

Determinazione delle amine biogene urinarie e dei loro metaboliti nella diagnostica dell'ipertensione arteriosa

Giulia Gioiello, Linda Di Gregorio, Martina Taglieri, Giulio Mengozzi

Azienda Ospedaliero Universitaria Citta Della Salute E Della Scienza Di Torino - Dipartimento Di Medicina Di Laboratorio

ABSTRACT

Determination of urine biogenic amines and their metabolites in the diagnostic workup of arterial hypertension

Catecholamines are produced by the sympathetic nervous system or by the medullary adrenal glands and play a key role both as hormones and as neurotransmitters. An increase in their production can lead to hypertension, due to neuroendocrine tumors like pheochromocytoma, paraganglioma and neuroblastoma. Among tumors of neuroendocrine derivation, there are also carcinoids that can cause carcinoid syndrome, associated with an excess of serotonin release. Proper biochemical analysis of patients suffering from these tumors is crucial to confirm the presence of excess production of catecholamines or serotonin and their metabolites. Serious and life-threatening cardiovascular complications related to catecholamines and their metabolites pose a challenge to the laboratory for a timely and accurate diagnosis of neuroendocrine tumors. The application of innovative technologies to determine these analytes, such as LC-MS/MS, potentially associated with a metabolomic approach, may provide an efficient tool to help physicians recognizing and appropriately treating these still difficult-to-find clinical entities. As a complement to this paper, we present a personal experience about the analysis of biogenic amines and their metabolites performed on both 24-hour and spot urines. The LC-MS/MS method is used with three different preparation phases: total metanephrines (free and conjugate), catecholamines, free methanephrine and serotonin and vanillylmandelic acid (VMA), homovanillic acid (HVA), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA). The organization of the chromatography and mass spectrometry division, based on expert technicians, includes centralized acceptance of samples, automation of the preparation phase and middleware-based validation of the results, offering to clinicians a valuable help in this challenging diagnostic.

Parole chiave: metaboliti urinari, LC-MS/MS, ipertensione arteriosa

GENERALITA'

Amine biogene e metaboliti

Le catecolamine sono un gruppo di sostanze derivate dall'amminoacido tirosina e prodotte dal sistema nervoso simpatico o dalla midollare delle ghiandole surrenali. Le catecolamine possono agire sia come neurotrasmettitori che come ormoni, agendo come regolatori dell'omeostasi. Come neurotrasmettitori, svolgono un ruolo chiave nella trasmissione degli impulsi nervosi interagendo con i rispettivi recettori adrenergici presenti sulla membrana cellulare. In particolare, le catecolamine rilasciate dalla componente ortosimpatica del sistema nervoso autonomo attivano la risposta "lotta o fuggi" attraverso

l'interazione con i recettori adrenergici, composti da 400-600 amminoacidi e facenti parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR). I recettori adrenergici sono classificati come $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$. Nel dettaglio, i recettori $\alpha 1$ sono collocati nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi sanguigni e nel tratto urinario e il legame con la catecolamina porta a vasocostrizione, contrazione della muscolatura liscia e ritenzione urinaria. La loro attivazione attiva la proteina G_q stimolatoria che attiva a cascata l'enzima fosfolipasi C (PLC), che attraverso la produzione del secondo messaggero inositolo trifosfato, porta alla liberazione di calcio dal reticolo endoplasmatico. I recettori $\alpha 2$ sono collocati nei neuroni presinaptici del sistema nervoso centrale, nel cuore e nelle piastrine.

Corrispondenza a: Giulia Gioiello, Azienda Ospedaliero Universitaria Citta Della Salute E Della Scienza Di Torino - Dipartimento Di Medicina Di Laboratorio, Email: giuliagioiello98@gmail.com

Ricevuto: 11.07.2023

Revisionato: 25.07.2023

Accettato: 25.09.2023

Publicato on-line: 13.10.2023

DOI: 10.19186/BC_2023.077

Questa tipologia di recettori è accoppiata ad una proteina G_i inibitoria che, inattivando l'adenilato ciclasi, riduce i livelli di adenosina monofosfato ciclico (cAMP). Questo previene l'attivazione della proteina chinasi A (PKA) da parte del cAMP, cosicché le proteine a valle della cascata non vengano attivate. I loro effetti riguardano la soppressione dell'attività sinaptica, la diminuzione della pressione arteriosa, la vasocostrizione della muscolatura liscia cardiaca e l'inibizione della secrezione dell'insulina. I recettori β_1 sono collocati, invece, principalmente nel cuore e la loro stimolazione controlla il battito cardiaco e la contrattilità ventricolare. I recettori β_1 sono accoppiati ad una proteina G_s stimolatoria che attiva la cascata enzimatica mediata dalla fosfochinasi A (PKA). A livello cardiaco, l'attivazione della PKA comporta la fosforilazione dei canali del calcio di tipo L, della troponina cardiaca, e delle catene leggere della miosina portando ad un aumento della contrattilità muscolare. I recettori β_2 sono distribuiti in tutto l'organismo ma principalmente nel tessuto muscolare liscio dei bronchi dove mediano broncodilatazione. Altre azioni mediate da tali recettori sono vasodilatazione, rilassamento della muscolatura uterina e gastrointestinale. Così come i β_1 , i recettori β_2 sono accoppiati ad una proteina G_s stimolatoria che attiva l'adenilato ciclasi, mediando così anche in questo caso la via dell'attivazione della PKA. Infine, i recettori β_3 sono collocati nel tessuto adiposo bruno e bianco, nel tratto urinario, nell'intestino e nella tonaca muscolare uterina. Tra le varie azioni, essi comportano l'aumento dell'ossidazione di acidi grassi, un miglioramento nella captazione del glucosio mediata dall'insulina e il rilassamento della muscolatura uterina. Questa tipologia di recettore adrenergico è peculiare poiché è capace di accoppiarsi sia con proteine G stimolatorie che inibitorie. L'attivazione dei recettori β_3 avviene a concentrazioni di catecolamine più alte rispetto a quelle necessarie per l'attivazione delle altre categorie di recettori adrenergici, e ciò garantisce il freno ad una eventuale iperattività del sistema nervoso simpatico (1).

