Optimizacija tekućinsko-kromatografskog postupka za mjerenje serotonina u plazmi uz primjenu fluorescentnog detektora

Mešter, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:640555

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Medicine Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Monika Mešter

OPTIMIZACIJA TEKUĆINSKO-KROMATOGRAFSKOG POSTUPKA ZA MJERENJE SEROTONINA U PLAZMI UZ PRIMJENU FLUORESCENTNOG DETEKTORA

Završni rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Monika Mešter

OPTIMIZACIJA TEKUĆINSKO-KROMATOGRAFSKOG POSTUPKA ZA MJERENJE SEROTONINA U PLAZMI UZ PRIMJENU FLUORESCENTNOG DETEKTORA

Završni rad

Osijek, 2019.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Željko Debeljak

Rad ima 26 stranica, 2 tablice i 10 slika.

Zahvale

Iskreno zahvaljujem mentoru doc.dr.sc. Željku Debeljaku na predloženoj temi, stručnom vodstvu i savjetima tijekom izrade rada.

Također zahvaljujem mag.med.biochem Ivani Marković na pomoći, strpljenju i vremenu prilikom izrade i pisanja ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima koji su mi bili najveća podrška tijekom cijelog života i koji su neupitno vjerojali u mene i sve mi omogućili. Sve što jesam danas mogu zahvaliti vama. Hvala vam na svemu!

Hvala mom dečku na podršci, motivaciji, ljubavi i pomoći u svakom aspektu života.

SADRŽAJ

1.UVOD 1

1.1. Serotonin 1

1.2. Sinteza i metabolizam serotonina 1

1.3. Pohrana serotonina 3

1.4. HPLC 4

1.5. Mjerenje koncentracije serotonina 5

2. CILJ 7

3. MATERIJALI I METODE 8

3.1. Ustroj studije 8

3.2. Materijali 8

3.2.1. Priprema plazma diluenta 9

3.2.2. Priprema dilucija kalibratora i kontrolnih uzoraka za HPLC analizu 10

3.3. Metode 11

3.4. Statističke metode 14

4. REZULTATI 16

4.1. Metoda kvantifikacije serotonina u plazmi uz primjenu IS-a 15

4.2. Ispitivanje osjetljivosti metode 16

5. RASPRAVA 19

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*)

UVOD

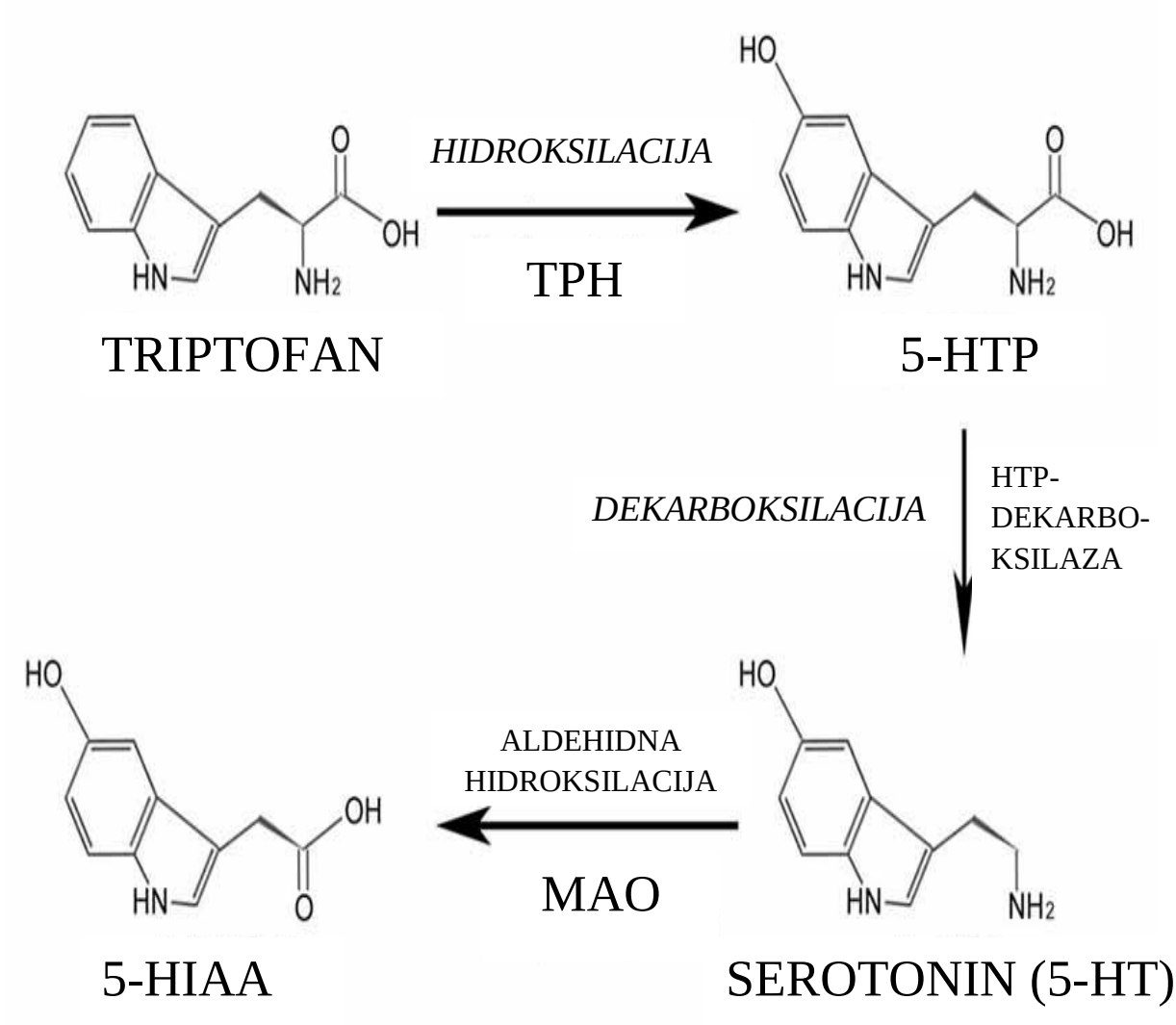
1.1. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin) je biogeni amin koji osim kod ljudi možemo naći i kod biljaka i životinja. Djeluje kao neurotransmiter i hormon. Regulira brojne normalne fiziološke procese poput peristaltike crijeva, zgrušavanja krvi, krvnog tlaka, temperature, apetita te utječe na raspoloženje i ostale kognitivne funkcije (1). Abnormalnosti u procesima sinteze, metabolizma ili pohrane serotonina mogu dovesti do nekih patofizioloških procesa poput sindroma iritabilnog crijeva, glavobolja, plućne i sistemske hipertenzije itd., a najčešći su poremećaji psihološke prirode poput anskioznosti, depresije te ozbiljne duševne bolesti kao npr. shizofrenije. Velika odstupanja u koncentraciji serotonina dosad su najviše uočena kod pacijenata sa karcinoidnim tumorom (2). U tom slučaju razina serotonina je patološki povišena te se postižu vrlo visoke vrijednosti serotonina u plazmi/serumu ili urinu (3). Nova istraživanja još uvijek donose neke nove spoznaje o utjecaju serotonina na periferna tkiva i organe što je povećalo broj određivanja u krvnoj plazmi i trombocitima te utjecalo na razvoj novih i usavršavanje postojećih metoda za određivanje serotonina. Određivanje serotonina može biti korisno u praćenju terapije serotonergičnim lijekovima odnosno lijekova koji moduliraju rad receptora za serotonin (4). Najnovija istraživanja pokazala su da serotonin utječe na regulaciju šećera u krvi, tj. regulira izlučivanje inzulina te ima ulogu u proliferaciji jetrenih stanica, razvoju mliječnih žlijezda te kostiju, itd. (5,6).

