

Optimizacija tekućinsko-kromatografskog postupka za mjerenje serotonina u plazmi

Turza, Lara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:066052>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-29**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Lara Turza

**OPTIMIZACIJA TEKUĆINSKO-
KROMATOGRAFSKOG POSTUPKA ZA
MJERENJE SEROTONINA U PLAZMI**

Završni rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Lara Turza

**OPTIMIZACIJA TEKUĆINSKO-
KROMATOGRAFSKOG POSTUPKA ZA
MJERENJE SEROTONINA U PLAZMI**

Završni rad

Osijek, 2018.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Željko Debeljak

Rad ima 26 stranica, 3 tablice i 10 slika.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Serotonin.....	1
1.2. Sinteza i metabolizam serotonina	1
1.3. Pohrana serotonina	3
1.4. HPLC	3
1.5. Mjerenje serotonina	4
2. CILJ	1
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Ustroj studije.....	7
3.2. Materijali	7
3.2.1. Priprema plazma diluenta.....	8
3.2.2. Priprema dilucija kalibratora i kontrolnih uzoraka za HPLC analizu.....	10
3.3. Metode	11
3.4. Statističke metode.....	13
4. REZULTATI.....	14
4.1. Metoda kvantifikacije serotonina u plazmi uz primjenu IS-a.....	14
4.2. Ispitivanje osjetljivosti metode	15
5. RASPRAVA.....	18
6. ZAKLJUČAK	21
7. SAŽETAK.....	22
8. SUMMARY	23
9. LITERATURA.....	24
10. ŽIVOTOPIS	26

POPIS KRATICA

5-HT – 5-hidroksitriptamin; serotonin

5-HTP – 5-hidroksitriptofan

TPH – triptofan-hidroksilaza (eng. *tryptophan hydroxylase*)

MAO – monoaminooksidaza

5-HIAA – 5-hidroksiindol octena kiselina (eng. *5-Hydroxyindoleacetic acid*)

5-HTt – prijenosni protein serotonina (eng. *serotonin transporter protein*)

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

ECD – elektrokemijski detektor (eng. *Electrochemical detector*)

FLD – fluorescentni detektor (eng. *Fluorescence detector*)

IS – interni standard (eng. *internal standard*)

P – precipitacijski reagens (eng. *precipitant*)

HIV 1/2 – virus humane imunodeficijencije tip 1 i tip 2 (eng. *Human immunodeficiency virus*)

HBV – virus hepatitisa B (eng. *Hepatitis B virus*)

HCV – virus hepatitisa C (eng. *Hepatitis C virus*)

HBsAg – površinski antigen virusa hepatitisa B (eng. *Hepatitis B surface antigen*)

HIV RNA – ribonukleinska kiselina virusa humane imunodeficijencije (eng. *Human immunodeficiency virus ribonucleic acid*)

HCV RNA – ribonukleinska kiselina virusa hepatitisa C (eng. *Hepatitis C virus ribonucleic acid*)

HBV DNA – deoksiribonukleinska kiselina virusa hepatitisa B (eng. *Hepatitis B virus deoxyribonucleic acid*)

LOQ – granica kvantifikacije (eng. *limit of quantitation*)

LOD – granica detekcije (eng. *limit of detection*)

1.UVOD

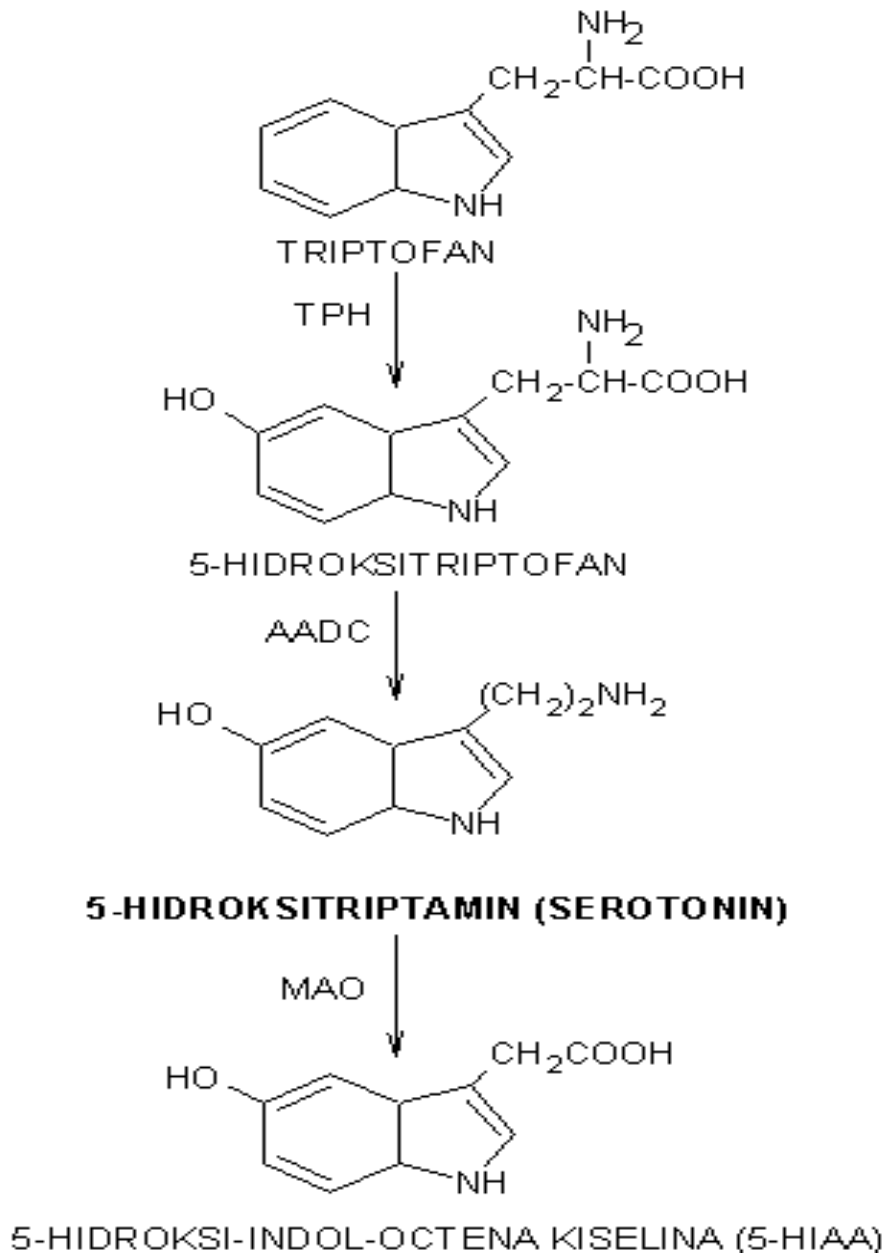
1.1. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je biogeni amin široko rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu. Jedan je od glavnih neurotransmitera koji je uključen u regulaciju brojnih fizioloških procesa kao što su kontrakcija glatkog mišićnog sustava, regulacija krvnog tlaka, temperature, apetita, regulacija raspoloženja, kognitivnih i motoričkih funkcija i dr. (1). Poremećaji biosinteze i otpuštanja serotonina te poremećaji receptora za serotonin mogu dovesti do pojave različitih bolesti, posebice psihijatrijskih kao što su depresija, psihoza i anksioznost. Zbog promjene koncentracije serotonina u perifernim organima i tkivima mogu se javiti hipertenzija, migrena, srčane aritmije kao i Raynaudova bolest, fibrotični sindrom i neki simptomi karcinoidnog sindroma. Najizraženija odstupanja sadržaja i koncentracije serotonina u perifernim tkivima i organima pronađena su kod pacijenata s karcinoidnim tumorom (2). Pacijenti koji pate od karcinoidnog tumora pokazuju patološki povišene razine serotonina u trombocitima, plazmi/serumu i urinu (3). Istraživanja o važnim ulogama serotonina na periferna tkiva značajno su povećala interes za njegovo određivanje u krvnoj plazmi i u trombocitima (1). Rezultati nedavnih istraživanja ukazuju na moguću ulogu serotonina u regulaciji rasta kostiju, ulogu u regeneraciji jetre i razvoja mliječnih žlijezda te ulogu izvanstaničnog serotonina u kontroli izlučivanja inzulina (4-6).