Alla famiglia delle catecolamine appartiene anche la dopamina che interagisce con i recettori GPCR dopaminergici. Questi ultimi sono stati da tempo classificati in due classi distinte: D1-like, suddivisi nei sottotipi recettoriali D1 e D5; D2-like, suddivisi in D2, D3, D4. Le due famiglie si differenziano anche nel sistema di trasduzione del segnale utilizzato. I recettori D1 stimolano la formazione di cAMP e aumentano l'attività della PLC, mentre i recettori D2 inibiscono l'adenilato ciclasi, attivando l'efflusso di potassio e inibendo l'influsso di calcio (2).

La biosintesi delle catecolamine inizia con la conversione dell'amminoacido L-tirosina in 3,4-diidrossifenilalanina (DOPA) da parte dell'enzima tirosina idrossilasi. La DOPA viene successivamente convertita in dopamina che ha un'ampia distribuzione tissutale e specificità di substrato. Se non rilasciata come tale dai neuroni dopaminergici, la dopamina viene trasportata dai trasportatori di monoamine vescicolari (VMAT1 e 2) nei granuli di deposito vescicolare, dove viene ulteriormente convertita in noradrenalina dalla dopamina β -idrossilasi (DBH).

Nelle cellule cromaffini surrenali si ha un'ulteriore conversione della noradrenalina in adrenalina grazie all'enzima feniletanolammina N-metil transferasi (PNMT) presente nelle cellule della midollare del surrene, dove è espresso principalmente, ed in alcuni neuroni del sistema nervoso centrale. L'adrenalina viene quindi traslocata nuovamente in granuli di stoccaggio e può essere successivamente secreta attivamente come ormone circolante (3).

Dopo aver espletato le loro funzioni, l'azione delle catecolamine nell'organismo termina attraverso la loro conversione in metaboliti inattivi. Le reazioni metaboliche avvengono in modo diverso a seconda della zona di captazione delle catecolamine (sistema nervoso o cellule cromaffini). La prima riguarda la captazione neuronale, ovvero la captazione da parte della terminazione nervosa della noradrenalina liberata nello spazio intersinaptico (circa l'80-90% di noradrenalina segue questo percorso). Nella terminazione nervosa la noradrenalina potrà essere depositata in granuli oppure essere deaminata per opera dell'enzima monoaminossidasi (MAO). Quest'ultimo è situato sulla superficie esterna della membrana mitocondriale e converte le catecolamine in aldeidi, che potranno essere convertite in acidi oppure alcoli da altri enzimi metabolici.

La seconda modalità di captazione è la via extraneuronale, che rappresenta la più attiva. In essa svolge un ruolo essenziale l'enzima catecol-o-metiltransferasi (COMT) che catalizza la reazione di metilazione delle catecolamine principalmente nel tessuto epatico-renale. L'enzima COMT converte circa il 70% dell'adrenalina circolante in metanefrina, a sua volta questa verrà convertita dall'enzima MAO nella rispettiva aldeide e infine ossidata ad acido vanilmandelico, maggior prodotto di escrezione delle catecolamine.

Nel dettaglio, dall'azione della COMT si formano i metaboliti 3-metossitiramina (3MT), normetanefrina (NMN) e metanefrina (MN). Successivamente queste molecole vengono convertite, mediante sulfotransferasi (SULT) e UDP-glucuronosiltransferasi (UDP-GT), in esteri del solfato e glucuronidi nell'apparato digerente, diventando i metaboliti coniugati. La coniugazione permette l'aumento dell'idrosolubilità rendendo più facile l'eliminazione urinaria. I passaggi successivi prevedono la demetilazione con l'ausilio di MAO da cui derivano l'acido omovanillico (HVA) e l'acido vanilmandelico (VMA), escreti nelle urine. Per riassumere, come esposto in Figura 1, la dopamina viene convertita in HVA, l'adrenalina viene convertita in MN e VMA, mentre la noradrenalina in NMN e VMA (4,5).

Oltre alle catecolamine sopra citate, si ha la serotonina, il cui precursore è il triptofano, che favorisce i collegamenti fra cellule nervose. Viene prodotta dal sistema nervoso ma anche da particolari cellule endocrine del polmone e del tratto gastrointestinale. Essa, oltre ad essere un vasocostrittore, modula la motilità gastrointestinale, la funzione piastrinica ed è stata implicata nella fisiopatologia dei disturbi dell'umore, del vomito, dell'emicrania, della sindrome dell'intestino irritabile e dell'ipertensione polmonare e sistemica.

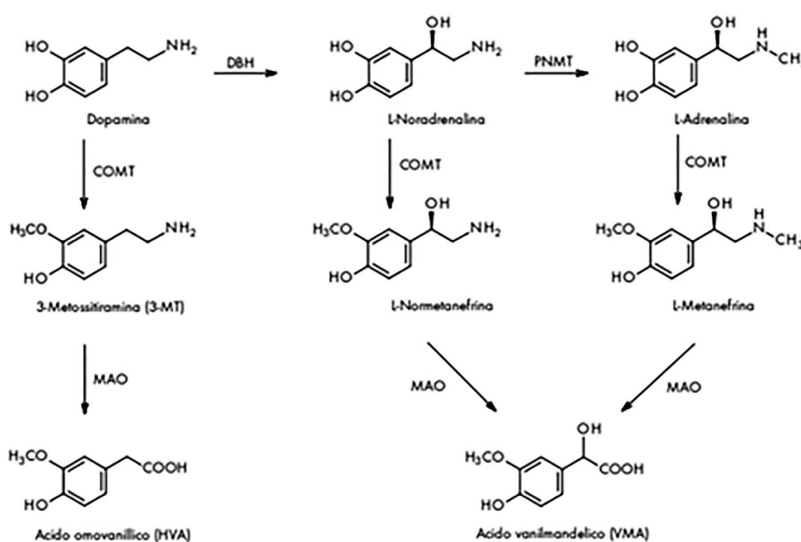


Figura 1

Metabolismo delle catecolamine. La prima fase prevede l'intervento dell'enzima catecol-O-metiltransferasi (COMT) che darà luogo a metanefrina, normetanefrina e 3-metossitiramina mentre la seconda, sostenuta da monoaminossidasi (MAO), porterà alla formazione dei successivi metaboliti

La serotonina viene deaminata per via enzimatica (Figura 2) ad opera di una MAO, generando 5-idrossi-indolacetaldeide, che poi viene ossidata grazie all'intervento dell'aldeide deidrogenasi (ALDH) in acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA), il prodotto di eliminazione principale (6).

