

POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W SZCZECINIE



mgr Urszula Semeniuk

**Ocena stężenia serotoniny i histaminy w szpiku kostnym pacjentów z
chorobami hematologicznymi**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Borowiak

Promotor pomocniczy: dr n. med. Tomasz Janus

Szczecin 2022 r.

*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi pomocniczemu
dr. n. med. Tomaszowi Janusowi,
za opiekę merytoryczną, cenne wskazówki przy realizacji badań i poświęcony czas.
Pragnę również serdecznie podziękować mojemu promotorowi
prof. dr hab. n. med. Krzysztofowi Borowiakowi
za motywację do podjęcia pracy naukowej i okazaną życzliwość,
oraz pracownikom Zakładu Toksykologii Klinicznej i Sądowej za wsparcie.*

Pracę dedykuję moim Rodzicom i Pawłowi

Spis Treści

Wykaz skrótów	6
1. Wstęp	9
1.1 Histamina	10
1.1.1 Wytwarzanie i magazynowanie histaminy	10
1.1.2 Działanie poprzez receptory histaminowe	10
1.1.3 Uwalnianie histaminy	11
1.1.4 Metabolizm histaminy	12
1.1.5 Wpływ histaminy na hematopoezę	13
1.2 Serotonina	14
1.2.1 Wytwarzanie i magazynowanie	14
1.2.2 Metabolizm serotoniny	15
1.2.3 Uwalnianie serotoniny	16
1.2.4 Działanie serotoniny	17
1.2.5 Wpływ serotoniny na hematopoezę	18
1.3 Charakterystyka fizykochemiczna histaminy i serotoniny	19
1.4 Szpik kostny	20
1.4.1 Występowanie i budowa szpiku kostnego	20
1.4.2 Funkcje szpiku kostnego	20
1.4.3 Szpik kostny jako materiał diagnostyczny	21
1.5 Choroby hematologiczne	21
1.5.1 Podział nowotworów układu krwiotwórczego	21
1.5.2 Podział nowotworów układu limfatycznego	22
1.5.3 Nowotwory mieloproliferacyjne	23
1.5.4 Zespoły mielodysplastyczne	24
1.5.5 Ostre białaczki	24
1.5.6 Mastocytoza	24
1.6 Metody analityczne – spektrometria mas	25
1.6.1 Chromatografia oddziaływań hydrofilowych	27
1.6.2 Elektrozpylanie	29
2. Założenia i cel pracy	31
3. Materiał i metody	33
3.1 Materiał biologiczny i dane kliniczne	33
3.2 Przygotowanie próbek do analizy	34
3.3 Analiza histaminy oraz serotoniny techniką LC/MS-MS	35
3.3.1 Specyfikacja techniczna zestawu analitycznego	35

3.3.2 Krzywe kalibracyjne i inne parametry walidacyjne	38
3.3.3 Stosowane odczynniki.....	46
3.3.4 Analiza statystyczna.....	47
4. Wyniki	48
4.1 Wyniki pomiarów w układzie LC-MS/MS.....	48
4.2 Statystyki opisowe	55
4.3 Wyniki analizy zależności oraz korelacji	58
4.3.1. Analiza zależności między stężeniami histaminy a grupami chorób hematologicznych.....	58
4.3.2 Analiza korelacji pomiędzy stężeniami histaminy i wartościami parametrów morfologii.....	59
4.3.3 Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a grupami chorób hematologicznych.....	63
4.3.4 Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii.....	64
4.3.5 Analiza zależności między stężeniami serotoniny a grupami chorób hematologicznych.....	71
4.3.6 Analiza korelacji pomiędzy stężeniami serotoniny i wartościami parametrów morfologii.....	72
4.3.7 Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami serotoniny a grupami chorób hematologicznych	76
4.3.8 Analiza zależności między zgrupowanymi w przedziałach stężeniami serotoniny a wartościami parametrów morfologii	77
5. Dyskusja	84
6. Wnioski.....	97
7. Streszczenie	98
8. Summary.....	100
9. Piśmiennictwo	102
Spis rycin	112
Wykaz Tabel.....	114

Wykaz skrótów

- 5-HIA- (ang. 5-hydroxyindoleacetic acid) kwas 5-hydroksyindoloocetowy
- 5-HIAA- (ang. 5-Hydroxyindoleacetic acid) kwas 5-hydroksyindoloocetowy
- 5-HT- (ang. serotonin) serotonina
- 5-HTOL - (ang. 5-Hydroxytryptophol) 5- hydroksytryptofol
- 5HTR- (ang. serotonin receptor) receptor serotoninowy
- ACN- (ang. acetonitrile) acetonitryl
- ALDH- (ang. aldehyde dehydrogenase) dehydrogenaza aldehydowa
- ATP- (ang. adenosine triphosphate) adenozyntrifosforan
- BMAT- (ang. bone marrow adipose *tissue*) adipocytowa tkanka szpiku kostnego
- CD- (ang. cluster of differentiation) antygen różnicowania komórkowego
- CE- (ang. collision energy) energia kolizji
- CM- (ang. cutaneous mastocytosis) mastocytoza skórna
- CUR- (ang. curtain gas) gaz osłonowy
- CXP- (ang. collision Cell Exit Potential) potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń
- cz.d.a- czysty do analizy
- DAG- (ang. diacylglycerol) diacyloglicerol
- DAO- (ang. diaminoxidase) diaminooksydaza
- DP- (ang. declustering potential) potencjał fragmentacyjny
- EC- (ang. enterochromaffin cells) komórki enterochromafinowe
- ECL- (ang. enterochromaffin-like cells) komórki enterochromatofinopodobne
- EI- (ang. electron ionization) jonizacja elektronami
- ELISA- (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) enzymatyczny odczyn immunoadsorpcyjny

EP- (ang. potential energy) potencjał wejściowy

ESI- (ang. electrospray ionization) elektrorozpylanie

GS1- (ang. nebulizer gas) gaz nebulizujący

GS2- (ang heating gas) gaz suszący

GTOL- (ang. 5-hydroxytryptophol glucuronide) glukuronid 5-hydroksytryptofolu

Hb- (ang. hemoglobin) hemoglobina

HDC- (ang. histidine decarboxylase) dekarboksylaza histydyny

HILIC- (ang. hydrophilic interaction chromatography) chromatografia oddziaływań hydrofilowych

HIOMT- (ang. hydroxyindole-O-methyltransferase) 5-Hydroksyindolo-O-metylotransferaza

HNMT- (ang. histamine N-methyltransferase) N-metylotransferaza histaminy

HSC- (ang. hematopoietic stem cell) hematopoetyczna komórka macierzysta

Ht- (ang. hematocrit) hematokryt

IL-3- (ang. interleukin 3) interleukina 3

IP₃ – (ang. inositol trisphosphate) trifosforan inozytolu

IS- (ang. ion spray voltage) napięcie przyłożone do igły w celu jonizacji próbki

IT- (ang. ion trap) pułapka jonowa

EDTA KE- (ang. potassium EDTA) wersenian potasowy

LC-MS/MS- (ang. liquid chromatography with tandem mass spectrometry) chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas

LIT- (ang. linear ion trap) liniowa pułapka jonowa

LOQ- (ang. limit of quantification) limit oznaczalności

MALDI- (ang. matrix-assisted laser desorption/ionization) desorpcja laserowa z udziałem matrycy

MAO- (ang. monoamine oxydase) monoaminooksydaza

MCH- (ang. mean corpuscular hemoglobin) średnia waga hemoglobiny w krwince

MCHC- (ang. mean corpuscular hemoglobin concentration) średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach

MCV- (ang. mean corpuscular volume) średnia objętość krwinki czerwonej

MRM- (ang. multiple reaction monitoring) tryb rejestracji wybranych jonów fragmentacyjnych

NAS- (ang. N-acetyloserotonin) N-acetyloserotonina

NK- (ang. natural killer cells) komórki natural killer

OUN- (ang. central nervous system) ośrodkowy układ nerwowy

PLT- (ang. platelet count) liczba płytek krwi

Q- (ang. quadrupole) kwadrupolowy filtr masowy

QqQ- (ang. quadrupole-quadrupole) potrójny kwadrupol

RBC- (ang. red blood cells) krwinki czerwone

S/N- (ang. signal to noise ratio) stosunek sygnału do szumu

SERT- (ang. serotonin transporter) transporter serotoniny

SM- (ang. systemic mastocytosis) mastocytoza układowa

SPE- (ang. solid phase extraction) ekstrakcja do fazy stałej

TEM- (ang. temperature) temperatura

TOF- (ang. time of flight) analizator czasu przelotu

TPH- (ang. tryptophan hydroxylase) hydroksylaza tryptofanowa 1

TRP - (ang. L-tryptophan) L-tryptofan

VMAT- (ang. vesicular monoamine transporter) pęcherzykowy transporter monoamin

WBC- (ang. white blood cells) liczba krwinek białych

WHO- (ang. world health organization) Światowa Organizacja Zdrowia

XIC- (ang. extracted-ion chromatogram) chromatogram wybranego prądu jonowego

1. Wstęp

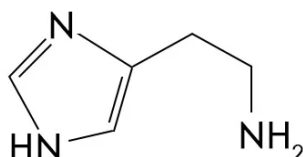
Histamina i serotonina należą do specyficznej grupy związków chemicznych, tzw. amin biogennych, których wspólną cechą jest zdolność do ich wytwarzania przez organizmy żywe oraz pełnienie ważnych funkcji ustrojowych w organizmie człowieka. Oba związki powstają na drodze stosunkowo prostych, endogennych reakcji chemicznych, z udziałem aminokwasów (L-histydyna, L-tryptofan) i dekarboksylaz. Wszystkie aminy biogenne zawierają w swojej strukturze atom azotu z wolną parą elektronową, co determinuje ich właściwości zasadowe [1,2]. Pośród wielu ważnych ustrojowo funkcji histaminy wymienić należy jej aktywny udział w procesach o podłożu alergicznym i stanach zapalnych, a także istotną rolę w procesie wytwarzania soku żołądkowego. Z kolei serotonina jest najczęściej niesłusznie kojarzona jedynie z rolą w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie rzeczywiście pełni funkcję kluczowego neuroprzekaźnika. Aczkolwiek badania w zakresie wielu innych funkcji histaminy i serotoniny w organizmie człowieka prowadzone są od ponad połowy zeszłego wieku, to choćby w przeciągu ostatnich kilku lat opublikowano wiele znaczących doniesień mających istotny wpływ na wyjaśnienie mechanizmu ich oddziaływania. Niezależnie od dobrze poznanych funkcji obu tych amin, zwraca uwagę złożony, wielokierunkowy mechanizm ich działania ustrojowego, znacznie szerszy niż przypisywane im powszechnie profile aktywności.

Nowe spojrzenie na opisywane zagadnienia umożliwiła niewątpliwie olbrzymi rozwój metod naukowo-badawczych, jaki obserwuje się w ostatnich latach, szczególnie w zakresie metod referencyjnych. Kosztowne urządzenia, dostępne jeszcze kilkanaście lat temu wyłącznie w nielicznych ośrodkach naukowych, stanowią obecnie często podstawowe wyposażenie laboratoriów profilowych w rutynowych oznaczeniach diagnostycznych. W przeciwieństwie do stosowanych od wielu lat metod immunochemicznych, metody referencyjne cechuje nie tylko wysoka czułość oznaczeń, pozwalająca na detekcję związków na poziomie niskich mikrogramów, czy wręcz nanogramów w litrze, ale także bardzo wysoka specyficzność względem analitów, co z kolei przekłada się na wysoką selektywność oznaczeń i nieporównywalnie większą wiarygodność otrzymywanych wyników. Wykorzystanie nowych rozwiązań analitycznych w badaniach biologicznych wydaje się nie tylko uzasadnione względami poznawczymi, ale także możliwością ich zastosowania w rutynowych oznaczeniach parametrów biochemicznych, po przeprowadzeniu stosownej walidacji.

1.1 Histamina

1.1.1 Wytwarzanie i magazynowanie histaminy

Histamina jest syntetyzowana z aminokwasu L-histydyny z udziałem enzymu dekarboksylazy histydynowej oraz kofaktora fosforanu pirydoksalu [3,4,5]. Jej biosynteza ma miejsce głównie w mastocytach, bazofilach, neuronach histaminergicznych w zwojach podstawy mózgu oraz komórkach enterochromafinopodobnych (ECL) żołądka. W znacznie mniejszym stopniu synteza histaminy zachodzi w komórkach T, komórkach dendrytycznych, płytkach krwi, komórkach epitelialnych oraz makrofagach [6,7]. Histamina magazynowana jest w ziarnistościach mastocytów i granulocytów zasadochłonnych [8,9]. Na rycinie 1 przedstawiono wzór strukturalny cząsteczki histaminy.



Rycina 1. Wzór strukturalny histaminy

1.1.2 Działanie poprzez receptory histaminowe

Działanie histaminy odbywa się poprzez cztery typy receptorów histaminowych: receptor H₁, H₂, H₃ i H₄, które należą do rodziny receptorów sprzężonych z białkiem G, a także charakteryzują się podobną strukturą molekularną i mechanizmem aktywacji [10,11]. Pierwszym opisanym receptorem histaminowym był receptor H₁, który odgrywa kluczową rolę w chorobach alergicznych oraz zapalnych. Receptory H₁ są zlokalizowane w mięśniach gładkich naczyń krwionośnych i dróg oddechowych, hepatocytach, chondrocytach, komórkach śródbłonna, komórkach dendrytycznych, neutrofilach, monocytach, limfocytach T oraz B, a efekty ich działania to przede wszystkim: skurcz mięśni gładkich, skurcz oskrzeli, rozszerzenie i zwiększenie przepuszczalności naczyń, świąd, zwiększone wydzielanie lepkiego śluzu w drogach oddechowych. [12,13].

Receptor H2 zlokalizowany jest w komórkach okładzinowych żołądka, neutrofilach, monocytach, limfocytach T i B, komórkach serca, macicy, oraz komórkach OUN, a jego działanie wyraża się poprzez zwiększenie wydzielania soku żołądkowego przez komórki okładzinowe żołądka, zwiększenie wydzielania śluzu oskrzelowego, rozkurczenie mięśni gładkich, hamowanie aktywacji neutrofilów i osłabianie chemotaksji, rozszerzenie naczyń krwionośnych, zahamowanie syntezy cytokin [14,15]. Kolejnym opisanym receptorem był receptor H3, związany z procesem neurotransmisji i zlokalizowany w komórkach ośrodkowego (OUN) oraz obwodowego układu nerwowego, komórkach płuc, serca, komórkach śródbłonna oraz układu pokarmowego. H3 uczestniczy także w modulacji pobudzenia, procesów uczenia się i pamięci oraz przyjmowania pokarmu [16]. Z kolei w procesach immunologicznych organizmu bierze udział receptor H4, występujący w komórkach hematopoetycznych, komórkach dendrytycznych, eozynofilach, fibroblastach, mastocytach i monocytach, komórkach NK tj. Natural Killer, neutrofilach, limfocytach T oraz B, komórkach śledziony, okrężnicy, grasicy, leukocytach, w szpiku kostnym. Oprócz roli w procesach zapalnych i immunologicznych, H4 odgrywa również rolę w procesie modulacji bólu [17,18].

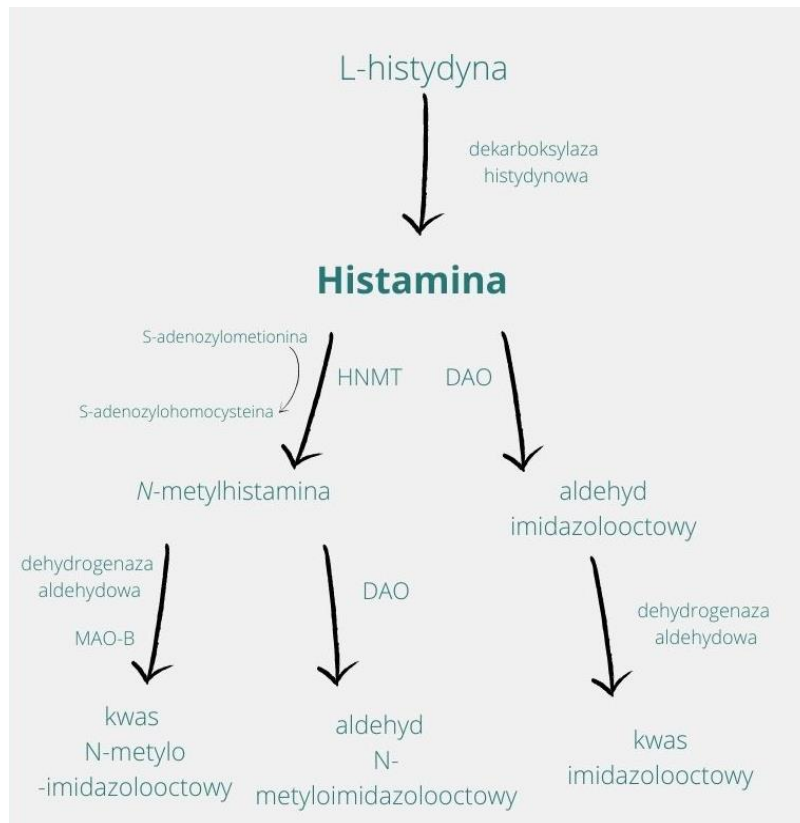
1.1.3 Uwalnianie histaminy

Uwalnianie magazynowanej histaminy odbywa się na trzy sposoby. Za najważniejszy z nich uważa się mechanizm stymulacji immunologicznej, gdzie histamina z ziarnistości komórek tucznych i bazofili uwalniana jest po przyłączeniu antygeny tj. immunoglobuliny E (IgE) do receptorów $Fc\epsilon RI$ znajdujących się na powierzchni degranulowanych komórek. Po przyłączeniu antygeny dochodzi do aktywacji fosfolipazy $C\gamma$, kinazy białkowej C oraz zwiększonej mobilizacji wapnia, co w rezultacie powoduje degranulację. [19,20] Histamina może także zostać uwolniona na drodze degranulacji fragmentarycznej. Proces ten dotyczy mastocytów i bazofili, związany jest z transportem pęcherzykowym i zapoczątkowany przez działanie cytokin. W wyniku fuzji pęcherzyka wydzielniczego z pęcherzykiem zawierającym histaminę następuje przekazanie histaminy, a następnie transport do błony plazmatycznej w pęcherzyku i finalnie jej uwolnienie. System ten występuje także w nieco zmodyfikowanej wersji, kiedy pęcherzyki wydzielnicze tworzą specjalny kanał, którym zawartość ziarnistości zostaje przetransportowana do błony plazmatycznej. Kolejnym opisanym mechanizmem jest konstytutywne uwalnianie, które

polega na biernym transporcie histaminy do błony plazmatycznej komórki z wykorzystaniem białek transportowych lub pęcherzyków wydzielniczych [21].

1.1.4 Metabolizm histaminy

Histamina metabolizowana jest dwójako, w zależności od lokalizacji na drodze deaminacji lub metylacji. Deaminacja oksydacyjna katalizowana jest przez enzym diaminooksydazę (DAO). Białko DAO uwalniane jest do krążenia pod wpływem określonych sygnałów np. heparyny uwalnianej wraz z histaminą z aktywowanych mastocytów. DAO jest zatem odpowiedzialny za metabolizm histaminy uwalnianej poza komórkę. Najwyższą aktywność DAO wykazano w jelicie cienkim, okrężnicy wstępującej, nerkach oraz łożysku. Produktem reakcji z udziałem DAO jest aldehyd imidazoloctowy, który w kolejnej reakcji jest przekształcany w kwas imidazoloctowy z wykorzystaniem dehydrogenazy aldehydowej. Inny szlak metabolizowania histaminy to reakcja metylacji z udziałem enzymu N-metyltransferazy histaminy (HNMT) [22]. Występuje on w wielu tkankach, ale najwyższą ekspresję zaobserwowano w nerkach i wątrobie, w mniejszym stopniu w śledzionie, prostaty, jajniku, jelicie i rdzeniu kręgowym. HNMT jest białkiem cytozolowym, odpowiedzialnym za metabolizm histaminy wewnątrz komórki. W reakcji metylacji z udziałem HNMT donorem metylu jest S-adenozylometionina (która jest przekształcana w S-adenozylhomocysteinę) a powstałym produktem jest N-metylhistamina. N-metylhistamina jest wydalana wraz z moczem z organizmu lub podlega dalszym reakcjom: z udziałem monoaminooksydazy B (MAO-B) i dehydrogenazy aldehydowej przekształcana zostaje w kwas N-metyloimidazoloctowy lub podlega reakcji z udziałem DAO i zostaje przekształcona w aldehyd N-metyloimidazoloctowy [23,24]. Opisane reakcje syntezy i przemian histaminy przedstawiono schematycznie na rycinie 2.



Rycina 2. Schemat powstawania i metabolizowania histaminy [23,24]; modyfikacja autorki.

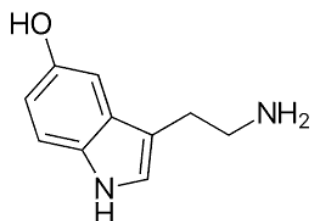
1.1.5 Wpływ histaminy na hematopoezę

Proces wytwarzania i różnicowania poszczególnych elementów morfotycznych krwi zachodzi w szpiku kostnym. Wszystkie te elementy wywodzą się z samoodnawialnej, wielopotencjalnej komórki macierzystej (HSC), która daje początek komórkom progenitorowym: limfoidalnym i mieloidalnym. Badania na myszach wykazały, że komórki progenitorowe wykazywały ekspresję receptora H4, którego aktywacja prowadziła do zahamowania cyklu komórkowego indukowanego przez czynnik wzrostu, a w konsekwencji do spowolnienia tworzenia kolonii mieloidalnej, limfoidalnej i erytroidalnej [25].

1.2 Serotonina

1.2.1 Wytwarzanie i magazynowanie

Serotonina jest aminą biogenną, której produkcja zachodzi w komórkach enterochromatofinowych (EC) przewodu pokarmowego (pula obwodowa), oraz komórkach szyszynki (pula centralna) [26,27]. Wzór strukturalny cząsteczki serotoniny przedstawiono na rycinie 3. Serotonina ma niewielką zdolność do przenikania bariery krew-mózg, zatem te dwie pule, odseparowane anatomicznie, działają w odrębny sposób [28]. Pula obwodowa jest wydzielana do krwi, skąd zostaje wychwytywana przez trombocyty za pomocą transportera serotoniny SERT, a następnie magazynowana w ich ziarnistościach (ciałkach) gęstych δ . Z kolei w komórkach nerwowych serotonina magazynowana jest w pęcherzykach w pobliżu błony presynaptycznej. Doniesienia badaczy sugerują, iż synteza i magazynowanie 5-HT może mieć miejsce także w innych komórkach, z uwagi na ekspresję SERT, hydroksylazy tryptofanowej 1 (TPH1, enzymu katalizującego reakcję syntezy serotoniny) lub obu tych związków jednocześnie. Ekspresję SERT wykazują m.in. mastocyty, prawdopodobnie komórki NK, limfocyty B i T, komórki dendrytyczne, eozynofile, a TPH1: mastocyty, makrofagi, limfocyty T [29,30]. Serotonina wytwarzana jest z aminokwasu L-tryptofanu (TRP) w reakcji katalizowanej przez enzym hydroksylazę tryptofanową (TPH). TPH występuje w dwóch izoformach- TPH1, której ekspresja zachodzi głównie w komórkach obwodowych oraz szyszynce, oraz TPH2, która wykazuje ekspresję w jądrach szwu [31,32,33]. W reakcji katalizowanej przez TPH powstaje 5-hydroksytryptofan (5-HTP), który ulega dekarboksylacji do serotoniny (5-HT).

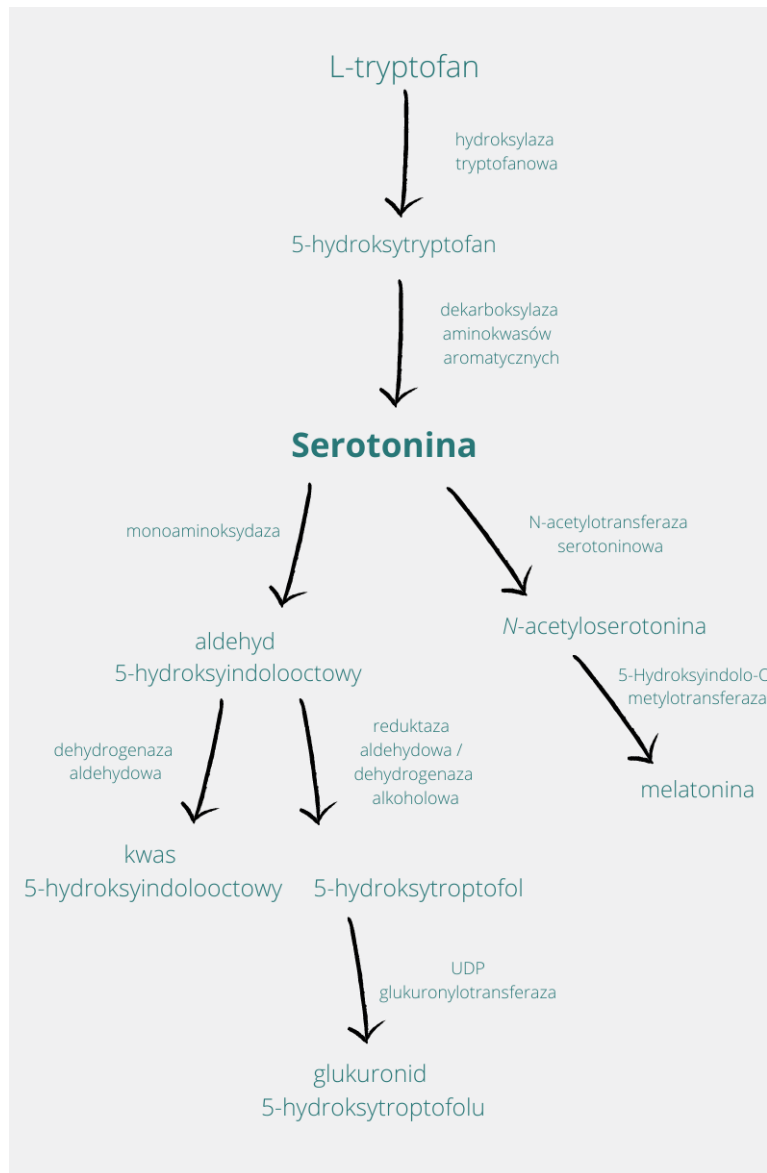


Rycina 3. Wzór strukturalny serotoniny

1.2.2 Metabolizm serotoniny

Metabolizm serotoniny zachodzi głównie z udziałem monoaminooksydaz (MAO), gdzie powstaje aldehyd kwasu 5-hydroksyindolooctowego (5-HIA), który jest następnie przekształcany w kwas 5-hydroksyindolooctowy (5-HIAA) w obecności dehydrogenazy aldehydowej (ALDH). 5-HIA może również ulegać reakcji z reduktazą aldehydową lub dehydrogenazą alkoholową, a produktem tej reakcji jest 5- hydroksytryptofol (5-HTOL). Produkt ten, w reakcji katalizowanej przez UDP glukuronylotransferazę zostaje przekształcony w glukuronid 5-hydroksytryptofolu (GTOL) [34]. Zarówno 5-HIAA, jak i GTOL są usuwane z organizmu wraz z moczem. Fizjologicznie głównym metabolitem serotoniny jest 5-HIAA, natomiast w przypadku spożywania alkoholu etylowego, metabolizm przesuwają się w stronę tworzenia 5-HTOL, proporcjonalnie do przyjętej dawki. Fakt ten został wykorzystany w opracowywaniu procedury analitycznej wykorzystującej biomarkery do oceny częstości spożywania alkoholu etylowego. Określenie stosunku 5-HTOL/5-HIAA jest jednym ze wskaźników niedawnej konsumpcji etanolu [35]. Reakcje metabolizowania serotoniny zachodzą w enterocytach, hepatocytach i neuronach OUN [36,37,38].

Serotonina może również ulegać przemianom do melatoniny w szyszynce w obecności enzymu N-acetylotransferazy serotoninowej. Produktem pośrednim jest N-acetyloserotonina (NAS), która następnie ulega reakcji katalizowanej przez O-metylotransferazę hydroksyindolową (HIOMT), a produktem tej reakcji jest melatonina [34]. Syntezę i przemiany serotoniny przedstawiono schematycznie na rycinie 4.



Rycina 4. Schemat powstawania i metabolizmu serotoniny [34]; modyfikacja autorki.

1.2.3 Uwalnianie serotoniny

Zsyntetyzowana w komórkach EC serotonina jest przenoszona do ich chromatofilnych ziarnistości wydzielniczych z wykorzystaniem pęcherzykowego transportera monoamin-izoforma 1 (VMAT1) [39,40]. Uwalnianie serotoniny jest fizjologicznie związane z perystaltyką jelit oraz poposiłkowym wydzielaniem trzustkowym i zachodzi na drodze egzocytozy [41]. Z kolei serotonina wytworzona w neuronach jest przenoszona do pęcherzyków synaptycznych z udziałem transportera monoamin -izoforma 2 (VMAT2)

[42]. Z pęcherzyków wydzielana jest dalej do szczeliny synaptycznej na drodze egzocytozy. W odpowiedzi na pobudzenie neuronu, następuje depolaryzacja błony presynaptycznej jako jeden z etapów potencjału czynnościowego, dalej fuzja pęcherzyka z błoną i finalnie uwolnienie serotoniny. Natomiast z płytek krwi serotonina zostaje uwolniona po ich aktywacji w odpowiedzi na czynniki takie jak trombina, tromboksan A2, kolagen czy adenozyntrifosforan (ATP) [43].

1.2.4 Działanie serotoniny

Umiejscowione na błonie komórkowej receptory serotoninowe stanowią punkt pośredniczący w działaniu biologicznym serotoniny. Zbadano i opisano jak dotąd, 7 typów receptorów serotoninowych, które zostały podzielone na podtypy. Porównanie występowania poszczególnych receptorów ujęto w formie tabeli (tabela 1). Serotonina działając na podtypy receptorów serotoninowych znajdujących się w przewodzie pokarmowym pośredniczy w funkcjach takich jak perystaltyka, odczuwaniu nudności, bólu i rozszerzeniu naczyń [44]. Większość procesów behawioralnych i neuropsychologicznych jest modulowanych właśnie przy udziale serotoniny, np. zachowania seksualne, pamięć, agresja, nastrój, apetyt czy uwaga [45]. Poprzez receptor 5HT_{2A}, który znajduje się m.in. na trombocytach, serotonina wpływa na proces agregacji płytek krwi, biorąc tym samym udział w procesie hemostazy. Serotonina bierze także udział w regulacji metabolizmu lipidów, regulacji glikemii, termoregulacji oraz odgrywa istotną rolę w procesach odpowiedzi immunologicznej tj. wzmacnia wydzielanie cytokin prozapalnych: interleukiny 1 i 6, a także wzmacnia fagocytozę [46]. W układzie sercowo-naczyniowym bierze udział w procesach kurczliwości serca, remodelingu sercowo-naczyniowym, wazodylatacji i wazokonstrykcji [47].

Receptor	Lokalizacja				
	ośrodkowy układ nerwowy	układ sercowo- naczyniowy	przewód pokarmowy	obwodowy układ nerwowy	trombocyty
5-HTR1	+	+			
5-HTR2	+	+	+	+	+
5-HTR3	+		+	+	
5-HTR4	+	+	+	+	
5-HTR5	+				
5-HTR6	+				
5-HTR7	+	+	+	+	

Tabela 1. Porównanie rozmieszczenia poszczególnych receptorów serotoninowych [46].

1.2.5 Wpływ serotoniny na hematopoezę

Serotonina wpływa na komórki megakariocytarne, promując ich mitogenezę poprzez 5-HTR2, a także wywiera antyapoptyczny wpływ na megakariocytową linię komórkową. Badania na myszach dotyczące wpływu 5-HT na linię erytroidalną wykazały, że u młodych dorosłych osobników z obwodowym niedoborem serotoniny rozwinęła się niedokrwistość makrocytowa z powodu nieskutecznej erytropoezy, utrudnionego różnicowania prekursorów i skrócenia przeżycia dojrzałych erytrocytów [48]. Wykazano również, że brak serotoniny powoduje zahamowanie różnicowania się prekursorów linii erytroidalnej u ludzi. Dodatkowo wykazano, że proerytroblasty są lokalnym (szpikowym) źródłem serotoniny [49].

1.3 Charakterystyka fizykochemiczna histaminy i serotoniny

Właściwości substancji stanowią istotny element w analizie chemicznej, m.in. doborze odpowiednich rozpuszczalników oraz parametrów pracy analizatora. Poniżej zaprezentowano wybrane właściwości chemiczne oraz fizyczne histaminy i serotoniny (tabela 2).

l.p	Parametr	Histamina	Serotonina
1	Wzór sumaryczny	C ₅ H ₉ N ₃	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O
2	Masa molowa	111,15 Da	176,21 Da
3	Rozpuszczalność	woda, metanol, etanol, gorący chloroform	woda, metanol, etanol
4	Rozpuszczalność w wodzie	25,5 mg/ml	34 mg/ml
5	pKa 1	5,9	9,1
6	pKa 2	9,7	9,8
7	logP	-0,7	0,2
8	Temperatura wrzenia	86 °C	167.5 °C
9	Temperatura topnienia	209-210 °C	416 °C
10	Masa monoizotopowa	111.079647300 Da	176.094963011 Da
11	Moment dipolowy	4.48 ± 1.08 D	1.46 ± 1.08 D
12	Polarność	silnie polarna	polarna

Tabela 2. Zestawienie wybranych właściwości fizykochemicznych serotoniny i histaminy [50,51,52,53,54].

1.4 Szpik kostny

1.4.1 Występowanie i budowa szpiku kostnego

Szpik kostny jest silnie ukrwioną tkanką o gąbczastej strukturze, która wypełnia jamy szpikowe w części centralnej kości długich oraz przestrzenie międzybeleckowe jam gąbczastych w nasadach. Wyróżnia się dwa rodzaje szpiku kostnego: żółty- nieczynny hematopoetycznie, w którym przeważają adipocyty, oraz czerwony o właściwościach krwiotwórczych, w którym stosunek komórek hematopoetycznych do adipocytów jest większy. U osób dorosłych szpik czerwony występuje tylko w kościach płaskich takich jak np. mostek czy miednica oraz nasadach kości długich takich jak np. kość udowa czy ramienna, a we wszystkich pozostałych kościach występuje szpik żółty. W okresie płodowym i u noworodka we wszystkich kościach występuje szpik kostny czerwony [55,56]. Szpik pod względem architektonicznym dzieli się na dwa przedziały: śródnaczyniowy i pozanaczyniowy (zatokowy). W skład zrębu przedziału śródnaczyniowego wchodzi tkanka siateczkowata, adipocyty, makrofagi, osteoblasty oraz komórki krwiotwórcze, które tworzą wyspy zawieszane w oczkach sieci utworzonej przez tkankę siateczkowatą, a przedział zatokowy stanowią naczynia zatokowe szpiku [57].

1.4.2 Funkcje szpiku kostnego

Podstawową funkcją szpiku kostnego (czerwonego) jest wytwarzanie elementów morfotycznych. Samoodnawialne krwiotwórcze komórki macierzyste dzielą się i różnicują się tworząc poszczególne linie komórkowe. Pierwszym etapem jest zróżnicowanie na komórki macierzyste mieloidalne i limfoidalne, które różnicując się dalej tworzą poszczególne elementy morfotyczne krwi [58]. Dojrzałe komórki opuszczają szpik kostny pokonując barierę szpik-krew. Dzieje się to dzięki obecności akwaporyny i glikoporyny, dzięki którym komórki mogą przyłączyć się i przedostać przez śródbłonek naczyń krwionośnych szpiku [59]. Szpik pełni również funkcję centralnego narządu limfatycznego. Z progenitorowej komórki limfoidalnej obecnej w szpiku powstają i różnicują się komórki układu limfatycznego takie jak limfocyty B, komórki Natural Killer (NK) oraz prekursorzy limfocytów T. Szpik, tak jak śledziona, jest magazynem limfocytów pamięci T, a dokładniej CD8 T_{CMs} [60,61,62,63,64]. Szpik pełni również funkcję magazynu adipocytów, a precyzyjniej adipocytowej tkanki szpiku kostnego (BMAT),

która najprawdopodobniej wpływa na metabolizm energetyczny całego organizmu, aczkolwiek jej dokładna funkcja nie została jeszcze w pełni zbadana i opisana. [65,66]. Badacze sugerują wpływ BMAT na hematopoezę oraz wpływ na proces przebudowy kości poprzez wydzielanie cytokin [67,68]. Rezerwuarem BMAT jest głównie szpik kostny żółty, w którym tkanka ta zajmuje nawet do 90% powierzchni szpiku [69].

1.4.3 Szpik kostny jako materiał diagnostyczny

Pobieranie szpiku jest procesem inwazyjnym, aczkolwiek informacje uzyskane podczas badań uzyskanego aspiratu stanowią kluczowy element w diagnostyce i leczeniu chorób hematologicznych. Zalecanym miejscem poboru szpiku kostnego, zarówno w przypadku biopsji aspiracyjnej jak i trepanobiopsji (pobrania wraz z fragmentem kości) jest górny, tylny koniec biodrowy. Zabieg wykonywany jest z zachowaniem zasad aseptyki z zastosowaniem znieczulenia miejscowego- znieczulenie nasiękowe tkanek podskórnych oraz okostnej. Po wprowadzeniu igły w przygotowane miejsce następuje usunięcie mandryna i przyłączenie strzykawki w celu pobrania aspiratu [70]. Pobrane próbki szpiku analizuje się oceniając preparaty mikroskopowe, wykonując badania cytochemiczne, immunofenotypowanie i badania genetyczne.

1.5. Choroby hematologiczne

1.5.1 Podział nowotworów układu krwiotwórczego

Obowiązujący podział nowotworów układu krwiotworzenia został opracowany przez Światową Organizację Zdrowia WHO i opublikowany w 2016 roku (rycina 5)

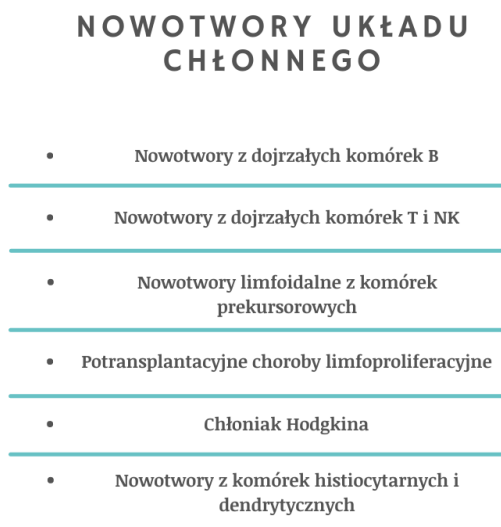
NOWOTWORY UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

- Nieokreślony typ histologiczny
- Nowotwory mieloproliferacyjne
- Mastocytoza
- Nowotwory mieloidalne lub limfoidalne z eozynofilią i rearanżacją PDGFRA, PDGFRb lub FGFR1, lub PCMI-JAK2
- Nowotwory mielodysplastyczno-mieloproliferacyjne
- Zespoły mielodysplastyczne
- Nowotwory mieloidalne związane z predyspozycjami dziedzicznymi
- Ostra białaczka szpikowa i pokrewne nowotwory
- Ostra białaczka szpikowa z powtarzalnymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi
- Ostra białaczka szpikowa z mutacjami genowymi
- Ostra białaczka szpikowa z cechami zależnymi od mielodysplazji
- Nowotwory mieloidalne zależne od terapii
- Ostra białaczka szpikowa bliżej nieokreślona
- Mięsak mieloidalny
- Nowotwór blastyczny z plazmacytoidnych komórek dendrytycznych
- Ostra białaczka o nieokreślonym pochodzeniu liniowym
- Mieloproliferaacje związane z zespołem Downa

Rycina 5. Podział nowotworów układu krwiotwórczego WHO z roku 2016 [71].

1.5.2 Podział nowotworów układu limfatycznego

Obowiązujący podział nowotworów układu chłonnego został opracowany przez Światową Organizację Zdrowia WHO i opublikowany w 2016 roku (rycina 6).



Rycina 6. Podział nowotworów układu limfatycznego WHO z roku 2016 [72].

1.5.3 Nowotwory mieloproliferacyjne

Nowotwory mieloproliferacyjne cechuje proliferacja jednej lub więcej linii krwiotworzenia. W stadiach początkowych szpik jest bogatokomórkowy, zawiera zwiększoną liczbę komórek prawidłowo dojrzewających z poszczególnych linii, co przekłada się na wzrost liczby danych komórek we krwi obwodowej. Z czasem, wraz z postępem choroby, może dojść do transformacji blastycznej, nieefektywnej hematopoezy czy włóknienia podścieliska szpiku. Grupa ta obejmuje następujące jednostki chorobowe: przewlekłą białaczkę szpikową BCR-ABL1-dodatnią, przewlekłą białaczkę neutrofilową, czerwienicę prawdziwą, pierwotną mielofibrozę, nadpłytkowość samoistną, przewlekłą białaczkę eozynofilową, niesklasyfikowany nowotwór mieloproliferacyjny [71,73,74].

1.5.4 Zespoły mielodysplastyczne

W zespołach mielodysplastycznych obserwuje się cytopenie obwodowe spowodowane nieefektywną proliferacją oraz zaburzeniami apoptozy komórek, występuje dysplazja w jednej lub więcej linii komórkowej oraz nieefektywna hematopoeza. Zespoły mielodysplastyczne mogą z czasem transformować w ostrą białaczkę szpikową [71,75].

1.5.5 Ostre białaczki

Ostre białaczki szpikowe charakteryzują się obecnością w szpiku kostnym niedojrzałych blastów, pochodzących ze zmienionej nowotworowo prekursorowej komórki mieloidalnej. Manifestacja choroby w obrazie krwi przejawia się niedokrwistością, małopłytkowością i neutropenią [76]. Z kolei ostre białaczki limfoblastyczne charakteryzują się obecnością nacieków z komórek limfoblastycznych w szpiku, krwi obwodowej i narządach. Tworzące je komórki wywodzą się ze zmienionej nowotworowo komórki prekursorowej limfocytów [77,78].

1.5.6 Mastocytoza

Cechuje się nadmierną proliferacją klonalną zmienionych morfologicznie i immunofenotypowomastocytów. Komórki te tworzą skupiska w szpiku kostnym, narządach takich jak np. śledziona, wątroba oraz w skórze. Mastocytoza jest chorobą rzadką, występowanie szacuje się na 5-10 przypadków na milion osób w skali roku. Poprzednio klasyfikowano ją do grupy nowotworów mieloproliferacyjnych, jednak w obowiązującym podziale WHO z 2016 została wyodrębniona jako oddzielna grupa, z uwagi na różnice morfologiczne, molekularno-cytogenetyczne względem chorób takich jak np. przewlekła białaczka szpikowa czy czerwienica prawdziwa [79].

Mastocytoza w przebiegu i manifestacji klinicznej może ograniczać się do zmian skórnych (mastocytoza skórna- CM) lub obejmować organy wewnętrzne (mastocytoza układowa-SM). Objawy związane są z dysfunkcją zajętego narządu, natomiast u większości pacjentów obserwuje się także objawy zależne od uwalniania mediatorów z mastocytów tj. histaminy i cytokin biorących udział w reakcjach zapalnych.

Diagnostyka opiera się na ocenie bioptatu szpiku, badaniach immunohistochemicznych mastocytów szpikowych, ich immunofenotypowaniu, ocenie aktywności tryptazy w surowicy oraz badań przesiewowych na obecność mutacji D816V *KIT* [80].

1.6 Metody analityczne – spektrometria mas

Ciągły postęp w analizie instrumentalnej zwiększa dostęp do zaawansowanych metod analitycznych, możliwych do zastosowania także w medycznych laboratoriach diagnostycznych. Wiele laboratoriów posiada na wyposażeniu oprócz typowych, automatycznych analizatorów biochemicznych także urządzenia wymagające większej ingerencji użytkownika na etapie przygotowania próbek czy interpretacji wyników (np. cytometry przepływowe, spektrofotometry). Aczkolwiek wciąż najpowszechniej wykorzystywane są techniki immunologiczne, to w ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania bogatą ofertą w zakresie metod referencyjnych. Jedną z bardziej zaawansowanych technik analitycznych o pełnej specyfikacji metody referencyjnej jest chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Technika ta, mimo zaawansowanej konstrukcji, zyskuje coraz większe zainteresowanie wobec bogatej oferty komercyjnej, często już zwalidowanych przez oferenta zestawów, obejmujących nie tylko same urządzenie, ale także dedykowane noty aplikacyjne i gotowe do użycia zestawy odczynnikowe umożliwiające prowadzenie analiz rutynowych.

W uproszczeniu, technika LC-MS polega na chromatograficznym rozdziale złożonych mieszanin związków biologicznie aktywnych, a następnie ich identyfikacji w formie izolowanej na odpowiednio dobranym analizatorze mas. Typowy zestaw aparaturowy obejmuje dwa niezależne elementy funkcjonalne: chromatograf cieczowy oraz spektrometr mas. Sam spektrometr mas składa się z kolei z trzech elementów funkcjonalnych: źródła jonów, analizatora (filtr masowy) oraz detektora. W praktyce wykorzystuje się najczęściej jonizację elektronami (EI – w sprzężeniu z chromatografem gazowym) oraz elektrorozpylanie (ESI – w sprzężeniu z chromatografem cieczowym). W niektórych zestawach, takich jak ten stosowany w procedurach identyfikacji mikroorganizmów, wykorzystuje się specyficzną metodę desorpcji laserowej z udziałem matrycy (MALDI) [81]. Natomiast do najczęściej stosowanych analizatorów mas zaliczyć należy analizator czasu przelotu (TOF), kwadrupolowy filtr masowy (Q), pułapkę jonową (IT).

Aczkolwiek rozdział chromatograficzny i detekcja w układzie analizatora pojedynczego pozwala na swobodne oznaczenia i uzyskanie dobrych wyników analizy, to jednak niezastąpione miejsce w analityce znalazły tzw. układy tandemowe, w których identyfikacja analitu dokonuje się w trzech analizatorach sprzężonych w jeden układ pomiarowy. Rozwiązanie takie znacząco zwiększa selektywność i czułość oznaczeń, szczególnie w przypadku analiz prowadzonych w bardzo złożonych matrycach takich jak materiał biologiczny. Analizator tandemowy wprowadza dodatkowy element rozdzielczy, niezależnie od samego rozdziału chromatograficznego, umożliwiając bardzo wąską selekcję określonych mas analitów, w pierwszym układzie kwadrupolowego filtra masowego, następnie ich fragmentację (najczęściej kolizyjną z gazem obojętnym) na drugim stopniu kolejnego kwadrupola i ostatecznie rejestrację produktów fragmentacji w stopniu trzecim [82]. Zaletą takiego rozwiązania jest niewątpliwie możliwość analizy związku przy jego niedostatecznym rozdziale na kolumnie chromatograficznej względem tła matrycowego, z czym mamy do czynienia stosunkowo często w przypadku analiz materiału biologicznego. Z drugiej strony zwrócić należy uwagę, że aczkolwiek sama konstrukcja układu tandemowego pozwala na izolację wybranych jonów od sygnałów tła, to jednak zbyt silne tło matrycy, niedostatecznie rozdzielonej na kolumnie chromatograficznej wpływa negatywnie na jonizację analitu (tzw. supresja jonu), w konsekwencji maleje intensywność rejestrowanego sygnału i to niezależnie od rzeczywistego stężenia analitu w próbce. Zjawisko to wydaje się być często błędnie pomijane na etapie walidacji metody. Nawet najbardziej wydajny, wysokorozdzielczy układ tandemowy nie rozwiązuje problemów wynikających ze zjawisk zachodzących na pierwszym etapie jonizacji próbki w źródle jonów [83].

Zależnie od rodzaju trzeciego analizatora, użytego w układzie tandemowym, możliwa jest rejestracja pełnych widm w szerokim zakresie mas (np. analizator typu TOF czy LIT) lub też jedynie wybranych jonów pokolizyjnych (analizator kwadrupolowy). Pierwszy tryb skanowania umożliwia precyzyjną identyfikację jakościową, najczęściej z wykorzystaniem dedykowanych widmowych baz danych, drugi natomiast stosowany jest w analizie ilościowej, gdy wymagany jest niski poziom detekcji (tzw. tryb MRM czyli rejestracji wybranych jonów fragmentacyjnych) [84]. Aczkolwiek urządzenia dedykowane do oznaczeń jakościowych mogą pracować w trybie rejestracji wybranych jonów fragmentacyjnych (analiza ilościowa), to jednak rozwiązania takie cechuje zwykle

mniejszy zakres dynamiczny oznaczeń (zachowanie liniowości w stosunkowo wąskim przedziale stężeń).

Największe znaczenie w analizach biomedycznych zyskały układy sprzężone typu potrójny kwadrupol (QqQ) oraz podwójny kwadrupol z analizatorem czasu przelotu (QqTOF). Niestety rozbudowane układy tandemowe pomimo olbrzymich zalet są układami kosztownymi, a ich użytkowanie wymaga dużego doświadczenia analityka. Nie są to układy pozbawione wad, które ujawniają się na etapie walidacji konkretnych oznaczeń. Szczególnie czasochłonne są procedury walidacyjne oznaczeń ilościowych, wymagające wykonania wielu powtórzeń, wieloparametrycznej optymalizacji poszczególnych elementów funkcjonalnych układu, oceny zjawiska supresji, uwzględnienia drogich deuterowanych standardów wewnętrznych. Tym nie mniej, tandemowe spektrometry mas znalazły zastosowanie w badaniach rutynowych, między innymi w badaniach przesiewowych noworodków w kierunku wrodzonych wad metabolizmu, terapii monitorowanej leków, w oznaczeniach ilościowych substancji psychoaktywnych, identyfikacji ksenobiotyków w laboratoryjnej diagnostyce zatruc [85].

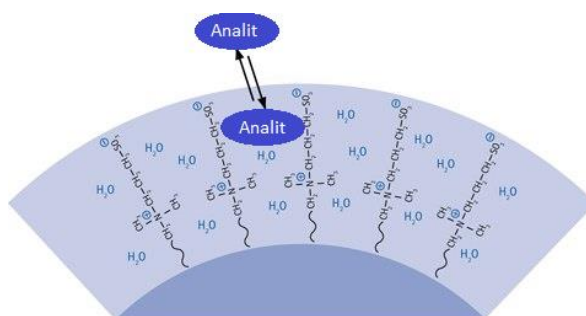
1.6.1 Chromatografia oddziaływań hydrofilowych

Opracowanie metody analitycznej w układach typu LC-MS/MS w ogromnej większości obejmuje optymalizację detektora mas przy nieco ograniczonej ingerencji w układ chromatograficzny. Wynika to niewątpliwie z faktu, iż dostępne obecnie kolumny chromatograficzne cechuje pewna uniwersalność, aczkolwiek związki o skrajnych właściwościach hydrofilowo-hydrofobowych, wymagają zastosowania dedykowanych wypełnień o zmodyfikowanej powierzchni złoża adsorpcyjnego. Przykładem specyficznego przeznaczenia kolumn chromatograficznych są konstrukcje oparte o chromatografię oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Rozwiązania te wykorzystywane są stosunkowo rzadko, jednak są zalecane w przypadku analizy chromatograficznej związków o charakterze silnie polarnym. Technika ta obejmuje zarówno elementy chromatografii w normalnym układzie faz (sorbent), odwróconym układzie faz (eluent), jak i wymiany jonowej (anality). W HILIC wypełnienia kolumn chromatograficznych są polarne (najczęściej modyfikowany żel krzemionkowy), a fazę ruchomą stanowią rozpuszczalniki organiczne, z dodatkiem buforu o dobranym do danej aplikacji odczynie pH. Mechanizm retencji polega na podziale polarnych analitów między eluent a warstwę bogatą w wodę,

która tworzy się na powierzchni fazy stacjonarnej (rycina 7). Im bardziej hydrofilowy analit, tym bardziej równowaga podziału fazowego przesunięta jest w kierunku warstwy wodnej, co skutkuje jego silniejszą retencją [86,87,88]. Co ciekawe, aczkolwiek układy tego rodzaju wykorzystywane są z powodzeniem w wielu aplikacjach, to pomimo licznych prób badaczom nie udało się do końca wyjaśnić wszystkich procesów chemicznych warunkujących skuteczność rozdziału chromatograficznego. Opracowując metodę w tym układzie należy zwrócić uwagę na kilka ważnych elementów, wynikających z odmiennej charakterystyka złoża i zachodzących na nim procesów, w stosunku do powszechnie stosowanych wypełnień typu C18. Po pierwsze, wysoki początkowy udział rozpuszczalnika organicznego w gradiencie (najczęściej 90% acetonitrylu), który w tym układzie wykazuje słabą siłę elucji w stosunku do związków polarnych. Po drugie, odtworzenie stanu równowagowego pomiędzy fazą ruchomą a stacjonarną wymaga stosunkowo długiego czasu kondycjonowania kolumny. Ma to szczególne znaczenie w przypadku kolumn dłuższych gdzie skuteczne kondycjonowanie może wymagać dłuższego czasu niż sam rozdział chromatograficzny. Długie kondycjonowanie wymagane jest bezwzględnie w przypadku nawet niewielkiej zmiany odczynu pH fazy ruchomej czy choćby dłuższych przerw pomiędzy seriami pomiarowymi. Odpowiednia sprawność kolumny osiągnana jest zwykle po przejściu 3 do 5 gradientów stosowanych w danym oznaczeniu, co w praktyce wymaga kondycjonowania poprzez pomiar serii próbek zerowych przed oznaczaniem próbek właściwych (np. sam rozpuszczalnik zamiast próbki). Wskazuje się także na mniejszą powtarzalność czasów retencji analitów w porównaniu do typowych wypełnień C18 [89,90]. Po dużych doświadczeniach własnych z wykorzystaniem tego układu wydaje się, że większość z opisywanych problemów wynika z trzech elementów. Po pierwsze posiadanych nawyków w pracy z kolumnami z wypełnieniem C18. Układ HILIC wymaga znacznie większej cierpliwości i poświęcenia niewspółmiernie dłuższego czasu dla ustalenia odpowiednich parametrów rozdziału. Preferowane winny być raczej dłuższe gradienty rozpuszczalnikowe, a jego modyfikacje dokonywać należy stopniowo wprowadzając jedynie niewielkie zmiany. Po drugie, niedostatecznego kondycjonowania kolumny, szczególnie po dłuższej przerwie w oznaczeniach. O ile po typowym przejściu gradientu na kolumnie typu C18 kolumna będzie odpowiednio kondycjonowana po upływie 2-3 minut, tak w przypadku układu HILIC niezbędny jest dwu- a nawet trzykrotnie dłuższy czas, zależnie od użytego modelu kolumny. Po trzecie, niezwykle ważne jest zachowanie dokładnie tego samego odczynu pH w obu fazach składowych eluentu. Już niewielkie różnice w ilości buforu mogą

skutkować znacznymi zmianami w obrazie chromatograficznym. Zachowanie proporcji składowych jest tak bardzo istotne, że znaczenie może mieć higroskopijny charakter acetonitrylu i nieco zwiększony udział wody w składowej acetonitrylowej gradientu faz.

Pomimo wielu wad opisywanego układu wydaje się, że warto rozważyć jego zastosowanie w przypadku silnie polarnych analitów, których skuteczny rozdział na klasycznej kolumnie typu C18 bywa niezadowalający.



Rycina 7. Schemat podziału analitów między warstwę bogatą w wodę i eluent w układzie HILIC [88].

1.6.2 Elektrozpylanie

Jedną z najczęściej stosowanych metod jonizacji przy rozdziale z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej jest metoda elektrozpylania (ESI). Analit w stanie ciekłym po elucji z kolumny chromatograficznej zostaje wprowadzony do źródła jonów poprzez metalową kapilarę, do której przyłożone jest odpowiednie napięcie. Pod wpływem zachodzących w źródle zjawisk fizykochemicznych, przy udziale strumienia gazu osuszającego, różnicy potencjałów i wysokiej temperatury, dochodzi do odparowania rozpuszczalnika z wytworzeniem mikro-kropli, których objętość maleje. Malejąca objętość przy jednoczesnym zwiększaniu gęstości ładunku elektrycznego, prowadzi ostatecznie do wytworzenia jonów pseudo-molekularnych, z cząsteczki analitu o ładunku obojętnym powstają jony o ładunku dodatnim (addycja protonu) bądź ujemnym (dysocjacja protonu) [91].

Wytworzenie jonowej formy związku chemicznego jest kluczowym etapem warunkującym skuteczność pomiaru w spektrometrze mas, dlatego też szczególnie ważna jest odpowiednia

konstrukcja źródła i zastosowanie odpowiednich mieszanin buforowych w eluencie. Z uwagi na zasadę tworzenia jonów w źródle, zależnie od budowy chemicznej analitów, rozważyć należy pomiar przy odpowiednim potencjale elektrycznym (tryb skanowania jonów dodatnich bądź jonów ujemnych). Aczkolwiek raczej większość z analizowanych związków biologicznie aktywnych ulega jonizacji dodatniej, poprzez addycje protonu do związków o charakterze zasadowym (analiza w potencjale ujemnym), to jednak związki dysocjujące z uwolnieniem protonu (np. typowo kwasy organiczne) wymagają analiz w potencjale dodatnim, nawet jeśli w strukturze cząsteczki obecne są inne centra reaktywne. O ile sama jonizacja z wytworzeniem jonu pseudo-molekularnego nie jest problematyczna i w przypadku związków zawierających heteroatom (azot, tlen, chlorowcopochodne) pozwala uzyskać zadowalające wyniki, to duży wpływ na proces jonizacji wykazuje współobecność innych związków w źródle w tym samym czasie, szczególnie obecnych w dużym stężeniu i o silnym charakterze jonowym. Zjawisko interferencji innych związków względem analitu określa się jako supresja jonu, skutkiem czego jest najczęściej obniżenie sygnału analitycznego choć zdarza się także jego zwielokrotnienie. Zjawisko to jest szczególnie problematyczne gdy wykazuje zmienne nasilenie wynikające ze zmienności składu matrycy (krew świeża, zdegradowana, pobrana na różne antykoagulanty, obecność różnych leków u różnych pacjentów). W takich przypadkach prowadzi ono do bardzo negatywnych następstw takich jak rejestracja sygnałów o różnej intensywności względem tego samego stężenia (brak powtarzalności lub liniowości oznaczeń) czy zawyżenia progu oznaczalności i w konsekwencji wyników fałszywie ujemnych w przypadku niskich stężeń analitu. Wpływ tego zjawiska na poprawność uzyskiwanych wyników może być w dużej mierze ograniczany poprzez zastosowanie deuterowanych wzorców wewnętrznych. Stanowią one analitycznie odpowiedniki badanych analitów, pod względem struktury i właściwości fizykochemicznych, z tą różnicą, że ich masa molowa jest zwiększona proporcjonalnie do ilości podstawionych deuterem atomów wodoru. Zwiększona masa pozwala na łatwe rozróżnienie spektralne analitu od wzorca wewnętrznego przy zachowaniu tych samych parametrów elucji z kolumny chromatograficznej. Tym samym wpływ zjawiska supresji zarówno na analit jak i wzorzec wewnętrzny jest dokładnie taki sam, co umożliwia stosowną korekcję odpowiedzi w relacji stężenie analitu – intensywność sygnału. Wzorce deuterowane analitów są dostępne w bardzo szerokim zakresie, aczkolwiek są one zwykle stosunkowo drogie, to ich zastosowanie w danej aplikacji nie powinno być problematyczne [92,93].

2. Założenia i cel pracy

Podstawowym badaniem w diagnostyce hematologicznej wciąż pozostaje morfologia krwi obwodowej, aczkolwiek ostateczne rozpoznanie i wdrożenie celowego leczenia wymaga wielu dodatkowych badań diagnostycznych, także w szpiku kostnym. Pomimo stosowanych obecnie w ośrodkach hematologicznych zaawansowanych technik laboratoryjnych, ostateczne rozpoznanie w niektórych przypadkach bywa utrudnione. Rozwój metod analitycznych umożliwiających identyfikację nowych biomarkerów, pozwala na wgląd w patomechanizm rozwoju wielu schorzeń na poziomie molekularnym, identyfikację kluczowych zmian i opracowywanie nowych metod diagnostycznych dla działań rutynowych. W trakcie podjętych już wcześniej przez autorkę badań szpiku (praca mgr. „Ocena profili proteomicznych szpiku u pacjentów z chorobami krwiotworzenia”), uwagę zwrócono na zmienne poziomy histaminy. Obserwacje te z uwagi na złożony charakter badanego materiału, zmienność grup badawczych oraz trudności w opracowaniu jakościowo-ilościowej metody analitycznej, wymagały oddzielnej, szczegółowej analizy i weryfikacji. Temat ten wydał się na tyle ciekawy, że w dostępnym piśmiennictwie brak jest danych odnośnie charakterystyki szpikowej tego parametru. Dodatkowo zauważono, że w ostatnim czasie pojawiały się doniesienia z bardziej szczegółową charakterystyką receptorów histaminowych, w tym ich istotnego wpływu na proces krwiotwórczy zachodzący w szpiku kostnym.

W ramach niniejszej pracy podjęto próbę oceny stężeń histaminy w szpiku w różnych stanach chorobowych pobieranego od pacjentów hospitalizowanych na oddziale hematologicznym. Jak wiadomo, głównym źródłem histaminy w formie związanej, są ziarnistości, przede wszystkim mastocytów, ale także granulocytów, których wytwarzanie zachodzi właśnie w szpiku kostnym. Z wielu doniesień wiadomo, że ziarnistości tych komórek oprócz histaminy, zawierają także pewne ilości serotoniny, dlatego też zasadnym było uwzględnienie także tej aminy biogennej w prowadzonych analizach. Zarówno histamina, jak i serotonina, pełnią różnorodne, często przeciwstawne funkcje w organizmie człowieka, także w procesie wytwarzania i różnicowania się elementów morfotycznych krwi, dlatego też łączne oznaczenie obu tych parametrów wydawało się uzasadnione.

Podjęte badania realizowano z wyznaczeniem trzech głównych celów badawczych:

- Opracowanie selektywnej procedury analitycznej dla ilościowo-jakościowego, łącznego oznaczania histaminy i serotoniny w szpiku kostnym z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.
- Ocena stężenia histaminy i serotoniny w szpiku kostnym pacjentów hematologicznych z podziałem na sześć grup: nowotwory mieloproliferacyjne, zespoły mielodysplastyczne, ostre białaczki, choroby limfoproliferacyjne, inne choroby hematologiczne bez cech nowotworzenia, mastocytoza.
- Ocena korelacji wyznaczonych stężeń histaminy i serotoniny w szpiku kostnym z parametrami morfologii krwi obwodowej, u pacjentów z chorobami hematologicznymi.

3. Materiał i metody

3.1 Materiał biologiczny i dane kliniczne

Szpik kostny pobierano od pacjentów Kliniki Hematologii, Onkologii i Radioterapii Uniwersytetu Zielonogórskiego Wielospecjalistycznego Szpitala Wojewódzkiego w Gorzowie Wielkopolskim (kierownik: dr hab. n. med. Katarzyna Brzeźniakiewicz-Janus). Badania przeprowadzono zgodnie ze standardami bioetycznymi (zgoda Komisji Bioetycznej nr KB-0012/54/14, zgoda Dyrekcji Szpitala). Pobranie stanowiło standardową procedurę w procesie diagnostyki, materiał pobierano metodą biopsji aspiracyjnej do próbek typu Monovette z dodatkiem antykoagulantu wersenianu potasowego (EDTA KE). Pozostałość szpiku po wykorzystaniu w ramach rutynowej diagnostyki, zabezpieczano, kodowano i transportowano do Zakładu Toksykologii Klinicznej i Sądowej PUM w Szczecinie (kierownik: prof. dr hab. n. med. Krzysztof Borowiak). Do czasu oznaczeń próbki były przechowywane w temp. $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$. Wyniki stężenia histaminy i serotoniny, uzyskane opracowaną metodą analityczną, skorelowano z wynikami morfologii krwi obwodowej pacjentów z dnia przyjęcia na oddział oraz rozpoznaniem jednostki chorobowej. W analizie statystycznej uwzględniono podstawowe parametry morfologii krwi tj. liczbę krwinek białych (WBC), procentowy skład leukocytów, liczbę krwinek czerwonych (RBC), liczbę płytek krwi (PLT), wartości hematokrytu (Ht), stężenie hemoglobiny (Hb), średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią wagę hemoglobiny w krwince (MCH), średnie stężenie hemoglobiny w krwinkach (MCHC).

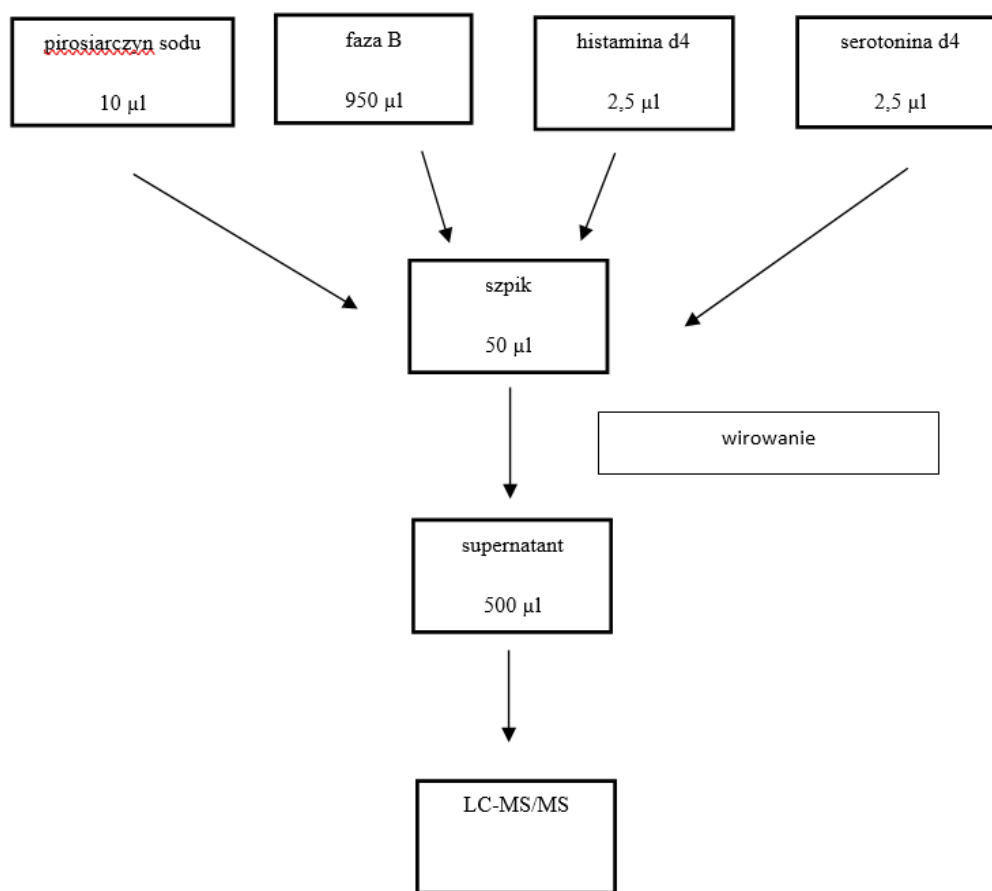
Analiza obejmowała łącznie 100 próbek szpiku kostnego.

3.2 Przygotowanie próbek do analizy

Próbki szpiku każdorazowo rozmrażano w temperaturze pokojowej (około 40 minut). Po całkowitym rozmrożeniu materiał mieszano dokładnie z użyciem wytrząsarki typu vortex.

Procedura przygotowania szpiku do analizy chromatograficznej, obejmowała następujące etapy (rycina 8):

1. Odmierzano 50 μl szpiku kostnego, przenoszono do próbki typu eppendorf pojemności 1,5 ml.
2. Dodawano 10 μl wodnego roztworu 10 mM pirosiarczynu sodu, mieszano na wytrząsarce typu vortex.
3. Dodawano 950 μl „fazy ruchomej B” (acetonitryl : woda z buforem mrówczanowym pH 3,4, 100 mM / 90:10 v/v), mieszano na wytrząsarce typu vortex.
4. Dodawano 2,5 μl metanolowego roztworu histaminy deuterowanej d4 (standard wewnętrzny) o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, mieszano na wytrząsarce typu vortex.
5. Dodawano 2,5 μl metylowego roztworu serotoniny deuterowanej d4 o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, mieszano na wytrząsarce typu vortex.
6. Wirowano w wirówce laboratoryjnej- 14 tyś rpm, przez 10 minut.
7. Pobierano 500 μl supernatantu do analizy LC-MS/MS.



Rycina 8. Schemat przygotowania próbki szpiku kostnego do analizy LC-MS/MS.

3.3 Analiza histaminy oraz serotoniny techniką LC/MS-MS

3.3.1 Specyfikacja techniczna zestawu analitycznego

Chromatograf ciekłowy

Analizy przeprowadzono z wykorzystaniem chromatografu ciekłowego ExionLC (AB Sciex, USA). Parametry opracowanego rozdzielania chromatograficznego przedstawiono w formie tabelarycznej, oddzielnie dla warunków pracy chromatografu (tabela 3) oraz gradientu fazowego (tabela 4).

Chromatograf cieczowy	
Objętość nastrzyku	10 µl
Kondycjonowanie	7 min
Sumaryczny przepływ fazy ruchomej	0,5 ml/min
Temperatura pieca kolumny	30 °C
Faza ruchoma A	80 % woda / 10% ACN / 10% bufor mrówczanowy pH 3,4 100mM (v/v)
Faza ruchoma B	90 % ACN / 10 % bufor mrówczanowy pH 3,4 100 mM (v/v)

Tabela 3. Wykaz parametrów zoptymalizowanych dla chromatografu cieczowego.

Czas (min)	Faza A (%)	Faza B (%)
0,00	5,0	95,0
0,20	5,0	95,0
1,40	10,0	90,0
1,41	25,0	75,0
3,30	25,0	75,0
3,50	70,0	30,0
6,30	70,0	30,0
6,60	5,0	95,0
7,00	5,0	95,0

Tabela 4. Zestawienie zmian w przebiegu gradientu fazowego w rozdziale chromatograficznym.

Kolumna chromatograficzna

Rozdział chromatograficzny prowadzono z wykorzystaniem kolumny SunShell HILIC-Amide (ChromaNik Technologies, Japonia). Parametry kolumny: średnica- 2,1 mm, długość - 150 mm, wielkość ziarna - 2,6 μm .

Spektrometr mas

Zastosowano systemem QTRAP® 6500+ (AB Sciex, USA), analizy prowadzono po optymalizacji źródła jonów oraz przejść jonowych dla poszczególnych analitów oraz wzorców wewnętrznych, przy ustawieniach głównych parametrów wyszczególnionych w tabeli 5 i 6.

Spektrometr masowy	
Typ skanowania	MRM
Tryb skanowania	dodatni
Źródło jonów	ESI
CUR	35 psi
IS	4200 kV
TEM	420 °C
GS1	60 psi
GS2	50 psi
EP	10 V
CXP	10 V

Tabela 5. Zestawienie parametrów pracy spektrometru mas. CUR- gaz osłonowy, IS- napięcie przyłożone do igły w celu jonizacji próbki, TEM- temperatura, GS1- gaz nebulizujący, GS2- gaz suszący, EP- potencjał wejściowy, CXP- potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń.

Związek	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (V)	CE (V)	Dwell Time (msec)
Histamina d4	116,100	99,100	45	20	50
Histamina 1	112,100	95,100	45	20	50
Histamina 2	112,100	68,000	45	30	50
Serotonina d4	181,100	164,100	5	14	50
Serotonina 1	177,100	160,100	5	13	50
Serotonina 2	160,100	115,100	120	30	50

Tabela 6. Zestawienie zoptymalizowanych parametrów dla przejść jonowych poszczególnych analitów (MRM). Q1- kwadropol pierwszy, Q3- kwadropol trzeci, DP- potencjał fragmentacyjny, CE- energia kolizji, Dwell Time- czas skanowania, Histamina 1- komponent ilościowy, histamina 2- komponent jakościowy, serotonina 1- komponent ilościowy, serotonina 2- komponent jakościowy.

Oprogramowanie

W trakcie analiz korzystano z oprogramowania Analyst Software i SCIEX OS 1.7.0.

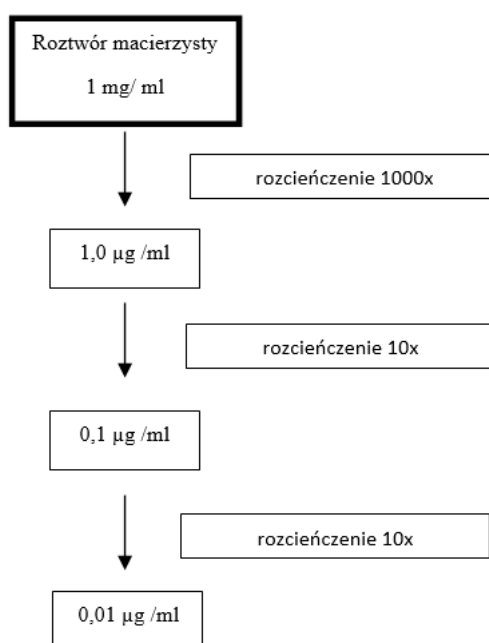
3.3.2 Krzywe kalibracyjne i inne parametry walidacyjne

Krzywe kalibracyjne wyznaczono poprzez regresję liniową ($y=ax$) z wymuszeniem przecięcia punkt 0,0, dla pomiarów w sześciu punktach o rosnącym stężeniu. Punkty dla histaminy: 2,1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml, punkty dla serotoniny: 1,1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 300 ng/ml.

Współczynnik regresji liniowej r^2 dla parametru ilościowego histaminy wynosił 0,99984, a dla serotoniny- 0,99997 (rycina 10 i 11). Pomiarów przeprowadzono z wykorzystaniem standardu wewnętrznego IS (histamina deuterowana), którego stężenie każdorazowo wynosiło 50 ng/ml. Matrycę biologiczną dla wszystkich oznaczeń walidacyjnych stanowiło osocze, w którym wstępnie wyznaczono stężenia histaminy i serotoniny metodą dodatku wzorca- stężenie histaminy wynosiło 1,1 ng/ml, a stężenie serotoniny 0,1 ng/ml.

Dokładność pomiaru próbek w sześciu punktach kalibracyjnych wraz z odczytami przedstawiono w formie tabelarycznej (tabela 9 i 10).

Objętości i stężenia roztworów roboczych oraz objętości osocza użyte do przygotowania próbek kalibracyjnych o odpowiednim stężeniu przedstawiono w tabeli 7. Do przygotowania próbek kalibracyjnych i kontrolnych wykorzystywano roztwory robocze sporządzone poprzez rozcieńczenie w metanolu wzorców macierzystych histaminy, histaminy deuterowanej, serotoniny oraz serotoniny deuterowanej. Stężenie roztworów macierzystych wynosiło 1 mg/ml. Schematyczne przygotowania rozcieńczeń przedstawiono na rycinie 9.



Rycina 9. Schemat przygotowania roztworów roboczych poprzez rozcieńczenie w metanolu.

Stężenie próbki kalibracyjnej	Objętość osocza	Stężenie roztworu roboczego	Dodana objętość roztworu roboczego
1 ng/ml	50 µl	0,01 µg /ml	5 µl
10 ng/ml	50 µl	0,1 µg /ml	5 µl
50 ng/ml	50 µl	1,0 µg/ml	2,5 µl
100 ng/ml	50 µl	1,0 µg/ml	5 µl
300 ng/ml	50 µl	1,0 µg /ml	15 µl

Tabela 7. Zestawienie ilości i objętości poszczególnych roztworów użytych do przygotowania roztworów roboczych oraz próbek kalibracyjnych.

Wyznaczono powtarzalność pomiarów dla stężenia 1 ng/ml (wartość referencyjna dla górnego poziomu fizjologicznego w osoczu) oraz 100 ng/ml (średnia wartość oczekiwana) (tabela 8). Wyznaczone parametry powtarzalności w pięciu niezależnych powtórzeniach przyjmowały wartości dopuszczalne wg europejskich wytycznych walidacji metod analitycznych.

Dla wykluczenia tzw. zjawiska przenoszenia analizowano próbkę zerową tzw. blank sample (rycina 12) i podwójnie zerową tzw. double blank sample, po uprzedniej pięciokrotnej analizie próbek o stężeniu 300ng/ml obu analitów (górny zakres oznaczalności).

Granice oznaczalności dla obu analitów wyznaczono na poziomie 0,2 ng/ml poprzez ocenę odczytów wartości pomiarowych przy minimalnym stężeniu i wyznaczony stosunek sygnału do szumu: dla serotoniny 5,8 w punkcie 0,2 ng/ml i dla histaminy 17,7 w punkcie 1,1 ng/ml (rycina 13 i 14).

Analit	Liczba powtórzeń	Średnia	SD	CV (%)	Dokładność (%)	RT (min)
Histamina 1 ng/ml	5	0,9	0,1	7,53	85,10	2,72+/- 0,01
Histamina 100 ng/ml	5	94,4	1,8	1,9	94,42	
Serotonina 1 ng/ml	5	1,1	0,1	5,3	106,73	1,35+/- 0,00
Serotonina 100 ng/ml	5	96,5	5,5	5,73	96,54	

Tabela 8. Zestawienie wyników pomiarów i parametrów powtarzalności powtórzeń próbek kontrolnych histaminy i serotoniny o stężeniu 1 ng/ml i 100 ng/ml. SD- odchylenie standardowe, CV- współczynnik zmienności, RT-czas retencji.

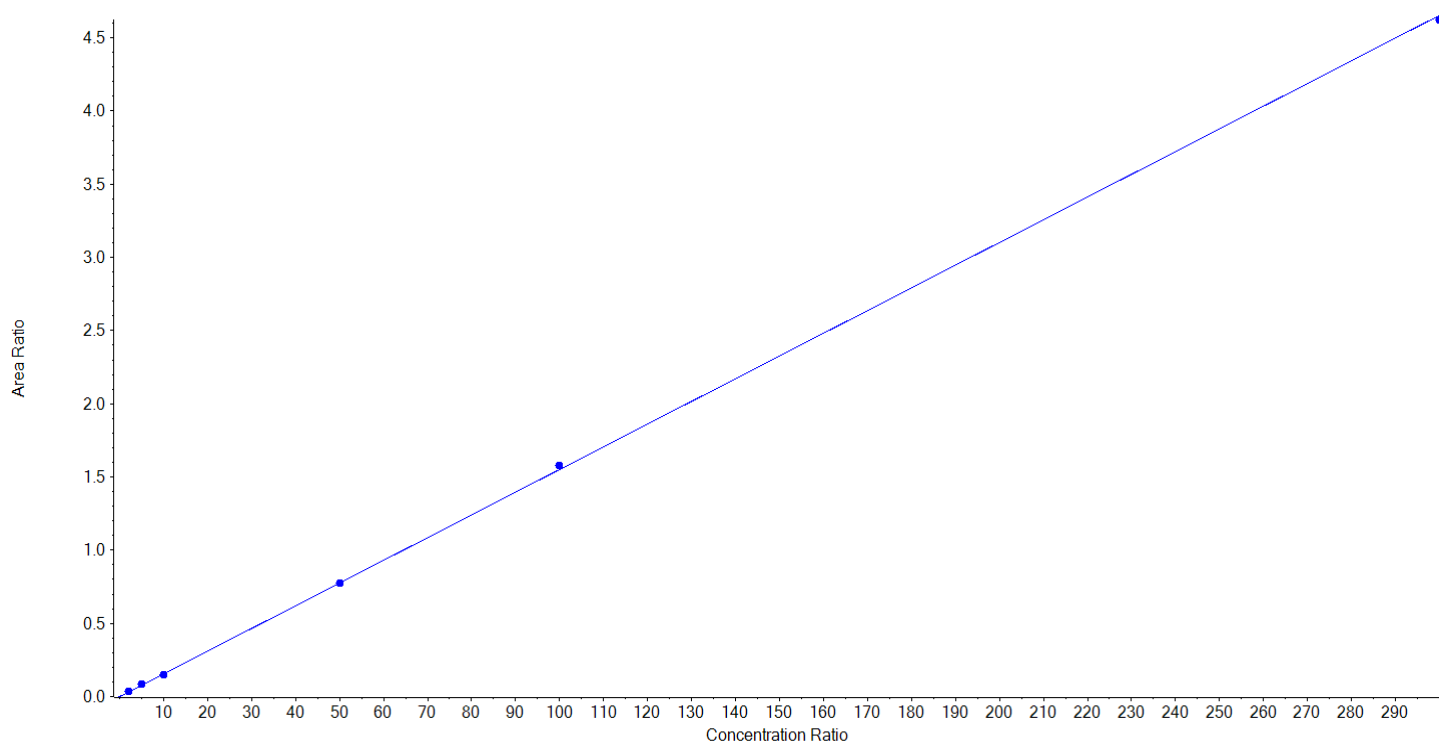
Stężenie oczekiwane (ng/ml)	Stężenie zmierzone (ng/ml)	Dokładność %
2.10	2.2	105.4
5.00	5.3	106.4
10.00	9.8	97.6
50.00	50.0	100.0
100.00	101.9	101.9
300.00	298.0	99.3

Tabela 9. Zestawienie wartości stężeń oczekiwanych i zmierzonych - odczyty dla krzywej kalibracyjnej histaminy.

Stężenie oczekiwane (ng/ml)	Stężenie zmierzone (ng/ml)	Dokładność %
1.10	1.1	99.4
5.00	4.8	96.9
10.00	10.0	99.7
50.00	49.7	99.3
100.00	100.8	100.8
300.00	299.7	99.9

Tabela 10. Zestawienie wartości oczekiwanych i zmierzonych odczyty dla krzywej kalibracyjnej serotoniny.

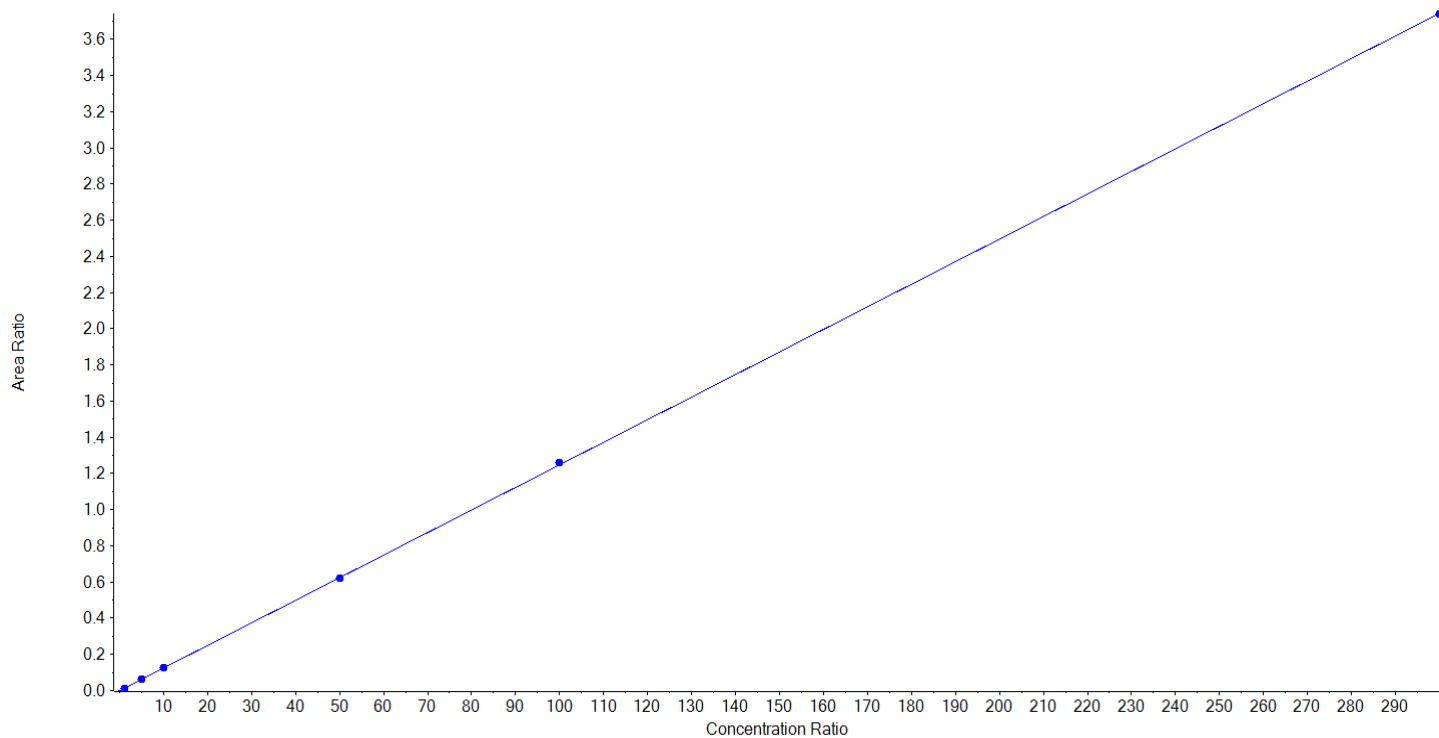
Równanie regresji: $y = 0.01551 x$ ($r = 0.99992$, $r^2 = 0.99984$) (ważenie: $1 / x$)



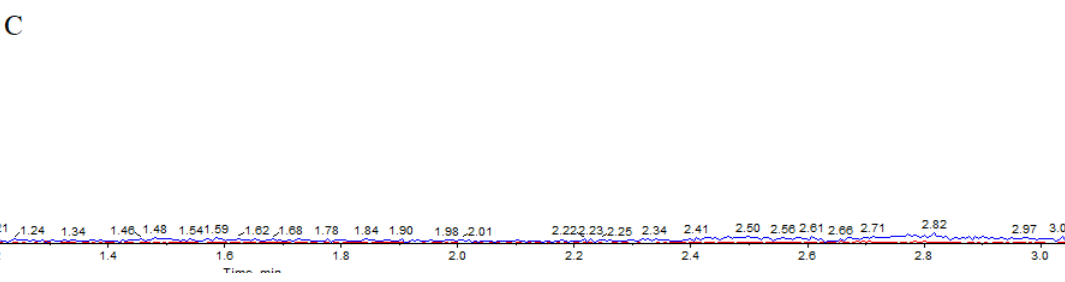
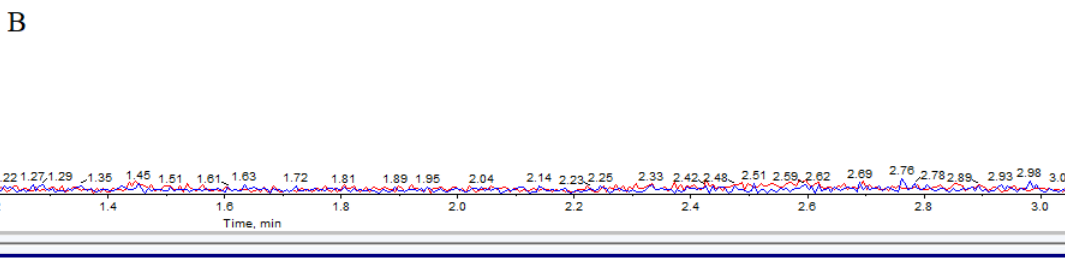
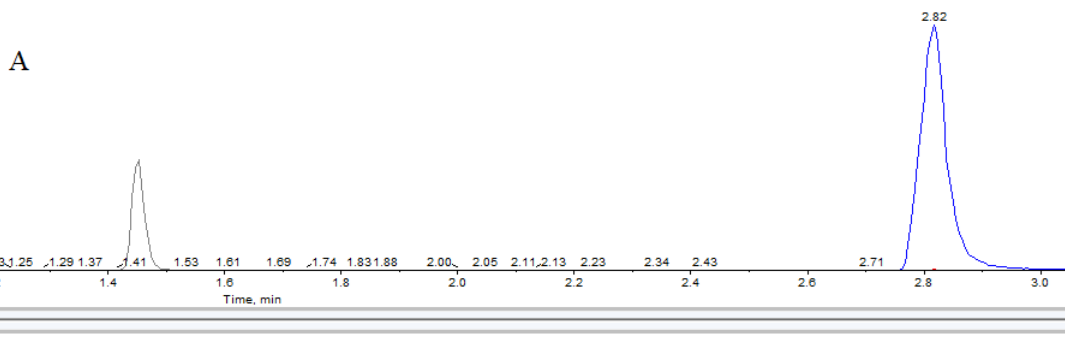
Rycina 10. Krzywa kalibracyjna analitu histamina. Area Ratio- stosunek pola powierzchni pikuj względem wzorca, Concentration Ratio- stosunek stężenia względem wzorca.

Równanie regresji:

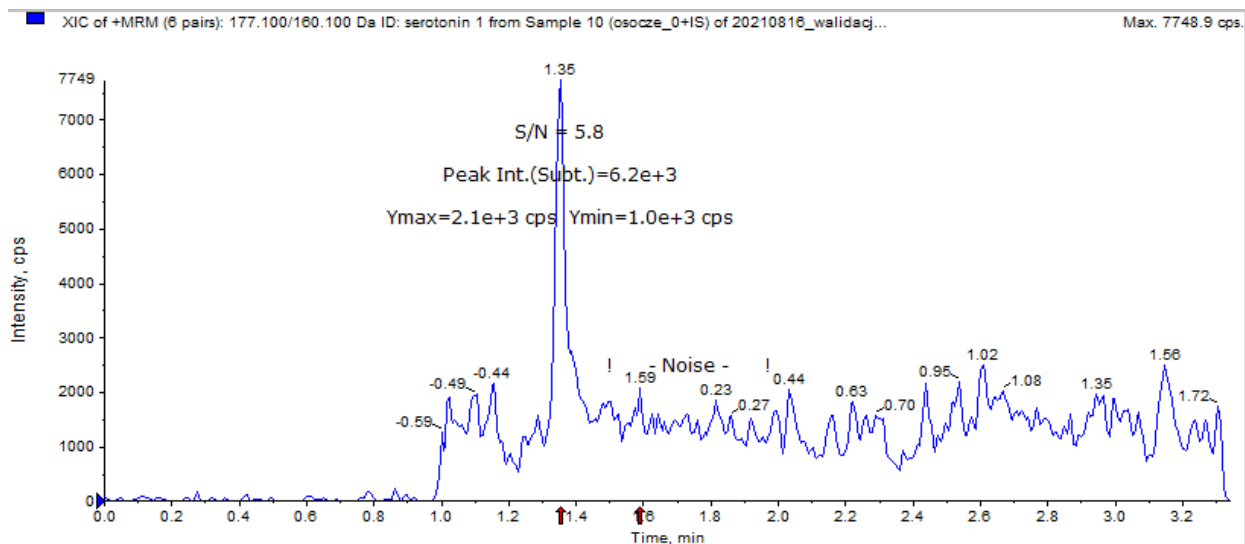
$$y = 0.01248 x \quad (r = 0.99999, r^2 = 0.99997) \quad (\text{w\u0105nienie : } 1 / x)$$



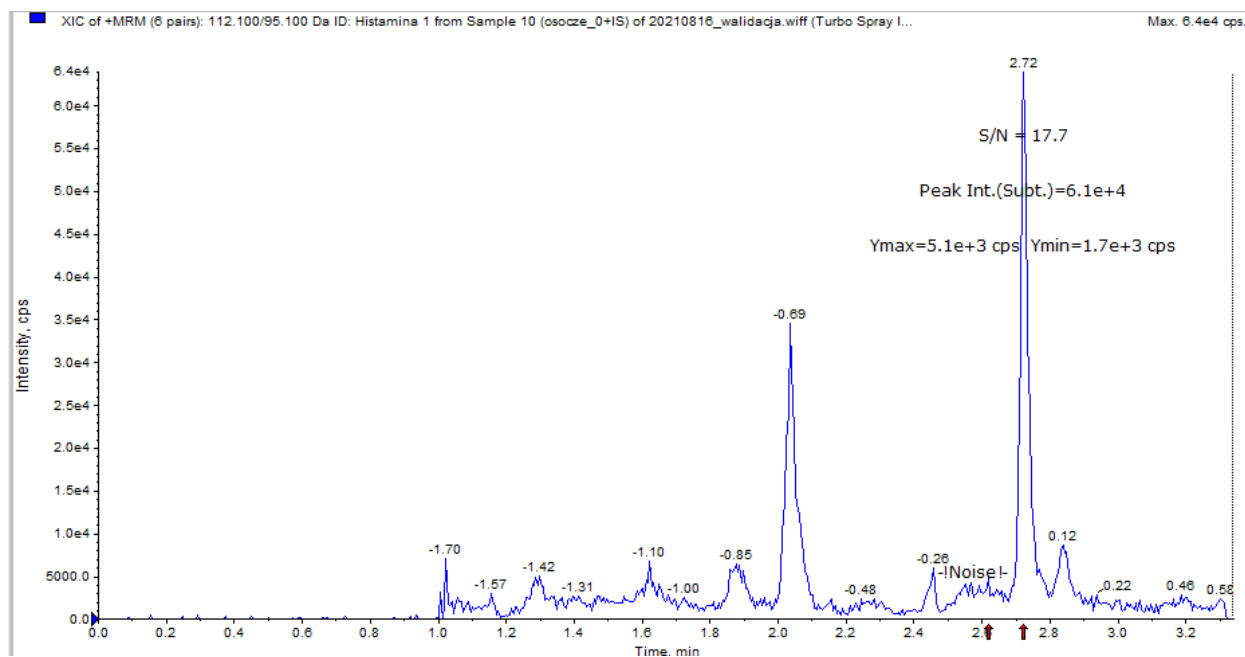
Rycina 11. Krzywa kalibracyjna analitu serotonina. Area Ratio- stosunek pola powierzchni piku względem wzorca, Concentration Ratio- stosunek stężenia względem wzorca.



Rycina 12. Chromatogramy wybranych prądów jonowych (XICs), pomiar w próbce zerowej: A- XIC 181,100→164,100 m/z (serotonina d4); 116,100→99,100 m/z (histamina d4). B- XIC 112,100→68,000 m/z (histamina 2); 112,100→95,100 m/z (histamina 1).



Rycina 13. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) dla przejścia 177,100→160,100 m/z (serotonina 1) z wyznaczonym stosunkiem sygnału do szumu (S/N).



Rycina 14. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) dla przejścia 112,100→95,100 m/z (histamina 1) z wyznaczonym stosunkiem sygnału do szumu (S/N).

3.3.3 Stosowane odczynniki

l.p	Nazwa polska	Nazwa angielska	Producent	Nr katalogowy
1	Acetonitryl do chromatografii ULC/MS	Acetonitrile for chromatography ULC/MS	Chempur	611026413
2	Chlorowodorek serotoniny d4	Serotonin d4 hydrochloride	Toronto Research Chemicals	S274982
3	Dichlorowodorek histaminy d4	Histamine- $\alpha,\alpha,\beta,\beta$ d4 dihydrochloride	Sigma Aldrich	762962-100MG
4	Dichlorowodorek histaminy	Histamine- dihydrochloride	Sigma Aldrich	PHR 1357-500MG
5	Kwas mrówkowy czystość LCMS	LCMS Grade Formic Acid	CovaChem	11202-10x1
6	Metanol cz.d.a	Methanol pure p.a	Stanlab	603-001-00-X
7	Mrówczan amonu czystość LCMS	LCMS Grade Ammonium Formate	CovaChem	19111-10pk
8	Pirosiarczyn sodu	Sodium metabisulfide	Sigma Aldrich	3148-500MG

Tabela 11. Wykaz stosowanych odczynników laboratoryjnych w kolejności alfabetycznej.

3.3.4 Analiza statystyczna

Do celów statystycznych próbki sklasyfikowano wg rozpoznania choroby pacjentów do grupy: nowotwory mieloproliferacyjne, zespoły mielodysplastyczne, ostre białaczki, choroby limfoproliferacyjne, inne choroby hematologiczne bez cech nowotworzenia, mastocytoza. Analizę statystyczną prowadzono w programie R, wersja 4.1.2 [94]. Zmienne ilościowe analizowano wyliczając średnią, odchylenie standardowe, medianę oraz kwartyle. Analizę zmiennych jakościowych przeprowadzono wyliczając liczbę i procent wystąpień każdej z wartości. Zmienne ilościowe w wyznaczonych 6 grupach porównywano za pomocą testu Kruskala-Wallisa. Zmienne wykazujące istotne statystycznie różnice, analizowano post-hoc testem Dunna w celu zidentyfikowania różniących się istotnie statystycznie grup. Korelacje zmiennych ilościowych badano za pomocą współczynnika korelacji Spearmana. Zależności pomiędzy stężeniami histaminy lub serotoniny a grupami chorób, badano także z uwzględnieniem wartości przedziałowych uzyskiwanych stężeń:

- zakresy histaminy: wartości poniżej 20 ng/ml, przedział 20-200 ng/ml, wartości powyżej 200 ng/ml,
- zakresy serotoniny: wartości poniżej 0,2 ng/ml, przedział 0,2-1 ng/ml, wartości powyżej 1 ng/ml.

Do analizy zmiennych pomiędzy wartościami przedziałowymi uzyskiwanych stężeń a 6 grupami chorób zastosowano dokładny test Fishera.

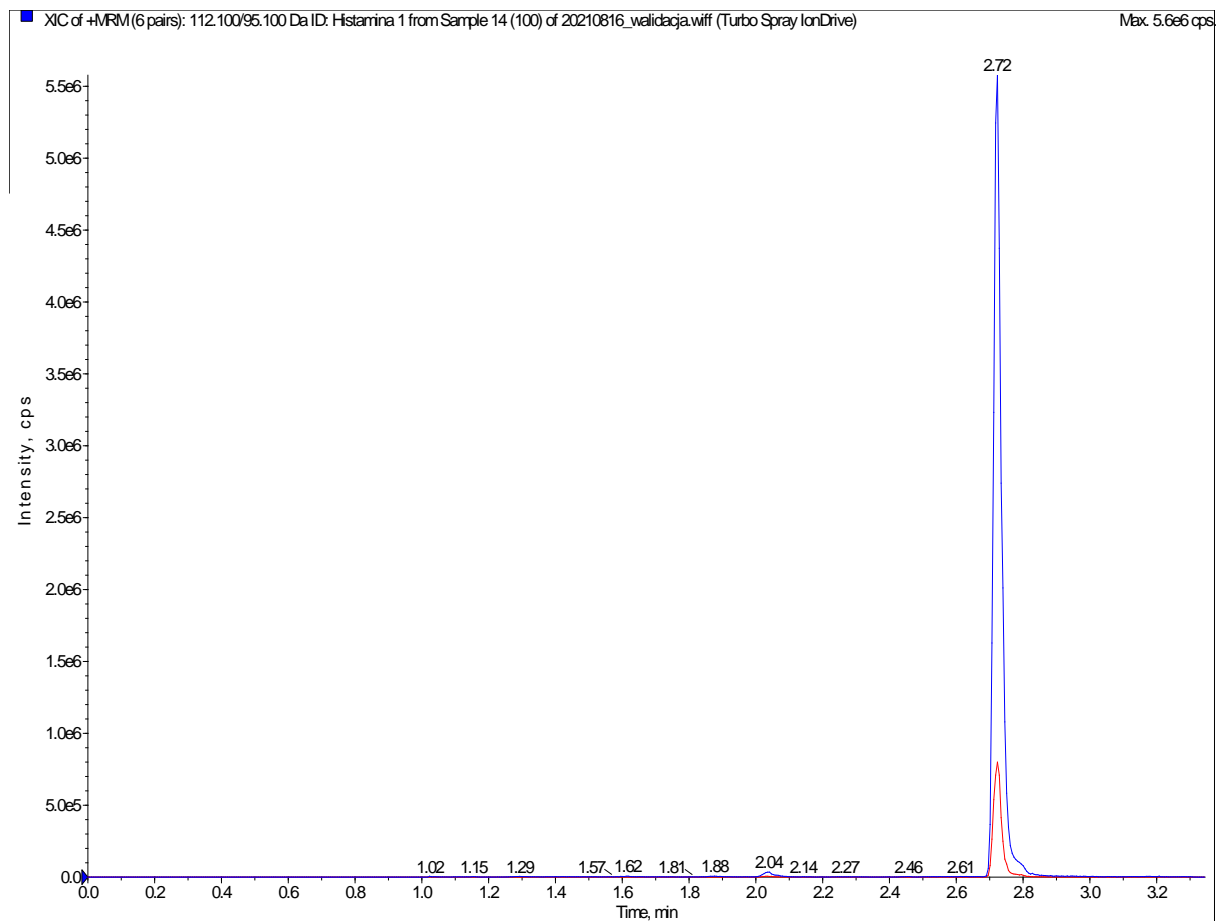
We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności 0,05.

4. Wyniki

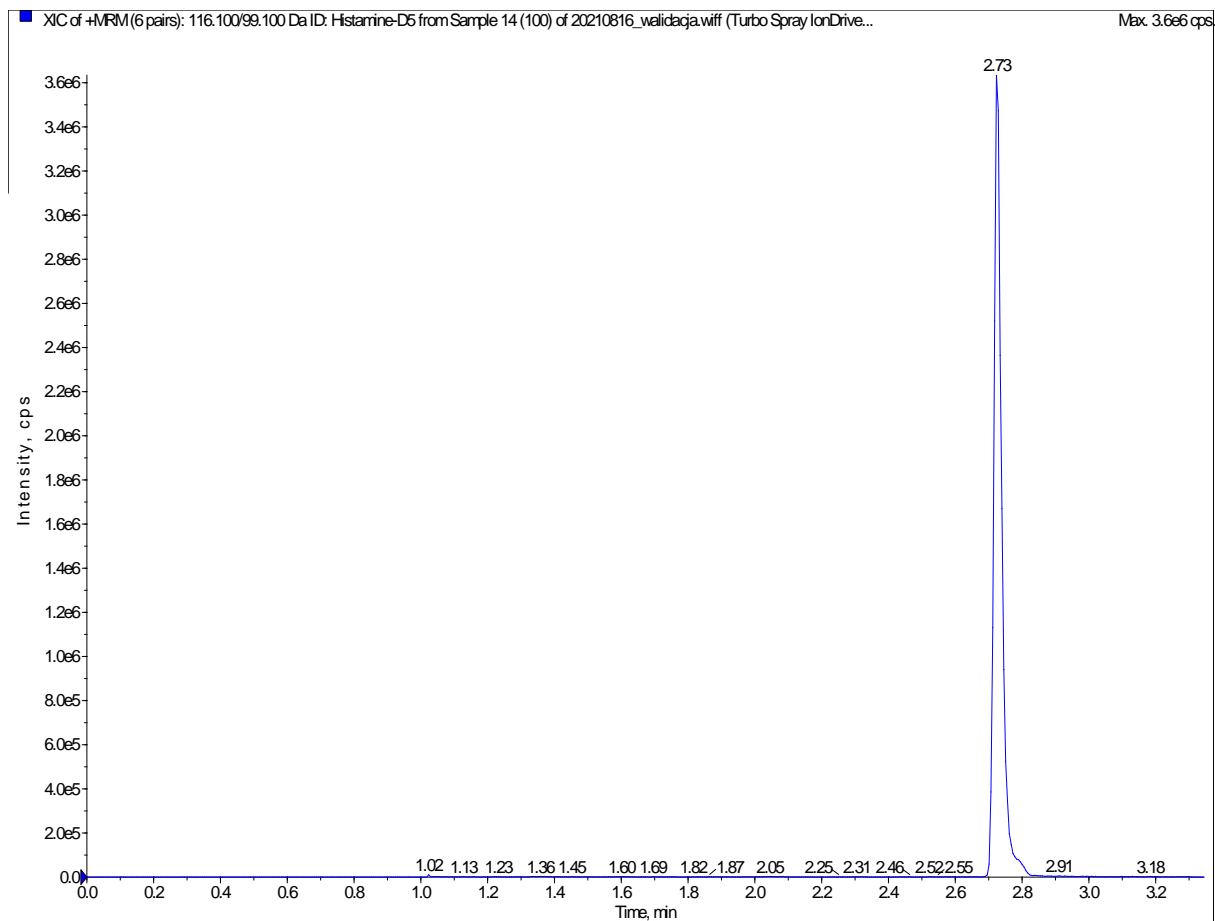
4.1 Wyniki pomiarów w układzie LC-MS/MS

Zoptymalizowana metoda analityczna z wykorzystaniem rozdziału na kolumnie typu HILIC i oznaczeniu w spektrometrze mas, pozwoliła na skuteczny rozdział zarówno składowych matrycy od analitów jak i analitów względem siebie. We wszystkich pomiarach uzyskano ostre, symetryczne piki, co uwidoczniło na przykładach zarejestrowanych prądów jonowych.

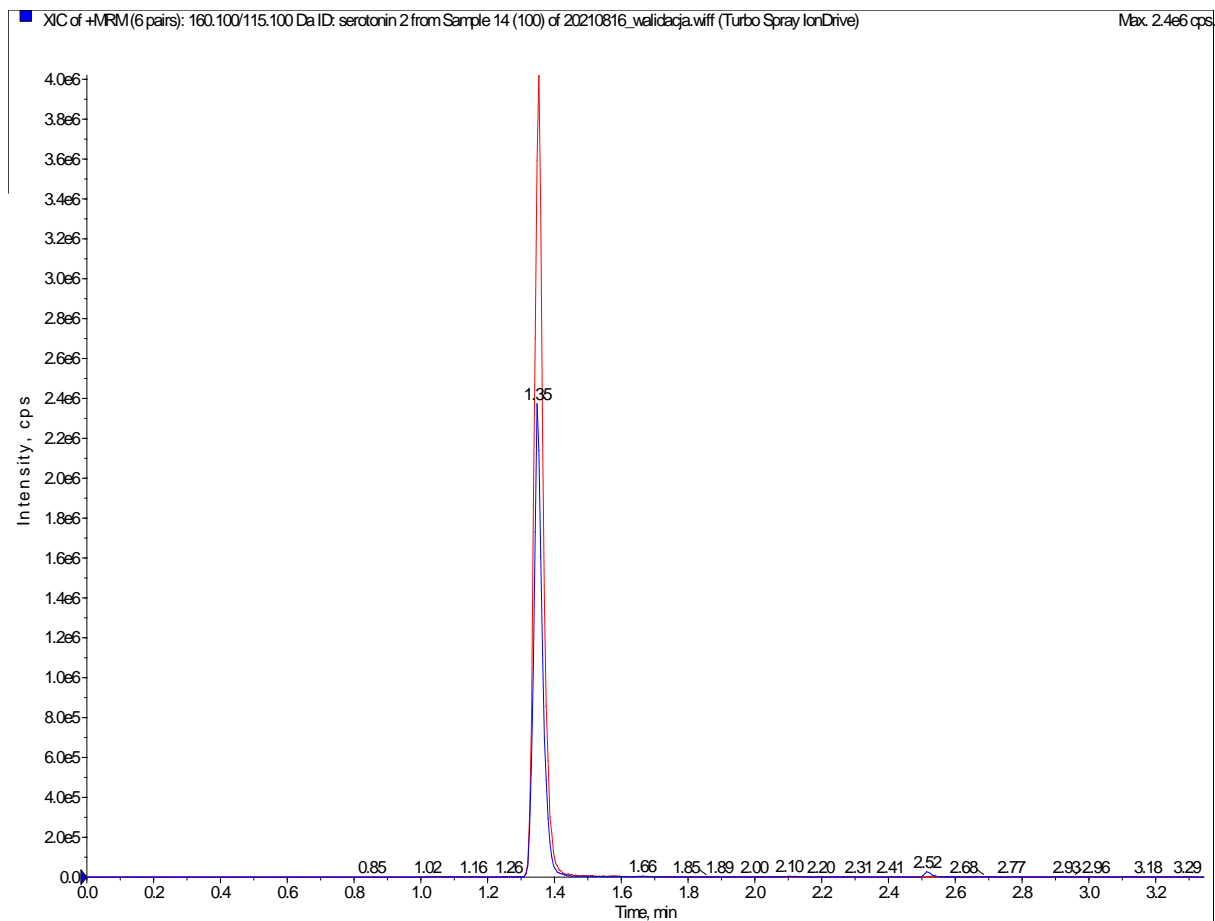
Chromatogramy wykreślone dla obu przejść jonowych wzorcowych roztworów histaminy oraz serotoniny w próbce kontrolnej o stężeniu 100ng/ml, przedstawiono na rycinach 14 oraz 16, natomiast dla ich deuterowanych odpowiedników na rycinach 16 oraz 18. Elucja histaminy w zastosowanym gradiencie zachodziła przy czasie 2,72 min, a serotoniny 1,35 min, w sposób odtwarzalny (brak zmienności czasów retencji) dla obu związków (tabela 7). Pomimo, iż elucja serotoniny zachodziła w stosunkowo krótkim czasie, to uzyskane sygnały wykazywały poprawne parametry analityczne, a przy tym czasie retencji nie stwierdzono interferencji matrycowych. Na rycinach 19 oraz 20 przedstawiono przykładowy wynik analizy próbki szpiku kostnego od pacjenta zaklasyfikowanego do grupy zespołów mieloproliferacyjnych (dla przejrzystości oddzielnie histamina oraz serotonina). W oznaczonej próbce szpiku nie odnotowano istotnej supresji jonów (szpik względem surowicy jako matrycy), nie odnotowano zmiany kształtu pików, jak również zmiany poszczególnych czasów retencji.



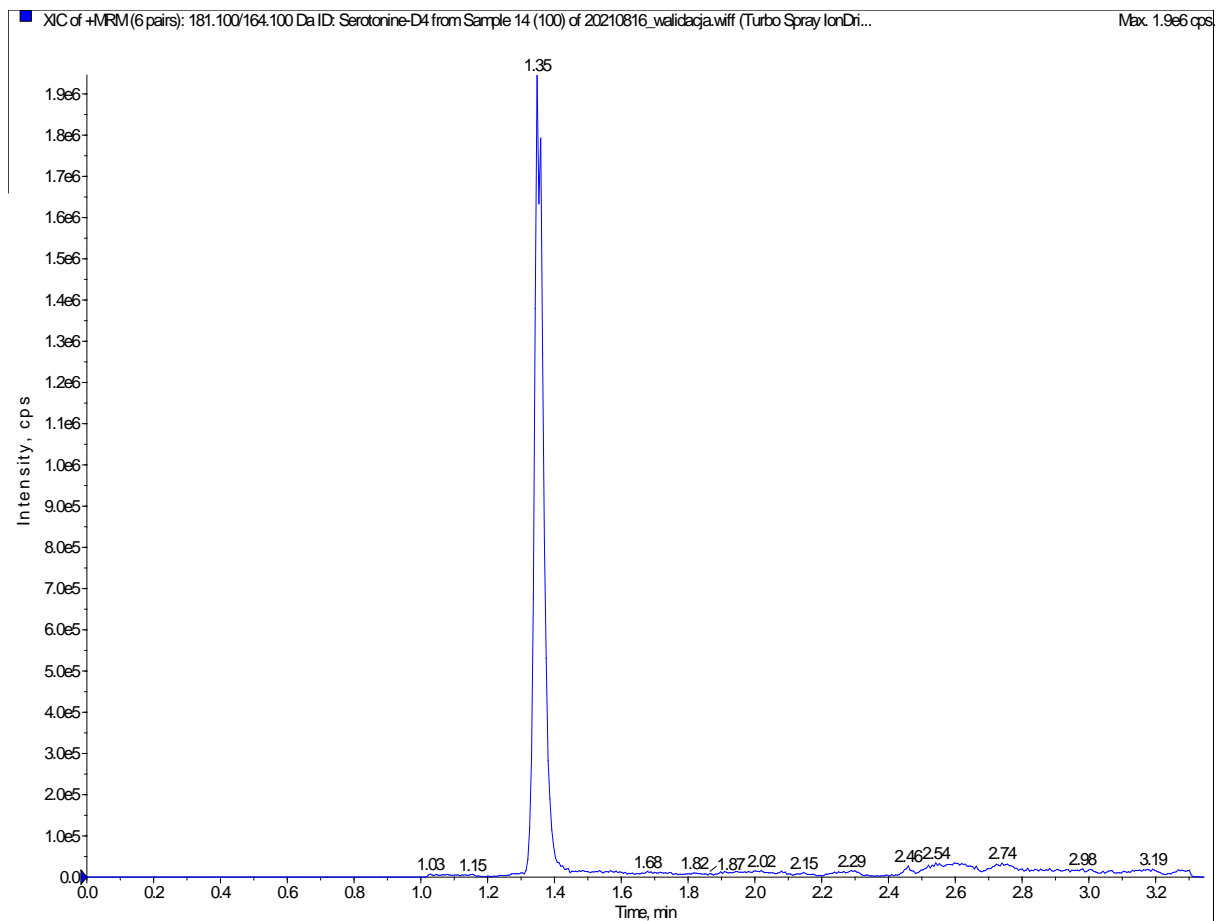
Rycina 15. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce kontrolnej o stężeniu 100 ng/ml. XIC 112,100→95,100 m/z (histamina 1- linia niebieska); 112,100→68,000 m/z (histamina 2-linia czerwona). Intensity- intensywność sygnału, time- czas retencji.



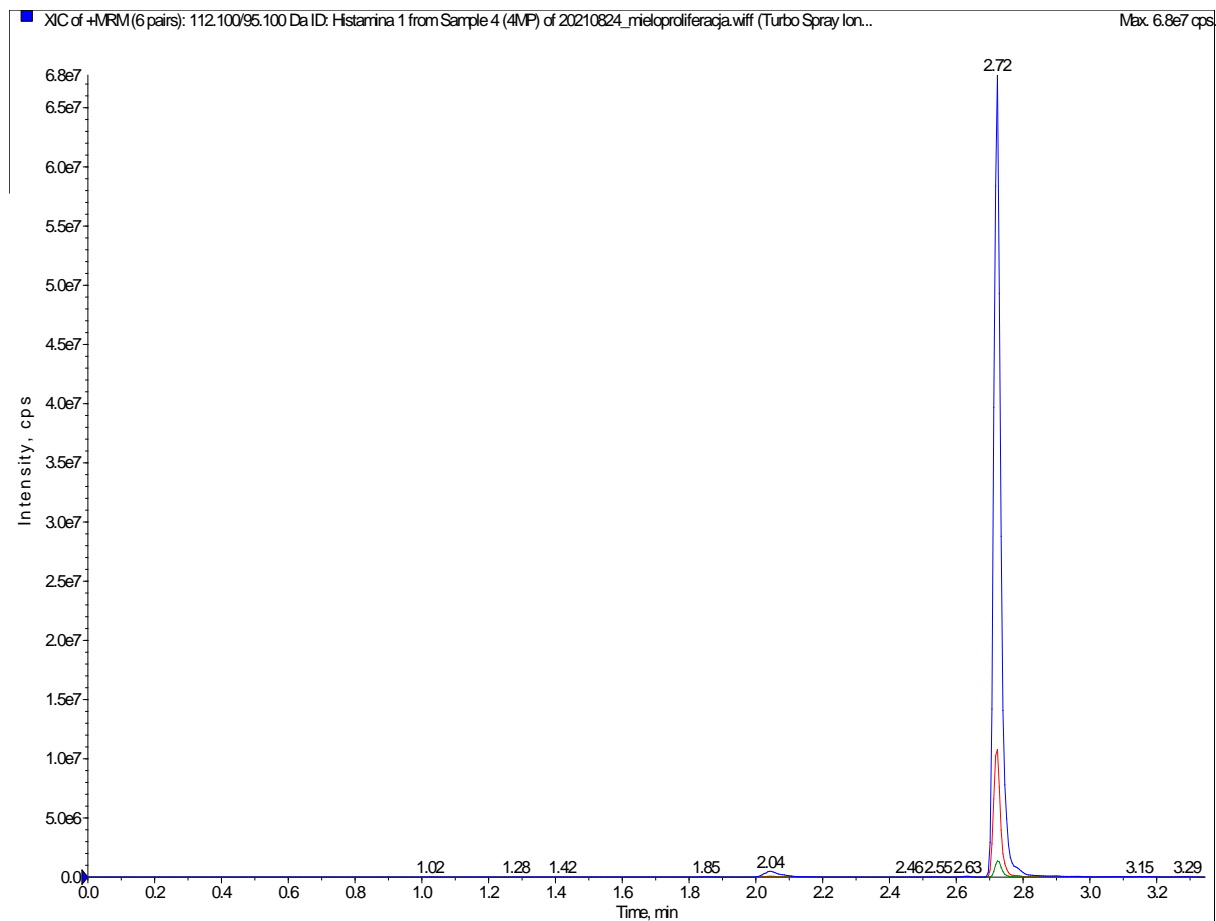
Rycina 16. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) w próbce kontrolnej. XIC: 116,100→99,100 m/z (IS, histamina d4). Intensity- intensywność sygnału, time- czas retencji.



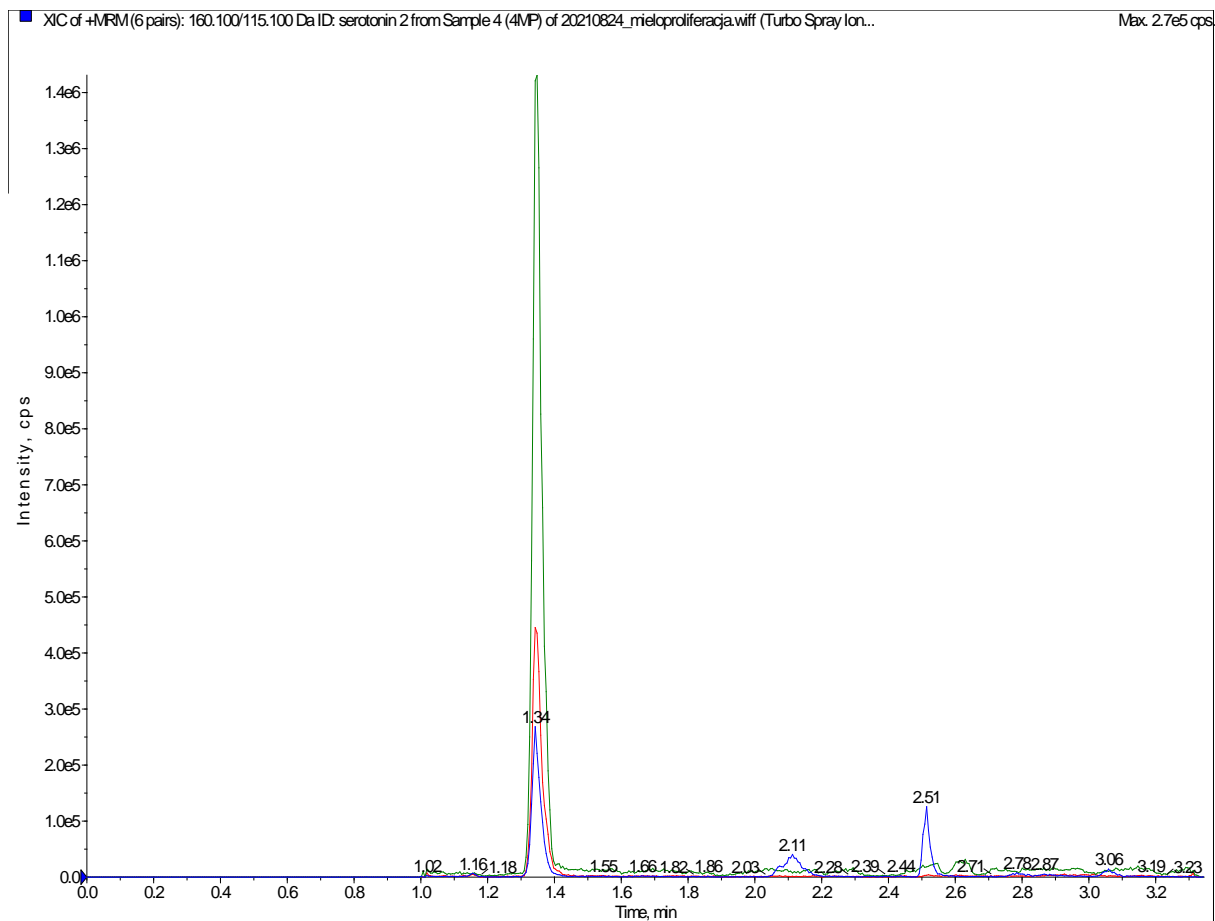
Rycina 17. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce kontrolnej o stężeniu 100 ng/ml. XIC 177,100→160,100 m/z (serotonina 1-linia czerwona); 160,100→115,100 m/z (serotonina 2-linia niebieska). Intensity- intensywność sygnału, time- czas retencji.



Rycina 18. . Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) w próbce kontrolnej. XIC 181,100→164,100 m/z (serotonina d4). Intensity- intensywność sygnału, time- czas retencji.



Rycina 19. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce szpiku kostnego pacjenta z grupy chorób mieloproliferacyjnych. XIC 112,100→95,100 m/z (histamina 1-linia niebieska); 112,100→68,000 m/z (histamina 2- linia czerwona); 116,100→99,100 m/z (histamina d4-linia zielona).



Rycina 20. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce szpiku kostnego pacjenta z grupy chorób mieloproliferacyjnych. XIC 177,100→160,100 m/z (serotonina 1-linia czerwona); 160,100→115,100 m/z (serotonina 2-linia niebieska); 181,100→164,100 m/z (serotonina d4-linia zielona).

4.2 Statystyki opisowe

Statystyki opisowe dotyczące płci, wieku, grupy pacjentów, a także morfologii i wyznaczonych stężeń histaminy oraz serotoniny, przedstawiono w formie tabelarycznej.

Średni wiek pacjentów wynosił 61,2 lata, nie odbiegał istotnie od danych statystycznych odnoszących się do średniego wieku zachorowalności na choroby hematologiczne, np. ostra białaczka szpikowa- 68 lat, przewlekła białaczka szpikowa- 50 lat, szpiczak plazmocytowy- 70 lat, [95,96]. Nie stwierdzono dysproporcji w badanej grupie pod względem płci - 45 % pacjentów stanowiły kobiety, 55 % stanowili mężczyźni. Znaczną część stanowili pacjenci ze zdiagnozowaną hematologiczną chorobą nowotworową (tabela 12) w porównaniu do pacjentów u których nie zdiagnozowano tego typu chorób (33%). Wśród parametrów morfologicznych krwi obwodowej największy rozrzut wyników względem średniej zaobserwowano dla płytek krwi. Wyliczone średnie wartości mieściły się w zakresach referencyjnych, oprócz liczby białych krwinek, których średnia wynosiła nieznacznie powyżej górnej granicy tego zakresu, przy czym kwartył górny wynosi 11,77, a zatem 75% wyników WBC było niższych od tej wartości (tabela 13).

Parametr		Łącznie (N=100)
Wiek [lata]	Średnia ±SD	61,2±15,55
	Mediana	63
	Kwartyle	55,75 - 74
Płeć	Kobiety	45 (45%)
	Mężczyźni	55 (55%)
Grupa	Nowotory mieloproliferacyjne	20 (20%)
	Zespoły mielodysplastyczne	10 (10%)
	Ostre białaczki	13 (13%)
	Nowotwory limfoproliferacyjne	22 (22%)
	Bez cech nowotworzenia	33 (33%)
	Mastocytoza	2 (2%)

Tabela 12. Zestawienie wyników statystyki opisowej: względem płci, wieku, grupy pacjentów.

Parametr	N	Średnia	SD	Mediana	Min	Max	Q1	Q3
WBC [G/l]	100	15,3	26,93	7,03	0,28	149,61	4,51	11,77
RBC [T/l]	100	3,93	0,94	3,9	1,77	7,57	3,3	4,53
Hb [g/dl]	100	11,73	2,49	11,65	5,6	22,8	10,1	13,33
Hct [%]	100	34,52	8,11	35,4	3,9	69	29,7	39,32
Plt [G/l]	100	274,97	250,61	198,5	3	1525	91,5	373
MCV [fl]	100	90,21	8,04	88,55	76,4	120,3	85,77	94,1
MCH [pg]	100	30,33	3,19	30	23,2	42	28,17	31,8
MCHC [g/dl]	100	33,6	1,31	33,7	29,6	36,4	32,88	34,5
Neutrofile [%]	100	53,73	22,31	55,55	0	94,2	41,75	70,55
Eozynofile [%]	100	2,32	3,36	1	0	19,8	0	3
Bazofile [%]	100	0,87	1,14	0,5	0	6	0,1	1
Limfocyty [%]	100	28,83	18,08	26,4	0,43	78,6	14,68	38,4
Monocyty [%]	100	11,94	19,38	7,5	0	152	4	11,77

Tabela 13. Zestawienie wyników analiz statystycznych dla parametrów morfologii krwi. Q1- kwartył pierwszy, Q3- kwartył trzeci, WBC- krwinki białe, RBC- krwinki czerwone, Hb- hemoglobina, Hct- hematokryt, Plt- płytki krwi, MCV- średnia objętość krwinki czerwonej, MCH- średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej, MCHC- średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej.

Średnie stężenie histaminy w próbkach szpiku wynosiło 344,11 ng/ml. Ponad połowa (67%) wartości mieściła się w zakresie 20-200 ng/ml. We wszystkich badanych próbkach była obecna histamina- najniższe uzyskane stężenie wynosiło 2,4 ng/ml i dotyczyło pacjenta bez zdiagnozowanej choroby rozrostowej szpiku. W przypadku serotoniny zdecydowana większość wartości znajdowała się w zakresie poniżej 0,2 ng/ml (poniżej zakresu oznaczalności) (tab. 14 i tab. 15).

Parametr		Łącznie (N=100)
Histamina [ng/ml]	średnia ±SD	344,11±959,09
	mediana	55,3
	kwartyle	32,58 - 136,18
Serotonina [ng/ml]	średnia ±SD	0,61±3,69
	mediana	0
	kwartyle	0 - 0

Tabela 14. Zestawienie statystyk dla stężeń histaminy oraz serotoniny wyznaczonych w próbkach szpiku: średnia, mediana, kwartyle.

Parametr		Łącznie (N=100)
Histamina	< 20 ng/ml	18 (18%)
	20-200 ng/ml	67 (67%)
	> 200 ng/ml	15 (15%)
Serotonina	< 0,2 ng/ml	83 (83%)
	0,2-1 ng/ml	10 (10%)
	> 1 ng/ml	7 (7%)

Tabela 15. Rozkład procentowego udziału stężeń histaminy oraz serotoniny wraz z liczebnością, w poszczególnych przedziałach.

4.3 Wyniki analizy zależności oraz korelacji

Uzyskane wyniki stężeń histaminy oraz serotoniny poddano szczegółowej analizie statystycznej przy uwzględnieniu danych klinicznych. Zmienne analizowano testem Kruskalla-Wallisa, post-hoc Dunna, Fishera oraz wyznaczano współczynniki korelacji Spearmana.

4.3.1. Analiza zależności między stężeniami histaminy a grupami chorób hematologicznych

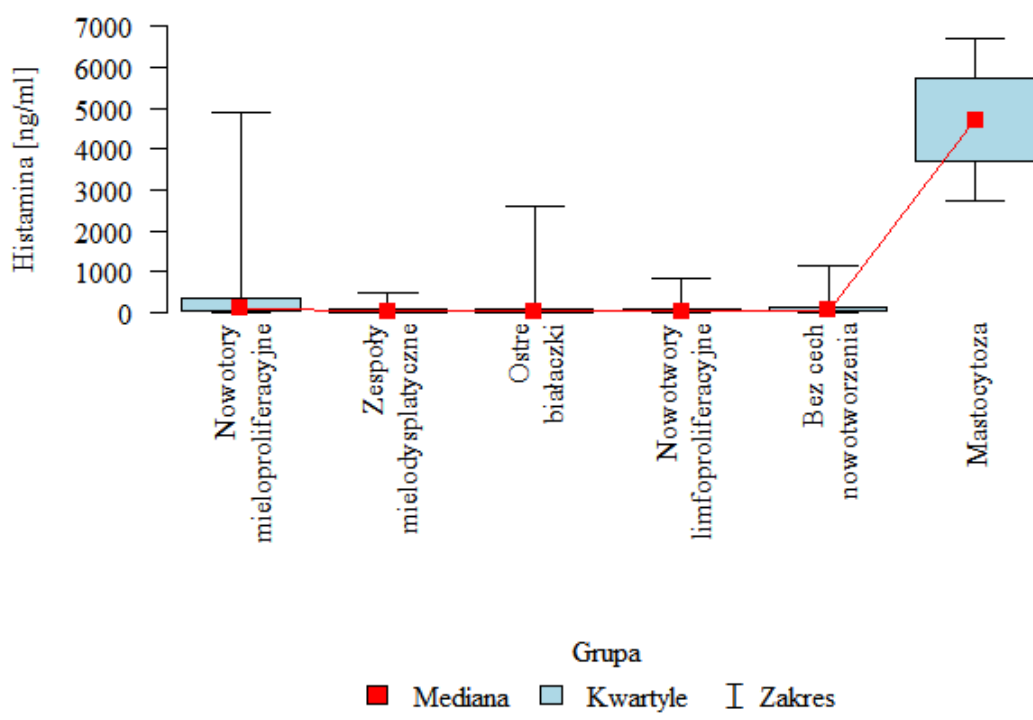
Analizy zmiennych z wykorzystaniem testu Kruskalla-Wallisa oraz analiza post-hoc testem Dunna wykazały, że stężenia histaminy były (tabela 16, rycina 21):

- istotnie wyższe w grupie z mastocytozą niż w grupie z zespołami mielodysplastycznymi, ostrymi białaczkami, nowotworami limfoproliferacyjnymi lub bez cech nowotworzenia (zależność istotna statycznie $p < 0,05$),

- istotnie wyższe w grupie z nowotworami mieloproliferacyjnymi niż w grupie z zespołami mielodysplastycznymi, ostrymi białaczkami lub nowotworami limfoproliferacyjnymi (zależność istotna statycznie $p < 0,05$).

Histamina [ng/ml]	Grupa						p
	Nowotory mieloproliferacyjne (N=20) - A	Zespoły mielodysplastyczne (N=10) - B	Ostre białaczki (N=13) - C	Nowotory limfoproliferacyjne (N=22) - D	Bez cech nowotworzenia (N=33) - E	Mastocytoza (N=2) - F	
śr±SD	650,36±1274	96,3±151,88	267,67±709,43	107,91±177,36	156,47±268,38	4711,85±2811,67	p=0,02
mediana	108,05	40,9	32,5	47	55,1	4711,85	F>E,D, B,C
kwartyle	44,45 - 362,45	19,35 - 77,45	11,6 - 95	33,27 - 105,13	32,6 - 122,2	3717,77 - 5705,92	A>D,B, C

Tabela 16. Zestawienie zależności między stężeniami histaminy a grupami chorób- wynik testu Kruskala-Wallisa oraz analizy post-hoc (test Dunna).



Rycina 21. Wykres pudełkowy zależności między stężeniami histaminy a grupami chorób hematologicznych.

4.3.2 Analiza korelacji pomiędzy stężeniami histaminy i wartościami parametrów morfologii

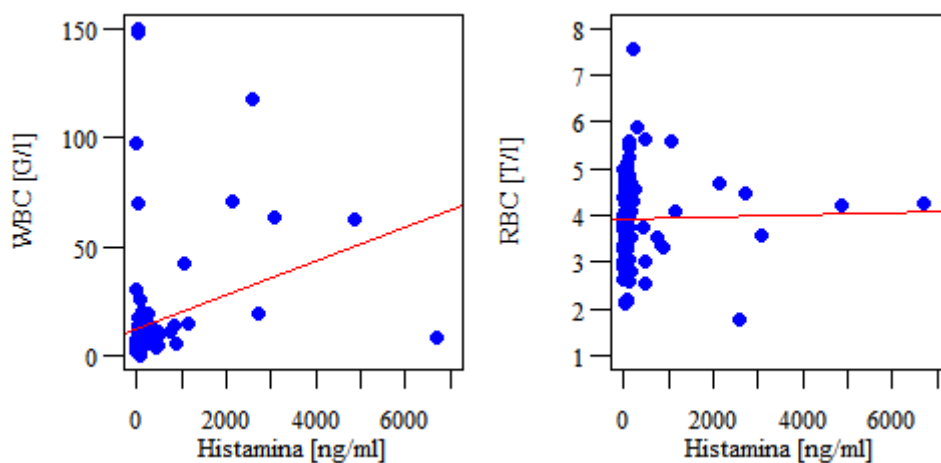
Analiza statystyczna wykazała, że stężenie histaminy koreluje istotnie ($p < 0,05$) dodatnio ($r > 0$) z WBC, Plt, odsetkiem neutrofilów, eozynofili i bazofili.

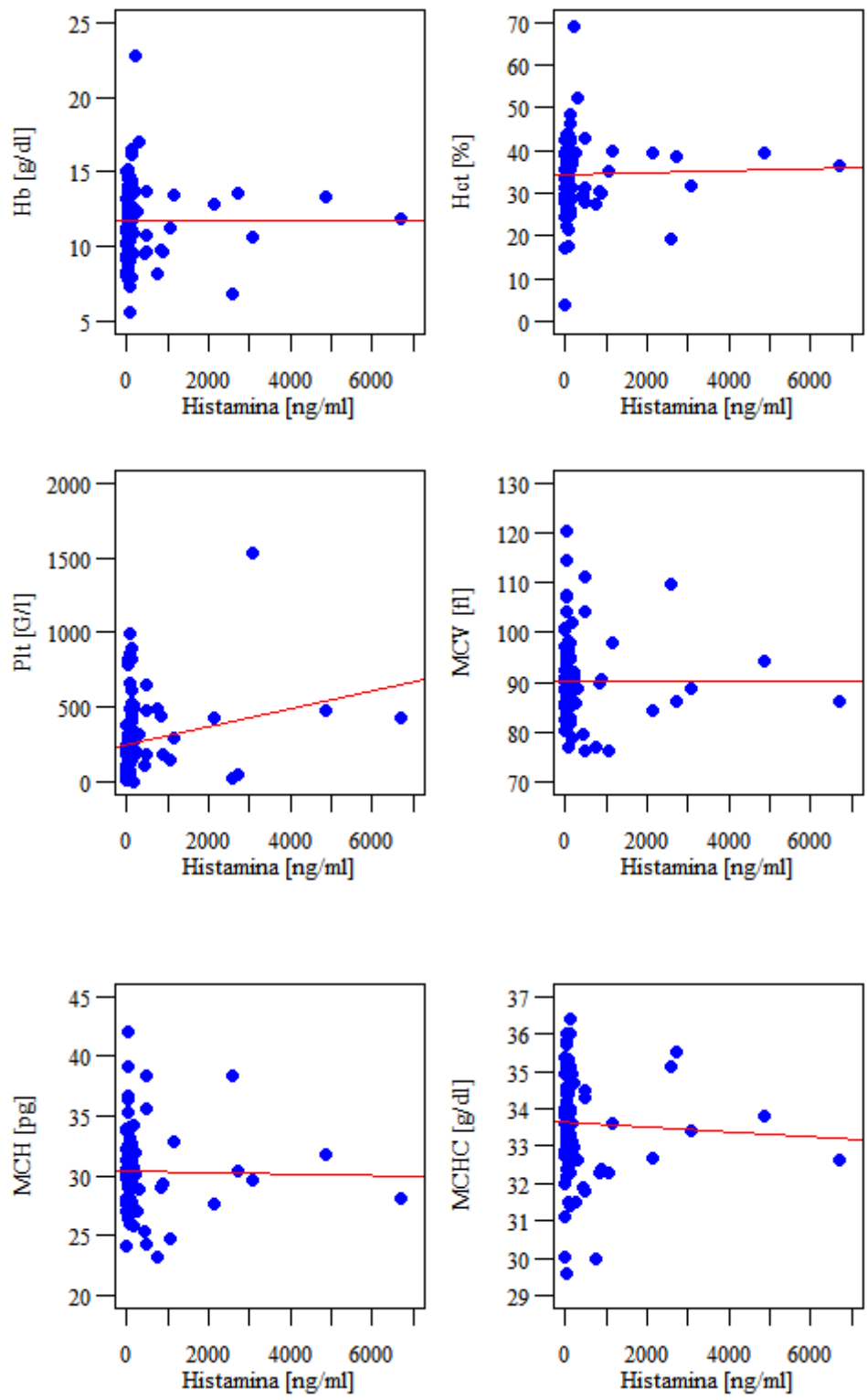
Zależność pomiędzy stężeniem histaminy a odsetkiem liczby limfocytów wskazuje na istnienie istotnej korelacji ($p < 0,05$) ujemnej ($r < 0$) z limfocytami (tabela 17, rycina 22).

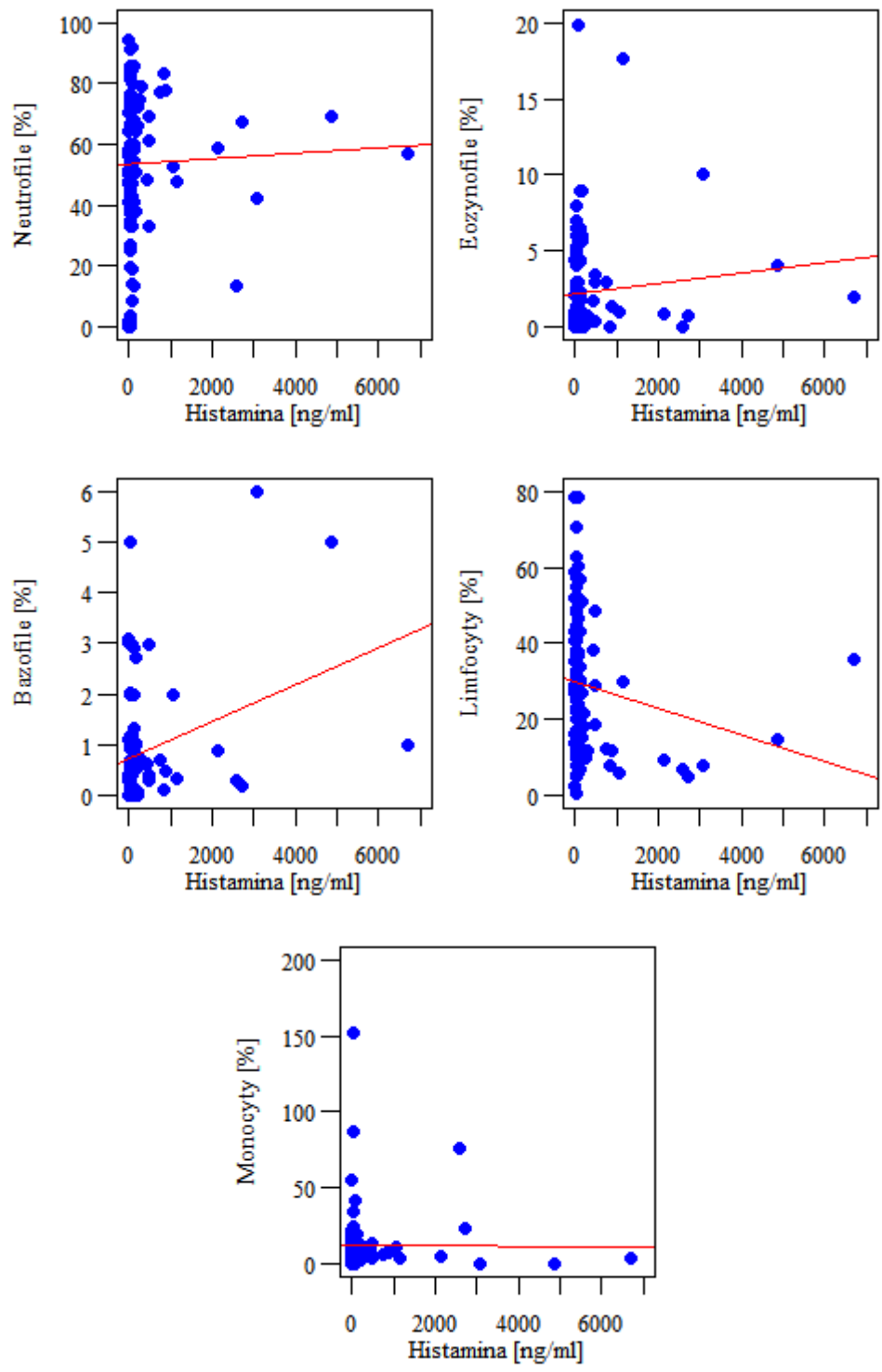
Parametr	Histamina
	Współczynnik korelacji Spearmana
WBC [G/l]	$r=0,433, p<0,001 *$
RBC [T/l]	$r=0,194, p=0,053$
Hb [g/dl]	$r=0,143, p=0,155$

Parametr	Histamina
	Współczynnik korelacji Spearmana
Hct [%]	$r=0,192, p=0,055$
Plt [G/l]	$r=0,383, p<0,001 *$
MCV [fl]	$r=-0,104, p=0,304$
MCH [pg]	$r=-0,131, p=0,195$
MCHC [g/dl]	$r=-0,135, p=0,179$
Neutrofile [%]	$r=0,213, p=0,034 *$
Eozynofile [%]	$r=0,283, p=0,004 *$
Bazofile [%]	$r=0,2, p=0,046 *$
Limfocyty [%]	$r=-0,313, p=0,002 *$
Monocyty [%]	$r=-0,049, p=0,629$

Tabela 17. Wyniki korelacji pomiędzy stężeniami histaminy i parametrami morfologii krwi- analiza współczynników Spearmana. *zależność istotna statystycznie ($p<0,05$).



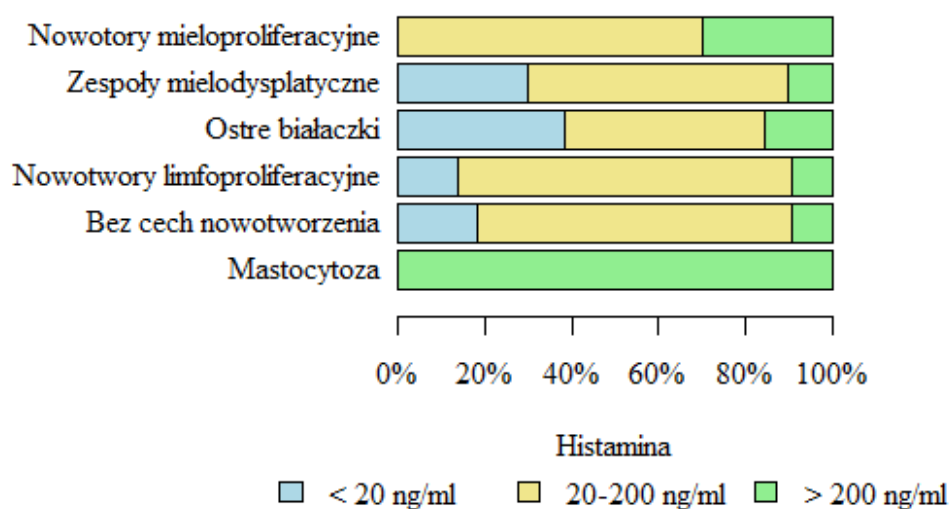




Rycina 22. Graficzne zobrazowanie korelacji pomiędzy stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii krwi.

4.3.3 Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a grupami chorób hematologicznych

Wyniki pomiarów stężeń histaminy w szpiku zgrupowano w trzech przedziałach: 1 - wartości poniżej 20 ng/ml, 2 wartości w zakresie 20-200 ng/ml, 3 – wartości powyżej 200 ng/ml. Najczęściej notowano wyniki stężeń histaminy mieszczące się w przedziale drugim, podczas gdy najwyższe stężenia stwierdzono w grupie mastocytozy oraz nowotworach mieloproliferacyjnych (ryc. 23).



Rycina 23. Wykres rozkładu procentowego zgrupowanych zakresów stężeń histaminy w poszczególnych grupach chorób hematologicznych.

Histamina	Grupa						p
	Nowotory mieloproliferacyjne (N=20)	Zespoły mielodysplastyczne (N=10)	Ostre białaczki (N=13)	Nowotory limfoproliferacyjne (N=22)	Bez cech nowotworzenia (N=33)	Mastocytoza (N=2)	
< 20 ng/ml	0 (0,00%)	3 (30,00%)	5 (38,46%)	3 (13,64%)	6 (18,18%)	0 (0,00%)	p=0,007
20-200 ng/ml	14 (70,00%)	6 (60,00%)	6 (46,15%)	17 (77,27%)	24 (72,73%)	0 (0,00%)	
> 200 ng/ml	6 (30,00%)	1 (10,00%)	2 (15,38%)	2 (9,09%)	3 (9,09%)	2 (100,00%)	

Tabela 18. Zestawienie zależności między zgrupowanymi stężeniami histaminy i grupami chorób hematologicznych - wynik dokładnego testu Fishera.

4.3.4 Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii

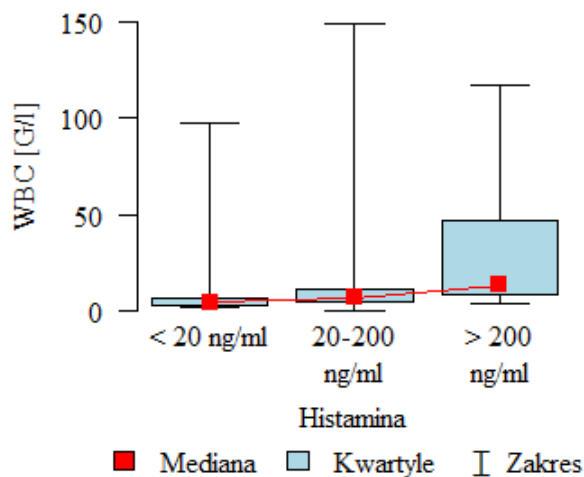
Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii wykazała, że:

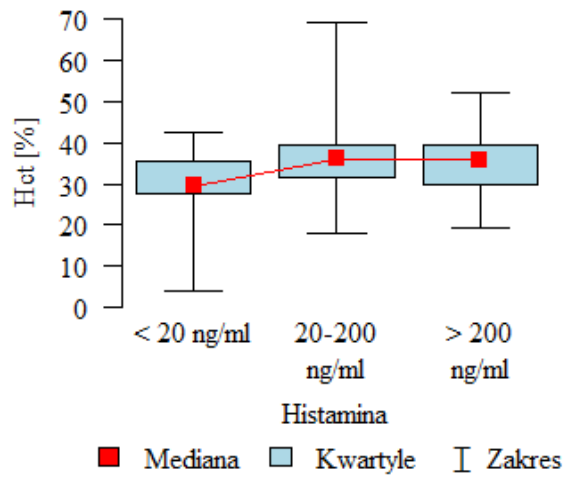
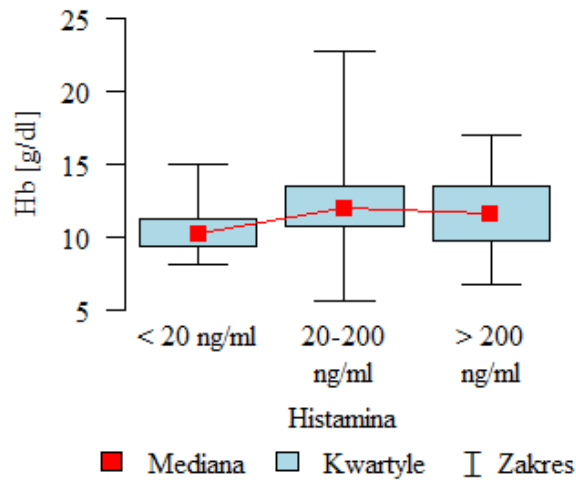
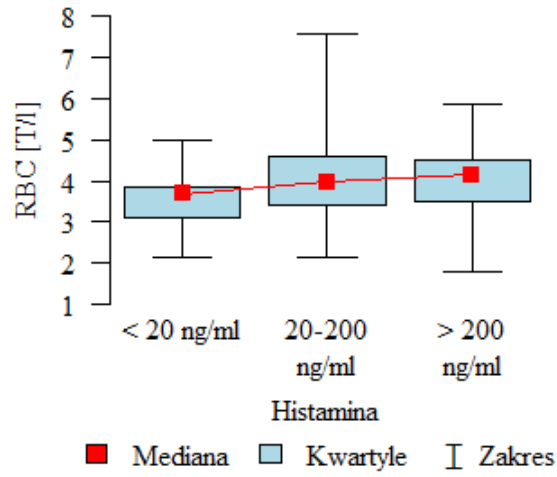
- wartości WBC były istotnie wyższe a odsetek limfocytów istotnie niższy w grupie z histaminą > 200 ng/ml niż w pozostałych grupach (tabela 19, rycina 24).
- poziom Hct był istotnie wyższy w grupie z histaminą 20-200 ng/ml niż w grupie z histaminą < 20 ng/ml, oraz że
- poziom Plt oraz odsetka eozynofiliów był istotnie niższy w grupie z histaminą < 20 ng/ml niż w pozostałych grupach.

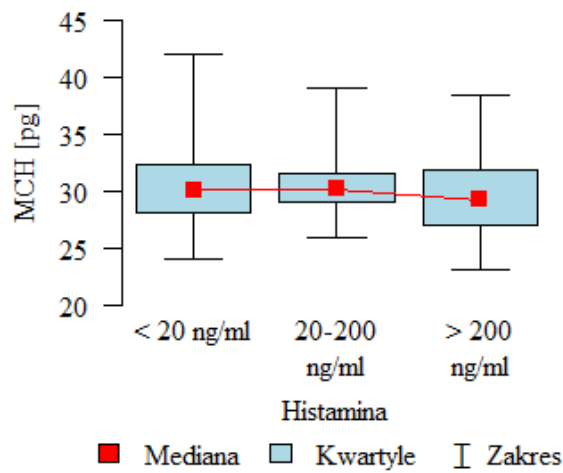
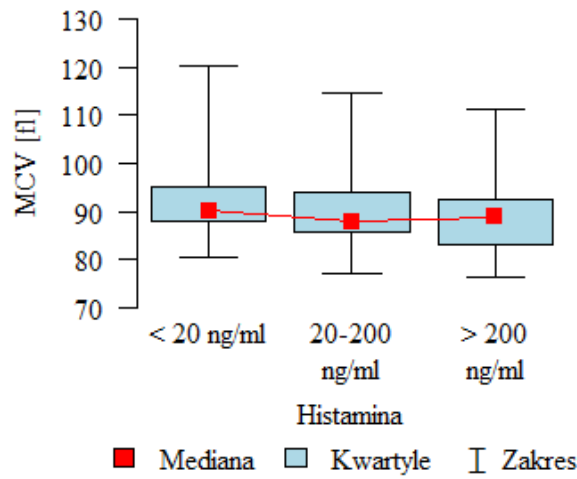
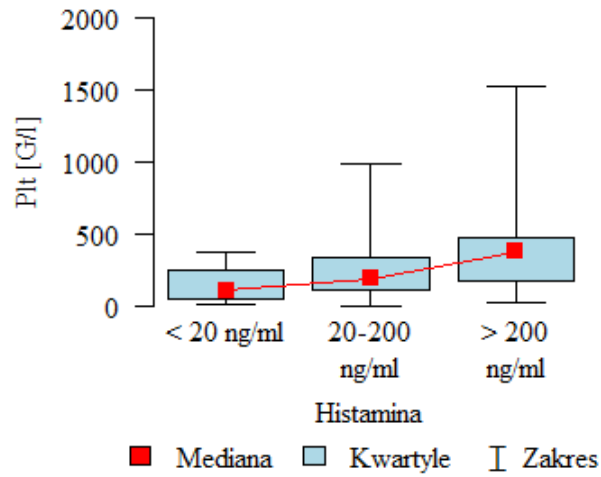
Parametr		Histamina			P
		< 20 ng/ml - A (N=17)	20-200 ng/ml - B (N=67)	> 200 ng/ml - C (N=16)	
WBC [G/l]	śr±SD	11,33±23,13	12,9±25,63	29,61±32,62	p<0,001 * C>B,A
	mediana	4,68	6,82	13,56	
	kwartyle	2,7 - 7,01	4,54 - 10,88	8,96 - 47,24	
RBC [T/l]	śr±SD	3,51±0,68	4±0,95	4,06±1,1	p=0,08
	mediana	3,69	3,97	4,14	
	kwartyle	3,12 - 3,83	3,4 - 4,58	3,5 - 4,52	
Hb [g/dl]	śr±SD	10,66±1,89	12,04±2,55	11,57±2,59	p=0,065
	mediana	10,2	12	11,6	
	kwartyle	9,4 - 11,3	10,8 - 13,45	9,7 - 13,45	
Hct [%]	śr±SD	29,67±9,1	35,64±7,59	35,01±7,73	p=0,041 * B>A
	mediana	29,4	36,1	35,75	
	kwartyle	27,8 - 35,4	31,7 - 39,5	29,87 - 39,5	
Plt [G/l]	śr±SD	157,88±122,17	276,61±235,7	392,5±351,98	p=0,023 * C,B>A
	mediana	113	192	376,5	
	kwartyle	55 - 247	110 - 344	176,5 - 477,5	
MCV [fl]	śr±SD	92,14±9,21	89,93±7,12	89,33±10,38	p=0,544
	mediana	90,1	87,9	88,8	
	kwartyle	88,2 - 95,2	85,75 - 94,05	83,18 - 92,65	
MCH [pg]	śr±SD	30,7±3,98	30,4±2,61	29,62±4,42	p=0,515
	mediana	30,1	30,2	29,25	
	kwartyle	28,2 - 32,3	29 - 31,51	27,03 - 31,83	
MCHC [g/dl]	śr±SD	33,26±1,78	33,8±1,11	33,08±1,42	p=0,118
	mediana	33,6	33,7	32,65	
	kwartyle	32,7 - 34,9	33,1 - 34,45	32,3 - 33,97	
Neutrofile [%]	śr±SD	47,99±24,61	53,51±22,57	60,73±17,5	p=0,191
	mediana	48	54,8	63,55	
	kwartyle	41 - 58	40,2 - 71,95	51,88 - 71,25	

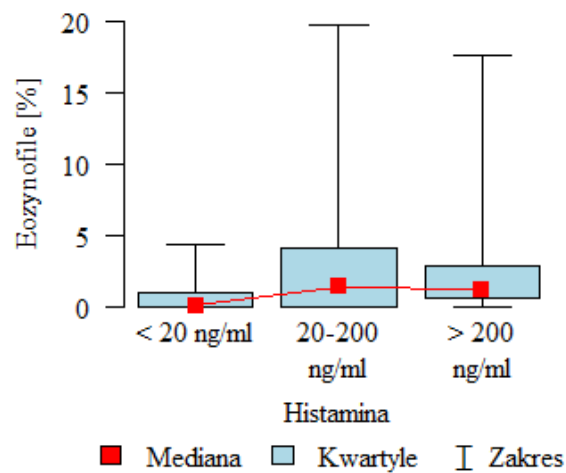
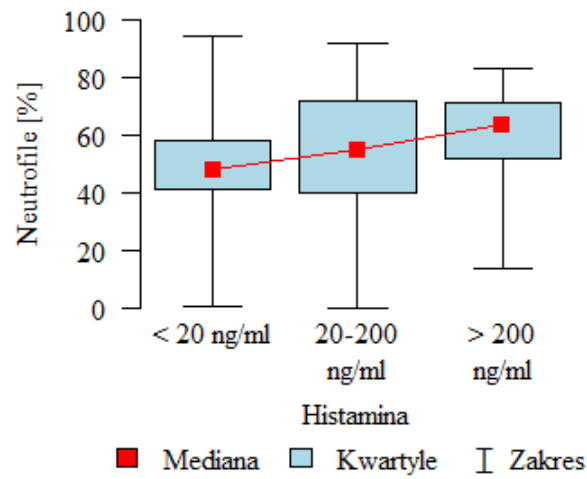
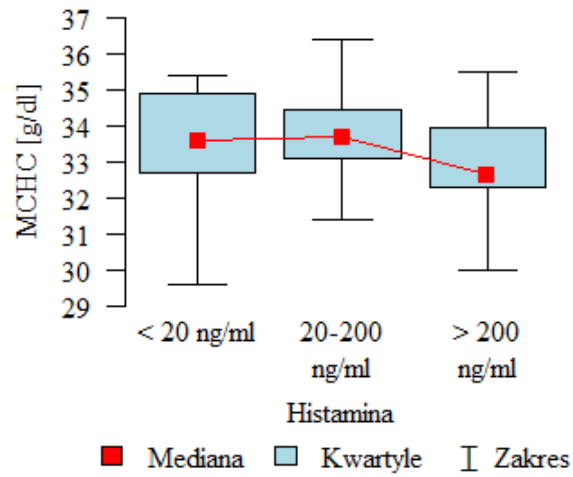
Parametr		Histamina			P
		< 20 ng/ml - A (N=17)	20-200 ng/ml - B (N=67)	> 200 ng/ml - C (N=16)	
Eozynofile [%]	śr±SD	0,77±1,26	2,57±3,31	2,91±4,62	p=0,036 * B,C>A
	mediana	0,1	1,4	1,2	
	kwartyle	0 - 1	0 - 4,15	0,62 - 2,92	
Bazofile [%]	śr±SD	0,98±1,17	0,73±0,9	1,36±1,79	p=0,411
	mediana	0,4	0,5	0,65	
	kwartyle	0 - 2	0 - 1	0,3 - 1,25	
Limfocyty [%]	śr±SD	36,56±19,9	29,75±17,75	16,76±11,03	p=0,004 * A,B>C
	mediana	37	26	12,1	
	kwartyle	26,8 - 49	16,25 - 38,2	8 - 23,6	
Monocyty [%]	śr±SD	10,96±13,41	12,37±21,11	11,16±17,98	p=0,654
	mediana	7,4	7,7	6,45	
	kwartyle	2 - 14,5	4,75 - 12,5	4 - 8,55	

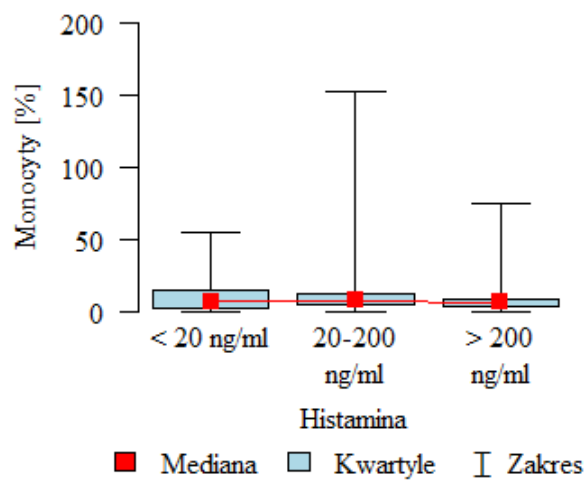
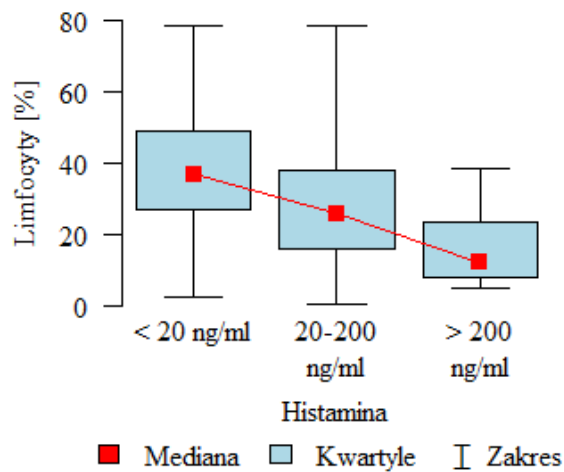
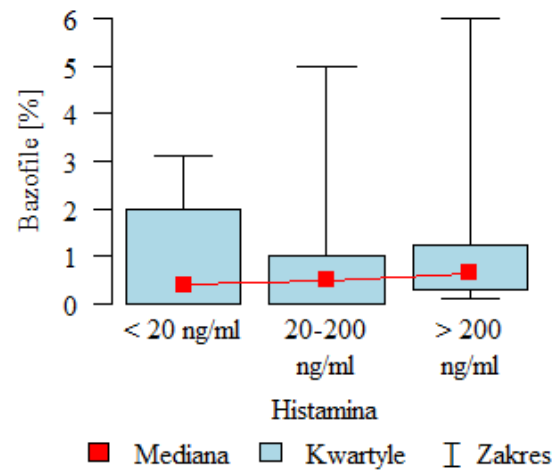
Tabela 19. Zestawienie zależności między zgrupowanymi stężeniami histaminy i grupami chorób hematologicznych - wyniki dokładnego testu Fishera.











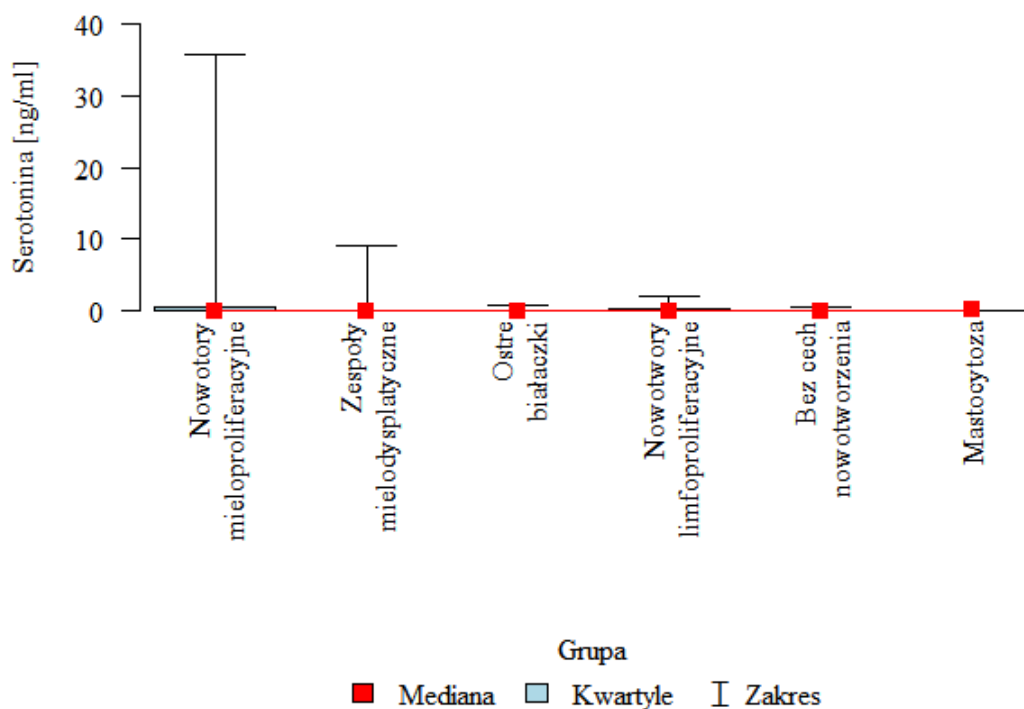
Rycina 24. Wykresy pudełkowe zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii krwi obwodowej.

4.3.5 Analiza zależności między stężeniami serotoniny a grupami chorób hematologicznych

Analiza przeprowadzona z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa nie wykazała istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem serotoniny a grupami chorób tj. określone sześć grup chorób nie różni się istotnie statystycznie poziomem serotoniny (tabela 20, rycina 25).

Serotonina [ng/ml]	Grupa						p
	Nowotory mieloproliferacyjne (N=20)	Zespoły mielodysplastyczne (N=10)	Ostre białaczki (N=13)	Nowotwory limfoproliferacyjne (N=22)	Bez cech nowotworzenia (N=33)	Mastocytoza (N=2)	
śr±SD	2,22±7,93	0,98±2,86	0,08±0,25	0,21±0,51	0,02±0,09	0,05±0,07	p=0,11
mediana	0	0	0	0	0	0,05	
kwartyle	0 - 0,58	0 - 0,08	0 - 0	0 - 0,22	0 - 0	0,03 - 0,08	

Tabela 20. Zestawienie zależności między stężeniem serotoniny a grupami chorób hematologicznych- wynik testu Kruskala-Wallisa.



Rycina 25. Wykres pudełkowy zależności pomiędzy stężeniami serotoniny notowanymi w poszczególnych grupach chorób hematologicznych.

4.3.6 Analiza korelacji pomiędzy stężeniami serotoniny i wartościami parametrów morfologii

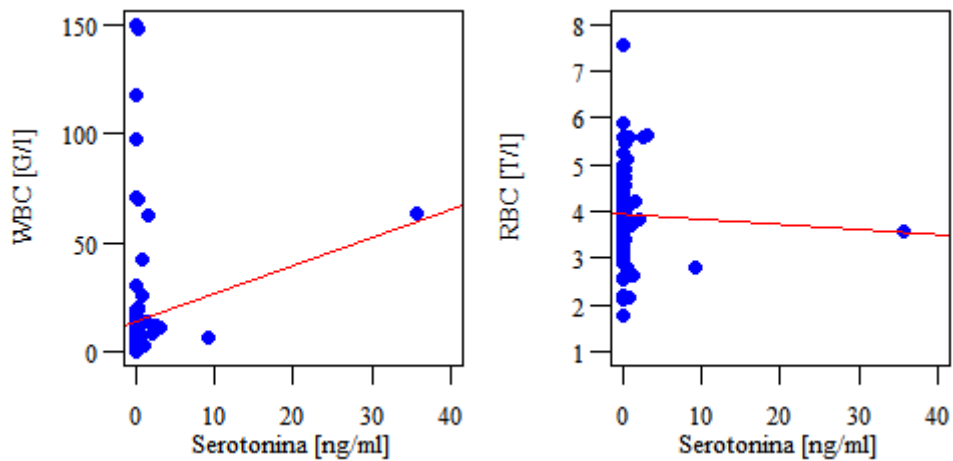
Analiza współczynników korelacji Spearmana (tabela 21, rycina 26) wykazała, że:

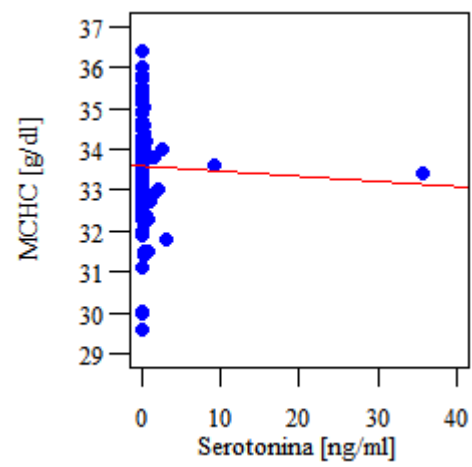
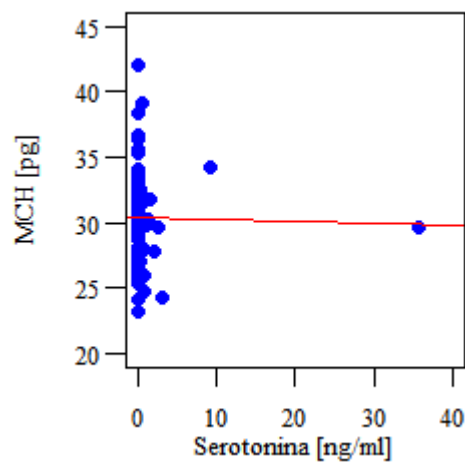
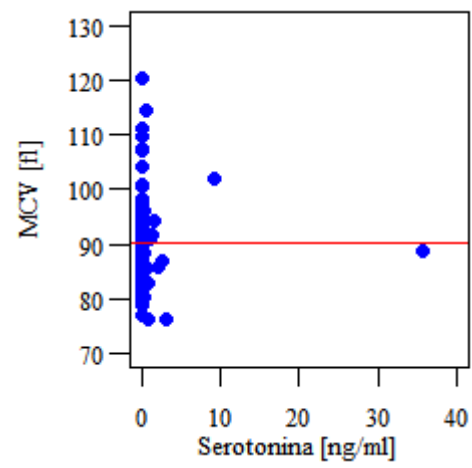
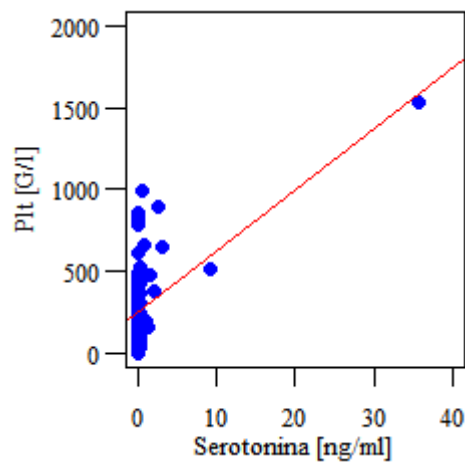
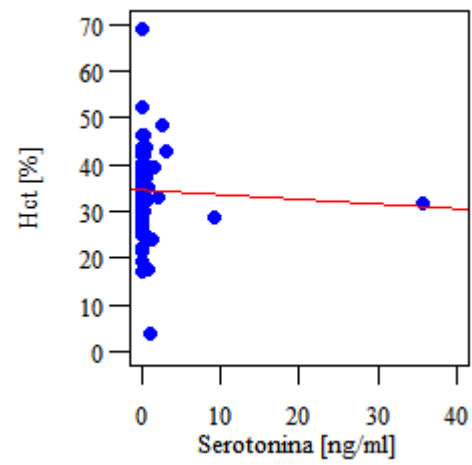
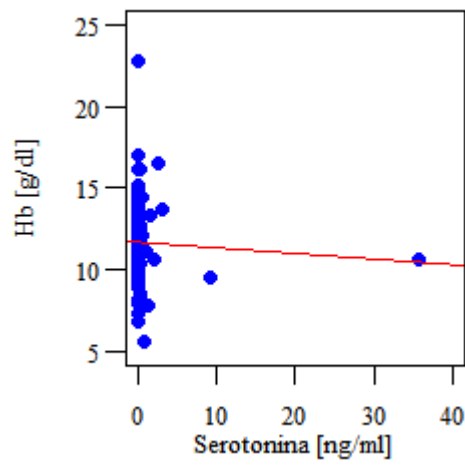
- stężenie serotoniny koreluje istotnie ($p < 0,05$) dodatnio ($r > 0$) z WBC i Plt,
- stężenie serotoniny koreluje istotnie ($p < 0,05$) ujemnie ($r < 0$) z MCHC i limfocytami.

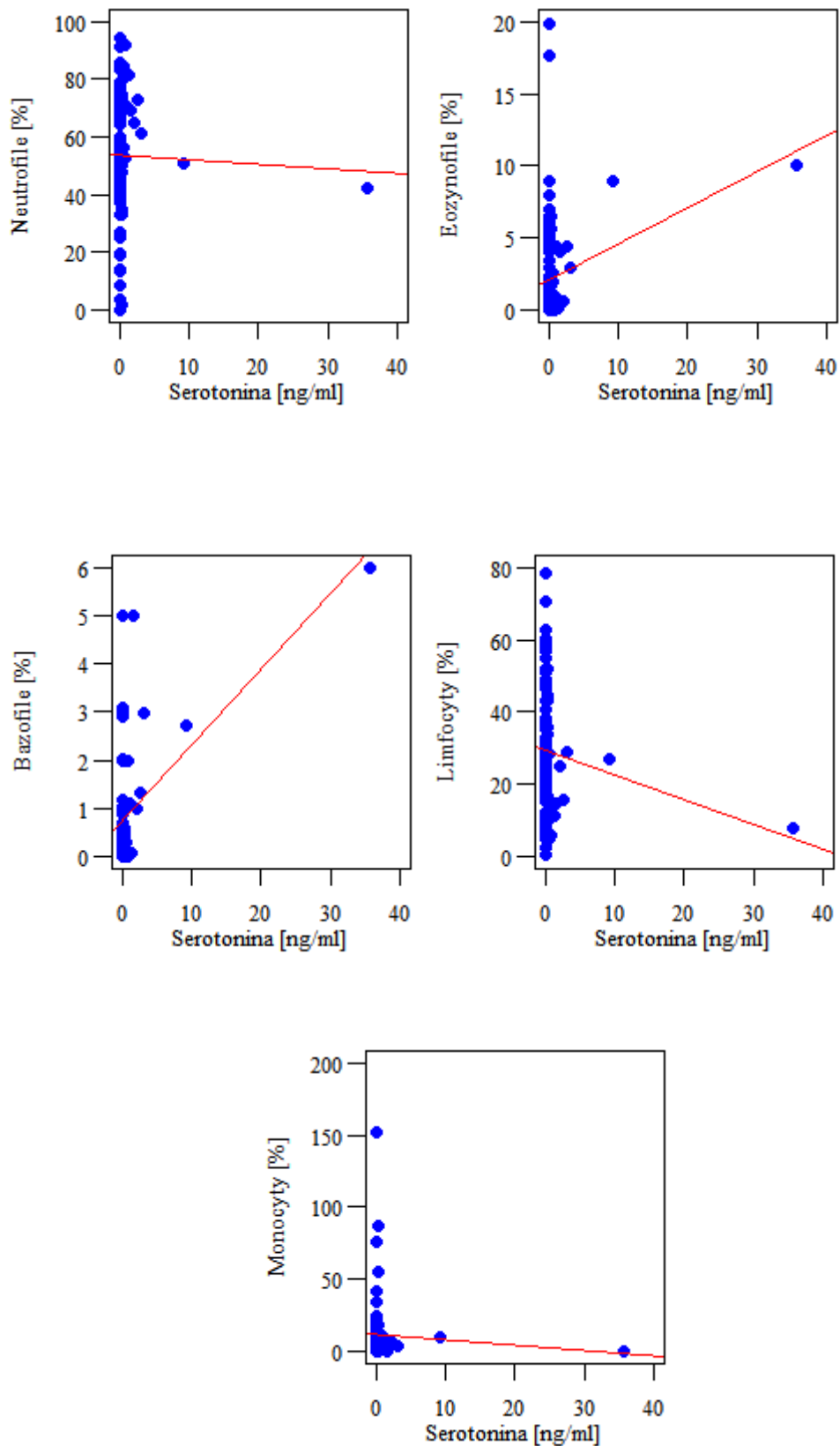
Parametr	Serotonina
	Współczynnik korelacji Spearmana
WBC [G/l]	$r=0,316, p=0,001 *$
RBC [T/l]	$r=0,062, p=0,538$
Hb [g/dl]	$r=-0,001, p=0,995$
Hct [%]	$r=0,015, p=0,883$
Plt [G/l]	$r=0,261, p=0,009 *$
MCV [fl]	$r=-0,06, p=0,554$

Parametr	Serotonina
	Współczynnik korelacji Spearmana
MCH [pg]	$r=-0,142, p=0,158$
MCHC [g/dl]	$r=-0,219, p=0,029 *$
Neutrofile [%]	$r=0,161, p=0,11$
Eozynofile [%]	$r=0,094, p=0,353$
Bazofile [%]	$r=0,185, p=0,066$
Limfocyty [%]	$r=-0,27, p=0,007 *$
Monocyty [%]	$r=-0,041, p=0,689$

Tabela 21. Zestawienie wyników korelacji pomiędzy stężeniami serotoniny a parametrami morfologii krwi- analiza współczynników Spearmana. *zależność istotna statystycznie ($p<0,05$).





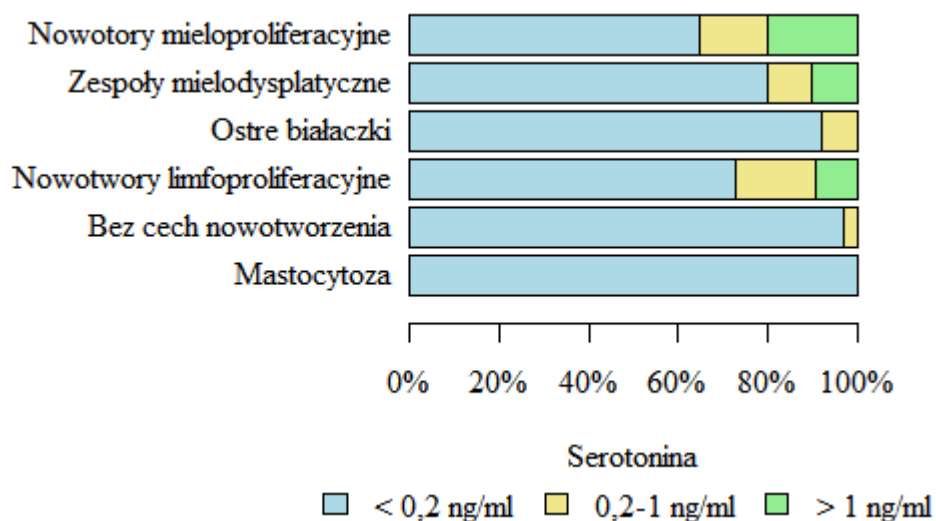


Rycina 26. Graficzne zobrazowanie korelacji między stężeniami serotoniny i wartościami parametrów morfologii krwi obwodowej.

4.3.7 Analiza zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami serotoniny a grupami chorób hematologicznych

Zdecydowaną większość we wszystkich grupach chorób stanowiły wyniki poniżej 0,2 ng/ml (rycina 27).

Analiza nie wykazała istotnych statystycznie zależności między grupami stężeń serotoniny a grupami chorób hematologicznych ($p > 0,05$) (tabela 22).



Rycina 27. Wykres rozkładu procentowego zakresów stężeń serotoniny w poszczególnych grupach chorób hematologicznych.

Serotonina	Grupa						p
	Nowotory mieloproliferacyjne (N=20)	Zespoły mielodysplastyczne (N=10)	Ostre białaczki (N=13)	Nowotwory limfoproliferacyjne (N=22)	Bez cech nowotworzenia (N=33)	Mastocytoza (N=2)	
< 0,2 ng/ml	13 (65,00%)	8 (80,00%)	12 (92,31%)	16 (72,73%)	32 (96,97%)	2 (100,00%)	p=0,084
0,2-1 ng/ml	3 (15,00%)	1 (10,00%)	1 (7,69%)	4 (18,18%)	1 (3,03%)	0 (0,00%)	
> 1 ng/ml	4 (20,00%)	1 (10,00%)	0 (0,00%)	2 (9,09%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	

Tabela 22. Zestawienie zależności między zakresami stężeń serotoniny a grupami chorób hematologicznych- wynik dokładnego testu Fishera.

4.4.8 Analiza zależności między zgrupowanymi w przedziałach stężeniami serotoniny a wartościami parametrów morfologii

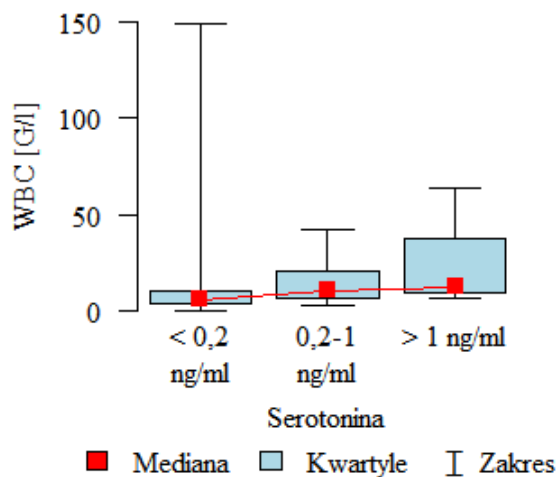
Ocena zależności z uwzględnieniem przedziałowych stężeniem serotoniny (tabela 23, rycina 28), wykazała, że:

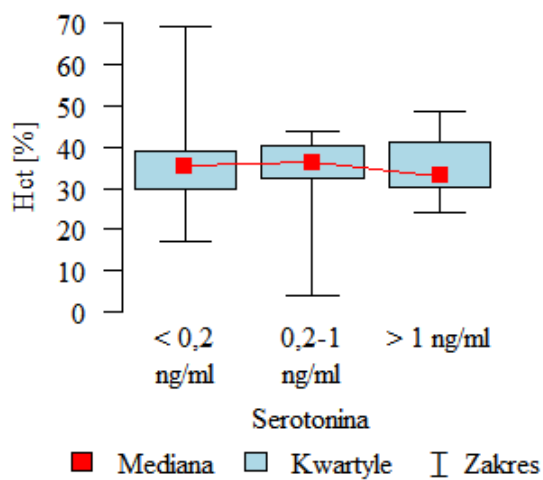
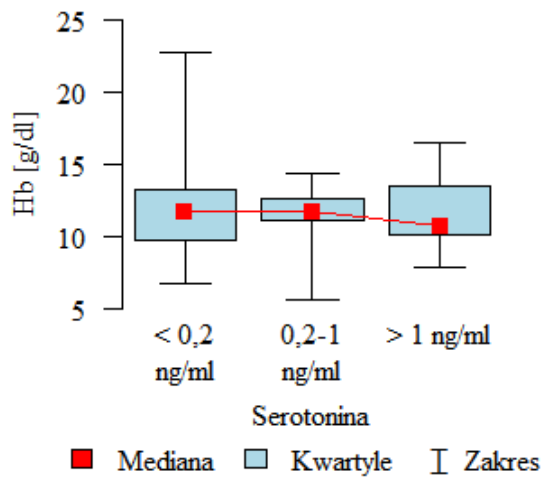
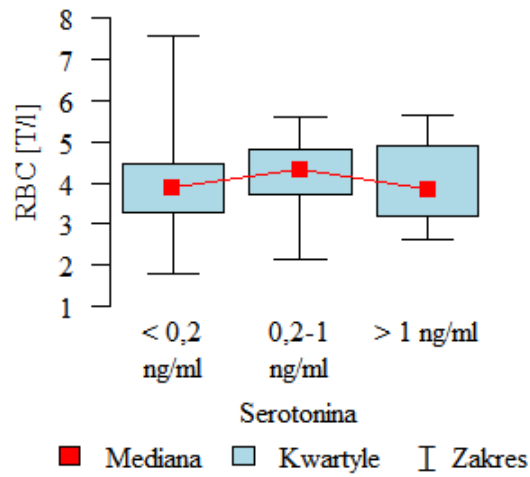
- wartości WBC i Plt były istotnie wyższe w grupie z serotoniną > 1 ng/ml niż w grupie z serotoniną < 0,2 ng/ml,
- wartości MCHC i odsetka limfocytów były istotnie wyższe w grupie z serotoniną < 0,2 ng/ml niż w grupie z serotoniną 0,2-1 ng/ml,
- odsetek neutrofilów był istotnie większy w grupie z serotoniną 0,2-1 ng/ml niż w grupie z serotoniną < 0,2 ng/ml,
- odsetek bazofilów był istotnie większy z serotoniną > 1 ng/ml niż w pozostałych grupach.

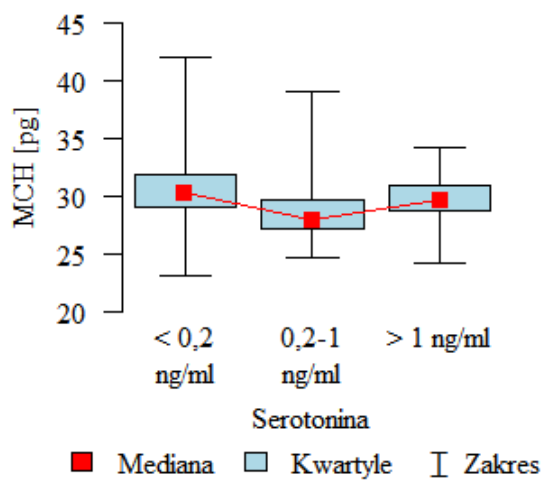
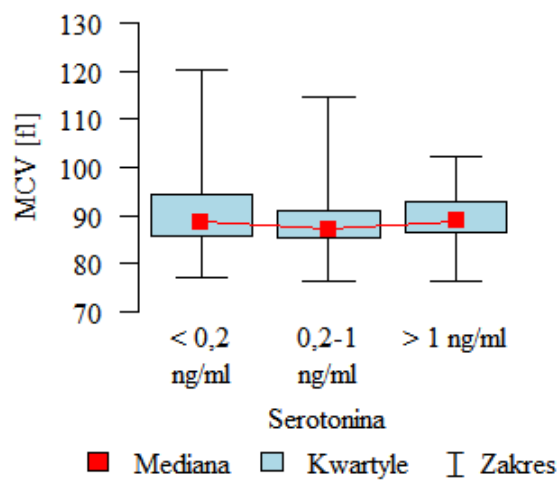
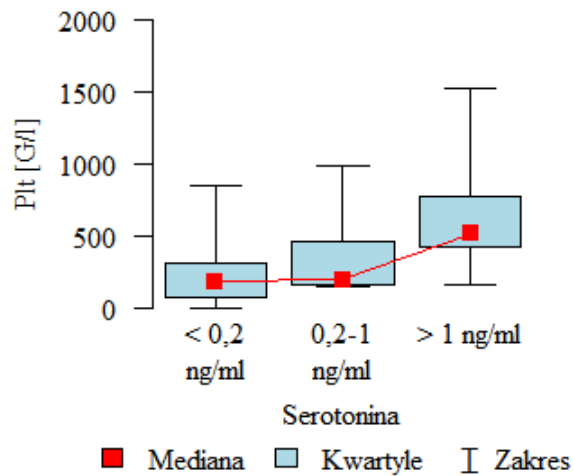
Parametr		Serotonina			P
		< 0,2 ng/ml - A (N=83)	0,2-1 ng/ml - B (N=10)	> 1 ng/ml - C (N=7)	
WBC [G/l]	śr±SD	14,47±28,31	15,1±12,22	25,46±25,77	p=0,013 * C>A
	mediana	6,11	10,54	12,41	
	kwartyle	4,1 - 10,63	6,96 - 20,27	9,81 - 37,91	
RBC [T/l]	śr±SD	3,9±0,92	4,12±1,06	4,04±1,21	p=0,647
	mediana	3,89	4,32	3,84	
	kwartyle	3,3 - 4,46	3,7 - 4,81	3,18 - 4,89	
Hb [g/dl]	śr±SD	11,75±2,5	11,54±2,36	11,77±2,91	p=0,958
	mediana	11,7	11,7	10,7	
	kwartyle	9,8 - 13,25	11,15 - 12,62	10,1 - 13,55	
Hct [%]	śr±SD	34,68±7,51	32,51±12,43	35,49±8,61	p=0,907
	mediana	35,4	36,2	33	
	kwartyle	29,6 - 39,05	32,48 - 40,15	30,15 - 41,25	
Plt [G/l]	śr±SD	233,98±193,65	347,2±286,85	657,86±444,27	p=0,004 * C>A
	mediana	184	198,5	514	
	kwartyle	75,5 - 308,5	163 - 462,25	427,5 - 772,5	
MCV [fl]	śr±SD	90,39±7,89	89,24±9,99	89,46±7,93	p=0,727
	mediana	88,7	87,2	88,8	
	kwartyle	85,85 - 94,25	85,55 - 90,87	86,5 - 92,95	
MCH [pg]	śr±SD	30,54±3,09	29,05±3,96	29,69±3,12	p=0,114
	mediana	30,3	27,95	29,7	
	kwartyle	29 - 31,85	27,23 - 29,78	28,75 - 31	
MCHC [g/dl]	śr±SD	33,76±1,32	32,5±0,97	33,21±0,74	p=0,004 * A>B
	mediana	33,8	32,35	33,4	
	kwartyle	33,05 - 34,65	31,68 - 32,85	32,95 - 33,7	
Neutrofile [%]	śr±SD	50,75±22,55	71,78±14,33	63,2±13,43	p=0,006 * B>A
	mediana	53,5	74,25	65,1	
	kwartyle	39 - 67,3	59,82 - 82,25	55,85 - 71	
Eozynofile [%]	śr±SD	2,27±3,44	1,29±1,49	4,43±3,8	p=0,117
	mediana	1	0,7	4	
	kwartyle	0 - 3	0,05 - 2,22	1,8 - 6,65	

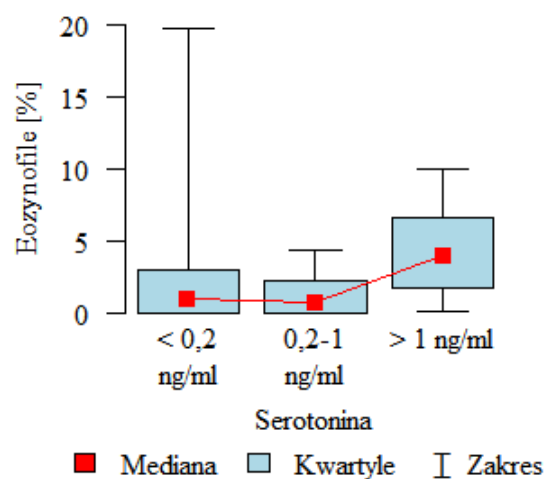
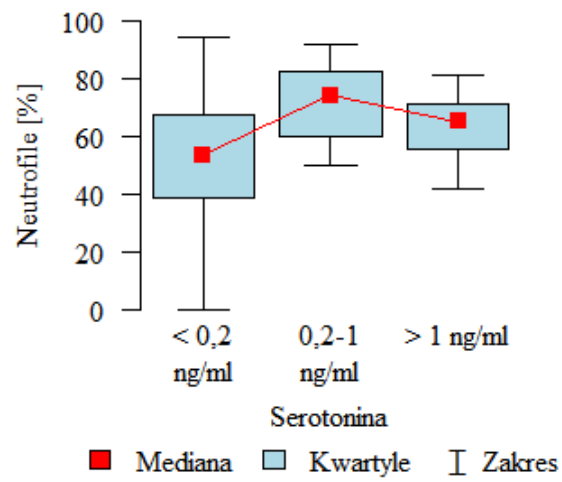
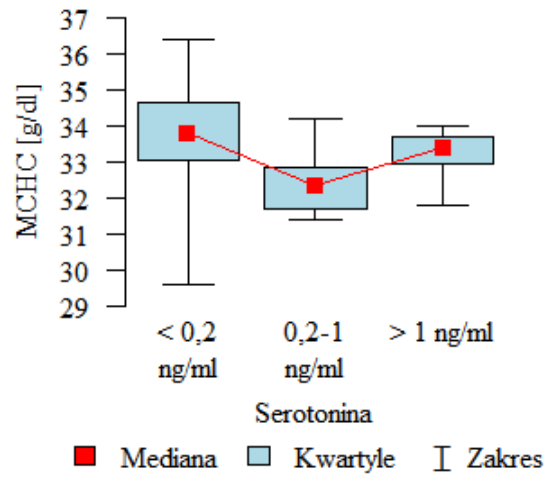
Parametr		Serotonina			P
		< 0,2 ng/ml - A (N=83)	0,2-1 ng/ml - B (N=10)	> 1 ng/ml - C (N=7)	
Bazofile [%]	śr±SD	0,74±0,93	0,66±0,62	2,73±2,16	p=0,014 * C>A,B
	mediana	0,5	0,5	2,7	
	kwartyle	0 - 1	0,23 - 1	1,15 - 4	
Limfocyty [%]	śr±SD	31,55±18,31	13,34±9,08	18,76±8,26	p=0,002 * A>B
	mediana	29,4	11,15	15,5	
	kwartyle	17,6 - 43	6 - 15,8	13,25 - 26,15	
Monocyty [%]	śr±SD	12,93±21,05	8,73±4,83	4,76±3,81	p=0,249
	mediana	7,4	9,05	5,2	
	kwartyle	4,1 - 13,9	5,28 - 10,75	2 - 6,9	

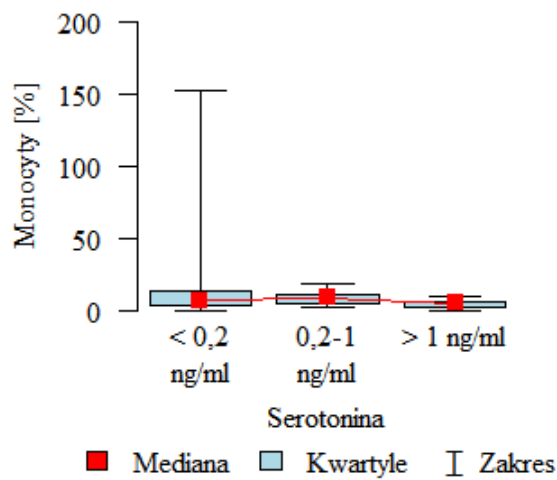
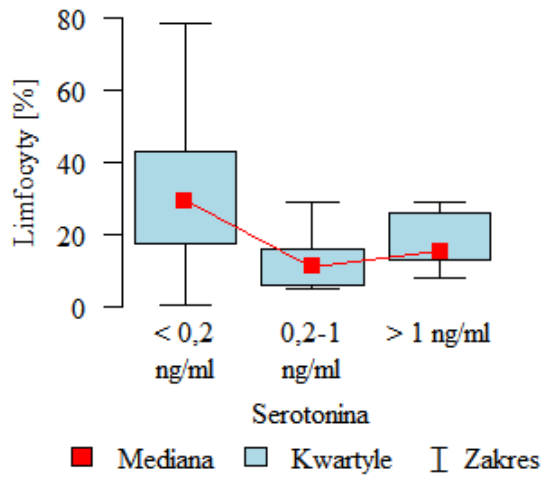
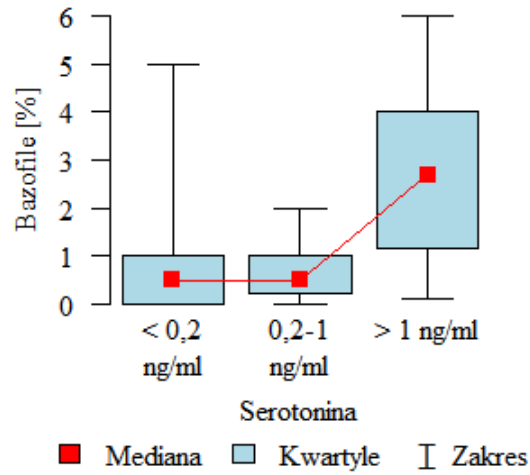
Tabela 23. Zestawienie zależności między zgrupowanymi w przedziałach stężeniami serotoniny a parametrami morfologii krwi- wyniki testu Kruskala-Wallisa oraz analizy post-hoc (test Dunna).











Rycina 28. Wykresy pudełkowe zależności między stężeniami serotoniny w poszczególnych zakresach a wartościami parametrów morfologii.

5. Dyskusja

Badania zawartości histaminy i serotoniny w materiale biologicznym są prowadzone głównie w celach naukowych, aczkolwiek analiza serotoniny we krwi ma znaczenie także w diagnostyce klinicznej przy rozpoznawaniu nowotworów neuroendokrynnych [97]. Oznaczenia wykonuje się najczęściej metodę immunologiczną ELISA, która jak wiadomo nie cechuje się najwyższą specyficnością substratową. Ograniczona specyficność metody może być szczególnie problematyczna w przypadku odczytów niskich stężeń rzeczywistych w próbce, a jak wynika z przeprowadzonych badań w niniejszej pracy, większość odczytów w przypadku serotoniny w szpiku, kształtowało się właśnie w zakresie wartości niskich.

Istotnym ograniczeniem dla wykorzystania metody immunologicznej w badaniach szpiku wydawał się fakt, że jak do tej pory nie publikowano wyników badań na temat oznaczeń, techniką ELISA, histaminy czy serotoniny w szpiku kostnym, a materiał ten w dedykowanych zastawach do oznaczeń nie był wprost wymieniany jako nadający się do analizy. Z kolei brak opisanych wartości referencyjnych dla poziomów histaminy i serotoniny w szpiku uniemożliwiał weryfikację uzyskiwanych wyników i ocenę ich poprawności. Przegląd piśmiennictwa nie wykazał, aby szpik badano pod kątem oceny stężeń obu tych amin jakkolwiek metodą analityczną i wedle najlepszej wiedzy niniejszym podjęte badania szpiku są pierwszymi w tym zakresie.

Dlatego też w pierwszej kolejności koniecznym było opracowanie metodyki dla oznaczeń obu parametrów z wykorzystaniem metody referencyjnej, o wysokiej specyficzności, dla uniknięcia zarzutu błędnej interpretacji uzyskiwanych wartości pomiarowych, szczególnie w zakresie wykluczenia możliwych interferencji krzyżowych. Metodą z wyboru, dla selektywnego oznaczania związków organicznych w materiale biologicznym, jest chromatografia cieczowa z detekcją mas (LC-MS). Metodę cechuje niekwestionowana specyficzność oznaczeń i znajduje ona coraz szersze zastosowanie w medycynie laboratoryjnej. Wybór tej techniki był uzasadniony także faktem, iż była ona z powodzeniem stosowana przez innych badaczy w oznaczeniach histaminy, a także serotoniny, aczkolwiek w innym niż szpik materiale (np. krew, mocza) [98,99,100,101]. Niestety przegląd dostępnego piśmiennictwa nie wykazał, aby obie aminy analizowano jednocześnie, bez względu na rodzaj matrycy, w jednym cyklu analitycznym, dlatego też należało opracować metodykę ich rozdzielania chromatograficznego, praktycznie od podstaw.

Opracowując procedurę analityczną uwzględniano konieczność spełnienia surowych kryteriów analitycznych wymaganych dla oznaczeń w laboratoriach medycznych, ale także możliwość ewentualnego wykorzystania metody do badań innych materiałów biologicznych i potencjalnych zastosowań w analizach rutynowych. Dlatego też wiele uwagi poświęcono na wybór odpowiedniego, ale dostępnego układu analitycznego, umożliwiającego także pomiary po względnie prostym przygotowaniu materiału, przy ograniczeniu etapów przygotowania próbki, chociaż nieoczekiwanie okazało się to niezwykle czasochłonne.

W pierwszej kolejności podjęto próbę doboru optymalnego układu chromatograficznego dla skutecznego rozdziału zarówno histaminy jak i serotoniny w jednym cyklu analitycznym, po uprzedniej optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas. Testy rozpoczęto wykorzystując kolumnę chromatograficzną typu C18, należącą do grupy najpowszechniej stosowanych obecnie kolumn chromatograficznych w odwróconym układzie faz (Chromolith Performance RP-18 100-2mm). Seria analiz z użyciem tej kolumny wykazała, że chociaż parametry chromatograficzne dla serotoniny były satysfakcjonujące, to w przypadku histaminy obserwowano praktycznie brak retencji i elucję w okolicy martwego czasu retencji. Pomimo modyfikacji składu fazy ruchomej, poprzez zmiany stężenia i odczynu pH buforu w zakresie pH od 2,8 aż do 5,4, nie uzyskano istotnej zmiany pozytywnej. Aczkolwiek przy wzroście wartości pH obserwowano niewielkie wydłużenie czasu retencji histaminy, to jednocześnie występowało niepożądane ogonowanie pików z obniżeniem intensywności sygnałów i to dla obu związków. Jak się wydaje, mniejsza kwasowość fazy ruchomej skutkowała niedostatecznym protonowaniem azotu w cząsteczce histaminy i deficytem jonów wodorowych, pomimo wysokiego stężenia buforu, co przekładało się na mniej wydajną jonizację w źródle ESI. Przeprowadzone próby wykluczyły raczej możliwość wykorzystania typowych wypełnień C18 do jednoczesnego, skutecznego rozdziału chromatograficznego analizowanych związków.

Już po pierwszych próbach z układem typu C18 i ocenie charakterystyki fizykochemicznej obu związków (tabela 2) zauważono, że cechują się one istotnie odmiennymi właściwościami w odniesieniu do wartości determinujących rozdział chromatograficzny (stałe dysocjacji pK_a, momenty dipolowe, itp.). Przede wszystkim, histamina wykazuje bardzo silne właściwości hydrofilowe w warunkach analizy w odwróconym układzie faz i środowisku kwaśnym, w przeciwieństwie do serotoniny, o lepszym powinowactwie do

układów lipofilnych. Teoretycznie zatem, każda zmiana parametrów danego układu preferująca retencję chromatograficzną jednego z tych związków, skutkować może pogorszeniem parametrów analitycznych względem drugiego. Takie też charakterystyki w trakcie pracy rzeczywiście zauważono. Dlatego też rozważono i przebadano inne układy rozdzielające, zamiast dokonywać daleko idących modyfikacji parametrów elucyjnych. W pierwszej kolejności uwzględniono złoża retencyjnego preferującej retencję związków silnie polarnych i umożliwiającej rozdział w warunkach 100% wody. Przypuszczano, że układ taki poprawi retencję histaminy przy zachowaniu dobrych parametrów także dla serotoniny. Przetestowano dwie dostępne komercyjnie kolumny dedykowane dla analitów polarnych: C18 Polar (Kinetex Polar C18 2,6 μm , 100 x 2,1 mm) oraz F5 (Kinetex F5 1,7 μm 50x2,1 mm). Z dużym zaskoczeniem zaobserwowano, że aczkolwiek znacznie poprawiła się rozdzielczość piku histaminy, to jednak intensywność sygnału pozostawała na względnie niskim poziomie, nie pozwalającym na osiągnięcie realnych granic oznaczalności poniżej 1 ng/ml. Mimo użycia kolumn dedykowanych, żadna z nich nie poprawiła istotnie retencji histaminy, co skutkowało jej elucją w krótkim czasie. Jak wiadomo krótki czas retencji sprzyja jednoczesnemu wymywaniu składników tła biologicznego, głównie soli, a wysokie stężenia jonu sodowego czy potasowego są jednymi z najsilniejszych czynników supresorowych w źródle ESI. W tym względzie notowanie sygnałów o niskiej intensywności dla histaminy było w pełni zrozumiałe. Zwrócić należy uwagę na fakt, iż przetestowano kolumny o krótkiej i średniej długości (5 oraz 10cm), uzyskane wyniki nie wykluczają skuteczności obu kolumn w wariancie najdłuższym, 15 cm.

W dalszej kolejności uznano za zasadne przeprowadzenie prób z wykorzystaniem alternatywnego dla układu faz odwróconych, wypełnienia typu HILIC. Rozwiązanie takie jest zalecane do rozdziału związków o charakterze silnie polarnym. Aczkolwiek w tym przypadku istniała obawa, że o ile polarna histamina ulegać będzie odpowiedniej retencji, to znacznemu pogorszeniu ulegną parametry notowane dla serotoniny. Zmiana charakterystyki wypełnienia na funkcjonalnie przeciwną, względem poprzednich układów, mogła skutkować sytuacją odwrotną, względem analitów. Ponadto, jak opisano w części wstępnej niniejszej rozprawy, stosowanie układów typu HILIC wiąże się z szeregiem ograniczeń i możliwych problemów na etapie walidacji metody. Tym nie mniej ostatecznie przetestowano także dwie kolumny typu HILIC, o nieco odmiennych względem siebie parametrach (Kinetex 1,7 μm HILIC 100 x 2,1 mm oraz SunShell HILIC-Amide, 2,6 μm ,

2.1 mm i.d x 150 mm). Testowanie obu kolumn wymagało zmiany sposobu przygotowania próbek. O ile układy typu C18 preferują przygotowanie próbki w roztworze wodnym, tak układy HILIC przeciwnie, w roztworach rozpuszczalnika organicznego. Paradoksalnie konieczność odpowiedniego przygotowania próbek pod analizę w układzie HILIC okazała się być elementem pozytywnym uzasadniającym przygotowanie próbek metodą strąceniową nadmiarem rozpuszczalnika, co z kolei wpłynęło na uproszczenie etapu przygotowania próbek przy zachowaniu wysokiej czułości oznaczeń. Próbką materiału biologicznego po strąceniu nadmiarem acetonitrylu mogła być bezpośrednio dozowana na kolumnę chromatograficzną jedynie po odwirowaniu. W przypadku kolumn C18 nadmiar rozpuszczalnika winien być odparowany a pozostałość ponownie rozpuszczona w buforze wodnym, bądź dodatkowo mieszana z wodą dla uzyskania większościowego udziału wody w roztworze.

Nieco odmienna charakterystyka zastosowanych kolumn w układzie HILIC, rzutowała istotnie na skuteczność rozdzielczą chromatograficzną. W układzie HILIC w wersji Kinetex pomimo wielu prób i modyfikacji składu fazy ruchomej, trudno było uzyskać piki o wymaganej rozdzielczości. Jak oczekiwano, odwróceniu uległa kolejność elucji analitów, serotonina wykazywała słabą retencję w przeciwieństwie do względnie silnej retencji histaminy, której elucja wymagała stosunkowo dużego, procentowego udziału wody w gradiencie fazowym. Aczkolwiek kolumna Kinetex była krótsza od kolumny SunShell (10 vs. 15cm), to jej wypełnienie cechowało drobniejsze uziarnienie przez oczekiwać należało jej wyższej sprawności w stosunku do kolumny zastosowanej alternatywnie (1,7 um vs. 2,1 um). Dlatego też porównanie parametrów analitycznych w stosunku do analizowanych związków w tym przypadku wydaje się uzasadnione. Znacznie lepsze wyniki uzyskano w układzie HILIC w wersji SunShell. Aczkolwiek układ ten wymagał również poświęcenia bardzo długiego czasu dla optymalizacji parametrów, to notowane wyniki uznać należało za satysfakcjonujące (ryciny 15-18). Po ocenie uzyskiwanych wyników (kształt piku, symetria, interferencje matrycowe, retencja, powtarzalność wyników) stwierdzono, że spośród przebadanych kolumn chromatograficznych, układ typu HILIC w wersji SunShell okazał się najbardziej optymalnym dla realizacji przyjętych założeń.

Przeprowadzone badania potwierdzają, że analizy z wykorzystaniem HILIC są niezwykle wymagające i czasochłonne, a na etapie walidacji metody wymagają dużego doświadczenia analityka. Często zaskakującym okazywał się olbrzymi wpływ niewielkich nawet zmian w składzie fazy ruchomej na jakość prowadzonych pomiarów. Już choćby

niewielkie różnice w proporcjonalnym udziale wody w fazie z rozpuszczalnikiem (na poziomie bliskim 1%), skutkowały zmianami czasu retencji serotoniny, a co gorsze, pogorszeniem rozdzielczości pików. Tak niewielkie różnice w udziale wody na początku gradientu, w przypadku układów typu C18, nie wykazują tak dużego wpływu na parametry retencji i są zwykle pomijane w praktyce. Z uwagi na fakt, że problem ten dotyczył wyłącznie serotoniny, notowanej przy krótkim czasie, przyjęć należy, że ulegała ona słabej retencji, a niewielkie zaburzenie stanu równowagi dynamicznej w fazie stacjonarnej skutkowało co najmniej częściową utratą oddziaływania międzyfazowego.

Dla zachowania odtwarzalności metody, przy przygotowywaniu materiałów i roztworów roboczych, wykorzystywano w miarę dostępności, fabryczne zestawy odczynnikowe, jak na przykład porcjowany w saszetkach mrówczanu amonu (6,306 g). Stosowanie wystandaryzowanych materiałów pozwoliło na zachowanie czasowej stabilności metody. Dużej staranności wymagało przygotowywanie nowych składników faz ruchomych z precyzyjnym odmierzeniem proporcji użytych składników. Natomiast wiele doświadczeń w pracy z układem HILIC okazywało się niezwykle zaskakujących. Szczególnym doświadczeniem była weryfikacja zaleceń opisywanych w notach aplikacyjnych przez samego producenta, odnośnie stosowania czystego acetonitrylu do przemywania systemu dozowania próbek, jako elementu znacząco poprawiającego jakość uzyskiwanych wyników. Wiadomo, że rozdział chromatograficzny w układzie HILIC wymaga użycia buforów w postaci soli, nierozpuszczalnych w czystym acetonitrylu. O ile początkowo stosowano się bezwzględnie do wszystkich zaleceń, tak w tym przypadku już po kilkudziesięciu oznaczeniach uszkodzeniu uległ rotor niskiego ciśnienia układu przemywania dozownika. Oględziny tego elementu wykazały jego dramatyczne zużycie, co było trudne do wytłumaczenia w przypadku aparatu niemalże fabrycznie nowego. Przyczyną awarii była najprawdopodobniej krystalizacja soli roztworu buforowego, albowiem zastosowanie 10% dodatku wody do acetonitrylu nie skutkowało podobnym choćby zużyciem pomimo setek przeprowadzonych analiz.

Kolejnym elementem wartym podkreślenia jest to, że układ wymagał przejścia co najmniej pięciu cykli analitycznych dla stabilizacji parametrów rozdziału chromatograficznego, nawet po krótkiej przerwie w pracy (analiza próbek zerowych przed właściwymi pomiarami). W przeciwnym razie pojawiły się problemy ze ścisłym odtworzeniem czasu i innych parametrów retencji, nawet przy precyzyjnym odmierzeniu składników fazy ruchomej. Układ po sporządzeniu nowych faz wymagał analizy próbek kontrolnych, celem

weryfikacji poprawności oznaczeń, ewentualnie niewielkiej modyfikacji przebiegu gradientu fazowego. W dostępnym piśmiennictwie inni badacze wskazują na konieczność stosunkowo długiej „ekwilibracji”, który nie powinien być krótszy niż 10 objętości kolumny [89]. Aczkolwiek według obliczeń w przypadku zastosowanej kolumny czas ten określić należało teoretycznie na poziomie 5 minut, tak w procedurze wyznaczono go na poziomie 7 minut, co gwarantowało dobrą stabilność i powtarzalność czasów retencji (tabela 8).

Po ustaleniu optymalnych warunków rozdzielania chromatograficznego przystąpiono do wyznaczenia parametrów walidacyjnych metody. Istotnym ograniczeniem był wybór odpowiedniej matrycy „zerowej”, niezbędnej do przygotowania roztworów kalibracyjnych i kontrolnych. Brak dostępności szpiku o zerowym stężeniu analitów uniemożliwił zastosowanie tej matrycy, a próby rozkładu tych związków poprzez nawet 48 godzinne naświetlanie pod lampą UV, było nieskuteczne. Aczkolwiek w takich przypadkach badacze stosują inne matryce, jak sól fizjologiczna ewentualnie wzbogacona materiałem białkowym, to w ocenie autorki są to matryce zbyt ubogie pod względem tła biologicznego i nie pozwalają one na ocenę zjawiska supresji. Dlatego też wykorzystano stosunkowo złożoną matrycę w postaci osocza krwi, w której oczekiwano stosunkowo niskich wartości analizowanych związków. Analiza poziomów wyjściowych stężeń w osoczu metodą dodatku wzorca wykazała niski poziom serotoniny (0,1ng/ml) i nieco wyższy poziom histaminy (1,1 ng/ml), materiał ten obciążano wzorcami i uwzględniano początkowe stężenia analitów przy wyznaczaniu wartości oczekiwanej względem zadanej.

Wyznaczając metodę przygotowania próbek do analizy uwzględniono wymagania układu HILIC odnośnie składu próbki pod względem zawartości wody, jako silnego czynnika elucyjnego, w stosunku do rozpuszczalnika organicznego (acetonitrylu). Zbyt wysoki udział procentowy wody skutkuje najczęściej pogorszeniem parametrów retencji i utratą rozdzielczości układu, z kolei pożądanym wysoki udział acetonitrylu jest technicznie trudny do uzyskania (konieczność nadmiarowego rozcieńczenia próbki i znaczna utrata czułości oznaczeń). Aczkolwiek zasadnym było rozważenie ekstrakcji do fazy stałej (SPE), to jednak odstąpiono od prób w tym zakresie z uwagi na wieloetapowość samej procedury SPE, co istotnie wydłużałoby etap przygotowania materiału. Wydaje się również, że w przypadku silnie hydrofilowej histaminy, ekstrakcja SPE mogłaby zachodzić ze stosunkowo niską wydajnością, co przekładałoby się na spadek czułości oznaczeń. Natomiast optymalną wydawała się metoda strąceniowa z uwagi na preferencję układu

HILIC odnośnie wysokiej zawartości rozpuszczalnika organicznego w próbce, a wytracenie wielkocząsteczkowych struktur i eliminacje zjawiska supresji jonów, umożliwi stosunkowo duży nadmiar objętościowy acetonitrylu. Uzyskane wyniki podjętych prób wykazały, że najbardziej optymalnym było użycie 20-krotnego nadmiaru rozpuszczalnika w postaci fazy B (acetonitryl : bufor 90:10). Z jednej strony, jak się wydaje w takich warunkach zachodziło wydajne strącenie niepożądanych składników matrycy, z drugiej zaś odpowiednio duże rozcieńczenie minimalizowało zjawisko supresji. Proporcja składowych próbki w układzie woda / acetonitryl była niemalże identyczna jak początkowe składowe gradientu w rozdiale chromatograficznym, co nie wpływało negatywnie na parametry rozdzału. Jednocześnie odnotowano, że mimo stosunkowo dużego rozcieńczenia zachowano wysoką czułość dla obu oznaczanych związków (dolny zakres oznaczalności 0,2 ng/ml). Metoda strąceniowa w przypadku analiz w układzie HILIC innych niż szpik materiałów jest także z powodzeniem wykorzystywana przez innych badaczy [102,103].

Skuteczność rozdzału chromatograficznego, aczkolwiek bywa niekiedy bagatelizowana w świetle wykorzystania wysokowydajnych tandemowych spektrometrów mas, to w ocenie autorki jest bardzo ważny elementem w analizie ilościowej. Szczególne znaczenie zyskuje w przypadku analiz trudnych, przy nieselektywnych metodach ekstrakcji (jak np. metoda strąceniowa), gdzie istotne znaczenie odgrywa wpływ elementów matrycy na wystąpienie zjawiska supresji. Wystąpienie tego zjawiska wiąże się z pogorszeniem parametrów walidacyjnych. Optymalizacja procedury w tym przypadku pozwoliła na uzyskanie wysokiej selektywności rozdzału, rejestracje ostrych, symetrycznych pików chromatogramach dla analitów (rycina 19-20), nie stwierdzono zjawiska przenoszenia (analiza próbki zerowej i podwójnie zerowej), interferencji matrycowych. Nadmienić należy jednak, że proces optymalizacji oznaczeń wymagał przeprowadzenia ponad pięciuset analiz.

Wykreślone krzywe kalibracyjne odpowiedzi układu na różne stężenia histaminy oraz serotoniny cechowały się liniowością (współczynnik regresji liniowej r^2 dla histaminy- 0,99984, serotoniny- 0,99997), niezależnie od przyjętego do obliczeń wzorca wewnętrznego (deuterowanej histaminy czy serotoniny). Ostatecznie uznano, że wyniki ilościowe dla obu związków należy wyznaczać względem deuterowanej histaminy, natomiast identyfikację jakościową (ocena czasów retencji) prowadzono względem obu deuterowanych odpowiedników. Aczkolwiek analiza obejmowała dwa związki w jednym cyklu analitycznym, ulegające elucji przy istotnie innych czasach retencji, to

zaobserwowano brak stabilności serotoniny deuterowanej, w trakcie jej przechowywania i prowadzonych oznaczeń, co objawiało się spadkiem stężenia intensywności sygnału i mogło znacząco wpływać na błędy przy interpretacji późniejszych oznaczeń.

Opracowaną metodę zastosowano z powodzeniem do analizy zebranych szpików, aczkolwiek należy podkreślić, że w sześciu przypadkach stwierdzono nadmierną supresję jonów (istotny spadek intensywności sygnału wzorca wewnętrznego). Częstą przyczyną tego niepożądanego zjawiska są sole występujące w materiale biologicznym oraz składnikach faz ruchomych [104]. Pośród innych przyczyn wymienić można także posuniętą degradację badanego materiału, znaczną zawartość związków o charakterze lipofilnym. W przypadku szpiku rozważyć można by także ewentualne różnice w składzie i strukturze pobranego materiału oraz jego niejednorodność (np. szpik wybitnie bogatokomórkowy). Rozważono ewentualny wpływ zmiennej ilości antykoagulantu (sól EDTA) na występowanie supresji (różne ilości pobranej próbki do takiej próbowki o takiej samej objętości). Przebadano przykładowe próbki szpiku pobrane w różnych objętościach, uzyskując w obu przypadkach sygnały o zbliżonej intensywności, co pozwoliło wykluczyć wpływ stężenia antykoagulantu na notowaną supresję jonów. Aczkolwiek przypuszczalną przyczyną notowanej supresji była niejednorodność pobranych próbek, to pomimo szerokiej analizy nie ustalono przyczyn występowania supresji w tych konkretnych próbkach.

Uzyskane wyniki oznaczeń histaminy i serotoniny w szpikach poddano analizie statystycznej. Analizowano zarówno zależności w odniesieniu do konkretnych stężeń (relacje ilościowe) oraz w odniesieniu do zakresów stężeń określonych w przedziałach (relacje jakościowe). Wyznaczono trzy zakresy dla histaminy: stężenia poniżej 20 ng/ml, stężenia w przedziale 20-200 ng/ml, oraz powyżej 200 ng/ml, a także trzy zakresy dla serotoniny: stężenia poniżej 0,2 ng/ml, stężenia w przedziale 0,2-1 ng/ml, oraz powyżej 1 ng/ml. Zakresy dla histaminy wyznaczono kierując się przedziałem stężeń histaminy we krwi pełnej oznaczanej metodą ELISA (tzw. norma referencyjna 20-200 ng/ml) [105]. Z kolei zakresy stężeń serotoniny odnosiły się do średniej wartości referencyjnych stwierdzanych w osoczu (do 1 ng/ml) oraz granicy oznaczalności metody (0,2 ng/ml). Podkreślenia wymaga, że przedziały te wyznaczono wobec braku wartości referencyjnych w dostępnym piśmiennictwie.

Stwierdzono, że stężenia histaminy we wszystkich próbkach znacznie przewyższały wyznaczoną granicę oznaczalności opracowanej metody analitycznej, tj. 0,2 ng/ml, a także przewyższały poziom referencyjny dla osocza u ludzi, tj. 1 ng/ml. Jednocześnie stwierdzono, że aż 67 % odnotowanych stężeń histaminy mieściło się w przedziale od 20 do 200 ng/ml (tabela 15). Przedział ten obejmuje zakres wartości referencyjnych dla histaminy we krwi pełnej wyznaczanych metodami immunologicznymi. Powyższe obserwacje pozwalają przyjąć, że synteza histaminy zachodzi najprawdopodobniej już w szpiku kostnym. Potwierdzeniem tego wniosku mogą być wyniki badań prowadzonych na myszach już w roku 1995, wg których różne komórki progenitorowe zdolne są do syntezy histaminy w szpiku kostnym pod wpływem interleukiny 3 (IL-3) [106,107]. Inne wyniki badań z roku 2020, wykazały, że szpikowe komórki mieloidalne wykazują ekspresję dekarboksylazy histydyny (HDC) i mogą być zdolne do produkcji histaminy [108].

Najbardziej interesujące wydają się wyniki oznaczeń histaminy w szpiku pacjentów z rozpoznaniem mastocytozy układowej, u których stwierdzono najwyższe poziomy tej aminy biogennej (tabela 16). Wiadomo, że mastocyty w warunkach fizjologicznych osiągają dojrzałość dopiero po opuszczeniu szpiku, w tkance docelowej, tym samym prawidłowy szpik nie powinien zawierać dojrzałych mastocytów, bogatych w histaminę. W piśmiennictwie brak jest danych dotyczących obecności form dojrzałych mastocytów w mastocytozie układowej, oprócz dwóch szczególnych przypadków. Pojawianie się dojrzałych komórek tucznych w szpiku przy mastocytozie układowej obserwowano w przypadku wariantu mastocytozy dobrze zróżnicowanej, gdzie mastocyty zawierały liczne ziarnistości, aczkolwiek były one znacznie większe od normalnych dojrzałych komórek tucznych. Mastocyty z licznymi ziarnistościami w szpiku obserwowano także u pacjentów z białaczką z komórek tucznych [109]. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki dla histaminy w szpiku pacjentów z mastocytozą, prawdopodobne jest, że komórki tuczne, także te zmienione nowotworowo, wykazują zdolność do syntezy histaminy już w szpiku kostnym, bądź też z nieznanych przyczyn traktują szpik jako tkankę docelową, gdzie osadzają się i dojrzewają. Pomimo niewielkiej liczby pacjentów w tej grupie, co wynikało z populacyjnie rzadkiego występowania tej choroby, uzyskane wyniki mogą wskazywać na selektywność wskazania histaminy jako potencjalnego biomarkera tej choroby i jego przydatność w złożonej diagnostyce hematologicznej tego schorzenia. Warto przytoczyć, że przypadki z tej grupy badano także pod kątem stężeń obu związków w osoczu oraz krwi pełnej, a uzyskane wyniki zarówno dla histaminy jak i serotoniny mieściły się w zakresie normy.

Wyniki te wskazują na potencjalnie znacznie większą przydatność diagnostyczną oznaczeń histaminy w szpiku niż w osoczu, w którym obecnie prowadzone jest jedynie oznaczenie rutynowe przy diagnostyce mastocytozy układowej.

Analiza stężeń histaminy w poszczególnych grupach chorób hematologicznych wykazała również istotną statystycznie zależność pomiędzy grupą „nowotwory mieloproliferacyjne” w porównaniu do pozostałych czterech grup, z wyłączeniem mastocytozy (tabela 16, rycina 21). Cechą wspólną chorób z tej grupy jest klonalny rozrost komórek z linii mieloidalnej, w tym komórek odpowiedzialnych za syntezę histaminy. Można przypuszczać, że komórki z tej linii, także zmienione nowotworowo, są zdolne do nadmiarowej produkcji histaminy w szpiku kostnym. Warto także podkreślić, że poprzednia klasyfikacja chorób hematologicznych obejmowała w tej grupie także mastocytozę układową, jednak z uwagi na różnice diagnostyczne w odniesieniu do pozostałych chorób, została stosunkowo niedawno wydzielona jako odrębna jednostka chorobowa.

Stężenia histaminy korelowano także z parametrami morfologii krwi obwodowej. Uzyskane wyniki wskazują na dodatnią, istotną statystycznie korelację tego związku z liczbą białych krwinek, płytek krwi, odsetkiem neutrofilów, eozynofili, bazofili oraz ujemną korelację z odsetkiem limfocytów (tabela 17, rycina 22). Jak wiadomo, synteza histaminy zachodzi głównie nie tylko w mastocytach, ale także bazofilach. Uzyskana dodatnia korelacja stężenia histaminy i odsetka bazofili może wskazywać na fakt, że jej synteza zachodzi już w trakcie dojrzewania tych komórek w szpiku, ale także na ewentualną rolę histaminy w aktywacji procesów dla powstawania tej linii komórkowej.

Istotnie statycznie okazały się także różnice w stężeniach histaminy szpikowej w odniesieniu do odsetka neutrofilów we krwi obwodowej. Badania hiszpańskich naukowców wykazały, że granulocyty obojętnochłonne należą do grupy komórek również produkujących i uwalniających histaminę [110]. Część dojrzałych neutrofilów (do 2 %) trafia do krwiobiegu, natomiast pozostała część tzw. rezerwa, pozostaje w szpiku kostnym [111]. Starzejące się neutrofile powracają do szpiku kostnego, gdzie ulegają procesie apoptozy, co może wyjaśniać obserwowaną korelację. Jako, że neutrofile stanowią ponad połowę wszystkich WBC, można by wnioskować, że dodatnia korelacja z histaminą odnosi się właśnie do neutrofilów oraz, że odsetek ten ma swoje odzwierciedlenie w szpiku kostnym. Dodatnią korelację stwierdzono także dla parametru PLT. Płytki krwi stanowią ważny

element transportowy dla serotoniny, ale również innych substancji, w tym histaminy, dlatego wykazana korelacja sugeruje, że płytki mogą być wysycane histaminą już w szpiku kostnym. Oprócz funkcji transportowej, płytki w pewnym stopniu stanowią także miejsce syntezy histaminy, zatem wobec uzyskanej korelacji można przypuszczać, że płytki mogą syntetyzować histaminę także w szpiku kostnym.

Nieoczekiwanie dodatnią korelację wykazano także w stosunku do odsetka eozynofili. Granulocyty kwasochłonne, jako komórki zawierające w swoich ziarnistościach histaminazę, powodują rozkład histaminy. Wydaje się, iż obserwacja ta podkreśla rolę poszczególnych linii komórkowych jako nośników, pewnego rodzaju magazynów, zarówno dla histaminy jak i serotoniny, których funkcja fizjologiczna ujawnia się dopiero po degranulacji i uwolnieniu tych związków do przestrzeni zewnątrzkomórkowej.

Aczkolwiek istnieją doniesienia o możliwej syntezie histaminy w limfocytach, to przeprowadzone badania wykazały istotną statycznie, jednak ujemną korelację pomiędzy stężeniem histaminy w szpiku a odsetkiem limfocytów we krwi. Zwrócić należy uwagę, że wynik ten nie pozostaje w sprzeczności z obecną wiedzą, albowiem o ile limfocyty mogą syntetyzować histaminę *de novo*, to jednak nie pełnią funkcji magazynowej dla tego związku, tak jak ma to miejsce w przypadku granulocytów.

Tak jak się spodziewano, przeprowadzone badania nie wykazały istotnych korelacji pomiędzy stężeniami histaminy a parametrami czerwonokrwinkowymi czy monocytami, najprawdopodobniej z uwagi na brak bezpośrednich powiązań pomiędzy tymi parametrami a histaminą (tabela 17, rycina 22).

Ocenę zależności pomiędzy histaminą a poszczególnymi grupami badano także po uprzedniej kategoryzacji stężeń na trzech poziomach. Ustalono, że najwyższe wartości histaminy tj. powyżej 200 ng/ml występowały jedynie przy mastocytozie (tabela 18). Liczba białych krwinek była znacząco wyższa, a odsetek limfocytów istotnie niższy w grupie z histaminą powyżej 200 ng/ml, niż w pozostałych grupach (tabela 19, rycina 24). Zbliżoną korelację stwierdzono także w odniesieniu do konkretnych stężeń histaminy, bez grupowania na trzech poziomach, co pozwala wnioskować, że wartości WBC i odsetka limfocytów były zwiększone przy wysokich stężeniach histaminy w szpiku.

Zaskakującym okazał się fakt, że poziom hematokrytu był istotnie wyższy w grupie z histaminą 20-200 ng/ml niż w grupie z histaminą < 20 ng/ml, oraz że poziom liczby płytek i odsetka eozynofiliów był istotnie niższy w grupie z histaminą < 20 ng/ml niż w

pozostałych grupach. Aczkolwiek może to sugerować promocyjny charakter histaminy w stosunku do poszczególnych elementów komórkowych, to głębsze wnioskowanie wymaga przeprowadzenia badań na większej liczbie przypadków.

Drugim związkiem jaki analizowano w ramach podjętych badań była serotonina. W przeciwieństwie do histaminy, stężenia serotoniny w przebadanych próbkach szpiku pozostawały na niskim poziomie - wartości poniżej 0,2 ng/ml (dolna granica oznaczalności metody) odnotowano aż w 83 % wszystkich przypadków. Nie wykazano istotnej korelacji z żadną z określonych grup chorób (tabela 20, rycina 25), ani nie wykazano istotnych statystycznie zależności między zakresami stężeń serotoniny a grupami chorób hematologicznych (tabela 22).

Wykazano natomiast istotną statystycznie, dodatnią korelację stężenia serotoniny z liczbą płytek krwi. Jak wiadomo, płytki krwi nie są zdolne do syntezy serotoniny [112], istnieją jednak hipotezy, wg których megakarioblasty i megakariocyty mogą produkować serotoninę w szpiku kostnym [103,114,115]. Wydaje się, że stwierdzona korelacja stężenia serotoniny szpikowej i liczby płytek krwi może być potwierdzeniem tej hipotezy. Zwiększona liczba prekursorów płytek może przekładać się na zwiększone poziomy serotoniny w szpiku. Potwierdzeniem tej obserwacji może być przypadek pacjentki z grupy „nowotwory mieloproliferacyjne” z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej. W próbce szpiku pobranego od tej pacjentki uzyskano najwyższe stężenie serotoniny ze wszystkich oznaczeń- 35,7 ng/ml, oraz wysokie stężenie histaminy- 3083,7 ng/ml. W opisie mielogramu szpiku kostnego podkreślono, że obraz szpiku wskazuje na fazę przewlekłą, przewlekłej białaczki szpikowej - wariant megakariocytowo-granulocytowy. Nie trudno powiązać rozpoznania rzadkiego wariantu tej choroby hematologicznej z uzyskanymi wysokimi stężeniami obu parametrów, przy uznaniu zależności poziomów serotoniny od liczby megakariocytów a histaminy od granulocytów. Fakt rzadkiej obserwacji wysokich poziomów serotoniny może wskazywać na wysoką selektywność tego parametru jako biomarkera tego typu schorzeń, aczkolwiek niewątpliwie wymaga to potwierdzenia na większej liczbie przypadków.

Interesujące okazały się wyniki stężeń serotoniny w odniesieniu do mastocytozy, ponieważ jej stężenia w szpikach nie odbiegało znacząco od stężeń w pozostałych próbkach. Jak wynika z danych opublikowanych przez amerykański zespół naukowy, stężenia serotoniny we krwi pacjentów z mastocytozą odbiegały od przyjętych wartości referencyjnych [116].

Wydawać by się mogło, że w takim przypadku zmiany obejmować powinny także szpik kostny.

Oprócz dodatniej korelacji z płytkami krwi, wykazano, że serotonina koreluje także dodatnio z WBC, ujemnie zaś z MCHC i odsetkiem limfocytów, a także nie koreluje z pozostałymi parametrami morfologii (tabela 21, rycina 26). Korelacja z MCHC jest dość zaskakująca, szczególnie z uwagi na brak potwierdzonego powiązania serotoniny z tym wskaźnikiem. Biorąc pod uwagę niewielką rozpiętość zakresu referencyjnych wyników parametru MCHC oraz konieczność rozpatrywania MCHC w kontekście wszystkich parametrów czerwonych, które nie wykazały istotnych statycznie zależności, próba uzasadnienia tej korelacji jest kłopotliwa.

Stężenia serotoniny grupowano, analogicznie jak w przypadku histaminy, na trzy poziomy: poniżej 0,2 ng/ml, pomiędzy 0,2 a 1 ng/ml oraz powyżej 1 ng/ml. Liczba białych krwinek i płytek krwi była wyższa w grupie z serotoniną > 1 ng/ml niż w grupie poniżej 0,2 ng/ml, a bazofili większy w grupie >1 ng/ml niż w pozostałych próbkach. W przypadku bazofili może być to związane ze zwiększoną produkcją serotoniny przez te komórki, a płytek- z omawianą powyżej syntezą przez prekursorów PLT. Wykazano także, że poziom MCHC i limfocytów był istotnie wyższy w grupie < 0,2 ng/ml niż w grupie 0,2-1 ng/ml oraz że poziom neutrofilów był z kolei istotnie większy w grupie 0,2-1 ng/ml niż w grupie < 0,2 ng/ml (tabela 23, rycina 28). Wyniki korelacji MCHC i limfocytów znajdują odzwierciedlenie w ujemnej korelacji w odniesieniu do niegrupowanych stężeń serotoniny, natomiast nie znaleziono argumentów dla wyjaśnienia zależności pomiędzy neutrofilami a stężeniami serotoniny w określonych przedziałach.

6. Wnioski

1. Opracowana metoda analityczna pozwoliła na selektywne oznaczenie stężeń histaminy i serotoniny w szpiku kostnym, w jednym cyklu analitycznym, z wykorzystaniem układu HILIC i techniki LC-MS/MS. Poprawne parametry walidacyjne przy względnie prostej procedurze przygotowania materiału pozwalają na wykorzystanie metody w analizach rutynowych.
2. Obecność histaminy stwierdzono we wszystkich badanych próbkach, a jej stężenia w szpiku kształtowały się głównie w przedziale referencyjnym określonym dla krwi obwodowej. Synteza i magazynowanie histaminy zachodzi w komórkach szpiku kostnego.
3. Stężenia histaminy mogą osiągać poziomy istotnie statystycznie wyższe w szpiku kostnym pobieranym od pacjentów z mastocytozą układową. Aczkolwiek histamina wykazuje cechy selektywnego biomarkera dla tej choroby, to ostateczne wnioskowanie wymaga przeprowadzenia badań na większej liczbie przypadków.
4. Stężenia serotoniny notowane w analizowanych grupach chorób hematologicznych, nie różniły się istotnie statystycznie. Większość wyników, w szczególności 97% oznaczeń w grupie bez choroby rozrostowej, pozostawało poniżej dolnej granicy oznaczalności. Synteza i magazynowanie serotoniny zachodzi głównie w obszarach poza szpikowych.
5. Istotna statystycznie korelacja pomiędzy stężeniem serotoniny w szpiku i liczbą płytek we krwi obwodowej, sugeruje możliwość syntezy serotoniny przez megakariocyty. Stężenie serotoniny w szpiku powyżej 1 ng/ml może wskazywać na nieprawidłowości o charakterze mieloproliferacyjnym, w szczególności w linii megakariocytowej.

7. Streszczenie

Histamina i serotonina są aminami biogennymi pełniącymi wiele ważnych funkcji ustrojowych. Wytwarzanie i magazynowanie histaminy zachodzi m.in. w mastocytach i bazofilach podczas gdy synteza serotoniny zachodzi głównie w komórkach enterochromatofilnych przewodu pokarmowego, a za jej transport odpowiedzialne są płytki krwi. Wydaje się, że zmiany stężeń histaminy oraz serotoniny w szpiku, jako miejscu wytwarzania komórek magazynowych dla obu tych związków, mogą odzwierciedlać zmiany parametrów biochemicznych zachodzące w różnych stanach patologicznych.

Pomiary stężeń tych związków w materiale biologicznym, głównie we krwi, moczu, płynie mózgowo rdzeniowym, prowadzi się najczęściej w celach naukowych, z wykorzystaniem metod immunologicznych. W dostępnym piśmiennictwie brak jest doniesień na temat oceny stężeń tych związków w szpiku kostnym, dlatego też zasadnym było przeprowadzenie badań w odniesieniu do tego materiału. W pierwszym etapie badań opracowano selektywną metodę jakościowo-ilościową do jednoczesnego oznaczania histaminy oraz serotoniny w szpiku kostnym, z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas. W oparciu o opracowaną metodę analizie poddano szpik pobierany od pacjentów z chorobami hematologicznymi a uzyskane wyniki korelowano z parametrami morfologii krwi oraz rozpoznaniem klinicznym. Do celów statystycznych analizowane przypadki grupowano według rozpoznanej jednostki chorobowej: nowotwory mieloproliferacyjne, zespoły mielodysplastyczne, ostre białaczki, choroby limfoproliferacyjne, inne choroby hematologiczne bez cech nowotworzenia i mastocytoza.

Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczny rozdział chromatograficzny histaminy i serotoniny, z uwzględnieniem złożonej matrycy biologicznej, uzyskano w układzie oddziaływań hydrofilowych HILIC. Stosowane powszechnie rozdziały chromatograficzne w odwróconym układzie faz cechowały się niską retencją dla histaminy, chociaż parametry analityczne dla serotoniny pozostawały na odpowiednim poziomie.

Wyznaczone stężenia w próbkach szpiku kostnego wynosiły dla histaminy $344,11 \pm 959,09$ ng/ml i serotoniny $0,61 \pm 3,69$ ng/ml (średnia \pm odchylenie standardowe). Histaminę stwierdzano we wszystkich przeanalizowanych próbkach, natomiast większość z nich nie zawierała serotoniny. Najwyższe stężenie serotoniny (35,7 ng/ml) uzyskano w próbce

pacjentki z rozpoznaniem przewlekłej białaczki szpikowej, wariant megakariocytowo-granulocytowy. Analiza statystyczna wykazała istotną zależność ($p < 0,05$) pomiędzy stężeniami histaminy w grupie pacjentów z rozpoznaniem mastocytozy. Dodatkowo, istotne statystycznie korelacje wykazano dla stężenia histaminy i liczby białych krwinek, płytek, odsetka bazofili, neutrofilii i bazofili, ujemne zaś dla stężenia histaminy i limfocytów. Wykazano również, że serotonina koreluje statystycznie istotnie i dodatnio z liczbą białych krwinek oraz płytek krwi, zaś ujemnie z odsetkiem limfocytów i wskaźnikiem MCHC.

8. Summary

Histamine and serotonin are biogenic amines which carry out a number of important bodily functions. The production and storage of histamine takes place, among others, in mast cells and basophils, while serotonin synthesis occurs mainly in the enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract. Platelets are responsible for its transport. It seems that changes in histamine and serotonin concentrations in the bone marrow, the place where the storage cells for both these compounds are produced, may reflect changes in biochemical parameters occurring in various pathological conditions.

Concentrations of these compounds in biological material – mainly in blood, urine and cerebrospinal fluid – are usually measured for scientific purposes with the use of immunological methods. There are no reports in the available literature on the evaluation of the concentrations of these compounds in bone marrow; therefore, it was legitimate to conduct a study in relation to this material. In the first stage of the study, a selective qualitative-quantitative method for the simultaneous histamine and serotonin determination in bone marrow was developed by means of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Based on this method, the marrow collected from patients with haematologic diseases was analysed and the results were correlated with complete blood count parameters and clinical diagnosis. For statistical purposes, the analysed cases were grouped according to the disease entity diagnosed: myeloproliferative neoplasms, myelodysplastic syndromes, acute leukaemias, lymphoproliferative diseases, other non-malignant haematologic diseases and mastocytosis.

The study revealed that efficient chromatographic separation of histamine and serotonin, having regard to the complex biological matrix, was achieved in the HILIC hydrophilic interaction system. Commonly used reversed-phase chromatographic separations were characterised by low histamine retention, although the analytical parameters of serotonin remained adequate.

The determined concentrations in bone marrow samples amounted to 344.11 ± 959.09 ng/ml for histamine and 0.61 ± 3.69 ng/ml for serotonin (mean \pm standard deviation). Histamine was found in all analysed samples, however, most of them did not contain serotonin. The highest serotonin concentration (35.7 ng/ml) was obtained in a sample from a patient diagnosed with chronic myeloid leukaemia – megakaryocytic-granulocytic variant. The statistical analysis showed a significant correlation ($p < 0.05$) between histamine

concentrations in the group of patients diagnosed with mastocytosis. Positive, statistically significant correlations were found for histamine concentration and white blood cell count, platelets as well as eosinophil, neutrophil and basophil percentages, whereas negative correlations were found for histamine concentration and lymphocyte percentage. It was also proved that serotonin correlates statistically significantly and positively with white blood cell and platelet counts, and negatively with lymphocyte percentage and MCHC index.

9. Piśmiennictwo

1. Cieślik, I., Migdał, W. (2011). Aminy biogenne w żywności. *Bromatologia. Chemia. Toksykologia*, 34(4), 1087-1096.
2. Wójcik, W., Łukasiewicz, M., Puppel, K. (2021). Biogenic amines: formation, action and toxicity—a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2634-2640.
3. Tiligada, E., Ennis, M. (2020). Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century. *British Journal of Pharmacology*, 177(3), 469-489.
4. Hirasawa, N. (2019). Expression of histidine decarboxylase and its roles in inflammation. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 376.
5. Brosnan, M. E., Brosnan, J. T. (2020). Histidine metabolism and function. *The Journal of Nutrition*, 150 (1), 2570S-2575S.
6. Huang, H., Li, Y., Liang, J., Finkelman, F. D. (2018). Molecular regulation of histamine synthesis. *Frontiers in immunology*, 9, 1392.
7. Yuan, H., Silberstein, S. D. (2018). Histamine and migraine. *Headache: The journal of head and face pain*, 58(1), 184-193.
8. Soetanto, T. S., Liu, S., Sahid, M. N. A., Toyama, K., Maeyama, K., Mogi, M. (2019). Histamine uptake mediated by plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporters in rat mast cell lines. *European Journal of Pharmacology*, 849, 75-83.
9. Kakavas, S., Karayiannis, D., Mastora, Z. (2021). The Complex Interplay between Immunonutrition, Mast Cells, and Histamine Signaling in COVID-19. *Nutrients*, 13(10), 3458.
10. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356-363.
11. Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W., et al. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. Histamine receptors. *Pharmacological reviews*, 67(3), 601-655.
12. Mehta, P., Miszta, P., Rzodkiewicz, P., Michalak, O., Krzeczyński, P., Filipek, S. (2020). Enigmatic histamine receptor H4 for potential treatment of multiple inflammatory, autoimmune, and related diseases. *Life*, 10(4), 50.
13. Tatarkiewicz, J., Rzodkiewicz, P., Żochowska, M., Staniszevska, A., Bujalska-Zadrożny, M. (2019). New antihistamines—perspectives in the treatment of some allergic and inflammatory disorders. *Archives of Medical Science: AMS*, 15(2), 537.

14. Meghnam, D., Oldford, S. A., Haidl, I. D., Barrett, L., Marshall, J. S. (2021). Histamine receptor 2 blockade selectively impacts B and T cells in healthy subjects. *Scientific reports*, *11*(1), 1-10.
15. Sahoo, N., Gu, M., Zhang, X., Raval, N., Yang, J., Bekier, M., et al. (2017). Gastric acid secretion from parietal cells is mediated by a Ca²⁺ efflux channel in the tubulovesicle. *Developmental cell*, *41*(3), 262-273.
16. Bhowmik, M., Khanam, R., Vohora, D. (2012). Histamine H₃ receptor antagonists in relation to epilepsy and neurodegeneration: a systemic consideration of recent progress and perspectives. *British journal of pharmacology*, *167*(7), 1398-1414.
17. Zampeli, E., Tiligada, E. (2009). The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *British journal of pharmacology*, *157*(1), 24-33.
18. Sanna, M. D., Galeotti, N. (2017). Central neuronal functions of histamine H₄ receptors. *Oncotarget*, *8*(8), 12556.
19. Kopeć-Szlęzak, J. (2016). Rola granulocytów zasadochłonnych (bazofili) w świetle badań z ostatnich lat. *Journal of Transfusion Medicine*, *9*(2), 45-53.
20. Cho, S. H., Woo, C. H., Yoon, S. B., Kim, J. H. (2004). Protein kinase C δ functions downstream of Ca²⁺ mobilization in Fc ϵ RI signaling to degranulation in mast cells. *Journal of allergy and clinical immunology*, *114*(5), 1085-1092.
21. Medina, V. A., Coruzzi, G., Lamas, D. M., Massari, N., Adami, M., Levi-Schaffer, F., et al. (2013). Histamine H₄ Receptor: A Novel Drug Target in Immunoregulation and Inflammation, 63-90.
22. Yoshikawa, T., Nakamura, T., Yanai, K. (2019). Histamine N-methyltransferase in the brain. *International journal of molecular sciences*, *20*(3), 737.
23. Maintz, L., Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, *85*(5), 1185-1196.
24. Tatarinova, T. V., Deiss, T., Franckle, L., Beaven, S., Davis, J. (2020). The impact of MNRI therapy on the levels of neurotransmitters associated with inflammatory processes. *International journal of molecular sciences*, *21*(4), 1358.
25. Petit-Bertron, A. F., Machavoine, F., Defresne, M. P., Gillard, M., Chatelain, P., Mistry, P., et al. (2009). H₄ histamine receptors mediate cell cycle arrest in growth factor-induced murine and human hematopoietic progenitor cells. *PLoS One*, *4*(8), e6504.
26. Lee, B. H., Hille, B., Koh, D. S. (2021). Serotonin modulates melatonin synthesis as an autocrine neurotransmitter in the pineal gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(43).

27. Linan-Rico, A., Ochoa-Cortes, F., Beyder, A., Soghomonyan, S., Zuleta-Alarcon, A., Coppola, V., et al. (2016). Mechanosensory signaling in enterochromaffin cells and 5-HT release: potential implications for gut inflammation. *Frontiers in neuroscience*, *10*, 564.
28. Jones, L. A., Sun, E. W., Martin, A. M., Keating, D. J. (2020). The ever-changing roles of serotonin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *125*, 105776.
29. Schoenichen, C., Bode, C., Duerschmied, D. (2019). Role of platelet serotonin in innate immune cell recruitment. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *24*, 514-526.
30. Ahern, G. P. (2011). 5-HT and the immune system. *Current opinion in pharmacology*, *11*(1), 29-33.
31. Nakamura, K., Hasegawa, H. (2007). Developmental role of tryptophan hydroxylase in the nervous system. *Molecular neurobiology*, *35*(1), 45-53.
32. Savelieva, K. V., Zhao, S., Pogorelov, V. M., Rajan, I., Yang, Q., Cullinan, E., et al. (2008). Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PloS one*, *3*(10), e3301.
33. Chen, Y., Xu, H., Zhu, M., Liu, K., Lin, B., Luo, R., et al. (2017). Stress inhibits tryptophan hydroxylase expression in a rat model of depression. *Oncotarget*, *8*(38), 63247.
34. Fanciulli, G., Ruggeri, R. M., Grossrubatscher, E., Calzo, F. L., Wood, T. D., Faggiano, A., et al. (2020). Serotonin pathway in carcinoid syndrome: Clinical, diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *21*(4), 599-612.
35. Waszkiewicz, N., Popławska, R., Konarzewska, B., Szajda, S. D., Galińska, B., Rutkowski, P., et al. (2010). Biomarkery nadużywania alkoholu. Część II. Nowe biomarkery oraz ich interpretacja. *Psychiatr. Pol*, *44*, 137-146.
36. Ruddell, R. G., Mann, D. A., Ramm, G. A. (2008). The function of serotonin within the liver. *Journal of hepatology*, *48*(4), 666-675.
37. Wan, M., Ding, L., Wang, D., Han, J., Gao, P. (2020). Serotonin: a potent immune cell modulator in autoimmune diseases. *Frontiers in immunology*, *11*, 186.
38. Wwope, V., Wwain, G., Kadrofske, M., Bian, X. (2011). Postnatal development of the serotonin signaling system in the mucosa of the guinea pig ileum. *Neurogastroenterology & Motility*, *23*(2), 161-e40.
39. Narboux-Nême, N., Sagné, C., Doly, S., Diaz, S. L., Martin, C. B., Angenard, et al. (2011). Severe serotonin depletion after conditional deletion of the vesicular monoamine

transporter 2 gene in serotonin neurons: neural and behavioral consequences. *Neuropsychopharmacology*, 36(12), 2538-2550.

40. Essand, M., Vikman, S., Grawé, J., Gedda, L., Hellberg, C., Oberg, K., et al. (2005). Identification and characterization of a novel splicing variant of vesicular monoamine transporter 1. *Journal of molecular endocrinology*, 35(3), 489-501.

41. Kidd, M., Modlin, I. M., Gustafsson, B. I., Drozdov, I., Hauso, O., Pfragner, R. (2008). Luminal regulation of normal and neoplastic human EC cell serotonin release is mediated by bile salts, amines, tastants, and olfactants. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(2), G260-G272.

42. König, N., Bimpisidis, Z., Dumas, S., Wallén-Mackenzie, Å. (2020). Selective knockout of the Vesicular monoamine transporter 2 (Vmat2) gene in Calbindin2/Calretinin-positive neurons results in profound changes in behavior and response to drugs of abuse. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 201.

43. Korzonek-Szlacheta, I., Zubelewicz-Szkodzińska, B., Gąsior, M. (2018). Płytki krwi-ogniwo łączące zakrzepicę ze stanem zapalnym. *Folia Cardiologica*, 13(4), 303-308.

44. Mawe, G. M., Hoffman, J. M. (2013). Serotonin signaling in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(8), 473-486.

45. Berger, M., Gray, J. A., Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual review of medicine*, 60, 355-366.

46. Kanova, M., Kohout, P. (2021). Serotonin—Its Synthesis and Roles in the Healthy and the Critically Ill. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4837.

47. Semczuk-Kaczmarek, K., Filipiak, K. J., Szymańska-Tutak, A., Płatek, A. E., Szymański, F. M., Ryś, A. (2018). Związek układu serotonergicznego i układu sercowo-naczyniowego. *Folia Cardiologica*, 13(5), 420-427.

48. Fouquet, G., Coman, T., Hermine, O., Côté, F. (2019). Serotonin, hematopoiesis and stem cells. *Pharmacological research*, 140, 67-74.

49. Sibon, D., Coman, T., Rossignol, J., Lamarque, M., Kosmider, O., Bayard, E., et al. (2019). Enhanced renewal of erythroid progenitors in myelodysplastic anemia by peripheral serotonin. *Cell Reports*, 26(12), 3246-3256.

50. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5202, Serotonin. Dostęp: 15.02.2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Serotonin>.

51. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 774, Histamine. Dostęp: 15.02.2022. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Histamine>.
52. Galichet Y.L. (red.) (2004). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Thrid edition. London, Chicago: Pharmaceutical Press, s.1104,1555-1556.
53. Pitt Quantum Repository (2016). Serotonin. Dostęp: 30.03.2022. <https://pqr.pitt.edu/mol/QZAYGJVTTNCVMB-UHFFFAOYSA-N>.
54. Pitt Quantum Repository (2016). Histamine. Dostęp: 30.03.2022. <https://pqr.pitt.edu/mol/NTYJJOPFIAHURM-UHFFFAOYSA-N>.
55. Gurevitch, O., Slavin, S., Feldman, A. G. (2007). Conversion of red bone marrow into yellow—cause and mechanisms. *Medical hypotheses*, 69(3), 531-536.
56. Karampinos, D. C., Ruschke, S., Dieckmeyer, M., Diefenbach, M., Franz, D., Gersing, A. S., et al. (2018). Quantitative MRI and spectroscopy of bone marrow. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 47(2), 332-353.
57. Zabel, M. (2012). *Histologia*, s.132. Wrocław: Elsevier Health Sciences Poland.
58. Rieger, M. A., Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a008250.
59. Tang Z. (2021). Short note on bone marrow and hematopoietic stem cells. *Journal of Biomedical Systems & Emerging Technologies*, 8(3), 107.
60. Di Rosa, F., Pabst, R. (2005). The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends in immunology*, 26(7), 360-366.
61. Mazo, I. B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L. L., Bonasio, R., Weninger, W., et al. (2005). Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8+ T cells. *Immunity*, 22(2), 259-270.
62. Zhang, X., Dong, H., Lin, W., Voss, S., Hinkley, L., Westergren, M., et al. (2006). Human bone marrow: a reservoir for “enhanced effector memory” CD8+ T cells with potent recall function. *The Journal of Immunology*, 177(10), 6730-6737.
63. Di Rosa, F., Gebhardt, T. (2016). Bone marrow T cells and the integrated functions of recirculating and tissue-resident memory T cells. *Frontiers in immunology*, 7, 51.
64. Feliksbrodt, M. E., Król, M. A., Dwilewicz-Trojaczek, J. (2005). Limfopoeza komórek B u człowieka. *Adv Clin Exp Med*, 14, 1033-1040.
65. Horowitz, M. C., Berry, R., Holtrup, B., Sebo, Z., Nelson, T., Fretz, J. A., et al. (2017). Bone marrow adipocytes. *Adipocyte*, 6(3), 193-204.

66. Piotrowska, K., Tarnowski, M. (2021). Bone Marrow Adipocytes—Role in Physiology and Various Nutritional Conditions in Human and Animal Models. *Nutrients*, 13(5), 1412.
67. Mirantes, C., Passequé, E., Pietras, E. M. (2014). Pro-inflammatory cytokines: emerging players regulating HSC function in normal and diseased hematopoiesis. *Experimental cell research*, 329(2), 248-254.
68. Li, Y., Lu, L., Xie, Y., Chen, X., Tian, L., Liang, Y., et al. (2021). Interleukin-6 knockout inhibits senescence of bone mesenchymal stem cells in high-fat diet-induced bone loss. *Frontiers in Endocrinology*, 1173.
69. Li, Q., Wu, Y., Kang, N. (2018). Marrow adipose tissue: its origin, function, and regulation in bone remodeling and regeneration. *Stem cells international*, 2018.
70. Lewandowski, K., Szczepański, T. (2015). Rekomendacje Kolegium Medycyny Laboratoryjnej w Polsce (KMLP) dotyczące wykonywania biopsji aspiracyjnej i oceny cytologicznej szpiku kostnego. *Acta Haematologica Polonica*, 46(3), 254-261.
71. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., et al. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2391-2405.
72. Prochorec-Sobieszek, M. (2013). Klasyfikacja i kryteria diagnostyczne nowotworów układu chłonnego. W: *Zalecenia postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w nowotworach złośliwych. Via Medica*, 789-812.
73. Hong, M., He, G. (2017). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myelodysplastic syndromes. *Journal of translational internal medicine*, 5(3), 139-143.
74. Bieniaszewska M., Hellmann A. (2015). Inne przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne. W: Dmoszyńska, A., Robak, T., Hus, I. (red.), *Podstawy hematologii*, s.337-349. Lublin: Wydawnictwo Czelej.
75. Steensma, D. P. (2018). Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*, 8(5), 1-7.
76. Wierzbowska, A. (2020). 1.10. Ostra białaczka szpikowa. *Onkologia w Praktyce Klinicznej-Edukacja*, 6(A), 119-144.
77. Czyż, A., Giebel, S. (2020). 2.4. Ostra białaczka limfoblastyczna i chłoniaki limfoblastyczne. *Onkologia w Praktyce Klinicznej-Edukacja*, 6(A), 204-241.

78. Terwilliger, T., Abdul-Hay, M. J. B. C. J. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7(6), e577-e577.
79. Valent, P., Akin, C., Metcalfe, D. D. (2017). Mastocytosis: 2016 updated WHO classification and novel emerging treatment concepts. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 129(11), 1420-1427.
80. Lewandowski, K. (2020). 1.7. Mastocytoza. *Onkologia w Praktyce Klinicznej-Edukacja*, 6(A), 86-98.
81. Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., Teng, S. H. (2019). Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of food and drug analysis*, 27(2), 404-414.
82. Picó, Y., Blasco, C., Font, G. (2004). Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass spectrometry reviews*, 23(1), 45-85.
83. George, R., Haywood, A., Khan, S., Radovanovic, M., Simmonds, J., Norris, R. (2018). Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC-MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment. *Therapeutic drug monitoring*, 40(1), 1-8.
84. Matraszek-Zuchowska, I., Wozniak, B., Posyniak, A. (2016). Comparison of the multiple reaction monitoring and enhanced product ion scan modes for confirmation of stilbenes in bovine urine samples using LC–MS/MS QTRAP® system. *Chromatographia*, 79(15), 1003-1012.
85. Stapleton, M., Kubaski, F., Mason, R. W., Shintaku, H., Kobayashi, H., Yamaguchi, S., et al. (2020). Newborn screening for mucopolysaccharidoses: Measurement of glycosaminoglycans by LC-MS/MS. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 22, 100563.
86. Guo, Y., Bhalodia, N., Fattal, B., Serris, I. (2019). Evaluating the adsorbed water layer on polar stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC). *Separations*, 6(2), 19.
87. Buszewski, B., Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402(1), 231-247.
88. *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*. Merck, Germany. Dostęp: 24.03.2022, <https://www.sigmaaldrich.com/PL/pl/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/hilic>.

89. McCalley, D. V. (2020). Managing the column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1612, 460655.
90. Rampler, E., Schoeny, H., Mitic, B. M., El Abiead, Y., Schwaiger, M., Koellensperger, G. (2018). Simultaneous non-polar and polar lipid analysis by on-line combination of HILIC, RP and high resolution MS. *Analyst*, 143(5), 1250-1258.
91. Markert, C., Thinius, M., Lehmann, L., Heintz, C., Stappert, F., Wissdorf, W., et al. (2021). Observation of charged droplets from electrospray ionization (ESI) plumes in API mass spectrometers. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 413(22), 5587-5600.
92. Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 49(7), 1041-1044.
93. Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., Lehane, M. (2013). Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta*, 115, 104-122.
94. R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Dostęp: 01.02.2022. <https://www.R-project.org/>.
95. Dmoszyńska A. (2015). Szpiczak plazmocytowy i inne gamapatie monoklonalne. W: Dmoszyńska, A., Robak, T., Hus, I. (red.), *Podstawy hematologii*, s. 292. Lublin: Wydawnictwo Czelej.
96. Juliusson, G., Antunovic, P., Derolf, Å., Lehmann, S., Möllgård, L., Stockelberg, D., et al. (2009). Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 113(18), 4179-4187.
97. Gierach, M., Gierach, J., Oczadło, M., Jarzembowska, M., Spsychalska, M., Czekień, M., et al. (2016). Rakowiaki przewodu pokarmowego. *Forum Medycyny Rodzinnej* (Vol. 10, No. 6, pp. 299-303).
98. Laurichesse, M., Gicquel, T., Moreau, C., Tribut, O., Tarte, K., Morel, I., et al. (2016). Histamine quantification in human plasma using high resolution accurate mass LC-MS technology. *Clinical Biochemistry*, 49(1-2), 111-116.
99. Kim, K. Y., Kwon, H. J., Cho, S. H., Nam, M., Kim, C. W. (2019). Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS method for in vitro measurement of histamine concentration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 172, 33-41.
100. Korse, C. M., Buning-Kager, J. C., Linders, T. C., Heijboer, A. C., van den Broek, D., Tesselaar, M. E., et al. (2017). A serum and platelet-rich plasma serotonin assay using

liquid chromatography tandem mass spectrometry for monitoring of neuroendocrine tumor patients. *Clinica Chimica Acta*, 469, 130-135.

101. Moriarty, M., Lee, A., O'Connell, B., Kelleher, A., Keeley, H., Furey, A. (2011). Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(8), 2481-2493.

102. Nemoto, T., Lee, X. P., Kumazawa, T., Hasegawa, C., Fujishiro, M., Marumo, A., et al. (2014). High-throughput determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 88, 71-80.

103. Kozlik, P., Hasikova, L., Stiburkova, B., Zavada, J., Kalikova, K. (2020). Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. *Analytical biochemistry*, 589, 113509.

104. Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19.

105. Nota aplikacyjna producenta Northwest Life Science Specialties Histamine ELISA Assay Kit. Dostęp 30.03.2022 https://www.nwlifescience.com/product_insert/nwk-his01_product_insert.pdf.

106. Corbel, S., Schneider, E., Lemoine, F. M., Dy, M. (1995). Murine hematopoietic progenitors are capable of both histamine synthesis and uptake.

107. Biosse-Duplan, M., Baroukh, B., Dy, M., de Vernejoul, M. C., Saffar, J. L. (2009). Histamine promotes osteoclastogenesis through the differential expression of histamine receptors on osteoclasts and osteoblasts. *The American journal of pathology*, 174(4), 1426-1434.

108. Li, H., Tang, C., Zhu, X., Zhang, W., Abudupataer, M., Ding, S., et al. (2020). Histamine deficiency facilitates coronary microthrombosis after myocardial infarction by increasing neutrophil-platelet interactions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(6), 3504-3520.

109. Arock, M., Valent, P. (2010). Pathogenesis, classification and treatment of mastocytosis: state of the art in 2010 and future perspectives. *Expert review of hematology*, 3(4), 497-516.

110. Alcañiz, L., Vega, A., Chacón, P., El Bekay, R., Ventura, I., Aroca, R., et al. (2013). Histamine production by human neutrophils. *The FASEB Journal*, 27(7), 2902-2910.

111. Rankin, S. M. (2010). The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *Journal of leukocyte biology*, 88(2), 241-251.
112. Cloutier, N., Allaey, I., Marcoux, G., Machlus, K. R., Mailhot, B., Zufferey, A., et al. (2018). Platelets release pathogenic serotonin and return to circulation after immune complex-mediated sequestration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7), E1550-E1559.
113. Anbarlou, A., Rahnama, M. A., Atashi, A., Soleimani, M. (2016). Selective serotonin reuptake inhibitors may improve the efficacy of hematopoietic stem cells transplantation. *Journal of Exploratory Research in Pharmacology*, 1(1), 16-19.
114. Kirouac, D. C., Ito, C., Csaszar, E., Roch, A., Yu, M., Sykes, E. A., et al. (2010). Dynamic interaction networks in a hierarchically organized tissue. *Molecular systems biology*, 6(1), 417.
115. Gaudet, S. (2010). Connecting cell fate decision networks in hematopoiesis from the outside in. *Molecular Systems Biology*, 6(1), 418.
116. Kushnir-Sukhov, N. M., Brittain, E., Scott, L., Metcalfe, D. D. (2008). Clinical correlates of blood serotonin levels in patients with mastocytosis. *European journal of clinical investigation*, 38(12), 953-958.

Spis rycin

Rycina 1. Wzór strukturalny histaminy	10
Rycina 2. Schemat powstawania i metabolizowania histaminy	13
Rycina 3. Wzór strukturalny serotoniny	14
Rycina 4. Schemat powstawania i metabolizmu serotoniny.	16
Rycina 5. Podział nowotworów układu krwiotwórczego WHO z roku 2016	22
Rycina 6. Podział nowotworów układu limfatycznego WHO z roku 2016.	23
Rycina 7. Schemat podziału analitów między warstwę bogatą w wodę i eluent w układzie HILIC.	29
Rycina 8. Schemat przygotowania próbki szpiku kostnego do analizy LC-MS/MS.	35
Rycina 9. Schemat przygotowania roztworów roboczych poprzez rozcieńczanie w metanolu.	39
Rycina 10. Krzywa kalibracyjna analitu histamina.	42
Rycina 11. Krzywa kalibracyjna analitu serotonina.	43
Rycina 12. Chromatogramy wybranych prądów jonowych (XICs), pomiar w próbce zerowej: A- XIC 181,100→164,100 m/z (serotonina d4); 116,100→99,100 m/z (histamina d4). B- XIC 112,100→68,000 m/z (histamina 2); 112,100→95,100 m/z (histamina 1)....	44
Rycina 13. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) dla przejścia 177,100→160,100 m/z (serotonina 1) z wyznaczonym stosunkiem sygnału do szumu (S/N).	45
Rycina 14. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) dla przejścia 112,100→95,100 m/z (histamina 1) z wyznaczonym stosunkiem sygnału do szumu (S/N).	45
Rycina 15. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce kontrolnej o stężeniu 100 ng/ml. XIC 112,100→95,100 m/z (histamina 1); 112,100→68,000 m/z (histamina 2).	49
Rycina 16. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) w próbce kontrolnej. XIC: 116,100→99,100 m/z (IS, histamina d4).	50
Rycina 17. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce kontrolnej o stężeniu 100 ng/ml. XIC 177,100→160,100 m/z (serotonina 1); 160,100→115,100 m/z (serotonina 2).	51
Rycina 18. Chromatogram wybranego prądu jonowego (XIC) w próbce kontrolnej. XIC 181,100→164,100 m/z (serotonina d4).	52
Rycina 19. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce szpiku kostnego pacjenta z grupy chorób mieloproliferacyjnych. XIC 112,100→95,100 m/z (histamina 1); 112,100→68,000 m/z (histamina 2); 116,100→99,100 m/z (histamina d4).	53

Rycina 20. Chromatogram wybranych prądów jonowych (XIC) w próbce szpiku kostnego pacjenta z grupy chorób mieloproliferacyjnych. XIC 177,100→160,100 m/z (serotonina 1); 160,100→115,100 m/z (serotonina 2); 181,100→164,100 m/z (serotonina d4).....	54
Rycina 21. Wykres pudełkowy zależności między stężeniami histaminy a grupami chorób hematologicznych.	59
Rycina 22. Graficzne zobrazowanie korelacji pomiędzy stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii krwi.	62
Rycina 23. Wykres rozkładu procentowego zgrupowanych zakresów stężeń histaminy w poszczególnych grupach chorób hematologicznych.	63
Rycina 24. Wykresy pudełkowe zależności pomiędzy zgrupowanymi w przedziałach stężeniami histaminy a wartościami parametrów morfologii krwi obwodowej.....	70
Rycina 25. Wykres pudełkowy zależności pomiędzy stężeniami serotoniny notowanymi w poszczególnych grupach chorób hematologicznych.	72
Rycina 26. Graficzne zobrazowanie korelacji między stężeniami serotoniny i wartościami parametrów morfologii krwi obwodowej.	75
Rycina 27. Wykres rozkładu procentowego zakresów stężeń serotoniny w poszczególnych grupach chorób hematologicznych.	76
Rycina 28. Wykresy pudełkowe zależności między stężeniami serotoniny w poszczególnych zakresach a wartościami parametrów morfologii.	83

Wykaz Tabel

Tabela 1. Porównanie rozmieszczenia poszczególnych receptorów serotoninowych.	18
Tabela 2. Zestawienie wybranych właściwości fizykochemicznych serotoniny i histaminy	19
Tabela 3. Wykaz parametrów zoptymalizowanych dla chromatografu cieczowego.	36
Tabela 4. Zestawienie zmian w przebiegu gradientu fazowego w rozdziale chromatograficznym.	36
Tabela 5. Zestawienie parametrów pracy spektrometru mas..	37
Tabela 6. Zestawienie zoptymalizowanych parametrów dla przejść jonowych poszczególnych analitów (MRM)..	38
Tabela 7. Zestawienie ilości i objętości poszczególnych roztworów użytych do przygotowania roztworów roboczych oraz próbek kalibracyjnych.....	40
Tabela 8. Zestawienie wyników pomiarów i parametrów powtarzalności powtórzeń próbek kontrolnych histaminy i serotoniny o stężeniu 1 ng/ml i 100 ng/ml..	41
Tabela 9. Zestawienie wartości stężeń oczekiwanych i zmierzonych - odczyty dla krzywej kalibracyjnej histaminy.....	41
Tabela 10. Zestawienie wartości oczekiwanych i zmierzonych odczyty dla krzywej kalibracyjnej serotoniny.	42
Tabela 11. Wykaz stosowanych odczynników laboratoryjnych w kolejności alfabetycznej.	46
Tabela 12. Zestawienie wyników statystyki opisowej: względem płci, wieku, grupy pacjentów.....	55
Tabela 13. Zestawienie wyników analiz statystycznych dla parametrów morfologii krwi.	56
Tabela 14. Zestawienie statystyk dla stężeń histaminy oraz serotoniny wyznaczonych w próbkach szpiku: średnia, mediana, kwartyle.....	57
Tabela 15. Rozkład procentowego udziału stężeń histaminy oraz serotoniny wraz z liczebnością, w poszczególnych przedziałach.....	57
Tabela 16. Zestawienie zależności między stężeniami histaminy a grupami chorób- wynik testu Kruskala-Wallisa oraz analizy post-hoc (test Dunna).....	58
Tabela 17. Wyniki korelacji pomiędzy stężeniami histaminy i parametrami morfologii krwi- analiza współczynników Spearmana..	60
Tabela 18. Zestawienie zależności między zgrupowanymi stężeniami histaminy i grupami chorób hematologicznych - wynik dokładnego testu Fishera.	64
Tabela 19. Zestawienie zależności między zgrupowanymi stężeniami histaminy i grupami chorób hematologicznych - wyniki dokładnego testu Fishera.	66

Tabela 20. Zestawienie zależności między stężeniem serotoniny a grupami chorób hematologicznych- wynik testu Kruskala-Wallisa.	71
Tabela 21. Zestawienie wyników korelacji pomiędzy stężeniami serotoniny a parametrami morfologii krwi- analiza współczynników Spearmana..	73
Tabela 22. Zestawienie zależności między zakresami stężeń serotoniny a grupami chorób hematologicznych- wynik dokładnego testu Fishera.....	77
Tabela 23. Zestawienie zależności między zgrupowanymi w przedziałach stężeniami serotoniny a parametrami morfologii krwi- wyniki testu Kruskala-Wallisa oraz analizy post-hoc (test Dunna).	79