1.2. Sinteza i metabolizam serotonina

Glavni prekursor u sintezi serotonina je esencijalna aminokiselina triptofan. Sinteza se odvija u dva glavna koraka. Prvi korak je hidroksilacija triptofana koju katalizira enzim triptofan hidroksilaza (TPH) te nastaje 5-hidroksitriptofan (5-HTP). Drugi korak je dekarboksilacija 5-HTP-a uz enzim hidroksitriptofan dekarboksilaza u 5-hidroksitriptamin tj. serotonin. U ljudskom tijelu serotonin se sintetizira u dva metabolički odvojena odjeljka. Prvi odjeljak sinteze, periferni, sadržava najveći dio serotonina u tijelu (oko 95 %). Periferni serotonin se sintetizira u enterokromafinim stanicama gastrointestinalnog trakta. Drugi odjeljak sinteze, centralni, se nalazi u središnjem živčanom sustavu gdje se serotonin sintetizira unutar presinaptičkih serotonin-producirajućih neurona (7). Oba odjeljka su odvojena za serotonin nepropusnom krvno-moždanom barijerom koja propušta samo triptofan da bi se serotonin mogao sintetizirati u serotonergičnim neuronima (8). Za razgradnju

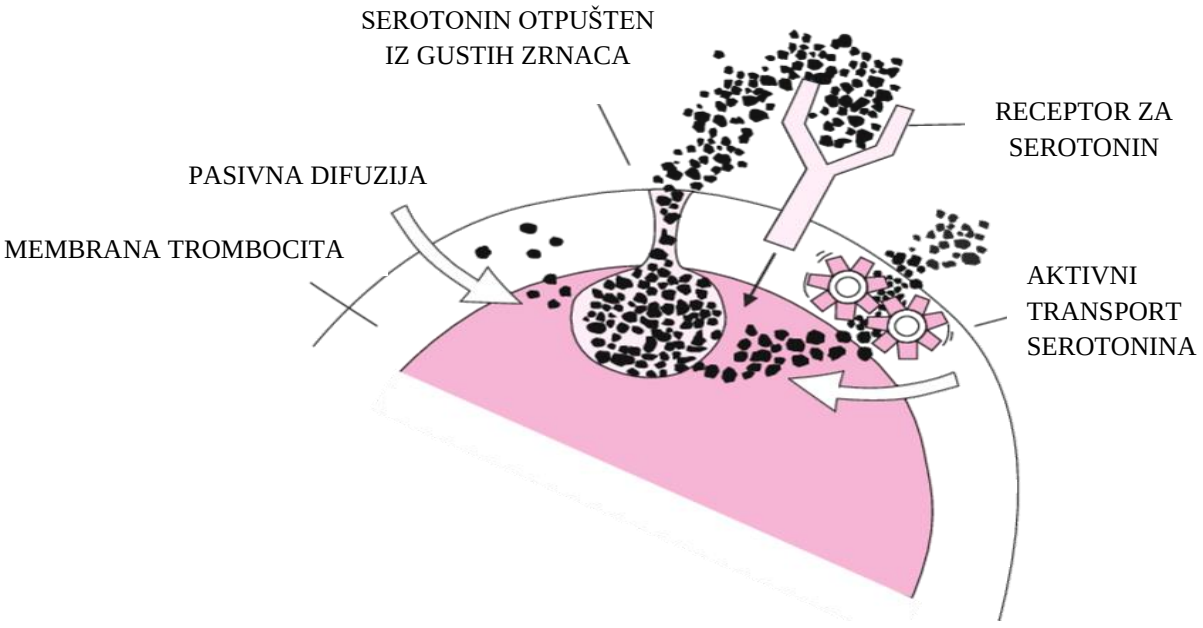
serotonina najvažniji je mitohondrijski enzim monoaminooksidaza (MAO) čijim se djelovanje razgradi 30-80 % serotonina. Konačni razgradni produkt serotonina je 5-hidroksiindol octena kiselina (5-HIAA) (7). Shematski prikaz metabolizma serotonina prikazan je na slici 1. Preostali dio se metabolizira u plućima, a 10 % uzimaju i pohranjuju trombociti. Važno je naglasiti da postoje dva izoenzima triptofan hidroksilaze – triptofan hidroksilaza 1 (TPH1) i triptofan hidroksilaza 2 (TPH2) (9).



Slika 1. Sinteza i metabolizam serotonina. Izvor: izradila autorica.

1.3. Pohrana serotonina

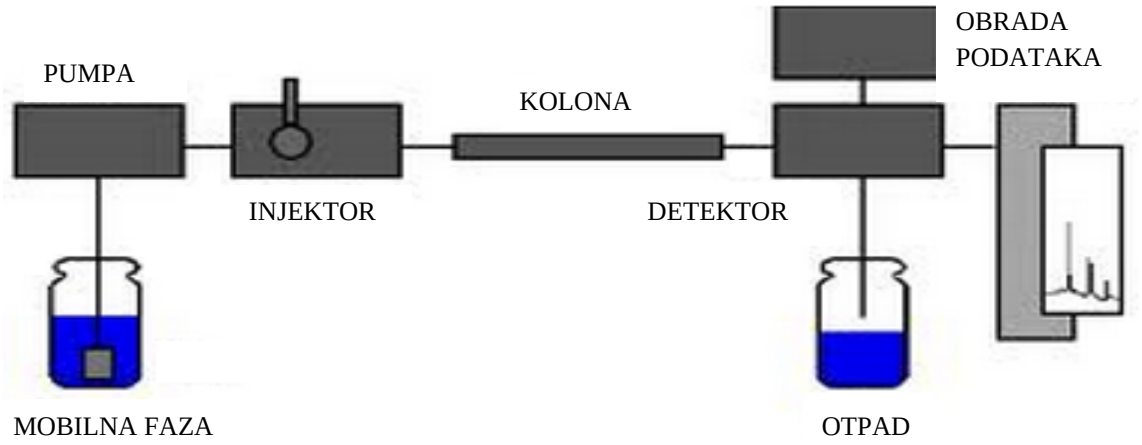
Približno 90 % ukupnog serotonina u organizmu nalazi se u enterokromafinim stanicama GI trakta gdje regulira motilitet crijeva. Nakon što se serotonin izluči u lumen crijeva ili bazolateralno veže se za receptore na ciljnim živčanim vlaknima te tako potiče peristaltiku crijeva. Od ostatka serotonina koji je bio višak, odnosno nije se vezao za receptore, jedan dio se pohranjuje ponovno u enterokromafine stanice, a dio odlazi u cirkulaciju (10). Slobodni (plazmatski) serotonin regulira srčani ritam i krvni tlak te djeluje kao bronhokonstriktor te vazokonstriktor u kardiovaskularnom sustavu (4). Kako se ne bi poremetila homeostaza organizma, tj. ukoliko nema potrebe za većom količinom serotonina u cirkulaciji od onoga koji je potreban za uobičajene fiziološke procese višak iz cirkulacije uzimaju trombociti i pohranjuju ga u trombocitnoj citoplazmi, odnosno u subcelularnim organelama tzv. gustim zrncima ili delta granulama (11). U slučaju krvarenja kada se trombociti vežu za ugrušak otpuštaju serotonin te tako pokreću zgrušavanje krvi, tj. hemostazu gdje serotonin služi kao vazokonstriktor i vazodilatator. Trombociti ne posjeduju triptofan-hidroksilazu što znači da ga ne mogu sami sintetizirati već ga iz krvi uzimaju pomoću prijenosnog proteina koji se nalazi na membrani trombocita (11). Uz serotoninski transmembranski prijenosnik trombociti sadrže i monoaminooksidazu (MAO) (12). Na slici 2. vidimo shematski prikaz transporta serotonina u trombocite i izvan trombocita.



