



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Biserka Getaldić-Švarc

POVEZANOST SVOJSTAVA TROMBOCITA I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA

Doktorski rad

Zagreb, 2011.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Biserka Getaldić-Švarc

**THE RELATIONSHIP BETWEEN
PLATELET PARAMETERS
AND PLATELET SEROTONIN LEVEL**

Doctoral thesis

Zagreb, 2011.



Sveučilište u Zagrebu
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Biserka Getaldić-Švarc

POVEZANOST SVOJSTAVA TROMBOCITA I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA

Doktorski rad

Mentori:

doc. dr. Nada Vrkić
doc. dr. Dalibor Karlović

Zagreb, 2011.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Biserka Getaldić-Švarc

THE RELATIONSHIP BETWEEN PLATELET PARAMETERS AND PLATELET SEROTONIN LEVEL

Doktorski rad

Mentori:

Assistant professor Nada Vrkić, PhD

Assistant professor Dalibor Karlović, MD, PhD

Zagreb, 2011.

Doktorski rad izrađen je u Kliničkom zavodu za kemiju
i Klinici za psihijatriju KBC »Sestre milosrdnice« Zagreb,
u suradnji s Hrvatskim zavodom za transfuzijsku medicinu Zagreb
i Odjelom za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek.

Ova istraživanje financijski je potomognuto sredstvima
Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa RH u okviru projekata:
134-0000000-3372 i 134-0061245-0205

*Zahvaljujem svojim mentorima,
doc.dr. Nadi Vrkić i doc.dr. Daliboru Karloviću
čiji su mi poticaj, stručnost i strpljenje bili dragocjeni
u izradi ovog doktorskog rada.*

*Zahvaljujem svim ispitanicima bez kojih ovo istraživanje
ne bi bilo moguće provesti.*

*Posebnu zahvalu za istinsku kolegijalnost upućujem
kolegi doc.dr. Željku Debeljaku s
Odjela za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek*

*Zahvaljujem svojim mladim kolegicama
Ivani Čelap, Aniti Klasić i Nikolini Puc na
pomoći i potpori u radu.*

Ovaj rad posvećujem mojim sinovima Ilku i Ivanu

SADRŽAJ

1. UVOD	4
1.1. Trombocitopoeza	6
1.2. Razvoj megakariocita i formiranje trombocita (ontogeneza trombocita)	9
1.3. Trombociti	11
1.3.1. Morfologija trombocita.	11
1.3.2. Membranski sustav	12
1.3.3. Strukturna zona	12
1.3.4. Periferna regija	13
1.3.5. Organele	13
1.3.6. Granule.	14
1.3.6.1. α -granule.	14
1.3.6.2. Guste granule	14
1.4. Morfološki trombocitni pokazatelji	15
1.4.1. Prosječni volumen trombocita – MPV (engl. mean platelet width)	15
1.4.2. Raspodjela trombocita po volumenu – PDW (engl. platelet distribution width)	17
1.4.3. Retikulirani trombociti (engl. reticulated platelets)	20
1.5. Osnove fiziologije serotonina u organizmu sisavaca	21
1.5.1. Serotoninski sustav u trombocitima.	24
1.5.2. Transport serotonina – serotoninski transporter	24
1.5.2.1. Struktura i način djelovanja serotoninskog transportera	25
1.5.3. Pohrana serotonina u trombocitima	26
1.5.4. Trombocitni serotoninski transporter	27
1.5.5. Serotonin i funkcionalni trombocitni odgovor – aktivacija i agregacija.	27
1.6. Metodologija analiziranja aktiviranih trombocita	28
1.7. Poremećaji raspoloženja	29
1.7.1. Potrebe za biološkim pokazateljima u poremećajima raspoloženja	30
1.7.2. Koncentracija trombocitnog serotonina u poremećajima raspoloženja	33

2.	CILJ I HIPOTEZE RADA.	35
3.	MATERIJAL I METODE	36
3.1.	Ispitanici	36
3.1.1.	Zdrave osobe	36
3.1.2.	Bolesnici	36
3.2.	Uzorci krvi.	37
3.2.1.	Uzorkovanje	37
3.2.2.	Skladištenje uzoraka	37
3.3.	Određivanje broja trombocita, MPV-a i PDW-a.	37
3.3.1.	Određivanje Pct (<i>engl. plateletcrit</i>) – trombokrita.	38
3.3.2.	Određivanje PDW-a (<i>engl. platelet distribution width</i>) – raspodjela trombocita po volumenu	38
3.4.	Određivanje udjela retikuliranih trombocita (rPI)	39
3.5.	Priprema suspenzije trombocita za određivanje koncentracije serotonina	39
3.5.1.	Priprema plazme bogate trombocitima (PRP)	39
3.5.2.	Postupak suspendiranja trombocita	40
3.6.	Određivanje koncentracije serotonina u trombocitima enzimimunoanalizom (ELISA <i>engl. enzyme-labelled immunosorbent assay</i>)	40
3.6.1.	Izračunavanje koncentracije serotonina u trombocitima	41
3.7.	Postupak kratke evaluacije analitičkog sustava i metode ELISA	41
3.8.	Statistička obrada podataka	42
4.	REZULTATI	44
4.1.	Postupak kratke evauacije ELISA metode	44
4.1.1.	Mjerna preciznost.	44
4.1.2.	Netočnost	45
4.1.3.	Referentni interval	45
4.1.4.	Usporedivost metode	47
4.2.	Uspredba trombocitnih pokazatelja između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem.	48
4.3.	Usporedba koncentracije serotonina u krvi i trombocitima između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem.	49
4.4.	Usporedba trombocitnih pokazatelja između pune krvi i PRP-a	51
4.5.	Usporedba koncentracije serotonina i trombocitnog serotonina te trombocitnih parametara MPV, PDV i Pct po spolu	52
4.6.	Povezanost dobi s koncentracijom serotonina u trombocitima	53

4.7.	Povezanost svih trombocitnih pokazatelja i količine serotonina u trombocitima . . .	55
4.8.	Povezanost količine serotonina u trombocitima s brojem trombocita.	57
4.9.	Povezanost količine serotonina u trombocitima s veličinom trombocita – MPV . . .	59
4.10.	Povezanost količine serotonina u trombocitima s količinom serotonina u PRP-u	61
4.11.	Povezanost količine serotonina u trombocitima s veličinom trombocita iskazanom kroz MPV u PRP-u	63
4.12.	Povezanost koncentracije serotonina s većim i manjim trombocitima	64
4.13.	Ispitivanje povezanosti koncentracije serotonina u trombocitima i koncentracije serotonina u krvi	65
4.14.	Ispitivanje dijagnostičke točnosti koncentracije serotonina u trombocitima. . . .	68
5.	RASPRAVA.	70
5.1.	Metodologija pripreme PRP-a i lizata trombocita.	71
5.2.	Metodologija određivanja serotonina	72
5.3.	Poslijeanalitički faktori u određivanju količine serotonina u trombocitima	74
5.4.	Distribucija učestalosti individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima	75
5.4.1.	Zdravi ispitanici.	75
5.4.2.	Bolesnici s depresivnim poremećajem	76
5.5.	Utjecaj životne dobi na koncentraciju serotonina u trombocitima	77
5.6.	Utjecaj spola na koncentraciju serotonina u trombocitima	78
5.7.	Utjecaj trombocitnih pokazatelja na koncentraciju serotonina	78
5.7.1.	Povezanost broja trombocita u cirkulaciji i količine serotonina u trombocitima	79
5.7.2.	Povezanost veličine trombocita i količine serotonina u trombocitima	79
5.7.3.	Povezanost polimorfizma trombocita i količine serotonina u trombocitima	81
5.8.	Dijagnostička točnost određivanja koncentracije serotonina u trombocitima	81
6.	ZAKLJUČCI	84
7.	SAŽETAK	85
8.	SUMMARY	86
9.	POPIS KRATICA	87
10.	LITERATURA	88

11. ŽIVOTOPIS	102
12 TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.	104
13. BASIC DOCUMENTATION CARD	105

1. UVOD

Usprkos velikom broju znanstvenih spoznaja o trombocitima koje su znanstvenici stekli u proteklom stoljeću, pripisujući si time primat u otkrićima kako trombocitne morfologije tako i funkcije, ostaje neupitna činjenica da su rezultati istraživanja Giulia Bizzozzera iz 1881. i 1882. godine postavili temeljne spoznaje o trombocitima koje su se tijekom vremena potvrđivale. Svojim otkrićem trombocita kao treće populacije krvnih stanica koje su dotada nazivane krvnom prašinom, ovaj genijalni talijanski patolog opravdano se naziva pioninom stanične biologije (Mazzarello, Calligaro, Calligaro, 2001). Proučavajući intravitalno mikroskopski animalne vene otkrio je diskoidni oblik trombocita u cirkulaciji te proces adhezije nakon ozljede krvne žile i agregacije te je tako prvi definirao trombocite kao središnje stanice sustava zgrušavanja (Ribatti, Crivellato, 2007). Prije otkrića trombocita Bizzozero je prvi koji je identificirao i vrlo detaljno opisao megakariocite u koštanoj srži, iako ih nije definirao kao trombocitne prethodnike, te je tako postavio temelje spoznaja o hematopoezi. Megakariocite je tek Wright 1906. godine, koristeći se novom metodom polikromnog bojenja stanica, potvrdio kao stvaralačke stanice trombocita.

Megakariocitopeza koja kao krajnji stadij proliferacije ima zrele megakariocite koji nemaju daljnju sposobnost proliferacije za razliku od ostalih progenitorskih krvnih stanica, ali imaju povećanu sintezu DNK te sposobnost da iz jedne stanice stvore dvije do tri tisuće trombocita, i dalje je predmet istraživanja (Kosaki, 2005). Od Wrightove hipoteze o nastanku trombocita fragmentiranjem citoplazme megakariocita do klasične »protrombocitne teorije« koju su postavili Becker i De Bruyn 1976. godine rezultati niza daljnjih istraživanja potvrdili su da je upravo taj model najvjerojatniji mehanizam trombocitne biogeneze. Mogućnost točnog određivanja udjela protrombocita u cirkulirajućim trombocitima metodom protočne citometrije istovremeno je potvrda protrombocitne teorije, kao i klinički izuzetno važan indirektni pokazatelj aktivnosti trombotičke (Briggs, Kunka, Hart, Oguni, Machin, 2004).

Fascinantna brzina aktiviranja trombocita koji u nekoliko stotinki milisekunde mijenjaju oblik, a koja im omogućava da ispunjavaju svoju biološku funkciju kroz adheziju na druge stanice, istovremeno je ogromna, trajno prisutna prepreka u kvantitativnim i kvalitativnim istraživanjima trombocita *in vitro*. Precizna i točna metoda brojenja trombocita postignuta je tek uvođenjem impedancijske i optičke metode određivanja čestica manjih od 10 fL, koja se razvila kroz tehnologije suvremenih hematoloških analizatora (Coulter, 1951). Kako su to istovremeno i volume-

trijске metode, postaje dijagnostički moguće točno i precizno odrediti i srednji volumen trombocita koji je pokazatelj njihove starosti i vjerojatno većega trombotičkog potencijala (Martin, 1991). Mjerenja stupnja heterogenosti trombocita u cirkulaciji – kao odstupanje od srednjeg volumena, – od posebnog su interesa u istraživanjima aterosklerotskih promjena te kao pozitivnoga prediktivnog biljega aktivacije trombocita i razvoja akutnoga koronarnog sindroma (Vagdatli, Gounari, Lazaridou, Katsibourlia, Tsikopoulou, Labrianou, 2010).

Osim srednjeg volumena trombocita, pokazatelj starosti cirkulirajućih trombocita je i koncentracija 5-hidroksi-triptamina – serotonina. Serotonin je glavna sastavnica trombocitnih gustih granula te se u njima nalazi najveća koncentracija serotonina u organizmu, što je potvrđeno imunohistokemijskim metodama (Sixma i sur., 1998). Trombocitni serotonin postaje predmetom intenzivnog istraživanja ne kao pokazatelj starosti trombocita, pa čak ni kao regulator njegove koncentracije u cirkulaciji u funkciji snažnoga perifernog vazokonstriktora, već kao periferni model istraživanja njegove funkcije neuroprijenosnika. Temelj za brojna istraživanja bile su početne spoznaje od prije 40 godina o postojanju sličnosti serotonergičnih struktura u trombocitu i neuronu (Pletcher, 1968.). Sva ostala *in vitro* istraživanja funkcionalne aktivnosti trombocita i temeljnih biokemijskih procesa kao njihovog preduvjeta temelje se na definiranom načinu izoliranja trombocita u kojem je zaustavljena njihova aktivacija, a koji je postavio Born 1962. godine. Koncentracije trombocitnog serotonina u istraživanjima određivane su raznim metodologijama tako da je bilo neizbježno postaviti bitne standarde u postupcima određivanja radi usporedivosti rezultata istraživanja, kao i raspone vrijednosti u zdravih osoba (Jernej, 2000.). Na pitanja kolike su sličnosti centralnih i perifernih serotoninskih pokazatelja, odgovori se nalaze u izuzetnom velikom broju radova u kojima se povezuje razina trombocitnog serotonina i serotonina u središnjem živčanom sustavu (SŽS) (Strüder i Weicker, 2001.). Ovaj trajni znanstveni interes za trombocitni serotonin zasigurno proizlazi i iz potrebe za biokemijskim pokazateljima u poremećajima raspoloženja. Psihijatrijski poremećaji i dalje temelje dijagnostičku i statističku klasifikaciju na kliničkim pokazateljima zbog čije varijabilnosti kod više od trećine bolesnika prođe prosječno deset godina do postavljanja ispravne dijagnoze (Lish i sur, 1994.). Rezultati većine studija na bolesnicima s velikim depresivnim poremećajem pokazuju snižene koncentracije trombocitnog serotonina, a otkrića o serotoninskom trombocitnom transporteru, kojega su započeli proučavati Born i sur. 1975. godine, dala su osnovu za napredak u liječenju temeljen na selektivnoj inhibiciji transporta serotonina u neuronima, ali posljedično i u trombocite (Hindmarch, 2001.).

S obzirom da dijagnostika i praćenje učinkovitosti terapije predstavljaju osnove medicinske biokemije i/ili laboratorijske medicine, istraživanje kliničke značajnosti određivanja koncentracije serotonina u trombocitima koje nazivaju »virtualni neurokemijski čuvari« te povezanosti s njihovim pokazateljima jest znanstveno opravdan cilj i ovog istraživanja.

1.1. Trombocitopoeza

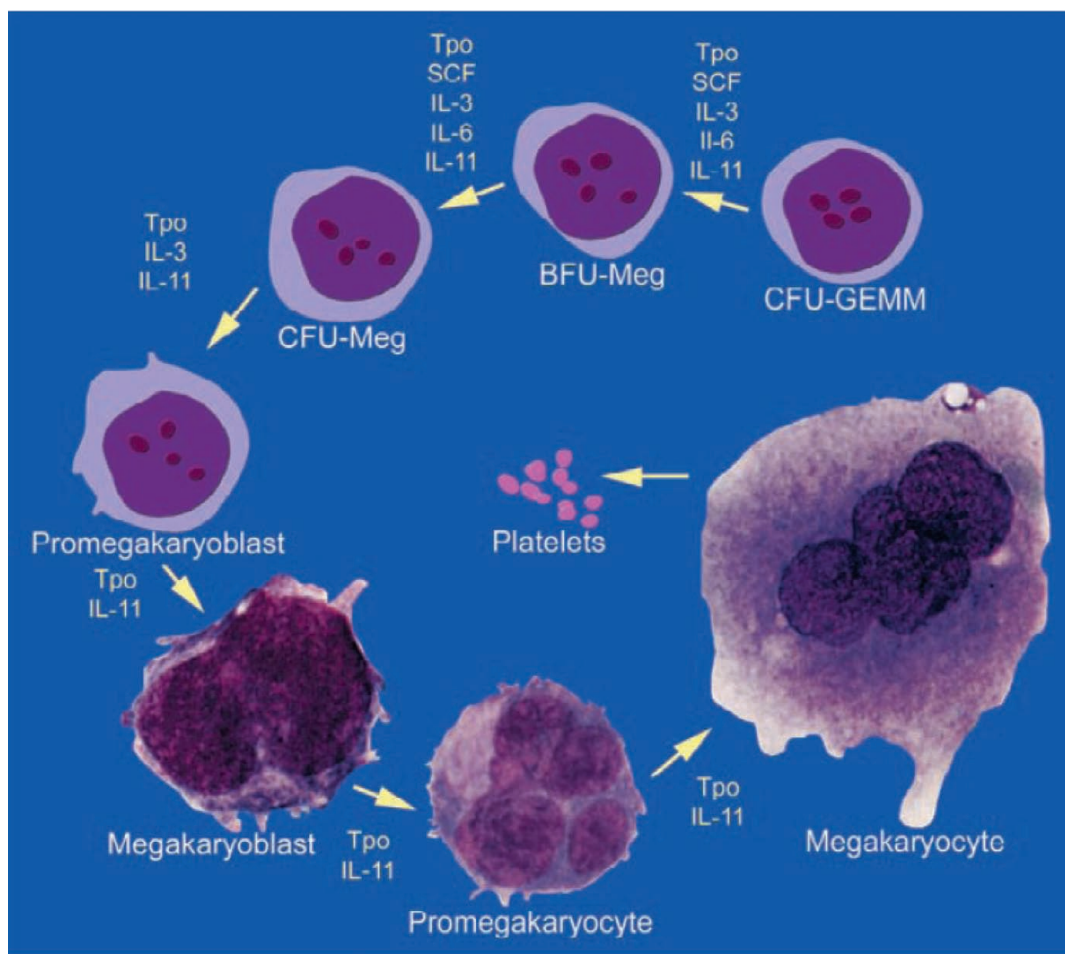
U proteklih sto godina od prvih spoznaja o trombocitima istraživanja su usmjerena na pokušaj odgovora na nekoliko temeljnih pitanja vezanih za njihovu ontogenezu, mehanizam ulaska u cirkulaciju, pričuvenu u slezeni, te proces aktivacije.

Evolucijski razvoj stanica koje svoju osnovnu biološku funkciju ispunjavaju u zgrušavanju krvi dosegnut je u sisavaca kod kojih osnovna stanica sustava zgrušavanja nema jezgru i naziva se pločica (engl. *platelet*) za razliku od ostalih, životinjskih vrsta u kojima je stanica sačuvala jezgru, višeznačnu funkciju i naziva se trombocit (Gregorie i sur., 1975.).

Usprkos tim saznanjima proces u kojem iz jedine poliploidne hematopoetske stanice – megakariocita, – nastaju najmanje i najbrojnije krvne stanice – trombociti, – naziva se trombo-poeza.

Trombociti sisavaca nastaju iz megakariocita, jedine poliploidne stanice hematopoetske stanice koja je njihova jedinstvena kako prethodnička stanica, tako i oslobađajuća stanica.

Megakariociti nastaju reguliranim procesom megakariopoeze iz pluripotentne matične hematopoezne stanice koja je ishodišna stanica i čijom diferencijacijom nastaju nezrele prethodne stanice mijelopoeznog i limfopoeznog sustava. Matična hematopetska stanica, iako morfološki nedefinirana, podsjeća na mali ili srednji limfocit (Labar i sur., str. 7, 2007.). Na površini ishodišnih matičnih stanica prisutan je biljeg CD 34. Koštana srž sadrži oko 3–5% stanica CD 34+, što je znatno više od stvarnog broja matičnih stanica (oko 1 na 20 000 stanica koštane srži) pa se smatra da je ovaj biljeg samo posredni pokazatelj koji tek uz prisutnost receptora za faktor rasta matičnih stanica (SCF – engl. *stem cell factor*) može definirati matičnu stanicu. Proces megakariocitopoeze kao dio hematopoeze ovisi o mikrookolišu ili stromi koštane srži za što je, između ostalog, potvrda i smještaj megakariocita unutar hematopoetskog tkiva. Za razliku od prethodnih stanica granulocitne loze koje su smještene duboko u hematopoeznom tkivu i koje tek kada postanu pokretne (mijelociti) putuju prema sinusoidnim prostorima preko kojih sve krvne stanice ulaze u vensku krv, megakariociti leže na vanjskoj strani venskih sinusa. Rezultat upravo takvog »rubnog« smještaja je da megakariociti mogu pružati svoje citoplazmatske produžetke i oslobađati trombocite izravno u cirkulaciju, pri čemu svakodnevno ovim putem za održavanje sustava hemostaze treba u cirkulaciju ući 100 bilijuna trombocita (Italiano, 2008.). Potvrda smještaja megakariocita te mreže retikulskih fibroblastoidnih stanica može se dokazati retikulinskim bojenjem (Aluwalia i sur. 2003.) i, najbolje, elektronskom mikroskopijom. Razvoj megakariocita iz pluripotentne matične stanice sastoji se od nekoliko stupnjeva diferencijacije, a sam proces megakariocitopoeze može se podijeliti u nekoliko stupnjeva isključivo radi boljeg razumijevanja (U Labar i sur., Hematologija 1. izd., str. 60–61, Zagreb, Školska knjiga, 2007.; U: Michelson, Platelets 2. izd., str. 23–34, San Diego: Elsevier Inc., 2007.).



Slika 1.1. Megakariocitopoeza i ontogeneza trombocita – slika preuzeta iz Michelson, Platelets 1. izd. San Diego: Elsevier Inc, str. 23 Fig. 2–1

Stupnjevi u procesu megakariocitopoeze prikazani su na slici br. 1. preuzetoj iz Michelson, Platelets 1. izd. San Diego: Elsevier Inc, str. 23 Fig. 2–1.

Proliferirajući stadij u razvoju megakariocita započinje usmjeravanjem primarne matične stanice GFU-GEMM (engl. *colony-forming unit – granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte*). Uvjeti za *in vitro* kultiviranje ove stanice na animalnom i humanom modelu spoznati su prije 30 godina (Vainchenker i sur., 1979.), što je potvrdilo teoriju o klonalnosti hematopoeze (nastanak hematopoeze iz jedne stanice). Matičnu je stanicu moguće odrediti funkcionalnim testovima ili određivanjem površinskog biljega CD34 metodom protočne citometrije. Ona je progenitorska stanica za dvije stanične kolonije koje sadrže isključivo megakariocite, a razlikuju se u svom funkcionalnom kapacitetu (Levin i sur., 1983.). Stanica koja se razvija u jednostavne kolonije koje sadržavaju 3 do 50 zrelih megakariocita naziva se CFU-MK (engl. *colony-forming unit – megakaryocyte*). Za razliku od nje, BFU-MK (engl. *burst-forming unit – megakaryocyte*) koja je daleko veća i složenija i uključuje satelitski smještene nakupine od nekoliko stotina megakariocita (40–500) i po stupnju zrelosti je prethodnica CFU – MK (Bridell i sur., 1989.). Progenitor-

ske stanice megakariocita mogu se identificirati imunocitokemijskim metodama u aspiratima koštane srži.

Humana megakariocitopoeza u svom prvom stupnju, koji se naziva i proliferirajući odjeljak megakariocita (U Labar i sur., Hematologija 1. izd., str. 60, Zagreb, Školska knjiga, 2007), regulirana je dvoznačno preko humoralnih hematopoeznih faktora rasta i staničnom reorganizacijom koja dovodi do prve morfološki karakteristične stanice – megakarioblasta. Proliferirajući faktori su citokini (IL-3, IL-6, IL-11), zatim SCF (engl. *stem cell factor* ili faktor stimulacije matičnih stanica) te trombopoetin (Tpo) kojeg je prvi pojmovno uveo Kelemen 1958. godine proučavajući potencijalne faktore koji sudjeluju u oporavku bolesnika s trombocitopenijom (Kelemen i sur., 1958.).

Za razliku od eritropoetina koji s trombopoetinom dijeli homologiju slijeda od 155 amino-kiselina, te je u kliničkoj primjeni kao rekombinantni humani preparat od 1989. godine, trombopoetin je tek 1994. godine izdvojilo nekoliko skupina istraživača. Brojna istraživanja kroz više od 20 godina nisu uspjela razviti metodologiju kojom bi se u *in vitro* uvjetima mogao proučavati mehanizam djelovanja ovog ključnog faktora rasta i/ili hormona trombocitopoeze koji se sintetizira u stromi koštane srži, jetri, slezeni i bubregu. Kulture stanice postale su model istraživanja trombopoetina i potvrdile njegovu nezamjenjivu funkciju u više stadija trombopoeze. Ukoliko nema dodatka trombopoetina, u staničnim podlogama dolazi do apoptoze megakariocita (Osada i sur., 1999.) te je time izmijenjeno dotadašnje tumačenje Tpo kao ključnog faktora isključivo u krajnjoj fazi trombogeneze koje se temeljilo na rezultatima ranijih istraživanja (Bunting i sur., 1997.) na eksperimentalnom modelu genski inaktivnih miševa za Tpo i njegovoga površinskog receptora c-Mpl (kratica od mijeloproliferativna leukemija), koji su imali broj trombocita 15% od normalnih vrijednosti.

U nastavku, istraživanjima se potvrdilo da Tpo sudjeluje u ranoj ontogenezi megakariocita tako što potiče endomitozu mononuklearne prethodničke stanica megakariocita te poliploidizaciju i da je preko receptora c-Mpl, prisutnog na matičnim stanicama CD34, megakariocitima i trombocitima, tako i primarni regulator megakariotrombocitopoeze. Ovaj složeni regulacijski mehanizam potreban je za održavanje broja trombocita u uskim granicama u normalnoj homeostazi te brzog odgovora na smanjenje broja trombocita.

Prikaz regulacije megakariocitopoeze nalazi se na slici br.1.1.

Istraživanjima se postiglo da je 1997. godine Uprava za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*) u SAD-u prihvaćen prvi agens (Neumega) koji djeluje na povećanje broja trombocita mehanizmom djelovanja IL-11. Time su pomaknute granice transfuzijske medicine »bez krvi«.

Funkcija specifičnih citokina u razvoju megakariocita posebno je proučena pa je, uz već navedene IL-6 i IL-11, dokazan poseban značaj IL-3 jer povećava sposobnost kako proliferacije, tako i diferencijacije stanica do promegakarioblasta (Long i sur., 1982.). Ta je stanica u stupnjevitoj podjeli razvoja megakariocita završni stadij drugog stupnja nakon kojeg slijedi zreli postmitotički odjeljak megakariocita. Prikaz regulacije megakariocitopoeze nalazi se na slici br.11.

1.2. Razvoj megakariocita i formiranje trombocita (ontogeneza trombocita)

Različite klasifikacijske sheme temeljene na morfološkim karakteristikama, histološkom bojenju, te biokemijskim biljezima koriste se u razlikovanju raznih stadija razvoja megakariocita. Kao što je već navedeno, prva morfološki prepoznatljiva prethodnička stanica megakariocita je promegakarioblast iz koje nastaje zrelija stanica megakarioblast koji predstavlja prvi stupanj u razvoju megakariocita.

Megakarioblast je promjera 10–50 µm s velikom poliploidnom jezgrom i izrazito je bazofilna ukoliko se aspirat koštane srži boji po Romanovskom. Bazofilija je uzrokovana velikim brojem ribosoma, što je značajno za kasniju funkcionalnu aktivnost trombocita jer u tom stadiju trombocitopoeze započinje sintetiziranje proteina koji su ključni u funkciji zrelih trombocita gdje te sinteze više nema (Shantsila i sur., 2008.). Nasuprot tome u citopazmi se ne nalaze niti jedna od granula koje karakteriziraju zreli trombocit. Promegakariocit ili megakariocit II je sljedeći razvojni oblik i veličinom je isti kao megakariocit; to su dvije najveće hematopoetske stanice s promjerom od 20–80 µm. Polikromatofilnost citoplazme ukazuje na razvoj granulacije, pa tako i nastajanje gustih granula (*engl. dens granules*) u kojim se nalazi serotonin.

Istraživanja u kojima je imunocitokemijskom metodom potvrđena nemogućnost unosa serotonina u guste granule u bolesnika s Hermansky-Pudlakovim sindromom kojeg karakterizira produljeno krvarenje usprkos normalnom broju trombocita i aktivnosti faktora zgrušavanja, istovremeno su i potvrda ranog unosa serotonina u trombocitopoezi, te nemogućnosti nadoknade unosom iz periferne krvi (Cieslar i sur., 1974.; Maurer-Spurej i sur., 2001.).

Zreli megakariocit je jedinstvena stanica hematopoetskog sustava jer je izgubio sposobnost proliferacije, ali posjeduje sposobnost povećane sinteze DNK bez diobe, što je razlog za nerasmjerno veliki volumen. Broj endomitoznih ciklusa u megakariocitu je u rasponu od tri do šest, ali ipak većina megakariocita prolazi tri endomitoze te tako ima sadržaj DNK od 16 N (Odell, 1970.). Mehanizam koji pokreće endomitozu nije do kraja razjašnjen jer neregulirani proces replikacije DNK i dijeljenja stanice je izuzetan u megakariocitima.

Rezultati istraživanja brojnih laboratorija usmjereni su na: identifikaciju molekularno programiranih regulatora mitoze (Zhang i sur., 2004.), smanjenu aktivnost MPF (*engl. mitosis-promoting factor*) multiproteinskog kompleksa koji je potreban da stanica ulazi u mitozu (Wang i sur., 1995.) i razne cikline (Kozar i sur., 2004.). Ograničenje ovih istraživanja je u činjenici da se većina njih temelji na staničnim kolonijama megakariocita pri čemu su stanice u trajnoj proliferaciji.

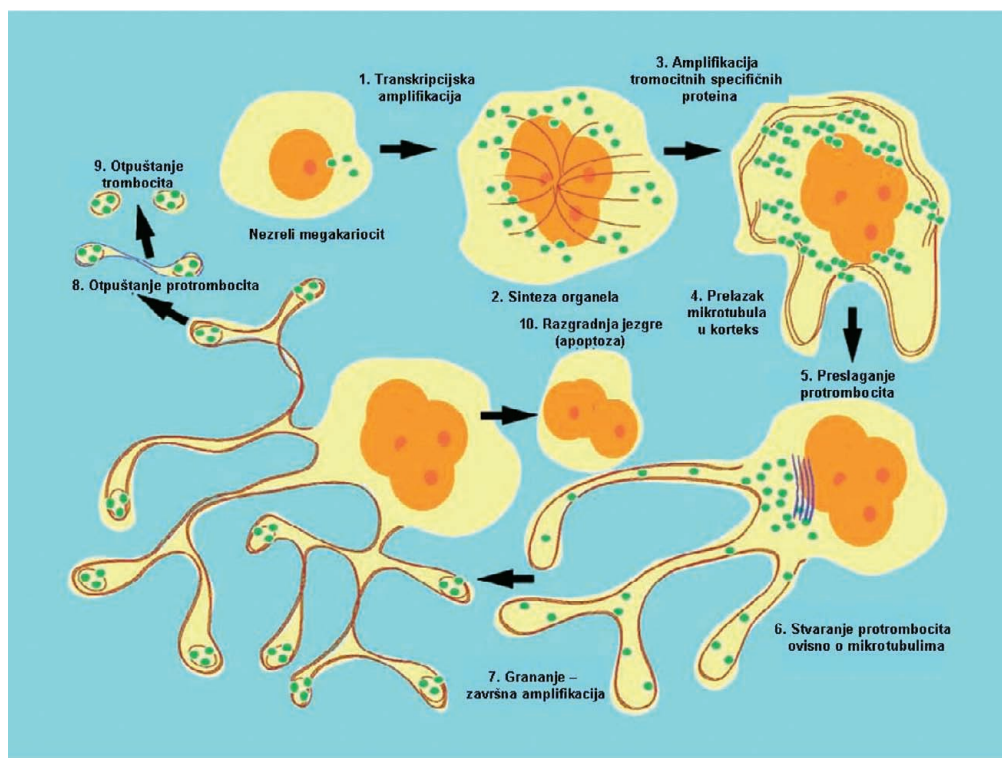
Tijekom sazrijevanja megakariocita krajnji ishod je otpuštanje trombocita u krvotok. Točan način nastanka trombocita nije u potpunosti spoznat iako je već 1906. godine James Homer Wright započeo detaljnu analizu ne bi li otkrio kako iz gigantskog megakariocita nastaju trombociti. Postavljeno je nekoliko bitnih teorija među kojima je 1957. godine Yamada potanko opisao nastanak DMS (*engl. demarcation membrane system*, demarkacijski membranski sustav) prema kojem membrana megakariocita tijekom sazrijevanja proliferira pa nastaje tubularna membranska mreža ili DMS koja dijeli citoplazmu megakariocita od trombocitnih područja. Elektronskom mikroskopijom prepoznate su u megakariocitu membrane i organele trombocita te se pretpostavljalo da membrane čine tubularnu membransku mrežu koja definira područje u kojima se stvaraju trombociti. Prema tom modelu trombociti se oslobađaju masivnom fragmentacijom citoplazme megakariocita uz DMS pa se može pretpostaviti da nakon toga slijedi interni proces reorganizacije membrana.

Kasnijim se istraživanjima na postavljenom modelu objasnilo kako se citoplazma megakariocita može još dodatno podijeliti u tako male volumene kakav imaju trombociti te istovremeno zatvoriti njihovu staničnu membranu. Istraživanja su potvrdila da trombociti, koji prema teoriji o DMS trebaju imati strukturne karakteristike stanica u mirovanju, to zapravo nisu (Radley i sur., 1987.), te da je sama membranska mreža u primarnoj funkciji membranske rezerve za stvaranje protrombocita.

Pojam protrombocita podrazumijeva duge protruzije nastale iz citoplazme megakariocita. Danas klasičnu »protrombocitnu teoriju« uveli su Becker i De Bruyn 1976. godine, pri čemu ne treba zaboraviti da je već Wright opisivao pseudopodije koje nastaju iz megakariocita.

Niz je eksperimentalnih potvrda formiranja trombocita iz protrombocita pa je danas opće prihvaćena važnost stvaranja protrombocita u trombopoezi. Na slici 1.2 prikazan je slijed staničnih događanja od megakariocita preko razgranatih protrombocita.

Trombociti nastaju na krajevima protrombocita, a cijela konverzija citoplazme megakariocita, koja obuhvaća i koncentraciju svih unutarstaničnih sadržaja u protrombocite i njihove izdanke koji imaju veličinu trombocita i predstavljaju krajnji stadij formiranja trombocita koji su nitima još spojeni citoplazmatski, traje oko 5 do 10 sati (Italiano i sur., 1999.). Taj je podatak bitan za svaku interpretaciju nalaza kvantitativnih promjena trombocita ako se uz to uzme u obzir da svaki megakariocit stvara 5 do 10 tisuća trombocita.



