI I METODE .....	6
3.1.	Ustroj studije .....	6
3.2.	Ispitanici .....	6
3.3.	Materijali i metode .....	6
3.3.1.	Određivanje metanefrina i normetanefrina u plazmi .....	6
3.3.2.	Određivanje metanefrina i normetanefrina u 24-satnom urinu .....	7
3.4.	Statističke metode .....	7
4.	REZULTATI .....	8
4.1.	ROC analiza .....	8
4.2.	Distribucije podataka .....	10
4.3.	Post hoc Kruskal-Wallisova ANOVA analiza - Dunn test .....	12
4.4.	Regresijska analiza .....	13
5.	RASPRAVA .....	15
6.	ZAKLJUČAK .....	17
7.	SAŽETAK .....	18
8.	SUMMARY .....	19
9.	LITERATURA .....	21
10.	ŽIVOTOPIS .....	24

## POPIS KRATICA

CT – kompjutorizirana tomografija (eng. *Computed Tomography*)

MRI – magnetska rezonanca (eng. *Magnetic Resonance Imaging*)

COMT – katehol-O-metiltransferaza (eng. *Catechol-O-methyltransferase*)

MAO – monoaminooksidaza (eng. *Monoamine oxidase*)

DHPG – dihidroksifenilglikol (eng. *dihydroxyphenylglycol*)

VMA – vanilmandelična kiselina (eng. *Vanillylmandelic acid*)

SULT1A3- sulfoniltransferaza (eng. *Sulfotransferase 1A3*)

HPLC-ECD – tekućinska kromatografija spregnuta s elektrokemijskim detektorom (eng. *High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detection*)

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija s tandemskom masenom spektrometrijom (eng. *Liquid Chromatography- Tandem Mass Spectrometry*)

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *High Performance Liquid Chromatography*)

LIS – laboratorijski informacijski sustav

BIS – bolnički informacijski sustav

SPE – ekstrakcija u čvrstoj fazi (eng. *Solid Phase Extraction*)

ESI – ionizacija elektrosprejom (eng. *Electrospray Ionization*)

MRM – praćenje višestrukih reakcija (eng. *Multiple Reaction Monitoring*)

ROC – operacijska svojstva primatelja (eng. *Receiver Operating Characteristic*)

KV - kardiovaskularne

AUC – površina ispod krivulje (eng. *Area Under the Curve*)

AD – adenom

FEO – feokromocitom

OKVP – ostali kardiovaskularni poremećaji



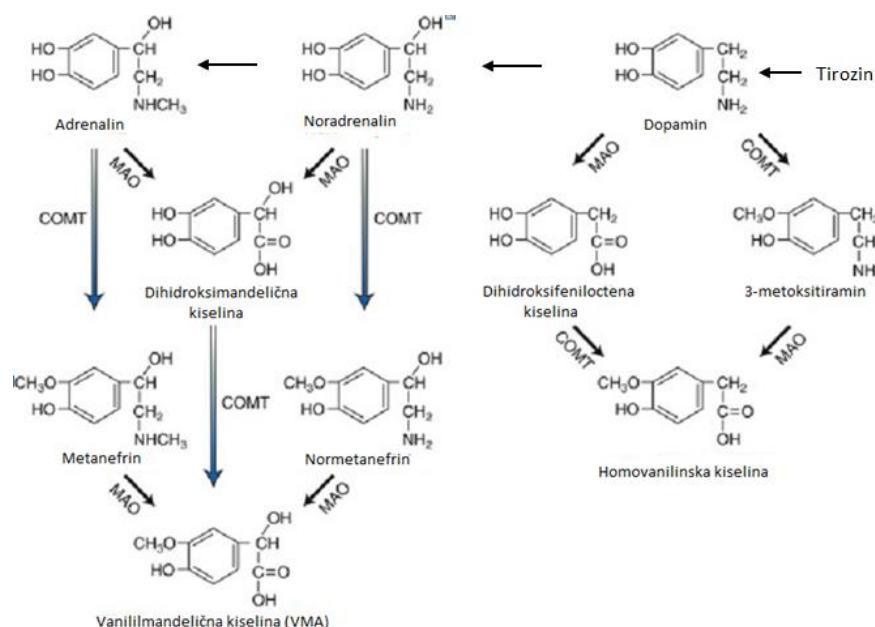
NMB – nemaligne bolesti ostalih organskih sustava

OTNŽ – ostali tumori nadbubrežnih žlijezda

## 1. UVOD

### 1.1. Sinteza i metabolizam kateholamina

Kateholamini se sintetiziraju iz aminokiseline tirozin koji se hidroksilira i dekarboksilira u dopamin. Noradrenalin je produkt metaboličkih modifikacija dopamina iz kojeg se metilacijom amino-skupine sintetizira adrenalin. U kromafinim stanicama srži nadbubrežne žlijezde kateholamine metabolizira katehol-O-metiltransferaza (COMT) koja je zaslužna za više od 90% cirkulirajućeg metanefrina i 24 – 40% cirkulirajućeg normetanefrina (Slika 1.) (1). Većina noradrenalina sintetizirana u živčanom sustavu primarno se metabolizira do dihidroksifenilglikola (DHPG) u simpatičkim živcima i otpušta u plazmu odakle ju preuzima jetra i pretvara u vanililmandeličnu kiselinu (VMA) (2). Svi kateholamini i njihovi metaboliti, osim VMA, mogu se konjugirati sulfatom uz pomoć enzima sulfotransferaze (SULT1A3) (3). Konjugirani spojevi topivi su u vodi te se eliminiraju urinarnom ekskrecijom (2). Kod pacijenata sa feokromocitomom, više od 94% povišenih razina plazmatskih normetanefrina ili metanefrina izvedeno je iz metabolizma kateholamina unutar tumorskih stanica, procesom koji se javlja neprekidno i nezavisno od svih fluktuacija u sekreciji kateholamina (4).



Slika 1. Biokemijski putevi metabolizma kateholamina (17)

Reakcije katalizirane katehol-O-metiltransferazom (COMT, eng. *Catechol-O-metiltransferase*) odvijaju se u ekstraneuralnim tkivima, a reakcije katalizirane monoamin oksidazom (MAO) u simpatičkim živcima i neuronima središnjeg živčanog sustava.

### 1.2. Feokromocitom

Feokromocitom je tumor kromafinih stanica srži nadbubrežnih žlijezda koji je karakteriziran prekomjernom sintezom i izlučivanjem kateholamina i njihovih metabolita. Može se javiti u muškaraca ili žena, najčešće u dobi između 30 i 60 godina. Karakteristični su simptomi feokromocitoma (kao posljedica pojačanog izlučivanja kateholamina i njihovih metabolita) hipertenzija, tahikardija, pojačano znojenje, palpitacije, izrazita glavobolja i bljedilo. (5, 6). Pojavnost većine feokromocitoma je sporadična, ali oko 25% slučajeva ima nasljednu osnovu (7). Feokromocitomi u multiplim endokrinim neoplazijama tipa 2 nastaju zbog mutacija *RET* protoonkogeno. Obiteljske mutacije *VHL* tumor supresorskog gena u von Hippel-Lindau sindromu mogu uzrokovati feokromocitom i tumore na bubrezima, jetri, testisima te hemangioblastome u središnjem živčanom sustavu i angiome mrežnice. Također, feokromocitomi se javljaju sekundarno kod mutacija gena za podjedinice B i D sukcinat dehidrogenaze. Osim navedenoga, mogu se pojaviti kod 1% pacijenata s neurofibromatozom tipa 1. (6).

