



UPPSALA
UNIVERSITET

Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi

Biomedicinska analytikerprogrammet

Examensarbete 15 hp

Reference interval for urinary catecholamines and methylated catecholamines analysed using HPLC

Anna Jonsson

Handledare: Lars Blomström och Torbjörn Åkerfeldt
Klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala

2012

ABSTRACT

Catecholamines are stress hormones that are produced and released by a rare tumor called pheochromocytoma. This tumor can cause hypertension which if undiagnosed and untreated leads to death. Since good therapy is available, it is important to find the tumor in time. The most common way to diagnose the tumor is measurement of the biochemical markers; catecholamines and their metabolites, methylated catecholamines.

After observation that almost all normetanephrine results for women were higher than the upper reference limit and therefore pathological, the accuracy of the present reference intervals was questioned. Therefore new reference intervals for both urinary catecholamines and methylated catecholamines were developed by analysis of 46 samples using HPLC. Creatinine was analysed in acidified urine in order to see if the results became the same as when analysed in non-acidified urine.

Urinary catecholamines and methylated catecholamines were analysed using HPLC. Comparison between measurement of creatinine in acidified urine and non-acidified urine with an enzymatic method was performed using Architect ci 8200, Abbott.

As suspected, there was a difference between the present and new intervals. Therefore the new intervals will be used for future diagnosis. There was no difference between the two treatments of creatinine samples wherefore it can be measured in both.

In conclusion reference intervals determined in this study will be used and it was shown that creatinine can be measured in acidified urine.

KEywords

Pheochromocytoma • Paraganglioma • Creatinine • Chromaffin cells • Urine

INTRODUKTION

Feokromocytom är en ovanlig typ av tumör som kan ge symtom som till exempel högt blodtryck. Obehandlad kan den leda till döden. Tumören kan vara svår att upptäcka, dels på grund av att symtomen kan variera mycket mellan olika individer dels på grund av att den är ovanlig [1]. Detta leder till att många fall inte upptäcks [2]. Det är relativt enkelt att ställa diagnosen feokromocytom när den väl är misstänkt och om tumören upptäcks i tid finns bra behandling och chansen att överleva är stor [1].

Människan har två binjuror som totalt väger ungefär 8-10 g och sitter på njurarna. Binjurarna är endokrina körtlar som består av en inre märg och en yttre bark. I binjuremärgen kan en typ av tumör som kallas för feokromocytom bildas. Denna tumör bildas från en celltyp som kallas för kromafina celler och finns i binjuren. Den kan även utvecklas från kromafina celler som finns i det sympatiska perifera nervsystemet. Normalt bildas katekolaminer (noradrenalin, adrenalin och dopamin) i binjuremärgen. Vid feokromocytom kan även tumörcellerna bilda katekolaminer och det resulterar då i en ökad mängd katekolaminer i blodet. I de flesta fall av feokromocytom produceras mest noradrenalin eller adrenalin. Det är inte lika vanligt med en ökad produktion av dopamin men även det förekommer [1].

Definitionen på tumörerna kan variera en del. I vissa fall kallas alla tumörer som har sitt ursprung från det sympatiska neuroendokrina systemet för feokromocytom och delas därefter in efter om de härstammar från binjuremärgen (adrenala) eller om de är extra-adrenala. Enligt

WHO:s terminologi kallas de tumörer som växer i binjuremärgen för feokromocytom och de tumörer som är extra-adrenala för paragangliom [3]. Hädanefter kommer tumörerna att benämnas som adrenala och extra-adrenala feokromocytom. Vid en adrenal tumör är det vanligast att en ökad mängd adrenalin frisätts medan en ökad frisättning av noradrenalin är vanligast vid en extra-adrenal tumör.

Feokromocytom är en ovanlig tumör med en årlig incidens på 2-8 fall per 1 miljon invånare [4]. Tumören kan vara svår att hitta på grund av att symtomen kan variera mellan olika individer. Om den inte upptäcks leder den med stor sannolikhet till döden på grund av påfrestningarna på kroppen orsakade av bland annat det höga blodtrycket och diabetes. Om man däremot upptäcker den så kan man i många fall bota patienten. Behandlingen innebär att tumören opereras bort. Om man lyckas ta bort tumören helt återgår blodtrycket till det normala hos 90 % av patienterna [1].

Feokromocytom är oftast mindre än 6 cm och väger mindre än 100 g. Ungefär 90 % av tumörerna är benigna och 10 % är maligna [1]. Det går varken att bestämma histologiskt eller med biokemiska tester om tumören är benign eller malign utan det enda sättet att fastställa att tumören är malign är om man hittar metastaser på ställen i kroppen där kromafina celler normalt inte finns, till exempel i lymfnoder, lever, lungor eller ben [5]. I en studie utförd av Laird AM *et al.* har författarna kommit fram till att storleken på tumören inte verkar ha något samband med malignitetsgraden [4]. Feokromocytom växer ofta sakta och 5 års-överlevnaden är 44 % för malignt feokromocytom. För patienter med en benign tumör är chansen att bli totalt återställd efter operation 90 % [5]. Den vanligaste lokaliseringen av tumören är i binjuremärgen där cirka 90 % påträffas. Dessutom är det vanligare att tumören finns i den högra körteln än i den vänstra. I de fall tumören är belägen utanför binjuren (extra-adrenalt) är maligniteten högre, nämligen 30 %, än om den är belägen adrenalt [1].

Feokromocytom är lika vanlig hos kvinnor som hos män och förekommer hos alla folkslag. Man kan drabbas i alla åldrar men det är vanligast mellan 30-40 år. Barn som drabbas har ofta en ärftlig typ av feokromocytom och tumören är oftare malign. I dessa fall är det även vanligare att ha en dubbelsidig tumör, det vill säga en tumör i båda binjurarna [1].

Tio procent av alla fall av feokromocytom är ärftliga och den vanligaste typen är multipel endokrin neoplasia 2 (MEN 2) [1]. MEN 2 är orsakat av en mutation på proto-onkgenen *c-RET* på kromosom 10 och innebär att patienten kan drabbas av flera olika endokrina tumörer, bland annat ensidig eller tvåsidig feokromocytom. Vid MEN 2 är det vanligt att patienten även drabbas av tumörer i sköldkörteln och bisköldkörteln [6].

