

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Kristina Dukić i Ivona Herceg

**STABILNOST I POVEZANOST KONCENTRACIJE
SEROTONINA U TROMBOCITIMA, U PLAZMI I U SERUMU**

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen je u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Nade Vrkić, i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2012./2013.

Rad je izrađen 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).

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1 Trombociti i serotonin	1
1.2 Trombociti	1
1.3 Trombociti i hemostaza	3
1.4 Trombocitni pokazatelji	4
1.5 Sinteza i metabolizam serotonina.....	5
1.6 Pohrana serotonina u trombocitima i neuronima	6
1.7 Funkcija serotonina	8
1.8 Mjerenje serotonina u raznim medijima.....	8
2. Opći i specifični ciljevi rada.....	10
3. Ispitanici i metode	11
3.1. Ispitanici.....	11
3.2 Uzorci krvi.....	11
3.3 Određivanje broja trombocita.....	12
3.4 Priprema suspenzije trombocita za određivanje koncentracije serotonina.....	13
3.4.1 Priprema plazme bogate trombocitima	13
3.4.2 Postupak suspendiranja trombocita	13
3.4.3 Priprema plazme siromašne trombocitima	13
3.4.4 Priprema seruma.....	13
3.5 Određivanje koncentracije serotonina u trombocitima u PRP, serumu i plazmi enzimimunoanalizom (engl. enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA).....	14
3.6. Statističke metode	16
4. Rezultati	18
4.1 Predanalitička stabilnost uzoraka	18
4.2 Povezanost koncentracije serotonina u serumu, PRP i plazmi.....	22

4.2.1	Povezanost koncentracije serotonina u PRP i koncentracije trombocitnog serotonina.....	26
5.	Rasprava	27
6.	Zaključci.....	34
7.	Zahvale	35
8.	Popis literature.....	36
9.	Sažetak.....	39
10.	Summary.....	40
11.	Životopis.....	41

Popis kratica

5HT - 5-hidroksitriptamin; serotonin

5HTt - 5HT transporter

5HT2a - serotoniniski receptor

5HTP - 5- hidroksitriptofan

TPH - triptofan hidroksilaza (engl. *tryptophan hydroxylase*)

5- HIAA - 5-hidroksiindololactena kiselina

MAO - monoaminooksidaza

OCS - otvoreni kanikularni sustav (engl. *open canicular system*)

DTS - gusti tubularni sustav (engl. *dense tubular system*)

PGI₂ - prostaciklin 2

vWF - von Willebrandov faktor

MPV - srednji volumen trombocita (engl. *mean platelet volume*)

PDW - širina distribucije trombocita po volumenu (engl. *platelet distribution width*)

Pct - trombokrit

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ELISA - enzimski imunotest (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

PRP - plazma bogata trombocitima (engl. *platelet rich plasma*)

PPP; P - plazma siromašna trombocitima (engl. *platelet poor plasma*)

S - serum

1. Uvod

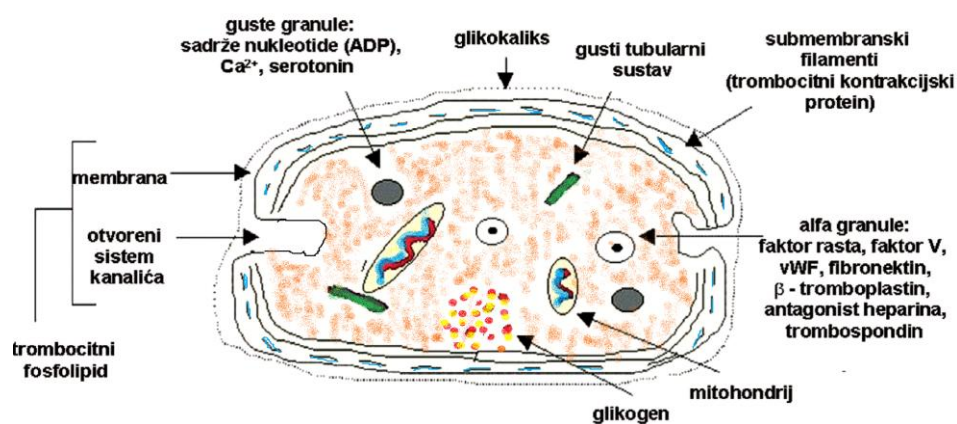
1.1. Trombociti i serotonin

Kroz povijest, prije i poslije znanstvene revolucije, do današnjih dana, misleći ljudi, znanstvenici i prirodoznalci proučavali su trombocite što nam danas omogućuje da znamo puno o trombocitnoj strukturi, funkciji i uopće o životu trombocita. Međutim, činjenica je da su rezultati istraživanja Giulia Bizzozera iz 1881. i 1882. godine postavili temeljne spoznaje o trombocitima koje su nakon njega bile potvrđivane. Proučavajući intravitalno mikroskopski animalne vene, otkrio je da je oblik trombocita diskoidan te da nakon ozljede krvne žile u cirkulaciji započinje proces adhezije i agregacije. Tako je prvi definirao trombocite kao središnje stanice sustava zgrušavanja (Ribatti i Crivellato, 2007). Nadalje, Bizzozero je prije otkrića trombocita identificirao i megakariocite u koštanoj srži koji su ujedno trombocitni prethodnici. Biomolekula serotonin, kemijskim jezikom 5-hidroksitriptamin ili 5-HT, široko rasprostranjen u prirodi biogeni je amin, neurotransmiter u neuronskim sinapsama, a skaldišten i u trombocitima ujedno je i pokazatelj starosti cirkulirajućih trombocita. Suvremena znanja o učincima postaju svaki dan sve šira, a zanimanje za tu molekulu je sve veće. „Hormon sreće“, kako je popularno nazvan serotonin, od ključne je važnosti za homeostazu brojnih organskih sustava. Također, tzv. leptirici u trbuhu koje osjećamo kada se zaljubimo povezani su sa serotoninom, tj. u prvim fazama zaljublivanja pojačano se luči i izaziva osjećaj zaludenosti i sreće. Ne govori se uzaludno da je za zaljublivanje potrebna kemija. Osim toga, pojačano lučenje povezano je i s vrstom hrane. Primjerice, čokolada će uzrokovati pojačano lučenje serotonina što će našem mozgu omogućiti nastanak osjećaja zadovoljstva i smirenosti.

1.2. Trombociti

Humani su trombociti stanice diskoidnog oblika bez jezgre, endoplazmatske mrežice i Golgijeva aparata pa je njihova funkcionalna aktivnost uvjetovana proteinima sintetiziranim u megakariocitu. Stvaraju se u koštanoj srži fragmentiranjem citoplazme zrelih megakariocita. Proces razvoja megakariocita je stupnjevit, kreće od nezrelih stanica, preko nezrelih megakariocita do zrelih megakariocita. Zreli megakariociti nemaju daljnju sposobnost proliferacije za razliku od ostalih progenitorskih stanica, ali imaju povećanu sintezu DNK te sposobnost da iz jedne stanice stvore dvije do tri tisuće trombocita. Trombocite bismo mogli

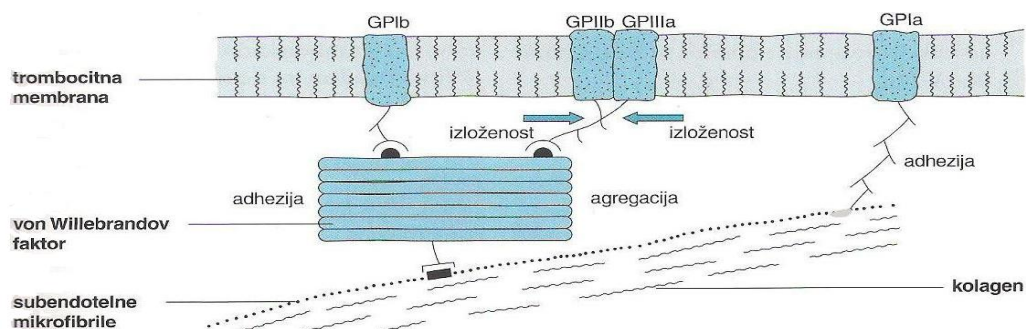
podijeliti na nekoliko regija s određenom funkcionalnom aktivnošću. Tako razlikujemo: membranski sustav, perifernu i strukturnu zonu, citoplazmatsku zonu s granulama i organelama. Površina membrane trombocita je glatka osim periodičnih invaginacija koje oslikavaju kompleksnu mrežu intramembranskih cijevi koje su propusne do citoplazme i nazivamo ih otvoreni kanikularni sustav (engl. *OCS – open canicular system*). Dvije su bitne funkcije ovog sustava: 1. predstavlja prolaz kroz koji se u krvotok mogu izlučiti, ali i aktivno unositi supstance trombocitnih granula, među kojima je i serotonin; 2. rezervoar je plazmatske membrane i njenih receptora. Trombociti, osim otvorenog kanikularnog sustava koji spada u membranski sustav imaju i gusti tubularni sustav (engl. *dense tubular system, DNS*) koji spada u strukturnu zonu ili regiju trombocita. Taj sustav predstavlja analogiju endoplazmatskoj mrežici te je prevladavajući sustav skladištenja kalcija, regulacije koncentracije kalcijevih iona, mjesto sinteze prostaglandina i enzima ciklooksigenaze (Gerrard i sur., 1976). Perifernu regiju trombocita čini 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. Citoplazmatsku zonu čine organele i granule. Sadrže relativno mali broj mitohondrija i lizosoma, a to je ujedno i potvrđeno elektronskim mikroskopom. Najzanimljivije je svojstvo trombocita bogatstvo granula u kojima se nalazi veliki broj biomolekula, među kojima je i serotonin. Razlikujemo 3 vrste granula: α -granule, guste granule (engl. *dens granule*) i lizosome. Iako su guste granule u manjini i prosječno ih je 8 (α -granula ima 40-80 u stanici), one su moćno skladišta serotonina.



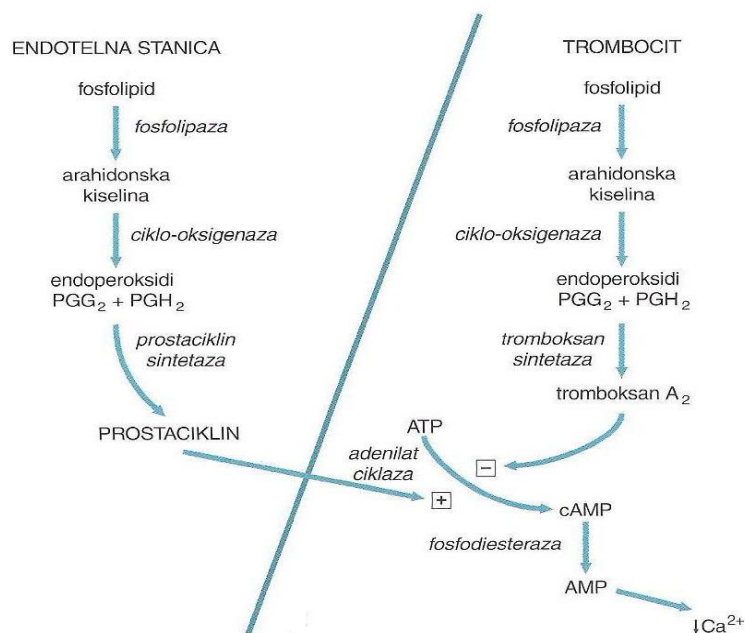
Slika 1. Shematski prikaz strukture trombocita

1.3. Trombociti i hemostaza

Jedna od funkcija trombocita je i sudjelovanje u hemostazi. Naime, na površini trombocita se nalaze brojni glikoproteini koji su važni za adheziju i agregaciju trombocita. Nakon oštećenja endotela bazalna membrana krvne žile i kolagen izlažu se cirkulaciji što dovodi do aktivacije trombocita. Adhezija na kolagen zbiva se vezanjem za vWF i glikoprotein Ia na trombocitu. U vezanju trombocita i krvnožilne stijenke su uključeni i brojni adhezijski proteini, tipa integrina. Glikoprotein IIb/IIIa važan je za vezanje trombocita na vWF i za vaskularni subendotel. Vezno mjesto za IIb/IIIa jest receptor za fibrinogen koji je važan u agregaciji trombocita za trombocit. Adhezija trombocita izaziva metaboličke reakcije kao što su promjena oblika trombocita i oslobađanje trombocitnih aktivnih tvari. Tijekom reakcije oslobađanja sadržaja trombocitnih granula, kolagen i trombin aktiviraju sintezu prostaglandina. Oslobađa se diacilglicerol i inozitol trifosfat, a oslobađa se i arahidonska kiselina te dovodi do stvaranja labilnog metabolita, tromboksana A_2 koji potiče agregaciju trombocita i ima jaku vazokonstriktornu aktivnost. Tromboksan A_2 smanjuje trombocitnu razinu AMP-a i potiče reakciju oslobađanja, dok tu reakciju pak inhibira tvar koja podiže razinu cikličkog AMP-a. To je prostaciklin PGI_2 koji se sintetizira u endotelnim stanicama. Agregacija trombocita postaje ireverzibilna zbog visoke koncentracije ADP, oslobađanja enzima tijekom reakcija sekrecije i trombocitnog kontraktalnog proteina. Trombin također pospešuje spajanje trombocita, a vWF ima funkciju i u adheziji te agregaciji trombocita (Labar i Hauptmann, 2007).



Slika 2. Interakcija trombocita, kolagena i von Wilebrandova faktora (Labar i Hauptmann, 2007)

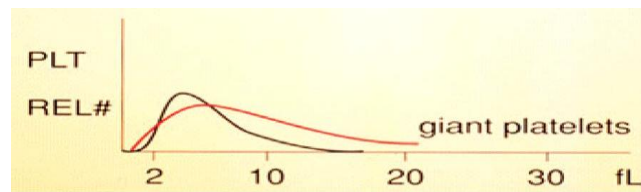


Slika 3. Sinteza tromboksana i prostaciklina te njihov učinak na sintezu cAMP u trombocitima (Labar i Hauptmann, 2007)

1.4. Trombocitni pokazatelji

Danas se u ispitivanju trombocita koriste brojne metode, a među njima su: određivanje njihova broja u crikulirajućoj krvi, veličina, mjerenje heterogenosti veličine, zastupljenost mlađih trombocita, te metode funkcionalne aktivnosti (agregacije i aktivacije). U svakom ispitivanju bitni su predanalitički postupci - uzimanje uzorka krvi kao i vrijeme od uzimanja uzorka do analize. Morfološke pretrage i pretrage funkcionalne aktivnosti uvijek započinju određivanjem broja trombocita u krvi i/ili plazmi bogatoj trombocitima. Prvi brojači koji su radili na principu promjene otpora (impedancije) omogućili su mjerenje broja trombocita koje je bilo značajno pozdanije što se tiče analitičke točnosti i preciznosti. Tako je razvojem tehnologije dosegnuta analitička točnost s koeficijentom varijacije (CV) manjim od 5% i analitička preciznost s $CV \leq 3\%$. Morfološki trombocitni pokazatelji koje je važno spomenuti jesu: prosječni volumen trombocita (MPV, engl. *mean platelet volume*), raspodjela trombocita po volumenu (PDW, engl. *platelet distribution width*) te retikulirani trombociti (engl. *reticulated platelets*). MPV predstavlja aritmetičku sredinu volumena svih izbrojenih stanica. Volumen trombocita varira u povezanosti s brojem trombocita, a odnos broja i veličine inverzan je: povećani volumen prati sniženi broj trombocita. PDW je parametar koji

se dobije na temelju krivulje raspodjele po volumenu. Taj je pokazatelj isključivo matematička izvedenica, za razliku od izravno izmjenog volumena, MPV-a. Normalna krivulja raspodjele trombocita po volumenu ulijevo je ukošena Gaussova krivulja i predočava histogram trombocita. Klinička značajnost PDW-a je u diferencijalnoj dijagnostici reaktivnih i primarnih trombocitoza. Retikulirani su trombociti analogni retikulocitima eritrocitne loze, po čemu su i dobili ime retikulirani, imaju karakteristične ostatke nukleinskih kiselina - citoplazmatsku RNK, a identificiraju se u automatskim analizatorima bojajenjem s TO-tiazol oranž bojom (Getaldić- Švarc, 2011).



Slika 4. Krivulja raspodjela trombocita po volumenu – slika preuzeta iz Seminar-Studies – The Automated Differential, Pierre, Mayo Foundation, Rochester, 1998.

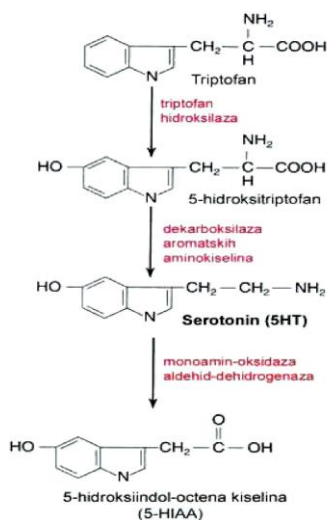
1.5. Sinteza i metabolizam serotonina

Sinteza serotonina (5-hidroksitriptamina, 5HT) odvija se u dva odjeljka, središnjem živčanom sustavu, koji se naziva i centralnim odjeljkom sinteze 5HT, u serotoninskim neuronima smještenim u rafe jezgrama u moždanom deblu, te periferno, najviše u enterokromafinim stanicama gastrointestinalne sluznice tankog crijeva. Sintetizira se iz aminokiseline L-triptofana, pri čemu enzim triptofan-hidroksilaza (TRH) pretvara triptofan u 5-hidroksitriptofan (5-HTP). Potom hidroksi-triptofansak dekarboksilaza pretvara 5-HTP u 5-hidroksitriptamin, tj. serotonin. Enterokromafine stanice sintetiziraju 80% ukupnog serotonina u organizmu (Frazer i sur., 1994).

Kod sisavaca nalazimo dvije izoforme triptofan hidroksilaze koji je jedini specifičan enzim za biosintezu serotonina. Triptofan hidroksilaza 1 (THP1) smještena je u perifernom sustavu, dok je tip 2 (THP2) dominantna u mozgu (Savelieva, 2008; Liu, 2008.).

Centralni i periferni odjeljak sinteze serotonina odvojeni su nepropusnom, krvnomoždanim barijerom koja propušta triptofan i tako omogućava sintezu serotonina u serotoninskim

neuronima. Novija istraživanja pokazuju da i sam serotonin može proći barijeru uz pomoć serotoniniskog transportera (Nakatani 2008.; Marc 2010.)



Slika 5. Prikaz metabolizma serotonina - slika preuzeta iz Getaldić-Švarc, 2011

Različiti podražaji mogu potaknuti otpuštanje serotonina iz enterokromafinih stanica. Nakon izlučivanja, uz ostale crijevne hormone, serotonin povećava protok krvi u gastrointestinalnom (GI) traktu. Nakon prvog prolaska kroz jetru 30-80% serotonina metabolizira se djelovanjem monoaminoooksidaze (MAO) do 5-hidroksi-indol-octene kiseline (5-HIAA), koja se izlučuje putem bubrega. 90% preostalog 5-HT metabolizira se u plućima, također do 5-HIAA. Preostalih 10% serotonina gotovo u potpunosti preuzimaju trombociti, gdje ostaje sve do oslobađanja u procesu zgrušavanja krvi.

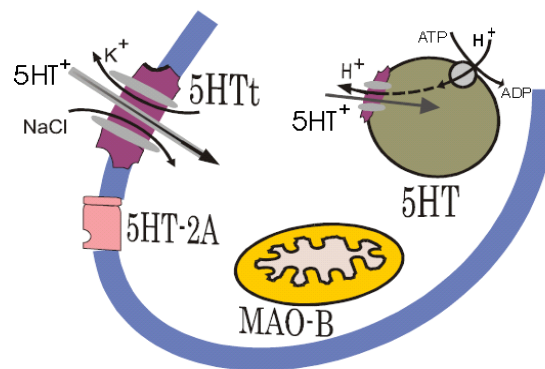
1.6. Pohrana serotonina u trombocitima i neuronima

Ljudski trombociti sadrže prosječno 150 do 600 ng serotonina u množini od 10^9 trombocita (drugim riječima, milijarda trombocita sadrži 150 do 600 ng serotonina) koncentracija slobodnog serotonina u plazmi manja je od 30 ng/mL. Međutim, serotonin se ne može sintetizirati u trombocitima jer ne sadrže ključni enzim za sintezu 5HT – triptofan-hidroksilazu, već se u njih unosi iz plazme aktivnim prijenosom preko 5HT transportnog proteina (5HTt) koji se nalazi na membrani trombocita. Pri unosu serotonina u trombocite mijenja se konformacije transportera, te se osim serotonina unose Na^+ i Cl^- ioni, a u zamjenu iz stanica izlaze K^+ ili H^+ ioni. Elektrokemijski gradijent Na^+ i K^+ održava $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATP-aza (Ruddick i sur., 2006). Od serotoniniskih elemenata, trombociti sadrže serotoniniski receptor

5HT-2A na membrani, monoaminooksidazu (MAO-B), te serotonin pohranjen u gustim granulama (Fuller, 1986).

Nakon što je serotonin unesen u trombocitnu citoplazmu, može biti ili razgrađen djelovanjem enzima MAO-B ili unesen u unutrašnjost gustih granula uz pomoć vezikularnog prijenosnika. Guste su granule dobile ime zbog gustoće strukture vidljive pod elektronskim mikroskopom, a često se nazivaju i sekrecijskim organelama ili skladištem serotonina. Funkcija gustih granula jest da čuvaju aktivne supstance koje se izlučuju iz njih tek prilikom aktivacije trombocita. Serotonin se iz gustih granula nakon stimulacije trombinom izluči u potpunosti u četiri sekunde (De Clerck, 1990).

Shema: prikaz trombocitnih serotoninskih elemenata



5HT	serotonin u gustim granulama
5HTt	serotoninski prijenosnik
MAO-B	monoaminooksidaza-B
5HT-2A	serotoninski receptor

Slika 6. Prikaz trombocitnih serotoninskih elemenata – slika preuzeta iz doktorskog rada (Balija, 2003)

U trombocitima je pohranjeno više od 99% ukupnog serotonina u cirkulaciji pa je koncentracija serotonina u krvi odraz sadržaja serotonina u trombocitima. Druge krvne stanice i krvna plazma sadrže zanemarive količine serotonina. Koncentracija serotonina u trombocitima ovisi o koncentraciji slobodnog serotonina u krvnoj plazmi, o aktivnosti 5HTt na trombocitnoj membrani, o mehanizmu pohrane serotonina u guste granule i o individualnim razlikama otpuštanja serotonina iz trombocita u plazmu. U fiziološkim uvjetima koncentracija trombocitnog serotonina odgovara njegovoj koncentraciji u krvi. Sličnosti između serotoninskih elemenata u trombocitima i neurona u mozgu uočene su prije 50 godina (Pletcher, 1968). U području neuroznanosti ovaj se model primjenjuje deset godina (Camacho, 2000). Trombocitni 5HT predstavlja periferni, lako dostupan biološki pokazatelj psihijatrijskih poremećaja s izgledima da bi mogao razlikovati oblike depresivnim

poremećajima poremećaja, predviđati suicidalno ponašanje te odgovor na farmakoterapiju (Maurer-Spurej, 2004).

1.7. Funkcija serotonina

Serotonin je jedan od glavnih neuroprijenosnika koji sudjeluju u složenim neuronskim komunikacijama. Uključen je u regulaciju brojnih fizioloških procesa kao što su spavanje, disanje, hranjenje, motilitet crijeva, metabolizam, kardiovaskularna funkcija, seksualno ponašanje, regulacija raspoloženja, kognitivnih i motoričkih funkcija i dr. (Berger i sur., 2009).

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

1.8. Mjerenje serotonina u raznim medijima

Najveći sadržaj serotonina nalazi se u trombocitima te se pri mjerenju koncentracije perifernog serotonina nastoji uključiti što više trombocita. Zbog toga se najčešće koristi PRP (engl. *Platelet Rich Plasma*), tj. plazma bogata trombocitima. Nedostatak primjene PRP-a jest dugotrajnost pripreme uzorka koja se ne može automatizirati u lako primijeniti u rutinskom radu medicinskih laboratorija.

Može se koristiti i serum jer nakon završenog zgrušavanja krvi *in vitro* oslobađa se serotonina iz trombocita.

Trombocitima siromašna plazma (PPP, engl. *Platelet Poor Plasma*) kakva se koristi u rutinskom radu koagulacijskih laboratorija nije primjerena za mjerenje koncentracija ukupnog perifernog serotonina jer se postupkom centrifugiranja odijele trombociti koji su glavni nositelji serotonina.

Također, koncentracije serotonina se mogu mjeriti i u urinu, što je uz PRP, važan medij pri dijagnostici neuroektodermalnih tumora, tzv. karcinoida, te pri praćenju terapije određenim lijekovima.

Karcinoidi su tumori koji se obično javljaju u želučano-crijevnom sustavu, a mogu lučiti prekomjerne količine nekoliko neuropeptida i amina kao što su serotonin, bradikinin, histamin i prostaglandini. Ako se karcinoid proširi u jetru, može uzrokovati simptome kao što su

crvenilo lica, plavkasta koža, trbušni grčevi, proljev, oštećenje srca i druge simptome koji čine karcinoidni sindrom. Karcinoidni tumori obično dolaze iz stanica koje proizvode hormone i oblažu tanko crijevo (enterokromafine stanice), ili iz drugih stanica želučano-crijevnog sustava, gušterače, testisa, jajnika ili pluća. Nije poznato što je uzrok stvaranja karcinoidnih tumora. Manje od 10% ljudi sa karcinoidnim tumorima razvije karcinoidni sindrom (<http://www.mayomedicallaboratories.com>).

Pri dijagnozi karcinoidnog tumora mjere se i razine serotonina i njegovog metabolita 5-hidroksi-indolactene kiseline (5-HIAA) u mokraći. Određuje se u 24-satnoj mokraći, a ispitanik barem 3 dana prije pretrage ne smije jesti hranu koja je bogata serotoninom, kao što su banane, rajčica, avokado, ananas, patliđani i orasi.

Neki lijekovi kao litij, MAO inhibitori, metildopa, morfin, reserpin, selektivni inhibitori serotonina, mogu povišiti koncentraciju serotonina u krvi pa se mjerenje koncentracije serotonina i 5-HIAA u mokraći i PRP-u primjenjuje u praćenju djelotvornosti terapije.

2. Opći i specifični ciljevi

U posljednjih desetak godina različite medicinske specijalnosti istražuju sadržaj serotonina i povezuju ga s mnogim poremećajima i bolestima. Sličnosti između serotoninskih pokazatelja u trombocitima i onih u neuronima u mozgu omogućuje neuroznanosti da se perifernim modelom na trombocitima, lako dostupnom biološkom materijalu, može procjenjivati stanje u neuronima. Proučavanje sadržaja serotonina u trombocitima u perifernoj krvi, tj. perifernim serotoninskim sustavom, posebno važno zbog opažene promjene njegove koncentracije u bolesnika s duševnim bolestima. Klinička primjena određivanja serotonina u trombocitima već nalazi primjenu, a pogotovu u dijagnostici karcinoidnih tumora gdje je ponekad važno mjeriti serotonin i u serumu i u plazmi. Ukratko, interes medicinske zajednice usmjeren je prema trombocitnim i vanstaničnim sadržajima serotonina (serum, plazma, mokraća).

Cilj je ovog rada istražiti moguće fiziološke odnose i povezanosti koncentracije serotonina u trombocitima, u plazmi i u serumu na skupini zdravih ispitanika. Svrha rada je utvrđivanje jednostavnijeg pristupa u medicinskoj praksi s realno primjenjivom metodom i opremom te predanalitičkim uvjetima kakvi su ostvarivi u kliničkoj praksi.

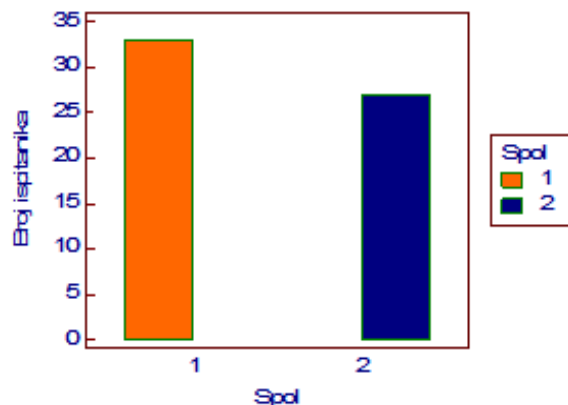
Specifični ciljevi:

- Procijeniti stabilnost uzoraka u predanalitičkoj fazi kroz 4 sata usporedbom mjerenja nakon promptne obrade uzorka te nakon 2 i 4 sata stajanja na sobnoj temperaturi. Vrijeme je odabrano prema stvarnim kliničkim mogućnostima u kojima organizacija transporta i prijema može odgoditi obradu uzorka do 4 sata. Budući da je prije obrade uzorka moguće spontano otpuštanje serotonina iz trombocita, važno je poznavati podatak o pouzdanom mjerenju ovisno o vremenu početka obrade uzorka.
- Prilagoditi metodu za određivanje trombocitnog i serumskog serotonina za plazmatski medij koji ima vrlo niske koncentracije serotonina.
- Istražiti međuodnose i stupanj povezanosti između koncentracija serotonina u plazmi, u serumu i u trombocitima pomoću kojih bismo mogli procjenjivati sadržaj trombocitnog serotonina na temelju rezultata mjerenja u plazmi i serumu bez dugotrajnog procesa izolacije trombocita i pripreme njihova lizata.
- Istražiti je li koncentracija serotonina u trombocitima jednaka razlici koncentracija serotonina u serumu i plazmi.
- Istražiti međuodnose i povezanost računskih izvedenica omjera i razlike između tri ispitivana medija te njihove povezanosti s brojem trombocita i trombokritom.

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 20 zdravih dobrovoljaca (N=20), od čega 5 djelatnika KB „Sestre milosrdnice“ (N=5) te 15 studenata Sveučilišta u Zagreb (N=15). Skupina ispitanika bila je ujednačena po spolu, tj. sastavljena od 11 muškaraca i 9 žena, u rasponu od 22 do 60 godina. Kriteriji za uključivanje u ispitivanje bili su nepostojanje akutnih i koroničnih psihičkih poremećaja i da tijekom ispitivanja nisu bili na terapiji psihofarmacima. Prvo uzorkovanje krvi je bilo 19. siječnja 2013. kada je krv uzeta devetorici ispitanika, a drugo uzorkovanje krvi je provedeno 9. veljače 2013. kada je krv uzeta preostaloj jedanaestorici ispitanika. Uzorci su bili obilježeni dvostruko, rednim brojem te imenom i prezimenom ispitanika. Uz to, jedini osobni podatak koji je uzet bila je dob i spol ispitanika.



Slika 7. Grafički prikaz udjela spolova; 1- muškarci, 2 - žene

3.2. Uzorci krvi

Uzorkovanje

Uzorci krvi uzimani su od dobrovoljaca u KBC »Sestre milosrdnice« u Zagrebu u vremenu od 9 do 11 sati u ambulanti Kliničkog zavoda za kemiju. Svi uzorci krvi bili su uzimani u standardne vakuum spremnike (Greiner Austrija) s antikoagulansom K₃EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) od 3 ml. Svakom ispitaniku je uzeto 7 epruveta krvi od čega

6 u epruvete s navedenim antikoagulansom, a jedna u epruvetu bez antikoagulansa iz koje smo dobili serum.

3.3. Određivanje broja trombocita

Broj trombocita 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 izmjenjenim parametrima. Instrument radi po načelu impedancije i volumetrijskog brojenja krvnih stanica. Razrijeđena suspenzija stanica prolaskom kroz strujni krug izaziva promjene otpora a potom 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 engl. *cell Volume, Conductivity, light Scatter*), prema kojem se ujedinjuju 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 *sketogram*. Računalnom obradom uzvede 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. U središtu našeg interesa bili su broj trombocita (PLT, $\times 10^9/L$), volumen trombocita (MPV, fL), i trombokrit (Pct, mL/L).

Broj trombocita i MPV određivani impedancijskom metodom akreditirane su pretrage

Kliničkog zavoda za kemiju KBC »Sestre milosrdnice« prema HR EN ISO 15189.

Nepreciznost za broj trombocita i MPV izražena kao koeficijent varijacije (CV%) na godišnjoj razini za 2010. godinu bila je :

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

3.4. Priprema suspenzije trombocita za određivanje koncentracije serotonina

3.4.1. Priprema plazme bogate trombocitima (PRP)

Uzorak krvi s EDTA centrifugirali smo 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. Postupak smo ponovili i s izdvojenim uzorcima koji su prije analiziranja stajali 2h, odnosno 4h nakon uzimanja krvi.

3.4.2. Postupak suspendiranja trombocita

Nakon određivanja broja trombocita odvojili smo 200 µL PRP i dodali 800 µL 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 µL destilirane vode. U električnoj mješalici (engl. *vortex mixer*) uzorak smo miješali 1 minutu. Iz ovako pripremljene suspenzije trombocita skladištili smo 100 µL na temperaturu -20 °C do određivanja koncentracije serotonina. Postupak smo ponovili i s drugim uzorcima koji su prije analiziranja stajali 2h, odnosno 4h nakon uzimanja krvi.

3.4.3. Priprema plazme siromašne trombocitima

Uzorak smo centrifugirali 10 min na 3500 G (4000 okretaja/min) na 20 °C. Gornji dio supernatanta činila je plazma siromašna trombocitima (PPP), od čega smo odvojili 200 µL, skladištili na -20 °C do određivanja koncentracije serotonina. Postupak smo ponovili i s drugim uzorcima koji su prije analiziranja stajali 2h, odnosno 4h nakon uzimanja krvi.

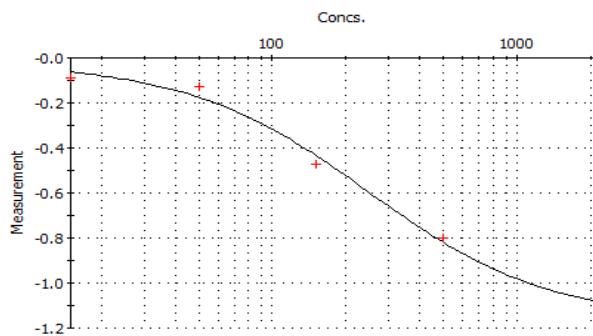
3.4.4. Priprema seruma

Uzorak smo ostavili na sobnoj temperaturi 30 minuta koliko je potrebno da se spontano završi proces zgrušavanja te potom centrifugirali snagom od 4500 G (4000 okretaja/min) na 20 °C . Od gornjeg dijela supernatanta koji predstavlja serum, odvojili smo oko 200 µL koje smo skladištili na -20 °C do određivanja koncentracije serotonina. Krvi bez antikoagulansa nismo

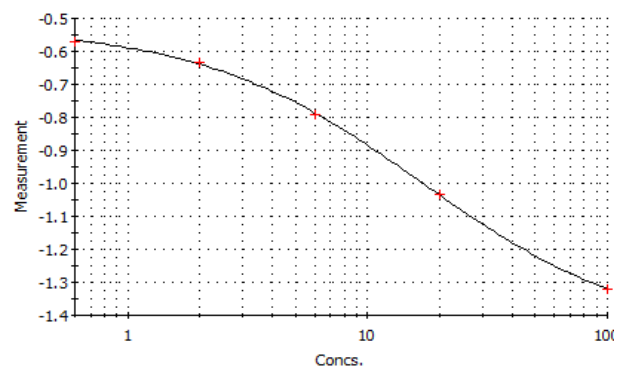
izlagali predanalitičkom ispitivanju kroz 2, odnosno 4 sata jer je proces zgrušavanja neodgodiv, a u serumskom dijelu

3.5 Određivanje koncentracije serotonina u trombocitima u PRP-u, serumu i plazmi enzimimunoanalizom (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*; ELISA).

Kalibracijska krivulja za serum i PRP-u izrađuje se sa šest standardnih otopina serotonina u rasponu vrijednosti od 0 do 2500 ng/mL. Interpoliranjem vrijednosti absorbancije uzorka očitava se vrijednost koncentracije serotonina u ispitivanom uzorku.



Slika 8. Kalibracijska krivulja za mjerjenje serotonina u PRP i u serumu (koncentracije standarda serotonina: 0; 15; 50; 150; 500; 2500 ng/mL)



Slika 9. Kalibracijska krivulja za mjerjenje serotonina u plazmi (koncentracije standarda serotonina: 0; 0,6; 2,0; 6,0; 20,0 ng/mL)

Kalibracijsku krivulju za plazmu izradili smo uz pomoć diluiranih standarda i kontrola koje smo dobili razrjeđivanjem po 50 μ L standarda i dvije kontrole u 1200 μ L 0,05 M HCl. Metodu za plazmu modificirali smo prema kombinacijom uputstava uputama za (DRG, Austria, 2009).

Slika 8. i 9. prikazuju kalibracijske krivulju po kojima smo u našem istraživanju mjerili koncentracije serotonina u uzorcima PRP, seruma i plazme.

Koncentraciju serotonina u trombocitima određivali smo komercijalnim testom Serotonin FAST ELISA EIA-5061 (DRG, Austrija) koji je sadržavao unaprijed sve reagense i standardne otopine i koji je priređen po IVD (engl. *In Vitro Diagnostic*) direktivi namijenjen upravo određivanju serotonina u humanim uzorcima. U radu smo se pridržavali svih uputa proizvođača. Neposredno prije određivanja koncentracije serotonina odledili smo suspenzije

trombocita iz PRP-a i termostatirali na sobnoj temperaturi, snažno promiješali na električnoj mješalici te centrifugirali 2 min na 10.000 okretaja/min (5.000 g). Uzorke plazme i seruma također smo neposredno prije analize odledili i termostatirali na sobnoj temperaturi te promiješali na električnoj mješalici. Postupak određivanja koncentracije serotonina pretpostavlja prethodno kvantitativno aciliranje serotonina u svim uzorcima. Aciliranje kontrolnih uzoraka, standarda i uzoraka suspenzije trombocita u uzorcima seruma i PRP-a izvodi se redom dodatkom:

- 25 μL uzorka
- 500 μL acilirajućeg pufera
- 25 μL acilirajućeg reagensa

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

- 100 μL diluiranih standarda i kontrola te nediluiranih plazmi
- 100 μL acilirajućeg pufera
- 10 μL acilirajućeg reagensa

Nakon toga se reakcijska smjesa neprekidno miješa tijekom 15 minuta na temperaturi od 20–25 °C. Ovako pripremljeni standardi, kontrole i uzorci pipetiraju (25 μL – serum i PRP; 50 μL plazma) 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 °C, uz stalno protresanje na električnoj tresalici u trajanju od 30 minuta, natječu se serotonin iz suspenzije trombocita i vezanog na stijenke jažica za vezna mjesta na antitijelu. Nakon što je postignuta reakcijska ravnoteža, suvišak slobodnog antigena (serotonina) i kompleksa antigen–antiserum ispere se triput sa po 300 μL pufera za ispiranje. Nakon svakog postupka ispiranja mikrotitarsku ploču smo prislonjali na apsorbirajuću podlogu da bi jažice oslobodili svakog suviška antitijela i antigena. U suhe jažice na čijim stijenkama je preostao samo vezani kompleks antigen–antiserum, dodali smo 100 μL enzimskog konjugata, inkubirali 15 minuta uz protresanje. Enzimski konjugat sadrži kompleks anti-zečjih IgG s peroksidazom koji se veže na antitijela u kompleksu serotonin–antiserotonin. Ponovnim trostrukim ispiranjem sa po 300 μL pufera i osušenim jažicama, na stijenkama je ostao samo kompleks serotonin–antiserotonin–zečji IgG obilježen peroksidazom. Dodatkom supstrata, točnije TMB (tetrametilbenzidin), u sljedećih 15 minuta inkubacije peroksidaza katalizirala je oksidaciju supstrata TMB i formirala obojeni kompleks. Reakciju smo zaustavili dodatkom 100 μL otopine (tzv. “Stop solution“ - otopina za zaustavljanje

enzimske reakcije) koja sadrži 0,25 M H₂SO₄. Razvijena plava boja dodatkom „Stop otopine“ prelazi u žutu. Nakon dodatka otopine za zaustavljanje enzimske reakcije količina stvorenog obojenog kompleksa određuje se očitanjem absorbancija u mikrotitarskoj ploči na automatskom fotometru Humareader prilagođenom za mikrotitarske pločice (Human, Njemačka) uz valnu duljinu 450 nm i sekundarnu korekcijsku valnu duljinu od 630 nm.

3.6. Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v. 12.2.1.0.. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Korištenjem deskriptivne analize prikazani su dobiveni podaci, a skupovi podataka ispitani su Kolmogorov-Smirnovljevim statističkim testom na normalnost raspodjele.

Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije r prema Coltonu

KOEFICIJENT KORELACIJE (r)	POVEZANOST
0 do ± 0, 25	nema povezanosti
± 0, 26 do ±0,50	slaba povezanost
±0, 51 do ± 0, 75	umjereno do dobra povezanost
± 0, 76 do ± 1	dobra do izvrsna povezanost

Ako distribucija podataka ne bude slijedila Gaussovu raspodjelu koristi ćemo neparametrijske testove, te podatke opisivati medijanom i rasponom izmjerenih vrijednosti. Za ispitivanje povezanosti varijabli koja govori o njihovoj povezanosti korišten je statistički postupak po Pearsonu ili Spearman za parametrijske, odnosno neparametrijske testove s pripadajućim koeficijentom korelacije r i njegovom statističkom značajnošću P. Koeficijenti korelacije tumačili smo prema Coltonu (Tablica 1.). Modelom linearne regresije procjenjivali smo ovisnu varijablu prema predikcijskoj na razini statističke značajnosti P<0,05. Koeficijentom determinacije (R²) utvrđivali smo u kojoj je mjeri matematički model primjenjiv za predviđanje ovisne varijable. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom histograma kojim se može primjetiti da raspodjela podataka ne slijedi Gaussovu krivulju, zatim, pravcem regresije s jednadžbom $y = a + bx$, gdje „a“ predstavlja odsječak na osi y u kojem pravac siječe

ordinatu, a „b“ nagib pravca, tj. porast na osi y za jedinični porast na osi x, uz naznačene granice pouzdanosti od 95% i granice predviđenih vrijednosti od 95%.

Za utvrđivanje postojanja statistički značajne razlike između varijabli u predanalitičkim varijacijama kroz 4 sata, korišten je parametrijski test Anova ili neparametrijski Kruskal-Wallisov test.

4. Rezultati

Skupina od 20 ispitanika starosne dobi od 22 do 60 godina imala je ujednačen udio muškaraca (N=11) i žena (N=9) kako je prikazano na Slici 7. te starosne dobi od 21 do 60 godina i medijanom od 23 godine (Tablica 2.)

4.1. Predanalitička stabilnost uzoraka

Prvi cilj rada bio je procijeniti stabilnost uzoraka u predanalitičkoj fazi, te se zbog toga pratila koncentracija serotonina u plazmi, serumu i PRP-u u 0 sati, nakon 2 i nakon 4 sata. Uz to promatrao se i broj trombocita u istim vremenskim intervalima. Stabilnost seruma kroz vrijeme nismo pratili jer je proces zgrušavanja neodgodiv te smo nakon završenog zgrušavanja od pola sata centrifugirali uzorak i odvajali serum.

Rezultati praćenja koncentracija serotonina i broja trombocita u vremenu su prikazani u tablici.

Dobiveni rezultati mjerenja koncentracija serotonina u serumu, plazmi i PRP-u, te broja trombocita u navedenim vremenskim intervalima prate normalnu raspodjelu ($P > 0,05$). Zbog toga je za utvrđivanje statistički značajne razlike između varijabli u predanalitičkim varijacijama kroz 4 sata bilo moguće koristiti parametrijski test Anova.

Usporedbu rezultata u tri vremena testirana je jednosmjernom analizom Anova pri čemu su dobivene P vrijednosti:

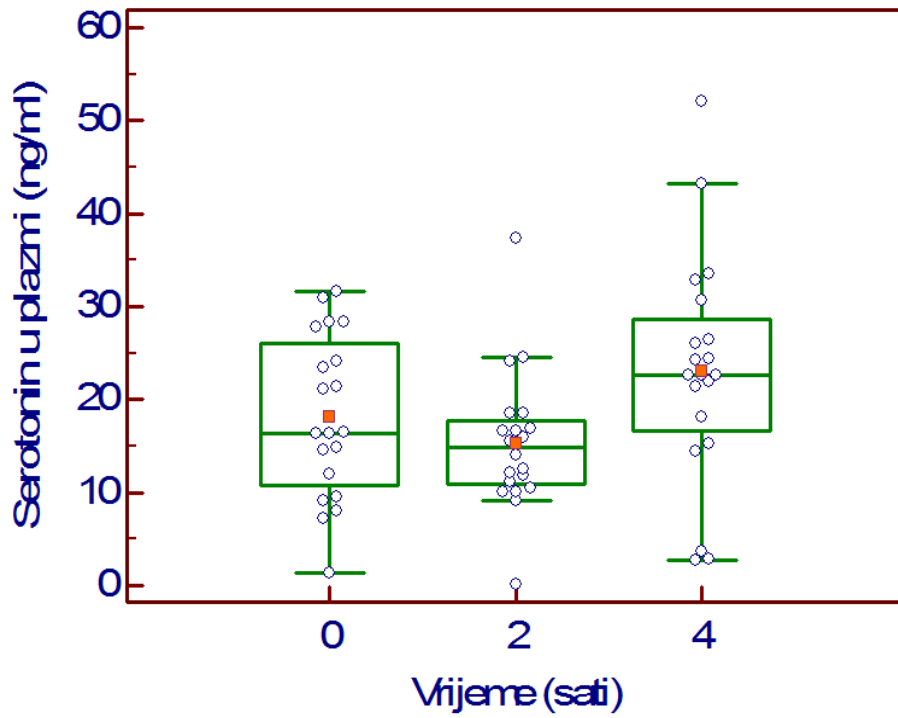
- praćenje koncentracije serotonina u plazmi kroz 0, 2 i 4 sata; $P = 0,075$
- praćenje koncentracije serotonina u trombocitima kroz 0, 2 i 4 sata; $P = 0,644$
- praćenje koncentracije serotonina u PRP ekstraktu kroz 0, 2 i 4 sata; $P = 0,739$
- praćenje broja trombocita kroz 0, 2 i 4 sata; $P = 0,148$

Iz dobivenih podataka je vidljivo da nema statistički značajne razlike između 0, 2 i 4 sata jer $P > 0,05$. Slikovnih prikaz usporedbe mjerenja kroz 4 sata prikazan je na Slici 10., 11. 12. i 13.

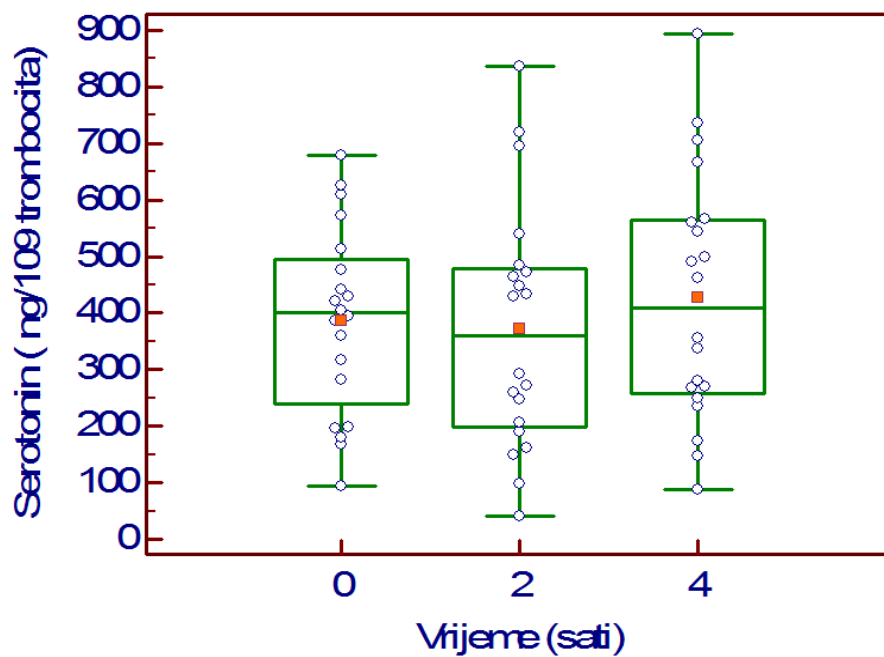
Tablica 2. Opisna statistika istraživanih skupa i rezultata mjerenja serotonina

	N	Srednja vrijednost	95% CI	SD	Medijan	95% CI	Minimum	Maksimum	5 - 95 P	P Testiranje normalnosti distribucije
Dob	20	29,4	23,2 - 35,6	13,21	23,0	22,0 - 23,8	21,0	60,0	21,0 - 59,5	0,0081
Trombociti 0	20	603,4	538,5 - 668,3	138,61	607,5	520,6 - 687,8	371,0	819,0	379,5 - 816,5	0,6219
Trombociti 2	20	562,7	504,2 - 621,2	125,05	576,5	500,9 - 634,1	293,0	761,0	342,0 - 747,5	0,7449
Trombociti 4	20	524,7	473,6 - 575,8	109,19	530,0	477,9 - 583,1	295,0	687,0	336,0 - 684,0	0,8221
Serotonin 0	20	231,7	179,9 - 283,4	110,54	247,9	167,9 - 281,2	64,9	483,4	65,8 - 452,2	0,5966
Serotonin 2	20	208,0	150,5 - 265,6	122,95	197,0	131,0 - 292,0	21,8	502,4	34,6 - 430,0	0,6218
Serotonin 4	20	220,7	166,1 - 275,3	116,66	226,4	124,5 - 295,6	42,2	475,1	59,6 - 429,8	0,6075
Ser tromb 0	20	387,5	309,0 - 464,0	165,57	400,4	287,6 - 470,7	93,8	678,4	130,6 - 651,9	0,6925
Ser tromb 2	20	372,0	270,3 - 473,81	217,47	360,1	214,0 - 471,8	40,2	837,4	69,1 - 778,6	0,5533
Ser tromb 4	20	426,5	323,5 - 529,6	220,20	409,6	267,9 - 557,2	88,7	894,2	117,0 - 815,3	0,5968
Plazma 0	20	18,2	14,1 - 22,3	8,78	16,4	12,4 - 24,1	1,3	31,6	4,3 - 31,3	0,4968
Plazma 2	20	15,3	11,8 - 18,9	7,52	14,8	11,3 - 16,9	0,1	37,4	4,7 - 30,0	0,4804
Plazma 4	20	23,1	17,3 - 28,9	12,35	22,6	18,7 - 26,4	2,7	52,1	2,8 - 47,7	0,5264
Serum	20	156,9	117,2 - 196,5	84,63	142,3	90,5 - 208,0	48,6	391,9	51,2 - 322,1	0,0479

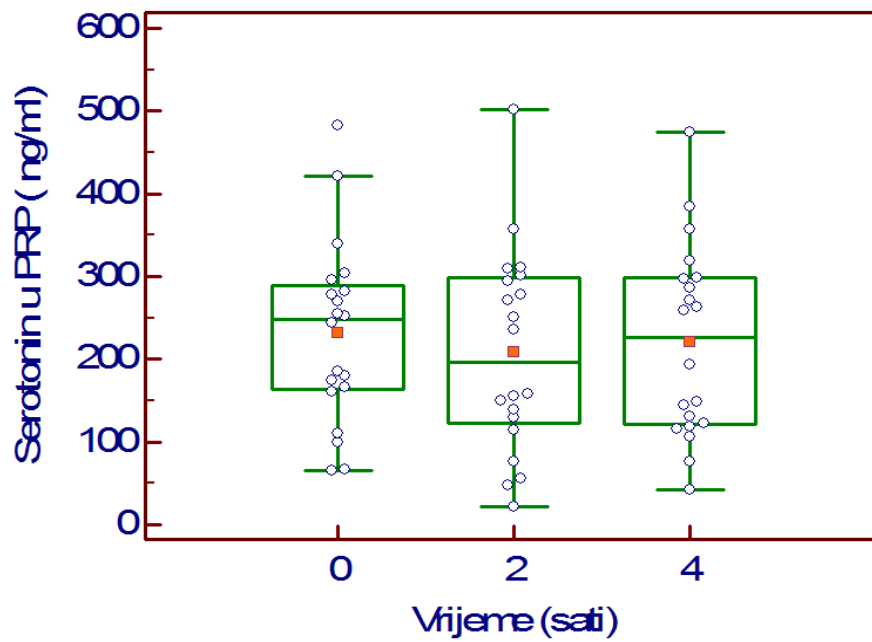
Trombociti 0, 2, 4 - broj trombocita u 0 h ,nakon 2h i nakon 4h; Serotonin 0, 2, 4 - koncentracija serotonina u PRP ekstraktu tj. lizatu u 0 sati, nakon 2h i nakon 4h u ng/ml; Ser tromb 0, 2, 4 – koncentracija serotonina u 0 sati, nakon 2h i nakon 4h u ng/10⁹ trombocita; Plazma 0, 2, 4 – koncentracija serotonina u plazmi u 0 h, nakon 2h i nakon 4h u ng/ml; Serum – koncentracija serotonina u serumu u ng/ml ; N – broj ispitanika; CI – interval pouzdanosti od 95 %; SD – standardna devijacija; PRP- plazma bogata trombocitima; 5 - 95 P – raspon veličina varijabli od 5. do 95. percentile



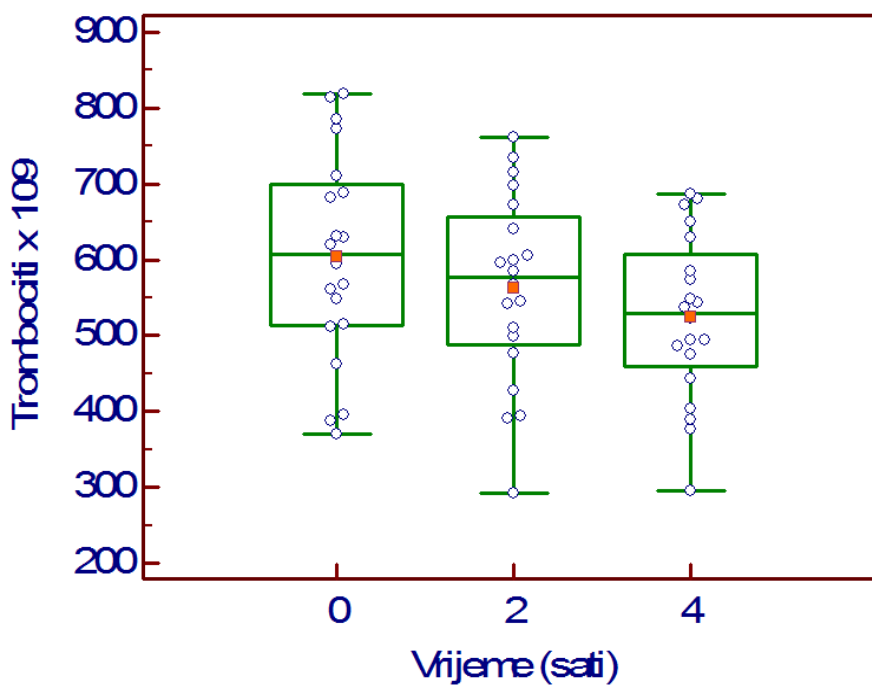
Slika 10. Prikaz stabilnosti koncentracije serotonina u plazmi kroz 0, 2 i 4 sata ; $P = 0,075$



Slika 11. Prikaz stabilnosti koncentracije serotonina u PRP-u na 109 trombocitima kroz 0, 2 i 4 sata; $P = 0,644$



Slika 12. Prikaz stabilnosti koncentracije serotonina u PRP ekstraktu kroz 0, 2 i 4 sata;
 $P = 0,739$



Slika 13. Prikaz stabilnosti broja trombocita kroz 0, 2 i 4 sata; $P = 0,148$

4.2. Povezanost koncentracije serotonina u serumu, u trombocitima i u plazmi

Drugi cilj našeg rada bio je istražiti povezanost matematički odnos između koncentracija serotonina u serumu, u plazmi i u trombocitima, odnosno istražiti je li koncentracija serotonina u PRP-u jednaka razlici koncentracija serotonina u serumu i plazmi. U tu svrhu primjenjene su dolje navedene matematičke transformacije koje su u skladu s poznavanjem fiziologije trombocita, te sa sličnim pokusima pronađenim u znanstvenim člancima (Ernberg i sur., 2000; Cubeddu i sur., 1992):

$$\begin{aligned} \text{pretpostavka: } & \text{konc. trombocitnog serotonina} \approx \text{konc. serumskog serotonina} - \\ & \text{konc. plazmatskog serotonina} \\ & (\text{PRP} \approx \text{S} - \text{P}) \end{aligned}$$

Postavljena su još dva odnosa između koncentracija serotonina u ova tri medija (serumu, plazmi i PRP-u). Ti su odnosi:

1. Ukupna koncentracija serotonina = zbroj konc. serotonina u lizatu trombocita i konc. u plazmi \approx konc. serotonina u serumu
$$(\text{PRP} + \text{P} \approx \text{S})$$
2. omjer plazmatske i serumske koncentracije serotonina (P/S) kao mjera odnosa koncentracija u različitim

Utvrđivane su povezanosti s brojem trombocita i trombokritom u PRP-u. Trombociti su izbrojani na automatskom analizatoru, također i volumen trombocita, a trombokrit smo izračunali (Pct) prema formuli, odnosno definiciji trombokrita po kojoj je on mjera mililitarskog udjela trombocitnog sloja u odnosu na 1L plazme.

$$\begin{aligned} \text{Trombokrit (Pct)} &= \text{broj trombocita u PRP-u} \times \text{srednji volumen trombocita (MPV)/1000} \\ & (\text{mL/L}) \end{aligned}$$

Rezultati izmjerenih koncentracija serotonina u lizatu trombocita, u serumu i u plazmi, računske izvedenice prema broju trombocita te matematički odnosi koncentracija među raznim medijima prikazani su u Tablici 3.

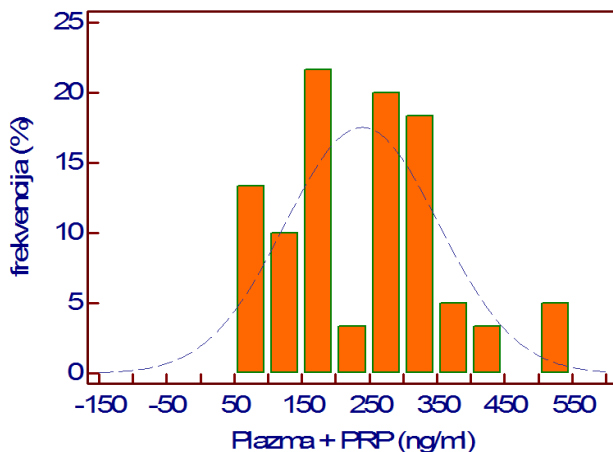
Tablica 3. rezultati mjerenja serotonina i trombocita te računski parametri izvedeni iz mjerenih veličina

	N	Srednja vrijednost	95% CI	SD	Medijan	95% CI	Minimum	Maksimum	5 - 95 P	P Testiranje normalnosti distribucije
Serotonin u plazmi (ng/mL)	60	18,9	16,3 - 21,5	10,13	16,8	15,3 - 21,9	0,1	52,1	2,8 - 35,5	0,6491
serotonina u serumu (ng/mL)	60	136,3*	105,1 - 176,8*		142,2*	90,5 - 208,8*	48,6	391,9	51,1 - 314,4*	0,7673
Serotonin u lizatu trombocita (PRP-a) (ng/ml)	60	220,1	190,3 - 249,9	115,24	240,2	157,7 - 271,1	21,8	502,4	51,5 - 448,1	0,3898
Serotonin u trombocitu (ng/10 ⁹ trombocita)	60	395,3	343,5 - 447,1	200,52	400,4	281,4 - 463,3	40,2	894,2	95,9 - 728,0	0,3199
Razlika serotonina u serumu i u plazmi (serum – plazma) (ng/ml)	60	111,8*	93,3 - 133,9*		123,1*	85,2 - 177,7*	20,8	376,5	26,6 - 300,1*	0,1967
Ukupni serotonin (Plazma + serotonin u lizatu PRP) (ng/ml)	60	238,0	209,6 - 268,4	113,78	253,3	176,0 - 285,7	59,2	517,8	67,5 - 472,2	0,3005
Omjer plazmatskog i serumskog serotonina) P/S	60	0,2	0,1 - 0,2	0,14	0,1	0,1 - 0,2	0,0	0,6	0,0 - 0,5	<0,0001
Broj trombocita u PRP-u (×10 ⁹)	60	563	530,8 to 596,3	126,9	564	522,5 to 600,3	293	819	374 – 779	0,9692
Srednji volumen trombocita MPV (fL)	60	7,5	7,3 - 7,7	0,77	7,3	7,2 to 7,5	6,4	9,2	6,4 - 9,1	0,1151
Trombokrit u PRP (mL/L)	60	4,2	3,9 - 4,4	0,81	3,9	3,8 to 4,3	2,4	6,5	3,1 - 5,6	0,2098

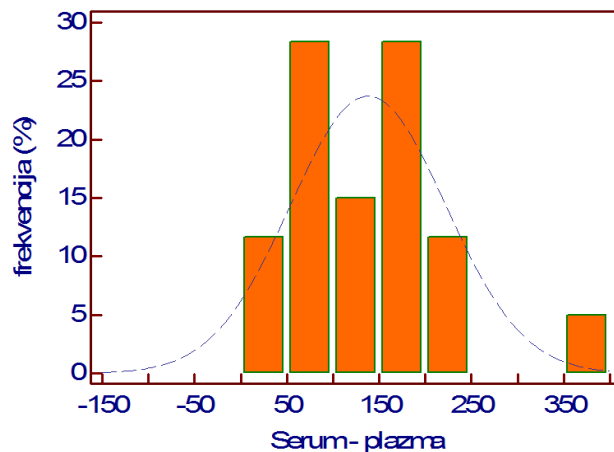
* normalna distribucija dobivena nakon logaritamske transformacije

N – broj uzoraka; CI – interval pouzdanosti od 95 %; SD – standardna devijacija; PRP- plazma bogata trombocitima; P/S – omjer koncentracije serotonina plazma/serum; 5 - 95 P - raspon veličina varijabli od 5. do 95. percentile

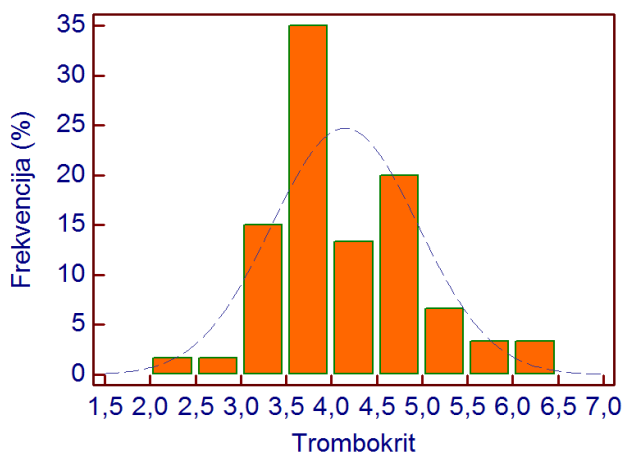
Distribucija varijabli izvedenih računskim putem iz izmjerenih vrijednosti prikazana je histogramima na Slici 14., 15., 16. i 17. gdje je uz frekvenciju (%) pokazana i sukladnost s Gaussovom raspodjelom. Iz prikaza je vidljivo da distribucija podataka slijedi normalnu raspodjelu kod svih računskih parametara, osim kod omjera P/S čije su veličine okupljene u uskom području omjera od 0,1 do 0,2.



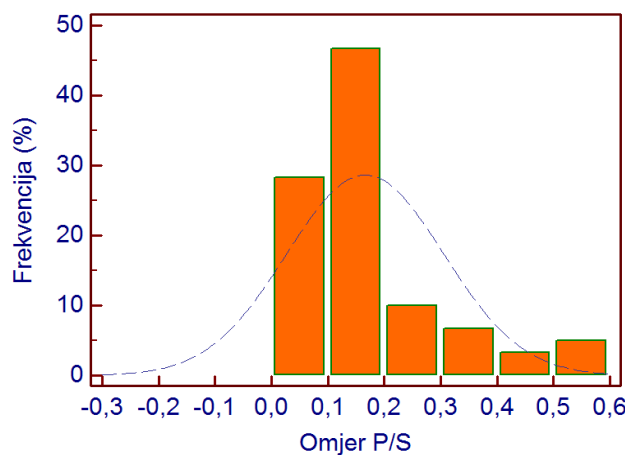
Slika 14. Histogram distribucije zbroja koncentracija serotonina u plazmi i u PRP-u



Slika 15. Histogram distribucije razlika koncentracija serotonina u serumu i u plazmi



Slika 16. Histogram distribucije trombokrita

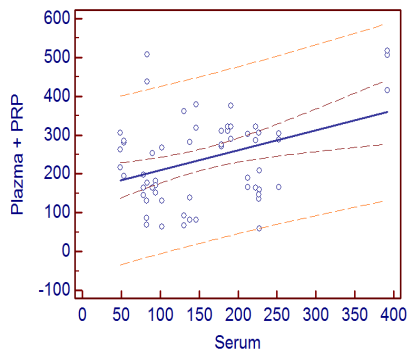


Slika 17. Histogram distribucije omjera koncentracija serotonina u plazmi i serumu (P/S)

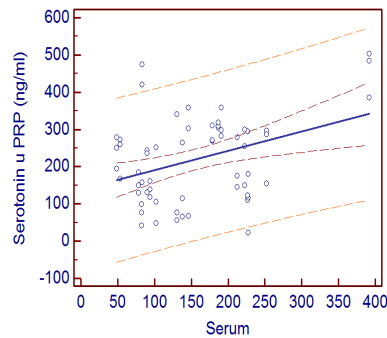
Ni jedna od matematičkih transformacija nije dala rezultate s kojima bi mogla biti zamijenjena neka od mjerenih varijabli. Skupovi podataka matematičkih inačica značajno su se razlikovali od izmjerenih podataka ($P < 0,05$). Hipoteza da bi razlika između serumske i plazmatske koncentracije mogla jednostavno zamijeniti koncentraciju u trombocitima nije se pokazala realnom. Stoga je matematičkim modelom linearne regresije pokušana pronaći mogućnost povezivanja varijabli.

Povezanost varijabli ispitana je korelacijskim testiranjem na statističkoj razini $P < 0,05$ uz

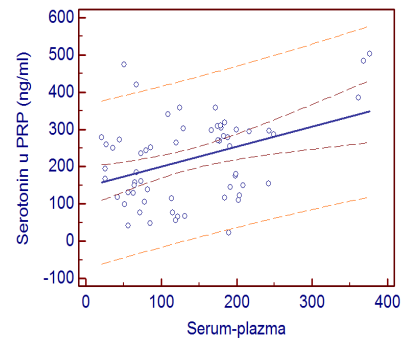
regresijsku analizu. Slike od 18. do 25. izabrane su samo za prikaz onih varijabli koje su pokazale povezanost i koja je ujedno i statistički značajna.



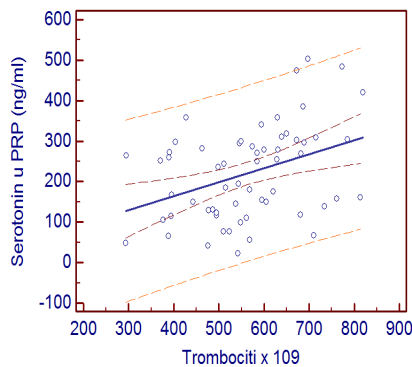
Slika 18. Povezanost zbroja koncentracija serotonina u plazmi i PRP s koncentracijom u serumu; $r = 0,376$; $R^2 = 0,142$; $P = 0,003$



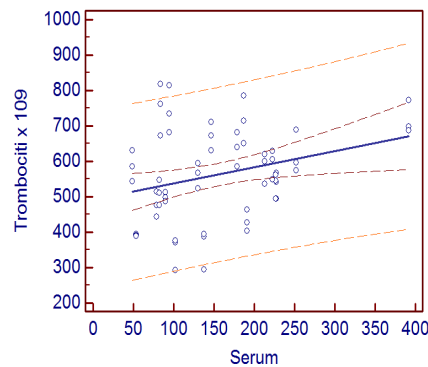
Slika 19. Povezanost koncentracija serotonina u PRP s koncentracijom u serumu; $r = 0,375$; $R^2 = 0,140$; $P = 0,003$



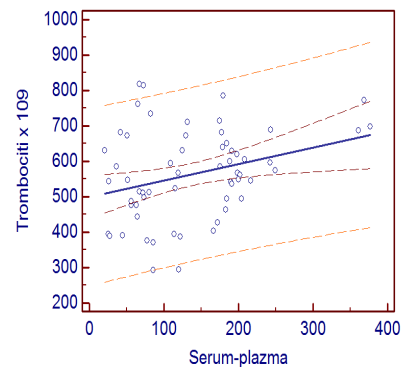
Slika 20. Povezanost koncentracija serotonina u PRP s razlikom koncentracija između seruma i plazme; $r = 0,393$; $R^2 = 0,154$; $P = 0,002$



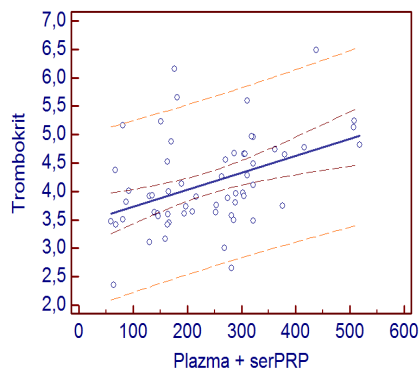
Slika 21. Povezanost koncentracija serotonina u PRP s brojem trombocita; $r = 0,379$; $R^2 = 0,144$; $P = 0,003$



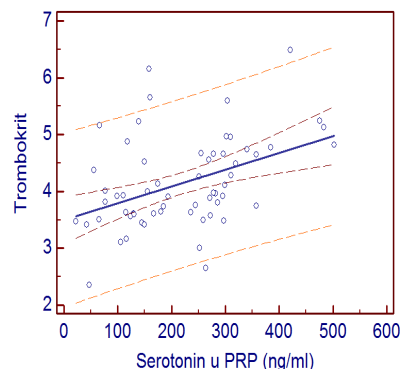
Slika 22. Povezanost broja trombocita ($\times 10^9$) s koncentracijom serotonina u serumu; $r = 0,301$; $R^2 = 0,091$; $P = 0,019$



Slika 23. Povezanost broja trombocita ($\times 10^9$) s razlikom koncentracija serotonina u serumu i plazmi; $r = 0,309$; $R^2 = 0,095$; $P = 0,016$



Slika 24. Povezanost zbroja koncentracija serotonina u plazmi i PRP s trombokritom; $r = 0,419$; $R^2 = 0,176$; $P = 0,001$

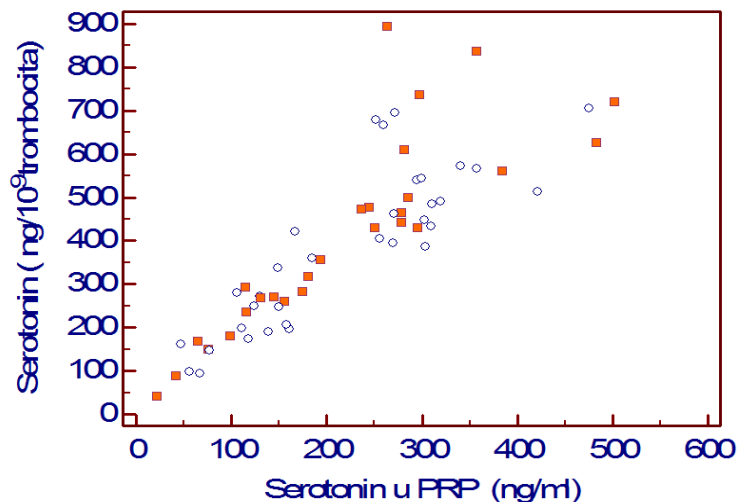


Slika 25. Povezanost koncentracije serotonina u PRP s trombokritom; $r = 0,421$; $R^2 = 0,178$; $P = 0,001$

Iz priloženih slika s podacima o statističkim parametrima vidljivo je da su povezanosti ispitivanih varijabli slabe jer se vrijednosti koeficijenta korelacije r kreću od 0,301 do 0,421, ali sve su povezanosti statistički značajne ($P < 0,05$).

4.2.1. Povezanost koncentracije serotonina u lizatu trombocita (PRP) i koncentracije trombocitnog serotonina izraženom prema broju trombocita

Statistička analiza korelacije utvrdilo da postoji snažna povezanost jedino između koncentracije serotonina u lizatu trombocita i koncentracije serotonina izraženog po broju trombocita. Test pokazuje da postoji značajna korelacija između ovih dviju varijabli ($r=0.854$, $R^2=0.714$ $P < 0,0001$), što podupire i činjenica da se jedna varijabla izračunava iz druge.



Slika 26. Grafički prikaz korelacije između koncentracije serotonina u PRP-u i trombocitima. $r=0,854$; $R^2=0.714$ i $P < 0,001$; $y=71,6273 + 1,4707x$; postoji statistički značajna povezanost između koncentracije serotonina u PRP-u i trombocitima; serotonin ($\text{ng}/10^9$ trombocita); koncentracija serotonina u $\text{ng}/10^9$ trombocita; serotonin u PRP (ng/ml)- koncentracija serotonina u PRP ekstraktu tj. lizatu u ng/ml ; crvenom bojom označena su mjerenja u uzorcima ženskog spola.

5. Rasprava

Serotonin se najvećim dijelom nalazi u središnjem živčanom sustavu gdje je jedan od glavnih neurotransmitera u mozgu, a periferno ga najviše ima u trombocitima. U njima je, unutar gustih granula, pohranjeno više od 99% ukupnog serotonina u cirkulaciji, dok je koncentracija slobodnog serotonina u plazmi zanemarivo mala prilikom kliničkih mjerenja. Uključen je u regulaciju brojnih fizioloških i patofizioloških procesa, a poremećaj serotoninskog sustava povezuje se s pojavom različitih bolesti, posebno duševnih kao npr. depresija, psihoza, anksiozni poremećaji, itd., te se zato koristi pri dijagnozi i praćenju terapije i tijekom navedenih bolesti. Ujedno, bitna je i njegova uloga u procesu zgrušavanja krvi gdje prilikom aktivacije trombocita dolazi do njegovog otpuštanja iz gustih granula.

Više od 60 godina mjeri se koncentracija serotonina, istražuje najpogodnija i klinički najvrednija vrsta medija za mjerenje kao i metode određivanja. Metode su se usavršile u svojoj specifičnosti i osjetljivosti, poglavito kromatografske i spektrofluorometrijske metode. Istovremeno su se spoznala i klinička primjena, a s njom i potreba za rutinskim metodama koje u klinici trebaju brzinu i jednostavnu primjenjivost. Najbolju praktičnu primjenu pokazale su imunokemijske metode, poput ELISA metode kojom smo se i mi koristili u istraživanju upravo zato da bi istraživanje lako bilo primjenjivo u kliničkoj praksi

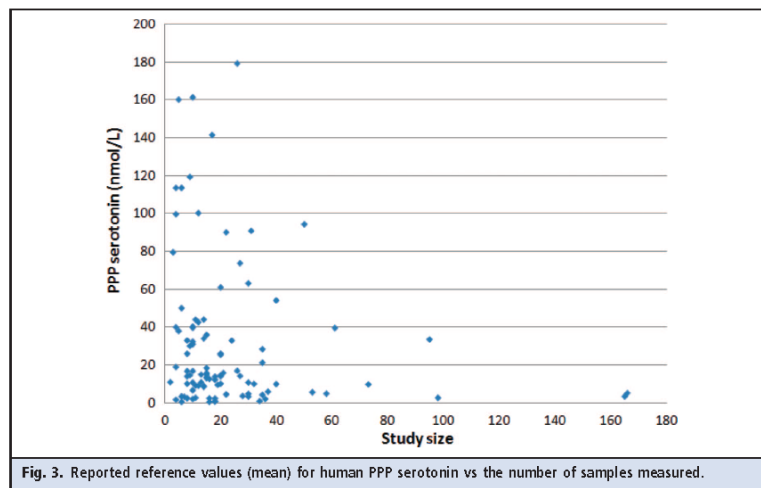
Klinička primjena serotonina u tjelesnim tekućinama i trombocitima nalazi svoje mjesto u različitim kliničkim poremećajima o kojima ovisi i odabir uzorka, medija za analizu. Zato do danas nije definiran jedinstveni medij jer različiti klinički entiteti trebaju i različite podatke o koncentraciji serotonina u anatomski odjeljcima. Istraživanja poput utjecaja majčinog serotonina na embriogenezu, uloga serotonina u regulaciji rasta kostiju, uloga perifernog serotonina u procesu obnove jetre, uloga serotonina u razvoju mliječnih žlijezda, uloga serotonina u razvoju fenfluraminom uzrokovane srčane vulvopatije, te uloga izvanstaničnog serotonina u kontroli izlučivanja inzulina, iziskuju mjerenje plazmatskog serotonina (Brand i Anderson., 2011). S druge strane, psihijatrijski poremećaji prate sadržaj trombocitnog serotonina kao model za procjenu serotonergičnog sustava u neuronima. Dijagnostika karcinoida pak nema jedinstven kriterij u odabiru uzorka jer tumorske stanice imaju nepredviđen metabolizam triptofana u ovisnosti o tipu i anatomskoj lokaciji karcinoida. Stoga je ponekad potrebno mjeriti koncentracije u plazmi, trombocitima i u urinu (Thomas, 1999). Literaturni podaci i znanstveni radovi istražuju sve medije i nalaze kliničku primjenu za svaki (Ernberg, 2013; Cubeddu, 1992). Velike medicinske ustanove poput Mayo klinike, određuju

koncentraciju serotonina u više medija (katalog na: <http://www.mayomedicallaboratories.com>), a relevantna literatura navodi referentne vrijednosti za svaki pojedini medij, odnosno vrstu uzorka (Burtis i Ashwood, 2005). U praktičnim, svakodnevnim uvjetima valja misiti na množinu svih uzoraka koji se u gotovo isto vrijeme nađu u laboratoriju te na teškoće brze obrade. Ujedno se događa odgoda obrade zbog transporta uzorka (udaljene bolnice, paviljoni unutar bolnice, tadržavanje uzorka na odjelu i sl.). Serotonin in vitro može biti nekontrolirano ispuštan iz trombocita te smo zato u prvom redu željeli ispitati stabilnost u vremenu primjerenom rutinskom radu. Odabrali smo vrijeme odmah iza uzimanja krvi (nulto vrijeme) kao najtočniji i najpouzdaniji podatak, a u praksi pak teško provediv, a potom dva realna vremena 2 i 4 sata nakon uzorkovanja. Serumske uzorke nismo pratili kroz vrijeme jer u epruveti bez antikoagulansa i s dodatkom aktivatora zgrušavanje započne odmah nakon uzorkovanja te je do dostave u laboratorij zgrušavanje najčešće već završeno što znači da je do dolaska u laboratorij gotovo sav serotonin oslobođen iz trombocita. Rezultati usporedbe izmjerenih koncentracija u uzorcima koji su odmah obrađivani te onih koji su na sobnoj temperaturi čekali obradu 2 i 4 sata, pokazali su da nema statistički značajne razlike između 0, 2 i 4 sata jer su svi $P > 0,05$ ($P = 0,644$; $P = 0,739$; $P = 0,148$; $P = 0,075$). ;

Naši su rezultati u skladu s malobrojnim ispitivanjima toga tipa. U radu Sanner i sur., 2013, proučavana je stabilnost uzoraka krvi koji su oduzeti u epruvete s antikoagulansom EDTA. Dobivena plazma iz tih uzoraka bila je pohranjena na 4°C kroz 3, 5, 8 i 12 sati. Rezultati govore da ne postoji značajna promjena koncentracije serotonina tijekom 3, 5 i 8 sati, te da se značajno mijenja tek nakon pohrane od 12 sati. Također upućuju na važnost obrade uzorka unutar preporučenog vremena. Navedeni rezultati i naši rezultati u suprotnosti s navodima u knjizi Lothara Thomasa (Thomas, 1998) prema kojima valja promptno obraditi uzorak.

Na primjeru ispitivanja plazme zapaža se nakon 2 sata pad koncentracije, ali nakon 4 sata ponovni rast. Iako promjene nisu statistički značajne ipak tu nelogičnosti dajemo značaj i pripisujemo nedovoljnoj preciznosti i osjetljivosti naše modificirane metode. Uz to, uvjete centrifugiranja prilagodili smo standardu za pripremu PPP za sve koagulacijske testove u namjeri da primjena metode može slijediti uhodane i realne rutinske uvjete u klinici. U literaturi se navode mnogi postupci odvajanja plazme te nekoliko vrsta primjene brzine i opetovanja centrifugiranja. Autori revijskog članka Brand i Anderson sakupili su 101 rad koji je mjerio serotonin u plazmi, iskazao način pripreme uzorka, metodologiju i izmjerene

koncentracije (Brand i Anderson, 2011) U članku se ističe velika neujednačenost rezultata između dobivenih koncentracija serotonina u plazmi, a obuhvaćaju interval od 0,6 do 179 nmol/L, odnosno 0,1 do 31,5 ng/mL (Slika 27.). Velike razlike koje navodi revijski članak posljedica su različitih predanalitičkih i analitičkih postupaka korištenih u studijama. Postoje razlike već od oduzimanja krvi (različite igle, eruvete, antikoagulansi), zatim razlike prilikom postavljanja uvjeta centrifugiranja (temperatura, jačina). Neki autori primjenjuju dvostruko centrifugiranje, a autori revijskog članka analizom studija zaključuju da je dovoljno jednokratno centrifugiranje na 4500 g. Mi smo primijenili 3500g kako bismo upravo u rutinskim uvjetim, s rutinski primjenjivom metodom ELISA izlučili zaključke na moguću korist klinici.

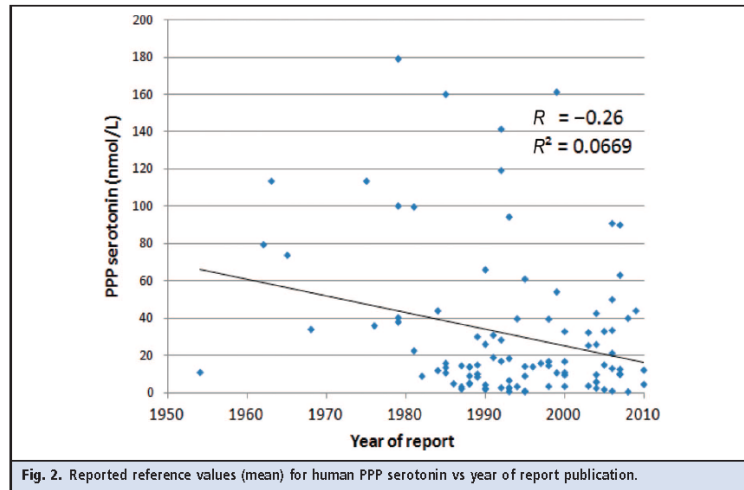


Slika 27. Rasipanje rezultata mjerenja plazmatskog serotonina. (preuzeto iz Brand i Anderson, 2011)

Također, u studijama su nakon centrifugiranja izdvajani različiti volumeni plazme, te su korištene metode različite specifičnosti i osjetljivosti za određivanje koncentracije serotonina. Naši su rezultati među višima ($18,8 \pm 10,12$ ng/ml) što nije neočekivano budući da literaturni podaci pokazuju da osjetljivija metodologija (primjerice HPLC) daje niže vrijednosti. Prodor osjetljivijih metoda kroz posljednjih 50 godina također se može zapaziti prateći rezultate mjerenja koncentracija serotonina kako su prikazali Brand i Anderson u revijskom članku (Slika 28.)

Razlozi veće grupiranosti nižih vrijednosti u posljednjih 25 godina rezultat su upravo usavršavanju metodologije prema osjetljivosti i specifičnosti, dostupnije tehnologije i mjernih instrumenata te posljedično i većeg interesa istraživača. Tako ekstremne razlike koje iznosi revijski članak, posljedice su različitih metoda, mjernih instrumenata, načina pripreme PPP i na

kraju najvažnije – nepostojanje internacionalnog pouzdanog standarda za procjenu točnosti. Stoga se naši rezultati ne mogu lako usporediti s drugima.



Slika 28. Koncentracije serotonina u plazmi objavljene u radovima od 1950. do 2010. godine (preuzeto iz Brand i Anderson, 2011)

Prepostavili smo vjerojatnost da bismo u uvjetima centrifugiranja na 4500 g uz hlađenje dobili kvalitetniju plazmu s nižim koncentracijama serotonina, ali da to ne bi poboljšalo odnose i povezanost s koncentracijama serotonina u PRP. Održanost korelacijskih odnosa temeljimo na pretpostavci proporcionalno nižih razina serotonina u tako priređenoj plazmi. Da bismo provjerili utjecaj centrifugiranja, odnosno zagađenost plazme trombocitima, napravili smo pokus s plazmama iz svakodnevnog rutinskog rada i dobili sljedeće rezultate: u po 20 uzoraka citratne i EDTA plazme izmjereno je 2 do 6 trombocita s veličine (MPV) 3 do 4 fL. Osjetljivost hematološkog analizatora je 4 trombocita, a to je ujedno vrijednost slijepa probe s kojom analizator pozdano broji. Budući da su izmjerene veličine trombocita u plazmi iznosile 3 do 4 fl, dovodimo u sumnju jesu li to uopće trombociti ili čestice koje ne pripadaju trombocitnoj populaciji. Ukratko, plazma koju smo priređivali prema standardu u laboratorijskoj praksi može se smatrati siromašnom, štoviše, lišenom trombocita. Zaključujemo da su naše izmjerene koncentracije u kategoriji viših vrijednosti isključivo zbog primjene nedovoljno osjetljive ELISA metode.

Rezultati mjerenja serotonina u trombocitima i u serumu u našoj skupini zdravih dobrovoljaca u skladu su s onima koji su deklarirani kao referentni intervali ili kao rezultati znanstvenih

istraživanja na zdravoj populaciji. Tablica 4. prikazuje usporedbu iz koje očitavamo da se naši rezultati usporedivi s literaturnim podacima za zapadnu civilizaciju, osobito u odnosu na aritmetičkim sredinama.

Tablica 4. Usporedba literaturnih podataka koncentracije serotonina u zdravoj populacija s rezultatima naše studije

Referenca	Koncentracija serotonina u PRP plazmi (ng/mL)	Koncentracija serotonina u trombocitima (ng/10 ⁹ trombocita)	Koncentracija serotonina u serumu (ng/mL)
Hardisty i Stacey, 1955		390 - 750	
Belendiuk i sur., 1980	279 - 461		
Zeller i sur., 1983		187 - 991	
Le Quan-Bui i sur., 1984			186 - 352
Guicheney, 1988			121 - 621
Thomas i sur., 1999		125 - 500	50 - 200
Jernej i sur., 1999		410 - 748	
Burtis i Ashwood, 2005		88 - 1230	30 - 200
Rochester Test Catalog Mayo Clinic, 2011.			≤ 230
Krtanjek, 2012.		46 - 1457	
Getaldić Švarc, 2011		399 - 655	
Neubauer i sur., 2012			83 - 295
U.S. National Institutes of Health, 2013			101 - 283
Naše istraživanje	54 - 448	40 - 895	49 - 392

Zapažamo da su koncentracije serotonina neujednačene, osobito u plazmatskom mediju siromašnom trombocitima. Jedan od snažnih razloga raspršenosti rezultata jest nedostatak međunarodnog standarda koji bi na planu različitih metoda donio ujednačenost. Sljedeći je

razlog u neujednačenoj, nestandardiziranoj pripremi uzorka, odabiru antikoagulansa i varijabilnosti ostalih predanalitičkih čimbenika. Kroz radove zapažemo da se posebna pažnja poklanja centrifugalnoj sili čija je snaga preduvjet u pripremi plazme siromašne trombocitima. Međutim, individualna je nepredvidljivost očuvanosti trombocita u procesu centrifugiranja te je tu moguća kontaminacija s trombocitima što čini slabu karika, bez prave kontrole u pripremi uzorka. Treći je razlog raspršenosti rezultata fiziološke, odnosno patofiziološke naravi. Mjerna područja i koncentracijski intervali u zdravoj su populaciji vrlo široki, i u plazmi bogatoj i onoj siromašnoj trombocitima koja je uz to jako podložna vrsti prehrane i aktivnosti trombocita i serotoninskih transportera. Stoga nas nije iznenadila slaba povezanost rezultata i u našoj studiji. Štoviše, u promišljanju o povezanosti varijabli obeshrabruje činjenica da je slaba povezanost između broja trombocita u PRP i koncentracije serotonina u lizatu trombocita ($r=0,379$), što nije logično, jednako kao i povezanost serumskog serotonina s brojem trombocita u PRP ($r=0,315$), što je prihvatljivo očekivanje. Zaključujemo da je vrlo upitno u kojoj mjeri se uspije osloboditi serotonin u lizatu u odnosu na oslobađanje serotonina u procesu zgrušavanja. Ukratko, nemamo kontrolu nad otpuštanjem serotonina iz trombocita ni u zgrušavanju in vitro ni u postupcima separacije trombocita centrifugiranjem.

U procjenu povezanosti uključili smo trombokrit kao mjeru udjela trombocita u PRP. Izražen je kao ml/L plazme, a izveli smo ga umnoškom srednjeg volumena trombocita (MPV) i broja trombocita u 1 L PRP. Uz ovu varijablu uveli smo i neke matematičke izvedenice rukovodeći se literaturnim idejama i predviđanjima odnosa koncentracija serotonina u različitim medijima, a prema znanju o biologiji serotonina. U nekim radovima zapazili smo pokušaj procjene relativne frakcije plazmatskog serotonina (S/P) (Ernberg i sur., 2000) te procjene ukupnog serotonina zbrojem plazmatske i trombocitne koncentracije (Cubeddu i sur., 1992) te smo primijenili u našem istraživanju. Ujedno smo pretpostavili da postoji povezanost između razlike serotonina u serumu i u plazmi u odnosu na trombocitni serotonin. Rukovodeći se prema navedenim promišljanjima izveli smo tri nove varijable izvedene iz mjerenih parametara.

Najbolju povezanost ($r=0,845$; $P<0,0001$) pokazale su koncentracije serotonina/ 10^9 trombocita (što predstavlja sadržaj serotonina u jednom trombocitu) u odnosu na koncentracije serotonina u PRP (lizatu trombocita). Sličnu povezanost pokazuju i drugi radovi (Getaldić Švarc, 2011). Međutim, takvu snažnu povezanost možemo dovesti u sumnju jer je kocentracija serotonina/ 10^9 trombocita matematička izvedenica manipulacijom s brojem trombocita koji su u znatno užem rasponu nego li je izmjerena koncentracija serotonina u

lizatu. Istovremeno broj trombocita uopće ne korelira s istom izvedenicom serotonin/ 10^9 trombocita ($r=0,108$). Ovi rezultati ipak imaju uporište u logičnom razmišljanju – koncentracija serotonina u jednom trombocitu povezana je s koncentracijom serotonina u lizatu nekog određenog broja trombocita, dok ista koncentracija serotonina u jednom trombocitu nije povezana s brojem trombocita. Prva navedena logičnost povezanosti dapače bi se mogla očekivati i u najvećem mogućem stupnju tj. s koeficijentom korelacije blizu 1. Budući da se radi o ispitivanju u području biologije, sa svim njezinim individualnim varijacijama, ne možemo očekivati matematičku logiku već biološki odgovor uz nesigurnost mjerenja. Gubitak je posve prirodan pa se povezanost s koeficijentom korelacije $r>0,845$ drži jako dobrom povezanošću. Slabe povezanosti u razinama r od 0,3 do 0,4 govore nam da povezanost ipak postoji, da je statistički značajna, ali da je nedovoljna da bismo matematičkim modelom linearne regresije mogli predvidjeti neku varijablu. Takav stupanj povezanosti proizlazi iz fiziologije - promjenjivog i dinamičnog mehanizma izmjene i metabolizma serotonina u krvi između trombocita i plazme.

Najbolju povezanost pokazao je odnos između trombocita i trombocitnog serotonina ($r=0,4213$; $P=0,0008$) trombocita i zbroja plazmatskog i trombocitnog serotonina ($r= 0,4194$; $P= 0,0009$) te trombocitnog serotonina i razlike između serumske i plazmatske koncentracije ($r=0,393$; $P=0,0019$). To je upravo na tragu naše ideje premda povezanosti nisu snažne. Pokazalo se da je varijabla trombocita značajna te da bi u budućim istraživanjima valjalo obratiti pozornost na trombocit u punoj krvi jer trombocit u PRP nije dovoljno primjeren podatak za predviđanje serumskog i plazmatskog serotonina. Naša je procjena na temelju trombocita u PRP-u nepotpuna, iako možemo vjerovati u proporcionalni odnos trombocita u punoj krvi i PRP-u. Uporište za takvo razmišljanje nalazimo iz podataka doktorskog rada (Getaldić Švarc, 2011) u kojem možemo naći na 244 uzorka dobru povezanost trombocita u PRP i u punoj krvi (srednja vrijednost trombocita u punoj krvi iznosila je $232 \times 10^9/L$, u PRP-u $557 \times 10^9/L$, a koeficijent korelacije $r 0,661$ uz $P<0,0001$).

Omjer plazmatskog i serumskog serotonina nije pokazao povezanost s drugim varijablama. Međutim, pokazao je zanimljivu distribuciju koja je koncentrirana u uskom području od 0,1 do 0,3. Zato bi omjer možda imao smisla u praćenju relativne plazmatske frakcije budući da bi bio neovisan o nedovoljnoj osjetljivosti metode i manipulaciji uzorkom, a bio bi obuhvaćen cjelokupni sadržaj serotonina u krvi. Stoga bi valjalo omjer istraživati na različitim skupinama bolesnika u usporedbi sa zdravom populacijom.

6. Zaključci

1. Ispitivanje predanalitička stabilnost uzoraka na sobnoj temperaturi pokazala je stabilnost uzoraka s EDTA antikoagulansom do 4 sata.
2. Modifikacijom metode ELISA izmjerili smo koncentracije serotonina u plazmi siromašnoj trombocitima i dobili rezultate usporedive s ostalim istraživanjima.
3. Pažljivom manipulacijom uzorka i jačom snagom centrifugiranja mogli bismo izmjeriti i niže koncentracije serotonina u skladu s osjetljivijim metodama poput HPLC.
4. Povezanost koncentracija serotonina u plazmi siromašnom trombocitima, u serumu i u trombocitima pokazala se statistički značajnom, ali slabom ($0,309 < r < 0,421$).
5. Matematičkim modelom linearne regresije ne može se uspostaviti okvir kojim bismo složeni postupak određivanja trombocitnog serotonina zamijenili s mjerenjem serumskog i plazmatskog serotonina. Model može predvidjeti svega 17% uzoraka.
6. Nepostojanje referentnog materijala (internacionalnog standarda) za serotonin onemogućava procjenu točnosti. U uvjetima koje pruža ELISA metoda i rutinska obrada uzoraka klinički bi mogao biti primjenjiviji relativni omjer plazmatskog i serumskog serotonina nego li rezultati izdvojenih mjerenja u serumu i plazmi. To je tek poticaj za dalja istraživanja u kliničkim studijama.
7. Utvrđena je povezanost serumске i plazmatske koncentracije serotonina s trombokritom u PRP što je poticaj za buduća istraživanja da se ta slaba veza može pojačati koreliranjem s trombokritom iz pune krvi.

7. Zahvale

Posebno zahvaljujemo našoj mentorici doc. dr. sc. Nadi Vrkić na uloženom trudu, strpljenju te brojnim korisnim savjetima pri pisanju ovog rada.

Zahvaljujemo i dr. sc. Biserki Getaldić-Švarc, spec. med. biok. na korisnim savjetima i pomoći u izradi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujemo i djelatnicima Kliničkog zavoda za kemiju KBC Sestre milosrdnice na pomoći u izradi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujemo i svim našim ispitanicima bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti.

8. Popis literature

1. Balića M, Serotoninski sustav u trombocitima zdravih ljudi. Doktorski rad. Zagreb: MEF 2003.
2. Belendiuk K, Belendiuk GW, Freedman DX. 1980. Blood monoamine metabolism in Huntington's disease. *Archives of General Psychiatry* 37, 325- 332
3. Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; 60:355–366.
4. Brand T, Anderson GM. The Measurement of Platelet-Poor Plasma Serotonin: A Systematic Review of Prior Reports and Recommendations for Improved Analysis *Clinical Chemistry* (2011), 57:101376–1386.
5. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. 5. izd., Philadelphia: WB Saunders company, 2005.
6. Camacho A, Dimsdale JE. Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom Med* 2000; 62: 326-36.
7. Cubeddu LX, Hoffmann IS, Fuenmayor NT, & Malave JJ. Changes in serotonin metabolism in cancer patients: its relationship to nausea and vomiting induced by chemotherapeutic drugs *Br J Cancer* (1992), 66, 198-203.
8. De Clerck F. The role of serotonin in thrombogenesis. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8:40-9.
9. Ernberg M, Voog U, Alstergren P, Lundeberg T, Kopp S. Plasma and serum serotonin levels and their relationship to orofacial pain and anxiety in fibromyalgia. *J Orofac Pain*. 2000;14:37-46.
10. Frazer A, Hensler JG. Serotonin. U: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. ured. *Basic Neurochemistry*, 5th ed. New York: Raven Press 1994; 283-308)
11. Fuller RW. Biochemical pharmacology of the serotonin system. *Adv Neurol* 1986; 43: 469-80.
12. Getaldić Švarc B. Povezanost svojstava trombocita i koncentracije trombocitnog serotonina. Doktorski rad. Zagreb: FBF, 2011.
13. 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.
14. Guicheney P. 1988. Human platelet serotonin content: methodological aspects and physiological variations. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 10, 253- 258.

15. Hardisty RM, Stacey RS. 1955. 5-Hydroxytryptamine in normal human platelets. *Journal of Physiology* 130, 711 - 720.
16. Jernej B, Banović M, Čičin-Šain L, Hranilović D, Balija M, Orešković D, Folnegović-Šmalc V. Physiological characteristic of platelet/circulatory serotonin: study on a large human population. *Psychiatry Research* 2000; 94: 153–162.
17. Krtanjek S. Određivanje referentnog intervala trombocitnog serotonina. Diplomski rad. Zagreb: FBF, 2012.
18. Labar B, Hauptmann E i sur. *Hematologija*, Zagreb: Školska knjiga, 2007.
19. Le Quan-Bui KH, Plaisant O, Leboyer M, Gay C, Kamal L, Devynck MA, Meyer P. 1984. Reduced platelet serotonin in depression. *Psychiat Res.* 13, I 29- 139.
20. Liu Q, Yang Q, Sun W, Vogel P. et al. 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.
21. 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; 635-44.
22. Maurer-Spurej E, Pittendreigh C, Solomons K. The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin. *Thromb Haemost* 2004; 91: 119–28.
23. Nakatani Y, Sato-Suzuki I, Tsujino N, Nakasato A, Seki Y, Fumoto M, Arita H. Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain-barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur J Neurosci* 2008; 27: 2466–72.
24. Neubauer, Katarzyna, Krzystek-Korpacka, Malgorzata, Paradowski, Leszek. Plasma serotonin level in left-sided colonic diverticulosis: A pilot study. *Cent Eur J Med.* 2012, 7: 591-595.
25. Pletcher A. Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Brit J Pharmacol Chemother* 1968; 32: 1-16.
26. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 31(10): 133–41.
27. 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
28. Sanner JE, Frazier L, Udtha M. Effects of delayed laboratory processing on platelet serotonin levels. *Biol Res Nurs.* 2013; 15:13-6.

29. 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).
30. Thomas L. Serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid. U: Thomas L. Clinical laboratory diagnostics, use and assessment of clinical laboratory results. 1. izd., Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 1998.
31. Zeller J, Weissbarth E, Baruth B, Mielke H, Deicher H. 1983. Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Correlation with clinical activity. Arthritis Rheum. 26, 532- 540.
32. Uputstvo za upotrebu, DRG® Serotonin ELISA (EIA-3947), REVISED 23 MAR. 2009 (VERS. 6.0).
33. Uputstvo za upotrebu, DRG® Serotonin FAST ELISA (EIA-5061), REVISED NOV. 2011 (VERS. 3.0).
34. <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Specimen/84373>, pristupljeno 22. travnja 2013.

9. Sažetak

Serotonin je monoaminski neurotransmitter koji se sintetizira iz aminokiseline L– triptofana. Najvećim dijelom sintetizira se u središnjem živčanom sustavu u rafe jezgrama iz kojih se projicira u sve dijelove mozga i kralježničke moždine. Periferno, najvažnije mjesto sinteze serotonina su enterokromafine stanice sluznice tankog crijeva. Uz serotonergične neurone i enterokromafine stanice, trombociti su stanice najbogatije serotoninom. Čak 99 % serotonina u cirkulaciji je pohranjeno u trombocitima. Serotonin sudjeluje u regulaciji brojnih fizioloških procesa, te se poremećaj serotoniniskog sustava povezuje se s pojavom različitih bolesti, posebno duševnih, te se zbog toga mjerenje koncentracije serotonina koristi u dijagnostici te praćenju terapije i tijeka bolesti. U dijagnostici karcinoidnih tumora čije stanice luče serotonin ili serotoniniske prekursore i metabolite mjeri se serotonin u plazmi, mokraći ili u krvi. Ujedno, bitna je i njegova uloga u procesu zgrušavanja krvi gdje se prilikom aktivacije trombocita otpušta iz gustih granula. Danas se za određivanje koncentracije serotonina najčešće koriste ELISA i HPLC, pri čemu je HPLC osjetljivija metoda, a ELISA primjenjivija u rutinskoj medicinskoj praksi. Prvi cilj rada bio je procijeniti stabilnost uzoraka u predanalitičkoj fazi, a drugi cilj je bio pokušati pronaći odnos, tj. matematički model, između koncentracija serotonina u serumu, plazmi i plazmi bogatoj trombocitima (PRP) u zdravoj populaciji, tako da bi se složena procedura s mjerenjem serotonina u PRP-u mogla zamijeniti mjerenjem serotonina samo u serumu i plazmi.

Ispitivana skupina sastojala se od 20 zdravih dobrovoljaca, od 11 muškaraca i 9 žena kojima je u KBC Sestre milosrdnice oduzeto 21 ml krvi, po šest epruveta krvi s EDTA i jedna epruveta bez antikoagulansa. U našem radu korištena je ELISA, koju smo prije određivanja koncentracije serotonina u plazmi modificirali za niže koncentracije.

Zaključno, ispitivanje predanalitičke stabilnosti uzoraka na sobnoj temperaturi pokazala je stabilnost uzoraka s EDTA antikoagulansom do 4 sata. Nismo uspjeli uspostaviti matematički model kojim bismo složeni postupak određivanja trombocitnog serotonina zamijenili s mjerenjem serumskog i plazmatskog serotonina. Utvrđena je povezanost serumske i plazmatske koncentracije serotonina s trombocritom u PRP što je poticaj za buduća istraživanja. Klinički bi mogao biti primjenjiviji relativni omjer plazmatskog i serumskog serotonina nego li rezultati izdvojenih mjerenja u serumu i plazmi.

Ključne riječi: trombocitni serotonin, plazma bogata trombocitima (PRP), plazma siromašna trombocitima (PPP), predanalitička stabilnost

10. Summary

Serotonin is a monoamine neurotransmitter that is synthesized from the amino acid L-tryptophan. Mainly synthesized in the central nervous system in the raphe nuclei of which is projected in all parts of the brain and spinal cord. Peripherally, the most important synthesis of serotonin are enterochromaffin cells which are part of the small intestine. With serotonergic neurons and enterochromaffin cells, platelets are the cells richest serotonin. Even 99% of circulating serotonin is stored in platelets. Serotonin is involved in the regulation of many physiological processes, and disruption of serotonergic system is associated with the occurrence of various diseases, especially mental, and therefore measure the concentration of serotonin used in the diagnosis and monitoring of treatment and clinical course. The diagnosis of carcinoid tumors whose cells secrete serotonin or serotonin precursors and serotonin metabolites measured in plasma, urine or blood. At the same time, is critical to its role in the process of blood clotting where during platelet activation released from dense granules. Today, the determination of serotonin commonly used ELISA and HPLC, while HPLC is more sensitive method, but ELISA is more usefull in routine medical practice. The first aim of this study was to evaluate the stability of samples in preanalytical stage, and the second aim was to try to find a relationship, that is a mathematical model, between the concentration of serotonin in serum, plasma and platelet rich plasma (PRP) in the healthy population, so that the complex procedure the measurement of serotonin in PRP could be replaced only by measuring serotonin in serum and plasma.

The study group consisted of 20 healthy volunteers, 11 men and 9 women who were seized 21 ml of blood in the KBC Sestre milosrdnice, six tubes of blood with EDTA and one tube without anticoagulant. In our work we used ELISA to determine the concentration of serotonin in plasma, modified to lower concentrations.

Finally, examination of preanalytical stability samples at room temperature showed the stability of samples with EDTA anticoagulant to 4 hours. We were unable to establish a mathematical model which could compound the determination of platelet serotonin replaced with the measurement of serum and plasma serotonin. We found the relationship between serum and plasma concentrations of serotonin and thrombocrit in PRP as an interesting for future research. Clinical could be achievable relative ratio plasma and serum serotonin than isolated results of measurements in serum and plasma.

Keywords: platelet serotonin, platelet rich plasma (PRP), platelet poor plasma (PPP), preanalytical stability

11. Životopis

Kristina Dukić - rođena sam 14. ožujka 1991. godine u Zadru. Završila sam Osnovnu školu Benkovac 2005. godine. Srednju školu kneza Branimira Benkovac, smjer opća gimnazija sam završila 2009. godine te iste godine upisala Farmaceutsko–biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Sudjelovala sam na simpoziju FARMEBS 2012. godine u Zagrebu.

Ivona Herceg – rođena sam 7. srpnja 1990. godine u Mostaru. Završila sam Osnovnu školu Vladimir Nator u Križevcima 2005. godine. Opću gimnaziju Ivana Zakmardija Dijankovečkoga u Križevcima završila sam 2009. godine te iste godine upisala Farmaceutsko–biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Sudjelovala sam na Twin projektima 2012. godine (tema projekta: Antimikrobna rezistencija) i 2013. godine (tema projekta: Dijagnostika malignih oboljenja) u Beogradu, te na simpoziju FARMEBS 2012. godine u Zagrebu.