### 1.3. Dijagnostika feokromocitoma

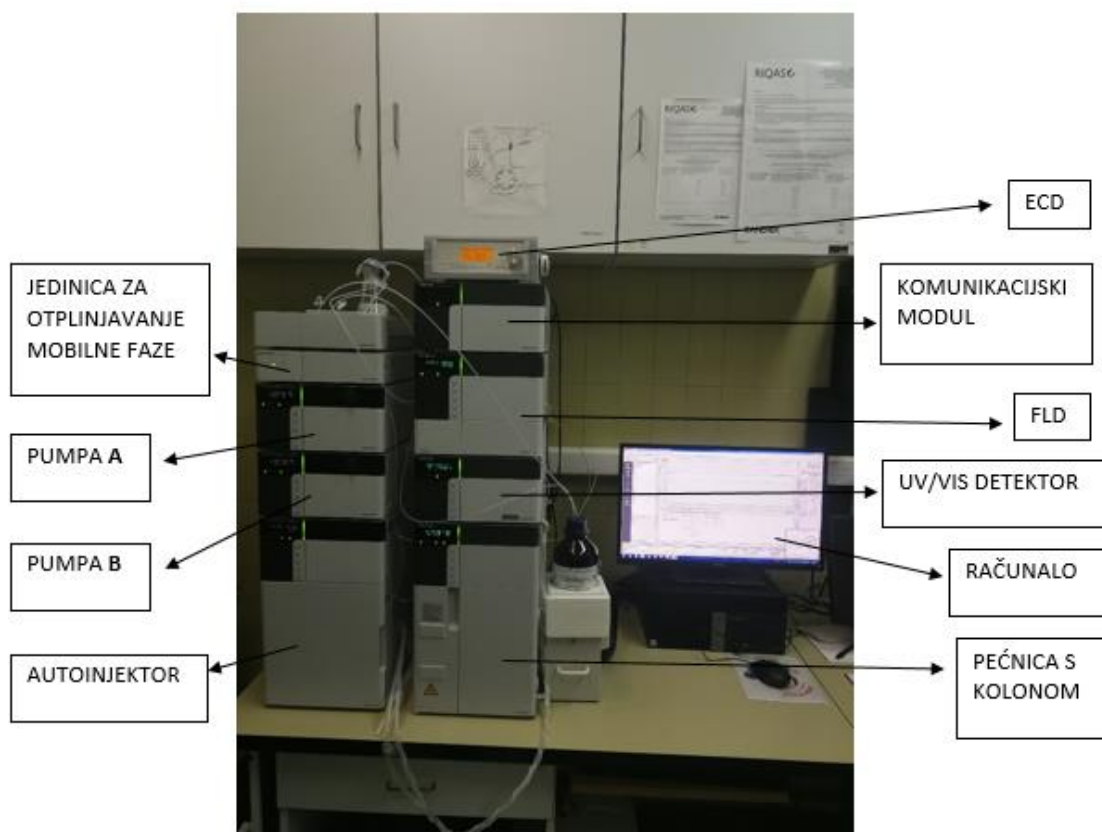
Pri sumnji na feokromocitom, uz uzimanje kliničke slike, određuju se razine metanefrina i normetanefrina u krvnoj plazmi i 24-satnom urinu, urinski i plazmatski kateholamini (adrenalin, noradrenalin i dopamin) te vanililmandelična kiselina (VMA) (8). U slučaju nepravovremene dijagnoze bolest može završiti fatalnim ishodom zbog čega je nužna visoka dijagnostička točnost biokemijskih testova. Kao potvrđne metode rade se slikovni prikazi lokalizacije tumora. Od slikovnih radioloških tehnika najčešće se upotrebljavaju kompjuterizirana tomografija (CT) i magnetska rezonanca (MRI). CT identificira do 95% feokromocitoma, a MRI je najpouzdanija metoda za lokaliziranje feokromocitoma (identificira više od 95% tumora) (9).

#### 1.4. Laboratorijska dijagnostika feokromocioma

Laboratorijska dijagnostika feokromocitoma zasniva se na biokemijskim testovima, točnije na određivanju koncentracija metanefrina i normetanefrina u krvnoj plazmi i u 24-satnom urinu. Tekućinska kromatografija spregnuta s elektrokemijskim detektorom (HPLC-ECD) ili spektrometrom masa (LC-MS/MS) metoda je izbora za određivanje navedenih analita u krvnoj plazmi. HPLC smatra se referentnom metodom za mjerenje kateholamina i njihovih metabolita u 24-satnom urinu (10).

##### 1.4.1. HPLC-ECD

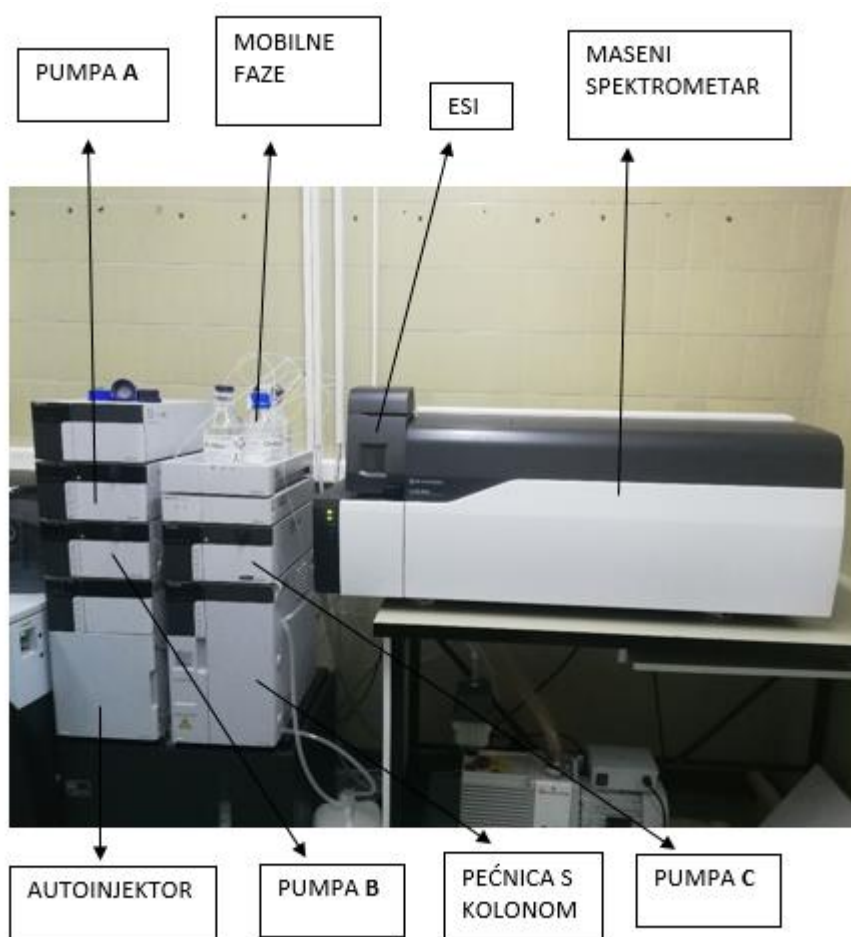
HPLC-ECD je sustav u kojem se pripremljeni uzorci injektiraju u mobilnu fazu te se komponente uzorka kromatografski odvajaju na koloni. Nakon odvajanja prolaze preko površine detektora na kojoj se odvijaju redoks reakcije. Elektrokemijskom reakcijom nastaje struja koja se mjeri elektrokemijskim detektorom. Izmjerena struja proporcionalna je koncentraciji analita koja se izračunava pomoću metode internog standarda uz korištenje visine kromatografskih pikova (Slika 2.). (11)