Det är den ökade produktionen av katekolaminer som orsakar de farliga symtomen. Katekolaminernas påverkan på kroppen i korta stunder är bra när kroppen ska klara av strid eller flykt. Om ökningen håller i sig en längre tid kan det däremot få allvarliga följder. Det allvarligaste symtomet är ökat blodtryck. Eftersom frisättningen av katekolaminerna både kan vara kontinuerlig och episodisk hos olika individer kan även det höga blodtrycket vara det. Högt blodtryck som är orsakat av feokromocytom går inte att behandla med vanliga blodtryckssänkande läkemedel. Andra vanliga symtom är huvudvärk, rikliga svettningar och hjärtklappning. Vissa patienter kan även få problem med den gastrointestinala funktionen till följd av de ökade mängderna av katekolaminer [1].

Katekolaminer består av en bensenring som har en hydroxylgrupp på tredje och fjärde kolet samt en sidokedja med en aminogrupp. Katekolaminerna bildas från aminosyran tyrosin. Enzymet tyrosinhydroxylas medverkar så att dihydroxyfenylalanin (DOPA) bildas i första steget. I andra steget bildas dopamin genom dekarboxylering av DOPA. Av dopamin bildas sedan noradrenalin och adrenalin. Katekolaminer är stresshormoner och produktionen och frisättningen av dessa ökar om kroppen utsätts för fara. När detta sker gör sig kroppen redo för strid eller flykt, blodtrycket och hjärtfrekvensen ökar, blodsockret stiger och blodet omfördelas från de inre organen till muskler och hjärna.

Katekolaminerna bryts ned till metaboliter med hjälp av enzymet katekol-O-metyltransferas (COMT). Det som sker då är att hydroxylgruppen på tredje kolet metyleras. Från adrenalin bildas metoxiadrenalin, från noradrenalin bildas metoxinoradrenalin och från dopamin bildas 3-metoxityramin. Dessa metaboliter kallas för metoxikatekolaminer och är inaktiverade katekolaminer, det vill säga de har inte längre någon biologisk aktivitet. En stor del av metoxikatekolaminerna metaboliseras sedan vidare till 4-hydroxi-3-metoximandelat. Med inverkan av enzymet monoaminoxidas (MAO), som kan verka både före och efter metylering av hydroxylgruppen, kan många olika metaboliter bildas. De vanligaste metaboliterna från katekolaminer är dock 4-hydroxi-3-metoximandelat och metoxikatekolaminer.

I muskler finns kreatinfosfat ur vilket energi frigörs. När detta sker bildas kreatinin som är en nedbrytningsprodukt och inte har någon funktion i kroppen. Kreatinin fördelar sig som vatten i kroppen och utsöndras via njurarna. Utsöndringen är relativt konstant och kreatininvärdet används därför ofta för att relatera koncentrationen av andra substanser i urinen till.

En stor andel av proverna som analyserades för katekolaminer och metoxikatekolaminer i urin på laboratoriet för klinisk kemi och farmakologi på Akademiska sjukhuset i Uppsala blev klassificerade som patologiska. Framförallt var provsvaren för metoxinoradrenalin hos kvinnor i de flesta fall ovanför referensintervallet. En misstanke väcktes därför om att referensintervallet som användes var felaktigt och ett syfte med denna studie är att ta fram ett nytt referensintervall. För att göra detta analyserades katekolaminer och metoxikatekolaminer i urin med hjälp av HPLC på 46 frivilliga personer.

Vanligtvis mäts kreatinin på icke surgjord urin men vid urinsamling är syra oftast tillsatt till urinsamlingsdunkarna. Efter att den nuvarande metoden för att mäta kreatinin på urin infördes har ingen kontroll skett på om det går lika bra att mäta kreatinin på surgjord urin som icke surgjord urin. Ett annat syfte med denna studie är därför att kontrollera att det fungerar bra att mäta kreatinin på surgjord urin. Detta kontrollerades genom att kreatinin mättes på surgjord och icke surgjord urin med en enzymatisk metod på Architect ci 8200, Abbott.

MATERIAL OCH METOD

En del av urinen surgjordes i efterhand med saltsyra, 6 mol/L till pH cirka 2,5. Katekolaminer och metoxikatekolaminer analyserades på surgjord urin med HPLC. Prover analyserades direkt eller frystes i $<-15^{\circ}\text{C}$ i väntan på analys.

HPLC-metoden bygger på att olika ämnen binder olika bra till en fast fas i en kolonn. Provet skickas genom kolonnen med hjälp av en mobil fas. Retentionstiden, det vill säga tiden det tar för ett specifikt ämne att ta sig genom kolonnen, är olika för olika ämnen. Med hjälp av retentionstiden identifierar man toppen på kromatogrammet som motsvarar ett visst ämne. En kvot räknades ut för höjden på toppen av det specifika ämnet i relation till höjden på den interna standarden. Därefter räknades koncentrationen ut från en standardkurva.

Kreatinin analyserades direkt, både på surgjord och icke surgjord urin. Alla prover har analyserats enligt tidigare utarbetad metodbeskrivning på laboratoriet för klinisk kemi och farmakologi, Akademiska sjukhuset, Uppsala.

Provmaterial

Icke surgjord dygnsamling av urin från friska individer i åldern 21-74 år användes för analys. Studiepopulationen bestod av 46 personer, 65 % kvinnor och 35 % män, med en medelålder

på 43 ± 15 år och en medianålder på 47 år. Medellängden hos populationen var 171 ± 8 cm och medelvikten 71 ± 15 kg vilket medförde ett medel-BMI på 24 ± 4 . Medelurinvolymen var 1615 ± 648 mL. Ingen etikprövning behövdes eftersom proverna var aidentifierade.

Katekolaminer i urin

Kalibratorer

Kalibratorer hanterades på samma sätt som proverna förutom att de inte centrifugerades. De fyra egentillverkade kalibratorerna fanns i början av varje analystillfälle och tillverkades i förväg.