1.2. Sinteza i metabolizam serotonina

Serotonin se sintetizira iz esencijalne aminokiseline triptofana pri čemu enzim triptofan-hidroksilaza (TPH) katalizira prijelaz triptofana u 5-hidroksitriptofan (5-HTP), a potom hidroksi-triptofan dekarboksilaza katalizira prijelaz 5-HTP-a u 5-hidroksitriptamin (5-HT), tj. serotonin (Slika 1). Sinteza se odvija u dva metabolički odvojena odjeljka, središnjem živčanom sustavu, koji je centralni odjeljak sinteze 5-HT, u presinaptičkim serotonin-producirajućim neuronima te periferno, najviše u enterokromafnim stanicama gastrointestinalne sluznice tankog crijeva koje sintetiziraju čak 80 % ukupnog serotonina u organizmu (7). Razlikujemo dva izoenzima triptofan-hidroksilaze: triptofan-hidroksilaza 1 (TPH1) smještena je u perifernom sustavu, dok se triptofan-hidroksilaza 2 (TPH2) nalazi u centralnom živčanom sustavu (8). Centralni i periferni odjeljak sinteze serotonina odvojeni su za serotonin nepropusnom, krvnomoždanom barijerom koja propušta triptofan i tako omogućava sintezu serotonina u serotoninским neuronima (9). Različiti podražaji mogu

potaknuti otpuštanje serotonina iz enterokromafinih stanica. Nakon prvog prolaska kroz jetru 30-80 % serotonina metabolizira se djelovanjem monoaminoooksidaze (MAO) do 5-hidroksiindol octene kiseline (5-HIAA) koja se izlučuje putem bubrega. Najveći dio preostalog 5-HT metabolizira se u plućima, također do 5-HIAA, a 10 % gotovo u potpunosti preuzimaju trombociti (9).



Slika 1. Metabolizam serotonina. (Adaptirano prema Kema IP, de Vries EGE, Muskiet FAJ (2)). TPH: triptofan hidroksilaza, AADC: dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (eng. *aromatic-L-amino acid decarboxylase*), MAO: monoaminoooksidaza

1.3. Pohrana serotonina

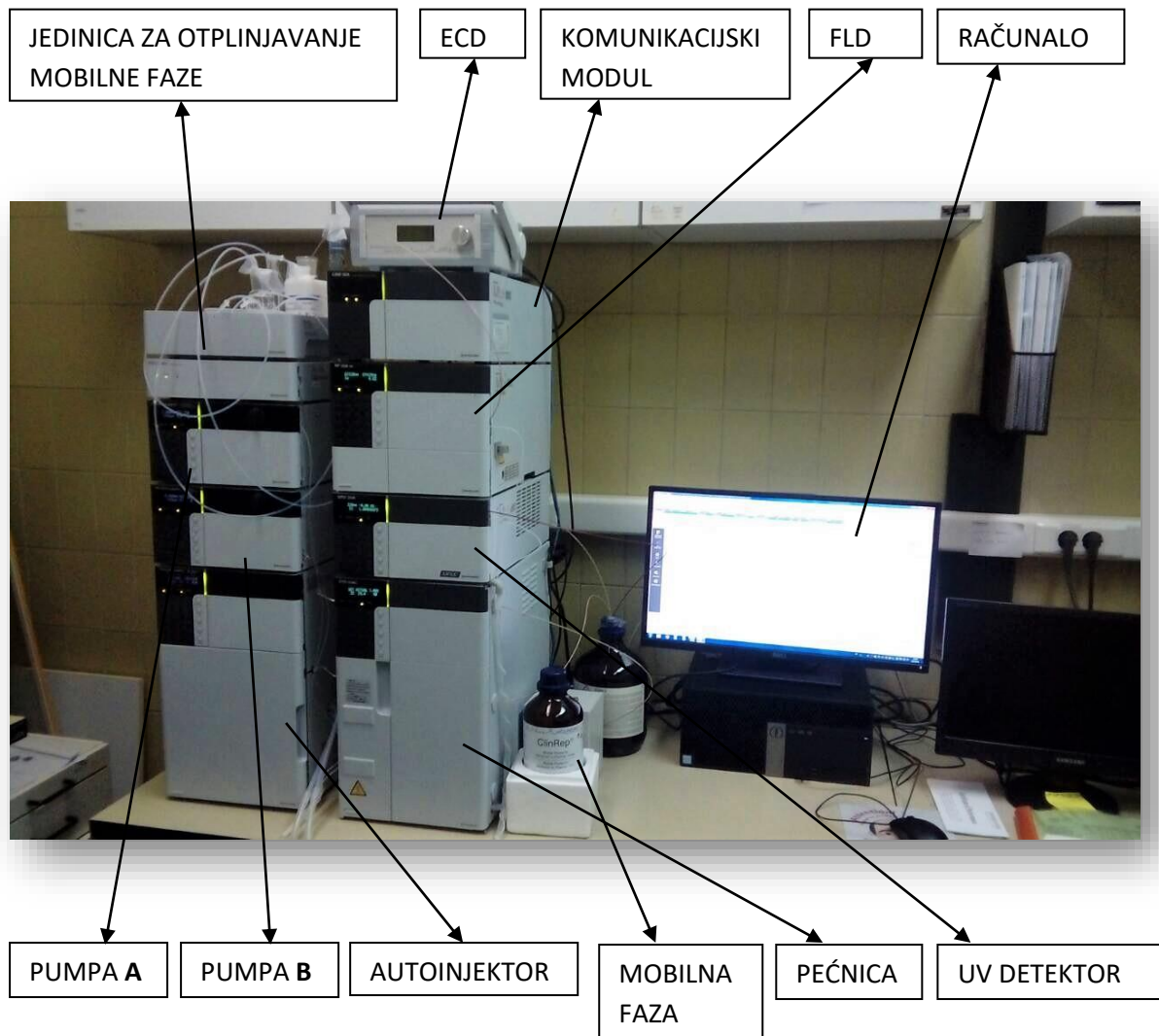
Uz 5-HT neurone i enterokromafine stanice, trombociti također sadrže veće količine serotonina. U njima je pohranjeno više od 99 % ukupnog serotonina u cirkulaciji, dok druge krvne stanice i krvna plazma sadrže zanemarive količine serotonina. Trombociti sadrže serotonin u trombocitnoj citoplazmi, odnosno u subcelularnim organelama tzv. gustim zrnima ili delta granulama. Kako trombociti ne posjeduju triptofan-hidroksilazu (ključni enzim za sintezu serotonina) te ga ne mogu sami sintetizirati, preuzimaju ga iz krvi pomoću prijenosnog proteina (5-HTt) koji se nalazi na membrani trombocita (10). Uz serotoninški transmembranski prijenosnik, trombociti sadrže i monoaminooksidazu (MAO) (11).

U gastrointestinalnom sustavu serotonin se nakon otpuštanja iz enterokromafinih stanica veže za ciljane receptore na obližnjim živčanim vlaknima i potiče peristaltiku. U fazi oporavka živčanih vlakana, dio serotonina ponovno se pohranjuje u enterokromafine stanice, dok dio ulazi u cirkulaciju (12). Slobodni serotonin u cirkulaciji (plazmatski serotonin) fiziološki djeluje kao bronhokonstriktor i vazokonstriktor te u kardiovaskularnom sustavu ima ulogu u regulaciji srčanog ritma i krvnog tlaka (1). Da bi učinak serotonina bio kontroliran, višak se pohranjuje u trombocite i otpušta se egzocitozom za vrijeme aktivacije trombocita tijekom procesa zgrušavanja (10). Kod bolesti i stanja koja utječu na sintezu, metabolizam i pohranu serotonina te ekspresiju serotoninških transportera i receptora korisno je određivanje serotonina u različitim odjeljcima – u plazmi i u trombocitima.

1.4. HPLC

HPLC (eng. *High Performance Liquid Chromatography* – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti) smatra se metodom izbora za mjerenje serotonina zbog visoke analitičke osjetljivosti, specifičnosti i preciznosti (2). Glavni sastavni dijelovi HPLC sustava uključuju pumpu, autoinjektor, pećnicu i detektor (Slika 2). Pripremljeni uzorci injektiraju se u mobilnu fazu te se komponente uzorka kromatografski odvajaju na koloni, a signal analita snima se primjenom elektrokemijskog/amperometrijskog (eng. *electrochemical detector* – ECD) ili fluorescentnog detektora (eng. *fluorescence detector* – FLD) koji su sustavom kapilara spojeni s analitičkom kolonom. U slučaju primjene ECD-a sastavnice smjese, nakon razdvajanja na analitičkoj koloni, prolaze preko površine radne elektrode detektora na kojoj se odvijaju redoks reakcije. Struja koja nastane elektrokemijskom reakcijom, točnije reakcijom oksidacije analita mjeri se ECD-om i proporcionalna je koncentraciji analita koji prolazi kroz

mjernu ćeliju što omogućuje kvantitativno određivanje analita. Prije samog injektiranja pripremljenih uzoraka potrebno je testirati HPLC sustav, tj. provjeriti je li mjerni sustav kondicioniran. Tek kada je analitički sustav kondicioniran, može se provesti mjerenje. Koncentracija analita izračunava se pomoću metode internog standarda preko visine kromatografskih vrškova (2).