Slika 2. HPLC uređaj s elektrokemijskim detektorom (ECD)

### 1.4.2. LC-MS/MS

LC-MS/MS je tekućinsko kromatografski sustav pri čemu se analiti u detektoru ioniziraju elektrosprejom (ESI) te prelaze u plinovito stanje. Nakon toga ionizirani analiti ulaze u MS/MS sustav koji se sastoji od dva kvadrupola između kojih je kolizijska ćelija. Kod određivanja metanefrina u plazmi mjerenje analita provodi se (eng.) *multiple reaction monitoring* (MRM) metodom kojom se u prvom kvadrupolu izoliraju prekursorski ioni određene mase i naboja koji zatim prelaze u kolizijsku ćeliju gdje se prekursorski ioni fragmentiraju uz pomoć inertnog plina (argona) pri odgovarajućem naponu. Zatim se nastali produkt, ioni određenog omjera mase i naboja izoliraju u drugom kvadrupolu i udaraju u detektor. Analiti se detektiraju prema različitim masenim prijelazima specifičnim za spoj te se koncentracija analita izračunava pomoću interne standardne metode uz korištenje površine pika (Slika 3.).



Slika 3. HPLC spregnut s LCMS 8050 spektrometrom masa

## **2. CILJ**

Cilj ove retrospektivne studije je ispitati dijagnostičku točnost metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu i optimizirati dijagnostiku feokromocitoma. Visoka dijagnostička točnost značila bi uspješnije postavljanje dijagnoze feokromocitoma koja je otežana zbog velike heterogenosti simptoma koji se javljaju i u drugim bolestima.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Ustroj studije

Za ovaj završni rad provedena je retrospektivna (eng.) *case-control* studija u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek. Postojeći rezultati mjerenja koncentracija metanefrina i normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu preuzeti su iz laboratorijskog informacijskog sustava (LIS), dok su podaci o slikovnim pretragama preuzeti iz bolničkog informacijskog sustava (BIS). Uzorci pacijenta sa sumnjom na feokromocitom koji ulaze u ovu studiju zaprimljeni su u periodu od 1. 1. 2017. do 22. 7. 2019. godine.

#### 3.2. Ispitanici

Iz prethodno navedenog perioda preuzeti su rezultati 106 pacijenata sa sumnjom na feokromocitom kojima su rađena oba dijagnostička postupka. U studiju su uvršteni podaci pacijenata starijih od 40 godina. Izdvojeni pacijenti su s obzirom na dijagnozu klasificirani u 5 skupina: 16 pacijenata s adenomom (AD), 5 s feokromocitomom (FEO), 6 s ostalim kardiovaskularnim poremećajima (OKVP), 12 s nemaligim bolestima ostalih organskih sustava (NMB) te 67 pacijenata s ostalim tumorima nadbubrežnih žlijezda (OTNŽ). (Tablica 1.)

Tablica 1. Prikaz pacijenata s obzirom na dijagnozu, spol i dob

dijagnoza		AD		FEO		OKVP		NMB		OTNŽ		
spol		m	z	m	z	m	z	m	z	m	z	
dob	41-50		1	1		2	2	1	1	2	8	
	51-60	1	5		1	1	1	1	3	6	15	
	61-70		4	1	2			1	2	7	19	
	71-80	3	2						3	4	4	
	81-90										2	
ukupno		4	12	2	3	3	3	3	9	19	48	106

#### 3.3. Materijali i metode

##### 3.3.1. Određivanje metanefrina i normetanefrina u plazmi

Pacijentima je ujutro, nakon polusatnog mirovanja u ležećem položaju, (12) izvađena krv u epruvete s litij heparinom kao antikoagulansom (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, SAD). Epruvete su nakon vađenja stavljene u ledenu kupelj i dostavljene na

radilište gdje su centrifugirane 10 min na 3500 okr/min. Uzorci plazme su odvojeni od stanica i zamrznuti na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize. Na dan analize uzorci su odmrznuti na sobnoj temperaturi i pripremljeni prema uputama proizvođača reagensa RECIPE ClinMass LC-MS/MS Complete Kit for Free Metanephrines in Plasma (München, Njemačka). Analiza je provedena na Shimadzu Nexera X2 HPLC-u spregnutim s LCMS 8050 spektrometrom masa (Kyoto, Japan).

### 3.3.2. Određivanje metanefrina i normetanefrina u 24-satnom urinu

24-satni urin prikupljen je prema preporukama za skupljanje 24-satnog urina (13) u plastične spreminke sa 6M HCl-om kao konzervansom. Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača reagensa Recipe ClinRep HPLC Complete Kit for Metanephrines in Urine (München, Njemačka. Po primitku izmjeren je volumen 24-satnog urina. pH je namješten na adekvatnu vrijednost i alikvot je zamrznut na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize. Analiza je provedena na HPLC Shimadzu Nexera X2 (Kyoto, Japan) spregnutim s RECIPE EC Sputnik 6000 elektrokemijskim detektorom (München, Njemačka).

### 3.4. Statističke metode

Prikupljeni podatci iz LIS-a i BIS-a o dobi, spolu, dijagnozi te vrijednosti metanefrina i normetanefrina u krvnoj plazmi i 24-satnom urinu uvršteni su u tablicu računalnog programa Microsoft Office Excel 2013. Pomoću navedenog programa provedena je i linearna regresija odnosa vrijednosti metanefrina izmjerenih u krvnoj plazmi i 24-satnom urinu te vrijednosti normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu. U svrhu ispitivanja dijagnostičke točnosti, osjetljivosti i specifičnosti provedena je analiza operacijskih svojstava primatelja, tzv. ROC analiza u računalnom programu MedCalc ver.18.2.1. U okviru ROC analize izrađen je i grafički prikaz radi usporedbe površina ispod ROC krivulja kako bi se dobila statistička značajnost razlike tih površina koja reflektira razlike u točnosti metoda. Analize distribucije prikazane su (eng.) *Box and Whisker* grafovima, odnosno provedena je usporedba podataka bolesnika sa feokromocitomom u odnosu na ostale dijagnoze (adenom, ostali kardiovaskularni poremećaji, nemaligne bolesti ostalih organskih sustava i ostali tumori nadbubrežnih žlijezda). U programu Statistica 7.0 napravljen je post hoc Kruskal Wallis Dunn test kako bi se pokazalo postoje li statistički značajne razlike u dijagnostičkim svojstvima urinskih i plazmatskih pokazatelja feokromocitoma.