Vi sono alcuni tumori, come il feocromocitoma e altri tumori neuroendocrini, che possono produrre elevate quantità di catecolamine, portando quindi ad un aumento della concentrazione sia delle catecolamine sia dei loro metaboliti nel sangue e nelle urine. L'aumento delle metanefrine plasmatiche di oltre quattro volte al di sopra del limite di riferimento superiore, è associato a una probabilità del tumore vicina al 100% (7).

Le cellule della midollare surrenale producono soprattutto metanefrine, come conseguenza dell'alta concentrazione di enzima COMT. Questo è il motivo per cui le metanefrine sono marcatori specifici per le catecolamine nelle cellule cromaffini e nei loro tumori (8)

Tumori neuroendocrini

Si definisce ipertensione l'aumento protratto, a riposo, della pressione arteriosa sistolica (≥ 130 mmHg), della pressione arteriosa diastolica (≥ 80 mmHg) o di entrambe. Essa si può classificare in base all'eziologia in forma primitiva/essenziale, che è la più rappresentata, oppure in forme secondarie ad eziologia nota. L'ipertensione secondaria comprende il 5-10% dei casi che originano da una patologia sottostante a livello renale, endocrino, vascolare e neurogeno. Cause rare di ipertensione arteriosa secondaria sono i tumori neuroendocrini (NET), tra cui troviamo il feocromocitoma, che ha un picco di incidenza fra i 30 e 40 anni. Si tratta di una neoplasia rara con un'incidenza nella popolazione generale di 2-8 casi/milione/anno (9). Esso si presenta nel 90% dei casi a partenza dalla midollare del surrene, nel 10% da un altro tessuto cromaffini (che prende così il nome di paraganglioma).

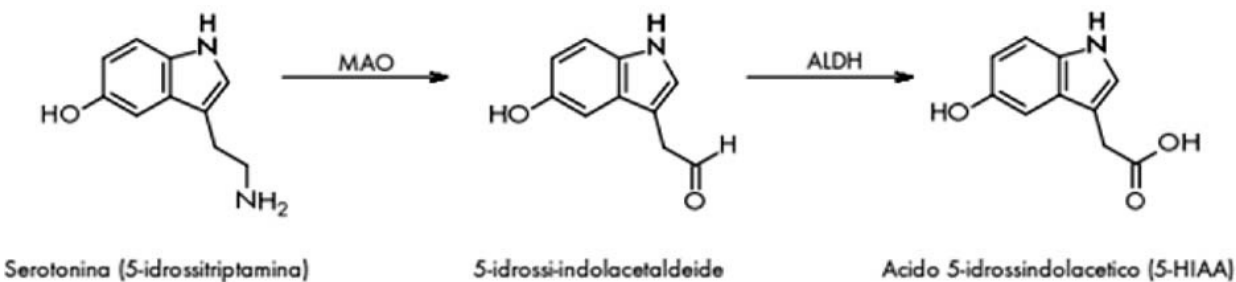


Figura 2

Metabolismo della serotonina. MAO, monoaminossidasi; ALD, aldeide deidrogenasi.

I NET possono essere classificati in base all'aspetto delle cellule tumorali al microscopio e alla velocità con cui le cellule crescono oppure possono essere distinti fra funzionanti e non funzionanti. I NET funzionanti producono e rilasciano ormoni che sono correlati a sintomatologia, mentre quelli non funzionanti non rilasciano sostanze a sufficienza e la loro diagnosi avviene in una fase più avanzata.

Fra i NET, oltre il feocromocitoma e il paraganglioma (PPGL), che sono di derivazione neurale, è incluso anche il neuroblastoma, le cui cellule provengono da cellule neuroblastiche immature, che si presenta quasi esclusivamente in età pediatrica. In questo caso si possono avere tumori sia a livello intra- che extra-surrenale. I neuroblastomi mostrano vie biosintetiche e secretorie delle catecolamine poco sviluppate, mentre i PPGL mostrano una notevole eterogeneità. I PPGL sono rari e si verificano in 2-5 pazienti per milione all'anno (10). Nello 0,1-0,6% dei pazienti ipertesi si riscontra un tumore PPGL; tuttavia, ancora molti pazienti non vengono individuati. La maggior parte dei tumori è benigna, ma il 10-15% sono definiti maligni in base allo sviluppo di metastasi in tessuti non cromaffini come linfonodi, fegato e ossa. Una caratteristica fondamentale dei PPGL è la loro diversità genetica; ad oggi la percentuale dei casi attribuibili alle mutazioni della linea germinale è del 35% e probabilmente potrà aumentare a seguito della scoperta di nuovi geni di suscettibilità. La maggior parte delle caratteristiche cliniche dei NET sono secondarie alla secrezione eccessiva tumorale delle catecolamine (noradrenalina, adrenalina e dopamina). La manifestazione clinica dipende dalla quantità, dal tipo e dalla modalità di secrezione di catecolamine ed è estremamente variabile tra i pazienti: molti soggetti presentano la triade classica, cioè episodi ipertensivi parossistici che portano forti mal di testa, palpitazioni e sudorazione. Altri sintomi possono essere pallore, sensazioni di panico ed ansia, nausea, febbre, vampate di calore e stipsi. L'azione metabolica delle catecolamine può portare alla perdita di peso ed a disturbi del metabolismo del glucosio, compreso il diabete mellito o l'acidosi lattica (10,11).

I sintomi non sono sempre presenti, poiché fino al 10-15% dei casi il tumore è del tutto asintomatico, ma va ricordato che, se non tempestivamente riconosciuta e trattata, la patologia può avere un esito devastante portando a complicanze gravi quali infarto miocardico, ipertensione grave, insufficienza cardiaca dovuta a cardiomiopatia tossica, encefalopatia ipertensiva, edema polmonare neurogeno, ictus e/o aritmia. Recentemente è stato riportato che i pazienti con PPGL hanno un tasso nettamente più elevato di eventi cardiovascolari maggiori rispetto ai pazienti con ipertensione primaria, probabilmente a causa della prolungata esposizione agli effetti tossici delle catecolamine tumorali. Per quanto riguarda il neuroblastoma, che di solito non secreta catecolamine in quantità sufficienti a causare segni o sintomi, l'individuazione è più complicata e viene sospettata sulla base dei risultati di una massa addominale palpabile o durante un'ecografia.