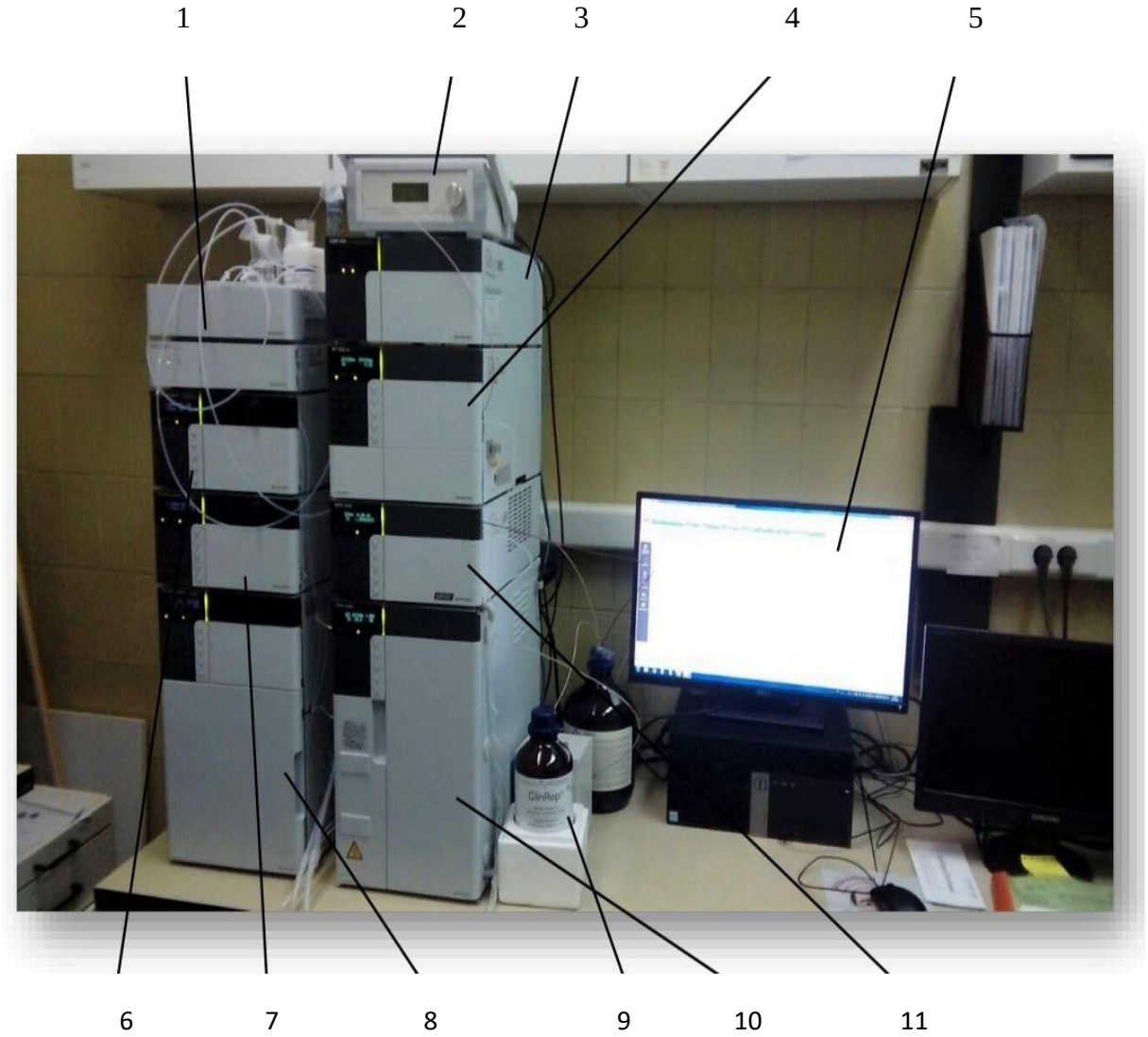
Slika 2. Shematski prikaz transporta serotonina u trombocite i izvan trombocita. Izvor: izradila autorica.

1.4. HPLC

HPLC je najšire korištena kromatografska metoda. Analitičari je koriste kako bi razdvojili organske, anorganske te biološke sastojke najkompleksnijih uzoraka (13). Metoda je izbora za mjerenje serotonina zbog visoke analitičke osjetljivosti, specifičnosti i preciznosti (2). HPLC uređaj se sastoji se injektora za unošenje uzorka, pumpe koja omogućuje protok mobilne faze kroz sustav, kolone, pećnice koja omogućuje održavanje definirane temperature analize, spremnika otapala, različitih vrsta detektora te programa za obradu dobivenih podataka (Slike 3, 4). Najčešći detektori koje se koriste u kombinaciji s HPLC-om su spektrofotometrijski, elektrokemijski, fluorescentni i spektrometri masa. Uzorci koje želimo analizirati injektiraju se u mobilnu fazu te se komponente uzorka kromatografski odvajaju na koloni, a signal analita snima se primjenom nekih od navedenih detektora. Princip rada fluorescentnog detektora (*engl. Fluorescence detector*, FLD) koji sam koristila u ovom istraživanju zasniva se na sposobnosti fluorescentnih sastojaka da emitiraju dio svjetla apsorbiranog od strane izvora ekscitacije. Takva vrsta detektora vrlo je selektivna te mjeri sposobnosti analita da fluorescira u zadanom rasponu eksitacijskih i emisijskih valnih duljina. Prije injektiranja pripremljenih uzoraka ponajprije je potrebno provjeriti je li mjerni sustav kondicioniran, odnosno dali je spreman za rad. Kada je analitički sustav kondicioniran može se provesti mjerenje. Koncentracija analita je proporcionalna visini kromatografskih vrškova što se zajedno s internim standardom koristi za mjerenje njegove koncentracije (2).



Slika 3. Shematski prikaz rada HPLC uređaja. Izvor: izradila autorica.



Slika 4. HPLC uređaj. (1- jedinica za otplinjavanje mobilne faze; 2- ECD; 3- komunikacijski modul; 4- FLD; 5- računalo; 6- pumpa A; 7- pumpa B; 8- autoinjektor; 9- mobilna faza; 10- pećnica; 11- UV detektor). Izvor: fotografirala autorica.

1.5. Mjerenje koncentracije serotonina

Kako se zna da je više od 99 % ukupnog serotonina u cirkulaciji pohranjeno u trombocitima, dosadašnja su istraživanja serotonina u cirkulaciji uglavnom provedena uz primjenu plazme bogate trombocitima što je korisno i svrsihodno ukoliko proučavamo biosintezu i pohranu tog hormona ali nije prikladan postupak za proučavanje učinka tog hormona na periferna tkiva i organe (14). Mjerenje serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima pokazalo se težim zbog niskih koncentracija serotonina i zbog pripreme plazme koja je često kontaminirana trombocitnim serotoninom uslijed procesa priprave. Tako dobiveni rezultati su dovodili do krivih zaključaka o mogućem utjecaju serotonina na

periferne organe i tkiva. I uz pravilnu pripremu, osjetljivost mjernog sustava nije dovoljno visoka za mjerenje niskih koncentracija serotonina u plazmi (14). U prošlogodišnjem istraživanju studentice Lare Turze pod nazivom "Optimizacija tekućinsko-kromatografskog postupka za mjerenje serotonina u plazmi" provedenom u KBC Osijek pokazalo se da ni optimizacija tekućinskog kromatografa opremljenog s elektrokemijskim detektorom nije dala zadovoljavajuću osjetljivost (15). Stoga je povod ovom radu postizanje veće osjetljivosti metode za određivanje koncentracije serotonina u krvnoj plazmi pri čemu će u tu svrhu, uz tekućinski kromatograf, biti primijenjen FLD.

2. CILJ

Cilj je ovog istraživanja prilagodba postavki tekućinskog kromatografa opremljenog FLD-om za kvantitativne analize serotonina u krvnoj plazmi. Smatramo da se primjenom FLD-a može postići osjetljivost od 1 nmol/L ili bolju, za razliku od primjene elektrokemijskog detektora pri čemu je postiguta osjetljivost od 1,7 nmol/L.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ustroj studije

Prije početka samog rada s uređajem pribavljen je pribor za rad i potrebni materijali. Zatim su pripremljeni reagensi i uzorci koji su bili analizirani. Optimizacija same metode započela je s postavkama propisanim od strane prozvođača komercijalnog kita za analizu serotonina u plazmi. Postavke FLD-a su se mijenjale u skladu s fizikalno-kemijskim svojstvima analita i interferirajućih tvari kao i u skladu s ograničenjima mjerne tehnologije. Postavke ostalih sastavnica tekućinskog kromatografa također su mijenjane kako bi povećali osjetljivost metode u odnosu na postavke proizvođača. Nakon promjene instrumentalnih postavki ispitivana su svojstva, prije svega osjetljivost i točnost postupka primjenom komercijalnih kontrolnih materijala te primjenom kontrolnih materijala pripremljenih u laboratoriju Odjela za kliničku kemiju, Zavod za kliničko laboratorijsku dijagnostiku, KBC Osijek.

3.2. Materijali

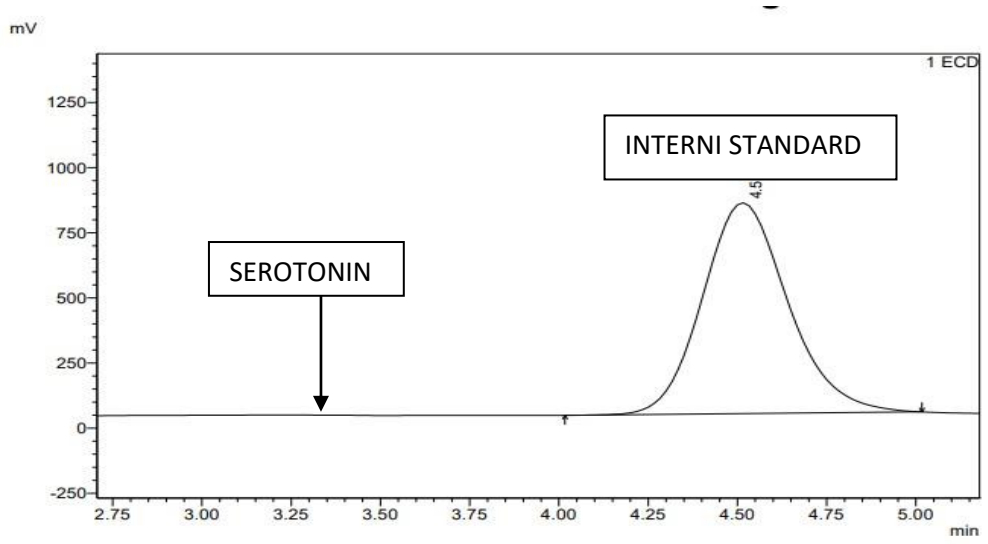
Rad u laboratoriju prije same priprave uzoraka zahtijevao je laboratorijske instrumente poput pipeta, nastavaka za pipete, centrifuge te električne mješalice. Cjelokupan pribor i komponente koje su korištene opisane su u pripadajućem priručniku za uporabu za određivanje serotonina u plazmi (ClinRep HPLC Complete Kit for Serotonin in Plasma, München, Njemačka). Jedan kompletan kit sadržava mobilnu fazu, interni standard (IS), plazma kalibrator, epruvete za pripremu uzoraka i precipitacijski reagens (P) proizvođača Recipe (München, Germany). Komponente koje se ne nalaze u sklopu kita, analitička kolona i kontrolni uzorci I i II pribavljene su posebno od istog proizvođača. Kalibratori i kontrolni uzorci navedenog proizvođača su pripravljeni iz plazme humanog podrijetla te se s njima mora postupati kao s potencijalno infektivnim materijalima iako je plazma testirana namarkere infekcija i pokazala se negativnom na: HIV 1/2, HBV i HCV antitijela, HbsAg, HIV i HCV RNA te HBV DNA. Izuzev postupaka navedenih u priručniku potrebno je bilo pripremiti dilucije kalibratora i kontrolnih uzoraka što je nužan korak za ispitivanje osjetljivosti optimiranih postupaka. U tu svrhu je bilo potrebno prethodno pripraviti plazma diluent. Za navedenu pripravu su se koristili viškovi krvi zaostali nakon obrade uzoraka redovnih pacijenata. Korištene komponente kita su bile unutar roka valjanosti navedenih na poleđini.

Za unutarnje osiguranje kvalitete u laboratoriju koristili su se kontrolni uzorci za određivanje serotonina u plazmi koji su dostupni u dvije koncentracijske razine – Recipe ClinChek Level 1 i ClinChek Level 2 (München, Njemačka). Njih je prije korištenja bilo potrebno pripremiti tako da im se dodalo 5,0 ml redestilirane vode, a potom ih se miješalo 15 min. Kada se sav liofilizat seruma otopio, tada su bili spremni za korištenje. Tako pripremljeni mogu se pohraniti na 2-8 °C te su stabilni 36 mjeseci. Za pripremu internog standarda (IS) bilo je potrebno u posudicu s liofilizatom dodati 1,0 ml vode i dobro miješati. Mobilnu fazu, precipitacijski reagens i analitičku kolonu potrebno je pohraniti na 15-30 °C, a epruvete za pripremu uzoraka treba čuvati na sobnoj temperaturi. 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. Stabilan je najmanje 5 dana ako se pohranjuje na 2-8 °C.

3.2.1. Priprema plazma diluenta

Plazma diluent je bilo potrebno pripraviti kako bi se što bolje simulirali stvarni uzorci plazme bolesnika jer su plazma diluentom iz koje je prethodno uklonjen serotonin pripravljene dilucije kalibratora i kontrolnih uzoraka I i II koji su se onda mogli analizirati na HPLC uređaju. Tako je osiguran matriks koji je po sastavu sličan plazmi pacijenta. Priprema je počela tako da se prvo prikupila puna krv s EDTA antikoagulansom a koja prethodno nije bila pohranjena u hladnjaku. Potom se krv centrifugirala 10 min na 3500 okr/min na temperaturi 25 °C. Bitno je naglasiti da se sve odvija na sobnoj temperaturi jer niska temperatura (2-8 °C) aktivira trombocite i uzrokuje otpuštanje serotonina iz gustih granula. Nakon centrifugiranja se odpipetira plazma pazeći pritom da se vrhom pipete nedodirne sloj leukocita i trombocita. Plazma iz svih pojedinačnih uzoraka krvi se skuplja u jednu epruvetu tako da dobijemo tzv. *pool* plazme. Nakon prikupljanja, plazma se pomiješa s aktivnim ugljenom (Merck) (cca 1 g na 15 mL plazme). Ugljen ima sposobnost da na sebe veže serotonin te ga tako ukloni iz plazme. Smjesa se zatim stavi u ultrazvučnu kupelj na 30 min. Nakon kupelji se smjesa centrifugira 30 min na 14000 okr/min da 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. Na kraju se plazma filtrira preko filter papira u čistu epruvetu. Dobivena plazma u kojoj nema serotonina se koristi kao matriks diluent. Plazma diluent testiran je na zaostalu prisutnost serotonina te je utvrđeno da serotonina nema (Slika 5).

Dijagram tijeka priprave plazma diluenta može se naći u radu studentice Lare Turze navedenom u literaturi (15).



Slika 5. Kromatogram za plazma diluent. Strijelicom je označeno mjesto gdje bi se serotonin trebao nalaziti. Uvjeti prema kojima je plazma diluent testiran opisani su u uputama proizvođača. Izvor: dobiveno obradom podataka računalnim softverom namijenjenim za analize na HPLC uređaju.

3.2.2. Priprema dilucija kalibratora i kontrolnih uzoraka za HPLC analizu

Prije priprave dilucija uzoraka prethodno je bilo potrebno pripremiti stock otopine kalibratora i kontrolnih uzoraka. Stock otopine su rađene tako da se 20 µL kalibratora/kontrolnog uzorka pomiješalo s 1980 µL plazma diluenta (početna dilucija 1:100). Koncentracija serotonina u diluiranom uzorku kalibratora iznosila je 12,72 nmol/L, kontrolnog uzorka I 6,02 nmol/L, a kontrolnog uzorka II 18,44 nmol/L. Potom su još pripravljene dilucije u omjeru 1:1000. Dilucije su pripravljene na način 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 20 µL diluiranog internog standarda (dilucija 1:50, tj. 40 µL IS + 1960 µL plazma diluenta). Potom slijedi miješanje 5 sekundi na električnoj mješalici, nakon čega se u svaku epruvetu doda 200 µL precipitacijskog reagensa. Zatim 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.