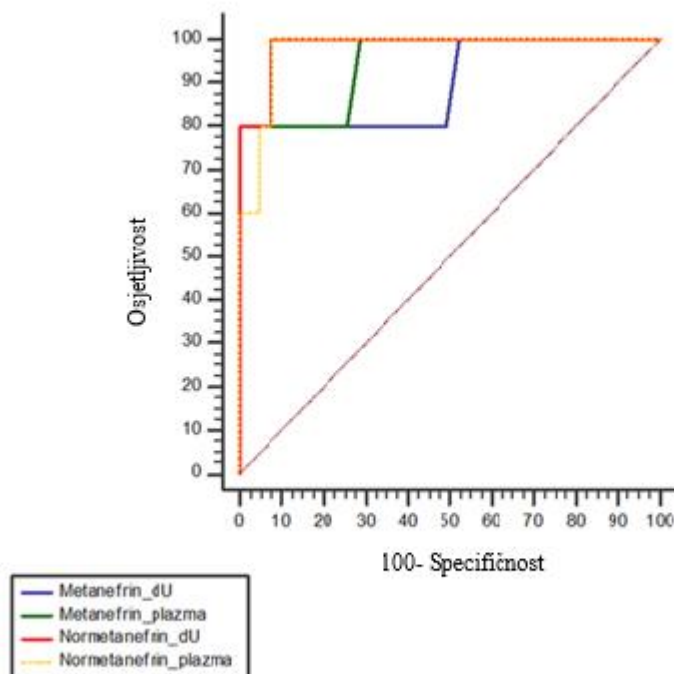


**4. REZULTATI**

**4.1. ROC analiza**

Tablica 2. Odnosi površina ispod ROC krivulja za pojedinu analizu

Varijabla	AUC	SE <sup>a</sup>	95% CI <sup>b</sup>
Metanefrin_dU	0,898	0,102	0,824 to 0,948
Metanefrin_plazma	0,946	0,0552	0,884 to 0,980
Normetanefrin_dU	0,984	0,0167	0,938 to 0,999
Normetanefrin_plazma	0,974	0,0188	0,923 to 0,995



Slika 4. Grafički prikaz usporedbe površina ispod ROC krivulja koji odražava razlike u točnosti metoda, odnosno odnos specifičnosti i osjetljivosti pojedine metode.

REZULTATI

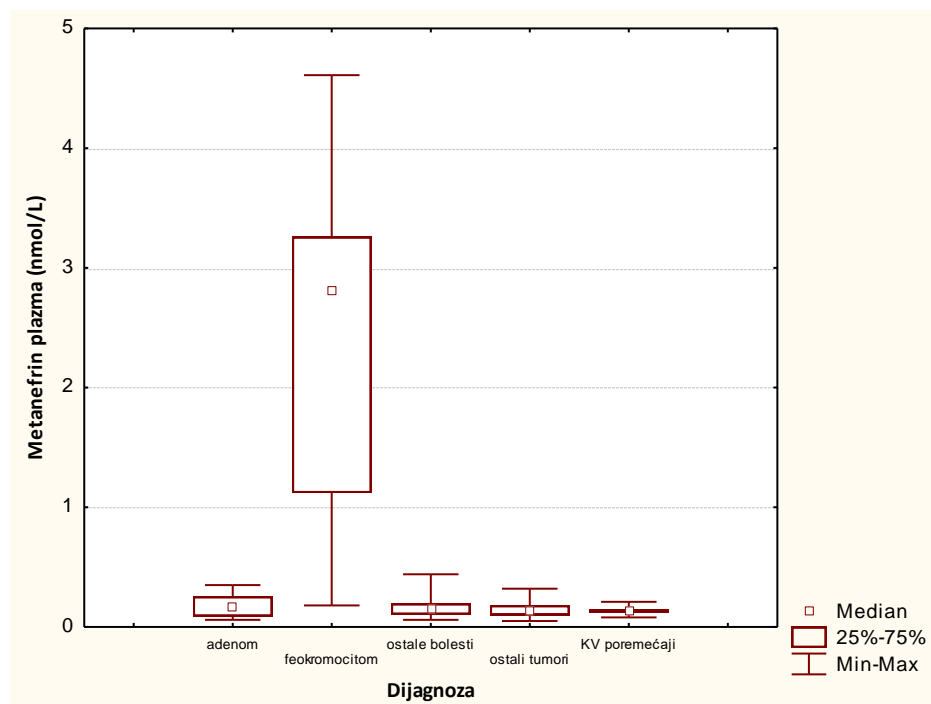
Tablica 3. Usporedba parova ROC krivulja za svaku analizu

Metanefrin_dU ~ Metanefrin_plazma	
Razlika između područja	0,0475
Standardna Pogreška <sup>a</sup>	0,0489
95% Interval Pouzdanosti	-0,0483 to 0,143
z statistika	0,972
Razina značajnosti	P = 0,3308
Metanefrin_dU ~ Normetanefrin_dU	
Razlika između područja	0,0861
Standardna Pogreška <sup>a</sup>	0,107
95% Interval Pouzdanosti	-0,125 to 0,297
z statistika	0,801
Razina značajnosti	P = 0,4229
Metanefrin_dU ~ Normetanefrin_plazma	
Razlika između područja	0,0762
Standardna Pogreška <sup>a</sup>	0,110
95% Interval Pouzdanosti	-0,140 to 0,293
z statistika	0,691
Razina značajnosti	P = 0,4899
Metanefrin_plazma ~ Normetanefrin_dU	
Razlika između područja	0,0386
Standardna Pogreška <sup>a</sup>	0,0613
95% Interval Pouzdanosti	-0,0815 to 0,159
z statistika	0,630
Razina značajnosti	P = 0,5286
Metanefrin_plazma ~ Normetanefrin_plazma	
Razlika između područja	0,0287
Standardna Pogreška <sup>a</sup>	0,0640
95% Interval Pouzdanosti	-0,0967 to 0,154
z statistika	0,449
Razina značajnosti	P = 0,6536
Normetanefrin_dU ~ Normetanefrin_plazma	
Razlika između područja	0,00990
Standardna Pogreška <sup>a</sup>	0,0210
95% Interval Pouzdanosti	-0,0312 to 0,0510
z statistika	0,472
Razina značajnosti	P = 0,6366