Slika 2. HPLC uređaj.

1.5. Mjerenje serotonina

Kako se gotovo sav serotonin u cirkulaciji nalazi unutar trombocita, dosadašnja su istraživanja uglavnom provedena na plazmi bogatoj trombocitima (13). Mjerenje serotonina u

plazmi siromašnoj trombocitima pokazalo se znatno težim zbog poteškoća u mjerenju niskih koncentracija serotonina i zbog pripreme plazme bez kontaminacije trombocitnim serotoninom. U dosadašnjim istraživanjima, tijekom pokušaja pripreme plazme siromašne trombocitima, često je dolazilo do otpuštanja trombocitnog serotonina tijekom centrifugiranja što je dovelo do lažno povišenih vrijednosti (13). Čak i ako je priprema plazme bila adekvatna, osjetljivost mjernog sustava nije dovoljno visoka za kvantificiranje niskih koncentracija serotonina u plazmi. Navedeni čimbenici, koji su rezultirali pogrešnim vrijednostima plazmatskog serotonina, stoga su bili povod ovom istraživačkom radu. U svrhu postizanja potrebne osjetljivosti mjernog postupka, bilo je potrebno prilagoditi postavke ECD-a spojenog na HPLC uređaj.

CILJ

2. CILJ

Cilj je ovog istraživanja prilagodba postavki HPLC-a opremljenog ECD-om za kvantitativne analize serotonina u krvnoj plazmi u svrhu postizanja zadovoljavajuće osjetljivosti mjernog postupka u koncentracijama od 1 nmol/L plazme ili nižim.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Optimizacija metode započela je s postavkama propisanim od strane proizvođača komercijalnog kita za analizu serotonina u plazmi. Kako bi se povećala postojeća osjetljivost metode, postavke ECD-a te, po potrebi, ostale komponente HPLC-a, mijenjale su se u skladu s fizikalno-kemijskim svojstvima analita i interferirajućih tvari kao i u skladu s ograničenjima mjerne tehnologije. Nakon promjene instrumentalnih postavki ispitivale su se analitičke performanse, prvenstveno osjetljivost, odnosno preciznost i točnost izmijenjenog postupka, primjenom komercijalnih kontrolnih materijala te primjenom kontrolnih materijala pripremljenih u laboratoriju Odjela za kliničku kemiju, Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, KBC-a Osijek. Opisani postupak je iterativan: do trenutka, dok se nije postigla zadovoljavajuća osjetljivost, prilagođavale su se postavke metode, a zatim su testirane performanse takve metode primjenom komercijalnih kontrolnih materijala.

3.2. Materijali

Za provedbu istraživanja koristili su se komercijalno dostupni kalibratori i kontrolni uzorci, koji su od strane proizvođača (Recipe, Njemačka), pripremljeni iz plazme ljudskog podrijetla. Iako su testirani na uobičajene markere infekcija, s njima treba rukovati jednakim mjerama opreza kao i s potencijalno infektivnim uzorcima pacijenata. Kompletni pribor i korištene komponente kita, čiji je sadržaj naveden u priručniku za uporabu ClinRep HPLC Complete Kit for Serotonin in Plasma (München, Njemačka), čine mobilna faza, interni standard (IS), plazma kalibrator, epruvete za pripremu uzoraka i precipitacijski reagens (P). Analitička kolona i kontrolni uzorci I i II ne nalaze se u sklopu kita, već je njih potrebno posebno pribaviti. Odmah po primitku u laboratorij, komponente je potrebno raspakirati i pažljivo slijediti upute o njihovu skladištenju. Neiskorištene komponente, pohranjene pod odgovarajućim uvjetima, mogu se iskoristiti do datuma navedenog na naljepnici proizvoda. Od laboratorijskih instrumenata za pripremu uzoraka bile su potrebne još i pipete, nastavci za pipete, centrifuga te električna mješalica (eng. *vortex mixer*).

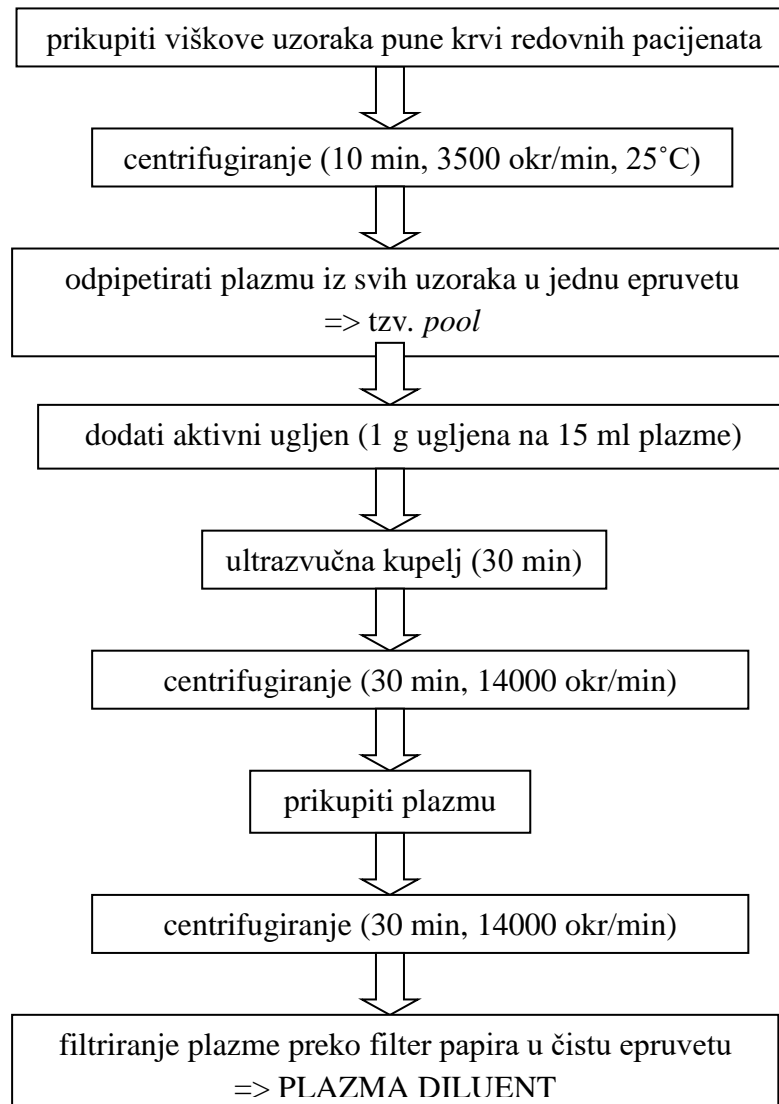
Kontrolni uzorci za određivanje serotonina u plazmi dostupni su u dvije koncentracijske razine – Recipe ClinChek Level 1 i ClinChek Level 2 (München, Njemačka) i koriste se za osiguranje unutarnje kvalitete u laboratorijima. Prije korištenja potrebno ih je

pripremiti na način da im se doda 5.0 ml redestilirane vode, a potom ih se miješa 15 min. Kada se sav materijal otopi, spremni su za korištenje. Pohranjuju se na 2-8 °C te su tako stabilni 36 mjeseci, ali ne smiju se koristiti poslije datuma otisnutog na naljepnici. Kalibrator Recipe ClinCal (München, Njemačka) služi za kvantifikaciju analiza u uzorku. Postupak pripreme i pohrane isti je kao i za plazmu kontrole I i II. Ljudska plazma, koja se koristila za proizvodnju kontrolnih uzoraka I i II te kalibratora, testirala se na markere infekcija i pokazala se negativnom na: HIV 1/2, HBV i HCV antitijela, HbsAg, HIV i HCV RNA te HBV DNA. Za pripremu internog standarda (IS) potrebno je dodati 1.0 ml vode i dobro miješati. Stabilan je najmanje 5 dana ako se pohranjuje na 2-8°C. Mobilnu fazu, precipitat i analitičku kolonu potrebno je pohraniti na 15-30°C, a epruvete za pripremu uzoraka treba čuvati na sobnoj temperaturi.

