Биологическая оценка выраженности депрессии — новый метод определения концентрации тромбоцитарного серотонина

М.В. БЕЗРУКОВ*, Ю.Е. ШИЛОВ, Н.В. ШЕСТАКОВА, Т.П. КЛЮШНИК

ФГБУ «Научный центр психического здоровья» РАМН, Москва

The biological evaluation of depression severity: a novel method for the determination of platelet serotonin concentration

M.V. BEZRUKOV, YU.E. SHYLOV, N.V. SHESTAKOVA, T.P. KLIUSHNIK

Mental Health Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Цель исследования. Разработка высокочувствительного метода определения концентрации тромбоцитарного серотонина, применимого в повседневной клинической практике. **Материал и методы.** Разработанный метод был ориентирован на исследование плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (ПОТ). Серотонин определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрической детекцией и использованием гематологического анализатора. **Результаты и заключение.** При обследовании здоровых лиц были получены значения концентраций тромбоцитарного серотонина, соответствующие данным литературы: от 2,19 до 4,87 нмоль/10^9 тромбоцитов. При обследовании 30 больных с депрессивными расстройствами было отмечено снижение содержания тромбоцитарного серотонина — от 0,11 до 2,89 нмоль/10^9 тромбоцитов и корреляция этого показателя с клинической оценкой выраженности депрессии. Авторы считают, что разработанный метод применим для клинических целей.

Ключевые слова: *депрессия, диагностика, тромбоциты, серотонин, ВЭЖХ, флуоресцентное детектирование.*

Objective. To develop a highly sensitive method for the determination of platelet-rich plasma serotonin concentration for everyday clinical practice. **Material and methods**. The method was developed for determination of serotonin in plateled-rich plasma. Serotonin was determined using high performance liquid chromatography with fluorescent detection and hematologic analyzer. **Results and conclusion**. In healthy people, concentrations of platelet serotonin were similar to those reported in literature: from 2.19 to 4.87 nmol/10^9 platelets. In patients with depression (n=30), platelet serotonin concentrations were lower (from 0.11 to 2.89 nmol/10^9 platelets) and correlated with the severity of depression. The method may be used in clinical purposes.

Key words: *depression, diagnosis, platelet, serotonin, HPLC, fluorescent detection.*

Серотонин (5-гидрокситриптамин, 5-НТ, 3-(2-аминоэтил)-1Н-индол-5-ол) в организме человека образуется из незаменимой аминокислоты триптофана в ходе его окислительного распада по метоксииндольному пути. Около 98% триптофана, поступающего в организм с пищей, метаболизируется по кинурениновому пути и примерно 2% — метоксииндольному [1] **(рис. 1)**. Серотонин относится к индолалкиламинам. Он и его производные обладают высокой и разнообразной биологической активностью.

Впервые серотонин был выделен в 1937 г. из слизистой кишечника и по способности сокращать его гладкие мышцы назван «энтерамином». Примерно в то же время M. Rapport и соавт. [2] выделили из сыворотки крови вещество, приводящее к сужению сосудов и повышению кровяного давления, назвав его «серотонин». В дальнейшем структура выделенного серотонина была подтверждена химическим синтезом [3]. В 1953 г. B. Twarog и I. Page [4] обнаружили серотонин в головном мозге. Было показано, что серотонин в основном (90—95%) синтезируется и хранится в энтерохромаффинных клетках кишечника, откуда поступает в кровь. Однако он также синтезируется в нейронах головного мозга и эпифизе. Серотонин в ЦНС играет роль важного нейромедиатора и нейромодулятора. Нарушения в функционировании серотониновой системы головного мозга вовлечены в патогенез психических и неврологических заболеваний [5—11]. Особенно широко распространена «серотониновая» гипотеза патогенеза депрессивных расстройств, согласно которой основной причиной развития депрессии является нарушение функционирования серотонинергических структур мозга. В основу этой гипотезы был положен факт снижения у больных депрессией уровня серотонина в серотонинергических синапсах мозга и тромбоцитах крови [12, 13]. При этом была отмечена связь между снижением уровня серотонина и тяжестью депрессивного состояния [14].

Экстрацеребральной моделью серотонинергических нейронов считаются тромбоциты [15], в плотных гранулах которых содержится практически весь серотонин крови. Было показано [16], что содержание серотонина в тромбоцитах в 25 000 раз выше, чем в плазме крови. Была выявле-

© Коллектив авторов, 2014

*e-mail: bezrmv1chem@mail.ru

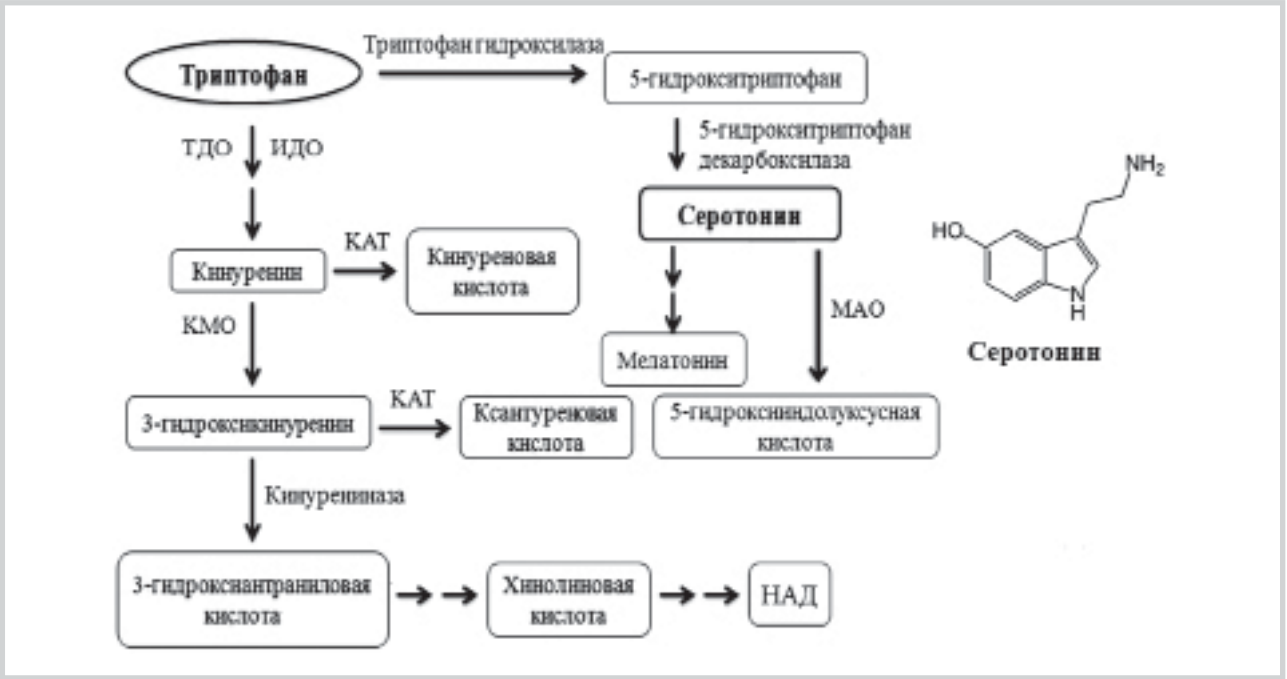

Рис. 1. **Схема превращений метаболитов триптофана.**

ТДО — триптофан 2,3-диоксигеназа, ИДО — индоламин 2,3-диоксигеназа, КМО — кинуренин 3-монооксигеназа, КАТ — кинуренин аминотрансфераза, МАО — моноаминоксидаза, НАД — никотинамидадениндинуклеотид.

на [17] корреляция между содержанием серотонина в тромбоцитах и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) и плохая корреляция содержания серотонина в плазме и ЦСЖ.

В ряде работ была показана высокая диагностическая и прогностическая значимость измерения уровня тромбоцитарного серотонина при психических заболеваниях [8, 18, 19] и некоторых неврологических расстройствах, в частности при церебральном ишемическом инсульте [20]. Измерение концентрации серотонина в сыворотке крови, моче, тромбоцитах может быть использовано также для диагностики карциноидных опухолей [21] и заболеваний печени [22].

Вследствие способности серотонина к быстрому окислению кислородом [23] и сложностей, возникающих при работе с содержащими серотонин тромбоцитами (например, склонность тромбоцитов к агрегации и разрушению), разработка простых и точных методов анализа содержания серотонина в тромбоцитах является актуальной задачей.

Цель нашего исследования — разработка простого, точного и высокочувствительного метода определения тромбоцитарного серотонина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуориметрической детекцией с использованием гематологического анализатора для подсчета количества тромбоцитов.

Материал и методы

Реактивы и растворители. В работе использовали ацетонитрил для ВЭЖХ («Merck», Art 17, США), изопропанол, перегнанный на ректификационной колонке, а также вспомогательные вещества — бикарбонат аммония, лимонная кислота, монофосфат аммония или азид натрия 99% («Sigma», США). Для приготовления стандартных растворов применяли гидрохлорид серотонина с чистотой не менее 99% («Acros Organics», США).

Для хроматографии использовали воду сопротивлением 10—18 мегаОм, получаемую из дистиллята, очищенного на установке для очистки воды Milli-Q («Millipore», США). Для хроматографии воду дополнительно перегоняли в режиме дефлегмации с использованием ректификационной колонки с призматической насадкой Зульцер.

Оборудование. Для центрифугирования вакутейнеров с K_3ЭДТА и кровью и получения плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (ПОТ), использовали центрифугу СМ6М («ELMI», Латвия) при 200 g в течение 10 мин. Центрифугу Allegra X-300 («Beckman Coulter», США) использовали для осаждения в присутствии K_3ЭДТА тромбоцитов плазмы при 6000 g в течение 40 мин при 4 °С и осаждения разрушенных тромбоцитов в течение 20 мин. Встряхивание тромбоцитов проводили в орбитальном шейкере со скоростью встряхивания 600 оборотов в 1 мин и амплитудой от 3 мм.

Для подсчета тромбоцитов в цельной крови и плазме крови, обогащенной тромбоцитами, использовали гематологический анализатор KX-21N («Sysmex», Япония) (коэффициент вариации метода составлял от 4 до 10%).

С помощью микроскопа проводили проверочное определение содержания тромбоцитов на 1000 эритроцитов в мазке крови по Фонио [24] с целью проверки и подтверждения данных, полученных на гематологическом анализаторе (данные не приводятся).

Дегазацию растворителей для ВЭЖХ проводили с использованием мембранного вакуумного насоса KNF Laboport (модель №820.3 AN18, «Weigand International»,

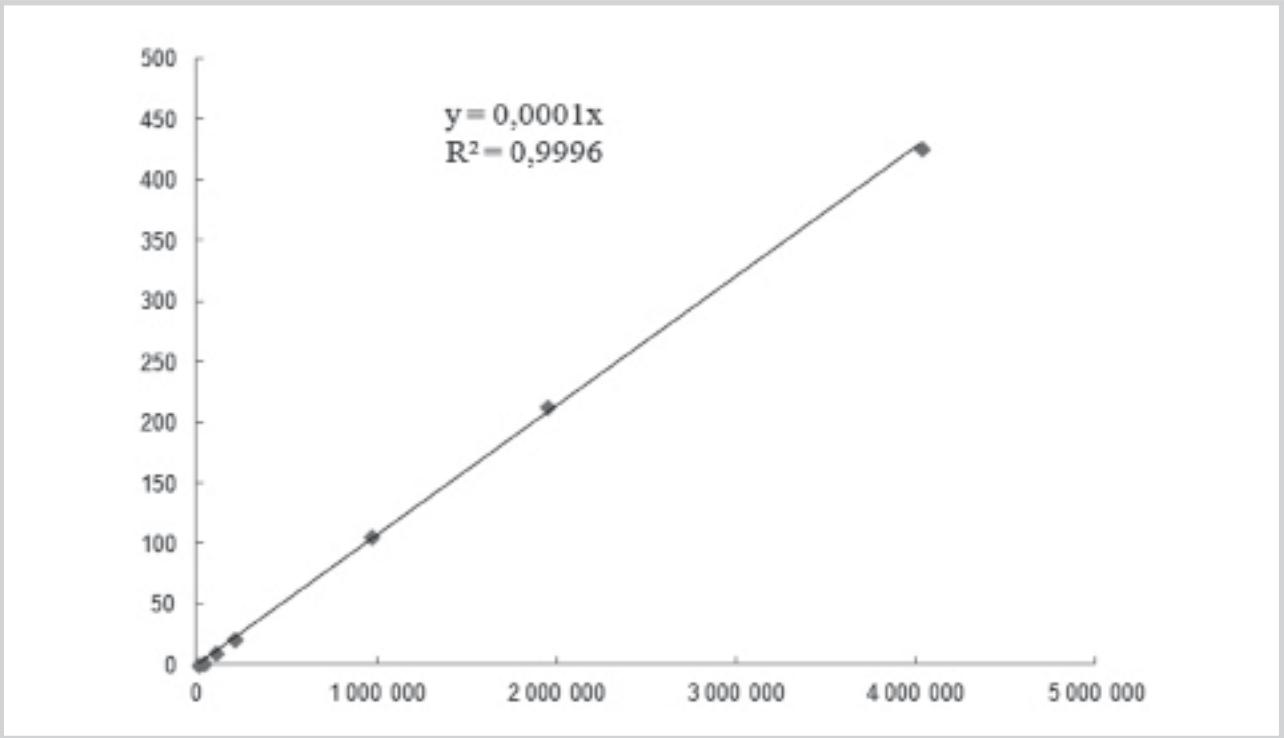

Рис. 2. **Калибровочная кривая (зависимость концентрации серотонина от величины площади хроматографических пиков).**
По оси абсцисс — площадь хроматографических пиков; по оси ординат — концентрация серотонина, нг/мл.

Германия) в вакууме при перемешивании на магнитной мешалке.

Определение концентрации серотонина в образцах проводили на жидкостном хроматографе System GOLD («Beckman Coulter») с флуометрическим детектором FP-2020+ (JASCO, Япония), насосом модели 128 с двумя аналитическими головками по 10 мл, инжектором Rheodine 7725i и аналитической колонкой с C_{18} обращенной фазой Ultrasphere XL 3мм ODS (70×4,5 мм) («Beckman Coulter»). Обсчет хроматограмм производили с использованием программы 32 KARAT («Beckman Coulter») или любой другой подходящей программы обсчета на основе калибровочного графика, построенного для свежеприготовленных растворов гидрохлорида серотонина в 3% ацетонитриле с конечными концентрациями 0,21; 1,06; 2,12; 10,6; 21,3; 106,4; 212,8; 425,6 нг/мл **(рис. 2)**.

Процедура забора крови и подготовка проб. Кровь из вены брали натощак в вакутейнер Vacuette Premium («Greiner Bio-one», Австрия), содержащий раствор K_3ЭДТА [25, 26]. За 48 ч до забора крови из рациона исключали продукты, влияющие на содержание серотонина в клетках крови или моче (шоколад, сыр, бананы, инжир, яйца, орехи, кукурузу и т.д.). Обследуемые должны были воздерживаться от употребления алкоголя и табакокурения. Учитывали и использование лекарств, в частности серотонина адипината, золофта и т.д.

После забора крови в вакутейнер кровь центрифугировали при 200 g в течение 10 мин и получали ПОТ [26]. Определяли с помощью гематологического анализатора количество тромбоцитов в ПОТ и венозной крови в присутствии K_3ЭДТА. Сразу после центрифугирования охлаждали ПОТ до +4°С и разливали в пластиковые пробирки с круглым дном по 400 мкл. (В дальнейшем все процедуры проводили при 4±2 °С, поскольку при более высокой температуре серотонин окисляется.) Затем тромбоциты осаждали центрифугированием при 6000 g в течение 40 мин при 4 °С, аккуратно декантировали верхний водный слой.

После центрифугирования в водном слое плазмы определяли содержание серотонина при помощи ВЭЖХ для контроля метода.

К осадку тромбоцитов, находящемуся в пластиковой пробирке, добавляли 400 мкл дистиллированной воды, охлажденной до 4±2 °С и затем разбивали тромбоциты на шейкере в течение 0,5 мин. Потом пробирку замораживали при –80 °С и не раньше чем через 1 ч размораживали и центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин при 4 °С. Из полученного супернатанта отбирали 20 мкл и проводили аналитическую хроматографию на колонке с С18 обращенной фазой.

Хроматографическое определение концентрации серотонина. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе («Beckman Coulter») с конфигурацией, описанной выше. Детектирование флюоресценции серотонина осуществляли при длине волны поглощения 300 нм и испускания 330 нм, при коэффициенте усиления 100 и ширине спектральной линии 18 нм.

При хроматографии в качестве буфера А использовали растворенные в 1 л перегнанной воды с сопротивлением 10—18 мегаОм 2336 мг лимонной кислоты, 1346 мг монофосфата аммония, 413 мг динатриевой соли ЭДТА, 918 мг бикарбоната аммония и 100 мг азида натрия. Дегазацию буфера А проводили в вакууме насоса KNF Laboport при 10 мм рт.ст. 25—30 мин, до окончания выделения

углекислого газа, при этом получали буферный раствор с pH 4,05—4,20. В качестве буфера В использовали смесь 200 частей ацетонитрила и 20 — воды или смесь 200 частей перегнанного изопропанола и 15 — воды. Буфер В дегазировали в течение 2—3 мин. После данной процедуры буферная система В может храниться в плотно закрытом сосуде 1 нед при 4±8 °С. При уменьшении концентрации ацетонитрила и увеличении времени удерживания серотонина буфер В заменяют. Буфер А можно хранить в холодильнике 1 мес.

Хроматографию водных или водно-органических экстрактов тромбоцитов, содержащих серотонин, проводили изократическим элюированием со скоростью потока 1,5 мл/мин 4% буфера В в буфере А в течение 2,5 мин; далее колонку отмывали от примесей линейным градиентом от 4 до 70% буфера В от 2,5 до 3 мин; от 3 до 5 мин колонку промывали 70% буфера В; затем от 5 до 10,5 мин колонку переуравновешивали 4% буфера В. Время удерживания серотонина на колонке составляло 1,65—2,15 мин и не изменялось после проведения более 1000 определений серотонина. Примеси, которые могут содержаться в использованной воде или образце экстракта тромбоцитов, элюировались с временем удерживания 0,45—0,6 и 4,7—6,8 мин. Время удерживания триптофана составляло 3—3,4 мин.

Перед нанесением на колонку растворы серотонина можно хранить в холодильнике при 4 °С или в замороженном виде при –15 °С и размораживать перед определением холодной водой.

Хроматограммы обсчитывали с использованием программы 32 KARAT («Beckman Coulter») или другой подходящей программы на основе калибровочной кривой, полученной для навесок гидрохлорида серотонина **(см. рис. 2)**. Типичная хроматограмма водного экстракта разрушенных тромбоцитов приведена на **рис.3**.

После забора пробы и проведения хроматографии пластиковую пробирку с раствором серотонина можно замораживать и хранить при –80 °С до 1 года.

Результаты и обсуждение

Разработанный метод определения концентрации тромбоцитарного серотонина включает получение из крови ПОТ, при центрифугировании крови в присутствии K_3ЭДТА при 200 g в течение 10 мин; быстрый подсчет количества тромбоцитов в ПОТ на гематологическом анализаторе в 10^9 клеток/мл (N); осаждение тромбоцитов в 400 мкл ПОТ высокоскоростным центрифугированием, декантирование супернатанта, суспендирование осадка тромбоцитов в объеме воды (или воды с 3—4% органического растворителя), равном объему ПОТ с последующим разрушением тромбоцитов замораживанием для выделения из них серотонина, размораживание жидкости с разрушенными тромбоцитами, ее центрифугирование и получение водного экстракта, содержащего тромбоцитарный серотонин; проведение ВЭЖХ и определение содержания в водном растворе тромбоцитарного серотонина в нг/мл (С) на основе калибровочного графика **(см. рис. 2)**, полученного для стандарта — гидрохлорида серотонина (мол. вес W=212,68) (процедура построения калибровочного графика приведена ниже); расчет концентрации тромбоцитарного серотонина (C_T) в нмоль/10^9 тромбоцитов по формуле $C_T=C/(N\cdot W)$.

Так, например, при определении на гематологическом анализаторе количества тромбоцитов: $N=0{,}054\cdot10^9$ клеток/мл. Определенное по ВЭЖХ значение концентрации серотонина в разрушенных тромбоцитах — 56,0 нг/мл. Соответственно содержание серотонина в тромбоцитах — $C_T=56{,}0/(0{,}054\cdot212{,}68)=4{,}87$ нмоль/10^9, что практически соответствует верхней границе нормы.

Разработанным методом были проведены измерения концентраций тромбоцитарного серотонина у 30 больных с клинической картиной депрессивного расстройства и 10 здоровых (контроль). У здоровых были получены концентрации серотонина в интервале от 2,19 до 4,87 нмоль/10^9

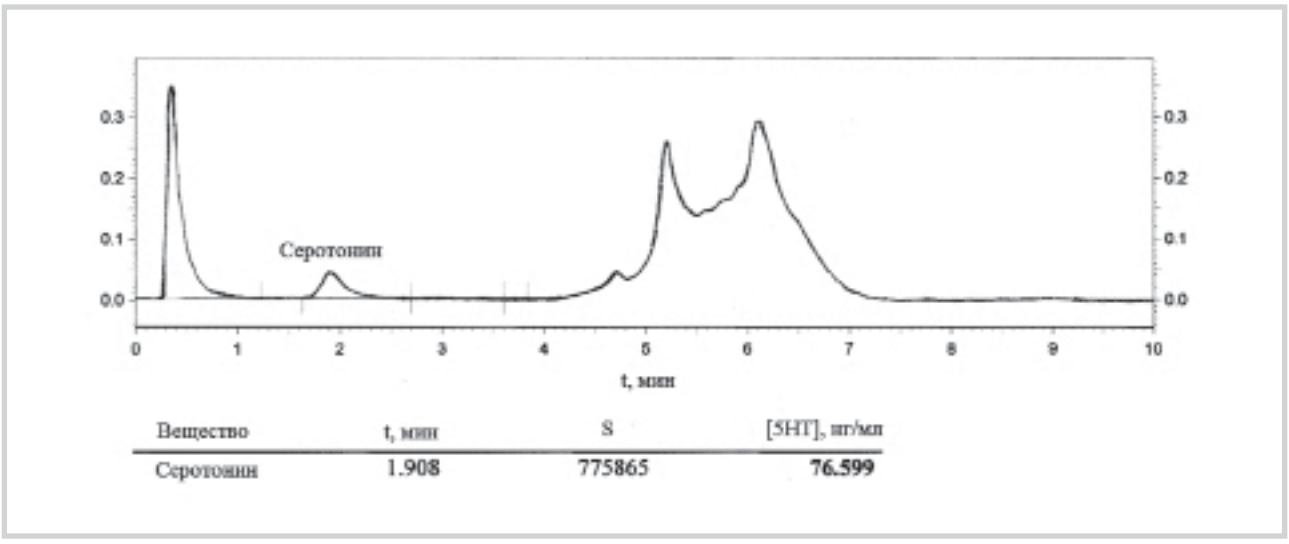

Рис. 3. **Хроматограмма выделенного из тромбоцитов серотонина.**

Здесь и на рис. 4: по оси абсцисс — интенсивность флюоресценции в отн. ед.; по оси ординат — время удерживания, в мин; S — площадь хроматографического пика; [5HT], нг/мл — концентрация серотонина.

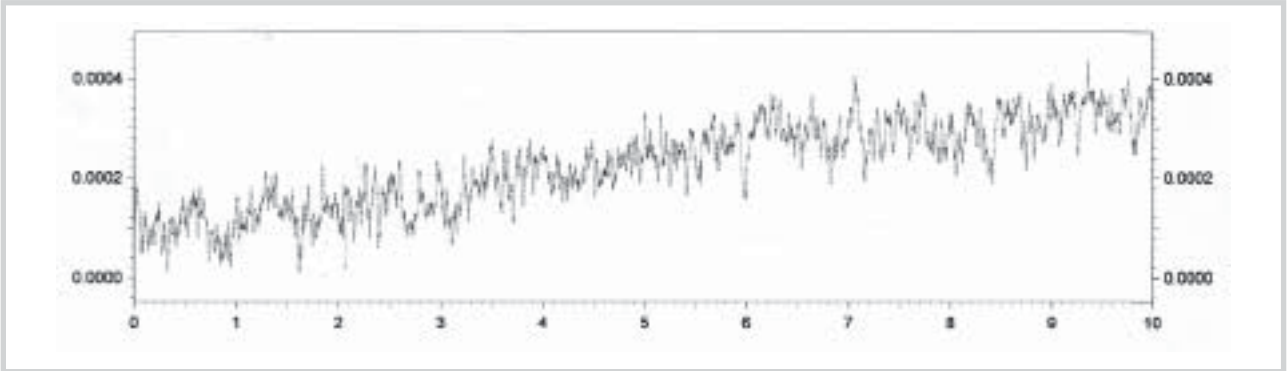

Рис. 4. **Хроматограмма базовой линии градиента с водой, перегнанной на ректификационной колонке.**

тромбоцитов, у больных они находились в интервале от 0,11 до 2,89 нмоль/10^9 тромбоцитов. Полученные значения концентрации серотонина у больных были не только ниже показателей у здоровых, но и коррелировали с клинической оценкой состояния больных. Таким образом, разработанный метод определения концентрации тромбоцитарного серотонина может быть использован вместе с другими клиническими методами для диагностики депрессивных расстройств.

Описанные в литературе нормальные значения концентраций тромбоцитарного серотонина в нмоль/10^9 тромбоцитов находятся в следующих интервалах: для новорожденных 1,67±0,74; для детей 4,09±1,04; для взрослых 3,87±0,87; для пожилых 2,57±1,12 [27], что также иллюстрирует применимость разработанного метода.

Для построения калибровочного графика использовались растворы, полученные из навески ~5 мг гидрохлорида серотонина с 99% хроматографической чистотой. Чистота подтверждалась тонкослойной хроматографией (ТСХ) на силикагеле Merk Art 5642 в системах этилацетат — уксусная кислота: вода 3:1:1 (Rf 0,50) и н-бутанол:уксусная кислота: вода 4:0,5:5,5 (Rf 0,51). При ТСХ нанесенный серотонин проявлялся одним пятном в УФ свете или при помощи проявителей для ТСХ [28, 29]. При построении калибровочного графика на колонку с С18 обращенной фазой наносилось по 20 мкл образца с растворенными навесками гидрохлорида серотонина в указанных выше концентрациях. При проведении хроматографии для образцов с навесками серотонина измерялась и обсчитывалась площадь пиков флюоресценции растворов гидрохлорида серотонина при ВЭЖХ с использованием функции Area и программного обеспечения KARAT 32 («Beckman Coulter»). Полученный график описывается уравнением C=0,0001·S, где C — концентрация серотонина в нг/мл, S — площадь хроматографического пика, определенная по функции Area. Калибровочный график является линейным во всей области концентраций от 0,2 до 425 нг/мл, в которой производится определение серотонина в тромбоцитах **(см. рис. 3)**.

Предел детекции гидрохлорида серотонина в 3% ацетонитриле составляет 0,2 нг/мл при отношении величин сигнала к шуму, равном 3:1. При работе с образцами серотонина, выделенного из разрушенных тромбоцитов, калибровка оборудования проверялась перед проведением анализов проверочной хроматографией стандартных растворов гидрохлорида серотонина в 3% водном ацетонитриле.

Подчеркнем, что разработанный метод включает быструю и точную стадию определения содержания количества тромбоцитов в ПОТ на гематологическом анализаторе и определение концентрации серотонина с помощью ВЭЖХ с флуометрической детекцией. Методы определения серотонина, включающие его электрохимическое детектирование, являются недостаточно надежными из-за адсорбции компонентов из разрушенных тромбоцитов на электроде и возникающих затруднений при проведении анализов. Методы, включающие детектирование серотонина при ВЭЖХ в УФ-области, недостаточно чувствительны для клинического применения.

При постановке анализа разработанным флюоресцентным хроматографическим методом в отличие от метода с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) не используются дорогостоящие антитела [25]. Разработанный хроматографический метод по сравнению с ИФА включает меньшее число стадий, обладает большей специфичностью и возможностями проверки другими независимыми хроматографическими методиками, позволяет анализировать единичные образцы и их серии и многокомпонентные смеси с высокой производительностью. Метод, основанный на ВЭЖХ, может быть улучшен с целью определения концентраций нескольких веществ в смесях. В то же время метод, основанный на ИФА, не имеет такой возможности. Растворители, используемые при ВЭЖХ, можно регенерировать с использованием ректификации, перегонок, а также кристаллизации при пониженных температурах. Проведение регенерации растворителей повышает экономичность хроматографии.

Таким образом, разработанный метод ВЭЖХ с флуометрической детекцией серотонина имеет преимущества по сравнению с другими методами анализа.

Относительно сложностей при использовании для анализа метода ВЭЖХ необходимо отметить, что из-за высокой чувствительности метода обычно используемая вода, получаемая путем очистки на системе водоподготовки Milli-Q reagent water system («Millipore», США), нуждается в дополнительной очистке перегонкой с использованием ректификационной колонки из-за появления при градиентном элюировании лишних пиков примесей с временем удерживания 0,45—0,6 и 4,7—6,8 мин **(см. рис. 3)**. При проведении работ было установлено, что ис-

пользование при ВЭЖХ воды, полученной на указанной системе водоочистки и перегнанной в режиме дефлегмации в ректификационной колонке со стальной спиральной призматической насадкой Зульцер, позволяет получать при хроматографии с флюоресцентным детектором ровную базовую линию при градиентном элюировании от 3 до 60% ацетонитрила **(рис. 4)**. Указанное преимущество позволяет определять профили элюирования обладающих флуоресценцией многокомпонентных смесей аминокислот и пептидов и количественно анализировать компоненты смеси, обладающие собственной флюоресценцией, например триптофан, тирозин и их производные.

Используемые в разработанном методе параметры центрифугирования были уточнены по сравнению с опубликованными [30]. Было показано, что для точного и качественного определения необходимо более длительное центрифугирование для осаждения тромбоцитов. Параметры центрифугирования контролировали при помощи ВЭЖХ по потерям серотонина в супернатантах. Было показано, что большая длительность центрифугирования необходима для осаждения разрушенных тромбоцитов и их фрагментов в присутствии K_3ЭДТА и обеспечения надежности работы хроматографической колонки.

Использование изократического режима элюирования с 3—4% содержанием ацетонитрила или изопропанола является более выгодным для определения тромбоцитарного серотонина по сравнению с системами с 7—10% содержанием неполярного компонента (ацетонитрил [31], алифатический спирт [30, 32]), поскольку более высокий процент неполярной фазы способен постепенно вымывать с колонки примеси, мешающие хроматографическому определению. Преимуществами изопропилового спирта по сравнению с ацетонитрилом являются невысокая цена, доступность и низкая токсичность. К недостаткам изопропанола по сравнению с ацетонитрилом можно отнести высокую вязкость.

Полученные данные позволяют утверждать, что хроматографический метод является достаточно быстрым, надежным и может быть автоматизирован для клинических определений. Ошибка метода, обусловленная потерями при центрифугировании, составляет менее 1%, поскольку величины концентраций серотонина в супернатантах, полученных после осаждения тромбоцитов, были значительно ниже предела определения серотонина. Было показано, что разработанный хроматографический метод определения серотонина хорошо воспроизводится при проведении серий анализов.

Процедуры подсчета тромбоцитов, определения концентрации тромбоцитарного серотонина значительно упрощены по сравнению с ранее описанными методами. Разработанные подходы могут быть использованы для проведения анализов тромбоцитарного серотонина с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуориметрической детекцией в условиях клинической лаборатории и для решения медико-биологических проблем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fernstrom J.D.* Effects of the diet on brain neurotransmitters. Metabolism 1977; 26: 2: 207—223.
2. *Rapport M.M., Green A.A., Page I.H.* Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. J Biol Chem 1948; 176: 3: 1243—1251.
3. *Erspamer V., Asero B.* Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. Nature 1952; 169: 4306: 800—801.
4. *Twarog B.M., Page I.H.* Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. Am J Physiol 1953; 175: 1: 157—161.
5. *Maes M., Leonard B.E., Myint A.M. et al.* The new '5-HT' hypothesis of depression: cell-mediated immune activation induces indoleamine 2,3-dioxygenase, which leads to lower plasma tryptophan and an increased synthesis of detrimental tryptophan catabolites (TRYCATs), both of which contribute to the onset of depression. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2011; 35: 3: 702—721.
6. *Eqqers A.E.* A serotonin hypothesis of schizophrenia. Med Hypotheses 2013; 80: 6: 791—794.
7. *Anderson G.M.* Genetics of Childhood Disorders: XLV. Autism, Part 4: Serotonin in Autism. J Am Child Adolesc Psychiatry 2002; 41: 12: 1513—1516.
8. *Mulder E.J., Anderson G.M., Kema I.P. et al.* Platelet serotonin levels in pervasive developmental disorders and mental retardation: diagnostic group differences, within-group distribution, and behavioral correlates. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 2004; 43: 4: 491—499.
9. *Rodríguez J.J., Noristani H.N., Verkhratsky A.* The serotonergic system in ageing and Alzheimer's disease. Progress in Neurobiology 2012; 99: 1: 15—41.
10. *Rylander D.* The serotonin system: a potential target for anti-dyskinetic treatment and biomarker discovery. Parkinsonism and Related Disorders 2012; Suppl 1: 126—128.
11. *Dupuis L., Spreux-Varoquaux O., Bensimon G. et al.* Platelet serotonin level predicts survival in amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One 2010; 5: 10: 13346.
12. *Schildkraut J.J.* The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 1965; 7: 524—533.
13. *Coppen A.* The biochemistry of affective disorders. Br J Psychiatry 1967; 113: 1237—1264.
14. *Тиганов А.С., Копейко Г.И., Брусов О.С., Клюшник Т.П.* Новое в исследовании патогенеза и терапии эндогенной депрессии. Журн неврол и психиат 2012; 112: 11: 1: 65—72.
15. *Pletscher A., Laubscher A.* Blood platelets as models for neurons: uses and limitations. Journal of Neural Transmission 1980; 16: 7—16.
16. *Da Prada M., Picotti G.B.* Content and subcellular localization of catecholamines and 5-hydroxytryptamine in human and animal blood platelets: monoamine distribution between platelets and plasma. Br J Pharmacol 1979; 65: 4: 653—662.
17. *Audhya T., Adams J.B., Johansen L.* Correlation of serotonin levels in CSF, platelets, plasma, and urine. Biochim Biophys Acta 2012; 1820: 10: 1496—1501.
18. *Kovacic Z., Henigsberg N., Pivac N. et al.* Platelet serotonin concentration and suicidal behavior in combat related posttraumatic stress disorder. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2008; 32: 2: 544—551.
19. *Muck-Seler D., Pivac N., Mustapic M. et al.* Platelet serotonin and plasma prolactin and cortisol in healthy, depressed and schizophrenic women. Psychiatry Res 2004; 127: 3: 217—226.
20. *Скворцова В.И., Петрова Е.А., Брусов О.С., Савина М.А., Шаклунова Н.В., Клюшник Т.П., Георгиевская Н.А., Фактор М.И.* Патогенетические особенности развития постинсультных аффективных расстройств. Журн неврол и психиат 2010; 110: 7: 35—40.

21. *Meijer W.G., Kema I.P., Volmer M. et al.* Discriminating capacity of indole markers in the diagnosis of carcinoid tumors. Clin Chem 2000; 46: 10: 1588—1596.

22. *Lesurtel M., Soll C., Graf R. et al.* Role of serotonin in the hepato-gastrointestinal tract: an old molecule for new perspectives. Cell Mol Life Sci 2008; 65: 6: 940—952.

23. *Wrona M.Z., Dryhurst G.* Oxidation of serotonin by superoxide radical: implications to neurodegenerative brain disorders. Chem Res Toxicol 1998; 11: 6: 639—650.

24. *Ревнова Н.В., Горн Л.Э.* Методы лабораторных исследований, используемые при диспансеризации рабочих с вредными условиями труда. Методические рекомендации 1980; 2—3: http://base.consultant.ru/cons/cgl/online.cgl?reg=doc:base=ESU:n=10564

25. *Middelkoop C.M., Dekker G.A., Kraayenbrink A.A., Popp-Snijders C.* Platelet-poor plasma serotonin in normal and preeclamptic pregnancy. Clin Chem 1993; 39: 8: 1675—1678.

26. Иммуноферментный тест для количественного определения серотонина в сыворотке крови, моче, тромбоцитах. Фармакопейная статья 2010/06620 от 22 апреля 2010 г. http://www.analytica.ru/instructions/immunochemystry/ifa/kits/LDN/ldn-bac-8900-serotonin.pdf

27. *Flachaire E., Beney C., Salandre Y., Qnincyc Rehand B.* Determination of reference values for serotonin concentration in platelets of healthy newborns children adults and elderly subjects by HPLS with electrochemical detector. Clinical Chemistry 1990; 3: 12: 2117—2120.

28. *Гершкович А.А., Киберев В.К.* Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка 1992; 357.

29. *Лурье А.А.* Хроматографические материалы (справочник). М: Химия 1978; 367—381.

30. *Picard M., Olichon D., Gombert J.* Determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr 1985; 341: 445—451.

31. *Chin J.R.* Determination of six indolic compounds, including melatonin, in rat pineal using high-performance liquid-chromatography with serial fluorimetric- electrochemical detectoion. J Chromatogr 1990; 528: 111—121.

32. *Садек П.* Растворители для ВЭЖХ. М: Бином. Лаборатория знаний 2006; 157.