## REZULTATI

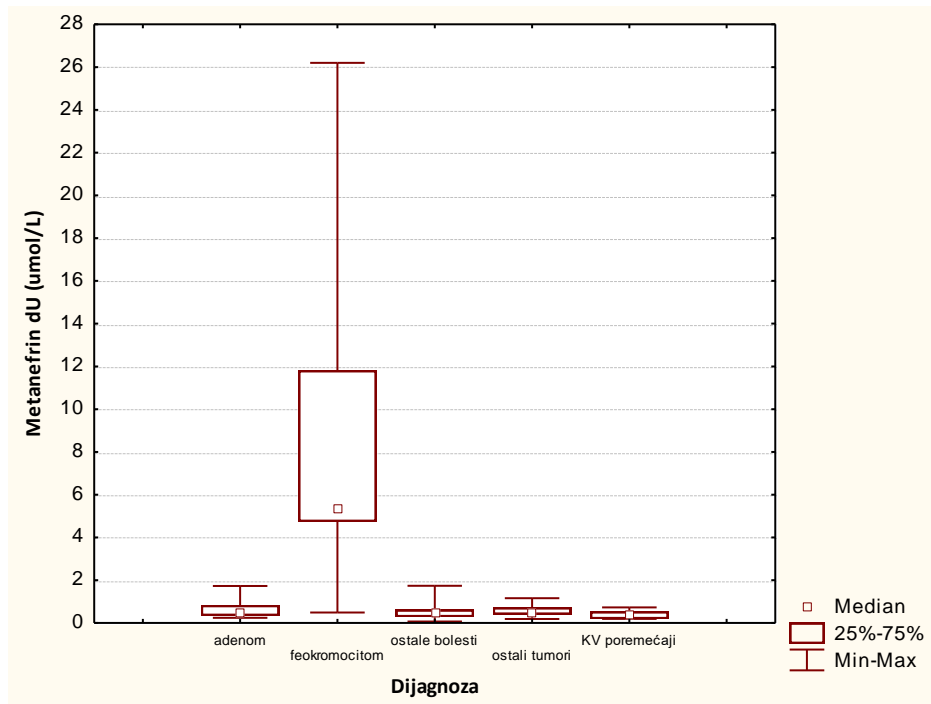
Iz prikazanoga je vidljivo kako nema statistički značajnih razlika s obzirom na dijagnostičku pouzdanost između pojedinih parametara. U svim slučajevima vrijednosti AUC prelazile su 0,89 (Tablica 2.). Youdenovom metodom dobivene su cut off vrijednosti metanefrina u plazmi  $>0,44$  nmol/L i metanefrina u 24-satnom urinu  $>1,74$   $\mu\text{mol/L}$  te cut off vrijednosti normetanefrina u plazmi  $>0,73$  nmol/L i normetanefrina u 24-satnom urinu  $>2,81$   $\mu\text{mol/L}$ . U skladu s navedenim, statistička analiza pokazala je da je osjetljivost metode za mjerenje metanefrina u plazmi i u 24-satnom urinu 80%, a osjetljivost za normetanefrin u plazmi i 24-satnom urinu 100%. Specifičnost je nešto niža kod normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu i iznosi 92,08% dok je specifičnost 100% za metanefrin u plazmi i 24-satnom urinu. Ovakvi rezultati ukazuju na nešto bolja dijagnostička svojstva analiza normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu zbog više osjetljivosti i specifičnosti.

### 4.2. Distribucije podataka

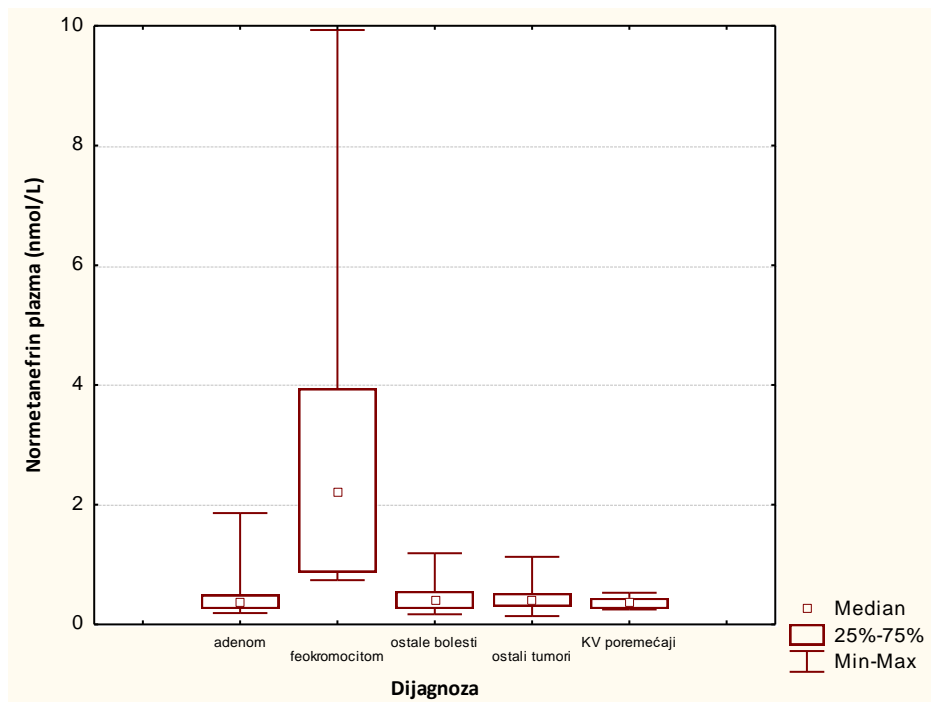


Slika 5. Prikaz distribucije podataka koncentracija metanefrina u plazmi kod bolesnika s feokromocitomom u odnosu na ostale dijagnoze

## REZULTATI

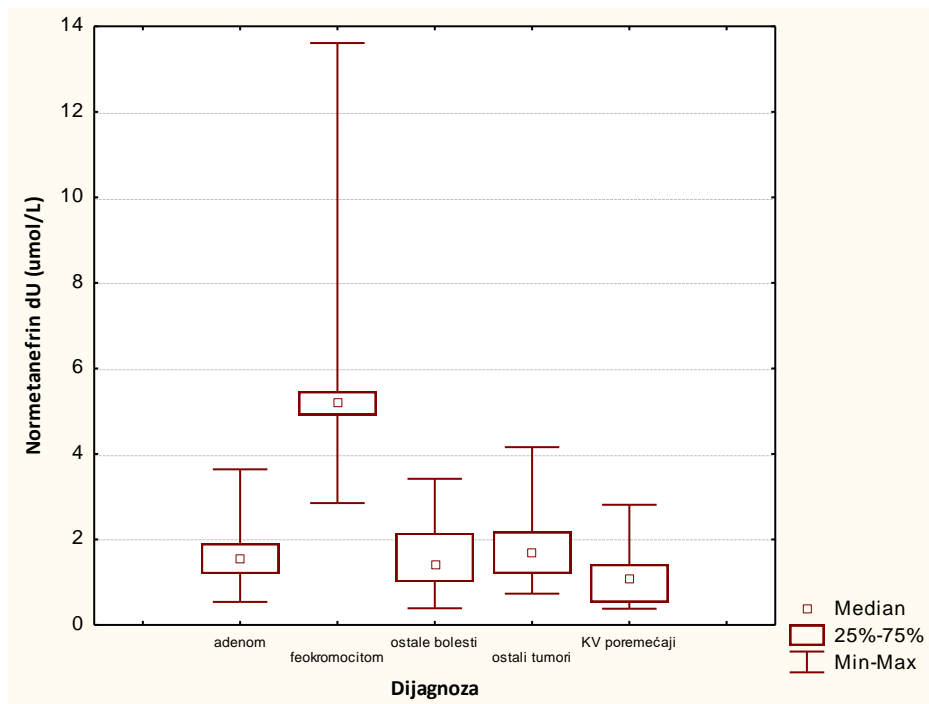


Slika 6. Prikaz distribucije podataka koncentracija metanefrina u 24-satnom urinu kod bolesnika sa feokromocitomom u odnosu na ostale dijagnoze