Slika 1.2. Magakariocitopoeza prema »protrombocitnoj teoriji«. Prema Michelson, Platelets 1. izd. 2002. San Diego: Elsevier Inc

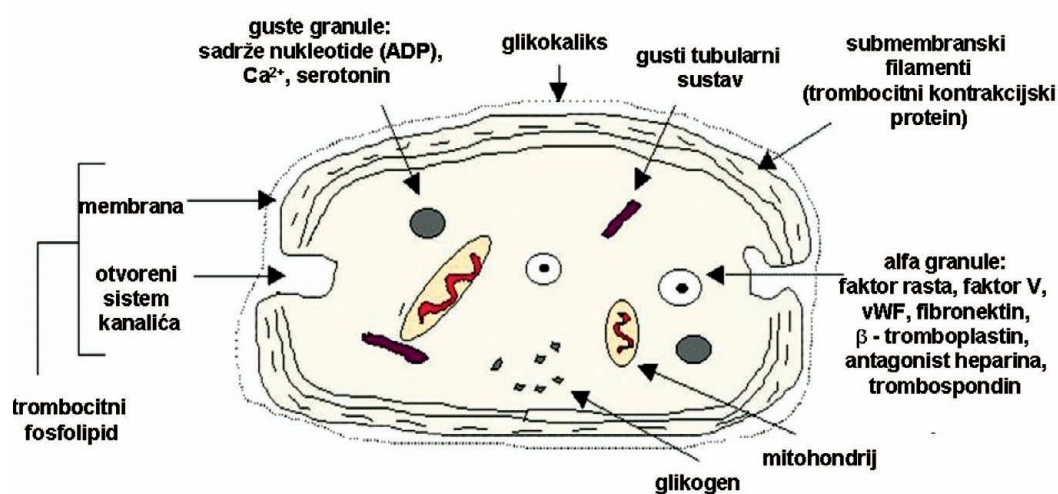
Po otpuštanju trombocita s krajeva protrombocita slijedi niz ruptura citoplazmatskih niti, te nakon toga ostaje takozvana »ogoljena jezgra« megakariocita koja ulazi u proces apoptoze (Gordge MF, 2005.). Trombociti ulaze u krvotok, pri čemu se oko 30% skladišti u slezeni kao sekundarnom organu limfatičkog sustava (Harker LA, 1971.)

1.3. Trombociti

1.3.1. Morfologija trombocita

Humani trombociti su stanice diskoidnog oblika bez jezgre, endoplazmatske mrežice i Golgijeva aparata, pa je njihova funkcionalna aktivnost uvjetovana proteinima sintetiziranim u megakariocitu. Pokazuju izrazitu heterogenost veličine pa im je promjer između 0,5 i 30 μm (Nachmias i sur., 1988.).

Diskoidni oblik neaktiviranih trombocita nije do kraja razjašnjen, ali za pretpostaviti je da im pomaže u svladavanju tlakova i brzina smicanja u cirkulaciji krvi. Ultrastruktura trombocita pokazuje nekoliko zona ili regija s definiranom funkcionalnom aktivnosti: periferna i strukturna zona, membranski sustav, te citoplazmatska zona s organelama i granulama. što je prikazano na slici 1.3.



Slika 1.3. Shematski prikaz ultrastrukture trombocita

1.3.2. Membranski sustav

Površina trombocitne plazmatske membrane je glatka osim periodičnih invaginacija koje daju obrise kompleksnoj mreži intramembranskih cijevi koje su propusne do citoplazme i nazivaju se otvoreni kanikularni sustav (engl. *OCS-open canicular system*). Ovaj sustav ima dvije bitne funkcije: 1. predstavlja prolaz kroz koji se u krvotok mogu izlučiti, ali i aktivno unositi supstance trombocitnih granula, među ostalim i serotonin; 2. rezervoar je plazmatske membrane i njenih receptora. Primjerice, trećina receptora trombina nalazi se u ovom sustavu dok su trombociti u mirovanju, čekajući transport na površinu tijekom aktivacije trombocita.

1.3.3. Strukturna zona

Osim otvorenog kanikularnog sustava, trombociti imaju gusti tubularni sustav (engl. *dense tubular system, DTS*) za koji se pretpostavlja da je analogija endoplazmatskoj mrežici i prevladavajući je sustav skladištenja kalcija i regulacije koncentracije kalcijevih iona, mjesto sinteze prostaglandina i tromboksana kao i enzima ciklooksigenaze (Gerrard i sur., 1976.). Samim tim ovaj je sustav izuzetano zanimljiv u razumijevanju mehanizma djelovanja antiagregacijskih lijekova.

Plazmatska membrana trombocita je odvojena od unutarstaničnog sadržaja mikroskopski nevidljivim slojem – skeletom trombocita. Ovaj citoskelet je proteinska mreža koja pomaže plazmatskoj membrani u održavanju diskoidnog oblika trombocita u mirovanju te omogućava iznimno brze promjene oblika stanice tijekom aktivacije.

Još dva polimerna sustava postoje u megakariocitu: aktin i tubulin. Ovi proteini sudjeluju u reverzibilnom stvaranju filamenata tubularnoga staničnog skeleta i postoje dokazi da upravo mikrotubuli i filamenti aktina imaju esencijalnu ulogu u stvaranju protrombocita (Patel i sur.,

2005.). Jedan od tih dokaza jest da djelovanje antineoplastičkog lijeka vinkristina na razini blokiranja stvaranja mikrotubula polimerizacijom α - i β -tubulina u megakariocitima dovodi do zaustavljanja formiranja protrombocita.

1.3.4. Periferna regija

Periferna regija trombocita je pahuljasti omotač – glikokaliks, na kojem su smješteni brojni glikoproteinski receptori za kemijske supstance manje molekularne težine (ADP, serotonin, acetil-kolin, prostaglandin), kao i makromolekule kao što su trombin, fibrinogen, kolagen i von Willebrandov faktor te faktori zgrušavanja V i VIII. Glikokaliks neke od ovih plazmatskih proteina zadrži u strukturi (osobito faktore zgrušavanja), a neki su dio membrane koja je sastavni dio periferne zone stanica.

Membranski sustav trombocita predstavlja konglomerat lipidnih i proteinskih molekula i naziva se sol-zona ispod koje se nalazi mikrotubularni i filamentni skelet trombocita ili strukturalna zona.

1.3.5. Organele

Trombociti imaju relativno mali broj mitohondrija i lizosoma, što je potvrđeno elektronskim mikroskopom.

Ispitivanja precizne energetske potrebe za svaku pojedinu funkciju trombocita vrlo su složena. Potrebno je pri tome razdvojiti energetske potrebe tzv. trombocita u mirovanju i aktiviranih stanica u procesu adhezije i agregacije. Usprkos malom broju mitohondrija, u njima se oksidacijskom fosforilacijom stvara dovoljno energije za životni vijek neaktiviranih trombocita od tjedan dana u ljudskom krvotoku (Mustard i Packham, 1970; Gross i Schneider, 1971.).

Odgovor na pitanje koji je izvor energije za ove stanice, koje su kontraktilne već tijekom rane faze aktivacije u kojem mijenjaju oblik i nastaju pseudopodije, dali su radovi Karpakina i suradnika 1970. godine (Biochemistry and Pharmacology of Platelets, 1975.). Ti su autori potvrdili da je glikogen glavno energetske spremište te da je količina glikogena jednaka kao u ljudskim mišićnom stanicama, primjenjujući pri tome osjetljivu fluorometrijsku metodu.

Razumijevanje metaboličke aktivnosti preduvjet je, između ostalog, i za razumijevanje kontraktilnosti trombocita koja zahtijeva energiju za jedinstvenu brzinu mijenjanja oblika od nekoliko stotinki milisekunde prilikom procesa agregacije i sekrecijske funkcije (Akkerman i sur., 1982.).

Bitno je promišljati o toj brzini pri interpretaciji morfoloških pokazatelja veličine i distribucije stanica.

Potrebno je pri tome razlikovati citoplazmatski ATP koji služi održavanju homeostatskog mehanizma stanica u mirovanju i rezultat je oksidacijske fosforilacije od ATP koji se zajedno sa

serotoninom nalazi u gustim granulama u kojima se specifičnim mehanizmom transporta skladišti već u megakariocitima (Handagama i sur., 1987.).

Potvrda hipoteze o postojanju, uvjetno rečeno, metaboličkog ATP i deponiranog endogenog bili su rezultati *in vitro* testiranja trombocita koji su bili izloženi [H^3] adeninu (Holmes., 1971.).

1.3.6. Granule

Granule su najinteresantnija karakteristika trombocita radi velikog broja biomolekula koje se u njima nalaze. U neaktiviranom trombocitu granule su smještene uz otvoreni kanikularni sustav kako bi se tijekom aktivacije mogle stapati i egzocitozom ulaziti u OCS (Flumenhaft i sur., 2003.).

U trombocitima su tri skladišna granularna odjeljaka: α -granule, guste (engl. *dens granule*) granule i lizosomi.

Zastupljenije su α -granule kojih ima oko 40–80 u stanici, dok gustih granula ima prosječno 8 (Sixma i sur., 1989.).

Ova razlika u broju tek je jedna od razlika koje postoje između te dvije vrste granula, a odražavaju se u različitoj ontogenezi, vrsti i količini biomolekula koje skladište endocitozom, brzini sekrecije, ali i međusobnoj reaktivnosti (Niewiarowski i sur., 1994.).

1.3.6.1. α -granule

α -granule su prosječno veličine 200–500 nm, sferičnog oblika s tamnom središnjom zonom (U Platelets 1. izd. San Diego: Elsevier Inc, str. 182.–2002)

Molekularni sadržaj ovih granula je trodjelan jer sadrže pretežito biomolekule (proteine) koje su specifične samo za trombocite i uglavnom su podrijetlom iz endogene sinteze u megakariocitu (von Willebrandov faktor, trombocitni faktor 4, P-selektin), zatim selektivne proteine koji se nalaze u relativno malom broju drugih stanica (faktor V, fibrinogen, PDGF), ali se kao plazmatski proteini unose i endocitozom i pinocitozom preko sustava receptora među kojima je fibrinogen najznačajniji (de Larouziere i sur., 1998.). Do sada nije poznato kolika je koncentracija pojedinih biomolekula u ovim granulama.

1.3.6.2. Guste granule

Guste granule (naziv potječe iz gustoće strukture vidljive pod elektronskim mikroskopom) često se nazivaju i sekrecijskim organelama ili skladištem serotonina. Nešto su manje od α -granula, imaju različitu ontogenezu jer ne proistječu samo iz endogene sinteze u megakariocitima već nastaju i heterogenom fuzijom endocitnih vezikula (Youssefian i sur., 2000.).

Primarna im je funkcija čuvanje hemostatski važnih aktivnih supstanci koje se izbacuju tijekom aktivacije trombocita brzinom koja je znakovito veća od sekrecijske brzina α -granula. Primjerice, sekrecija serotonina iz gustih granula odvija se izuzetno brzo, tako da se serotonin nakon stimulacije trombinom u potpunosti izluči u četiri sekunde (Gear i sur., 1982.)

Endogenom sintezom nastaju ATP i ADP dok se serotonin unosi u megakariopoezi, ali i kasnije iz cirkulirajuće krvi.

Kao potvrda hipoteze da postoji trajni transport između gustih granula i multivezikularnih tjelešaca jest postojanje multivezikularnih tjelešaca koja tvore endocitozne odjeljke i sadrže isti membranski protein kao i membrana gustih granula. Njegovo detektiranje je moguće upotrebom monoklonskog antitijela CD 63 (Youssefian T i sur., 2000.).

1.4. Morfološki trombocitni pokazatelji

Brojne se metode danas koriste u ispitivanju trombocita, a uključuju određivanje njihova broja u cirkulirajućoj krvi, veličine, mjerenje heterogenosti veličine, zastupljenost mlađih trombocita, te metode ispitivanja funkcionalne aktivnosti, ponajprije agregacije te aktivacije.

Osnovni preduvjet svakog ispitivanja je standardizirano uzimanje uzorka krvi kao i vrijeme od uzimanja uzorka do analize.

Morfološke pretrage i pretrage funkcionalne aktivnosti uvijek započinju određivanjem njihova broja u krvi i/ili plazmi bogatoj trombocitima; za točnost takvih pretraga ključni su predanalitički uvjeti kao što su: antikoagulans (K3EDTA), stijenka epruvete (plastična ili silikonizirano staklo) i vrijeme i temperatura skladištenja (5 sati na 20 °C).

Primjenom metode promjene otpora (impedancije) Wallace-a Coultera za određivanja mikroskopski malih čestica na prvim brojačima započelo je razdoblje u kojem je postignuto značajno poboljšanje analitičke točnosti i preciznosti u određivanju broja trombocita.

Razvojem tehnologije dosegnuta je izrazita analitička točnost (CV = <5%) i preciznost (CV = <3%) za broj trombocita. Tako su suvremeni analitički sustavi postigli poželjne analitičke ciljeve prema kriterijima biološke varijabilnosti po Westgardu (poželjna vrijednost za trombocite CV < 0,5, CV intraindividualno) (<http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>).

Sporna još jedino ostaje točnost u području izrazito niskih vrijednosti trombocita ispod $20 \times 10^9 / L$, pa je preporuka ICSH (engl. *International Council for Standardization in Hematology*) da se u takvim slučajevima trombociti određuju upotrebom monoklonskog antitijela CD61 metodom protočne citometrije.

1.4.1. Prosječni volumen trombocita – MPV (*eng.mean platelet volume*)

Cirkulirajući trombociti izrazito su heterogeni po veličini te metaboličkoj i funkcionalnoj aktivnosti tako da je tek uvođenje računalnih programa u analitičke jedinice – hematološke brojače – omogućilo da suvremeni hematološki analizatori određuju točan i reproducibilan broj trombocita u izrazito velikom rasponu te mjere i izračunavaju morfološke pokazatelje tih stanica.

Na taj je način dobiven i trombocitni pokazatelj: prosječni volumen trombocita – MPV, – koji predstavlja aritmetičku sredinu svih izbrojenih stanica.

Dosta je proturječnosti o dijagnostičkom i kliničkom značenju MPV-a iako je veliki broj ispitivanja učinjen u proteklih dvadeset godina koja su bila usmjerena na njegovo kliničko značenje.

Naslov nekih početnih radova, kao što je »MPV: Facts or Artefacts?« (Lippi i sur., 1985.), možda bi mogao simbolizirati jedinstvo svih početnih upita o kliničkom značenju svakoga novog staničnog pokazatelja, pa tako i MPV-a, čiju pojavu omogućuju tehnologije, a za koje je potrebno dugo razdoblje da se zaista klinički potvrde.

U dosta velikom broju ispitivanja određivani su predanalitički faktori koji su bitni za interpretaciju ovog pokazatelja. Posebno je značajno ispitivanje Bessmana o povećanju MPV u uzorcima s K3EDTA nakon venepunkcije te njegova stabiliziranja nakon dva sata (Bessman, 1980.). Rezultat je to djelomične promjene diskoidnog oblika trombocita u sferični u uvjetima *in vitro* nakon kontakta s antikoagulansom i postizanja ekvilibrija nakon dva sata.

Nadalje, sustavno je ispitivan način unutarnje i vanjske kontrole kvalitete (Lippi i sur., 1983.; Lippi i sur., 1984.) koji je rezultirao povećanjem preciznosti i kontrolnim uzorcima krvi s rasponima stabilnih vrijednosti za MPV. Pri interpretaciji promjena vrijednosti MPV bitno je uzeti u obzir vrijednosti mjerne nesigurnosti analitičkog sustava na kojem se određuje, te se optimalnim može smatrati $CV < 2\%$. Referentni interval je isto tako ispitivan u nizu radova, pri čemu je istaknuto da se ispitivanja moraju provoditi u zadanom vremenskom razdoblju neovisno o kojem se mjernom principu radi.

Poznata je varijabilnost volumena (veličine) trombocita u usporedbi s brojem trombocita i normalno postoji inverzni odnos broja i veličine: povećani volumen prati sniženi broj trombocita.

Ovaj odnos prikazan je nomogramom (Bessman, 1983.). Nomogram pokazuje da je MPV između 9 do 9,9 fl normalno područje volumena za sve trombocite koji su u normalnom rasponu vrijednosti za broj trombocita. MPV od 7,8 do 8,9 fl ili 9,9 do 12,0 fl može biti ili ne mora u normalnom rasponu. To ovisi o broju trombocita (Bessman i sur., 1981.).

Kliničko značenje MPV-a temelji se na pretpostavci da su veći trombociti reaktivniji i mogu uzrokovati nastanak više trombogenih faktora (Martin i sur., 1992.; Thompson i sur., 1984.).

Ispitivanja su se usmjerila prema odgovorima na dva pitanja:

1. može li MPV, kao lako dostupan pokazatelj, biti i pouzdan pokazatelj aktivnosti trombocitogeneze;
2. može li biti pouzdan pokazatelj aktiviranja trombocita.

Iako mehanizam još nije do kraja razjašnjen, potvrđeno je da MPV korelira s dinamikom megakariocitopoeze, odnosno da mlađi trombociti imaju veći MPV. Najvjerojatnije je povećanje

MPV u slučajevima ubrzanoga trombocitnog nestanka povezano s pojačanim stvaranjem interleukina IL-6, IL-11 i trombopoetina koji izravno utječu na ploidnost megakariocita koji otpuštaju veće i reaktivnije trombocite (Stohlawetz i sur., 1999.; Richards i sur., 1996.). Na taj način odgovor na prvi upit bio bi potvrđen i u slučajevima trombocitopenije u bolesnika koji primaju anti-neoplastičke lijekove kod kojih najprije slijedi povećanje MPV, a naknadno i broja trombocita (Bowels i sur., 2006.).

U traženju odgovora na drugi upit istraživanja su pokazala da veći trombociti, koji su uzrokom i povećanoga MPV, imaju veću metaboličku aktivnost kao preduvjet aktivacije te imaju viši trombotički potencijal (Martin i sur., 1990.).

Veći trombociti su strukturno gušći, imaju ubranu agregaciju induciranu kolagenom te oslobađaju više sekrecijskih biomolekula, među kojima je i serotonin (Shantsila i sur., 2008.).

Kako trombociti imaju značajnu funkciju u patogenezi ateroskleroze i razvoju akutnoga koronarnog sindroma, razumljivo je da bolesnike oboljele od tih bolesti karakteriziraju reaktivniji trombociti s većim MPV-om, što je potvrđeno u nizu radova pa se smatra da je MPV jedan od prediktivnih biljega razvoja akutnoga koronarnog sindroma (Van der Loo i sur., 1999.; Greisen-ger i sur., 2004.; Kilicli-Camur i sur., 2005.).

U daljnjim ispitivanjima potrebno je utvrditi odražava li povećanje veličine trombocita (MPV) njihovo brzo bujanje *in vitro* u razdoblju od nekoliko minuta do sata, ili je ono odraz ubrzane trombopoze koja rezultira stvaranjem »stresnih« mlađih trombocita u krvotoku.

Određivanje udjela nezrelih ili retikuliranih trombocita, koje je do sada bilo isključivo moguće metodom protočne citometrije, omogućiti će uvođenjem novih tehnologija na analizatore ispitivanja na velikom broju ispitanika (preduvjet za ispitivanje svakoga prediktivnog biljega) i istovremeno su put prema razjašnjenju ove dileme koju je postavio Tong 1987. godine (Tong i sur., 1987.).

Zanimljivo je da je među indirektnim metodama određivanja starosti trombocita, uz MPV koji ne pokazuje promjene tijekom starenja trombocita, i određivanje koncentracije serotonina koje je proizašlo iz pokusa na psima gdje je zapaženo da stariji trombociti nakupljaju više serotonina (Mezzano i sur., 1991.; Aranda i sur., 1994.).

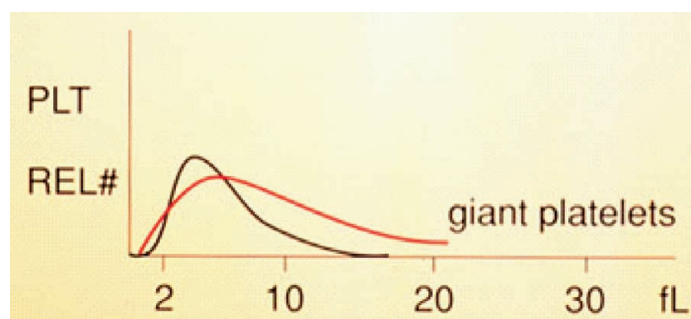
Aranda i suradnici su 2006. godine ispitivanje nastavili na ljudskim trombocitima i potvrdili korelaciju koncentracije serotonina i životnog vijeka trombocita (Aranda i sur., 2006.). Razumljivo je da se ovaj podatak može interpretirati samo u ispitivanju velikog broja bolesnika te da nije individualno informativan.

1.4.2. Raspodjela trombocita po volumenu – PDW (engl. *platelet distribution width*)

Ovaj trombocitni pokazatelj dobiva se isključivo iz krivulje raspodjele trombocita po volumenu i, za razliku od direktno izmjenjenog MPV- a, isključivo je matematički dobiven pokazatelj.

Različiti hematološki brojači (analizatori) na različite načine definiraju tu širinu. No, bez obzira na definiciju, svi predstavljaju mjeru varijacije volumena izbrojene populacije trombocita. Normalna krivulja raspodjele trombocita po volumenu je ulijevo ukošena Gausova krivulja (slika br.1.5) – histogram trombocita.

To znači da krivulja nema maksimum oko aritmetičke sredine volumena, već je pomaknuta više ulijevo. Druga važna značajka je da iznad 20 fl ima mali broj, tj. površina ispod krivulje je minimalna i kao takva ide do 70 fl gdje je gotovo nula. Gledajući normalnu raspodjelu po volumenu možemo zaključiti da su veći broj trombocita kao i srednja vrijednost volumena ispod 10 fl (cca 7 do 8 fl), a da je manji dio trombocita po volumenu (time i veličini) veći, te da oni predstavljaju »mlađe« trombocite. Histogram raspodjele trombocita po volumenu prikazan je na slici 1.4.



Slika 1.4. Krivulja raspodjela trombocita po volumenu – slika preuzeta iz Seminar-Studies – The Automated Differential, Pierre, Mayo Foundation, Rochester, 1998.

Klinička značajnost PDW-a neupitna je u diferencijalnoj dijagnozi reaktivnih i primarnih trombocitoza (Osselaer i sur., 1997.) uz neke kasnije uvedene korekcije vrijednosti PDW-a, ali se postupno ovaj klinički »zanemareni« trombocitni pokazatelj počeo ispitivati u svrhu predviđanja trombofilija.

Lokalno aktiviranje trombocita koji imaju veći MPV i heterogeniji su pa je i PDW povišen može biti dobra pretraga probira za bolesnike koji, uz ostale faktore rizika, mogu razviti akutni koronarni sindrom; stoga bi ovi lako dostupni i materijalno racionalni hematološki parametri mogli poslužiti kao prediktivni faktori rizika, posebno u zemljama s izrazito velikom populacijom kao što je Indija, što i navodi skupina autora u svom radu s provokativnim naslovom »Indijski scenarij« (Khandkari i sur., 2006.).

Neki od najnovijih radova pokazuju upravo izuzetno dobru korelaciju povišenog PDW-a i biljega trombofilije (Ikara i sur., 2010.) te ga svrstavaju u biljege razvoja aneurizme aorte, dok istovremeno postoje proturječni podaci drugih autora koji ne nalaze povezanost PDW-a i pojačane agregacije trombocita (De Luca i sur., 2009.) te debljine stijenke aorte (De Luca i sur., 2010.).

Jedan od razloga radi kojih PDW teško nalazi kliničku primjenu je velika varijabilnost u načinu izračuna, mjernim jedinicama, pa samim tim i referentnim intervalima za razne analizatore.

Isto tako, nezanemariva je činjenica da postoji niz analitičkih i predanalitičkih interferencija (mikroagregati trombocita, postojanje višestrukih populacija, neadekvatno izmiješan uzorak krvi) koje se predočuju na histogramu trombocita. Zbog toga se pokušalo uključiti novi pokazatelj koji pokazuje koliko se krivulja raspodjele po volumenu izmjerene populacije trombocita razlikuje od normalne; taj je pokazatelj nazvan PDW ostatni (Leniček Krleža i sur., 1999.).

Ovako korigirani parametar bolji je pokazatelj u diferencijalnoj dijagnostici esencijalnih i reaktivnih trombocitoza od izmjerenog PDW.

Usprkos tome, u kasnijim radovima potvrdila se značajnost PDW i MPV u etiologiji trombocitoza gdje su sekundarne – mahom reaktivne radi infekta, ili maligne bolesti karakterizirane nižim MPV i PDW od primarnih ili klonalnih trombocitoza koje su prisutne u mijeloproliferativnim bolestima (Tafazzoli i sur., 2006.)

Različiti hematološki analizatori na različite načine definiraju PDW, bilo kao koeficijent varijacije MPV ili standardnu devijaciju MPV.

Iz toga neminovno proistječu i razlike u referentnim intervalima za različite analitičke sustave.

Ispitivanje referentnog intervala za svaki analitički sustav je preporuka ICSH, te se već nalaze radovi s takvim ispitivanjima koji predstavljaju put ka standardizaciji ovoga staničnog pokazatelja koji je, neovisno o navedenim manjkavostima, mjera varijacije ili heterogenosti izbrojenih trombocita (Farias MG i sur., 2010.).

Za sada se može smatrati da je najveća ispitana baza podataka iz studije NHANTES III (*National Health and Nutrition Examination Survey Home*), objavljena u časopisu Laboratory Hematology 2004. godine u kojoj je dobivena normalna vrijednost PDW-a u rasponu 15,0% – 17,8% (Calvino Ka Wing Cheng i sur., 2004.).

Učinjen je bitan pomak u analitičkoj točnosti i preciznosti jer novije komercijalne kontrolne krvi omogućavaju izračun mjerne nesigurnosti, pri čemu je poželjan CV koji zadovoljava kriterije biološke varijabilnosti s vrijednosti manjoj od 1,4%. Iz toga slijedi da u ispitivanju kliničke značajnosti ovoga staničnog pokazatelja postaje moguće odrediti koliko mjerna nesigurnost utječe na razinu kliničkog odlučivanja.

Heterogenost veličine trombocita uvjetovana većom količinom aktiviranih trombocita kao središnjih stanica sustava zgrušavanja treba promatrati u cjelovitosti ravnoteže hemostatskog sustava u kojem se stalno odvija proces zgrušavanja na razini mikrotrauma koji, kao takav, nije patofiziološki proces. Hipoteza autorice brojnih radova o serotoninu u trombocitima Elisabeth Maurer–Spurej je da upravo trombocitni serotonin ima važnu ulogu u održavanju ravnoteže između zgrušavanja i fibrinolize interakcijom sa specifičnim plazmatskim proteinima (Maurer-Spuraj., 2005.).

1.4.3. Retikulirani trombociti (engl. *reticulated platelets*)

Retikulirane trombocite prvi je opisao Ingram 1969. godine promatrajući ih svjetlosnim mikroskopom u pripravcima obojenim novim matilenskim plavilom, pri čemu je kao i u retikuloцитima zapazio karakteristične ostatke nukleinskih kiselina – pretežito citoplazmatske RNK, te ih je nazvao retikulirani trombociti koji su analogni retikuloцитima eritrocitne loze. Tek je Lee sa suradnicima 1986. godine opisao upotrebu fluorescentne boje tiazol-oranž – TO (engl. *thiazole orange*) koja boji DNK i RNK, te metodom protočne citometrije omogućuje analiziranje stanica bez jezgre.

Prvi rad o dijagnostičkoj značajnosti retikuliranih trombocita objavili su Kienst i Schmitz 1990. godine u kojem su obradili bolesnike s trombocitopenijom različite etiologije (Kienst i Schmitz, 1990.). Ispitivanja na animalnom modelu pokazala su da retikulirani trombociti ostaju u krvotoku 24 do 36 sati te da se nakon toga progresivno smanjuje količina DNK i njihov volumen (Ault i sur., 1995.).

Nakon toga je slijedilo dosta radova u kojima su autori rabili modifikacije metode.

Jedno od osnovnih pitanja na koje je zastupljenost retikuliranih trombocita pružala potencijalan odgovor je: može li se diferencijalno dijagnostički njihova vrijednost upotrebiti u razjašnjenju etiologije trombocitopenija, što je bio cilj i početnog ispitivanja Kiensta i Schmita. Trombocitopenija ima tri osnovna razloga nastanka: 1. nedovoljno stvaranje u koštanoj srži, 2. pojačana razgradnja, 3. abnormalno skladištenje u slezeni.

Aspiracijska punkcija i biopsija koštane srži bila je metoda koja se smatrala zlatnim standardom u diferencijalnoj dijagnostici. Pojava neinvazivne metode protočne citometrije omogućila je jednostavniju i točniju dijagnostiku. Rezultati radova pokazali su da je broj retikuliranih trombocita značajno povišen (>40%) kod trombocitopenija uzrokovanih perifernim razaranjem ITP (Diguatro i sur., 2009.). U slučajevima hipoplazije ili aplazije koštane srži te tijekom kemoterapija potvrđen je jednak broj retikuliranih trombocita kao i u kontrolnoj skupini (Richards i sur., 1996. i Yasunari i sur. 2009.).

Iskorak u dostupnosti ovoga staničnog pokazatelja učinjen je razvojem tehnologije hematoloških analizatora koji unazad nekoliko godina imaju mogućnost da iz uzorka krvi upotrebom boje tiazol-narančasta, koja se rabi u protočnoj citometriji, odrede trombocite s ostatkom citoplazmatske mrežice bogate s RNK.

Osnovno mjerno načelo određivanja retikuliranih trombocita je zasnovano na mjerenju rasapa monokromatske svjetlosti lasera, pri čemu je stanica obojena fluorescentnom bojom koja se veže na staničnu RNK, u dodiru s laserskom zrakom od 488 nm fluorescira kod 530 nm i mjeri se optičkom metodom. Trombociti sadrže različitu količinu RNK te stoga daju različitu jačinu optičkog signala. Razvijena je tehnologija (Abbott, Sysmex) koja vrlo brzo daje podatak o udjelu retikuliran trombocita ili IPF (engl. *immature platelet fraction*).

Upotrebom takve tehnologije potvrđena je značajnost povišenja retikuliranih trombocita u bolesnika nakon presađivanja koštane srži kao pokazatelja ulaska u remisiju (Takami i sur., 2007.), a zatim kao dobroga ranog biljega oporavka nakon terapije antineoplastičnim lijekovima (Chaoi, 2005.), što sve ima za posljedicu racionaliziranje transfuzije koncentratima trombocita (Briggs i sur., 2006.). Rezultati ispitivanja retikuliranih trombocita u bolesnika s cirozom jetre pokazali su niže vrijednosti, što možda ukazuje da hipoteza o smanjenom broju trombocita u ovih bolesnika nije samo rezultat razaranja u slezeni već i niže aktivnosti koštane srži (Panasuik i sur., 2004.). U prilog tome idu ispitivanja koja su pokazala da je jedan od ključnih posrednika obnove hepatocita serotonin iz gustih granula trombocita koje su prisutne već u retikuliranim trobo-citima, iz čega proizlazi da sadrže samo serotonin unesen u megakariocitima (Lesurtel i sur., 2006.).

Postoje i dalje problemi oko standardiziranja ove metode jer nema kontrolnog materijala i referentne metode, a raspon vrijednosti koji se smatra normalnim varira ovisno o tehnologiji tako da su literaturni podaci u rasponu od $< 1\%$ do $6,1\%$ za odrasle osobe (Brigs i sur., 2006.; Chaoi i sur., 2005.). Ispitivanja Yasunari Abe i suradnika potvrdila su rezultate ispitivanja Briggsa i suradnika, te time istodobno potvrdila da nema razlike u različitim etničkim skupinama i da bi se kao granična vrijednost aktiviranja trombopoeze mogla uzeti $7,7\%$, pri kojoj je najveća osjetljivost i specifičnost uz indeks pouzdanosti od 95% (Yasunari Abe i sur., 2006.).

1.5. Osnove fizilogije serotonina u organizmu sisavaca

Serotonin je najprije otkriven kao snažan periferni vazokonstriktor (Rappport 1948.), a tek naknadno je utvrđeno da pripada u glavne neuroprijenosnike koji sudjeluju u složenim neuronskim komunikacijama. Serotonin uz histamin spada u skupinu biogenih amina koji imaju veliku i raznovrsnu biološku aktivnost i rasprostranjenost u biljnom i životinjskom svijetu.

Serotonin, ili 5-hidroksi-triptamin (5HT), nastaje iz aromatske esencijalne aminokiseline L-triptofana (iz koje još nastaje i nikotinamidski prsten u NAD^+) djelovanjem enzima triptofan-hidroksilaze i hidroksi-triptofan-dekarboksilaze.

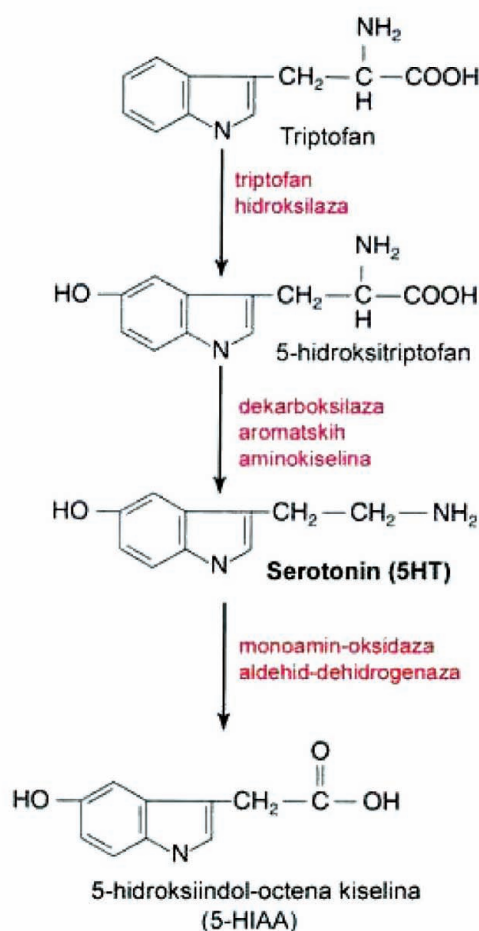
Periferni serotonin metabolizira se u jetri djelovanjem enzima monoaminooksidaze (MOA) koja ga razgrađuje u 5-hidroksi-indol octenu kiselinu -5-HIAA (*eng5-hidroxyindolacetic acid*) koja se izlučuje mokraćom. Povišene vrijednosti 5-HIAA u mokraći nalaze se u slučajevima karcinoidnog sindroma kao posljedica sintetiziranja serotonina karcinoidnih stanica. Na slici 1.5 prikazana je sinteza i katabolizam serotonina.

Serotoninsku homeostazu u organizmu sisavaca možemo načelno razmatrati kroz dva anatomska i funkcionalno odvojena odjeljka: centralni, koji obuhvaća središnji živčani sustav, te periferni, koji se odnosi na druga tkiva, ponajprije na enterokromafine stanice sluznice tankog crijeva.

Ovi su odjeljci odvojeni za serotonin uvjetno rečeno – nepropusnom, krvnomoždanom branom koja propušta serotoniniski prethodnik triptofan i omogućava sintezu serotoninina u serotoniniskim neuronima koji su okupljeni u jezgrama rafe smještenim u moždanom debalu i daju projekciju u gotovo sve dijelove mozga i kralježničke moždine (Arora i sur., 1984.; Frazer i sur., 1994.; Fuller, 1986.). Dugo se vjerovalo se da serotonin radi svojih kemijskih svojstava ne prolazi krvnomoždanu branu, ali novija istraživanja pokazuju da serotonin može proći endotelne stanice brane koristeći serotoniniski transporter (Nakatani 2008.; Marc 2010.).

Na isti način propuštaju i metabolit 5-hidroksi-indol-octenu kiselinu. Za sada se nije pokazala direktna povezanost između aktivnosti neuroprijenosnika u mozgu i njihovog lučenja urinom, ipak najnovija istraživanja sugeriraju mogućnost praćenja aktivnosti CNS određivanjem količine serotoninina u urinu (Marck, 2010.).

Glavno mjesto sinteze perifernog serotoninina su enterokromafine stanice gastrointestinalne sluznice tankog crijeva koje ga otpuštaju u portalni krvotok gdje se preko trombocitnog prijenosnika gotovo 99% cirkulirajućeg serotoninina unosi u trombocite, a preostala količina slobodnog amina dolazi do svojih glavnih metaboličkih mjesta – pluća i plućne mikrovaskulature (Fuller, 1986.).



Slika 1.5. Prikaz sinteze i katabolizma serotoninina

Prema novijim istraživanjima ključni enzim u sintezi serotonina iz triptofana – triptofan-hidroksilaza TPH (TPH-eng. *Tryptophan hydroxylase*) nalazimo u sisavaca u dvije isoforme koje su smještene upravo na mjestima sinteza serotonina (Savelieva, 2008; Liu, 2008). Triptofan hidroksilaza tip 1 (TPH1) je smješena u perifernom sustavu dok je tip 2 (TPH2) dominantna u mozgu.

Serotonin pripada u glavne neuroprijenosnike koji sudjeluju u složenim neuronskim komunikacijama. Serotonin posreduje u čitavom nizu centralnih i perifernih funkcija. Među ostalim, smatra se da je uključen u modulaciju brojnih fizioloških funkcija kao što su prehrana, spavanje, seksualno ponašanje, cirkadijalni i neuroendokrini ritmovi i drugo.

Smatra se da je uključen u modulaciju ponašanja i homeostatskih procesa u organizmu: regulaciji raspoloženja, kognitivnih i motoričkih funkcija, te regulaciju disanja i kardiovaskularne funkcije (Lucki, 1998.)

Sličnost između nekih serotoninskih elemenata na trombocitu i u mozgu prvi je put uočena krajem šezdesetih godina prošlog stoljeća (Pletcher, 1968.).

Od otkrića brojnih podudarnosti između trombocitnoga serotoninskog sustava i serotonergičnih neurona prihvaćeno je da trombocitni sustav kao »zrcalna slika« postane periferni pokazatelj serotogeničkog sustava i predstavlja model (Pletcher A. *Platelets as peripheral models for neuropsychiatry*; 1991.) na kojem se vrlo intenzivno provode istraživanja.

Prema riječima Branimira Jerneja lako je prihvatiti taj eksponencijalni rast radova u području neuroznanosti koji koriste ovaj periferni model »... jer se laganom venepunkcijom dobiva homogena vijabilna populacija humanih stanica – trombocita, koje imaju dosta elemenata neurona koji nisu direktno dostupni za *in vivo* istraživanje.« (Jernej, 1995.).

Sličnosti i razlike između trombocita i serotonergičkih neurona prikazane su u tablici 1.1.

Tablica 1.1. Sličnosti i razlike između trombocita i serotonergičnih neurona

Serotonergični neuroni	Trombociti
sličnosti	
Serotonin pohranjen u gustim granulama i vezikulama	
Aktivni transport preko transmembranskog transportera 5HTt	
Vezujuća mjesta ³ H-paroxetine, ³ H-imipramine	
Serotoninski receptor 5-HT _{2A}	
MOA tip B	
razlike	
TPH2- Sinteza serotonina	Ne sintetizira se serotonin
Funkcija: Neuroprijenosnik	Funkcija; degranuliranjem – vazokonstrikcija i agregacija

1.5.1. Serotoninski sustav u trombocitima

Uz serotonergične neurone i enterokromafine stanice, trombociti pripadaju u stanice najbogatije serotoninom. Iako se trombociti anatomski, funkcionalno i ontogenetski bitno razlikuju od živčanih stanica, elementi trombocitnog serotoninskog sustava gotovo su identični onima u serotonergičnim neuronima, kao što je prikazano u tablici br. 1.1. Za razliku od živčane stanice, trombociti ne provode električne impulse, nemaju jezgru, ne sintetiziraju amine (pa tako ni serotonin) i imaju kraći životni vijek (Michelson i sur., 2002.).

Osnovno načelo koje bi trebalo biti postojano u svim usporedivostima serotoninskog sustava trombocita i neurona je da, osim nemogućnosti sinteze serotonina, njegovo otpuštanje ima temeljno različite posljedice.

Otpuštanje iz neurona rezultira neuronskom komunikacijom dok je degranulacija trombocita prvi stupanj u procesu agregacije ključne za zgrušavanje.

Istraživanja koja su rezultirala spoznajama o elementima serotoninskog sustava trombocita dio su sveukupnoga znanstvenog interesa prema identificiranju promjena na morfologiji, metaboličkoj aktivnosti i funkcionalnoj aktivnosti trombocita koje bi mogle biti dijagnostički pokazatelji u kombinaciji s određenim sindromima, ali i prediktivni i/ili korelirajući biljezi odgovora na terapiju u bolesnika s duševnim poremećajima kao što je to predviđao Sthal u svom radu iz 1977. godine: »The human platelets; diagnostic and research tool for study of biogenic amines in psychiatric and neurological disorders«.

Četiri elementa u trombocitnom serotoninskom sustavu su vrlo opsežno ispitivana: serotoninski transporter ili prijenosnik (5HTt) stanični serotoninski receptor (5HT-2A), enzim monoaminooksidaza-B(MAO-B), te serotonin (5HT) u gustim granulama trombocita.

1.5.2. Transport serotonina – serotoninski transporter

Evolucijski visoko konzerviran serotoninski transporter (SERT ili 5HTt) regulira čitav serotogeni sustav i njegove receptore preko modulacije izvanstanične koncentracije serotonina.

Ovaj transmembranski protein nije isključivo prijenosnik serotonina već ima određenu sposobnost transporta drugih endogenih amina poput dopamina (Massom i sur., 1999.).

Primarna struktura serotoninskog prijenosnika utvrđena je 1991. godine (Blakely i sur., 1991.), a nakon toga izuzetno važan podatak da je 5HTt u svim stanicama identična (Lesch i sur., 1993.).

5HTt nalazi se na membrani stanica posteljice, kromafinih stanica nadbubrežne žlijezde, endotelu plućnih kapilara, u epitelnim stanicama mukoze crijeva, dio je serotoninskog sustava parafolikularnih stanica štitnjače i trombocitnoga serotoninskog sustava.

U mozgu serotonininski prijenosnik zauzima središnje mjesto u procesu brze eliminacije neuroprijenosnika iz sinaptičke pukotine u presinaptički krajnji neuron i stoga je izravno uključen u regulaciju serotonergičnog neuoprijenosa (Uebellhack i sur., 2006.).

Iako još nije do kraja razjašnjena korelacija funkcije 5HTt u serotogeničnim neuronima i trombocitima, smatra se da postoji analogija po kojoj serotoninški prijenosnik na trombocitnoj membrani uklanja farmakološki aktivan serotonin iz krvne plazme unosom u trombocit gdje se jednim dijelom metabolizira, a dijelom pohranjuje u granule (Rausch i sur., 2005.).

1.5.2.1. Struktura i način djelovanja serotoninškog transportera

5HT-transporter najbolje je opisan u čovjeka i u štakora. U obje vrste 5HTt je integralni membranski protein sastavljen od 630 aminokiselina. Krajevi polipeptida N i C nalaze se unutar stanice, a 12 hidrofobnih regija tvori transmembranska područja (domene). Od 12 transmembranskih domena, domenu 3 i 4 povezuje velika izvanstanična petlja koja ima po 2 mjesta za glikozilaciju. Drži se da je 12. domena uključena u vezivanje supstrata: serotonin i antagonista te antidepresiva (Barker i sur., 1996.).

Iako kodirani istim genom, ljudski 5HTt na serotogeničnim neuronima i perifernim tkivima razlikuju se po stupnju glikoziliranosti molekula proteina (Ramamoorthy i sur., 1993.). Gen koji kodira serotoninški prijenosnik u neuronima i na plazmatskoj membrani perifernih tkiva nalazi se u čovjeka na kromosomu 17 u regiji 17q11.1–17q12 (Murphy i sur., 2004.).

Razlike u izražaju i funkciji serotoninškog prijenosnika, koje su produkt varijabilnosti gena 5HTt, povezane su s mnogim poremećajima u ljudskom organizmu (Kirchneier i sur., 2004.).

Poremećaji kinetike 5HT na trombocitnoj membrani opisani su u etiopatogenezi nekih psihijatrijskih bolesti kao što su depresivni poremećaji, opsesivno-kompulzivni poremećaji, panična stanja i drugo.

Unutar makromolekularnog proteinskog kompleksa 5HTt u serotonergičnom neuronu nalazi se vezno mjesto za antidepresive preko kojih se inhibira aktivan unos 5HT (Schloss, 1998).

Nesrazmjerno snažna eliminacija serotonin iz sinaptičke pukotine posredovana sa 5HTt i posljedično nedostatan sinaptički prijenos 5HT kod depresivnih bolesnika pokušava se terapijski korigirati farmakološkom blokadom serotoninškog prijenosnika sa svrhom dužeg zadržavanja neuoprijenosnika u sinaptičkoj pukotini i poboljšanja neurotransmisije. Antidepresivi inhibiraju aktivan unos 5HT uzrokujući alosteričke promjene na prijenosniku.

To je jedan od razloga za brojne molekularne analize 5HTt, posebno u bolesnika s duševnim poremećajima u kojih je potvrđena smanjena ili povišena serotogenična neurotransmisija.

Istovremeno predmetom farmakogenetičkih ispitivanja je polimorfizam gena 5HTt jer ovaj prijenosnik predstavlja glavno ciljno mjesto za različite antidepresive (Malison 1998.; Muck-Seler. 2005)

1.5.3. Pohrana serotonina u trombocitima

Kinetika prijenosa serotonina u trombocite vrlo se intenzivno istraživala unatrag 40 godina. Prema podacima Crawforda (Crawford i sur., 1965.) ljudski trombociti sadržavaju normalno od 150 do 600 ng serotonina na 10^9 trombocita, dok je koncentracija slobodnog serotonina u plazmi manja od 30 ng/ml.

U istraživanjima su posebno istraživana dva aspekta. Prvo je bilo potrebno razviti model *in vitro* koji će omogućiti praćenje unosa serotonina kako bi se razjasnio prijenos koji se odvija protiv koncentracijskog gradijenta (konc. serotonin trombociti : plazma – 1000:1) i, drugo, pokušati razjasniti faktore koji su bitni u toj kinetici. Sama se metodologija u tom razdoblju dosta ispitala jer je postojala velika heterogenost u rezultatima kinetike unutar fizioloških uvjeta (Pletscher i sur., 1968.; Born i sur., 1972.; Codd i sur., 1987.; Jernej i sur., 2000.). Razvijen je model u kojem su definirani eksperimentalni uvjeti: optimalan broj trombocita u plazmi bogatoj trombocitima (PRP), koncentracije ^{14}C serotonina do zasićenja, puferski sustav (Tuomisto, 1978.; Mälgren, 1981.; Banović i sur., 2010.), koji su potrebni za razjašnjenje značajki serotoninске trombocitne kinetike.

U procesu nakupljanja serotonina u trombocite posreduju dva prijenosnika. Na membrani trombocita nalazi se opisani proteinski 5HTt, transportni protein koji omogućava unos serotonina iz krvne plazme u unutrašnjost trombocita. Pokretačku snagu za unos 5HT u stanicu čini ko-transport Na^+ i Cl^- u smjeru njihova elektrokemijskog gradijenta, te istovremeni antiport K^+/H^+ iz stanice, pri čemu elektrokemijski gradijent Na^+ i K^+ održava Na^+-K^+ ATP-aza (Rudnick i sur., 1993.). Na vezno mjesto 5HTt, okrenuto vanjskoj okolini, vežu se Na^+ , 5HT i Cl^- . Tada molekula 5HT mijenja konformaciju pa se vezno mjesto liganada okrene prema unutrašnjosti stanice. Ligandi se otpuštaju u citoplazmu, a za 5HTt veže se stanični K^+ ili H^+ (ako nedostaje K^+) te se ponovnom promjenom konformacije otpuštaju izvan stanice. Nakon aktivnog unosa u trombocitnu citoplazmu serotonin može biti podvrgnut ili enzimskoj razgradnji posredovanoj enzimom MAO-B ili unesen u unutrašnjost granula pomoću prijenosnika koji se može potvrditi protočnom citometrijom koristeći monoklonsko antitijelo CD63 smješteno na membrani gustih granula, a pomoću visoko učinkovite protonske ATP-aze (Rudnick i sur., 1977.).

Rezultati istraživanja potvrdili su maksimalna brzina (V_{max}) unosa u trombocite odražava broj prijenosnika na membrani i njeno postizanje povezano je s koncentracijom serotonina u plazmi, što objašnjava brzinu kojom cirkulirajući trombociti unesu slobodni serotonin sintetiziran u enterokromafinim stanicama. Aktivan unos serotonina u stanicu slijedi saturacijsku kinetiku (kinetiku zasićenja) i opisuje se parametrima (kinetskim konstantama K_m i V_{max}) u skladu s Michaelis-Mentenovim zakonom enzimске kinetike (Jernej i sur., 2000.). Prijenos serotonina u trombocite je elektroneutralan jer je zbroj negativno i pozitivno nabijenih iona koji se kreću preko membrane jednak nuli i saturabilan je.

Rezultati longitudinalnog praćenja koncentracije serotonina u trombocitima u fiziološkim uvjetima u zdravoj populaciji pokazuju intraindividualnu stabilnost s obzirom na dinamično održavanu ravnotežu između slobodnoga plazmatskog i trombocitnog serotonina koja je izravno kontrolirana upravo unosom serotonina u trombocite (Jernej i sur., 1991.; Eynard i sur., 1993.).

1.5.4. Trombocitni Serotoninski receptor

Trombocitni receptori predstavljaju mjesta međustaničnog i izvanstaničnog kontakta trombocita, te su uz granule njihova stanična specifičnost.

Spoznaja o broju receptora stalno se povećava tako da je do sada poznato 45 različitih struktura koje su svrstane u 5 osnovnih skupina.

Iako je primarna funkcija trombocita vezana za održavanje sustava hemostaze, jasno je da glavna funkcija receptora ipak nije samo isključivo usmjerena na tu staničnu aktivnost. U prilog ovoj tvrdnji mogu se navesti klinička stanja u kojima je sustav zgrušavanja, ukoliko nema poremećaja funkcionalne aktivnosti trombocita, održavan i sa 10% normalnog broja cirkulirajućih trombocita). Velika heterogenost receptorskog fenotipa omogućava ovim stanicama bez jezgre (nemogućnost sintetiziranja proteina *de novo*) održavanje fiziološkog sustava hemostaze te poticanje patoloških trombotičkih zbivanja samo malom početnom promjenom (Clemson K. Platelet receptors. U: Platelets. 2. izd. San Diego: Elsevier Inc., 2007; 117–127).

Jedno od najzanimljivijih pitanja u proučavanju trombocitnog serotonina bilo je upravo vezano za receptore, odnosno razjašnjenje mehanizma kojim isti receptor inicira unos 5-HT u trombocite i/ili aktivaciju trombocita.

1.5.5. Serotonin i funkcionalni trombocitni odgovor – aktivacija i agregacija

Razvojem optičke agregometrije Born je 1968. godine postavio temelje za ispitivanja procesa agregacije trombocita u uvjetima *in vitro*. Agregometrijska mjerenja pokazala su da je 5-HT inducira agregaciju, ali do određene koncentracije nakon koje nastupa inhibicijsko djelovanje (Baumgartner i Born, 1969.).

Ti su rezultati upućivali na određenu vrstu autoinhibicije aktivacije trombocita potaknute serotoninom i istovremeno usmjerili istraživanja prema kompleksu receptora i serotonina te disocijaciji serotonina nakon ulaska u stanicu. Rezultati istraživanja pokazali su da izravan učinak serotonina na trombocitnu aktivaciju nastaje tek kada postoje slobodni receptori, odnosno kada su zasićene guste granule.

U prilog tome je potvrđena povezanost koncentracije serotonina u trombocitima štakora i jačine njihove agregacije (Banović i sur., 1993.). Specifičnom blokadom serotoninskog recepto-

ra ketanserinom mogu se inhibirati oba učinka serotonina na trombocitni odgovor te se time potvrđuje važnost slobodnih receptora za aktivaciju (De Clerck i sur., 1984.; Jernej i sur., 1994.).

Na površini trombocita kao dio serotoniniskog trombocitnog sustava, poznat je jedan serotoniniski receptor, tj. 5HT-2A koji se u klasifikaciji trombocitnih receptora ubraja u skupinu od sedam transmembranskih heterogenih receptora agonista koji induciraju brzu aktivaciju trombocita. Receptor je vezan na G-proteine i vezivanjem serotonina na receptor dolazi do poremećaja koncentracije Ca^{2+} koja je ključni regulator fosfolipidne asimetrije plazmatske stanične membrane te posljedično aktivacije trombocita (Kagaya. i sur., 1992.). Aktivacija trombocita narušava fosfolipidnu asimetriju te dolazi do premještanja negativno nabijenih fosfolipida iz unutarnjeg u vanjski dvosloj pa se sadržaj fosfatidilserina na vanjskoj membrani dramatično povećava, a njegovo izlaganje na vanjskoj membrani je nužno za stvaranje prokoagulacijske površine jer se na njega vežu ostaci γ -karboksiglutaminske kiseline faktora zgrušavanja (Heemskerk i sur., 2002.).

Mehanizam koji dovodi do ove početne promjene fosfolipida nije u potpunosti razjašnjen, ali se smatra da je za nju odgovorna fosfolipidna »skramblaza« (engl. *phospholipide scramblase*, PLSCR1) koja se aktivira porastom koncentracije citoplazmatskog Ca^{2+} (Sims i sur., 2001.). Novija su istraživanja pokazala da je ova regulacija membranskih fosfolipida ključna za funkcionalnu aktivnost i drugih krvnih stanica (Countrey Frasch. i sur., 2004.).

Osim opisanog procesa aktivacije trombocita, serotonin je autokrini agonist koji u procesu otpuštanja putem egzocitoze izlazi iz gustih granula zajedno s ATP-om potrebnim za proces aktivacije. Stimulacija trombocita trombinom, kolagenom, te ADP-om mobilizira unutarstanični Ca^{2+} , što dovodi do fuzije granularne i plazmatske membrane i otpuštanja pohranjenog serotonina (Murer i sur., 1981.).

1.6. Metodologija analiziranja aktiviranih trombocita

Detekcija aktiviranih trombocita *in vivo* vjerojatno predstavlja signal neposredne ili početne hiperkoagulabilnosti, ali to treba dokazati odgovarajućim tehnikama.

Međutim, zbog rukovanja uzorkom tijekom analize teško je razlikovati aktivirane trombocite *in vivo* od trombocita dodatno aktiviranih *in vitro*. Od mnoštva metoda koje su opisane u literaturi očito je da još uvijek ne postoji suglasje oko jedne laboratorijske pretrage kao zlatnog standarda za analizu aktiviranih trombocita *in vivo*. Metodologija koja se primjenjivala može se podijeliti prema vrsti promjena koje se zbivaju u trombocitu tijekom aktivacije.

Park i suradnici su kao pokazatelj aktiviranih trombocita koristili morfološke promjene koja se odražavaju na promjeni MPV-a (Park i sur., 2002.). U ovoj studiji, kao i ostalim utemeljenima na određivanju MPV, ostaje upitna predanalitička i analitička točnost uzorka, o čemu je već raspravljano u ovom radu.

Zatim su metodama protočne citometrije mjereni površinski aktivacijski biljezi, pri čemu su to uglavnom bili biljeg P-selektina (CD-62P) i integrinskog kompleksa CD-63 (Israels i sur., 2001.; Klinkhardt i sur., 2005.). U ovim studijama aktivacije trombocita *in vivo* jedno od glavnih proceduralnih pitanja je način fiksacije uzorka koji mora spriječiti aktivaciju *in vitro*.

U međuvremenu su se razvile metode koje se temelje na funkcionalnoj aktivnosti, pri čemu je mjerenje oslobođenog serotonina iz granula postavljeno kao zlatni standard određivanja aktiviranih trombocita jer predstavlja najvjerodostojniji biološki test. Ova su mjerenja uglavnom provedena metodama HPLC, ELISA ili (C¹⁴) obilježenim serotoninom (Dale i sur., 2002.; Gobbi i sur., 2003.). Ostaje i dalje problem zahtjevne tehnologije te financijski skupih monoklonskih antitijela koji ograničavaju ove metode.

1.7. Poremećaji raspoloženja

Poremećaji raspoloženja, kao što i sam naziv govori, imaju kao osnovno obilježje poremećeno (povišeno ili sniženo) raspoloženje.

Najviše korišteni kategorijski sustavi za dijagnosticiranje psihijatrijskih poremećaja su Dijagnostički i statistički priručnik (engl. Diagnostic and Statistic Manual, 4th Edition – DSM-IV, APA, 1994) i Međunarodna klasifikacija bolesti (engl. International Classification of Diseases, 10th revision, ICD-10, WHO, 1993)

Izraz depresija dolazi od latinske riječi depressum što znači potištenost. Depresija je stara koliko i čovječanstvo, smatra se jednom od najranije opisanih bolesti u povijesti medicine.

U 4. stoljeću pr. K. Hipokrat je iznio humoralnu teoriju nastanka melankolije smatrajući da se bolest razvija kada se crna žuč (*melanos* – crn, *chole* – žuč) izlije i dospije do mozga od čega i dolazi naziv melankolija.

Opisi bolesti nastavili su se kroz povijest medicine, u periodu staro rimske medicine to je opisao Araetus iz Kapadokije, u drugom stoljeću novog vijeka nagovijestio je povezanost depresivnoga oboljenja s poremećajima koji podsjećaju na maniju, a Galen u isto vrijeme, kao pristaša humoralne teorije, opisuje depresivni poremećaj. U svom dijelu iz 1621., »Anatomy of melancholy«, autor, engleski svećenik Robert Burton, opisuje psihološke i socijalne uzroke povezane s melankolijom. Značajnija istraživanja i razmatranja na području dijagnostike i liječenja depresivnog poremećaja počinju tek u 19. stoljeću (U Wallace RE IV, Gach J, editors. History of Psychiatry and Medical Psychology. New York: Springer; 2006)

Bleuler je u svojim opisima ravnopravno upotrebljavao termin melankolija i depresija. On je 1911. godine jasnije razgraničio maničnodepresivnu psihozu, koja ima remitirajući tijek, od drugih afektivnih i ostalih psihoza. Dosadašnji pokušaji klasificiranja depresija uglavnom se na-

laze na deskriptivnoj, odnosno simptomatskoj razini. Većina autora prihvaća podjelu depresija na dvije osnovne grupe: endogene i egzogene depresije

Depresija predstavlja vrlo često poremećaj, životni rizik za oboljenje od velikog depresivnog poremećaja iznosi približno 15% (Bland, 1997.). Depresija uzrokuje značajne obiteljske, profesionalne i socijalne poteškoće, dovodi do radne i socijalne disfunkcionalnosti, sa procjenom da depresija čini 13–14% od svih disfunkcionalnosti i prerane smrti u svijetu. Istovremeno je to i jedan od najtežih poremećaja u psihijatriji jer čak do 15% osoba završava život samoubojstvom (Bostwick i sur., 2000.), a kod osoba iznad 55 godina opća smrtnost je i do 4 puta veća. Poremećaj je kroničan tako da je vjerojatnost nastanka sljedećih epizoda depresije nakon prve epizode 50–60%, nakon druge 70%, a nakon treće čak 90%.

Depresivni je poremećaj u ukupnoj populaciji na četvrtom mjestu po učestalosti, s udjelom od 4,5% u globalnom teretu bolesti, dok depresija za žene predstavlja drugi po redu zdravstveni problem. Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će depresija do 2020. godine postati drugi zdravstveni problem u svijetu iza ishemijske bolesti srca s udjelom od 5,7%, a kod ženske populacije vodeći zdravstveni problem. Rizik oboljenja od velikog depresivnog poremećaja (VDP) češći je 1,6–3,1 puta kod žena nego kod muškaraca sa značajnom disproporcijom u Sjedinjenim Američkim Državama i zemljama zapadne Europe. Razlika među spolovima počinje se uočavati u periodu puberteta, uočeno je pogoršanje simptoma kod žena koje koincidira sa pojavom prve menstruacije. Biopsihosocijalni model, koji objašnjava rizične čimbenike za razvoj depresije, razliku u prevalenciji depresivnog poremećaja između mladića i djevojaka pripisuje u prvom redu hormonskim utjecajem te većoj sklonosti djevojaka korištenju maladaptivnih strategija suočavanja sa stresom koje su usmjerene na emocije (Angold, 1999)

1.7.1. Potrebe za biološkim pokazateljima u poremećajima raspoloženja

Unatoč kliničkoj slici, veliki depresivni poremećaj (VDP) često u pojedinim osoba ostaje dugo vremena neprepoznat te stoga i neadekvatno liječen.

U jednoj studiji na 500 bolesnika s VDP 48% bolesnika bilo je pregledano kod 5 ili više liječnika prije postavljanja dijagnoze, a u 35% bolesnika je prošlo prosječno 10 godina od prvog javljanja bolesti pa do postavljanja ispravne dijagnoze (Lish i sur., 1994.).

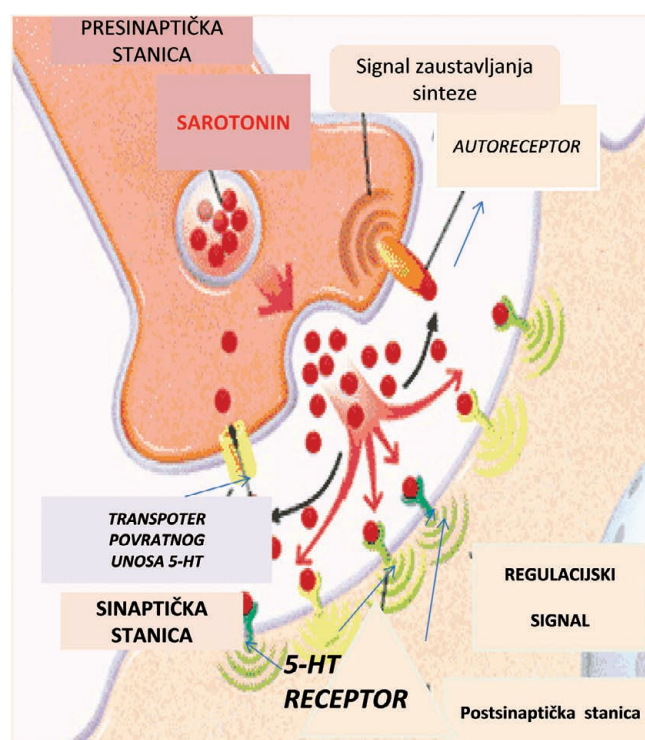
Slično tome, rezultati jedne objavljene studije ukazuju da samo jedna trećina bolesnika s VDP zatraži pomoć u prvoj godini svoje bolesti, dok u jedne trećine prođe čak najmanje 10 godina do prvog javljanja liječniku (Hirschfeld i sur., 2003.), dok se smatra da je u shizofreniji to razdoblje u prosjeku kraće te iznosi 1 do 2 godine (Hafner i Maurej, 2006.).

U gore navedenoj studiji 69% bolesnika s VDP je u početku liječenja imalo pogrešnu dijagnozu, najčešće povratnog depresivnog poremećaja (60%) (Hirschfeld i sur., 2003.). Bolesnici

često ne spominju ili uopće nisu svjesni epizode manije, a posebice hipomanije, a liječniku se javljaju samo kada se nalaze u depresivnoj epizodi.

Dok povišeno raspoloženje stvara osjećaj ugone, sniženo raspoloženje vrlo je teško i neugodno za bolesnike te se oni tada javljaju za pomoć liječniku. Konzultacija s članovima obitelji može pomoći u otkrivanju ranijih epizoda povišenog raspoloženja. Sve je više dokaza o biološkim uzročnim čimbenicima koji, zajedno sa okolišnim socijalnim čimbenicima, dovode do duševnih bolesti. Interakcija je vrlo složena i uključuje niz okolišnih čimbenika koji mogu mijenjati biološku ravnotežu središnjeg živčanog sustava (SŽS), ali i obrnuto, čitav sustav od molekula i iona, preko staničnih struktura, neurona i glija stanica do neuroprijenosnika, u određenim makroanatomskim strukturama središnjeg živčanog sustava, može utjecati na izražavanje nečije osobnosti, a time utjecati na socijalno okruženje pojedinca. Točna neurobiološka osnova depresivnog poremećaja još nije u potpunosti objašnjena iako je već prije 40 godina postavljeno hipoteza po kojoj je depresija posljedica snižene razine serotonina i disfunkcije serotonegičnog, dopaminskog i noradrenalinskog sustava (Coppen, 1967.). Jedan od načina pojašnjenja neurobiologije bio bi otkriće novih bioloških čimbenika. Još uvijek nije postignuta suglasnost o postojanju pouzdanog biološkog uzročnog čimbenika u depresivnom poremećaju.

Prepoznavanje bioloških pokazatelja, lako primjenjivih u svakodnevnoj kliničkoj praksi, posebno je važno u onih osoba koje imaju depresivnu epizodu, a još nisu imali epizodu manije (Yatham i sur., 1997.). Postojanje takvih pokazatelja pomoglo bi u razumijevanju etiologije afek-



Slika 1.6. Transport serotonina između neurona – prema slici preuzetoj s [www.NeuroNexus – Neuroanatomy](http://www.NeuroNexus-Neuroanatomy)

tivnih poremećaja te točnijem i ranijem postavljanju dijagnoze, a time i njihovom liječenju. U proteklim godinama istraživanja su bila usmjerena na pronalaženje i kliničku primjenjivost perifernog biološkog pokazatelja u depresivnim poremećajima. Između ostalog rezultati ispitivanja koncentracije glavnog metabolita serotonina 5-HIAA u likvoru pokazali su snižene vrijednosti u bolesnika s depresivnim poremećajem (Asberg, 1976), ali kasnija istraživanja nisu potvrdila razliku u koncentraciji bolesnika s depresivnim poremećajem i zdravih osoba (Reddy, 1992; Placidi, 2001.). Među mogućim poremećajima, pretpostavka manjkave serotoninske neurotransmisije (prijenosa podražaja) u središnjem živčanom sustavu (SŽS) prevladava u razumijevanju depresije, te u farmakološkom pristupu liječenju (Hindmarch, 2001.).

Novija istraživanja potvrdila su da je u depresivnih bolesnika pojačana brzina povratnog unosa serotonina među neuronima (Barton, 2008). Transport serotonina među neuronima prikazan je na slici 1.6.

Usprkos tome nije razjašnjeno da li je to posljedica pojačane neuralne aktivnosti, poboljšanog vezikuarnog propuštanja i/ili mogućeg intraneuralnog metabolizma serotonina.

Između ostalih pretpostavki ispitivana je i smanjena dostupnost 5-HTt u mozgu (Jakovljević 1997.; Malison 1998.). Za sada među mogućim poremećajima prevladava, pretpostavka manjkave serotoninske neurotransmisije (prijenosa podražaja) u središnjem živčanom sustavu. Serotoninska pretpostavka (hipoteza) podrazumijeva relativan ili apsolutan manjak neuroprijenosnika serotonina. Studija pozitronske emisijske tomografije (PET) utvrdila je smanjenu sintezu serotonina u dijelovima limbičkog i paralimbičkog korteksa u depresivnih bolesnika u usporedbi sa zdravom kontrolom (Rosa-Neto i sur., 2004.).

Do sada je utvrđeno 14 različitih receptora 5HT na neuronima, svaki sa specifičnim farmakološkim, funkcionalnim i anatomskim profilom. Najviše su istraživani receptor tipa 1A (5-HT_{1A}) u etiologiji depresivnih poremećaja. Razlog je njegova velika rasprostranjenost u raznim regijama mozga i terapijska mogućnost aktiviranja presinaptičkih 5-HT_{1A} autoreceptora za serotonin ili inhibiranje njihovih agonista (Kreiss, 1994.).

Usprkos brojnim istraživanjima još uvijek ne postoji suglasnost o postojanju pouzdanoga **perifernog** biološkog pokazatelja u poremećajima raspoloženja. Prepoznavanje takvog pokazatelja potrebno je iz nekoliko razloga:

1. pomoć kod postavljanja dijagnoze;
2. pomoć u razumijevanju etiologije poremećaja;
3. pomoć u izboru liječenja i praćenju učinkovitosti terapije.

Dok se takvi pouzdani pokazatelji ne otkriju, klinička procjena psihijatra ostaje presudna u postavljanju dijagnoze i određivanju liječenja (Leonard, 2000.). Među mogućim perifernim pokazateljima najviše se istraživao trombocitni serotonin radi razloga koji su već navedeni te se istovremeno vjerojatno najviše približio zadovoljavanju kriterija upravo perifernog pokazatelja depresivnih poremećaja.

7.1.2. Koncentracija trombocitnog serotonina u poremećajima raspoloženja

Mnogo je više istraživanja bioloških pokazatelja bilo u bolesnika s PDP nego s BAP-manijom ili BAP-depresijom (Höschl, 2000.; Shiah i Yatham, 2000.; Mahmood i Silverstone, 2001.). To je nedvojbeno povezano s teškoćama uključivanja maničnih bolesnika u istraživanja.

Razina trombocitnog serotonina intenzivno se istraživala u bolesnika s depresivnim poremećajima, a studije su pokazale uglavnom, ali ne i uvijek, sniženu koncentraciju trombocitnog serotonina. Neke od tih studija koje su istraživale koncentraciju trombocitnog serotonina prikazane su redoslijom u tablici Tablica 1.2.

Tablica 1.2. Prikaz dosadašnjih studija trombocitnog serotonina u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem (prema Šagud, 2007.)

<i>Studija/Godina</i>	<i>Studijska populacija</i>	<i>Rezultat</i>
Takashi, 1976	20 bolesnika sa unipolarnom depresijom i 19 sa involutivnom depresijom, 20 prva epizoda depresije, 118 zdravih ispitanika	Bolesnici sa unipolarnom i involutivnom depresijom su imali nižu koncentraciju trombocitnog serotonina nego zdrave osobe
Sarrias i sur, 1987	18 bolesnika sa melankolijom, nisu dobivali antidepresiv posljednjih godinu dana, a terapija benzodiazepinima je ukinuta 2 tjedna ranije, 20 osoba u kontrolnoj skupini	Koncentracija trombocitnog serotonina značajno niža, od zdrave kontrole, nije bilo razlike u ukupnom i slobodnom triptofanu, niti je bilo koji pokazatelj ovisio o dobi i tj. težini
Jakovljević i sur, 1991	62 bolesnika sa shizofrenijom, 19 sa shizoafektivnim poremećajem i 60 sa povratnim depresivnim poremećajem	Period ispiranja od prethodne terapije 7 dana, bolesnici sa psihotičnom depresijom su imali značajno višu koncentraciju trombocitnog serotonina nego bolesnici sa nepsihotičnom depresijom
Mann i sur, 1992	29 depresivnih bolesnika, 12 nakon pokušaja suicida, miješana skupina koja uključuje i bolesnike sa psihotičnom depresijom i sa BAP depresijom, te 27 zdravih osoba	Nije bilo razlike u razini trombocitnog serotonina između čitave skupine depresivnih bolesnika i kontrolne skupine. Međutim su bolesnici nakon pokušaja suicida imali značajno nižu razinu trombocitnog serotonina
Quintana, 1992	25 neliječenih depresivnih bolesnika i 25 zdravih osoba	Koncentracija trombocitnog serotonina niža u depresivnih bolesnika

Mück-Šeler i sur, 1996		<i>Nepsihotični depresivni pacijenti su imali nižu, a psihotični višu koncentraciju trombocitnog serotonina u odnosu na kontrolu. Suicidalni bolesnici imali su nižu koncentraciju trombocitnog serotonina od nesuicidalnih depresivnih pacijenata, a najnižu koncentraciju imala je skupina pacijenata koji su počinili suicid.</i>
Maurej-Spurej i sur. 2004	<i>27 bolesnika (13 neliječenih, 14 koji uzimaju SSRI)</i>	<i>Vrsta depresije nije navedena, koncentracija trombocitnog serotonina niža u neliječenih depresivnih bolesnika</i>
Mück-Šeler i sur. 2004.	<i>20 bolesnica s shizofrenijom, 25 depresivnih bolesnica, 25 zdravih žena u kontrolnoj skupini. U vrijeme uzorkovanja shizofrene i depresivne bolesnice nisu dobivale lijekove najmanje 7 dana</i>	<i>Koncentracija trombocitnog serotonina bila je značajno viša kod shizofrenih bolesnica nego kod depresivnih i zdravih kontrola, dok je bila značajno niža kod depresivnih bolesnica u odnosu na zdrave kontrole i shizofrene bolesnice.</i>

CILJ I SVRHA RADA

Suvremena tehnološka dostignuća omogućila su precizni uvid u funkcionalnu aktivnost trombocita u procesu koagulacije krvi te mogući uvid u značaj pojedinih njihovih kvantitativnih i kvalitativnih morfoloških karakteristika i njihovih aberacija u dijagnostičke svrhe u hematologiji.

Istovremeno se vrlo intenzivno izučava sadržaj serotonina u trombocitima u perifernoj krvi (**periferni serotoninski sustav**) radi svoje analogije s **centralnim serotoninskim sustavom** u mozgu pri čemu je od posebnog mogućeg dijagnostičkog interesa opažena promjena njegove koncentracije u bolesnika s duševnim bolestima.

Unatoč brojnim studijama ostala je neutvrđena moguća povezanost između pojedinih morfoloških karakteristika (pokazatelja) i razine trombocitnog serotonina u zdravih odraslih osoba i boleska u depresivnim stanjima.

Iako su studije pokazale da je u tih bolesnika razina trombocitnog serotonina snižena, nisu utvrđene mjere dijagnostičke točnosti tih laboratorijskih metoda koje bi se zahvaljujući novim tehnološkim dostignućima mogle koristiti u dijagnostičke svrhe u što objektivnijem i preciznijem strukturiranju depresivnih poremećaja.

Stoga će istraživanja u ovoj studiji biti istovremeno usmjerena u određivanje :

1. kvantitativnih i kvalitativnih morfoloških karakterika trombocita kao što su veličina stanica izražena kao MPV, njihov polimorfizam izražen kao PDW, ukupna zastupljenost izražena kao Pct i udjel mađih tromobica te
2. utvrđivanje razine serotonina u trombocitima u skupini zdravih ispitanika i skupini neliječeni bolesnika s depresivnim poremećajem nerazvrstanim prema psihijatrijskoj ljestvici subklasifikacije bolesti

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ispitanici

3.1.1. Zdrave osobe

Kriteriji za uključivanje u ispitivanje za sve skupine zdravih ispitanika bili su:

1. da nemaju aktualnih psihičkih poremećaja;
2. da nemaju psihičkih poremećaja u anamnezi;
3. da nisu tijekom ispitivanja te ranije bili na terapiji psihofarmacima;
4. da su bili potpuno tjelesno zdravi i nisu uzimali nikakve lijekove jedan mjesec prije uzimanja uzorka, posebno lijekove koji utječu na funkcionalnu aktivnost trombocita.

Ispitanike zdrave kontrolne skupine ($N = 179$) činili su zdravi dobrovoljci prema gore navedenim kriterijima iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu ($N = 60$), djelatnici KB »Sestre milosrdnice« ($N = 68$), te studenti Sveučilišta u Zagrebu koji su bili na nastavi u KB »Sestre milosrdnice« ($N = 51$).

Kontrolna skupina ispitanika bila je sastavljena od ispitanika oba spola ($M = 98$, $\bar{Z} = 80$) i prosječne životne dobi $49 \pm 12,2$ SD u rasponu od 19 do 79 godina. Kontrolna skupina ispitanika je bila prikupljena u razdoblju od 5 mjeseci.

3.1.2. Bolesnici

Kriteriji za uključivanje u ispitivanje za sve bolesne ispitanike bili su:

1. da imaju aktualan depresivni poremećaj;
2. da nemaju drugih psihičkih poremećaja u anamnezi;
3. da nisu tijekom ispitivanja te unatrag dva mjeseca bili na terapiji psihofarmacima;
4. da su bili potpuno tjelesno zdravi i nisu uzimali nikakve lijekove tijekom jednog mjeseca prije uzimanja uzorka, posebice lijekove koji utječu na funkcionalnu aktivnost trombocita.

Skupinu bolesnih ispitanika činili su bolesnici Klinike za psihijatriju KB »Sestre milosrdnice« (N = 137). Ispitanici su bili oba spola (M = 72, $\bar{Z}$ = 65) i prosječne životne dobi $53 \pm 10,4$ SD u rasponu od 22 do 88 godina. Skupina bolesnih ispitanika je prikupljena u razdoblju od 12 mjeseci.

Svaki ispitanik u obje skupine usmeno je obaviješten o razlozima uzimanja uzorka i potpisom je potvrdio pristanak za sudjelovanje u ispitivanju (»obaviješteni pristanak«).

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu te Etičko povjerenstvo KB »Sestre milosrdnice«.

3.2. Uzorci krvi

3.2.1. Uzorkovanje

Uzorci krvi uzimani su od dobrovoljnih darivatelja krvi prilikom rutinskog darivanja krvi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu u vremenu od 7 do 9 sati prijepodne.

Uzorci krvi uzimani od djelatnika KB »Sestre milosrdnice« i studenata Sveučilišta u Zagrebu uzimani su u ambulanti Kliničkog zavoda za kemiju u vremenu od 8 do 9 sati prijepodne.

Svi uzorci krvi bili su uzimani u standardne spremnike proizvođača *Greiner* K₃EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) od 3 mL, s molarnom koncentracijom antikoagulansa $4,55 \pm 0,85$ mmol / L krvi, prema preporuci ICSH (International Council for Standardization in Hematology).

3.2.2 Prijevoz i skladištenje uzoraka

Uzorci su dopremljeni iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu u vremenu od jednog sata od uzimanja u fiksiranim stalcima bez pothlađivanja.

Svi su uzorci bili skladišteni najdulje 2 sata na sobnoj temperaturi prije analiziranja.

3.3. Određivanja broja trombocita, MPV-a i PDW-a

Broj trombocita, MPV i PDW u svim uzorcima venske krvi odredili smo na hematološkom analizatoru Beckman Coulter LH 750 (Beckman Coulter, Miami, SAD).

Beckman-Coulter 750 je automatski hematološki analizator za *in vitro* dijagnostiku u kliničkim hematološkim laboratorijima. Analizator određuje 24 hematološka parametara pri čemu se izravno mjere u krvi: broj leukocita (WBC), broj eritrocita (RBC), koncentracija hemoglobina (HGB), broj trombocita (PLT), broj retikulocita (RTC), broj eritroblasta (NRBC), prosječni volumen eritrocita (MCV), prosječni volumen trombocita (MPV) i prosječni volumen retikulocita

(MRV), dok se ostali parametri (HCT, MCH, MCHC, RDW, **PCT**, **PDW**, IRF) izračunavaju iz podataka o izmjerenim parametrima.

Instrument radi po načelu impedancije i volumetrijskog brojenja krvnih stanica. Razrijeđena suspenzija stanica prolaskom kroz strujni krug izaziva promjene otpora koje izazivaju promjene napona, što se bilježi detektorima, a nastali se signali prevode u električne impulse koji se broje. Količina volumena izotonične elektrolitne otopine koju stanice izbijaju svojim prolaskom analogna je visini električnog impulsa i rabi se za određivanje staničnog volumena.

Temeljem principa VCS-tehnologije, prema kojem se ujedanjuju karakteristike stanica leukocitne loze tako da se volumen stanice određuje impedancijskom metodom, a nukleocitoplazmatski omjer, granuliranost stanica i gustoća jezgre razlikama u vodljivosti radiofrekventnih signala, analizator prikazuje dvodimenzionalni citogram. Taj prikaz grupira stanične populacije, a broj točkica u svakoj populaciji označuje koncentraciju pojedine vrste stanica i naziva se *scategram*. Računalnom obradom dobiva se peterodijelna diferencijalna krvna slika koja razlučuje populacije neutrofilnih granulocita, limfocita, monocita, eozinofilnih i bazofilnih granulocita. Rezultat se izražava u relativnim (%) i apsolutnim ($\times 10^9/L$) vrijednostima leukocitnih populacija.

U analizi svakog uzorka analizator automatski sve parametre određuje tri puta u zasebnim komoricama i kao rezultat izdaje srednju vrijednost određivanja.

Analizator određuje još pet parametara krvnih stanica koji još nisu usvojeni za upotrebu u kliničkim hematološkim laboratorijima. Ti parametri imaju oznaku @ koja se nalazi ispred kratice parametara ispisanih na pregledniku:

@ **HLR** % = high light scatter reticulocytes %

@ **HLR** # = high light scatter reticulocytes #

@ **MSCV** = mean sphered cell volume

@ **Pct** = plateletcrit

@ **PDW** = platelet distribution width

Broj trombocita i MPV određivani impedancijskom metodom akreditirane su pretrage Kliničkog zavoda za kemiju KB »Sestre milosrdnice« prema HR EN ISO 15189:2006. Nepreciznost za broj trombocita i MPV izražena kao koeficijent varijacije na godišnjoj razini za 2010. godinu bila je:

CV (trombociti) = 2,92%, dok je za MPV bila CV = 1,01%.

3.3.1. Određivanje Pct (*engl. plateletcrit*) – trombokrita

Trombokrit je parametar koji je rezultat umnoška broja trombocita i njihovog MPV-a. Izražava kao se numerička frakcija te stoga nema mjerne jedinice.

3.3.2. Određivanje PDW-a (*engl. platelet distribution width*) – raspodjela trombocita po volumenu

Na Beckman Coulterovima analizatorima raspodjela trombocita po volumenu izražava se kao koeficijent varijacije volumena i rezultat je matematičkog izračuna prema formuli:

$$\text{PDW} = 10 \times V \text{ kod } 16\% / V \text{ kod } 84\% \times \text{konst.}$$

konst = faktor korekcije koinkidencije.

3.4. Određivanja udjela retikuliranih trombocita (rPI)

Udjel retikuliranih trombocita odredili smo na hematološkom analizatoru Abbott CD Sapphire.

Instrument radi po načelu protočne citometrije brojenja krvnih stanica (laserska tehnologija rasipanja svjetlosti uporabom plavog argonskog lasera). Razrijeđena suspenzija stanica prolaskom ispred izvora svjetla (laser) raspršuje svjetlo, što se bilježi detektorima, a nastali signali prevode se u električne impulse koji se broje. Količina raspršenog svjetla razmjerna je površini s koje se odbija te se visina električnog impulsa rabi za određivanje staničnog volumena.

Broj eritrocita (RBC) i broj trombocita (PLT) određuju se istodobno optičkom (RBCo) i impedancijskom (RBCi) metodom brojenja. Optičkom metodom brojenja trombocita uklanjaju se interferencije pri brojenju trombocita koje uzrokuje prisutnost fragmenata eritrocita ili mikrociti (eritrociti smanjenog volumena), koji interferiraju u impedancijskoj metodi brojenja.

Brojač određuje retikulocite u perifernoj krvi po načelu fluorescencije. Retikulocitni reagens sadrži fluorescentnu boju (tiazol-narančastu) kojom se boji ribonukleinska kiselina u retikulocitima kao i u mlađim retikuliranim trombocitima. Fluorescencija nastalog obojenja mjeri se na 530 nm. Rezultat se izražava u relativnim (postotnim) i apsolutnim ($\times 10^9/\text{L}$) vrijednostima retikulocita. Intenzitet fluorescencije razmjeran je stupnju nezrelosti retikulocita, što se koristi za određivanje parametra IRF (*engl. immature reticulocyte fraction*) ili frakcije nezrelih retikulocita. Na isti način primjenom računalnog programa analizator određuje udio nezrelih trombocita koji se izražava kao % rPI.

3.5. Priprema suspenzije trombocita za određivanje koncentracije serotonina

3.5.1. Priprema plazme bogate trombocitima (PRP)

Nakon što smo u svakom uzorku venske krvi odredili trombocitne pokazatelje na hematološkim analizatorima, uzorak smo centrifugirali 10 min na 200 G (500 okretaja/min) na temperaturi od 20 °C.

Odvojili smo gornji dio supernatanta kojeg čini plazma bogata trombocitima (PRP). Broj trombocita odredili smo na hematološkom analizatoru neposredno nakon odvajanja uz prethodno protresanje.

3.5.2. Postupak suspendiranja trombocita

Nakon određivanja broja trombocita odvojili smo 200 μ L PRP i dodali 800 μ L fiziološke otopine.

Taj smo uzorak centrifugirali 10 minuta na 4500 G (4000 okretaja/min) na 4 °C.

Nakon centrifugiranja uklonili smo supernatant i na talog dodali 200 μ L destilirane vode. Zatim smo u električnoj mješalici (*engl. vortex mixer*) uzorak miješali 1 minutu. Iz ovako pripremljene suspenzije trombocita skladištili smo 100 μ L na temperaturu –20 °C do određivanja koncentracije serotonina. Vrijeme skladištenja bilo je najduže 4 tjedna.

3.6. Određivanje koncentracije serotonina u trombocitima enzimimunoanalizom (*engl. enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA).

Koncentraciju serotonina u trombocitima određivali smo testom ELISA FAST, verzija 2, 2009/2010 proizvođača DRG (DRG Instruments GmbH, Njemačka).

Prije određivanja količine serotonina, uzorke suspenzije trombocita termostatirali smo na sobnu temperaturu i centrifugirali 2 min na 10.000 okretaja/min.

Postupak određivanja količine serotonina u trombocitima ovom metodom pretpostavlja kvantitativno aciliranje serotonina u svim uzorcima.

Aciliranje kontrolnih uzoraka, standarda i uzoraka suspenzije trombocita izvodi se dodatkom:

1. 25 μ L acilirajućeg reagensa
2. pufera 250 μ L acilirajućeg pufera
3. 25 μ L uzorka.

Nakon toga se reakcijska smjesa neprekidno miješa tijekom 15 minuta na temperaturi od 20–25 °C.

Ovako pripremljeni standardi, kontrole i uzorci pipetiraju (25 μ L) se u jažice mikrotitarske ploče na čijim se stijenkama nalazi vezana definirana količina antigena (serotonin).

Dodatkom 100 μL antiseruma sa serotoninским antitijelima i inkubiranjem na 20–25 $^{\circ}\text{C}$ uz stalno protresanje u trajanju od 1 sata dolazi do kompetitivnog vezivanja serotonina iz suspenzije trombocita i vezanog na stijenke jažica.

Nakon što je postignuta reakcijska ravnoteža, suvišak slobodnog antigena (serotonina) i kompleksa antigen – antiserum ispere se trostrukim ispiranjem svaki put s 300 μL pufera za ispiranje.

Mikrotitarske ploče se nakon ispiranja prislone na apsorbirajuću podlogu.

U svaku jažicu doda se 100 μL enzimskog konjugata i inkubira 30 minuta uz protresanje.

Enzimski konjugat sastavljen je od anti-zečjih IgG-peroksidaza koji se veže na antitijela vezana na antigen na stijenkama.

Peroksidaza katalizira oksidaciju TMB (tetrametilbenzidina) pri čemu se formira obojeni kompleks, a sama se reakcija zaustavlja dodatkom 100 μL otopine koja sadrži 0,25 M H_2SO_4 . Nakon dodatka otopine za zaustavljanje enzimske reakcije količina stvorenog obojenog kompleksa određuje se očitanjem ekstinkcija u mikrotitarskoj ploči na automatskom čitaču mikrotitarske pločice (Humana – Microreader, Njemačka) fotometrijski na 450 nm.

Kalibracijska se krivulja izrađuje sa šest standardnih otopina u rasponu vrijednosti od 0 do 2500 ng/mL serotonina. Interpoliranjem vrijednosti ekstinkcije uzorka na krivulju, očitava se vrijednost količine serotonina u ispitivanom uzorku.

3.6.1. Izračunavanje koncentracije serotonina u trombocitima

Ukoliko se koncentracija serotonina želi izraziti na broj trombocita potrebno je koncentraciju serotonina u ng/mL dobivenu očitanjem iz krivulje pomnožiti s 1000 i podijeliti s brojem trombocita u PRP – u izraženim na 10^9 .

Formula:

$$\frac{\text{koncentracija serotonina (ng/mL)} \times 1000}{\text{broj trombocita u PRP (10}^9\text{)}}$$

3.7. Postupak kratke evaluacije analitičkog sustava i metode ELISA

Postupak je učinjen prema protokolu ECCLS.

3.7.1. Nepreciznost u seriji

Nepreciznost je ispitana na 10 ponavljanja u seriji. Kao uzorak korištena je komercijalna kontrola (Control 1) proizvođača DRG (DRG Instruments GmbH, Njemačka).

3.7.2. Netočnost

Netočnost je ispitana određivanjem količine serotonina u komercijalnim kontrolama (Control 1 i Control 2) proizvođača DRG (DRG Instruments GmbH, Njemačka) s dvije razine vrijednosti u razdoblju od 12. 01. 2010. do 23. 01. 2011. godine.

3.7.3. Verifikacija referentnog intervala

Provedena je sa rezultatima koncentracije serotonina dobivenih u 144 zdrava ispitanika.

3.7.4. Usporedba s odabranom metodom

Odabrana metoda za usporedbu u ovom je radu bila metoda tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC). Učinjena je usporedba sa 44 uzorka ispitanika s vrijednostima iz cijeloga koncentracijskog područja.

3.8. Statistička obrada

Razina statističke značajnosti određena je na $p < 0.05$ i svi intervali pouzdanosti dani su na razini od 95%. Normalnost distribucije frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina ispitivana je Kolmogorov-Smirnov (KS) testom (kvantifikacija diskrepance distribucije izmjerenih vrijednosti i Gaussove distribucije).

Usporedivost rezultata dviju metoda ispitana je regresijskom raščalmbom Passing – Bablok.

Deskriptivne varijable skupine ispitanika s depresivnim poremećajem i kontrolne skupine zdravih ispitanika prikazane su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom.

Značajnost razlike ispitivanih trombocitnih pokazatelja i koncentracije serotonina između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem ispitana je Student t-testom za nezavisne uzorke (unpaired t-test; F test sa df; [$df = \text{stupanj slobode} - \text{engl. degrees of freedom}$]). Rezultati su interpretirani na 5%-tnoj ili nižoj razini značajnosti ($p < 0.05$).

Statistička značajnost povezanosti životne dobi i koncentracije serotonina utvrđena je linearnom regresijom u kojoj je koncentracija serotonina bila ovisna varijabla, a dob u godinama prediktorska varijabla. Rezultati su interpretirani s granicama pouzdanosti od 95 % Interpretacija hipoteza učinjena je iz statističke značajnosti izračunate F vrijednosti. Jakost povezanosti izražena je kroz izračunati koeficijent determinacije r^2 . Na isti način je ispitana statistička značajnost povezanosti svih trombocitnih pokazatelja i koncentracije serotonina u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika i bolesnika s depresivnim poremećajem. Statistička značajnost povezanost koncentracije serotonina s veličinom trombocita iskazanom kao manji i veći trombociti zasebno za kon-

trotnu skupinu i za skupinu s depresivnim poremećajem provjerena je logističkom regresijom. Osjetljivost i specifičnost trombocitnog serotonina kao dijagnostičkih pokazatelja depresivnog poremećaja određena je ROC analizom.

Sve su statističke obrade obavljene u programskom paketu SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) i programskom paketu MedCalc 11.5.0.0.[®] za Windows (MedCalc Software, Broekstraat 52, B-9030 Mariakerke, Belgiume).

4. REZULTATI

4.1. Postupak kratke evaluacije ELISA metode

Postupak evaluacije ELISA metoda kojom je u radu određena količina serotonina u lizatima trombocita, te iz nje izračunata količina serotonina u trombocitima ($\text{ng}/10^9$), u obje skupine ispitnika učinjen je prema smjernicama ECCL.

4.1.1. Mjerna preciznost

Preciznost u seriji ispitana je s 10 uzoraka u seriji. Kao uzorak koristili smo komercijanu kontrolu proizvođača s deklariranom ciljnom vrijednosti serotonina od $100 \text{ ng} / 10^9$ trombocita. Preciznost u seriji korištenom ELISA metodom je; $KV = 10,4\%$.

$$\Delta X = 108,0; SD = 11,3; KV = 10,4$$

Tablica 4.1.1. Rezultati 10 uzastopnih određivanja uzorka (komercijalne kontrole) u seriji

1	107,0
2	127,0
3	107,0
4	89,0
5	91,0
6	107,0
7	110,0
8	114,0
9	116,0
10	112,0
ciljna vrijednost	100,00

4.1.2. Netočnost

Netočnost ELISA metode korištene u određivanju količine serotonina u trombocitima u obje grupe ispitanika ispitana je u 3 određivanja komercijalnih kontrolnih uzoraka od proizvođača s dvije razine vrijednosti serotonina u trombocitima (100 i 350 ng /10⁹ trombocita).

$$\text{Netočnost (R \%)} = X_{\text{analita}} / \text{ciljna vrijednost} \times 100$$

U Tablici 4.1.2. prikazani su rezultati 3 određivanja komercijalnih kontrolnih uzoraka

Tablica 4.1.2. Rezultati 3 određivanja komercijalnih kontrolnih uzoraka s dvije razine vrijednosti te izračun netočnosti ELISA metode za određivanje količine serotonina u trombocitima.

	Kontrola 1	Kontrola 2
1	107,5	327,4
2	107,2	343,3
3	78,2	353,3
ciljna vrijednost:	100	350
X	98,23	343,48
SD	11,94	9,94
CV	12,16	2,90
R	-1,78	-1,86

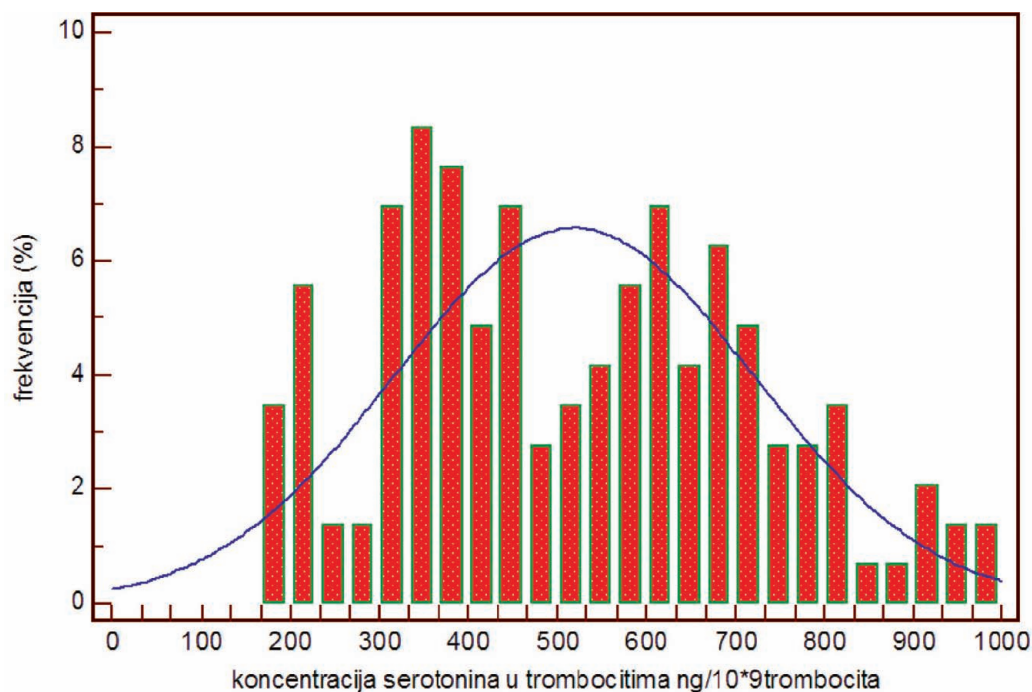
Netočnost ELISA metode za određivanje količine serotonina korištene u ispitivanjima je R = 1,86%

4.1.3. Referentni interval

Očekivani interval vrijednosti serotonina u trombocitima za zdravu populaciju određivan ELISA metodom prema proizvođaču je od 215–850 ng /10⁹ trombocita.

Provjera intervala učinjena je s rezultatima 144 zdrava ispitanika.

Na slici 4.1. Grafički prikaz učinjen je s pomoću statističke programske potpore MedCalc i prikazuje histogram raspodjele dobivenih podataka o količini serotonina u trombocitima za zdrave ispitanike na kojima je učinjena provjera deklariranog intervala. Rezultati su razvrstani 50 djelova, te je prikazana i frekvencija rezultata.



Slika 4.1. Histogram raspodjele podataka o koncentraciji serotonina u trombocitima u zdravoj populaciji

Normalnost raspodjela testirali smo Kolmogorov-Smirnovim testom za provjeru normalne distribucije.

U tablici 4.1.3. prikazani su rezultati testiranja Kolmogorov-Smirnovim testom koji ukazuju da nema bitna razlike između mediana i aritmetičke sredine te se radi o normalnoj raspodjeli u referentnom intervalu.

Tablica 4.1.3 Rezultati testiranja Kolmogorov-Smirnovim testom referentnog intervala

Normalne varijable	
Veličina uzorka	144
Najniža vrijednost	172,4000
Najviša vrijednost	999,7000
Aritmetička sredina	527,7428
Median	528,3000
SD	198,5407
Kolmogorov-Smirnov test	
Za normalnu distribuciju prihvatljiv	(P=0,2921)

Prema našim ispitivanjima s 90%-tnom pouzdanosti koncentracija serotonina u trombocitima za ispitanu zdravu populaciju, s provjerom graničnih vrijednosti baziranoj na normalnoj distribuciji nalazi se unutar granica intervala:

Donja granica 201,5 (90% CI 184,6 – 231,8)

Gornja granica 940,2 (90% CI 904,2 – 999,7)

4.1.4. Usporedivost metode

Usporedivost ELISA metoda za određivanje koncentracije serotonina u trombocitima koju smo koristili u našim ispitivanjima za obje skupine ispitanika kako za zdrave ispitanike tako i za ispitanike s depresivnim poremećajem učinjena je određivanjem koncentracije serotonina u trombocitima u lizatima trombocita HPLC metodom. Predanalitički uvjeti za obje metode bili su istovjetni, što uključuje i transport zaleđenih uzoraka lizata trombocita s poznatim brojem trombocita na temperaturi od -20°C u KBC Osijek – Odjel za kliničku laboratorijsku dijagnostiku gdje je učinkovito određivanje koncentracije serotonina u trombocitima HPLC metodom u 44 uzorka.

Postoji li povezanost (korelacija) između rezultata dviju metoda i kolika je statistička značajnost korelacije ispitali smo statističkim postupkom Passing – Bablok regresije.

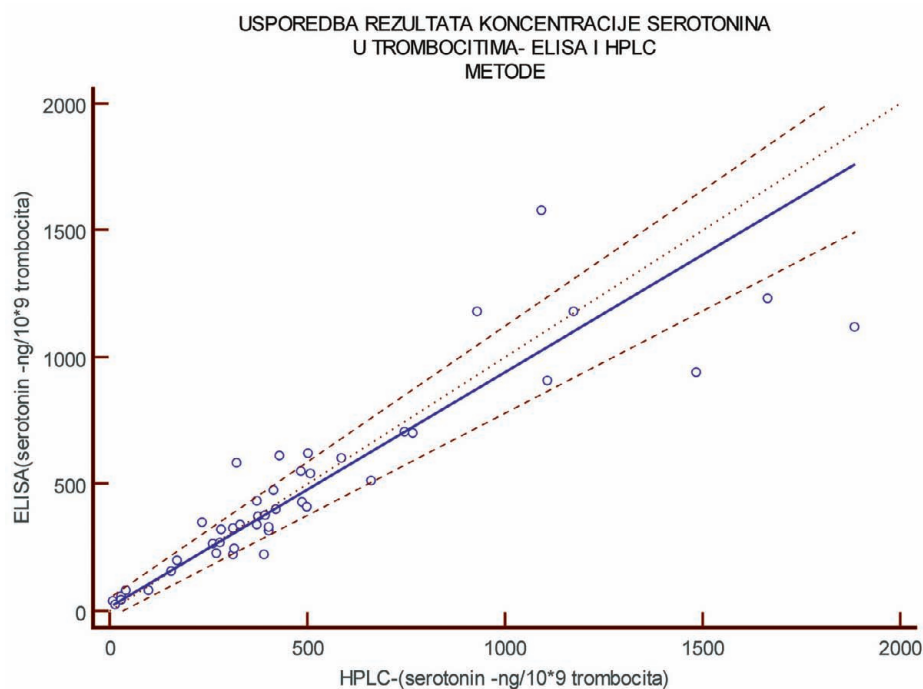
U statističkom modelu ispitivanja vrijednosti iste varijable – koncentracije serotonina u trombocitima izmjerene ELISA metodom i HPLC metodom postavili smo vrijednosti dobivene HPLC metodom kao poznatu varijablu x.

U tablici 4.1.4. prikazane su rezultati statističkog postupka Passing-Bablok regresije za usporedbu rezultata koncentracije serotonina u trombocitima ELISA i HPLC metodom.

Tablica 4.1.4. Rezultati Passing-Bablok regresije za usporedbu vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima ($\text{ng}/10^9$ trombocita) određenog ELISA i HPLC metodom.

varijabla X	rezultati HPLC metode	
varijabla Y	rezultati ELISA metode	
N = 44	varijabla X	varijabla Y
najniža vrijedost	10,10	23,60
najviša vrijednost	1887,00	1579,00
srednja vrijednost	501,00	474,29
median	393,35	374,50
SD	426,87	358,77
SE	64,35	54,08

Grafički prikaz Passing-Bablok regresije učinjen je s pomoću statističke programske potpore MedCalc pri čemu je prikazani regresijski pravac (puna linija) granice pouzdanosti regresijskog pravca (isprekidana linija) te idealan pravac (sitno isprekidana linija) i prikazan je na slici 4.2.



Slika 4.2. Grafički prikaz Passing-Bablok regresije za rezultate određivanja koncentracije serotonina trombocitima metodama ELISA i HPLC

Rezultati Passing-Bablok regresija za rezultate određivanja koncentracije serotonina u trombocitima metodama ELISA i HPLC s 95 %-tnom pouzdanosti nemaju značajno odstupanje među izmjerenim vrijednostima ($y = 12,0984 + 0,9266x$).

Privatljiva je vrijednost odsjeka regresijskog pravca **a** ($-25,5276 - 50,7125$), te nagiba **b** ($0,8053 - 1,0716$) ($P > 0.10$).

4.2. Usporedba trombocitnih pokazatelja između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem

U tablici 4.2. nalaze se podaci ispitivanih trombocitnih pokazatelja u punoj krvi i u PRP-u u zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem. Kako je razvidno iz tablice student t-testom za nezavisne uzorka nije utvrđena statistički značajna razlika ni u jednom ispitivanom trombocitnom pokazatelju između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem osim broja retikuliranih trombocita.

Tablica 4.2. Trombocitnih pokazatelji u punoj krvi i PRP-u u zdravoj kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s depresivnim poremećajem

	Zdrava kontrolna skupina (N=179)	Depresivni poremećaj (N=134)	Student t-test
Puna krv			
Trombociti ($\times 10^9/L$)	232,2 $\pm$ 46,9	244,6 $\pm$ 66,8	t=1.939; df=314; p=0.05
MPV (fL)	8,518 $\pm$ 1,018	8,412 $\pm$ 1,027	t=0.915; df=314; p=0.361
PDW(cv%)	16,463 $\pm$ 0,578	16,476 $\pm$ 0,687	t=1.151; df=314; p=0.852
Pct(1/1)	0,194 $\pm$ 0,033	0,205 $\pm$ 0,015	t=1.006; df=314; p=0.316
rPl (%)	1,585 $\pm$ 0,722	2,363 $\pm$ 1,381	t=3.106; df=314; p=0.003
PRP			
Trombociti ($\times 10^9/L$)	572,2 $\pm$ 178,2	535,2 $\pm$ 150,9	t=1.938; df=314; p=0.06
MPV(fL)	8,620 $\pm$ 0,986	8,392 $\pm$ 1,043	t=1.981; df=314; p=0.048
PDW (cv%)	16,228 $\pm$ 0,719	16,268 $\pm$ 0,694	t=0.490; df=314; p=0.624
Pct(1/1)	0,462 $\pm$ 0,116	0,437 $\pm$ 0,111	t=1,857; df=314; p=0.064

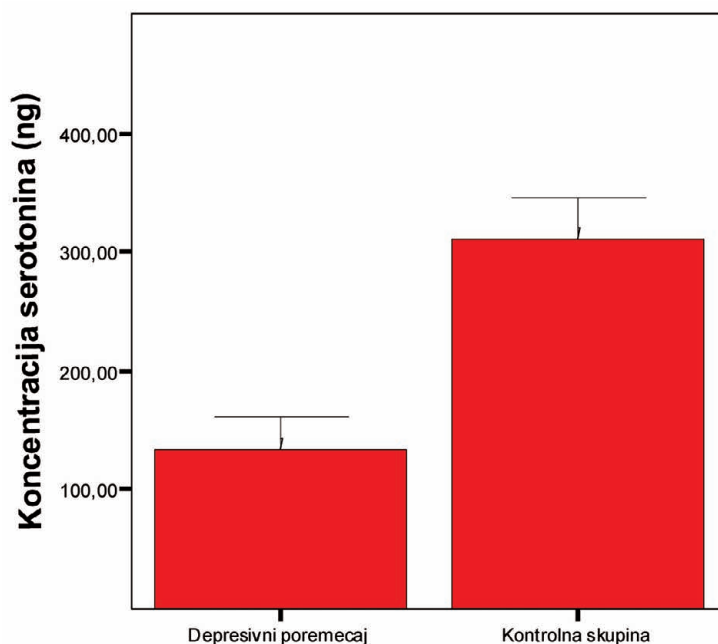
4.3. Usporedba koncentracije serotonina u krvi i trombocitima između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem

U tablici 4.3. nalaze se podaci koncentracije serotonina i količine serotonina u trombocitima u zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem. Kako je razvidno iz tablice, student t-testom za nezavisne uzorke utvrđena je statistički značajna razlika između zdrave kontrolne skupine i bolesnika s depresivnim poremećajem, kako za koncentraciju serotonina tako i količinu serotonina u trombocitima.

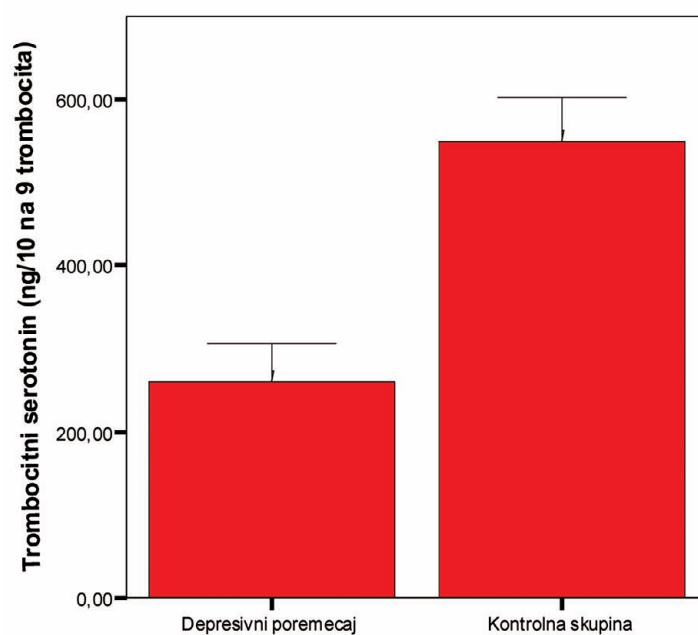
Tablica 4.3. Koncentracija serotonina i količina serotonina u trombocitima u zdravoj kontrolnoj skupini i skupini bolesnika s depresivnim poremećajem

	Zdrava kontrolna skupina (N=179)	Depresivni poremećaj (N=134)	Student t-test
Koncentracija serotonina (ng/mL)	310,07 $\pm$ 34,81	134,05 $\pm$ 15,95	t=7.461; df=314; p<0,001
Količina serotonina u trombocitima (ng/ 10^9 trombocita)	549,16 $\pm$ 255,43	259,27 $\pm$ 175,92	t=7.889; df=314; p<0,001

U slikama 4.3 i 4.4 grafički su prikazane srednje vrijednosti koncentracije serotonina i koncentracije serotonina u trombocita u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s depresivnim poremećajem



Slika 4.3. Srednja vrijednost koncentracije serotonina u krvi prema ispitivanim skupinama; crta raspršenja predstavlja interkvartilni raspon



Slika 4.4. Srednja vrijednost koncentracije serotonina u trombocitima prema ispitivanim skupinama; crta raspršenja predstavlja interkvartilni raspon

4.4. Usporedba trombocitnih pokazatelja između pune krvi i PRP –a

U tablici 4.4. prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije broja trombocita, MVP, PDW i Pct u zdrave kontrolne skupine. Statistička značajnost prikazana je pomoću studentovim t-testom za zavisne uzorke. Kako je razvidno iz tablice student t-testom za zavisne uzorke utvrđena je statistički značajna razlika u svim trombocitnom pokazateljima između PRP i pune krvi u kontrolnoj skupini zdravih ispitanika

Tablica 4.4. Srednje vrijednosti i standardne devijacije broja trombocita i trombocitnih pokazatelja u punoj krvi i PRP u zdravih ispitanika

	Puna krv	PRP	Student t-test
Trombociti ($\times 10^9/L$)	232,29 $\pm$ 47,11	572,22 $\pm$ 178,16	t=29,998; df=179; P<0.01
MPV (fL)	8,516 $\pm$ 1,020	8,620 $\pm$ 0,986	t=3,506; df=179; P<0.01
PDW(cv%)	16,462 $\pm$ 0,580	16,228 $\pm$ 0,719	t=4,880; df=179; P<0.01
Pct(1/1)	0,194 $\pm$ 0,030	0,116 $\pm$ 0,110	t=35,091; df=179; P<0.01

U tablici 4.5. prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije broja trombocita, MPV, PDW i Pct u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem. Statistička značajnost prikazana je pomoću studentovim t-testom za zavisne uzorke. Kako je razvidno iz tablice student t-testom za zavisne uzorke utvrđena je statistički značajna razlika u svim trombocitnom pokazateljima osim MPV – a, između PRP i pune krvi skupini ispitanika s depresivnim poremećajem.

Tablica 4.5. Srednje vrijednosti i standardne devijacije broja trombocita i trombocitnih pokazatelja u punoj krvi i PRP u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem

	Puna krv	PRP	Student t-test
Trombociti ($\times 10^9/L$)	243,72 $\pm$ 63,95	535,18 $\pm$ 150,90	t=31,67; df=134; p=0,01
MPV (fL)	8,41 $\pm$ 1,03	8,39 $\pm$ 1,04	t=0,580; df=134; p=0,56
PDW(cv%)	16,463 $\pm$ 0,578	16,476 $\pm$ 0,687	t=3,75; df=134; p<0,01
Pct(1/1)	0,157 $\pm$ 0,0150	0,438 $\pm$ 0,009	t=0,829; df=134; p=0,01

4.5. Usporedba koncentracije serotonina i trombocitnog serotonina te trombocitnih parametara MPV, PDW i Pct po spolu

U tablici 4.6. prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije broja trombocita, MPV, PDW, Pct i koncentracije serotonina te trombocitnog serotonina u zdrave kontrolne skupine podijeljene po spolu. Statistička značajnost prikazana je pomoću studentovim t- testom za nezavisne uzorke. Kako je razvidno iz tablice student t-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena statistički značajna razlika u svim trombocitnom pokazateljima, koncentraciji serotonina i trombocitnog serotonina po spolu u skupini zdravih ispitanika.

Tablica 4.6. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije serotonina i trombocitnog serotonina, broja trombocita i trombocitnih pokazatelja zdravih ispitanika po spolu

	Muškaci	Žene	Student t-test
Koncentracija serotonina (ng/ mL)	328,98±72,3	294,03±42,22	t=0,703; df=179; p=0,483
Trombocitni serotonin (ng / 10 ⁹ trb)	521,06±253,4	524,17±264,8	t=0,500; df=179; p=0.960
Puna krv			
Trombociti (x10 ⁹ /L)	223,82±44,8	239,0±50,0	t=1,732; df=179; p=0.086
MPV (fL)	8,431±0.963	8,568±1,27	t=0.678; df=179; p=0.499
PDW(cv%)	16,463±0,566	16,481±0,621	t=2,472; df=179; p=0.015
Pct(1/1)	0,200±0,03	0,186±0,03	t=2,47; df=179; p=0.452
PRP			
Trombociti (x10 ⁹ /L)	521,22±148,4	622,81±187,6	t=3,048; df=179; p=0.030
MPV (fL)	8,652±1,25	8,574±0,88	t=0,409; df=179; p=0.683
PDW(cv%)	16,324±0,72	16,06±0,72	t=1,925; df=179; p=0.056
Pct(1/1)	0,427±0,07	0,485±0,121	t=2,766; df=179; p=0.007

U tablici 4.7. prikazane su srednje vrijednosti i standardne devijacije broja trombocita, MPV, PDW, Pct i koncentracije serotonina te trombocitnog serotonina u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem po spolu. Statistička značajnost prikazana je pomoću Studentovim

t- testom za nezavisne uzorke. Kako je razvidno iz tablice Student t-testom za nezavisne uzorke nije utvrđena statistički značajna razlika u svim trombocitnom pokazateljima, koncentraciji serotoninina i trombocitnog serotoninina po spolu u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem.

Tablica 4.7. Srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije serotoninina i trombocitnog serotoninina, broja trombocita i trombocitnih pokazatelja u ispitanika s depresivnim poremećajem podijeljenih po spolu

	Muškaci	Žene	Student t-test
Koncentracija serotoninina ng/ mL	144,25±96,40	122,41±22,93	t=0,768; df=134; p=0,44
Trombocitni serotonin ng / 10 ⁹ trb	268,70±131,90	248,51±110,69	t=0,426; df=134; p=0,67
Puna krv			
Trombociti (×10 ⁹ /L)	232,2±66,5	258,8±64,8	t=2,36; df=134; p=0,019
MPV (fL)	8,28±1,06	8,53±0,96	t=1,51; df=134; p=0,133
PDW(cv%)	16,637±0,800	15,292±0,474	t=3,01; df=134; p=0,003
Pct(1/1)	0,194±0,033	0,188±0,045	t=1.08; df=134; p=0.316
PRP			
Trombociti (×10 ⁹ /L)	542,8±165.7	526,3±132,6	t=0,630; df=134;p=0.530
MPV (fL)	8,22±1,07	8,59±0,98	t=2,07; df=134; p=0,040
PDW(cv%)	16,34±0,79	16,18±0,55	t=1,38; df=134; p=0.169
Pct(1/1)	0,434±0,110	0,44±0,105	t=0,360; df=134; p=0,717

4.6. Povezanost dobi s koncentracijom serotoninina u trombocitima

Da bi utvrdili utjecaj dobi na koncentraciju serotoninina u trombocitima učinjena je linearna regresija u kojoj je koncentracija serotoninina bila ovisna varijabla, a dob u godinama prediktorska varijabla. Navedena analiza učinjena je zasebno za skupinu zdravih ispitanika kontrolne skupine i za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem.

Linearnom regresijskom analizom u skupini zdravih ispitanika utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s samo 0,4 % ($r^2 = 0,004$), drugim riječima kon-

centracija serotonina u trombocitima se može objasniti s samo 0,4 % starosti izraženo u godinama.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je koncentracija serotonina ovisna varijabla, a starost izražena u godinama prediktorska varijabla nije statistički značajan [$F(1, 177) = 1,68$; $p = 0,197$]. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.8.

Tablica 4.8. Koeficijenti linearne regresijske analize za zdravu kontrolnu skupinu Prediktorska varijabla je dob, a ovisna varijabla je koncentracija serotonina

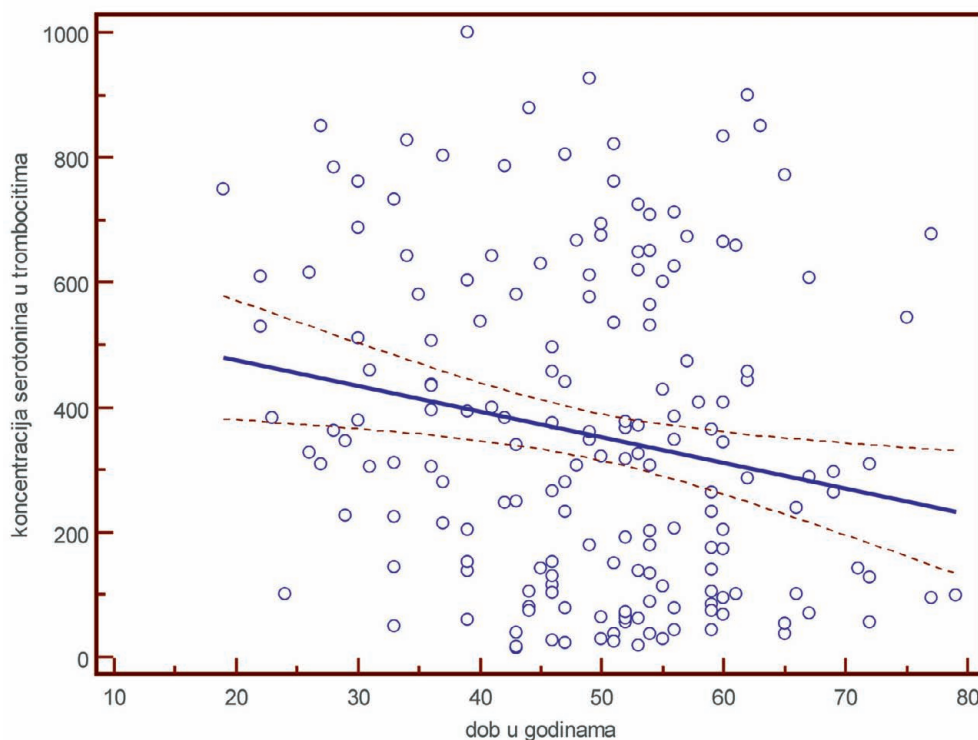
DOB	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. pogreška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	-1,923	1,483	-0,097	5,326	<0,001	255,76	556,84

Linearnom regresijskom analizom u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem utvrđeno da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s samo 0,7 % ($r^2 = 0,007$), drugim riječima koncentracija serotonina u trombocitima se može objasniti s samo 0,7 % starosti izraženo u godinama.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je koncentracija serotonina ovisna varijabla, a starost izražena u godinama prediktorska varijabla nije statistički značajan [$F(1,135) = 0,945$; $p = 0,333$]. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.9.

Tablica 4.9. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem. Prediktorska varijabla je dob, a ovisna varijabla je koncentracija serotonina

DOB	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. pogreška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	-1,394	1,434	-0,083	2,717	0,007	56,26	357,14



Slika 4.5. Grafički prikaz linearne regresije za rezultate određivanja koncentracije serotonina u trombocitima u odnosu na dob za obje skupine ispitanika u kojem je razvidno da koncentracija serotonina u trombocitima nije ovisna o životnoj dobi.

4.7. Povezanost svih trombocitnih pokazatelja i količine serotonina u trombocitima

Ispitivanje povezanosti trombocitnih pokazatelja i količina serotonina učinjeno je izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije – r , te značajnost povezanost – p . Tumačenja koeficijenta korelacije učinjeno je prema Coltonu; $r = 0-0,25$ – nema povezanosti, $r = 0,25-0,50$ – slaba povezanost, $r = 0,50-0,75$ – dobra povezanost i $r = 0,75-1$ – izvrsna povezanost. Granica statističke značajnosti postavljena na $p < 0,05$.

Dobra povezanost koja ima i statističku značajnost potvrđena je u bolesnika s depresivnim poremećajem između trombokrita (PCT) u PRP – u kao rezultat izoliranja isključivo trombocita. Isto vrijedi i za povezanost broje trombocita u krvi s trombokritom u PRP-u. Povezanost trombokrita i broja trombocita u krvi je slijed izračuna trombokrita u koji je direktno uključen broj trombocita. Izvrsna je povezanost MPV-a u krvi i PRP-u.

U tablici 4.10. prikazani su koeficijenti korelacije (r) i statistička značajnost povezanosti (p) za sve trombocitne pokazatelje i količinu trombocitnog serotonina u PRP i punoj krvi za grupu ispitanika s depresivnim poremećajem.

Tablica 4.10. Koeficijenti korelacije (*r*) i statistička značajnost povezanosti (*p*) za sve trombocitne pokazatelje i količinu trombocitnog serotonina u PRP-u i punoj krvi u grupi ispitanika s depresivnim poremećajem.

količina serotonina u trbomocitima (ng /10 ⁹ trb)	konc. serotonina ng	ser./trb	PRP	MPV	PDW	PCT	TRB	MPV	PCT	PDW
se/trb	0,94 <0,001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PRP	0,19 0,025	0,00 0,987	–	–	–	–	–	–	–	–
MPV	0,05 0,561	0,01 0,875	0,31 <0,001	–	–	–	–	–	–	–
PDW	0,21 0,014	0,10 0,248	0,26 0,003	0,01 0,987	–	–	–	–	–	–
PCT	0,13 0,114	0,02 0,827	0,85 <0,001	0,06 0,460	0,23 0,008	–	–	–	–	–
TRB	0,09 0,288	0,09 0,919	0,80 <0,001	0,41 <0,001	0,19 0,026	0,63 <0,001	–	–	–	–
MPV	0,10 0,232	0,03 0,690	0,37 <0,001	0,88 <0,001	0,06 0,465	0,04 0,621	0,42 <0,001	–	–	–
PCT	0,16 0,066	0,18 0,031	0,00 0,918	0,02 0,853	0,02 0,854	0,01 0,895	0,03 0,749	0,02 0,837	–	–
PDW	0,00 0,996	0,03 0,713	0,23 0,009	0,14 0,871	0,56 <0,001	0,25 0,004	0,23 0,006	0,16 0,849	0,01 0,869	–
rPI	0,04 0,848	0,07 0,712	0,22 0,234	0,48 0,007	0,01 0,952	0,13 0,503	0,19 0,313	0,36 0,052	0,00 0,961	0,47 0,008

Dobra povezanost koja ima i statističku značajnost potvrđena je u grupi zdravih ispitanika između trombocita (PCT) u PRP – u kao rezultat izoliranja isključivo trombocita. Isto vrijedi i za povezanost broje trombocita u krvi s trombocitom u PRP-u. Povezanost trombocita i broja trombocita u krvi je slijed izračuna trombocita u koji je direktno uključen broj trombocita. Izvrsna je povezanost MPV-a u krvi i PRP-u kao što je i u grupi ispitanika s depresivnim poremećajem.

U tablici 4.11. prikazani su koeficijenti korelacije (*r*) i statistička značajnost povezanosti (*p*) za sve trombocitne pokazatelje i količinu trombocitnog serotonina u PRP i punoj krvi za grupu zdravih ispitanika.

Tablica 4.11. Koeficijenti korelacije (*r*) i statistička značajnost povezanosti (*p*) za sve trombocitne pokazatelje i količinu trombocitnog serotonina u PRP-u i punoj krvi u grupi zdravih ispitanika

količina serotonina u trombocitima (ng /10 ⁹ trb)	konc. serotonina ng	ser./trb	PRP	MPV	PDW	PCT	TRB	MPV	PCT	PDW
se/trb	0,760 <0,001	–	–	–	–	–	–	–	–	–
PRP	0,45 <0,001	0,49 0,512	–	–	–	–	–	–	–	–
MPV	0,08 0,301	0,09 0,197	0,365 <0,001	–	–	–	–	–	–	–
PDW	0,26 <0,001	0,04 0,559	0,51 <0,001	0,30	–	–	–	–	–	–
PCT	0,40 <0,001	0,43 0,567	0,87 <0,001	0,01 0,867	0,28 <0,001	–	–	–	–	–
TRB	0,32 <0,001	0,14 0,848	0,66 <0,001	0,50 <0,001	0,27 <0,001	0,55 <0,001	–	–	–	–
MPV	0,15 0,400	0,06 0,460	0,45 <0,001	0,92 <0,001	0,32 <0,001	0,11 0,133	0,54 <0,001	–	–	–
PCT	0,26 <0,001	0,05 0,504	0,47 <0,001	0,029 0,904	0,10 0,171	0,57 <0,001	0,82 <0,001	0,02 0,840	–	–
PDW	0,11 0,133	0,01 0,957	0,15 0,043	0,29 <0,001	0,53 <0,001	0,08 0,282	0,18 0,014	0,27 <0,001	0,05 0,536	–
rPI	0,22 0,156	0,06 0,723	0,32 0,037	0,38 0,012	0,39 0,012	0,17 0,274	0,38 0,011	0,34 0,026	0,26 0,096	0,01 0,970

4.8. Povezanost količine serotonina u trombocitima s brojem trombocita

Da bi utvrdili utjecaj broja trombocita na količinu serotonina u trombocitima učinjena je linearna regresija u kojoj je koncentracija serotonina bila ovisna varijabla, a broj trombocita izražen 10⁹/L prediktorska varijabla. Navedena analiza učinjena je zasebno za skupinu zdravih ispitanika kontrolne skupine i za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem.

Linearnom regresijskom analizom u skupini zdravih ispitanika utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 10,2 % ($r^2=0,102$), drugim riječima koncentracija serotonina u trombocitima se može objasniti s 10,2% broja trombocita.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je koncentracija serotonina ovisna varijabla, a broj trombocita izražen $10^9/L$ prediktorska varijabla statistički značajan [$F(1, 177) = 20,165$; $p = < 0.001$] što znači da je u skupini zdravih ispitanika pokazano da količina serotonina u trombocitima ne ovisi o njihovom broju. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.12.

Tablica 4.12. Koeficijenti linearne regresijske analize za zdravu kontrolnu skupinu Prediktorska varijabla je broj trombocita, a ovisna varijabla je količina serotonina

BROJ TRB.	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	1,598	0,356	0,320	4,491	<0,001	-227,389	105,347

Linearnom regresijskom analizom u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem utvrđeno da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s samo 0,8% ($r^2 = 0,008$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s samo 0,8% broja trombocita izraženih u $10^9/L$.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je koncentracija serotonina ovisna varijabla, a broj trombocita izražen u $10^9/L$, prediktorska varijabla nije statistički značajan [$F(1,135) = 1,138$; $p = 0,288$] što znači da je u skupini ispitanika s depresivnim poremećajem pokazano da količina serotonina u trombocitima ne ovisi o broju trombocitakao što je pokazano već u skupini zdravih ispitanika. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.13.

Tablica 4.13. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem. Prediktorska varijabla je broj trombocita izražen u $10^9/L$, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina

BROJ TRB.	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	0,27	0,213	-0,091	1,456	0,148	-28,155	185,22

4.9. Povezanost količine serotonina u trombocitima s veličinom trombocita – MPV

Da bi utvrdili utjecaj veličine trombocita na količinu serotonina u trombocitima učinjena je linearna regresija u kojoj je koncentracija serotonina bila ovisna varijabla, a veličina trombocita izražen kao MPV u fL, prediktorska varijabla. Navedena analiza učinjena je zasebno za skupinu zdravih ispitanika kontrolne skupine i za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem.

Linearnom regresijskom analizom u skupini zdravih ispitanika utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 2,4 % ($r^2 = 0,024$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s 2,4% veličine trombocita.

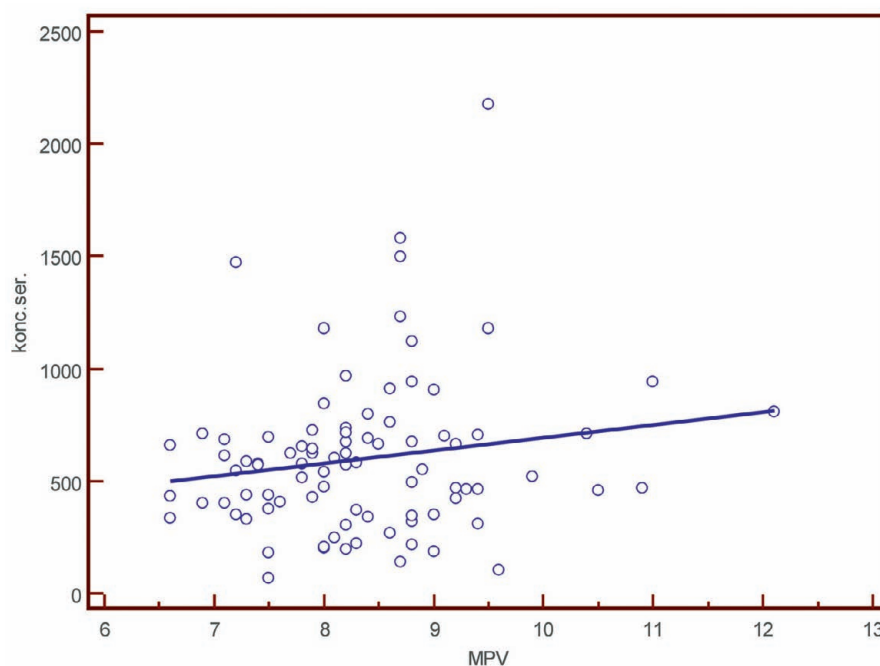
U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je količina serotonina ovisna varijabla, a veličina trombocita izražena kao MPV u fL, prediktorska varijabla statistički značajan [$F(1, 177) = 4,278$; $p = 0.040$] što znači da je u skupini zdravih ispitanika pokazano da količina serotonina u trombocitima ne ovisi o njihovoj veličini. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.14

Tablica 4.14. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu zdravih ispitanika. Prediktorska varijabla je veličina trombocita izražena kao MPV – u fL, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina

MPV	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	-35,42	17,128	-0,154	-2,068	0,040	321,860	901,81

Linearnom regresijskom analizom u skupini ispitanika s depresivnim poremećajem utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 1,1 % ($r^2 = 0,011$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s 1,1% veličine trombocita.

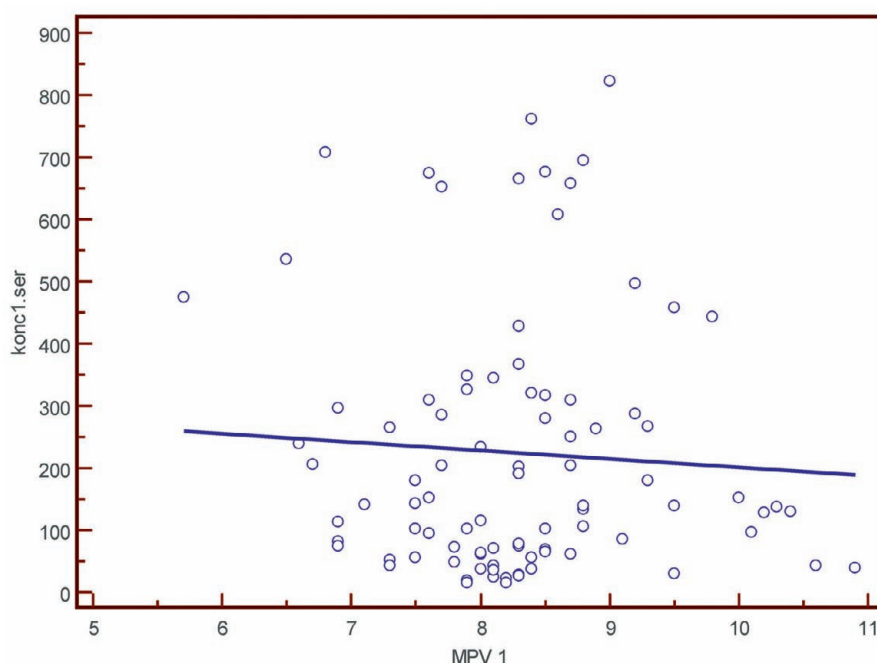
U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je količina serotonina ovisna varijabla, a veličina trombocita izražena kao MPV u fL, prediktorska varijabla statistički značajan [$F(1,135) = 1.441$; $p = 0.232$] što znači da je u skupini ispitanika s depresivnim poremećajem nije pokazano da količina serotonina u trombocitima ne ovisi o njihovoj veličini. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.15.



Slika 4.6. Grafički prikaz linearne regresije za rezultate određivanja koncentracije serotonina u trombocitima u odnosu na MPV za kupine zdravih ispitanika prema kojem je razvidno da koncentracija serotonina u trombocitima nije ovisna o MPV-u.

Tablica 4.15. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem. Prediktorska varijabla je veličina trombocita izražena kao MPV – u fL, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina

MPV	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	-16,595	13,825	-0,103	-1,200	0,232	41,954	505,36



Slika 4.7. Grafički prikaz linearne regresije za rezultate određivanja koncentracije serotonina u trombocitima u odnosu na MPV za skupine ispitanika s depresivnim poremećajem prema kojem je razvidno da koncentracija serotonina u trombocitima nije ovisna o MPV-u.

4.10. Povezanost količine serotonina u trombocitima s količinom serotonina u PRP-u

Da bi utvrdili utjecaj količine serotonina u PRP na količinu serotonina u trombocitima izraženu kao količina u 10^9 trombocita učinjena je linearna regresija u kojoj je količina serotonina u PRP bila ovisna varijabla, a količina serotonina izražena na 10^9 trombocita prediktorska varijabla. Ova analiza učinjena je radi dodatne provjere izražavanja količine serotonina u trombocitima. Navedena analiza učinjena je zasebno za skupinu zdravih ispitanika kontrolne skupine i za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem.

Linearnom regresijskom analizom u skupini zdravih ispitanika utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 19,9 % ($r^2 = 0,199$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s 19,9% količine serotonina u PRP-u.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je količina serotonina u PRP-u ovisna varijabla, a količina serotonina u trombocitima izražena u 10^9 , prediktorska varijabla statistički značajan [$F(1, 177) = 43,815$; $p = < 0,001$] što znači da je u skupini zdravih ispitanika pokazano da količina serotonina u trombocitima ovisi o količini serotonina u PRP-u. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.16.

Tablica 4.16. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu zdravih ispitanika. Prediktorska varijabla je količina serotonina u PRP-u, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina u 10^9 trombocita.

PRP	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	0,590	0,089	0,446	6,619	<0,001	-133,207	77,595

Linearnom regresijskom analizom u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 3,7% ($r^2 = 0,037$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s 3,7% količine serotonina u PRP-u.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je količina serotonina u PRP-u ovisna varijabla, a količina serotonina u trombocitima izražena u 10^9 , prediktorska varijabla statistički značajan [$F(1,132) = 5,127$; $p = 0,025$] što znači da je u skupini ispitanika s depresivnim poremećajem pokazano da količina serotonina u trombocitima ovisi o količini serotonina u PRP-u.

Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.17.

Tablica 4.17. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu ispitanika s depresivnim poremećajem. Prediktorska varijabla je količina serotonina u PRP-u, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina u 10^9 trombocita.

PRP	NESTANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFICIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	0,215	0,095	0,193	2,264	0,025	-84,199	124,29

4.11. Povezanost količine serotonina u trombocitima s veličinom trombocita iskazanom kroz MPV u PRP-u

Da bi utvrdili utjecaj veličine trombocita nakon izolacije iz pune krvi, izraženoj kroz MPV u PRP-u na količinu serotonina u trombocitima učinjena je linearna regresija u kojoj je koncentracija serotonina bila ovisna varijabla, a veličina trombocita u PRP-u izražena kao MPV u fL, prediktorska varijabla. Navedena analiza učinjena je zasebno za skupinu zdravih ispitanika kontrolne skupine i za skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem.

Linearnom regresijskom analizom u skupini zdravih ispitanika utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 0,6% ($r^2 = 0,006$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s 0,6 veličine trombocita u PRP.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je količina serotonina ovisna varijabla, a veličina trombocita u PRP-u izražena kao MPV u fL, prediktorska varijabla statistički nije značajan [$F(1, 177) = 1,077$; $p = 0.301$] što znači da je u skupini zdravih ispitanika pokazano da količina serotonina u trombocitima ne ovisi o njihovoj veličini u PRP-u. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.18.

Tablica 4.18. Koeficijenti linearne regresijske analize za skupinu zdravih ispitanika. Prediktorska varijabla je veličina trombocita izražena kao MPV – u fL u PRP, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina

MPV u PRP	NESTANDARDIZIRANI KOEFIČIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFIČIJENTI	t	p	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	-18,612	17,937	-0,078	-1,038	0,301	-54,011	16,786

Linearnom regresijskom analizom u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem utvrđeno je da je varijanca zavisne promjenjive varijable objašnjena s 0,3% ($r^2 = 0,003$), drugim riječima količina serotonina u trombocitima se može objasniti s 0,3 veličine trombocita u PRP.

U slijedećem koraku linearne regresije učinjena je analiza varijance koja je pokazala da model u kojemu je količina serotonina ovisna varijabla, a veličina trombocita u PRP-u izražena kao MPV u fL, prediktorska varijabla statistički nije značajan [$F(1,135) = 0,339$; $p = 0.561$] što znači da je u skupini ispitanika s depresivnim poremećajem pokazano da količina serotonina u trombocitima ne ovisi o njihovoj veličini u PRP-u. Koeficijenti linearne regresijske analize nalaze se u tablici 4.19.

Tablica 4.19. Koeficijenti linearne regresijske analize za ispitanika s depresivnim poremećajem. Prediktorska varijabla je veličina trombocita izražena kao MPV – u fL u PRP, a ovisna varijabla je količina trombocitnog serotonina

MPV u PRP	NESTANDARDIZIRANI KOEFIČIJENTI		STANDARDIZIRANI KOEFIČIJENTI	<i>t</i>	<i>p</i>	GRANICE POUZDANOSTI (CI) 95%	
	B	St. greška	β			donja vrijednost	gornja vrijednost
	–8,006	13,742	–0,050	–0,583	0,561	–54,011	16,786

4.12. Povezanost koncentracije serotonina s većim i manjim trombocitima

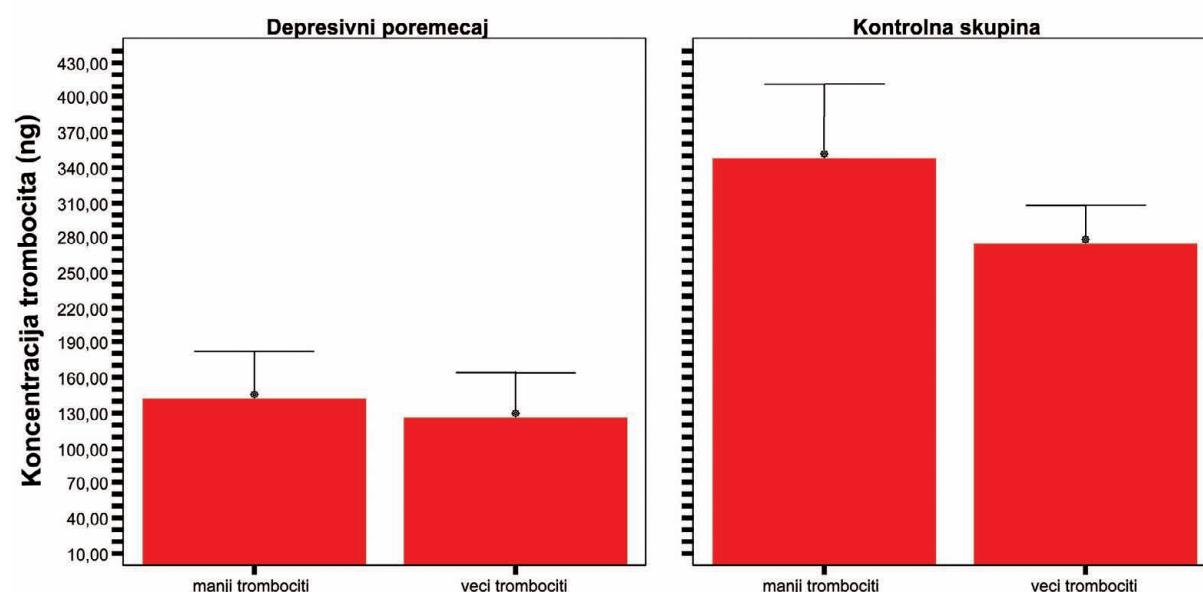
Da bi kontinuiranu varijablu MPV pretvorili u dihotomnu varijablu koja bi pokazivala razdvajanje srednje vrijednosti trombocita – MPV, na dvije kategorije (veći i manji trombociti) izvršen je poseban statistički postupak identifikacije presječnih točaka mediana i rešifriranje rezultata kontinuirane varijable MPV-a u novu dihotomnu varijablu većih i manjih trombocita. Postupak je učinjen zasebno za skupinu kontrolnih ispitanika i za bolesnika s depresivnim poremećajem.

U tablici 4.20. nalaze se srednje vrijednosti i standardne devijacije koncentracije serotonina u trombocitima u skupinama s manjim i većim trombocitima, i to zasebno za kontrolnu skupinu i skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem.

Tablica 4.20. Srednja vrijednosti i SD koncentracije serotonina u trombocitima u skupinama većih i manjih trombocita za obje skupine ispitanika

	Manji trombociti	Veći trombociti	Student t-test
ZDRAVA SKUPINA N= 177			
Koncentracija serotonina ng/ mL	347,90±192,13	275,08±58,91	t=2,092; df=177; p=0,038
DEPRESIVNI POREMEĆAJ N= 134			
Koncentracija serotonina ng/ mL	142,38±71,46	125,08±60,64	t=0,610; df=134; p=0,544

U slikama 4.7 i 4.8. rađički su prikazani srednje vrijednosti koncentracije serotonina u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s depresivnim poremećajem razvrstane u skupine većih i manjih trombocita.



Slika 4.7. i 4.8. Grafički prikaz srednjih vrijednosti koncentracije serotonina u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s depresivnim poremećajem razvrstane u skupine većih i manjih trombocita.

U slijedećem koraku učinili smo logističku regresiju da bi utvrdili povezanost koncentracije serotonina s veličinom trombocita iskazanom kao manji i veći trombociti zasebno za kontrolnu skupinu i za skupinu s depresivnim poremećajem

U zdravoj skupini ispitanika model u kojemu je veličina trombocita bila zavisna varijabla prediktorska koncentracija serotonina je pokazala statističku značajnost, ($\chi^2 = 4,773$; $df = 1$; $p = 0,029$) što pokazuje da model razlikuje koncentraciju serotonina s obzirom na veličinu trombocita izraženu kao veći i manji.

Model u cjelini objašnjava 2,6–3,5 % varijance (Cox i Snell $r^2 = 0,026$; Nagelkerke $r^2 = 0,035$) i ispravno kvalificira 53,6 % slučajeva.

4.13. Ispitivanje povezanosti koncentracije serotonina u trombocitima i koncentracije serotonina u krvi

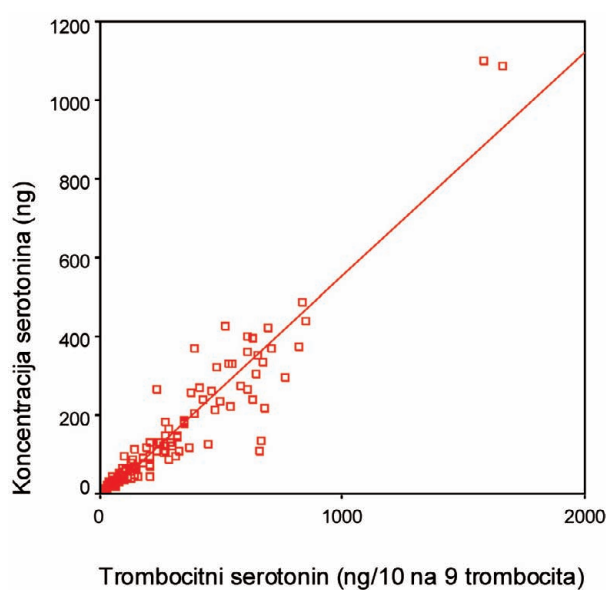
Da bi ispitali povezanost koncentracije serotonina u trombocitima izražene u ng serotonina / 10^9 trombocita s koncentracijom serotonina u krvi izraženom u ng serotonina na mL, učinjeno je izračunavanjem Pearsonovog koeficijenta korelacije – r , te značajnost povezanost – p . Tumačenja koeficijenta korelacije učinjeno je prema Coltonu kako je navedeno već navedeno u 4.7. ovog rada. Granica statističke značajnosti postavljena na $p < 0,05$. Povezanost je ispitana u obje grupe ispitanika kako za zdrave tako i bolesnika s depresivnim poremećajem.

U tablici 4.21 prikazani su koeficijenti korelacije (r) i statistička značajnost povezanosti (p) za količinu trombocitnog serotonina i koncentraciju serotonina u krvi za grupu ispitanika s depresivnim poremećajem i grupu zdravih ispitanika. Iz rezultata je vidljiva izuzetno dobra povezanost koncentracije serotonina u trombocitima i serotonina u krvi.

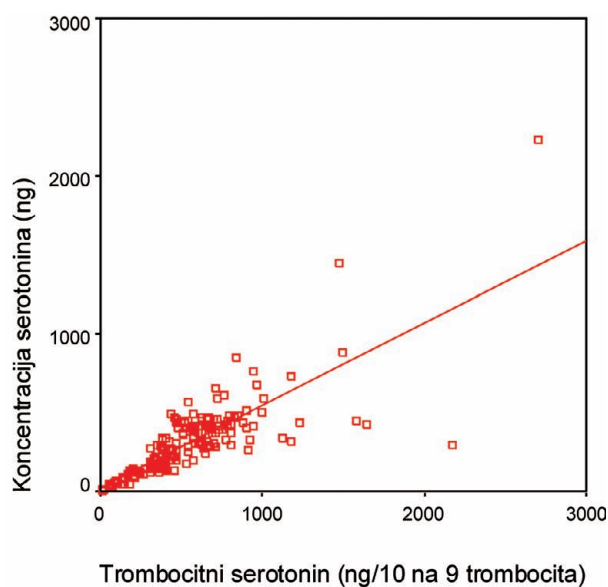
Tablica 4.21. Koeficijenti korelacije i statistička značajnost povezanosti količine trombocitnog serotonina i koncentraciju serotonina u krvi za obje grupe ispitanika

	Koncentracija serotonina u trombocitima ng/10 ⁹ L
SKUPINA ZDRAVIH ISPITANIKA N= 179	
Koncentracija serotonina ng/ mL	$r = 0,78$ $p < 0,001$
SKUPINA S DEPRESIVNIM POREMEĆAJEM N= 137	
Koncentracija serotonina ng/ mL	$r = 0,94$ $p < 0,001$

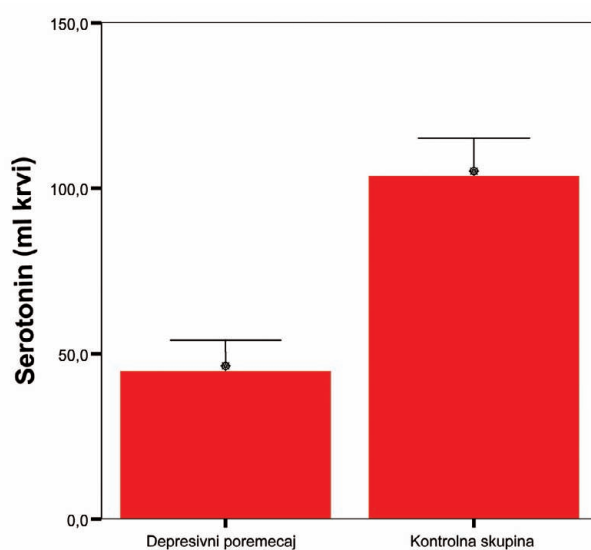
Na slici 4.9. i 4.10. grafički je prikaz korelacije koncentracije serotonina u krvi izražena u ng serotonina /mL. u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s depresivnim poremećajem



Slika 4.9. korelacija koncentracije serotonina u trombocitima i koncentracije u krvi u skupini zdravih ispitanika



Slika 4.10. korelacija koncentracije serotonina u trombocitima i koncentracije u krvi u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem



Slika 4.11. grafički prikaz srednjih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s depresivnim poremećajem razvrstane

Na slici. 4.11. grafički je prikaz srednjih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi u skupini zdravih ispitanika i ispitanika s depresivnim poremećajem razvrstane

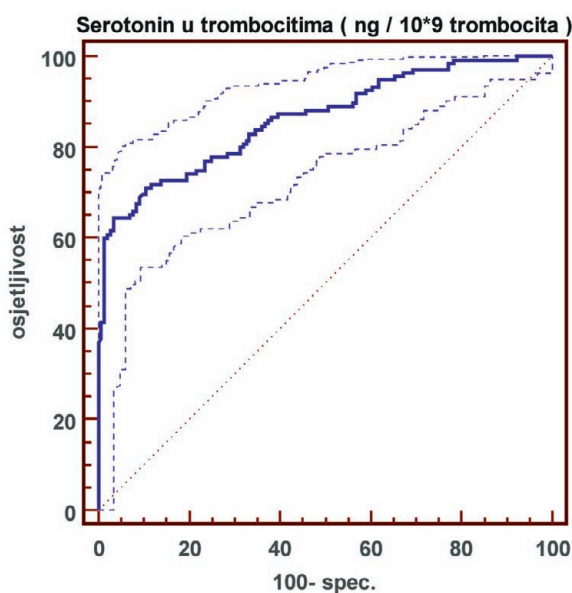
4.14. Ispitivanje dijagnostičke točnosti koncentracije serotonina u trombocitima

Dijagnostičku točnost pretrage određivanja koncentracije serotonina u trombocitima učinili smo ispitivanjem mjera dijagnostičke točnosti:

1. ispitivanje osjetljivosti i specifičnosti pretrage,
2. određivanjem granične vrijednosti (*engl. cut off*) koja bi razgraničavala zdrave i osobe s depresivnim poremećajem,
3. ispitivanje prediktivne vrijednosti.

Kako osjetljivost i specifičnost neke pretrage nisu konstantne mjere dijagnostičke točnosti nego se mijenjaju s izborom granične vrijednosti napravili smo ROC krivulju za određivanja optimalnih vrijednosti osjetljivosti i specifičnosti koncentracije serotonina u trombocitima (ROC – akronim od *engl. Receiver Operating Characteristic Analysis*).

Na slici 4.12. prikazan je grafikon ROC krivulje koncentracije trombocitnog serotonina s obzirom na specifičnost i osjetljivost navedene varijable u dijagnostici bolesnika s depresivnim poremećajem.



Slika 4.12. ROC krivulja koncentracije trombocitnog serotonina prema dijagnosticiranom depresivnom poremećaju

Analizom površine ispod ROC krivulje određena je vrijednost od 111,8 kao točka u kojoj su osjetljivost i specifičnost koncentracije trombocitnog serotonina za predikciju velikog depresivnog poremećaja u optimalnoj ravnoteži. Ukupna točnost predikcije depresije (AUC površina

ispod ROC krivulje) temeljem koncentracije trombocitnog serotonina je vrlo dobra i iznosi 0,858 ($P=0,001$). U tablici 4.22. prikazno je testiranje statističke značajnosti dijagnostičke vrijednosti koncentracije trombocitnog serotonina.

Tablica 4.22. Testiranje statističke značajnosti dijagnostičke vrijednosti koncentracije trombocitnog serotonina

površina ispod krivulje			95 %-tni interval pouzdanosti	
površina (ukupna točnost) 0,858	st. pogreška 0,022	p < 0,001	donja granica 0,813	gornja granica 0,895

Pri navedenoj graničnoj vrijednosti od 118,8 ng serotonina / 10^9 trombocita, pretraga ima visoku specifičnost od 96,5 % koja zadovoljava dijagnostičke potrebe prema kojim je mala vjerojatnost da će zdrava osoba dobiti lažno negativan rezultata pretrage, odnosno malu vjerojatnost da će zdrave osobe imati vrijednost serotonina u trombocitima ispod granične vrijednosti. Osjetljivost pretrage pri ovoj graničnoj vrijednosti je 64,4 % i ona je prihvatljiva jer se u bolesnih osoba u dijagnozu depresivnih poremećaja uključuje psihijatrijsko promatranje.

Ukoliko bismo pomaknuli osjetljivost na višu vrijednost od 90 % granična vrijednost bi bila 330 ng serotonina / 10^9 trombocita, te bi time udjel lažno pozitivnih nalaza bio znatno veći jer bi granična vrijednost bila iznad donje granice referentnog intervala, a samim tim ne bi bio postignut doprinos u dijagnostici ovih bolesnika.

Omjer vjerojatnosti za pozitivan rezultat pretrage LR + (*engl. likelihood ratio*) iznosi 18,56, te se određivanje serotonina u trombocitima može smatrati dobrim dijagnostičkim testom za depresivne poremećaje koji ima značajan doprinos u prihvaćanju dijagnoze depresivnog poremećaja ($LR > 10$).

Omjer vjerojatnosti za negativan rezultat LR – iznosi 0,37, te je vjerojatnost da se negativni rezultat (viša vrijednost trombocitnog serotonina) pojavi kod bolesnika s depresivnim poremećajem znatno manja u odnosu na zdrave ispitanike.

Pozitivna prediktivna vrijednost u našem ispitivanju s novo određenim granicama koncentracije serotonina u trombocitima za dijagnozu depresivnog poremećaja iznosi 94,5 %, u ispitivanoj populaciji (prevalencija bolesti – 48,4 %). Ova vrijednost pokazuje izrazito visoku vjerojatnost da će u bolesnika s depresivnim poremećajem biti rezultati pretrage pozitivni, odnosno razina serotonina u trombocitima ispod granične vrijednosti. Negativna prediktivna vrijednost u našim ispitivanjima i ispitivanoj populaciji iznosi 74,5% što pokazuje visoku vjerojatnost da se u zdravih osoba neće naći negativan rezultat odnosno više vrijednosti koncentracije serotonina.

RASPRAVA

Trombociti i serotonin kao dva osnovna pojma koji su bili istraživani u ovom radu zasigurno u suvremenim znanstvenim istraživanjima prelaze u područje za koje se može reći da je »popularna znanost«. Svekoliko prisutne medijske informacije o ovim stanicama i bioaminu, koje sežu od područja farmaceutske industrije preko nutricionizma do niza priručnika o emocionalnoj inteligenciji i uravnoteženju raspoloženja, nisu bezrazložne.

Naime, nije bezrazložan ovaj ogroman javni i znanstveni interes jer su poremećaji funkcionalne aktivnosti trombocita i neuravnotežena sinteza neurotransmitera serotonina bitan dio patofiziologije dviju najučestalijih bolesti u humanoj populaciji, a to su ishemijska bolest srca i depresija. Istovremeno nije još u potpunosti prihvaćeno da postoji uzročnopsljedična povezanost patofiziologije ova dva stanja.

Svjetska zdravstvena organizacija predviđa da će depresija do 2020. godine postati drugi zdravstveni problem na svijetu iza ishemijske bolesti srca s udjelom od 5,7 %, a kod ženske populacije vodeći zdravstveni problem. Istovremeno epidemiološke studije od prije 20 godine ukazuju da je depresivni poremećaj nezavisni prediktor razvoja kardiovaskularnih oboljenja te dva do tri puta veće smrtnosti takovih bolesnika (Musselman, 1998; Glassman, 1998.). Hospitalizirani bolesnici radi infarkta miokarda koji su razvili depresivni poremećaj, imaju gotovo dvostruko veći rizik mortaliteta od kardiogenog šoka (Rumsfeld, 2005). Ova uzročnopsljedična povezanost dviju najzastupljenijih bolesti pokretač je istraživanjima u kojima se pokušalo razjasniti višestruke mehanizme što vjerojatno povezuju te patofiziološke promjene (Kim, 2005; Nemeroff, 2009). Današnja stajališta o razvoju aterosklerotskih promjena uključuju izmijenjenu funkcionalnu aktivnost trombocita kao jedan od dominantnih faktora patofiziologije ateroskleroze i vjerojatno ključno mjesto preklapanja s depresivnim poremećajima.

Brojnost radova u kojima je ispitana pojačana agregabilnost trombocita u bolesnika s aterosklerotskim promjenama, kao i onih koji su razvili ishemijsku bolest srca, rezultirala je uvođenjem protektivne antiagregacijske terapije. Istovremeno se razvila i metodologija praćenja aktivnosti trombocita u *in vitro* uvjetima čije je temelje postavio Born kao što je navedeno u uvodu. Koliko god spoznaja o bolestima krvožilnog sustava jako napreduje, te smo svjedoci kliničke primjene brojnih dijagnostičkih biljega kojima se prate takvi bolesnici, toliko je, na žalost, pri-

stup bolesnicima s duševnim poremećajima i dalje prepušten isključivo psihijatrima uz trajno prisutnu stigmatizaciju takvih bolesnika.

Podatak da je 48% bolesnika bilo pregledalo 5 ili više liječnika prije postavljanja dijagnoze, a u 35% bolesnika je prošlo prosječno 10 godina od prvog javljanja bolesti pa do postavljanja ispravne dijagnoze (Lish i sur., 1994.), kao i rezultati nedavno objavljene studije, ukazuju da samo jedna trećina bolesnika s velikim depresivnim poremećajem zatraži pomoć u prvoj godini svoje bolesti, dok u jedne trećine prođe čak najmanje 10 godina do prvog javljanja liječniku (Hirschfeld i sur., 2003.) – samo to potvrđuju.

Istraživanja koja su rezultirala spoznajama o elementima serotonininskog sustava trombocita dio su sveukupnoga znanstvenog interesa prema identificiranju promjena na morfologiji, metaboličkoj aktivnosti i funkcionalnoj aktivnosti trombocita koje bi mogle biti dijagnostički pokazatelji u kombinaciji s određenim sindromima, ali i prediktivni i/ili korelirajući biljezi odgovora na terapiju u bolesnika s duševnim poremećajima kao što je to predviđao Sthal u svom radu iz 1977. godine: »The human platelets; diagnostic and research tool for study of biogenic amines in psychiatric and neurological disorders«. Trombociti su na taj način postali periferni model istraživanja ponajprije serotoninina čija količina izuzetno korelira s razinom u serotonegičnim neuronima, ali u punom manjem opsegu istraživali su se njihovi pokazatelji.

Ovdje je potrebno naglasiti da se uz veliki broj podataka o koncentraciji serotoninina u trombocitima u različitim bolestima i patološkim stanjima, vrlo rijetko susreću radovi posvećeni predanalitičkim i analitičkim aspektima što bi zapravo trebalo predstavljati nužnu polaznu osnovu za patofiziološka istraživanja.

5.1. Metodologija pripreme PRP-a i lizata trombocita

Osnova za sva određivanja predstavlja pripravljanje plazme bogate trombocitima. U ovom radu koristili smo kao jedinstveni uzorak za pripravu PRP-a uzorak venske krvi uzet u jutarnjim satima, što je bitno radi cirkadianog ritma serotoninina.

Prema ispitivanjima (Montero i sur., 1989) u praćenju dnevne dinamike koncentracije serotoninina u trombocitima pokazalo se lagano povišenje u peridu od 8 sati ujutro do 20 sati navečer, dok je tijekom noći rast bio značajno povišen ($p < 0,05$) u razini od 165 ± 175 nmola/ 10^8 trombocita. Podatak je pak u suprotnosti s rezultatima Wirtza i Justice iz 1977. koji nisu potvrdili povišene vrijednosti tijekom noći.

Autori preporučuju da se u uzimanju uzorka za određivanja serotoninina u trombocitima vrijeme uzorkovanja ograniči na razdoblje od 8 do 10 sati ujutro čime bi se izbjegla intraindividualna varijabilnost. Vrijeme uzorkovanja bitno je ako se ova pretraga uključi u kliničke pretrage, ali i u istraživanjima referentnog intervala neovisno o metodologiji kojom se određuje serotonin.

Uzorak krvi uzet je na K₃ EDTA od 3 mL, s molarnom koncentracijom antikoagulansa $4,55 \pm 0,85$ mmol/L krvi. U nekim radovima navodi se upotreba ACD (acidi citrici, dekstroza) antikoagulansa, ali omjer antikoagulansa i krvi je 1:10 u takvim uzorcima, što nije adekvatan uzorak za određivanje trombocitnih parametara, a opisana još veća razrjeđenja nemaju osnovu u sprečavanju aktivacije trombocita (Šagud, 2007, Balijs, 2003). U radu Banovića i suradnika (Banović, 1993) opisan je optimirani postupak izoliranja trombocita u svrhu određivanja serotonina, ali naš je cilj bio minimaliziranje uzorka, što je i postignuto.

Trombocitne parametre određivali smo nakon što je uzorak skladišten najmanje dva sata na sobnoj temperaturi da bi se postigla stabilnost volumena trombocita i promjene njihova disko-idnog oblika u in uvjetima *in vitro*, što je dokazao Bessman kako je navedeno u uvodu rada.

Trombocyte smo izolirali centrifugiranjem u trajanju od 10 min na $200 \times g$ (500 okretaja/min) na temperaturi od 20 °C. Ovim se načinom separiraju trombociti u većini suvremenih radova u kojima je određivana koncentracija serotonina u trombocitima ili praćena kinetika serotonina u trombocitima (Banović, 2010; Ayzenberg, 2007, Maurer-Spurej, 2007). Nakon odvajanja plazme bogate trombocitima koja je bila zadovoljavajuće količine od 300–350 µL određeni su trombocitni parametri u PRP-u na hematološkom analizaoru koji radi na principu impedancije i na kojem su određeni parametri u punoj krvi. Interesantno je da se još u novijim radovima nalaze podaci u kojima je broj trombocita u PRP određivan manuelno vizuelnom metodom (Fišar, 2008) čija nepreciznost je u razini CV od 20–25%.

Prema našim rezultatima tijekom odvajanja trombocita i priprema PRP-a nije nastala značajna razlika u njihovoj veličini u skupini zdravih ispitanika. Srednja vrijednost MPV-a u punoj krvi bile su za skupinu zdravih ispitanika u rasponu $8,518 \pm 1,018$ fL, a u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem $8,412 \pm 1,027$ fL pri čemu nema statističke značajnosti ispitano t-testom. U PRP-u srednje vrijednosti MPV-a u zdravih ispitanika $8,620 \pm 0,986$ fL, dok je u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem $8,392 \pm 1,043$ fL. Ova mala razlika nije značajna u smislu izmijenjene strukture trombocita u bolesnika s depresivnim poremećajem u *in vitro* uvjetima, već je isključivo rezultat mjerne preciznosti za MPV koja je na našem analitičkom sustavu 2010. god iznosila $CV < 2\%$. Malo je radova u kojima su mjerene vrijednosti MPV-a u PRP-u, pa jedini dostupni usporedivi podatak nalazimo u radu iz 2003 (Balijs, 2003) u kojem je izmjeren MPV u PRP-u u skupine isključivo zdravih ispitanika isto nije bio bitno izmijenjen (7,1 fL – puna krv; 7,0 fL – PRP).

Navedeni podaci podržavaju način odvajanja trombocita koji je upotrijebljen u ovom radu, a količina dobivenog PRP-a dostatna je za određivanje trombocitnih pokazatelja te za pripremu lizata u kojem se određuje serotonin. Metodologija liziranja trombocita u PRP-u učinjena je u našim ispitivanjima u dvostupnjevito razaranju stanica. Prvo smo dodatkom fiziološke otopine i centrifugiranjem na 4 °C iskoristili poznatu tremolabilnost trombocita za njihovo razaranje i ispiranje ostalih plazmatskih proteina. Talog je resuspendiran dodatkom destilatne vode i inten-

zivnim protresanjem. Ovaj način liziranja trombocita korišten je i u drugim radovima (Zeller, 1986; Kema, 2001) dok je ultrasonifikacijski pristup metodološki zahtjevniji (Balijski, 2003).

Ujedno, u našem postupku vrijeme je pripreme PRP izuzetno kratko što je u skladu s porukama Malmgrena koji je proučavao upravo predanalitičke faktore kod različitih metodologija određivanja serotonina u humanim trombocitima (Malmgren, 1981.)

Ovako pripremljeni lizati trombocita skladišteni su na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ nekoliko tjedana, odnosno do određivanja koncentracije serotonina ELISA metodom.

Izvrсна korelacija naših rezultata s rezultatima HPLC metode koja je provedena na istovjetnim uzorcima lizata trombocita potvrdila nam je ispravnost pripreme PRP-a, kao i lizata trombocita.

5.2. Metodologija određivanja serotonina

Kao što je u uvodnom dijelu rečeno, trombocitni serotonin predstavlja gotovo ukupni sadržaj serotonina u cirkulaciji budući da je slobodni serotonin manji od 1%.

Od biokemijskih metoda mjerenja najviše se koriste spektrofotometrijska (OPT – ortoftaldiladhid) i HPLC metoda dok se metoda ELISA koja primjenjuje u istraživanjima proteklih nekoliko godina (Fišar, 2008). Među 16 radova u razdoblju od 2000. god. do danas, u kojima se istraživala fiziologija serotonina u trombocitima radi uspostavljanja referentnih intervala za zdravu populaciju, nije se koristila ELISA tehnika. Prema broju ispitanika treba istaknuti radove Herviga i sur iz 1996., te Jerneja i sur. iz 2000. koji su u ispitivanju uključili 200 odnosno 500 zdravih ispitanika.

Metoda HPLC odlikuje se visokom specifičnošću, ali je znatno dugotrajnija, i ekonomski zahtjevnija. Naši rezultati usporednog određivanja 44 uzorka s HPLC metodom pokazali su izuzetno visoku povezanost rezultata ovih dviju metoda.

Rezultati Passing-Bablok regresije za rezultate određivanja koncentracije serotonina u trombocitima metodama ELISA i HPLC s 95% pouzdanošću, pokazuju da nema značajnog odstupanja među izmjerenim vrijednostima.

Ispitivanjem preciznosti unutar serije dobili smo prihvatljive rezultate ($CV = 10,4\%$) Provjeru referentnog intervala koji je deklarirao proizvođač testa, ispitali smo na 144 zdravih ispitanika s 90% pouzdanosti, s provjerom graničnih vrijednosti. Koncentracije serotonina pokazale su normalnu distribuciju i vrijednosti unutar granica intervala: donja granica 201,5 i gornja granica 940,2 ng serotonina/ 10^9 trombocita. Pozitivan rezultat kratke evaluacije metode bio nam je uporište za sve interpretacije naših rezultata koje su uslijedile.

5.3. Postanalitički faktori u određivanju količine serotonina u trombocitima

Ako se količina serotonina izražava po jediničnoj masi trombocitnog proteina kao mjeri trombocitne mase (kao što se u nekim radovima navodi), istraživačima se nameću neke nedoumice. Jedna od njih je ostatni stanični proteini leukocitne populacije nakon ispiranja uzorka, ali i ostatni plazmatski proteini koji su interindividuano varijabilni. Oni bi mogli biti razlogom lažno povišene trombocitne proteinske mase te tako izravno utjecati na rezultate prikazujući ih lažno nižim (Zeller, 1986.; Anthony; 1989., Mück Šeler, 1996., Jernej, 2000.)

Pri tome treba imati na umu da je količina proteina u trombocitima izrazito mala jer je ona determinirana već u ranoj fazi trombopoeze, kao što je opisano u uvodu i prema literaturi iznosi oko 450 μg proteina na 1 mL PRP-a, pa je u toj količini interferencija drugih proteina vrlo vjerojatna.

Analizom uzorka PRP-a dobili smo i vrijednosti ostalih leukocita koji se prenesu tijekom odvajanja plazme po završetku centrifugiranja jer se limfociti praktično ne razlikuju po svojim sedimentacijskim karakteristikama. Nadalje, kako se u radovima (Jernej, 2000; Jernej 1988.) navodi mogućnost interferiranja ostalih leukocita radi male količine serotonina u njima, provjerili smo korelaciju ostalih leukocita i koncentraciju serotonina za sve ispitane uzorke i dobili da ne postoji korelacija između broja ostalih leukocita i koncentracije serotonina u trombocitima ($r = -0,08$; $p = 0,257$). Mišljenja smo da je količina ostalih stanica leukocitne populacije bitna ukoliko se količina serotonina izražava na količinu proteina, dok u ispitivanjima u kojima se količina izražava na broj trombocita to nema značaja, što smo i pokazali našim rezultatima.

U literaturi se još susreću radovi u kojima se količina serotonina izražava u nmol na 10^9 trombocita (Flachaire, 1990. Maurer-Spurej, 2006). Kako je u takovom načinu izražavanja referentni interval prema istraživanjima Flachire i sur. $3,52 \pm 1,32$ nmol/ 10^9 trombocita, teško je uspoređivati navedene rezultate jer je za preračunavanje količine potrebno poznavanje količine serotonina po mililitru krvi koja se nakon toga konvertira s faktorom 5,67 u ng.

Kao jedan od načina izražavanja koji je prisutan u literaturi je količina serotonina na jedinični volumen krvi. Iako ovaj način izražavanja ima drugu fiziološku dimenziju, on je u neposrednoj povezanosti jer se 99% ukupnog serotonina u cirkulaciji, kao što je navedeno u uvodu, nalazi u trombocitima.

Radi razlike u fiziologiji ne treba očekivati da će izuzetno korelirati količine serotonina u krvi s količinom u trombocitima, jer ne mora nužno značiti povišeni cirkulirajući serotonin (primjer trombocitopenija) i povišenu vrijednost u trombocitima, ipak je više autora našlo dobru povezanost, te rezultate svojih ispitivanja izrazilo u ng serotonina u ml krvi (Ortiz, 1988.; Šattichis, 1994. Jernej 2000.)

U našem radu našli smo jako dobru korelaciju koncentracije serotonina u trombocitima i količine serotonina u krvi u grupi zdravih ispitanika ($r = 0,78$; $p < 0,001$), te izuzetnu korelaciju rezultata u grupi bolesnika s depresivnim poremećajem ($r = 0,94$; $p < 0,001$). U radu Jerneja i sur. na ispitivanoj grupi od 483 zdrava ispitanika potvrdio je korelaciju na razini $r = 0,66$ (Jernej, 2000.). Ujednačavanje načina izražavanja u budućim istraživanjima olakšalo bi interpretaciju rezultata, posebno u kliničkoj dijagnostičkoj primjeni određivanja serotonina. Za sada su u istraživanjima preteže izražavanje cirkulirajućeg serotonina i/ili izražavanje koncentraciji serotonina na broj trombocita.

5.4. Distribucija frekvencije individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima

5.4.1. Zdravi ispitanici

Distribucija koncentracije serotonina istražena je u trombocitima zdravih ispitanika koji su bili heterogena skupina sastavljena od: dobrovoljnih davaoci krvi, studenta i djelatnika u našoj zdravstvenoj ustanovi. Prosječne vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima iznosile su za cjelokupnu skupinu $549,16 \pm 255,43$ ng/ 10^9 trombocita, za muškarce $521,06 \pm 253,4$ ng/ 10^9 trombocita, a za žene $524,17 \pm 264,8$ ng/ 10^9 trombocita. Distribucija frekvencije individualnih vrijednosti pokazuje normalnu raspodjelu. Literatutni podaci o srednjoj vrijednosti distribucije frekvencije individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima navode raspon od 474 do 730 ng/ 10^9 trombocita. U Tablici 5.1. objedinjeni su naši rezultati i literaturni podaci onih odabranih radova čije su ispitivanje skupine imale više od 50 zdravih ispitanika. U navedenim radovima metodologija je bila HPLC ili spektrofotometrijska metoda.

Tablica 5.1. Usporedba literaturnih podataka koncentracije trombocitnog serotonina i rezultata ovog rada

Referenca	N	5HT u trombocitima (ng/ 10^9 trombocita)	5HT u krvi (ng/mL PRP)
Guicheney (1988)	88	640 ± 164	/
Ortiz i sur (1988)	75	711 ± 319	187 ± 87
Flachaire i sur (1990)	56	670 ± 164	/
Cook i sur. (1993)	98	/	181 ± 53
Hervig (1996)	200	491	
Jernej (2000)	483	579 ± 169	130 ± 42
Ovaj rad	179	549 ± 255	103 ± 45

Usporedbom naših rezultata u kojima je koncentracija serotonina određena ELISA metodom, s navedenim rezultatima dobijenim drugim metodama, utvrdili smo njihovu dobru podudarnost.

5.4.2. Bolesnici s depresivnim poremećajem

U našim ispitivanjima distribucija koncentracije serotonina istražena je u trombocitima bolesnika s depresivnim poremećajem. U ispitivanim uzorcima prosječne vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima iznosile su $259,27 \pm 175,92$ ng/ 10^9 trombocita, a koncentracija serotonina u krvi bila je $134,05 \pm 15,95$ ng/ml.

U bolesničkoj su skupini zapažene izuzetno niže vrijednosti u odnosu na skupinu zdravih ispitanika što je dokazala statistička obrada Studentovim t-testom ($p < 0,001$).

Snížene koncentracije serotonina u depresivnim poremećajima opisalo je dosta autora. Bitno je za istaknuti da su ispitivane skupine s depresivnim poremećajem bile znatno manje od broja ispitanika u ovom radu kao što je prikazano u uvodu u tablici 1.2.

U ispitivanjima Maurer Spurej (2007.) vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima u bolesnika s postporođajnim depresivnim poremećajima iznosile su 41% do 43% od vrijednosti zdravih ispitanika. Ista autorica u prethodnim istraživanjima depresivnih poremećaja dobro i spolno heterogene skupine nalazi vrijednosti koje su niže za više od 50% od zdravih ispitanika (Maurer-Spurej, 2004.). U ispitivanjima suicidalnih bolesnika navode se izrazito niske razine serotonina. Istraživanja na našoj populaciji autora Mück-Šeler i Jakovljević (1996. god.) nisu dokazala razlike između depresivnih ispitanika i kontrolne skupine s razinom serotonina $1,24 \pm 0,27$ nmol/mg proteina za zdrave, te razinom od $1,25 \pm 0,49$ nmol/mg proteina za depresivne bolesnike. No, kad su skupinu bolesnika s depresivnim poremećajem podijelili u psihotične i nepsihotične, rezultati su pokazali znatno niže vrijednosti u nepsihotičnih bolesnika ($1,09 \pm 0,41$). Najnižu vrijednost našli su u jednog ispitanika koji je pokušao suicid (razina serotonina $0,12$ nmol/mg proteina). Za razlikovanje psihotičnih i nepsihotičnih depresivnih poremećaja suvremena psihijatrijska dijagnostika osim tradicionalnih simptomatoloških pokazatelje koristi i laboratorijske endokrinološke pretrage.

Ovaj je rad imao za cilj ispitati razinu trombocitnog serotonina u cjelovitoj skupini bolesnika s depresivnim poremećajem koji još nisu bili podvrgnuti terapiji te razvrstani prema psihijatrijskoj ljestvici subklasifikacija. ELISA metoda kojom smo se služili pokazala je sa statističkim uporištem takva analitička svojstva i dijagnostičku točnost da je bila primjerena ciljevima rada. Sukladnost naših rezultata s rezultatima drugih istraživača ogledala se na primjeru trojice ispitanika koji su u periodu od godine dana (koliko je trajalo istraživanje u ovom radu), pokušali suicid. Oni su imali razine serotonina niže od 20 ng/ 10^9 trombocita. Valja naglasiti da su upravo ti bolesnici bili uključeni u usporedno određivanje serotonina HPLC metodom te da je potvrđena tako niska vrijednost serotonina.

Ovako niske vrijednosti serotonina u trombocitima vjerojatno su one bazične razine serotonina koje su u gustim granulama unesene u promegakariocitu, i koje ne ovise o kinetici serotonskog transportera (Fuster i sur. 2008.). Ova smjela pretpostavka može naći uporište u kliničkim i laboratorijskim podacima da u ovih bolesnika nema opisanih promjena u sustavu zgrušavanja. Suprotno tome, bolesnici s Hermansky-Pudlakovim sindromom u kojih je na razini promegakariocita blokiran unos serotonina, nemaju ni najmanji sadržaj serotonina u gustim granulama a imaju veću sklonost krvarenju (Maurer-Spurej i sur., 2001.).

5.5. Utjecaj životne dobi na koncentraciju serotonina u trombocitima

Zavisnost koncentracije trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina o životnoj dobi ispitalo je više autora. Usprkos razlici među istraživanjima koja su uključivala raznolike kombinacije dobnih skupina ispitanika, većina radova navodi manji pad koncentracije serotonina s porastom životne dobi. Izdvajamo ispitivanje Elisabeth Flachaire i suradnika (1990. god) koji su ispitali referentne intervale u četiri dobne skupine koristeći HPLC metodu. Zanimljivo je da su ispitali raspon vrijednosti kod novorođenčadi, iz krvi pupkovine, i te su vrijednosti serotonina bile najniže. U skupinu djece uključili su ispitanike oba spola od 1 do 16 godina i dobili vrijednost serotonina od $4,09 \pm 1,04$ nmol/ 10^9 trombocita. Skupini odraslih ispitanike od 20–56 godina, različitih zanimanja a podjednake zastupljenosti spolova, izmjerene su koncentracije serotonina u rasponu $3,81 \pm 0,87$, dok je skupina starijih ispitanika od 65–94 godine imala vrijednosti $2,57 \pm 1,12$ nmol/ 10^9 trombocita. Već je iz ovih podataka jasno da u ispitivanjima treba podjeliti ispitanike u veći broj razreda ako se želi obuhvatiti veliki raspon životne dobi. Prema dosadašnjim ispitivanjima na našoj populaciji (Balića, 2003.) u kojoj su ispitanici bili isključivo dobrovoljni davaoci krvi prosječne životne dobi od 41 godine a u rasponu od 21–67 godina, uočena je blaga tendencija pada u skupini starijoj od 50 godina. U našim ispitivanjima skupina zdravih ispitanika ($N = 179$) obuhvaćala je dob od 19–79 godina sa srednjom vrijednošću od $49 \pm 12,2$ godine, a skupina bolesnika $53 \pm 10,4$ godina s rasponom od 22–82 godine.

Rezultati naših ispitivanja pokazali su da je razina serotonina u skupini zdravih ispitanika neovisna o dobi. Linearnom regresijskom analizom u skupini zdravih ispitanika utvrđeno je da je zavisna varijabla predvidiva za samo 0,4% ($r^2 = 0,004$) nezavisnih varijabli, što dokazuje da se koncentracija serotonina u trombocitima ne može predvidjeti po životnoj dobi. Rezultati ispitivanja u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem također nisu pokazali povezanost razine serotonina s dobi što je potvrdila i analiza linearne regresije po kojoj je zavisna varijabla predvidiva za samo 0,7% ($r^2 = 0,007$) zavisnih varijabli. Ujednačenost skupina po dobi pridonosi pouzdanijoj interpretaciji rezultata i zaključivanju o istovjetnoj neovisnosti koncentracije serotonina i životne dobi i u zdravih i u oboljelih od depresivnog poremećaja. No, nemamo podatke za vrijed-

nosti serotonina u starijoj životnoj dobi koja je pak značajan dio moderne civilizacije. Stoga bi u budućim istraživanjima bilo važno ispitati veću skupinu takve populacije radi moguće dopune referentnog intervala. Nepoznavanjem gerijatrijskih referentnih intervala pridružujemo se općepreputnoj manjkavosti na čitavom području laboratorijske dijagnostike te ipak držimo vrijednim što smo uspostavili referentni intervala za životnu dob od 20 do 60 godina.

5.6. Utjecaj spola na koncentraciju serotonina u trombocitima

Literaturni podaci o utjecaju spola na razinu serotonina mogu se podijeliti u dvije grupacije kontradiktornih studija. U jednoj su rezultati ispitivanja pokazali više vrijednosti serotonina u žena dok druga istraživanja ne nalaze utjecaj spola. U ispitivanjima Herviga na 200 ispitanika dobrovoljnih davaoca krvi nađena je povišena vrijednost kod žena ($2,80 \text{ nmol}/10^9$ trombocita) u odnosu na muškarce ($2,67 \text{ nmol}/10^9$ trombocita) (Hervig, 1996). Ortiz i suradnici u svojim ispitivanjima nalaze također povišene vrijednosti kod žena iako ne treba zanemariti činjenicu da je ispitivana sociološki vrlo heterogena skupina (Ortiz, 1988).

Nasuprot navedenom, Badcock u svojim radovima ne nalazi razlike u razini serotonina među spolovima (Badcock, 1987), kao ni Flachaire koja je ujedno radila i na ispitivanjima skupina po životnoj dobi (Flachaire, 1990)

Literaturni podaci o ispitivanjima u našoj populaciji (Jernej i sur., 2000.) pokazuju da nije nađena razlike među spolovima (žene – $605 \pm 165 \text{ ng}/10^9$ trombocita; muškarci – $575 \pm 170 \text{ ng}/10^9$ trombocita). Serotonin su mjerili spektrofotometrijskom metodom.

Rezultati našeg ispitivanja u skupini zdravih ispitanika nisu pokazala razliku između spolova (muškarci – $521,1 \pm 153,4$; žene – $524,2 \pm 164,8 \text{ ng}/10^9$ trombocita) što je u skladu s radovima Badcocka i Flaichaire.

U skupini ispitanika s depresivnim poremećajem također nije nađena razlika među spolovima: muškarci – $144,3 \pm 96,4$; žene $122,4 \pm 22,93 \text{ ng}/10^9$ trombocita.

5.7. Utjecaj trombocitnih pokazatelja na koncentraciju serotonina

Zavisnost koncentracije trombocitnog serotonina o trombocitnim pokazateljima gotovo da nije ispitivana. Jedinu literaturnu podaci, koji su navedeni u uvodu, spominju povezanost životnog vijeka stanica i koncentracije serotonina. Pri tome se starost trombocita promatrala kroz veličinu stanica izraženu kao MPV (Stohlawetz i sur., 1999.; Richards i sur., 1996), dok je jedino Aranda i suradnici, najprije na animalnom modelu, a kasnije na humanim trombocitima, pokazao da dužim boravkom u cirkulaciji u fiziološkim uvjetima trombociti povećavaju količinu serotonina

(Aranda, 2006). Ostali trombocitni pokazatelji nisu ispitivani, posebno ne u bolesnika s depresivnim poremećajem, za razliku od brojnih radova, spomenutih u uvodu, u kojima se ispitalo i pokazalo da postoji povezanost polimorfizma trombocita, izraženog kao PDW, s ishodom oboljelih od ishemijske srčane bolesti.

5.7.1. Povezanost broja trombocita u cirkulaciji i količine serotonina u trombocitima

Prema rezultatima naših ispitivanja nema razlike u broju trombocita u skupini zdravih ispitanika između spolova (muškarci. $223,8 \pm 44,8$; žene $239,0 \pm 50,0 \times 10^9/L$) te isto tako nema razlike ni u skupini ispitanika s depresivnim poremećajem (muškarci $232, 2 \pm 66, 5$; žene $258,8 \pm 64,8 \times 10^9/L$). Nismo našli statistički značajne razlike ni između dvije ispitivane skupine u ukupnom broju trombocita ($p = 0,05$).

Regresijskom analizom ispitali smo mogućnost zavisnosti koncentracije serotonina o broju trombocita u cirkulaciji. Prema našim rezultatima broj trombocita u fiziološkim uvjetima ne uvjetuje sadržaj serotonina u njima ($r^2 = 0,102$), ali isto tako ni u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem broj trombocita ne uvjetuje razinu serotonina ($r^2 = 0,008$).

U literaturi gdje se ispitivala razina serotonina u depresivnih poremećaja autori ne navode broj trombocita, ali iz naših rezultata možemo zaključiti da je u bolesnika s depresivnim poremećajem sačuvana homeostaza cirkulirajućih trombocita te da smanjena koncentracija serotonina nije povezana s brojem trombocita. Kako je IL-6 jedan od potvrđenih bioloških biljega patofiziologije depresivnih stanja, tako je njegova povišena vrijednost u tih bolesnika trajni proupalni stimulator trombopeze koji posljedično pridonosi nešto višim vrijednostima cirkulirajućih trombocita (Caruncho, 2010.). Tim su rezultatima sukladna i naša ispitivanja

5.7.2. Povezanost veličine trombocita i količine serotonina u trombocitima

Povezanost veličine trombocita i količine serotonina ispitivana je u nekoliko radova koji su prvenstveno bili usmjereni na pokazatelje kao mjeru dužine života trombocita ili na njihov povećani trombotički potencijal o čemu smo izviještavali u uvodu. U fiziološkim uvjetima tijekom životnog vijeka od oko tjedan dana, veličina trombocita se polaganu smanjuje što rezultira manjim MPV-om. Istovremeno, povećava se i količina serotonina unesena iz cirkulacije. Prema ispitivanjima Arande i suradnika koji su radeći na humanim trombocitima utvrdili razliku u veličini između dvije subpopulacije te svrstavali trombocite prema gradijedu gustoće u populaciju velike i populaciju male gustoće, trombociti veće gustoće su 1,28 puta veći i imaju 2,23 puta veću količinu serotonina u odnosu na trombocita male gustoće (Aranda, 1986.). Prema istraživanjima Thompsona u kojima su ultracentrifugom trombociti separirani u sedam subpopulacija, najveću gustoću imala je populacija s najvećim MPV-om ($8,19 \pm 0,64$) u odnosu na inicijalni (MPV $6,57 \pm 0,61$ fL), s dvostruko većom količinom gustih granula te četiri puta većim unosom

serotonina (Thompson, 1982.). Kako je u uvodu već opisano, razvoj tehnologije hematoloških analizatora u proteklih 20 godina omogućio je puno veću preciznost određivanja MPV-a tako da se prema sadašnjim stajalištima o analitičkoj preciznosti ovi se rezultati mogu interpretirati isključivo kao potencijalni odnos veličine i sadržaja stanica. Dokazuje to već podatak da je inicijalni MPV ispod graničnih vrijednosti referentnog intervala, neovisno o tehnologiji kojom se određivao.

Skupina zdravih ispitanika poslužila nam je kao model za procjenu fiziološke veličine trombocita. Vrijednosti MPV-a bile su unutar granica referentnog intervala kako za muškarce $MPV = 8,43 \pm 0,963$, tako i za žene $8,56 \pm 1,27$ fL. U skupini bolesnika s depresivnim poremećajem nisu nađena statistički značajne razlike u veličini trombocita – muškarci $8,28 \pm 1,06$; žene – $8,53 \pm 0,96$ fL.

U literaturi smo pronašli samo jedno slično osmišljeno istraživanje, k tomu na malom uzorku od 15 bolesnika s depresivnim poremećajem, u kojem je nađena viša vrijednost MPV-a ($MPV = 10,92 \pm 0,75$ fL) u odnosu na kontrolnu skupinu ($MPV = 10,0 \pm 0,66$ fL). Autori su radili mjerenja na analizatoru s optičkim principom u uzorcima s antikoagulansom citratom u omjeru 1:4 te je referentni raspon iznosio 7,0–11,0 (Ataoglu, 2009). Navedeni rezultati ponovo nas upućuju na zaključak, kako smo u uvodu već naglasili, da je za interpretaciju nalaza neophodno uključiti mjernu nesigurnosti analitičkog sustava u kojem se određuje MPV, mjerno načelo sustava i vrstu antikaagulansa.

U našim ispitivanjima nismo našli značajnu promjenu u veličini trombocita, izraženu kao MPV, u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem, kao ni povezanost veličine trombocita s koncentracijom serotonina. Zaključili smo to na temelju usporednih ispitivanja u uzoracima venske krvi i u uzorcima PRP-a, što još dodatno dokazuje beznačajnu razliku u veličini trombocita prije i nakon izoliranja.

Razlika između zdravih ispitanika, koji su predstavljali fiziološki model, i bolesnika s depresivnim poremećajem promišljena je sljedećim pristupom. Kontinuiranu varijablu MPV pretvorili smo u dihotomnu varijablu koja je dijelila srednje vrijednosti trombocita (MPV) na dvije kategorije – veće i manje trombocite. U skupini zdravih ispitanika našli smo veću zastupljenost manjih trombocita u kojima je pak količina serotonina bila značajno viša ($347,9 \pm 192,13$ ng/mL) nego u potskupini manjih trombocita ($275,1 \pm 158,9$).

U bolesnika s depresivnim poremećajem nismo našli značajne razlike u zastupljenosti manjih trombocita u odnosu na veće a isto tako ni razlike u količini serotonina u tim pod skupinama. Ovaj model povezanosti manjih i većih trombocita s količinom serotonina potvrdili smo statističkom analizom logističke regresije.

Naši rezultati ukazuju da je u fiziološkim uvjetima količina manjih trombocita više zastupljena što je u skladu s podacima o njihovom životnom vijeku. Iz toga slijedi da će ta populacija

trombocita imati i veću količinu serotonina kao rezultat dobro regulirane homeostaze serotonina u fiziološkim uvjetima. Suprotno, u bolesnika s depresivnim poremećajem nema pravilnog udjela trombocita po veličini pa zaključujemo da bi jedan od uzroka sniženom sadržaju serotonina mogao biti i izmijenjen životni vijek trombocita. Zaključak nalazi uporište i u našim nalazima veće zastupljenosti retikuliranih trombocita u bolesnika s depresivnim poremećajem. Do danas nema objavljenih podataka o vrijednostima retikuliranih trombocita u depresivnom poremećaju a naša ispitivanja snažnom statističkom značajnošću ($p < 0,001$) pokazuju višu vrijednost u depresivnim poremećajima ($2,36 \pm 1,38\%$) nego li je to u zdravih ispitanika ($1,58 \pm 0,722\%$). Objašnjenje za veću zastupljenost aktiviranih trombocita možemo tražiti u koncentraciji membranskog proteina P-selektina čije smo značenje u aktivaciji trombocita detaljno razmatrali u uvodu (Piletz, 2000, Mendoza-Sotelo, 2010.).

Nadalje, naši rezultati pokazuju da MPV kao pokazatelj veličine stanica nema prediktorsku dijagnostičku vrijednost u bolesnika s depresivnim poremećajem ako se radi o jednokratnom uzorkovanju. Pri tome se ne smije zanemariti činjenica da je MPV uprosječna vrijednost veličina stanica te da nije pokazatelj subpopulacija kao što je to ispitano u radu Thompsona. U budućim istraživanjima trebat će longitudinalno pratiti bolesnike da bi se ispitale moguće promjene u MPV-u nakon uvođenja terapije. Tek po završetku takvih ispitivanja mogao bi se MPV opravdati kao dijagnostički biljeg depresivnih poremećaja. Razvoj novih tehnologija najavljuje mogućnost mjerenja gustoće trombocita iskazane kao MPC (*eng. MPC, Mean Platelet Component Concentration*). Ovaj novi pokazatelj omogućit će nova istraživanja koja će proučavati povezanosti gustoće stanica i sadržaja serotonina (Ahnadi, 2004).

5.7.3. Povezanost polimorfizma trombocita i količine serotonina u trombocitima

U literaturi nalazimo dosta istraživanja u kojima se ispitivao PDW kao pokazatelj heterogenosti cirkulirajućih trombocita. Ponajviše su zastupljena istraživanja na bolesnicima s aterosklerotskim promjenama. Istraživanja su pokušala potvrditi moguće prediktorsko značenje PDW-a u razvoju srčane ishemijske bolesti što smo već istaknuli u uvodu.

Naša ispitivanja nisu dokazala da postoji razlika između PDW-a u fiziološkim uvjetima i onoga u depresivnom poremećaju (zdravi $16,46 \pm 0,566$; depresivni poremećaj $16,48 \pm 0,621$).

5.8. Dijagnostička točnost određivanja koncentracije serotonina u trombocitima

Koncentracija trombocitnog serotonina mogla bi imati prediktivnu vrijednost za prepoznavanje depresivnog poremećaja. Na temelju statističke ROC analize ustanovili smo dobru dijagnostičku

točnost (AUC = 0,858) uz graničnu vrijednost od 118,8 ng serotonina/ 10^9 trombocita. Granična tj. diskriminacijska vrijednost predstavlja onu koncentraciju serotonina kod koje je postignuta najbolja osjetljivost i najbolja specifičnost za razlikovanje zdravih ispitanika od onih oboljelih od velikog depresivnog poremećaja. Vrijednosti serotonina od 118,8 ng serotonina/ 10^9 trombocita pridružena je osjetljivost od 64% i specifičnost od 96,5 %.

Pozitivna prediktivna vrijednost iznosi 94,5% što znači da će nalaz serotonina niži od graničnog 118,8 ng/ 10^9 trombocita s 94,5% vjerojatnosti pripadati bolesnicima s depresivnim poremećajem. Negativna prediktivna vrijednost koja iznosi 75% objašnjava i svrstava 75% koncentracija serotonina većih od 118,8 ng/ 10^9 trombocita u kategoriju ispitanika bez depresivnog poremećaja. Ove prediktivne vrijednosti ovise o prevalenciji bolesti u ovoj ispitivanoj populaciji.

Za razliku od prediktivnih pokazatelja, omjeri vjerojatnosti s pozitivnim i negativnim predznakom izgleda za bolest, odnosno izgleda za odsustvo bolesti, a koji su izračunati za ovu skupinu ispitanika mogu se primjeniti i na druge kliničke studije ako se depresivni poremećaj jednako definira kao u ovom ispitivanju, a neovisno o prevalenciji bolesti.

Omjer vjerojatnosti za pozitivni rezultat pretrage LR + (*engl. likelihood ratio*) iznosi 18,56 te se određivanje serotonina u trombocitima može smatrati korisnim dijagnostičkim testom za depresivne poremećaje. Zaključujemo da serotonin ima značajan doprinos u prihvatanju dijagnoze depresivnog poremećaja budući da je $LR+ \geq 10$ a $LR- \leq 1$. Omjer vjerojatnosti za negativan nalaz iznosi $LR- \leq 0,37$, što govori da je manja vjerojatnost negativnog nalaza (nalaz viši od 118,8 ng/ 10^9) u bolesnika s depresivnim poremećajem nego u zdravih ispitanika.

Zapažamo da u stručno-znanstvenoj literaturi vlada općeprihvaćeno stajalište da je trombocitni serotonininski sustav zrcalna slika serotonergičnog sustava u SŽS, a mi dodajemo da je svaka zrcalna slika podložna iskrivljenju, uljepšavanju odraza, ali srećom i realnom presliku. Pristupimo li s takvim promišljanjem rezultatima naših ispitivanja provedenim isključivo na humanim trombocitima, valja nam trajno promišljati o dinamici trombopeze koja svakodnevno dopunjava cirkulaciju s oko 100 biliona stanica, čija se aktivacija mjeri u sekundama. Stoga svaki istraživački rad ne smije zaboraviti na uvjete *in vitro* koji gotovo trenutačno mijenjaju oblik stanice. Istovremeno, dobro je poznata dinamična i brza kinetika unosa serotonina u trombocite koja održava ravnotežu cirkulirajućeg i trombocitnog serotonina. Izmjerene sastavnice navedenog sustava u određenom trenutku u prvom redu odraz su trenutačne homeostaze.

Usprkos spoznajama o ograničenjima ispitivanja na trombocitnom modelu i nemogućnosti holističkog pristupa depresivnim poremećajima, možemo naša ispitivanja sagledavati i kao metodološki pristup određivanju trombocitnog serotonina. Rezultati ohrabruju u opravdanosti njegove primjene za buduća znanstvena i klinička ispitivanja, pa čak i za kliničku praksu.

Ispitivanjima trombocitnih pokazatelja proveli smo jednokratno, odnosno presječno u samo jednom trenutku svake jedinice s jedinim kriterijem – prisustvo depresivnog poremećaja.

Ovakva studija nije pokazala povezanost trombocitnih pokazatelja s koncentracijom serotonina, te bi ispitivanja valjalo nastaviti u longitudinalnom praćenju bolesnika. U vremenu, u kojem će se bolesnici još i podvrći terapiji, moguće je očekivati promjene morfoloških pokazatelja.

Retikulirani trombociti, po čijem udjelu smo procijenili ubrzanu aktivnost trombopoeze, pojavljuju se kao novi pokazatelj čija je primjena tehnološki brzo i lako provediva. Buduća istraživanja imaju izazov da na većem broju bolesnika povežu retikulirane trombocite i patofiziološke procese u depresivnom poremećaju, moguće ih razjasne te čak da ustanove stupanj dijagnostičke značajnosti ovog trombocitnog pokazatelja. Isti izazov pruža ideja o nastavku ispitivanja na tragu modela trombocitnog serotonina u diferencijalnoj dijagnostici depresivnih poremećaja. Depresivni su poremećaji heterogena skupina s različitim pristupima liječenju te bi u kliničkoj praksi dobrodošlo poboljšanje diferencijalne dijagnostike i praćenja terapije.

Ispitivanje koncentracije serotonina u fiziološkim uvjetima proteglo se kroz nešto više od godine dana te su ispitanicima uzorkovane krvi u svim godišnjim dobima. Više istraživača objavilo je podatke o sezonskim utjecajima na razinu serotonina, no taj utjecaj nismo uključili u interpretaciju rezultata ni podijelili skupine po sezoni uzorkovanja. Zato tek možemo pretpostaviti da raspon vrijednosti serotonina u našem istraživanju sadrži i varijabilnost zbog godišnjih doba, što bismo preciznije znali da je studija bila osmišljena s dovoljno velikim podskupinama i rasponom serotonina razdijeljenog u razrede po godišnjim dobima.

Moguća ispitivanja koncentracije serotonina u zdravoj populaciji u području mediteranskog podneblja moglo bi pridonijeti i boljem razumijevanju etiologije depresivnih poremećaja.

Suprotno Mediteranu, fiziologija trombocitnog serotoninuskog sustava u nordijskim zemljama u kojima klima uvjetuje komorni život, u kojem je rad neminovnost a zastupljenost depresivnih poremećaja veća u odnosu na druge prostore, možda bi mogla hipotetski razjasniti uzročnopsljudičnu povezanost rada i depresije. Ovu hipotezu začaranog kruga postavljamo na podacima iz povijesti filozofije po kojoj su velike povijesne ličnosti u potpunoj predanosti radu bile opisani kao melanholidi?!

»Dok se znanstvena znanja tiču pojedinih predmeta za koje ni u kojem slučaju ne mora svatko znati, u filozofiji je uvijek u pitanju cjelina bića koja se tiče čovjeka kao čovjeka, istina koja, tamo gdje zasvijetli, potresa dublje nego bilo koje znanstveno znanje.« (Karl Jaspers, 1953.)

ZAKLJUČCI

Uz uvjet da se laboratorijska analiza uzoraka 3 ml venske krvi izvrši do dva sat nakon uzorkovanja moguća su visoko reproducibilna određivanja slijedećih kvalitativnih i kvantitativnih morfoloških karakteristika trombocita (MPV, Ptc, PDW i Plr) uz simultano izoliranje trombocita.

Opisana metodologija izolacije i liziranja trombocita može se primjeniti za određivanje koncentracije serotonina ELISA i HPLC metodama.

Primjenom ELISA metode u populaciji 179 zdravih ispitanika utvrđeni su referentni rasponi normalnih vrijednosti te utjecaj dobi i spola na koncentraciju serotonina u njima.

Ne postoje statistički značajne razlike trombocitnih pokazatelja MPV-a i PDW-a u populaciji zdravih ispitanika i populaciji od 137 ispitanika s dijagnosticiranim depresivnim poremećajem. Jedina statistički značajna razlika je u povećanoj zastupljenosti retikuliranih trombocita u bolesnika s depresivnim poremećajem.

Našli smo statistički značajno manju koncentraciju serotonina u trombocitima u bolesnika s depresivnim poremećajem u odnosu na zdravu populaciju.

Nije uočena korelacija između koncentracije trombocitnog serotonina i morfoloških karakteristika trombocita u zdravih ispitanika i u ispitanika s depresivnim poremećajem.

Stupanj međuzavisnosti morfoloških karakteristika trombocita i koncentracije serotonina nema statističku značajnost u zdravih ispitanika i bolesnika s depresivnim poremećajem.

Razvrstavanjem trombocita po veličini našli smo u skupini zdravih ispitanika i pozitivnu povezanost koncentracije trombocitnog serotonina i skupine manjih trombocita

Pri graničnoj vrijednosti od 118,8 ng serotonina / 10^9 trombocita, pretraga ima visoku specifičnost koja zadovoljava dijagnostičke potrebe te visoku pozitivnu prediktivnu vrijednost za što objektivniju dijagnozu depresivnog poremećaja.

SAŽETAK

Ovaj smo rad posvetili istraživanjima trombocitnih pokazatelja MPV, Pct, PDW, Plr i koncentraciji trombocitnog serotonina u fiziološkim uvjetima i u bolesnika s depresivnim poremećajem. U prvom dijelu razradili smo metodološke pristupe koji omogućuju simultano mjerenje trombocitnih pokazatelja i određivanje koncentracije trombocitnog serotonina metodom ELISA. Istraživanje je provedeno u 179 zdravih ispitanika i 137 bolesnika s depresivnim poremećajem.

Učinili smo validaciju metode ELISA te prikazali granice referentnog intervala u fiziološkim uvjetima: donja granica 201,5, gornja granica 940,2 ng serotonina/ 10^9 trombocita, za životnu dob od 20 do 60 godina života neovisno o spolu.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoje li razlike u trombocitnim pokazateljima između zdravih ispitanika i bolesnika s depresivnim poremećajem. U našim ispitivanjima nismo našli značajnu promjenu u trombocitnim pokazateljima u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem. Jedino je udio retikuliranih trombocita ($2,363 \pm 1,381\%$) u bolesnika s depresivnim poremećajem pokazao statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike ($1,585 \pm 0,722\%$).

Distribucija koncentracije serotonina istražena u trombocitima ispitivane heterogene skupine zdravih ispitanika iznosila je: $549,16 \pm 255,43$ ng/ 10^9 trombocita. Naši su rezultati pokazali da bolesnici s depresivnim poremećajem imaju statistički značajno nižu koncentraciju serotonina u odnosu na kontrolnu skupinu: $259,27 \pm 175,92$ ng/ 10^9 trombocita.

Regresijskom analizom nije utvrđena uvjetovanost količine trombocitnog serotonina s ispitivanim trombocitnim pokazateljima. U skupini zdravih ispitanika pokazali smo veću zastupljenost manjih trombocita u kojima je količina serotonina bila značajno viša ($347,90 \pm 192,13$ ng/mL) nego u podskupini većih trombocita ($275,08 \pm 158,9$). Nasuprot tome, u bolesnika s depresivnim poremećajem nismo utvrdili značajne razlike u zastupljenosti manjih trombocita u odnosu na veće te isto tako ni razlike u količini serotonina u tim podskupinama.

Potvrđena je prediktivna dijagnostička vrijednost koncentracije trombocitnog serotonina u dijagnozi depresivnog poremećaja u ispitivanoj populaciji.

SUMMARY

In this study, we have investigated the following platelet parameters: MPV, Pct, PDW, Plr and platelet serotonin levels in physiological conditions and in patients with depressive disorder. In the initial section, methodological approaches have been elaborated that allow simultaneous measurement of platelet parameters and determination of the platelet serotonin level using the ELISA method. The study included 179 healthy subjects and 137 patients with depressive disorder.

The validation of the ELISA method was carried out and reference range limits shown in physiological conditions: the lower limit: 201.5, the upper limit: 940.2 ng serotonin/ 10^9 platelets, for the age of 20–60 years, regardless of the subject gender.

The aim of the study was to investigate if there were differences in platelet parameters between healthy subjects and depressive disorder patients. In our analyses, we found no significant change in platelet parameters in the group of patients with depressive disorder. A statistically significant difference ($p < 0.001$) in comparison to healthy subjects ($1.585 \pm 0.722\%$) was shown only for the proportion of reticulated platelets ($2.363 \pm 1.381\%$) in patients with depressive disorder.

The distribution of serotonin concentration, investigated in the platelets of the observed heterogeneous group of healthy subjects, amounted to 549.16 ± 255.43 ng/ 10^9 platelets. Our results showed that depressive disorder patients had statistically significantly lower serotonin level compared to the control group: 259.27 ± 175.92 ng/ 10^9 platelets.

Using regression analysis, we could not establish that the quantity of platelet serotonin was conditioned by the investigated platelet parameters. In the group of healthy subjects, we demonstrated increased frequency of small platelets in which the quantity of serotonin was significantly higher (347.90 ± 192.13 ng/mL) than in the subgroup of large platelets (275.08 ± 158.9). In contrast, we found in depressive disorder patients no significant differences in the frequency of small platelets compared to the large ones, as well as no differences in serotonin quantity in these subgroups.

The predictive diagnostic value of platelet serotonin concentration in the diagnosis of depressive disorder was confirmed in the observed population.

POPIS OZNAKA I KRATICA

5HT	– 5-hidroksitriptamin; serotonin
5HTt	– 5HT transporter
5HTP	– 5-hidroksitriptofan
TPH	– triptofan hidrksilaza (<i>-engl. Tryptophan hydroxylase</i>)
5HIAA	– 5-hidroksiindoloctena kiselina
MAO	– monoaminoksidaza
Km	– konstanata Michaelisa Mentenove
Vmax	– maksimalna brzina
PRP	– plazma bogata trombocitima (<i>engl: Platelet Reach Plasma</i>)
SCF	– faktor stimulacije matičnih stanica (<i>engl.stem cell factor</i>)
GFU-GEMM	(<i>engl. colony-forming-unit-granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte</i>)
CFU-MK	(<i>engl. colony-forming-unit-megakaryocyte</i>)
Tpo	– trombopetin
DMS	– demarkacijski membranski sustav (<i>engl. demarcation membrane system</i>)
OCS	– otvoreni kanikularni sustav (<i>engll.OCS-open canicular system</i>)
MPV	– srednji volumen trombocita (<i>eng.mean platelet volume</i>)
PDW	– širina distribucije trombocita po volumenu (<i>enlg.platelet distribution width</i>)
Pct	– trombokrit
Plr	– retikulirani trombociti
HPLC	– tekućinska kromatografija
ELISA	– Enzimski imuno test (<i>engl. Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)

LITERATURA

1. Akkerman JW, Gorter G, Klopogge E. Kinetic analysis of alpha-granule secretion by platelets. A methodological report. *Thromb Res.* 1982; 1; 27(1): 59–64
2. Alberio LJ, Clemetson KJ. All platelets are not equal: COAT platelets. *Curr Hematol Rep* 2004; 3(5): 338–43
3. Amstein R, Fetkovska N, Lüscher TF, Kiowski W, Bühler FR. Age and the platelet serotonin vasoconstrictor axis in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 11 suppl1: s35–40
4. Andres AH, Rao MA, Ostrowitzki S, Enzian W. Human brain cortex and platelet serotonin₂ receptor binding properties and their regulation by endogenous serotonin. *Life Sci* 1993; 52: 313–321
5. Angold A, Costello EJ, Erkanli A, Worthman CM. Pubertal changes in hormone levels and depression in girls. *Psychol Med.* 1999; 29: 1043–53.
6. Aranda E, Pereira J, Ajenjo C, Prieto C, Sepúlveda S, Mezzano D. Human intraplatelet 5-hydroxytryptamine is correlated with mean platelet survival time. *Thromb Res.* 1996 1; 84(1): 67–72
7. Aranda E, Pizarro M, Pereira J, Mezzano D. Accumulation of 5- hydroxytryptamine by aging platelets: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost.* 1994; 7(4): 488–92
8. Asberg M, Traskman L, Thoren P. 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch Gen Psychiatry* 1976; 33: 1193–1197
9. Ataoglu A, Canan F. Mean platelet volume in patients with major depression- effects of escitalopram treatment. *J Clin Psychopharmacol* 2009; 29: 368–371
10. Ayzenberg I, Oberman M, Leineweber K, Franke L, Yoon MS, Diener HC, Katsarava Z. Increase activity of serotonin uptake in platelets in medication overuse headache following regular intake of analgesics and triptans. *J Headache Pain* 2009; 9: 109–112
11. Badcock NR, Spence JG, Stern LM. Blood serotonin level in adults, autistic and non-autistic children with a comparison of different methodologies. *Annals Clin Biochem* 1987; 24: 625–634.

12. Bagamery K, Kvell K, Landau R, Graham J. Flow cytometric analysis of CD41-labeled platelets isolated by the rapid, one-step OptiPrep method from human blood. *Cytometry* 2005; 65A: 84–87
13. Bališa M, Bodrukalo – Nikšić T, Mokrović M, Čičin-Šain L, Jernej B. Serotonin level and serotonin uptake in human platelets: a variable interrelation under marked physiological influences. *Clin Chim Acta*. 2011. 30; 412(3–4): 299–304
14. Bališa M. Serotoninski sustav u trombocitima zdravih ljudi, Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Zagreb 2003; 1–106
15. Banović M, Bodrukalo-Nikšić T, Bališa M, Čičin-Šain L, Jernej B. Platelet serotonin transporter (5HTt): physiological influence on kinetic characteristic in large human population. *Platelets* 2010; 21: 429–438
16. Banović M, Čičin-Šain L, Jernej B, Zoran M, Coen D, Bališa M, Grgičević D. Optimizacija postupka izdvajanja trombocita iz humane krvi uz mjerenje trombocitnog serotonina. *Biochem Med* 1993; 4: 89–90.
17. Barton DA, Esler MD, Dawood T, Lambert EA, Haikerwal D, Brechley C, Socratous F, Hastings J, Guo L, Wiesner G, Kaye DM, Bayles R, Schlaich MP, Lambert GW. Elevated brain serotonin turnover in patients with depression effect of genotype and therapy. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65: 38–46
18. Bazzichi L, Giannaccini G, Betti L, Mascia G, Fabbrini L, Italliani P, De Feo F, Giuliano T, Giacomelli C, Rossi A, Lucacchini A, Bombardieri S. Alteration of serotonin transporter density and activity in fibromyalgia. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R99
19. Becker RP, De Bruyn PP. The transmural passage of the blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation: a screening electron microscopic investigation. *Am J Anat* 1976; 145: 1046–52
20. Beretta L, Cossu M, Marchini M, Cappiello F, Artoni A, Motta G, Scorza R. A polymorphism in the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene may protect against systemic sclerosis by reducing platelet aggregation. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 403
21. Berger JS, Becker RC, Ortel TL, Kuhn TL, Helms MJ, Williams RB. Platelet aggregation and serotonin activity. *J Thromb Haemost* 2007; 5: P-T-344
22. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanding biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; 60: 355–366
23. Bessman JD, Williams LJ, Gilmer PR. Mean platelet volume: the inverse relation of platelet size and count in normal subjects, and an artefact of other particles. *Am J Clin Pathol* 1981; 76: 289–293
24. Bessman JD. Platelet volume/count relationship aids thrombocytopenia prognosis *JAMA*. 1983; 249(21): 2863–2864

25. Blakely RD, De Felice LJ, Hartzell HC. Molecular physiology of norepinefrine and serotonin transporters. *J exp Biol* 1994; 196: 263–281
26. Borue X, Cooper S, Hirsh J, Condron B, Venton J. Quantitative evaluation of serotonin release and clearance in *Drosophila*. *J Neu Meth* 2009; 179: 300–308
27. Bowles KM, Cooke LJ, Richards EM. Platelet size has diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. *Clin Lab Hematol* 2005; 27: 370–373
28. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S, Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004; 126: 93–99
29. Buttarello M, Plebani M. Automated blood cell counts – State of the art. *Am J Clin Pathol* 2008; 130: 104–116
30. Buznikov GA, Chudakova IV, Zvezdina ND. The role of neurohumours in early embryogenesis. Serotonin content of developing embryos of sea urchin and loach. *J Embryol exp Morph.* 1964; 12: 563–573
31. Camacho A, Dimsdale JE. Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom Med* 2002; 62: 326–36
32. Caranobe C, Sie P, Boneu B. Serotonin uptake and storage in human platelet density subpopulations. *Br J Haematol* 1982; 52(2): 253–8
33. Caranobe C, Sie P, Nouvel C, Laurent G, Pris J, Boneu B. Platelets in myeloproliferative disorders. II. Serotonin uptake and storage: correlations with meparcine labelled dense bodies and with platelet denstiy. *Scand J Haematol* 1980; 25(4): 289–95
34. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor AW, Craig I, Harrington L, Mcclay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003; 301: 386–389
35. Chatterjee D, Anderson GM. The human platelet dense granule: serotonin uptake, tetrabenazine binding, phospholipid and ganglioside profiles. *Archives of biochemistry and biophysics* 1993; 302: 439–446
36. Cheng CK, Cheng CK, Chan J, Cembrowski GS, vanAssendelf OW. Completa blood cout reference interval diagram derived from NHANES III: stratification by age, sew and race. *Lab-Hematol.* 2004; 10(1) 42–53
37. Cho YG, Lee JH, Kim DS, Lee HS, Choi SI. Clinical usefulness of the simple technique to diagnose thrombocytopenia using immature platelet fraction. *Korean J Lab Med* 2007; 27: 1–6
38. Cieslar P, Hermanský F, Smetana K, Prokes J. Platelet functions and ultrastructure in the Hermanský-Pudlák syndrome. 1974; *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.*; 101(4): 553–61
39. Côté F, Fligny C, Fromes Y, Mallet J, Vojdani G. Recent advances in understanding serotonin regulation of cardiovascular function, *Trends in Molecular Medicine* 2004; 10: 232–238

