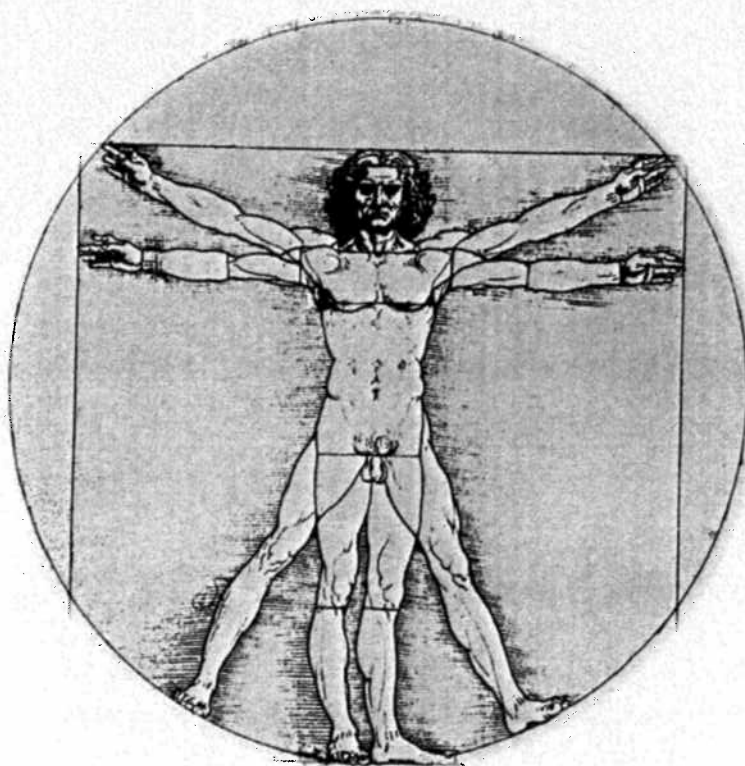


RECENZOVANÝ, POSTGRADUÁLNE ZAMERANÝ ODBORNÝ LEKÁRSKY ČASOPIS

INTERNÁ MEDICÍNA

PEER-REVIEWED POSTGRADUATE MEDICAL JOURNAL

INTERNAL MEDICINE



ISSN 1335-8359
www.samedl.sk

1
Ročník 1/2011

FEOCHROMOCYTÓM: MOŽNOSTI BIOCHEMICKEJ DIAGNOSTIKY

Pavel Blažíček

Zobrazovacie metódy na lokalizáciu feochromocytómu výrazne pokročili, ale napriek tomu má biochemická diagnostika v primárnej diagnostike veľký význam. Ako skriningová metóda na diagnostiku feochromocytómu sa používa stanovenie voľných katecholamínov (adrenalin, noradrenalin, dopamin) v 24-hodinovom moči (toto stanovenie má senzitivitu 85 % pri 85 % špecifite) alebo celkové nefríny (metanefrin, normetanefrin, metoxydopamin) v 24-hodinovom moči (toto stanovenie má senzitivitu 96 % pri 64 % špecifite). Keď bolo dokázané, že v krvi sa vyskytujú voľné nefríny (metanefrin a normetanefrin), ktoré pochádzajú priamo z feochromocytómu (feochromocytóm obsahuje enzým katechol-O-metyltransferázu, ktorá premieňa katecholamíny na nefríny), stanovenie nefrínov sa začalo používať ako najspoľahlivejšia metóda na diagnostiku feochromocytómu (senzitivita 98 % pri špecifite 89 %).

Kľúčové slová: biochemická diagnostika, feochromocytóm, katecholamíny, nefríny)

PHEOCHROMOCYTOMA: BIOCHEMICAL DIAGNOSTIC OPTIONS

Imaging techniques to localize pheochromocytomas have advanced markedly, but nevertheless the biochemical diagnosis in primary diagnostics is of major importance. As a screening method for diagnostics of pheochromocytomas is used determination of free catecholamines (adrenaline, noradrenaline, dopamine) in 24-hour urine (this determination has a sensitivity of 85 % at 85 % specificity), or total nephines (metanephrine, normetanephrine, methoxydopamine) in 24-hour urine (this determination has a sensitivity of 96 % at 64 % specificity). When it was proved that in blood there was found a high level of free nephines (metanephrine and normetanephrine), directly derived from pheochromocytoma (pheochromocytoma contains catechol-O-methyltransferase, which converts catecholamines to nephines) determination of nephrine had become as the most reliable method for diagnostics of pheochromocytoma (sensitivity 98 % at specificity 89 %).