In aggiunta ai tumori secernenti prima citati, si trovano i carcinoidi, tumori che originano dalle cellule neuroendocrine nel tratto gastrointestinale nel 90% dei casi. Normalmente i carcinoidi sono di natura benigna, alcuni, come quelli all'ileo o ai bronchi, sono spesso maligni. Essi danno luogo ad una sindrome endocrinologica chiamata sindrome da carcinoide, dovuta all'eccesso di secrezione della serotonina. Essa agisce sulla muscolatura liscia causando diarrea, coliche e malassorbimento. Il segno più frequente della sindrome è l'arrossamento della testa e del collo, che comporta un'evidente modificazione del colore della cute dal pallido al violaceo (12,13).

Le complicanze cardiovascolari gravi e potenzialmente letali sottolineano l'importanza di una diagnosi rapida. La maggior parte dei NET viene scoperta inaspettatamente nel corso di indagini radiologiche o di imaging (incidentalomi). Prima di avviare qualsiasi procedura di localizzazione a seguito dei sintomi, la presenza di questi tumori deve essere dimostrata biochimicamente, anche se l'interpretazione dei risultati degli esami di laboratorio, per la diagnosi di questi tumori, può essere difficile nella pratica clinica quotidiana.

Sebbene i tumori neuroendocrini siano rari, la loro precoce e corretta identificazione è fondamentale per la prevenzione delle complicanze correlate all'eccesso di produzione di amine biogene e metaboliti. Il rischio associato a tali condizioni è spesso poco conosciuto ed ancora relativamente poco studiato. Due lavori pubblicati dal nostro gruppo di ricerca, basati su un'analisi retrospettiva dei risultati di metanefrine urinarie, hanno dimostrato una forte associazione tra le concentrazioni urinarie di metanefrine e complicanze cardiovascolari e alterazioni del metabolismo (14). Gli individui con alti livelli di questi marcatori indiretti di attività simpatica devono essere attentamente monitorati e possono trarre beneficio da un trattamento aggressivo per ridurre il rischio cardiometabolico. Il secondo lavoro ha mostrato che alti livelli di metanefrine urinarie nelle 24 ore sono associati a rischio cardiovascolare e a complicanze cardiometaboliche anche in un'ampia coorte di pazienti con incidentalomi non funzionanti (15). In particolare, alti livelli di normetanefrina sono associati in modo indipendente alla sindrome metabolica, mentre alti livelli di metanefrina hanno un'associazione indipendente con la escrezione urinaria di albumina. Lo studio ha fornito evidenze sulla possibilità di stratificare il rischio cardiovascolare in pazienti con incidentalomi non funzionanti, attraverso la misurazione dei livelli di metanefrine, a causa della loro capacità nella valutazione indiretta dell'attività simpatica e non solo nella diagnosi di PPGL.

Un'adeguata analisi biochimica è quindi fondamentale per confermare o confutare la presenza inequivocabile di un eccesso di produzione di catecolamine o dei loro metaboliti. Infatti, nei casi di iperproduzione di catecolamine, la cellula risponde generando, tramite COMT, soprattutto metanefrine. COMT non è presente nelle cellule del sistema simpatico, dunque le metanefrine sono specifiche nelle cellule cromaffini e nei loro tumori.

Determinazione biochimica

Gli esami biochimici elencati in Tabella 1 includono le determinazioni delle catecolamine urinarie e plasmatiche, delle metanefrine libere urinarie e plasmatiche, VMA, HVA urinario e 5-HIAA. Per le analisi si utilizzano normalmente le urine delle 24 ore, raccolte in un contenitore adatto. La raccolta delle urine fornisce un risultato di misurazione integrale, ma è potenzialmente inaccurata e i pazienti mostrano una bassa aderenza alle indicazioni per una accurata raccolta del campione. Inoltre, le sostanze sono spesso presenti in bassi livelli nel materiale biologico. Quando la raccolta è difficoltosa o nei pazienti pediatrici, può essere analizzato un campione random riferendo il risultato al valore della concentrazione urinaria di

creatinina. È possibile prelevare anche un campione di sangue in qualsiasi momento, ma per ottenere risultati accurati per la misurazione delle catecolamine plasmatiche o delle metanefrine, le condizioni di campionamento sono fondamentali. Relativamente alla misura della concentrazione di catecolamine nel plasma, la determinazione è meno affidabile, in quanto lo stress che precede il prelievo può aumentarne il livello nel campione biologico.

Nei NET si verifica un significativo aumento del metabolismo delle catecolamine con un conseguente aumento in circolo delle metanefrine plasmatiche. Questo comporta una maggiore sensibilità e specificità della misurazione delle metanefrine rispetto alle catecolamine.

Tabella 1

Esami biochimici: indicazioni per la fase pre-analitica

Analita	Materiale	Provetta	Volume minimo necessario	Conservazione e trasporto	Osservazioni
Metanefrine plasmatiche (NMN e MN)	Plasma	Plasma EDTA K ₂	500 µL di sangue	Centrifugazione e separazione del plasma entro 4 ore dal prelievo. Congelamento del plasma a -20°C se l'analisi non avviene in giornata.	Effettuare prelievo in clinostatismo
Metanefrine dU (NMN e MN)	Urine 24 ore	Provetta di urina	500 µL	Conservare a 4°C	Indicare la diuresi. Non acidificare il campione
Catecolamine dU (Noradrenalina, Adrenalina e Dopamina)	Urine 24 ore	Provetta di urina	500 µL	Invio del campione al laboratorio subito dopo la fine della raccolta. Se non è possibile, acidificare il campione. Trasporto a temperatura controllata (4-8°C)	Indicare la diuresi. Non acidificare il campione se la spedizione al laboratorio avviene subito dopo la fine della raccolta.
Serotonina dU	Urine 24 ore	Provetta di urina	500 µL	Invio del campione al laboratorio subito dopo la fine della raccolta. Se non è possibile, acidificare il campione. Trasporto a temperatura controllata (4-8°C)	Indicare diuresi. Non acidificare il campione se la spedizione al laboratorio avviene subito dopo la fine della raccolta.
Acido 5-idrossi indolacetico, Acido omovannilico, Acido vanilmandelico dU	Urine 24 ore	Provetta di urina	500 µL	Invio del campione al laboratorio subito dopo la raccolta. Se non è possibile, acidificare il campione. Trasporto a temperatura controllata (4-8°C)	Indicare la diuresi. Non acidificare il campione se la spedizione al laboratorio avviene subito dopo la fine della raccolta.
Catecolamine plasmatiche (Noradrenalina, Adrenalina e Dopamina)	Plasma	Plasma Lio/Eparina	1 µL di sangue	Centrifugazione e separazione immediata del plasma. Congelamento a -20°C se l'analisi non avviene in giornata. Spedire al laboratorio mantenendo il campione congelato.	