40. Ćulafić ĐM, Mirković DS, Vukčević MD, Rudić JS. Plasma and platelet serotonin levels in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(43): 5750–5753
41. D'Hondt P, Maes M, Leysen JE, Gommeren W, Scharpé S, Cosyns P. Binding of $\text{[}^3\text{H]}\alpha\text{-paroxetine}$ to platelets of depressed patients: seasonal difference and effects of diagnostic classification. *Journal of affective disorders* 1994; 32: 27–35
42. Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG. Platelets as model for neurons? *Experientia* 1988; 44: 115–126
43. Daimon T, Gotoh Y. Cytochemical evidence of the origin of the dense tubular system in the mouse platelets. *Histochemistry* 1982; 76: 189–96
44. De Larouziere V, Brouland JP, Souni F, Drouet L, Cramer E. Inverse immunostaining pattern for synthesized versus endocytosed alpha-granule proteins in human bone marrow megakaryocytes. *Br J Haematol* 1998; 101: 618–25
45. De Luca G, Santagostino M, Secco GG, Cassetti E, Giuliani L, Coppo L, Schaffer A, Fundaliotis A, Iorio S, Venegoni L, Bellomo G, Marino P. Platelet-Large Cell Ratio and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study. *Thromb Thrombolysis*. 2010; 30(4): 426–33
46. De Luca G, Venegoni L, Iorio S, Secco GG, Cassetti E, Verdoia M, Schaffer A, Coppo L, Bellomo G, Marino P; Novara Atherosclerosis Study Group. Platelet distribution width and the extent of coronary artery disease: results from a large prospective study. *Platelets*. 2010; 21(7): 508–14.
47. Diquattro M, Gagliano F, Calabrò GM, Tommasi M, Scott CS, Mancuso G, Palma B, Menozzi. Relationship between platelet counts, platelet volumes and reticulated platelets in patients with ITP: evidence for significant platelet count inaccuracies with conventional instrument methods. *Int Jnl Lab Hem* 2009; 31: 199–206
48. Duerschmied D, Bode C. The role of serotonin in haemostasis. *Hamostaseologie* 2009; 29(4): 356–9
49. El-Sayed MS. Effects of exercise and training on blood rheology. *Sports Med* 1998; 26: 281–92
50. Endler G, Klimesch A, Sunder H. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. *Br J Haematol* 2002; 117: 399–404
51. Erspamer V, Asero B. Identification of enteramine, specific hormone of enterochromaffine cell, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 1952; 169: 800–801
52. Farias MG, Schunek EG, Dal Bò S, de Castro SM. Definition of reference ranges for the platelet distribution width (PDW): a local need. *Clin Chem Lab Med*. 2010 Nov; 48(11): 1675–6
53. Fišar Z, Kališová L, Paclt I, Andres M, Vevera J. Platelet serotonin uptake in drug-naïve depressive patients before and after treatment with citalopram. *Psychiatry Research* 2008; 161: 185–194

54. Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. Determinations 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: 2117–2120
55. Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1152–1160
56. Freyssinet JM. Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1655–1662
57. Galan AM, Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, Navalon F, Gomez E, Gasto C, Escolar G. Serotonergic mechanisms enhance platelet-mediated thrombogenicity. *Thromb Haemost* 2009; 102: 424–425
58. Gear A, Burke D. Thrombin-induced secretion of serotonin from platelets can occur in seconds. *Blood*. 1982; 60(5): 1231–4
59. Gerrard JM, White JG, Rao GH, Townsend D. Localization of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. *Am J Pathol* 1976; 101: 283–98
60. Gobbi G, Prisco M, Tazzari PL, Ricci F, Caimi L, Caccholi A, Papa S, Conte R, Vitale M. Flow cytometry detection of serotonin content and release in resting and activated platelets. *British Journal of Haematology*. 2003. 121, 829–896
61. Gordge MP. Megakaryocyte apoptosis: sorting out the signals. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 271–3
62. Goveas JS, Csernansky JG, Coccaro EF. Platelet serotonin content correlates inversely with life history of aggression in personality-disordered subjects. *Psychiatry Res* 2004; 126: 23–32
63. Greisenegger S, Endler G, Hsieh K, et al. Is elevated mean platelet volume associated with a worse outcome in patients with acute ischemic cerebrovascular events? *Stroke* 2004; 35: 1688–1691
64. Gross R, Schneider W. Introduction into the biochemistry of human blood platelets *Med Welt*. 1972; 8; 23(15): 519–21
65. Handagama PJ, George JN, Shuman MA, McEver RP, Bainton DF. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(3): 861–5
66. Harker LA. The role of the spleen in thrombokinetics. *J Lab Clin Med*. 1971; 77(2): 247–53
67. Harpwr AG, Mason MJ, Sage SO. A key role for dense granule secretion in potentiation of the Ca^{2+} signal arising from store – operated calcium entry in human platelets. *Cell Calcium* 2009; 45: 413–420
68. Hekimsoy Z, Payzin B, Ornek T, et al. Mean platelet volume in type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2004; 18: 173–176
69. Hervig TA, Farstad M, Vollset SE. Endogenous serotonin in human blood platelets: factors that may influence reference values. *Platelets* 1996; 7(1–2): 47–52

70. Hoffman R, Long MW. Control of thrombocytopoiesis: current state of the art. *Cancr Treat Res* 1995; 80: 25–49
71. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71, 533–554
72. Hummerich R, Schloss P. Serotonin-more than a neurotransmitter: transglutaminase-mediated serotonylation of C6 glioma cells and fibronectin. *Neurochem Int* 2010; 57(1): 67–75
73. Italiano J, Hartwig J.: U Michelson, Platelets 1. izd. 2002. str. 21–31. San Diego: Elsevier Inc.
74. Italiano J, Hartwig J.: U Michelson, Platelets 2. izd. 2007. str. 23–34. San Diego: Elsevier Inc.
75. Italiano JE Jr, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J. Cell. Biol.* 1999; 13; 147(6): 1299–312
76. Italiano JE, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1174–1182
77. Italiano; U Gresele P, Fuster V, Lopez JA, Page CP, Vermynen J. Platelets in Hematologic and Cardiovascular Disorders. str 8. Cambridge University Press. 2008
78. Ito T, Ishida Y, Kashiwagi R, Kuriya S. Recombinant human c-MpI ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation of human megakaryocytes. *Br J Haematol* 1996; 94: 387–90
79. Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiology Review* 1992; 72: 165–229
80. Jakovljevic M, Muck-Seler D, Pivac N, Ljubicic Đ, Bujas M, Dodig G. Seasonal influence on platelet 5-HT concentrations in patients with recurrent major depression and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1997; 41: 1028–1034
81. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2009; 102: 248–257
82. Jernej B, Banović M, Čičin-Šain L, Hranilović D, Bališa M, Orešković D, Folnegović-Šmalc V. Physiological characteristic of platelet/circulatory serotonin: study on a large human population. *Psychiatry Research* 2000; 94: 153–162
83. Jernej B, Čičin-Šain L, Iskrac S. A simple and reliable method for monitoring platelet serotonin levels in rats. *Life Sciences* 1988; 43: 1663–1670
84. Jernej B. Platelet versus neuron: a glimpse from serotonergic perspective. *Period biol* 1995; 97: 3: 183–190
85. Karas SI, Yazykov KG, Makarova EV. Serotonin content in human blood platelets is not stable. *Clin Chim Acta* 1995; 238(2): 179–86
86. Khandekar MM, Khurana AS, Deshmukh SD, Kakrani AL, Katdare AD, Inamdar AK. Platelet volume indices in patients with coronary artery disease and acute myocardial infarction: an Indian scenario. *J Clin Pathol.* 2006; 59(2): 146–9.

87. Kienast J, Schmitz G. Flow cytometric analysis of the thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorder. *Blood* 1990; 75(1): 116–21
88. Kilicli Camur N, Demirtunc R, Konuralp C, Eskiser A, Basaran Y. Could mean platelet volume be a predictive marker for acute myocardial infraction? *Med Sci Monit* 2005; 11: CR387–92
89. Kosaki G. In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets?. *Int. J. Hematol.* 2005; 81(13): 2008–19
90. Kosaki G. Platelet production by megakaryocytes: proplatelet theory justifies cytoplasmatic fragmentation model. *Int. J. Hematol.* 2008; 88(3): 255–67
91. Kozar K. Mouse development and cell proliferation in the absence of d-cyclins. *Cell* 2004; 118: 477–91
92. Kunz D, Kunz WS, Scott CS, Gressner AM. Automated CD61 immuno platelet analysis of thrombocytopenic samplas. *Br j Haematol* 2001; 112: 584–592
93. Labar i sur. *Hematologija* 1. izd. 2007. str. 60–61, Zagreb, Školska knjiga
94. Labar i sur. *Hematologija* 1. izd. 2007. str. 7, Zagreb, Školska knjiga
95. Lakhan SE, Viera K, Hamlat E. Biomarkers in psychiatry: Drawbacks and potential for misuse. *Int Arch Med* 2010; 3: 1.
96. Le Quan-Bui KH, Plaisant O, Leboyer M, Gay C, Kamal L at all. Reduced Platelet serotonin level in depression. *Psych Research* 1984; 13: 129–139.
97. Leniček Krleža J, Zadro R, Nakić M, Sučić M, Huzjak N, Juričević M, Stavljenić-Rukavina A. Značenje i uporabna vrijednost trombocitnih pokazatelja. *Paediatr croat* 1999; 43: 79–85
98. Leonard BE. Peripheral markers of depression. *Curr Opin Psychiatry* 2000; 13: 61–8.
99. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm* 1994; 95: 157–162
100. Lesurtel M, Graf R, Aleil B. Platelet – derived serotonin mediates liver regeneration. *Science* 2006; 312: 104–7
101. Lieberman JA, Mailman RB, Duncan G, Sikich L, Chakos M, Nichols DE, Kraus JE. Serotonergic basis of antipsychotic drug effects in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 1099–1117
102. Lippi U, Cappelletti P, Schinella M. Mean platelet volumes: facts or artefacts? *Am J Clin Pathol* 1985; 84: 111–113
103. Lippi U, Cappelletti P. Mean platelet volumes and platelet counts in hospitalized patients. *Am J Clin* 1984; 81(3): 406–7
104. Lippi U. Quality control of mean platelet volume: a chimera? *Am J Clin Path.* 1983; 79(5): 648–50.
105. Liu Q, Yang Q, Sun W, Vogel P, Heydorn W, Yu W-Q, Hu Z, Yu W, Jonas B, Pineda R, Calderon-Gay V, Germann M, O’neill E, Brommage R, Cullinan E, Platt K, Wilson A, Powell D,

- Sands A, Zambrowicz B, Shi Z-C. Discovery and characterization of novel tryptophan hydroxylase inhibitors that selectively inhibit serotonin synthesis in the gastrointestinal tract. *J Pharmacol Exp Therapy* 2008; 325: 47–55
106. Long M.: U Michelson, Platelets 1. izd. 2002. str. 32. San Diego: Elsevier Inc.
107. Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG, Escolar G, Galan AM. Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovasc Res* 2009; 84: 309–316
108. Lucki I. The spectrum of behaviours influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 151–162
109. Mackenzie A, Quinn JP. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 15251–15255
110. Malison RT, Price LH, Berman R, Van Dyck CH, Pelton GH, Carpenter L, Sanacora G, Owens MJ, Nemeroff CB, Nallakandi Rajeevan N, Robert M, Baldwin RM, Seibyl JP, Innis RB, Charney DS. Reduced brain serotonin transporter availability in major depression as measured by [¹²³I]-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl) tropane and single photon emission computed tomography. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 1090–1098
111. Malmgren R. Methodological aspect of studies on the 5-HT uptake mechanism in normal platelets. *Acta pharmacol et toxicol* 1981; 49: 277–284
112. Mann JJ, McBride PA, Anderson GM, Mieczkowski TA. Platelet and whole blood serotonin content in depressed inpatients: correlations with acute and life-time psychopathology. *Biol Psychiatry* 1992; 32: 243–257
113. Marc DJ, Ailts JW, Ailts Campeau DC, Bull MJ, Olson KL. Neurotransmitters excreted in the urine as biomarkers of nervous system activity: Validity and clinical applicability. *Neurosci-Biobehav Rev.* 2010; 10
114. Martin JF, Bath PM, Burr ML. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet* 1991; 7; (8780): 1409–1411
115. Martin JF, Bath PM, Burr ML. Mean platelet volume and myocardial infarction. *Lancet* 1992; 18; 339(8799): 1000–1.
116. Masson J, Sagné C, Hamon M, El Mastikawy S. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharm Rev* 1999; 51: 439–464
117. Matic GB, Sabrinah Chapman E, Zaiss M, Rothe G, Schmitz G. Whole blood analysis of reticulated platelets: improvements of detection and assay stability. *Cytometry* 1998; 34: 229–234
118. Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Solomons K. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb Haemost* 2004; 91: 119–28

119. Maurer-Spurej E, The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Throm Haemost*. 2004; Jan; 91(1): 119–28
120. Maurer-Spurej E. Serotonin reuptake inhibitors and cardiovascular diseases: a platelet connection. *Cell Mol Life Sci*. 2005 Jan; 62(2): 159–170
121. Maurer-Spurej E, Dyker K, Gahl WA, Devine DV. A novel immunocytochemical assay for the detection of serotonin in platelets. *Br J Haematol* 2002; 116: 604–6011
122. Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Misri S. Platelet serotonin levels support depression scorec for women with postpartum depression. *J Psychiatry Neurosci* 2007; 32: 23–29
123. Mazzearello P, Calligaro AL, Calligaro A. Giulio Bizzozzero: a pioneer of cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2(10): 776–81
124. Meltzer HY, Ramesh CA, Baber R, Tricou BJ. Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38: 1322–1326
125. Mendelson SC. The current status of the platelet 5-HT_{2A} receptor in depression. *J Affect Disord* 2000; 57: 13–24
126. Mezzano D, Aranda E, Rodriguez S, Foradori A, Lira P. Increase in denstiy and accumulation of serotonin by human aging platelets. *Am J Hematol* 1984; 17(1): 11–21
127. Mezzano D, del Pino GE, Montesinos M, Garcia ME, Aranda ME, Foradori A. Platelet 5-hydroxytryptamine increases with platelet age in dogs. *Thromb Haemost* 1991; 66(2): 254–8
128. Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and its discontents. Theory of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 2009; 65: 732–41.
129. Monteagudo M, Amengual MJ, Munoz L, Soler JA, Roig I. Reticulated platelets as a screening test to identfy trombocytopenia aetiology. *Q J Med* 2008; 101: 549–555
130. Montero D, Ofori-Adjei D, Wägner. Circadial variation of platelet ³H-imipramine binding, platelet serotonin content, and plasma cortisol in healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 1989; ; 26: 794–804
131. Muck-Seler D, Jakovljevic M, Deanovic Z. Platelet serotonin in subtypes of schizophrenia and unipolar depression. *Psychiatry Res* 1991; 38: 105–113
132. Muck-Seler D, Jakovljevic M, Pivac N. Platelet 5-HT concentrations and suicidal behaviour in recurrent major depression. *J Affec Disord* 1996; 39: 73–80
133. Muck-Seler D, Pivac N, Jakovljević M, Šagud M, Mihaljević-Peješ A. Platelet 5-HT concentration and comorbid depression in war veterans with or without posttraumatic stress disorder. *J Affect Disord* 2003; 75: 171–179
134. Muck-Seler D, Pivac N, Jakovljevic M. Sex differences, season of birth and platelet 5-HT levels in schizophrenic patients. *J Neural Transm* 1999; 106: 337–347

135. Muck-Seler D, Pivac N, Mustapić M, Crnčević Ž, Jakovljević M, Šagud M. Platelet serotonin and plasma prolactin and cortisol in healthy, depressed and schizophrenic women. *Psychiat Research* 2004; 127: 217–226
136. Mustard JF, Packham MA. Factors influencing platelet function: adhesion, release, and aggregation. *Pharmacol Rev.* 1970; 22(2): 97–187
137. Nachmias VT, Yoshida K. The cytoskeleton of the blood platelet: a dynamic structure. *Adv Mol Cell Biol* 1988; 2: 181–211
138. Nakatani Y, Sato-Suzuki I, Tsujino N, Nakasato A, Seki Y, Fumoto M, Arita H. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain-barriere through the 5-HT transporter in rat. *Eur J Neurosci* 2008; 27: 2466–2472
139. Niewiarowski S.: U Michelson, Platelets 1. izd. 2002. str. 181. San Diego: Elsevier Inc.
140. Nurkalem Z, Alper AT, Orhan AL, Zencirci AE, Sari I, Erer B, Aksu HU, Ergün DS, Yilmaz HY, Eren M. Mean platelet volume in patients with slow coronary flow and its relationship with clinical presentation. *Turk Kardiyol Dem Ars* 2008; 36(6): 363–7
141. O'Malley T, Langhorne P, Elton RA. Platelet size in stroke patients. *Stroke* 1995; 26: 995–999
142. Odell T, Jackson C, Friday T. Megakaryocytopoiesis in rats with special reference to polyploidy. *Blood* 1970; 35: 775–82
143. Ortiz J, Artigas F, Gelpi E. Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 1988; 43: 983–990
144. Osada M, Komeno T, Todokoro K, Takizawa M, Kojima H, Suzukawa K, Ninomiya H, Abe T, Nagasawa. Immature megakaryocytes undergo apoptosis in the absence of thrombopoietin. *Exp Hematol.* 1999; 27(1): 131–8
145. Osselaer JC, Jamrt J, Scheiff JM. Platelet distribution width for differential diagnosis of thrombocytosis. *Clin Chem* 1997; 43: 1072–1076
146. Oxenkrug GF. The content and uptake of 5-HT by blood platelets in depressive patients. *Journal of Neural Transmission* 1979; 45, 285–289.
147. Patel SR, Richardson J, Schulze H. Differential roles of the microtubule assembly and sliding in proplatelet formation by megakaryocytes. *Blood* 2005; 106: 4076–85
148. Pereira J, Palomo I, Ocqueteau M, Soto M, Aranda E, Mezzano D. Platelet aging in vivo is associated with loss of membrane phospholipid asymmetry. *Thromb Haemost* 1999; 82(4): 1318–21
149. Pereira J, Soto M, Palomo I, Ocqueteau M, Coetzee LM, Astudillo S, Aranda E, Mezzano D. Platelet aging in vivo is associated with activation of apoptotic pathways: studies in a model of suppressed thrombopoiesis in dogs. *Thromb Haemost* 2002; 87(5): 905–9
150. Piletz JE, Zhu H, Madakasira S, Pazzaglia P, Lindsey De Vane C, Goldman N, Halaris A. Elevated P-selectin on platelets in depression: response to bupropion. *J Psychiatr Res.* 2000; 34(6): 397–404

151. Pivac N, Kozaric-Kovacic D, Mustapic M, Dezeljin M, Borovecki A, Grubisic-Ilic M, Muck-Seler D. Platelet serotonin in combat related posttraumatic stress disorder with psychotic symptoms. *J Affect Disord* 2006; 93: 223–227
152. Placidi GP, Oquendo MA, Malone KM, Huang YY, Ellis SP, Mann JJ. Aggressivity, suicide attempts, and depression: relationship to cerebrospinal fluid monoamine metabolite levels. *Biol Psychiatr* 2001; 50: 783–791
153. Radley J, Hatshorn M. Megakaryocyte fragments and the microtubule coil. *Blood Cells* 1987; 12: 603–8
154. Radley JM, Haller CJ. The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer? *Blood* 1982; 60: 213–19
155. Rajantie J, Javela K, Joutsu-Korhonen L, Kekomäki R. Chronic thrombocytopenia of childhood: use of non-invasive method in clinical evaluation. *Eur J Haematol* 2004; 72: 268–272
156. Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 1948; 176: 1243–1251
157. Reddy PL, Khanna S, Subhash MN, Channabasavanna SM, Rao BS. CSF amine metabolites in depression. *Biol Psychiatry* 1992; 31: 112–118
158. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 31(10): 133–41
159. Richards EM, Baglin TP. Quantitation of reticulated platelets: methodology and clinical application. *Br J Haematol* 1995; 91: 445–451
160. Richards EM, Jestice HK, Mahendra P. Measurement of reticulated platelets following peripheral blood progenitor cell and bone marrow transplantation: implications for marrow reconstitution and use of thrombopoietin. *Bone Marrow Transplant* 1996; 17: 1029–1033
161. Rinder HM, Munz UJ, Ault KA, Bonan JL, Smith BR. Reticulated platelets in the evaluation of thrombotic disorder. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117(6): 606–10
162. Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook G, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med* 2006; 8: 1–27
163. Sabrinah Chapman E, Sorette M, Hetherington E, Zelmanovic D, Kling G, Dugailliez J, Pujol-Moix N, Okrongly D. A rapid, automated flow cytometric method to measure activated degranulated platelets by density determination. *Thromb Haemost* 2003; 89: 1004–1015
164. Sagud M, Pivac N, Mustapic M, Nedic G, Mihaljevic-Peles A, Kramaric M, Jakovljevic M, Muck-Seler D. The influence of lamotrigine on platelet serotonin concentration in patients with bipolar depression. *Psychopharmacology* 2008; 197: 683–685
165. Sakariassen KS, Hanson SR, Cadroy Y. Methods and models to evaluate shear-dependent and surface reactivity-dependent antithrombotic efficacy. *Thromb Res* 2001; 104: 149–174

166. Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, Thomas H, Lanthorn TH. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behaviour in models sensitive to antidepressants. *PLoS ONE* 2010; 3(10):
167. Sewell R, Ibboson RM, Phillips R, Carson P. High mean volume after myocardial infarction: is it due to consumption of small platelets? *Br. Med. J.* 1984; 8; 289(6458): 157–8
168. Shantsila E, Lip GY. Variability of response to antiplatelet therapy: what should we do next? *Fundam Clin Pharmacol.* 2009; 23(1): 19–22
169. Sheline YI, Bardgett ME, Jackson JL, Newcomer JW, Csernansky JG. Platelet serotonin markers and depressive symptomatology. *Biol Psychiatry* 1995; 37: 442–447.
170. Shencheng G, White JG, Haynes CL. Quantal Release of serotonin from platelets. *Anal Chem* 2009; 81: 2935–2943
171. Sixma J, Slot W, Geuze J.: *U Michelson, Platelets* 1. izd. 2002. str. 182. San Diego: Elsevier Inc
172. Snyder SH, Axelrod J, Zweig M. A sensitive and specific fluorescence assay for tissue serotonin. *Biochem Pharmacol* 1965; 14: 831–835
173. Sobas M, Pérez-Encinas M, Quinteiro C, González T, Ansoar E, Ordoñez S, Bello JL. A new association between the allelic JAK2V617F burden and the platelet volume in polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET). *Haematologica* 2008; 93(s1) Abs 0142
174. Stahl SM. Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. Serotonin receptors and pathways mediate therapeutic effects and side effects. *J Affect Disord* 1998; 51: 215–235
175. Stahl SM. Platelets as pharmacological models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. In Longenecker GL (ed): *Platelets: Physiology and Pharmacology*. New York, Academic Press, 1985; pp. 307–340
176. Stohlawetz P, Schulenburg A, Stiegler G, Panzer S, Höcker P, Kalhs P, Schwarzingen I, Müller L, Simonitsch I, Geissler K, Jilma B. The proportion of reticulated platelets is higher in bone marrow than in peripheral blood in haematological patients. *Eu J Haematol.* 1999; 63(4): 239–44
177. Takami A, Shibayama M, Orito M, Omote M, Okumura H, Yamashita T, Shimadoi S, Yoshida T, Nakao S, Asakura H. Immature platelet fraction for prediction of platelet engraftment after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007; 39(8): 501–7.
178. Thomas-Kaskel AK, Mattern D, Köhler G, Finke J, Behringer D. Reticulated platelet counts correlate with treatment response in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura and help identify the complex causes of thrombocytopenia in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cytometry part B* 2007; 72B: 241–248
179. Thompson CB, Eaton KA, Princiotta SM, Rushin CA, Valeri CR. Size dependent platelet subpopulations: relationship of platelet volume to ultrastructure, enzymatic activity, and function. *Br J Haematol* 1982; 50(3): 509–19

180. Thompson CB, Jakubowski JA, Quinn PG, et al. Platelet size and age determine platelet function independently. *Blood* 1984; 63: 1372–1375
181. Thompson CB, Love Dg, Quinn PG, Valeri CR. Platelet size does not correlate with platelet age. *Blood* 1983; 62(2): 487–94
182. Thompson CB. Selective consumption of large platelets during massive bleeding. *Br Med J* 1985; 13; 291(6488): 95–6.
183. Tong M, Seth P, Penington DG. Proplatelets and stress platelets. *Blood* 1987; 69: 522–8
184. Trowbridge EA, Reardon DM, Hutchinson D. The routine measurement of platelet volume: a comparison of light-scattering and aperture-impeance technologies. *Clin Phys Physiol Meas* 1985; 6: 221–238
185. Twarong BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol* 1953; 175: 157–162
186. Uebalhack R, Franke L, Herold N, Plotkin M, Amthauer H, Felix R. Brain and platelet serotonin transporter in humans-correlation between [123 I]- ADAM SPECT and serotonergic measurements in platelets. *Neuroscience Letters* 2006; 406: 153–158
187. Van den Bossche J, Devreese K, Malfait R, Van de Vyvere M, Wauters A, Neels H, De Schouwer P. Reference intervals for a complete blood count determined on different automated haematology analysers: Abx Pentra 120 retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500, Abbott Cell Dyn 4000 ad Bayer Advia 120. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(1): 69–73
188. Van der Loo B, Martin JE. A role for changes in platelet production in the cause of acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 672–9
189. Varol E, Icli A, Ozaydin M, Erdogan D, Arslan A. Mean platelet volume is elevated in patients with myocardial infraction with normal coronary arteries, as in patients with myocardial infraction with obstructive coronary artery disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2009; 69(5): 570–4
190. Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of 5-HT transporetr in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 1996; 16: 2352–2364
191. Wallace RE IV, Gach J, editors. *History of Psychiatry and Medical Psychology*. New York: Springer; 2006
192. Wang Z, Zhang Y, Kamen D. Cyclin D3 is essential for megakaryocytopoiesis. *Blood* 1995; 86: 3783–8
193. Watts SW, Pristley JR, Thompson JM. Serotonylation of vascular proteins important to contraction. *PloS One* 2009; 4(5): e5682
194. Westgard QC, <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>
195. Yasunari Abe Y, Wada H, Tomatsu H, Sakaguchi A, Nishioka J, Yabu Y, Onishi K, Nakatani K, Morishita Y, Oguni S, Nobori T. A simple technique to determine thrombopoiesis level using immature platelet fraction (IPF). *Thromb Res*. 2006; 118(4): 463–9

196. Yilmaz HY, Ertu Rul Z, Ertu Rul BL, Ertu Rul D. Mean platelet volume in patients with subclinical hypothyroidism. *Platelets* 2011; 22(2)143–7
197. Yilmaz MB, Saricam E, Biyikoglu SF, et al. Mean platelet volume and exercise stress test. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17: 115–20
198. Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*. 2000; 15; 95(12): 4004–7.

ŽIVOTOPIS

Rođena u Zagrebu 1954.

1973. završila II gimnaziju u Zagrebu

1978. diplomirala na Farmaceutsko biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu-smjer medicinska biokemija

1988. završila poslijediplomski studij iz medicinske biokemije na Farmaceutsko biokemijskom fakultetu u Zagrebu

1990. obranila magistarski rad pod naslovom »MTT-test: Procjena vrijednosti i primjena metode u određivanju funkcionalane aktivnosti humanih limfocita« na Farmaceutsko biokemijskom fakultetu u Zagrebu

2007. položila specijalistički ispit iz medicinske biokemije;

Od 21.07.1981. do danas u stalnom radnom odnosu u KB »Sestre milosrdnice«, Zagreb

(od 1981. do 2005. u Hematološkom laboratoriju Zavoda za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti a od 2005. voditelj Odjela za laboratorijsku hematologiju i koagulaciju u Kliničkom zavodu za kemiju)

Popis radova:

1. Vucelić, Vesna; Stančić, Vladimir; Ledinsky, Mario; Getaldić, Biserka; Sović, Dragica; Dodig, Javorka; Grbac, Ljiljana; Gaćina, Petar; Rinčić, Goran; Čaržavec, Dubravka. Combined megaloblastic and immunohematolytic anemia associated – a case report. // *Acta clinica Croatica*. 47 (2008), 4; 239–243 (prikaz, ostalo).
2. Marcus, Marko; Vrkić, Nada; Getaldić, Biserka. Analitička procjena komercijalnog testa za određivanje koncentracije P1NP. // *Biochemia medica*. 16 (2006), 2; 178–190 (izvorni stručni, stručni).
3. Getaldić, Biserka; Mujagić, Renat; Lovrić, Manuela; Čelap, Ivana; Margetić, Sandra. Assuring internal analytical quality of blood cells examination with the different automated hematology analyzers according to the EN ISO 15189:2003 // *Clinical Chemistry and Laboratory*

- Medicine / Siest, Gerard (ur.). Berlin : Walter de Gruyter, 2009. S336–S336 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
4. Getaldić, Biserka; Gjerek, Jadranka; Čelap, Ivana; Lovrić, Manuela; Topić, Elizabeta. Comparative evaluation of nucleated red blood cell (NRCB) counting by Abbott Cell-Dyn Sapphire hematology analyzer and microscopy // Clinical Chemistry and Laboratory Medicine / Siest, Gérard (ur.). Berlin, Njemačka : Walter de Gruyter, 2008. S342–S342 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
 5. Vrsalović, Mislav; Nikolić-Heitzler, Vjerran; Pavlov, Marin; Vrkić, Nada; Raić, Biserka; Getaldić, Biserka; Petrač, Dubravko. Effect of age on fibrinogen and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes // European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation / Pantaleo Giannuzzi, David A Wood (ur.). London : Lippincott Williams & Wilkins, 2007. S23–S23 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
 6. Tešija-Kuna, Andrea; Getaldić-Švarc, Biserka; Vrkić, Nada; Topić, Elizabeta. Analytical and clinical evaluation of a new Roche electrochemiluminescence immunoassay for the determination of total P1NP // Clinica chimica acta, Supplement 1 / Delanghe, J.; Wu, A.H. (ur.). Amsterdam : Elsevier, 2005. S255–S256 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
 7. Burek B, Getaldić B, Vitale B. Transient early metabolic and functional hyperreactivity and late areactivity of lymphocytes in preleukemic AKR mice. Res Exp Med (Berl). 1993; 193(3): 153–61
 8. Galesić K, Klancir S, Getaldić B, Sabljarić-Matovinović M. Evaluation of mean volume of urinary erythrocytes in the evaluation of the cause of hematuria. Relation between pH and urinary osmolarity Lijec Vjesn. 1994 May-Jun; 116(5–6): 139–41. Croatian.
 9. Kes P, Pecanić Z, Getaldić B. Plasmapheresis and hemodialysis in the treatment of acute renal failure in multiple myeloma Acta Med Croatica. 1996; 50(4–5): 173–7.
 10. Vucelić V, Stancić V, Ledinsky M, Getaldić B, Sović D, Dodig J, Grbac L, Gaćina P, Rincić G, Carzavec D. Combined megaloblastic and immunohemolytic anemia associatedm – a case report. Acta Clin Croat. 2008 Dec; 47(4): 239–43. Autor poglavlja u knjizi: Elizabeta Topić, Dragan Primorac i Stipan Janković. MEDICINSKOBIOKEMIJSKA DIJAGNOSTIKA U KLINIČKOJ PRAKSI, Medicinska naklada, 2004.

Urednica tri priručnika trajne edukacije medicinskih biokemičara u organizaciji HKMB

12. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

POVEZANOST SVOJSTAVA TROMBOCITA I KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA

Biserka Getaldić-Švarc

Ovaj smo rad posvetili istraživanjima trombocitnih pokazatelja MPV, Pct, PDW, Plr i koncentraciji trombocitnog serotonina u fiziološkim uvjetima i u bolesnika s depresivnim poremećajem. U prvom dijelu razradili smo metodološke pristupe koji omogućuju simultano mjerenje trombocitnih pokazatelja i određivanje koncentracije trombocitnog serotonina metodom ELISA. Istraživanje je provedeno u 179 zdravih ispitanika i 137 bolesnika s depresivnim poremećajem.

Učinili smo validaciju metode ELISA te prikazali granice referentnog intervala u fiziološkim uvjetima: donja granica 201,5, gornja granica 940,2 ng serotonina/ 10^9 trombocita, za životnu dob od 20 do 60 godina života neovisno o spolu.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati postoje li razlike u trombocitnim pokazateljima između zdravih ispitanika i bolesnika s depresivnim poremećajem. U našim ispitivanjima nismo našli značajnu promjenu u trombocitnim pokazateljima u skupini bolesnika s depresivnim poremećajem. Jedino je udio retikuliranih trombocita ($2,36 \pm 1,381\%$) u bolesnika s depresivnim poremećajem pokazao statistički značajnu razliku ($p < 0,001$) u odnosu na zdrave ispitanike ($1,58 \pm 0,722\%$).

Distribucija koncentracije serotonina istražena u trombocitima ispitivane heterogene skupine zdravih ispitanika iznosila je: $549,2 \pm 255,43$ ng/ 10^9 trombocita. Naši su rezultati pokazali da bolesnici s depresivnim poremećajem imaju statistički značajno nižu koncentraciju serotonina u odnosu na kontrolnu skupinu: $259,3 \pm 175,92$ ng/ 10^9 trombocita.

Regresijskom analizom nije utvrđena uvjetovanost količine trombocitnog serotonina s ispitivanim trombocitnim pokazateljima. U skupini zdravih ispitanika pokazali smo veću zastupljenost manjih trombocita u kojima je količina serotonina bila značajno viša ($347,9 \pm 192,13$ ng/mL) nego u podskupini većih trombocita ($275,1 \pm 158,90$). Nasuprot tome, u bolesnika s depresivnim poremećajem nismo utvrdili značajne razlike u zastupljenosti manjih trombocita u odnosu na veće te isto tako ni razlike u količini serotonina u tim podskupinama.

Potvrđena je prediktivna dijagnostička vrijednost koncentracije trombocitnog serotonina u dijagnozi depresivnog poremećaja u ispitivanoj populaciji.

Ključne riječi: trombocitni pokazatelji, MPV, Pct, PDW, Plr, koncentracija trombocitnog serotonina, ELISA, depresivni poremećaj, (xx stranice, xx slika, xx tablica, xx literaturna podatka, jezik izvornika: hrvatski)

Mentori:

doc. dr. Nada Vrkić, doc. Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
doc. dr. Dalibor Karlović, doc. Medicinskog Fakulteta Sveučilišta u Splitu

Povjerenstvo:

13. BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

PhD Thesis

THE RELATIONSHIP BETWEEN PLATELET PARAMETERS AND PLATELET SEROTONIN LEVEL

Biserka Getaldić-Švarc

In this study, we have investigated the following platelet parameters: MPV, Pct, PDW, Plr and platelet serotonin levels in physiological conditions and in patients with depressive disorder. In the initial section, methodological approaches have been elaborated that allow simultaneous measurement of platelet parameters and determination of the platelet serotonin level using the ELISA method. The study included 179 healthy subjects and 137 patients with depressive disorder.

The validation of the ELISA method was carried out and reference range limits shown in physiological conditions: the lower limit: 201.5, the upper limit: 940.2 ng serotonin/ 10^9 platelets, for the age of 20–60 years, regardless of the subject gender.

The aim of the study was to investigate if there were differences in platelet parameters between healthy subjects and depressive disorder patients. In our analyses, we found no significant change in platelet parameters in the group of patients with depressive disorder. A statistically significant difference ($p < 0.001$) in comparison to healthy subjects ($1.58 \pm 0.722\%$) was shown only for the proportion of reticulated platelets ($2.36 \pm 1.381\%$) in patients with depressive disorder.

The distribution of serotonin concentration, investigated in the platelets of the observed heterogeneous group of healthy subjects, amounted to 549.2 ± 255.43 ng/ 10^9 platelets. Our results showed that depressive disorder patients had statistically significantly lower serotonin level compared to the control group: 259.3 ± 175.92 ng/ 10^9 platelets.

Using regression analysis, we could not establish that the quantity of platelet serotonin was conditioned by the investigated platelet parameters. In the group of healthy subjects, we demonstrated increased frequency of small platelets in which the quantity of serotonin was significantly higher (347.9 ± 192.13 ng/mL) than in the subgroup of large platelets (275.1 ± 158.90). In contrast, we found in depressive disorder patients no significant differences in the frequency of small platelets compared to the large ones, as well as no differences in serotonin quantity in these subgroups.

The predictive diagnostic value of platelet serotonin concentration in the diagnosis of depressive disorder was confirmed in the observed population.

Keywords: platelet parameters: MPV, Pct, PDW, Plr, platelet serotonin level, ELISA method, depressive disorder (xxpages, xxfigures, xx tables, xx references, original in Croatian)

Supervisors:

Assistant professor Nada Vrkić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb
Assistant professor Dalibor Karlović, PhD, School of Medicine, University of Split

Reviewers:

