

# Serotoninski sustav u trombocitima zdravih ljudi

---

**Balija, Melita**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2003**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:603808>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine  
Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**Medicinski fakultet**

**Melita Balijsa**

**SEROTONINSKI SUSTAV U  
TROMBOCITIMA ZDRAVIH LJUDI**

**Doktorska disertacija**

**Zagreb, travnja 2003.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković, pod stručnim voditeljstvom dr.sc. Branimira Jerneja, znanstvenog savjetnika IRB.

## Zahvala

Zahvaljujem svom mentoru dr.sc. Branimiru Jerneju koji mi je strpljivo posvetio svoj trud i vrijeme kako bi mi pomogao vrijednim činjenicama i mišljenjima te brojnim stručnim savjetima i korisnim raspravama usmjeravao tijekom pisanja rada.

Ravnateljici Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu i dragom krugu kolegica, kolega i suradnika u HZTM izražavam zahvalnost radi podstreka i razumijevanja pri završnici izrade disertacije.

Djelatnicima Instituta Ruđer Bošković dr.sc. Lipi Čičin-Šain, višem znanstvenom suradniku IRB, Tatjani Bordukalo-Nikšić, dipl. ing., Vedrani Filić, dipl.ing., Katarini Karlo, ing.lab.med. i Vladimiru Vraneši, ing.lab.med. iskreno zahvaljujem na susretljivosti i dragocjenoj pomoći u laboratorijskim ispitivanjima i obradi rezultata.

Zahvaljujem na suradnji djelatnicima Odjela za promidžbu i uzimanje krvi i Odjela za osiguranje i kontrolu kvalitete u HZTM.

Dobrovoljnim davateljima krvi zahvaljujem na pristanku za sudjelovanje u provedenim ispitivanjima.

Svojoj obitelji dugujem zahvalnost za ljubav, vjeru i podršku.

## POPIS OZNAKA I KRATICA

5HT	5-hidroksitriptamin; serotonin
5HTt	5HT prijenosnik
<sup>14</sup> C-5HT	radioaktivnim ugljikom obilježen 5HT
5HTP	5-hidroksitriptofan
5HIAA	5-hidroksiindoloctena kiselina
A	afinitet (1/Km)
ACD	antikoagulantna otopina
Aquasol	scintilacijska tekućina
CNS	središnji živčani sustav
CV	koeficijent varijabilnosti
df	stupanj slobode (engl: <i>degrees of freedom</i> )
dpm	raspadi u minutu (engl: <i>desintegration per minute</i> )
E	učinkovitost, efikasnost (Vmax/Km)
HPLC	tekućinska kromatografija
Km	Michaelisova konstanta
M	srednja vrijednost
MAO	monoaminoksidaza
N	broj ispitanika
nM	nanomol
μM	mikromol
OPT	o-ftaldialdehid
p	razina statističke značajnosti
PRP	plazma bogata trombocitima (engl: <i>Platelet Reach Plasma</i> )
r	koeficijent korelacije
s	supstrat
SD	standardna devijacija
SEM	standardna pogreška srednje vrijednosti
SPF	spektrofotofluorimetrija
TCA	trikloroctena kiselina
trc	trombocit
v	brzina
Vmax	maksimalna brzina

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>1.1. NAČELNA FIZIOLOGIJA SEROTONINA U ORGANIZMU SISAVACA</b>	<b>1</b>
<b>1.2. SEROTONINSKI SUSTAV U TROMBOCITIMA</b>	<b>2</b>
<i>1.2.1. Elementi trombocitnog serotoninskog sustava</i>	2
<i>1.2.2. Serotonin i funkcionalni trombocitni odgovor</i>	4
<b>1.3. TROMBOCITNI MODEL U NEUROBIOLOGIJI</b>	<b>4</b>
<b>1.4. TROMBOCITNI SEROTONINSKI RECEPTOR</b>	<b>5</b>
<b>1.5. SEROTONIN U TROMBOCITNIM GRANULAMA</b>	<b>6</b>
<i>1.5.1. Koncentracija (razina) cirkulatornog serotonina</i>	6
<i>1.5.2. Pohrana serotonina u trombocite</i>	6
<i>1.5.3. Otpuštanje serotonina iz trombocita</i>	7
<i>1.5.4. Fiziološka uloga trombocitnog serotonina</i>	7
<i>1.5.5. Klinički značaj trombocitnog serotonina</i>	8
<b>1.6. TROMBOCITNI SEROTONINSKI PRIJENOSNIK</b>	<b>9</b>
<i>1.6.1. Distribucija serotoninskog prijenosnika u tkivima</i>	9
<i>1.6.2. Struktura i način djelovanja serotoninskog prijenosnika</i>	9
<i>1.6.3. Genska kodiranost serotoninskog prijenosnika</i>	10
<i>1.6.4. Regulacija ekspresije gena za serotoninski prijenosnik</i>	10
<i>1.6.5. Mjerenje kinetike trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	11
<i>1.6.6. Fiziološka uloga i klinički značaj serotoninskog prijenosnika</i>	11
<b>1.7. TROMBOCITNA MONOAMINOKSIDAZA (MAO-B)</b>	<b>12</b>
<i>1.7.1. Struktura i klasifikacija MAO</i>	13
<i>1.7.2. Distribucija MAO u organizmu sisavaca</i>	14
<i>1.7.3. Genska kodiranost i regulacija ekspresije gena za MAO</i>	15
<i>1.7.4. Kinetička svojstva trombocitne MAO-B</i>	15
<i>1.7.5. Čimbenici koji utječu na aktivnost humane trombocitne MAO-B</i>	16
<i>1.7.6. Fiziološka uloga MAO</i>	17
<i>1.7.7. Klinički značaj određivanja kinetike trombocitne MAO-B</i>	18
<b>2. CILJ I SVRHA RADA</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	<b>21</b>
<b>3.1. ISPITANICI</b>	<b>21</b>
<b>3.2. REAGENCIJE I OTOPINE</b>	<b>21</b>
<b>3.3. OPREMA I PRIBOR ZA RAD</b>	<b>22</b>

<b>3.4. UZORCI KRVI</b>	<b>22</b>
3.4.1. <i>Uzimanje uzoraka</i>	22
3.4.2. <i>Priprava uzoraka za ispitivanje</i>	23
3.4.2.1. <i>Postupak izdvajanja plazme bogate trombocitima (PRP) iz pune krvi</i>	23
<b>3.5. ODREĐIVANJE BROJA I VOLUMENA TROMBOCITA</b>	<b>23</b>
<b>3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE (RAZINE) SEROTONINA U TROMBOCITIMA</b>	<b>24</b>
3.6.1. <i>Metodološki princip</i>	24
3.6.2. <i>Priprava trombocitnog taloga</i>	24
3.6.3. <i>Priprava otopina</i>	24
3.6.4. <i>Postupak</i>	25
3.6.5. <i>Mjerenje</i>	26
<b>3.7. MJERENJE KINETIČKIH PARAMETARA AKTIVNOG UNOSA SEROTONINA U TROMBOCITE</b>	<b>26</b>
3.7.1. <i>Metodološki princip</i>	26
3.7.2. <i>Prethodna priprema za rad</i>	27
3.7.3. <i>Neposredna priprema za rad</i>	27
3.7.4. <i>Priprava otopina</i>	28
3.7.5. <i>Postupak</i>	29
3.7.6. <i>Mjerenje</i>	30
<b>3.8. ODREĐIVANJE KINETIČKIH PARAMETARA TROMBOCITNE MAO-B</b>	<b>31</b>
3.8.1. <i>Metodološki princip</i>	31
3.8.2. <i>Priprava otopina</i>	31
3.8.3. <i>Postupak</i>	32
3.8.4. <i>Mjerenje</i>	33
<b>3.9. METODOLOGIJA MJERENJA KINETIKE TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA</b>	<b>35</b>
<b>3.10. METODOLOGIJA MJERENJA KINETIKE TROMBOCITNE MAO-B</b>	<b>37</b>
<b>3.11. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA</b>	<b>39</b>
<b>4. REZULTATI</b>	
<hr/>	
<b>4.1. BROJ I VOLUMEN TROMBOCITA</b>	<b>40</b>
4.1.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti broja i volumena trombocita</i>	40
4.1.2. <i>Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti broja i volumena trombocita</i>	41
4.1.3. <i>Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti broja i volumena trombocita</i>	43
4.1.4. <i>Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti broja i volumena trombocita</i>	45
<b>4.2. KONCENTRACIJA (RAZINA) TROMBOCITNOG SEROTONINA</b>	<b>47</b>
4.2.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije 5HT u trombocitima i u krvi</i>	47
4.2.2. <i>Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije 5HT</i>	49

4.2.3. <i>Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije 5HT</i>	51
4.2.4. <i>Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije 5HT</i>	53
<b>4.3. TROMBOCITNI SEROTONINSKI PRIJENOSNIK</b>	<b>55</b>
4.3.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	55
4.3.2. <i>Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	58
4.3.3. <i>Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	61
4.3.4. <i>Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	64
<b>4.4. TROMBOCITNA MONOAMINOKSIDAZA (MAO-B)</b>	<b>67</b>
4.4.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitne MAO-B</i>	67
4.4.2. <i>Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitne MAO-B</i>	70
4.4.3. <i>Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitne MAO-B</i>	73
4.4.4. <i>Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitne MAO-B</i>	76
<b>4.5. KORELACIJE ISTRAŽIVANIH KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNOG 5HT</b>	<b>79</b>
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>80</b>
<b>5.1. METODOLOŠKI ASPEKT</b>	<b>82</b>
5.1.1. <i>Mjerenje koncentracije trombocitnog serotonina</i>	83
5.1.2. <i>Mjerenje kinetike trombocitnog 5HT prijenosnika</i>	85
5.1.3. <i>Mjerenje kinetike trombocitne monoaminoksidaze (MAO-B)</i>	87
<b>5.2. FIZIOLOŠKI ASPEKTI TROMBOCITNIH 5HT ELEMENATA</b>	<b>89</b>
<b>5.2.1. FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KONCENTRACIJE (RAZINE) TROMBOCITNOG SEROTONINA</b>	<b>89</b>
5.2.1.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije (razine) trombocitnog/cirkulatornog serotonina</i>	89
5.2.1.2. <i>Utjecaj životne dobi na koncentraciju (razinu) trombocitnog serotonina</i>	90
5.2.1.3. <i>Utjecaj spola na koncentraciju (razinu) trombocitnog serotonina</i>	91
5.2.1.4. <i>Cirkummanualne varijacije koncentracije (razine) trombocitnog serotonina</i>	91
<b>5.2.2. FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KINETIKE TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA (5HTt)</b>	<b>93</b>
5.2.2.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	93
5.2.2.2. <i>Utjecaj životne dobi na vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	94
5.2.2.3. <i>Utjecaj spola na vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika</i>	95

5.2.2.4. <i>Cirkummanualne varijacije kinetskih parametara trombocitnog serotoniniskog prijenosnika</i>	95
<b>5.2.3. FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KINETIKE TROMBOCITNE MONOAMINOKSIDAZE (MAO-B)</b>	97
5.2.3.1. <i>Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti kinetike trombocitne MAO-B</i>	97
5.2.3.2. <i>Utjecaj životne dobi na kinetske parametre trombocitne MAO-B</i>	98
5.2.3.3. <i>Utjecaj spola na kinetske parametre trombocitne MAO-B</i>	99
5.2.3.4. <i>Cirkummanualne varijacije kinetskih parametara trombocitne MAO-B</i>	99
<b>5.3. ZBIRNI PRIKAZI VRIJEDNOSTI SVIH MJERENIH PARAMETARA</b>	100
<b>5.4. MEĐUSOBNA POVEZANOST MJERENIH TROMBOCITNIH 5HT PARAMETARA</b>	101
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	103
<hr/>	
<b>7. SAŽETAK</b>	104
<hr/>	
<b>8. SUMMARY</b>	106
<hr/>	
<b>9. LITERATURA</b>	108
<hr/>	
<b>10. ŽIVOTOPIS</b>	118
<hr/>	



## **1. UVOD**

## 1.1. NAČELNA FIZIOLOGIJA SEROTONINA U ORGANIZMU SISAVACA

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT), biogeni amin koji nastaje sintezom iz esencijalne aminokiseline triptofana, široko je rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu.

Serotoninsku homeostazu u organizmu sisavaca možemo načelno razmatrati kroz dva metabolički odvojena odjeljka – centralni, koji obuhvaća središnji živčani sustav i periferni koji se odnosi na druga tkiva. Ovi odjeljci su odvojeni, za serotonin nepropusnom, krvnomoždanom barijerom koja propušta 5HT prekursor triptofan i metabolit 5-hidroksiindolactenu kiselinu<sup>6,55,56,124</sup>. Serotonin je uključen u niz fizioloških funkcija na periferiji, a u mozgu ima ulogu neurotransmitera / neuromodulatora.

U središnjem živčanom sustavu, serotoniniski neuroni okupljeni su u jezgrama rafe smještenim u moždanom deblu i daju projekcije u praktički sve dijelove mozga i kralježnične moždine. U serotonergičnim neuronima serotonin se sintetizira iz esencijalne aminokiseline triptofana koji se nakon hidroksilacije dekarboksilira u amin (serotonin). Glavni metabolički put je oksidacija na 5-hidroksiindolactenu kiselinu. Ključni sintetski enzim je triptofan hidroksilaza, a ključni razgradni enzim monoaminoksidaza (MAO) izoenzim A<sup>50,55,56</sup>.

Glavni izvor perifernog serotonina su enterokromafine stanice gastrointestinalne sluznice koje otpuštaju dio svog sadržaja serotonina u krvotok.<sup>175</sup> Slobodni amin iz krvne plazme djelomično unose u sebe trombociti, a glavno metaboličko mjesto predstavljaju pluća, odnosno plućna mikrovaskulatura<sup>56,124</sup>.

Serotonin posreduje čitav niz centralnih i perifernih funkcija što čini njegovu fiziologiju vrlo kompleksnom. Među ostalim, smatra se da je uključen u modulaciju ponašanja i homeostatskih procesa u organizmu: regulaciji raspoloženja, kognitivnih i motoričkih funkcija te cirkadijanih i neuroendokrinih ritmova poput regulacije disanja, spavanja, kardiovaskularne funkcije,

metabolizma, temperature, hranjenja, spolne aktivnosti i drugo<sup>54,65,68,95,110,152,171</sup>.

Poremećaj serotonergičnih mehanizama veže se uz etiopatogenezu različitih duševnih i somatskih bolesti kao npr. depresije, autizma, anksioznih poremećaja, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, psihoza, poremećaja uzimanja hrane, ovisnosti, poremećaja hemostaze, migrene, povraćanja i drugo<sup>4,17,37,95,110,111,152,171</sup>.

## **1.2. SEROTONINSKI SUSTAV U TROMBOCITIMA**

Uz 5HT neurone i enterokromafine stanice trombociti pripadaju u stanice najbogatije serotoninom.

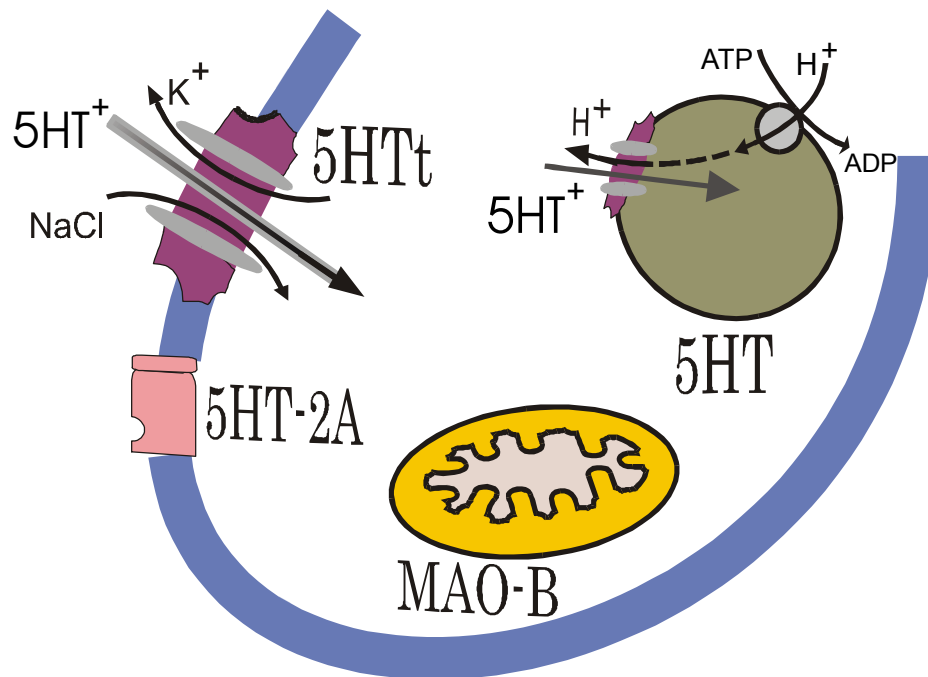
Iako se trombociti anatomski, funkcionalno i ontogenetski bitno razlikuju od živčanih stanica, elementi trombocitnog serotoninskog sustava su gotovo identični onima u serotonergičnim neuronima. Za razliku od živčane stanice, trombociti ne provode električne impulse, nemaju jezgru, ne sintetiziraju amine (pa tako ni serotonin) i imaju kraći životni vijek<sup>94</sup>. Serotoninski sustav u trombocitima sudjeluje u trombocitnom odgovoru, tj. promjeni oblika i agregaciji trombocita<sup>22,42,43,61,62,173</sup>.

### **1.2.1. Elementi trombocitnog serotoninskog sustava**

Trombociti sadrže serotonin u visokim koncentracijama u trombocitnoj citoplazmi, odnosno u subcelularnim organelama tzv. gustim zrcima ili delta granulama koje su nepropusne za elektronsko-mikroskopski snop pa otuda i naziv (engl: *dense bodies*). Trombocitni 5HT potječe iz krvne plazme. Trombocit ne posjeduje ključni enzim za sintezu 5HT - triptofan hidroksilazu te se serotonin unosi u unutrašnjost trombocita pomoću prijenosnog proteina<sup>56</sup>.

Od serotoninskih elemenata u trombocitu susrećemo: serotoninski transmembranski prijenosnik, serotoninski receptor, monoaminoksidazu (MAO-B) i serotonin pohranjen u gustim zrcima.

*Shema: prikaz trombocitnih serotoninskih elemenata*



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

Kao što je ranije spomenuto, za razliku od enterokromafinih stanica i serotonergičkih neurona, trombociti ne posjeduju enzimski aparat za sintezu serotonina već amin nakupljaju aktivnim unosom iz okolne krvne plazme. Proces nakupljanja serotonina u trombocite posreduju dva prijenosnika. Na membrani trombocita nalazi se proteinski 5HT prijenosnik, transportni protein koji posreduje unos serotonina iz krvne plazme u unutrašnjost trombocita <sup>94,132,133,162</sup>. Na membrani gustih granula nalazi se vezikularni prijenosnik koji posreduje unos serotonina iz trombocitne citoplazme u guste (delta) granule <sup>41,132,162,172</sup>.

Na membrani trombocita nalazi se serotoninski receptor 5HT-2A koji nakon vezanja 5HT aktivira trombocitni odgovor (promjenu oblika trombocita na indukciju serotoninom), odnosno reakciju otpuštanja i serotoninom izazvanu

ili/i pojačanu agregaciju trombocita. Vezno mjesto za serotonin na 5HT<sub>1</sub> je vezno mjesto na koje se vežu antidepresivi – inhibitori aktivnog unosa serotonina<sup>37,41</sup>.

Za vanjsku membranu trombocitnih mitohondrija vezan je enzim monoaminoksidaza (MAO) i to izoenzim B koji metabolizira monoamine pa tako i oksidativno deaminira 5HT<sup>46,172</sup>.

### **1.2.2. Serotonin i funkcionalni trombocitni odgovor**

Uz izravni učinak serotonina na trombocitni odgovor (5HT spada u kategoriju slabih trombocitnih agonista), pokazano je da taj autokaid (autogeni farmak) posjeduje sposobnost snažne amplifikacije trombocitnog odgovora u prisutnosti drugih agonista<sup>42,173</sup>.

Oba učinka serotonina - izravna aktivacija trombocita (promjena oblika, ograničena agregacija) i amplifikacija trombocitnog odgovora posredovana su 5HT-2A receptorima na trombocitnoj površini i mogu se specifično inhibirati blokadom tog receptora ketanserinom<sup>41,81</sup>. U prilog značaju trombocitnog serotonina govori i nalaz povezanosti koncentracije serotonina u trombocitima štakora i jačine njihove agregacije<sup>14</sup>.

## **1.3. TROMBOCITNI MODEL U NEUROBIOLOGIJI**

Istraživanja elemenata trombocitnog serotoninuskog sustava uključena su u različite medicinske discipline kao što su hematologija/transfuziologija<sup>38</sup>, gastroenterologija<sup>53</sup>, imunologija<sup>111</sup>. Međutim, daleko najveći dio istraživanja elemenata trombocitnog serotoninuskog sustava susreće se u području neuroznanosti<sup>25,82</sup>.

Sličnost između nekih serotoninuskih elemenata na trombocitu i u mozgu prvi puta je uočena krajem šezdesetih godina prošlog stoljeća<sup>131</sup>.

Laka dostupnost trombocitnih 5HT elemenata i njihovo korištenje u smislu perifernog modela za analogne sinaptičke strukture, popularizirala je trombocitna istraživanja u neurobiologiji kao bazičnoj, te u kliničkim neuroznanstvenim disciplinama - neurologiji i biološkoj psihijatriji u istraživanju funkcionalnosti serotoninergičnih elemenata – koncentracije trombocitnog serotonina, aktivnosti 5HT prijenosnika, MAO-B i 5HT-2A receptora<sup>121,185</sup>.

Otkrića strukturne identičnosti između trombocitne i neuronalne monoaminoksidaze MAO-B,<sup>31</sup> serotoninskog prijenosnika<sup>94</sup> i 5HT-2A receptora<sup>37</sup> dodatno su pridonijela značaju trombocitnog serotoninskog sustava.

U prilog vrijednosti trombocitnog modela na eksperimentalnoj razini govori i nalaz funkcionalnih promjena u moždanom 5HT prijenosniku štakora kod kojih su genetskom selekcijom bile izazvane analogne promjene na prijenosniku na trombocitnoj membrani<sup>144</sup>. Isto tako, strukturna identičnost molekula 5HT prijenosnika, 5HT-2A receptora i monoaminoksidaze B u neuronima i trombocitima, te njihova kodiranost istim genima<sup>37,94</sup> govori u prilog trombocitnom modelu, no odsutnost jezgre u trombocitu, kao i mogućnost različite regulacije transkripcije gena u mozgu i perifernim tkivima ograničava njegovu valjanost<sup>8</sup>.

U području neurofarmakologije trombocitni model koristi se u eksperimentalnim i u kliničkim farmakološkim studijama psihotropnih lijekova: inhibitora serotoninskog prijenosa, inhibitora granularne pohrane serotonina, inhibitora enzima MAO-B, te antagonista 5HT-2A receptora.<sup>40,97,105,116,126,144</sup>

#### **1.4. TROMBOCITNI SEROTONINSKI RECEPTOR**

Do sada je utvrđeno 14 različitih 5HT receptora na neuronima, svaki sa specifičnim farmakološkim, funkcionalnim i anatomskim profilom. Od tih receptora, na površini trombocita nalazi se samo serotoninski receptor 5HT-2A, koji je uključen u trombocitni odgovor pri poticaju trombocitne reakcije plazmatskim serotoninom kao agonistom.<sup>35,3741,70</sup>

U središnjem živčanom sustavu, 5HT-2 receptor nalazi se na postsinaptičkoj membrani i većinom je udružen sa finim serotonergičnim vlaknima u središnjim dijelovima korteksa i mezolimbicnim područjima. Kliničkim ispitivanjima uočena je povezanost disfunkcije 5HT-2 receptora s migrenom, anksioznim stanjima, paničnim poremećajima i shizofrenijom.<sup>16,69,116</sup>

## 1.5. SEROTONIN U TROMBOCITNIM GRANULAMA

Trombocitne granule (*engl: dense bodies*) su stanične organele koje sadrže serotonin u visokim koncentracijama u kompleksu s adeninskim nukleotidima (ATP, ADP) i dvovaljanim kationima ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ). Za elektronski snop mikroskopa one su praktički neprozirne, pa otuda engleski naziv “*dense bodies*”. Obzirom da trombociti ne posjeduju aktivnosti triptofan-hidroksilaze, biosinteza tog amina u trombocitima ne postoji, odnosno, ukupni sadržaj serotonina potječe iz trombocitne okoline (krvne plazme). Za transmembranski transport amina zadužen je proteinski serotoninški prijenosnik (5HTt). Prijenos serotonina iz trombocitne citoplazme u delta granule posreduje vodikova ATP-aza. Serotonin ulazi u granule u zamjenu za vodikove ione koje  $H^+$  ATP-aza ubacuje iz okolne citoplazme.<sup>148</sup>

### 1.5.1 Koncentracija (razina) cirkulatornog serotonina

Koncentracija (razina) serotonina u krvi odraz je sadržaja serotonina u trombocitima u kojima je pohranjeno preko 99% ukupnog serotonina u cirkulaciji<sup>107,124</sup>. U usporedbi s trombocitima, druge krvne stanice i krvna plazma sadrže zanemarive količine serotonina<sup>6</sup>. Koncentracija (razina) serotonina u trombocitima zavisi o više čimbenika: o koncentraciji slobodnog serotonina u krvnoj plazmi, o aktivnosti 5HT prijenosnika na trombocitnoj membrani, o mehanizmu pohrane serotonina u guste granule i o individualnoj različitosti otpuštanja serotonina iz trombocita u plazmu<sup>6,51,65,68</sup>.

Koncentracija (razina) serotonina u krvi predstavlja intra individualno stabilni parametar<sup>81,85,92,184</sup> koji se nalazi pod genetskim nadzorom<sup>71,80,81,94,95,97</sup>. Visoka vrijednost koncentracije serotonina u trombocitima ne mora istovremeno značiti i obavezno visoku razinu u krvi (slučaj u trombocitopenijama). Rezultati ispitivanja na velikom broju ispitanika potvrđuju da u fiziološkim uvjetima visoka koncentracija trombocitnog serotonina u izravnom je odnosu s visokom koncentracijom toga amina u krvi<sup>51,65,68,107</sup>.

### 1.5.2 Pohrana serotonina u trombocite

Trombocitni serotonin pohranjuje se u specifičnim subcelularnim organelama - gustim granulama, analogno vezikularnom 5HT u neuronima, gdje je zaštićen

od enzimatske aktivnosti MAO-B. Mehanizam unosa serotonina u guste granule trombocita identičan je mehanizmu unosa serotonina u neuronske vezikule<sup>31,50,55</sup>.

Proces nakupljanja serotonina u trombocit posreduju dva prijenosnika: membranski – na citoplazmatskoj membrani trombocita i vezikularni – na membrani gustih granula. Nakon aktivnog unosa u trombocitnu citoplazmu, serotonin može biti podvrgnut ili enzimatskoj razgradnji posredovanoj enzimom MAO-B ili unesen u unutrašnjost granula putem transportera na membrani gustih granula, posredstvom visoko učinkovite protonske ATP-aze<sup>39,51,147</sup>.

### **1.5.3. Otpuštanje serotonina iz trombocita**

Trombociti, osim sposobnosti pohrane serotonina, imaju i sposobnost njegova otpuštanja. Reakcija otpuštanja predstavlja brz proces ovisan o energiji, kojim se, putem egzocitoze ispražnjava sadržaj trombocitnih granula. Serotonin spremljen u gustim granulama otpušta se egzocitozom za vrijeme aktivacije trombocita tijekom procesa zgrušavanja, što je slično kao i otpuštanje serotonina iz sinaptičkih vezikula egzocitozom tijekom kemijske transmisije.<sup>22,94</sup> Stimulacija trombocita trombinom, kolagenom, ADP-om ili adrenalinom mobilizira unutarstanični  $Ca^{2+}$ , što dovodi do fuzije granularne i plazmatske membrane i otpuštanja pohranjenog serotonina<sup>114,132,180</sup>.

### **1.5.4. Fiziološka uloga trombocitnog serotonina**

Fiziološka uloga visokih koncentracija (razina) serotonina u trombocitima zdravih osoba još uvijek nije potpuno razjašnjena. Klasični koncept trombocita kao «čistača» plazmatskog serotonina doveden je u sumnju nalazima o individualnoj stabilnosti koncentracije serotonina u trombocitima<sup>23,68, 85,95</sup> i genetskim nadzorom nad tim parametrom.<sup>31,37,71,94,95</sup>

Istraživanje glavnih fizioloških karakteristika trombocitnog/cirkulatornog serotonina vezano je uz ispitivanje distribucije frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije trombocitnog/cirkulatornog serotonina, utjecaja spola, zavisnosti o starosnoj dobi, individualnoj stabilnosti kroz duže vremensko razdoblje i periodičkim oscilacijama koncentracije trombocitnog/cirkulatornog serotonina<sup>51,54,65,67,68,85,87,137,153,184</sup>. Prema literaturnim podacima, istraživanja fizioloških karakteristika trombocitnog / cirkulatornog serotonina u zdravoj



populaciji ukazuju na normalnu distribuciju vrijednosti koncentracije serotonina, tendenciju pada koncentracije s povećanjem dobi, najčešće izostanak utjecaja spola i izostanak utjecaja godišnjeg doba na razinu trombocitnog serotonina.<sup>51,54,65,68,107,137</sup> Potvrda intraindividualne stabilnosti koncentracije trombocitnog serotonina tijekom duljeg vremena ukazuje na dinamički ekvilibrij između trombocitnog i plazmatskog serotonina, izravno kontroliran mehanizmom aktivnog unosa serotonina u trombocite<sup>68,81,87,92</sup>.

### **1.5.5. Klinički značaj trombocitnog serotonina**

Koncentracija trombocitnog serotonina u krvi dobar je pokazatelj homeostaze perifernog odjeljka ovog amina u organizmu. U području neurobiologije ispitivana je koncentracija serotonina u trombocitima ili krvi iz nekoliko aspekata: socijalnog statusa<sup>106,188</sup>, u području psihopatologije (povišena koncentracija serotonina u autizmu i u shizofrenih bolesnika)<sup>2,33,185</sup>. Koncentracija trombocitnog serotonina ispitivana je i u drugim granama medicine: hematologiji,<sup>38</sup> gastroenterologiji,<sup>53</sup> ginekologiji,<sup>66</sup> imunologiji,<sup>91</sup> kardiologiji.<sup>182</sup>

U farmakološkim ispitivanjima serotonina potvrđen je jasan odgovor nakon primjene psihotropnih lijekova: serotoninskog prekursora (5HTP), inhibitora serotoninske sinteze, blokatora pohrane serotonina, blokatora povratnog unosa serotonina (triciklički antidepresivi, selektivni blokatori povratnog unosa), inhibitora razgradnje serotonina (inhibitori MAO), te agonista i antagonista 5HT receptora<sup>145</sup>. U bolesnika s depresijom uočen je smanjeni transport serotonina u trombocite, kao i smanjeno vezanje imipramina i paroksetina na 5HT prijenosnik i u neuronima i na trombocitima<sup>109,118,163</sup> u žrtava samoubojstva<sup>164</sup> i u osoba s anksioznim poremećajem<sup>75</sup>. Smanjena koncentracija serotonina u trombocitima, te smanjena koncentracija metabolita serotonina u cerebrospinalnoj tekućini uočena je u alkoholičara<sup>18</sup>. U osoba zaraženih HIV-om nađen je za više od trećine snižen 5HT u trombocitima.<sup>91</sup>

## **1.6. TROMBOCITNI SEROTONINSKI PRIJENOSNIK**

Serotoninski prijenosnik (5HTt) smješten je osim na serotonergičnim neuronima još i na plazmatskim membranama nekih perifernih tkiva i stanica gdje vrši svoju fiziološku ulogu. Primarna struktura serotoninskog prijenosnika utvrđena je 1991.g.<sup>22</sup> i u svim stanicama je identična<sup>22,96,135</sup>.

### **1.6.1. Distribucija serotoninskog prijenosnika u tkivima**

5HTt nalazi se na membrani stanica placente<sup>12</sup>, limfocita<sup>52</sup>, kromafinih stanica nadbubrežne žlijezde<sup>155</sup>, endotelu plućnih kapilara<sup>93</sup>, u epitelnim stanicama mukoze crijeva<sup>175</sup>, dio je serotoninskog sustava parafolikularnih stanica štitnjače<sup>150</sup> i trombocitnog serotoninskog sustava<sup>146</sup>.

U mozgu, serotoninski prijenosnik zauzima središnje mjesto u procesu brze eliminacije neurotransmitera iz sinaptičke pukotine i stoga je izravno uključen u regulaciju serotonergične neurotransmisije.

Analogno, serotoninski prijenosnik na trombocitnoj membrani uklanja farmakološki aktivan serotonin iz krvne plazme unosom u trombocite.

### **1.6.2. Struktura i način djelovanja serotoninskog prijenosnika**

5HT prijenosnik najbolje je opisan u čovjeka i u štakora. U obje vrste 5HTt integralni je membranski protein sastavljen od 630 aminokiselina. N i C krajevi polipeptida nalaze se unutar stanice, a 12 hidrofobnih regija tvori transmembranska područja (domene). Od 12 transmembranskih domena, domenu 3 i 4 povezuje velika izvanstanična petlja koja ima po 2 mjesta za glikozilaciju<sup>94</sup>. Drži se da je 12. domena uključena u vezivanje supstrata: 5HT i antagonista te antidepresiva<sup>16</sup>. Humani 5HTt sadrži 3 mjesta za fosforilaciju protein kinazom C i protein kinazom ovisnom o cikličkom adenozin monofosfatu (cAMP). Iako kodirani istim genom, humani 5HTt neurona i perifernih tkiva razlikuju se po stupnju glikoziliranosti molekula proteina<sup>135</sup>. Sekvence transporterata istražene su u ljudima, štakorima, miševima i drozofilima<sup>22,44,64,135</sup>. Mjesta za fosforilaciju protein kinazama ljudskog i štakorskog 5HT prijenosnika su različita. 5HTt u štakora posjeduje četiri mjesta za fosforilaciju protein kinazom C.<sup>96</sup>

Serotoninski prijenosnik pripada prijenosnom proteinu obitelji  $\text{Na}^+$  simportera (suprijenosnika) jer istodobno prenosi još jednu vrstu molekula u istom smjeru. Pokretačku snagu za unos 5HT u stanicu čini kotransport  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u smjeru njihova elektrokemijskog gradijenta, te istovremeni antiport  $\text{K}^+/\text{H}^+$  iz stanice, pri čemu elektrokemijski gradijent  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  održava  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATP-aza.<sup>148</sup> Na vezno mjesto 5HTt, okrenuto vanjskom miljeu, veže se  $\text{Na}^+$ , 5HT i  $\text{Cl}^-$ . Tada molekula 5HTt mijenja konformaciju, pa se vezno mjesto liganada okrene prema unutrašnjosti stanice. Ligandi se otpuštaju u citoplazmu, a za 5HTt se veže stanični  $\text{K}^+$  ili  $\text{H}^+$  (ako nedostaje  $\text{K}^+$ ) i ponovnom promjenom konformacije, otpuštaju se izvan stanice. Vanstanični  $\text{K}^+$  i  $\text{H}^+$  koče prienos 5HT u stanicu<sup>149</sup>.

### **1.6.3. Genska kodiranost serotoninskog prijenosnika**

Gen koji kodira serotoninski prijenosnik (5HTt) u 5HT neuronima i na plazmatskoj membrani perifernih tkiva nalazi se u čovjeka na kromozomu 17 u regiji 17q11.1-17q12.0., a u miša na 11 kromozomu, uz varijacije u slijedu nukleotida<sup>19,64,135</sup>.

### **1.6.4. Regulacija ekspresije gena za serotoninski prijenosnik**

Pretpostavlja se da se regulacija aktivnosti serotoninskog prijenosnika odvija u dvije vremenske razine: akutnoj i kroničnoj.

Akutnu regulaciju aktivnosti 5HTt predstavljaju post-translacijske modifikacije transportera. Pretpostavka je da promjena stupnja fosforiliranosti, posredovana protein kinazama i fosfatazama (prvenstveno protein-kinazom C i fosfatazom 2A) utječe na njegovu distribuciju u membrani i na kapacitet unosa serotonina<sup>103</sup>. Pretpostavlja se da ovisnost ekspresije prijenosnika na staničnoj membrani o izvanstaničnoj koncentraciji supstrata predstavlja vrlo osjetljivi homeostatski mehanizam u neuronu, koji istančano usklađuje kapacitet 5HT prijenosa s fluktuirajućim koncentracijama neurotransmitora<sup>136</sup>.

Dugotrajna regulacija aktivnosti temelji se na regulaciji transkripcije gena za 5HT prijenosnik, što za posljedicu ima smanjeni ili povećani broj molekula proteina na membrani<sup>96,138</sup>.

### **1.6.5. Mjerenje kinetike trombocitnog serotoninskog prijenosnika**

Aktivni unos serotonina u stanicu slijedi saturacijsku kinetiku (kinetiku zasićenja) i opisuje se parametrima (kinetskim konstantama  $K_m$  i  $V_{max}$ ) u skladu s Michaelis-Menten-ovim zakonom enzimske kinetike<sup>165</sup>. Kinetika prijenosa serotonina kroz trombocitnu membranu humanih i štakorskih trombocita kvalitativno je slična dok u kvantitativnom smislu postoje razlike<sup>84</sup>.

Prijenos 5HT u stanicu je elektroneutralan jer je zbroj negativno i pozitivno nabijenih iona koji se kreću preko membrane jednak nuli. To je aktivan proces protiv koncentracijskog gradijenta, koji između trombocita i plazme iznosi oko 1.000:1. Proces je saturabilan, ovisan o pH, temperaturi, ionskom sastavu medija ( $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $K^+$ )<sup>148</sup>.

Krivulja odnosa brzine reakcije ( $v$ ) i koncentracije supstrata ( $S$ ) ima oblik hiperbole i opisana je jednadžbom:

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{[S] + K_m}$$

$V_{max}$  = maksimalna brzina unosa 5HT u trombocit i odražava broj prijenosnika na membrani

$K_m$  = koncentracija (razina) 5HT kod koje je postignuta polovica maksimalne brzine

Afinitet prijenosnika za 5HT je  $A = \frac{1}{K_m}$ .

### **1.6.6. Fiziološka uloga i klinički značaj serotoninskog prijenosnika**

5HT<sub>t</sub> smješten u endotelu plućnih kapilara uklanja serotonin iz krvne plazme<sup>93</sup>, a u epitelnim stanicama mukoze crijeva posreduje peristaltički refleks<sup>175</sup>,

5HT<sub>t</sub> dio je serotoninskog sustava parafolikularnih stanica štitnjače za koji se pretpostavlja da regulira ekspresiju kalcitonina i njemu srodnog peptida<sup>150</sup>.

Serotoninski prijenosnik na trombocitnoj membrani uklanja farmakološki aktivan serotonin iz krvne plazme i sudjeluje u aktivaciji trombocita<sup>146</sup>.

Serotoninski prijenosnik u serotonergičnom neuronu zauzima središnju ulogu u procesu brze eliminacije neurotransmitera iz sinaptičke pukotine (prekid sinaptičkog 5HT prijenosa) i stoga je izravno uključen u regulaciju ukupne 5HT aktivnosti serotonergične sinapse (neurotransmisije). Poremećaji

serotonergične neurotransmisije smatraju se važnim čimbenikom u etiopatogenezi nekih psihijatrijskih bolesti. Poremećaji kinetike 5HT na trombocitnoj membrani opisani su u etiopatogenezi nekih psihijatrijskih bolesti kao što su: depresivni poremećaji, opsesivno-kompulzivni poremećaji, panična stanja i drugo<sup>109,110,152,171</sup>.

Unutar 5HTt makromolekularnog proteinskog kompleksa u serotonergičnom neuronu nalazi se vezno mjesto za antidepresive putem kojeg se inhibira aktivan unos 5HT. Nesrazmjerno snažna eliminacija serotonina iz sinaptičke pukotine posredovana sa 5HTt i posljedično nedostatni sinaptički 5HT prijenos kod depresivnih bolesnika pokušava se terapijski korigirati farmakološkom blokadom serotoninskog prijenosnika sa svrhom dužeg zadržavanja neurotransmitora u sinaptičkoj pukotini i poboljšanja neurotransmisije<sup>1,78</sup>. Antidepresivi inhibiraju aktivan unos 5HT uzrokujući alosteričke promjene na prijenosniku<sup>58,104</sup>.

## **1.7. TROMBOCITNA MONOAMINOKSIDAZA (MAO-B)**

Enzim monoaminoksidaza (EC1.4.3.4) integralni je protein vanjske mitohondrijske membrane. Detaljno su upoznate njegove biokemijske osobine<sup>29</sup>, molekularna struktura<sup>27,28,46</sup>, distribucija u tkivima<sup>29,47,48,67,123</sup> te je pretpostavljena njegova uloga u organizmu<sup>29,190,191</sup>. Osnovna uloga MAO u organizmu je regulacija koncentracije biogenih amina u stanicama različitih tkiva putem katalizacije oksidativne deaminacije tih amina. Enzim je prvi puta opisao Hare 1928. godine pod imenom tiramin oksidaza, a današnjim imenom monoaminoksidaza nazvao ga je Zeller 1938. godine<sup>195</sup>.

Osnovnu strukturu monoaminoksidaze čine proteinski dio (apoenzim) i koenzim riboflavin. Monoaminoksidaza se javlja u dva izoenzimskih oblika (A i B). Osnovna je uloga monoaminoksidaze nadzor nad koncentracijom biogenih amina u stanicama različitih tkiva u organizmu katalizacijom njihove oksidativne deaminacije. Reakcija oksidativne deaminacije, koju katalizira MAO, odvija se oksidacijom amina u imin koji se potom hidrolizira u aldehid<sup>9,29,60,178</sup>.

Objavljen je vrlo širok raspon vrijednosti aktivnosti humane trombocitne MAO-B što je vjerojatno posljedica utjecaja različitih endogenih (genetski polimorfizam, hormonalni status, dob, spol, cirkadijalni ritmovi) i egzogenih faktora (prehrana, lijekovi i drugo)<sup>142,174</sup>. Različite vrijednosti aktivnosti ( $V_{max}$  i  $K_m$ ), humane trombocitne MAO-B posljedica su i primjene različitih metoda mjerenja (npr. različiti rasponi koncentracija supstrata)<sup>76,77,152</sup>.

Zbog pretpostavljenog značaja u etiopatologiji različitih neuropsihijatrijskih bolesti, u kojih je pokazano da je aktivnost MAO promijenjena, istraživanje aktivnosti humane trombocitne MAO predstavlja vjerojatno najviše istraživani aspekt toga enzima uopće.<sup>25,159,194</sup> Veliki dio današnjih istraživanja MAO usmjeren je na učinke MAO inhibitora čiji je terapijski potencijal pokazan kod širokog spektra neuropsihijatrijskih bolesti.<sup>25,160,161,181</sup>

### **1.7.1. Struktura i klasifikacija MAO**

MAO je enzim građen od proteinskog dijela (apoenzim) i riboflavina (koenzim). Na osnovu selektivnosti prema supstratu i osjetljivosti na inhibitore utvrđena su dva oblika MAO - izoenzim A i izoenzim B (MAO-A i MAO-B) koji se razlikuju u strukturi, specifičnosti za supstrate, osjetljivosti na inhibitore, raspodjeli u tkivima, imunološkim svojstvima i regulaciji transkripcije<sup>86,178</sup>.

Godine 1984. Pearce i Roth primjenom su kromatografske tehnike prvi puta razdvojili MAO-A i MAO-B kao katalitički aktivne čestice koje zadržavaju enzimska svojstva, nakon čega je upoznata i struktura oba oblika MAO<sup>128</sup>. Oba oblika sastoje se od podjedinica slične molekularne mase<sup>28</sup>. FAD (flavin adenin dinukleotid) vezujuće podjedinice (koenzim) razlikuju se u peptidnoj strukturi i u antigenim determinantama<sup>27,46</sup>.

Utvrđen je i redosljed aminokiselina u oba podtipa MAO te da aminokiselinske sekvence istog podtipa MAO kod različitih vrsta pokazuju veću sličnost nego aminokiselinske sekvence između podtipova MAO-A i MAO-B unutar iste vrste<sup>9</sup>. Oba enzima su homodimeri, aminokiselinski slijedovi pokazuju 70%-tnu identičnost i čine podjedinice molekularne mase 58700 u MAO-A, odnosno 58800 u MAO-B. Svaka podjedinica sadrži pentapeptid Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr na kojeg je kovalentno vezan koenzim FAD<sup>72,178,187</sup>.

Specifičnost prema supstratu određena je alifatskim, odnosno, aromatskim bočnim ograncima aminokiselina u aktivnom mjestu. MAO-A pokazuje veću

specifičnost prema serotoninu, noradrenalinu i adrenalinu i veću osjetljivost na inhibitor klorgilin. MAO-B ima veću specifičnost prema  $\beta$ -feniletilaminu i benzilaminu kao supstratu i veću osjetljivost na inhibitor deprenil. Prema nekim supstratima (npr. tiraminu) oba podtipa MAO pokazuju jednaku specifičnost<sup>57,157,194</sup>.

Iako je klasifikacija MAO na A i B podtip izvršena na osnovi njihove specifičnosti prema supstratu danas se smatra da ne postoji jasna podjela enzima obzirom na navedenu specifičnost. Oba oblika MAO mogu metabolizirati sve supstrate<sup>86</sup>.

### **1.7.2. Distribucija MAO u organizmu sisavaca**

Osim po svojim fizičko-kemijskim svojstvima MAO-A i MAO-B razlikuju se i po distribuciji u tkivima i lokalizaciji u stanicama<sup>99</sup>. Prisutnost MAO dokazana je u gotovo svim organima i tkivima sisavaca, a zavisi i o vrsti organizma<sup>154</sup>.

Lokalizacija MAO u mozgu može biti intraneuronalna ili ekstraneuronalna. MAO-A nalazi se u noradrenergičnim i adrenergičnim neuronima, a MAO-B u serotonergičnim neuronima, ependimskim stanicama, cirkumventrikularnim organima i glija-stanicama<sup>140</sup>. U glija stanicama mozga utvrđena je aktivnost oba oblika MAO. Mozak čovjeka sadrži više MAO-B od MAO-A<sup>140</sup>. Starenjem se povećava udio MAO-B, dok se razina MAO-A u mozgu vrlo malo povisuje<sup>123</sup>. Starenjem stanica u mitohondrijima dolazi do promjena u morfologiji i lipidnom sastavu, pa neki autori pretpostavljaju da se aktivnost MAO mijenja kao funkcija promijena lipidnog sustava u vanjskoj membrani mitohondrija, iako drugi autori nisu opazili takve promjene<sup>115</sup>. Ekspresija MAO-A u kateholaminergičnim neuronima odražava distribuciju prirodnih supstrata (dopamin, noradrenalin, adrenalin). Uloga MAO-B u serotonergičnim neuronima vjerojatno je sprječavanje nakupljanja raznih prirodnih supstrata (npr. dopamina) koji bi mogli interferirati s metabolizmom serotonina.

U mozgu štakora uglavnom je prisutna MAO-A dok je u mozgu čovjeka dominantan oblik MAO-B<sup>140,177</sup>.

U trombocitima kunića prisutna su oba oblika MAO, a trombociti štakora uopće ne sadrže MAO<sup>48</sup>. U štakora se MAO-A nalazi u jetri, duodenumu, srčanim

zaliscima, pankreasu, nadbubrežnoj žlijezdi i plućima dok se MAO-B u štakora nalazi u jetri, duodenumu, bubregu i plućima<sup>99,154</sup>.

Većina humanih tkiva eksprimira obje forme enzima, dok samo mali broj tkiva sadrži isključivo ili uglavnom jedan oblik enzima. Humana placenta sadrži uglavnom MAO-A dok se u trombocitima i limfocitima te u kromafinim stanicama nalazi isključivo MAO-B<sup>47</sup>. MAO-A nalazi se još i u tankom crijevu, plućima, mišićima, bubrezima, jetri, slezeni, nadbubrežnoj žlijezdi, a MAO-B nalazi se još i u tankom crijevu, plućima, srcu, bubrezima, jetri, nadbubrežnoj žlijezdi<sup>29,143</sup>.

### **1.7.3. Genska kodiranost i regulacija ekspresije gena MAO**

Istraživanjima je dokazano da je aktivnost humane trombocitne MAO u pojedinca stabilna tijekom vremenskog perioda<sup>115</sup>, da se nalazi pod genetičkom kontrolom<sup>119</sup> te da njenu aktivnost određuje više gena<sup>99,187</sup>. Uz to postoje i mehanizmi kontrole aktivnosti enzima MAO putem inhibitora ili aktivatora prisutnih u krvi<sup>21,45</sup>. Aktivnosti trombocitne MAO u zdravih ljudi variraju u rasponu i do 50 puta<sup>115,174,179</sup>.

Podtipovi MAO-A i MAO-B potječu od odvojenih gena<sup>72,179</sup>. Strukturni geni za oba podtipa smješteni su na kratkom kraku X kromozoma u regiji p11.23-11.4. Svaki od njih obuhvaća 60 do 70 kb, imaju identičan raspored eksona i introna što ukazuje da su geni nastali vjerojatno duplikacijom zajedničkog ishodišnog gena<sup>187</sup>.

Osim strukturnih gena, u sintezi MAO i regulaciji njene aktivnosti sudjeluje i niz drugih gena kao što su geni uključeni u posttranslacijske modifikacije enzima (npr. dodatak flavina), geni odgovorni za mikrokolinu MAO, geni koji kodiraju enzime uključene u razgradnju MAO i drugi. Glavni kontrolni mehanizam ekspresije je transkripcijska koncentracija. Polimorfne varijante gena za MAO-A i MAO-B povezuju se s alkoholizmom, ovisnostima i poremećajima ponašanja (agresivnost)<sup>99</sup>.

### **1.7.4. Kinetička svojstva trombocitne MAO - B**

Monoaminoksidaza slijedi Michelis – Menten-ovu enzimsku kinetiku. Kinetičke konstante  $K_m$  i  $V_{max}$  ovise o supstratu, a izračunavaju se iz matematičke



transformacije saturacijske krivulje enzima dobivene mjerenjem brzine reakcije (katalizirane enzimom) u određenom vremenu uz različite koncentracije supstrata i stalnu količinu enzima u inkubacijskoj smjesi<sup>165</sup>.

MAO-B iz različitih tkiva ima slična biokemijska i kinetička svojstva, međutim usporedbom kinetičkih parametara trombocitne MAO-B s MAO-A i MAO-B iz kore mozga bolesnika post mortem pokazano je da korelacija između njihove aktivnosti ne postoji<sup>143,193</sup>. Prema tim podacima čini se da aktivnost trombocitne MAO – B ne odražava aktivnost MAO mozga iako to nije moguće ispitati u zdravih ljudi. Također je utvrđeno da ne postoji korelacija između aktivnosti trombocitne MAO-B i MAO-A iz fibroblasta kože iste osobe<sup>59</sup>.

Iako nije dokazano da aktivnost MAO u perifernim tkivima odražava aktivnost enzima u CNS-u, pretpostavlja se da bi se bilo kakva promjena u aktivnosti enzima, nastala zbog nasljednih promjena u strukturi molekula MAO, odrazila na enzim u svim tkivima<sup>130,154</sup>.

#### **1.7.5. Čimbenici koji utječu na aktivnost humane trombocitne MAO-B**

Niz endogenih i egzogenih faktora utječe na aktivnost humane trombocitne MAO. Od endogenih najizraženije su fiziološke varijable - dob, spol, cirkadijani ritmovi, hormonalni status i genetski polimorfizam, a od egzogenih izražen je utjecaj lijekova, prehrane i niza patoloških stanja organizma<sup>57,174,187</sup>.

U većini istraživanja utvrđeno je da žene imaju više vrijednosti aktivnosti trombocitne MAO nego muškarci<sup>115</sup>. Moguće je da je postojanje spolnih razlika povezano s lokacijom gena za MAO-B na X kromozomu<sup>119,130</sup>. Osim spolnih hormona i drugi hormoni djeluju na razinu MAO aktivnosti - porast odnosno sniženje u različitim tkivima nakon hipofizektomije<sup>74</sup>, kao i porast aktivnosti nakon adenektomije<sup>125</sup>.

Podaci o istraživanju promjene aktivnosti trombocitne MAO-B u ovisnosti o dobi su vrlo različiti. Neki autori dokazuju pozitivnu korelaciju između aktivnosti trombocitne MAO i dobi. U nekim istraživanjima je uočeno da se u zdravih ljudi aktivnost MAO-B povećava starenjem zbog povećanja broja glija-stanica, dok koncentracija MAO-A ostaje nepromijenjena<sup>142</sup>, nasuprot ispitivanjima koja su pokazala da najnižu aktivnost MAO-B imaju odrasle osobe<sup>195</sup>. Starenjem stanica u mitohondrijima dolazi do promjena u morfologiji i lipidnom sastavu, pa neki autori pretpostavljaju da se aktivnost MAO mijenja kao funkcija

promijena lipidnog sustava u vanjskoj membrani mitohondrija, iako drugi autori nisu opazili takve promjene<sup>115</sup>. Svi navedeni podaci, za spol i dob, odnose se samo na aktivnost (brzinu reakcije) trombocitne MAO dok o afinitetu enzima nema podataka.

Eksperimentalno je ustanovljeno da u plazmi shizofrenih osoba postoje čimbenici s inhibitornim efektom na aktivnost MAO u zdravih ljudi<sup>22,57</sup>. U istraživanjima drugih autora pokazano je da u plazmi zdravih ljudi postoje određeni čimbenici koji djeluju aktivirajuće ili inhibiraju aktivnost trombocitne MAO<sup>45,176</sup>.

### **1.7.6. Fiziološka uloga MAO**

Enzim monoaminoksidaza sastavni je dio vanjske membrane mitohondrija i zajedno sa serotoninskim granulama, transmembranskim prijenosnikom serotonina (5HTt) i serotoninskim receptorom (5HT-2A) sačinjava serotoninski sustav trombocita za kojeg je pokazano da je po svojim biokemijskim i farmakološkim karakteristikama vrlo sličan, a u nekim dijelovima čak identičan serotoninskom sustavu serotonergičnih neurona mozga<sup>9,29,60,163,178</sup>.

Fiziološka uloga MAO u organizmu povezana je s lokalizacijom enzima u pojedinim organima ili stanicama<sup>47,48,143,154</sup>. Zbog važnosti MAO u metabolizmu neurotransmitera, a time u regulaciji neurotransmisije, velik dio ispitivanja enzima usmjeren je na središnji živčani sustav<sup>99,143,154</sup>. Glavni fiziološki supstrati za MAO su aromatski monoamini među koje spadaju serotonin, dopamin, adrenalin i noradrenalin koji predstavljaju klasične neurotransmitere središnjeg živčanog sustava. Inaktivacijom serotonina, dopamina i noradrenalina, MAO sudjeluje u održavanju njihove citoplazmatske koncentracije (intraneuronalno) kao i u regulaciji neurotransitorske sinaptičke aktivnosti. MAO ima i dodatnu važnu funkciju kao čistač različitih amina npr. 2-feniletilamina, tiramina, oktopamina i triptamina, normalno prisutnih u vrlo niskim koncentracijama, a istraživanja pokazuju da sudjeluje i u razgradnji različitih inertnih amina iaminskih derivata (detoksikacija, metabolizam lijekova i sl.)<sup>29</sup>. Moguća uloga MAO je sprječavanje nakupljanja raznih prirodnih supstrata (npr. dopamina) koji bi mogli interferirati s metabolizmom serotonina<sup>192</sup>.

Jetrena MAO regulira koncentraciju različitih biogenih amina u krvi, kao i visoko aktivna MAO-A krvnih žila i pluća koja ima važnu ulogu u zaštiti organizma od toksičnog efekta cirkulirajućih monoamina osobito serotonina.<sup>190</sup> U tankom crijevu, MAO je odgovorna za inaktivaciju simpatomimetičnih amina (npr. tiramina i feniletilamina) ili drugih amina nastalih od aminokiselinskih prekursora.<sup>191</sup>

Prava fiziološka uloga MAO-B u ljudskim trombocitima još nije razjašnjena, naročito stoga što MAO podtipovi nisu jednako prisutni u trombocitima sisavaca (npr. trombociti kunića sadrže oba podtipa MAO dok trombociti štakora uopće ne sadrže MAO)<sup>89</sup>.

### **1.7.7. Klinički značaj određivanja kinetike trombocitne MAO-B**

Iako do danas nije razjašnjen razlog izrazite sličnosti između trombocitnog serotoninskog sustava (trombociti potječu iz mezoderma) i analognih elemenata na serotonergičkim neuronima (neuroni su ektodermalnog porijekla), kao ni potpuna uloga MAO u trombocitima, lako dostupni trombociti prihvaćeni su kao prikladan periferni model za serotonergičke neurone<sup>157,159,162,163,179</sup>. Stoga i trombocitna MAO-B predstavlja značajan objekt neurobioloških i neurofarmakoloških istraživanja. MAO, kao ključni enzim u degradaciji monoaminskih neurotransmitera centralnog i perifernog živčanog sustava (serotonina, dopamina, adrenalina, noradrenalina), ima važnu ulogu u regulaciji njihove celularne koncentracije i procesa neurotransmisije, odnosno uključena je u modulaciju funkcija središnjeg živčanog sustava a time i u etiologiju/patogenezu različitih neuroloških i psihijatrijskih bolesti<sup>9,29,60,178</sup>.

Promjene aktivnosti trombocitne MAO pokazane su u nizu patoloških stanja. Smanjena aktivnost MAO-B povezuje se s alkoholizmom, shizofrenijom, migrenom, sklonošću suicidu<sup>3,160,161</sup>. Povišena aktivnost MAO-B utvrđena je u unipolarnom afektivnom poremećaju, Huntingtonovoj bolesti<sup>17</sup>, Alzheimerovoj bolesti<sup>168</sup> i u Parkinsonovoj bolesti<sup>170</sup>. Međutim, funkcionalna povezanost između trombocitne MAO-B i metaboličke izmjene monoamina u mozgu nije dokazana<sup>191,193</sup>. Pretpostavlja se da snižena aktivnost trombocitne MAO može biti pokazatelj sklonosti prema psihičkim poremećajima<sup>123</sup>.

Pušenje cigareta inhibira MAO u mozgu i u trombocitima, a nakon prestanka pušenja aktivnost trombocitne MAO-B vraća se na normalu. Mehanizam inhibicije još nije poznat<sup>20</sup>.

Selektivni MAO-B ihibitori danas se koriste u terapiji Parkinsonove bolesti usporavajući njen razvoj<sup>170</sup>, a također je uočen njihov pozitivan učinak na ponašanje bolesnika s Alzheimerovom bolesti<sup>168</sup>. Antidepresivno djelovanje selektivnih MAO-A inhibitora potvrđeno je njihovom primjenom u liječenju raznih depresivnih bolesti<sup>29,134</sup>. Efikasnost njihove primjene u depresivnim bolestima jednaka je ili veća od efikasnosti tricikličkih antidepresiva<sup>29</sup>. Osim u terapiji depresije, MAO inhibitori danas se koriste i u terapiji anksioznosti, paničnih stanja, socijalne fobije, bolesti vezanih za poremećaj apetita (bulimija), migrene i drugo<sup>90</sup>.

## **2. CILJ I SVRHA RADA**

Istraživanje patofiziologije nekog biološkog parametra pretpostavlja dobro poznavanje njegovih fizioloških osobitosti. Kao što je navedeno u uvodu, trombocitni 5HT elementi istražuju se doista široko u okviru različitih medicinskih disciplina. Ipak, u literaturi se vrlo rijetko susreću studije posvećene temeljnoj fiziologiji serotoninskih elemenata u humanim trombocitima; istraživanja koja bi pak bila usmjerena na veći broj elemenata istodobno, praktički nema.

Držimo da dobro poznavanje fizioloških osobitosti istraživnog parametra, uz pouzdanu metodiku mjerenja, predstavlja nužne preduvjete za kliničke studije. Stoga smo glavni dio ovog rada posvetili tim problemima.

### **CILJEVI I SVRHA OVOG RADA SU:**

1. Opisati i uvesti optimizirani metodološki postupak koji bi omogućio simultano mjerenje tri parametara trombocitnog serotonina - 5HT, 5HTt i MAO-B iz jednokratno uzetog (malog) uzorka kvi.
2. Spoznati i opisati fiziološke osobitosti tih tri parametra (utjecaj dobi, spola i godišnjeg doba) sa svrhom stvaranja preduvjeta, odnosno dobivanja referentnog oslonca, za buduća daljnja patofiziološka istraživanja.
3. Ispitati stupanj međusobne povezanosti (međuzavisnosti) navedenih tri parametra u fiziološkim uvjetima s ciljem dobivanja uvida u njihov stvarni međuodnos.

U prvom dijelu ovog istraživanja opisat ćemo metodološki postupak simultanog mjerenja sva tri parametra iz jednokratno uzetog (istog) uzorka kvi. U okviru prvog dijela razradit ćemo i opisati postupke mjerenja parametra koncentracije (razine) trombocitnog serotonina, kinetike serotoninskog prijenosnika na trombocitnoj membrani (5HTt) i kinetike trombocitne monoaminoksidaze (MAO-B).

U drugom dijelu rada prikazat ćemo individualne vrijednosti i opis fizioloških osobitosti svakog od tri parametra u populaciji od 63 dobrovoljnih darivatelja krvi: distribucija u zdravoj populaciji, raspon normalnih vrijednosti, utjecaj dobi, spola i godišnjeg doba.

Na kraju ćemo istražiti stupanj međuzavisnosti navedenih tri parametra.

### **3. MATERIЈAL I METODE**

### 3.1. ISPITANICI

Ispitivanje je provedeno u 63 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi oba spola: 10 žena i 53 muškaraca, prosječne životne dobi od 41 godina (raspon od 18 do 65;  $M=41$ ;  $SD=10,2$ ;  $CV=24,8\%$ ) u razdoblju od 18 mjeseci. Svaki ispitanik usmeno je obaviješten o razlozima uzimanja uzorka i potpisom je potvrdio pristanak sudjelovanja u ispitivanju («obaviješteni pristanak»). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Hrvatskog zavoda za transfuzijsku medicinu.

### 3.2. REAGENCIJE I OTOPINE

- Solutio ACD – sastav A; (1000 mL ACD: limunska kiselina 7,3g; Na citrat 22,0g; dekstroza 24,5g; voda za injekcije do 1000 mL; Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu)
- $^{14}\text{C}$ -5 hidroksitriptamin kreatinin sulfat, specifične aktivnosti 57 mCi/nmol (Amersham International plc, Engleska)
- Pufer Krebs-Ringer fosfatni bez  $\text{CaCl}_2$  pH 7.4 (0.154 M NaCl, 0.154 M KCl, 0.154  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  = 0.1 M fosfatni pufer pH 7.4)
- Aquasol, scintilacijska tekućina (komercijalni pripravak; NEN, DuPont, Njemačka)
- Pufer za ispiranje pH 7.2 (NaCl 8.1g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.22 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0.219 g, glukoza 2 g, redestilirana  $\text{H}_2\text{O}$  do 1.000 mL)
- $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , p.a. (Alkaloid, Makedonija)
- NaOH u zrcima p.a. (Kemika, Hrvatska)
- L-cistein (Koch-Light, Lab. Ltd. Engleska)
- O-ftaldialdehid, OPT (Koch-Light, Lab. Ltd. Engleska)
- Kinuramin (kynuramine DiHBr, Sigma Chemical Company, USA)
- Trikloroctena kiselina (Merck, Njemačka)
- 4-hidroksikinolin (Sigma Chemical Company, USA)
- Na borat / HCl pufer



### 3.3. OPREMA I PRIBOR ZA RAD

- Centrifuga Superspeed RC2-B (Sorvall, USA)
- Centrifuga International PR-2 (International, USA)
- Ultrazvučni dezintergrator (Ultrasonicator MSE model 100 W, Engleska)
- Spektrofotometar SF8-100 UV / VIS (Pye Unicam, Engleska)
- Spektrofluorimetar LS 50 (Perkin Elmer, Engleska)
- Beta scintilacijski brojač Walac 1214 Rackbeta (LKB, Švedska)
- Vodena kupelj s tresilicom
- pH metar (Radiometer Copenhagen, Danska)
- Uređaj za vakuum filtraciju (Institut R. Bošković, Hrvatska)
- Rotacijska mješalica za miješanje uzoraka krvi (Institut R. Bošković, Hrvatska)
- Ekspresor za separaciju plazme bogate trombocitima (Institut R. Bošković, Hrvatska)
- Brojač krvnih stanica Coulter Counter A<sup>c</sup>T diff<sup>TM</sup> (Coulter Electronics, Engleska)

### 3.4. UZORCI KRVI

#### 3.4.1. Uzimanje uzoraka

Uzorci krvi uzimani su od dobrovoljnih darivatelja krvi prilikom rutinskog davanja krvi u Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu u vremenu od 07<sup>30</sup> do 10h prijepodne. Dnevno je od 4 darivatelja krvi uzet po 1 uzorak venozne krvi. Neposredno po završenom uzimanju krvi u plastičnu vrećicu za krv ā 450 mL, uporabom integriranog Y nastavka za uzimanje uzoraka, uzeto je od svakog darivatelja još 16 mL pune krvi u plastičnu štrcaljku od 20 mL. Plastična štrcaljka je prethodno napunjena s 4 mL ACD antikoagulantne otopine. Po završenom uzimanju uzorka, pomakom klipa navuklo se oko 2 mL zraka u štrcaljku, a otvor se zatvorio plastičnom kapicom. Sadržaj štrcaljke se odmah dobro promiješao (najmanje 10 puta) laganim pokretima ruke.

### **3.4.2. Priprava uzoraka za ispitivanje**

Nakon uzimanja, iz sva 4 uzorka pune krvi izdvojena je plazma bogata trombocitima (PRP) i podijeljena u alikvote za ispitivanje broja i volumena trombocita, određivanja razine trombocitnog serotonina, mjerenja kinetike aktivnog unosa serotonina u trombocite i kinetike trombocitne monoaminoksidaze (MAO-B). Postupak mjerenja aktivnosti prijenosnika trombocitnog serotonina obavljen je unutar 2 sata nakon pripreme plazme bogate trombocitima (PRP), broj trombocita u PRP i punoj krvi određen je tijekom istog dana, dok je mjerenje druga dva trombocitna parametra obavljeno unutar 2 tjedna od spremanja uzoraka na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Mjerenja koncentracije trombocitnog serotonina izvršena su iz smrznutog trombocitnog taloga, a mjerenje MAO-B iz smrznutih uzoraka plazme bogate trombocitima.

#### **3.4.2.1. Postupak izdvajanja plazme bogate trombocitima (PRP) iz pune krvi**

- Uzorci krvi izvađeni u plastične štrcaljke  $\bar{a}$  20 mL (4 mL ACD-a + 16 mL pune krvi) rotiraju se najmanje 5 minuta na rotacijskoj mješalici
- Nakon rotacije krv se istisne u dvije plastične štrcaljke  $\bar{a}$  10 mL (štrcaljke s odrezanim klipom)
- Štrcaljke  $\bar{a}$  10 mL centrifugiraju se 2 min na 1200 x g
- Nakon opreznog vađenja iz centrifuge očita se i zapiše volumen plazme bogate trombocitima u svakoj štrcaljki, te se pažljivo istisne u plastične epruvete i nježno promiješa
- U nove plastične epruvete izdvoji se plazma bogata trombocitima za:
  - 1 x 1.0 mL za određivanje broja trombocita u PRP.
  - 1 x 1.0 mL za mjerenje trombocitnog serotonina
  - 2 x 1.0 mL za mjerenje trombocitne MAO
  - 1 x 1.0 mL za mjerenje aktivnog unosa serotonina

### **3.5. ODREĐIVANJE BROJA I VOLUMENA TROMBOCITA**

- Broj i volumen trombocita u krvi i u alikvotima plazme bogate trombocitima određivao se na automatskom brojaču Coulter Counter A<sup>c</sup>T diff<sup>TM</sup>.

### **3.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE (RAZINE) SEROTONINA U TROMBOCITIMA**

#### **3.6.1. Metodološki princip**

Koncentracija (razina) trombocitnog/cirkulatornog serotonina (5HT) mjerena je fluorimetrijskom metodom iz trombocitnog taloga dobivenog centrifugiranjem PRP. Trombocitni talog je homogeniziran ultrasonikacijom u deioniziranoj vodi. Proteini su precipitirani sa  $ZnSO_4/NaOH$ , a sadržaj serotonina je kvantificiran primjenom OPT-fluorimetrijske metode uz ekscitaciju na 345 nm i emisiju 485 nm. Standardi i prazne probe procesirane su istovjetno kao i uzorci PRP. Koncentracija (razina) 5HT izražena je u ng 5HT po jediničnom broju trombocita (ng 5HT/ $10^9$  trc) i na jedinični volumen krvi (ng 5HT/mL).

#### **3.6.2. Priprava trombocitnog taloga**

- 1.0 mL PRP-a doda se u epruvetu prethodno napunjenu s 3 mL 0,9% NaCl
- Epruveta se centrifugira 5 min na 8500 x g
- Supernatant se brzo izlije iz epruvete i 15 sekundi ostavi na filter papiru da se iscijedi.
- Epruvete s trombocitnim talogom odmah se smrzavaju i pohranjuju na  $-20^{\circ}C$  do provođenja postupka mjerenja.

#### **3.6.3. Priprava otopina**

- HCl, 0.1 N - 0.84 mL 36%-tne HCl nadopuniti sa deioniziranom  $H_2O$  do 100 mL
- $ZnSO_4$ , 10% - otopiti 10 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  u 90 mL deionizirane  $H_2O$
- NaOH, 1N - otopiti 4 g NaOH u 100 mL deionizirane  $H_2O$
- L-cystein, 1% - otopiti 10 mg cisteina u 1 mL 0.1N HCl, priređivati neposredno pred uporabu u količini ovisnoj o broju uzoraka
- OPT, 0.01% u 10 N HCl - otopiti 10 mg OPT u 82.81 mL konc. HCl, nadopuniti sa deioniziranom  $H_2O$  do 100 mL, priređivati količinu ovisno o broju uzoraka, može stajati 2 do 3 dana na  $+4^{\circ}C$
- Kinin sulfat, 1 $\mu$ g/mL - otopiti 4 mg u 4 mL 0.1 N  $H_2SO_4$ , čuva se u začepljenoj kiveti, neograničeno

- Serotonin kreatinin sulfat - matičnu otopinu - (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pripremiti otapanjem 46 mg 5HT kreatinin sulfata u 100 mL 0.1 N HCl, rok trajanja nekoliko mjeseci.
- Na dan pokusa rade se radni standardi:
  - 300  $\mu\text{L}$  matične otopine + 20 mL deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$  = radni standard 3000 ng/mL (međustandard, može stajati tjedan dana)
  - 2000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 3000 + 2700  $\mu\text{L}$  deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$  = radni standard 300 ng/mL
  - 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 300 + 2000  $\mu\text{L}$  deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$  = radni standard 200 ng/mL
  - 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 200 + 2000  $\mu\text{L}$  deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$  = radni standard 100 ng/mL

#### **3.6.4. Postupak**

- Epruvete s uzorcima uložiti u ledenu kupelj i dodati po 1.0 mL deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$
- Uzorke sonicirati 30 sekundi uz frekvenciju 20 kHz i amplitudu 8  $\mu\text{m}$ . Vrijeme se mjeri od trenutka odljepljivanja taloga, pri uranjanju sonde u uzorak talog je okrenut prema naprijed, sonda ne smije dodirivati stjenke epruvete i treba biti uronjena do sredine uzorka.
- U epruvete za standarde staviti po 1 mL pojedinog radnog standarda (100, 200, 300).
- U epruvete za praznu probu staviti po 1 mL deionizirane  $\text{H}_2\text{O}$  (raditi u duplikatima)
- U sve epruvete dodati po 1000  $\mu\text{L}$  10%  $\text{ZnSO}_4$ .
- U sve epruvete dodati po 500  $\mu\text{L}$  1 N NaOH
- Promiješati na rotacijskoj mješalici, ostaviti 5 minuta
- Istaložiti proteine centrifugiranjem u horizontalnom rotoru 15 min. na 2000g.
- Pripremiti potreban broj staklenih epruveta
- U epruvete dodati:
  - 1500  $\mu\text{L}$  deproteiniziranog supernatanta (bistrog)
  - 100  $\mu\text{L}$  otopine cisteina

- 2000  $\mu\text{L}$  otopine OPT
- Uzorke kuhati u vodenoj kupelji 10 minuta, ohladiti na sobnu temperaturu (hlađenje uzoraka može se ubrzati uranjanjem u hladnu vodu)

### **3.6.5. Mjerenje (kvantifikacija sadržaja serotonina primjenom OPT-fluorimetrijske metode)**

- Spektrofotofluorimetar uključiti 10-ak minuta prije mjerenja (zagrijavanje lampe)
- Očitavati fluorescenciju redom:
  - kinin na 345/445 nm (pukotine 2.5/2.5)
  - prazna proba na 345/485 (pukotine 10/10)
  - standardi
  - uzorci
  - standardi i kinin (ponoviti)
- Koncentracija (razina) 5HT izražena je u ng 5HT po jediničnom broju trombocita (ng 5HT/ $10^9$  trc) i na jedinični volumen krvi (ng 5HT/mL).

## **3.7. MJERENJE KINETIČKIH PARAMETARA AKTIVNOG UNOSA SEROTONINA U TROMBOCITE**

### **3.7.1. Metodološki princip**

- Aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika određivana je radioizotopskom metodom uz primjenu radioaktivno obilježenog serotonina ( $^{14}\text{C}$ -5HT). Trombociti (plazma bogata trombocitima) resuspendirani u Krebs-Ringer fosfatnom puferu bez  $\text{CaCl}_2$  inkubirani su u šest koncentracija  $^{14}\text{C}$ -5HT. Inkubacija je prekinuta dodatkom ledene fiziološke otopine i brzom vakuum filtracijom. Nakon ispiranja, radioaktivnost zaostala na filterima mjerena je beta scintilacijskim brojačem. Standardi i prazne probe procesirane su istovjetno kao i uzorci. Kinetički parametri aktivnog unosa serotonina: Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina ( $V_{\text{max}}$ ) izračunati su iz Eadi-Hofsteeove transformacije saturacijske krivulje.  $K_m$  je izražen kao  $\mu\text{M}$  koncentracija  $^{14}\text{C}$ -5HT, a  $V_{\text{max}}$  je izražen u  $\text{pmol } ^{14}\text{C}$ -

5HT/10<sup>8</sup>trombocita/minutu. Također je izračunat sintetski kinetski parametar učinkovitosti trombocitnog serotoninog prijenosnika ( $V_{max}/K_m$ ).

### **3.7.2. Prethodna priprema za rad**

- Narezati filter papire (GF/C)
- Fiziološku otopinu - 0.9% NaCl ohladiti
- Prirediti Krebs-Ringer fosfatni pufer bez CaCl<sub>2</sub>

### **3.7.3. Neposredna priprema za rad**

- Vodenu kupelj zagrijati na 37°C
- Pripremiti seriju staklenih bočica:
  - ako se rade saturacijske krivulje:
    - 6x2 bočica za standarde (duplikati, posebne bočice)
    - 6x2 bočica za prazne uzorke (duplikati)
    - po 6 bočica za svaki od PRP uzoraka
  - ako se radi jedna koncentracija
    - 2 bočice za standard
    - 3 bočice za praznu probu
    - po 2 bočice za svaki od PRP uzoraka
- Na dno bočica za standarde staviti filter papiriće
- Pripremiti staklene epruvete za standarde i 1 eprvetu s puferom (za pripravu otopina standarda)
- Pripremiti standardne otopine
- Na filter papire u bočicama za standarde otpipetirati po 100 μL pojedine koncentracije standarda (od manje k većoj) i dodati po 1 mL Aquasol-a.
- Pripremiti plastične epruvete za prazne probe i uzorke.
- U njih dodati po 800 μL pufera (zagrijanog na sobnu temperaturu)
- Dodati po 100 μL PRP-a. Svaki uzorak prije pipetiranja promiješati kružnim pokretima.
- Ostatak PRP-a od nekoliko uzoraka pomiješati i od toga dodati po 100 μL u epruvete za praznu probu.
- Pripremljene uzorke preinkubirati 10-ak minuta u kupelji

- Prirediti ledenu kupelj (zdrobljeni led + voda) i uroniti epruvete za prazne probe, ostaviti 10-ak minuta.
- Tlak namjestiti na 500 mmHg.
- Isprati lijevke za odsisavanje destiliranom vodom (2x)
- Bocu sa 0.9% NaCl staviti u zdrobljeni led.
- Uložiti filter papire u lijevke

#### **3.7.4. Priprava otopina**

- Fiziološka otopina (0.9% NaCl u destiliranoj vodi)
- Krebs –Ringer fosfatni pufer (bez CaCl<sub>2</sub>), pH 7.4
- Prirediti:
  - 0.9% NaCl (0.154 M)
  - 1.15% KCl (0.154 M)
  - 3.82% MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (0.154 M)
  - 0.1 M fosfatni pufer, pH 7.4 (17.8 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 20 mL 1 N HCl, do 1 L)
  - Pomiješati 100 dijelova NaCl, 4 dijela KCl, 1 dio MgSO<sub>4</sub> i 20 dijelova pufera. Čuva se na +4°C, par tjedana.
- <sup>14</sup>C-5HT kreatinin sulfat
  - za svaku novu bočicu <sup>14</sup>C-5HT izračuna se koncentracija 5HT
  - koncentracija (μM) =  $\frac{\text{radioakt. konc. } \mu\text{Ci/mL}}{\text{specif. aktivnost mCi/nmol}}$
- Saturacijska krivulja se radi sa 6 koncentracija supstrata (C<sub>1</sub> – C<sub>6</sub>). Konačne koncentracije u inkubacijskoj smjesi iznose: 0.15; 0.25; 0.40; 0.70; 1.20 i 2.00 μM <sup>14</sup>C-5HT.
- Radni standardi se rade 10x većih koncentracija: 1.5; 2.5; 4.0; 7.0; 12.0 i 20.0 μM (pripremljene koncentracije standarda razrijeđuju se 10x u konačnoj inkubacijskoj smjesi – 100 μL u 1000 μL).
- Ovisno o broju uzoraka u pokusu, iz matične otopine priređuje se najmanja potrebna količina radnog standarda najveće koncentracije (C<sub>6</sub>) od koje se zatim rade sve potrebne koncentracije.

Izračunavanje potrebnih volumena za pripravu standarda:

$$V_{st (1-5)} = \frac{V_{uk} \times C_{(1-5)}}{C_6}$$

$$V_{mot} = \frac{V_{rs} \times C_{rs}}{C_{mot}}$$

$V_{st}$ =volumen standarda

$V_{uk}$ =ukupni volumen inkubacijske smjese

$C$ =koncentracija supstrata ( $^{14}C$ -5HT)

$V_{mot}$ =volumen matične otopine

$V_{rs}$ =volumen radnog standarda

$C_{rs}$ =koncentracija radnog standarda

$C_{mot}$ = koncentracija matične otopine

### 3.7.5. Postupak

- Inkubacije se rade prvo s praznim probama (od najmanje prema većim koncentracijama supstrata), zatim s uzorcima (od najmanje prema većim koncentracijama)
- Izvaditi epruvetu iz kupelji i na satu odrediti nulto vrijeme. Dodati 100  $\mu$ L standarda u smjesu, protresti epruvetu i vratiti je u kupelj.
- Smjesu inkubirati 60 sekundi na 37°C, prazne probe na 0°C (ledena kupelj)
- Prekidanje inkubacije: epruveta se izvadi iz kupelji 1 sekundu prije isteka vremena inkubacije i točno nakon 60 sekundi od početka inkubacije štrcaljkom se ulije 2.5 mL ledene 0.9% NaCl otopine, sadržaj epruvete se izlije u lijevak i odsiše. U epruvetu se doda 2x2.5 mL ledene 0.9% NaCl otopine, izlije u lijevak, odsiše i još jednom ponovi (ukupno 2.5 mL za prekidanje i 2x5 mL za ispiranje).
- Nakon što se završi jedna serija uzoraka, filter papiri se pažljivo izvade i stave u bočice
- U bočice se doda po 1 mL Aquasol-a
- Uzorci se ostave stajati 2 do 3 sata prije brojanja



- U svakom pokusu u 2 do 3 nasumce odabrane prazne bočice dodati 1 mL Aquasol-a i staviti na brojanje (radi provjere čistoće)
- Radioaktivnost na filter papirima mjeri se scintilacijskim brojačem

### 3.7.6. Mjerenje

Mjere se prazna proba i uzorci.

- Scintilacijskim beta brojačem mjeri se aktivnost  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocitima i aktivnost  $^{14}\text{C}$ -5HT zaostala na filter papiru, mjereći broj raspada u minuti (*engl. disintegration per minute, dpm*).
- Sva izmjerena aktivnost u praznim probama odnosi se samo na obilježeni serotonin ( $^{14}\text{C}$ -5HT) zaostao na filter papiru i na površinskoj membrani trombocita. Dozvoljeni raspon raspada u minutu (dpm) praznih proba je  $\pm 20\%$ .
- Oduzimanjem vrijednosti aktivnosti prazne probe od vrijednosti aktivnosti uzoraka inkubiranih na  $37^{\circ}\text{C}$  izračunava se količina  $^{14}\text{C}$ -5HT koja je aktivnim transportom unesena u trombocite.
- Kao kontrole mjerenja na scintilacijskom brojaču koriste se standardne otopine obilježenog serotonina u količini od 100  $\mu\text{L}$  u koncentracijama od 1.500, 2.500, 4.000, 7.000, 12.000 i 20.000 nM kako bi se vidjelo koliko dpm-a odgovara 1 nmolu  $^{14}\text{C}$ -5HT tj. da se dobije standardni faktor za daljnji izračun. Dpm varira ovisno o specifičnoj aktivnosti, izračunava se za svaku bočicu  $^{14}\text{C}$ -5HT, a dozvoljeni raspon je  $\pm 5\%$ .
- Kinetički parametri aktivnog unosa serotonina: Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) izračunaju se iz Eadi-Hofsteeove transformacije saturacijske krivulje.  $K_m$  je izražen kao  $\mu\text{M}$  koncentracija  $^{14}\text{C}$ -5HT, a  $V_{max}$  je izražen u  $\text{pmol } ^{14}\text{C}\text{-5HT}/10^8\text{trombocita}/\text{minutu}$ .
- Izračuna se  $V_{max}/K_m$  - sintetski kinetski parametar učinkovitosti trombocitnog serotoniniskog prijenosnika.

### **3.8. ODREĐIVANJE KINETIČKIH PARAMETARA TROMBOCITNE MAO-B**

#### **3.8.1. Metodološki princip**

- Aktivnost trombocitne MAO-B određivana je spektrofotofluorometrijski uz kinuramin kao supstrat. Kao izvor enzima MAO-B korištena je plazma bogata trombocitima (PRP). Trombociti, preinkubirani u Na-borat-HCl puferu, inkubirani su u šest koncentracija supstrata. Reakcija je prekinuta dodatkom trikloroctene kiseline i mješavina je centrifugirana. Deaminacijom kinuramina nastaje 4-hidroksikinolin (4-OH-kinolin) koji fluorescira. Intenzitet fluorescencije mjerio se na spektrofotofluorometru uz ekscitaciju na 310 nm i emisiju 362 nm. Standardi i prazne probe procesirane su istovjetno kao i uzorci. Kinetski parametri Michaelis-ova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) izračunati su iz Eadi-Hofstee-ove transformacije saturacijske krivulje<sup>165</sup>. Afinitet ( $K_m$ ) trombocitne MAO-B prema kinuraminu izražen je kao  $\mu\text{M}$  koncentracija supstrata (kinuramina). Aktivnost ( $V_{max}$ ) trombocitne MAO-B izražena je kao količina produkta (4-OH-kinolin) nastala po jediničnom broju trombocita u jediničnom vremenu ( $\text{nmol}/10^8\text{trc}/1\text{h}$ ). Također je izračunat sintetski kinetski parametar učinkovitosti trombocitne MAO-B ( $V_{max}/K_m$ ).

#### **3.8.2. Priprava otopina**

- 0.33 M Na-borat/HCl pufer, pH 8.3 - otopiti 12.58 g u 1000 mL redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ , pH podesiti sa 2 N HCl
- 20% trikloroctena kiselina (TCA) - otopiti 200 g u 1000 mL redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$
- Kinuramin matičnu otopinu (2mM) prirediti otapanjem 6.52 mg u 10 mL boratnog pufera, razdijeliti po 700  $\mu\text{L}$  u epruvete (Eppendorf) i smrznuti.
- Na dan pokusa raditi radne standarde (konačne koncentracije u inkubacijskoj smjesi trebaju biti 1-32  $\mu\text{M}$ ):
  - 650  $\mu\text{L}$  matične otopine + 1380  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 32
  - 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 32 + 1000  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 16
  - 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 16 + 1000  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 8

- 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 8 + 1000  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 4
- 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 4 + 1000  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 2
- 1000  $\mu\text{L}$  radnog standarda 2 + 1000  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 1
- 4-OH kinolin – matičnu otopinu (4mM) prirediti otapanjem 2.9 mg u 5 mL redestilirane  $\text{H}_2\text{O}$ ; može se čuvati do mjesec dana na  $+4^\circ\text{C}$ .
- Na dan pokusa priređuju se radni standardi 4-OH kinolina (konačna količina u uzorcima treba biti 1.2 i 4 nmola):
  - 100  $\mu\text{L}$  matične otopine + 900  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 0.4 mM (međustandard)
  - 100  $\mu\text{L}$  radnog standarda 0.4 mM + 900  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 0.4 mM
  - 500  $\mu\text{L}$  radnog standarda 0.04 mM + 900  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 0.02 mM
  - 500  $\mu\text{L}$  radnog standarda 0.02 mM + 900  $\mu\text{L}$  pufera = radni standard 0.01 mM

### 3.8.3. Postupak

- Smrznute uzorke PRP (plazme bogate trombocitima) ostaviti da se otope na sobnoj temperaturi
- Vodenu kupelj zagrijati na  $37^\circ\text{C}$
- Prirediti stalak sa staklenim centrifugalnim epruветama. Za 8 uzoraka potrebno je 56 epruвета: za svaki uzorak po 6 koncentracija supstrata = 48 epruвета + 6 epruвета za standarde (3 koncentracije u duplikatu) + 2 epruвете za praznu probu.
- U epruвете dodati po 1800  $\mu\text{L}$  pufera, u epruвете za standarde po 1900  $\mu\text{L}$  pufera
- Uzorke PRP dobro promiješati (oko 10 okretaja epruвете) i dodati po 100  $\mu\text{L}$  u sve epruвете, osim u one za standarde. Za praznu probu se nasumično odaberu 2 uzorka.
- Epruвете preseliti u kupelj, uključiti tresalicu i preinkubirati 10 min na  $37^\circ\text{C}$ .
- Prirediti radne otopine kinuramina.

- U epruvete dodati po 100  $\mu\text{L}$  kinuramina, prvo najmanju koncentraciju u svaki od uzoraka, zatim redom do najveće. U praznu probu se još ne dodaje kinuramin.
- Zabilježiti vrijeme početka inkubacije. Inkubacija traje ovisno o uzorcima od 15 do 60 minuta, što se prethodno odredi u pokusu u kojem se inkubira 100  $\mu\text{L}$  pojedinog PRP-a sa 32  $\mu\text{M}$  kinuramina tijekom 60 minuta. Vrijeme inkubacije u pokusu izračuna se ispitivanjem linearnosti enzimske reakcije ( $V_{\text{max}}$ ; aktivnost MAO-B) u ovisnosti o trajanju inkubacije za svaki uzorak PRP. Što je aktivnost MAO veća vrijeme inkubacije je kraće.
- Inkubaciju prekinuti dodatkom 1 mL TCA, istim redoslijedom i brzinom kojom se dodavao kinuramin (kako bi se smanjile greške).
- TCA dodati i u prazne probe, a tek nakon toga dodati po 100  $\mu\text{L}$  kinuramina (bilo koje koncentracije) i promiješati.
- Uzorke i prazne probe centrifugirati 15 min na 2000 x g.
- Prirediti standarde 4.OH kinolina. U ranije priređene epruvete sa po 1900  $\mu\text{L}$  pufera dodati po 100  $\mu\text{L}$  pojedinog standarda (1, 2 i 4 nmola) i po 1000  $\mu\text{L}$  TCA. Standarde nije potrebno centrifugirati.

Inkubacijska smjesa:

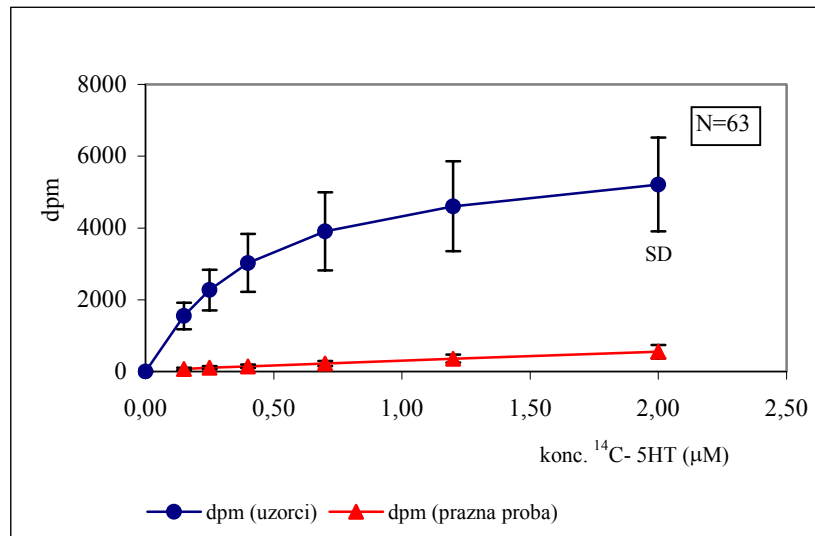
	uzorci	standardi	prazna proba
pufer	1800 $\mu\text{L}$	1900 $\mu\text{L}$	1800 $\mu\text{L}$
uzorak	100 $\mu\text{L}$	-	100 $\mu\text{L}$
preinkubacija 10min/37°C			
kinuramin <sub>(1-32)</sub> :	100 $\mu\text{L}$	kinolin <sub>(1,2,4)</sub> : 100 $\mu\text{L}$	-
inkubacija (15 - 60 min)			
TCA	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$	1000 $\mu\text{L}$
			kinuramin <sub>(1)</sub> : 100 $\mu\text{L}$

#### 3.8.4. Mjerenje

- Supernatante preseliti u nove epruvete i očitavati fluorescenciju na 310/362 nm (ekscitacija/emisija) uz pukotine 10/4. Očitavati redom:
  - otopina kinina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (služi kao kontrola aparata) na 345/445 nm (pukotina 2.5/2.5)

- 
- redestilirana H<sub>2</sub>O
  - prazna proba
  - standardi
  - uzorci (nakon svakog niza uzoraka isprati kivetu)
  - standardi i kinin (ponoviti)
- 
- Kinetski parametri Michaelis-ova konstanta (K<sub>m</sub>) i maksimalna brzina (V<sub>max</sub>) izračunaju se iz Eadi-Hofsteeove transformacije saturacijske krivulje.
  - Afinitet (K<sub>m</sub>) trombocitne MAO-B prema kinuraminu izražen je kao μM koncentracija supstrata. Aktivnost (V<sub>max</sub>) trombocitne MAO-B izražena je kao količina produkta (4-OH-kinolin) nastala po jediničnom broju trombocita u jediničnom vremenu (nmol/10<sup>8</sup> trc/1h).
  - Izračuna se V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>, sintetski kinetski parametar učinkovitosti trombocitne MAO-B.

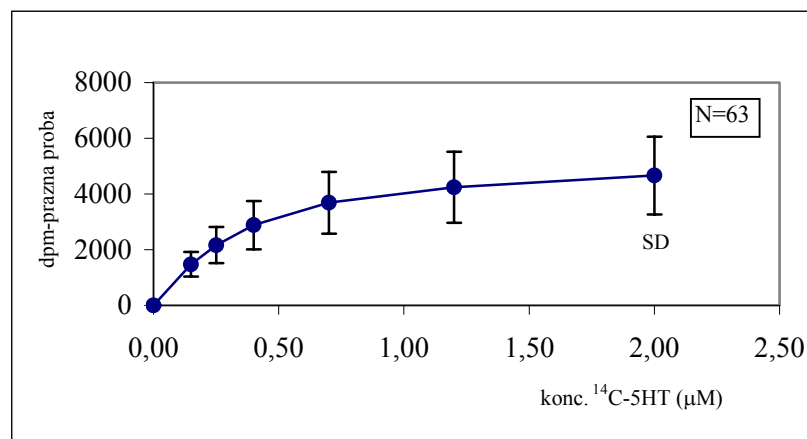
### 3.9. METODOLOGIJA MJERENJA KINETIKE TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA



**Slika 3.9.1. Kinetska krivulja ukupnog aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite (s pripadajućom krivuljom prazne probe)**

*N=broj uzoraka; SD=standardna devijacija; dpm (engl.: desintegration per minute)=radioaktivni raspadi u minuti.*

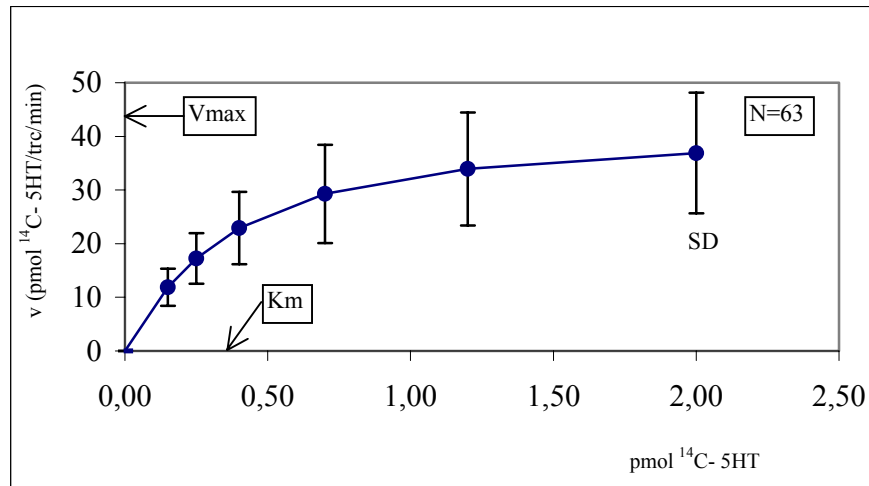
Uzorcima su inkubirani u 6 različitim koncentracijama  $^{14}\text{C}$ -5HT. Mjerena je brzina unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite. Rezultati su prikazani ukupnom kinetskom krivuljom aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT uz pripadajuću krivulju prazne probe. Uz točke koje prikazuju srednje vrijednosti mjerenja označena je standardna devijacija. Od rezultata kinetskih mjerenja nisu odbijene vrijednosti prazne probe, slika 3.9.1.



**Slika 3.9.2. Zbirna kinetska krivulja aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite (s oduzetim vrijednostima prazne probe)**

*N=broj uzoraka; SD=standardna devijacija; dpm (engl.: desintegration per minute)=radioaktivni raspadi u minuti.*

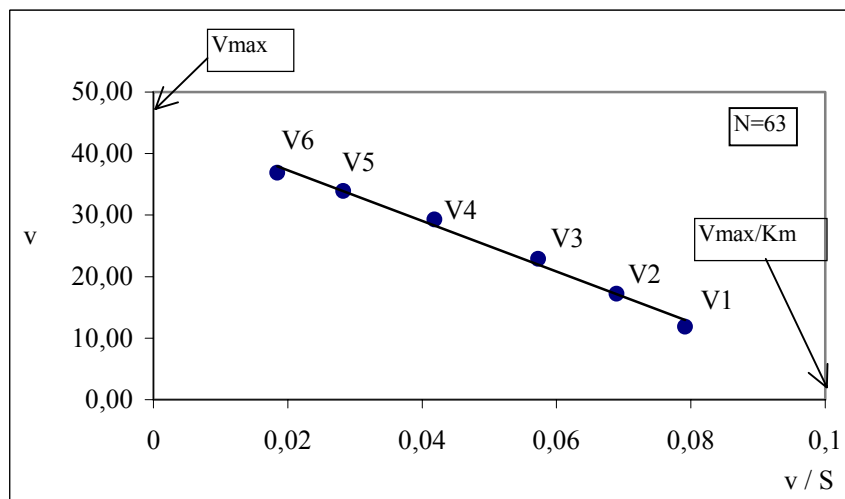
Zbirna kinetska krivulja aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u ljudske trombocite izračunata je temeljem mjerenja prikazanih na slici 3.9.1. Od iznosa prikazanih na ukupnoj kinetskoj krivulji odbijeni su pripadajući iznosi prazne probe. Uz točke koje prikazuju srednje vrijednosti mjerenja označena je standardna devijacija, slika 3.9.2.



**Slika 3.9.3. Kinetska krivulja aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite bez prazne probe**

$N$ =broj uzoraka,  $V$ =brzina aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite u minuti;  $V_{\text{max}}$ =maksimalna brzina prijenosnika;  $K_m$ =Michaelisova konstanta;  $SD$ =standardna devijacija

Mjerena je brzina unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite u minuti u odnosu na 6 koncentracija serotonina u inkubacijskom mediju. Od ukupne krivulje oduzeta je vrijednost prazne probe<sup>165</sup>. Uz točke koje prikazuju srednje vrijednosti mjerenja označena je standardna devijacija, slika 3.9.3.

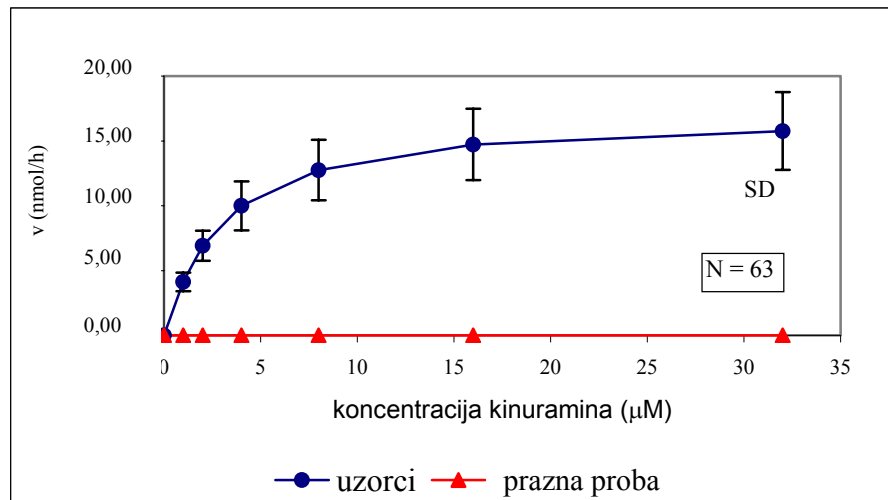


**Slika 3.9.4. Linearizacija krivulje aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite**

$N$ =broj uzoraka;  $V$ =brzina aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite/ $10^8\text{trc/min}$ ;  $S$ =koncentracija supstrata;  $V_{\text{max}}$ =maksimalna brzina aktivnog unosa  $^{14}\text{C}$ -5HT u trombocite;  $K_m$ =koncentracija supstrata kod koje je postignuta polovica maksimalne brzine;  $V_{\text{max}}/K_m$ =učinkovitost serotoninog prijenosnika.

Radi izračunavanja kinetskih parametara  $V_{\text{max}}$  i  $K_m$  provedena je matematička transformacija kinetske krivulje u pravac, tj. linearizacija<sup>15</sup>. U matematičkoj obradi saturacijske kinetike primjenjena je linearizacija po Eadie-Hofsteeu<sup>165</sup>, slika 3.9.4.

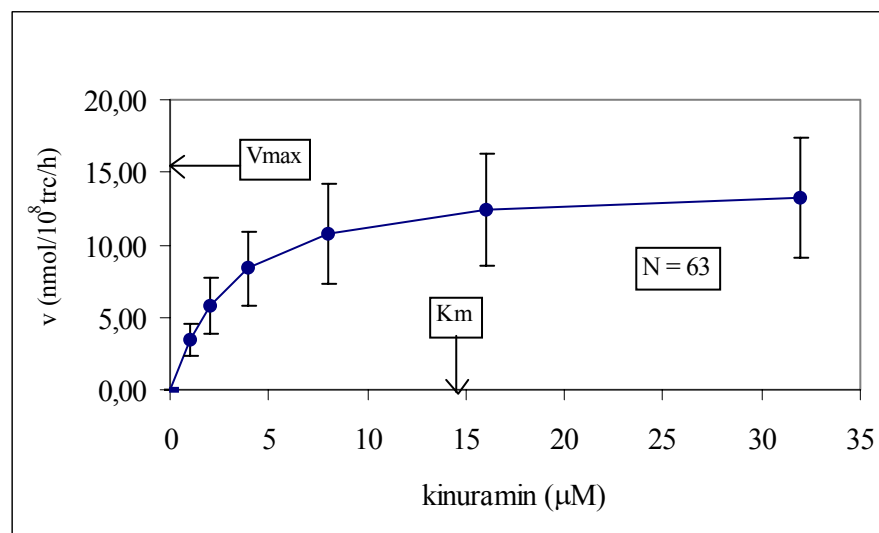
### 3.10. METODOLOGIJA MJERENJA KINETIKE TROMBOCITNE MAO-B



**Slika 3.10.1. Kinetska krivulja aktivnosti MAO-B (s pripadajućom krivuljom prazne probe)**

$N$ =broj uzoraka,  $V$  = brzina reakcije (nmol/h),  $SD$ =standardna devijacija

Uzorci su inkubirani u 6 različitih koncentracija supstrata (kinuramin; 0,00; 3,46; 5,80; 8,35; 10,14; 12,37; 13,23). Ovisnost brzine enzimske aktivnosti MAO-B o koncentraciji supstrata prikazana je kinetskom krivuljom aktivnosti MAO-B uz pripadajuću krivulju prazne probe. Uz točke koje prikazuju srednje vrijednosti mjerenja označena je standardna devijacija. Rezultat prazne probe jednak je 0 (nema enzima), te ova krivulja ujedno pokazuje neto aktivnost MAO-B, slika 3.10.1.

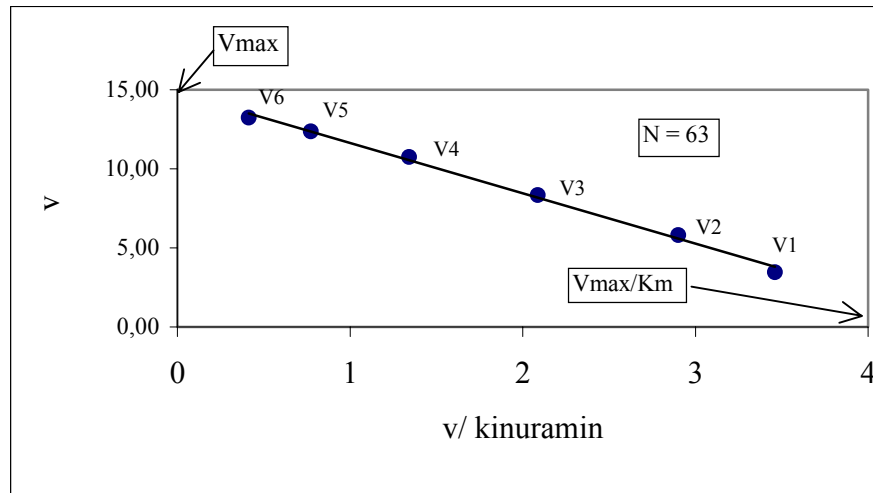


**Slika 3.10.2. Kinetska krivulja aktivnosti MAO-B – brzina reakcije –**

$N$ =broj uzoraka,  $V$  = brzina reakcije (nmol/h),  $SD$ =standardna devijacija;  $V_{max}$ =maksimalna brzina reakcije;  $K_m$ =afinitet enzima

Uzorci su inkubirani u 6 različitih koncentracija supstrata (kinuramin). Prikazana je krivulja kinetike MAO-B, odnosno, ovisnost brzine enzimske aktivnosti o koncentraciji supstrata (kinuramina) u inkubacijskoj smjesi pri konstantnoj količini enzima (trombocita) u jednom satu, slika 3.10.2.





### Slika 3.10.3. Linearizacija krivulje aktivnosti MAO-B

$V$ =brzina reakcije (nmol/h),  $K_m$ =afinitet enzima;  $V_{max}$ =aktivnost MAO-B;  $V_{max}/K_m$ =učinkovitost MAO-B.

Na slici 3.10.3. prikazana je linearizacija krivulje aktivnosti MAO-B (deaminacija kinuramina humanom trombocitnom MAO-B). Radi izračunavanja kinetskih parametara  $V_{max}$  i  $K_m$  bilo je potrebno provesti matematičku transformaciju kinetske krivulje u pravac, tj. linearizaciju<sup>117</sup>. U matematičkoj obradi primjenjena je linearizacija po Eadie-Hofsteuu<sup>165</sup>.

### 3.11. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Rezultati mjerenja izražavani su kao individualne vrijednosti, odnosno srednje vrijednosti (M) skupine uz standardnu devijaciju (SD), standardnu pogrešku srednje vrijednosti (SEM) i koeficijent varijabilnost (CV – relativna standardna devijacija izražena kao postotak srednje vrijednosti) kao pokazatelje varijabilnosti unutar skupine.

Normalnost distribucije frekvencija individualnih vrijednosti ispitivana je Kolmogorov-Smirnov (KS) testom (kvantifikacija diskrepance distribucije izmjerenih vrijednosti i Gaussove distribucije) uz primjenu Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode za izračun značajnosti razine ( $p$ ) odklona od normalne distribucije<sup>197</sup>.

Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti za dva parametra korišten je t-test (unpaired t-test; F test sa  $df$ ; [ $df=stupanj\ slobode - engl. degrees\ of\ freedom$ ]), a za tri i više parametra analiza varijance ANOVA s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom. Rezultati su interpretirani na 5%-tnoj ili nižoj razini značajnosti ( $p < 0,05$ ).

Analizom linearne korelacije ispitana je međuzavisnost istraživanih parametara ( $r$ -Pearsonov koeficijent korelacije).

Kinetski parametri: Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) izračunati su iz Eadi-Hofsteeove transformacije saturacijske krivulje<sup>165</sup>.

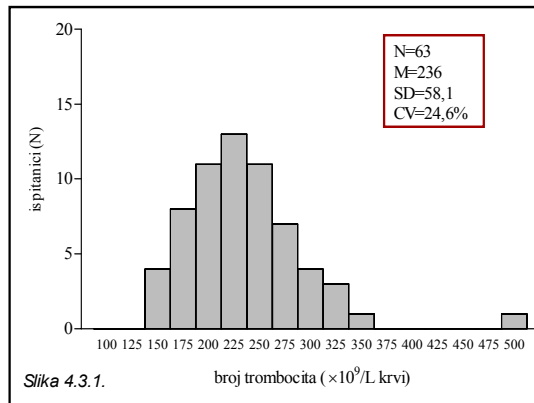
Za statističku obradu podataka korišteni su statistički računalni paketi GraphPad PRISM verzija 3 (GraphPad Software, Inc. San Diego CA, USA).

## **4. REZULTATI**

## 4.1. BROJ I VOLUMEN TROMBOCITA

### 4.1.1. DISTRIBUCIJA FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI BROJA I VOLUMENA TROMBOCITA

Ispitana je normalnost distribucije frekvencija individualnih vrijednosti broja i volumena trombocita u ispitanika.

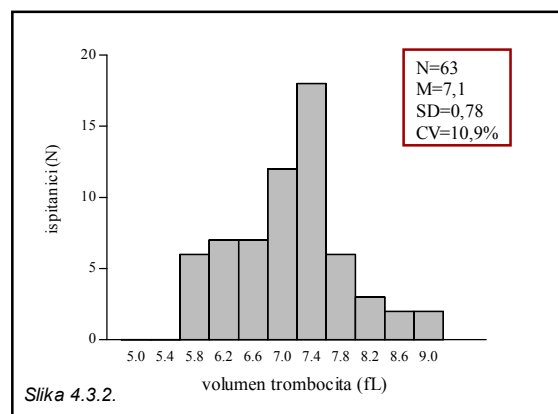


Slika 4.3.1.

#### Slika 4.1.1.1. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti broja trombocita

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti*  
 Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika (p) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik (KS=0,09644, p>0.10) raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti broja trombocita, slika 4.1.1.1.



Slika 4.3.2.

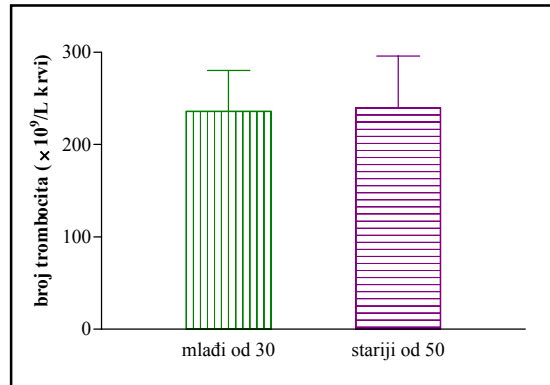
#### Slika 4.1.1.2. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti*  
 Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika (p) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik (KS=0,07594, p>0.10) raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita, slika 4.1.1.2.

#### 4.1.2. UTJECAJ ŽIVOTNE DOBI NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI BROJA I VOLUMENA TROMBOCITA

Ispitanici su podijeljeni u dvije dobne skupine: mlađi od 30 i stariji od 50 godina.



**Slika 4.1.2.1. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti broja trombocita**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

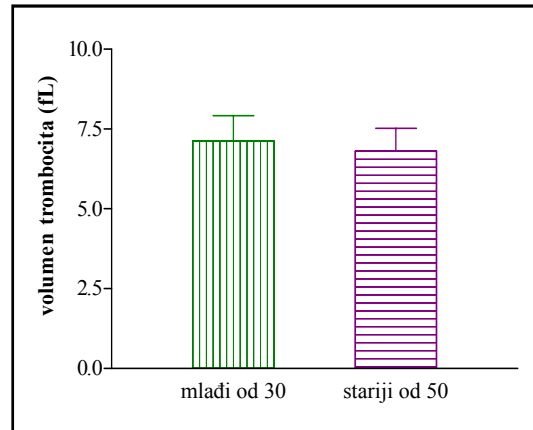
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Mlađi od 30: N=11; M=235,9; SD=44,25; SEM=13,34.*

*Stariji od 50: N=12; M=239,6; SD=56,45; SEM=16,30.*

*t-test: t=0,1726, df=21, p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na distribuciju frekvencije individualnih vrijednosti broja trombocita u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.1.2.1.



**Slika 4.1.2.2. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test).; t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike, df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

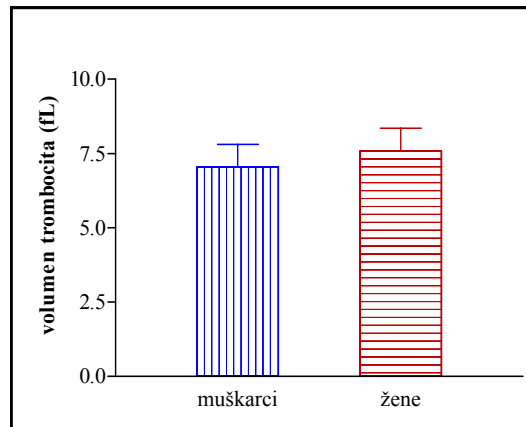
*Mlađi od 30: N=11; M=7,118; SD=0,8060; SEM=0,2430.*

*Stariji od 50: N=12; M=6,800; SD=0,7249; SEM=0,2093.*

*t-test: t=0,9969, df=21, p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na distribuciju frekvencije individualnih vrijednosti volumena trombocita u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.1.2.2.

#### 4.1.3. UTJECAJ SPOLA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI BROJA I VOLUMENA TROMBOCITA



**Slika 4.1.3.1. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti broja trombocita**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike, df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

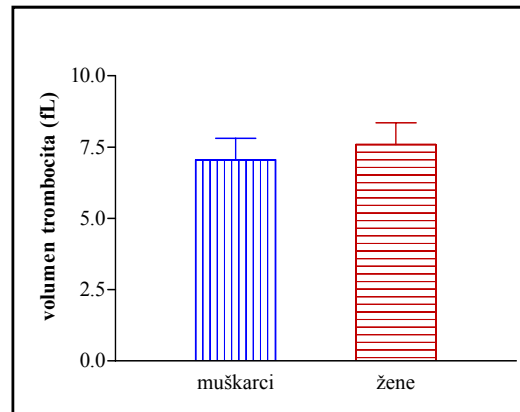
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Muškarci: N=53; M=235,6; SD=60,97; SEM=8,375.*

*Žene: N=10; M=236,5; SD=41,92; SEM=13,25.*

*t-test: t=0,04346, df=61; p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na distribuciju frekvencije individualnih vrijednosti broja trombocita nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.1.3.1.



**Slika 4.1.3.2. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike, df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Muškarci: N=53; M=7,053; SD=0,7605; SEM=0,1045.*

*Žene: N=10; M=7,590; SD=0,7608; SEM=0,2406.*

*t-test: t=2,049, df=61;*

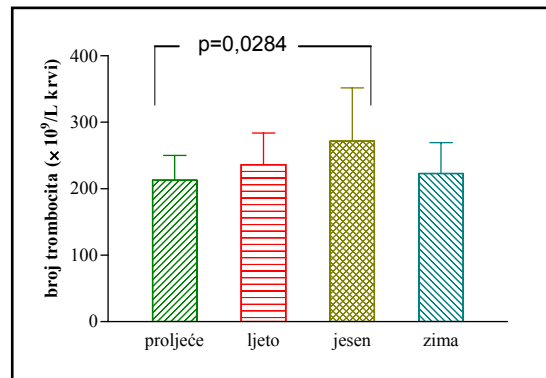
*Razlika: žene p=0,0448, p<0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita utvrđena je statistički značajno viša vrijednost u žena, p<0,05, slika 4.1.3.2.



#### 4.1.4. UTJECAJ GODIŠNJEG DOBA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI BROJA I VOLUMENA TROMBOCITA

Ispitivanja cirkumannualnih varijacija broja i volumena trombocita u ispitanika provedena su u intervalu od dvadesetak uzastopnih mjeseci. Dobivene vrijednosti grupirane su u 4 skupine prema kalendarskom godišnjem dobu, slika 4.1.4.1. i slika 4.1.4.2.



**Slika 4.1.4.1. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti broja trombocita**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Proljeće: N=15; M=212,7; SD=37,61; SEM=9,712.*

*Ljeto: N=18; M=236,1; SD=47,67; SEM=11,24.*

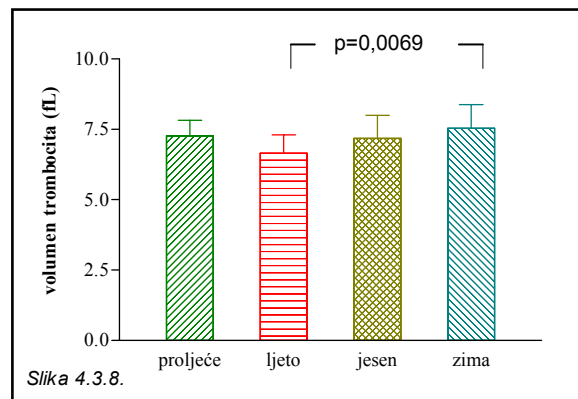
*Jesen: N=15; M=271,4; SD=80,54; SEM=20,79.*

*Zima: N=15; M=222,8; SD=46,54; SEM=12,02.*

*ANOVA test: p=0,0284 (p<0,05), df=3.*

*Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test: razlike proljeće vs jesen p<0,05.*

Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti broja trombocita s nižim vrijednostima u proljeće vs jesen, p<0,05, slika 4.1.4.1.



Slika 4.3.8.

#### Slika 4.1.4.2. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Proljeće: N=15; M=7,267; SD=0,5538; SEM=0,1430.*

*Ljeto: N=18; M=6,656; SD=0,6555; SEM=0,1545.*

*Jesen: N=15; M=7,180; SD=0,8152; SEM=0,2105.*

*Zima: N=15; M=7,547; SD=0,8383; SEM=0,2164.*

*ANOVA test: p=0,0069 (p<0,05), df=3.*

*Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test: razlike ljeto vs zima p<0,01.*

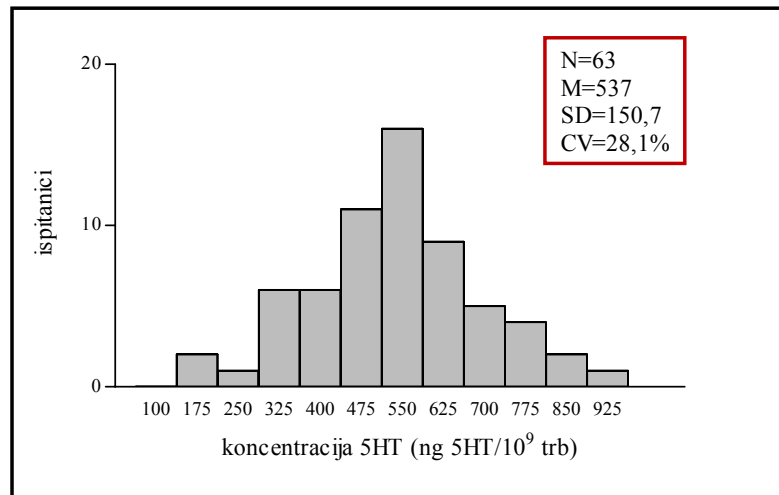
Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti volumena trombocita s nižim vrijednostima u ljeto vs zima, p<0,01, slika 4.1.4.2.

Sumarno, dobivene vrijednosti pokazuju normalnu raspodjelu broja i volumena trombocita u zdravih ispitanika (p>0,10). Nisu nađene značajne razlike u vrijednosti navedenih parametara u odnosu na dob i spol. Utvrđene su statistički značajne cirkummanualne promjene broja trombocita u proljeće vs jesen (p<0,05), kada dosežu najviše vrijednosti, te u vrijednosti volumena trombocita u ljeto vs zima (p<0,01).

## 4.2. KONCENTRACIJA (RAZINA) TROMBOCITNOG SEROTONINA

### 4.2.1. DISTRIBUCIJA FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJE 5HT U TROMBOCITIMA I U KRVI

Ispitana je normalnost distribucije frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije 5HT u trombocitima i u krvi.

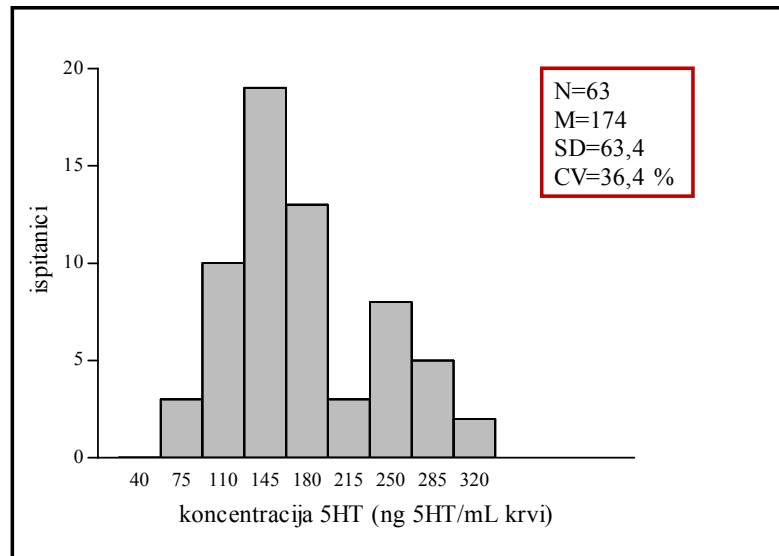


**Slika 4.2.1.1. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika (p) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele koncentracije serotonina (KS=0,06121; p>0.10) u trombocitima ispitanika, slika 4.2.1.1.



**Slika 4.2.1.2. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi**

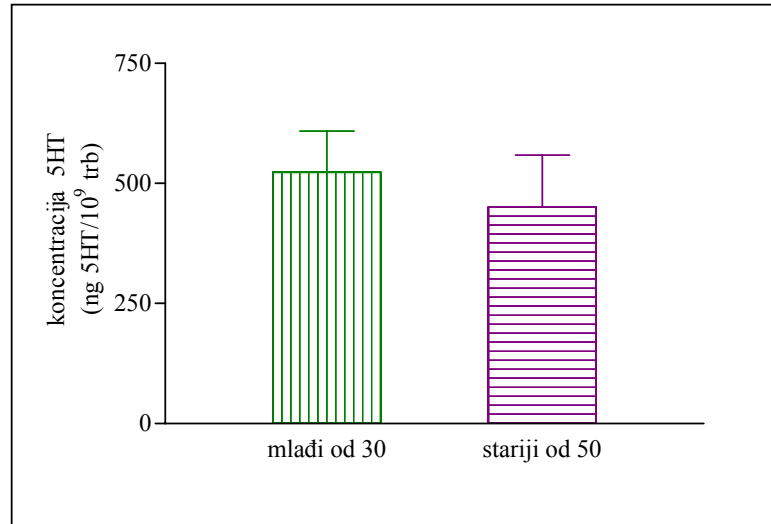
*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele koncentracije serotonina ( $KS=0,1382$ ;  $p>0,10$ ) u cirkulaciji ispitanika, slika 4.2.1.2.

#### 4.2.2. UTJECAJ ŽIVOTNE DOBI NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJE 5HT

Ispitanici su podijeljeni u dvije dobne skupine: mlađi od 30 i stariji od 50 godina.



**Slika 4.2.2.1. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

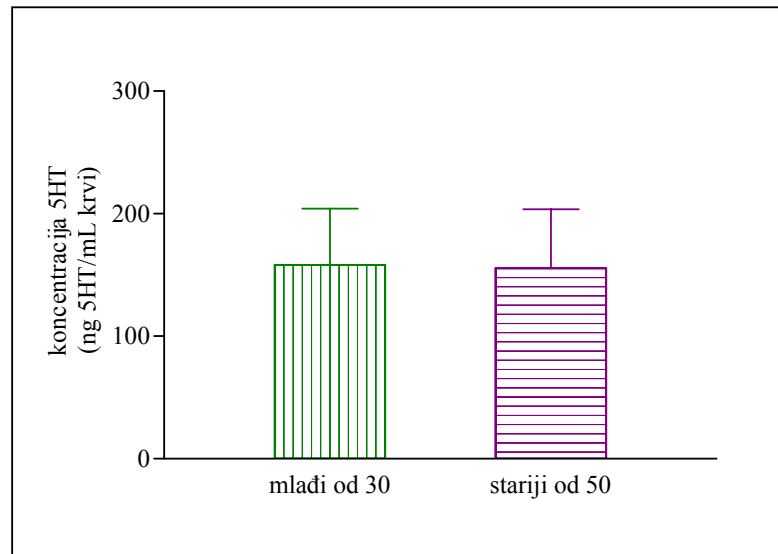
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Mlađi od 30: N=11; M=523,4; SD=85,69; SEM=25,84.*

*Stariji od 50: N=12; M=451,0; SD=108,1; SEM=31,21.*

*t-test: t=0,1726, df=21, p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na koncentraciju serotonina u trombocitima u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.2.2.1.



**Slika 4.2.2.2. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je  $t$ -test (unpaired  $t$ -test i  $F$  test).  $t$ =razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike;  $df$ =stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

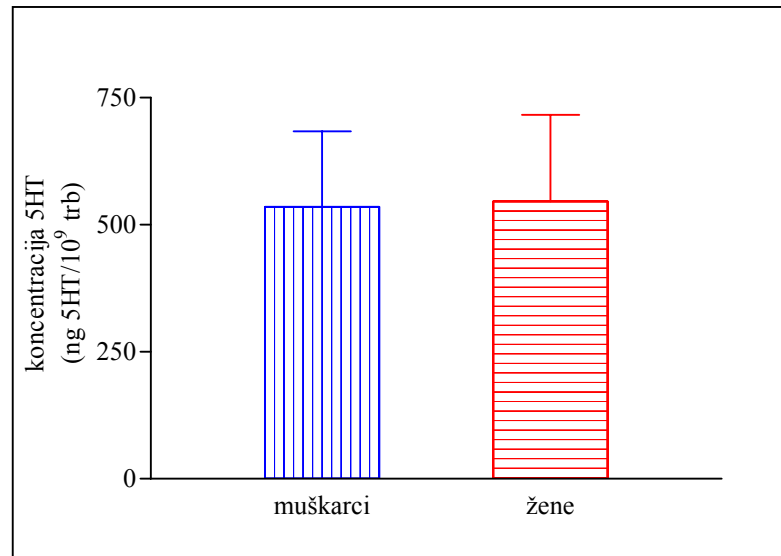
*Mlađi od 30:  $N=11$ ;  $M=158,0$ ;  $SD=46,06$ ;  $SEM=13,89$ .*

*Stariji od 50:  $N=12$ ;  $M=155,3$ ;  $SD=48,39$ ;  $SEM=13,97$ .*

*$t$ -test:  $t=0,1351$ ,  $df=21$ ,  $p>0,05$ .*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na koncentraciju serotonina u krvi u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.2.2.2.

#### 4.2.3. UTJECAJ SPOLA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJE 5HT



**Slika 4.2.3.1. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike, df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

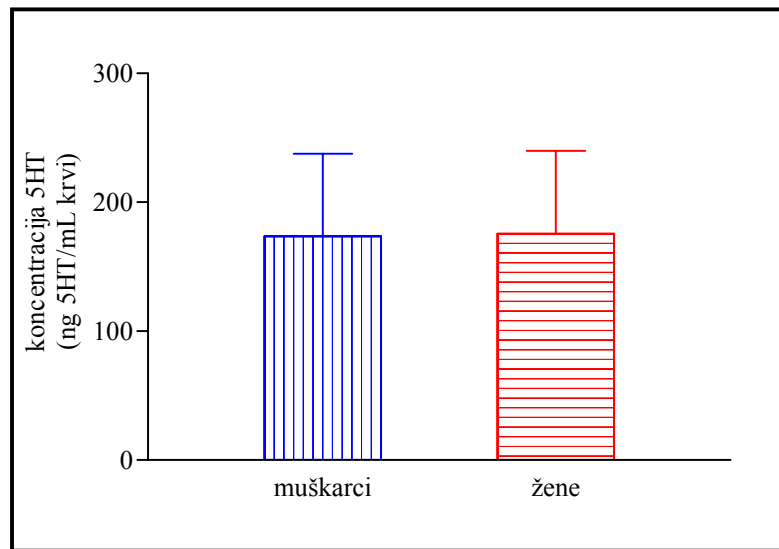
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Muškarci: N=53; M=535; SD=148; SEM=20,4.*

*Žene: N=10; M=546; SD=170; SEM=53,9*

*t-test: t=0,2044, df=61; p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na distribuciju frekvencije individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.2.3.1.



**Slika 4.2.3.2. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike, df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Muškarci: N=53; M=174; SD=63,9; SEM=8,77.*

*Žene: N=10; M=176; SD=64,3; SEM=20,3*

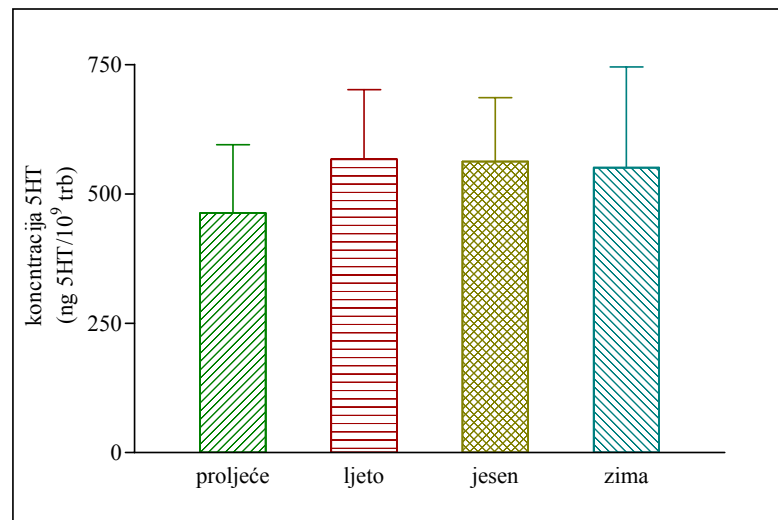
*t-test: t=0,08629, df=61; p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na distribuciju frekvencije individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi ispitanika nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.2.3.2.



#### 4.2.4. UTJECAJ GODIŠNJEG DOBA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KONCENTRACIJE 5HT

Ispitivanja cirkumanualnih varijacija koncentracije serotonina u trombocitima i u krvi ispitanika provedena su u intervalu od dvadesetak uzastopnih mjeseci. Dobivene vrijednosti (ispitanici) grupirane su u 4 skupine prema kalendarskom godišnjem dobu, slika 4.2.4.1. i slika 4.2.4.2.



**Slika 4.2.4.1. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test (bez post hoc testa,  $p > 0,05$ ).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

*Proljeće: N=15; M=462,9; SD=132,0; SEM=34,08.*

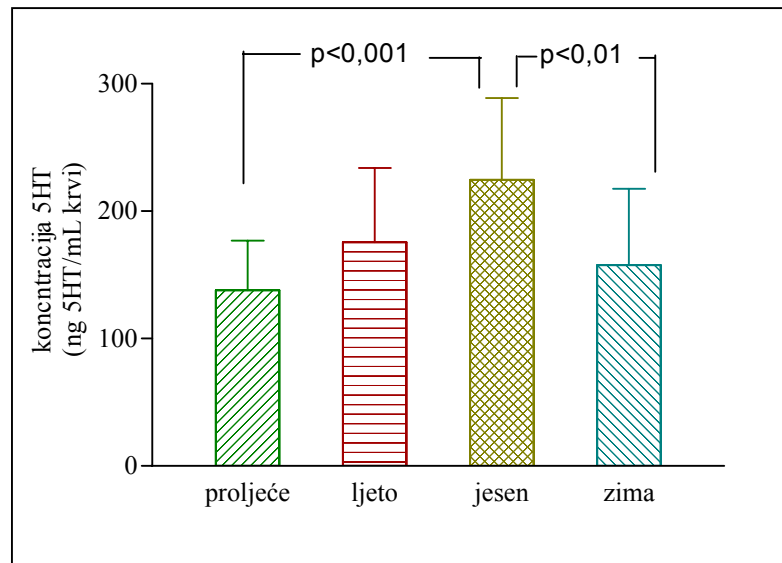
*Ljeto: N=18; M=566,5; SD=135,0; SEM=31,82.*

*Jesen: N=15; M=562,3; SD=123,8; SEM=31,96.*

*Zima: N=15; M=550,8; SD=194,5; SEM=50,22.*

*ANOVA test:  $p=0,1820$  ( $p > 0,05$ ),  $df=3$ .*

Analizom nije je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u trombocitima ispitanika u odnosu na godišnja doba, slika 4.2.4.1.



**Slika 4.2.4.2. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Proljeće: N=15; M=137,9; SD=38,91; SEM=10,05.*

*Ljeto: N=18; M=175,5; SD=58,33; SEM=13,75.*

*Jesen: N=15; M=224,7; SD=64,32; SEM=16,61.*

*Zima: N=15; M=157,7; SD=59,92; SEM=15,47.*

*ANOVA test: p=0,0007 (p<0,05), df=3.*

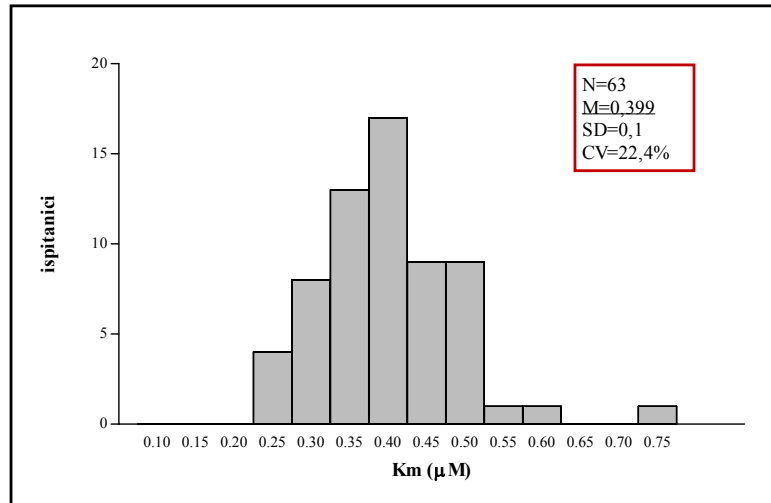
*Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test: razlike proljeće vs jesen p<0,0001, te jesen vs zima p<0,01.*

Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u krvi ispitanika i to u proljeće vs jesen (niže vrijednosti u proljeće, p<0,001), te u jesen vs zima (više vrijednosti u jesen, p<0,01). Razina serotonina u krvi doseže najviše vrijednosti u jesen, slika 4.2.4.2.

### 4.3. TROMBOCITNI SEROTONINSKI PRIJENOSNIK

#### 4.3.1. DISTRIBUCIJA FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA

Ispitana je normalnost distribucije frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}/K_m$ ) trombocitnog serotoninskog prijenosnika slika 4.3.1.1, slika 4.3.1.2. i slika 4.3.1.3.

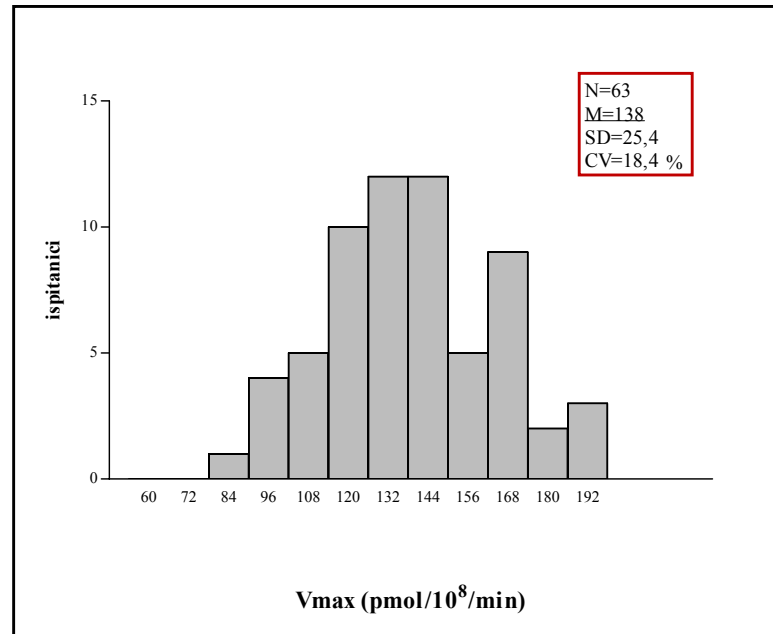


**Slika 4.3.1.1. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti Michaelisove konstante ( $K_m$ )**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti;  $K_m$ =Michaelisova konstanta.*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti  $K_m$  ( $KS=0,08860$ ;  $p>0,10$ ) u ispitanika, slika 4.3.1.1.

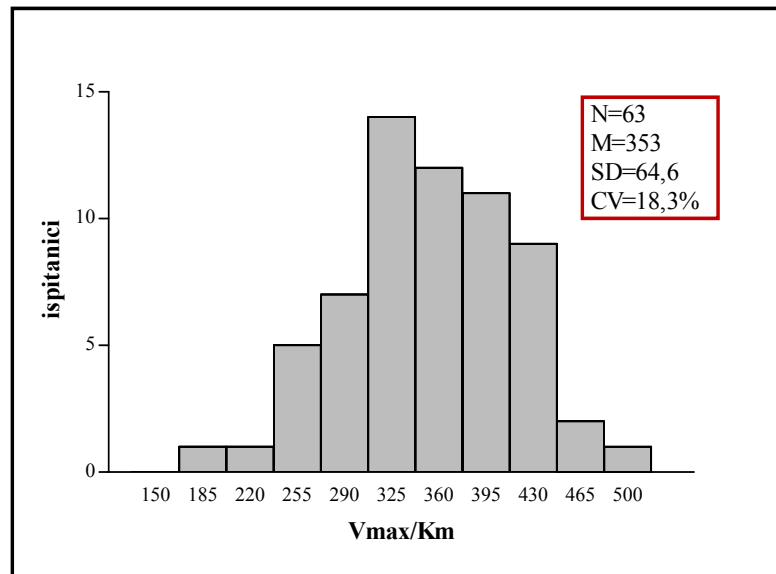


**Slika 4.3.1.2. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti maksimalnih brzina (Vmax) unosa serotonina**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti; Vmax=maksimalna brzina transportera.*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika (p) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti Vmax (KS=0,06206; p>0.10) u ispitanika, slika 4.3.1.2.



**Slika 4.3.1.3. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti učinkovitosti ( $V_{max}/K_m$ ) tromboцитnog serotoninškog prijenosnika**

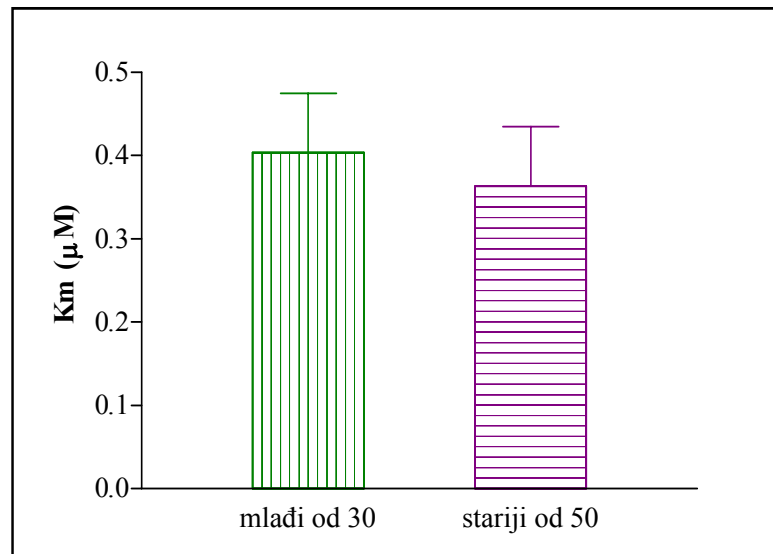
*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti;  $K_m$ =Michaelisova konstanta;  $V_{max}$ =maksimalna brzina transportera;  $V_{max}/K_m$ =učinkovitost serotoninškog prijenosnika.*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti  $V_{max}/K_m$  u ispitanika ( $KS=0,05003$ ;  $p>0.10$ ) u ispitanika, slika 4.3.1.3.

#### 4.3.2. UTJECAJ ŽIVOTNE DOBI NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA

Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara serotoninskog prijenosnika ( $K_m$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}/K_m$ ) ispitan je u dvije dobne skupine: ispitanici mlađi od 30 godina i ispitanici stariji od 50 godina.



**Slika 4.3.2.1. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti  $K_m$  serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti;  $K_m$ =Michaelisova konstanta*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je  $t$ -test (*unpaired  $t$ -test* i *F test*).  $t$ =razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike;  $df$ =stupanj slobode (engl. *degrees of freedom*).*

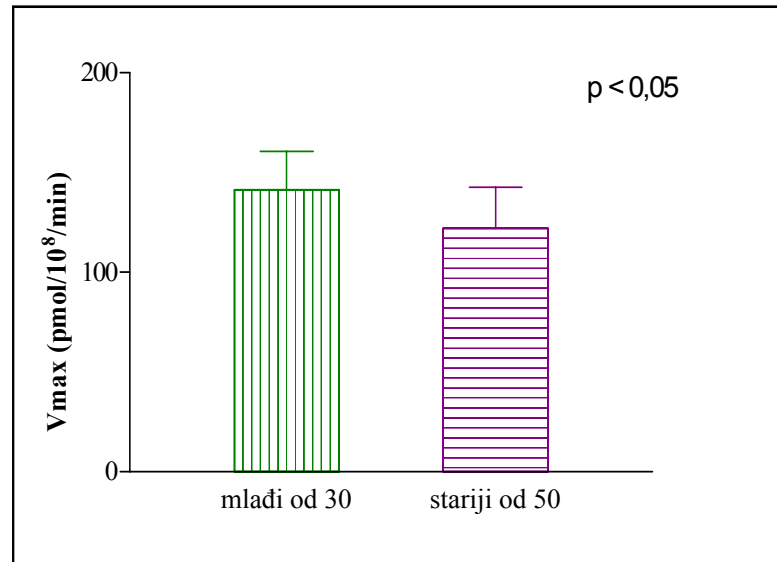
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

*$K_m$ : Mlađi od 30:  $N=11$ ;  $M=0,4041$ ;  $SD=0,07046$ ;  $SEM=0,2125$ .*

*Stariji od 50:  $N=12$ ;  $M=0,3633$ ;  $SD=0,07136$ ;  $SEM=0,02060$ .*

*$t$ -test:  $t=1,379$ ,  $df=21$ ,  $p>0,05$ .*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na  $K_m$  serotoninskog prijenosnika u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.3.2.1.



**Slika 4.3.2.2. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Vmax serotoniniskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Vmax=maksimalna brzina transportera.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

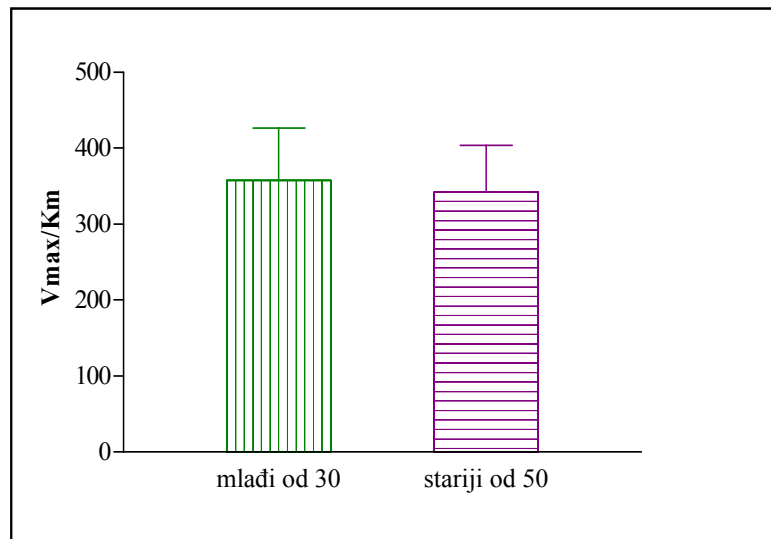
*Vmax: Mlađi od 30: N=11; M=141,5; SD=19,12; SEM=5,764.*

*Stariji od 50: N=12; M=122,0; SD=20,56; SEM=5,937;*

*t-test: t=2,343, df=21,*

*Razlike: stariji od 50 godina: p=0,0290 (p<0.05)*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na Vmax serotoniniskog prijenosnika u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) utvrđene su statistički značajne niže vrijednosti maksimalne brzine unosa (Vmax) u ispitanika starijih od 50 godina, p=0,0290 (p<0.05), slika 4.3.2.2.



**Slika 4.3.2.3. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti  $V_{max}/K_m$  serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti;  $K_m$ =Michaelisova konstanta;  $V_{max}$ =maksimalna brzina transportera;  $V_{max}/K_m$ =učinkovitost serotoninskog prijenosnika.*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je  $t$ -test (*unpaired t-test i F test*).  $t$ =razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike;  $df$ =stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

*$V_{max}/K_m$ : Mlađi od 30:  $N=11$ ;  $M=357,8$ ;  $SD=68,80$ ;  $SEM=20,74$ .*

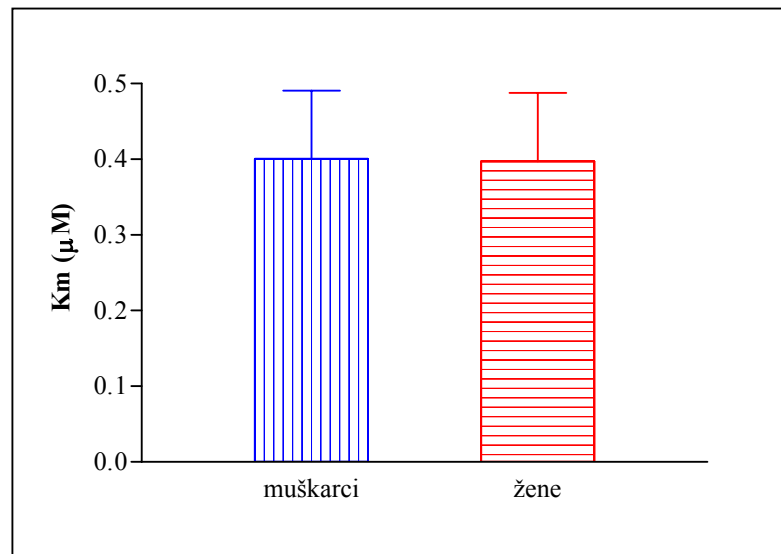
*Stariji od 50:  $N=12$ ;  $M=342,4$ ;  $SD=61,02$ ;  $SEM=17,61$ .*

*$t$ -test:  $t=0,5690$ ,  $df=21$ ,  $p>0,05$*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na učinkovitost ( $V_{max}/K_m$ ) serotoninskog prijenosnika u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.3.2.3.



### 4.3.3. UTJECAJ SPOLA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA



**Slika 4.3.3.1. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Km serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Km=Michaelisova konstanta*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

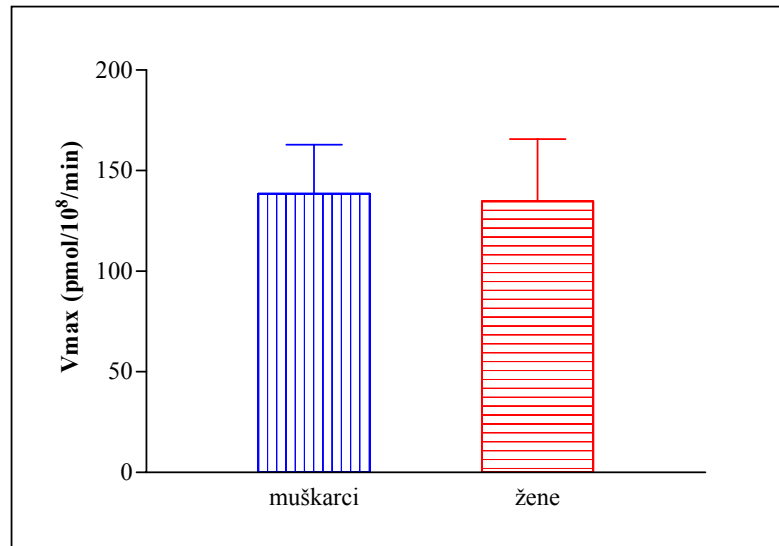
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Km: Muškarci: N=53; M=0,4005; SD=0,0903; SEM=0,0124.*

*Žene: N=10; M=0,3972; SD=0,0906; SEM=0,0286.*

*t-test: t=0,1056, df=61, p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na Km serotoninskog prijenosnika nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.3.3.1.



**Slika 4.3.3.2. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Vmax serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Vmax=maksimalna brzina transportera.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

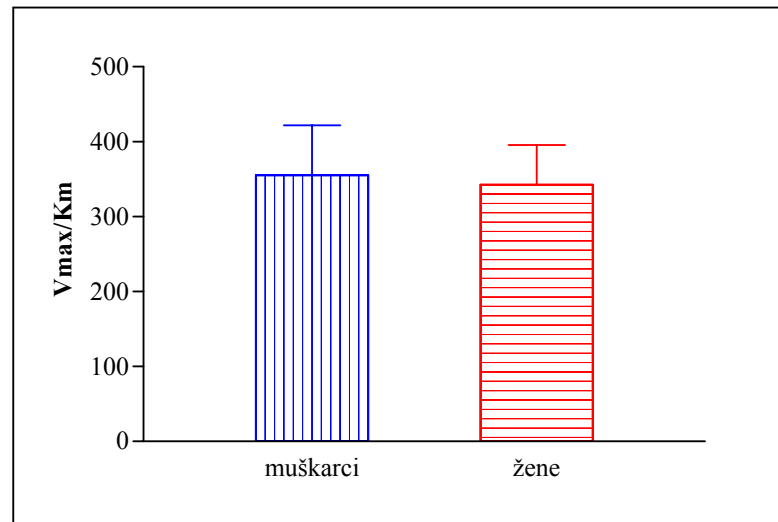
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Vmax Muškarci: N=53; M=138,5,0; SD=24,43; SEM=3,356.*

*Žene: N=10; M=134,7; SD=31,07; SEM=9,824.*

*t-test: t=0,4351, df=61, p>0,05*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na brzinu unosa (Vmax) serotoninskog prijenosnika nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.3.3.2.



**Slika 4.3.3.3. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Vmax/Km serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Km=Michaelisova konstanta; Vmax=maksimalna brzina transportera Vmax/Km=učinkovitost serotoninskog prijenosnika.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

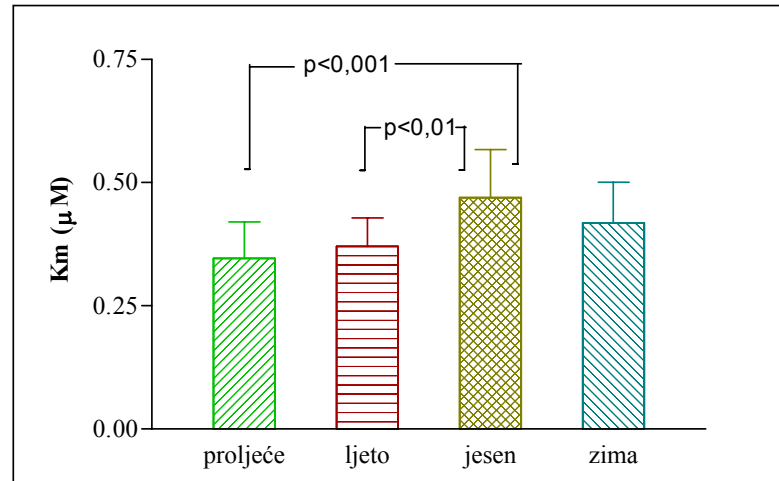
*Vmax/Km: Muškarci N=53; M=355,1; SD=66,79; SEM=9,174.  
 Žene: N=10; M=342,6; SD=52,89; SEM=16,73.*

*t-test: t=0,5590, df=61, p>0,05*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na učinkovitost (Vmax/Km) serotoninskog prijenosnika nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.3.3.3.

#### 4.3.4. UTJECAJ GODIŠNJEG DOBA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA

Ispitivanje cirkumannualnih varijacija kinetskih parametara serotoninskog prijenosnika ( $K_m$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}/K_m$ ) u trombocitima ispitanika provedena su u vremenu od dvadesetak uzastopnih mjeseci. Dobivene vrijednosti grupirane su u 4 skupine prema kalendarskom godišnjem dobu, slika 4.3.4.1, slika 4.3.4.2, slika 4.3.4.3.



**Slika 4.3.4.1. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti  $K_m$  serotoninskog prijenosnika**

$N$ =broj ispitanika;  $M$ =srednja vrijednost;  $SD$ =standardna devijacija;  $SEM$ =standardna pogreška srednje vrijednosti;  $df$ =stupanj slobode (engl. degrees of freedom);  $K_m$ =Michaelisova konstanta.

Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.

Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:

$K_m$ : Proljeće:  $N=15$ ;  $M=0,3463$ ;  $SD=0,0742$ ;  $SEM=0,0191$ .

Ljeto:  $N=18$ ;  $M=0,3712$ ;  $SD=0,05745$ ;  $SEM=0,01354$ .

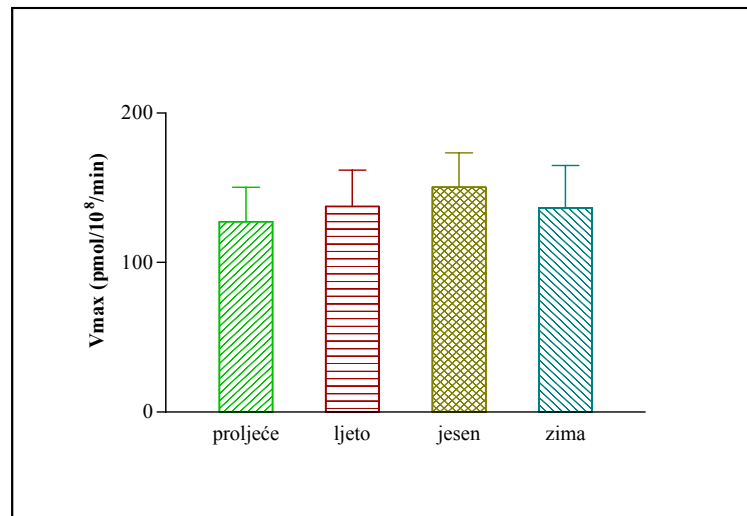
Jesen:  $N=15$ ;  $M=0,4695$ ;  $SD=0,09775$ ;  $SEM=0,0252$ .

Zima:  $N=15$ ;  $M=0,4187$ ;  $SD=0,08250$ ;  $SEM=0,0213$ .

ANOVA test:  $p=0,0003$  ( $p<0,05$ ),  $df=3$ .

Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test: razlike proljeće vs jesen  $p<0,001$ , te ljeto vs jesen  $p<0,01$ .

Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti  $K_m$  (Michaelisove konstante) serotoninskog prijenosnika u proljeće vs jesen (najniže vrijednosti u proljeće,  $p<0,001$ ) i u ljeto vs jesen (niže vrijednosti u ljeto,  $p<0,01$ ).  $K_m$  doseže najviše vrijednosti u jesen, slika 4.3.4.1.



**Slika 4.3.4.2. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Vmax serotoniniskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom) Vmax=maksimalna brzina transportera.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test (bez post hoc testa  $p > 0,05$ ).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

*Vmax Proljeće: N=15; M=127,5; SD=22,75; SEM=5,874.*

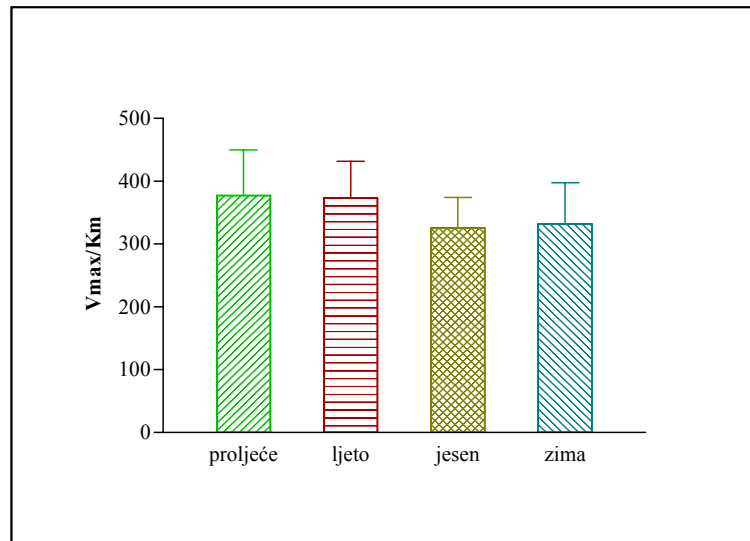
*Ljeto: N=18; M=137,4 SD=24,34; SEM=5,736;*

*Jesen: N=15; M=150,3; SD=22,87; SEM=5,906.*

*Zima: N=15; M=136,6; SD=28,31; SEM=7,310.*

*ANOVA test:  $p=0,0995$  ( $p > 0,05$ ),  $df=3$ .*

Analizom nije je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti Vmax serotoniniskog prijenosnika u odnosu na godišnja doba, slika 4.2.4.1.



**Slika 4.3.4.3. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Vmax/Km serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom); Km=Michaelisova konstanta; Vmax=maksimalna brzina transportera; Vmax/Km=učinkovitost serotoninskog prijenosnika.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Vmax/Km:     Proljeće: N=15; M=377,5; SD=72,48; SEM=18,71.  
                   Ljeto: N=18; M=373,2 SD=58,32; SEM=13,75;  
                   Jesen: N=15; M=325,7; SD=48,51; SEM=12,52.  
                   Zima: N=15; M=332,1; SD=65,54; SEM=16,92.*

*ANOVA test: p=0,0387 (p<0,05), df=3.*

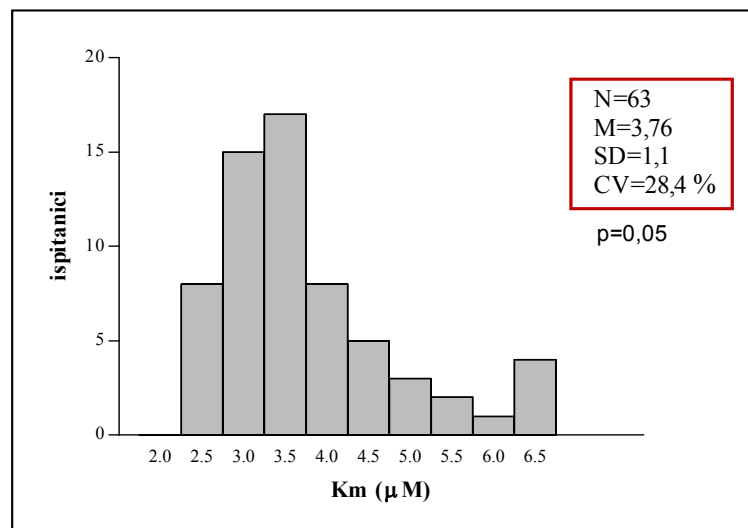
*Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test za sva godišnja doba je p>0,05*

*Analizom nije je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti učinkovitosti (Vmax/Km) serotoninskog prijenosnika u odnosu na godišnja doba, slika 4.3.4.3.*

#### 4.4. TROMBOCITNA MONOAMINOKSIDAZA (MAO – B)

##### 4.4.1. DISTRIBUCIJA FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNE MAO-B

Ispitana je normalnost distribucije frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}/K_m$ ) trombocitne MAO-B, slika 4.4.1.1, slika 4.4.1.2. i slika 4.4.1.3.

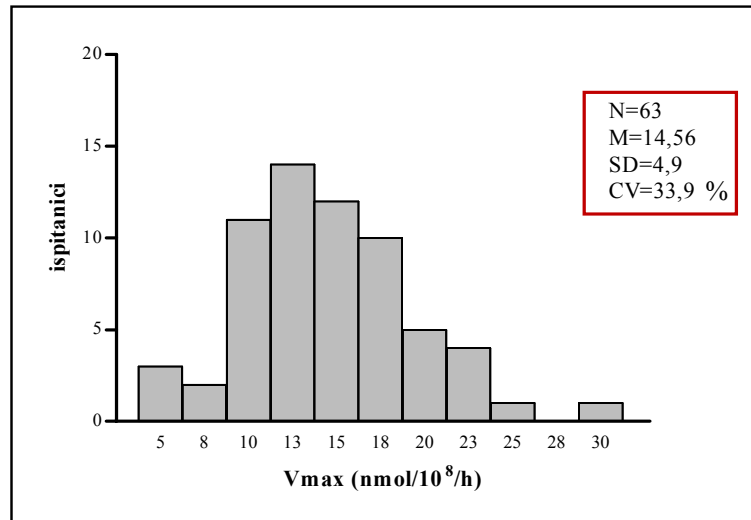


**Slika 4.4.1.1. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti Michaelisove konstante ( $K_m$ )**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti;  $K_m$ =afinitet enzima MAO-B.*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje graničnu asimetričnost raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti  $K_m$  trombocitne MAO-B ( $KS=0,1719$ ;  $p=0,05$ ) u ispitanika, slika 4.4.1.1.



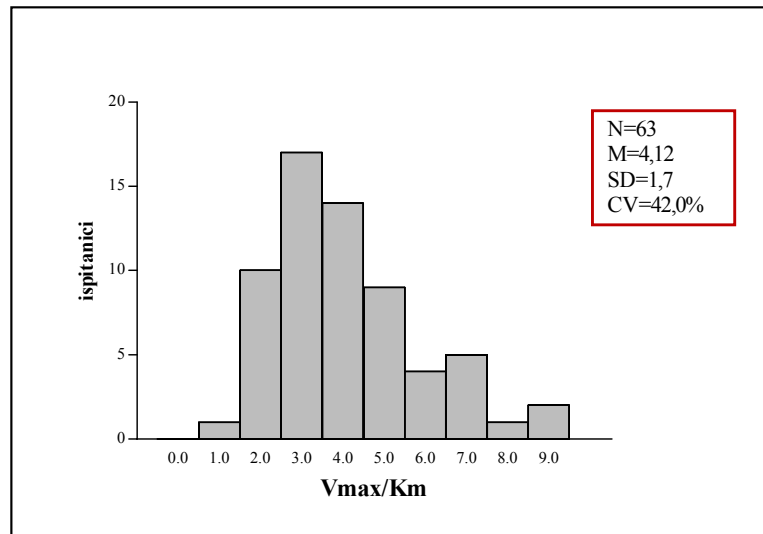
**Slika 4.4.1.2. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti maksimalnih brzina aktivnosti MAO-B (Vmax)**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti; Vmax=aktivnost trombocitne MAO-B.*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika (p) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti Vmax trombocitne MAO-B (KS=0,08176; p>0.10) u ispitanika, slika 4.4.1.2.





**Slika 4.4.1.3. Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti učinkovitosti MAO-B ( $V_{max}/K_m$ )**

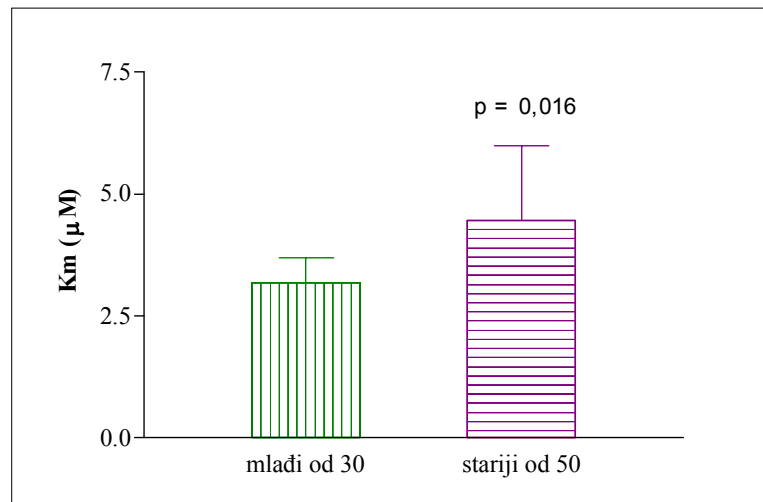
*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti;  $K_m$ =afinitet enzima;  $V_{max}$ =aktivnost MAO-B;  $V_{max}/K_m$ =učinkovitost MAO-B.*

*Za ispitivanje normalnosti distribucije korišten je Kolmogorov-Smirnov (KS) test. Kvantifikacija diskrepance između dobivene distribucije i idealne Gaussove distribucije izražena je kao KS vrijednost. KS vrijednost korištena je za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) primjenom Dallal-Wilkinsonove aproksimacije Lillieforsove metode<sup>197</sup>.*

Distribucijski histogram pokazuje normalan oblik raspodjele frekvencija individualnih vrijednosti  $V_{max}/K_m$  trombocitne MAO-B u ispitanika ( $KS=0,1183$ ;  $p>0,10$ ), slika 4.4.1.3.

#### 4.4.2. UTJECAJ ŽIVOTNE DOBI NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSkih PARAMETARA TROMBOCITNE MAO-B

Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencije individualnih vrijednosti kinetskih parametara tromboцитne MAO-B ( $K_m$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}/K_m$ ) ispitivana je u dvije dobne skupine: ispitanici mlađi od 30 godina i ispitanici stariji od 50 godina, slika 4.4.2.1, slika 4.4.2.2, slika 4.4.2.3.



**Slika 4.4.2.1. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti  $K_m$  tromboцитne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti;  $K_m$ =afinitet enzima.*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je  $t$ -test (unpaired  $t$ -test i  $F$  test).  $t$ =razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike;  $df$ =stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

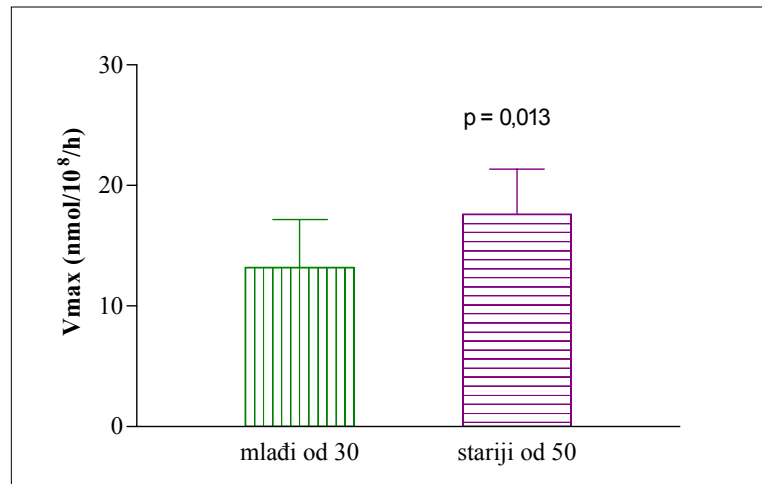
*$K_m$ : Mlađi od 30:  $N=11$ ;  $M=3,181$ ;  $SD=0,510$ ;  $SEM=0,1538$ .*

*Stariji od 50:  $N=12$ ;  $M=4,458$ ;  $SD=1,539$ ;  $SEM=0,4442$ .*

*$t$ -test:  $t=2,619$ ,  $df=21$ ,*

*Razlike: stariji od 50:  $p=0,016$  ( $p<0.05$ )*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na afinitet enzima MAO-B ( $K_m$ ) u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) utvrđene su statistički značajne ( $p=0,016$ ,  $p<0,05$ ) više vrijednosti  $K_m$  u skupini starijih od 50 godina, slika 4.4.2.1.



**Slika 4.4.2.2. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti Vmax trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Vmax= aktivnost MAO-B.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

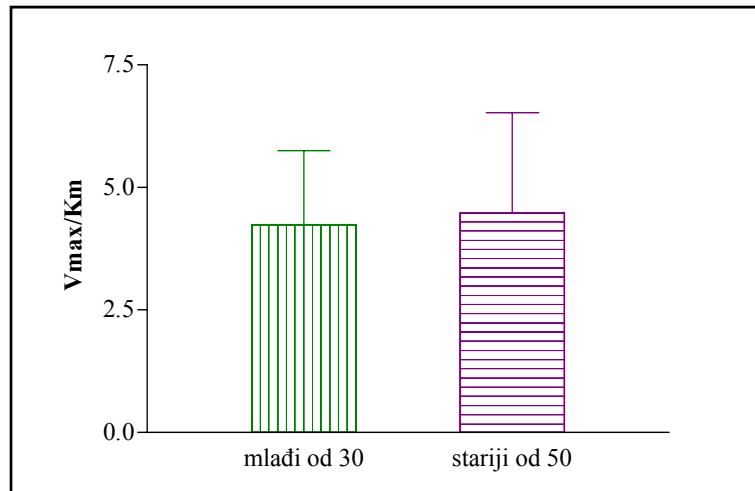
*Vmax: Mlađi od 30: N=11; M=13,20; SD=3,980; SEM=1,200.*

*Stariji od 50: N=12; M=17,58; SD=3,773; SEM=1,089.*

*t-test: t=2,712, df=21,*

*Razlike: stariji od 50: p=0,0131 (p<0.05)*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na aktivnost enzima MAO-B (Km) u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) utvrđene su statistički značajne (p=0,013, p<0,05) više vrijednosti Vmax u skupini starijih od 50 godina, slika 4.4.2.2.



**Slika 4.4.2.3. Utjecaj životne dobi na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti  $V_{max}/K_m$  trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti;  $K_m$ =afinitet enzima;  $V_{max}$ =aktivnost MAO-B;  $V_{max}/K_m$ = učinkovitost MAO-B.*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test).  $t$ =razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike;  $df$ =stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

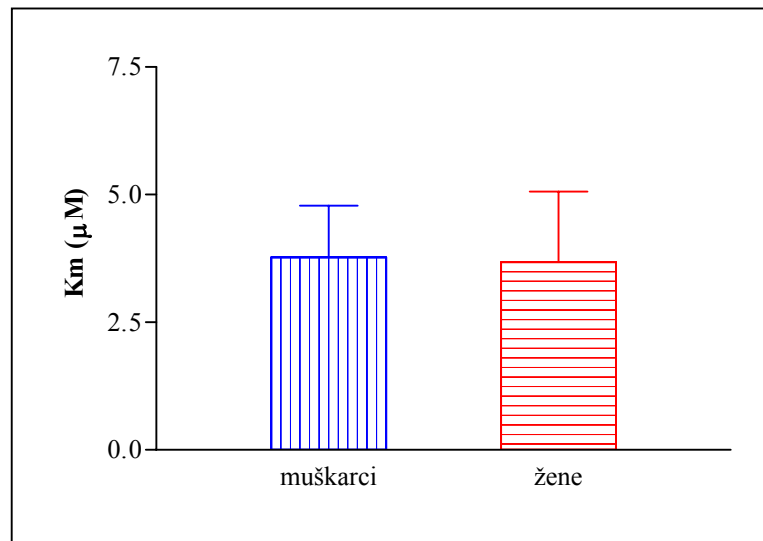
*$V_{max}/K_m$ : Mlađi od 30:  $N=11$ ;  $M=4,234$ ;  $SD=1,513$ ;  $SEM=0,456$ .*

*Stariji od 50:  $N=12$ ;  $M=4,483$ ;  $SD=2,042$ ;  $SEM=0,589$ .*

*t-test:  $t=0,3185$ ,  $df=21$ ,  $p>0,05$*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja životne dobi na učinkovitost trombocitne MAO-B ( $V_{max}/K_m$ ) u dvije dobne skupine (ispitanici mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina) nisu utvrđene statistički značajne razlike, slika 4.4.2.3.

#### 4.4.3. UTJECAJ SPOLA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNE MAO-B



**Slika 4.4.3.1. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti afiniteta (Km) tromboцитne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Km=afinitet enzima.*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

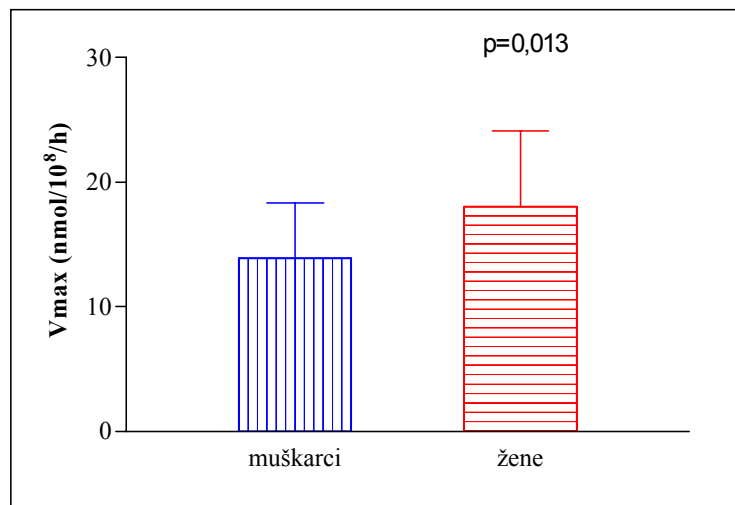
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Km: Muškarci: N=53; M=3,77; SD=1,01; SEM=0,139.*

*Žene: N=10; M=3,68; SD=1,38; SEM=0,437.*

*t-test: t=0,2661, df=61, p>0,05.*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na afinitet tromboцитne MAO-B (Km) nije utvrđena statistički značajna razlika, slika 4.4.3.1.



**Slika 4.4.3.2. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti na aktivnost (Vmax) trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; Vmax=aktivnost MAO-B..*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je t-test (unpaired t-test i F test). t=razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

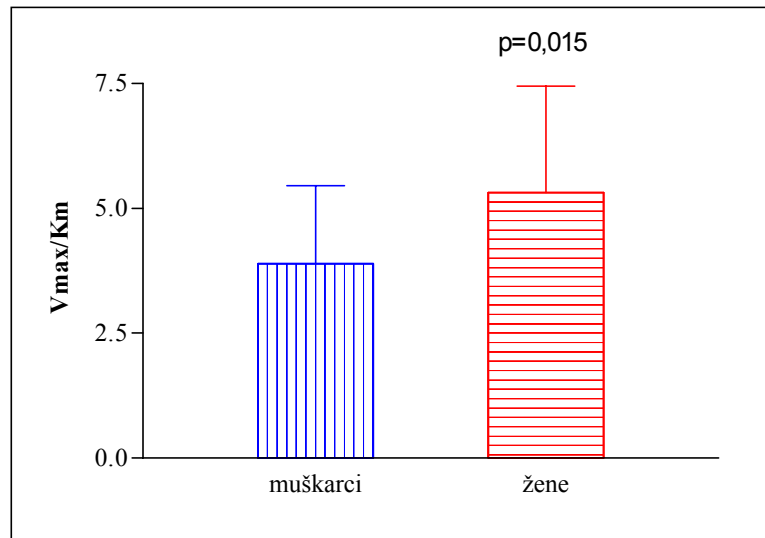
*Vmax: Muškarci N=53; M=13,9; SD=4,46; SEM=0,613.*

*Žene: N=10; M=18,1; SD=6,07; SEM=1,92.*

*t-test: t=2,343, df=21,*

*Razlike: žene: p=0,0130 (p<0.05)*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na aktivnost trombocitne MAO-B (Vmax) utvrđene su statistički značajne (p<0,05) više vrijednosti aktivnosti enzima u žena, slika 4.4.3.2.



**Slika 4.4.3.3. Utjecaj spola na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti na učinkovitost ( $V_{max}/K_m$ ) trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti;  $K_m$ =afinitet enzima;  $V_{max}$ =aktivnost MAO-B;  $V_{max}/K_m$ = učinkovitost MAO-B.*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti dviju skupina korišten je  $t$ -test (unpaired  $t$ -test i  $F$  test).  $t$ =razlika između srednje vrijednosti uzoraka podijeljena sa standardnom pogreškom razlike;  $df$ =stupanj slobode (engl. degrees of freedom).*

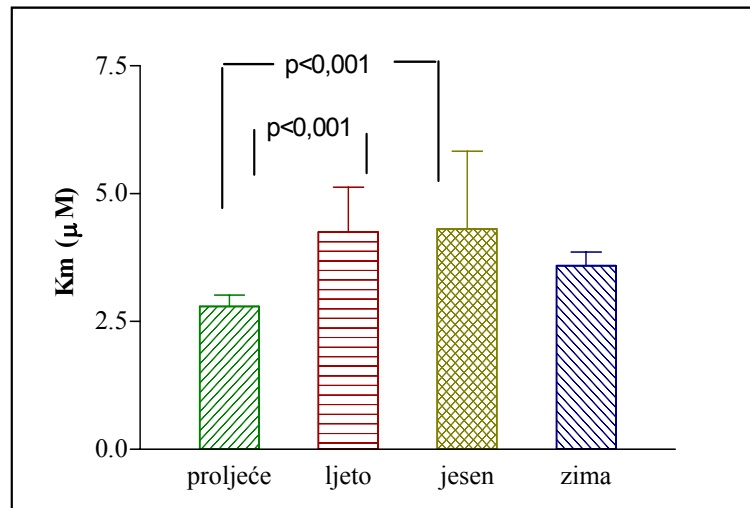
*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:  
 $V_{max}/K_m$ : Muškarci:  $N=53$ ;  $M=3,89$ ;  $SD=1,56$ ;  $SEM=0,215$ . Žene:  $N=10$ ;  
 $M=5,32$ ;  $SD=2,14$ ;  $SEM=0,677$ . Razlike: žene:  $p=0,0155$  ( $p<0.05$ )*

*$t$ -test:  $t=2,491$ ,  $df=21$ ,  
 Razlike: žene:  $p=0,0155$  ( $p<0.05$ )*

Analizom izmjerenih vrijednosti utjecaja spola na učinkovitost trombocitne MAO-B ( $V_{max}/K_m$ ) utvrđene su statistički značajne ( $p<0,05$ ) više vrijednosti učinkovitosti enzima u žena, slika 4.4.3.3.

#### 4.4.4. UTJECAJ GODIŠNJEG DOBA NA DISTRIBUCIJU FREKVENCIJA INDIVIDUALNIH VRIJEDNOSTI KINETSКИH PARAMETARA TROMBOCITNE MAO-B

Ispitivanja cirkumanualnih varijacija vrijednosti kinetskih parametara MAO-B ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}/K_m$ ) u ispitanika provedena su u intervalu od dvadesetak uzastopnih mjeseci. Dobivene vrijednosti grupirane su u 4 skupine prema kalendarskom godišnjem dobu, slika 4.4.4.1, slika 4.4.4.2. i slika 4.4.4.3.



**Slika 4.4.4.1. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti afiniteta enzima ( $K_m$ ) trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom);  $K_m$ =afinitet enzima.*

*Za ocjenu značajnosti razlika ( $p$ ) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

*$K_m$ : Proljeće:  $N=15$ ;  $M=2,789$ ;  $SD=0,2252$ ;  $SEM=0,0581$ .*

*Ljeto:  $N=18$ ;  $M=4,247$ ;  $SD=0,8759$ ;  $SEM=0,2065$ .*

*Jesen:  $N=15$ ;  $M=4,310$ ;  $SD=1,520$ ;  $SEM=0,3924$ .*

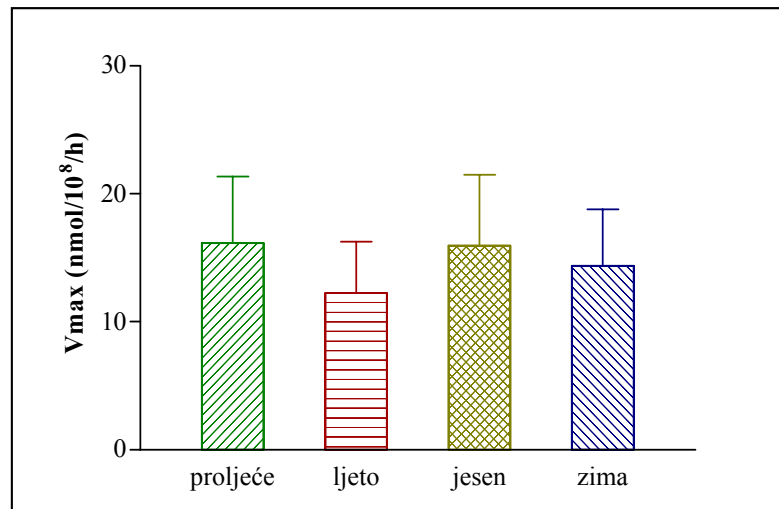
*Zima:  $N=15$ ;  $M=3,592$ ;  $SD=0,2678$ ;  $SEM=0,0691$ .*

*ANOVA test:  $p=0,0001$  ( $p<0,05$ ),  $df=3$ .*

*Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test: razlike proljeće vs ljeto  $p<0,001$ , proljeće vs jesen  $p<0,001$*

Razine statističke značajnosti utvrđene su za smanjeni afinitet ( $K_m$ ) trombocitne MAO-B u proljeće vs ljeto  $p<0,001$  i u proljeće vs jesen  $p<0,001$ .  $K_m$  doseže najviše vrijednosti u jesen, slika 4.4.4.1.





**Slika 4.4.4.2. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti aktivnosti enzima (Vmax) trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom) Vmax=aktivnost trombocitne MAO-B..*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test (bez post hoc testa,  $p > 0,05$ ).*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu  $\pm$  standardna devijacija:*

*Vmax: Proljeće: N=15; M=16,15; SD=5,179; SEM=1,337.*

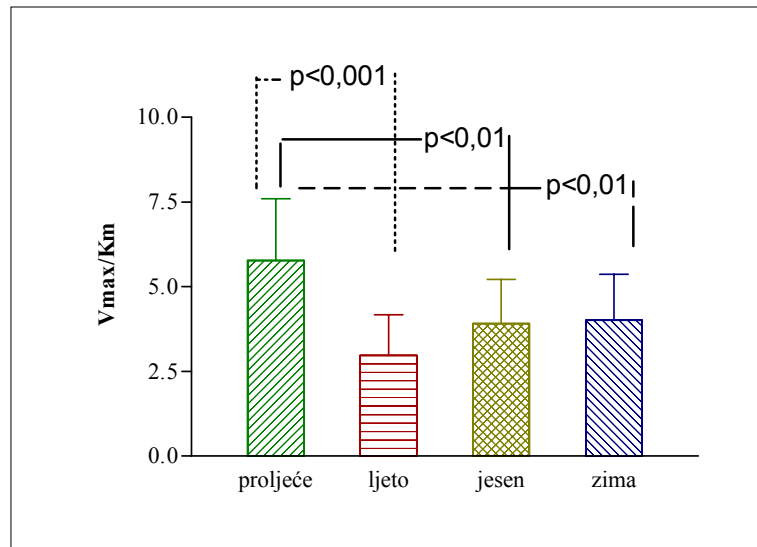
*Ljeto: N=18; M=12,24 SD=3,985; SEM=0,939;*

*Jesen: N=15; M=15,93; SD=5,556; SEM=1,434.*

*Zima: N=15; M=14,37; SD=4,413; SEM=1,139.*

*ANOVA test:  $p=0,0786$  ( $p > 0,05$ ),  $df=3$ .*

Sezonske varijacije aktivnosti MAO-B (Vmax) ne dostižu razinu značajnosti, slika 4.4.4.2.



**Slika 4.4.4.3. Utjecaj godišnjeg doba na distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti učinkovitosti enzima (Vmax/Km) trombocitne MAO-B**

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; SEM=standardna pogreška srednje vrijednosti; df=stupanj slobode (engl. degrees of freedom); Km=afinitet enzima; Vmax=aktivnost MAO-B; Vmax/Km=učinkovitost MAO-B..*

*Za ocjenu značajnosti razlika (p) izmjerenih vrijednosti četiri skupina korišten je One-way ANOVA test s post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison testom.*

*Stupići prikazuju aritmetičku sredinu ± standardna devijacija:*

*Vmax/Km: Proljeće: N=15; M=5,777; SD=1,823; SEM=0,4708.*

*Ljeto: N=18; M=2,981 SD=1,190; SEM=0,2806;*

*Jesen: N=15; M=3,909; SD=1,311; SEM=0,3384.*

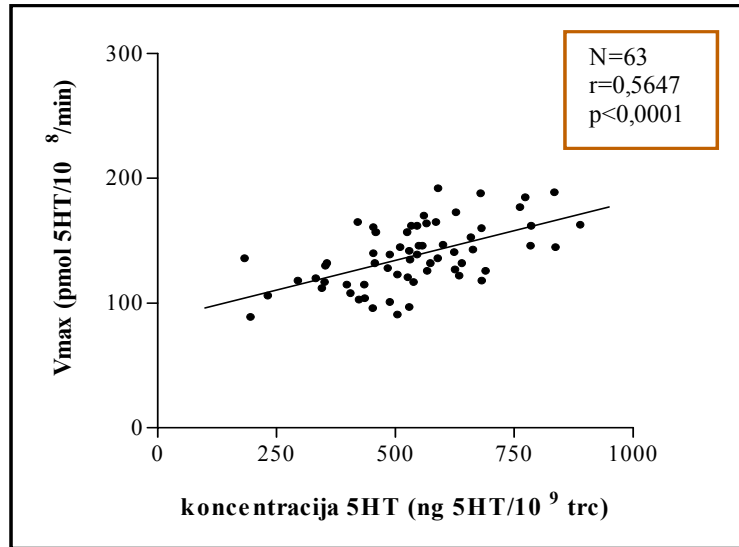
*Zima: N=15; M=4,023; SD=1,340; SEM=0,3461.*

*ANOVA test: p=0,0001 (p<0,05), df=3.*

*Post hoc Tukey-Kramer Multiple Comparison test: razlike proljeće vs ljeto p<0,001, proljeće vs jesen p<0,01 i proljeće vs zima p<0,01.*

Analizom je utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji frekvencija individualnih vrijednosti učinkovitosti enzima (Vmax/Km) u proljeće vs ljeto p<0,001, proljeće vs jesen p<0,01 i proljeće vs zima p<0,01, s najvišim vrijednostima u proljeće, slika 4.4.4.3.

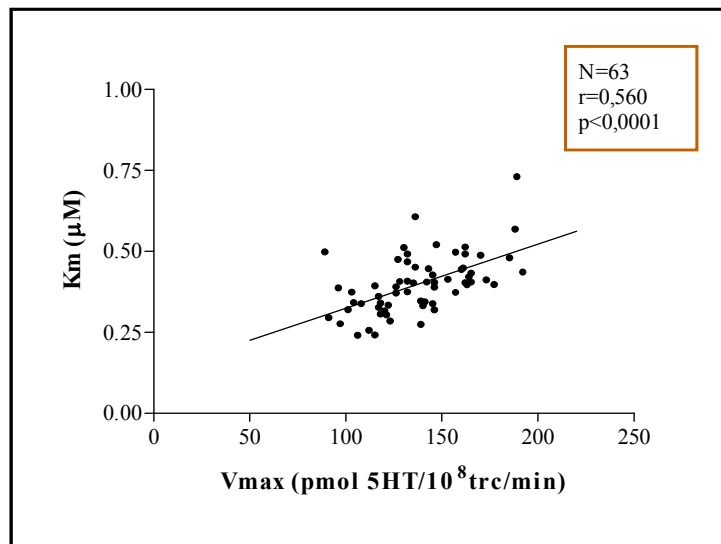
#### 4.5. KORELACIJE ISTRAŽIVANIH KINETSKIH PARAMETARA TROMBOCITNOG 5HT



**Slika 4.5.1. Korelacija između koncentracije trombocitnog serotonina i maksimalne brzine trombocitnog serotoninskog prijenosnika**

*N=broj ispitanika; r=Pearsonov koeficijent korelacije; Vmax=maksimalna brzina unosa serotonina*

Analizom linearne korelacije utvrđena je statistički visoko značajna ( $p < 0,0001$ ) pozitivna povezanost (međuzavisnost) koncentracije trombocitnog serotonina i maksimalne brzine unosa serotonina u trombocite.



**Slika 4.5.2. Korelacija između maksimalne brzine unosa trombocitnog serotoninskog prijenosnika i pripadajućih vrijednosti Michaelisove konstante**

*N=broj ispitanika; r=Pearsonov koeficijent korelacije; Km=Michaelisova konstanta (afinitet prijenosnika); Vmax=maksimalna brzina unosa serotonina*

Analizom linearne korelacije utvrđena je statistički visoko značajna ( $p < 0,0001$ ) pozitivna povezanost (međuzavisnost) maksimalne brzine unosa serotonina u trombocite i afiniteta prijenosnika.

## **5. RASPRAVA**

U uvodnom je dijelu navedeno da se homeostaza serotonina u organizmu sisavaca može promatrati kroz dva metabolički odvojena (krvnomoždanom barijerom) odjeljka: centralni, koji se odnosi na serotonin u središnjem živčanom sustavu i periferni, koji obuhvaća ostala tkiva, naročito enterokromafini sustav crijevne sluznice, te mnogobrojna druga tkiva odnosno organe. U oba spomenuta odjeljka odvija se potpuna metabolička izmjena serotonina od triptofana do konačnih metabolita - poglavito 5-hidroksiindolooctene kiseline (5HIAA)<sup>6,55,56</sup>.

Trombociti posjeduju uz serotonin pohranjen u gustim granulama i neke od serotonergičnih elemenata/proteina koje susrećemo i u mozgu (5HT sinapsi) i u drugim stanicama na periferiji, a to su: serotoninški prijenosnik (5HTt), serotoninški receptor (5HT-2A) i monoaminoksidaza (MAO-B).

Bitna razlika trombocitnog serotoninškog sustava prema onom u mozgu (5HT sinapsi) ili na periferiji (npr. enterokromafine stanice) leži u odsutnosti enzima triptofanhidroksilaze (TPH). Sadržaj trombocitnog serotonina ovisi o aktivnom unosu iz krvne plazme pomoću membranskog serotoninškog prijenosnika<sup>39,82,132,162</sup>.

Istraživanja tijekom posljednjih tridesetak godina pokazala su značajne fiziološke i farmakološke podudarnosti između trombocitnih i sinaptičkih elemenata koje su bile osnovom postuliranja trombocitnog modela u neurobiologiji<sup>83,133,185</sup>. Nedavna molekularnogenetička istraživanja dala su dodatnu potporu trombocitnom modelu činjenicom da je pokazana identična struktura i kodiranost istim genima sinaptičkih i analognih trombocitnih 5HT elemenata: prijenosnika (5HTt), monoaminoksidaze (MAO-B) i receptora (5HT-2A)<sup>31,37,94</sup>.

Osim "modelnog" korištenja trombocita kao potencijalnih pokazatelja analognih 5HT elemenata u serotoninergičnim neuronima (zbog čega su opsežno istraživani u biološkoj psihijatriji), trombociti mogu korisno poslužiti i kao lako dostupni pokazatelji periferne serotoninške homeostaze (npr. porast koncentracije serotonina dobar je pokazatelj prisutnosti aktivnog karcinoidnog

tumora analogno nalazu povišene koncentracije serotoninskog metabolita 5HIAA u mokraći)<sup>68,95,110,152,171</sup>.

Ako se osvrnemo na samu trombocitnu fiziologiju, serotonin ima i tu svoje mjesto budući da pripada izravnim trombocitnim agonistima (slabijim), i što je još važnije, pripada u značajne pojačivače (amplifikatore) trombocitne reakcije<sup>41,42,173</sup>.

Istraživanja trombocitnih serotoninskih elemenata mogu stoga biti od praktičnog značaja za homeostazu kako perifernog (npr. karcinoid) tako i centralnog (npr. depresija) serotoninina, a istraživanja posvećena jednom i drugom aspektu susreću se u literaturi<sup>29,133,134</sup>. Ovdje valja istaknuti da su takova istraživanja u pravilu usmjerena na jedan od trombocitnih serotoninskih parametara npr. na koncentraciju serotoninina u trombocitima ili na kinetiku serotoninskog prijenosnika; ponekad se susreću radovi koji promatraju istovremeno dva parametra dok nismo naišli na istraživanja usmjerena istovremeno na tri trombocitna 5HT elementa. Simultano praćenje nekoliko serotoninskih trombocitnih elemenata omogućilo bi dobivanje komplementarnih podataka o serotoninskoj homeostazi i tako sveobuhvatniji uvid u (pato)fiziologiju tog amina u organizmu. S druge strane omogućilo bi razumijevanje međusobnog odnosa pojedinih 5HT parametara u trombocitu tj. stupanj njihove međuzavisnosti, odnosno neovisnosti, i opravdanosti korištenja sintagme trombocitni 5HT sustav. Ovdje je potrebno naglasiti da se uz veliki broj podataka o trombocitnim 5HT elementima u različitim bolestima i patološkim stanjima, vrlo rijetko susreću radovi posvećeni njihovim fiziološkim aspektima što bi zapravo trebalo predstavljati nužnu polaznu osnovu za patofiziološka istraživanja.

Ovaj smo rad stoga posvetili upravo fiziološkim istraživanjima 5HT elemenata u humanim trombocitima s time da smo u prvom dijelu razradili metodološke pristupe koji omogućuju simultano mjerenje tri parametra: koncentracije trombocitnog serotoninina, kinetike 5HT prijenosnika na trombocitnoj membrani te kinetike trombocitne monoaminoksidaze (MAO-B). Nakon toga nastojali smo opisati fiziološke aspekte ta tri parametra u populaciji zdravih ispitanika, te konačno istražiti potencijalnu intraindividualnu povezanost ta tri trombocitna serotonergična parametra.

## 5.1. METODOLOŠKI ASPEKTI

Pri odabiru načina mjerenja tri navedena parametra, uz uobičajene karakteristike koje pouzdano mjerenje mora zadovoljiti, bilo je potrebno voditi računa o mogućnostima njihovog izvođenja na jednom uzorku krvi, o izbjegavanju vremenskog interferiranja između pojedinih mjerenja te, koliko je to moguće korištenju istog, referentnog oslonca (vrijednosti izražene na broj trombocita, na sadržaj trombocitnog proteina i na volumen krvi) u izražavanju rezultata.

Osnovu za sva određivanja predstavljala je plazma bogata trombocitima (PRP) koja se dobivala centrifugiranjem antikoaguliranog uzorka krvi. Pri tom je korišten ranije opisan postupak centrifugiranja krvi u specifično adaptiranim plastičnim štrcaljkama što je omogućavalo kvantitativnu separaciju PRP<sup>15, 79</sup>. U cilju postizanja pouzdane antikoagulacije korištena je veća količina citratnog antikoagulansa (ACD) od uobičajene<sup>169</sup> i ona je iznosila 20%. Na taj se način, uz pouzdano sprječavanje koagulacije i aktivacije trombocita (koja dovodi do reakcije otpuštanja trombocitnog sadržaja pa tako i serotonina koji je jedan od objekata mjerenja), olakšavalo izdvajanje čiste trombocitne frakcije i istodobno povećavao volumen PRP.

Prije početka specifičnih mjerenja u svakom je uzorku PRP (ali i u ishodnom uzorku pune krvi) određen broj trombocita (automatskim brojačem) čime je osiguran referentni oslonac za izražavanje rezultata. Prosječan broj trombocita bio je u PRP:  $M=332 \times 10^9/\text{mL}$ ,  $SD=87,0$ ,  $CV=26,2\%$  u punoj krvi:  $M=236 \times 10^9/\text{L}$ ,  $SD=58,1$ ,  $CV=24,6\%$ . Prosječan volumen trombocita bio je u PRP:  $M=7,0 \text{ fL}$ ,  $SD=0,8$ ,  $CV=11,7\%$ ; u punoj krvi:  $M=7,1 \text{ fL}$ ,  $SD=0,8$ ,  $CV=10,9\%$ .

Iako se u literaturi kao mjera trombocitne mase susreće i sadržaj trombocitnog proteina te se on koristi umjesto broja trombocita kao referentni oslonac, naše iskustvo daje prednost brojanju trombocita, jer je postupkom separacije PRP moguće zahvatiti i dio leukocitne frakcije (limfociti se po svojim sedimentacijskim karakteristikama praktički ne razlikuju od trombocita). Svako takovo zagađenje leukocitima dodaje lažne proteine masi trombocitnog

proteina te tako izravno utječe na rezultate koji postaju lažno niski. Zagađenje PRP leukocitima, prema našim ranijim istraživanjima, vrlo je varijabilno i individualno specifično. Postoje također velika interindividualna variranja u sedimentranju krvi tj. dobivenom volumenu PRP i njegovom staničnom sastavu te je time utjecaj na točnost rezultata mjerenja trombocitnih 5HT parametara još pogubniji<sup>85</sup>. S druge strane, u analognim eksperimentalnim mjerenjima na štakoru izražavanje na trombocitni protein pokazalo se pouzdanim zbog malih, praktički zanemarivih, interindividualnih varijacija u postupku separacije, volumenu i sastavu PRP, te na taj način i interferiranja leukocitne frakcije<sup>79</sup>.

Simultano određivanje broja trombocita u punoj krvi omogućuje alternativno izražavanje rezultata na jedinični volumen krvi i time šire mogućnosti usporedbe s literaturnim navodima.

### **5.1.1. MJERENJE KONCENTRACIJE TROMBOCITNOG SEROTONINA**

Kao što je u uvodnom dijelu bilo navedeno, trombocitni serotonin predstavlja gotovo ukupni sadržaj serotonina u cirkulaciji, budući da slobodni serotonin u plazmi (kojeg je praktički vrlo teško mjeriti zbog velike opasnosti od "zagađenja" serotoninom otpuštenim iz trombocita u tijeku postupka separacije krvne plazme) čini zanemarujuću količinu koja iznosi manje od 1%.<sup>124</sup> Zbog toga se uzima da trombocitni serotonin odgovara ukupnom serotoninu u krvi što je važno istaknuti pri raspravi metodoloških pristupa mjerenju trombocitnog serotonina<sup>6,42,79</sup>.

Prije rasprave same metodologije mjerenja treba napomenuti da postoje dvije skupine metoda koje se razlikuju prema objektu mjerenja. Jedna metoda obuhvaća mjerenje koncentracije serotonina u cirkulaciji tj. koncentracije amina u jediničnom volumenu krvi<sup>34,36</sup> ili njenih derivata u serumu<sup>65,92</sup>, odnosno plazmi bogatoj trombocitima<sup>17</sup> i druga metoda prema kojoj se mjeri koncentracija (razina) serotonina u trombocitima koristeći ili izražavanje na



jedinični broj trombocita ili na jediničnu masu trombocitnog proteina kao pokazatelja trombocitne mase, odnosno trombocitnog broja.<sup>4,196</sup>

Od biokemijskih metoda mjerenja najčešće se koriste spektrofotofluorimetrija (SPF) i tekućinska kromatografija visokog učinka (HPLC)<sup>6,54,158</sup>. Obje metode u potpunosti zadovoljavaju svojom osjetljivošću (trombociti sadrže relativno visoke koncentracije serotonina - reda mikrograma u mjenom uzorku). Metoda HPLC se, osim toga, odlikuje visokom specifičnošću ali je znatno dugotrajnija, zahtijeva specifičnu pripremu uzorka i ekonomski zahtjevnija. Nasuprot tome, metoda SPF je brža i stoga prikladnija za serijska određivanja. Kada je riječ o tkivima u kojima se odvija metabolizam serotonina (moždano tkivo, crijevna sluznica) HPLC je metoda izbora budući da ona dobro razlučuje 5-hidroksi indole (5HTP, 5HT, 5HIAA). Trombociti ne sadrže triptofan-hidroksilazu već serotonin nakupljaju unosom iz okolne plazme tako da problem interferencije otpada. Zbog navedenih prednosti, u našem istraživanju smo se odlučili za primjenu spektrofotofluorimetrijske metode.

U zaključku možemo navesti da se fluorimetrijsko određivanje serotonina u trombocitnom talogu i izražavanje njegove koncentracije na broj trombocita pokazalo prikladnim i pouzdanim postupkom, a simultano određivanje broja trombocita u punoj krvi omogućilo je i izražavanje rezultata kao sadržaj serotonina po jediničnom volumenu krvi. Postupke izražavanja sadržaja serotonina po jediničnom volumenu PRP ili po jediničnom volumenu krvnog seruma smatramo neprikladnim zbog varijabilnosti u sastavu tih krvnih sastojaka i praktičnom nemogućnosti usporedbe rezultata s literaturnim navodima.

### 5.1.2. MJERENJE KINETIKE TROMBOCITNOG 5HT PRIJENOSNIKA

Serotoninski prijenosnik u trombocitnoj membrani pripada u skupinu prijenosnih proteina čija se aktivnost opisuje parametrima saturacijske kinetike  $K_m$  i  $V_{max}$ . Brzina transporta supstrata, u ovom slučaju prijenosa (unosa) serotonina kroz trombocitnu membranu, zavisi o koncentraciji supstrata u neposrednoj okolini transportera. S porastom koncentracije supstrata brzina unosa raste, ali taj porast nije linearan nego eksponencijalan.

Afinitet transportera za supstrat ( $A=1/K_m$ ) određuje područje koncentracija u kojem transportni protein optimalno funkcioniše, te je i pri mjerenju njegove kinetike važno pravilno odabrati raspon koncentracija supstrata u kojem će se mjerenje provesti. Uobičajeno je uzeti nekoliko koncentracija ispod  $K_m$  (koncentracija supstrata kod koje prijenosnik pokazuje pola od maksimalne brzine prijenosa tj.  $\frac{1}{2} V_{max}$ ) i nekoliko koncentracija iznad  $K_m$  kako bi se što bolje pokrilo najvažnije područje kinetske hiperbole<sup>165</sup>. Idealno bi bilo odmaknuti se što dalje od  $K_m$ , s jedne strane u područje vrlo niskih koncentracija (gdje je samo mjerenje brzine tj. količine unesenog markiranog serotonina vrlo teško zbog niske koncentracije radioaktivnosti koja se mjeri), a s druge strane, trebalo bi se što je moguće više približiti maksimalnoj brzini –  $V_{max}$  (što je opet vezano s velikim utroškom vrlo skupog radioaktivno obilježenog supstrata).

U našem smo istraživanju, na temelju prethodnih mjerenja, odabrali prilično široki raspon koncentracija od 150 do 2.000 nM  $^{14}C$ -5HT koji je i u ranijim istraživanjima dao u potpunosti zadovoljavajuće rezultate.<sup>15,84</sup>

Također je potrebno optimizirati dužinu vremenskog intervala u kojemu se odvija aktivni unos (vrijeme inkubacije). Dobro je mjeriti i početne brzine unosa, međutim, tijekom previše kratkih vremena inkubacije internaliziraju se vrlo male količine obilježenog supstrata koje je teško pouzdano mjeriti. S druge strane, previše dugi vremenski interval inkubacije može "iscrpiti" sadržaj serotonina iz inkubacijske smjese i dovesti do pada koncentracije supstrata pri koncu mjerenja, što nije dopustivo budući da brzina unosa izravno ovisi o

koncentraciji supstrata te bi njen pad doveo do lažno niskih vrijednosti brzine kod određene koncentracije.<sup>33,62,73,122</sup>

Kako bismo precizno izmjerili samo količinu internaliziranog serotonina (tj. onog koji je prošao kroz transporter čiju brzinu mjerimo) potrebno je korištenjem tzv. «prazne» probe (engl. blank) odbiti radioaktivnost koja potječe od serotonina vezanog na površinu trombocita ili na materijal samih GF filtera. Praznu probu određujemo kod niskih temperatura jer na oko 0 °C prijenosnik nije aktivan i nema unosa serotonina u trombocite. Izmjerena vrijednost prazne probe odražava iznos zaostale radioaktivnosti koja nije u odnosu sa transporterom. Opetovanim ispiranjem u kombinaciji s dobrom vakuum-filtracijom uspjeli smo postići da u čitavom rasponu koncentracija iznos prazne probe iznosi manje od 12% od iznosa mjerenja u odgovarajućem eksperimentalnom uzorku.

Linearizacija kinetskih krivulja provedena je primjenom transformacije po Eadie-Hofstee-u<sup>165</sup>. U literaturi se uz ovu transformaciju koriste i linearizacije po Hanes-u i Lineweaver-Burk-u<sup>98,100,165</sup>. Odabrali smo transformaciju po Eadie-Hofstee-u jer ona zadržava približno jednakomjerne razmake između točaka na transformacijskom pravcu tj. daje podjednaku težinu mjerenjima u čitavom rasponu koncentracija. Primjenom transformacije po Lineweaver-Burku dolazi do “kondenzacije” točaka u području viših koncentracija, a primjenom linearizacije po Hanesu do analognog zgušnjavanja točaka na pravcu u području niskih koncentracija supstrata.

Učinkovitost serotoninskog prijenosnika određena je njegovim kinetskim parametrima: maksimalnom brzinom  $V_{max}$  i Michaelis-ovom konstantom  $K_m$  (koja predstavlja iznos koncentracije supstrata kod koje se postiže polovica maksimalne brzine unosa). Afinitet prijenosnika prema supstratu -  $A$  - definiran je kao recipročni iznos Michaelis-ove konstante  $K_m$  tj.  $A=1/K_m$ , pa tako možemo reći da učinkovitost transportera ovisi o maksimalnoj brzini prijenosa ( $V_{max}$ ) i afinitetu prema supstratu ( $A$ ). Na taj način, kao mjeru efikasnosti (učinkovitosti) transportera, možemo uzeti umnožak  $V_{max} \times A$ , odnosno,  $V_{max} \times 1/K_m$  tj. skraćeno  $V_{max}/K_m$ . Taj kinetski produkt  $E=V_{max}/K_m$  koristi

se u kinetskim mjerenjima kao sintetski parametar učinkovitosti prijenosnika koji omogućuje izravnu usporedbu između različitih transportnih proteina (npr. na trombocitima čovjeka u odnosu na trombocite štakora)<sup>121,165</sup>.

### **5.1.3. MJERENJE KINETIKE TROMBOCITNE MONOAMINOKSIDAZE (MAO-B)**

Aktivnost trombocitne MAO-B može se mjeriti na više načina: u literaturi se susreću mjerenja potrošnje kisika, nestajanja aaminskog supstrata odnosno mjerenja stvaranja produkta. Od metoda za određivanja koriste se spektrofotometrija, spektrofotofluorimetrija izravno UV mjerenje, bioluminiscencija, HPLC, te radioenzimske metode<sup>88,172,188</sup>.

Mi smo odabrali spektrofotofluorimetriju 4-hidroksikinolina (4-HQ), kao produkta enzimske reakcije uz kinuramin kao supstrat, koristeći nešto modificiranu metodu opisanu u literaturi i razvijanu u ovom laboratoriju<sup>108,117</sup>. Kao supstrat korištena je plazma bogata trombocitima.

Kad je riječ o izvoru trombocitne MAO u literaturi se koriste puna krv, plazma bogata trombocitima ili trombocitni talog<sup>45,172</sup>. Kako smo i za dva ranije spominjana mjerenja (trombocitnog serotonina i kinetike serotoninskog prijenosnika) koristili plazmu bogatu trombocitima ona je rabljena i u ispitivanju MAO. Pri korištenju trombocitnog taloga, pokazano je da primjena ultrazvuka za njegovu homogenizaciju (tj. ultrasonikacija) nepovoljno utječe na afinitet enzima prema supstratu (lažno visoki Km u odnosu na mjerenja na intaktnim trombocitima). Budući da puna krv predstavlja vrlo heterogenu mješavinu opterećenu velikom količinom balastnog materijala njeno ispitivanje nam nije bilo prikladno. Mjerenje vrijednosti MAO u punoj krvi bi eventualno moglo biti korišteno kada bi se i trombocitni serotonin paralelno određivao mjerenjem u punoj krvi (npr. metodom HPLC)<sup>172</sup>.

U pogledu korištenog supstrata važno je napomenuti da trombociti predstavljaju jedno od rijetkih tkiva koje sadrži samo izoenzim B<sup>47</sup>. Zbog toga

pri mjerenju nije nužna primjena MAO-B specifičnog supstrata kao npr. beta-feniletilamina ili benzilamina. Kinuramin, koji je nespecifičan u tom pogledu, što nije bitno, nije podložan deaminaciji plazmatskom aminoksidazom što je ključno kad radimo s PRP-om<sup>108,117</sup>. Osim toga, jednostavna spektrofotofluorimetrijska metoda pokazuje dovoljnu osjetljivost za pouzdano mjerenje produkta enzimske reakcije 4-OH kinolina u uzorcima humane plazme bogate trombocitima.

U većini istraživanja koja susrećemo u literaturi aktivnost trombocitne MAO određuje se kao brzina enzima kod samo jedne koncentracije supstrata<sup>186</sup>. Puna kinetska analiza koju smo odabrali u našem radu, osim pouzdanijeg rezultata mjerenja, daje i specifične vrijednosti oba kinetska parametra  $V_{max}$  i  $K_m$ . U nekim patofiziološkim stanjima može osim promjene brzine samog enzima biti zahvaćen i njegov afinitet prema supstratu (tj.  $1/K_m$ ) što možemo otkriti jedino detaljnom kinetskom analizom<sup>9,29,160,161,179</sup>.

Na kraju, možemo sumarno reći da korištenjem jednog uzorka venske krvi od 16 mL (+ 4mL antikoagulansa) možemo provesti određivanje tri trombocitna serotoniniska parametra: koncentracije trombocitnog serotoninina, pune kinetike trombocitnog serotoniniskog prijenosnika i pune kinetike trombocitne monoaminoksidaze (MAO-B). U sva tri slučaja primijenili smo izražavanje rezultata na jedinični broj trombocita. Simultanim određivanjem broja trombocita u punoj krvi i izražavanjem rezultata na jedinični volumen krvi željeli smo postići bolju usporedivost s različitim pristupima koji se susreću u literaturi. U pogledu vremenskog rasporeda određivanja, prioritet ima određivanje kinetike prijenosnika (koje mjerenje mora biti izvršeno u roku od nekoliko sati od uzimanja uzorka krvi) i određivanje broja trombocita (u PRP i punoj krvi) koje treba provesti istog dana. Određivanje koncentracije trombocitnog serotoninina i aktivnosti trombocitne MAO može se provesti kasnije, jer smo pokazali da čuvanje zamrznutih uzoraka trombocitnih taloga, odnosno PRP, tijekom 2-3 tjedna ne utječe na rezultate mjerenja<sup>79, 82,84,85</sup>.

## 5.2. FIZIOLOŠKI ASPEKTI TROMBOCITNIH 5HT ELEMENATA

### 5.2.1. FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KONCENTRACIJE (RAZINE) TROMBOCITNOG SEROTONINA

#### 5.2.1.1. *Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije (razine) trombocitnog/cirkulatornog serotonina*

Distribucija koncentracije serotonina istražena je u trombocitima ispitivane populacije zdravih dobrovoljnih davatelja krvi. U našim ispitivanim uzorcima izmjerili smo prosječnu vrijednost koncentracije trombocitnog serotonina  $M=537 \pm 150,7$  ng/ $10^9$  trombocita sa  $CV=28,1\%$ , odnosno cirkulatornog  $M=174 \pm 63,4$  ng/mL krvi uz  $CV=36,4\%$  ( $M$ =srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija;  $CV$ =koeficijent varijabilnosti), *slika 4.2.1.1., tablica 5.*

Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije serotonina u cirkulaciji ispitanika pokazuje normalnu raspodjelu, odnosno nešto užu distribuciju. Vrijednosti ispitivanog serotonina u cirkulaciji iznosile su prosječno  $M=174 \pm 63,4$  ng/mL pune krvi, što je sukladno objavljenim rezultatima drugih autora, uz naše nešto niže vrijednosti koeficijenta varijabilnosti  $CV=36,4\%$ , *slika 4.2.1.2., tablica 5.*

**Tablica 1. Usporedba literaturnih podataka koncentracije trombocitnog / cirkulatornog serotonina (5HT) i rezultati ovog rada**

Reference	N	5HT u trombocitima (ng 5HT/ $10^9$ trc)	5HT u cirkulaciji (ng/mL pune krvi)
Belendiuk i sur. (1980)	51	$730 \pm 300$	-
Zeller i sur (1983)	60	$589 \pm 402$	-
Guicheney (1988)	88	$640 \pm 164$	-
Ortiz i sur (1988)	75	$711 \pm 319$	$187 \pm 78$ n
Antony i Lance (1989)	35	474	-
Comings (1990)	71	-	$98 \pm 41$ n
Flachaire i sur. (1990)	56	$670 \pm 164$	-
Cook i sur. (1993)	98	-	$181 \pm 53$
Pattichis (1994)	34	-	$312 \pm 284$
<b>Ovaj rad</b>	<b>63</b>	<b><math>537 \pm 150</math></b>	<b><math>174 \pm 63,4</math></b>

Vrijednosti u Tablici 1 izražene su kao koncentracija (razina) 5HT po trombocitima – na jedinični broj trombocita (ng 5HT/10<sup>9</sup> trc) ili kao koncentracija (razina) 5HT u cirkulaciji – na jedinicu volumena pune krvi (ng/mL pune krvi). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD (standardna devijacija), uz broj ispitanika (N) za svaku studiju. Uključene su samo studije koje su provele ispitivanje na većim grupama (N>30).

Literaturni podaci srednje vrijednosti distribucije frekvencija individualnih vrijednosti koncentracije trombocitnog serotonina kreću se u rasponu od 474 do 730 ng 5HT/10<sup>9</sup> trombocita, odnosno 98 do 312 ng 5HT/mL u cirkulaciji. Usporedbom naših rezultata sa literaturnim podacima utvrđeno je njihovo dobro uklapanje (*tablica 1*).

### **5.2.1.2. Utjecaj životne dobi na koncentraciju (razinu) trombocitnog serotonina**

Zavisnost koncentracije trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina o životnoj dobi ispitalo je više autora. Uprkos razlikama u dobnim skupinama ispitanika ili načina izražavanja rezultata, u većini radova se navodi manji pad koncentracije trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina s porastom životne dobi <sup>7,54,65,68</sup>. U drugim radovima nije potvrđena značajnost utjecaja dobi <sup>17,92</sup>. Naše ranije studije na štakoru nisu potvrdile utjecaj dobi na razinu trombocitnog serotonina <sup>80</sup>. Prema podacima iz naše nedavne studije na velikom uzorku zdrave populacije <sup>85</sup> i prema rezultatima ispitivanja iz ovog rada, možemo zaključiti da prisutnost ili odsutnost značajnosti utjecaja životne dobi na razinu trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina zavisi o odabiru dobnih intervala koji se promatraju (podjela malog broja ispitanika u veći broj razreda s manjim rasponom životne dobi) <sup>17,92</sup>.

Naše ispitivanje je provedeno u 63 zdravih dobrovoljnih darivatelja krvi oba spola: 10 žena i 53 muškaraca, prosječne životne dobi od 41 godina (raspon od 21 do 67; M=41; SD=10,4) u razdoblju od 18 mjeseci. U ovom radu smo ispitanike podijelili u dvije ekstremne dobne skupine (mlađi od 30 i stariji od 50 godina). Prema dobivenim podacima uočena je tendencija padu vrijednosti koncentracije trombocitnog serotonina u starijoj životnoj dobi, *slika 4.2.2.1.*, dok nema razlike u koncentraciji serotonina u cirkulaciji u odnosu na dob ispitanika, *slika 4.2.2.2.*

### **5.2.1.3. Utjecaj spola na koncentraciju (razinu) trombocitnog serotonina**

Literaturni podaci o utjecaju spola na razinu trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina mogu se podijeliti na studije u kojima se ne potvrđuje utjecaj spola<sup>10,54,137</sup> i na studije u kojima je prikazana tendencija ka višim vrijednostima u žena<sup>7,184</sup> ili su dobivene statistički značajne razlike prema spolu u korist žena<sup>34,65,68,124</sup> s izuzetkom jedne studije sa višim vrijednostima u muškaraca<sup>112</sup>.

U ovom radu nismo dobili značajnu razliku u odnosu na spol, iako je uočena blaga tendencija ka višim vrijednostima koncentracije trombocitnog serotonina u žena, *slika 4.2.3.1*. Nema statistički značajne razlike niti u koncentraciji cirkulatornog serotonina u odnosu na spol ispitanika, *slika 4.2.3.2*.

Naše ispitivanje je provedeno u 63 uzoraka krvi zdravih dobrovoljnih davatelja krvi oba spola: 10 žena (15,8%) i 53 muškarca (84,2%). Broj ispitanika ženskog spola u ovom radu izravno je bio ovisan o odnosu zastupljenosti žena i muškaraca među dobrovoljnim davateljima krvi u Zagrebu – 85% muškaraca i 15% žena<sup>11</sup>. Moguće je da bi, u jednako velikoj grupi ispitanika oba spola, uočena mala razlika među spolovima mogla doseći razinu statističke značajnosti, što može i objasniti razliku u literaturnim podacima.

Dobiveni podaci u ovom radu odgovaraju našim rezultatima iz ranijih studija na štakorima gdje je također uočena tendencija ka višim vrijednostima trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina u ženki štakora, što nije bilo prisutno u štakorima prepubertetne dobi<sup>32</sup>.

### **5.2.1.4. Cirkummanualne varijacije koncentracije (razine) trombocitnog serotonina**

Analiza rijetkih literaturnih podataka o varijacijama koncentracije trombocitnog/cirkulatornog serotonina zavisno o godišnjem dobu bila je otežana radi razlika u promatranim vremenskim intervalima u studijama različitih autora.



Istraživanja u ovom radu provedena su u vremenskom intervalu u od dvadesetak uzastopnih mjeseci s mjerenjem 5HT vrijednosti u svih 63 ispitanika. Izmjerene vrijednosti koncentracije trombocitnog/cirkulatornog serotonina grupirane su u sezonske periode i prikazane kao srednje vrijednosti za sva 4 godišnja doba. Na *slici 4.2.4.1.* prikazana je tendencija ka nižim vrijednostima serotonina u trombocitima u proljeće u odnosu na vrijednosti izmjerene u drugim godišnjim dobima. Statistički značajna varijacija koncentracije cirkulatornog serotonina javlja se u odnosu proljeće vs jesen ( $p < 0,001$ ; u jesen doseže najviše vrijednosti) i jesen vs zima ( $p < 0,01$ ), *slika 4.2.4.2.*

Prema našem mišljenju, primijećene varijacije uzrokovane su veličinom uzorka ispitanika koji je za takvo ispitivanje bio relativno malen. Možemo napomenuti da cirkumannualna varijacija koncentracije 5HT prati varijaciju broja i volumena trombocita u 4 godišnja doba, *slika 4.14.1. i slika 4.1.4.2.*

Sumarno možemo reći da koncentracija (razina) trombocitnog/cirkulirajućeg serotonina u zdravih ispitanika pokazuje normalnu raspodjelu uz nešto užu distribuciju u trombocitima ( $CV=28,1\%$ ). Nema značajne razlike u koncentraciji cirkulatornog serotonina u odnosu na dob (postoji tendencija padu vrijednosti koncentracije trombocitnog serotonina u starijoj životnoj dobi). Isto tako, uočena je tendencija ka višim vrijednostima trombocitnog i cirkulatornog serotonina u žena, bez statističke značajnosti. Utvrđena je značajna varijacija koncentracije cirkulatornog serotonina u proljeće vs jesen ( $p < 0,001$ ; u jesen doseže najviše vrijednosti) te u jesen vs zima ( $p < 0,01$ ). Ritmika cirkumannualnih varijacija koncentracije cirkulatornog 5HT prati varijaciju broja trombocita ( proljeće vs jesen  $p < 0,05$ ) i volumena trombocita (ljetno vs zima  $p < 0,01$ ).

## 5.2.2. FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KINETIKE TROMBOCITNOG SEROTONINSKOG PRIJENOSNIKA (5HTt)

### 5.2.2.1. *Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika*

U literaturi se fiziološke vrijednosti parametara serotoninskog prijenosnika obično navode kao vrijednosti kontrolne skupine pri patofiziološkim ili farmakološkim istraživanjima.

U ovom istraživanju raspodjele individualnih vrijednosti kinetskih parametara (Km, Vmax i Vmax/Km) je normalna. Srednja vrijednost Km iznosila je 0,400 nM  $\pm$  0,1 uz CV=22,4%. Mjerenjem vrijednosti Vmax u populaciji dobivena je srednja vrijednost 138 pmol <sup>14</sup>C-5HT/10<sup>8</sup>trc/min uz standardnu devijaciju od 25,4 i CV=18,4%. Vmax/Km iznosio je 353  $\pm$  64,4 uz CV=18,3%; *slika 4.3.1.1, slika 4.3.1.2 i slika 4.3.1.3 i tablica 5.*

Uporedbom naših rezultata i literaturnih podataka uočava se njihova dobra podudarnost s rezultatima autora koji su istraživanja proveli na većim populacijama i uz drugačije metodološke pristupe<sup>98,110</sup>, *tablica 2.*

**Tablica 2. Usporedba vrijednosti kinetskih parametara aktivnosti unosa trombocitnog 5HT raznih autora i vrijednosti dobivene u ovom radu.**

Reference	N	Vmax (pmol/10 <sup>8</sup> trc/min)	Km (nM)
Omen i sur.(1987)	54	102 $\pm$ 10	400,0 $\pm$ 20
Arora i sur (1981)	-	107 $\pm$ 21	450 $\pm$ 90
Malmgren (1981)	25	130 $\pm$ 11	1050 $\pm$ 110
Lingjaerde (1984)	70	106	550
Bastani i sur (1991)	53	122 $\pm$ 26	450 $\pm$ 120
Meltzer i Arora (1991)	160	125 $\pm$ 29	470 $\pm$ 13
Maguire i sur (1993)	30	117 $\pm$ 56,1	1160 $\pm$ 510
Ravindran i sur (1994)	22	105 $\pm$ 15	750 $\pm$ 190
<b>Ovaj rad</b>	<b>63</b>	<b>138 <math>\pm</math> 25,4</b>	<b>400 <math>\pm</math> 10</b>

(N = broj ispitanika, Vmax = maksimalna brzina unosa 14C-5HT, Km = Michaelisova konstanta. Uz srednje vrijednosti kinetskih parametara navedena je vrijednost standardne devijacije)

### **5.2.2.2. Utjecaj životne dobi na vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika**

Utjecaj životne dobi na vrijednosti kinetskih parametara ispitan je na skupini ispitanika, dobrovoljnih davatelja krvi, oba spola, prosječne životne dobi od 41 godina (raspon od 18 do 65; M=41 g; SD=10,4). U ovom radu smo ispitanike podijelili u dvije ekstremne dobne skupine - mlađi od 30 i stariji od 50 godina. U našim ranijim istraživanjima pojedinih parametara ispitanike smo razvrstavali u razrede užih dobnih rasponai i nismo uočili zavisnost 5HTt u odnosu na dob<sup>15,82,84,85,117</sup>. S obzirom da su uzorci krvi uzimani od dobrovoljnih darivatelja krvi ispitanici su bili u dobnom rasponu od 18 do 65 godina.

Maksimalna brzina (Vmax) trombocitnog serotoninskog prijenosnika pokazuje statistički značajan pad ( $p < 0,05$ ) u starijoj životnoj dobi, *slika 4.3.2.2*.

Učinkovitost serotoninskog prijenosnika određena je njegovim kinetskim obilježjima i to maksimalnom brzinom unosa (Vmax) i afinitetom prijenosnika ( $1/Km$ ). Kinetski parametri Km i Vmax se u fiziološkim uvjetima homeostatski kompenziraju i stoga ih prije donošenja zaključaka treba promatrati zajedno s učinkovitosti Vmax/Km. Kinetski parametri Km i Vmax serotoninskog prijenosnika izravno su proporcionalnom odnosu s njegovom učinkovitosti (Vmax/Km). Veća maksimalna brzina osigurava proporcionalno veći prijenosni učinak, a tako i viši afinitet prijenosnika za supstrat rezultira ukupno većim prijenosom kroz membranu. Efikasnost prijenosnika je maksimalna brzina kod koncentracije supstrata koji odgovara Km. U našem radu utvrdili smo niže vrijednosti Km (bez statističke značajnosti) i značajno niže vrijednosti Vmax u starijoj dobnoj skupini što se kompenzira s efikasnošću (Vmax/Km) koja se ne mijenja značajno s dobi.

Prema većini autora kinetika prijenosa serotonina ne ovisi o dobi. Taj je nalaz koristan za patofiziološka istraživanja jer otklanja utjecaj dobi kao izvor mogućih razlika u rezultatima, odnosno potencijalne razlike koje se nađu u patofiziološkim ispitivanjima ne bi mogle biti pripisane eventualnoj razlici dobi

ispitanika u određenim dobnim rasponima. Međutim, nekoliko autora spominje tendenciju pada vrijednosti  $V_{max}$  s rastućom životnom dobi, tendenciju porasta  $K_m$  s dobi, odnosno porastu  $V_{max}$  s dobi<sup>30,120</sup> što zahtijeva obvezno razmatranje značaja tog parametra pri patofiziološkim ispitivanjima.

### **5.2.2.3. Utjecaj spola na vrijednosti kinetskih parametara trombocitnog serotonininskog prijenosnika**

Naše ispitivanje je provedeno u 63 uzoraka krvi zdravih dobrovoljnih davatelja krvi oba spola: 10 žena (15,8%) i 53 muškaraca (84,2%).

Rezultati upućuju na odsutnost statistički značajnih razlika u odnosu na spol kod oba kinetska parametra  $V_{max}$  i  $K_m$ , *slika 4.3.3.1* i *slika 4.3.3.2*. Prema literaturi, neki autori nisu našli statistički značajnih razlika<sup>98,110</sup> dok su drugi autori uočili više vrijednosti  $V_{max}$  u muškaraca<sup>139</sup>.

Prema rezultatima ovog ispitivanja spol nema značajan utjecaj na kinetiku serotonininskog prijenosnika na trombocitnoj membrani. Podaci su sukladni rezultatima naših ranijih istraživanja utjecaja spola na razinu trombocitnog serotoninina koji je izravno ovisan o aktivnosti membranskog prijenosnika jer trombociti ne posjeduju mogućnost sinteze serotoninina. U navedenim istraživanjima nisu uočene statistički značajne razlike iako je uočena lagana tendencija ka višim vrijednostima učinkovitosti prijenosnika u populaciji žena<sup>82</sup>.

### **5.2.2.4. Cirkumannualne varijacije kinetskih parametara trombocitnog serotonininskog prijenosnika**

Periodičke (cirkumannualne) varijacije kinetike trombocitnog serotonininskog prijenosnika ispitivali su razni autori na manjim populacijama zdravih ispitanika, u pravilu su to bile kontrolne skupine pri ispitivanju bolesnika, bez velike podudarnosti rezultata. Neki autori opisuju periodičke varijacije vrijednosti kao npr. porast vrijednosti  $V_{max}$  i  $K_m$  u srpnju i kolovožu<sup>101</sup>, porast  $V_{max}$  u travnju i lipnju<sup>5</sup> odnosno, visoke vrijednosti u srpnju<sup>49</sup> ili nisu uočili prisutnost cirkumannualnih varijacija.

Istraživanja u ovom radu provedena su u vremenskom periodu od dvadesetak uzastopnih mjeseci s mjerenjem aktivnosti serotonininskog prijenosnika u svih 63 ispitanika. Podaci su grupirani u sezonske periode i prikazani kao srednje

vrijednosti za sva 4 godišnja doba. Analizom rezultata utvrdili smo da kinetski parametar  $K_m$  serotoninskog prijenosnika pokazuje značajnije cirkumannualne varijacije i to u odnosu proljeće vs jesen ( $p < 0,001$ ) i ljeto vs jesen ( $p < 0,01$ ), (*slika 4.3.4.1*); bez značajnosti varijacije maksimalne brzine unosa (*slika 4.3.4.2*) i učinkovitosti prijenosnika (*slika 4.3.4.2*).

U zaključku možemo reći da, prema našem ispitivanju, kinetski parametri trombocitnog serotoninskog prijenosnika pokazuju normalnu raspodjelu uz nešto užu distribuciju  $V_{max}$  ( $CV=18,4\%$ ) i  $V_{max}/K_m$  ( $CV=18,3\%$ ). Maksimalna brzina ( $V_{max}$ ) trombocitnog serotoninskog prijenosnika značajno varira s dobi, odnosno, utvrđen je statistički značajan pad u starijoj životnoj dobi ( $p < 0,05$ ) što se kompenzira s efikasnošću ( $V_{max}/K_m$ ) koja se ne mijenja značajno s dobi. Isovremeno  $K_m$  pokazuje tendenciju pada u starijoj životnoj dobi bez dosezanja razine značajnosti. Taj nalaz potvrđuje djelovanje homeostatskog mehanizma jer u sintetskom parametru učinkovitosti ( $V_{max}/K_m$ ) nema značajnih razlika. Visoke vrijednosti  $K_m$  upućuju na slab afinitet prijenosnika koji se kompenzira za višim vrijednostima  $V_{max}$  jer je afinitet prijenosnika  $A=1/K_m$ . Znači dob nema bitan utjecaj na učinkovitost prijenosnika ali ako promatramo izdvojeno samo  $K_m$  i  $V_{max}$  na taj nalaz treba obratiti pažnju.

Spol nema značajan utjecaj na kinetiku serotoninskog prijenosnika. Kinetski parametar  $K_m$  pokazuje značajne cirkumannualne varijacije u proljeće vs jesen  $p < 0,001$  i u ljeto vs jesen  $p < 0,01$ , dok vrijednosti maksimalne brzine ( $V_{max}$ ) i učinkovitosti prijenosnika ( $V_{max}/K_m$ ) ne dosežu razinu značajnosti. Utvrđene varijacije utjecaja godišnjeg doba upućuju da o njima treba voditi računa kada se u kliničkom ispitivanju, koje se provodi kroz duže vremensko razdoblje, odabire kontrolna skupina. Ako su bolesnici i ispitanici kontrolne skupine odabrani i istraženi u različitim godišnjim dobima može biti upitna interpretacija dobivenih rezultata.

### **5.2.3. FIZIOLOŠKA OBILJEŽJA KINETIKE TROMBOCITNE MONOAMINOKSIDAZE (MAO-B)**

Eksperimentalni podaci o promjenama aktivnosti trombocitne MAO u pojedinim patološkim stanjima često se međusobno ne podudaraju,<sup>166</sup> a kao uzrok se navodi utjecaj različitih endogenih faktora (spol, hormonalni status, stres i sl) koji se samo djelomično mogu kontrolirati odabirom ispitivanih skupina, te različiti metodološki pristupi<sup>77,151</sup>.

Poznavanje metodičkih elemenata koji izravno utječu na iznos izmjerene aktivnosti trombocitne MAO-B je najvažnije za pouzdanost ispitivanja. To uključuje izvor enzima, način pripreme uzorka, koncentraciju supstrata kao i metodu mjerenja rezultata.

#### **5.2.3.1. *Distribucija frekvencija individualnih vrijednosti kinetike trombocitne MAO-B***

Fiziološke vrijednosti MAO obično se u literaturi navode kao vrijednosti kontrolne skupine pri različitim patofiziološkim ili farmakološkim istraživanjima. Prema našim izmjerenim vrijednostima kinetike MAO-B raspodjele individualnih vrijednosti srednja vrijednost afiniteta ( $K_m$ ) u populaciji iznosila je  $3,76 \mu\text{M}$  uz standardnu devijaciju od 1,1 i  $\text{CV}=28,4\%$ , *slika 4.4.1.1., tablica 5*. Srednja vrijednost  $V_{\text{max}}$  u populaciji iznosila je  $14,56 \text{ nmol}/10^8 \text{ trc}/\text{h} \pm 4,9$  uz  $\text{CV}=33,9\%$ , *slika 4.4.1.2, tablica 5*, a srednja vrijednost  $V_{\text{max}}/K_m$  iznosila je  $4,12 \pm 1,7$  uz  $\text{CV}=42,0\%$ , *slika 4.4.1.3, tablica 5*.

Analizom naših rezultata utvrđeno je da afinitet trombocitne MAO ( $K_m$ ) pokazuje graničnu asimetričnost distribucijske krivulje ( $p=0,05$ ) što je posljedica nešto brojnijih vrijednosti u području visokih aktivnosti.  $V_{\text{max}}$  i  $V_{\text{max}}/K_m$  pokazuju normalnu raspodjelu individualnih vrijednosti u zdravoj populaciji.  $V_{\text{max}}$  ( $\text{CV}=33,9\%$ ) je šire distribuirana od  $K_m$  ( $\text{CV}=28,4\%$ ), dok  $V_{\text{max}}/K_m$  ima izrazito široku distribuciju ( $\text{CV}=42\%$ ) što govori da se ljudi međusobno značajnije razlikuju po učinkovitosti ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) MAO-B.

Dobiveni rezultati podudarni su rezultatima ispitivanja većeg broja autora, iako se u literaturi ne može naći veći broj ispitivanja pune kinetike MAO, *tablica 3*.

Tablica 3. Usporedba literaturnih podataka aktivnosti trombocitne MAO-B

Reference	N	V ili Vmax (nmol/10 <sup>8</sup> trc/h)	Km ( $\mu$ M)
Van Kempen i sur. (1985)	10	17,0 $\pm$ 3,8	-
McEntire i sur (1979)	21	10,8 $\pm$ 4,2	-
Kuiper i sur (1993)	20	229 $\pm$ 55	-
Van Kempen i sur (1992)	20	40,4 $\pm$ 23,2	-
Veral i sur (1997)	35	6,18 $\pm$ 3,3	-
Filinger i sur (1987)	14	22,1 $\pm$ 2,1	5,3 $\pm$ 0,2
Fleissner i sur (1987)	59	8,9 $\pm$ 3,2	-
Youdim i sur (1976)	11	22,2 $\pm$ 4,0	48
<b>Ovaj rad</b>	<b>63</b>	<b>14,5 <math>\pm</math> 4,9</b>	<b>3,7</b>

Velikoj širini distribucije aktivnosti MAO u čovjeka doprinose s jedne strane različiti endogeni (genetski polimorfizam, hormonalni status, dob, spol, cirkadijalni ritmovi) i egzogeni čimbenici (prehrana, lijekovi isl)<sup>142</sup> koji mogu utjecati na rezultate mjerenja, a teško ih je kontrolirati, i s druge strane, različiti metodološki pristupi mjerenju<sup>76,151</sup>.

### **5.2.3.2. Utjecaj životne dobi na kinetske parametre trombocitne MAO-B**

Literaturni podaci o promjenama aktivnosti trombocitne MAO zavisno o dobi odnose se uglavnom na brzinu reakcije mjerenu kod jedne koncentracije supstrata i nisu međusobno podudarni. Neki autori nisu uočili razlike,<sup>115</sup> drugi su utvrdili porast aktivnosti povećanjem dobi<sup>156</sup> ili porast aktivnosti u kasnijoj životnoj dobi<sup>141</sup>.

U našem radu aktivnost trombocitne MAO-B praćena je u dvije ekstremne skupine ispitanika – mlađi od 30 godina i stariji od 50 godina. Na *slici 4.4.2.1* prikazan je značajan porast vrijednosti Km ( $p < 0,05$ ) i na *slici 4.4.2.2* značajan porast Vmax ( $p < 0,05$ ) u starijoj dobnoj skupini, dok u ispitivanju efikasnosti MAO-B nisu utvrđene značajne razlike, *slika 4.4.2.3*.

### **5.2.3.3. Utjecaj spola na kinetske parametre trombocitne MAO-B**

U nizu studija ispitivana je ovisnost trombocitne MAO u odnosu na spol sa vrlo podudarnim rezultatima prema kojima žene imaju 15 do 35% više vrijednosti aktivnosti MAO nego muškarci. Mjerenja su provedena uz jednu koncentraciju supstrata i nisu bila zavisna o vrsti korištena supstrata<sup>115,129</sup>.

Obzirom na provedena mjerenja u 6 različitih koncentracija supstrata, podaci ovog rada daju kinetičke parametre trombocitne MAO-B. Mjerenjem rezultata utvrdili smo da nema veće razlike među spolovima u odnosu na afinitet enzima ( $K_m$ ; *slika 4.4.3.1*), ali je prisutna značajno viša vrijednost  $V_{max}$  ( $p < 0,05$ ; *slika 4.4.3.2*) i jača učinkovitost ( $V_{max}/K_m$ ;  $p < 0,05$ ) u žena, *slika 4.4.3*. Viša vrijednost maksimalne brzine ( $V_{max}$ ) trombocitne MAO-B u žena može biti posljedica i endogenih čimbenika u žena, npr spolnih hormona<sup>183</sup>.

### **5.2.3.4. Cirkumannualne varijacije kinetskih parametara trombocitne MAO-B**

Podaci o cirkumannualnim varijacijama dobiveni u ovom radu grupirani su u sezonske periode i prikazani kao srednje vrijednosti za sva 4 godišnja doba. Ispitivanja su provedena u vremenskom razdoblju od dvadesetak uzastopnih mjeseci s mjerenjem aktivnosti MAO-B u svih 63 ispitanika.

Analiza rezultata pokazala je prisutnost statistički značajnih varijacija  $K_m$  (*slika 4.4.4.1*) u proljeće vs jesen ( $p < 0,001$ ) i proljeće vs ljeto ( $p < 0,001$ ) i statistički značajnu razliku u učinkovitosti MAO-B ( $V_{max}/K_m$ ; *slika 4.4.4.2*) u odnosu na godišnja doba i to u proljeće vs ljeto ( $p < 0,001$ ), proljeće vs jesen ( $p < 0,01$ ) i proljeće vs zima ( $p < 0,01$ ).

Usporedbom prema malobrojnim literaturnim podacima, rezultati ovog dijela istraživanja su nešto drugačiji od autora koji su utvrdili da aktivnost enzima u populaciji nije podložna cirkumannualnim promjenama<sup>117</sup>. Prema našem istraživanju afinitet enzima ( $A=1/K_m$ ) se ne kompenzira s  $V_{max}$  jer smo utvrdili značajne razlike u učinkovitosti enzima ( $V_{max}/K_m$ ) u proljeće vs jesen. Kinetski parametri  $K_m$  i  $V_{max}$  se u fiziološkim uvjetima homeostatski kompenziraju i stoga ih prije donošenja zaključaka treba promatrati zajedno s učinkovitosti  $V_{max}/K_m$ . Navedeni autori<sup>117</sup> nisu u svom istraživanju promatrali sintetski parametar  $V_{max}/K_m$ , a uz to su ispitanike razvrstali u grupe po



pojedininim mjesecima (12 mjeseci) dok su naši ispitanici podijeljeni u četiri razreda prema godišnjem dobu. Prema navedenom jasno je da treba obratiti pozornost na odabir uzoraka i kontrauzoraka naročito ako se ispitivanja provode tijekom i proljeća (najviše vrijednosti  $V_{max}/K_m$ ) i ljeta (najniže vrijednosti ( $V_{max}/K_m$ ) radi ispravnosti interpretacije rezultata.

Sumarno, aktivnost trombocitne MAO-B pokazuje normalnu distribuciju  $V_{max}$  i  $V_{max}/K_m$  u zdravoj populaciji uz izrazito široku distribuciju  $V_{max}/K_m$  ( $CV=42\%$ ). Utvrđena je granična asimetričnost distribucijske krivulje  $K_m$  ( $p=0,05$ ). Utvrđen je značajan porast vrijednosti  $K_m$  ( $p<0,05$ ) i  $V_{max}$  ( $p<0,05$ ) u starijoj dobnoj skupini. Prisutna je značajno viša vrijednost  $V_{max}$  ( $p<0,05$ ) i jača učinkovitost  $V_{max}/K_m$  ( $p<0,05$ ) MAO-B u žena. Utvrđena je statistički značajna varijacija afiniteta  $K_m$  MAO-B u proljeće vs jesen ( $p<0,001$ ) i u proljeće vs ljeto ( $p<0,001$ ) te varijacija učinkovitosti ( $V_{max}/K_m$ ) u proljeće vs ljeto ( $p<0,001$ ), u proljeće vs jesen ( $p<0,01$ ) i u proljeće vs zima ( $p<0,01$ ).

### 5.3. ZBIRNI PRIKAZI VRIJEDNOSTI SVIH MJERENIH PARAMETARA

**Tablica 4.** Izmjerene vrijednosti trombocitnih parametara u ispitivanim uzorcima

Trombocitni parametar		M	SD	CV %
Broj trombocita	puna krv	$236 \times 10^9/L$	58,1	24,6
	PRP	$332 \times 10^9/mL$	87,0	26,2
	% iskorištenja	76	7,2	9,4
Volumen trombocita	puna krv	7,1 fL	0,8	10,9
	PRP	7,0 fL	0,8	11,7
	indeks vol.	97	3,8	3,9

*N=broj ispitanika; M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti*

**Tablica 5. Izmjerene vrijednosti koncentracije trombotnog serotonina, kinetskih parametara trombotnog prijenosnika i trombotne MAO-B u ispitivanim uzorcima**

5HT parametar	M	SD	CV %
Koncentracija serotonina	537 ng/10 <sup>9</sup> trc	150,7	28,1
	174 ng/mL	63,4	36,4
Kinetika trombotnog prijenosnika	0,40 nM	0,1	22,4
	138 pmol/10 <sup>8</sup> trc/min	25,4	18,4
	353	64,6	18,3
Kinetika trombotne MAO-B	3,76 μM	1,1	28,4
	14,56 nmol/10 <sup>8</sup> trc/h	4,9	33,9
	4,12	1,7	42,0

*M=srednja vrijednost; SD=standardna devijacija; CV=koeficijent varijabilnosti*

Prema rezultatima našeg ispitivanja, najšira distribucija uočena je u učinkovitosti MAO-B (CV=42,0%), dok je širina distribucije frekvencija individualnih vrijednosti kinetike trombotnog prijenosnika (Vmax i Km/Vmax) upola manja (CV=18,3% i CV=18,4%) uz normalnu distribuciju koncentracije serotonina.

#### **5.4. MEĐUSOBNA POVEZANOST MJERENIH TROMBOTNIH 5HT PARAMETARA**

Analizom linearne korelacije utvrđena je statistički visoko značajna ( $p < 0,0001$ ) pozitivna povezanost koncentracije trombotnog serotonina i maksimalne brzine (Vmax) unosa serotonina u trombotite, *slika 4.5.1.* te visoko značajna ( $p < 0,0001$ ) pozitivna povezanost maksimalne brzine (Vmax) unosa serotonina u trombotite i Michaelisove konstante (Km) kao mjere afiniteta ( $A=1/Km$ ) trombotnog serotoninskog prijenosnika, *slika 4.5.2.*

Nije uočena korelacija između koncentracije trombotnog serotonina ili kinetskih parametara trombotnog serotoninskog prijenosnika s kinetskim parametrima trombotne MAO-B. Kinetski parametri ispitivanih elmenata trombotnog serotoninskog sustava (Km i Vmax) se u fiziološkim uvjetima

homeostatski kompenziraju te ih treba promatrati paralelno sa sintetskim parametrom učinkovitosti ( $V_{max}/K_m$ ).

Dobiveni rezultati ispitivanja sugeriraju da sam pojam serotoninski trombocitni sustav može biti korišten uvjetno jer tri istraživana elementa trombocitnog serotoninskog sustava jesu samo u djelomičnoj korelaciji obzirom da koncentracija serotonina u trombocitima izravno zavisi o unosu serotonina iz okolne plazme. Ispitivanjem inhibicije MAO razni autori su utvrdili njen izravan ali nizak utjecaj na razgradnju serotonina (svega oko 20%), a da pri tome nije uočena smanjena funkcija – agregacija – trombocita<sup>22,57,174,176</sup>. Nasuprot tome, ispitivanjem inhibicije 5HT prijenosnika utvrđen je značajan pad koncentracije (razine) serotonina u trombocitima<sup>109,110,146,152</sup> uz izrazito smanjenu agregabilnost trombocita (B. Jernej neobjavljeni podaci, usmeno priopćenje)<sup>38,114,132,180</sup>. Koncentracija (razina) serotonina u trombocitima očito zavisi o više raznih čimbenika. Jedan od važnih čimbenika je 5HT prijenosnik čiji smo značajan izravni utjecaj na razinu trombocitnog serotonina potvrdili u ovom istraživanju, a da pri tome nismo utvrdili međuzavisnost 5HTt ili koncentracije trombocitnog serotonina s trombocitnom MAO-B.

## **6. ZAKLJUČCI**

- 1) Razrađen je i opisan metodološki pristup koji omogućuje simultano i reproducibilno mjerenje tri elementa serotoninskog trombocitnog sustava u čovjeka iz jednokratno uzetog (malog) uzorka krvi: koncentracije (razine) trombocitnog serotonina i kinetskih parametara ( $V_{max}$  i  $K_m$ ) serotoninskog trombocitnog prijenosnika (5HTT) i enzima trombocitne monoaminoksidaze MAO-B.
- 2) Primjenom navedene metodologije istražene su i opisane vrijednosti trombocitnih serotoninskih parametara u populaciji od 63 zdrava ispitanika, odnosno ispitana su temeljna fiziološka obilježja elemenata trombocitnog serotoninskog sustava koji predstavljaju osnovu u patofiziološkim ispitivanjima. Nakon istraživanja raspona normalnih vrijednosti i obilježja distribucije individualnih vrijednosti u ispitanika istražili smo utjecaj dobi, spola i godišnjih doba i time dobili referentni oslonac za daljnja buduća patofiziološka i farmakološka ispitivanja.
- 3) Ispitan je i stupanj međuzavisnosti navedenih elemenata trombocitnog serotoninskog sustava. Utvrđena je statistički visoko značajna pozitivna povezanost koncentracije (razine) trombocitnog serotonina i maksimalne brzine ( $V_{max}$ ) unosa serotonina u trombocite te visoko značajna pozitivna povezanost maksimalne brzine ( $V_{max}$ ) unosa serotonina u trombocite i Michaelisove konstante ( $K_m$ ) kao mjere afiniteta ( $A=1/K_m$ ) trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Nije uočena korelacija između koncentracije trombocitnog serotonina ili kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika s kinetskim parametrima trombocitne MAO-B.

Dobiveni rezultati ispitivanja opravdavaju uvjetno korištenje pojma «serotoninski trombocitni sustav».

## **7. SAŽETAK**

## SEROTONINSKI SUSTAV U TROMBOCITIMA ZDRAVIH LJUDI

### SAŽETAK

Serotonin pripada u glavne neurotransmitere koji sudjeluju u složenim neuronskim komunikacijama. Serotonin posreduje čitav niz centralnih i perifernih funkcija. Među ostalim, smatra se da je uključen u modulaciju brojnih fizioloških funkcija kao što su prehrana, spavanje, seksualno ponašanje, cirkadijani i neuroendokrini ritmovi i drugo. Trombocitni 5HT potječe iz krvne plazme jer trombocit ne posjeduje ključni enzim za sintezu 5HT - triptofan hidrosilazu te se pomoću prijenosnog proteina unosi se u unutrašnjost trombocita. Fiziološka uloga visokih koncentracija serotonina u trombocitima zdravih osoba još uvijek nije potpuno razjašnjena. Sam 5HT pripada u kategoriju slabih trombocitnih agonista ali je snažan pojačivač trombocitnog odgovora u prisutnosti drugih agonista. Elementi trombocitnog serotoninskog sustava gotovo su identični onima u serotonergičnim neuronima: serotoninski transmembranski prijenosnik (5HTt), serotoninski receptor (5HT-2A), monoaminoksidaza (MAO-B) i serotonin pohranjen u gustim granulama. Poremećaj serotonergičnih mehanizama veže se uz etiopatogenezu različitih duševnih i somatskih bolesti. Lako dostupni trombocitni serotoninski elementi predstavljaju objekt istraživanja u neurobiologiji i biološkoj psihijatriji kao i u različitim istraživanjima serotoninske patofiziologije. Međutim, vrlo rijetko se susreću radovi posvećeni fiziološkim aspektima trombocitnih 5HT elemenata.

Ovaj rad smo posvetili fiziološkim istraživanjima tri elementa trombocitnog serotoninskog sustava u humanim trombocitima: koncentracije trombocitnog serotonina, aktivnosti serotoninskog prijenosnika na trombocitnoj membrani i aktivnosti trombocitne monoaminoksidaze. U prvom dijelu smo razradili metodološke pristupe koji omogućuju simultano mjerenje ta tri trombocitna serotoninska parametra. Nakon toga smo opisali glavne fiziološke osobine ta tri parametra u populaciji zdravih ispitanika: distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti, utjecaj dobi, spola i godišnjih doba kroz vremensko razdoblje od 18 mjeseci. Na kraju smo istražili stupanj međusobne povezanosti (međuzavisnosti) navedenih parametara u fiziološkim uvjetima s ciljem dobivanja uvida u njihov stvarni međuodnos i s tim u vezi opravdanost korištenja pojma tzv. trombocitnog serotoninskog sustava.

Ispitivanje je provedeno u 63 zdrava dobrovoljna darivatelja krvi starosti od 21 do 67 godina, oba spola (10 žena i 53 muškaraca), tijekom 18 uzastopnih mjeseci. Ispitanike smo podijelili u dvije ekstremne dobne skupine (mlađi od 30 i stariji od 50 godina). Uzorci krvi uzimani su od dobrovoljnih darivatelja krvi prilikom rutinskog davanja krvi. Od svakog ispitanika uzet je uzorak od 16 mL venozne krvi (+ 4 mL ACD antikoagulantne otopine). Iz uzorka pune krvi izdvojena je plazma bogata trombocitima (PRP) i podijeljena u alikvote za ispitivanje. Postupak mjerenja aktivnosti serotoninskog prijenosnika obavljen je unutar 2 sata nakon pripreme PRP, a broj trombocita u PRP i punoj krvi određen je tijekom istog dana. Koncentracija trombocitnog serotonina mjerena je iz smrznutog trombocitnog taloga dobivenog centrifugiranjem PRP, a kinetika MAO-B iz smrznutih uzoraka plazme bogate trombocitima unutar 2 tjedna od spremanja uzoraka na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Koncentracija trombocitnog/cirkulatornog serotonina (5HT) mjerena je spektrofotofluorimetrijski. Trombocitni talog je homogeniziran ultrasonikacijom u deioniziranoj vodi. Proteini su precipitirani sa  $\text{ZnSO}_4/\text{NaOH}$ , a sadržaj serotonina je kvantificiran primjenom OPT-fluorimetrijske metode. Standardi i prazne probe

procesirane su istovjetno kao i uzorci. Rezultati su izraženi u ng 5HT po jediničnom broju trombocita (ng 5HT/ $10^9$  trc) i na jedinični volumen krvi (ng 5HT/mL).

Aktivnost trombocitnog serotoninskog prijenosnika određivana je radioizotopskom metodom uz primjenu radioaktivno obilježenog serotonina ( $^{14}\text{C}$ -5HT). Trombociti resuspendirani u Krebs-Ringer fosfatnom puferu, bez  $\text{CaCl}_2$ , inkubirani su u šest koncentracija  $^{14}\text{C}$ -5HT. Inkubacija je prekinuta dodatkom ledene fiziološke otopine i brzom vakuum filtracijom. Nakon ispiranja, radioaktivnost zaostala na filterima mjerena je beta scintilacijskim brojačem. Standardi i prazne probe procesirane su istovjetno kao i uzorci. Kinetički parametar Km izražen je kao molarna koncentracija  $^{14}\text{C}$ -5HT ( $\mu\text{M}$ ), a maksimalna brzina ( $V_{\text{max}}$ ) u  $\text{pmol } ^{14}\text{C}$ -5HT/ $10^8$  trombocita/minutu.

Aktivnost trombocitne MAO-B određivana je iz PRP spektrofotofluorimetrijski uz kinuramin kao supstrat. Trombociti, preinkubirani u Na-borat-HCl puferu inkubirani su u šest koncentracija supstrata. Reakcija je prekinuta dodatkom trikloroctene kiseline i mješavina je centrifugirana. Intenzitet fluorescencije 4-hidroksikinolina (4-OH-kinolin) mjerio se na spektrofotofluorimetru. Standardi i prazne probe procesirane su istovjetno kao i uzorci. Kinetički parametar Km izražen je kao  $\mu\text{M}$  koncentracija supstrata. Aktivnost enzima ( $V_{\text{max}}$ ) izražena je kao količina produkta (4-OH-kinolin) nastala po jediničnom broju trombocita u jediničnom vremenu ( $\text{nmol}/10^8$  trc/1h).

Srednja vrijednost koncentracije trombocitnog serotonina iznosila je  $M=537\pm 150,7$  ng/ $10^9$ trc, a srednja vrijednost koncentracije cirkulatornog serotonina  $M=174\pm 63,4$  ng/mL krvi. Vrijednosti kinetskih parametara serotoninskog prijenosnika bili su:  $K_m=0,40\pm 0,1$   $\mu\text{M}$  i  $V_{\text{max}}=138\pm 25,4$   $\text{pmol}/10^8$ trc/min. Vrijednosti kinetskih parametara aktivnosti MAO-B bili su:  $K_m=3,76\pm 1,1$   $\mu\text{M}$  i  $V_{\text{max}}=14,56\pm 4,9$   $\text{nmol}/10^8$ trc/h.

Istraživani parametri – koncentracija trombocitnog/cirkulatornog serotonina i kinetski parametri  $V_{\text{max}}$  i  $K_m$  serotoninskog prijenosnika i aktivnosti monoaminoksidaze MAO-B pokazali su normalnu distribuciju frekvencija individualnih vrijednosti s graničnom vrijednosti  $K_m$  za MAO-B ( $p=0,05$ ).

U odnosu na fiziološke karakteristike – utjecaj životne dobi, spola i godišnjeg doba, uočene su značajne varijacije koncentracije cirkulatornog serotonina u proljeće vs jesen ( $p<0,001$ ) i jesen vs zima ( $p<0,01$ ). Značajne promjene utvrđene su u brzini aktivnog unosa serotonina i u aktivnosti MAO-B. 5HT prijenosnik pokazao je značajan pad brzine ( $V_{\text{max}}$ ) u starijoj životnoj dobi ( $p<0,05$ ) te porast učinkovitosti ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) u proljeće vs jesen ( $p<0,001$ ) i ljeto vs jesen ( $p<0,01$ ). Kinetički parametri MAO-B pokazali su značajan porast sa starijom životnom dobi ( $V_{\text{max}}$   $p<0,05$ ;  $K_m$   $p<0,05$ ) i značajno više vrijednosti  $V_{\text{max}}$  ( $p<0,05$ ) i  $V_{\text{max}}/K_m$  ( $p<0,05$ ) u žena. Značajne sezonske varijacije  $K_m$  kinetskog parametra MAO-B utvrđene su u proljeće vs ljeto ( $p<0,001$ ) i proljeće vs jesen ( $p<0,001$ ), a  $V_{\text{max}}/K_m$  proljeće vs ljeto ( $p<0,001$ ), proljeće vs jesen ( $p<0,01$ ) i proljeće vs zima ( $p<0,01$ ).

Analizom linearne korelacije utvrđena je statistički visoko značajna ( $p<0,0001$ ) pozitivna povezanost koncentracije trombocitnog serotonina i maksimalne brzine ( $V_{\text{max}}$ ) unosa serotonina u trombocite te visoko značajna ( $p<0,0001$ ) pozitivna povezanost maksimalne brzine ( $V_{\text{max}}$ ) unosa serotonina u trombocite i Michaelisove konstante ( $K_m$ ) kao mjere afiniteta trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Korelacija između koncentracije trombocitnog serotonina ili kinetskih parametara trombocitnog serotoninskog prijenosnika s kinetskim parametrima trombocitne MAO-B nije utvrđena.



## **8. SUMMARY**

## PLATELET SEROTONIN SYSTEM IN HEALTHY HUMAN

### SUMMARY

Serotonin is regarded as a master control neurotransmitter of complex neuronal communication. The brain serotonin system is involved in numerous physiological functions among which eating, sleep, sexual behaviour, circadian rhythmicity and neuroendocrine functions are the most prominent ones. The physiological role of high serotonin concentration in platelets has remained poorly understood. Serotonin was recently shown to play, in addition to its direct agonistic action, an important role as potent amplifier of platelet response. Blood platelets contain 5HT elements similar to neurons: two of them are in platelet cytoplasm: amine storage granules and mitochondrial MAO-B activity; others are linked to the platelet membrane: 5HT transporter and serotonin (5HT-2A) receptor. Platelet serotonin is stored in dense granules, analogously to vesicular 5HT in neurons, where is protected from MAO activity. However, in contrast to neurons, platelets do not synthesise 5HT and their amine content is a result of the transporter-mediated uptake from the surrounding blood plasma. Easy accessible platelet serotonin elements represent object of studies in neurobiology and biological psychiatry as well as in various investigations addressing serotonin pathophysiology in general in contrast to far fewer studies aimed at the physiological aspects of platelet 5HT elements.

This work has been aimed at the study of three platelet 5HT elements: platelet granular serotonin (PS), platelet serotonin transporter (5HTt) and platelet monoamineoxidase activity (MAO-B) in a population of 63 healthy human volunteers of both sexes.

The first part of the investigation was dedicated to the introduction of methodologies enabling reliable measurements of the mentioned parameters. In the second part of this work we have investigated the main physiological characteristics of three platelet 5HT elements: frequency distribution of individual values, dependence on age, influence of sex, intra-individual stability over time and periodic oscillations, on a 63 healthy voluntary blood donor in the course of longer time period.

Studies were performed on a population of healthy volunteers (blood donors) of both sexes: 10 females and 53 males aged between 21 and 67 years, over the period of 18 months. Blood sampling was routinely performed during the blood donor session. From each person a sample of 16 ml of venous blood was collected on 4 ml of ACD anticoagulant. After centrifuging blood in adapted plastic syringes PRP was quantitatively separated in aliquots of 1 ml. Platelet number and mean platelet volume, as well as measurement of 5HT transport kinetics was performed on the same day. The samples of platelet pellets (for measurement of serotonin level), and samples of PRP (for measurement of MAO-B kinetics) were frozen and stored at -20°C; the measurements were performed within two weeks.

Platelet serotonin content was determined spectrophotofluorometrically. Deionized water was added to each platelet pellet and samples were sonicated. ZnSO<sub>4</sub>/NaOH and centrifugation precipitated proteins. Following deproteinisation of the ultrasonicated platelet sample, platelet serotonin was measured by orthophtaldialdehyde (OPT) – enhanced fluorometry at 345/485 nm. Platelet serotonin level was expressed per unit number of platelets (ng 5HT/10<sup>9</sup>platelets) reflecting the amine concentration in platelets or per unit volume of whole blood (ng 5HT/ml) reflecting the amine level in the circulation.

Platelet 5HT uptake was assayed by use of radioisotopic method. Platelets in Krebs-Ringer phosphate buffer (without  $\text{CaCl}_2$ ) were incubated with six concentrations of radioactively labelled ( $^{14}\text{C}$ ) serotonin. Uptake interval amounted to 60 seconds with sharp termination by the addition of ice-cooled buffer followed by immediate vacuum filtration. The determination of blank values was processed in the same manner but near  $0^\circ\text{C}$ . Results were expressed as  $V_{\text{max}}$  in pmol of serotonin per  $10^8$  of platelets and  $K_{\text{m}}$  in molar concentration of serotonin ( $\mu\text{M}$ ). The kinetic product ( $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ) was also calculated in each person.

Activity of MAO-B was measured spectrophotofluorometrically using six concentrations of kynuramine as substrate. PRP was preincubated with buffer (Na-borate-HCl) and then incubated with six concentrations of substrate. The reaction was stopped by adding trichloroacetic acid, the mixture was centrifuged and formed 4-hydroxyquinoline (4-hQ) was measured fluorimetrically at 310 nm excitation and 362 nm emission. Standards and blanks were carried through the entire procedure.  $K_{\text{m}}$  results were expressed as  $\mu\text{M}$  concentration of kynuramine.  $V_{\text{max}}$  results were expressed as quantity of product 4-OH quinoline ( $\text{nmol}/10^8$  platelets/60 min).

The mean values of granular serotonin amounted to  $537 \pm 150,7$  ng/ $10^9$  platelets and the mean values of serotonin concentration in blood were  $174 \pm 63,4$  /ml. The values of transporter kinetic parameters were:  $V_{\text{max}}=138 \pm 25,4$  pmol/ $10^8$ /min and  $K_{\text{m}}=0,400 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$ . The values of kinetic parameters of MAO-B activity were:  $V_{\text{max}}=14,56 \pm 4,9$  nmol/ $10^8$ /h and  $K_{\text{m}}=3,76 \pm 1,1$   $\mu\text{M}$ .

The studied parameters - granular serotonin content in platelets and serotonin level in blood, as well as kinetic parameters of serotonin transporter ( $V_{\text{max}}$  and  $K_{\text{m}}$ ) and monoamineoxidase activity ( $V_{\text{max}}$  and  $K_{\text{m}}$ ) demonstrated normal frequency distributions of individual values (with the borderline values  $p=0,05$  of  $K_{\text{m}}$  distribution) of MAO-B.

Regarding physiological characteristics - influences of age, sex and seasonal periodicity, significant changes were found in seasonal oscillation of platelet serotonin level spring vs autumn ( $p<0,001$ ) and autumn vs winter ( $p<0,01$ ) and in MAO-B activity and transporter velocity. 5HT transporter velocity ( $V_{\text{max}}$ ) demonstrated verificant decrease with age ( $p<0,05$ ) and higher values ( $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ) in spring vs autumn ( $p<0,001$ ) and in summer vs autumn ( $p<0,01$ ). Velocity of MAO-B ( $V_{\text{max}}$ ) and  $K_{\text{m}}$  demonstrated increase with age ( $p<0,05$ ) and higher values ( $V_{\text{max}}$  and  $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$ ) in females ( $p<0,05$ ) as well as significant seasonal oscillations  $K_{\text{m}}$  in spring vs summer ( $p<0,001$ ) and spring vs autumn ( $p<0,001$ ) and oscillation  $V_{\text{max}}/K_{\text{m}}$  in spring vs summer ( $p<0,001$ ), spring vs autumn ( $p<0,01$ ) and spring vs winter ( $p<0,01$ ).

Kinetic parameter of serotonin transporter  $V_{\text{max}}$  (maximal velocity) demonstrated high significant correlation with granular serotonin content ( $p<0,001$ ) and with affinity of the transporter ( $p<0,001$ ), but both platelet serotonin and kinetic parameters of serotonin transporter demonstrated no correlation with MAO-B kinetic parameters.

## **9. LITERATURA**

1. Ajhler T. Učinak antidepressiva na kinetiku unosa i razinu serotonina u štakorskim trombocitima. Magistarski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 1994.
2. Anderson GM, Horne WC, Cfatterjee D, Cohen DJ. The hyperserotonemia of autism. U Whitaker-Azmita P, Peroutka SJ. The neuropharmacology of serotonin. The New York Academy of Science, New York 1990.
3. Anthenelli RM, Tabakoff B. The search for biochemical markers. *Alcohol Health & Research World* 1995; 19: 176-181.
4. Anthony M, Lance JW. Plasma serotonin in patients with chronic tension headaches. *J Neurol Neurosur Psychiat.* 1989; 52: 82-184.
5. Arora RC, Kregel L, Meltzer HY. Seasonal variation of serotonin uptake in normal controls and depressed patients. *Biol Psychiat* 1984; 19: 795-804.
6. Artigas F, Sarrias MJ, Martinez E, Gelpi E. Serotonin in body fluids: Characterization of human plasmatic and cerebrospinal fluid pools by means of a new HPLC method. *Life Sci* 1985; 37: 441-447.
7. Ashcroft GW, Crawford TBB. Estimation of 5-hydroxytryptamine in human blood. *Clin Chem Acta* 1964; 9: 364-369.
8. Austin MC, Bradely CC, Mann JJ, Blakely RD. Expression of serotonin transporter messenger RNA in the human brain. *J Neurochem* 1994; 62: 2362-2367.
9. Bach AWJ, Lan NC, Johnson DL, Abell CW, Bembenek ME, Kwan SW, Seeburg PH, Shih JC. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 85: 4934-4938.
10. Badcock NR, Spence JG, Stern LM. Blood serotonin level in adults, autistic and non-autistic children with a comparison of different methodologies. *Annals Clin Biochem* 1987; 24: 625-634.
11. Balija M. Demografska obilježja i razlozi koji potiču ljude na dobrovoljno davanje krvi. Magistarski rad, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 1996.
12. Balkovetz DF, Triuppathi C, Leibach FH, Mahesh VB, Ganapathy V. Evidence for an imipramine-sensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. *J Biol Chem* 1989; 264: 2195-2198.
13. Banović M, Čičin-Šain L, Jernej B, Zoran M, Coen D, Balija M, Grgičević D. Optimizacija postupka izdvajanja trombocita iz humane krvi uz mjerenje trombocitnog serotonina. *Biochem Med* 1993; 4: 89-90.
14. Banović M, Planinc-Peraica A, Zoran M, Nazor A, Jernej B. Platelet aggregation in rats genetically selected for high and low platelet serotonin levels. U: Bulat et al. eds. *Pharmacol Communicat*, Zagreb 1993, 183-185.
15. Banović M. Serotoninski prijenosnik na trombocitnoj membrani: fiziološka i patofiziološka istraživanja. Doktorska disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 1998.
16. Barker EL, Blakely RD. Identification of a single amino acid, phenylalanine 586, that is responsible for high affinity interactions of tricyclic antidepressants with the human serotonin transporter. *Mol Pharmacol* 1996; 50: 957-965.
17. Belendiuk K, Belendiuk GW, Freedman DX. Blood monoamine metabolism in Huntington's disease. *Arch Gen Psychiat* 1980; 37: 325-332.
18. Benedetti MS, Dostert P. Monoamine oxidase: from physiology and pathophysiology to the design and clinical application of reversible inhibitors. U: Testa B, ured. *Advances in Drug Research*. London: Academic Press, 1992; 65.
19. Bengel D, Heils A, Petri S, Seemann M, Glatz K, Andrews A, Murphy DL, Lesch KP. Gene structure and 5'-flanking regulatory region of the murine serotonin transporter. *Mol Brain Res* 1997; 44: 286-292.
20. Berlin I, Anthenel RM. Monoamine oxidases and tobacco smoking. *International J Neuropsychopharm* 2001; 4: 33-42.

21. Berrettini WH, Vogel WH. Evidence for an endogenous inhibitor of platelet MAO in chronic schizophrenia. *Am J Psychiat* 1977; 134: 805-807
22. Blakely RD, Berson HE, Fremeaut RT, Caron GM, Peek MM, Prince HK, Bradley CC. Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rabbit brain. *Nature* 1991; 354: 66-70.
23. Brammer GL, McGuire MJ, Raleigh MJ. Vervet monkey whole blood serotonin levels is determined by platelet uptake sites. *Life Sci* 1987; 41: 1539-1546.
24. Brewerton TD, Flament MF, Rapoport JL, Murphy DL. Seasonal effects on platelet 5-HT content in patients with OCD and controls. *Arch Gen Psychiat* 1993; 50: 326-337.
25. Camacho A, Dimsdale JE. Platelets and psychiatry: lessons learned from old and new studies. *Psychosom Med* 2000; 62: 326-336.
26. Catterjee D, Anderson GM. The human platelet dense granule: serotonin uptake, tetrabenazine binding, phospholipid and ganglioside profiles. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 439-446.
27. Cawthon RM, Breakefield XO. Differences in A i B forms of monoamine oxidase revealed by limited proteolysis and peptide mapping. *Nature* 1979; 281: 692-694.
28. Cawthon RM, Pintar JE, Haseltine FP, Breakefield XO. Differences in the structure of A and B forms of human monoamine oxidase. *J Neurochem* 1981; 37: 363-372
29. Cesura AM, Pletscher A. The new generation of monoamine oxidase inhibitors. *Prog Drug Res* 1992; 38: 171-297.
30. Chatterjee D, Anderson GM. The human platelet dense granule: serotonin uptake, tetrabenazine binding, phospholipid and ganglioside profiles. *Arch Biochem Biophys* 1993; 302: 439-446.
31. Chen K, Wu HF, Shih JC. The deduced aminoacid sequences of human platelet and frontal cortex monoamine oxidase B are identical. *J Neurochem* 1993; 61: 187-190.
32. Čičin-Šain L, Jernej B, Magnus V. Platelet serotonin levels and gonadal hormones in rats. *Life Sci* 1989; 45: 1885-1892.
33. Codd EE. factors affecting serotonin uptake into human platelets. *Psychopharmacol* 1988; 95: 180-184.
34. Comings DE. Blood serotonin and tryptophan in Tourette Syndrome. *Am Jour of Med Genetics* 1990; 46:418-430.
35. Conn PJ, Sanders-Bush E. Central serotonin receptors: Effector systems, Physiological roles and regulation. *Psychopharmacol* 1987; 92: 267-277.
36. Cook EH, Arora RC, Anderson GM, Berry-Kravis EM az all. Platelet serotonin studies in hyperserotonemic relatives of children with autistic disorder. *Life Sci* 1993; 52: 2005-2015. 1993;
37. Cook EH, Fletcher KE, Wainwright M, Marks N, Yan S, Leventhal BL. Primary structure of the human platelet serotonin 5HT-2A receptor: Identity with frontal cortex serotonin 5HT-2A receptor. *J Neurochem* 1994; 63: 465-469.
38. Cortellazzo S, Viero P, Buczke W, Barbui T, De Gaetano G. Platelet 5-hydroxytryptamine transport and storage in myeloproliferative disorders. *Scand J Haematol* 1985; 34: 146-151.
39. Da Prada M, Cesura AM, Launay JM, Richards JG. Platelets as model for neurons? *Experientia* 1988; 44: 115-126.
40. Dar DE, Weitzman A, Karp L, Grinshpoon A, Bidder M, Kotler M, Tyano S, Bleich A, Gavish M. Platelet benzodiazepine receptors in repeated stress. *Life Sci* 1991; 48: 341-346.
41. De Clerck F, Xhonneux B, Leysen J, Janssen PAJ. Evidence for functional 5HT-2 receptor sites on human blood platelets. *Biochem Pharm* 1984; 33: 2807-2811.
42. De Clerck F. The role of serotonin in thrombogenesis. *Clin Physiol Biochem* 1990; 8: 40-49.
43. De Clerck F. Effects of serotonin on platelets and blood vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 17:S1-S5.

44. Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Sugamori KS, Barker EL, Blakely RD, Wolfgang WJ, Forte MA, Niznik HB. Cloning, expression and localization of a chloride-facilitated, cocaine sensitive serotonin transporter from *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 51,85-5162.
45. Demisch L. Short-term alteration of MAO activity after translocation of calcium in human blood platelets. *Life Sci* 1981; 28: 1995-2002.
46. Denney RM, Denney CB. An update on the identity crisis of monoamine oxidase: New and old evidence for the independence of MAO A and B. *Pharmacol Ther* 1985; 30: 227-227-258.
47. Donnelly CH, Murphy DL. Substrate- and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 853-858.
48. Edwards DJ, Chang SS. Multiple forms of monoamine oxidase in rabbit platelets. *Life Sci* 1975; 17: 1127-1131.
49. Egrise D, Rubinstein M, Schoutens A, Cantraine F, Mendlewicz J. Seasonal variation of platelet serotonin uptake and 3H-imipramine binding in normal and depressed subjects. *Biol Psychiat* 1986; 21: 283-292.
50. Erulkar SD. Chemically mediated synaptic transmission: An overview. U: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. ured. *Basic Neurochemistry*, 5th ed. New York: Raven Press 1994; 181-208.
51. Eynard N, Flachaire E, Lestra C, Broyer M, Zadian R, Claustrat B, Quincy C. Platelet serotonin content and free and total plasma tryptophan in healthy volunteers during 24 hours. *Clin Chem* 1993; 39: 2337-2340.
52. Faraj BA, Olkowski ZL, Jackson RT. Expression of high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. *Int J Immunopharmac* 1994; 16: 561-567.
53. Filatova NA. Amine oxidase activity and blood serotonin levels in cancer of the gastro-intestinal tract and lung. *Vopr Med Khim* 1986; 32: 36-39.
54. Flachaire E, Beney C, Berthier A, Salandre J, Quincy C, Renaud B. Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns, children, adults, and elderly subjects by HPLC with electrochemical detection. *Clin Chem* 1990; 36: 2117-2120.
55. 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.
56. Fuller RW. Biochemical pharmacology of the serotonin system. *Adv Neurol* 1986; 43: 469-471.
57. Geha RM, Rebrin I, Chen K, Shih JC. Substrate and inhibitor specificities for human monoamine oxidase A and B are influenced by a single amino acid. *J Biol Chem* 2001; 276: 0977-9882.
58. Gentsch C, Lichtsteiner M, Feer G. Selective breeding of rats for extreme densities of platelets <sup>3</sup>H-imipramine binding sites. Evidence against a trait hypothesis. *Psychiat Res* 1989; 27: 287-295.
59. Giller EL, Young JG, Breakefield XO, Carbonari C, Braverman M, Cohen DJ. Monoamine oxidase and catechol-O-methyltransferase activities in cultured fibroblasts and blood cells from children with autism and Gilles de la Tourette syndrome. *Psychiat Res* 1980; 2: 187-197
60. Girmen AS, Baenziger J, Hotamisligil GS, Konradi C, Shalish C, Sullivan JL, Breakefield XO. Relationship between platelet monoamine oxidase B activity and alleles at the MAO-B locus. *J Neurochem* 1992; 59: 2063-2066.
61. Given MB, Longenecker GL. Characteristics of serotonin uptake and release by platelets. In: Longenecker GL, editors: *The platelets: physiology and pharmacology*. Orlando, Florida. Academic Press 1985; 463-479.
62. Gordon JL, Olverman HJ. 5-hydroxytryptamine and dopamine transport by rat and human blood platelets. *Brit J Pharmacol* 1978; 62: 219-226.
63. Gordon JL, editor. *Platelets in biology and pathology*. Elsevier Biomedical Press 1981.

64. Gregor P, Patel A, Shimada S, Lin CL, Rochelle JM, Kitayama S, Seldin MF, Uhl GR. Murine serotonin transporter: sequence and localization to chromosome 11. *Mamm Genome* 1993; 4: 283-284.
65. Guicheney P. Human platelet serotonin content: methodological aspects and physiological variations. *Meth Experim Clin Pharmacol*. 1988;10: 253-258.
66. Gujrati VR, Goyal A, Gaur SPS, Singh N, Shanker K, Chandravati K. Relevance of platelet serotonergic mechanisms in pregnancy induced hypertension. *Life Sci* 1994; 55: 327-335.
67. Halbreich U, Rojanski N, Zander KJ, Barkai A. Influence of age, sex and diurnal variability on imipramine receptor binding and serotonin uptake in platelets of normal subjects. *J Psychiat Res* 1991;25:7-8
68. Hervig TA, Farstad M, Vollset SE. Endogenous serotonin in human blood platelets-factors that may influence reference values. *Platelets* 1996; 7: 47-52.
69. Hoffman BJ, Mezey E, Brownstein MJ. Cloning of a serotonin transporter affected by depressants. *Science* 1991; 254: 579-580.
70. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PPA. VII International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994; 46: 157-203.
71. Hranilović D. Struktura i ekspresija gena za serotoninški prijenosnik u uvjetima promijenjene homeostaze serotonina. Doktorska disertacija, Prirodoslovno matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb 2000.
72. Hsu YPP, Powell JF, Sims KB, Breakefield XO. Molecular genetics of the monoamine oxidases. *J Neurochem* 1989; 53: 12-18.
73. Humphries LL, Chirley P, Allen M, Codd EE, Walker RF. Daily patterns of serotonin uptake in platelets from psychiatric patients and control volunteers. *Biol Psychiat* 1985; 20: 1073-1081.
74. Ilsley NP, Lamartiniere CA. The imprinting of adult hepatic monoamine oxidase levels and androgen responsiveness by neonatal androgen. *Endocrinology* 1980; 107: 551-556.
75. 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: 281-291.
76. Jackman H, Arora R, Meltzer HY. Comparison of platelet count and platelet protein methods for determination of platelet MAO activity. *Clin Chim Acta* 1979; 96: 15-23.
77. Jackman H, Meltzer HY. Factors affecting determination of platelet monoamine oxidase activity. *Shizophrenia Bull* 1980; 6: 259-266.
78. Jensen PN, Smith DF, Poulsen JH, Moller HJ, Rosenberg R. Effect of flunarizine and calcium on serotonin uptake in human and rat blood platelets and rat synaptosomes. *Biol Psychiatry* 1994; 36: 118-123.
79. Jernej B, Čičin-Šain L, Iskrić S. Decrease of platelet serotonin level in rats as a monitor of serotonin uptake inhibition in the course of treatment with various antidepressants. *Psychopharmacol* 1988; 96: 298.
80. Jernej B, Čičin-šain L, Genetic alterations of serotonin uptake kinetics in rat platelets. *Biol Psych* 29,601S.
81. Jernej B, Čičin-Šain L, Banović M. Platelet aggregation in rats genetically selected for high or low platelet serotonin levels. *Can J Physiol Pharm* 72. suppl 1994; 1: 145.
82. Jernej B, Banović M, Balija M, Čičin-Šain L, Nazor A, Grgičević D. Physiological characteristics of platelet serotonin (5HT) level, platelet 5HT uptake and platelet monoamine oxidase (MAO-B) activity in humans. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995; 5: 416-417.
83. Jernej B. Platelet versus neuron: a glimpse from serotonergic perspective. *Period Biol* 1995; 97: 183-190.
84. Jernej B, Čičin-Šain L, Froebe A, Hranilović D, Podnar M, Banović M, Iskrić S, Balija M, Grgičević D, Kozarić-Kovačić D, Folnegović-Šmalc V. Serotonin



- transporter: studies on platelet model in rats and humans. *Period Biol* 1996; 98: 95-102.
85. Jernej B, Banović M, Čičin-Šain L, Hranilović D, Balija M, Orešković D, Folnegović-Šmalc V. Physiological characteristics of platelet/circulatory serotonin: study on large human population. *Psych Research* 2000; 94: 153-162.
  86. Johnston JP. Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 1968; 17: 1285-1297.
  87. Karas SI, Yazykov KG, Makarova EV. Serotonin content in human blood platelets is not stable. *Clin Chem Acta* 1995; 238: 179-186.
  88. Kawai S, Nagatzu T. Gas chromatographic and high-performance liquid chromatographic determination of monoamine oxidase activity using mixed substrates. U: *Monoamine oxidase: Basic and clinical frontiers*. Kamijo K, Usdin E, Nagatzu Z, ured. Excerpta Medica, Amsterdam 1982.
  89. Kettler R, Cesura AM, Dingemans J, Da Prada M. MAO B inhibition in rabbit tissues and in human platelets by Ro 19-6327 shows similar time-course. *J Neural Transm* 1990; supplementum 32: 211-214.
  90. Larsen JK. MAO inhibitors: Pharmacodynamic aspects and clinical implications. *Acta Psychiatr Scand* 1988; supplementum 345:74-78.
  91. 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: 441-446.
  92. Le Quan-Bui KH, Plaisant O, Leboyer M, Gay C, Kamal L at all. Reduced Platelet serotonin level in depression. *Psych Research* 1984; 13: 129-139.
  93. Lee SL, Fanburg BL. Serotonin uptake by bovine pulmonary artery endothelial cells in culture. *Am J Physiol* 1986; 250: 761-765.
  94. Lesch KP, Aulakh CS, Wolozin BL, Tolliver TJ, Hill JL, Murphy DL. Regional brain expression of serotonin transporter mRNA and its regulation by reuptake inhibiting antidepressants. *Mol Brain Res* 1993; 17: 31-35.
  95. Lesch KP, Moessner R. Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry* 1998; 44: 179-192.
  96. Lesch KP, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. *J Neurochem* 1993; 60: 2319-2322.
  97. Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm* 1994;95:157-162.
  98. Lingjaerde O. Blood platelets as model system for studying the biochemistry of depression. *Frontiers in Biochemical and Pharmacological Research in Depression* 1984; 99-111.
  99. Luque JM, Kwan SW, Abell CW, Da Prada M, Richards JG. Cellular expression of mRNAs encoding monoamine oxidases A and B in the rat central nervous system. *J Comparative Neurol* 1995; 363: 665-680.
  100. Maguire K, Tuckwell V, Pereira A, Dean B, Singh B. Significant correlation between 14C-5-HT uptake by and 3H-paroxetine binding to platelets from healthy volunteers. *Biol Psychiatry* 1993; 34: 356-360.
  101. Malmgren R. Methodological aspects of studies on the 5-HT uptake mechanism in normal platelets. *Acta Pharmacol et Toxicol* 1981; 49: 277-284.
  102. Mann JJ, McBride PA, Anderson GM, Mieczkowski TA. Platelet and whole blood serotonin content in depressed patients: correlation with acute life-time psychopathology. *Biol Psychiatry* 1992; 32: 243-257.
  103. Marazziti D, Rossi A, Masala I, Rotondo A, Palego L, Mazzoni M, Giannaccini G, Lucacchini A, Cassano GB. Regulation of platelet serotonin transporter by protein kinase C in the young and elderly. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 443-447.

104. Marcuson J, Beackstgroem I, Ross SB. Single-site model of the neuronal 5-hydroxytryptamine uptake and imipramine binding site. *Mol Pharmacol* 1986; 30: 121-128.
105. Markovitz JH. Hostility is associated with increased platelet activation in coronary disease. *Psychosom Med* 1998; 60: 586-591.
106. Marsden D. Serotonin and social rank among human males. U Masters RO, McGuire MT. *The neurotransmitter revolution*. Southern Illinois University Press 1994; 146.
107. Martin F, Rozas G, Miguez J, Aldegunde M. Plasma serotonin: factors affecting its level. *Biogenic Amines* 1990; 7: 57-62.
108. McEntire JE, Buchok SJ, Papermaster BW. Determination of platelet monoamine oxidase activity in human platelet-rich plasma. *Biochem Pharmacol* 1979; 28: 2345-2347.
109. Meltzer H, Arora R, Baber R, Tricou B. Serotonin uptake in blood platelets of psychiatric patients. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38: 1322-1329.
110. Meltzer HY, Arora RC. Platelet serotonin studies in affective disorders: evidence for serotonergic abnormality? U: Snidler M, Coppen A, Harnett S, ur. *5-Hydroxytryptamine in Psychiatry. A Spectrum of Ideas*. Oxford: Oxford University Press 1991; 50-89.
111. Meyerhoff J, Dorsch CA. Decreased platelet serotonin levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 1981; 24: 1495-1500.
112. Mück-Šeller D, Jakovljević M, Pivac N. Platelet 5-HT concentration and suicidal behaviour in recurrent major depression. *J Affect Disord* 1996; 39: 73-80.
113. Mück-Šeller D. Značenje endogenog serotonina u patogenezi i liječenju depresije i shizofrenije. Doktorska disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb 1989; 1-234.
114. Murer EH, Stewart GJ, Davenport K, Sioja E. Effect of the calcium antagonism on platelet secretion and metabolism. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 523-530.
115. Murphy DL, Wright C, Buchsbaum M, Nichols A, Costa JL, Wyatt RJ. Platelet and plasma amine oxidase activity in 680 normal sex and age differences and stability over time. *Biochem Med* 1976; 16: 254-265
116. Murphy DL. Peripheral indices of central serotonin function in humans. U: Whitaker-Azmitia PM, Peroutka SJ. ur. *The Neuropharmacology of Serotonin*. New York: The New York Academy of Science 1990; 228-296.
117. Nemčić-Jurec J. Monoaminoksidaza u trombocitima čovjeka. Magistarski rad, Farmaceutsko biokemijski fakultet, Zagreb 1995.
118. Nemeroff CB. The presynaptic serotonin uptake site in depression. *Clin Neuropharmacol* 1992; 15: 347-348.
119. Nies A, Robinson DS, Lamborn KR, Lampert RP. Genetics control of platelet and plasma monoamine oxidase activity. *Archs Gen Psychiat* 1973; 28: 834-838.
120. Norman TR. Platelet serotonin uptake in panic disorder patients: a replication study. *Psychiat Res* 1989; 30: 21-29.
121. Oerlinghausen BM, Uebelhack R. Platelet markers in aggression. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995; 5: 179-180.
122. Omenn GS, Smith LT. A common uptake system for serotonin and dopamine in human platelets. *J Clin Invest* 1987; 80: 235-240.
123. Orelund L, Shaskan EG. Monoamine oxidase activity as a biological marker. *Trends Pharmacol Sci* 1983; 4: 339-342.
124. Ortiz J, Artigas F, Gelpi E. Serotonergic status in human blood. *Life Sci* 1988; 43: 983-990.
125. Parvez H, Parvez S. The effects of metopyrone and adrenalectomy on the regulation of the enzymes monoamine oxidase and catechol-O-methyl transferase in different brain regions. *J Neurochem* 1973; 20: 1011-1020.
126. Patterson SM, Zakovski SG, Hall MH, Cohen L, Wolman K, Baum A. Psychological stress and platelet activation: differences in platelet reactivity in healthy men during active and passive stressors. *Health Psychol* 1994; 13: 34-38.

127. Pattichis K, Louca LL, Jarman J, Glover V. Red wine can cause a rise in human whole blood 5-hydroxytryptamine level. *Med Sci Res* 1994; 22: 381-382.
128. Pearce LB, Roth JA. Monoamine oxidase: Separation of type A and B activities. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1809-1811.
129. Pintar JE, Barbosa J, Francke U, Castiglione CM, Hawkins M, Breakefield XO. Gene for monoamine oxidase type A assigned to human X chromosome. *J Neurosci* 1981; 1: 166-175.
130. Pintar JE, Breakefield XO. Monoamine oxidase (MAO) activity as a determinant in human neurophysiology. *Behav Genet* 1982; 2: 53-68.
131. Pletcher A. Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Brit J Pharmacol* 1968; 32: 1-16.
132. Pletscher A. The uptake system of 5-hydroxytryptamine in blood platelets: physiology and pathophysiology. *Int J Cardiol* 1987; 14: 177-188.
133. Pletcher A. Platelets as peripheral models for neuropsychiatry: A brief review. *Biol Psychiat* 1991; 2: 354-356.
134. Potter WZ, Murphy DL, Wehr TA, Linnoila M, Goodwin FK. Clorgyline: A new treatment for patients with refractory rapid-cycling disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1982; 39: 505-510.
135. Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD. Antidepressant and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2542-2546.
136. Ramamoorthy S, Blakely R. Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants. *Science* 1999; 285: 763-766.
137. Rao ML, Gross G, Strebel B, Halaris A, Huber G et al. Circadian rhythm of tryptophan, serotonin, melatonin and pituitary hormones in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1994; 35: 151-163.
138. Rattray M, Wotherspoon G, Savery D, Baldessari S, Marden C, Priestly JV, Bendotti C. Chronic D-fenfluramine decreases serotonin transporter messenger RNA expression in dorsal raphe nucleus. *Eur J Pharmacol* 1994; 268: 439-442.
139. Ravindran AR, Chudzik J, Bialik RJ, Lapierre YD, Hrdina PD. Platelet serotonin measures in primary dysthymia. *Am J Psychiat* 1994; 151: 1369-1371.
140. Richards JG, Saura J, Ulrich J, Da Prada M. Molecular neuroanatomy of monoamine oxidases in human brainstem. *Psychopharmacology* 1992; 106: 21-23.
141. Robinson DS, Davis JM, Nies A, Ravaris CL, Sylwester D. Relation of sex and aging to monoamine oxidase activity of human brain, plasma and platelets. *Arch Gen Psychiat* 1971; 24: 536-539.
142. Robinson DS, Nies A. Demographic, biologic and other variables affecting monoamine oxidase activity. *Schizophrenia Bull* 1980; 6: 298-307.
143. Rodriguez MJ, Saura J, Billet EF, Finch CC, Mahy N. Cellular localization of monoamine oxidase A and B in human tissues outside of the central nervous system. *Cell&Tissue Research* 2001; 304: 215-220.
144. Romero L, Jernej B, Bel N, Čičin-Šain L, Cortes R, Artigas F. Basal and Extracellular serotonin concentration in the brain of rats with altered serotonin uptake. *Synapse* 1998; 28: 313-321.
145. Ronald F, Borne PhD. Serotonin: The Neurotransmitter for the '90s. *Drug Topics* 1994; 108.
146. Rudnick G. Active transport of 5-hydroxytryptamin by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. *J Biol Chem* 1977; 252: 2170-2174.
147. Rudnick G, Bencuya R, Nelson PJ, Zito RA. Inhibition of platelet serotonin transport by propanol. *Mol Pharmacol* 1981; 20: 118-123.
148. Rudnick G, Clark J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. *Biochem Biophys Acta* 1993; 1144: 249-263.

149. Rudnick G, Humpreys CJ. Platelet serotonin transporter. U: Hawiger JJ, ured. Methods in enzymology vol. 215-B. San Diego, California: Academic Press Inc 1992; 213-224.
150. Russo AF, Clarc MS, Durham PL. Thyroid parafollicular cells. Mol Neurobiol 1996; 13: 257-276.
151. Sandler M, Ma Reveley, Glover V. Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: a rewiw. J Clin Pathol 1981; 34: 292-297.
152. Sandler M, Coppen A, Harnett S. ur. 5-Hydroxytryptamine in Psychiatry. A Spectrum of Ideas. Oxford: Oxford University Press 1991; 50-89.
153. Sarrias MJ, Artigas F, Martinez E, Gelpi E. Seasonal changes of plasma serotonin and related parameters: correlation with environmental measures. Biolog Psychiat 1989; 26: 695-706.
154. Saura J, Kettler R, Da Prada M, Richards JG. Qualitative enzyme autoradiography with <sup>3</sup>H-Ro 41-1049 and <sup>3</sup>H-Ro 19-6327 *in vitro*: lokalization and abundance of MAO-A and MAO-B in rat CNS, peripheral organs, and human Brain. J Neurosci 1992;12: 1977-1999.
155. Schroeter S, Levey AI, Blakely RD. Polarized expression of the antidepressant-sensitive serotonin transporter in epinephrine-synthesizing chromaffin cells of the rat adrenal gland. Mol Cell Neurosci 1997; 9: 170-184.
156. Schurr AS, Ho BT, Schoolar JC. Human brain monoamine oxidase: one molecular entity-multiple binding sites? J Pharm 1980; 33: 165-170.
157. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Monoamine oxidase: from genes to behavior. Ann Rev Neurosci 1999; 22: 197-217.
158. Shuttlerworth RD, O'Brien JR. Interplatelet serotonin and plasma 5-hydroxyindoles in health and disease. Blood 1981; 57: 505-509.
159. Singer TP, Ramsay RR. Monoamine oxidase: old friends hold many surprises. FASEB Journal 1995; 9: 605-610.
160. Soyka M, Bondy B, Benda E, Preuss U, Hegerl U, Moller HJ. Platelet monoamine oxidase activity in alcoholics with and without a family history of alcoholism. Eur Addict Res 2000; 6: 57-63.
161. Spreux-Varoquaux O, Alvarez JC, Berlin I, Batista G, Despierre PG, Gilton A, Cremniter D. Differential abnormalities in plasma 5-HIAA and platelet serotonin concentrations in violent suicide attempters-relationships with impulsivity and depression. Life Science 2001; 69: 647-657.
162. Stahl SM, Meltzer HYA. A kinetic and pharmacologic analysis of 5-hydroxytryptamine transport by human platelets and platelet storage granules: comparison with central serotonergic neurons. J Pharm Exp Ther 1978; 205: 118-132
163. Stahl SM. Platelets as pharmacological model for the receptor and biochemistry of monoaminergic neurons. U: The platelets: physiology and pharmacology. Longenecker GC ured. Academic Press, London 1985; 307.
164. Stanley M, Virgillio J, Gershon D. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. Science 1982; 216: 1337-1339.
165. Streyer L. Enzymes: Basic concepts and kinetics. U: Streyer L. ured. Biochemistry 4<sup>th</sup> ed. New York: W.H. Freeman and Co. 1995; 181-206.
166. Strolin Benedetti M, Dostert P. Monoamine oxidase: From physiology and pathophysiology to design and clinical application of reversible inhibitors. U: Advances in drug research 23. Testa Bur. Academic Press, London 1992; 65.
167. Swade C, Coppen A. Seasonal variations in biochemical factors related to depressive illness. J Affectiv Disord 1980; 2: 249-255.
168. Tariol PN, Cohen RM, Sunderland T, Newhouse PA, Yount D. L-deprenil in Alzheimer's disease: Preliminary evidence for behavioral change with monoaminoxidase B inhibition. Arch Gen Psychiat 1987; 44: 427
169. Technical Manual, Walker RH. editor-in-chief. AABB Bethesda 1993; 11th ed., 51-68.

170. Tetrad JW, Langston JW. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science* 1989; 245: 519.
171. Trimble MR. *Biological Psychiatry*, Second edition. Chichester: John Wiley&Sons, 1996.
172. Van Kempen GMJ, Van Brussel LJ, Pennings EJM. Assay of platelet monoamine oxidase in whole blood. *Clin Chem A* 1985; 153: 197-202.
173. Vangs DM, Rodgers SE, Duncam EM, Lloyd JV, Bochner F. Potentiation of ADP-induced aggregation in human platelet rich plasma by 5-hydroxytryptamine and adrenaline. *Br J Pharmacol* 1992; 106: 917-923.
174. Veral A, Alper G, Menten G, Ersoz B. Age and sex related alternatios in serum and platelet monoamine oxidase. *Eur J Clin Chem & Clin Biochem* 1997; 35: 265-268.
175. Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 1996; 16: 2352-2364.
176. Wahlund LO, Säaf J, Ross SB, Wetterberg L. Activation of monoamine oxidase by high molecular weight fractions of human plasma. *Acta Physiol Scand* 1984; 120: 337-341.
177. Waldmeier PC. Amine oxidase and their endogeneous substrates. *J Neural Transm* 1987; 23: 55-58.
178. Weyler W, Hsu YPP, Breakefield XO. Biochemistry and genetics of monoamineoxidase. *Pharm Ther* 1990; 47: 391-417.
179. Weyler W, Hsu YPP, Breakefield XO: Biochemistry and genetics of monoamine oxidases in human brainstem. *Psychopharmacology* 1992; 106: 21-23.
180. White JG. The dense bodies of human platelets. U: Meyers KM, Barnes CD, ured. *The Platelet Amine Sorage Granule*. Boca Raton: CRC Press, 1992; 1-29.
181. Whitfield JB, Pang D, Bucholz KK, Madden PAF, Heath AC, Statham DJ, Martin NG. Monoamine oxidase: associations with alcohol dependence, smoking and other measures of psychopathology. *Psychosomatic Med* 2000; 30: 443-454.
182. Williams RB, Douglas A, Kishore MG, Barefoot JC, Grichnik K at all. Central Nervous System Serotonin Function and Cardiovascular Response to Stress. *Psychosomatic Med* 2001; 63: 300-305.
183. Wirz-Justice A, Pühringer W, Hole G, Menzi R. Monoamine oxidase and free tryptophan in human plasma: normal variations and their implications for biochemical research in affective disorders. *Pharmakopsychiat* 1975; 8: 310-312.
184. Wirz-Justice A, Lichtsteiner M, Feer H. Diurnal and seasonal variations in human platelet serotonin in man. *JNeur Transm* 1977; 41: 7-15.
185. Wirz-Justice A. Platelet research in psychiatry. *Experientia* 1988; 44: 145-152.
186. Wise CD, Potkin SG, Bridge TP, Phelps BH, Cannon-Spoor HE, Wyatt RJ. Sources of error in the determination of platelet monoamine oxydase: a review of methods. *Sch Bull* 1980; 6: 245-253.
187. Wong WK, Chen K, Shih JC. Regulation of human monoamine oxidase B gene by Sp1 and Sp3. *Molec Pharmacol* 2001; 59: 852-859.
188. Wurtman RJ, Axelrod J. A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. *Biochem Pharmacol* 1963; 12: 1439-1442.
189. Wurthman C. *Socioendocrinology: Key to a fundament synergy*. U: Ziegler TE, Bercovitch FB. *Socioendocrinology of primate reproduction*, Wiley-Liss 1990; 187.
190. Youdim MBH, Ben-Harari RR, Bakhle YS. Factors affecting monoamine inactivation in lung. U: *Metabolic aspect of lung*. Porter R, Knight J ured. *Ciba Foundation Symposium*, Amsterdam 1980; 105.
191. Youdim MBH, Finberg JPM. Monoamine oxidase inhibitor antidepressants. U: *Psychopharmacol*. Grahame-Smith DG, Hippins A, Winoker H ured. *Excerpta Medica*, Amsterdam 1982; 38.
192. Youdim MBH. Platelet monoamine oxidase B: use and misuse. *Experientia* 1988; 44: 137-141.

- 
193. Young WF, Laws ER, Sharbrough FW, Weinshilboun RM. Human monoamine oxidase. Lack of brain and platelet correlation. *Arch Gen Psychiat* 1986; 43(6): 604-609.
  194. Yu PH. Pharmacological and clinical implications of MAO-B inhibitors (a review). *Gen Pharmacol* 1994; 25: 1527-1539.
  195. Zeller EA, Boshes B, Arbit J, Bieber M, Blonsky ER, Dolkart M, Huprikar SV. Effect of parinsonism, age, sex and L-dopa on platelet monoamine oxidase. *J Neur Transm* 1976; 39: 63-67.
  196. Zeller J, Weissbarth E, Baruth B, Mielke H, Deicher H. Serotonin content of platelets in inflammatory rheumatic diseases. Correlation with clinical activity. *Arthritis and Rheumatism* 1983; 26: 532-540.
  197. Dallal and Wilkinson approximation to Lilliefors method. *Am Statistician*, 1986; 40:294-296.

## **10. ŽIVOTOPIS**

**Melita Balija**

- Rođena: 21.10.1950.g.  
Mjesto rođenja: Ljubljana, Slovenija  
Nacionalnost: Hrvatica
- Školovanje:** 1957 - 1969.g.  
Osnovna škola: u Zagrebu  
Gimnazija: u Zagrebu
- Studij:** 1969 - 1975.g. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Liječnički pripravnički staž:** 1975 - 1976.g. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
- Specijalizacija:** 1981 - 1985.g. Transfuzijska medicina
- Specijalistički ispit:** 1985.g. Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu
- Postdiplomski studij:** 1989 - 1991.g., Javno zdravstvo  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Magisterij:** 1996.g., Demografska obilježja i razlozi koji potiču ljude na dobrovoljno davanje krvi  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Stručno usavršavanje:** Sudjelovanje na stručnim skupovima u zemlji i inozemstvu  
1988.g. studijski boravak u BTC u Groningenu, Nizozemska  
1996.g. studijski boravak u BTC u Hamburgu, Njemačka  
1996.g. studijski boravak u Istraživačkom centru tvrtke Baxter, Minhen, Njemačka  
2000.g. studijski boravak u BTC u Antwerpenu, Belgija
- Rad u struci:** 1976 - 1982.g. - Liječnik, voditelj ekipe za prikupljanje krvi (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb)  
1985 - 1991.g. - Rukovoditelj RJ Transfuziologija (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb)  
1991 – ..... - Rukovoditelj Službe za transfuzijsku medicinu (Hrvatski zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb)
- Objavljeni radovi:**
1. Banović M, Čičin-Šain L, Jernej B, Zoran M, Coen D, Balija M, Grgičević D. Optimizacija postupka izdvajanja trombocita iz humane krvi uz mjerenje trombocitnog serotonina. Biochem med 4 1993; 89-90.
  2. Hundrić-Hašpl Ž; Juraković-Lončar N; Grgičević D, Balija M. Alloimmunizations Following Blood Transfusion. Acta med. Croatica 1994; 48: 193-197



3. Jernej B, Banović M, Balijsa M, Čičin-Šain L, Nazor A, Grgičević D. Physiological characteristics of platelet serotonin (5HT) level, platelet 5HT uptake and platelet monoamine oxidase (MAO-B) activity in humans. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995; 5: 416-417.
4. Juraković-Lončar N, Hundrić-Hašpl Ž, Balijsa M, Grgičević D. Evaluacija direktnog antiglobulinskog testa. *Liječnički vjesnik*, 1995, 117
5. Strauss-Patko M, Balijsa M, Grgičević D. Sigurnost transfuzijskog liječenja s posebnim osvrtom na inaktivaciju virusa u preparatima proizvedenim iz ljudske krvi; *Liječnički vjesnik*, 1995; 117: 216-211
6. Šarlija D, Balijsa M, Bosanac I, Hundrić-Hašpl Ž, Tomičić M, Grgičević D. Kontrola kvalitete rada u imunohematološkim laboratorijima transfuzijskih ustanova u Hrvatskoj; *Liječnički vjesnik*, 1995; 117:19-23
7. Jernej B, Čičin-Šain L, Froebe A, Hranilović D, Podnar M, Banović M, Iskrić S, Balijsa M, Grgičević D, Kozarić-Kovačić D, Folnegović-Šmalc V. Serotonin transporter: studies on platelet model in rats and humans. *Period Biol* 1996; 98: 95-102.
8. Babuš V, Presečki V, Katičić M, Balijsa M, Zorić I, Kronja Lj, Sabo A, Vrličak J, Čuković-Čavka S. Rasprostranjenost infekcije s *Helicobacter pylori* u odrasloj populaciji Hrvatske. *Lij. vjesnik*; 1997; 119
9. Vuk T, Putarek K, Jukić I, Rojnić N, Balijsa M, Grgičević D. Što možemo naučiti o odbijanju transfuzijskog liječenja iz iskustva s Jehovinim svjedocima? *Liječ Vjesn* 1997;119:243-245.
10. Vuk T, Putarek K, Rojnić N, Gjenero-Margan I, Balijsa M, Grgičević D. Croatian blood transfusion service in prevention of HIV spread during the war. *Acta med. Croatica* 1998;52:221-222.
11. Vuk T, Balijsa M, Grgičević D. Croatian blood transfusion service during the war. *Transfusion Today* 1998;34:20-21.
12. Bingulac-Popović J, Grahovac B, Zambeli J, Mihaljević I, Dražić V, Pirc-Tiljak D, Petrovečki M, Balijsa M, Grgičević D; Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction among Croatian blood donors and patients. *Period biol* 1998; Vol. 100, No 3, 389-349.
13. Vuk T, Šarlija D, Balijsa M, Grgičević D. Hemoglobin determination in blood donors. *Vox Sang* 1998;75:73.
14. Vuk T, Maglov Č, Godec D, Tomičić M, Balijsa M, Grgičević D. Platelet function and markers of hemostatic activation in plasma donors. *Infusionsther Transfusionsmed* 1999;26:
15. Jernej B, Banović M, Čičin-Šain L, Hranilović D, Balijsa M, Orešković D, Folnegović-Šmalc V. Physiological characteristics of platelet/circulatory serotonin: study on large human population. *Psych Research* 2000; 94: 153-162.
16. Jernej B, Vladić A, Čičin-šain L, Hranilović D, Banović M, Balijsa M, Bilić E, Sučić Z, Vukadin S. Platelet serotonin measures in migraine. *Headache* 2002; 42: 588-595.
17. Hranilović D, Štefulj J, Furac I, Kubat M, Balijsa M, Jernej B. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and Intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian. *BioPsychiatry* 2003; (u tisku).

## **PLATELET SEROTONIN SYSTEM IN HEALTHY HUMAN**

### **SUMMARY**

Serotonin is regarded as a master control neurotransmitter of complex neuronal communication. The brain serotonin system is involved in numerous physiological functions among which eating, sleep, sexual behaviour, circadian rhythmicity and neuroendocrine functions are the most prominent ones. The physiological role of high serotonin concentration in platelets has remained poorly understood. Serotonin was recently shown to play, in addition to its direct agonistic action, an important role as potent amplifier of platelet response. Blood platelets contain 5HT elements similar to neurons: two of them are in platelet cytoplasm: amine storage granules and mitochondrial MAO-B activity; others are linked to the platelet membrane: 5HT transporter and serotonin (5HT-2A) receptor. Platelet serotonin is stored in dense granules, analogously to vesicular 5HT in neurons, where is protected from MAO activity. However, in contrast to neurons, platelets do not synthesise 5HT and their amine content is a result of the transporter-mediated uptake from the surrounding blood plasma. Easy accessible platelet serotonin elements represent object of studies in neurobiology and biological psychiatry as well as in various investigations addressing serotonin pathophysiology in general in contrast to far fewer studies aimed at the physiological aspects of platelet 5HT elements.

This work has been aimed at the study of three platelet 5HT elements: platelet granular serotonin (PS), platelet serotonin transporter (5HTt) and platelet monoamineoxidase activity (MAO-B) in a population of 63 healthy human volunteers of both sexes.

The first part of the investigation was dedicated to the introduction of methodologies enabling reliable measurements of the mentioned parameters. In the second part of this work we have investigated the main physiological characteristics of three platelet 5HT elements: frequency distribution of individual values, dependence on age, influence of sex, intra-individual stability over time and periodic oscillations, on a 63 healthy voluntary blood donor in the course of longer time period.

Studies were performed on a population of healthy volunteers (blood donors) of both sexes: 10 females and 53 males aged between 21 and 67 years, over the period of 18 months. Blood sampling was routinely performed during the blood donor session. From each person a sample of 16 ml of venous blood was collected on 4 ml of ACD anticoagulant. After centrifuging blood in adapted plastic syringes PRP was quantitatively separated in aliquots of 1 ml. Platelet number and mean platelet volume, as well as measurement of 5HT transport kinetics was performed on the same day. The samples of platelet pellets (for measurement of serotonin level), and samples of PRP (for measurement of MAO-B kinetics) were frozen and stored at -20°C; the measurements were performed within two weeks.

Platelet serotonin content was determined spectrophotofluorometrically. Deionized water was added to each platelet pellet and samples were sonicated. ZnSO<sub>4</sub>/NaOH and centrifugation precipitated proteins. Following deproteinisation of the ultrasonicated platelet sample, platelet serotonin was measured by orthophtaldialdehyde (OPT) – enhanced fluorometry at 345/485 nm. Platelet serotonin level was expressed per unit number of platelets (ng 5HT/10<sup>9</sup>platelets) reflecting the

amine concentration in platelets or per unit volume of whole blood (ng 5HT/ml) reflecting the amine level in the circulation.

Platelet 5HT uptake was assayed by use of radioisotopic method. Platelets in Krebs-Ringer phosphate buffer (without  $\text{CaCl}_2$ ) were incubated with six concentrations of radioactively labelled ( $^{14}\text{C}$ ) serotonin. Uptake interval amounted to 60 seconds with sharp termination by the addition of ice-cooled buffer followed by immediate vacuum filtration. The determination of blank values was processed in the same manner but near  $0^\circ\text{C}$ . Results were expressed as  $V_{\text{max}}$  in pmol of serotonin per  $10^8$  of platelets and  $K_m$  in molar concentration of serotonin ( $\mu\text{M}$ ). The kinetic product ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) was also calculated in each person.

Activity of MAO-B was measured spectrophotofluorometrically using six concentrations of kynuramine as substrate. PRP was preincubated with buffer (Na-borate-HCl) and then incubated with six concentrations of substrate. The reaction was stopped by adding trichloroacetic acid, the mixture was centrifuged and formed 4-hydroxyquinoline (4-hQ) was measured fluorimetrically at 310 nm excitation and 362 nm emission. Standards and blanks were carried through the entire procedure.  $K_m$  results were expressed as  $\mu\text{M}$  concentration of kynuramine.  $V_{\text{max}}$  results were expressed as quantity of product 4-OH quinoline ( $\text{nmol}/10^8$  platelets/60 min).

The mean values of granular serotonin amounted to  $537 \pm 150,7$  ng/ $10^9$  platelets and the mean values of serotonin concentration in blood were  $174 \pm 63,4$  /ml. The values of transporter kinetic parameters were:  $V_{\text{max}}=138 \pm 25,4$  pmol/ $10^8$ /min and  $K_m=0,400 \pm 0,1$   $\mu\text{M}$ . The values of kinetic parameters of MAO-B activity were:  $V_{\text{max}}=14,56 \pm 4,9$  nmol/ $10^8$ /h and  $K_m=3,76 \pm 1,1$   $\mu\text{M}$ .

The studied parameters - granular serotonin content in platelets and serotonin level in blood, as well as kinetic parameters of serotonin transporter ( $V_{\text{max}}$  and  $K_m$ ) and monoamineoxidase activity ( $V_{\text{max}}$  and  $K_m$ ) demonstrated normal frequency distributions of individual values (with the borderline values  $p=0,05$  of  $K_m$  distribution) of MAO-B.

Regarding physiological characteristics - influences of age, sex and seasonal periodicity, significant changes were found in seasonal oscillation of platelet serotonin level spring vs autumn ( $p<0,001$ ) and autumn vs winter ( $p<0,01$ ) and in MAO-B activity and transporter velocity. 5HT transporter velocity ( $V_{\text{max}}$ ) demonstrated significant decrease with age ( $p<0,05$ ) and higher values ( $V_{\text{max}}/K_m$ ) in spring vs autumn ( $p<0,001$ ) and in summer vs autumn ( $p<0,01$ ). Velocity of MAO-B ( $V_{\text{max}}$ ) and  $K_m$  demonstrated increase with age ( $p<0,05$ ) and higher values ( $V_{\text{max}}$  and  $V_{\text{max}}/K_m$ ) in females ( $p<0,05$ ) as well as significant seasonal oscillations  $K_m$  in spring vs summer ( $p<0,001$ ) and spring vs autumn ( $p<0,001$ ) and oscillation  $V_{\text{max}}/K_m$  in spring vs summer ( $p<0,001$ ), spring vs autumn ( $p<0,01$ ) and spring vs winter ( $p<0,01$ ).

Kinetic parameter of serotonin transporter  $V_{\text{max}}$  (maximal velocity) demonstrated high significant correlation with granular serotonin content ( $p<0,001$ ) and with affinity of the transporter ( $p<0,001$ ), but both platelet serotonin and kinetic parameters of serotonin transporter demonstrated no correlation with MAO-B kinetic parameters.