NMN, normetanefrina; MN, metanefrina

Le determinazioni delle catecolamine plasmatiche e urinarie vengono comunemente richieste ma la loro breve emivita rende problematica l'interpretazione dei valori ottenuti perché è difficile discriminare tra una sovrapproduzione patologica e un picco di secrezione al prelievo. Vengono, perciò, misurate le metanefrine nel plasma e nelle urine poiché presentano un'accuratezza diagnostica maggiore rispetto alle catecolamine. Le metanefrine totali, ovvero la somma delle metanefrine coniugate e libere, presentano persistenza prolungata in circolo e ridotta fluttuazione giornaliera e concentrazione plasmatica 10-20 volte superiore rispetto a quella delle metanefrine libere (16). Le metanefrine urinarie vengono solitamente misurate dopo la deconiugazione (il risultato riflette le metanefrine libere e coniugate), mentre le metanefrine plasmatiche vengono misurate in forma libera. Pertanto, quale valutazione iniziale, è preferibile utilizzare un singolo esame con un valore predittivo negativo molto elevato rispetto a una combinazione di esami. Inoltre, è necessario valutare i possibili fattori che possono portare ad un falso positivo e un falso negativo nell'esame biochimico. Per effettuare queste analisi bisogna tenere sotto controllo le diverse fasi: in fase preanalitica possono influenzare il risultato stress e postura. È richiesto infatti il prelievo in clinostatismo, soprattutto per l'analisi della normetanefrina, il metabolita che è più sensibile all'attivazione simpatica. Inoltre possiamo incorrere in questa fase in errori nel campionamento e nella stabilità del campione e valutare l'influenza della variabilità biologica inter-individuale, nonché le possibili interferenze causate da farmaci. Nel caso dell'analisi delle metanefrine è dimostrata l'interferenza con il paracetamolo, oppure farmaci simpatomimetici, come l'efedrina, o inibitori del riassorbimento dei neurotrasmettitori come i farmaci antidepressivi triciclici (TCAs). In Tabella 2 sono raggruppate alcune interferenze da farmaci (17).

Per quanto riguarda la determinazione della serotonina, almeno due giorni prima e durante il giorno della raccolta del campione urinario dovrebbe essere

evitato il consumo di cibi contenenti serotonina come ad esempio banane, noci, ananas, kiwi.

Prima del campionamento, i pazienti dovrebbero idealmente interrompere tutti i trattamenti che potrebbero alterare le concentrazioni di catecolamine o metanefrine nelle matrici biologiche (12).

Dall'altra parte bisogna valutare gli aspetti della fase analitica come la variabilità intra e inter-metodo e gli aspetti della de-coniugazione (libere verso totali/coniugate) Per quanto riguarda i falsi positivi bisogna considerare che l'elevazione delle catecolamine non è specifica per il feocromocitoma e nel caso dei falsi negativi bisogna tenere a mente che i tumori di piccole dimensioni possono essere silenti.

L'analisi delle catecolamine e delle metanefrine nel plasma e nelle urine può essere effettuata mediante diverse tecniche analitiche. Le precedenti procedure che utilizzavano saggi colorimetrici e radioimmunologici sono state generalmente sostituite da metodi HPLC altamente sensibili e specifici che utilizzano il rilevamento elettrochimico (HPLC-ECD) (8). I successivi miglioramenti tecnici hanno portato allo sviluppo di una nuova tecnica: la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS).

Per la diagnosi di feocromocitoma le recenti linee guida dell'Endocrine Society definiscono come esami di prima linea la determinazione delle metanefrine plasmatiche libere o delle metanefrine urinarie frazionate utilizzando tecniche cromatografiche (LC-ECD, LC-MS/MS). Tali metanefrine presentano un'alta sensibilità, per cui un risultato negativo permette l'esclusione di diagnosi di feocromocitoma, mentre la determinazione delle catecolamine e di altri loro metaboliti, come il VMA, non permette di ottenere la stessa accuratezza diagnostica (18).

Ad oggi, la determinazione delle metanefrine plasmatiche libere è considerata la più efficace per escludere o confermare la presenza di feocromocitoma con una sensibilità del 95-100% e una specificità dell'85-100% (19).

Tabella 2
Interferenze da farmaci

Antidepressivi triciclici (TCAs)	Blocco del riassorbimento della noradrenalina, causando un innalzamento della noradrenalina, normetanefrina e VMA in plasma e urine
Fenossibenzamina	Blocco dei recettori α_2 presinaptici, causando un innalzamento della noradrenalina, normetanefrina e VMA in plasma e urine
Inibitori delle monoamminoossidasi (MAO)	Blocco della deaminazione, causando aumento di metanefrine in plasma e urine
Levodopa e α -metildopa	Metabolizzate dagli enzimi e poi convertite in catecolamine
Stimolanti e simpaticomimetici (amfetamine, efedrina)	Aumento delle catecolamine urinarie e plasmatiche
Calcio antagonisti	Aumento delle catecolamine plasmatiche dovute all'attivazione simpatica
Paracetamolo	Interferenza positiva

VMA, Acido vanilmandelico.

