

# Upotreba HPLC metode u analizama mozgova guštera

---

**Bogner, Ana-Marija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:470317>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

UPOTREBA HPLC METODE U ANALIZAMA MOZGOVA  
GUŠTERA

APPLICATION OF HPLC IN LIZARD BRAIN ANALYSIS

Seminarski rad

Ana-Marija Bogner  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Zagreb, 2020.

## Sadržaj

1. Uvod.....	2
2. Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja.....	3
2.1. Princip rada HPLC sustava .....	3
2.2. Dijelovi sustava.....	4
3. Kvalitativna i kvantitativna analiza podataka .....	5
3.1. Kvalitativna analiza .....	5
3.2. Kvantitativna analiza.....	5
4. Mozak guštera i neurotransmiteri .....	7
4.1. Katekolamini.....	8
4.1.1. Dopamin.....	8
4.1.2. Noradrenalin i adrenalin.....	9
4.2. Serotonin .....	10
5. Analize neurotransmitera različitim izvedbama HPLC-a .....	12
5.1. HPLC/ECD .....	12
5.2. HPLC/MS .....	13
5.3. HPLC/FLD.....	13
5.4. HPLC/UV .....	14
6. Primjene HPLC metode u analizi mozgova guštera .....	15
7. Sažetak .....	16
8. Summary .....	17
9. Izvori .....	18

## 1. Uvod

Metoda tekućinske kromatografije visoke moći razlučivanja (HPLC) moderni je oblik tekućinske kromatografije koji koristi stupce s malim česticama (tj. kolona; stacionarna faza) kroz koje se mobilna faza upumpava pod visokim pritiskom. Prolazak uzorka dodanog u mobilnu fazu kroz kolonu pod visokim pritiskom omogućava njegovo razdvajanje na sastavnice. HPLC je raznovrsna analitička tehnologija koje ima široku upotrebu u analizama farmaceutika, biomolekula, polimera i raznih organskih i ionskih spojeva (Dong 2006). Koristi se za njihovo pročišćavanje, identifikaciju, analizu i kvantifikaciju (Pratap i sur. 2016). Postoji više načina razdvajanja HPLC metodom, a četiri najvažnije su kromatografija normalne faze, kromatografija obrnute faze, ionsko-izmjenjivačka kromatografija i kromatografija isključenjem (Dong 2006). Prednosti HPLC metode su brza i precizna kvantitativna analiza, automatiziranost, visoko osjetljiva detekcija, oporavak kvantitativnih uzoraka i mogućnost analize raznih uzoraka (Dong 2006). Jedna vrsta uzoraka koji se mogu koristiti su i uzorci tkiva mozga u kojima se može kvantificirati količina neurotransmitera. Neurotransmiteri su signalne molekule koje igraju važnu ulogu u komunikaciji središnjeg živčanog sustava (Kim i sur, 2014). Kako bi znali pravilno upotrijebiti HPLC potrebno je prvo se upoznati s osnovama HPLC sustava te s uzorcima koje analiziramo. Potrebno je znati uloge i karakteristike ispitivanih analita poput neurotransmitera kako bi se uvjeti izvedbe HPLC-a mogli prilagoditi te kako bi se podaci mogli protumačiti.

## 2. Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja

Kromatografija obuhvaća širok raspon sustava i tehnika. Ono što je zajedničko svima je upotreba stacionarne i mobilne faze. Komponente smjese tokom mobilne faze prolaze kroz stacionarnu fazu i razdvajanje se temelji na razlikama u stopama migracije među komponentama mobilne faze. Kromatografske metode obuhvaćaju dva osnovna tipa, kromatografiju na stupcu u kojoj se stacionarna faza nalazi unutar uske cijevi dok mobilna faza prolazi kroz cijev zbog pritiska ili gravitacije te tankoslojnu kromatografiju u kojoj se stacionarna faza nalazi na ploči ili u porama papira dok mobilna faza prolazi kroz stacionarnu fazu kapilarno ili pod utjecajem gravitacije. Kromatografija na stupcu je jedna od najčešće upotrebljivanih metoda. Tipovi kromatografije na stupcu obuhvaćaju plinsku kromatografiju (GC), tekućinsku kromatografiju (LC) i kromatografiju superkričnim fluidom (SFC) (Skoog i sur. 2014). Tekućinska kromatografija je tehnika razdvajanja provedena u tekućoj fazi. Uzorak se razdvaja na analite distribucijom između mobilne i stacionarne faze (Dong 2006). HPLC predstavlja modernu kulminaciju razvoja tekućinske kromatografije (Snyder i sur 2009).

### 2.1. Princip rada HPLC sustava

Osnovni princip rada HPLC metode obuhvaća protjecanje tekuće mobilne faze koja sadrži uzorak pod visokim pritiskom kroz stupac napunjen odgovarajućim matriksom. Odvajanje je postignuto diferencijalnom interakcijom molekula s matriksom u stupcu i molekule se razdvajaju na temelju vremena koje im je potrebno za prolazak kroz stupac.

Kromatografija normalne faze temelji se na apsorpciji/ desorpciji analita na polarnu stacionarnu fazu. Kao stacionarna faza najčešće se koriste silikagel ili aluminijev oksid. Polarni analiti sporo prolaze kroz kolonu zbog snažnih interakcija sa silanolnim skupinama (-Si-OH). Za mobilnu fazu se često koristi nepolaro otapalo poput heksanola. U kromatografiji normalne faze nepolarni analiti prvi eluiraju (Dong 2006).

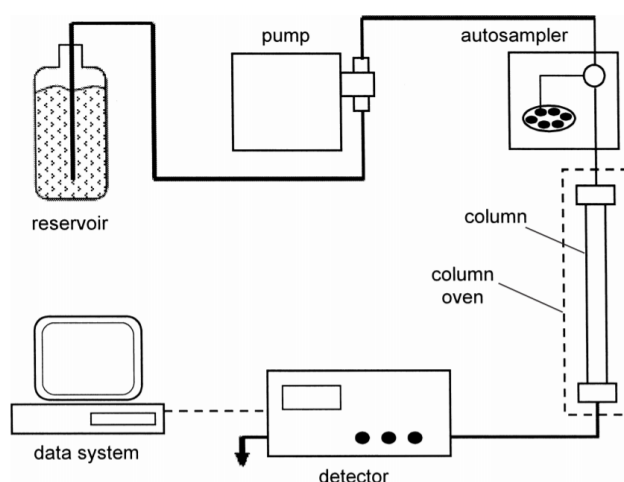
Kromatografija obrnute faze se temelji na particijskim koeficijentima analita između polarne mobilne i nepolarne (hidrofobne) stacionarne faze. Kao mobilna faza često se koristi smjesa metanola ili acetonitrila s vodom. Polarni analiti prvi eluiraju dok nepolarni zaostaju u koloni zbog jačih interakcija s hidrofobnim grupama vezanim na silikagel (čvrstu potporu) (Dong 2006).

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija se temelji na izmjeni ionskih analita s protu-ionima ionskih skupina dodanih na silikagel ili sintetski polimer koji čini matriks kolone. Ako su vezane anionske skupine kolone su kationsko-izmjenjivačke dok su anionsko-izmjenjivačke

ako su vezane kationske skupine. Uobičajena upotreba je pri analizi aminokiselina, proteina, peptida i polinukleotida (Dong 2006).

## 2.2. Dijelovi sustava

Osnovne komponente HPLC sustava obuhvaćaju spremnik s mobilnom fazom, crpka, sustav za nanošenje uzorka (injektor), kolona, kućište kolone, detektor i sustav za analizu podataka (Sl. 1).



**Slika 1** Dijagram HPLC sustava preuzeto s Snyder i sur., 2009.

Crpka kontrolira stopu protoka mobilne faze te stvara pritisak dostatan za prolazak mobilne faze kroz kolonu (Snyder i sur. 2009). Preduvjeti crpke su: mogućnost stvaranja pritiska do 6000 psi (lb/in<sup>2</sup>), izlaz tekućine bez pulsiranja, stvaranje protoka od 0,1-10 ml/min, reproducibilnost protoka od 0,5% ili bolja i otpornost na koroziju pri korištenju različitih otapala (Skoog i sur. 2014). Injektor služi za nanošenje uzorka na kolonu bez zaustavljanja protoka pumpe. Detektor reagira na pojavu analita i daje signal proporcionalan koncentraciji analita. Mogu se koristiti razni detektori; Uv/Vis detektori, fluorescencijski, elektrokemijski, maseno spektrometrijski i njihove razne inačice (Snyder i sur. 2009). Korišteni detektor ovisi o karakteristikama uzorka i ispitivanih analita (Skoog i sur. 2014). Detektorski signal u ovisnosti o vremenu i koncentracije daje kromatogram (Snyder i sur. 2009).

### 3. Kvalitativna i kvantitativna analiza podataka

#### 3.1. Kvalitativna analiza

Kvalitativni podaci omogućuju identifikaciju analita ili pomažu pri identifikaciji strukture analita. Uobičajeni načini kvalitativne analize su retencijsko vrijeme, *on-line* i *offline* kvalitativna analiza. Neovisno o korištenoj tehnici lakše je dokazati da dva pika nisu isti spoj nego da jesu zato što spojevi sa sličnom strukturom obično imaju i slično retencijsko vrijeme. U tom slučaju za dodatni dokaz se koristi masena spektrometrija, nuklearna magnetska rezonancija (NMR) ili infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (Snyder i sur. 2009).

Uobičajena tehnika koja se koristi je **retencijsko vrijeme**. Retencijsko vrijeme je vrijeme koje prođe od injektiranja uzorka u kolonu do maksimuma pika u kromatogramu za svaku otopljenu tvar u uzorku i mjeri se u minutama ili sekundama kod brzog razdvajanja. Pri identifikaciji analita uspoređuje se retencijsko vrijeme ( $t_R$ ) analita s retencijskim vremenom referentnog standarda. Ako retencijsko vrijeme analita spada u retencijski raspon standarda dolazi se do zaključka da su analit i standard isti spoj. Kako je retencijsko vrijeme samo jedna od karakteristika spoja, i drugi spojevi mogu imati jednako retencijsko vrijeme. Dodatna tehnika kvalitativne analize je koinjektiranje referentnog standarda. U ovom slučaju prvo se injektira uzorak potom se u uzorak dodaje standard i injektira se smjesa u kolonu. Ako pikovi oba injektiranja imaju isto retencijsko vrijeme, širinu, i oblik pika te pik u uzorku u kojem je koinjektiran referentni standard rezultira višim od pika koji se opaža kod samog uzorka dobivaju se dodatni dokazi da su analit i standard isti spoj.

#### 3.2. Kvantitativna analiza

**Kvantitativna analiza** omogućava određivanje količine svakog analita u uzorku. Kako bi se omogućilo određivanje količine analita u uzorku tj. njegove mase ili koncentracije vrlo bitna je kalibracija. Kalibracija je proces pri kojem se određuje odgovor detektora po jedinici koncentracije (mase) analita. Dvije često korištene metode su metoda vanjskog standarda i metoda unutarnjeg standarda (Snyder i sur. 2009).

U **metodi vanjskog standarda** koriste se otopine poznatih koncentracija referentnog standarda. Pripremljene otopine se dodaju u matriks uzorka i pripremaju se serijska razrjeđenja. Analizira se raspon koncentracija standarda kako bi se stvorio baždarni pravac. Iz nagiba

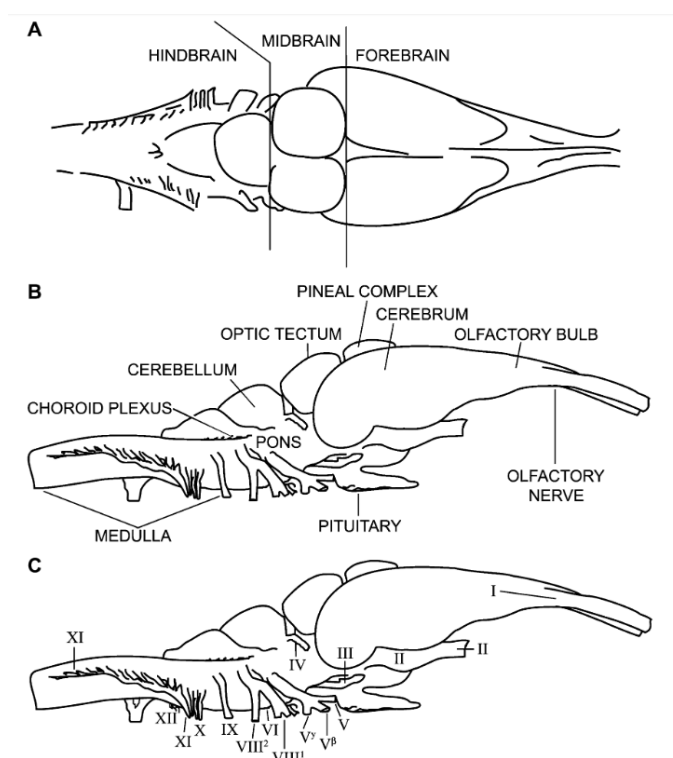
baždarnog pravca dobiva se jednadžba prema kojoj se određuje koncentracija (masa) nepoznatih uzoraka (Snyder i sur. 2009).

**Metoda unutarnjeg standarda** podrazumijeva dodatak unutarnjeg standarda u uzorak. Unutarnji standard je kemijski i fizikalno sličan analitu (Skoog i sur. 2004). Unutarnji standard se u uzorak dodaje prije predtretmana (postupka pročišćavanja uzorka kojim se uklanjaju sastavnice koje mogu oštetiti kolonu ili ometati razdvajanje spojeva od interesa). Kalibratori se pripremaju serijskim razrjeđenjima kao i kod metode vanjskog standarda. Alikvoti kalibracijskih standarda se miješaju s otopinom unutarnjeg standarda i uzorkom. Izračun koncentracije analita se temelji na omjeru površina analita i unutarnjeg standarda. Baždarni pravac na y-osi sadrži vrijednosti omjera površina analita i unutarnjeg standarda dok se na x-osi nalaze vrijednosti koncentracije analita (Snyder i sur. 2009).



#### 4. Mozak guštera i neurotransmiteri

Gušteri spadaju u gmazove koji predstavljaju vrlo raznoliku skupinu koja uključuje i krokodile, kornjače, prenosnike te dinosaure. Gmazovi kao skupina su evolucijski povezani sa sisavcima i pticama te svi zajedno spadaju u potkoljeno kralježnjaka. Zbog te evolucijske povezanosti njihov mozak (Sl. 2), iako se smatra evolucijski primitivnim, predstavlja odličan model za istraživanja evolucije mozga i evolucije funkcija moždanih puteva kralježnjaka. Komparativnim istraživanjima različitih skupina kralježnjaka identificiraju se homologne regije mozga, moždani putevi i stanični tipovi (Naumann i sur. 2015).



**Slika 2** Mozak guštera, preuzeto s Wyneken, 2017.

Životinje na socijalni okoliš odgovaraju adaptivnim bihevioralnim odgovorom tako što integriraju važnost podražaja s vlastitom fiziologijom. Neuralni mehanizmi iza toga još se istražuju, a neurokemijskim istraživanjima moguće je dobiti uvid u te mehanizme. Glavna neuralna mreža koja je odgovorna za evaluaciju podražaja i ponašanja među kralježnjacima je neuralna mreža donošenja socijalnih odluka (SDM mreža; eng. *social decision making network*) koju čine mezolimbčki sustav nagrade i neuralna mreža socijalnog ponašanja koja regulira reprodukciju, agresiju i roditeljsko ponašanje. Istraživanja ponašanja životinja često su povezana s određivanjima koncentracije i lokalizacije neurotransmitera i njihovih receptora. Najčešće istraživani neurotransmiteri su dopamin, serotonin, adrenalin i noradrenalin

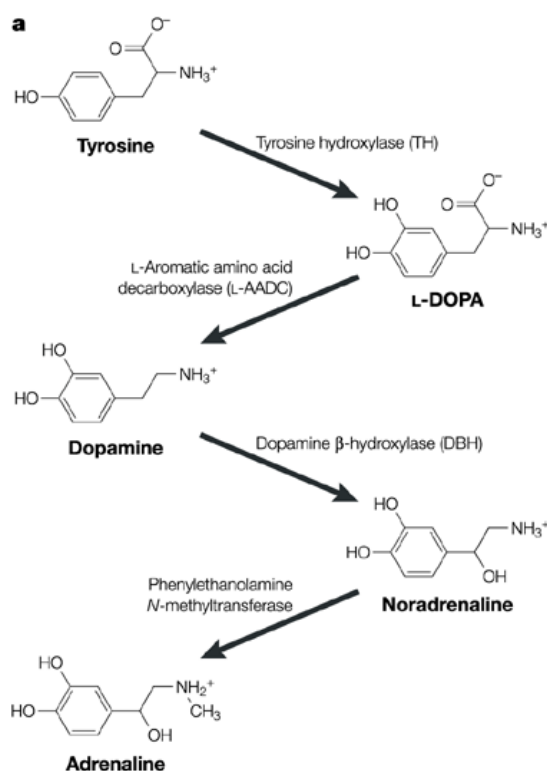
(O'Connell i Hofmann, 2012). Gušteri predstavljaju odličan model povezanosti između čvorova neuralne mreže socijalnog ponašanja (Kabelik i sur, 2014).

## 4.1. Katekolamini

Katekolamini spadaju u monoamine i zajednička karakteristika im je postojanje katekolne skupine (benzenske skupine s dvije dodane hidroksilne skupine) i etilaminskog bočnog lanca koji sadrži jednu amino skupinu koja može imati dodatne supstitucije. Glavni predstavnici skupine katekolamina u mozgu su dopamin, noradrenalin i adrenalin.

### 4.1.1. Dopamin

Dopamin ( 4-(2-aminoetil)benzen-1,2-diol ) je aaminski derivat katekola (2-hidroksifenola). Jedan je od najstarijih neurotransmitera i koriste ga čak i diploblastične životinje. Sintetizira se u neuronima i bubrezima iz tirozina u dvije enzimatske reakcije (Slika 3).



**Slika 3** Sinteza katekolamina iz tirozina, preuzeto s Goridis i Rohrer, 2002.

Prvu reakciju katalizira tirozin-hidroksilaza te nastaje L-DOPA (3-hidroksi-L-tirozin). U sljedećem koraku kataliziranom aromatsko aminokiselinskom dekarboksilazom nastaje dopamin koji se dalje može koristiti kao prekursor za nastanak adrenalina i noradrenalina. Nakon sinteze dopamin se skladišti u sinaptičke vezikule pomoću vezikularnog monoaminskog transportera 2 (vMAT2). Ispuštanje dopamina iz vezikula može biti regulirano lokalnom koncentracijom kalcija na dendritima ili sinaptičkom mašinerijom. Kod regulacije sinaptičkom mašinerijom ispuštanje dopamina je uzrokovano depolarizacijom i ulaskom kalcija u terminalne završetke neurona ili dendrita. Nakon otpuštanja iz stanica, dopamin se veže na dopaminergičke receptore, membranski proteini sa sedam transmembranskih regija koji su spregnuti s G proteinom. Receptori su podijeljeni u 2 skupine, D<sub>1</sub> (u koju spadaju podtipovi receptora D<sub>1</sub> i D<sub>5</sub>) i D<sub>2</sub> (u koju spadaju podtipovi receptora D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> i D<sub>4</sub>) (Yamamoto i Vernier, 2011).

Na temelju imunohistokemijskih analiza dopamin je u mozgu guštera pronađen u neuronima kralježnične moždine, ventrolateralnog tegmentuma, dorzomedijalnoj skupini jezgara solitarnog trakta (*tractus solitarius*), mezencefalonu, hipotalamusu, telencefalonu gdje lokalizacija ovisi o vrsti, njušnoj lukovici (*bulbus olfactorius*) i retini (Smeets i González, 2000).

Uloge dopamina su razne, a uključuju endokrinu regulaciju (hipotalamički neuroni), kretanje (nigrostratijalni neuroni), motivacijske procese, učenje, kogniciju i afektivno ponašanje (nigrostratijalni, mezolimbčki i mezokortikalni neuroni) (Brady i sur., 2012). Kod guštera *Anolis sagrei* dopamin promovira naskakivanje mužjaka kao dio seksualnog ponašanja. (Woolley i sur. 2001)

#### 4.1.2. Noradrenalin i adrenalin

Adrenalin i noradrenalin su katekolamini koji nastaju preradom dopamina. Noradrenalin nastaje  $\beta$ -hidroksilacijom dopamina enzimom dopamin- $\beta$ -hidroksilaza koji se nalazi u vezikulama kromafinih stanica medule nadbubrežne žlijezde i spremišnim vezikulama terminalnih završetaka aksona koji otpuštaju adrenalin i noradrenalin. Adrenalin je metilirani derivat noradrenalina. Oba katekolamina imaju ulogu u perifernom autonomnom živčanom sustavu gdje sudjeluju u održavanju homeostaze. U središnjem živčanom sustavu imaju ulogu neurotransmitera i sudjeluju u stanju uzbuđenja (pažnje/ budnosti/ alarmiranosti) i integraciji s autonomnim sustavom (Stanford, 2020). U mozgu su pronađena tri područja u kojima dolazi

do grupiranja neurona koji sadrže noradrenalin, *locus coeruleus*, lateralni tegmentalni sustav i dorzalna medularna skupina. (Brady i sur., 2012)

## 4.2. Serotonin

Serotonin ili 5-hidroksitriptamin je važan neurotransmiter i neuromodulator koji se sintetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofana kroz dvije enzimske reakcije. Prvu enzimatsku reakciju katalizira triptofan-hidroksilaza te nastaje 5-hidroksitriptofan koji se konvertira u serotonin pomoću enzima dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (Sl. 4).



**Slika 4** Sinteza serotonina iz triptofana, preuzeto s Olivier, 2015.

Zato što sadrži 5-hidroksiindolnu jezgru, serotonin može apsorbirati svjetlost u UV spektru i intrinzično je fluorescentan. Apsorpcijski spektar serotonina ovisi o pH, u kiselim otopinama maksimum apsorbancije opaža se pri 275nm, a dodatni pik se opaža pri 298nm (Szeitz i Bandiera, 2018).

Neuroni koji sadrže serotonin u mozgu guštera nalaze se u području jezgre rafa, u moždanom deblu, kaudalnom mezenfaličkom *tegmentum* i u produženoj moždini (*medulla*

*oblongata*). Također pronađeni su i neuroni unutar crne tvari (*substantia nigra*), u *nucleus reticularis superior*, lateralnom dijelu *nucleus reticularis medius* i ventrolateralnom dijelu *nucleus reticularis inferior* (Wolters i sur., 1985). Samo mali dio serotonina prisutnog u tijelu se sintetizira u serotonergičkim neuronima središnjeg živčanog sustava (Szeitz i Bandiera, 2018). Ostatak serotonina sintetizira se u perifernim dijelovima tijela, najviše u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva. Osim u gastrointestinalnom sustavu, serotonin ima regulatornu ulogu u kardiovaskularnom i genitourinarnom sustavu te pri aktivaciji trombocita koji sadrže značajne količine serotonina no ne sintetiziraju ga (Berger i sur. 2009). U središnjem živčanom sustavu serotonin sudjeluje u skoro svim integrativnim funkcijama, u raspoloženju, anksioznosti, strahu, agresiji, hranjenju, kogniciji i spolnom ponašanju (Olivier, 2015).

## 5. Analize neurotransmitera različitim izvedbama HPLC-a

Razvojem metode tekućinske kromatografije omogućava se njegovo korištenje u analizama i ona postaje glavna metoda za razdvajanje i kvantifikaciju bioaktivnih molekula. Neurokemijske analize pojedinih moždanih struktura eksperimentalnih životinja mogu pružiti važne informacije o sintezi, otpuštanju i promjenama metabolizma uslijed bihevioralnih ili farmakoloških manipulacija. Kvantifikacija neurotransmitera i njihovih metabolita moguća je korištenjem HPLC metode (Church, 2005). Za određivanje količine monoaminskih neurotransmitera i njihovih metabolita korišten je HPLC s različitim detektorima: elektrokemijskim (ECD), dvostruki ECD, fluorescencijski (FLD), FLD/ECD, kemiluminiscencijski i masena spektrometrija (MS). Osim toga korištena je i plinska kromatografija (GC) s masenim spektrometrom (Park i sur. 2013). Prije analize HPLC-om, mozak je potrebno izolirati iz tijela i ako se istražuje određeni dio mozga, njega se treba posebno izolirati što se može postići izrezivanjem potrebnog dijela mozga iz preza cijelog mozga. Uzorci tkiva se zatim moraju obraditi kako bi se pripremio čisti i tekući uzorak koji se može injektirati u kolonu za HPLC što se može postići dodatkom otopine za homogenizaciju, homogeniranjem i zatim centrifugiranjem te filtriranjem (Church 2005).

### 5.1. HPLC/ECD

Elektrokemijski detektor mjeri električnu struju koja nastaje reakcijom oksidacije/redukcije analita na odgovarajućim elektrodama, količina struje je proporcionalna koncentraciji analita. (Ivaniš 2012) Uvjeti za odvajanje katekolamina HPLC/ECD sustavom zahtijevaju mobilnu fazu s vodenim puferom, organski modifikator, agens za kompleksiranje metala i agens za stvaranje ionskih parova. Uloge pufera su stvaranje odgovarajuće otopine elektrolita za odvijanje elektrokemijskih reakcija na ugljikovoj elektrodi i održavanje acidobazne ravnoteže. Organski modifikator, uobičajeno metanol ili acetonitril, je potreban za solvataciju hidrofobne stacionarne faze i smanjenje vremena razdvajanja. Agens za stvaranje ionskih parova se koristi za poboljšanje odvajanja pozitivno nabijenih spojeva (npr. dopamina). Za smanjenje pozadinske buke detektora može se koristiti agens za kompleksiranje metala (npr. EDTA). Retencijsko vrijeme se može mijenjati promjenom pH, koncentracije organskog modifikatora i agensa za stvaranje ionskih parova (Church, 2005).

Jedna od često korištenih metoda za razdvajanje serotonina, 5-HIAA, dopamina, DOPAC-a, adrenalina, noradrenalina i MHPG koristi pufer natrijevog acetata (pH 5) s unutarnjim

standardom ( $\alpha$ -metildopamin). Elektrokemijski detektor se bazira na dvije elektrode s prvo reducirajućim pa oksidirajućim potencijalom, dodana je još i „čuvarska ćelija“ (eng. *guard cell*) s visokom potencijalom za oksidaciju kontaminanata. U mobilnu fazu dodan je 10%-tni acetonitril, konačni pH je bio 2,9. Kvantifikacija je odrađena usporedbom površina ispod pikova analita s površinama ispod pikova standardnih otopina poznatih koncentracija. Metoda je izvedena iz metode koju je Barbato (1990) razvio za analizu katekolamina i indolamina u moždanim tkivima ptica (Summers i sur. 2003). Barbato (1990) navodi uspješnu kvantifikaciju dvanaest neurotransmitera i metabolita. Michaelidis i sur. (2002) su pri određivanju količine serotonina, 5-HIAA, dopamina, DOPAC-a, HVA, noradrenalina i adrenalina u tkivu guštera koristili drugačiju metodu HPLC-a obrnute faze. Mobilna faza sastojala se od 100 mmol l<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mmol l<sup>-1</sup> EDTA, 30 mg l<sup>-1</sup> natrijevog oktilsulfata i 6%-tnog metanola te pH 3.7. Kao radna elektroda elektrokemijskog detektora korištena je mala ugljikova elektroda u obliku diska čiji je elektrodni potencijal održavan na +750mV nasuprot referentne Ag-AgCl elektrode. Rezultati su ukazali na pivotalnu ulogu serotonina u centralnoj živčanoj kontroli hibernacije i smanjenu sintezu katekolamina tijekom hibernacije. Korištena metoda slična je metodi koju su koristili Reipschlager i sur. (1997) na morskom beskralježnjaku *Sipunculus nudus*.

## 5.2. HPLC/MS

Masenom spektrometrijom odvajaju se nabijeni ioni na temelju omjera mase i naboja pomoću električnog ili magnetskog polja i mjeri se njihova zastupljenost. (Kailasa i Wu, 2013) HPLC spregnut s MS-om omogućava identifikaciju analita u uzorku mozga guštera na temelju omjera mase i naboja. Kod analize uzoraka u kojima se nalaze neurotransmiteri s drugačijim skupinama koje se mogu ionizirati potrebno je derivatizirati analite. Park i sur. (2013) razvili su metodu derivatizacije s etil kloroformatom koju su primijenili pri istovremenom mjerenju količine serotonina, dopamina i njihovih metabolita u mozgu štakora. Derivatizacijom amino (-NH<sub>2</sub>) i hidroksilne (-OH) skupine su promijenjene u N(O)-alkoksikarbonilnu, a karboksilna skupina je prešla u oblik etil estera.

## 5.3. HPLC/FLD

Sustav HPLC/ECD je najkorišteniji no zbog težeg održavanja, problema s pozadinskom bukom i potrebe za stručnim osobljem prednost jednostavnije analitičkog sustava ima

HPLC/FLD sustav. Problem je relativno niska osjetljivost na katekolamine. Rješenje problema predstavlja derivatizacija 5-hidroksiindola i katekolamina s benzilaminom (BA) i 1,2-difeniletildiamin(DPE). Derivatizacijom se dobivaju visoko fluorescentni benzoksazolni derivati (Fujino i sur., 2003).

#### 5.4. HPLC/UV

Detektori u HPLC/UV sustavu mjere apsorbanciju UV i vidljive svjetlosti u eluentu (Dong 2006). Thomas i sur. (2014) su u radu opisali optimizaciju pripreme uzoraka za razdvajanje serotonina i noradrenalina u mozgu guštera. Najbolji rezultat dobiven je pri korištenju mobilne faze koja se sastoji od 0,05% mravlje kiseline i acetonitrila u omjeru 90:10 s izokratskom elucijom i valnom duljinom od 280nm. Pri analizi mozgova guštera korištena je mobilna faza s 0,043% mravlje kiseline i ph 2,8 s dodatkom acetonitrila (Nikolić i sur., 2019).



## 6. Primjene HPLC metode u analizi mozgova guštera

Značajnost metode je mogućnost kvantifikacije količine neurotransmitera u određenim dijelovima mozga što može dati neurokemijsko objašnjenje ponašanja životinja. Neka od malobrojnih istraživanja provedenih na gušterima korištenjem HPLC metode su navedena u nastavku.

Summers i sur. (2003) su na mužjacima *A. carolinensis* su pokazali da izlaganje socijalnom stresu povećava serotonergičnu aktivnost u hipokampusu, *nucleus accumbens* i amigdali kod dominantnih i podređenih mužjaka. Temporalni uzorak aktivnosti neurotransmitera i glukokortikoida može biti indikator neuralnih puteva koji rezultiraju promjenama ponašanja koje reflektiraju socijalni status. Osim toga, došli su do zaključka da je hipokampus važan za regulaciju kratkotrajnog stresnog odgovora, a da amigdalo-strijatalna aktivnost je odgovorna za koordinaciju stresnog odgovora kratkog i dugog trajanja.

Bertolucci i sur. (2003) su kvantitativnom i kvalitativnom analizom otpuštenog melatonina iz epifize guštera *P. sicula* utvrdili da epifiza sadrži autonomne cirkadijanske oscilatore koji kontroliraju sintezu melatonina i da na sintezu utječu i oscilatori koji se nalaze izvan epifize. Manipulacije „eyespot“ i utjecaj na agresivno ponašanje i socijalni status mužjaka *Anolis carolinensis* prate promjene u koncentraciji dopamina i katabolita dopamina DOPAC. Povećana količina dopamina u hipotalamusu, crnoj tvari (*substantia nigra*) i ventralnom tegmentalnom području su povezane s agresivnijim ponašanjem i višim statusom. Uočene promjene povezane s motoričkom aktivnosti ukazuju na specifične stereotipne pokrete u socijalnoj komunikaciji. Povećanje količine dopamina i DOPAC-a u *nucleus accumbens* kada mužjak uspostavi dominantnost povezane su sa sustavom motivacije i nagrade (Korzan i sur., 2006).

## 7. Sažetak

Tekućinska kromatografija visoke moći razlučivanja jedna je od čestih analitičkih metoda koja ima široku upotrebu u analizama farmaceutika, biomolekula, polimera i raznih organskih i ionskih spojeva. Za pravilno korištenje HPLC sustava bitno je optimizirati sustav i koristiti detektor koji može detektirati analite za što je potrebno znati i karakteristike analita. Jedna od mogućih upotreba metode je u analizama neurotransmitera i njihovih metabolita u mozgovima guštera. Najčešće ispitivani neurotransmiteri i njihovi metaboliti su dopamin, noradrenalin, adrenalin i serotonin. Analize koje pokazuju njihovu lokalizaciju i koncentraciju u mozgu pomažu pri razumijevanju njihovih uloga u središnjem živčanom sustavu i moždanih puteva u kojima djeluju te odgonetavanju evolucije mozga i moždanih funkcija. Dopamin ima ulogu u endokrinoj regulaciji, kretanju, motivacijskim procesima, učenju, kogniciji i afektivnom ponašanju. Noradrenalin i adrenalin osim brojnih uloga koje izvršavaju kao hormoni u ostatku tijela, u središnjem živčanom sustavu imaju uloge u stanju uzbuđenosti, budnosti i opreznosti. Serotonin ima ulogu u raspoloženju, anksioznosti, strahu, agresiji, hranjenju, kogniciji i spolnom ponašanju. Neke od izvedbi HPLC-a u analizi neurotransmitera i njihovih metabolita su HPLC/UV, HPLC/ECD, HPLC/MS i HPLC/FLD. Upotrebom HPLC metode pri analizama mozgova guštera pruženo je neurokemijsko objašnjenje prethodno opaženih ponašanja guštera.

## 8. Summary

High-performance liquid chromatography is a frequently used analytical method in the analysis of pharmaceuticals, biomolecules, polymers and various organic and inorganic compounds. For a proper use of HPLC, it is essential to optimise the system for analysed analytes and to use detector sensitive to analytes for which it is crucial to understand the characteristics of the analytes. One of the applications of the HPLC method is the analysis of neurotransmitters and their metabolites in lizard brains. Most frequently analysed neurotransmitters and their metabolites are serotonin, dopamine, noradrenaline and adrenaline. Analyses which demonstrate localization and concentration of neurotransmitters and their metabolites assist in the comprehension of their roles in the central nervous system and brain circuits in which they operate or help with unraveling of brain evolution and evolution of brain functions with the lizard brain as an evolutionary model. Some of dopamine roles are in movement, endocrine regulation, motivation, learning, cognition and affective behaviour. Noradrenaline and adrenaline, except numerous roles as hormones in the rest of the body, in the central nervous system have roles in state of arousal, vigilance and alertness. Roles of serotonin are in mood, anxiety, fear, aggression and sexual behaviour. HPLC methods used for neurotransmitter measurement are HPLC/UV, HPLC/MS, HPLC/FLD and most frequently used HPLC/ECD. With the use of HPLC methods when analysing lizard brains, neurochemical explanation of previously observed lizard behaviour is provided.

## 9. Izvori

- Barbato, G.F. (1990). A Fast HPLC Analysis Of Catecholamines and Indoleamines in Avian Brain Tissue. *Journal of Liquid Chromatography*, 13(13), pp.2553–2560.
- Berger, M., Gray, J.A. and Roth, B.L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual review of medicine* 60, pp.355–66.
- Bertolucci, C., Wagner, G., Foà, A., Gwinner, E. i Brandstätter, R. (2003). Photoperiod affects amplitude but not duration of in vitro melatonin production in the ruin lizard (*Podarcis sicula*). *Journal of Biological Rhythms* 18(1), pp.63–70
- Brady, S.T., Siegel, G.J., R Wayne Albers i Price, D.L. (2012). *Basic Neurochemistry : principles of molecular, cellular, and medical neurobiology*. Waltham, Massachusetts ; Oxford: Academic Press / Elsevier.
- Church, W.H. (2005). Column Chromatography Analysis of Brain Tissue: An Advanced Laboratory Exercise for Neuroscience Majors. *Journal of Undergraduate Neuroscience Education* 3(2), pp.A36–A41
- Dong, M.W. (2006). *Modern HPLC for practicing scientists*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience.
- Fujino, K., Yoshitake, T., Kehr, J., Nohta, H. i Yamaguchi, M. (2003). Simultaneous determination of 5-hydroxyindoles and catechols by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *Journal of Chromatography A* 1012(2), pp.169–177
- Ivaniš B. (2012). Validacija HPLC metode za određivanje sadržaja lidokaina u Lidokain spreju. Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.
- Goridis, C. and Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nature Reviews Neuroscience* 3(7), pp.531–541
- Jadaun, G.P.S., Dixit, S., Saklani, V., Mendiratta, S., Jain, R. i Singh, S. (2017). HPLC for Peptides and Proteins: Principles, Methods and Applications. *Pharmaceutical Methods* 8(1).

- Kabelik, D., Alix, V.C., Singh, L.J., Johnson, A.L., Choudhury, S.C., Elbaum, C.C. and Scott, M.R. (2014). Neural activity in catecholaminergic populations following sexual and aggressive interactions in the brown anole, *Anolis sagrei*. *Brain Research* 1553, pp.41–58.
- Kailasa, S.K. i Wu, H.-F. (2013). Recent Advances in Mass Spectrometry for the Identification of Neuro-chemicals and their Metabolites in Biofluids. *Current Neuropharmacology* 11(4), pp.436–464.
- Kim, T.-H., Choi, J., Kim, H.-G. and Kim, H.R. (2014). *Quantification of Neurotransmitters in Mouse Brain Tissue by Using Liquid Chromatography Coupled Electrospray Tandem Mass Spectrometry*. [online] Journal of Analytical Methods in Chemistry.
- Korzan, W.J., Forster, G.L., Watt, M.J. i Summers, C.H. (2006). Dopaminergic activity modulation via aggression, status, and a visual social signal. *Behavioral Neuroscience*, 120(1), pp.93–102.
- Michaelidis, B., Loumbourdis, N.S. i Kapaki, E. (2002). Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *Journal of Experimental Biology* 205(8), pp.1135–1143.
- Naumann, R.K., Ondracek, J.M., Reiter, S., Shein-Idelson, M., Tosches, M.A., Yamawaki, T.M. i Laurent, G. (2015). The reptilian brain. *Current Biology*, 25(8), pp.R317–R321.
- Nikolic, B., Josic, P., Buric, D., Tkalec, M., Lisicic, D., Blazevic, S.A. i Hranilovic, D. (2019). Coexisting lacertid lizard species *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* differ in dopamine brain concentrations. *Journal of Comparative Physiology A*, 205(4), pp.451–456.
- O’Connell, L.A. i Hofmann, H.A. (2012). Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science (New York, N.Y.)* 336(6085), pp.1154–1157.
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753, pp.2–18.
- Park, J.-Y., Myung, S.-W., Kim, I.-S., Choi, D.-K., Kwon, S.-J. i Yoon, S.-H. (2013). Simultaneous measurement of serotonin, dopamine and their metabolites in mouse

- brain extracts by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry following derivatization with ethyl chloroformate. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 36(2), pp.252–258.
- Reipschlager, A., Nilsson, G.E. and Portner, H.O. (1997). A role for adenosine in metabolic depression in the marine invertebrate *Sipunculus nudus*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 272(1), pp.R350–R356.
- Skoog, D.A. i Al, E. (2004). *Fundamentals of analytical chemistry*. Belmont Etc.: Thomson-Brooks/Cole, Cop.
- Smeets, W.J. i González, A. (2000). Catecholamine systems in the brain of vertebrates: new perspectives through a comparative approach. *Brain Research. Brain Research Reviews* 33(2–3), pp.308–379.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J. i Dolan, J.W. (2009). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Stanford, S.C. (2020). Norepinephrine and Epinephrine: Introduction. *eLS*, 1(2), pp.1–7.
- Summers, C.H., Summers, T.R., Moore, M.C., Korzan, W.J., Woodley, S.K., Ronan, P.J., Hglund, E., Watt, M.J. I Greenberg, N. (2003). Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. *Neuroscience* 116(2), pp.553–563.
- Szeitz, A. i Bandiera, S.M. (2018). Analysis and measurement of serotonin. *Biomedical chromatography: BMC* 32(1).
- Thomas, J., Khanam, R. i Vohora, D. (2015). A validated HPLC-UV method and optimization of sample preparation technique for norepinephrine and serotonin in mouse brain. *Pharmaceutical Biology*, 53(10), pp.1539–1544.
- Wolters, J.G., ten Donkelaar, H.J., Steinbusch, H.W. i Verhofstad, A.A. (1985). Distribution of serotonin in the brain stem and spinal cord of the lizard *Varanus exanthematicus*: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 14(1), pp.169–193.

- Woolley, S.C., Sakata, J.T., Gupta, A. and Crews, D. (2001). Evolutionary Changes in Dopaminergic Modulation of Courtship Behavior in *Cnemidophorus* Whiptail Lizards. *Hormones and Behavior*, 40(4), pp.483–489.
- Wyneken, J. (2007). Reptilian Neurology: Anatomy and Function. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10(3), pp.837–853.
- Yamamoto, K. i Vernier, P. (2011). The evolution of dopamine systems in chordates. *Frontiers in Neuroanatomy* 5(21), p.21.