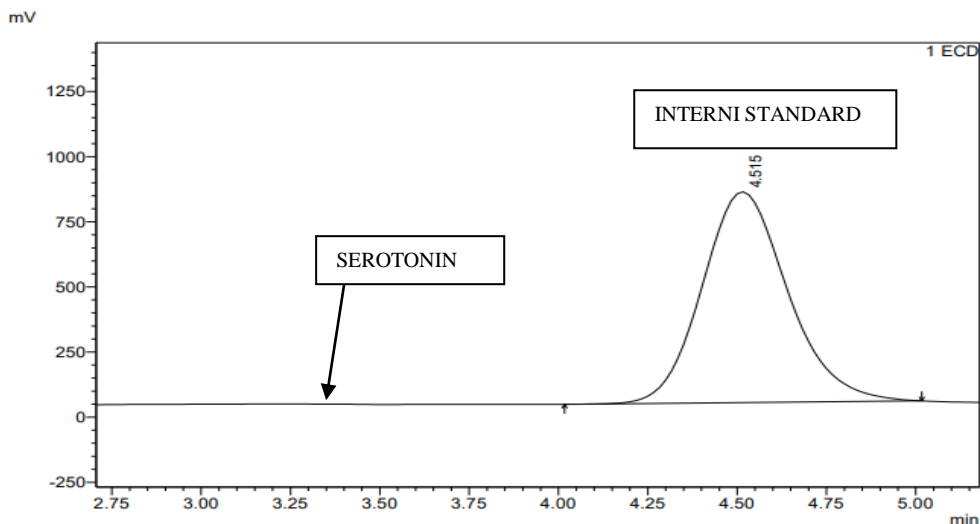
3.2.1. Priprema plazma diluenta

Kako bi uzorke mogli analizirati na HPLC uređaju, prvo je bilo potrebno pripremiti dilucije kalibratora, kontrolnog uzorka I i kontrolnog uzorka II. Kako bi se što bolje simulirali stvarni uzorci plazme bolesnika, važno je kalibratore i kontrolne uzorke diluirati s humanom plazmom (plazma diluent) iz koje je prethodno uklonjen serotonin. Tek na taj način osiguran je matriks koji je po sastavu sličan plazmi pacijenata. Priprema plazma diluenta (Slika 3) započinje prikupljanjem viškova uzoraka pune krvi redovnih pacijenata u epruvetama koje sadržavaju EDTA antikoagulans, a koji nisu bili pohranjeni u hladnjaku. Sastav tih uzoraka *ne* analizira se na sadržaj bilo kojeg dijagnostičkog pokazatelja. Krv se centrifugira 10 min na 3500 okr/min na temperaturi 25 °C. Vrlo je bitno da se sve odvija na sobnoj temperaturi jer niska temperatura (2-8 °C) aktivira trombocite i uzrokuje otpuštanje serotonina iz gustih granula. Nakon centrifugiranja iz svakog uzorka odpipetira se plazma pazeći pritom da se vrhom pipete ne dodirne sloj leukocita i trombocita. Plazma iz svih uzoraka pipetira se u istu epruvetu da bi se dobila dovoljna količina plazme potrebne za diluciju, tzv. *pool*. U epruvetu, u kojoj se nalazi plazma, potrebno je dodati aktivni ugljen, približno 1g ugljena na 15 mL plazme. Smjesa plazme i ugljena stavi se u ultrazvučnu kupelj na 30 min, a nakon toga se centrifugira 30 min na 14000 okr/min kako bi se ugljen odvojio od plazme. Plazma se prikupi i ponovno se centrifugira 30 min na 14000 okr/min da bi se dodatno pročistila od čestica ugljena koje su na sebe vezale sav serotonin iz plazme. Na kraju se filtrira preko filter papira u čistu epruvetu. Dobivena plazma bez serotonina koristi se kao plazma diluent odnosno

prikladan matriks za diluiranje komercijalnih kalibratora i kontrolnih uzoraka. Plazma diluent testiran je na zaostalu prisutnost serotonina te je utvrđeno da serotonina nema (Slika 4).



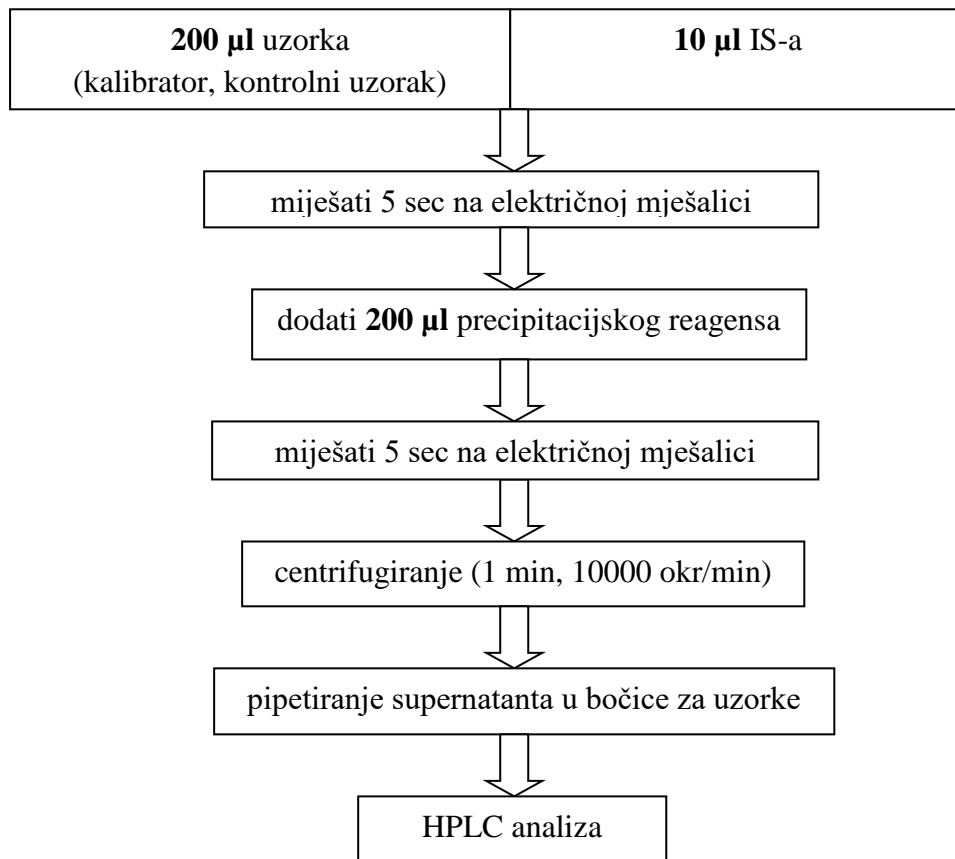
Slika 3. Dijagram tijeka: priprema plazma diluenta.



Slika 4. Kromatogram za plazma diluent. Strijelicom je označeno mjesto gdje bi se serotonin trebao nalaziti.

3.2.2. Priprema dilucija kalibratora i kontrolnih uzoraka za HPLC analizu

Kako bi uzorke diluirali najprije je bilo potrebno pripremiti stock otopine tako da se 20 μL kalibratora/kontrolnog uzorka pomiješa s 1980 μL plazma diluenta (početna dilucija 1:100). Koncentracija serotonina u diluiranom uzorku kalibratora iznosila je 12.0 nmol/L, kontrolnog uzorka I 6.02 nmol/L, a kontrolnog uzorka II 18.44 nmol/L. Zatim slijede redom priprave dilucija 1:200, 1:600, 1:1000 koje se pripremaju tako da se određena količina kalibratora/kontrolnog uzorka I i II pomiješa s točno određenom količinom plazma diluenta. Zatim se od navedenih dilucija stock otopine odvaja 200 μL u epruvetu u koju se dodaje 10 μL diluiranog internog standarda (dilucija 1:100, tj. 20 μL IS + 1980 μL plazma diluenta) (Slika 5). Slijedi miješanje 5 sekundi na električnoj mješalici, nakon čega se u svaku epruvetu doda 200 μL precipitacijskog reagensa. Potom je potrebno ponovno miješanje 5 sekundi na električnoj mješalici, centrifugiranje 1 min na 10000 okr/min i na kraju pipetiranje supernatanta u bočice za uzorke čime su uzorci spremni za HPLC analizu.



