



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사학위논문

혈소판 생리적 기능에 기반한
SSRI 내성 생체지표 탐색에 관한 연구

Development of functional prediction marker
for SSRIs response capitalizing on platelets

2013년 2월

서울대학교 대학원

약학과 예방약학전공

박 소 진

요 약 (국문초록)

Serotonin을 포함한 신경전달물질의 조절 이상은 우울증 발생의 주요 원인 중 하나이다. Selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)는 대표적인 항우울제로, pre-synaptic neuron의 serotonin transporter (SERT)의 작용을 차단하여 serotonin의 재흡수를 억제시킴으로써 시냅스에서 serotonin의 양을 특이적으로 증가시키는 효과를 가진다. 하지만 일부 환자의 경우 SSRI 약물 치료에 의한 임상 증상 개선을 보이지 않는 non-responder로 보고되고 있어, 약물 치료 전 SSRI response를 예측하기 위한 생체지표 개발의 중요성이 대두되고 있다.

한편, 혈소판은 serotonin의 저장, 분비 및 감각 등 주요 조절과정이 시냅스와 매우 유사하기 때문에 신경세포 연구를 위한 peripheral model로 주목 받고 있다. 특히 혈소판의 SERT와 serotonin receptor (5-HT_{2A}R)는 신경세포에 발현되어 있는 것과 유전적으로 완전히 동일한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 혈소판과 신경세포의 유사성에 주목하여, 혈소판의 반응성과 우울증의 발현 및 SSRI에 의한 치료효과 사이의 상관관계를 확인하기 위한 실험을 계획하였다.

혈소판의 생리적 기능을 측정하기 위해, 정상인 및 우울증 환자의 혈액에서 Platelet rich plasma (PRP)를 분리하여 agonist 및 SSRI에 대한 혈소판의 반응성을 확인하였다. Agonist로는 neurotransmitter인 serotonin과 epinephrine을 이용하였다. 정상인에서 Aggregation 반응에 개인차가 존재함을 확인하였고, SSRI (fluoxetine) 전처리에 의해 aggregation 반응 변화 정도에도 개인차가 있음을 확인하였다.

이러한 혈소판성의 개인차는 우울증 환자의 혈소판을 이용한

aggregation, P-selectin expression 및 GP II b/IIIa activation 실험에서도 확인되었으며, SSRI(Escitalopram)을 전처리한 경우 혈소판 반응의 변화에도 개인차를 확인하였다. 이러한 혈소판 반응성과 SSRI 복용 시 임상적인 우울증 증상 개선 정도를 비교 분석한 결과, 혈소판 반응성 지표 중 일부가 HAM-D score 변화 정도와 유의적인 연관성을 나타내었다. 이는 우울증 환자에서 SSRI 반응성을 미리 예측 하기 위한 생체지표로 혈소판이 가능성을 가짐을 시사하며, 향후 혈소판의 생리적 기능을 기반으로 한 SSRI 반응성의 예측 지표 개발 가능성을 확인하였다.

주요어 : 혈소판, SSRI, 우울증, Epinephrine, Serotonin, Aggregation

학번 : 2011-21721

목 차

요 약 (국문초록) -----	i
목 차 -----	iii
List of Figures -----	iv
List of Abbreviations -----	v
서 론 -----	1
실 험 방 법 -----	5
시약 및 antibodies -----	5
정상인 혈소판의 반응성 확인 -----	5
Human platelet rich plasma 의 분리 -----	5
혈소판 Aggregation 측정 -----	6
우울증 환자 혈소판의 반응성 확인 -----	6
Subject -----	6
Protocol -----	7
우울증 환자의 PRP 분리 -----	7
혈소판의 전처리 -----	8
혈소판 Aggregation 측정 -----	8
P-selectin 발현 및 GPIIb/IIIa 활성화 측정 -----	10
자료 분석 및 통계 처리 -----	10
실 험 결 과 -----	12
고 찰 -----	31
참 고 문 헌 -----	35
Abstract -----	40

List of Figures

- Figure 1.** Platelet aggregation induced by neurotransmitters
- Figure 2.** Individual variation in platelet response to neurotransmitters.
- Figure 3.** Platelet response to neurotransmitters.
(Healthy volunteers)
- Figure 4.** Platelet Response to SSRI. (Healthy volunteer)
- Figure 5.** Optimization of platelet aggregation methods.
- Figure 6.** Platelet response to neurotransmitters.
(Depression patients)
- Figure 7.** Platelet response to neurotransmitters.
- Figure 8.** Platelet response to SSRI. (Depression patients)
- Figure 9.** Relationship between severity of depression and response of platelet.
- Figure 10.** Relationship between clinical improvement of depression and response of platelet.
- Table 1.** Characteristics of Patients
- Table 2.** Relationship between initial severity of depression and platelet response.
- Table 3.** Relationship between clinical improvement of SSRI treatment and platelet response.