Key words: biochemical diagnostics, pheochromocytoma, catecholamines, nephines

Interná med. 2011; 11 (1): 10-15

Úvod

Tumory chromafinného tkaniva sú pomerne zriedkavé, ale ich včasná diagnostika umožňuje „vyliečenie“ pacienta. Medzi tumory chromafinného tkaniva zaraďujeme feochromocytóm (FEO), feochromoblastóm, paraganglióm, neuroblastóm. Vzhľadom na to, že tumory chromafinného tkaniva vylučujú zvýšené množstvá katecholamínov (KA), ich biochemická diagnostika bola od začiatku dôležitá a napriek výraznému pokroku zobrazovacích metód zostáva v diferenciálnej diagnostike veľmi dôležitá. Vzťah medzi katecholamínmi a tumormi chromafinného tkaniva je dávno známy, avšak meranie KA bolo veľmi zložitý. V r. 1929 pacientovi s hypertenziou počas jeho života bol odstránený tumor nadobličky a potom došlo k normalizácii predtým vysokého krvného tlaku, a tým sa prvýkrát potvrdil priamy vzťah medzi FEO a KA. Významný pokrok v biochemickej diagnostike prinieslo až presné poznanie biosyntézy KA a metabolizmu KA^(1,2). KA sú organické zlúčeniny, ktoré majú vo svojej molekule katecholové jadro (benzénové jadro, ktoré má v polohe 3,4-hydroxilovú skupinu) a v postrannom alifatickom reťazci aminovú skupinu. KA sú prvé chemicky identifikované hormóny a v organizme sú syntetizované v adrenergických neurónoch nervového systému, v bunkách sympatických ganglií a v chromafinných bunkách drene nadobličky. Vzhľadom na to, že sa v biologických tekutinách vyskytujú vo veľmi nízkych koncentráciách (v krvi približne 100 pmol/l, v moči 500 nmol/l), výber analytickej metódy je veľmi dôležitý.

Diagnostikou a liečbou feochromocytómu sa naše pracovisko zaoberalo od roku 1970, keď sa nám podarilo diagnostikovať a liečiť prvého pacienta s FEO^(3,16). Odvtedy som v spolupráci s endokrinológmi, internistami a urológmi zistil u viacej ako 100 pacientov vysoké hladiny KA v moči a nefrínov v krvi a FEO bol lokalizovaný (CT, MIBG, PET) a operačne odstránený. V práci chcem uviesť vlastné skúsenosti s biochemickou diagnostikou a súčasné literárne poznatky. Treba zdôrazniť, že ak tumory sympatikoneurálneho systému nie sú včas liečené, vedú jednoznačne ku skráteniu života. Na druhej strane, keďže morfológicky a klinicky sú často benigne, ich odstránenie z organizmu až v 90 % vedie k vyliečeniu. Farmakologicky následkom nadmernej produkcie svojich hormónov sú malígne a vedú k vývoju komplikácií a k predčasnej smrti. K diagnostickému a liečebnému úspechu sa možno dopracovať len poznaním ich prejavov, dôkazom ich prítomnosti v organizme a v rukách profesionálov sa môže pacient vyliečiť. Hoci tumory sú relatívne zriedkavé, na základe genetických poznatkov sa dá chorobám nimi vyvolaným predchádzať pred klinickými prejavmi u pacienta alebo v príbuzenstve a niekedy zabrániť vzniku ochorenia, ak sa odstráni cieľový orgán. Najprv treba vysloviť podozrenie a potom biochemicky stanoviť zvýšenú koncentráciu KA alebo nefrínov (NE) a potvrdiť podozrenie a potom niektorou zo zobrazovacích metód lokalizovať tumor. Problém sa týka širokej lekárskej spoločnosti - internistov, biochemikov, pediatrov, pôrodnikov, urológov, chirurgov, anestéziolo-

ológov, onkológov, psychiatrov, dermatológov, oftalmológov, neurológov a ostatných zdravotníckych pracovníkov, aby sa minimalizovali potenciálne nebezpečia pri manipulácii s pacientom. Takmer bez konca sú subjektívne a objektívne príznaky u pacienta s FEO a niektoré môžu ošetrojúceho lekára pomiasť, ale ak pozná embryologické a genetické vzťahy tohto ochorenia, môže sa lekár zorientovať a dospieť k správnej diagnóze. Veľmi dôležitý je fakt, že feochromocytóm je niekedy vyliečiteľný, ale neliečený sa skoro vždy končí smrťou.