Slika 5. Dijagram tijeka: priprema kalibratora i kontrolnih uzoraka I i II za analizu.

3.3. Metode

Prilagodbe metode za analizu serotonina u plazmi u cilju optimizacije osjetljivosti provodile su se na temelju poznavanja elektrokemijskih svojstava serotonina i interferirajućih spojeva. Određivanje serotonina iz plazme siromašne trombocitima provelo se na HPLC uređaju Shimadzu Nexera X2 (Kyoto, Japan) na koji je spojen ECD Recipe ClinLab EC6000 (München, Njemačka). HPLC smatra se referentnom metodom zbog visoke analitičke osjetljivosti, specifičnosti i preciznosti. Pripremljeni uzorci injektirani su u HPLC sustav te su komponente uzorka kromatografski odvojene na koloni, a signali analita snimljeni su ECD-om. Prije injektiranja pripremljenih uzoraka (kalibrator, kontrolni uzorci I i II) bilo je potrebno testirati HPLC sustav, tj. napraviti probni test injektiranjem 20 µL standardne otopine. Za kalibraciju koristio se plazmatski kalibrator koji je pripremljen po protokolu proizvođača. Za kontrolu kvalitete analitičkog mjerenja bile su korištene dvije komercijalno dostupne plazma kontrole s različitim koncentracijama (kontrolni uzorak I i kontrolni uzorak

II). Svi kvantitativni rezultati dobiveni su primjenom linearne kalibracije uz korištenje internog standarda (IS). Za izračun koncentracije serotonina u uzorku prema Jednadžbi 1. potrebni su sljedeći podaci:

S_{uzorak} = visina kromatografskog vrška serotonina u kromatogramu uzorka

$S_{kalibrator}$ = visina kromatografskog vrška serotonina u kromatogramu kalibratora

IS_{uzorak} = visina kromatografskog vrška internog standarda u kromatogramu uzorka

$IS_{kalibrator}$ = visina kromatografskog vrška internog standarda u kromatogramu kalibratora

$C_{kalibrator}$ = koncentracija serotonina u kalibratoru

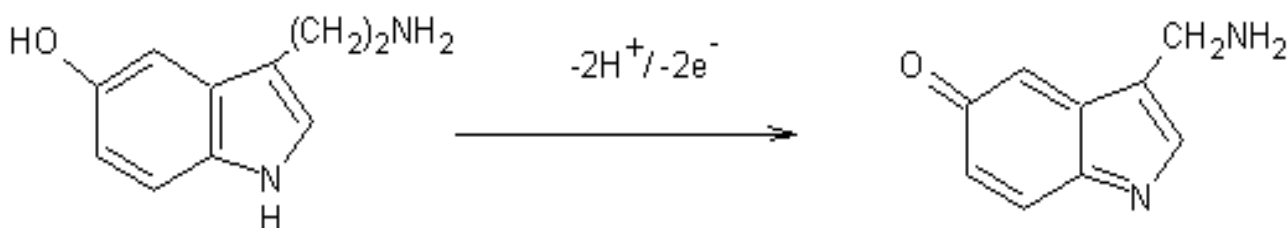
$$C_{serotonin, uzorak} (nmol / L) = \frac{S_{uzorak} \times IS_{kalibrator}}{S_{kalibrator} \times IS_{uzorak}} \times C_{kalibrator}$$

Jednadžba 1. Izračun koncentracije serotonina u uzorku pomoću metode internog standarda temeljene na visini kromatografskih vrškova.

Protok mobilne faze iznosio je 1.0 mL/min, a duljina analize 10 min. Boca s mobilnom fazom treba biti čvrsto zatvorena kako ne bi došlo do promjene retencijskog vremena analita zbog isparavanja komponenti mobilne faze. Recirkulacija mobilne faze nije se koristila. Zadane postavke ECD-a, prema priručniku proizvođača, bilo je potrebno prilagoditi kako bi se postigla potrebna osjetljivost mjernog postupka. Postavke su promijenjene više puta sve dok nije postignuta zadovoljavajuća osjetljivost (Tablica 1). Pozitivni napon na radnoj elektrodi uzrokuje oksidaciju molekule serotonina, a promjena struje koja nastaje zbog otpuštanja elektrona proporcionalna je koncentraciji serotonina u uzorku (Slika 6).

Tablica 1. Optimizacija zadanih postavki ECD-a s ciljem postizanja najveće osjetljivosti mjernog postupka.

	Zadane postavke	Testirane postavke						Konačne postavke
		50	50	50	50	50	50	
POMAK (mV)	90	50	50	50	50	50	50	90
NAPON (mV)	+450	+450	+650	+550	+450	+450	+450	+450
RASPON (nA)	20	20	5	5	5	1	1	1
FILTER (Hz)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.05	0.1	0.1



Slika 6. Prikaz reakcije oksidacije serotonina. (Adaptirano prema Kema IP, de Vries EGE, Muskiet FAJ (2)).

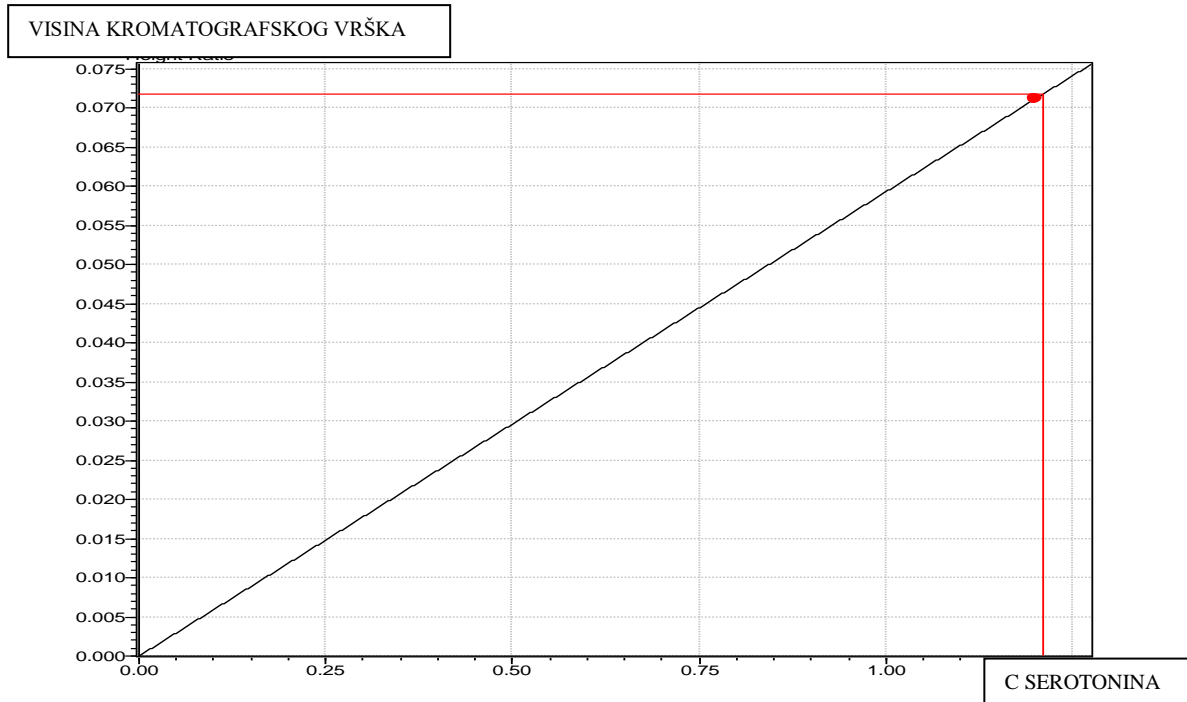
3.4. Statističke metode

Primjenjene su jednostavne metode deskriptivne statistike poput izračuna srednje vrijednosti, standardne devijacije i koeficijenta varijacije (CV) koncentracije serotonina u ispitivanim uzorcima. Iz navedenih veličina izračunan je limit kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ) ECD-a za mjerenje serotonina na temelju sljedećih kriterija primjenjenih na analizu kontrolnih materijala: CV < 20 % uz srednju vrijednost točnosti koja mora biti unutar intervala 100 ± 20 %. Srednju vrijednost, standardnu devijaciju i CV bilo je potrebno izračunati za kalibrator te za kontrolne uzorke I i II, za svaku diluciju posebno (1:100, 1:200, 1:600, 1:1000). Izračuni su provedeni primjenom računalnog programa Microsoft Office Excel 2007.