3.3. Metode

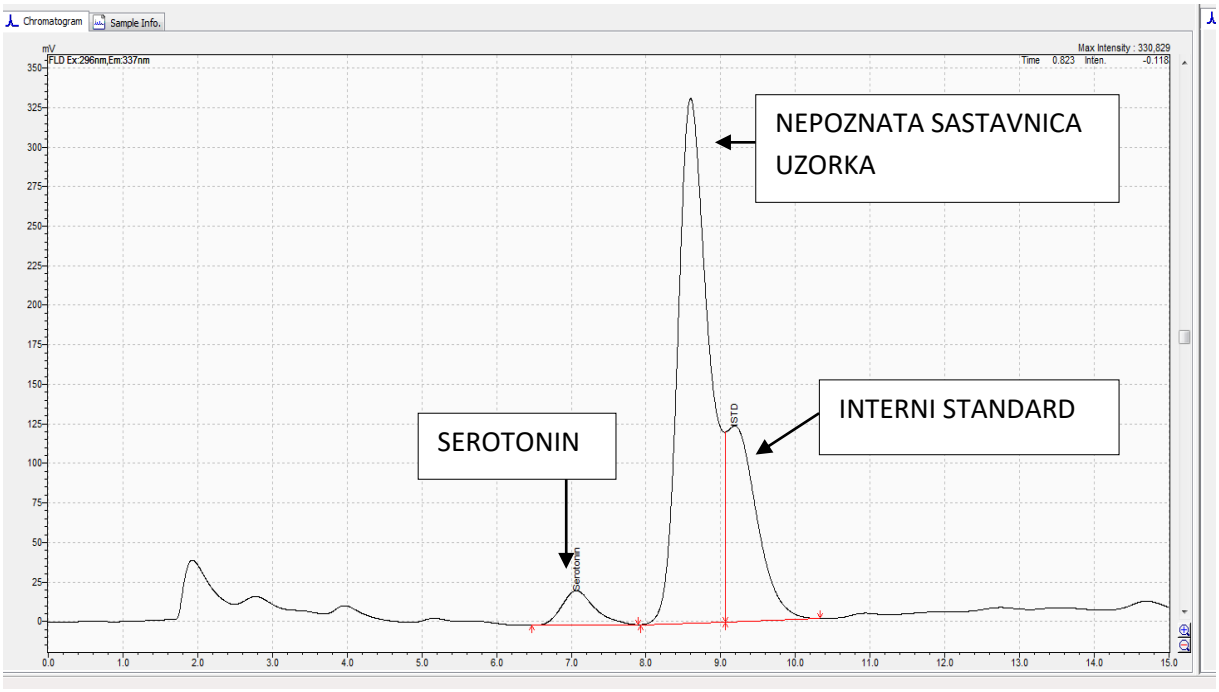
Kako bi postigli zadovoljavajuću osjetljivost metode za analizu serotonina bilo je potrebno prilagoditi metodu prema poznavajućim fluorescirajućim svojstvima serotonina i interferirajućih spojeva. HPLC se najčešće koristi zbog visoke analitičke osjetljivosti, specifičnosti i preciznosti. HPLC uređaj na kojem smo određivali serotonin iz plazme siromašne trombocitima je Shimadzu Nexera X2 (Kyoto, Japan) na koji je spojen FLD. Prije samog testiranja pripremljenih uzoraka (kalibrator, kontrolni uzorci I i II) bilo je potrebno testirati HPLC sustav, tj. napraviti probni test injektiranjem 20 µL standardne otopine. Potom su uzorci koji su prethodno pripremljeni injektirani u HPLC sustav te su komponente uzorka kromatografski odvojene na koloni, a signali analita snimljeni su FLD-om. 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 koristimo jednadžbu koja je navedena u radu "Optimizacija tekućinsko-kromatografskog postupka za mjerenje serotonina u plazmi" (15).

Postavke HPLC-a i detektora prilagođivane su kako bi se postigla potrebna osjetljivost mjernog postupka. Postavke su promijenjene više puta sve dok nije postignuta zadovoljavajuća osjetljivost. Recirkulacija mobilne faze nije se koristila. Boca s mobilnom fazom treba biti čvrsto zatvorena kako ne bi došlo do promjene retencijskog vremena analita zbog isparavanja komponenti mobilne faze. Protok mobilne faze iznosio je 0,7 mL/min, a vrijeme, odnosno duljina analize 20 minuta. Volumen injektiranja je iznosio 20 µL, a temperatura pećnice 15 °C. Konačne postavke FLD-a koje smo upotrijebili prikazane su u tablici 1.

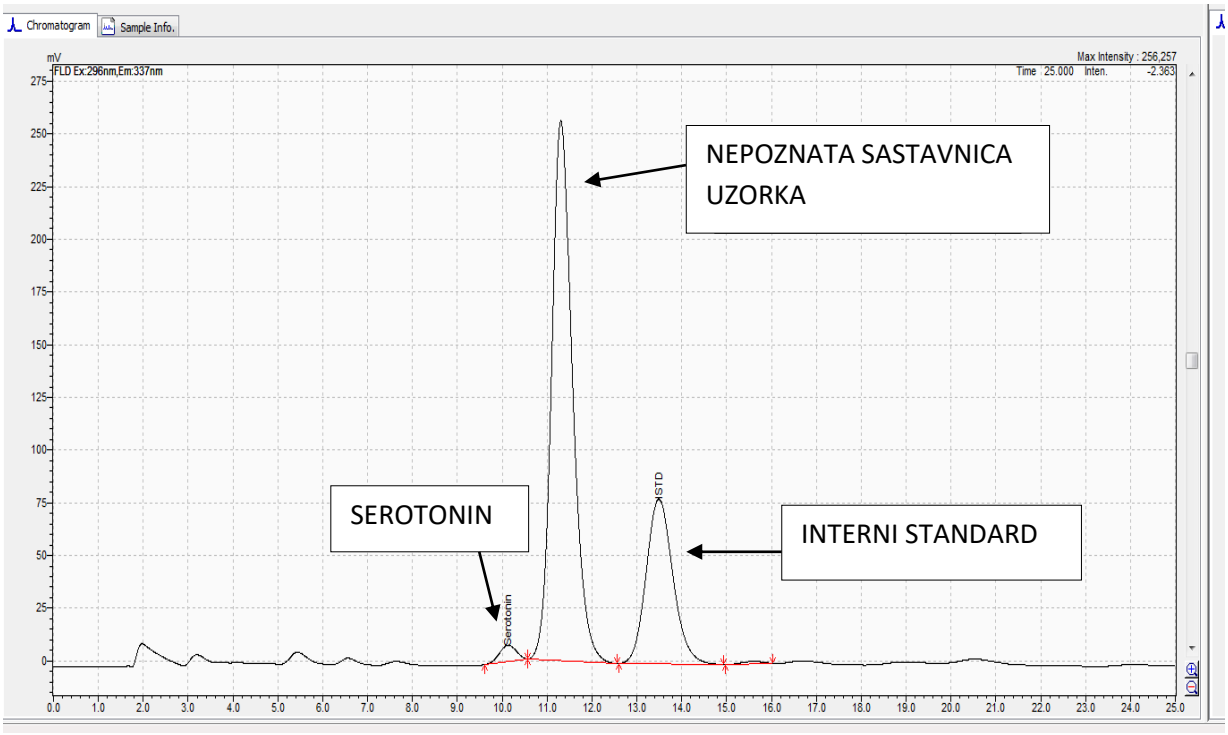
Tablica 1. Postavke FLD-a pri kojima je postignuta najveća osjetljivost mjernog postupka.