Tuttavia i metodi disponibili oggi per la determinazione delle metanefrine plasmatiche si dimostrano tutt'ora poco affidabili in particolare perché sono poco riproducibili con elevata variabilità sia intra-laboratorio che tra laboratori diversi, anche in centri specialistici esperti. Inoltre non sono ancora disponibili valori di riferimento validati su ampie casistiche.

ESPERIENZA PERSONALE NELLA DETERMINAZIONE DEI METABOLITI URINARI

Questa sezione presenta l'esperienza degli Autori nella determinazione dei metaboliti urinari nella Struttura Complessa di Biochimica Clinica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino. Il grafico in Figura 3 mette in confronto le richieste pervenute al laboratorio di analisi per metanefrine e catecolamine urinarie sulle 24 ore nel periodo 2016-2022. Si può osservare che, oltre al crollo dovuto all'emergenza SARS-CoV-2 nel 2020, le richieste delle metanefrine sono in netto aumento. In Figura 4 viene mostrata la numerosità delle richieste dei metaboliti urinari, suddiviso tra campione delle 24 ore e campione random negli stessi anni.

Sono state eseguite valutazioni sulle richieste delle catecolamine e dei metaboliti urinari pervenute al laboratorio nel periodo 2016 ai primi sette mesi del 2023. Rispetto agli anni precedenti si può dedurre che le richieste saranno nell'anno corrente, quasi raddoppiate, come ad esempio le richieste di catecolamine su campione delle 24 ore (che passano da 905 nel 2022 a 582 da gennaio a luglio 2023) e metanefrine (da 2136 nel 2022 a 1559 da gennaio a luglio 2023).

Nell'intervallo di tempo considerato sono stati diagnosticati in totale 46 feocromocitomi presso i due principali centri prescrittori (Centro per ipertensione arteriosa e Centro per le malattie endocrine). La popolazione è costituita da 28 femmine e 18 maschi, con età media di 54,1 anni (intervallo 26-79), evidenziando come la diagnosi venga posta anche in età più avanzata rispetto a quella giovanile, in cui viene classicamente definita la patologia. Ciò potrebbe essere, almeno in parte, dovuto alla

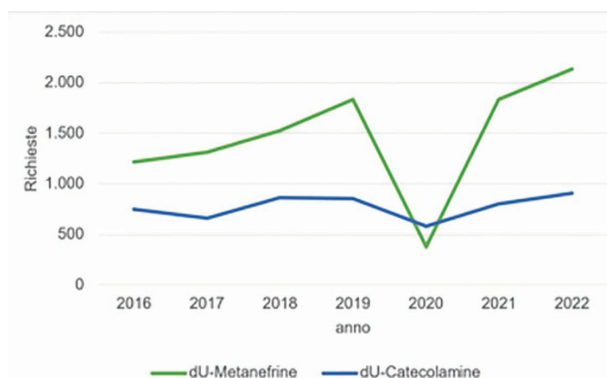


Figura 3

Numerosità delle richieste di metanefrine e catecolamine urinarie sulla raccolta delle 24 ore negli anni 2016-2022.

maggiore accessibilità e richiesta di analisi biochimiche, con tempi di risposta clinicamente utili per un corretto inquadramento diagnostico e terapeutico.

Risulta difficile presentare le concentrazioni dei singoli pazienti e di tutti i feocromocitomi come gruppo, considerata l'ampia variabilità di valori ottenuti sia intra-individuali (lo stesso paziente può presentare in controlli ripetuti nel tempo valori al di sotto del limite di riferimento o molto al di sopra) sia inter-individuali.

Non sono disponibili dati per altri NET e carcinoidi, a causa della difficoltà di reperire informazioni cliniche per pazienti in età pediatrica, nel caso dei neuroblastomi, oppure per pazienti seguiti in maniera disomogenea da diverse divisioni, come avviene per i carcinoidi.

Metodi utilizzati

I metodi di analisi e quantificazione si possono dividere in due principali gruppi: metodi immunochimici competitivi oppure metodi cromatografici quali HPLC-ECD o LC-MS/MS.

Nei metodi immunochimici competitivi si rileva la presenza di catecolamine sfruttando la reazione di complessazione anticorpo-antigene e sono utilizzati come metodo di screening per rilevare la presenza dell'analita in matrici biologiche. La cromatografia è la metodica di conferma nella diagnostica clinica, in quanto risulta essere più sensibile e specifica rispetto ai metodi immunochimici. Inoltre, l'uso di uno spettrometro di massa come rilevatore nella diagnostica clinica si sta affermando sempre di più nei laboratori di analisi.

Il motivo per cui si preferisce l'utilizzo della spettrometria di massa è dovuto al vantaggio in specificità, permettendo l'analisi simultanea di più analiti e metaboliti. Questi ultimi vengono infatti separati e rilevati secondo il loro rapporto massa/carica (m/Z), superando così le interferenze con analoghi di struttura che si verificano nei metodi immunochimici. Inoltre, la spettrometria di massa ha un vantaggio in sensibilità perché, a differenza del rilevatore elettrochimico, permette la rilevazione e quantificazione di analiti presenti in tracce.

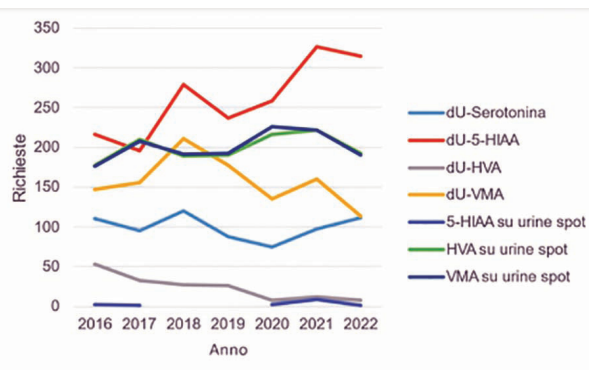


Figura 4

Numerosità delle richieste dei metaboliti urinari e della serotonina, suddivisi per tipologia di campione (24 ore o campione random) negli anni 2016-2022. 5-HIAA, acido 5-idrossiindolacetico; HVA, acido omovanillico; VMA, acido vanilmandelico

Per queste caratteristiche di sensibilità e specificità elevata, la spettrometria di massa, è considerata la scelta ideale per la determinazione di catecolamine e metanefrine in plasma ed urine. L'alta sensibilità delle metanefrine, sia plasmatiche che urinarie, permette in maniera efficace di diagnosticare la presenza di feocromocitoma o paraganglioma (20).

Nel nostro laboratorio fino al 2018 le analisi venivano effettuate in HPLC-ECD con sistema di rivelazione coulombometrico o amperometrico (Shimadzu, Kyoto, Giappone). Dal 2018 è stata adottata la metodica di LC-MS/MS. Le analisi vengono eseguite utilizzando uno spettrometro Citrine Triple QUAD (AB Sciex, Framingham, MA, USA) accoppiato ad un sistema LC Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Giappone). L'elaborazione dati avviene tramite il software di gestione dello strumento Analyst (versione MD 1.6.3, AB Sciex, Framingham, MA, USA) ed il software per la quantificazione MultiQuant (versione MD 3.0.3, AB, Sciex, Framingham, MA, USA). La procedura analitica è basata sul kit diagnostico MassChrom@Ammine biogene/metaboliti nelle urine-Chromatographic Platform (Chromsystems®), in combinazione con tre Sample Prep Set differenti (Figura 5):

- metanefrine totali (libere + coniugate),
- catecolamine, metanefrine libere e serotonina e iii) acido vanilmandelico (VMA), acido omovanillico (HVA)
- acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA).

Il primo di questi set è un prodotto per la diagnosi *in vitro* destinato ai laboratori clinici per la determinazione quantitativa di metanefrina, normetanefrina e 3-metossitiramina come metanefrine totali (somma dei metaboliti liberi e coniugati in campioni). La liberazione delle forme coniugate (solfati e glucuronidi) si ottiene mediante idrolisi acida. L'estrazione in fase solida ha la funzione di purificare i campioni e arricchire gli analiti. Al termine della fase preparativa del campione, gli eluati vengono analizzati con LC-MS/MS. Ogni analita è riferito ad uno standard interno stabile, marcato isotopicamente. I coefficienti di variazione intra-serie calcolati su 10 ripetizioni dello stesso campione su due livelli diversi per ogni analita sono <3,5% per le metanefrine e <4,7% per le catecolamine. La precisione inter-serie, ottenuta con 10 ripetizioni dello stesso campione in 10 giornate diverse, ha mostrato CV <5% per le metanefrine e <8,5%

per le catecolamine.

I Sample Prep Set coprono i diversi gruppi di analiti e contengono tutti i componenti necessari per una preparazione efficiente del campione, mentre la Chromatographic Platform contiene le fasi mobili, la Rinsing Solution e la colonna analitica che è uguale per tutti i Sample Prep Set. Non occorre pertanto cambiare il sistema cromatografico per l'analisi dei diversi gruppi.

Le analisi sono condotte su campioni di urina, preferibilmente delle 24 ore. Le urine vengono raccolte in un recipiente adatto, contenente 10 mL di soluzione salina al 10-25%. Per la determinazione delle metanefrine nell'urina non è necessaria nessuna stabilizzazione. Ricercare gli analiti in una matrice complessa come l'urina richiede un passaggio di pretrattamento del campione, con la finalità di eliminare gli interferenti all'interno della matrice e così isolare solo gli analiti di interesse. L'estrazione in fase solida è una tecnica di preparazione del campione che utilizza delle colonnine o cartucce contenenti una fase solida, che viene sottoposta ad un flusso di fase liquida. Il processo è basato sull'interazione degli analiti da estrarre, disciolti in una fase liquida (o a volte gassosa) con una fase solida (adsorbente). Il campione dopo estrazione viene successivamente analizzato mediante LC-MS/MS. La cromatografia liquida rappresenta il passaggio chiave nella separazione e successiva quantificazione delle catecolamine e metanefrine urinarie, a seguito di una corretta estrazione in fase solida. La colonna analitica per questa metodica si basa su un meccanismo di fase inversa: la fase stazionaria è particolarmente affine verso composti polari e con carattere idrofobico come le catecolamine. La colonna cromatografica è interfacciata allo spettrometro di massa tandem a triplo quadrupolo che usa una sorgente electrospray per la ionizzazione (ESI) che lavora a pressione atmosferica. L'analizzatore utilizzato è un triplo quadrupolo che lavora in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM), con alta sensibilità e selettività verso i frammenti selezionati. Si selezionano più frammentazioni contemporaneamente, ciò permette l'analisi simultanea di analiti in una singola corsa cromatografica. Con la metodica estrazione in fase solida seguita da LC-MS/MS si ottiene, dunque, una sensibilità alta, in grado di misurare la concentrazione degli analiti in tracce.

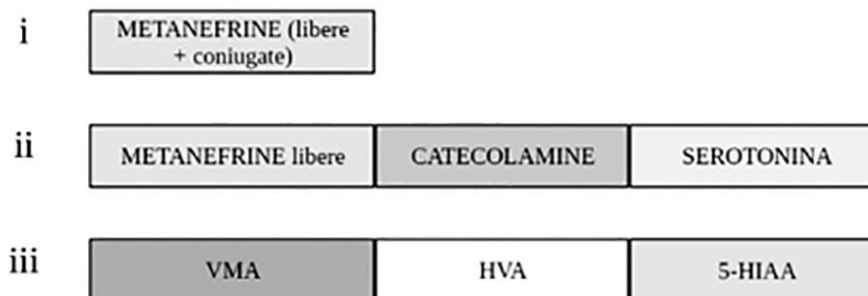


Figura 5

Kit utilizzati per le determinazioni urinarie il primo è dedicato alle metanefrine totali (libere + coniugate), il kit ii aggiunge catecolamine e serotonina. Il kit iii permette la determinazione di acido vanilmandelico (VMA), acido omovanillico (HVA) e l'acido 5-idrossiindolacetico (5-HIAA).

DISCUSSIONE

La nostra esperienza ha messo in evidenza come cambiamenti organizzativi delle aree analitiche in laboratorio, da un lato, ed una revisione delle applicazioni e delle indicazioni cliniche di indagini biochimiche di secondo livello, dall'altro, possano condurre a colmare il problema diagnostico per condizioni patologiche considerate rare.