4. REZULTATI

4.1. Metoda kvantifikacije serotonina u plazmi uz primjenu IS-a

Slika 7. prikazuje ovisnost između koncentracije serotonina i visine kromatografskog vrška. Rezultati su izračunati prema općoj jednadžbi pravca: $y = ax + b$.



Slika 7. Kalibracijski pravac razrjeđenja 1:1000. Jednadžba pravca: $y = 0.0593039 x + 0$

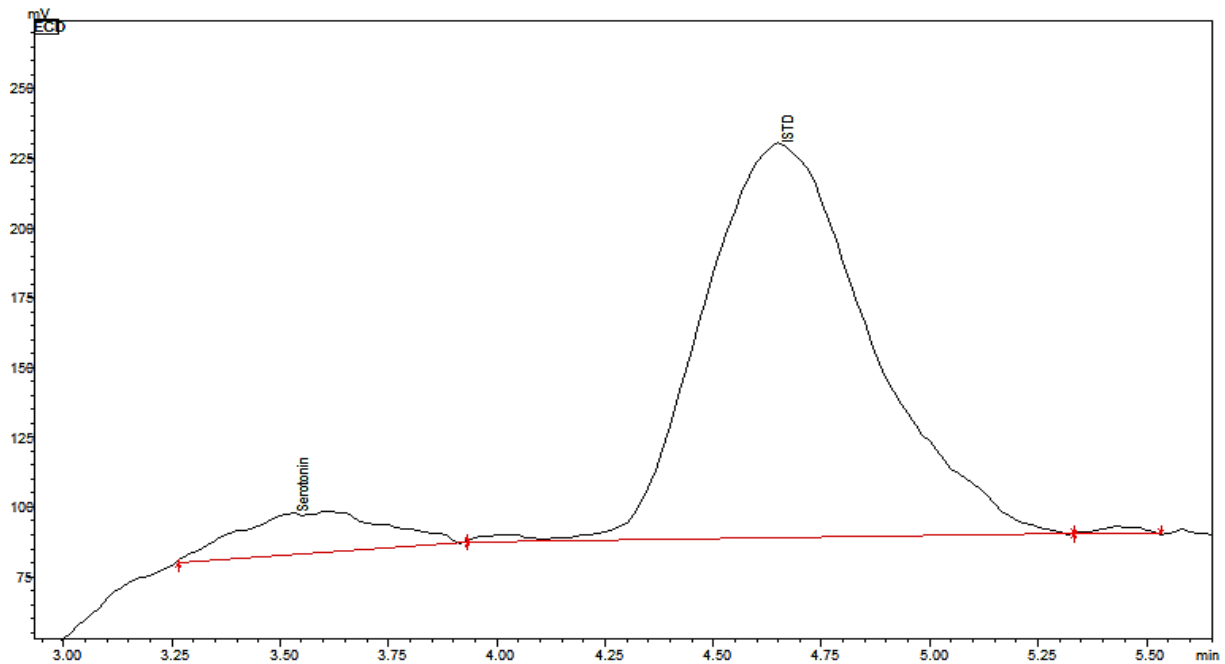
4.2. Ispitivanje osjetljivosti metode

Tablica 2. Ispitivanje osjetljivosti metode.

	Dilucija Stock otopine	C serotonina (nmol/L)	Koeficijent varijacije CV(%)	Točnost (%)
Kalibrator	1+0 (1:100)	12	4.8	-
	1+1 (1:200)	6	9.8	-
	1+5 (1:600)	2	8.3	-
	1+9 (1:1000)	1.2	15.5	-
Kontrolni uzorak 1	1+0 (1:100)	8.4	9.8	140
	1+1 (1:200)	4.1	6.6	136
	1+5 (1:600)	1.8	7.2	175.6
	1+9 (1:1000)	1.1	52.7	174.8
Kontrolni uzorak 2	1+0 (1:100)	22.3	2.2	120.8
	1+1 (1:200)	10.1	6.1	110
	1+5 (1:600)	2.5	10.5	82.1
	1+9 (1:1000)	1.7	10.7	90.3

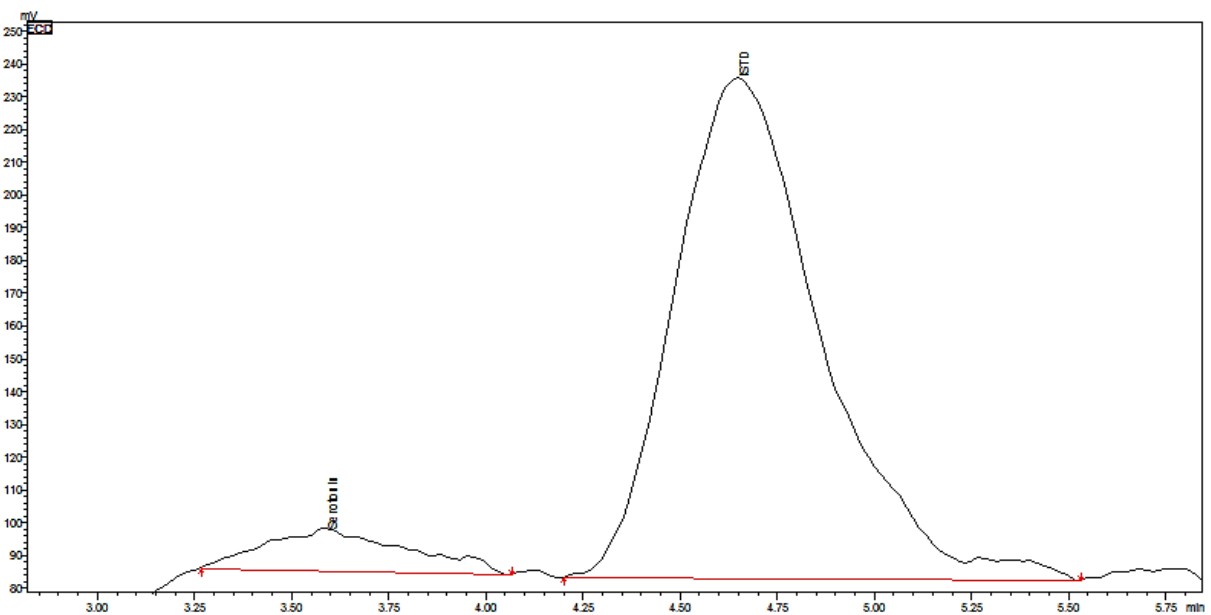
Iz Tablice 2. uočljivo je da je 1.7 nmol/L najniža izmjerena koncentracija za koju je CV manji od 20 %, a točnost je unutar zadanog kriterija 100 ± 20 %. Dobivena je pri 1:1000 razrjeđenju stock otopine kontrolnog uzorka II te tu vrijednost smatramo limitom kvantifikacije (LOQ) ECD-a za mjerenje serotonina pri postavljenim uvjetima analize (Slika 8).

REZULTATI



Slika 8. Kromatogram za kontrolni uzorak 2 pri razrjeđenju 1:1000; koncentracija serotonina iznosi 1.7 nmol/L.

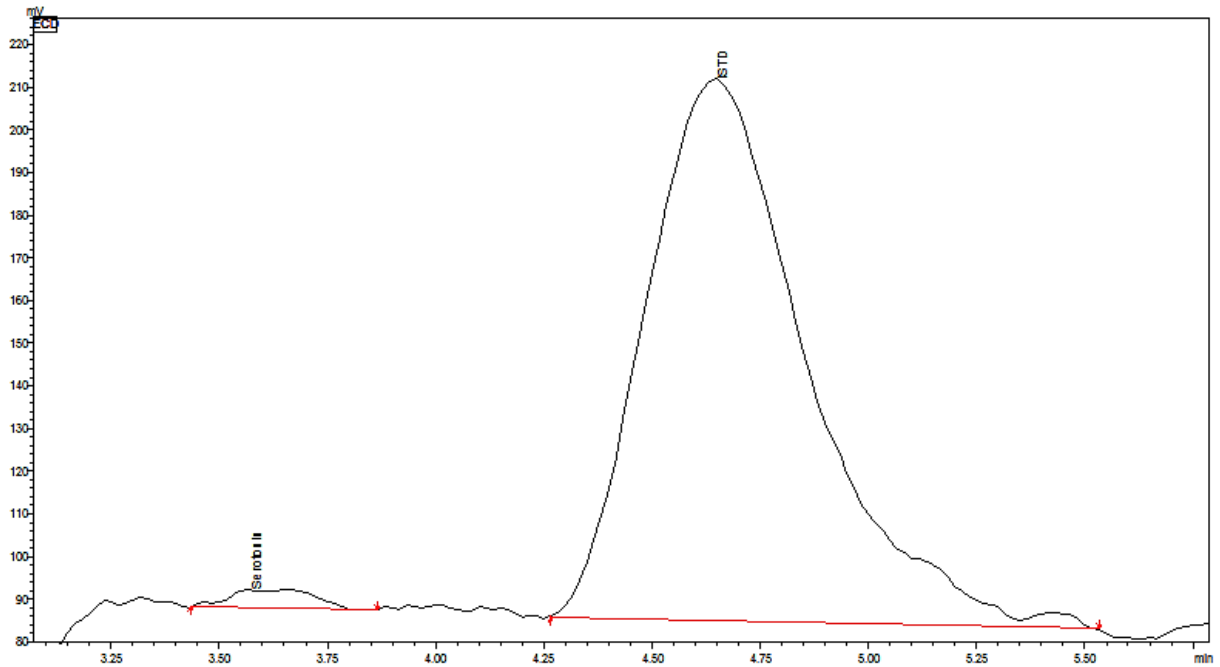
LOQ vjerojatno je i nešto niži jer je i koeficijent varijacije za kalibrator, nominalne koncentracije 1.2 nmol/L, manji od 20 % (Tablica 2., Slika 9.). Kako je riječ o kalibratoru ne postoji mogućnost izračunavanja točnosti pa ova vrijednost samo ukazuje na mogućnost da je stvarni LOQ niži od 1.7 nmol/L.