POSTAVKE FLD-A	
EKSCITACIJSKA VALNA DULJINA	296 nm
EMISIJSKA VALNA DULJINA	337 nm
VRIJEME ODZIVA DETEKTORA	10 sec
AMPLIFIKACIJA	4x
OSJETLJIVOST	visoka

Postavke HPLC uređaja su se mijenjale s ciljem da dobijemo što bolji prikaz kromatografskih vrhova serotonina i bolje odvajanje serotonina i internog standarda od ostalih sastavnica uzorka. Tako su mijenjane postavke poput duljine analize, protoka, temperature pećnice te frekvencije snimanja signala. Slike 6. i 7. tj. kromatogrami su primjer pokušaja odnosno procesa optimizacije postupka s ciljem postizanja potrebne osjetljivostimjernog postupka. Na slici 6. vidimo kako se interni standard nije potpuno odvojio od interferirajućeg vrška što je vjerojatno zbog većeg protoka i manje duljine analize, za razliku od kromatograma sa slike 7. gdje je manji protok, a veća duljina analize.



Slika 6. Kromatogram za kalibrator pri razrijeđenju 1:100 gdje je metoda također još u procesu optimizacije pa je tako ovdje protok iznosio 1,2 ml/min, duljina analize 15 min, temperatura pećnice 25 °C te frekvencija snimanja signala 5 Hz. Izvor: dobiveno obradom podataka računalnim softverom namijenjenim za analize na HPLC uređaju.



Slika 7. Kromatogram za kalibrator pri razrijeđenju 1:200 gdje je metoda još u procesu optimizacije pa je tako ovdje protok iznosio 0,7 ml/min, duljina analize 25 min, temperatura pećnice 15 °C te frekvencija snimanja signala 2,5 Hz. Izvor: dobiveno obradom podataka računalnim softverom namijenjenim za analize na HPLC uređaju.

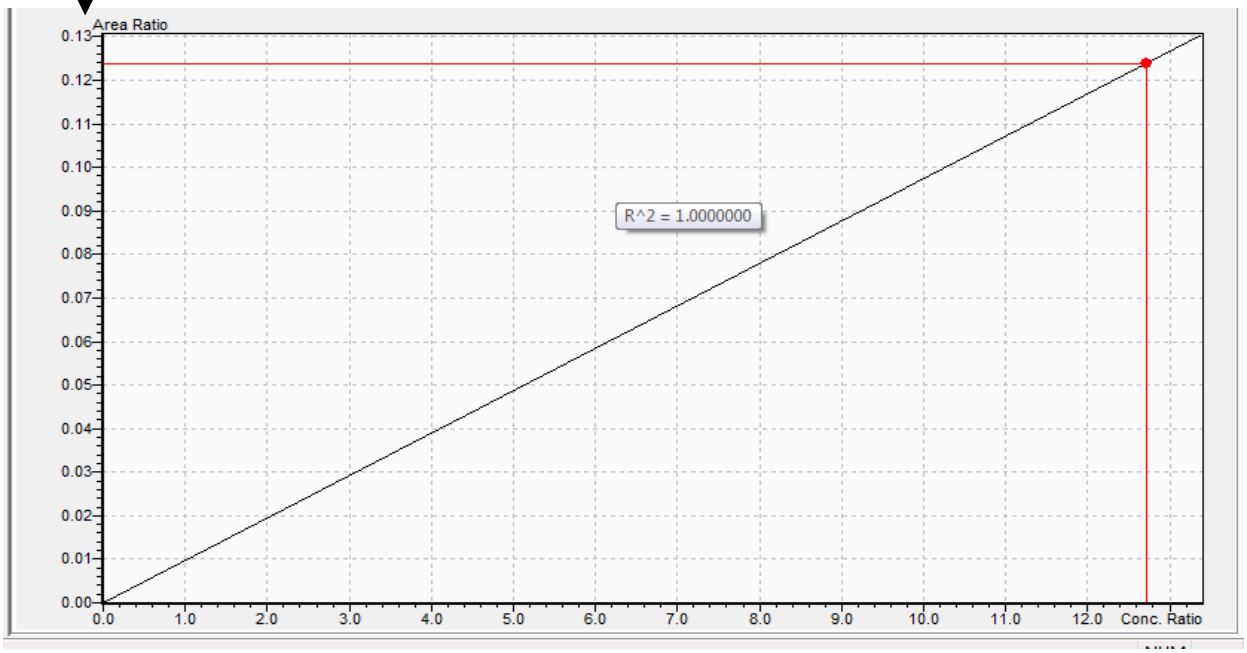
3.4. Statističke metode

Statističke metode koje su se primijenile za obradu dobivenih rezultata mjerenja koncentracije serotonina u diluiranim uzorcima su jednostavne deskriptivne statističke metode poput izračuna aritmetičke sredine, standardne devijacije i koeficijenta varijacije (CV). Iz navedenih veličina izračunat je limit kvantifikacije: najniža koncentracija serotonina u plazmi za koju je koeficijent varijacije manji od 20 % a točnost mjerenja unutar raspona 80 - 120 % je proglašen limitom kvantifikacije. Aritmetičku sredinu, standardnu devijaciju i CV bilo je potrebno izračunati za kalibrator te za kontrolne uzorke I i II, za svaku diluciju posebno (1:100 i 1:1000). Izračuni su se proveli primjenom računalnog programa Excel 2007 proizvođača Microsoft (Redmond, USA).

4. REZULTATI

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

OMJER VISINA KROMATOGRAFSKIH VRŠAKA
SEROTONINA I INTERNOG STANDARDA



KONCENTRACIJA SEROTONINA

Slika 8. Kalibracijski pravac razrjeđenja 1:100. Jednadžba pravca: y = 0.00974305x + 0, gdje nam x označuje omjer visina kromatografskih vršaka, a y koncetraciju serotonina.

Izvor: dobiveno obradom podataka računalnim softverom namijenjenim za analize na HPLC uređaju.

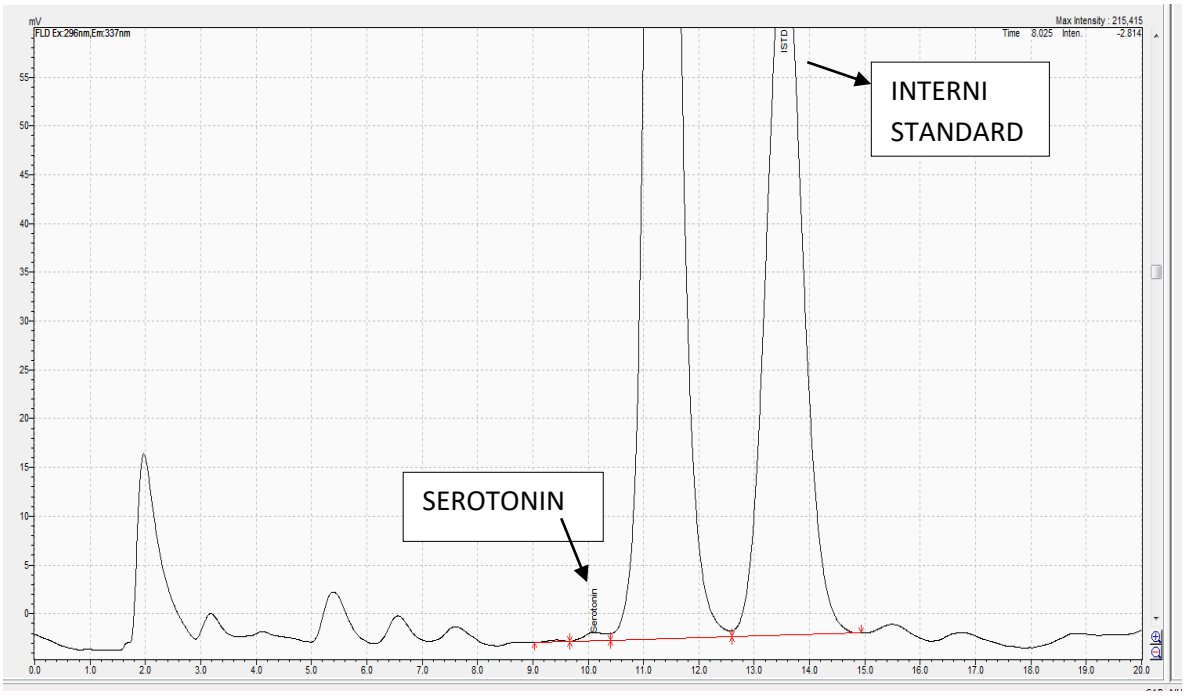
Ova slika nam tako prikazuje ovisnost između koncentracije serotonina i omjer visina kromatografskih vršaka serotonina i internog standarda.

4.2. Ispitivanje osjetljivosti metode

Tablica 2. Ispitivanje osjetljivosti metode

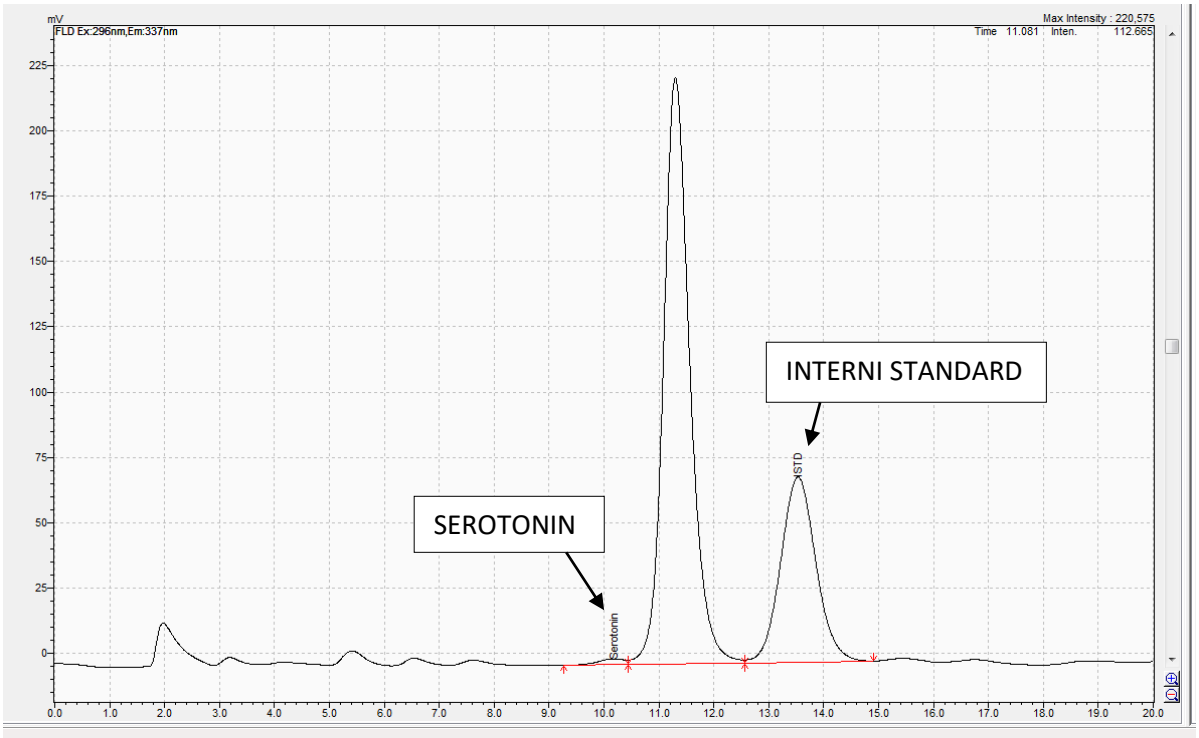
	DILUCIJA STOCK OTOPINE	C SEROTONINA (nmol/L)	KOEFICIJENT VARIJACIJE (%)	ARITMETIČKA SREDINA (%)
KALIBRATOR	1+0 (1:100)	12,7	1,64	-
	1+9 (1:1000)	1,3	7,05	-
KONTROLNI UZORAK 1	1+0 (1:100)	6,5	1,73	108,5
	1+9 (1:1000)	0,6	13,44	99,9
KONTROLNI UZORAK 2	1+0 (1:100)	19,7	1,24	106,7
	1+9 (1:1000)	2	11,06	107,4

Iz Tablice 2. možemo uočiti da je 0,6 nmol/L najniža izmjerena koncentracija za koju je CV manji od 20 %, a točnost je unutar zadanog kriterija 100 ± 20 %. Ta koncentracija je dobivena pri 1:1000 razrjeđenju stock otopine kontrolnog uzorka I te tu vrijednost smatramo limitom kvantifikacije (LOQ) FLD-a za mjerenje serotonina pri postavljenim uvjetima analize (slika 9).



Slika 9. Kromatogram za kontrolni uzorak I pri razrjeđenju 1:1000; koncentracija serotonina iznosi 0,6 nmol/L. Izvor: dobiveno obradom podataka računalnim softverom namijenjenim za analize na HPLC uređaju.

Koeficijent varijacije za kalibrator, koncentracije 1,3 nmol/L također je manji od 20 % (Tablica 2., Slika 10.). Ovdje je riječ o kalibratoru stoga ne postoji mogućnost izračunavanja točnosti.



Slika 10. Kromatogram za kalibrator pri razrijeđenju 1:1000; koncentracija serotonina iznosi 1,3 nmol/L. Izvor: dobiveno obradom podataka računalnim softverom namijenjenim za analize na HPLC uređaju.

Kako je naša najniža izmjerena koncentracija od 0,6 nmol/L za koju je CV manji od 20 %, a točnost je unutar zadanog kriterija 100 ± 20 % ona ujedno predstavlja i grubu procjenu limita detekcije (*eng. limit od detection*, LOD).

Postoji mogućnost da je LOQ još niži od 0,6 nmol/L, ali da bi to mogli potvrditi, potrebno bi bilo pripremiti još veća razrijeđenja kalibratora i kontrolnih uzoraka.

5. RASPRAVA

Kako su sva istraživanja utjecaja serotonina na periferna tkiva i organe uglavnom provedena na plazmi bogatoj trombocitima jer se gotovo sav serotonin u krvi nalazi unutar trombocita, bilo je potrebno naposljetku utvrditi stvarne koncentracije serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima. Tim povodom objavljen je sustavni pregledni članak prethodno objavljenih istraživanja (14). Pretraživajući znanstvene baze podataka 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. Mjerenje manjih, ali nekad važnijih vrijednosti serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima pokazalo se znatno težim što je rezultiralo velikim rasponom referentnih vrijednosti. U provedenim istraživanjima raspon plazmatskih koncentracija serotonina iznosio je od 0,6 do čak 179 nmol/L. 80-tih godina prošlog stoljeća zahvaljujući sve većoj dostupnosti HPLC tehnologije zabilježen je porast broja istraživanja koja uključuju određivanje plazmatskog serotonina. Osim problema kod odabira najprikladnije metode za određivanje koncentracije serotonina, pokazalo se da postoje još neki čimbenici koji utječu na koncentracije plazmatskog serotonina poput predanalitičkih koji uključuju postupak venepunkcije, rukovanja s uzorcima, postupak pripreme uzorka za analizu i analitičkih koji uključuju centrifugiranje (sila, vrijeme, temperatura) te osjetljivost i specifičnost mjerne metode (14). Još jedan problem, na temelju prijašnjih istraživanja, bio je taj da se pokazalo da niža temperatura aktivira trombocite i uzrokuje otpuštanje serotonina iz gustih granula. Danas se zna da je naprikladnije centrifugirati plazmu na sobnoj temperaturi (14). Nama je u našem istraživanju bilo bitno da osiguramo matriks koji je sličan sastavu pacijenta te smo stoga uzorke diluirali plazma diluentom jer kako se u prijašnjim istraživanjima ispostavilo, voda daje jako niske vrijednostu LOQ te stoga nije pogodan medij za analizu. Za područje kvantifikacije plazmatskog serotonina pokazalo se važnim istraživanje Becka iz 1993. gdje su prvi put temeljito opisane metode pripreme plazme siromašne trombocitima (16). Najviše istraživanja provedeno je HPLC metodom uz primjenu ECD-a, ali najniže vrijednosti plazmatskog serotonina izmjerene su radioenzimatskim metodama i masenom spektrometrijom, dok je spektrofotometrija pokazala najviše vrijednosti.

