

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lada Surjan

**KONCENTRACIJA TROMBOCITNOG SEROTONINA U
BOLESNIKA S DEPRESIVNIM POREMEĆAJEM**

Diplomski rad

Zagreb, ožujak 2011.

POPIS KRATICA

5-HT	5-hidroksitriptamin, serotonin
5-HTt	5-HT prijenosnik
5-HT-2A	5-HT receptor
5-HTP	5-hidroksitriptofan
SŽS	središnji živčani sustav
MAO	monoaminooksidaza
MAO A	izoenzim A monoaminooksidaze
MAO B	izoenzim B monoaminooksidaze
trb	trombocit
MPV	srednji volumen trombocita
PDW	distribucija trombocita prema volumenu
ATP	adenindinukleotid trifosfat
ADP	adenindinukleotid difosfat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
TCA	triciklički antidepresivi
SSRI	selektivni inhibitori ponovnog povrata serotonina
K ₃ EDTA	kalijeva sol etilendiaminooctene kiseline

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. SEROTONIN.....	1
1.1.1. Fiziologija serotonina.....	1
1.1.2. Rasprostranjenost u organizmu.....	2
1.1.3. Funkcija.....	3
1.2. SEROTONINSKI SUSTAV U TROMBOCITIMA.....	3
1.3. SEROTONIN U TROMBOCITNIM GRANULAMA.....	5
1.3.1. Koncentracija serotonina u cirkulaciji.....	5
1.3.2. Pohrana i otpuštanje serotonina iz trombocita.....	5
1.3.3. Fiziološka uloga trombocitnog serotonina.....	7
1.3.4. Klinički značaj trombocitnog serotonina.....	7
1.4. DEPRESIVNI POREMEĆAJ.....	8
1.4.1. Definicija.....	8
1.4.2. Znakovi i simptomi.....	9
1.4.3. Etiologija.....	9
1.4.4. Liječenje.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. ISPITANICI	12
3.2. OPREMA I PRIBOR ZA RAD.....	12
3.3. UZORCI KRV.....	12
3.3.1. Uzimanje uzoraka.....	12
3.3.2. Priprava uzoraka za ispitivanje.....	13
3.3.2.1. Postupak izdvajanja plazme bogate trombocitima iz pune krvi.....	13
3.4. ODREĐIVANJE TROMBOCITA I NJIHOVIH PARAMETARA.....	13
3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA.....	15
3.5.1. Metodološki princip.....	15
3.5.2. Postupak.....	16
3.5.3. Izračunavanje koncentracije serotonina u trombocitima.....	17
3.5.4. Statistička obrada.....	17
4. .REZULTATI.....	18
4.1. OPISNA STATISTIKA.....	18

4.1.1. Usporedba skupina ispitanika prema dobi.....	18
4.1.2. Frekvencija spola po skupinama.....	19
4.1.3. Razdioba koncentracije 5HT u PRP unutar skupina.....	20
4.1.4. Razdioba koncentracije trombocitnog 5HT unutar skupina.....	21
4.2. POVEZANOST SEROTONINA SA ŽIVOTNOM DOBI.....	22
4.2.1. Povezanost koncentracije 5HT u PRP i dobi ispitanika.....	22
4.2.2. Povezanost koncentracije trb. 5HT i dobi ispitanika.....	24
4.2.3. Povezanost koncentracije trb. 5HT i konc 5HT u PRP.....	25
4.2.4. Linearna regresija koncentracije trb. 5HT u PRP i dobi.....	26
4.2.5. Linearna regresija konc. trb. 5HT i konc. 5HT u PRP.....	27
4.3. KONCENTRACIJE 5HT U ZDRAVIH ISPITANIKA I BOLESNIKA S DEPRESIVNIM POREMEĆAJEM.....	30
4.3.1. Usporedba koncentracije 5HT u PRP između skupina.....	30
4.3.2. Usporedba koncentracije trombocitnog. 5HT između skupina.....	31
5. RASPRAVA.....	33
6. ZAKLJUČAK.....	35
7. LITERATURA.....	36
8. SAŽETAK.....	39
9. SUMMARY.....	40

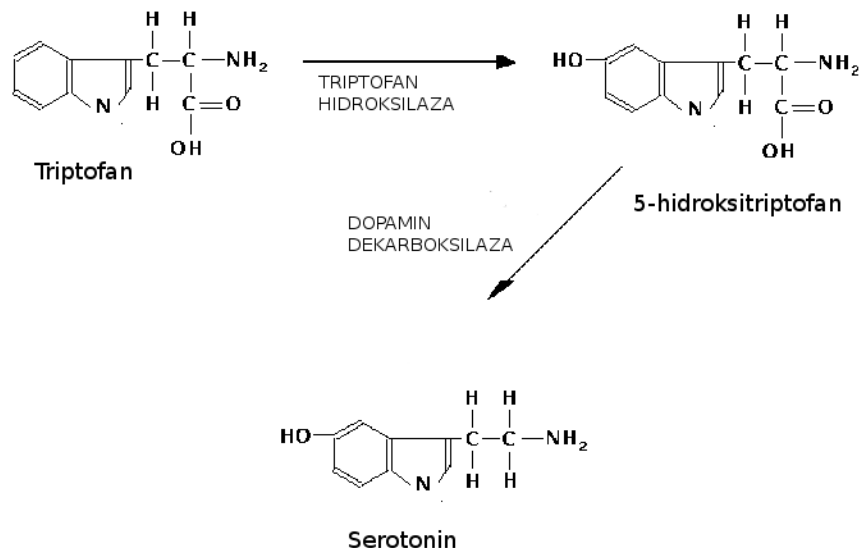
1. UVOD

1.1. SEROTONIN

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biogeni monoamin. Nastaje sintezom iz esencijalne aminokiseline triptofana. Široko je rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu.

1.1.1. Fiziologija serotonina

U organizmu sisavaca serotonin se nalazi u središnjem živčanom sustavu (SŽS) i na periferiji. Ova dva odjeljka odvojena su krvno moždanom barijerom nepropusnom za serotonin, koja međutim propušta serotoninški prekursor triptofan i metabolit 5-hidroksiindoloctenu kiselinu (Fuller, 1986).

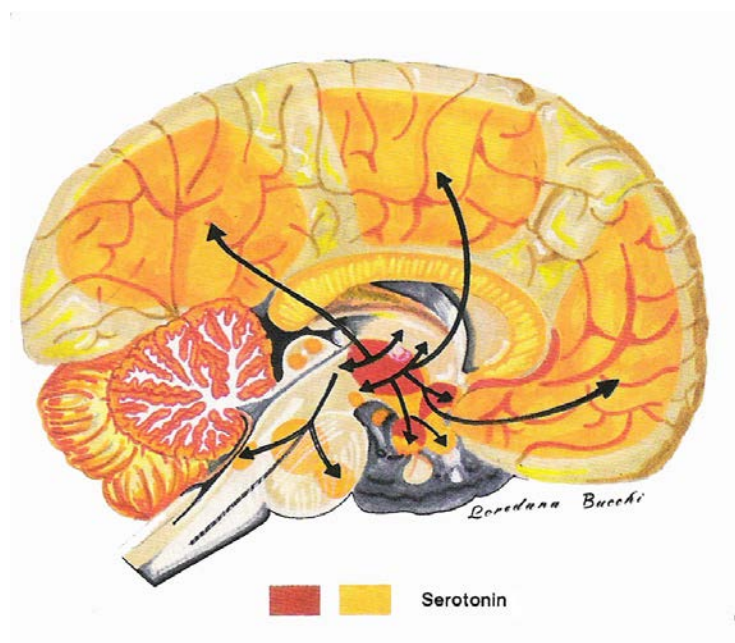


Slika 1.1. Prikaz reakcija sinteze serotonina iz triptofana, preko 5-hidroksitriptofana djelovanjem enzima triptofan hidroksilaze i dopamin dekarboksilaze (preuzeto s herkules.oulu.fi)

U perifernom dijelu organizma serotonin je uključen u razne fiziološke procese, a u mozgu ima ulogu neurotransmitera.

1.1.2. Rasprostranjenost u organizmu

U središnjem živčanom sustavu, neuroni odgovorni za otpuštanje serotonina nalaze se u jezgrama rafe smještenim u moždanom deblu. Aksoni ovih neurona pružaju se u gotovo sve dijelove središnjeg živčanog sustava.



Slika 1.2. Prikaz projekcije serotoninergičnih neurona u središnjem živčanom sustavu (preuzeto s www.nilalienum.it)

U serotoninergičnim neuronima serotonin nastaje iz triptofana pod djelovanjem enzima triptofan hidroksilaze. Glavni metabolit serotonina je 5-hidroksiindolactena kiselina koja nastaje razgradnjom pod djelovanjem enzima monoaminooksigenaze (MAO) (Frazer i sur, 1994).

Glavni izvor perifernog serotonina su enterokromafine stanice crijeva. Oko 80% ukupnog serotonina u organizmu nalazi se u ovim stanicama. Slobodni amin otpušten u krvotok djelomično unose u sebe trombociti, a većinom se metabolizira u plućnoj mikrovaskulaturi (Berger i sur, 2009).

1.1.3. Funkcija

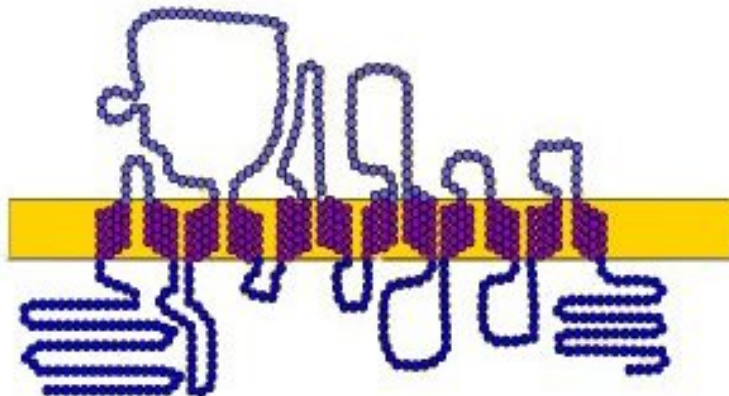
Serotonin je uključen u regulaciju brojnih bioloških procesa u organizmu, kao što su raspoloženje, disanje, spavanje, kardiovaskularna funkcija, hranjenje, motilitet crijeva, metabolizam, spolna funkcija i dr (Berger i sur, 2009).

Poremećaj serotoniniskog sustava povezuje se s pojavom različitih bolesti, posebno duševnih kao npr. depresija, psihoza, anksiozni poremećaji, autizam i dr, ali i poremećaji homeostaze, povraćanje, migrena i dr.

1.2. SEROTONINSKI SUSTAV U TROMBOCITIMA

U trombocitima se nalaze relativno velike količine od ukupnog serotonina u organizmu. To su stanice najbogatije serotoninom nakon enterokromafinih stanica i serotoninergičnih neurona.

Trombociti se bitno razlikuju od neurona, prema podrijetlu, anatomiji i funkciji u organizmu. Serotonin se ne može sintetizirati u trombocitima, već u njih prelazi iz krvne plazme aktivnim prijenosom pomoću proteinskog 5HT prijenosnika (Pletscher, 1987). Međutim, trombocitni serotoniniski sustav gotovo je jednak onome u serotoninergičnim neuronima.



Slika 1.3. Prikaz proteinskog serotoniniskog prijenosnika smještenog na membrani trombocita i serotoninergičnih neurona. Sažbi 12 transmembranskih podjedinica. (preuzeto s www.shockmd.com)

Serotonin je pohranjen u gustim (delta) granulama u citoplazmi trombocita, u koje ulazi iz trombocitne citoplazme pomoću vezikularnog prijenosnika.

Od ostalih serotoniniskih elemenata u trombocitima nalazimo 5HT receptor (5HT-2A) i monoaminooksigenazu (izoenzim MAO-B), enzim koji metabolizira monoamine (oksidativna deaminacija 5HT), a nalazi se na vanjskoj membrani trombocitnih mitohondrija (Fuller, 1986).

5HT-2A receptor nalazi se na membrani trombocita. Nakon vezanja serotoninu aktivira trombocitni odgovor tj. promjenu oblika i pojačanu agregaciju trombocita. Iako spada u kategoriju slabih trombocitnih agonista, pokazano je da serotonin posjeduje sposobnost snažne amplifikacije trombocitnog odgovora u prisutnosti drugih agonista (De Clerck, 1990).

1.3. SEROTONIN U TROMBOCITNIM GRANULAMA

Guste granule (*engl: dense bodies*) su stanične organele u trombocitima u kojima je pohranjen serotonin u velikoj koncentraciji, a pojavljuje se u kompleksu s adeninskim nukleotidima (ATP, ADP) i dvovalentnim ionima (Mg^{2+} , Ca^{2+}). Kako je prije spomenuto, u trombocitima nije prisutan enzim triptofan-hidroksilaza zbog čega biosinteza serotoninina nije moguća. Ukupni sadržaj serotoninina potječe iz krvne plazme, a u trombocite ulazi djelovanjem proteinskog serotonininskog prijenosnika (5HTt).

Iz trombocitne citoplazme, pomoću vodikove ATP-aze, serotonin prelazi u guste granule, u zamjenu za vodikove ione koje H^+ ATP-aza izbacuje u okolnu citoplazmu (Rudnick i Clarck, 1993).

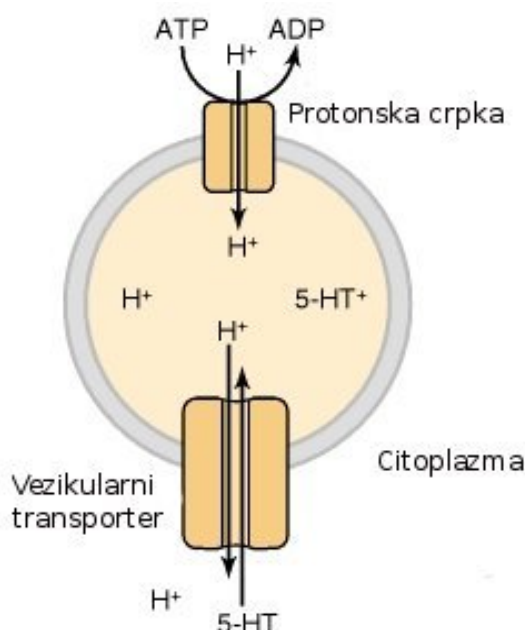
1.3.1. Koncentracija serotoninina u cirkulaciji

Koncentracija serotoninina u krvi odraz je sadržaja serotoninina u trombocitima koji sadrže preko 99% ukupnog serotoninina u cirkulaciji (Ortiz i sur, 1988). Ostale krvne stanice i krvna plazma sadrže neusporedivo manju količinu serotoninina. Sadržaj serotoninina u trombocitima ovisi o koncentraciji slobodnog serotoninina u krvnoj plazmi, o aktivnosti 5HT prijenosnika na membrani trombocita, o mehanizmu pohrane serotoninina u guste granule te o otpuštanju serotoninina iz trombocita u krvnu plazmu, gdje postoje individualne razlike (Arora i sur, 1984). Tako na primjer visoka koncentracija serotoninina u trombocitima ne mora istovremeno značiti i visoku koncentraciju serotoninina u plazmi (takav je slučaj u trombocitopenijama). Rezultati istraživanja na velikom broju ispitanika potvrđuju da u fiziološkim uvjetima koncentracija trombocitnog serotoninina odgovara njegovoj koncentraciji u krvnoj plazmi (Hervig i sur, 1996).

1.3.2. Pohrana i otpuštanje serotoninina iz trombocita

Proces nakupljanja serotoninina u trombocitu posreduju proteinski serotonininski prijenosnik na membrani trombocita i vezikularni prijenosnik (H^+ ATP-aza).

Nakon unosa u trombocitnu citoplazmu serotonin može biti podvrgnut razgradnji djelovanjem MAO-B ili pohranjen (Da Prada i sur, 1988). Serotonin se u trombocitima pohranjuje u gustim (delta) granulama. Naziv su dobile po tome što su nepropusne za elektronski snop mikroskopa. To su subcelularne organele u kojima je serotonin zaštićen od djelovanja MAO-B, analogno vezikularnom serotoninu u neuronima. Mehanizam unosa serotonina u guste granule i u vezikule u neuronima je jednak (Hervig i sur, 1996).



Slika 1.4. Prikaz ulaska serotonina u guste granule djelovanjem vezikularnog transportera H⁺ ATPaze (preuzeto s www.ncbi.nlm.nih.gov)

Otpuštanje serotonina iz trombocita proces je koji se odvija za vrijeme aktivacije trombocita, tijekom hemostaze. Serotonin se iz gustih granula oslobađa egzocitozom, a proces je sličan otpuštanju serotonina iz sinaptičkih vezikula. Stimulacija trombocita trombinom, kolagenom, ADP-om ili adrenalinom mobilizira unutarstanični Ca²⁺, što dovodi do fuzije granularne i plazmatske membrane i otpuštanja granularnog sadržaja u plazmu (White, 1992).

1.3.3. Fiziološka uloga trombocitnog serotonina

Fiziološka uloga pohrane visokih koncentracija serotonina u trombocitima još uvijek nije potpuno razjašnjena.

Prema literaturnim podacima, istraživanja fizioloških karakteristika trombocitnog 5HT u zdravoj populaciji ukazuju na normalnu distribuciju vrijednosti koncentracije 5HT, tendenciju pada koncentracije s povećanjem dobi, te najčešće izostanak utjecaja spola i godišnjeg doba na koncentraciju serotonina (Rao i sur, 1994, Hervig i sur, 1996, Martin i sur, 1990).

1.3.4. Klinički značaj trombocitnog serotonina

Koncentracija serotonina u krvi dobar je pokazatelj homeostaze perifernog odjeljka serotonina u organizmu, zbog čega je ispitivana u brojnim granama medicine: hematologiji, gastroenterologiji, ginekologiji, kardiologiji, imunologiji i psihijatriji.

U farmakološkim ispitivanjima serotonina potvrđen je jasan odgovor nakon primjene psihotropnih lijekova: serotoniniskog prekursora (5HTP), inhibitora serotoniniske sinteze, blokatora pohrane serotonina, blokatora ponovnog unosa serotonina (TCA, SSRI), inhibitora razgradnje serotonina (inhibitori MAO), te agonista i antagonista 5HT receptora (Ronald, 1994).

Kod depresivnih bolesnika uočen je smanjeni unos serotonina u trombocite, kao i smanjeno vezanje imipramina i paroksetina na 5HT prijenosnik i u neuronima i u trombocitima, u žrtava samoubojstva (Stanley i sur, 1982) i u osoba s anksioznim poremećajem (Iny i sur, 1994). Kod alkoholičara je uočena smanjena koncentracija serotonina u trombocitima i smanjena koncentracija metabolita serotonina u cerebrospinalnoj tekućini (Benedetti i Dostert, 1992). Snižene koncentracije serotonina u trombocitima nađene su i kod osoba oboljelih od HIV-a, gdje je 5HT snižen za više od trećine (Larsson i sur, 1989).

1.4. DEPRESIVNI POREMEĆAJ

1.4.1. Definicija

Pod pojmom poremećaja raspoloženja razumijevaju se duševni poremećaji u kojima se osnovne psihopatološke promjene zbivaju u raspoloženju, a prate ga i promjene u nekim drugim psihičkim i tjelesnim funkcijama.

Depresija je znatna promjena u smjeru sniženog raspoloženja, pod čijim se utjecajem mijenja sveukupno razmišljanje, opažanje, tjelesno stanje, ponašanje i socijalno funkcioniranje osobe (Hotujac i sur, 2006).

Postoji nekoliko oblika depresivnog poremećaja : veliki depresivni poremećaj, distimija, psihotična depresija, reaktivna depresija, postpartalna depresija, klimakterična depresija, sezonska depresija, atipična depresija i dr. Od prije navedenih najčešći su veliki depresivni poremećaj (epizoda) i distimija (distimijski poremećaj).

Veliki depresivni poremećaj karakteriziran je kombinacijom simptoma koji utječu na pacijentovu radnu sposobnost, san, učenje, apetit i hedoniju (sposobnost uživanja u stvarima u kojima je prije uživao), dakle onemogućava pacijentovo normalno funkcioniranje. Ovaj se tip poremećaja može pojaviti samo jednom u životu, ali epizode se mogu ponavljati i tijekom života.

Distimija je poremećaj karakteriziran kroničnim simptomima koji traju 2 godine ili duže, a blaži su od onih koji se javljaju u velikoj depresivnoj epizodi. Ovakvi simptomi neće u potpunosti onesposobiti osobu , ali je mogu ometati u normalnom funkcioniranju. Distimični bolesnici također mogu kroz život razviti jednu ili više velikih depresivnih epizoda.

1.4.2. Znakovi i simptomi

Znakovi i simptomi depresije su potištenost, smanjenje energije, interesa i volje, jak osjećaj krivnje, poremećaj koncentracije, nesanica, gubitak apetita, suicidalna razmišljanja i pokušaji, zatim promjene kognitivnih sposobnosti, govora i vegetativnih funkcija. Kao rezultat tih poremećaja, gotovo uvijek je prisutno oštećenje socijalnih funkcija.

1.4.3. Etiologija

Etiologija bolesti je, kao i kod većine psihijatrijskih poremećaja, nepoznata. Postoje brojne teorije o mehanizmu nastanka poremećaja raspoloženja, no većina se može prikazati unutar osnovnih podskupina: biokemijske i psihosocijalne teorije (Hotujac i sur, 2006).

Biokemijske teorije temelje se na genetičkim istraživanjima i istraživanjima djelovanja antidepresiva. Prema monoaminskoj teoriji, biološka podloga za depresiju je funkcionalni deficit monoaminske transmisije (noradrenergičke i/ili serotoninergičke) u određenim dijelovima mozga (Hirschfeld RM, 2000). Hipoteza se najprije temeljila na noradrenalinu, ali je većina istraživanja koja su uslijedila nakon toga pokazala da je 5HT ključna supstanca. Iako ima nekih odstupanja, farmakološki dokazi općenito najviše idu u prilog ovoj teoriji (Rang HP i sur, 2006).

Psihodinamičke teorije temelje se na pacijentovom osjećaju gubitka neke osobe, situacije ili predmeta, koji može biti stvaran ili zamišljen.

U socijalnim teorijama veliku ulogu ima stres. Pretpostavlja se da niz stresnih situacija predodređuje osobu za razvoj depresije, međutim ove tvrdnje nisu znanstveno potkrijepljene (Hotujac i sur, 2006).

1.4.4. Liječenje

U liječenju depresije koriste se različite biološke, psihoterapijske i

socioterapijske metode. Psihoterapijske i socioterapijske metode primjenjuju se individualno ili u skupini. Obitelj ima vrlo važnu ulogu u navedenim metodama. U biološke metode liječenja ubraja se terapija antidepresivima, terapija svjetlom, deprivacija spavanja i kronoterapija, te terapija litijem i elektrokonvulzivima.

Antidepresivi su lijekovi koji se koriste u liječenju depresije. Prema mehanizmu djelovanja podijeljeni su u nekoliko skupina: *inhibitori ponovnog unosa monoamina* (TCA (oni su neselektivni ili u nekim slučajevima selektivni inhibitori ponovnog unosa monoamina), SSRI (selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina), ostali inhibitori kemijski različiti od TCA, ali slični farmakološki), *inhibitori MAO*, koji su neselektivni u odnosu na podvrste MAO (MAO-A i MAO-B) i *ostali antidepresivi* (ili atipični antidepresivi): lijekovi s neselektivnim blokirajućim učincima na receptore i čiji mehanizam djelovanja nije razjašnjen (Rang HP i sur, 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Serotonin je biogeni monoamin koji sudjeluje u regulaciji brojnih fizioloških

funkcija u ljudskom organizmu. Najvećim dijelom nalazi se u središnjem živčanom sustavu, enterokromafinim stanicama crijeva i trombocitima. Serotoninski sustav u trombocitima i neuronima gotovo je identičan. Iz ovoga proizlazi da je moguće proučavanjem trombocitnog serotoninskog sustava steći uvid u serotoninski sustav neurona.

Prema monoaminskoj teoriji serotonin, odnosno deficijencija serotoninergičkog sustava ima, uz noradrenergički sustav, važnu ulogu u razvoju depresije. Lijekovi koji se koriste pretežno djeluju na principu zadržavanja otpuštenih neurotransmitera u sinapsi i sprečavanja njihovog ponovnog povrata u neurone. Istraživanja su pokazala da je koncentracija trombocitnog serotonina snižena kod nekih psihičkih poremećaja.

Ciljevi ovog rada jesu:

1. Usporediti koncentracije trombocitnog serotonina kod depresivnih bolesnika s koncentracijama kod zdravih ispitanika
2. Utvrditi u kojoj su mjeri koncentracije trombocitnog serotonina kod depresivnih bolesnika promijenjene
3. Utvrditi način izražavanja koncentracije trombocitnog serotonina

3. MATERIJAL I METODE

3.1. ISPITANICI

U istraživanju je sudjelovalo 178 ispitanika (90 muškaraca i 88 žena), od čega 105 bolesnika s depresivnim poremećajem i 73 zdrava ispitanika oba spola. Prosječna životna dob bolesnika s depresivnim poremećajem bila je 54 godine (raspon od 22 do 79). Prosječna životna dob zdravih ispitanika je 42 godine (u rasponu od 19 do 65).

Svi su ispitanici usmeno obaviješteni o razlozima uzimanja uzoraka i potpisom su potvrdili pristanak sudjelovanja u istraživanju. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničke bolnice Sestre milosrdnice.

3.2. OPREMA I PRIBOR ZA RAD

- DG Serotonin ELISA EIA 3947 (DRG Instruments GmbH, Njemačka)
- Centrifuga Universal 320 R (Hettich zentrifugen, Njemačka)
- Automatski ispirać StatFax 2600 (Awareness Technology, SAD)
- Čitač mikrotitarskih pločica Humareader (Human, Njemačka)
- Miješalica VKR basic Vibrax Janke & Kunkel typ VX7 (IKA, Njemačka)
- Miješalica Vortex EV-100 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- Automatski analizator LH 750 (Beckman Coulter, SAD)

3.3. UZORCI KRVI

3.3.1. Uzimanje uzoraka

Uzorci bolesnika i zdravih ispitanika sakupljeni su na Klinici za psihijatriju i u ambulantni Kliničkog zavoda za kemiju Kliničke bolnice Sestre milosrdnice. Uzorci su sakupljeni u periodu od 7³⁰ do 9 sati prijepodne.

Svi uzorci su uzimani u standardne spremnike s podtlakom volumena 3 ml

(Greiner bio-one, Austrija) s antikoagulansom K_3 EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina).

3.3.2. Priprava uzoraka za ispitivanje

Nakon uzimanja uzoraka pune krvi pripravljena je plazma bogata trombocitima (PRP, *platelet rich plasma*). Broj trombocita u PRP određen je unutar 3 sata tijekom istog dana.

Nakon određivanja broja trombocita napravljena je suspenzija trombocita tako što je odvojeno 200 μ l PRP i dodano 800 μ l fiziološke otopine. Ovaj je uzorak zatim centrifugiran 10 min na 4500 g (4000 okretaja/min) na 4 °C.

Nakon centrifugiranja odliven je supernatant i na talog je dodano 200 μ l destilirane vode. Zatim je uzorak miješan 1 minutu, na električnoj mješalici (engl. *vortex mixer*) čime su razoreni trombociti. Iz ovako pripremljene suspenzije trombocita uzeto je 100 μ L i spremljeno na temperaturu –20 °C. Koncentracija trombocitnog 5HT određena je unutar 3 tjedna od spremanja uzoraka.

3.3.2.1. Postupak izdvajanja plazme bogate trombocitima (PRP) iz pune krvi

- Uzorci pune krvi izvađeni u epruvete od 3 ml, uz EDTA, centrifugiraju se 10 min na 2000 g (500 okretaja/min), pri sobnoj temperaturi.
- Nakon pažljivog vađenja iz centrifuge, u kivete se izdvoji PRP za određivanje koncentracije 5HT u trombocitima i broj trombocita.

3.4. OREĐIVANJE TROMBOCITA I NJIHOVIH PARAMETARA

Broj trombocita, MPV (srednji volumen trombocita, engl. *mean platelet volume*) i PDW (distribucija trombocita, engl. *platelet distribution width*) u plazmi bogatoj trombocitima određivani su na hematološkom analizatoru Beckman-Coulter LH 750 (Beckman-Coulter, Fullerton, SAD).

Broj trombocita i MPV izravno se mjere u krvi impedancijskom metodom.

PDW je jedan od parametara krvnih stanica koji još nisu usvojeni za kliničku primjenu u kliničkim hematološkim laboratorijima. Izračunava se iz vrijednosti MPV i hematokrita .



Slika 3.1. Automatski hematološki brojač Beckamn-Coulter LH750 (preuzeto s www.beckmancoulter.com)

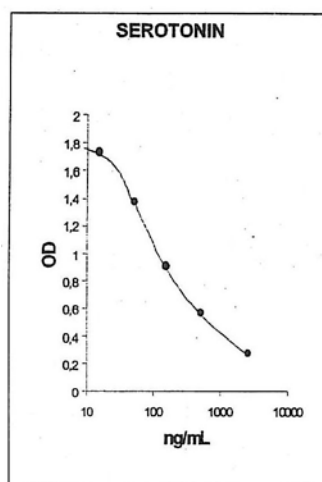
Analizator Beckman-Coulter LH 750 radi na principu impedancije i volumetrijskog brojanja krvnih stanica. Razrijeđena suspenzija stanica prolaskom kroz strujni krug izaziva promjene otpora koji izazivaju promjene neapona što se bilježi detektorima, a nastali signali prevode se u električne impulse koji se broje. Količina volumena izotonične elektrolitne otopine koju stanice izbijaju svojim prolaskom analogna je visini električnog impulsa i rabi za

određivanje staničnog volumena (RU 5.3-81-9/1, Interni dokument Kliničkog zavoda za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice).

3.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA

3.5.1. Metodološki princip

Koncentracija trombocitnog serotonina određena je ELISA (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) metodom. Korišten je DRG Serotonin ELISA kit EIA-3947 (proizvođač DRG Diagnostics). Antigen je vezan za čvrstu fazu mikrotitarske pločice. Standarde, kontrole i uzorke potrebno je acilirati. Acilirani standardi, kontrole i uzorci i analit vezan za čvrstu fazu mikrotitarske pločice konkuriraju za vezanje na točno određeni broj veznih mjesta u antiserumu. Nakon što se postigne ravnoteža u sustavu slobodni antigen i slobodni kompleksi antigen-antiserum se uklanjaju ispiranjem. Antitijela vezana na čvrstu fazu detektiraju se konjugatom zečji IgG-proksidaza, a kao supstrat koristi se tetrametilbenzidin (TMB). Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 450 nm.



Slika 3.2. Primjer bazdarne krivulje kakva se koristi u ozračunavanju koncentracije serotonina (DRG® Serotonin ELISA (EIA-3947), REVISED 23 MAR. 2009)

Kvantifikacija serotonina u nepoznatim uzorcima postiže se usporedbom

apsorbancija s referentnom krivuljom koja se dobije mjerenjem apsorbanacija 6 standardnih otopina poznatih koncentracija, u rasponu vrijednosti od 0 do 2500 ng/mL serotonina.

3.5.2. Postupak

- Koncentrat otopine za ispiranje volumena 20 ml razrijediti s destiliranom vodom do volumena 500 ml.
- Uzorke supenzije trombocita termostatirati na sobnu temperaturu i centrifugirati 2 min na 10.000 okretaja/ min
- Pipetirati po 10 µl svakog do standarda, po 10 µl svake od kontrola, i po 10 µl svakog od uzoraka u odgovarajuće bunariće na reakcijskoj pločici.
- Dodati 250 µl acilacijske otopine u sve bunariće.
- Dodati 25 µl acilacijskog reagensa u sve bunariće.
- Temeljito promiješati i inkubirati 15 min pri sobnoj temperaturi na miješalici (cca. 600 rpm).
- Pipetirati po 10 µl prethodno pripremljenih aciliranih standarda, kontrola i uzoraka u odgovarajuće bunariće na mikrotitaskoj pločici za Serotonin ELISA-u.
- Pipetirati 50 µl serotoniniskog antseruma u sve bunariće.
- Prekriti mikrotitarsku pločicu adhezivnom folijom i inkubirati 1 sat pri sobnoj temperaturi na miješalici (cca. 600 rpm).
- Foliju ukloniti i baciti. Izliti ili aspirirati sadržaj bunarića i isprati svaki bunarić 3 puta, temeljito s 300 µl otopine za ispiranje. Osušiti bunariće tapkanjem okrenute mikrotitarske pločice na staničevini.
- Pipetirati 100 µl enzimskog konjugata u sve bunariće.
- Inkubirati 30 min pri sobnoj temperaturi na miješalici (cca. 600 rpm).
- Izliti ili aspirirati sadržaj bunarića i isprati svaki bunarić 3 puta, temeljito s 300 µl otopine za ispiranje. Osušiti bunariće tapkanjem okrenute mikrotitarske pločice na staničevini.
- Pipetirati 100 µl supstrata u sve bunariće i inkubirati 20-30 min pri sobnoj

temperaturi na miješalici (cca. 600 rpm). Izbjegavati direktnu izloženost sunčevoj svjetlosti!

- Dodati 100 µl Stop otopine u svaki bunarić i protresti mikrotitarsku pločicu, da se osigura ravnomjerna raspodjela dodane otopine.
- Očitati apsorbanciju reakcijske otopine u bunarićima unutar 10 min, koristeći čitač mikrotitarskih pločica namještena na valnu duljinu 450 nm, s referentnom valnom duljinom između 620 nm i 650 nm.

3.5.3. Izračunavanje koncentracije serotonina u trombocitima

Nakon očitavanja apsorbancija standarda konstruira se baždarna krivulja na kojoj su poznatim koncentracijama serotonina na osi x pridodane apsorbancije na osi y. Iz ove krivulje očitaju se koncentracije kontrola i uzoraka.

Sadržaj serotonina u trombocitima odnosi se na 10^9 trombocita.

Koncentracija serotonina u trombocitima izračunata je tako što je dobivena koncentracija serotonina u pojedinom uzorku pomnožena 1000 i podijeljena s brojem trombocita (dobivenih na brojaču, analizom PRP) u odgovarajućem uzorku.

Koncentracija trombocitnog 5HT = Koncentracija 5HT u PRP (ng/ml) x
 $1000/\text{broj trombocita}(x10^9/\text{ml})$

3.5.4. Statistička obrada

Pohrana podataka učinjena je u programu Excel 2000 programskoga paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD). Za opis kvalitativnih varijabli korištene su tablice distribucije frekvencije, a kvantitativne varijable s normalnom raspodjelom opisane su aritmetičkom sredinom ($\bar{x}$), standardnom devijacijom (SD), a one s nenormalnom raspodjelom rasponom od najmanje do najveće vrijednosti, te medijanom (M). Razlike između pojedinih grupa ispitanika

testirane su neparametrijskim Mann-Whitney U-testom. Interpretacija rezultata postavljena je na 5%-tnoj razini značajnosti ($p < 0,05$). Obrada podataka učinjena je u programu za statističku obradu MedCalc (Medisoftware, Mariakerke, Belgium) (www.medcalc.be).

4. REZULTATI

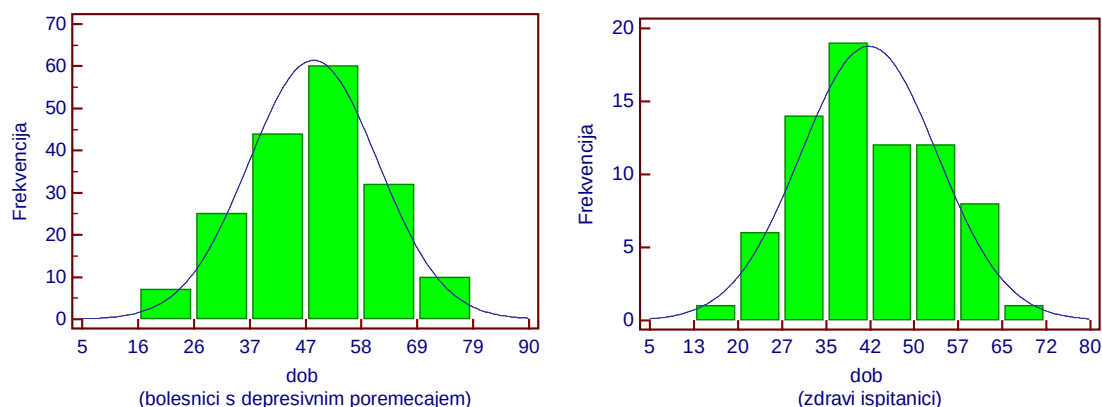
4.1. OPISNA STATISTIKA

4.1.1. Usporedba skupina ispitanika prema dobi

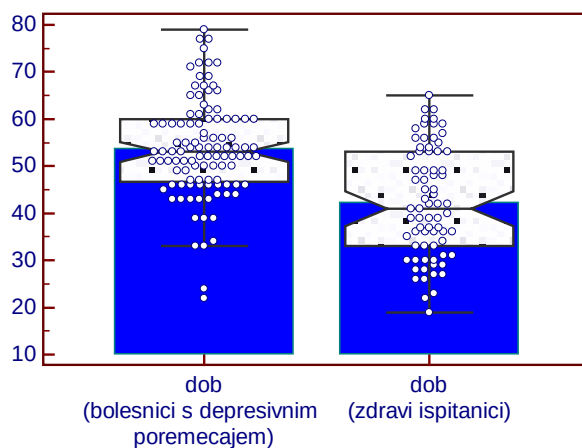
Normalnost raspodjela unutar skupina ispitanika testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom za provjeru normalne distribucije. U tablici 4.1. su prikazani rezultati testiranja Kolmogorov-Smirnovljevim testom koji pokazuju da nema bitne razlike između medijana i aritmetičke sredine te da se radi o normalnoj raspodjeli po dobi.

Bolesnici s depresivnim poremećajem		Zdravi ispitanici	
Veličina uzorka	105	Veličina uzorka	73
Najniža vrijednost god	22,	Najniža vrijednost	19,0000
Najviša vrijednost	79,0000	Najviša vrijednost	65,0000
Aritmetička sredina	53,6762	Aritmetička sredina	42,3014
Medijan	53,0000	Medijan	41,0000
Standardna devijacija	10,4794	Standardna devijacija	11,6317
Kolmogorov-Smirnovljev test za Normalnu razdiobu	prihvaćena (P=0,379)	Kolmogorov-Smirnovljev test za Normalnu razdiobu	prihvaćena (P=0,503)

Tablica 4.1. Rezultati testiranja Kolmogorov-Smirnovljevim testom za provjeru normalne razdiobe prema dobi



Slika 4.1.1. Histogrami razdiobe dobi u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

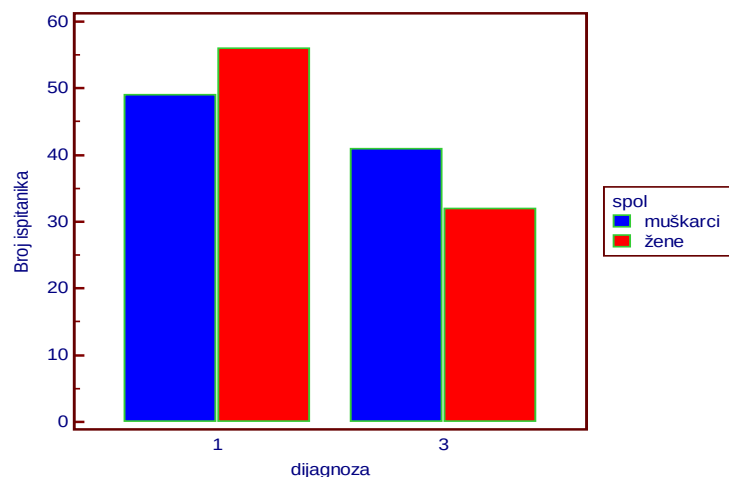


Slika 4.1.2. Usporedba skupina po dobi

4.1.2. Frekvencija spola u skupinama

Usporedba frekvencije spola između skupine bolesnika s depresivnim poremećajem i skupine zdravih ispitanika napravljena je χ^2 -testom.

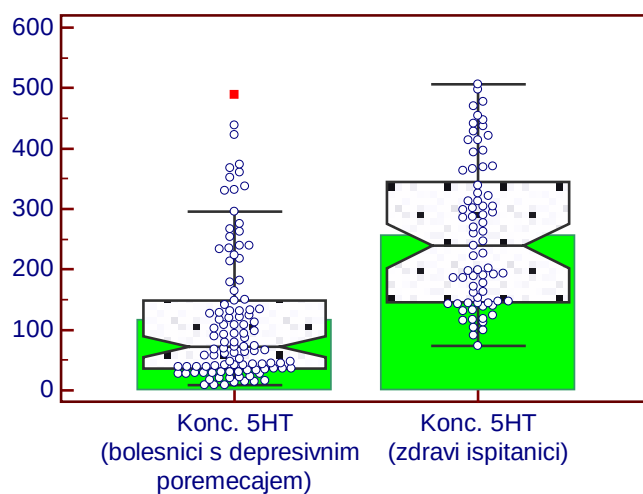
Razina signifikantnosti ($P = 0,273$) ukazuje kako ne postoji značajna razlika između frekvencija spola u dvjema ispitivanim skupinama. χ^2 je 1,197.



Slika 4.2.2. Histogram zastupljenosti spolova u skupinama
(1 = bolesnici s depresivnim poremećajem, 2 = zdravi ispitanici)

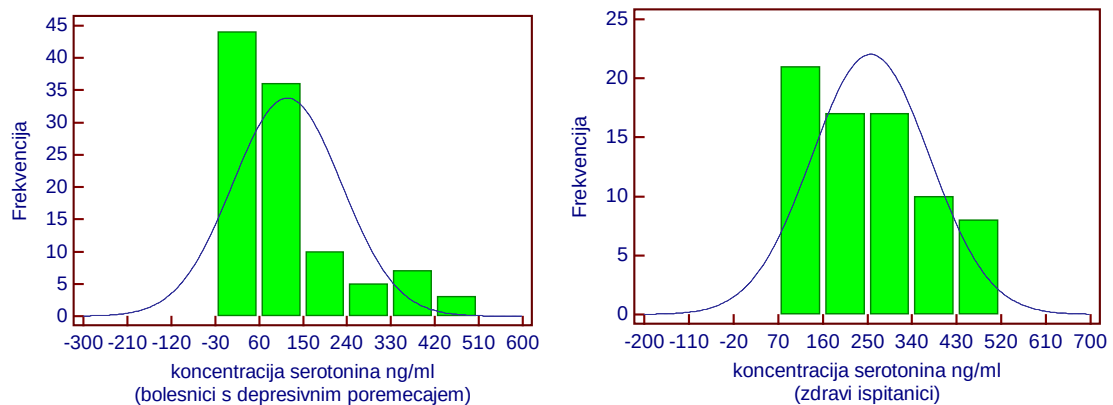
4.1.3. Razdioba koncentracije serotonina u PRP unutar skupina

Normalnost razdiobe serotonina testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom za provjeru normalne distribucije. U skupini bolesnika s depresivnim poremećajem test pokazuje značajnu razliku između aritmetičke sredine (117,43 ng/ml) i medijana (71, 70 ng/ml). U ovoj skupini koncentracija serotonina nije raspodijeljena prema normalnog razdiobi ($P=0,003$).



Slika 4.3.1. Graf usporedbe koncentracije serotonina jedinice!među skupinama

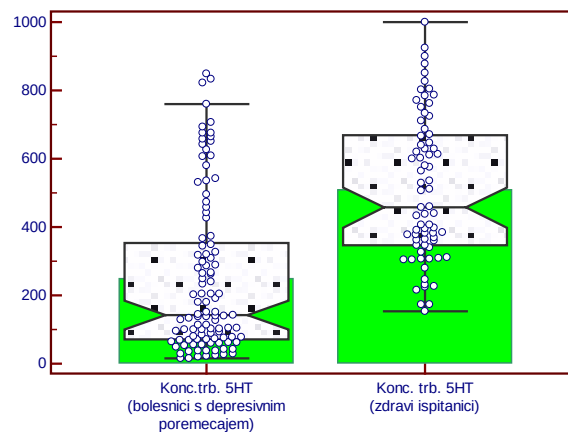
Test je također pokazao i da se u skupini zdravih ispitanika , aritmetička sredina (256,46 ng/ml) i medijan (239,10 ng/ml) koncentracije serotonina bitno ne razlikuju, te da se radi o normalnoj razdiobi ($P=0,103$).



Slika 4.3.2. Histogrami razdiobe koncentracije serotonina u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

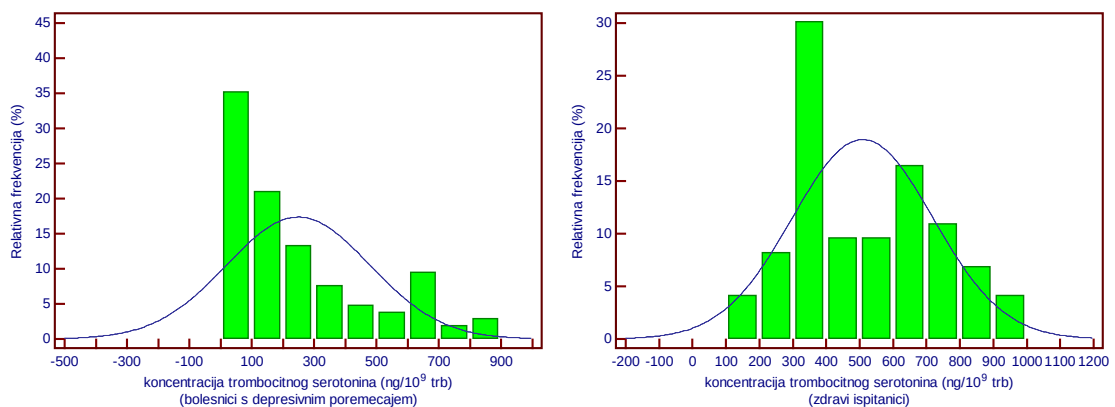
4.1.4. Razdioba koncentracije trombocitnog serotonina unutar skupina

Normalnost razdiobe trombocitnog serotonina testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom za provjeru normalne distribucije. U skupini bolesnika s depresivnim poremećajem test pokazuje značajnu razliku između aritmetičke sredine ($249,00 \text{ ng}/10^9 \text{ trb}$) i medijana ($142,20 \text{ ng}/10^9 \text{ trb}$). U ovoj skupini koncentracija trombocitnog 5HT nije raspodijeljena prema normalnoj razdiobi ($P<0,001$).



Slika 4.4.1. Usporedba koncentracije trombocitnog serotonina jed! između skupina

Test je također pokazao i da se u skupini zdravih ispitanika , aritmetička sredina (508,88 ng/10⁹ trb) i medijan (456,80ng/10⁹ trb) koncentracije trombocitnog serotonina bitno ne razlikuju, te da se radi o normalnoj razdiobi (P=0,113).



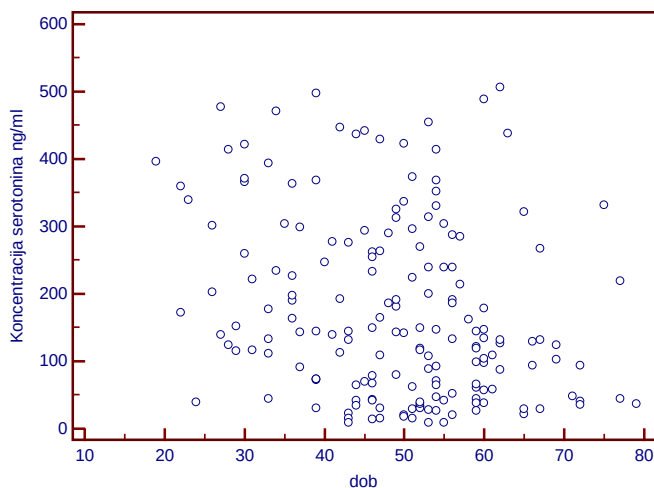
Slika 4.4.2. Histogrami razdiobe koncentracije trombocitnog serotonina u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

4.2. POVEZANOST SEROTONINA SA ŽIVOTNOM DOBI

4.2.1. Povezanost koncentracije serotonina u PRP i dobi ispitanika

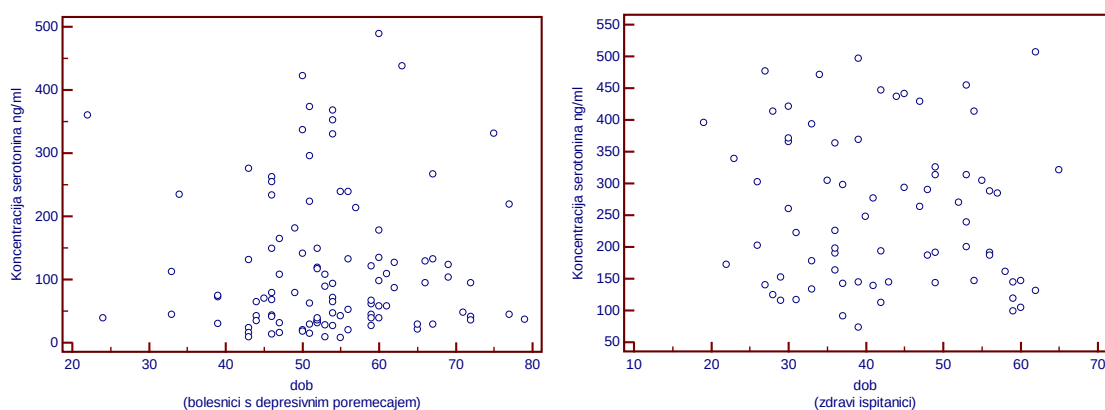
Izračun korelacije napravljen je da bi se utvrdilo postoji li povezanost između dobi ispitanika i koncentracije trombocitnog serotonina. Test pokazuje da nema

značajne povezanosti između ovih dviju varijabli ($r = -0,270$, $P = 0,0003$), prema tome koncentracija trombocitnog serotonina ne ovisi o dobi ispitanika.



Slika 4.5.1. Dijagram odnosa koncentracije serotonina i dobi ispitanika

Izračun korelacije između koncentracije trombocitnog serotonina i dobi napravljen je i odvojeno u skupinama. Dokazano je da nema korelacije između ovih dvaju varijabli u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem ($r = -0,006$, $P = 0,953$), kao ni u skupini zdravih ispitanika ($r = -0,097$, $P = 0,417$).



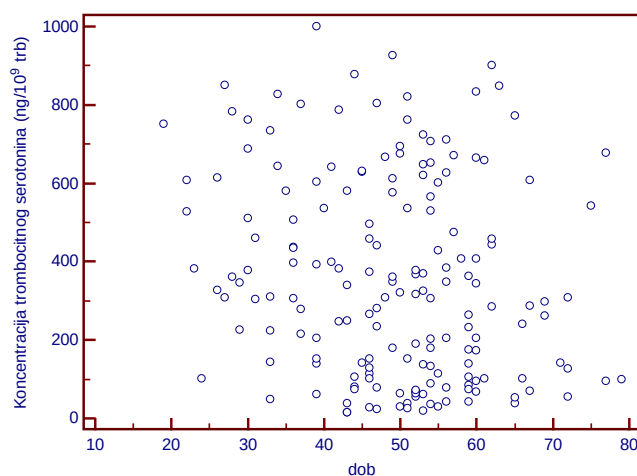
Slika 4.5.2. Dijagrami odnosa koncentracije serotonina i dobi u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

Koncentracija trombocitnog serotonina izračunava se matematički iz koncentracije serotonina u PRP. Pretpostavili smo da će između koncentracije

trombocitnog serotonina i dobi također biti slaba korelacija.

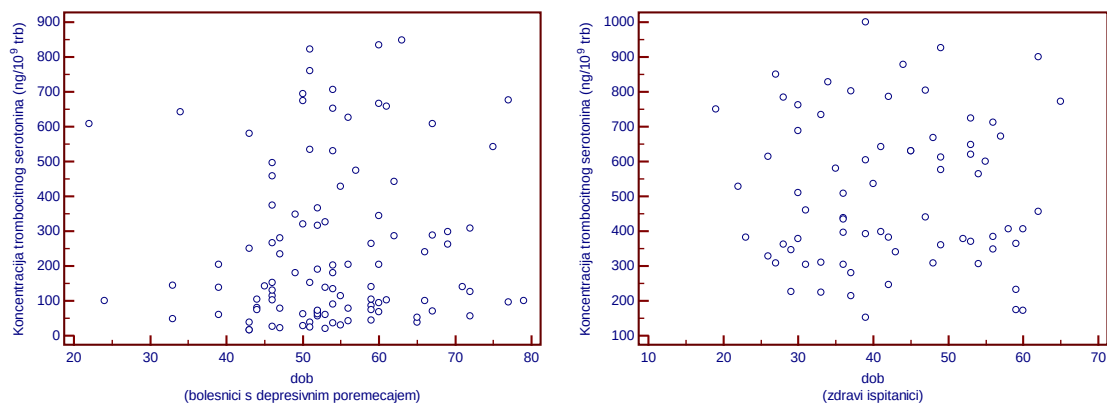
4.2.2. Povezanost koncentracije trombocitnog serotonina i dobi ispitanika

Izračun korelacije napravljen je da bi se utvrdilo postoji li povezanost između dobi ispitanika i koncentracije trombocitnog serotonina. Test pokazuje da nema značajne povezanosti između ovih dvaju varijabli ($r = -0,1982$, $P = 0,0080$), prema tome koncentracija trombocitnog serotonina ne ovisi o dobi ispitanika.



Slika 4.6.1. Dijagram odnosa koncentracije trombocitnog serotonina i dobi ispitanika

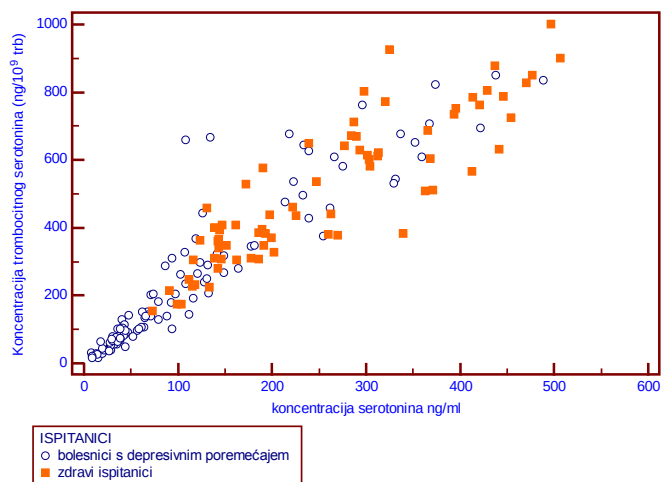
Izračun korelacije između koncentracije trombocitnog serotonina i dobi napravljen je i odvojeno u skupinama. Dokazano je da nema korelacije između ovih dvaju varijabli u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem ($r = 0,06672$, $P = 0,4989$), kao ni u skupini zdravih ispitanika ($r = 0,001380$, $P = 0,9908$).



Slika 4.6.2. Dijagrami odnosa koncentracije trombocitnog serotonina i dobi u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

4.2.3. Povezanost koncentracije serotonina u PRP i koncentracije trombocitnog serotonina

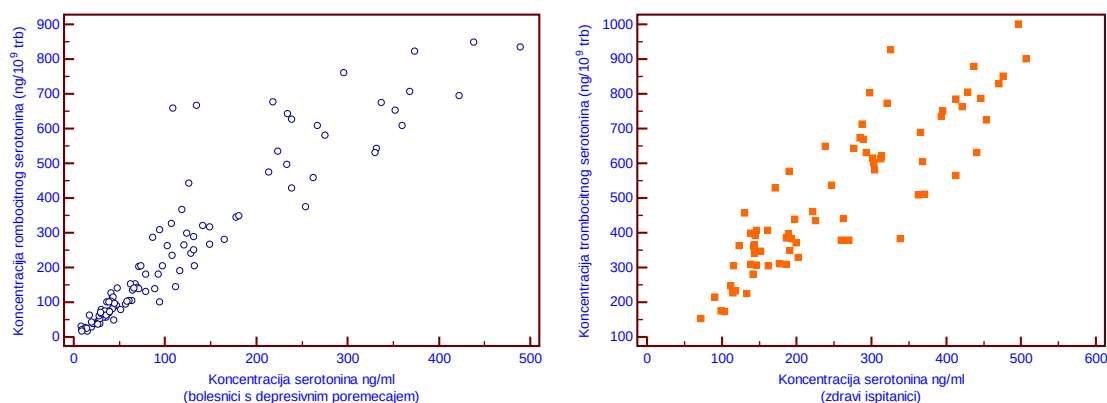
Statistička analiza korelacije napravljena je da bi se utvrdilo postoji li zavisnost između koncentracije serotonina i koncentracije trombocitnog serotonina. Test pokazuje da postoji značajna korelacija između ovih dviju varijabli ($r=0,9309$, $P<0,0001$), što dodatno potvrđuje i činjenica da se jedna varijabla izračunava iz druge.



Slika 4.7.1. Dijagram odnosa koncentracije serotonina u PRP i koncentracija trombocitnog serotonina u ispitanika

Test je primijenjen i na skupine ispitanika pojedinačno. Utvrđeno je da postoji

značajna korelacija između koncentracije serotonina u PRP i koncentracije trombocitnog serotonina kod bolesnika s depresivnim poremećajem ($r=0,929$, $P<0,0001$), kao i kod zdravih ispitanika ($r=0,880$, $P<0,0001$)

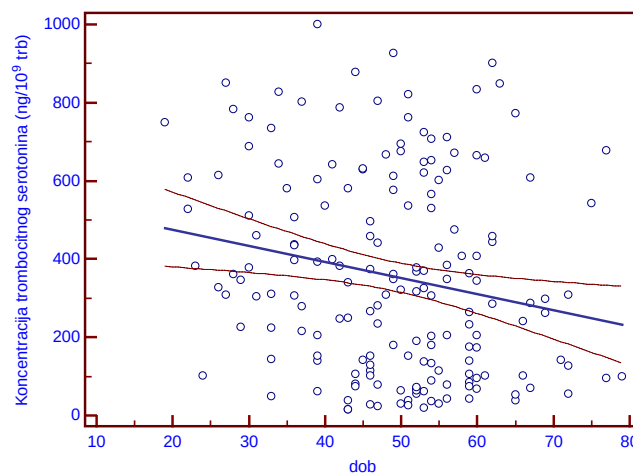


Slika 4.7.2. Dijagrami odnosa koncentracije serotonina u PRP i koncentracije trombocitnog serotonina u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

4.2.4. Linearna regresija koncentracije trombocitnog serotonina i dobi

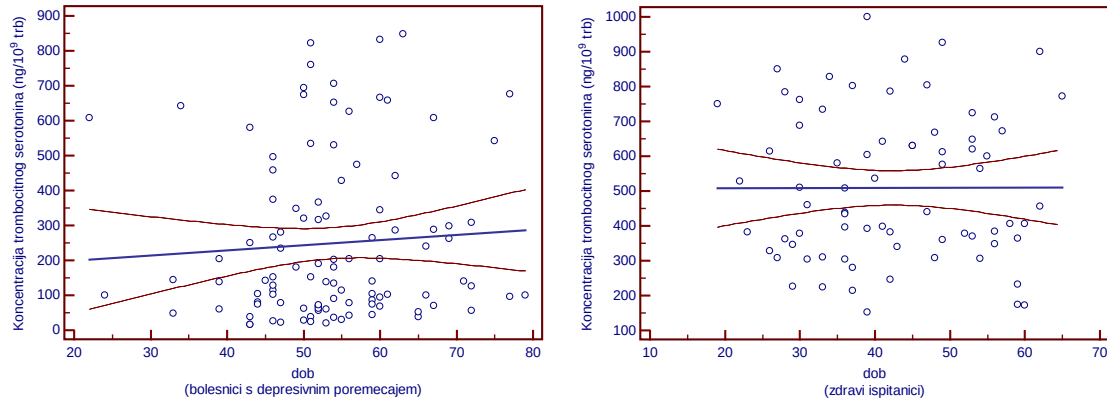
Utjecaj dobi na koncentraciju trombocitnog serotonina utvrđen je izradom linearne regresije. Kao ovisna varijabla uzeta je koncentracija trombocitnog serotonina, a kao prediktorska varijabla, dob ispitanika.

Rezultat testa je pravac $y = 557,8669 - 4,1273 x$. Koeficijent determinacije $R^2=0,0393$ pokazuje kako navedeni model linearne regresije može objasniti svega 3,9% uzoraka. Podatak o statističkoj značajnosti od $P=0,008$ ne doprinosi povezanosti dobi i koncentracije trombocitnog serotonina.



Slika 4.8.1. Linearna regresija koncentracije serotonina u PRP i dobi

Linearna regresija napravljena je i pojedinačno za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem i za skupinu zdravih ispitanika. U ovim slučajevima R^2 vrijednost blizu 0 što znači da pravac ne može opisati raspršene točke koje ne povezuju koncentraciju trombocitnog serotonina i životnu dob.



Slika 4.8.2. Dijagram linearne regresije koncentracije serotonina i dobi u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

Linearna regresijska analiza u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem.

Koeficijent determinacije $R^2 = 0,004452$, $P = 0,499$

$$y = 170,4630 + 1,4632 x$$

Linearna regresijska analiza u skupini zdravih ispitanika

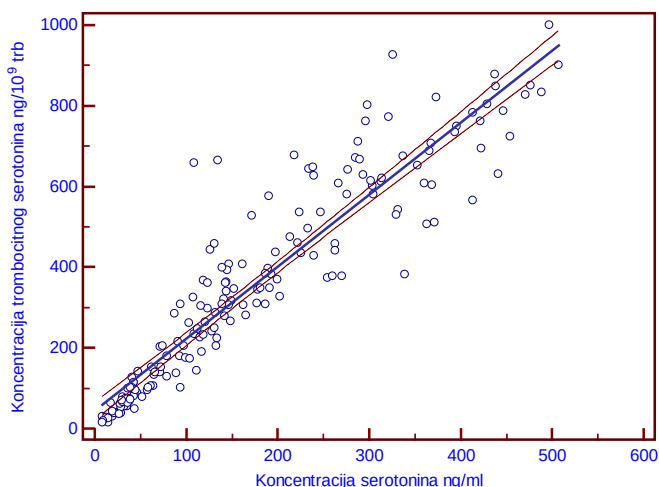
Koeficijent determinacije $R^2 = 0,000001904$, $P = 0,991$

$$y = 507,8238 + 0,02499 x$$

4.2.5. Linearna regresija koncentracije trombocitnog serotonina i koncentracije serotonina u PRP

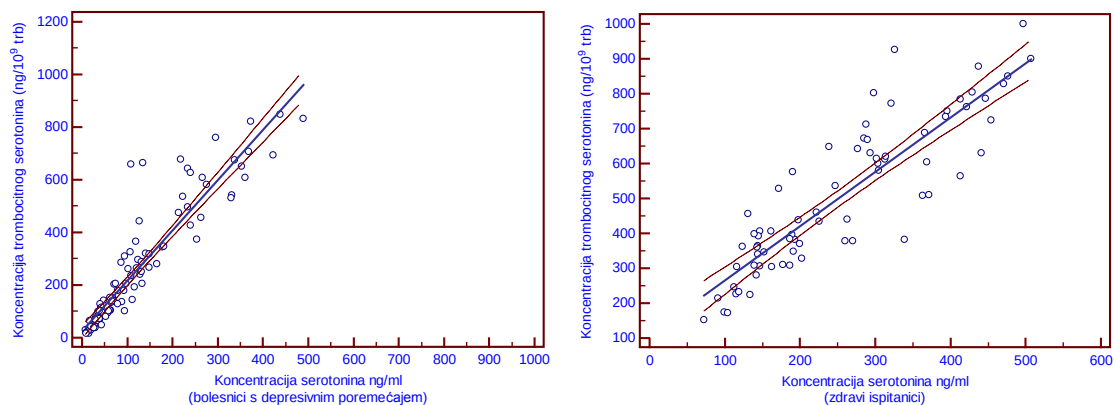
Utjecaj koncentracije serotonina na koncentraciju trombocitnog serotonina utvrđen je izradom linearne regresije. Kao ovisna varijabla uzeta je koncentraciju trombocitnog serotonina u PRP, a kao prediktorska varijabla, koncentracija serotonina.

Rezultat testa je pravac $y = 43,8563 + 1,7869 x$. Koeficijent determinacije ukazuje da dobiveni pravac dobro opisuje točke na grafu ($R^2=0,8666$, $P<0,001$). Zaključujemo da su prediktorska i ovisna varijabla međusobno povezane. Ako mijenjamo vrijednosti prediktorske varijable možemo pretpostaviti trend promjene vrijednosti ovisne varijable.



Slika 4.9.1. Dijagram linearne regresije koncentracije trombocitnog serotonina i koncentracije serotonina u PRP

Analiza linearne regresije provedena je i pojedinačno za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem i za skupinu zdravih ispitanika. Test je također pokazao kako dobiveni pravci dobro opisuju točke na grafu. Pokazala se značajna povezanost između prediktorske i ovisne varijable.



Slika 4.9.2. Dijagram linearne regresije koncentracije trombocitnog serotonina i koncentracije serotonina u PRP u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i u skupini zdravih ispitanika

Linearna regresijska analiza koncentracije trombocitnog serotonina i koncentracije serotonina u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem.

$$R^2=0,8638, P<0,001$$

$$y = 24,2789 + 1,9137 x$$

Linearna regresijska analiza koncentracije trombocitnog serotonina i koncentracije serotonina u skupini zdravih ispitanika.

$$R^2=0,7750, P<0,001$$

$$y = 109,1695 + 1,5586 x$$

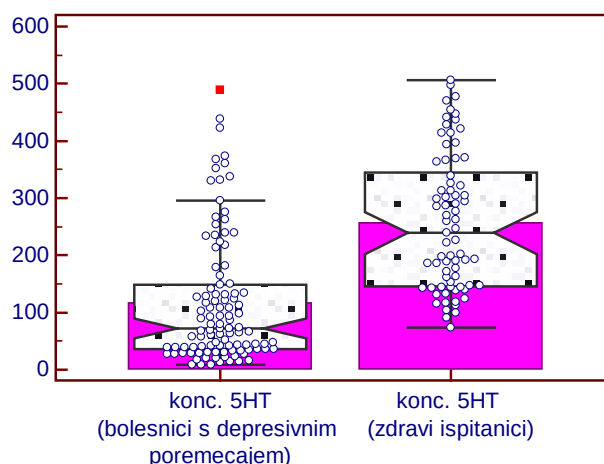
4.3. USPOREDBA KONC. 5HT IZMEĐU ZDRAVIH ISPITANIKA I BOLESNIKA S DEPRESIVNIM POREMEĆAJEM

4.3.1. Usporedba koncentracije serotonina u PRP među skupinama

Mann-Whitneyev test primijenjen je da bi se usporedile koncentracije serotonina u PRP između skupina ispitanika. Ovaj test je primijenjen jer u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem koncentracije trombocitnog serotonina nije rapodijeljena prema normalnoj razdiobi.

Testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između koncentracije serotonina u PRP u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i one u

zdravih ispitanika ($P < 0,0001$).

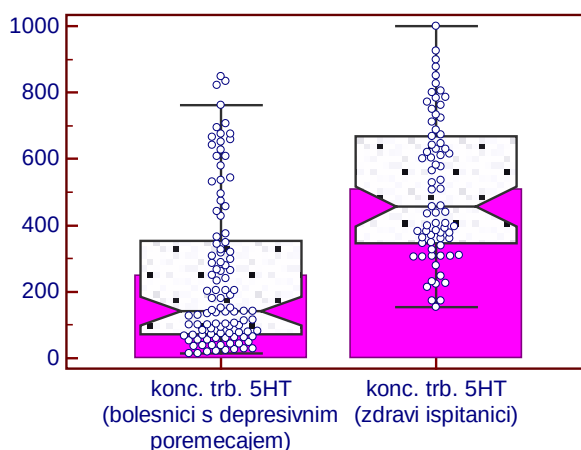


Slika 4.10.1. Graf usporedbe koncentracije serotonina među skupinama

Testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između koncentracije serotonina u PRP u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i one u zdravih ispitanika ($P < 0,0001$).

4.3.2. Usporedba koncentracije trombocitnog serotonina među skupinama

Mann-Whitneyev test primijenjen je da bi se usporedile koncentracije trombocitnog serotonina između skupina ispitanika. Ovaj test je primjenjen jer u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem koncentracije trombocitnog serotonina nije raspodijeljena prema normalnoj razdiobi.



Slika 4.11.1. Graf usporedbe koncentracije trombocitnog serotonina među skupinama
Testom je utvrđeno da postoji statistički značajna razlika između koncentracije trombocitnog serotonina u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem i one u zdravih ispitanika ($P < 0,0001$).

5. RASPRAVA

U uvodnom dijelu opisana je fiziologija serotonina u organizmu. Kao što je prije navedeno serotoninski sustav postoji u dvama odvojenim odjelcima u organizmu: središnjem živčanom sustavu i na periferiji (trombociti, enterokromafine stanice i sl.). Istraživanja su pokazala da postoje značajne fiziološke i farmakološke podudarnosti između trombocitnih i sinaptičkih elemenata serotoninskog sustava (Pletcher, 1991; Wirz-Justice, 1988).

Ova saznanja omogućuju korištenje trombocitnog modela u neurobiologiji. Na temelju istraživanja trombocitnog serotoninskog sustava izvode se zaključci o serotoninskom sustavu SŽS-u.

Ovaj rad usmjeren je na ispitivanje trombocitnog serotoninskog sustava. Koncentracija serotonina u krvi određivana je ELISA metodom, a zatim je koncentracija trombocitnog serotonina izračunata iz dobivenih podataka. Koncentracija trombocitnog serotonina izražena je u $\text{ng}/10^9$ trombocita.

Napravljena su statistička ispitivanja između skupina bolesnika s depresivnim poremećajem i zdravih ispitanika. Ispitano je o kakvoj se razdiobi radi unutar skupina ovisno o ispitivanom parametru, te zavisnost trombocitnog serotonina o dobi, spolu i koncentraciji serotonina u krvi.

Zavisnost koncentracije trombocitnog serotonina o životnoj dobi ispitivana je u više istraživanja. U nekim radovima navodi se razlika u koncentraciji trombocitnog serotonina, točnije smanjenje koncentracije trombocitnog serotonina s porastom životne dobi (Flachaire i sur, 1990; Guicheny, 1988). U drugim radovima nije potvrđen značajniji utjecaj dobi (Le Quan-Bui i sur, 1984). Rezultati ovog istraživanja također ukazuju da nema zavisnosti između koncentracije trombocitnog serotonina i dobi. Štoviše, nije statistički opravdano provesti analizu linearne regresije na modelu koji nema korelacije. Međutim, potrebno je uzeti u obzir da u ovom istraživanju ispitanici nisu svrstani u dobne

skupine čime bi bio obuhvaćen široki raspon starosne dobi..

Literaturni podaci o zavisnosti koncentracije trombocitnog serotonina o spolu se razilaze. Prema nekim istraživanjima tendenciju prema višim vrijednostima imaju žene (Ashcroft i sur, 1964; Wirz-Justice i sur, 1977), dok prema drugim istraživanjima nema zavisnosti između koncentracije trombocitnog serotonina i spola (Badcock i sur, 1987; Flachaire i sur, 1990). Rezultati ovog rada također pokazuju kako nema statistički značajne zavisnosti između koncentracije trombocitnog serotonina i spola.

Usporedbom koncentracija trombocitnog serotonina u bolesnika s depresivnim poremećajem i onih u zdravih ispitanika utvrđeno je da postoji statistički jako značajna razlika među ovim dvjema skupinama. Koncentracija trombocitnog serotonina značajno je niža kod bolesnika s depresivnim poremećajem. Ovakvi rezultati se slažu s literaturnim navodima (Meltzer i sur, 1981; Nemeroff i sur, 1992).

Koncentracija trombocitnog serotonina uspoređivana je i s koncentracijom serotonina u PRP i dokazana je povezanost ovih dviju varijabli. Koncentracija trombocitnog serotonina izračunava se iz koncentracije serotonina i broja trombocita u PRP-u preko matematičke formule, pa je ovakav rezultat očekivan premda je broj trombocita također promjenjiva varijabla. Posredno možemo zaključiti da je odnos serotonina i broja trombocita proporcionalan i u zdravih i u bolesnih ispitanika.

Ovo istraživanje napravljeno je na skupini od 105 bolesnika s depresivnim poremećajem i 72 zdravih ispitanika. To je relativno mali broj ispitanika i zbog toga je važno napomenuti kako ovi rezultati, iako ukazuju na stanje serotoninskog sustava kod depresivnih bolesnika, ipak trebaju biti uzeti s rezervom. U daljnjim istraživanjima potrebno je uključiti veći broj ispitanika, te proširiti područje ispitivanja na ostale serotoninske parametre kako bi se stekao što bolji uvid u funkcioniranje serotoninskog sustava kod bolesnika s depresivnim poremećajem.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedene analize, dobivenih rezultata i rasprave moguće je zaključiti:

1. Koncentracija trombocitnog serotonina u bolesnika s depresivnim poremećajem statistički se značajno razlikuje od koncentracije trombocitnog serotonina kod zdravih ispitanika.
2. Koncentracija trombocitnog serotonina smanjena je kod bolesnika s depresivnim poremećajem, što je još jedan dokaz uloge deficijencije serotoninergičkog sustava u razvoju depresije.
3. Izražavanje koncentracije serotonina u ng/ml ili ng/broj trombocita $\times 10^9$ po našim istraživanju jednakovrijedan je podatak budući da smo kod svih ispitanika našli značajnu povezanost ovih dviju vrijednosti.

7. LITERATURA

1. Arora RC, Kregel L, Meltzer HY. Seasonal variation of serotonin reuptake in normal controls and depressed patients. *Biol Psychiat* 1984; 19: 795-804
2. Ashcroft GW, Crawford TBB. Estimation of 5-hydroxytryptamine in human blood. *Clin Chem Acta* 1964; 9: 364-9
3. Badcock NR, Spence JG, Stem LM. Blood serotonin level in adults, autistic and non-autistic children with comparison of different methodologies. *Annals Clin Biochem* 1987; 24: 625-34
4. Benedetti MS, Dostert P. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. U: Testa B, ured. *Advances in Drug Research*. London: Academic Press, 1992; 65
5. Berger M, Gray JA, Roth BL (2009). "The expanded biology of serotonin". *Annu. Rev. Med.* 60: 355–66.
6. Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG. Platelets as model for neurons? *Experientia* 1988; 44: 115-26
7. De Clerck F. The role of serotonin in thrombogenesis. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8:40-9
8. Frazer A, Hensler JG. Serotonin. U: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. ured. *Basic Neurochemistry*, 5th ed. New York: Raven Press 1994; 283-308
9. Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin chem* 1990; 36: 2117-20
10. Fuller RW. Biochemical pharmacology of the serotonin system. *Adv Neurol* 1986; 43: 469-80
11. Guicheny P. Human platelet serotonin content: methodological aspects and physiological variations. *Meth Experim Clin Pharmac.* 1988;10:253-8
12. Hervig TA, Farstad M, Vollset SE. Endogenous serotonin in human blood

- platelets – factors that may influence reference values. *Platelets* 1996; 7: 47-52
13. Hirschfeld RM. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2000;61 Suppl 6:4–6
 14. Hotujac LJ i sur. *Psihijatrija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str.169-84
 15. Iny LJ, Pecknold J, Suranyi-Cadotte BE, Bernier B, Luthe L, Nair NPV. Studies of a neurochemical link between depression, anxiety, and stress from (3H) imipramine and (3H) paroxetine binding on human platelets. *Biol Psychiatry* 1994; 36: 281-91
 16. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev*. 1992 Jan;72(1)165-229
 17. Larsson M, Hagberg L, Norkrans G, Forsman A. Indole amine deficiency in blood and cerebrospinal fluid from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Neurosci Res* 1989; 23: 441-6
 18. Le Quan-Bui KH, Plaisant O, Leboyer M, Gay C, Kamal L et al. Reduced platelet serotonin level in depression. *Psych Research* 1984; 13: 129-39
 19. Martin F, Rozas G, Miguez J, Aldegunde M. Plasma serotonin: factors affecting its level. *Biogenic Amines* 1990; 7: 57-62
 20. Meltzer H, Arora R, Baber R, Tricou B. Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38: 1322-9
 21. Nemeroff CB. The presynaptic serotonin uptake site in depression. *Clin Neuropharmacol* 1992; 15: 347-8
 22. Ortiz J, Artigas F, Gelpi E. Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 1988; 43: 983-90
 23. Pletscher A. The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int J Cardiol*. 1987 Feb;14(2):177-88.
 24. Pletcher A. Platelets as peripheral models for neuropsychiatry: A brief review. *Biol Psychiatry* 1991; 2: 354-6
 25. Radna uputa RU 5.3-81-9/1, Rukovanje hematološkim analizatorom Beckman-Coulter LH750, Klinički zavod za kemiju, Klinička bolnica Sestre milosrdnice

26. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb: Golden marketing - Tehnička knjiga; 2006. str. 535-49
27. Rao ML, Gross G, Strebek B, Halaris A, Huber G et al. Circadian rhythm of tryptophan, serotonin, melatonin and pituitary hormones in schizophrenia. Biol Psychiatry 1994; 35: 151-63
28. Ronald F. Borne PhD. Serotonin: the Neurotransmitter for the 90's. Drug topics 1994;108.
29. Rudnick G, Clarck J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. Biochem Biophys Acta 1993; 1144: 249-63
30. Stanley M, Virgillio J, Gershon D. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. Science 1982; 216: 1337-9
31. Uputstvo za upotrebu, DRG® Serotonin ELISA (EIA-3947), REVISED 23 MAR. 2009 (VERS. 6.0)
32. Wirz-Justice A. Platelet research in psychiatry. Experientia 1988; 44: 145-52
33. Wirz-Justice A. Lichtsteiner M. Feer H. Diurnal and seasonal variations in human platelet serotonin in man. Jneur Transm 1977; 41: 7-15
34. White JG. The dense bodies of human platelets. U: Meyers KM, Barnes CD, ured. The Platelet Amine Storage Granule. Boca Ration: CRC Press. 1992; 1-29
35. <http://www.nilalienum.it/Sezioni/Aggiornamenti/Psicopatologia%20dinamica/Psicopatologia%20dinamica/BiochDep.html>, pristupljeno 02.12.2010.
36. <http://www.shockmd.com/2008/05/16/how-can-genes-and-stress-cause-depression/>, pristupljeno 02.12.2010.
37. <http://herkules.oulu.fi/isbn9514267672/html/i43346.html>, pristupljeno 02.12.2010.
38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28150/>, pristupljeno 02.12.2010.
39. http://www.beckmancoulter.com/products/instrument/hematology/lh750_analyzer.asp, pristupljeno 01.02.2011.

8. Sažetak

Trombociti sadrže visoku koncentraciju serotonina (5HT) koji inicira njihovu aktivaciju. Serotoninski sustav trombocita identičan je onome u serotonergičnim neuronima. Poremećaji u serotonergičnim neuronima povezuju se s etiopatogenezom različitih psihijatrijskih bolesti među kojima je i veliki depresivni poremećaj. Za istraživanja se koristi trombocitni serotoninski sustav. Prema monoaminskoj teoriji deficijencija serotoninergičkog sustava ima, uz noradrenergički sustav, važnu ulogu u razvoju depresije.

Cilj je istraživanja bio procijeniti u kojoj mjeri je trombocitni serotonin promijenjen u skupini bolesnika s velikim depresivnim poremećajem u odnosu na skupinu zdravih ispitanika. Uz to, cilj je bio utvrditi način izražavanja koncentracije serotonina u lizatu trombocita. Koncentracija je mjerena imunokemijsko metodom.

Rezultati su pokazali statistički vrlo značajno snižene vrijednosti serotonina u bolesnika. Analitički je pak pristup potvrdio jednakovrijedan način izražavanja koncentracije serotonina po volumenu lizata kao i po broju trombocita.

Ključne riječi: trombociti; serotonin; depresivni poremećaj

9. Summary

Serotonin system and platelets with high serotonin level (5HT) have the pivotal role in platelet activation. For researchers, it is important that the platelet serotonin system is almost identical to serotonin system in serotonergic neurons. Disorder of the serotonin system in serotonergic neurons has been associated with etiopathogenesis of various mental diseases as major depressive disorders. Platelet serotonin system has been used as a study model.

The aim of this study was to assess the extent to which the altered platelet serotonin in patients with major depressive disorder in relation to a group of healthy subjects. The goal was to establish a way of expressing the concentration of serotonin in platelets lysate. Concentration is measured by the immunochemical method.

The results showed a statistically significantly decreased levels of serotonin in patients. The analytical approach is in turn confirmed the equivalent way of expressing serotonin concentration by lysate volume and by the number of platelets.

Key words: platelets; serotonin; depressive disorder