Slika 9. Kromatogram za kalibrator pri razrjeđenju 1:1000; koncentracija serotonina iznosi 1.2 nmol/L.

REZULTATI

Najniža izmjerena koncentracija od 1.1 nmol/L predstavlja grubu procjenu limita detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) (Slika 10). Budući da je CV u tom slučaju viši od 20 %, ta je vrijednost manja od limita kvantifikacije ECD-a.



Slika 10. Kromatogram za kontrolni uzorak 1 pri razrjeđenju 1:1000; koncentracija serotonina iznosi 1.1 nmol/L što predstavlja grubu procjenu LOD.

5. RASPRAVA

Bolja osjetljivost mjernog sustava za kvantifikaciju plazmatskog serotonina omogućit će unapređenje kliničkih istraživanja uloge serotonina u nastanku hipertenzije. Naime, u slučaju hipertenzije razina plazmatskog serotonina povišena je (14,15). Međutim, prijašnja istraživanja sugeriraju da bi povećanje razine serotonina u plazmi moglo biti posljedica, a ne uzrok nekih oblika hipertenzije, što je potrebno temeljitije istražiti primjenom pouzdanijih mjernih postupaka poput onog opisanog u istraživanju Barnesa i suradnika (16,17).

Početakom 80-tih godina prošlog stoljeća zabilježen je porast broja istraživanja koja uključuju kvantifikaciju plazmatskog serotonina što se pripisuje većoj dostupnosti HPLC tehnologije. Predanalitički i analitički čimbenici koji potencijalno utječu na koncentracije plazmatskog serotonina uključuju postupak venepunkcije, centrifugiranja (sila, vrijeme, temperatura), rukovanja s uzorcima, postupak pripreme uzorka za analizu te osjetljivost i specifičnost mjerne metode (13). Kako je voda čisti medij te diluiranje kalibratora i kontrolnih uzoraka I i II vodom daje nerealno niske LOQ vrijednosti za serotonin, za naše istraživanje uzorke smo diluirali s plazmom u kojoj nema serotonina. Na taj je način osiguran matriks koji je po sastavu sličan plazmi pacijenata i koji će osigurati realnije uvjete za mjerenje te točnije procjene LOQ za serotonin. Također, na temelju prijašnjih istraživanja u kojima su korišteni razni postupci izolacije plazme siromašne trombocitima, ispostavilo se da je najprikladnija temperatura centrifugiranja plazme sobna temperatura jer će niža temperatura aktivirati trombocite i uzrokovati otpuštanje serotonina iz gustih granula (13). Iako proizvođač kita navodi da je recirkulacija mobilne faze moguća, recirkulacija dovodi do porasta mjernog šuma pa u ovom istraživanju nije korištena. Kako se gotovo sav serotonin u cirkulaciji nalazi unutar trombocita, istraživanja su uglavnom provedena na plazmi bogatoj trombocitima. Mjerenje mnogo manjih, ali potencijalno važnijih vrijednosti serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima pokazalo se znatno težim i neujednačenijim što je rezultiralo velikim rasponom referentnih vrijednosti. U pokušaju da se utvrdi najbolja procjena stvarne koncentracije serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima objavljen je sistemski pregledni članak prethodno objavljenih istraživanja (13). Pretraživanjem znanstvene literature kao što su PubMed, ScienceDirect i OVID autori navedenog članka pronašli su 101 objavljeno istraživanje koje je uključivalo kvantifikaciju plazmatskog serotonina s podacima o korištenoj metodi pripreme plazme siromašne trombocitima i analitičke metode određivanja koncentracije plazmatskog serotonina. Raspon plazmatskih koncentracija serotonina u provedenim istraživanjima iznosio je od 0.6 do čak 179 nmol/L. Najviše istraživanja

provedeno je upravo HPLC metodom uz primjenu ECD-a, međutim najniže vrijednosti plazmatskog serotonina izmjerene su radioenzimatskim metodama i masenom spektrometrijom, dok je spektrofotometrija pokazala najviše vrijednosti (Tablica 3.).

Tablica 3. Srednje vrijednosti plazmatskog serotonina dobivene različitim metodama na zdravim ispitanicima. LC-MS: tekućinska kromatografija-masena spektrometrija (eng. *Liquid chromatography – mass spectrometry*)

GODINA	AUTORI	METODA	C SEROTONINA (nmol/L)
1963.	Crawford (18)	Spektrofotometrija	114
1990.	Barnes i suradnici (17)	HPLC (ECD)	2.2
1993.	Middekoop i suradnici (19)	HPLC (ECD)	2.8
1995.	Herve i suradnici (20)	Radioenzimatska metoda	0.6
2003.	Patkar i suradnici (21)	HPLC (ECD)	3.7
2006.	Mitani i suradnici (22)	HPLC (ECD)	90.8
2007.	Houghton i suradnici (23)	HPLC (FLD)	12.7
2010.	De Jong i suradnici (24)	LC-MS	4.6

Istraživanje Becka i suradnika iz 1993. godine, u kojem su temeljito opisali korištene metode pripreme plazme siromašne trombocitima te analitičke metode, smatramo posebice važnim za područje kvantifikacije plazmatskog serotonina (25). Tek mali broj rezultata prijašnjih istraživanja pokazuje koncentracije plazmatskog serotonina u zdravih ispitanika reda veličine 1 nmol/L. S obzirom na očitu prisutnost pogrešaka zbog otpuštanja trombocitnog serotonina postupkom centrifugiranja ili zbog nedovoljno osjetljivih i selektivnih analitičkih metoda, preporučeno je većinu provedenih istraživanja, s izmjerenim koncentracijama serotonina > 3 nmol/L, zanemariti.

Iz Tablice 2. Vidljivo je da % točnosti na dilucijama kontrolnog uzorka 1 izlazi iz dozvoljenih kriterija 100 ± 20 %, čak i na koncentracijama 8.4 nmol/L i 4.1 nmol/L koje bi i sa standardnim postavkama uvjeta na ECD-u trebale biti mjerljive unutar dozvoljenih kriterija za točnost. Nezadovoljavanje tih kriterija pripisujemo pogreškama u pripravi uzoraka zbog višestrukih dilucija.

Iako smo našim istraživanjem izmjerili koncentraciju serotonina od 1.7 nmol/L što je manje od 2.83 nmol/L (LOQ prema korisničkom priručniku proizvođača kita), osjetljivost metode može se još poboljšati, odnosno postoji potreba kvantifikacije serotonina u koncentracijama nižim od 1 nmol/L plazme te bi u tu svrhu, u budućim istraživanjima trebalo ispitati mogućnost primjene FLD-a. Većoj osjetljivosti moglo bi pridonijeti i bolje termostatiranje ćelije ECD-a jer prema Nernstovoj jednadžbi temperatura ćelije direktno utječe na elektrodni potencijal, odnosno što je temperatura ćelije stabilnija to će i uvjeti elektrokemijske reakcije biti stabilniji, a time će biti bolji omjer signala i šuma odnosno bit će niži LOQ.