List of Abbreviations

ADP	:	Adenosine diphosphate
BSA	:	Bovine serum albumin
E	:	Epinephrine
FITC	:	Fluorescein–isothiocyanate
GP	:	Glycoprotein
HAM–D	:	The Hamilton Depression rating scale
HEPES	:	N–2–hydroxyethylpiperazine–N’ 2–ethanesulfonic acid
NE	:	Norepinephrine
PE	:	Phycoerythrin
PRP	:	Platelet rich plasma
PPP	:	Platelet poor plasma
S	:	Serotonin
SSRI	:	Selective serotonin reuptake inhibitor
SERT	:	Serotonin transporter

서론

우울증은 현대 사회에서 유병률 증가의 주요 원인으로 지목 받고 있으며, 최근 발생률 및 관련 의료비용이 점차 증가하면서 사회적인 문제로 부각되고 있다. 우울증에 대한 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 정상적인 사회 생활에 어려움을 겪을 뿐 아니라 심한 경우 자살로 이어질 수도 있어, 우울증에 대한 적극적이고 지속적인 치료의 필요성이 대두되고 있는 실정이다. 우울증은 중추 신경계에서 신경 전달 물질의 조절 이상으로 발생하는 질환으로, 특히 serotonin (S ; 5-Hydroxytryptamine, 5-HT), norepinephrine (NE) 및 epinephrine (E) 등의 monoamine neurotransmitter 의 조절이상인 우울증, 공포, 불안 등과 같은 기분 장애 (mood disorder)를 일으키는 중요한 원인이 된다. 따라서 신경 전달 과정에서 이들의 양을 조절하는 다양한 약물들이 사용되고 있다. (Nutt 2008)

항우울제로 사용되는 여러 약물 중, selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI)는 다른 항우울제에 비해 심각한 우울증에 뛰어난 약효를 나타내며, (Kirsch, Deacon et al. 2008; Fournier, DeRubeis et al. 2010) 부작용은 덜하다고 보고되어 (Anderson 2000) 가장 널리 사용되는 대표적인 항우울제이다. SSRI는 presynaptic neuron의 serotonin transporter (SERT)에 작용, 시냅스로 분비된 serotonin 이 다시 uptake 되는 것을 억제하여 시냅스 상의 serotonin 의 양을 특이적으로 늘려준다. (Hyttel 1994) 그러나 일부 환자의 경우 SSRI 치료에 의해 충분한 치료효과를 얻지 못하며, 29-46%의 우울증 환자가 낮은 반응성을 보이거나 혹은 반응성을 전혀 보이지 않는 non-responder로 보고

되고 있다. (Fava 2000; Spear, Heath-Chiozzi et al. 2001) SSRI에 의한 우울증의 개선 효과는 약물 복용 전에 미리 예측하거나 약물 치료 초반에 확인할 수 있는 것이 아니므로, 환자는 4주에서 6주 간 SSRI를 복용하고 임상적 반응성을 평가하여 약물 치료 효과를 판단하게 된다. 이러한 과정은 적절한 약물치료 효과를 얻지 못하는 non-responder에서 약물 복용 순응도 감소와 우울증의 심화를 야기할 수 있으며, 약물 치료 비용이 증가하는 등 사회, 경제적 손실을 증가시킬 수 있다.

이에 SSRI의 반응성을 예측하기 위한 biomarker를 개발하려는 여러 연구가 이루어져 왔다. 최근 유전적으로 서로 다른 염기서열을 갖게 되는 single nucleotide polymorphism (SNP)이 약물 반응성의 차이를 나타내는 원인이 된다고 생각하여 이러한 관점에서 많은 연구가 진행되었으나, 아직까지 효과적인 biomarker는 밝혀지지 않았다. 일례로 SERT 발현에 영향을 주는 것으로 알려진 5-HTTLPR polymorphism의 경우, *ll* genotype에서 SSRI에 대한 높은 반응성을 보이는 것으로 알려졌으나, (Zanardi, Benedetti et al. 2000) 한국인 환자를 대상으로 한 환자에서는 반대 결과가 보고되어 SSRI 반응성과의 관계가 불명확한 상태이다. (Kim, Lim et al. 2006)

혈소판은 serotonin의 저장, 분비 및 감작 등의 주요 조절과정이 중추신경계의 neuron과 매우 유사하기 때문에 신경세포연구를 위한 peripheral model로 주목 받아 왔다. 특히 혈소판의 SERT와 serotonin receptor (5-HT_{2A}R)는 neuron에 발현되어 있는 것과 유전적으로 완전히 동일한 것으로 알려져 있다. (Lesch, Wolozin et al. 1993; Cook Jr, Fletcher et al. 1994) 혈소판은 혈액에 존재하는 serotonin의 대부분을 저장하고 있으며, (Lesurtel, Graf et al. 2006) 저장된 serotonin은

혈소판 활성화 및 혈관 수축 조절 등 생리활성 기전의 조절에 관여한다.(Ni and Watts 2006) 또한 혈소판에는 serotonin 외에도 epinephrine 등 neurotransmitter에 대한 receptor가 발현되어 있어 혈소판의 활성화에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

혈소판과 neuron 간에 밀접한 관련이 있다는 것은 우울증 환자에서 심혈관계 질환의 발병이 상당히 높은 정도로 나타난다는 것과, SSRI 등의 항우울제를 썼을 때 혈소판 기능 이상이 나타나며 이에 따라 출혈 부작용이 발생한다는 보고 등에서 확인할 수 있다. (LAKE, BIRMAHER et al. 2000; Serebruany 2006; Halperin and Reber 2007) 또한 혈소판 반응성과 우울증의 치료 효과의 상관관계를 확인한 연구에서, 우울증 치료 약물 복용 후 혈소판의 세로토닌 reuptake 가 억제되어 있는 정도를 보고, 이것을 우울증 개선 정도, 즉 약효와 관련하여 상관관계를 보았을 때 유의적인 차이를 보인다는 사실이 보고되었다. (Axelson, Perel et al. 2005; Fišar, Kališová et al. 2008) 이처럼, 혈소판은 serotonin을 비롯한 여러 neurotransmitter 관련 조절 기전이 neuron 과 유사할 뿐 아니라 환자의 말초 혈관에서 직접 채혈하여 분리하기 쉬우므로, SSRI 반응성을 예측하기 위한 biomarker를 찾아내는데 기여할 수 있는 중요한 peripheral maker가 될 수 있을 것으로 사료된다.

연구 목적

본 연구에서는 정상인 및 우울증 환자로부터 혈소판을 분리하여 neurotransmitter인 serotonin과 epinephrine에 대한 혈소판 반응성을

확인하고, SSRI 전처리에 의한 혈소판 반응성 변화를 확인하였다. 또한 우울증 환자에게 SSRI를 일정기간 복용시킨 후 임상적 치료효과를 관찰하여, 혈소판 기능과의 상관관계를 확인하고 이로부터 SSRI의 효과를 예측할 수 있는 biomarker를 개발하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 antibodies

NaCl, KCl, MgCl₂, HEPES, D-glucose, NaHCO₃, Na₂HPO₄, bovine serum albumin (BSA), adenosine diphosphate (ADP), (-)-epinephrine (+)-barbitrate salt, serotonin hydrochloride, fluoxetine hydrochloride 및 buffer 조제 시 사용한 모든 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, LO, USA) 로부터 구입하였다. Escitalopram oxalate 는 APHC Industrial Estate (India) 로부터 구입하였다.

Antibody 로는 Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labelled Mouse Anti-Human CD62P, FITC-labelled PAC-1, phycoerythrine (PE)-labelled Mouse Anti-Human 는 BD pharmingen (San Jose, CA, USA) 으로부터 구입하였다. 그 밖의 시약은 모두 특급 시약을 구입 하여 사용하였다.

정상인 혈소판의 반응성 확인

Human platelet rich plasma 의 분리

Platelet rich plasma (PRP) 를 분리하기 위하여 2주일 이상 약물을 복용하지 않은 건강한 남성의 정맥으로부터 3.2 % sodium citrate 를 항응고제로 하여 혈액을 채취하였다. 채혈 한 혈액을 900 rpm에서 15 분간 원심 분리한 후 상층액 (PRP)를 얻고 잔사를 3000 rpm에서

20 분간 원심 분리하여 상층액으로 platelet poor plasma (PPP) 를 얻었다. 이와 같이 얻은 PRP의 혈소판 수는 hemacytometer를 이용하여 광학 현미경으로 세고, PRP 를 PPP로 희석하여 1 mL 당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 한 후 실험에 이용하였다.