Kalibrator 4 innehöll noradrenalin (arterenol) 800 nmol/L, adrenalin (epinefrin) 200 nmol/L och dopamin (3-hydroxytyramin) 4,0 μ mol/L, kalibrator 3 innehöll noradrenalin 400 nmol/L, adrenalin 100 nmol/L och dopamin 2,0 μ mol/L, kalibrator 2 innehöll noradrenalin 200 nmol/L, adrenalin 50 nmol/L och dopamin 1,0 μ mol/L och kalibrator 1 innehöll noradrenalin 80 nmol/L, adrenalin 20 nmol/L och dopamin 0,4 μ mol/L. Samtliga var spädda i perklorosyra 0,1 mol/L innehållande natriumdisulfid 0,1 mmol/L.

Kalibratorerna förvarades i $<-15^{\circ}\text{C}$.

Kontroller

Kontroller hanterades på samma sätt som proverna, det fanns en låg (normal) och en hög (patologisk) kontroll i början och slutet av varje analystillfälle. Kontroller till katekolaminer tillverkades av urin från friska individer. Till den höga kontrollen tillsattes noradrenalin, adrenalin och dopamin till en lämplig koncentration. Kontroller förvarades i $<-15^{\circ}\text{C}$.

Intern standard

Intern standard till katekolaminanalys bestod av 3,4-dihydroxibenzylaminhydrobromid. Intern standard 1,0 μ mol/L innehöll även 0,1 mol/L perklorosyra och 0,1 mol/L natriumdisulfid. Intern standard förvarades i $<-15^{\circ}\text{C}$.

Förbehandling av prover

Prover centrifugerades 10 minuter vid 2000 G, 250 μ L prov sattes till respektive rör och 50 μ L intern standard tillsattes till varje rör.

Rening av prover på uppberedningskolonn

Till uppberedning och injicering användes roboten ASPEC GX-271, loop 100 μ L (Gilson) med tillhörande programvara och proverna renades på en 'reversed phase'-kolonn (Isolute MFC18-kolonn, 1 mL kolonnvolym, packmaterial 50 mg, IST, Biotage). Till proverna tillsattes 500 μ L buffert med komplexbindande reagens vilket innehöll 8,9 mmol/L 2-aminoetyldifenylborat, 13,4 mmol/L EDTA och 2,0 mol/L ammoniumklorid och hade pH 8,5 och därefter 1 mL tetrabutylammoniumbromid-buffert 0,8 % (w/v) med 1,3 mmol/L EDTA och 0,2 mol/L ammoniumklorid, pH 8,5. Detta blandades med hjälp av insprutning av 2 mL luft. MFC18-kolonnerna konditionerades genom att de sköljdes igenom med 1 mL metanol och 1 mL tetrabutylammoniumbromid-buffert 0,4 % (w/v) med 1,3 mmol/L EDTA och 0,2 mol/L ammoniumklorid, pH 8,5. Därefter tillsattes 1,5 mL prov till respektive kolonn för att rinna igenom med ett flöde på 6 mL/min. Kolonnerna tvättades med 1 mL tetrabutylammoniumbromid-buffert 0,4 %, 1 mL tetrabutylammoniumbromid-buffert/metanol vilket bestod av hälften tetrabutylammoniumbromid-buffert 0,8 % och hälften metanol och 500 μ L vatten. Vid eluering användes 2 x 500 μ L citronsyra 47,7 mmol/L innehållande dinatriumvätefosfat 50 mmol/L. Eluatet blandades med hjälp av insprutning av 2 mL luft. Vid justering av pH till 8,5 användes ammoniaklösning 25 %.

Separation på HPLC

Stegvis ökades flödet till 0,750 mL/min på HPLC-pumpen. Den mobila fasen avluftades i en degasy och fick därefter ekvibrera systemet tills baslinjen blev stabil. Prover injicerades i en katjonbyteskolonn (Nucleosil 5 SA, 5 µm, 150 *3,9 mm, HiChrom, Scantec) med en injektionsvolym på 100 µL. Den mobila fasen innehöll 47,7 mmol/L citronsyra, 50 mmol/L di-natriumvätefosfat och 4 % (v/v) acetonitril och pH var justerat till 4,6 med natriumhydroxid 5 mol/L. Den mobila fasen var filtrerad med ett filter på 0,20 µm.

Detektion

Detektion skedde i en detektorcell (högekänslighetscell 5011, ESA, ChromTech AB). En elektrokemisk detektor användes där en oxidation och därefter en reduktion skedde. Detektorparametrarna var följande; oxidationspotential, detektor 1 E +350 mV och reduktionspotential, detektor 2 E -400 mV. Responstiden var 2 sek och förstärkning R2 5 µA. Detektorn (ESA Coulochem III, ChromTech AB) registrerade signalerna och skickade dessa vidare till dataintegreringsprogrammet Chromeleon (Dionex) där resultaten kunde tolkas. Dataintegreringsprogrammet registrerade signaler från detektorn och bildade ett kromatogram i 15 minuter från att provet injicerades i kolonnen.

Tolkning av svar

Kalibreringskurvan kontrollerades, retentionstiden på topparna jämfördes så att rätt topp på kromatogrammet blev identifierad som rätt substans. Kontrollerna kontrollerades så att de låg inom två standardavvikelser av det förväntade värdet. Koncentrationsvärdet på de olika substanserna omräknades till substansflöde och en kreatininkvot räknades ut. Värdet justerades även till 24 timmar. Referensvärden räknades ut med 2,5 och 97,5 percentilen. För substansflöde räknades bara en övre referensgräns ut medan ett referensintervall räknades ut för kreatininkvoten.

Metoxikatekolaminer i urin

Kalibratorer

Kalibratorer hanterades på samma sätt som proverna förutom att de inte centrifugerades. De fyra egentillverkade kalibratorerna fanns i början av varje analystillfälle och tillverkades i förväg.

Kalibrator 4 innehöll metoxinoradrenalin (normetanefrin hydroklorid) 4,0 µmol/L, metoxiadrenalin (metanefrin hydroklorid) 2,0 µmol/L och 3-metoxityramin (3-metoxityramin hydroklorid) 2,0 µmol/L, kalibrator 3 innehöll metoxinoradrenalin 2,0 µmol/L, metoxiadrenalin 1,0 µmol/L och 3-metoxityramin 1,0 µmol/L, kalibrator 2 innehöll metoxinoradrenalin 1,0 µmol/L, metoxiadrenalin 0,5 µmol/L och 3-metoxityramin 0,5 µmol/L och kalibrator 1 innehöll metoxinoradrenalin 0,5 µmol/L, metoxiadrenalin 0,2 µmol/L och 3-metoxityramin 0,2 µmol/L. Samtliga var spädda i perklorsyra 0,1 mol/L innehållande natriumdisulfit 0,2 mmol/L.