Slika 7. Prikaz distribucije podataka koncentracija normetanefrina u krvnoj plazmi kod bolesnika sa feokromocitomom u odnosu na ostale dijagnoze

## REZULTATI



Slika 8. Prikaz distribucije podataka koncentracija normetanefrina u 24-satnom urinu kod bolesnika sa feokromocitomom u odnosu na ostale dijagnoze

Iz grafičkih prikaza distribucije podataka uočljiva je značajna razlika normetanefrina u 24-satnom urinu i plazmi u uzorcima kod bolesnika sa feokromocitomom u odnosu na sve ostale ispitivane bolesti (Slika 7. i Slika 8.) dok metanefrini u 24-satnom urinu i plazmi slabije razlikuju feokromocitom od adenoma (Slika 5. i Slika 6.). Uzrok ovakvih vrijednosti metanefrina moguć je zbog malog broja ispitanika s dijagnosticiranim feokromocitomom i/ili zbog variranja vrijednosti kod pacijenata sa paroksizmalnom hipertenzijom.

### 4.3. Post hoc Kruskal-Wallisova ANOVA analiza - Dunn test

Tablica 4. Prikaz odnosa statističkih značajki feokromocitoma u odnosu na ostale dijagnoze prema pojedinim metodama

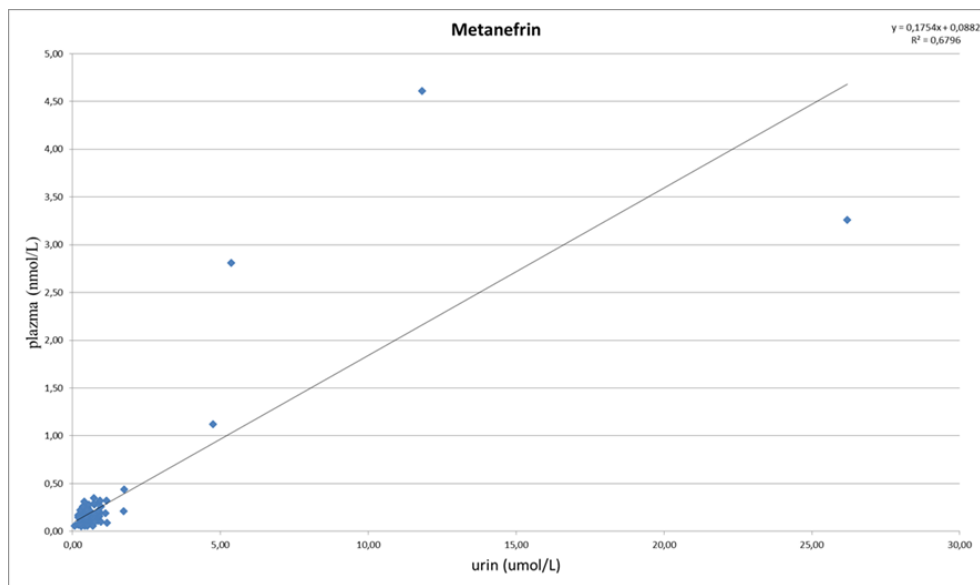
	AD	OKVP	NMB	OTNŽ	
Metanefrin plazma	0,106693	0,048678	0,05179	0,006332	FEO
Normetanefrin plazma	0,004630	0,019564	0,034218	0,006062	
Metanefrin dU	0,094370	0,023911	0,030444	0,049134	
Normetanefrin dU	0,008067	0,000988	0,007942	0,006777	

Iz Tablice 4. uočljivo je da ne postoje statistički značajne razlike između adenoma i feokromocitoma kod mjerenja metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu. Također, nema

## REZULTATI

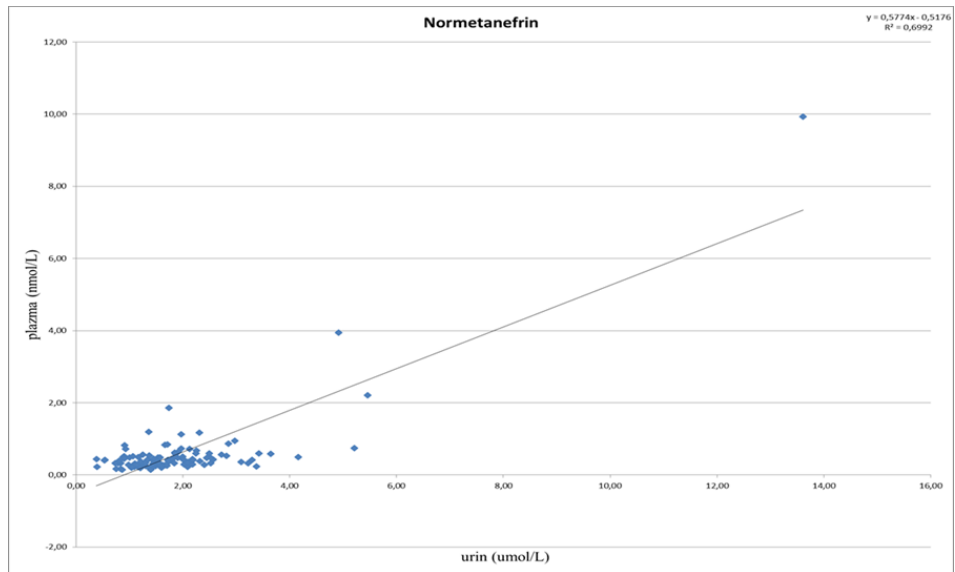
statistički značajnih razlika između nemalignih bolesti ostalih organskih sustava i feokromocitoma kod mjerenja metanefrina u krvnoj plazmi te između ostalih tumora nadbubrežnih žlijezda i feokromocitoma kod mjerenja metanefrina u 24-satnom urinu. Ovakav rezultat pokazao je mjerenje normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu najboljim metodama za razlikovanje feokromocitoma od ostalih dijagnoza.

### 4.4. Regresijska analiza



Slika 9. Grafički prikaz odnosa plazmatskih i urinskih vrijednosti metanefrina

## REZULTATI



Slika 10. Grafički prikaz odnosa plazmatskih i urinskih vrijednosti normetanefrina

Iz grafičkih prikaza distribucija metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu (Slika 9.) te normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu (Slika 10.) može se uočiti proporcionalan odnos između plazmatskih i urinskih metanefrina, odnosno normetanefrina no, unatoč tome, čini se da ovisnost nije linearna.