Uzimajući u obzir ovdje prikazane rezultate te rezultate prethodnih istraživanja, može se zaključiti kako je vrlo niske vrijednosti serotonina u plazmi teško ispravno izmjeriti ukoliko priprema plazme siromašne trombocitima nije adekvatna ili osjetljivost mjerne metode nije dovoljno visoka i stoga postoji potreba za daljnjim razvojem predanalitičkih i analitičkih postupaka za određivanje koncentracije serotonina u krvnoj plazmi.

6. ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- prilagodbom postavki ECD-a spojenog na tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti povećana je osjetljivost kvantifikacije plazmatskog serotonina,
- limitom kvantifikacije (LOQ) za mjerenje plazmatskog serotonina uz primjenu HPLC-a opremljenog s ECD-om u optimalnim uvjetima smatramo koncentraciju od 1.7 nmol/L,
- za pouzdano određivanje serotonina u plazmi potrebno je dodatno povećati osjetljivost mjernog postupka za mjerenje koncentracije niže od 1 nmol/L,
- u svrhu daljnjeg povećanja osjetljivosti metode preporuča se primjeniti FLD ili naprednije termostatiranje ECD-a.

7. SAŽETAK

Uvod: Serotonin je jedan od glavnih neurotransmitera koji je uključen u regulaciju brojnih fizioloških procesa u organizmu čovjeka pa poremećaji biosinteze i otpuštanja serotonina te poremećaji receptora za serotonin mogu rezultirati pojavom različitih bolesti. Kako je više od 99 % ukupnog serotonina u cirkulaciji pohranjeno u trombocitima, mjerenje serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima u dijagnostičke svrhe pokazalo se kao problem zbog pripreme plazme kod koje često dolazi do kontaminacije trombocitnim serotoninom i zbog vrlo niskih koncentracija plazmatskog serotonina.

Cilj: Prilagodba postavki HPLC-a opremljenog ECD-om za kvantitativne analize serotonina u krvnoj plazmi u svrhu postizanja zadovoljavajuće osjetljivosti mjernog postupka u koncentracijama od 1 nmol/L plazme ili nižim.

Materijali i metode: Kako bi se optimirala osjetljivost postojeće metode, mijenjale su se postavke ECD-a dok se nije postigla zadovoljavajuća osjetljivost, a zatim su performanse takve metode testirane primjenom komercijalnih kontrolnih materijala koji su diluirani plazmom ljudskog podrijetla.

Rezultati: Svi kvantitativni rezultati dobiveni su primjenom metode internog standarda (IS). Najniža izmjerena koncentracija plazmatskog serotonina s CV-om manjim od 20 % i uz točnost unutar intervala 100 ± 20 % je 1.7 nmol/L te tu vrijednost smatramo LOQ odnosno osjetljivošću ECD-a za mjerenje serotonina pri postavljenim uvjetima.

Zaključak: Osjetljivost mjernog postupka za kvantifikaciju serotonina u plazmi povećana je prilagodbom postavki ECD-a, no za pouzdano određivanje potrebno je dodatno povećati osjetljivost mjernog postupka za mjerenje koncentracije od 1 nmol/L ili niže.

Ključne riječi: elektrokemijski detektor; optimizacija; serotonin; tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

8. SUMMARY

Optimization of the liquid chromatography procedure for the plasma serotonin determination

Introduction: Serotonin is one of the major neurotransmitters that is involved in the regulation of numerous physiological processes in the human body. Disorders of the serotonin biosynthesis and release and the serotonin receptor disorders may result in the occurrence of various diseases. As more than 99% of the total serotonin in the circulation is stored in platelets, measurement of serotonin in platelet poor plasma proved as a problem because of the preparation of plasma in which thrombocytic serotonin contamination often occurs and because of the very low plasma serotonin concentrations.

Goals: Optimization of the HPLC equipped with ECD for quantitative analysis of plasma serotonin to achieve the required sensitivity of the measurement of 1 nmol/L or lower.

Materials and methods: In order to optimize the sensitivity of existing method, the different ECD settings have been tested until satisfying sensitivity is obtained and then the performance of such a method has been assessed using commercial control materials that were diluted with human plasma.

Results: The lowest measured concentration of serotonin characterized by a CV less than 20% and by the accuracy within the interval $100 \pm 20 \%$ is 1.7 nmol/L and this value is considered as LOQ or ECD sensitivity for the plasma serotonin determinations.

Conclusion: Sensitivity of the plasma serotonin HPLC determination has been increased by optimization of the ECD settings, but for reliable determination it is necessary to improve the sensitivity even more to achieve LOQ of 1 nmol/L or lower.

Keywords: electrochemical detector; High Performance Liquid Chromatography; optimization; serotonin;

9. LITERATURA

1. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; 60:355–366.
2. Kema IP, De Vries EGE, Muskiet FAJ. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *J Chromatogr. B* 2000;747:33-48.
3. Donaldson D. Carcinoid tumors: the carcinoid syndrome and serotonin (5-HT). A brief review. *J R Soc Health* 2000;120:78.
4. Anderson GM, Cook EH Jr, Blakely RD. Serotonin rising. *N Engl J Med* 2009; 360:957-9.
5. Lesurtel M, Graf R, Aleli B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, *et al.* Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006;312:104-7.
6. Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinckel J, Bader M, *et al.* Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. *PLoS Biol* 2009;7:e1000229.
7. Nakatani Y, Sato-Suzuki I, Tsujino N, Nakasato A, Seki Y, Fumoto M, *et al.* Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain-barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur J Neurosci* 2008;27:2466–72.
8. Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook G, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med* 2006;8:1–27.
9. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992;72:165-229.
10. De Clerck F. The role of serotonin in thrombogenesis. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8:40-9.
11. Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, *et al.* Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behaviour in models sensitive to antidepressants. *PLoS ONE* 2010;3(10).
12. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signaling in the gut—functions, dysfunctions and therapeutic targets. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2013;10:473-86.
13. Brand T, Anderson GM. The measurement of platelet-poor plasma serotonin: A systematic review of prior reports and recommendations for improved analysis. *Clin Chem* 2011;57:1376-1386.

14. Vikens K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation* 1999;100:483–489.
15. Davis RP, Szasz T, Garver H, Burnett R, Tykocki NR, Watts SW. One-month serotonin infusion results in a prolonged fall in blood pressure in the deoxycorticosterone acetate (DOCA) salt hypertensive rat. *ACS Chem Neurosci*. 2013;4:141–148.
16. Ziu E, Freyaldenhoven S, Mercado CP, Ahmed BA, Preeti P, Lensing S, i sur. Down-regulation of the Serotonin Transporter in hyper-reactive platelets counteracts the pro-thrombotic effect of serotonin. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:1112–11121.
17. Barnes NM, Ge J, Jones WG, Naylor RJ, Rudd JA. Cisplatin induced emesis: preliminary results indicative of changes in plasma levels of 5-hydroxytryptamine. *Br J Cancer* 1990;62:862–4.
18. Crawford N. Plasma free serotonin (5-hydroxytryptamine). *Clin Chim Acta* 1963; 8:39–45.
19. Middelkoop CM, Dekker GA, Kraayenbrink AA, Popp-Snijders C. Platelet-poor plasma serotonin normal and preeclamptic pregnancy. *ClinChem* 1993;39:1675– 8.
20. Herve´ P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, i sur. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 1995;99:249 –54.
21. Patkar AA, Gopalakrishnan R, Naik PC, Murray HW, Vergare MJ, Marsden CA. Changes in plasma noradrenaline and serotonin levels and craving during alcohol withdrawal. *Alcohol Alcohol* 2003;38:224 –31.
22. Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Kawahara R. Plasma levels of homovanillic acid, 5-hydroxyindoleacetic acid and cortisol, and serotonin turnover in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:531–4.
23. Houghton LA, Atkinson W, Lockhart C, Whorwell PJ, Keevil B. Sigmoid-colonic motility in health and irritable bowel syndrome: a role for 5-hydroxytryptamine. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19:724 –31.
24. De Jong WH, Wilkens MH, de Vries EG, Kema IP. Automated mass spectrometric analysis of urinary and plasma serotonin. *Anal Bioanal Chem* 2010;396:2609 –16.
25. Beck O, Walle´n NH, Bröijerse´n A, Larsson PT, Hjemdahl P. On the accurate determination of serotonin in human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:260–6.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Lara Turza

Datum i mjesto rođenja:

8. travnja 1996., Našice

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola kralja Tomislava, Našice

2011. – 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku