

Sanja Krtanjek

**Određivanje referentnog intervala trombocitnog
serotonina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2012.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja
kliničke biokemije, Sveučilišta u Zagrebu,
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom
zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra „Sestre milosrdnice“
pod stručnim vodstvom doc. dr. Nade Vrkić, specijaliste
medicinske biokemije

Diplomski rad izrađen je u sklopu znanstvenih projekata Ministarstva znanosti,
obrazovanja i sporta: Molekularno-biokemijski čimbenici u bolesnika s depresivnim
poremećajem (134-0000000-3372) i Hemoreološki poremećaji u kroničnim bolestima
(134-0061245-0205).

POPIS KRATICA

CI	interval pouzdanosti (<i>engl.</i> confident interval)
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
5-HT	5-hidroksitriptamin, serotonin
5-HT-2A	5-HT receptor
MAO	monoaminooksidaza
MAO B	izoenzim B monoaminooksidaze
ATP	adenindinukleotid trifosfat
ADP	adenindinukleotid difosfat
ELISA	enzimimunoanaliza (<i>engl.</i> Enzyme-linked immunosorbent assay)
RIA	radioimuno analiza (<i>engl.</i> radioimmunoassay)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>engl.</i> High-performance liquid chromatography)
PRP	plazma bogata trombocitima (<i>engl.</i> Platelet Rich Plasma)
RI	referentni interval
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	etilenediamintetraoctena kiselina
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (<i>engl.</i> World Health Organization)
IVD	laboratorijska dijagnostika (<i>engl.</i> In Vitro Diagnostic)

SADRŽAJ RADA

1. UVOD	1
1.1. REFERENTNI INTERVAL	1
1.1.1. Pojam „referentni interval“	1
1.1.2. Protokol određivanja referentnih intervala	2
1.1.3. <i>A priori</i> i <i>a posteriori</i> pristup	3
1.1.4. Tehnika direktnog i indirektnog uzorkovanja	3
1.1.5. Postupanje s vrijednostima koje značajno odstupaju od ostalih („outliers“)	4
1.1.6. Odabir referentnih pojedinaca	5
1.1.7. Kriteriji za isključenje pojedinaca i odjeljivanje skupina	6
1.1.8. Alternativa određivanju referentnih intervala	7
1.2. SEROTONIN	7
1.2.1. Sintetski put serotonina	8
1.2.2. Serotoninski sustav u trombocitima	9
1.2.3. Guste granule trombocita	10
1.2.4. Koncentracija serotonina u cirkulaciji	11
1.2.5. Otpuštanje serotonina iz trombocita	11
1.2.6. Fiziološka uloga trombocitnog serotonina te klinički značaj njegova mjerenja	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. ISPITANICI	14
3.2. UZORKOVANJE I UZORCI KRVI	14
3.3. PRIPREMA UZORKA ZA ODREĐIVANJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA	15
3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA	15
3.4.1. Princip metode	15
3.4.2. Postupak određivanja koncentracije serotonina.....	15
3.4.3. Izračunavanje koncentracije serotonina u trombocitima	17

3.5. METODA IZRADE REFERENTNIH INTERVALA	17
3.6. STATISTIČKA OBRADA	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. OPISNA STATISTIKA I REFERENTNI INTERVALI.....	19
4.1.1. Frekvencija ispitanika prema spolu	22
4.1.2. Frekvencija ispitanika prema dobi	22
4.1.3. Rezultati mjerenja svih ispitanika za trombocitni serotonin	23
4.1.4. Određivanje referentnog intervala bez odjeljivanja podskupina	24
4.1.5. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za muške ispitanike	25
4.1.6. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za ženske ispitanice	27
4.1.7. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za ispitanike mlađe od 36 godina	28
4.1.8. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za ispitanike s 36 i više godina	30
4.1.9. Usporedba koncentracija trombocitnog serotonina u ispitanika u odnosu na graničnu dob od 36 godina	32
4.2. RASPRAVA	33
5. ZAKLJUČCI	36
6.LITERATURA	37
7.SAŽETAK/SUMMARY.....	40
8. PRILOG	42
8.1. SUGLASNOST ETIČKOG POVJERENSTVA	42
9.TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	43

1. UVOD

1.1. REFERENTNI INTERVAL

1.1.1. Pojam „referentni interval“

Referentni vrijednosti su vrijednosti dobivene određivanjem ili mjerenjem na referentnim pojedincima odabranih iz referentne grupe. U pravilu je referentni interval centralni interval vrijednosti omeđen vrijednostima referentnih granica s određenim percentilom, odnosno on se odnosi na skup vrijednosti određenih u referentnoj grupi ili predviđenih za referentnu populaciju definirani specifičnim postotkom.

Referentni intervali (RI) omogućuju usporedbu individualnih vrijednosti laboratorijskih pretraga s referentnim vrijednostima dobivenih iz definirane populacije. Zbog toga i jesu od izrazite važnosti jer se koriste kod donošenja medicinske odluke, određivanja terapije ili fiziološke procjene. Za sve vrste pretraga u medicinsko-biokemijskom laboratoriju potrebni su referentni intervali da bi laboratorijsko pretraživanje moglo pridonijeti dijagnostičkom postupku. Neophodno je postojanje pouzdanih referentnih intervala koji su bitna sastavnica kliničkih laboratorija i dijagnostičkih testove uopće (Horowitz i sur., 2008).

Referentne vrijednosti su one vrijednosti za koje je navedeno za koga su referentne i kako su izrađene. U nekim slučajevima nije svejedno jesu li za pedijatrijsku populaciju, odraslu dob ili starije, jesu li za mušku ili žensku populaciju, jesu li za jednu etničku grupu ili za neku drugu. Kod nekih analiza postoje razlike u fiziološkim koncentracijama ovisno o dobi, spolu ili etničkoj pripadnosti.

Prvi puta pojam „referentne vrijednosti“ predstavio je R. Dybkaer na 8. međunarodnom kongresu kliničkih kemičara u Kopenhagenu 1972., nakon čega je osnovan odbor sastavljen od kliničkih kemičara, liječnika i statističara kojem je bio cilj izraditi preporuke s nakanom da pojam referentne vrijednosti i pripadajuća terminologija, te glavne smjernice uspostavljanja referentnih vrijednosti, budu jedinstvene u cijelom svijetu (Albert-Šubić i sur., 1990).

Glavna nit vodilja kod uspostave referentnih intervala je da referentne osobe čine referentnu populaciju iz koje se odabire referentni uzorak, odnosno skupina na kojoj se određuju referentne vrijednosti koje pokazuju referentnu distribuciju iz koje se nakon statističke obrade parametarskim ili ne parametarskim metodama određuju referentne granice koje omeđuju referentne intervale (Horowitz i sur., 2008).

1.1.2. Protokol određivanja referentnih intervala

Za određivanje referentnih intervala nužno je pratiti standardizirani protokol. Trebalo bi ga primijeniti kada se određuju referentne vrijednosti za neki novi analit, za neku drugu referentnu grupu osoba ili za novu analitičku metodu s poboljšanom analitičkom osjetljivošću i specifičnošću.

Potrebno je:

1. Formirati listu analitičkih interakcija i podrijetla biološke varijabilnosti iz medicinske i znanstvene literature.
2. Odrediti kriterije odjeljenja i isključivanja te prirediti upitnik prigodan za otkrivanje tih kriterija kod potencijalnih referentnih pojedinaca.
3. Pribaviti pisani pristanak svakog pojedinog ispitanika za sudjelovanje u studiji određivanja referentnih intervala.
4. Razvrstavanje potencijalnih referentnih pojedinaca na temelju upitnika i odgovarajuće zdravstvene procjene.
5. Isključivanje određenih pojedinaca iz referentne grupe prema kriterijima isključenja ili odgovarajućoj procjeni o narušenom zdravlju.
6. Odlučiti o prikladnom broju referentnih pojedinaca s obzirom na željene granice pouzdanosti.
7. Pripremiti izabrane osobe za uzorkovanje u skladu s rutinskom praksom uzorkovanja.
8. Sakupiti i postupati s biološkim materijalom na odgovarajući standardni način.
9. Prikupiti referentne vrijednosti analizirajući uzorke odgovarajućom analitičkom metodologijom pod dobro definiranim uvjetima i u skladu s rutinskim radom.
10. Provjeriti vrijednosti referentnih podataka i pripremiti histogram za procjenu distribucije podataka.

11. Identificirati moguće pogreške u podacima i identificirati udaljene, izolirane vrijednosti od ostatka skupa izmjerenih vrijednosti (*engl.* outliers).
12. Analizirati referentne vrijednosti, odrediti metodu za ocjenjivanje i ocijeniti referentne granice i referentni interval.
13. Dokumentirati sve prethodno navedene korake i procedure.
(Horowitz i sur., 2008)

1.1.3. *A priori* i *a posteriori* pristup

Kod *a priori* pristupa prvotno se dobro definiraju kriteriji uključenja i isključenja, a zatim se provodi uzorkovanje na pojedincima koji su prošli određene kriterije.

Kod *a posteriori* pristupa koriste se izmjerene vrijednosti iz velike kolekcije podataka već određene na medicinski ispitivanim ili drugim grupama pojedinaca. *A posteriori* pristup je nekad puno pogodniji za laboratorijske procedure koje su nove ili slabo proučene ili za koje literatura pruža malo podataka. Pošto čimbenici koji definiraju subgrupe pojedinaca nisu poznati u početku, upitnik kod ovog pristupa bi trebao biti temeljitiji nego kod *a priori* pristupa (Horowitz i sur., 2008).

1.1.4. Tehnika direktnog i indirektnog uzorkovanja

Kod tehnike direktnog uzorkovanja, bilo *a priori* ili *a posteriori* pristupom, uzorkovanje se radi namjenski za određenu studiju određivanja referentnih intervala.

Ona je jedina koja se slaže s preporukama IFCC.

Kod tehnike indirektnog uzorkovanja laboratorijske vrijednosti određene za neku drugu svrhu koriste se u procjeni referentnih intervala. Ova tehnika se koristi kada je teško ili neprimjereno sakupiti uzorke od zdravih pojedinaca, ali tu je potreban poseban oprez da se ne uključi prevelik broj rezultata od „ne zdravih“ ispitanika.

Indirektno uzorkovanje temeljeno je na pretpostavci da je većina rezultata, čak i kod bolničkih pacijenata, „normalna“. Ipak, preporučuje se uzeti rezultate od relativno zdravijih pojedinaca:

- darovatelja krvi
- pojedinaca podvrgnutih sistematskim pregledima
- pojedinaca podvrgnutim probiru

- pacijenata koji su u bolnici radi nekog manjeg kirurškog zahvata
 - pacijenata koji su u bolnici radi genetičkog testiranja
- (Horowitz i sur., 2008)

1.1.5. Postupanje s vrijednostima koje značajno odstupaju od ostalih („outliers“)

Kod određivanja referentnih intervala postoji važna pretpostavka da skup vrijednosti koje su promatrane predstavljaju homogenu kolekciju vrijednosti. To znači da sve vrijednosti dolaze od istovjetne populacije i da su one opisane nekom vjerojatnom distribucijom.

Tu homogenost zadovoljava većina vrijednosti, ali neke od njih odstupaju i predstavljaju grubu pogrešku. Ako takve vrijednosti leže između ostalih, tada ih je nemoguće otkriti, osim ako osoba koja obavlja analizu zna da ta vrijednost predstavlja neko atipično analitičko stanje ili je ona rezultat aritmetičke ili proceduralne pogreške.

Ipak, često takve vrijednosti leže daleko izvan svih ostalih vrijednosti i lako ih je odrediti kao „outliers“ s malo više pozornosti. Danas postoje mnogi statistički testovi za njihovu detekciju s tim da su preporuke usmjerene na dva testa.

Dixon je predložio test u kojem se dijeli apsolutna udaljenost između ekstremne vrijednosti i sljedeće vrijednosti s brojem svih vrijednosti te se na temelju rezultata jednakog ili većeg od $1/3$ ekstremna vrijednost proglašava nepodobnim („outliers“) i isključuje iz obrade.

Metoda koju je predložio Tukey (Tukey, 1997) uključuje pak izračunavanje nižeg i višeg kvartila, odnosno 25. i 75. percentila (prvi i treći kvartil, Q_1 i Q_3). Pomoću njih se izračuna interkvartilni raspon ($IQR=Q_3-Q_1$) koji se koristi u izračunu gornje i donje granice (donja granica = $Q_1 - 1.5 \times IQR$, gornja granica= $Q_3+1.5 \times IQR$). Svaka vrijednost koja prelazi ove granice definira kao se „outlier“ i izostavlja iz referentnog intervala (Horowitz i sur., 2008).

1.1.6. Odabir referentnih pojedinaca

Odabir referentnih pojedinaca je vrlo delikatna stvar kod određivanja referentnih intervala. Razlog tome je što je pojam zdravlja prilično relativan i teško ga je definirati.

Svjetska zdravstvena organizacija (WHO, *engl.* World Health Organization) definirala je zdravlje kao stanje potpunog fizičkog, mentalnog i socijalnog blagostanja, bez prisutstva bolesti ili nemoći. To je pokušaj definiranja apsolutnog zdravlja, premda se takvo nikad ne može potpuno postići (Burtis i Ashwood, 1994). Zbog toga je u kontekstu referentnih vrijednosti bolje koristiti neku umjereniju definiciju zdravlja budući da je moguće biti bolestan u jednom pogledu, a zdrav u drugom. Također, ono što se smatra zdravim u razvijenim zemljama moglo bi se gledati kao prilično nezdravo u zapadnoj Europi i Sjevernoj Americi.

Sukladno takvom promišljanju javila se općenitija definicija zdravlja: Zdravlje je karakterizirano minimalnim subjektivnim osjećajima i objektivnim znakovima bolesti, procijenjeno u odnosu na socijalnu situaciju subjekta i svrhu medicinske aktivnosti te je u potpunom skladu s neodrživim idealnim stanjem.

Zbog toga razne studije imaju kriterije odjeljivanja i isključenja i potrebno ih je dokumentirati za svaku pojedinačnu.

Minimalan broj referentnih pojedinaca mora biti 120 po preporuci Radne skupine (Working Group on Reference Intervals from CLSI) jer broj referentnih pojedinaca utječe na pouzdanost širine referentnog intervala. Navedeni broj referentnih pojedinaca omogućava izračun referentnih granica s 90%-tnom pouzdanošću (Horowitz i sur., 2008).

Referentnom osobom može se smatrati ona osoba, određene životne dobi, kod koje se iscrpnom anamnezom i fizikalnim pregledom te uvidom u postojeću medicinsku dokumentaciju ne može utvrditi bolesno stanje koje bi utjecalo na promjenu rezultata laboratorijskih pretraga za koje se određuju referentne vrijednosti (Albert-Šubić i sur., 1990).

1.1.7. Kriteriji za isključenje pojedinaca i odjeljivanje skupina

Kriteriji isključenja predstavljaju detalje koji, ako su za pojedinca istiniti, isključuju ga iz referentne grupe. Nemaju sve studije o referentnim intervalima jednake kriterije isključenja.

Tablica 1. Primjer mogućih kriterija isključenja

Konzumacija alkohola	Bolest, nedavno
Darivatelj krvi	Laktacija
Nenormalni krvni tlak	Pretilost
Zloupotreba droga	Profesija
Uzimanje lijekova, na recept	Oralni kontraceptivi
Uzimanje lijekova, bez recepta	Trudnoća
Okoliš	Operacija, nedavno
Dijeta	Pušenje
Genetski faktori	Transfuzija, nedavno
Hospitalizacija (trenutna/nedavna)	Zloupotreba vitamina

Kriteriji odjeljivanja skupina predstavljaju karakteristike odabranih referentnih pojedinaca koje dijele referentni uzorak u karakteristične podskupine.

Dva najčešća kriterija odjeljivanja su spol i dob.

Cilj odjeljivanja je težnja za smanjivanjem, ako je moguće i potrebno, varijacija između pojedinaca kako bi bilo što manje neidentificiranih bioloških razlika. Manje razlike između podskupina daju uže i osjetljivije referentne intervale, intervale specifične za svaku podskupinu. (Burtis i Ashwood, 1994)

Tablica 2. Primjer mogućih kriterija odjeljivanja. (Horowitz i sur., 2008)

Dob	Geografska lokacija
Krvna grupa	Uzorkovanje u uspravnom položaju
Cirkadijalna varijacija	Rasa
Djeta	Spol
Etnička pripadnost	Stadij menstrualnog ciklusa
Tjelovježba	Stadij trudnoće
Prehrambene navike	Uzimanje duhana

1.1.8. Alternativa određivanju referentnih intervala

Laboratorij može umjesto određivanja referentnih intervala preuzeti referentne intervale koje nudi proizvođač određenih reagenasa za pojedinu pretragu.

Svi proizvođači imaju IVD direktivu (*engl. In Vitro Diagnostic Directive*) koja zahtjeva da sve analize koje se obavljaju u laboratorijima budu sljedeće do referentne metode ili referentnog materijala višeg reda. Odnosno, ako proizvođač podliježe IVD direktivi to znači da ima implementiran sustav kvalitete po točno određenim standardima (Buntak, 2010.).

Prije same primjene reagencija provjerava se referentni interval na 20 sakupljenih uzoraka.

Vrlo često rutinski laboratoriji pristupaju ovom načinu provjere referentnih intervala jer je puno jeftinije i jednostavnije. Sama izrada referentnih intervala vrlo je skupa, nepraktična, iziskuje mnogo vremena te se mnogi laboratoriji jednostavno ne mogu upustiti u tako složene postupke za veliki broj pretraga koje analiziraju.

1.2. SEROTONIN

Serotonin (5-hidroksi-triptamin, 5-HT) pripada skupini biogenih amina koji imaju veliku i raznovrsnu biološku aktivnost i rasprostranjenost u biljnom i životinjskom svijetu.

Serotonin je isprva otkriven kao snažan periferni vazokonstriktor (Rappaport i sur., 1948), a kasnije je utvrđeno da pripada i u glavne neuroprijenosnike koji sudjeluju u vrlo složenim neuronskim vezama.

Posreduje u čitavom nizu perifernih i centralnih funkcija. Smatra se da djeluje na mnogobrojne fiziološke funkcije koje uključuju kardiovaskularne funkcije, disanje te termoregulaciju, posreduje u regulaciji cirkadijalnih i neuroendokrini ritmova te je uključen u razne oblike ponašanja od agresije, seksualnog ponašanja, osjetljivosti na bol. Kao posrednik u kognitivnim funkcijama njegovo djelovanje se očituje i kod pamćenja i učenja. (Lucki, 1998)

Novija istraživanja ukazuju na glavnu ulogu serotonina kod ranog embrionalnog razvoja (Levin i sur., 2006) te posredovanje kod regeneracije jetre (Lesurtel i sur., 2006).

Djelovanje serotonina vrlo je rasprostranjeno po organizmu. Neke od ostalih funkcija su mu posredstvo kod agregacije trombocita, kod vazokonstrikcija bronhalnih mišića (Gershon i Tamir, 1985.) te služi kao prekursor za sintezu neurohormona melatonina (Brzezinski, 1997).

1.2.1.Sintetski put serotonina

Serotonin se stvara u mozgu, trombocitima i probavnom traktu iz esencijalne aminokiseline triptofana u stanicama koje sadrže triptofan hidroksilazu, a to su prvenstveno serotonergični neuroni u jezgrama rafe moždanog debla, a stvara se i na periferiji, u enterokromafinim stanicama tankog crijeva.

Za daljni put metabolizma, odnosno razgradnje, glavnu ulogu ima enzim monoaminooksigenaza (MAO) čijim djelovanjem nastaje metabolit serotonina 5-hidroksiindolacetaldehid koji se djelovanjem aldehyd-dehidrogenaze prevodi u konačni metabolit serotonina, 5-hidroksiindol-octenu kiselinu (Frazer i i Hensler, 1994).

Konačni metabolit iz organizma se uklanja putem bubrega.

Kao što je prethodno rečeno, glavno mjesto sintetiziranja perifernog serotonina su enterokromafine stanice gastrointestinalne sluznice tankog crijeva. One ga nakon sinteze otpuštaju u portalni krvotok gdje ga preuzima jetra, a jetra ga zatim otpušta te transportira u pluća i plućne mikrovaskulature. Nakon prolaska kroz jetru i pluća, 99% serotonina uklanja se iz cirkulacije ulaskom u trombocite (Fuller, 1986).

Vrlo malen dio serotonina sintetizira se u pinealnoj žlijezdi gdje se odmah nakon sinteze prevodi u melatonin koji je važan u regulaciji spavanja i cirkadijalnog ritma (Brzezinski, 1997).



Slika 1. Prikaz sinteze i katabolizma serotonina

1.2.2. Serotoninski sustav u trombocitima

Trombociti su, uz serotonergične neurone i enterokromafine stanice, stanice najbogatije serotoninom. Premda se trombociti prema embriološkom podrijetlu razlikuju od živčanih stanica, komponente trombocitnog serotoninskog sustava gotovo su identične onima u serotonergičnim neuronima.

Sličnosti između trombocita i serotonergičnih neurona uključuju aktivni transportni mehanizam za serotonin, vezno mjesto za imipramin, subcelularnu pohranu serotonina u vezikule, prisutnost monoamino oksidaze tip B te neuron specifičnu enolazu, prisutnost polupropusne membrane, prisutnost dviju vrsta granula, neurotransmitera u tim granulama te jednak ulazni mehanizam tvari u stanice. Sve ovo nabrojano upućuje na mogućnost odabira trombocita kao zamjenu za istraživanje serotoninskog sustava u središnjem živčanom sustavu jer se trombociti ponašaju gotovo podjednako kao i serotoninski neuroni u središnjem živčanom sustavu. Upravo ta sličnost omogućila je razjašnjavanje patogeneze psihijatrijskih poremećaja te učinak same terapije kod određenih psihijatrijskih poremećaja (Pletscher, 1987).

Serotonin se ne sintetizira u trombocitima (nije prisutan enzim triptofan-hidroksilaza u trombocitima), već u njih prelazi iz krvne plazme aktivnim prijenosom pomoću proteinskog 5-HT prijenosnika (Pletscher, 1987).

Kada prijeđe iz krvne plazme u trombocite serotonin se pohranjuje u guste granule (delta granule) u citoplazmi trombocita u koje ulazi putem vezikularnog prijenosnika iz trombocitne citoplazme.

Od ostalih elemenata serotoninskog sustava u trombocitima se nalaze 5HT receptor (5HT-2A) i monoaminooksigenaza (izoenzim MAO-B) koja metabolizira monoamine i nalazi se na vanjskoj membrani mitohondrija trombocita (Fuller, 1986). 5-HT-2A receptor nalazi se na membrani samih trombocita.

1.2.3. Guste granule trombocita

Guste granule (*engl.*: dense bodies) su stanične organele unutar trombocita u kojima se serotonin pohranjuje u prilično velikim količinama, a pojavljuje se u kompleksu s adeninskim nukleotidima (ATP, ADP) i dvovalentnim ionima (Mg^{2+} , Ca^{2+}).

Svojstvo granula koje nazivamo gustim dolazi iz gustoće strukture vidljive pod elektronskim mikroskopom. Nerijetko se spominju u literaturi kao sekrecijske organele ili skladišta serotonina (Youssefian i Cramer, 2000). To su subcelularne organele u kojima je serotonin zaštićen od djelovanja MAO-B, analogno vezikularnom serotoninu u neuronima. Mehanizam unosa serotonina u guste granule jednak je onom za ulazak u vezikule u neuronima (Hervig i sur., 1996).

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

Sekrecija serotonina iz gustih granula odvija se izuzetno brzo, tako da se serotonin nakon stimulacije trombinom u potpunosti izluči u četiri sekunde (Gear i Burke, 1982).

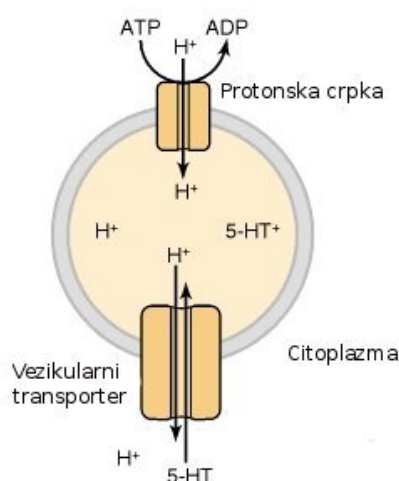
1.2.4. Koncentracija serotonina u cirkulaciji

Koncentracija serotonina u krvi refleksijski je sadržaj serotonina u trombocitima. Trombociti sadrže preko 99% ukupnog serotonina iz cirkulacije te je u cirkulaciji zanemariva količina (Ortiz i sur., 1988). Sadržaj serotonina u trombocitima ovisi o više čimbenika – o koncentraciji slobodnog serotonina u krvnoj plazmi, o aktivnosti 5-HT prijenosnika na membrani trombocita, o mehanizmu pohrane serotonina u guste granule te o otpuštanju serotonina iz trombocita u krvnu plazmu, a zapažaju se individualne razlike (Arora i sur., 1984).

Primjerice, visoka koncentracija serotonina u trombocitima ne mora ujedno značiti i visoku koncentraciju serotonina u plazmi (nađeno kod trombocitopenija), ali rezultati istraživanja na velikom broju ispitanika potvrđuju da u fiziološkim uvjetima koncentracija trombocitnog serotonina korespondira s njegovom koncentracijom u krvnoj plazmi (Hervig i sur., 1996).

1.2.5. Otpuštanje serotonina iz trombocita

Proces nakupljanja serotonina u trombocitu posreduju proteinski serotoninski prijenosnik na membrani trombocita i vezikularni prijenosnik (H^+ ATP-aza). Nakon što se serotonin unese u trombocitnu citoplazmu, on može biti razgrađen djelovanjem MAO-B ili pohranjen (Da Prada i sur., 1988).



Slika 2. Prikaz ulaska serotonina u guste granule djelovanjem vezikularnog transportera H^+ ATPaze

Serotonin se otpušta iz trombocita istovremeno s aktivacijom trombocita, a tijekom hemostaze. Oslobađa se iz gustih granula egzocitozom, a sam tok je sličan otpuštanju serotonina iz sinaptičkih vezikula. Stimulacija trombocita trombinom, kolagenom, ADP-om ili adrenalinom mobilizira unutarstanični Ca^{2+} i konačno dovodi do fuzije granularne i plazmatske membrane i otpuštanja granularnog sadržaja u plazmu (White, 1992).

1.2.6. Fiziološka uloga trombocitnog serotonina te klinički značaj njegova mjerenja

Nije još razjašnjeno zbog čega se velike koncentracije serotonina pohranjuju u trombocitima. Mnogi su istraživali fiziološke karakteristike trombocitnog 5-HT u zdravoj populaciji te su uvidjeli da postoji normalna distribucija vrijednosti koncentracije 5-HT, opadanje koncentracije s godinama te da spol i godišnje doba ne pokazuju nikakav utjecaj na koncentraciju serotonina (Rao i sur., 1994; Hervig i sur., 1996; Martin i sur., 1990).

Koncentracija serotonina u krvi vrlo dobro prikazuje stanje perifernog serotonina zbog čega je često predmet tispitivanja u hematologiji, gastroenterologiji, ginekologiji, kardiologiji, imunologiji i psihijatriji.

Depresivni pacijenti pokazuju smanjeni unos serotonina u trombocite, a kod žrtava samoubojstva (Stanley i sur., 1982) i u osoba s anksioznim poremećajem (Iny i sur., 1994) utvrđeno je smanjeno vezanje imipramina i paroksetina na 5H prijenosnik u neuronima i u trombocitima.

Depresivni pacijent i osobe sklone samoubojstvu sadrže manju količinu serotonina u trombocitima te se zbog toga kompenzatorno povećava broj serotoninskih receptora. Na taj način je omogućeno lakše aktiviranje trombocita sa serotoninom kao agonistom s čim dolazi i pojačana agregacija trombocita te veći rizik takvih osoba za koronarnu bolest (Mukhopadhyay i Mukhopadhyay, 2002).

Serotoninergički sustav prvenstveno se promatrao kroz farmakološku regulaciju, kao jedan od faktora u psihijatrijskim poremećajima, depresiji, anksioznosti, shizofreniji, anoreksiji nervosi te autizmu (Lucki, 1998).

Prisutnost smanjene koncentracije serotonina u trombocitima, kao i njegovih metabolita u cerebrospinalnoj tekućini kod alkoholičara, upućuju na vrijednost mjerenja serotonina u kliničkom radu (Benedetti i Dostert, 1992).

Snižene koncentracije serotonina u trombocitima nađene su i kod osoba oboljelih od HIV-a gdje je 5-HT snižen za više od trećine (Larsson i sur., 1989).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Referentne vrijednosti su vrijednosti pretraga koje su učinjene na uzorcima referentnih osoba, odnosno osoba određene životne dobi u kojih se iscrpnom anamnezom i fizikalnim pregledom te uvidom u postojeću dokumentaciju ne može utvrditi bolesno stanje. Iz referentnih vrijednosti određuju se referentni intervali koji čine 95% vrijednosti referentnih (zdravih) osoba. Najbitniji dio procjene i tumačenja svakog laboratorijskog nalaza jest usporedba dobivenih vrijednosti s pripadajućim referentnih intervalima te se zbog toga i javlja velika potreba za ustanovljenjem referentnih intervala za sve analite koji se danas određuju u laboratorijskoj praksi. Da bi se mogla donijeti što ispravnija medicinska odluka, bilo u smislu praćenja terapije, rješavanja kliničke situacije ili potvrde fiziološkog statusa, nužno je poznavati referentne intervale.

Referentni intervali mogu se razlikovati među populacijama. Stoga je bitno za svaku određenu populaciju odrediti pripadajući interval. Budući da nisu ustanovljeni referentni intervali za našu populaciju, a da je opravdana klinička primjena određivanja koncentracije serotonina, ovo je istraživanje usmjereno na ustanovljenje referentnih intervala trombocitnog serotonina za odraslu populaciju na području Republike Hrvatske.

Cilj ovog rada jest:

Odrediti referentne intervale serotonina u trombocitima za odraslu populaciju

Specifični ciljevi.

1. Prikupiti uzorke referentnih pojedinaca oba spola i odrasle životne dobi prema uključnim kriterijima.
2. Odrediti koncentraciju serotonina u lizatu trombocita.
3. Utvrditi vrijednosti koje odstupaju od skupine i statistički ih ocijeniti.
4. Napraviti statističku obradu dobivenih referentnih vrijednosti za uspostavu referentnog intervala.
5. Procijeniti mogućnost odjeljivanja podskupina prema dobi i spolu.

3.MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Ispitanike, njih 242, činili su zdravi dobrovoljci iz Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu (što i je jedna od preporuka Radne skupine) , djelatnici KBC „Sestre milosrdnice“ te studenti Sveučilišta u Zagrebu.

Svaki pojedinac je bio usmeno obavješten o razlogu uzimanja njegovog uzorka te je pristanak za sudjelovanje u ispitivanju potvrdio svojim potpisom na Informiranom pristanku.

Istaživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i Etičko povjerenstvo KBC „Sestre milosrdnice“.

Kriteriji uključivanja i isključivanja u studiju:

Ispitanici su morali biti odrasle životne dobi, stariji od 18 godina.

Podvrgnuti su pregled kod specijaliste psihijatra i interniste da se isključe bolesti za koje su oni nadležni te su ispunili upitnik kojim ih se moglo isključiti iz istraživanja. Oni kandidati koji su imali povišen krvni tlak, koji su bili na dijeti, koji su bili hospitalizirani u tom trenutku ili nedavno, majke koje su dojile i žene koje su bile trudne bili su isključeni iz istraživanja jer predstavljaju posebna stanja zbog kojih ih se ne može smatrati referentnim osobama.

Ispitana im je i moguća prisutnost dijabetesa te su samo oni kojima je glukoza natašte bila manja od 7,2 mmol/L mogli biti uvršteni u daljnje istraživanje.

3.2. UZORKOVANJE I UZORCI KRVI

Kod dobrovoljnih darivatelja krvi uzorkovanje se provodilo za vrijeme rutinskog darivanja krvi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu od 7 sati do 10h.

Kod djelatnika KBC „Sestre milosrdnice“ i studenata Sveučilišta u Zagrebu uzorkovanje se provodilo u prijemnoj ambulanti Kliničkog zavoda za kemiju KBC „Sestre milosrdnice“ od 8 sati do 10 sati prema protoklu o rutinskom uzimanju krvi.

Kod svih ispitanika krv se uzimala natašte.

Krv se uzimala uz dodatak antikoagulansa K₃EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina) u koncentraciji 4,55±0,85 mmol/L u standardne spremnike s podtlakom (Greiner bio-one, Austrija) prema preporuci međunarodnog stručnog tijela International Council for Standardization in Hematology.

Nakon uzimanja krvi uzorak je čuvan na hladnom (2 do 8 °C) do postupka obrade koji se obavljalo unutar sat vremena od uzorkovanja.

3.3. PRIPREMA UZORKA ZA ODREĐIVANJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA

Da bi se pripremile plazme bogate trombocitima (PRP, *engl.* **Platelet Rich Plasma**) potrebno je centrifugirati uzorke 10 minuta na 200 x g (500 okretaja/min) na temperaturi od 20°C. Iz centrifugiranih uzoraka odvoji se supernatant koji čini plazmu bogatu trombocitima. Nakon tog se mjeri broj trombocita na hematološkom analizatoru, a zatim se priprema suspenzija trombocita.

Odvoji se 200 µL plazme bogate trombocitima (PRP) i doda 800 µL fiziološke otopine. Takav uzorak se centrifugira 10 minuta na 4500 x g (4000 okretaja/min) u rashladnoj centrifugi na 4°C. Nakon toga odlije se supernatant i na talog doda 200 µL destilirane vode. Suspenzija se miješa 1 minutu u električnoj mješalici kako bi se razorili trombociti. Iz tako pripremljene suspenzije uzme se 100 µL te se čuva na -20 °C do određivanja koncentracije serotonina.

3.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE SEROTONINA U TROMBOCITIMA

3.4.1. Princip metode

Koncentracija serotonina u trombocitima određena je ELISA (*engl.* **Enzyme-Linked Immunosorbent Assay**) metodom.

ELISA pripada imunokemijskim metodama koje se temelje na specifičnoj reakciji antigen-protutijelo a odlikuju se osjetljivošću, reproducibilnošću i jednostavnošću izvedbe. Nakon nastanka kompleksa antigen-protutitijelo enzim kojim je obilježeno protutijelo katalizira reakciju u kojoj se supstrat prevodi u obojeni produkt te se mjeri intenzitet obojenja. Intenzitet obojenja proporcionalan je količini antigena (Štraus i sur., 1997).

3.4.2. Postupak određivanja koncentracije serotonina

Analiza je provedene gotovim regencijama sukladnim IVD direktivi - Serotonin Fast ELISA kit EIA-5061 (DRG International, SAD). Analitički je postupak izveden po preporučenim standardima i u cijelosti primjenjiv za rutinski rad. To je bio osnovni preduvjet da je metoda, odnosno prijeanalitički i analitički postupak u ovoj studiji identičan onom koji će se provoditi

u rutinskoj kliničkoj praksi. U protivnom bi ustanovljeni referentni intervali bili neprimjenjivi.

Protutijelo antizečja-IgG bilo je obilježeno enzimom peroksidazom, a supstrat je bioTMB (tetrametilbenzidin).

POSTUPAK:

- Prije određivanja koncentracije serotonina u trombocitima nužno je uzorke suspenzije trombocita termostatirati na sobnu temperaturu .
- Centrifugirati uzorke trombocitne suspenzije na 10.000 x g kroz 10 minuta.
- Acilirati kontrolne uzorake, standarde i uzorake suspenzije trombocita ispitanika (dodaje se 25 μ L acilirajućeg reagensa, 250 μ L acilirajućeg pufera te 25 μ L uzorka)
- Neprekidno miješanje reakcijske smjese 15 minuta na temperaturi od 20-25°C
- 25 μ L pripremljenih kontrolnih uzoraka, standarda i uzoraka suspenzije trombocita pipetira se u jažice mikrotitarske pločice na čijim je stjenkama vezana definirana količina antigena, odnosno serotonina.
- U mikrotitarske pločice se zatim dodaje 100 μ L antiseruma sa serotoninским antitijelima obilježenim enzimom.
- Sve se inkubira na 20-25 °C uz kontinuirano protresanje sat vremena u kojem se kompetitivnog veže serotonin iz suspenzije trombocita i vezanog na stjenkama jažica
- Postiže se reakcijska ravnoteža.
- Trostruko ispiranje s 300 μ L pufera za ispiranje (da se ispere suvišak slobodnog antigena–serotonina i kompleksa antigen-antiserum)
- Dodavanje 100 μ L supstrata u svaku jažicu.
- Inkubacija 30 min uz protresanje (poticanje reakcije i djelovanje enzima na supstrat)
- Dodavanje 100 μ L otopine koja sadrži 0,23 M H₂SO₄ da bi se zaustavila reakcija.

U zadnjoj inkubaciji oksidira se TMB-a (tetrametilbenzidin) a reakciju katalizira peroksidaza pri čemu nastaje obojenje.

Nakon dodatka otopine koja zaustavlja reakciju količina stvorenog obojenog kompleksa određuje se očitanjem apsorbancije na mikrotitarskoj ploči na automatskom čitaču Human reader mikrotitarske pločice (Human, Njemačka) fotometrijski na 450 nm.

Za kvantifikaciju serotonina u uzorcima potrebna je kalibracijska krivulja.

Kalibracijska krivulja izrađuje se tako da se napravi šest standardnih otopina u rasponu vrijednosti od 0 do 2500 ng/mL serotonina. Vrijednosti apsorbancije uzorka uspoređuju se s kalibracijskom krivuljom i očitava količina serotonina.

3.4.3. Izračunavanje koncentracije serotonina u trombocitima

Kada se očitaju apsorbancije nepoznatih uzoraka slijedi izrada baždarne krivulje na kojoj se poznatim koncentracijama serotonina pridružuju određene izmjerene apsorbancije. Na taj se način mogu očitati koncentracije nepoznatih uzoraka kojima smo izmjerili apsorbanciju.

Koncentracija serotonina se izražava na broj trombocita te je zbog tog potrebno koncentraciju trombocita u ng/mL koja se dobiva očitanjem iz krivulje pomnožiti s 1000 te podijeliti s brojem trombocita u PRP- u izraženim na 10^9

$$\text{Koncentracija trombocitnog 5-HT} = \frac{\text{Koncentracija 5HT u PRP (ng/ml)} \times 1000}{\text{broj trombocita}(\times 10^9/\text{ml})}$$

3.5. METODA IZRADE REFERENTNIH INTERVALA

U ovom istraživanju radio se *a priori* pristup, odnosno prvotno su se dobro definirali kriteriji uključivanja i isključivanja ispitanika, a zatim se provelo uzorkovanje na pojedincima koji su zadovoljili određene kriterije (kriteriji su navedeni u poglavlju 3.1.Ispitanici).

Odabir pojedinaca bio slučajan, što osigurava heterogenost referentne populacije. Uzorkovalo se po načelu direktnog uzorkovanja odnosno prema planu i namijeni osmišljenoj samo za ovo istraživanje.

3.6. STATISTIČKA OBRADA

Podaci su pohranjivani u programu Microsoft Office Excel 2000 (Microsoft, SAD).

Normalnost raspodjele unutar skupina testirana je Kolmogorov-Smirnoljevim testom za provjeru normalne distribucije.

U statističkoj obradi podataka korišten je program deskriptivne statistike, a testiranje značajnosti razlike među skupinama provedeno je testom za neparne nezavisne uzorke – Mann-Whitney test jer većina podataka nije bila distribuirana po Gaussovoj normalnoj razdiobi.

Statističku značajnost razmatrali smo na razini od 95% ($P < 0,05$).

Budući da nisu sve varijable distribuirane po Gaussovoj normalnoj razdiobi, te da Radna skupina prvenstveno preporuča izradu referentnih intervala uz primjenu neparametrijskih statističkih testova, mi smo i u ovom radu koristili samo neparametrijske testove. Neparametrijska metoda ne pretpostavlja kakva bi mogla biti distribucija promatranih referentnih vrijednosti, dok parametrijska metoda pretpostavlja da su vrijednosti distribuirane prema Gaussovoj normalnoj razdiobi.

Referentni intervali, odjeljivanje podskupina te identifikacija i postupanje s odstupajućim vrijednostima (outliers) izvedeni su statističkom programu MedCal ver. 12.2.1 (Mariakerke, Belgija).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPISNA STATISTIKA I REFERENTNI INTERVALI

Rezultati su prikazani opisnom statistikom i uspostavljanjem referentnih intervala na 13 tablica te grafičkim prikazima s ukupno 9 slika.

Tablica 3. Prikaz svih pojedinačnih ispitanika (N=242) s podacima o spolu, dobi te izmjerenim koncentracijama trombocitnog serotonina

Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)	Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)	Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)
1	48	307	1	68	128	1	50	17
2	49	612	1	53	647	1	39	153
1	49	925	1	60	407	1	33	224
2	53	725	1	53	620	1	36	396
1	26	328	1	53	370	1	31	305
2	22	528	1	59	364	1	36	437
2	41	641	1	49	360	1	39	1000
1	52	377	1	55	15	1	33	310
1	54	307	1	42	247	1	49	57
1	30	687	1	52	9	1	56	712
1	23	382	1	55	601	1	43	340
2	59	174	1	30	625	2	29	346
1	29	226	1	37	802	2	36	434
1	62	900	1	28	784	2	32	460
1	34	827	1	45	630	2	58	672
1	65	772	2	35	581	2	26	361
1	61	137	1	19	750	2	30	344
1	30	378	1	29	2704	2	43	786
2	47	805	1	39	392	2	58	348
1	45	629	1	30	762	2	40	279
1	60	172	1	59	232	2	25	399
1	42	382	1	39	603	2	40	536

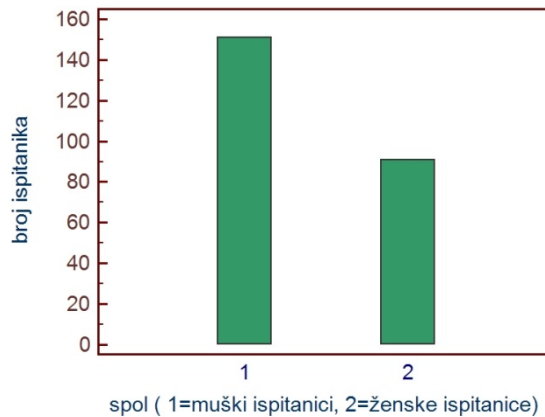
Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)	Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)	Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)
2	49	576	1	22	464	1	41	654
2	44	878	1	26	438	1	31	437
2	27	309	1	23	763	2	30	708
2	36	507	1	24	371	2	29	311
2	26	614	1	32	429	1	35	602
2	30	510	1	45	303	2	38	703
2	27	850	1	38	424	1	28	377
2	47	440	2	43	1470	1	33	337
2	33	733	1	37	584	1	33	550
2	55	73	1	44	621	2	30	401
2	58	407	2	55	725	2	30	337
2	62	457	2	48	99	2	28	245
2	32	154	2	52	672	1	30	475
2	37	215	1	48	799	2	30	329
1	36	305	2	37	939	1	29	1177
2	21	668	1	49	843	2	28	431
2	22	385	1	34	103	1	29	267
2	30	565	1	35	219	1	33	1119
1	41	1003	1	30	585	2	35	1228
1	59	447	1	47	140	1	31	904
1	39	535	1	22	734	2	47	1579
1	32	519	1	22	969	1	32	611
1	32	810	1	21	570	1	32	320
1	42	463	2	42	217	1	32	699
1	46	464	1	45	66	1	38	80
1	24	494	2	30	185	2	35	941
1	44	1498	1	46	351	2	32	408
1	29	576	2	35	717	1	37	1179
1	24	664	1	34	664	1	30	196
1	22	696	1	35	349	1	42	909
1	23	459	1	36	576	1	32	676
1	24	467	1	29	682	2	32	342
1	21	657	1	28	624	2	38	207
1	21	401	1	28	469	1	37	1647
1	35	517	1	44	621	1	51	178
1	60	520	1	33	687	2	28	745
1	25	711	1	30	2174	2	37	349
1	19	545	1	31	542	1	36	513
1	20	572	2	45	201	1	49	281

Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)	Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)	Spol	Dob (god.)	Koncentracija trombocitnog serotonina (ng/10 ⁹ trombocita)
1	43	852	2	24	414	1	37	407
1	59	581	2	18	207	1	35	46
1	56	553	2	48	770	2	36	684
1	50	527	2	35	658	1	39	667
1	38	707	1	40	592	1	29	468
1	40	96	2	18	533	2	49	165
2	56	511	2	18	552	2	25	282
2	41	521	2	18	433	2	28	299
2	52	312	2	18	503	2	21	429
2	46	406	1	60	221	2	25	468
2	19	1054	1	52	322	1	28	114
2	48	297	1	29	298	1	35	640
2	28	482	1	30	233	1	24	335
1	18	473	1	32	125	1	28	727
1	26	345	1	38	286	2	22	483
2	40	750	1	29	25	2	40	402
2	18	692	1	38	189	2	37	635
2	18	180	1	50	25	2	37	447
2	18	1308	1	46	104	2	51	659
2	40	530	1	45	519			

Kolona **Spol**: 1 – muškarci; 2 - žene

4.1.1. Frekvencija ispitanika prema spolu

Ispitanika je ukupno bilo 242, od toga 151 muški ispitanik (62,4 %) i 91 ženska ispitanica (37,6%). χ^2 testom utvrdilo se da se distribucija muških i ženskih ispitanika razlikuje ($P < 0,0001$).



Slika 3. Udio ispitanika po spolu

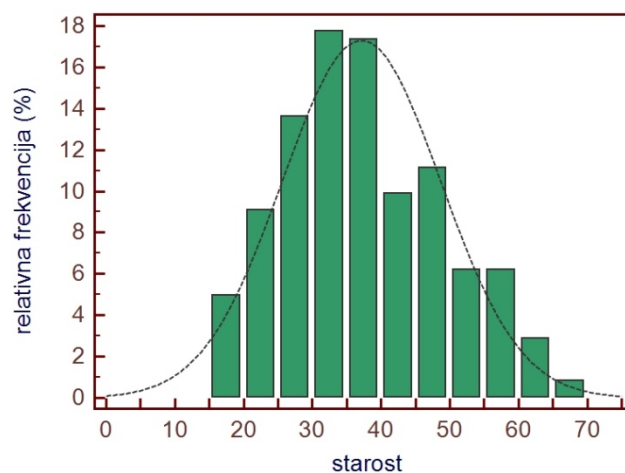
4.1.2. Frekvencija ispitanika prema dobi

Tablica 4. Statistička analiza koja opisuje skupinu ispitanika

Veličina uzorka (N)	242
Najniža starosna dob (godine)	18
Najviša starosna dob (godine)	68
Aritmetička sredina (godine)	37,1
95% CI za središnju vrijednost (godine)	35 - 38
Medijan (godine)	36
95% CI za medijan (godine)	33 - 37
Standardna devijacija (godine)	11,53
Kolmogorov-Smirnovljev test za normalnu razdiobu	Normalnost razdiobe je prihvaćena ($P=0,0573$)

Normalnost raspodjele testirana na razini značajnosti $P < 0,05$; CI = interval pouzdanosti na razini 95%

Najmlađi ispitanik je imao 18 godina, najstariji 68 godina, dok je aritmetička sredina iznosila 37,1 godina, a medijan 36 godina.



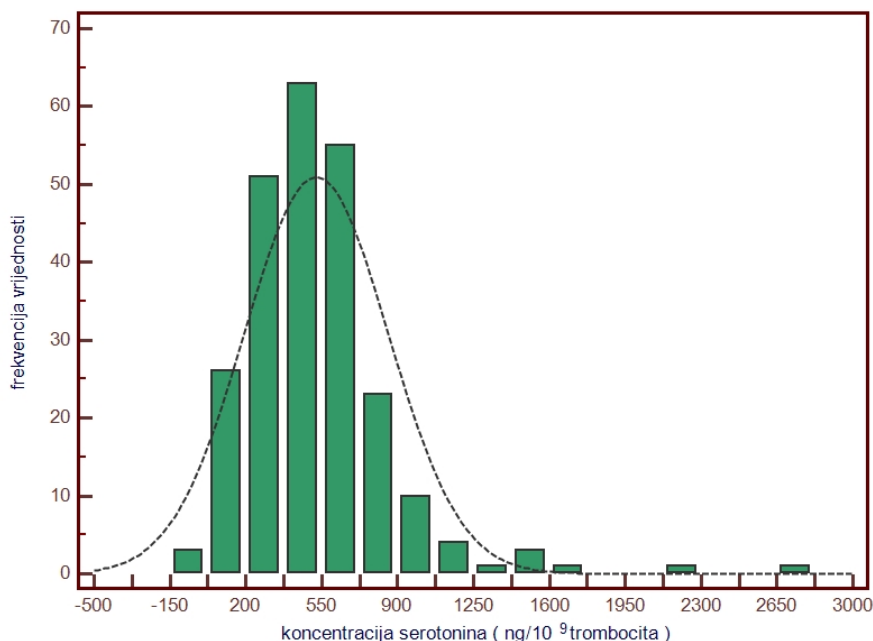
Slika 4. Relativne frekvencije ispitanika prema starosti (izraženoj u godinama) (N=121)

4.1.3. Rezultati mjerenja svih ispitanika za trombocitni serotonin

Tablica 5. Prikaz sumarne statistike za sve vrijednosti trombocitnog serotonina

Broj uzoraka (N)	242
Najniža vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	9
Najviša vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	2704
Aritmetička sredina (ng/10⁹ trombocita)	524,0
95% CI za srednju vrijednost (ng/10⁹ trombocita)	482 - 566
Medijan (ng/10⁹ trombocita)	474
95% CI za medijan (ng/10⁹ trombocita)	437 - 527
Standardna devijacija (ng/10⁹ trombocita)	331,72
Kolmogorov-Smirnovljev test za normalnu razdiobu	Normalna razdioba je odbačena (P=0,0117)

Normalnost raspodjele testirana na razini značajnosti $P < 0,05$; CI = interval pouzdanosti na razini 95%



Slika 5. Frekvencije određene koncentracije trombocitnog serotonina u skupini ispitanika (N=242)

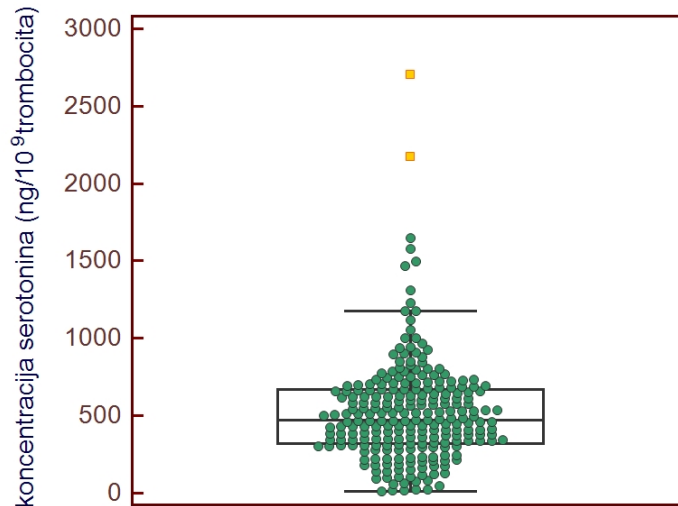
4.1.4. Određivanje referentnog intervala bez odjeljivanja podskupina

Tablica 6. Gornja i donja granica RI za trombocitni serotonin s intervalima pouzdanosti (CI 90%) za sve ispitanike (N=242)

Neparametrijska percentilna metoda	
Donja granica referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	46
90% CI za donju granicu referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	15- 96
Gornja granica referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	1457
90% CI za gornju ranicu referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	1119 -2174

95%-tni referentni interval za sve ispitanike od 18 do 68 godina iznosi 46 – 1457 ng/10⁹ trombocita.

90%-tni interval pouzdanosti za donju granicu iznosi 15 – 96 ng/10⁹ trombocita, a za gornju 1119 – 2174 ng/10⁹ trombocita.



Slika 6. Raspodjela koncentracija trombocitnog serotonina ispitanika (N=242)
kvadratići obojeni žuto – isključeni „outliers“

4.1.5. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za muške ispitanike

Tablica 7. Rezultati statističke analize za varijablu koncentracije trombocitnog serotonina u muških ispitanika (N=151)

Broj uzoraka (N)	151
Najniža vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	9
Najviša vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	2704
Aritmetička sredina (ng/10⁹ trombocita)	522
Medijan (ng/10⁹ trombocita)	473
Standardna devijacija (ng/10⁹ trombocita)	359,87
Kolmogorov-Smirnovljev test za normalnu razdiobu	Normalnost razdiobe je odbačena (P=0,0229)

Normalnost raspodjele testirana na razini značajnosti P<0,05

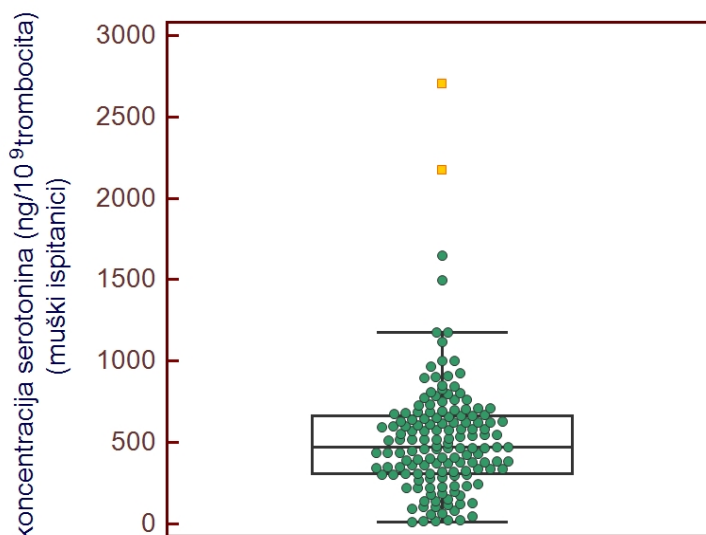
Otkrivene su četiri vrijednosti trombocitnog serotonina koje se značajno razlikuju od skupine (1498, 1647, 2174, 2704), no samo su vrijednosti 2174 i 2704 statističkim testom odbačene.

Tablica 8. Gornja i donja granica RI za trombocitni serotonin s intervalima pouzdanosti (CI 90%) za muške ispitanike (N=151)

Neparametrijska percentilna metoda	
Donja granica referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	23
90% CI za donju granicu referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	9-66
Gornja granica referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	1527
90% CI za gornju granicu referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	1003-2704

95%-tni referentni interval za muške ispitanike iznosi 23 – 1527 ng/10⁹ trombocita.

90%-tni interval pouzdanosti za donju granicu iznosi 9- 66 ng/10⁹ trombocita, a za gornju 1003 - 2704 ng/10⁹ trombocita.



Slika 7. Raspodjele koncentracija trombocitnog serotonina za muške ispitanike (N=151) kvadratići obojeni žuto – isključeni „outliers“

4.1.6. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za ženske ispitanice

Tablica 9. Rezultati statističke analize za varijablu koncentracije trombocitnog serotonina u ženskih ispitanica

Broj uzoraka (N)	91
Najniža vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	73
Najviša vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	1579
Aritmetička sredina (ng/10⁹ trombocita)	526
Medijan (ng/10⁹ trombocita)	482
Standardna devijacija (ng/10⁹ trombocita)	280,7226
Kolmogorov-Smirnovljev test za normalnu razdiobu	Normalnost razdiobe je prihvaćena (P=0,2834)

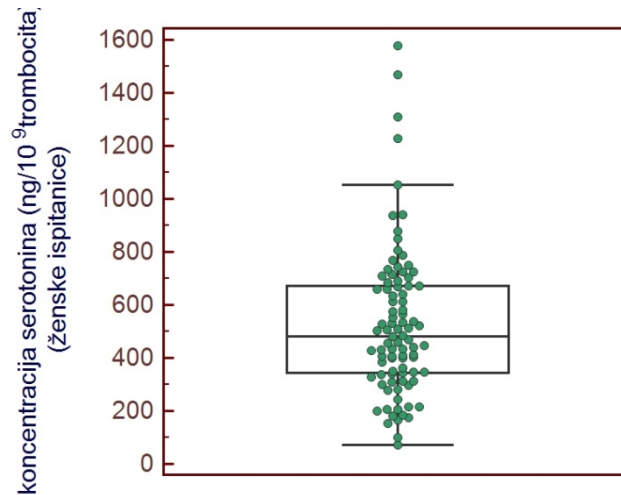
Normalnost raspodjele testirana na razini značajnosti P<0,05

Otkrivene su četiri vrijednosti trombocitnog serotonina koje odskaču od svih ostali (1228, 1308, 1470, 1579), no statističkim testom ni jedna nije odbačena.

Tablica 10. Gornja i donja granica RI s intervalima pouzdanosti (CI 90%) za ženske ispitanice (N=91)

Neparametrijska percentilna metoda	
Donja granica referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	115
90% CI za donju granicu referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	-
Gornja granica referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	1421
90% CI za gornju granicu referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	-

95%-tni referentni interval za ženske ispitanice iznosi 115 - 1421 ng/10⁹ trombocita. Interval pouzdanosti statistički je program odbacio zbog nedovoljnog broja uzoraka.



Slika 8. Raspodjela koncentracija trombocitnog serotonina za ženske ispitanice (N=91)

4.1.7. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za ispitanike mlađe od 36 godina

Tetiranje varijable dobi pokazala je da ne slijedi Gaussovu distribuciju te da središnja vrijednost (medijan) na polovici skupine iznosi 36. Zbog toga je 36 godina uzeta kao godina koja će biti uporište da napravimo dvije podjednake skupine od po 120 uzoraka. S takvom podjelom osiguran je minimalan broj ispitanika za obje skupine na kojima se može određivati referentni interval. Ova podjela nema fiziološkog uporišta već samo zadovoljen temeljni preduvjet najmanjeg broja ispitanika. Testiranjem razlike referentnih vrijednosti između te dvije skupine utvrdit će se postoji li među njima statistički značajna razlika, a time i opravdanost odjeljivanja skupina prema dobi na granici od 36 godina.

Tablica 11. Rezultati statističke analize za varijablu koncentracije trombocitnog serotonina u ispitanika mlađih od 36 godina (N=121)

Broj uzoraka N	121
Najniža vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	25
Najviša vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	2704
Aritmetička sredina (ng/10⁹ trombocita)	544
Medijan (ng/10⁹ trombocita)	482
Standardna devijacija (ng/10⁹ trombocita)	345,74
Kolmogorov-Smirnovljev test za normalnu razdiobu	Normalnost razdiobe je odbačena (P=0,0087)

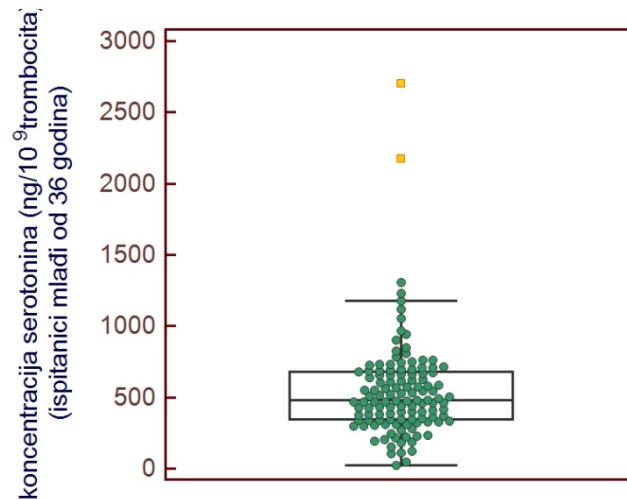
Normalnost raspodjele testirana na razini značajnosti P<0,05

Otkrivene su četiri vrijednosti trombocitnog serotonina koje su značajnoviše od svih ostali (1228, 1308, 2174, 2704), no statističkim testom odbačene su samo vrijednosti 2174 i 2704.

Tablica 12. Gornje i donje granice RI za trombocitni serotonin te interval pouzdanosti za obje granice intervala kod ispitanika mlađih od 36 godina (N=121)

Neparametrijska percentilna metoda	
Donja granica referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	103
90% CI za donju granicu referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	25 – 180
Gornja granica referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	1304
90% CI za gornju granicu referentnog intervala (ng/10⁹ trombocita)	1054- 2704

95%-tni referentni interval za ispitanike mlađe od 36 godina iznosi 103 - 1304 ng/10⁹ trombocita. 90%-tni interval pouzdanosti za donju granicu iznosi 25 - 180 ng/10⁹ trombocita, a za gornju 1054 – 2704 ng/10⁹ trombocita.



Slika 9. Raspodjela koncentracija trombocitnog serotonina za ispitanike mlađe od 36 godina (N=121) kvadratići obojeni žuto – isključeni „outliers“

4.1.8. Referentne vrijednosti trombocitnog serotonina za ispitanike s 36 i više godina

Tablica 13. Rezultati statističke analize za varijablu koncentracije trombocitnog serotonina u ispitanika koji imaju ≥ 36 godina (N=121)

Broj uzoraka N	121
Najniža vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	9
Najviša vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	1647
Aritmetička sredina (ng/10⁹ trombocita)	503
Medijan (ng/10⁹ trombocita)	463
Standardna devijacija (ng/10⁹ trombocita)	317,18
Kolmogorov-Smirnovljev test za normalnu razdiobu	Normalnost razdiobe je prihvaćena (P=0,4992)

Normalnost raspodjele testirana na razini značajnosti $P < 0,05$

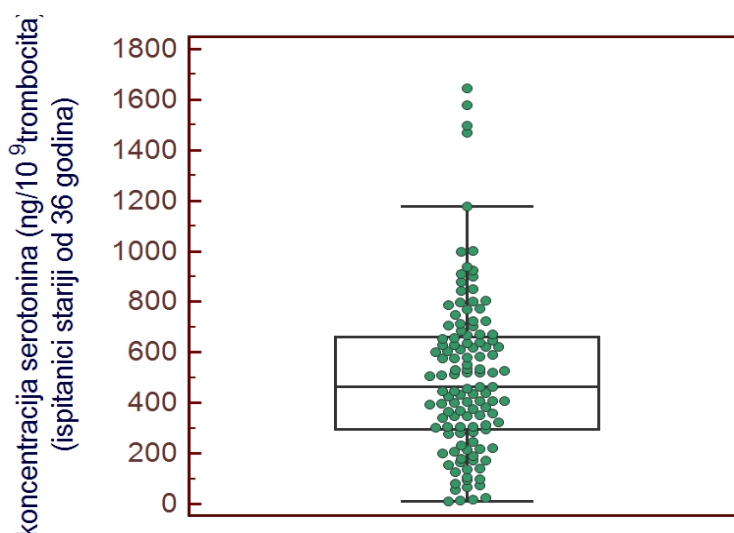
Otkrivene su četiri vrijednosti trombocitnog serotonina koje su značajno više od svih ostali (1470, 1498, 1579, 1647), no statistički program ih nije odbacio.

Tablica 14. Gornja i donja granice RI te interval pouzdanosti za obje granice intervala kod ispitanika koji imaju ≥ 36 godina (N=121)

Neparametrijska percentilna metoda	
Donja granica referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	17
90% CI za donju granicu referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	9 – 73
Gornja granica referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	1496
90% CI za gornju granicu referentnog intervala (ng/10 ⁹ trombocita)	1000 – 1647

95%-tni referentni interval za ispitanike starije od 36 godina iznosi 17 - 1496 ng/10⁹ trombocita.

90%-tni interval pouzdanosti za donju granicu iznosi 9 – 73 ng/10⁹ trombocita, a za gornju granicu 1000 - 1647 ng/10⁹ trombocita.



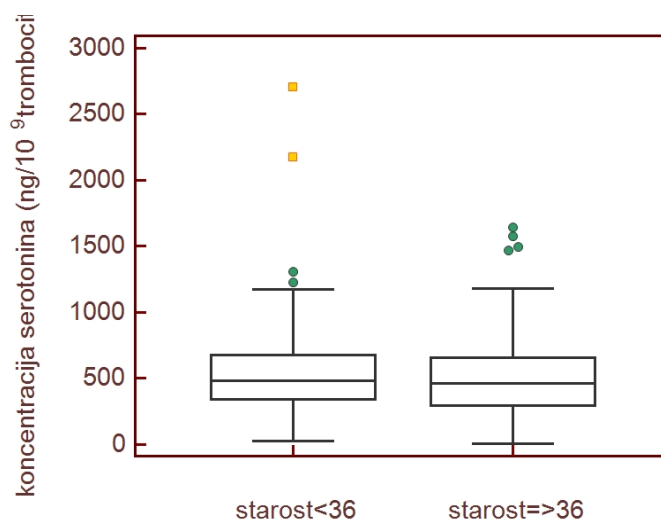
Slika 10. Raspodjela koncentracija trombocitnog serotonina za ispitanike s ≥ 36 godina (N=121)

4.1.9. Usporedba koncentracija trombocitnog serotonina u ispitanika u odnosu na graničnu dob od 36 godina

Tablica 15. Usporedba Mann-Withney-evim testom koncentracije trombocitnog serotonina dviju skupina ispitanika u ovisnoći dobi

	<36 godina	≥ 36 godina
Broj uzoraka N	121	121
Najniža vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	25	9
Najviša vrijednost trombocitnog serotonina (ng/10⁹ trombocita)	2704	1647
Medijan (ng/10⁹ trombocita)	482	463
95% CI za medijan (ng/10⁹ trombocita)	437 - 548	406- 535
Interkvartilni raspon (ng/10⁹ trombocita)	343,5 - 677,5	294,3 - 661,0
Testiranje razlike (na razini značajnosti P<0,05)	P=0,3452	

Testiranjem Mann-Withney-evim testom dvije skupine ispitanika koji imaju manje od 36 godina i onih koji imaju 36 i više godina utvrđeno je da između njih nema statistički značajne razlike (P=0,3452).



Slika 11. Usporedba vrijednosti trombocitnog serotonina za dvije skupine ispitanika prema kriteriju > ili ≥36 godina kvadratići obojeni žuto – isključeni „outliers“

4.2. RASPRAVA

Najbitnije dio procjene laboratorijskog nalaza, kao što je prethodno rečeno, jest usporedba dobivenih vrijednosti s pripadajućim referentnim intervalima. U zdravstvenom okruženju oni su jedno od glavnih uporišta za donošenje medicinske odluke i velika pomoć u interpretaciji individualnih rezultata laboratorijskih pretraga.

Istraživanja su pokazala da se 80% medicinskih odluka donosi isključivo na temelju interpretacije laboratorijskog nalaza (Katayev i sur., 2010), što dodatno ističe potrebu za primjenom pouzdanih referentnih intervala.

Koncentracija trombocitnog serotonina vrlo je dobar pokazatelj homeostaze perifernog odjeljka serotonina u organizmu. Kao jedan od biokemijskih biljega u ulozi indikatora primjenjuje se u psihijatrijskim poremećajima, depresiji, anksioznosti, shizofreniji, anoreksiji nervosi te autizmu. Vrlo je dobar pokazatelj terapijskog odgovora na terapiju antidepresivima što je i pokazalo jedno istraživanje provedeno kod nas (Pivac i sur., 2003) te je naglašena klinička potreba za uspostavom pouzdanih referentnih intervala.

No, sama provedba istraživanja u svrhu njihova određivanje financijski je često nepogodna i otežana. Problemi se javljaju često već na početku kada je potrebno definirati zdravu populaciju, odabrati pojedince koji bi bili referentni i koji bi mogli biti ogledalo određene populacije. Iznimno je teško određivati referentne intervale u pedijatrijskoj populaciji jer ona zahtjeva još veću dozu opreza i poteškoća. Najveći problem kod određivanja referentnih intervala za pedijatrijsku populaciju jest otežano dobivanje dovoljnog volumena uzorka koje je ponekad gotovo nemoguć, primjerice kod novorođenčadi. Nadalje, fiziološka koncentracija biokemijskih veličina kod pedijatrijske populacije varira iz godine u godinu, dapače iz mjeseca u mjesec. Fiziologija cijelog organizma vrlo je promjenjiva i kod takve populacije starosna dob ima velik utjecaj na referentne intervale što otežava njihovo određivanje. Potvrda tome je i veliko istraživanje CALIPER (*engl. Canadian Laboratory Initiative on Pediatrics Reference Interval Database*) koje već nekoliko godina provodi mnoštvo stručnjaka kako bi odredili referentne intervale za 40 biokemijskih biljega u pedijatrijskoj populaciji (Jung i Adeli, 2009)

Upravo zbog svih tih poteškoća većina laboratorija nije spremna pristupiti tako opsežnom poslu određivanja referentnih intervala za svoju populaciju te većinom koristi referentne intervale koje preporuča proizvođač, a laboratorij sam provodi samo provjeru na na minimalnom broju uzorka u

svojoj populaciji.

Ovaj je rad bio namijenjen određivanju referentnih intervala za trombocitni serotonin. Kako još na našem području nije definiran referentni interval za trombocitni serotonin, to je bio još dodatan motivacijski faktor za njegovo određivanje.

Istraživanje je napravljeno na skupini od 242 ispitanika, odnosno dvostruko više unutar broja koji se preporuča za izradu referentnih intervala (N=120).

Teoretski smo mogli napraviti dvije podskupine s obzirom na spol, ali zbog manjeg broja ženskih ispitanica (N=91) u odnosu na preporučeni broj, obrada podataka nije bila moguća u potpunosti. Statistiku smo proveli i ona je prikazana u radu, ali i sam program je prepoznao da se radi o nedovoljnom broju ispitanica te nije mogao odrediti interval pouzdanosti za referentne granice. Iako se medijani i aritmetičke sredine između muških i ženskih ispitanika nisu skoro uopće razlikovali, nismo mogli donijeti zaključak o nepostojanju razlike između referentnih intervala oba spola. Rezultati drugih istraživanja o razlikama referentnih intervala između spolova proturječni su (Guicheney, 1988; Jernej i sur., 2000).

Odbacivši odjeljivanje ispitanika prema spolu, odlučili smo se za odjeljivanje prema starosnoj dobi. Budući da smo imali 242 ispitanika, mogli smo odijeliti samo dvije podskupine da bismo zadovoljili minimalni broj od 120 ispitanika. Stosna dob od 36 godina (medijan) razdijelila je ispitanike na dvije skupine – po 121 ispitanik u svakoj skupini).

Provedena je statistička analiza te je uvrđeno da između ispitanika koji su mlađi od 36 godina i onih koji imaju 36 i više godina nema statistički značajne razlike te da je neopravdano dijeliti skupinu, a time i određivati zasebne referentne intervale.

Stoga je 95% - tni referentni interval za trombocitni serotonin, zbog prethodno navedenog razloga, u našem istraživanju jedinstven za cijelu populaciju od 18-68 godina i iznosi 46– 1457 ng/10⁹ trombocita, a 90%-tni interval pouzdanosti za donju granicu iznosi 15 – 96 ng/10⁹ trombocita, dok za gornju iznosi 1119 – 2174 ng/10⁹ trombocita.

U potrazi za mogućom usporedbom naših rezultata, literatura za naše područje ne pruža gotovo nikakva istraživanja u kojima bi se kao neki od rezultata objavio referentni interval trombocitnog serotonina.

Prošle godine je skupina stručnjaka određivala fiziološku koncentraciju trombocitnog serotonina kod trudnica te su imali kontrolnu skupinu koja je obuhvaćala zdrave žene, ali su oni trombocitni serotonin izražavali u nmol/mg proteina te nam nisu mogli poslužiti ni kao orijentacija ni kao usporedba (Gall i sur., 2011).

Referentni interval prilično je širok pogotovu ako ga uspoređujemo s referentnim intervalima koje

nudi proizvođač (DRG International, SAD) (215– 850 ng/10⁹ platelets), ali u uputi gdje je izložio svoje očekivane referentne intervale za trombocitni serotonin nije opisano na koji način je birana populacija, na kojem broju ispitanika su ustanovljeni referentni intervale i kojom se statističkom metodom koristio. Nije ustanovio odijeljene intervale prema spolu ni dobi. Uz to, u uputama izričito navodi: *It is recommended that each laboratory establishes its own reference intervals. The values reported in this test instruction are only indicative.* (<http://www.drg-international.com/ifu/eia-5061.pdf>).

Zbog toga je teško uspoređivati naše i njihove rezultate jer se statističke analize uvelike mogu razlikovati.

Za našu populaciju literatura navodi jedno istraživanje koje je prošle godine izrađeno u svrhu povezivanja svojstava trombocita i koncentracije trombocitnog serotonina (Getaldić-Švarc, 2012). U tom radu je kao referentni interval trombocitnog serotonina određena vrijednost od 201,5 – 940,2 ng serotonina/10⁹ trombocita. S obzirom na interval koji smo mi u ovom radu odredili (46– 1457 ng/10⁹ trombocita), interval iz tog istraživanja sličniji je onom koji je ustanovio proizvođač reagensa. Treba naglasiti da taj rad nije rađen u svrhu određivanja referentnih intervala, da su kod njih koncentracije trombocitnog serotonina pokazale normalnu distribuciju, dok je kod nas normalna distribucija koncentracija trombocitnog serotonina odbačena. Ne znamo jesu li nam rezultati u daljnjem ispitivanju bili obrađivani na jednak način. Također, u tom istraživanju prepoznavanje i odbacivanje „outliers“ nije slijedilo statističke zakonitosti već jednostavni vizualni pregled te subjektivnu procjenu o odbacivanju ili zadržavanju ekstremnijih vrijednosti. S druge strane, mi smo koristili preporučnu statističku analizu po Tukeyu koja je, i nakon što je detektirala udaljene vrijednosti od skupa, veći broj zadržala i uvrstila u referentni interval. To bi mogao biti razlog za veću širinu našeg referentnog intervala.

U istraživanju smo se rukovodili preporučenim smjernica Radne skupine te nemamo razloga sumnjati u ispravnost referentnog intervala za trombocitni serotonin. Međutim, skupina je morala biti znatno veća da bismo pristupili odjeljivanju podskupina prema spolu i dobi.

S velikom teškoćom se uspoređuju dobiveni rezultati s rezultatima iz literature jer se trombocitni serotonin nestandardizirano još uvijek iskazuje na četiri različita načina - kao ng/mL krvi, kao ng/mg trombocitnog proteina, kao nmol/10⁹ trombocita i naposljetku kao ng/10⁹ trombocita čemu smo se i mi priklonili. Ujedno, metode koje se primjenjuju vrlo su različite - ELISA, RIA, HPLC. Kad bi se u budućim istraživanjima ujednačila metodologija i način izražavanja koncentracije trombocitnog serotonina, to bi uvelike olakšalo i interpretaciju i usporedbu dobivenih vrijednosti.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

Odabir skupine i kriteriji isključivanja i uključivanja za određivanje referentnih vrijednosti slijedio je preporuke

- S obzirom da broj muških i ženskih ispitanica pojedinačno nije zadovoljavao kriterije koje Radna skupina (Working Group on Reference Intervals from CLSI) preporuča nije bilo moguće napraviti razdjeljivanje referentnih intervala za trombocitni serotonin prema spolu.
- Podjela skupine od 242 ispitanika na dvije podskupine po načelu minimalnog broja ispitanika od 120 odijeljene su bile dobnom granicom od 36 godina. Podjela se nije pokazala opravdanom jer se referentne vrijednosti nisu statistički razlikovale ($P=$
- Referentni interval za trombocitni serotonin ustanovljen je za populaciju od 18-68 godina bez obzira na spol te iznosi od 46 – 1457 ng/10⁹ trombocita.

6. LITERATURA

- Albert-Šubić N, Tadej D, Golec B, Dobrić V. Referentne vrednosti klinički relevantnih sastojaka krvi i seruma. Model: populacija Zagreba i bliže okolice. Zagreb, Školska knjiga, 1990, str. 9-13.
- Arora RC, Kregel L, Meltzer HY. Seasonal variation of serotonin reuptake in normal controls and depressed patients. *Biol Psychiatry*, 1984, 19, 795-804.
- Benedetti MS, Dostert P. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. U: *Advances in Drug Research*. Testa B, urednici, London, Academic Press, 1992, 65.
- Brzezinski, A. Melatonin in humans. *NEJM*, 1997, 336, 186-195.
- Buntak, K. Mjeriteljstvo – ukratko. Zagreb, Državni zavod za mjeriteljstvo, 2010. str. 51-52.
- Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia, W. B. Saunders company, 1994, str. 454-484.
- Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG. Platelets as model for neurons? *Experientia*, 1988, 44, 115-26.
- DRG[®] Serotonin FAST Elisa (EIA-5061) <http://www.drg-international.com/ifu/eia-5061.pdf>, prisupljeno 21. lipnja 2012.
- Frazer A, Hensler JG. Serotonin. U: *Basic Neurochemistry*. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB., urednici, New York, *Raven Press*, 1994, str. 283-308.
- Fuller RW. Biochemical pharmacology of the serotonin system. *Adv Neurol*, 1986, 469-80.
- Gall V, Košec V, Soljačić Vraneš H, Jukić M, Filipović Djaković I, Vuković A. Platelet Serotonin Concentration at Term Pregnancy and after Birth; Physiologic Values for Croatian Population. *Coll Antropol*, 2011, 35, 715-718.
- Gear A, Burke D. Thrombin-induced secretion of serotonin from platelets can occur in seconds. *Blood*, 1982, 60, 1231-4.
- Gershon MD, Tamir H. Peripheral Sources of Serotonin and Serotonin-Binding Proteins. U: *Serotonin and the cardiovascular system*. Vanhoutte PM urednik, New York, *Raven Press*, 1985, str. 15-26.

- Getaldić-Švarc, B. Povezanost svojstava trombocita i koncentracije trombocitnog serotonina. Doktorski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2011.
- Guichenev P. Human platelet serotonin content: methodological aspects and physiological variations. *Meth Experim Clin Pharmac*, 1988, 10, 253-258.
- Hervig TA, Farstad M, Vollset SE. Endogenous serotonin in human blood platelets – factors that may influence reference values. *Platelets*, 1996, 7, 47-52.
- Higley JD, Bennett AJ. Central nervous system serotonin and personality as variables contributing to excessive alcohol consumption in non-human primates. *Alcohol & Alcoholism*, 1999, 34, 402-418.
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd, JC, Cerioiti F, Garg U, Horn P, Pesce A, Sine HE, Zakowski J. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory ; approved guideline – third edition. Wayne, Clinical and laboratory standards institute, 2008.
- Iny LJ, Pecknold J, Suranyi-Cadotte BE, Bernier B, Luthe L, Nair NPV. Studies of a neurochemical link between depression, anxiety, and stress from (3H) imipramine and (3H) paroxetine binding on human platelets. *Biol Psychiatry*, 1994, 36, 281-91.
- Jernej B, Banović M, Čičin-Šain L, Hranilović D, Baliija M, Orešković D, Folnegović-Šmalc V. Physiological characteristics of platelet/circulatory serotonin: study on a large human population, *Psychiatry Res*, 2000, 94, 153-162.
- Jung B, Adeli K. Clinical laboratory reference intervals in pediatrics: the CALIPER initiative. *Clin Biochem*, 2009, 42, 1589 –95.
- Katayev A, Balciza C, Seccombe D. Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results. *Am J Clin Pathol*, 2010, 133, 180-186.
- Larsson M, Hagberg L, Norkrans G, Forsman A. Indole amine deficiency in blood and cerebrospinal fluid from patients with human immunodeficiency virus infection. *J Neurosci Res*, 1989, 23, 441-6
- Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, 2006, 312, 104-107.
- Levin M, Buznikov GA, Lauder JM. Of Minds and Embryos: Left-Right Asymmetry and the Serotonergic Controls of Pre-Neural Morphogenesis. *Dev Neurosci*, 2006, 28, 171-85.
- Lucki I. The spectrum of behaviours influenced by serotonin. *Biol Psychiatry*, 1998, 44, 151–

162.

- Martin F, Rozas G, Migurez J, Aldegunde M. Plasma serotonin: factors Affecting its level. *Biogenic Amines*, 1990, 7, 57-62.
- Mukhopadhyay S, Mukhopadhyay AK. Non-haematological function of platelets. *Natl Med J India*, 2002, 2, 78-80.
- Ortiz J, Artigas F, Gelpi E. Serotonergic status in human blood. *Life Sci*, 1988, 43, 983–90.
- Pivac N, Mück-Šeler D, Šagud M, Mustapić M, Mihaljević-Peješ A, Jakovljević M. Trombocitni serotonin kao pokazatelj terapijskog odgovora na antidepresive. *Psychiatr Danub*, 2003, 15, 203-04.
- Pletscher A. The 5-hydroxytryptamine system of blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int J Cardiol*, 1987, 14, 177-88.
- Rao ML, Gross G, Strebek B, Halaris A, Huber G et al. Circadian rhythm of tryptophan, serotonin, melatonin and pituitary hormones in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 1994, 35, 151-63.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem*, 1948, 176, 1243–51.
- Rudnick G, Clark J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochem Biophys Acta*, 1993, 1144, 249-63.
- Stanley M, Virgillio J, Gershon D. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. *Science*, 1982, 216, 1337-9.
- Štraus B, Stavljenić-Rukavina A, Plavšić F i sur. Analitičke tehnike u kliničkom laboratoriju. Zagreb, Medicinska naklada, 1997, str. 176-177.
- Tukey W. Exploratory data analysis. Boston, Addison-Wesley, 1977.
- White JG. The dense bodies of human platelets. U: The Platelet Amine Storage Granule. Meyers KM, Barnes CD, urednici, CRC Press, 1992, str. 1-29.
- Youssefian T, Cramer EM. Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies. *Blood*, 2000, 95, 4004–7.

7. SAŽETAK

Određivanje referentnog intervala trombocitnog serotonina

Referentni interval je centralni interval vrijednosti omeđen vrijednostima referentnih granica s određenim percentilom, a odnosi se na skupinu vrijednosti određenih u referentnoj grupi ili predviđenih za referentnu populaciju definirani specifičnim obuhvatnim postotkom. Najčešće obuhvaća 95% vrijednosti referentne populacije.

Referentni interval predstavlja „normalne“ vrijednosti neke zdrave populacije za određeni analit i služi za interpretaciju individualnih nalaza laboratorijskih pretraga, a konačno postaje uporište medicinske odluke.

U ovom radu cilj je bio odrediti referentni interval trombocitnog serotonina za našu populaciju.

Istraživanje je obuhvatilo 242 ispitanika, od kojih 151 muških ispitanika i 91 ženskih ispitanica u dobi od 18-68 godina koji su nakon iscrpne anamneze i fizikalnog pregleda specijalista psihijatra i interniste te ostalih preporučenih kriterija uvršteni kao referentne osobe. Ispitanicima je natašte uzet uzorak krvi s antikoagulansom iz kojeg je priređena plazma bogata trombocitima te suspenzija trombocita. U takvom uzorku određivan je serotonin ELISA metodom. Statistička obrada rezultata je provedena prema preporukama Radne skupine za utvrđivanje referentnih intervala iz Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI)

Odjeljivanje podskupina prema dobi i spolu pokazalo se neutemeljenim. Minimalni broj ispitanika za pouzdanu statistiku iznosi 120 te nismo mogli obraditi skupinu žena koja je brojila 91 ispitanica. Dijeljenje skupine po dobi, uz poštivanje istog načela minimalnih 120 ispitanika, nalazilo se na dobnoj granici od 36 godina, odnosno skupine su bile podijeljene po kriteriju $<$ ili ≥ 36 godina. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike ($P=0,3452$) između promatranih skupina, te da nije potrebno raščlanjivati ispitanike prema dobi.

Rezultati istraživanja u promatranj skupini definirali su referentni interval trombocitnog serotonina za odraslu populaciju od 18-68 godina u granicama od 46 do $1457 \text{ ng}/10^9$ trombocita.

Ključne riječi: referentni intervali, referentna populacija, serotonin, trombociti, depresivni poremećaj, terapija antidepresivima

7.SUMMARY

Establishment of platelet serotonin's reference interval

Reference interval is a central interval of value bound by values of reference limits with a certain percentile. Reference interval, which is defined by a specific percentage (95%), is referred to a set of values determined in a reference group.

The reference interval represents „normal“ values of a certain population for a certain biochemical marker and serves to interpret individual medical report and later finally becomes the base of a medical decision.

During this research the purpose was to determine a reference interval of platelet serotonin for our population.

This survey included 242 examinees, more accurately, 151 male examinees and 91 female examinees at the age of 18-68. After a detailed anamneses, physical examination and other recommended criteria they were determined as reference individuals. The blood samples with anticoagulants were taken from the hungry examinees, out of which were prepared platelet-rich plasma and platelets suspension. In this kind of sample serotonin was determined by the ELISA method. Statistical evaluation of results was carried out according to recommendations of a Working Group on Reference Intervals from Clinical and laboratory standards institute (CLSI).

Subgroup separation according to age and sex has not been valid. Minimal number of examinees for reliable statistics is 120, so we could not process 91 female examinees. Separating the group by age and respecting the same principal of minimal number of 120 examinees would include age limit at the age of 36, and the groups have been divided according to the age criteria of $<$ or \geq 36 years of age. The results showed that it is not necessary to divide examinees according to their age because there is no statistically important difference ($P=0,3452$) between the observed groups.

The survey results of the observed group determined a platelet serotonin's reference interval for adult population between 18 and 68 years of age which amounts from 46-1457 ng/10⁹ platelets.

Key words: reference interval, reference population, serotonin, platelets, depressive disorder, antidepressant therapy

8.PRILOG

8.1. SUGLASNOST ETIČKOG POVJERENSTVA

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za Medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ODREĐIVANJE REFERENTNOG INTERVALA TROMBOCITNOG SEROTONINA

Sanja Krtnanjek

Referentni interval je centralni interval vrijednosti omeđen vrijednostima referentnih granica s određenim percentilom, a odnosi se na skupinu vrijednosti određenih u referentnoj grupi ili predviđenih za referentnu populaciju definirani specifičnim obuhvatnim postotkom. Najčešće obuhvaća 95% vrijednosti referentne populacije.

Referentni interval predstavlja „normalne“ vrijednosti neke zdrave populacije za određeni analit i služi za interpretaciju individualnih nalaza laboratorijskih pretraga, a konačno postaje uporište medicinske odluke.

U ovom radu cilj je bio odrediti referentni interval trombocitnog serotonina za našu populaciju.

Istraživanje je obuhvatilo 242 ispitanika, od kojih 151 muških ispitanika i 91 ženskih ispitanica u dobi od 18-68 godina koji su nakon iscrpne anamneze i fizikalnog pregleda specijalista psihijatra i interniste te ostalih preporučenih kriterija uvršteni kao referentne osobe. Ispitanicima je natašte uzet uzorak krvi s antikoagulansom iz kojeg je priređena plazma bogata trombocitima te suspenzija trombocita. U takvom uzorku određivan je serotonin ELISA metodom. Statistička obrada rezultata je provedena prema preporukama Radne skupine za utvrđivanje referentnih intervala iz Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (CLSI)

Odjeljivanje podskupina prema dobi i spolu pokazalo se neutemeljenim. Minimalni broj ispitanika za pouzdanu statistiku iznosi 120 te nismo mogli obraditi skupinu žena koja je brojila 91 ispitanica. Dijeljenje skupine po dobi, uz poštivanje istog načela minimalnih 120 ispitanika, nalazilo se na dobnoj granici od 36 godina, odnosno skupine su bile podijeljene po kriteriju $<$ ili ≥ 36 godina. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike ($P=0,3452$) između promatranih skupina, te da nije potrebno raščlanjivati ispitanike prema dobi.

Rezultati istraživanja u promatranoj skupini definirali su referentni interval trombocitnog serotonina za odraslu mušku i žensku populaciju od 18-68 godina u granicama od 46 do 1457 ng/10⁹ trombocita.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 45 stranica, 9 grafičkih prikaza, 15 tablica i 38 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku

Ključne riječi: referentni intervali, referentna populacija, serotonin, trombociti, depresivni poremećaj, terapija antidepresivima

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *docent/ Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ime i Prezime**, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ime i Prezime, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Ime i Prezime, *viši asistent/ docent/ izvanredni profesor/ redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipnja 2012.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ESTABLISHMENT OF PLATELET SEROTONIN'S REFERENCE INTERVAL

Sanja Krtanjek

Reference interval is a central interval of value bound by values of reference limits with a certain percentile. Reference interval, which is defined by a specific percentage (95%), is referred to a set of values determined in a reference group.

The reference interval represents „normal“ values of a certain population for a certain biochemical marker and serves to interpret individual medical report and later finally becomes the base of a medical decision.

During this research the purpose was to determine a reference interval of platelet serotonin for our population.

This survey included 242 examinees, more accurately, 151 male examinees and 91 female examinees at the age of 18-68. After a detailed anamneses, physical examination and other recommended criteria they were determined as reference individuals. The blood samples with anticoagulants were taken from the hungry examinees, out of which were prepared platelet-rich plasma and platelets suspension. In this kind of sample serotonin was determined by the ELISA method. Statistical evaluation of results was carried out according to recommendations of a Working Group on Reference Intervals from Clinical and laboratory standards institute (CLSI).

Subgroup separation according to age and sex has not been valid. Minimal number of examinees for reliable statistics is 120, so we could not process 91 female examinees. Separating the group by age and respecting the same principal of minimal number of 120 examinees would include age limit at the age of 36, and the groups have been divided according to the age criteria of $<$ or \geq 36 years of age. The results showed that it is not necessary to divide examinees according to their age because there is no statistically important difference ($P=0,3452$) between the observed groups.

The survey results of the observed group determined a platelet serotonin's reference interval for adult population between 18 and 68 years of age which amounts from 46-1457 ng/10⁹ platelets.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 45 pages, 9 figures, 15 tables and 38 references. Original is in Croatian language.

Keywords: reference interval, reference population, serotonin, platelets, depressive disorder, antidepressant therapy

Mentor: Nada Vrkić, **Ph.D.** *Assistant/University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Reviewers: **Ime i Prezime, Ph.D.** */Assistant/Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Ime i Prezime, Ph.D. */Assistant/Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

Ime i Prezime, Ph.D. */Assistant/Assistant Professor/ Associate Professor/ Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*

The thesis was accepted: June, 2012.