Kalibratorerna förvarades i <-15°C och tinades innan användande.

Kontroller

Till metoxikatekolaminer användes frystorkade kontroller; Lyphocheck Quantitative Urine Control, level 1 (BIO-RAD, USA) som låg kontroll och Lyphocheck Quantitative Urine Control, level 2 (BIO-RAD, USA) som hög kontroll. Till dessa kontroller sattes 10,0 g saltsyra 0,1 mol/L. Detta fick stå i minst 30 min sedan blandades det och 1 mL överfördes till varsitt ellermanrör. Kontrollerna förvarades i <-15°C.

Intern standard

Intern standard till metoxikatekolaminanalys tillverkades av 4-O-metyldopamin (3-hydroxi-4-metoxifenetylamino hydroklorid). Intern standard 10 µmol/L innehöll även 0,1 mol/L natriumdisulfit och 0,1 mol/L perklorosyra. Intern standard förvarades i <-15°C.

Förbehandling av prover

Prover centrifugerades 10 minuter i 2000 G och 250 µL prov sattes till varsitt provrör till vilket 50 µL intern standard och 250 µL vatten tillsattes. Därefter tillsattes 100 µL saltsyra 2 mol/L och innehållet i rören blandades. Rören kokades i värmeblock 100°C, minst 45 minuter och kylades sedan till rumstemperatur. Till varje rör tillsattes 4 mL ammoniumpentaborat/NaOH-buffert 37 mmol/L, pH 7,5 innehållande 13,4 mol/L EDTA.

Rening av prover på upprenningskolonn

Till upprensning och injicering av prover användes roboten aspec GX-271 (Gilson) med tillhörande programvara. Proverna renades på en svag katjonbyteskolonn (Isolute CBA-kolonn, 1 mL kolonnvolym, packmaterial 100 mg, IST, Biotage). Kolonnen konditionerades med 1 mL metanol 20 % (v/v) och därefter med 1 mL fosfatbuffert 62 mmol/L med pH 7,2 vilket bestod av 45 mmol/L di-natriumvätefosfat och 17 mmol/L natriumdivätefosfat. Med ett flöde på 1 mL/min fick 4,7 mL prov rinna igenom kolonnen. Kolonnerna tvättades med 1 mL vatten. Eluering skedde med 600 µL perklorosyra 1,0 mol/L. Eluatet blandades om med hjälp av insprutning av 2 mL luft.

Separation på HPLC

Separationen med HPLC skedde på samma sätt som för katekolaminer. Dock användes en reversed phase-kolonn (µBondapak C18, 10 µM, 300 x 3,9 mM, Waters Sverige AB) och injektionsvolymen var 25 µL. Den mobila fasen innehöll 47,7 mmol/L citronsyra, 50 mmol/L di-natriumvätefosfat och 4 % (v/v) acetonitril och lösningen filtrerades med ett filter på 0,20 µm.

Detektion

Detektionen skedde på samma sätt som för katekolaminer. Detektorparametrarna var dock inställda enligt följande. Oxidationspotential för detektor 1, E1, +450 mV, reduktionspotential, detektor 2, E2, -400 mV. Responstiden var 2 sek och förstärkning R2 var 2 µA. Dataintegreringsprogrammet registrerade signaler från detektorn och bildade ett kromatogram i 16 minuter från att provet injicerades i kolonnen.

Tolkning av svar

Tolkning av svar skedde på samma sätt som för katekolaminer.

Kreatinin i urin

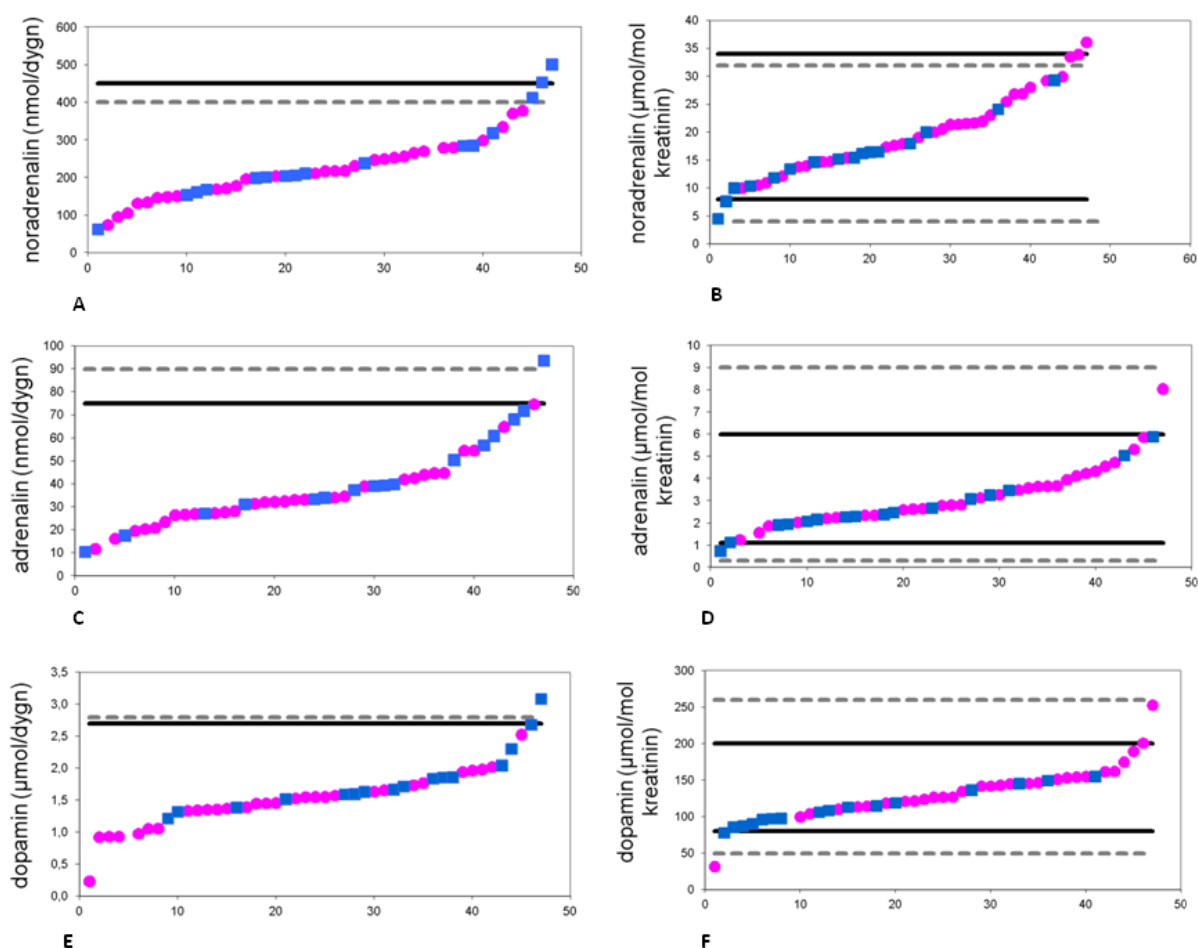
Rören centrifugerades 5 minuter i 2400 G. Kreatinin analyserades sedan med en enzymatisk metod på Architect ci 8200, Abbott (USA). I maskinen späddes provet 1:10 med natriumklorid 0,15 mol/L till en volym på 200 µL. Till analysen användes kitet Creatinine (Enzymatic), Abbott vilket innehöll två reagenser. Reagens 1 innehöll Goods buffert pH 7,5, 25 mmol/L vilket bestod av kreatinas, sarkosinoxidas, askorbatoxidas, katalas, ESPMT (N-etyl-N-sulfopropyl-m-toluidin), detergent och gentamicin. Reagens 2 innehöll Goods buffert pH 7,5, 100 mmol/L vilket bestod av kreatininas, peroxidas, 4-aminoantipyrin, detergent och natriumazid. Till varje analys användes 180 µL av reagens 1 och 60 µL av reagens 2.

RESULTAT

Katekolaminer och metoxikatekolaminer analyserades i urin från 46 frivilliga personer med hjälp av HPLC för att se koncentrationerna av dessa komponenter och därefter kunna räkna ut ett referensintervall. Referensintervall räknades ut med 2,5 och 97,5 percentilen. Kreatinin analyserades i både surgjord och icke surgjord urin och resultaten jämfördes för att se om de blev samma oavsett om urinen var surgjord eller inte.

Katekolaminer i urin

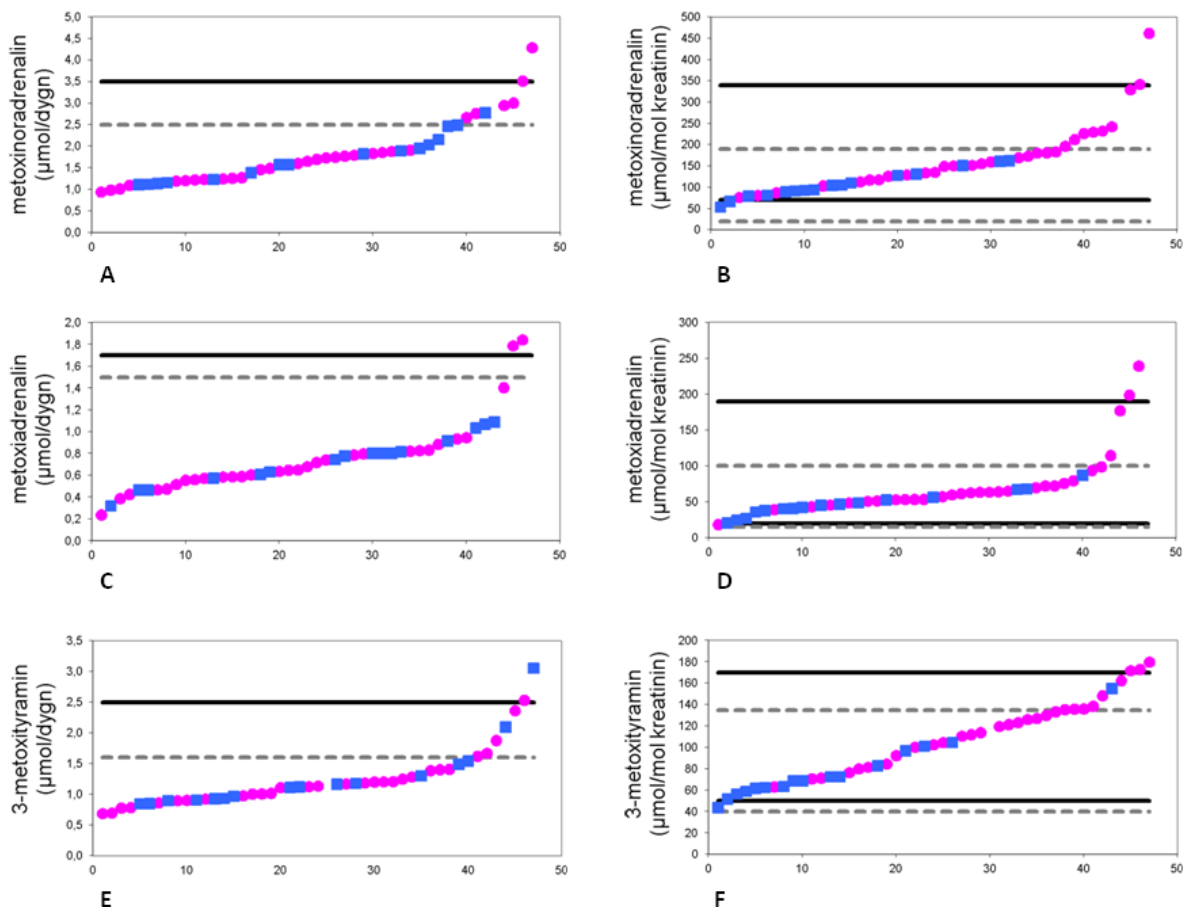
I figur 1 kan man se substansflöde och kreatininkvot för noradrenalin, adrenalin och dopamin. För noradrenalin, substansflöde och kreatininkvot, är de nya referensintervallen högre än de tidigare. För adrenalin och dopamin, substansflöde och kreatininkvot, är de nya referensintervallen lägre än de tidigare. För substansflöde för de tre analyterna liknar männens värden kvinnornas men för kreatininkvoten för de tre analyterna är männens värden något lägre än kvinnornas.