Così, la riorganizzazione del percorso dei campioni e dei flussi di lavoro all'interno del laboratorio ha permesso di costituire un'area di lavoro dedicata alle analisi in cromatografia e spettrometria di massa. L'accettazione centralizzata di tutti i campioni di urina, inviati dalle divisioni interne (ma anche pazienti ambulatoriali) e da strutture sanitarie esterne, destinati all'analisi delle amine consente di uniformare il pretrattamento dei campioni e lo smistamento dei gruppi di campioni da processare secondo le diverse linee preparative. La confluenza dei risultati analitici in un unico middleware favorisce il processo di validazione dei dati da parte di operatori tecnici esperti, facenti parte del gruppo dedicato al settore di cromatografia e spettrometria di massa. L'introduzione dell'automazione della fase di preparazione dei campioni permetterà nel prossimo futuro di ottimizzare i tempi di esecuzione e di programmazione delle sedute analitiche.

Come dimostrato dai nuovi casi diagnosticati, è ipotizzabile che un maggiore utilizzo degli approfondimenti biochimici possa portare alla identificazione di un numero più elevato di pazienti affetti da feocromocitoma, come già dimostrato per l'iperaldosteronismo primario, un'altra causa di ipertensione arteriosa secondaria, spesso misconosciuta nel passato ed oggi sempre più ricercata e individuata. Con il miglioramento delle prestazioni delle indagini biochimiche e con la definizione di percorsi diagnostici condivisi tra laboratori di riferimento sarà possibile rilevare tumori in fasi molto precoci e come pure casi di incidentalomi oggi descritti come non funzionanti, sulla base dei biomarcatori attualmente utilizzati.

Per rispondere sempre meglio alle esigenze cliniche, le prospettive future saranno volte alla definizione del ruolo della determinazione delle frazioni libere delle metanefrine urinarie, con il necessario adeguamento della fase di pre-trattamento dei campioni e, soprattutto, sullo sviluppo di un profilo di amine allargato, come pannello metabolomico comprendente in un unico kit oltre agli analiti attuali anche altri metaboliti di interesse, quali DOPAL (3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde), DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid), Tyrosine, DOPA, DHMA (3,4-dihydroxymandelic acid), DHPG (3,4-dihydroxyphenylglycol), DOPEGAL (3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde), DOPET (3,4-dihydroxyphenylethanol), MHPG (3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol), e MOPEGAL (methoxy-4-hydroxyphenylglycolaldehyde).

CONCLUSIONI

L'importanza della determinazione delle catecolamine e dei metaboliti sulle urine comporta un impegno del laboratorio nella gestione della fase pre-analitica,

sempre molto delicata per i campionamenti condotti nelle 24 ore, e nella ottimizzazione del percorso analitico, dalla preparazione del campione fino alla validazione dei risultati. In particolare, il consolidamento della fase preparativa e la standardizzazione della fase analitica ci hanno consentito di fornire ai clinici risposte adeguate in tempi utili, in quanto in una settimana vengono eseguite due sedute analitiche, per una diagnostica differenziale particolarmente impegnativa.

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Motiejunaite J, Amar L, Vidal-Petiot E. Adrenergic receptors and cardiovascular effects of catecholamines. *Ann Endocrinol (Paris)* 2021;82:193-7.
2. Clementi F, Fumagalli G. *Farmacologia generale e molecolare* Edra, quinta edizione 2018;47880.
3. T.Flatmark Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol Scand* 2000;168:1-17.
4. Boyle JG, Davidson DF, Perry CG, Connell JM. Comparison of diagnostic accuracy of urinary free metanephrines, vanillyl mandelic Acid, and catecholamines and plasma catecholamines for diagnosis of pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;292:4602-8.
5. Barron J. Pheochromocytoma: diagnostic challenges for biochemical screening and diagnosis. *J Clin Pathol* 2010;63:669-74.
6. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* 2008;31:187-99.
7. Eisenhofer G, Goldstein DS, Walther MM, Friberg P, Lenders JW, Keiser HR, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: how to distinguish true-from false-positive test results. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2656-66.
8. Eisenhofer G, Peitzsch M. Laboratory evaluation of pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Chem* 2014;60:1486-99.
9. Carr JC, Spanheimer PM, Rajput M, Dahdaleh FS, Lal G, Weigel RJ, et al. Discriminating pheochromocytomas from other adrenal lesions: the dilemma of elevated catecholamines. *Ann Surg Oncol* 2013;20:3855-61.
10. Eisenhofer G, Pacak K, Maher ER, Young WF, de Krijger RR. Pheochromocytoma. *Clin Chem*. 2013 Mar;59:466-72.
11. Lenders J W M, Eisenhofen G, Manelli M, et al. Pheochromocytoma. *Lancet* 2005;366:665-75
12. Van Berkel A, Lenders JW, Timmers HJ. Diagnosis of endocrine disease: biochemical diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma. *Eur J Endocrinol* 2014;170:R109-19.
13. Pandit S, Annamaraju P, Bhusal K. Carcinoid Syndrome. [Updated 2023 Feb 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448096/> (ultimo accesso: luglio 2023)
14. Parasiliti-Caprino M, Obert C, Lopez C, Bollati M, Bioletto F, Bima C, et al. Association of urine metanephrine levels with cardiometabolic risk: an observational retrospective study. *J Clin Med* 2021;10:1967.
15. Parasiliti-Caprino M, Lopez C, Bollati M, Bioletto F, Sola C, Di Carlo MC, et al. A retrospective study on the association

- between urine metanephrines and cardiometabolic risk in patients with nonfunctioning adrenal incidentaloma. *Sci Rep* 2022;12:14913.
16. Grouzmann E, Drouard-Troalen L, Baudin E, Plouin PF, Muller B, Grand D et al. Diagnostic accuracy of free and total metanephrines in plasma and fractionated metanephrines in urine of patients with pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol* 2010;162:951-60.
 17. Lenders JWM, Eisenhofer G. Update on Modern Management of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2017;32:152-61.
 18. Lenders J W, Duh,QY, Eisenhofer G, et al. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1915-42.
 19. Lenders JW, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P, et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma: which test is best?. *JAMA* 2002;287:427-34.
 20. De Filpo G, Canu L. Problemi interpretativi del dosaggio delle metanefrine. *L'Endocrinologo* 2020;21:475-7.