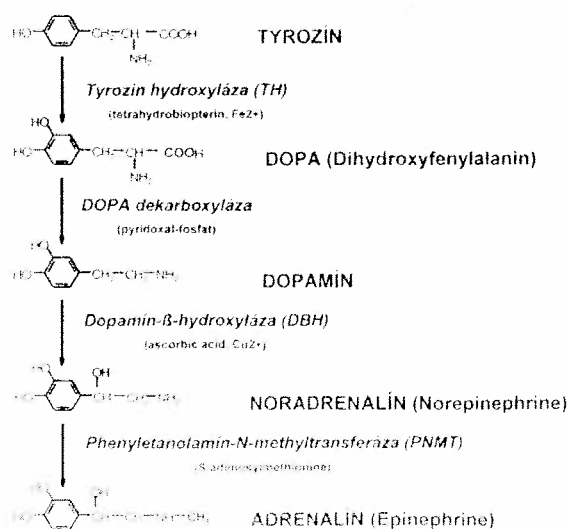
Biosyntéza katecholaminov

Začína sa hydroxyláciou tyrozinu pomocou tyrozínhydroxylázy (TH) a vzniká dihydroxyfenylalanín (DOPA). Účinkom enzýmu dekarboxylácia l-aromatických aminokyselín vzniká dopamín (DA), prvý katecholamín. Účinkom dopamín-beta-hydroxylázy (DBH) vzniká noradrenalín (norepinefrín) (NA) a pôsobením fenyletanolamin-N-metyltransferázy (PNMT) vzniká adrenalin (epinefrín) (A). Táto posledná reakcia prebieha v dreni nadobličky a v malom množstve aj v dvoch oblastiach mozgu a srdci (obrázok 1).

Metabolická degradácia katecholaminov

Začína sa pomocou enzýmu catechol-O-metyltransferáza (COMT) a pôsobením enzýmu monoaminoxidáza (MAO). Účinkom COMT vznikajú metylované deriváty metanefrín (MN), normetanefrín (NMN) a metoxydopamín (MDA). Účinkom MAO vzniká dihydroxyfenylglykol (DHPG). Ak na metylované deriváty MN, NMN účinkuje MAO, vzniká prechodná zlúčenina 3-metoxi-4-hydroxyfenylaldehyd, ktorý sa oxiduje na 3-metoxi-4-hydroxymandľovú kyselinu (kyselina vanilmandľová VMK) alebo sa redukuje na 3-metoxi-4-hydroxyfenylglykol (MHPG). Z MDA vzniká 3-metoxi-4-hydroxyfenylglykol (MHPG). Väčší význam má stanovenie metabolitov v krvi. MN a NMN dávajú takmer 100% špecifitu, pretože

Obrázok 1. Syntéza katecholaminov

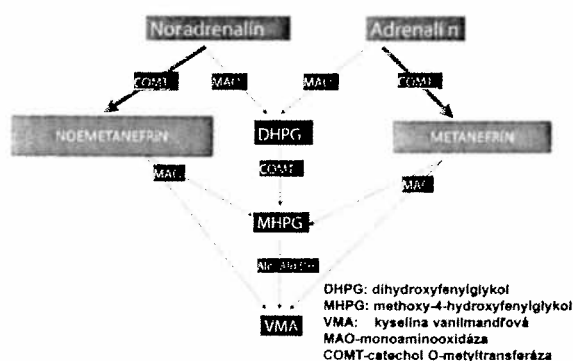


pochádzajú prevažne z pôsobenia COMT v tumore (MAO v tumore chýba), lebo rozhodujúca je na membránu FEO viazaná COMT a nie COMT v pečeni. Koncentrácia celkových metanefrínov v krvi je až 10000-krát vyššia ako koncentrácia KA v krvi⁽⁹⁾ (obrázok 2a, obrázok 2b).