U prethodnim istraživanjima vjerojatno najveći problem je bio kada se prilikom centrifugiranja otpuštao trombocitni serotonin što je dovelo do lažno povišenih vrijednosti

serotonina te je stoga jako mali broj istraživanja dobio rezultate koji prikazuju koncentraciju veličine 1 nmol/L ili manje u zdravih ispitanika. Našim smo istraživanjem postigli LOQ koji je manji od 0,6 nmol/L čime je ostvaren cilj ovog istraživanja, iako se možda može postići još veća osjetljivost daljnim optimiziranjem postavki HPLC-a i FLD-a. Mjerenje serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima može biti važno kod ishemičnih i koronarnih bolesti srca te hipertenzije gdje se očekuje da je serotonin povišen. Važno je mjerenje plazmatskog serotonina i u trudnoći gdje je u slučaju preeklampsije, on povišen (17-20). Najnovija istraživanja nam kazuju da u uporabu dolaze neke nove metode i postupci pa je tako dokazano da se s novim uređajima poput UPLC/MS/MS (ultra performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry) i automatiziranim masenim spektrometrijskim analizatorom može postići još bolja analitička specifičnost i osjetljivost (21-22). Gledajući ovdje prikazane rezultate te rezultate prethodnih istraživanja, možemo utvrditi 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 FLD-a spojenog na tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti povećana je osjetljivost kvantifikacije plazmatskog serotonina,
- postignut je cilj ovog rada jer je dobiven zadovoljavajući LOQ,
- limitom kvantifikacije (LOQ) za mjerenje plazmatskog serotonina uz primjenu HPLC-a opremljenog s FLD-om u optimalnim uvjetima smatramo koncentraciju od 0,6 nmol/L,
- metoda se vjerojatno još može unaprijediti daljnjim podešavanjem postavki HPLC-a i FLD-a s ciljem postizanja još veće osjetljivosti

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj je ovog istraživanja prilagodba postavki tekućinskog kromatografa opremljenog fluorescentnim detektorom za kvantitativne analize serotonina u krvnoj plazmi. Očekujemo da se primjenom FLD-a može postići osjetljivost od 1 nmol/L ili bolja.

Nacrt studije: Kako bi povećali osjetljivost metode u odnosu na postavke proizvođača, postavke fluorescentnog detektora te ostalih sastavnica tekućinskog kromatografa su se mijenjale u skladu s fizikalno-kemijskim svojstvima analita i interferirajućih tvari kao i u skladu s ograničenjima mjerne tehnologije. Nakon promjene instrumentalnih postavki ispitivana su svojstva, prije svega osjetljivost postupka, primjenom komercijalnih kontrolnih materijala te primjenom kontrolnih materijala pripremljenih u laboratoriju Odjela za kliničku kemiju, KBC Osijek.

Materijali i metode: Za potrebe istraživanja koristili su se komercijalno dostupni kalibratori i kontrolni uzorci koji su diluirani plazmom humanog podrijetla. Kako bi postigli odgovarajuću osjetljivost postojeće metode, mijenjale su se postavke FLD-a i HPLC-a. Svi kvantitativni rezultati dobiveni su primjenom metode internog standarda (IS).

Rezultati: Najniža izmjerena koncentracija plazmatskog serotonina s CV-om manjim od 20 % i uz točnost unutar intervala 100 ± 20 % je 0,6 nmol/L te tu vrijednost smatramo LOQ odnosno osjetljivošću FLD-a za mjerenje serotonina pri postavljenim uvjetima.

Zaključak: Osjetljivost mjernog postupka za kvantifikaciju serotonina u plazmi povećana je optimizacijom postavki FLD-a.

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

8. SUMMARY

Optimization of the liquid chromatography procedure for plasma serotonin determination using the fluorescence detector

Objectives: The main goal of this study is to adapt the settings of a liquid chromatography equipped with a fluorescence detector for quantitative analysis of plasma serotonin. The author believes that using FLD could achieve a sensitivity of 1 nmol/L or higher.

Study design: In order to increase the sensitivity of the method in regard to the manufacturer settings, the settings of the fluorescence detector and other components of the liquid chromatography are modified in accordance with the physicochemical properties of the analytes and interfering substances and also in accordance with the limitations of measurement technology. After changing the instrumental settings, the properties, primarily the sensitivity of the procedure, were tested using commercial control materials and control materials that were prepared in the laboratory of the Department of Clinical Chemistry, KBC Osijek.

Materials and methods: For the purposes of this study, commercially available calibrators and control samples diluted with human origin plasma were used. In order to achieve adequate sensitivity of the existing method, the settings of FLD and HPLC were changed. All quantitative results are obtained by the application of internal standard (IS) methods.

Results: The lowest measured serotonin concentration is 0,6nmol/L, where CV is less than 20 % and the accuracy within the interval 100 ± 20 %. This value is considered as LOQ or FLD sensitivity for the plasma serotonin determinations.

Conclusion: The sensitivity of the measurement procedure for plasma serotonin quantification was increased by optimization of FLD settings.

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

9. LITERATURA

1. Mohammad-Zadeh LF, Moses L, Gwaltney-Brant SM. Serotonin: a review.

J Vet Pharmacol Ther. 2008;31(3):187-99.

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 rewiev. J R Soc Health. 2000; 120:78.

4. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expand biology of serotonin. Annu Rev Med. 2009; 60:355–366.

5. Paulmann N, Grohmann M, Voigt JP, Bert B, Vowinckel J, Bader M, i sur. Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic beta-cells by protein serotonylation. PloS Biol. 2009,7:e1000229.

6. Lesurtel M, Graf R, Aleli B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, i sur. Plateled-derived serotonin mediates liver regeneration. Science. 2006; 312:104-7.

7. Muck-Šeler D, Pivac N. Serotonin. Periodicum biologorum [Internet]. 2011 [pristupljeno 02.09.2019.];113(1):29-41. Dostupno na: https://hrcak.srce.hr/67234.

8. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. Physiol Rev. 1992; 72:165-229.

9. 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.

10. Mawe GM, Hoffman JM. Serotonin signaling in the gut-functions, dysfunctions and therapeutic targets. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013;10:473-86

11. De Clerck F. The role of serotonin in thrombogenesis. Clin Physiol Biochem. 1990; 8:40-9.

12. Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, i sur. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behaviour in models sensitive to antidepressants. PloS ONE. 2010; 3(10).

13. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. Osnove analitičke kemije. 6. izd., 1. hrvatsko izdanje. Zagreb:Školska knjiga;1999. str. 645-647.

14. 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.

15. Turza L. Optimizacija tekućinsko-kromatografskog postupka za mjerenje serotonina u plazmi [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2018 [pristupljeno 02.09.2019.] Dostupno na: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:066052.

16. 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.

17. Vikens K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. Circulation. 1999;100:483–489.

18. Hirowatari Y, Hara K, Kamihata H, Iwasaka T, Takahashi H. High-performance liquid chromatographic method with column-switching and post-column reaction for determination of serotonin levels in platelet-poor plasma. Clin Biochem. 2004;37:191-7.

19. 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.

20. Middelkoop CM, Dekker GA, Kraayenbrink AA, Popp-Snijders C. Platelet-poor plasma serotoninin normal and preeclamptic pregnancy. Clin Chem. 1993;39:1675– 8.

21. 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.

22. Wang H, Walaszczyk EJ, Li K, Chung-Davidson YW, Li W. High-performance liquid chromatography with fluorescence detection and ultra-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry method for the determination of indoleamine neurotransmitters and their metabolites in sea lamprey plasma. Anal Chim Acta. 2012;721:147-53.

10. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Monika Mešter

Datum i mjesto rođenja: 31. ožujka 1996., Našice

Obrazovanje:

2003. – 2011. Osnovna škola Josipa Jurja Strossmayera, Đurđenovac

2011. – 2015. Opća gimnazija, Srednja škola Isidora Kršnjavog, Našice

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