## 5. RASPRAVA

Feokromocitomi su heterogeni tumori u smislu kliničkih znakova i simptoma te biokemijskih karakteristika (14). Najčešći simptomi koji se javljaju kod pacijenata s feokromocitomom su hipertenzija, znojenje, palpitacije i glavobolja te je kod takvih pacijenata najveća vjerojatnost da će biokemijski testovi pokazati povišene koncentracije plazmatskih i urinarnih kateholamina odnosno njihovih metabolita. Međutim, kod nekih pacijenata simptomi neće biti izraženi ili ih uopće neće biti te biokemijski testovi kod takvih pacijenata mogu biti negativni. To može značiti da je tumor još malen i/ili da je biokemijski neaktivan. Osim toga, koncentracije plazmatskih kateholamina i ekskrecija urinarnih metanefrina nepromjenjivo su povišene kada feokromocitom uzrokuje neprekidnu hipertenziju, a kada je hipertenzija paroksizmalna, vrijednosti kateholamina i njihovih metabolita u plazmi i urinu mogu biti normalne za vrijeme normotenzivnih perioda (14).

Spektar poremećaja za koje je potrebno provesti testiranje na feokromocitom uključuje simptomatske pacijente za koje se sumnja na primarni ili recidivirajući feokromocitom, pacijente s incidentalomima, hipertenzijom rezistentnom na terapiju te pacijente s nasljednom predispozicijom za feokromocitom (pacijenti s von Hippel-Lindau sindromom, multiplom endokrinom neoplazijom tipa 2, neurofibromatozom tipa 1 i mutacijama gena za podjedinice B i D sukcinat dehidrogenaze). U ovoj studiji izdvojeno je 106 pacijenata starijih od 40 godina koji su klasificirani u 5 skupina: pacijente s adenomom, feokromocitomom, kardiovaskularnim poremećajima, ostalim bolestima i ostalim tumorima nadbubrežnih žlijezda (Tablica 1.). Svim pacijentima provedena su mjerenja metanefrina i normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu.

Za svaku metodu izračunate su vrijednosti površine ispod ROC krivulja (AUC) koje imaju vrijednosti iznad 0,89. Najveću površinu ispod krivulja imale su metode za normetanefrin u plazmi (0,97) i 24-satnom urinu (0,98) što ukazuje da ovi biokemijski pokazatelji imaju veću specifičnost i osjetljivost koja im omogućuje razlikovanje pozitivnih i negativnih rezultata, odnosno oboljelih i neoboljelih od feokromocitoma u odnosu na mjerenje metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu (Tablica 2., Slika 4.). Usporedba parova ROC krivulja nije pokazala statistički značajne razlike s obzirom na interval pouzdanosti. Normetanefrin u plazmi i u 24-satnom urinu ima specifičnost 92,08% i osjetljivost 100% dok metanefrin u plazmi i 24-satnom urinu imaju specifičnost 100% i osjetljivost 80%. Studija je pokazala bolja dijagnostička svojstva za mjerenje normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu zbog veće osjetljivosti u odnosu na mjerenje metanefrina u plazmi i 24-satnom



urinu koji su pokazali manju osjetljivost; dok u svim metodama nema veće razlike u specifičnosti metoda. S druge strane, Sawka i suradnici navode kako veću specifičnost imaju urinski testovi (98,2% do 100%) od plazmatskih testova (89,7 do 98,6%) (15). Isto tako istraživanje d'Herbomez i suradnika pokazalo je da urinski testovi imaju veću specifičnost, a plazmatski veću osjetljivost (16). Razlog ovakvom razilaženju u rezultatima može se pripisati ograničenom broju ispitanika što je moglo utjecati na mogućnost otkrivanja razlike u specifičnosti i osjetljivosti metoda.

Prikazi distribucije podataka normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu u odnosu na ostale dijagnoze pokazali su značajnu statističku razliku za razliku od metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu koji se nije pokazao uspješan u razlikovanju adenoma od feokromocitoma (Slika 5. – 8.). Kako bi se detaljnije proučile razlike između dijagnoza, provedena je post hoc Kruskal-Wallisova ANOVA analiza koja je pokazala statistički značajne razlike između feokromocitoma i ostalih dijagnoza kod mjerenja normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu što znači da su ove metode najpouzdanije u razlikovanju feokromocitoma od AD, OKVP, NMB i OTNŽ. Mjerenje metanefrina u plazmi uspješno razlikuje OKVP i OTNŽ od feokromocitoma dok mjerenje metanefrina u 24-satnom urinu uspješno razlikuje feokromocitom od OKVP i NMB (Tablica 4.). Regresijska analiza pokazala je proporcionalan odnos između koncentracija metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu kao i između koncentracija normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu, no unatoč tome čini se da ovisnost nije linearna (Slika 9. i Slika 10.).

S obzirom na dobivene rezultate i literaturne izvore može se zaključiti kako analize normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu imaju nešto bolja dijagnostička svojstva od analize metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu. U našoj studiji, za razliku od studije koju su proveli Sawka i suradnici, i plazmatski testovi su pokazali visoku specifičnost, a ne samo urinski. Iako je studija pokazala nešto bolja dijagnostička svojstva za mjerenje normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu, zbog malog broja pacijenata oboljelih od feokromocitoma, nije isključena valjanost metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu kao dijagnostičkog pokazatelja. Ova studija pokazala je zadovoljavajuću dijagnostičku točnost biokemijskih testova za postavljanje dijagnoze feokromocitoma.

## 6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedene studije i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- nema statistički značajnih razlika u dijagnostičkim svojstvima urinskih i plazmatskih pokazatelja feokromocitoma zbog toga što je AUC u svim slučajevima 0,89 ili veći što je u skladu s literaturnim podacima
- nešto bolja dijagnostička svojstva imaju analize normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu od analize metanefrina što je značajno kod razlikovanja feokromocitoma i adenoma.

## 7. SAŽETAK

**Uvod:** Feokromocitom je tumor kromafinih stanica srži nadbubrežnih žlijezda. Karakteriziran je prekomjernom sintezom i izlučivanjem kateholamina i njihovih metabolita što posljedično dovodi do hipertenzije, tahikardije, pojačanog znojenja, palpitacija, izrazite glavobolje i bljedila. Uz kliničku sliku, dijagnosticiranje feokromocitoma zasniva se na biokemijskim testovima, točnije određuju se koncentracije metanefrina i normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu te kao potvrdne metode koriste se slikovne radiološke tehnike (CT, MRI). HPLC-ECD ili LC-MS/MS metode su izbora za određivanje metanefrina i normetanefrina u plazmi dok se HPLC smatra referentnom metodom za mjerenje kateholamina i njihovih metabolita u 24-satnom urinu.

**Cilj:** Ispitati dijagnostičku točnost metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu i optimizirati dijagnostiku feokromocitoma.

**Materijali i metode:** Provedena je retrospektivna (eng.) *case-control* studija. Preuzeti su postojeći rezultati mjerenja koncentracija metanefrina i normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu iz LIS-a i podatci o slikovnim pretragama iz BIS-a. Provedena je analiza operacijskih svojstava primatelja (ROC analiza) te post hoc Kruskal Wallis Dunn test.

**Rezultati:** ROC analiza je pokazala osjetljivost metode za mjerenje metanefrina u plazmi i 24-satnom urinu 80%, a osjetljivost za normetanefrin u plazmi i 24-satnom urinu 100%. Specifičnost za metanefrin u plazmi i 24-satnom urinu je 100%, a za normetanefrin u plazmi i 24-urinu specifičnost je 92,08%. Post hoc Kruskal Wallis Dunn test pokazao je da, za razliku od metanefrina, normetanefrin razlikuje feokromocitom od ostalih bolesti.

**Zaključak:** Nema statistički značajnih razlika u dijagnostičkim svojstvima plazmatskih i urinskih pokazatelja feokromocitoma, no nešto bolja dijagnostička svojstva imaju analize normetanefrina u plazmi i 24-satnom urinu.

**Ključne riječi:** feokromocitom; kateholamini; metanefrin; normetanefrin

## 8. SUMMARY

### **Retrospective Study of Diagnostic Properties of Laboratory Methods for Determination of Metanephrines in Blood Plasma and Daily Urine**

**Introduction:** Pheochromocytoma is a tumor of the chromaffin cells of the adrenal gland. It is characterized by the over-synthesis and excretion of catecholamines and their metabolites, which in turn leads to hypertension, tachycardia, increased sweating, palpitations, severe headaches and pallor. The diagnosis of pheochromocytoma is based on clinical picture, biochemical tests for determination concentrations of metanephrine and normetanephrine in plasma and daily urine and as confirmatory methods are used imaging radiological techniques (CT, MRI). HPLC-ECD or LC-MS/MS are the methods of choice for the determination of plasma metanephrine and normetanephrine, while HPLC is considered the reference method for the measurement of catecholamines and their metabolites in daily urine.

**Goals:** To investigate the accuracy of metanephrines in plasma and daily urine and optimize the diagnosis of pheochromocytoma.

**Materials and methods:** A retrospective case-control study was conducted. Existing results of measurements of metanephrine and normetanephrine concentrations in plasma and daily urine from the Laboratory Information System have been retrieved as well as imaging data from the Hospital Information System. ROC analysis and post hoc Kruskal Wallis Dunn test have been performed.

**Results:** ROC analysis showed the sensitivity of the method for measuring methanephrine in plasma and daily urine of 80%, and sensitivity for normetanephrine in plasma and daily urine of 100%. The specificity for plasma methanephrine and daily urine is 100%, and 92.08% for plasma normethanephrine and daily urine. Post hoc Kruskal Wallis Dunn test showed that, unlike metanephrine, normetanephrine distinguishes pheochromocytoma from other diseases.

**Conclusion:** There are no statistically significant differences in the diagnostic properties of the plasma and urine indicators of pheochromocytoma, but analyzes of normetanephrine in plasma and 24-hour urine have slightly better diagnostic properties.

## SUMMARY

**Keywords:** catecholamines; metanephrine; normetanephrine; pheochromocytoma

## 9. LITERATURA

1. Eisenhofer G, Rundquist B, Aneman A, Friberg P, Dakak N, Kopin IJ, et al. Regional release and removal of catecholamines and extraneuronal metabolism to metanephrines. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80: 3009-17.
2. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev* 2004;56: 331-49.
3. Goldstein DS, Swoboda KJ, Miles JM, Coppack SW, Aneman A, Holmes C, et al. Sources and physiological significance of plasma dopamine sulfate. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2523-31.
4. Eisenhofer G., Keiser H., Friberg P., and al. Plasma metanephrines are markers of pheochromocytoma produced by catechol-O-methyltransferase within tumors *J Clin Endocrinol Metab* 1998 ; 83 : 2175-2185
5. Hrvatski liječnički zbor u suradnji s farmaceutskom tvrtkom MSD. MSD priručnik dijagnostike i terapije. Dostupno na adresi: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/endokrinologija/bolesti-nadbubreznih-zlijezda/feokromocitom>. Datum pristupa: 01.08.2019
6. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Sawyer BG. *Tiezt Fundamentals of Clinical Chemistry*. 6.izd. St. Louis: Saunders; 2008. str. 466-467.
7. Pacak K, Eisenhofer G, eds. *Pheochromocytoma: first international conference*. Annals of the New York Academy of Sciences. Boston: Blackwell Science, 2006.
8. Eisenhofer G, Huynh TT, Hiroi M, Pacak K. Understanding Catecholamine Metabolism as a Guide to the Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2001;2:297-311
9. Manger WM., Gifford RW ,Pheochromocytoma: current diagnosis and management, *Cleve Clin J Med* 1993; 60:365-378.

## LITERATURA

10. Lenders JWM, Biochemical diagnosis of pheochromocytoma i paraganglioma ,  
Annales d'Endocrinologie 70 (2009) 161-165
11. Kema IP, De Vries EGE, Muskiet FAJ. Clinical chemistry of serotonin and  
metabolites. J Chromatogr. B 2000;747:33-48.
12. Lenders JWM, Duh Q-Y, Eisenhofer G, Ginenez-Roqueplo A-P, Grebe SKG,  
Murad MH, Naruse M, Pacak K, Young WF. :Pheochromocytoma and  
Paraganglioma:An Endocrine Society Clinical Practice Guideline, J Clin  
Endocrinol Metab 2014, 99(6), 1914-1942.
13. RECIPE Chemicals+Instruments GmbH. Instruction Manual Metanephrines in  
Urine, File name: META\_E\_MAN.DOC
14. Peitzsch M, Prejbisz A, Kroiß M, Beuschlein F, Arlt W, Januszewicz A, Siegert G,  
Eisenhofer G: Analys of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and  
metanephrine by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass  
spectrometry: utility for diagnosis of dopamine-producing metastatic  
phaeochromocytoma, Ann Clin Biochem 2013, 50, 147-155.
15. Sawka AM, Jaeschke R, Singh RJ & Young WF Jr. A comparison of biochemical  
tests for pheochromocytoma: measurement of fractionated plasma metanephrines  
compared with the combination of 24-hour urinary metanephrines and  
catecholamines. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2003 88 553–  
558.
16. d'Herbomez M, Forzy G, Bauters C, Tierny C, Pigny P, Carnaille B, Pattou F,  
Wémeau JL and Rouaix N, An analysis of the biochemical diagnosis of 66  
pheochromocytomas, European Journal of Endocrinology (2007) 156 569–575

## LITERATURA

17. Adaptirano prema Dluhy RG, Lawrence JE, Williams GH. Endocrine hypertension. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al, eds. Williams Textbook of Endocrinology, 10th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2003:556



## **10. ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:**

Natalija Babić

**Datum rođenja:**

11. prosinca 1997.

**Adresa:**

B. J. Jelačića 74a, 34000 Požega

**e-mail:**

natalijababic4@gmail.com

**Obrazovanje:**

2004. - 2012. Osnovna škola Julija Kempfa, Požega

2012. - 2016. Katolička gimnazija s pravom javnosti, Požega

2016. - 2019. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika,  
Medicinski fakultet Osijek