Figur 1. Figuren visar spridningen av resultaten för de 46 personer som utgör referensgruppen samt fördelningen mellan kvinnor (rosa) och män (blå). I figuren visas substansflöde för noradrenalin (A), adrenalin (C) och dopamin (E) samt kreatininkvot för noradrenalin (B), adrenalin (D) och dopamin (F). I varje delfigur visas tidigare (streckad grå linje) och nytt (heldragen svart linje) referensintervall.

Metoxikatekolaminer i urin

I figur 2 kan man se substansflöde och kreatininkvot för metoxinoradrenalin, metoxiadrenalin och 3-metoxityramin. De nya referensintervallen är högre än de tidigare för samtliga analyser. För substansflöde för de tre analyterna liknar männens värden kvinnornas men för kreatininkvoten för de tre analyterna är männens värden något lägre än kvinnornas.



Figur 2. Figuren visar spridningen av resultaten för de 46 personer som utgör referensgruppen samt fördelningen mellan kvinnor (rosa) och män (blå). I figuren visas substansflöde för metoxinoradrenalin (A), metoxiadrenalin (C) och 3-metoxityramin (E) samt kreatininkvot för metoxinoradrenalin (B), metoxiadrenalin (D) och 3-metoxityramin (F). I varje delfigur visas tidigare (streckad grå linje) och nytt (heldragen svart linje) referensintervall.

Jämförelse av tidigare och nytt referensintervall

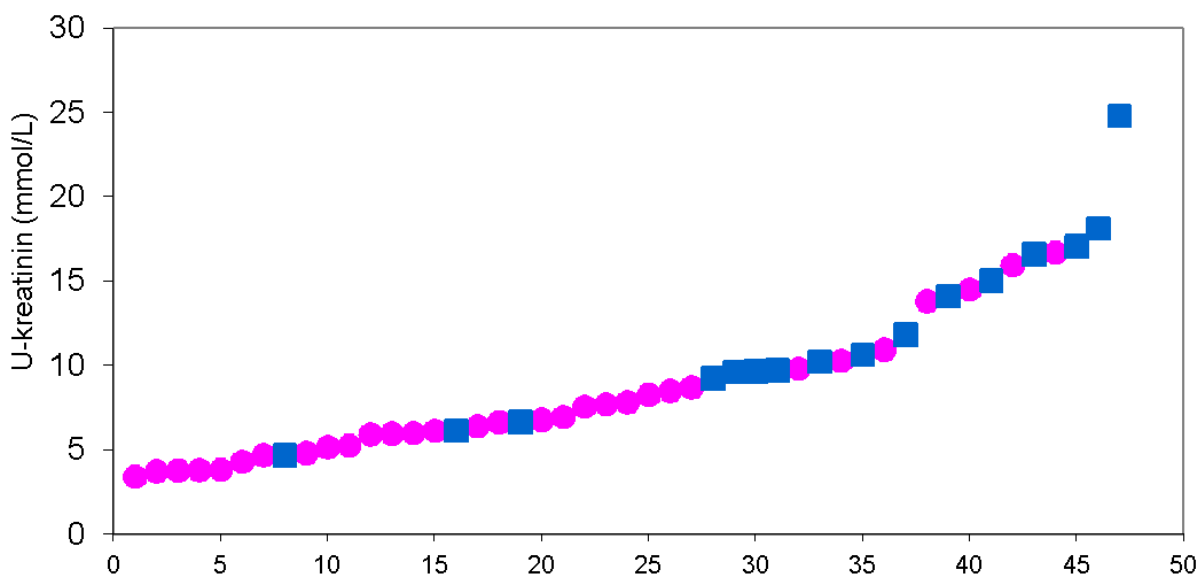
Alla provsvar från år 2011 på Akademiska laboratoriet i Uppsala jämfördes mot de tidigare respektive de nya referensintervallen, se tabell 1. För alla analyser förutom adrenalin (substansflöde och kreatininkvot) hamnade färre individer utanför de nya referensintervallen än de tidigare. Endast värden högre än referensintervallet anses som patologiska eftersom sjukdomen orsakar en ökad produktion av katekolaminer.

Tabell 1. Tabellen visar andelen av alla provsvar från år 2011 på Akademiska laboratoriet i Uppsala som hamnade utanför det tidigare respektive det nya referensintervallet. Även det totala antalet provsvar för varje analys samt tidigare och nytt referensintervall redovisas i tabellen.

Analys	Antal procent utanför tidigare referensintervall	Antal procent utanför nytt referensintervall	Totalt antal patientanalyser (n=)	Tidigare intervall	Nytt intervall
noradrenalin substansflöde	22,2	15,7	1399	<400	<450
noradrenalin kreatininkvot	30,6	25,5	1472	4-32	8-34
adrenalin substansflöde	9,3	16,6	851	<90	<75
adrenalin kreatininkvot	6,6	15,8	1160	0,3-9,0	1,1-6,0
dopamin substansflöde				<2,8	<2,7
dopamin kreatininkvot				50-260	80-200
metoxinoradrenalin substansflöde	23,7	8,5	684	<2,5	<3,5
metoxinoradrenalin kreatininkvot	43,4	9,7	691	20-190	70-340
metoxiadrenalin substansflöde	6,0	4,1	679	<1,5	<1,7
metoxiadrenalin kreatininkvot	19,2	4,2	687	15-100	20-190
3-metoxityramin substansflöde	16,2	4,1	686	<1,6	<2,5
3-metoxityramin kreatininkvot	22,4	10,0	692	40-135	50-170