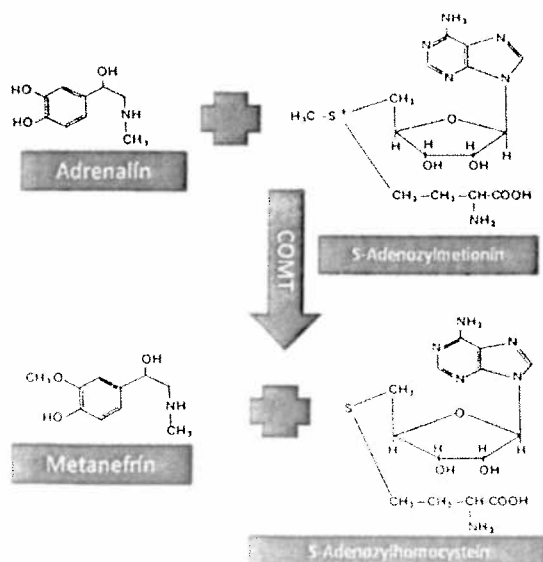
Biochemická diagnostika FEO

Hoci sa nenašiel gén zodpovedný za vznik chromafinných tumorov, ich častá prítomnosť pri syndrómoch MEN, hlavne MEN 2, vyžaduje stanovovanie vylučovania KA a ich metabolitov. Keďže ich stanovovanie nie je dost široko prístupné v klinickej praxi, najčastejšie sa meria exkrécia VMK močom počas 24 hodín. Považuje sa za dobrú skriningovú metódu⁽⁴⁾. Môže odhaliť tumor chromafinného tkaniva až v 60% (62% senzitivita pri 92% špecifite), lebo VMK tvorí až 40% degradačných produktov KA. Citlivejšie a špecifickejšie je meranie KA v 24-hodinovom moči⁽³⁾. Na presné stanovenie KA existuje HPLC (high pressure liquid chromatography) metóda s elektrochemickou, prípadne coulochemickou detekciou. Táto metóda

Obrázok 2a. Metabolizmus noradrenalínu a adrenalínu

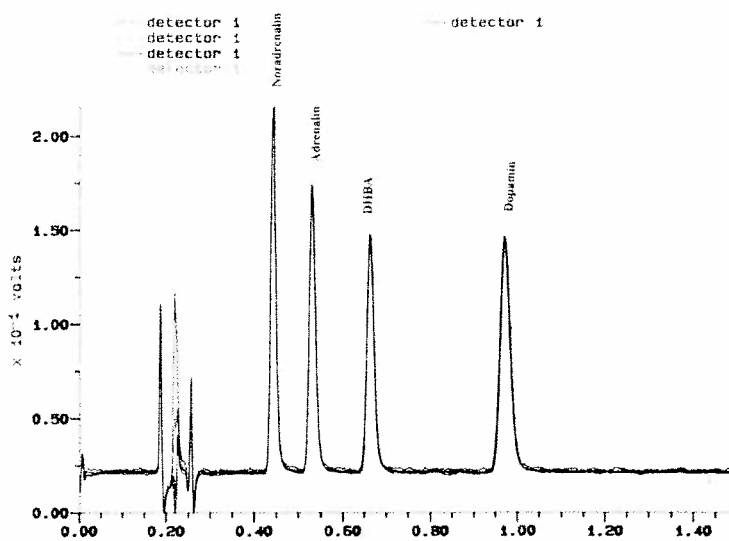


Obrázok 2b. Mechanizmus degradácie adrenalínu



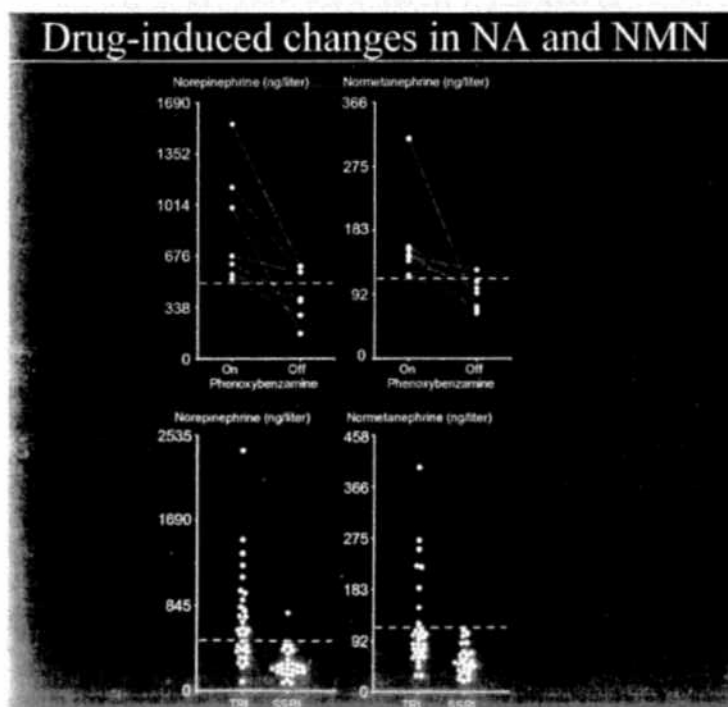
dovoľuje stanoviť jednotlivé KA (A, NA a DA). Pri niektorých neuroblastómoch sa do moču vylučujú prevažne DA a jeho metabolity HVK spolu s metabolitmi A a NA⁽⁵⁾. Ani stanovenie uvedených metabolitov nemusí dať úplnú istotu o prítomnosti tumoru v organizme, lebo tumor nie je inervovaný a vylučuje KA z buniek exocytózou nepravidelne, nezávisle od jeho veľkosti alebo lokalizácie, takže mimo záchvatu môžu byť hodnoty v moči aj v plazme normálne alebo hraničné. KA v moči môžu byť zvýšené, aj keď nie je prítomný endokrinné aktívny tumor pri akomkoľvek

Obrázok 3. HPLC chromatogram katecholamínov



Standards (A, NA, DA 50 nmol/l) and int.standard 5 times separately analyzed. Overlay.

Obrázok 4. Zníženie koncentrácie noradrenalinu a normetanefrínu po podaní niektorých liekov



druhu akútneho stresu (telesná námaha, emócia, artériografia, intubácia pred narkózou, niektoré farmaká, akútny infarkt myokardu, náhla ischemia mozgu). V takýchto situáciách treba vyšetrenie opakovať, prípadne pacienta poučiť o zbere moču po záchvate (zbierať moč do nádoby s 10 ml 6 mol/l kyseliny soľnej) a v tomto moči stanoviť katecholamíny a prepočítať to na mmol kreatinínu. Menej spoľahlivé je meranie KA v plazme, lebo samotný odber krvi je stres. Preto pri odbere venóznej krvi na stanovenie KA treba dbať na šetrný odber (poloha v ľahu, najlepšie zo zakanylovej žily o 30 minút po zavedení. Krv sa musí odoberať do odberovky s EDTA (ako na krvný obraz) a ihneď vložiť do ľadu a rýchlo centrifugovať. Najpresnejšie je však stanovenie nefrínov v plazme^(6,7,8,9,10,11,12,13,14). Ak hodnoty KA v moči, resp. v plazme, sú hraničné, treba vyšetrenie po určitom čase zopakovať. Zavádzanie špecifickejších biochemických metód na stanovenie KA a ich metabolitov znižuje počet falošných výsledkov, najmä pri chemických interferenciách po požití určitých potravín alebo liekov. Takou metódou je práve vysokotlaková kvapalinová chromatografia (HPLC) s elektrochemickou detekciou a najnovšie s coulochemickou detekciou. Vplyv rôznych potravín sa touto metódou odstráni, ale zníženie vylučovania KA vplyvom liečiva je problém a pri interpretácii nameraných výsledkov treba na to pamätať (obrázok 3).

Na obrázku 3 je HPLC-chromatogram štandard KA. Jednotlivé KA sú od seba oddelené a presne identifikované. Veľmi presná je tiež metóda ELISA.

Základom správnej analýzy je správna: 1. predanalytická fáza, 2. presná analýza 3. správna interpretácia.

Zber moču: moč sa zbiera 24 hod. do tmavej nádoby, v ktorej je 10 ml 6 mol/l HCl. Celý objem moču sa dobre premieša, zmeria sa presne objem a vzorka moču cca 10 ml sa pošle na vyšetrenie. Výsledné pH musí byť 2-3. Ak má moč pH vyššie, treba ho upraviť na pH=3. Je to dôležité, lebo KA sú pri vyššom pH veľmi citlivé na oxidáciu a pri transporte môže dôjsť k rozkladu, a teda namerajú sa nižšie hodnoty. Naopak, pri nízkom pH (menej ako 2) sú síce KA stabilné, ale dochádza k uvoľňovaniu KA a môžu sa nmerať vyššie hodnoty. V moči totiž meriame voľné KA, ktorých je cca 5-7% z celkovej produkcie KA (v moči sa však nachádza aj asi 5-7% konjugovaných KA). Ak je pH nižšie ako pH=2, môže dochádzať pri transporte a skladovaní k uvoľňovaniu z väzby (KA sú viazané na kyselinu glukurónovú a kyselinu sírovú). Uvádzané referenčné hodnoty sú pre voľné KA. Pacient nesmie pred zberom a počas zberu moču jesť

banány, oriešky, čokoládu, silný čaj, nemal by brať 48 hod. žiadne lieky (ak z vitálnej indikácie berie lieky, treba to vyznačiť na žiadanke). Tento údaj je pre interpretáciu veľmi dôležitý, lebo, ako už bolo spomenuté, hlavne niektoré lieky znižujú tvorbu KA (napr. dibenylín, **obrázok 4**).

Pacient nesmie mať tesne pred zberom a počas zberu moču žiadne náročné vyšetrenie, lebo pri strese sa zvyšuje tvorba KA. Zlepšovaním prístrojového vybavenia sa zlepšovali aj možnosti analýzy jednotlivých KA a ich metabolitov v biologických tekutinách a, samozrejme, aj význam v diagnostike. Veľký pokrok bola fluorimetrická metóda stanovenia katecholaminov v moči po chromatografii na kolónke s Al_2O_3 ⁽¹⁶⁾. Stanovenie KA a ich metabolitov v moči a v krvi je teda kľúčový moment v diagnostike. Najpoužívanejšia metóda na stanovenie KA je HPLC s elektrochemickým alebo coulochemickým detektorom a najnovšie stanovenie KA aj NE pomocou ELISA. Senzitivita a špecifita jednotlivých testov je v **tabuľke 1**. ROC krivka na **obrázku 5** ukazuje význam stanovenia nefrínov v krvi.

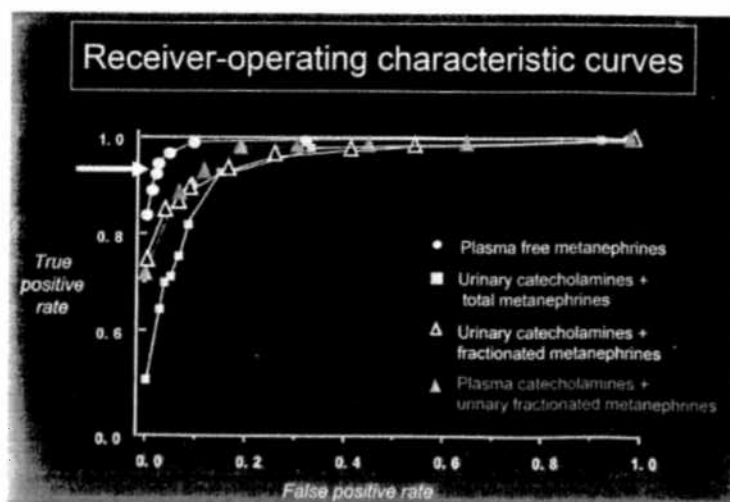
ELISA analýza KA v moči:

KA sa najprv adsorbujú na cis-diol špecifický afinitný gél, potom sa acetyľujú a pomocou COMT metylujú na nefríny a potom prebieha štandardná ELISA metóda. Antigén je pevne viazaný na stripoch, pridajú sa metylované vzorky, pridá sa antisérum (kompetívna analýza) (inkubuje sa), premyje sa to (wash buffer 4x), pridá sa konjugát

Tabuľka 1. Senzitivita a špecifita jednotlivých testov

	Senzitivita %	Špecifita %
Volné metanefríny (plazma)	98	89
Katecholamíny (plazma)	81	81
Celkové nefríny (moč)	72	93
Frakciované nefríny (moč)	96	64
Katecholamíny (moč)	85	85
Vanilmandľová kyselina (moč)	62	93

Obrázok 5. ROC krivka poukazuje na význam nefrínov v diagnostike feochromocytómu



(anti-rabbit IgG conjugate with peroxidase), inkubuje sa to (wash buffer 4x), pridá sa substrát (TMB inkubuje sa a nakoniec sa pridá stop činidlo (0,25 mol/l H_2SO_4). Výsledné žlté zafarbenie sa meria pri 450 nm/620 nm. Zároveň sa spracovávajú štandardy, kontroly a výsledky sa získajú z kalibračnej krivky.

HPLC analýza KA v moči:

A, NA, DA a DOPA môžu byť merané podobným analytickým postupom, pretože obsahujú katecholovú skupinu. KA musia byť z biologickej tekutiny alebo tkaniva vyextrahované a až potom analyzované. Na izoláciu KA sa používa prevažne Al_2O_3 pri pH=8,5⁽¹³⁾. Adsorpcia KA na oxid je veľmi rýchly dej. Na elúciu KA z oxidu sa môže použiť rôzne kyseliny (octová, soľná, sírová, šťaveľová; chloristá) s koncentráciou 0,2-0,5 mol/l. Najpoužívanejšia je kyselina octová. K 0,5 ml moču v Eppendorfke sa pridá 100 mg Al_2O_3 a 0,5 ml pufer (Tris + EDTA pH=8,6). Pridá sa interný štandard (DHBA). Zároveň sa tým istým spôsobom spracováva aj štandard a kontrolná vzorka. Trep sa 10 min., nechá sa ustáť vrstva Al_2O_3 a odsaje sa efluent. Prepláchnu sa 3-krát vodou a katecholamíny sa elujú s 0,2 mol/l CH_3COOH . Trepe sa 10 min. Časť eluátu sa upraví na pH=6,5 (pomocou K-PO4 pufru) a dá sa na kolónku s BioRex 70 (100-200 mesh). Po prepláchnutí vodou sa katecholamíny elujú s 0,67 mol/l H_3BO_4 . Tento eluát sa potom meria pri 700 mV na elektrochemickom detektore alebo na ESA Coulochem 3 (nastavenie Guard cell = 350 mV, E1 = -150, E2 = 220 mV). Používa sa izokratická metóda, kolona C18.

Na **obrázku 3** je chromatogram štandardnej zmesi, adrenalin, noradrenalin, DHBA (dihydroxibenzylamin), dopamin. Vzorka bola spracovaná päťkrát a päťkrát analyzovaná. Chromatogramy sú nanosené spôsobom overlay (sú nanosené na seba). Z obrázka vidieť, že metóda je skutočne reprodukovateľná. Intra assay 4,5 %, inter assay 8,2 %.

Na základe našich skúseností možno povedať, že použitie HPLC systému s elektrochemickou, resp. coulochemickou detekciou je na analýzu katecholaminov a ich metabolitov v moči veľký prínos a momentálne je to najlacnejšie riešenie. Referenčné rozpätie adrenalínu je menej ako 100 nmol/24 hodín, noradrenalinu menej ako 500 nmol/24 hodín, dopamínu menej ako 2 500 nmol/24 hodín.

Analýza NE v krvi HPLC metódou:

V ostatnom období na základe presných meraní sa za najpresnejšiu diagnostickú metódu považuje stanovenie NE v plazme (**tabuľka 1 a obrázok 5**). Na našom oddelení analyzujeme prevažne NE v plazme. Vychádzali sme z práce⁽⁶⁾ v modifikácii⁽¹³⁾.

Analýza pozostáva z týchto krokov:

1. bezstresový odber krvi (odoberá sa z katetra 20 minút po zavedení do v. cubiti), striekačka s heparínom sa musí dať ihneď do

radu a centrifugovať pri 0°C, 2. extrakcia metanefrínov na solid-phase cation exchange columns (kolónky strata SCX-500 mg/3 ml), 3. elúcia a odparenie eluátu na termovape pri 44°C, 4. meranie na HPLC s coulochemickou detekciou. Odparovanie eluátu oproti pôvodnej metóde (odparovali lyofilizáciou) robíme pomocou termovapu (odparujeme pomocou dusíka pri 44°C). Je síce nižšie recovery (asi o 8%), intraassay CV je menej ako 5,3%, interassay CV je 11%. Ak sa zistia zvýšené hladiny nefrínov v krvi (štyrikrát viac ako horná hranica normy - (4 x URL), musí nasledovať lokalizácia tumoru. Ak CT a MIBG sú negatívne, nasleduje PET scan (po podaní 18-F-DA). Takto možno lokalizovať aj malý skrytý tumor.

Analýza NE v krvi ELISA metódou:

Používa sa EDTA plazma. K 500 ul plazmy sa pridá deprotizáčne činidlo, centrifuguje sa a zo supernatantu sa pipetuje 75 ul na stanovenie MN a 25 ul na stanovenie NMN. Pipetuje sa to priamo do stripov, kde je viazaný antigén pre MN a NMN. Pridá sa pracovný roztok a acylačný roztok a NE sa acetyluje, potom sa pridá špecifická protilátka a nechá sa 20 hod. inkubovať v chladničke. Odsaje sa roztok z jednotlivých stripov, premyje sa to (wash buffer), pridá sa konjugát (anti-rabbit IgG conjugate with peroxidase) a inkubuje sa, premyje sa to (wash buffer), pridá sa substrát (TMB), inkubuje sa a nakoniec sa pridá stop činidlo (0,25 mol/l H₂SO₄). Výsledné žlté zafarbenie sa meria pri

450 nm/620 nm. Zároveň sa spracovávajú štandardy, kontroly a výsledky sa získajú z kalibračnej krivky. Referenčné rozpätie metanefrínu je do 62 pg/ml, normetanefrínu do 125 pg/ml. Za presnú diagnostiku feochromocytómu sa považuje, ak hodnoty sú štyrikrát vyššie ako horná hranica referenčného rozpätia.

Záver

Napriek významnému pokroku zobrazovacích metód (CT, USG, MIBG, PET scan) stanovenie KA a ich metabolitov, hlavne NE v krvi, hrá dôležitú úlohu v diagnostike tumorov chromafinného tkaniva. Významný pokrok v biochemickej diagnostike prinieslo až presné poznanie biosynézy a degradácie KA. Vzhľadom na dôkaz, že NE v krvi pochádzajú priamo z katecholamínov z tumoru, záujem o ich stanovenie v krvi narástol a teraz sa považuje za najšpecifickejšiu biochemickú diagnostiku FEO (98 % senzitivity pri 89 % špecificite). Napriek tomu treba pri interpretácii brať do úvahy jednotlivé lieky, ktoré pacient užíva.

Adresa pre korešpondenciu:

doc. Ing. Pavel Blažiček, PhD.
AlphaMedical, a. s.
Inštitút laboratórnej diagnostiky
Vičie hrdlo 49, 821 07 Bratislava
e-mail: blazicek.pavel@alphamedical.sk

Literatúra

- Axelrod J. The formation, metabolism, uptake and release of noradrenaline and adrenaline enzymatic formation of adrenaline and other catechols from monophenols. *Science* 1963; 140: 499.
- Armstrong MD, Shaw KNF and Wall PE. The phenolic acids in human urine. *Paper chromatography of phenolic acids. J. Biol. Chem.* 1956; 218: 293.
- Blažiček P, Langoš J.: Katecholamíny v diagnostike tumorov neurálnej platničky. *Biochem. clin. bohemoslov.* 1986;15:105-117.
- Blažiček P, Langoš J, Vencel P. Rýchla a citlivá ionomerničová metóda na stanovenie vanilmandľovej kyseliny v moči u ľudí. *Biochem. clin. bohemoslov.* 1977; 3:137-145.
- Goldstein S, Stull et al. Plasma 3,4-dihydrophenylalanin (DOPA) and Catecholamines in Neuroblastoma or Pheochromocytoma *Ann. int. Med* 1986;105: 887-888.
- Lenders J.W.M, Eisenhofer G et al. Determination of plasma metanephrines by liquid chromatography with electrochemical detection. *Clinical Chemistry* 1993; 39: 97-103.
- Lenders JW, Keiser H.R., Goldstein D.S et al. Plasma metanephrines in diagnosis of pheochromocytoma *Ann. Intern. Med.* 1995; 123:101-109.
- Eisenhofer G, Lenders HWM, Lineham WM et al.: Plasma Normetanephrine and Metanephrine for Detecting Pheochromocytoma in von Hippel Lindau Disease and MEN type 2. *NEJM* 1999; 340:1872-1879.
- Eisenhofer G: Free of Total Metanephrines for Diagnosis of Pheochromocytoma: Chat is the Difference. *Clin Chem* 2001; 47: 988-1002.
- Lenders JWM, Pacak K, Walter MM et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best? *JAMA* 2002; 287:1427-1434.
- Lenders JWM, Pacak K, Eisenhofer G: New Advances in the Biochemical Diagnosis of Pheochromocytoma. *Annal of the NYAS* 2002; 970:29-40.
- Pacak K, Goldstein DS, Doppman JL, Shulkin BL et al. A „Pheo“ Lurks: Novel Approaches for Locating Occult Pheochromocytoma. *JCEM* 2002; 86:3641.
- Roden M, Raffesberg RW, Raber Wet all. Quantification of Unconjugated Metanephrines in Human plasma without Interference by Acetaminophen. *Clin Chem*, 2001;47: 1061-1067.
- Blažiček P, Pacák K. Nekonjugované metanefríny v plazme: význam a možnosti stanovenia. *Interná med* 2004; 9 (S3):38.
- Euler U. S. von and Lishajko F. Improved technique for the fluorimetric estimation of catecholamines. *Acta Physiol. Scand* 1961; 51:348.
- Balažovjeh I. Klinický obraz ochorení sympatiko-adrenálneho systému. V: Kreze A, Langer P, Klimeš I, Lichardus B (Eds): *Praktická endokrinológia*, Bratislava, SAP, 1993: 318-329.