Kreatinin i urin

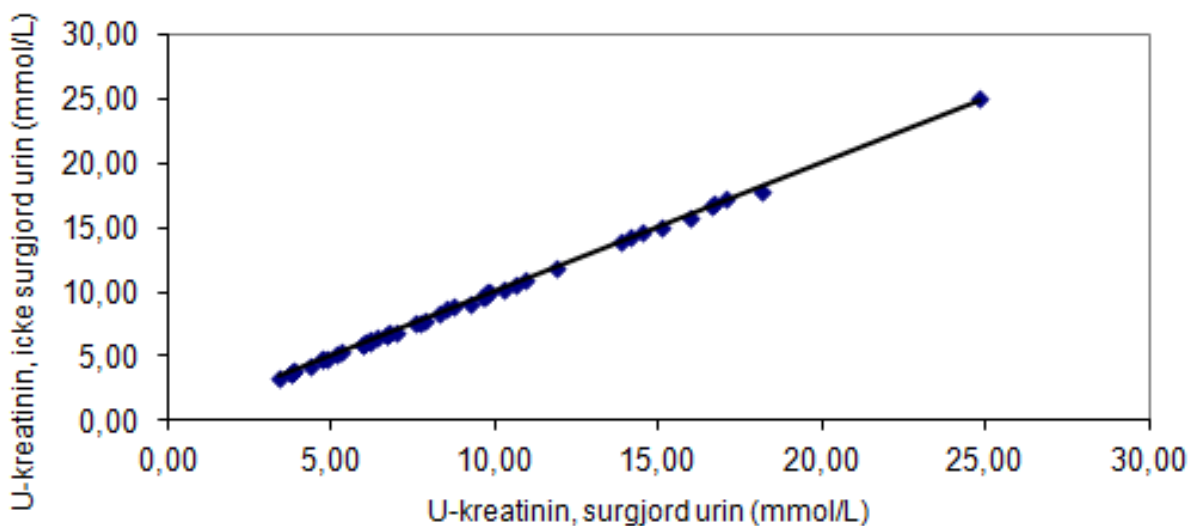
Figur 3 visar koncentrationvärdet för kreatinin i surgjord urin. Spridningen i kreatininvärde för studiepersonerna var jämn men männen hade något högre värden än kvinnorna. Värdena har använts för att räkna ut en kreatininkvot för katekolaminer och metoxikatekolaminer.



Figur 3. Kreatinin i surgjord urin (mmol/L). Figuren visar spridningen av provsvaren för försökspersonerna, fördelningen mellan män (blå) och kvinnor (rosa).

Jämförelse av analys av kreatinin på surgjord respektive icke surgjord urin

I figur 4 visas värdena för kreatinin analyserat på surgjord urin mot kreatinin analyserat på icke surgjord urin. Lutningen på kurvan är 1,0042 och R^2 är 0,9994.



Figur 4. Regressionskurva för jämförelse av kreatinin analyserat på surgjord urin (x-axeln) mot kreatinin analyserat på icke-surgjord urin (y-axeln). Lutningen på kurvan är 1,0042 och R^2 är 0,9994.

DISKUSSION

Eftersom referensintervallen för katekolaminer och metoxikatekolaminer i urin misstänktes vara felaktigt togs nya referensintervall fram genom att urinprover från 46 försökspersoner analyserades med hjälp av HPLC. Referensintervall räknades ut med hjälp av 2,5 och 97,5 percentilen. För att undersöka om det var någon skillnad på att analysera kreatinin på surgjord och icke surgjord urin analyserades samma 46 prover som dubbelprover där det ena provet surgjordes.

Försökspopulationen hade en medelurinmängd för 24 timmar på 1615 mL.

Medelurinmängden för 24 timmar hos 1152 försökspersoner i en studie utförd i Tyskland var mellan 1690-1853 mL beroende på kön och åldersgrupp [7]. Medelvolymen mellan de två grupperna skiljer sig inte mycket och skillnaden kan antas bero på att försökspopulationen i denna studie endast var 46 personer. Medel-BMI på försökspopulationen var 24,3 med en standardavvikelse på 3,8. Enligt WHO:s rekommendationer är det på gränsen mot övervikt men en norsk studie visar att ett BMI som ligger över gränsen för övervikt är vanligt förekommande [8]. Befolkningen i Norge och Sverige antas vara ganska lika och med avseende på urindygnsmängd och BMI kan försökspopulationen anses representera befolkningen.

Medianåldern för studiepopulationen var något högre än medelåldern vilket tyder på en snedfördelning. Detta skulle kunna påverka det framtagna referensintervallet om nivåerna av katekolaminer och metoxikatekolaminer skiljer sig mellan olika åldersgrupper. Det har inte skett någon kontroll om detta är fallet och därför antas nivåerna av analyterna vara samma i de olika åldersgrupperna.

Andelen män i försökspopulationen var lägre än andelen kvinnor, trots att en jämn könsfördelning eftersträvades. Detta berodde på att försökspopulationen till största delen bestod av laboratoriepersonal och studenter där kvinnor var överrepresenterade. Resultaten för kvinnorna var något lägre än för männen med avseende på kreatininkvoten. En orsak till detta är att individer med en större muskelmassa har ett högre kreatininvärde. Vanligtvis har män mer muskelmassa än kvinnor och därmed även ett högre kreatininvärde. Detta kunde observeras även i denna studie. Ett högre kreatininvärde medför en lägre kreatininkvot. Detta innebär följaktligen att två individer med samma substansföde per dygn kan få olika kreatininkvot och kvinnor som grupp får därmed högre värden. Om ett referensintervall med avseende på kreatininkvoten för enbart kvinnor skulle göras skulle det bli högre än ett referensintervall för båda könen. Följden av detta blir att en större andel kvinnor än män kommer att hamna utanför ett gemensamt referensintervall. Referensintervallet har ändå valts att göras på män och kvinnor tillsammans eftersom antalet män var för litet för att kunna användas till att ta fram ett eget referensintervall.

Det finns vissa felkällor för analysen. Dygnsurinsamlingen har inte alltid skett i exakt 24 timmar och det är även svårt att kontrollera om dygnsurinsamlingen har skett i 24 timmar och på rätt sätt. Vissa saker, till exempel nikotin, stress, koffein och alkohol, kan orsaka en ökad utsöndring av katekolaminer. Ingen kontroll av studiepersonernas intag av detta har skett eftersom patienterna antas ha samma intag av dessa komponenter som studiepersonerna. Vissa läkemedel kan även påverka utsöndringen av katekolaminer samt interferera med analyterna i metoden. Det har kontrollerats att studiepersonerna inte har intagit några läkemedel som man vet påverkar resultaten.

HPLC med elektrokemisk detektion är den metod som används på Akademiska laboratoriet i Uppsala för att analysera katekolaminer och metoxikatekolaminer i urin. Enligt en studie av Lenders J W *et al.* vet man inte vilken metod som är den bästa för att fastställa diagnosen

feokromocytom men för att utesluta sjukdomen eller kontrollera sjukdomsförloppet är analys av fria metoxikatekolaminer i plasma den bästa metoden. Samma metod rekommenderas därför även för att fastställa diagnosen [9]. Det är vanligast att katekolaminer och metoxikatekolaminer analyseras i urin med hjälp av HPLC och mindre vanligt med analys av metoxikatekolaminer i plasma. HPLC är en tidskrävande och kostsam metod och därför arbetar man för att utveckla nya, snabbare och bättre metoder. Unger N *et al.* menar att olika ”immunoassays” baserade på radio- eller enzymteknik skulle kunna ersätta HPLC men det behövs mer arbete för att utveckla sådana metoder [10]. Taylor R L *et al.* har validerat en metod för att mäta konjugerat metoxinoradrenalin och metoxiadrenalin i urin. Metoden heter ”liquid chromatography–tandem mass spectrometry” (LC-MS/MS) och har enligt författarna fördelarna att läkemedel inte interfererar och att tiden som ett kromatogram registreras är kortare än vid HPLC [11].

Under studiens gång uppstod vissa problem med den använda metoden. På vissa körningar erhöles inte en rak baslinje och detta berodde på att HPLC-kolonnen var för gammal och den byttes ut med lyckat resultat. Det var även vissa tekniska problem med uppberedningsroboten vilket orsakade att vissa prover fick analyseras om. Denna metod är som sagt tidskrävande och det kan vara bra om snabbare metoder utvecklas för att minska kostnaderna.

Det nya framtagna referensintervallet skiljer sig från det tidigare och det kan man tydligt se i att andelen patienter som får ett patologiskt provsvar skiljer sig beroende på om man använder det nya eller det tidigare referensintervallet. Som förväntat var den största skillnaden mellan referensintervallen bland annat på kreatininkvoten för metoxinoradrenalin där 43,4 % av provsvaren klassificerades som patologiska med det tidigare referensintervallet i jämförelse med 9,7 % med det nya referensintervallet. De flesta nya intervall blev högre än de tidigare och klassificerade därmed en lägre procentandel provsvar som patologiska. De nya intervallen för adrenalin, substansflöde och kreatininkvot, samt dopamin, substansflöde och kreatininkvot, blev lägre än de tidigare. Katekolaminer bryts lätt ner men är stabilare vid låg temperatur och lågt pH. För att minska nedbrytningen bör urinsamling ske med syra tillsatt i dunken och urinsamlingen bör förvaras svalt [3]. I denna studie tillsattes syra i efterhand och försökspersonerna uppmanades att förvara urinsamlingsdunkarna svalt om möjligt men ingen kontroll om detta hade skett gjordes. Detta kan vara anledningen till att de nya intervallen för adrenalin och dopamin blev lägre än de tidigare. Nivåerna av katekolaminer kan påverkas av stress så även det kan ha varit en orsak till skillnaderna.

Ett nytt referensintervall kommer att tas fram för alla analyser och detta är av stort värde då färre patienter behöver få ett falskt positivt provsvar och genomgå onödig medicinsk utredning. Detta minskar även kostnaderna för sjukvården.

Metoden som användes för att analysera kreatinin är den som används på laboratoriet, en enzymatisk metod på Architect ci 8200, Abbott (USA). Som man kan se under resultat fungerade det bra att analysera kreatinin på surgjord urin. Lutningen på kurvan blev 1,0042 vilket innebär att svaret blir samma oavsett om det analyseras på surgjord eller icke surgjord urin. R^2 var 0,9994 vilket talar för en god korrelation. Innebörden av detta är att man kan fortsätta att analysera kreatinin på surgjord urin.

Sammanfattningsvis har ett nytt referensintervall tagits fram för katekolaminer och metoxikatekolaminer i urin. Det har även konstaterats att kreatinin kan analyseras på surgjord urin och att det får samma resultat som kreatinin analyserat på icke surgjord urin med ovan beskriven metod på Architect ci 8200 från Abbott.

REFERENSER

- [1] Agana-Defensor R, Proch M. Pheochromocytoma: a clinical review. *AACN Clin Issues*. 1992(3);309-18
- [2] Yu R, Nissen N N, Chopra P, *et al*. Diagnosis and treatment of pheochromocytoma in an academic hospital from 1997 to 2007. *Am J Med*. 2009(122);85-95
- [3] Reisch N, Peczkowska M, Januszewicz A, *et al*. Pheochromocytoma: presentation, diagnosis and treatment. *J Hypertens*. 2006(24);2331-9
- [4] Laird A M, Gauger P G, Doherty G M, *et al*. Paraganglioma: not just an extra-adrenal pheochromocytoma. *Langenbecks Arch Surg*. 2012(397);247-53
- [5] Bravo E L. Evolving concepts in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of pheochromocytoma. *Endocr Rev*. 1994(15);356-68
- [6] Marini F, Falchetti A, Del Monte F, *et al*. Multiple endocrine neoplasia type 2. *Orphanet J Rare Dis*. 2006(1);45
- [7] van Haarst E P, Heldeweg E A, Newling D W, *et al*. The 24-h frequency-volume chart in adults reporting no voiding complaints: defining reference values and analysing variables. *BJU Int*. 2004(9);1257-61
- [8] Petursson H, Sigurdsson J A, Bengtsson C, *et al*. Body configuration as a predictor of mortality: comparison of five anthropometric measures in a 12 year follow-up of the Norwegian HUNT 2 study. *PloS ONE* 2011(6);e26621
- [9] Lenders J W, Pacak K, Walther M M, *et al*. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma – which test is best? *JAMA* 2002(287);1427-34
- [10] Unger N, Deutschbein T, Walz M K, *et al*. The value of immunoassays for metanephrines in the biochemical diagnosis of pheochromocytoma. *Horm Metab Res*. 2009(41);676-79
- [11] Taylor R L, Singh R J. Validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for analysis of urinary conjugated metanephrine and normetanephrine for screening of pheochromocytoma. *Clin Chem*. 2002(48);533-39