혈소판 Aggregation 측정

정상인 혈소판의 응집 정도를 Light transmittance aggregometer (Chrono-Log Co., USA) 를 이용하여 turbidity 변화로써 측정하였다. PRP 는 vehicle (DW) 혹은 SSRI (Fluoxetine $1 \mu\text{M}$, Sigma Aldrich, USA)를 가한 후 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 10 분간 반응 시킨 후 aggregometer로 옮겨 응집 반응을 측정하였다. PRP 의 light transmission 을 0 %, PPP 의 light transmission을 100 % 로 맞춘 후 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 에서 혈소판의 aggregation 정도에 따른 light transmission 변화를 측정 하였다. 측정 시 silicon 으로 코팅된 aggregometer cuvette을 사용하며, 반응이 일어나는 동안 1,000 rpm에서 지속적으로 교반하였다.

우울증 환자 혈소판의 반응성 확인

Subject

본 연구는 우울증 치료를 목적으로 삼성서울병원에 내원한 환자를 대상으로 진행하였으며, 모든 연구 내용은 삼성서울병원의 Institution Review Board (IRB)의 심의를 거쳤다. 연구자는 모든 실험 참가자에게 구두 설명 및 문서 제공을 통해 실험내용을 충분히 설명하였으며, 환자

의 동의 하에 실험을 진행하였다.

Protocol

환자의 우울증 치료를 위하여 SSRI (Escitalopram)이 6주간 처방되었다. 약물 치료에 대한 환자의 반응성을 확인하기 위하여, 약물 치료 전과 후에 우울증 평가 지표인 The Hamilton Depression Rating Scale (HAM-D score)를 측정하였다. 약물치료에 의해 HAM-D score가 50 % 이상 감소한 경우 우울증 치료 효과가 나타난 Responder인 것으로 구분하였으며, 그렇지 않은 경우 Non-responder로 구분하였다. 혼동되는 부분은 각종 검사에 대한 종합적인 견해를 통해 임상가의 판단에 따라 구분하였다. 약물 복용 전 환자의 혈소판 반응성을 확인하기 위하여 혈액 sample을 채취, 서울대학교 약학대학에서 관련 실험을 수행하였다.

우울증 환자의 PRP 분리

우울증 치료 약물을 복용하지 않은 환자의 정맥으로부터 3.2 % sodium citrate를 항응고제로 하여 혈액을 채취하였다. 채혈 된 혈액은 서울대학교 약학대학 실험실로 전달되어 PRP 분리에 이용되었으며, 채혈 후 혈소판 분리 과정 시작까지의 전 과정은 3 시간 이내에 수행하였다. 혈액을 900 rpm에서 15 분간 원심 분리한 후 상층액 (PRP) 를 얻고 잔사를 3000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 상층액으로부터 platelet poor plasma (PPP) 를 얻었다. 이와 같이 얻은 PRP 의 혈소판 수는 hemacytometer 를 이용하여 광학 현미경으로 세고, PRP 를 PPP 로 희석하여 1 ml 당 3×10^8 개의 혈소판이 포함되도록 하였다.

혈소판의 전처리

환자 혈액으로부터 분리된 PRP 는 SSRI 또는 vehicle을 처리하여 pre-incubation 시킨 후 각 실험에 이용하였다. SSRI (Escitalopram, 200 nM, APHC Industrial Estate, India) 또는 vehicle (Normal saline)을 처리하여 37 °C에서 60 분간 반응시켰다. 이 때 약한 정도로 교반하여 혈소판이 가라앉는 것을 방지하였다. P-selectin 발현 및 GP IIb/IIIa 활성화 확인 실험에서는 혈소판의 응집반응을 방지하기 위하여 1 ml당 3×10^7 개의 혈소판이 포함되도록 suspension buffer (13.4 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM HEPES, 5.0 mM D-glucose, 12.0 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.3 % BSA, pH 7.4) 를 이용하여 희석시킨 후 SSRI 또는 vehicle을 가하여 전처리하였다.

혈소판 Aggregation 측정

혈소판 응집 측정 : Microtiter plate (MTP) method

우울증 환자에서의 혈소판 응집 정도를 ELISA reader (VERSAmax™, USA)를 이용하여 흡광도(Optical density, OD)의 변화로 측정하였다. 전처리 한 PRP 를 vehicle 또는 agonist를 미리 넣어 놓은 96 well plate에 가하여 sample 당 100 μ l 가 되도록 하였다. 준비된 plate를 ELISA reader 내에서 교반 시키며 15 분간 반응 시켜 595 nm에서의 흡광도 변화를 관찰하였다. 반응 중 plate 온도는 37 °C 를 유지하였다. 모든 반응은 duplication 하여 진행하였으며, 반응 전 (t=0) PRP의 응집반응을 0 %, PPP의 응집반응을 100 % 로 가정하고

다음과 같이 응집반응을 계산하였다.

$$Aggregation(\%) = \frac{(OD_{t=0} - OD_{PPP}) - (OD_t - OD_{PPP})}{OD_{t=0} - OD_{PPP}} \times 100$$

혈소판 응집 측정 : Particle count method

MTP method 에서 반응 후 남아 있는 혈소판 입자 수의 변화를 통해 particle count method 로 응집 반응을 재확인 하였다. MTP method 반응 후 남아있는 PRP 중 일부 (20 μ l) 를 취하여, glutaraldehyde 0.5 % in fixing buffer (3.4 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.0 mM MgCl₂, 10.0 mM HEPES, 5.0 mM D-glucose, 12.0 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.3 % BSA, pH 7.4)에 가해 총 300 μ l 가 되도록 희석하였다. 고정된 혈소판은 다시 fixing buffer 로 희석시킨 후 BD FACSCaliber (BD bioscience)에서 분석하였다. 분석 프로그램으로는 Cell Quest Pro software를 이용하였다. Forward scatter, side scatter 를 이용하여 혈소판을 구분하였으며, 모든 sample을 대상으로 일정 시간 동안 particle count를 측정하였다. Control군의 측정 결과를 기준으로 다음과 같이 응집반응을 계산 하였다.

$$Aggregation(\%) = \frac{Particle\ count_{control} - Particle\ count_{sample}}{Particle\ count_{control}} \times 100$$

P-selectin 발현 및 GP IIb/IIIa 활성화 측정

전처리 된 혈소판 현탁액에 agonist를 가하고, 37 °C에서 일정 시간 동안 반응시켰다. 반응 시 약한 정도로 교반하여 혈소판이 가라앉는 것을 방지하였다. Agonist에 노출된 혈소판 중 일부를 취하여 PE Mouse Anti-Human CD42b 와 FITC Mouse Anti-Human CD62P 또는 PAC-1 FITC 를 미리 넣어놓은 시험관에 가하고 차광조건에서 20 분 간 반응시켰다. Anti-CD42b는 혈소판 세포막에 존재하는 glycoprotein Ib를 표지하여 기계적인 noise 로부터 혈소판을 구별해내기 위하여 이용하였으며, anti-CD62P과 PAC-1은 각각 P-selectin expression 및 activated GP IIb/IIIa 를 측정하기 위해 사용하였다.

준비된 flow cytometric analysis 용 sample을 BD FACSCaliber 에서 분석하였다. 분석 프로그램으로는 Cell Quest Pro software를 이용하였다. Flow cytometer는 혈소판 분석을 위해 최적화된 상태로 calibration 하여 사용하였으며, 네 가지 지표, 즉 입자 분석을 위한 forward scatter, side scatter와 green (FITC), orange (PE) fluorescence를 이용하여 분석하였다. Agonist에 의한 P-selectin 발현 및 GP IIb/IIIa 활성화 정도는 control (DW 처리) 을 기준으로 하여 99 % 이상의 형광 신호가 보이는 구간을 설정하여 분석하였다.

자료 분석 및 통계 처리

모든 실험 결과는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 표시하였다. 통계적인 유의성을 검증하기 위한 통계 프로그램으로는 SPSS software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test를 통해 유의성을 검증 하였다. 환자의 우울증 치료 결과와 혈소판 실험 결과 사

이의 상관관계를 분석하기 위해 Pearson's correlation analysis를 통해 유의성을 검증하였으며, regression 분석을 통해 분석결과의 유의성을 재확인하였다. 혈소판 실험결과에서 결측치가 있는 경우, 유의성 분석과정에서 제외 되었으며, 분석결과는 모든 경우에서 $p < 0.05$ 일 때 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

실험 결과

Neurotransmitter 에 의한 혈소판 aggregation 반응 확인

Neurotransmitter 인 serotonin 과 epinephrine 이 혈소판을 활성화시킬 수 있는지 확인하기 위하여 정상인으로부터 분리한 혈소판을 이용, aggregation 반응을 확인하였다. Epinephrine 은 농도 의존적인 aggregation 반응을 보였으며, serotonin 은 단독으로 처리했을 때 혈소판 aggregation 을 일으키지 못하는 weak agonist 임을 확인 하였다. (Fig. 1A) 또한 epinephrine 및 serotonin 을 단독으로 처리한 군과 serotonin 과 epinephrine 을 함께 처리한 군을 비교한 결과, serotonin 은 epinephrine 에 의한 aggregation 반응의 크기를 증가시키는 potentiation 효과를 나타냄을 확인하였다. (Fig. 1B)

Neurotransmitter 에 의한 혈소판 반응성의 개인차 확인

Neurotransmitter 에 의한 혈소판 반응성을 확인하기 위하여, 정상인 20 명으로부터 분리한 혈소판을 이용하여 aggregation 반응을 확인하였다. Epinephrine (0.1–100 μ M) 에 의한 aggregation 반응을 확인한 결과, epinephrine 에 대한 혈소판 반응에 개인차가 존재함을 확인하였다. (Fig. 2) 대부분의 경우 농도 의존적인 혈소판 aggregation 반응을 나타냈으나, 일부에서는 epinephrine 에 대한 혈소판 반응성이 낮은 것을 확인하였다. 20 명 중 6 명의 경우 (흰색으로 표시) epinephrine 을 고농도 (100 μ M) 로 가했을 때에도 낮은 aggregation

반응을 보여, epinephrine non-responder 로 구분할 수 있다. 본 실험
계의 재현성을 확인하기 위해 개인별로 2 회 이상 채혈 및 실험을 진행
하였으며, 결과는 그 평균값을 표기하였다.

Epinephrine 에 대한 responder 와 non-responder 를 구분하여
농도별 aggregation 정도를 표기한 결과, 두 군 사이에 유의한 반응성
차이가 존재함을 확인하였다. (Fig. 3A)

Epinephrine 농도별로 aggregation 반응의 분포를 확인한 결과, 저
농도 ($0.1 \mu\text{M}$) 의 epinephrine 을 처리했을 때에는 responder 와
non-responder 사이의 반응성 차이가 잘 나타나지 않으나 고농도 ($10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$) 의 epinephrine 을 처리한 경우 낮은 반응성을 보이는
non-responder 가 확실히 구분되는 것을 알 수 있다. (Fig. 3B) 이러
한 epinephrine non-responder 는 실험 대상의 약 30 % 를 차지하였
다.

SSRI 에 의한 혈소판 반응성의 개인차 확인

SSRI 가 혈소판 반응성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 정상인
혈소판에 SSRI (Fluoxetine $1 \mu\text{M}$) 또는 vehicle (DW) 을 가해 10
분간 incubation 시킨 후 neurotransmitter 를 가해 혈소판
aggregation 반응을 유도하였다. SSRI 에 의한 혈소판 반응성의 변화는
50 % 의 aggregation 반응을 일으키는데 필요한 epinephrine 의 농도
인 EC_{50} 의 증감을 기준으로 평가하였다. 실험 결과, 개인별로 SSRI
전처리에 의한 EC_{50} 변화가 다양하게 나타남을 확인하였다. 일부의 경
우 SSRI 에 의해 혈소판 aggregation 반응이 감소 (EC_{50} 증가) 하였
으며, 일부에서는 오히려 aggregation 반응이 증가하는 것을 확인할 수

있다. (Fig. 4) 즉, SSRI 가 정상인의 혈소판 반응성에 영향을 미치며, 그 정도에는 개인별로 차이가 존재함을 확인하였다.

SSRI 복용에 의한 우울증 치료효과

본 연구에서는 총 10 명의 환자를 대상으로 SSRI 복용에 의한 우울증의 임상적 치료 효과를 확인하였다. 약물 치료 전 (week 0) 환자의 평균 HAM-D score 는 19.4 점으로, 6 주간 escitalopram 을 복용하는 약물 치료 후 (week 6) 7.5 점으로 유의성 있게 감소하였다. ($p=0.0005$) (Table 1) 치료 전 HAM-D score 를 기준으로, 치료 후 HAM-D 50% 이상 감소한 경우를 responder 로 분류 하였을 때, 전체 환자 중 약 16.6 % (1/6) 가 SSRI 치료에 대한 responder 로 확인되었다. Non-responder 는 83.3 % (5/6)로 확인 되었다. SSRI 약물 치료에서 통상적으로 기대되는 response 정도는 약 50~60%로, (Fava 2000; Spear, Heath-Chiozzi et al. 2001) 본 연구에서는 더 높은 response 수치를 기록하였다. 이는 연구 참여 환자 수가 적었던 점, 일부 환자의 경우 임의로 병원에 내원하지 않음에 따라 실험 결과를 얻지 못했던 점 등에 영향을 받았을 것으로 생각된다. 약물치료 결과가 낮았던 경우, 약물 순응도가 감소하고 이에 따라 약물 치료를 포기하였을 수 있을 것으로 추측된다.

우울증 환자의 혈소판 반응성 실험

우울증 환자의 혈소판 반응성을 확인하기 위하여, 치료 약물 복용하기 전 (week0) 혈소판을 분리하여 실험을 진행하였다. 혈소판의 반응성이 정상적으로 유지되도록 하기 위하여, 모든 실험은 채혈 후 3 시간 이

내 혈소판 분리를 진행하였다. (Sweeney, Hoernig et al. 1989; Ho and Chan 1995; Seyfert, Haubelt et al. 2007)

정상인에서 neurotransmitter 에 대한 반응성을 확인 한 aggregation 실험 외에, GP IIb/IIIa 활성화 및 P-selection 발현 정도의 변화를 관찰하기 위한 실험도 함께 진행하였다. 혈소판에 처리하는 agonist 는 정상인 실험결과를 바탕으로, 다음과 같이 최적농도를 설정 하였다.

- 1) DW : control
- 2) Serotonin 10 μ M
- 3) Epinephrine 1 μ M
- 4) Epinephrine 10 μ M
- 5) Epinephrine 1 μ M + Serotonin 10 μ M
- 6) Epinephrine 10 μ M + Serotonin 10 μ M
- 7) ADP 10 μ M

혈소판 Aggregation 실험계 개선

우울증 환자의 경우, 채혈량이 제한되어 있어 정상인에 적용하였던 aggregation 실험계 (Light transmittance aggregometer ; Chronolog, USA 를 그대로 적용하는데 무리가 있다. 이에 혈소판 aggregation 반응을 측정하기 위해 microtiter plate (MTP) method (Armstrong, Truss et al. 2008; Chan, Armstrong et al. 2011; Bismuth-Evenzal, Gonopolsky et al. 2012) 와 particle count method (Jy, Horstman et al. 1998; Satoh, Yatomi et al. 2002; Fox, Sasae et al. 2004; Matzdorff and Voss 2006) 를 도입하였다. 새로 도입된 실험계는 기존

의 LTA 방법에서 요구되었던 시료량을 1/5 로 줄일 수 있을 뿐 아니라, multiple screening 이 가능하다는 장점을 가진다. MTP method 와 particle count method 가 기존의 LTA 방법에서 확인되었던 neurotransmitter 에 의한 aggregation 반응의 경향성을 잘 반영하는 것을 정상인 혈소판을 이용하여 확인하였다. (Fig. 5)

우울증 환자를 대상으로 neurotransmitter 에 의한 혈소판 반응성 확인

우울증 환자의 혈소판에 neurotransmitter 를 가했을 때, 혈소판의 aggregation 반응이 일어나는 것을 확인하였다. (Fig. 6) 개인별로 neurotransmitter 에 대한 반응성이 다르게 나타났으며, 이러한 개인차는 aggregation 반응 뿐 아니라 GP IIb/IIIa 활성화 및 P-selectin 발현 정도에서도 확인되었다. (Fig. 6) Aggregation 및 GP IIb/IIIa 활성화 및 P-selectin 발현 정도는 개인별 혈소판 반응성의 차이를 잘 반영하며, 각 지표의 반응성은 같은 경향성을 보인다. (Fig. 7)

우울증 환자를 대상으로 SSRI 에 의한 혈소판 반응성 확인

우울증 환자의 혈소판에 SSRI (escitalopram) 을 전처리 하여 혈소판 반응성에 미치는 영향을 확인하였다. Escitalopram 을 복용하였을 때 혈중 농도는 평균 50nM (20~125nM, 100mg/day 복용 시)라고 알려져 있으며 (Atar, Malinin et al. 2007), 본 실험에서는 therapeutic range 를 고려하여 혈소판에 escitalopram 200 nM 을 60 분 간 전처리 한 후

실험을 진행 하였다. 이때, neurotransmitter 에 의한 혈소판 반응성에 변화를 일으킴을 확인하였다. 이러한 반응성의 변화는 개인별로 차이를 보였으며, SSRI 에 의해 혈소판 반응의 증가 혹은 감소가 관찰되었다. 이러한 개인차는 aggregation 반응 뿐 아니라 GP IIb/IIIa 활성화 및 P-selectin 발현 정도에서도 확인되었다. (Fig. 8)

우울증 임상지표와 혈소판 반응성 사이의 상관관계 확인

우울증 환자를 대상으로, 우울증 정도를 확인하기 위한 임상지표인 HAM-D score 와, in vitro 실험에서 확인한 혈소판 반응성 사이의 상관관계를 확인하기 위해 분석을 실시하였다.

치료 전 우울증 정도와 혈소판 반응성 사이의 상관관계

치료 전 우울증의 심각도 (HAM-D score, week 0)과 혈소판 반응성의 상관관계를 확인한 결과, 유의한 상관관계를 가지는 혈소판 지표가 존재함을 확인하였다. (Figure 9; Table 2)

우울증 치료 결과와 혈소판 반응성 사이의 상관관계 확인

6 주간의 SSRI 복용에 의해 우울증의 임상적 개선 정도를 HAM-D score 변화를 통해 확인하고, 이와 혈소판 반응성 사이의 상관관계를 확인하였다. 분석 결과, 유의한 상관관계를 가지는 혈소판 지표가 존재함을 확인하였다. (Figure 10; Table 3)

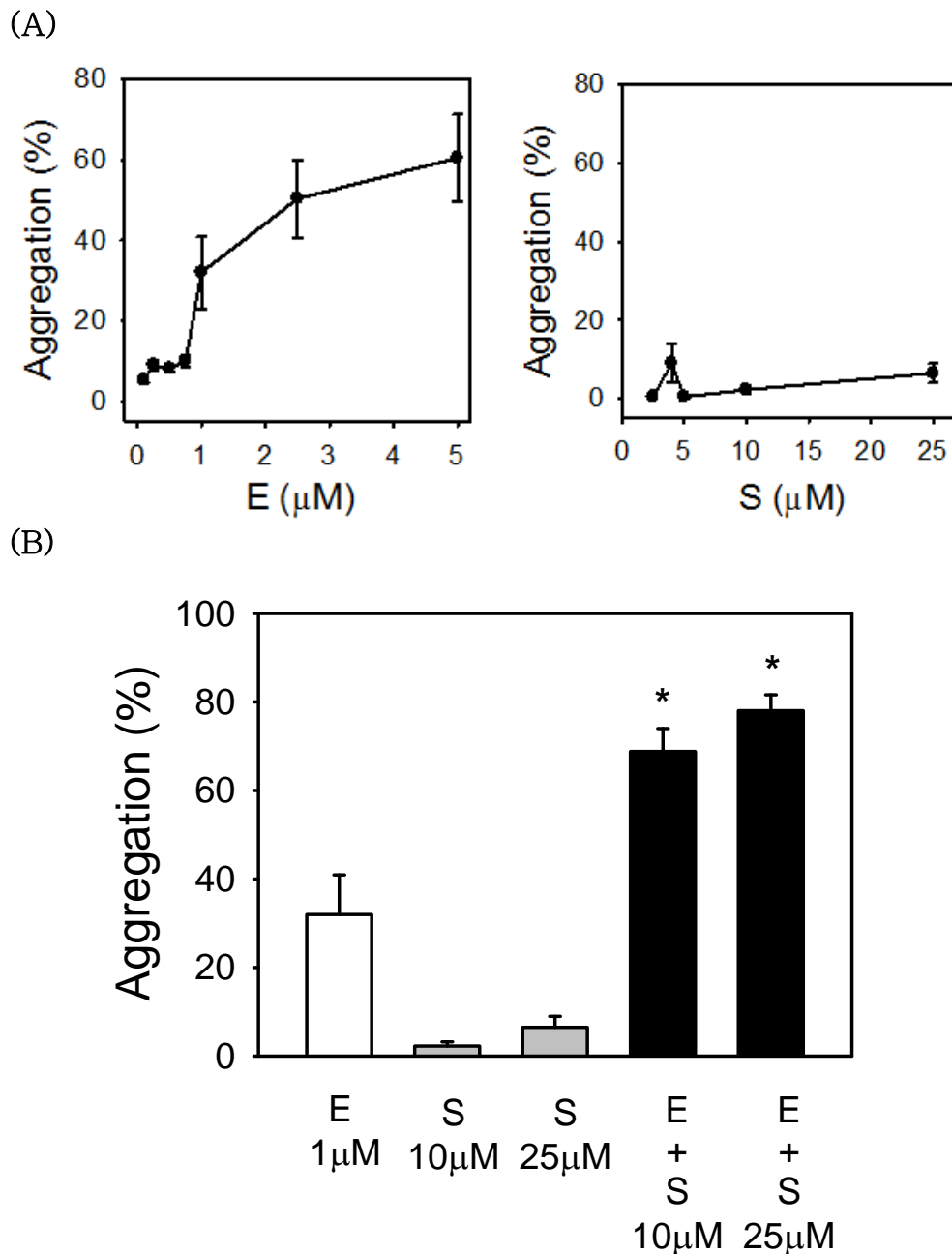


Figure 1. Platelet aggregation induced by neurotransmitters. Platelet rich plasma (PRP) from healthy volunteers were undergone aggregation reaction described in Materials and Methods. (A) Aggregation induced by epinephrine or serotonin. (B) Serotonin potentiate aggregation reaction induced by epinephrine. Values are the mean \pm SEM of three to five independent experiments. * represents significant differences from epinephrine alone (white bar) ($p < 0.05$).

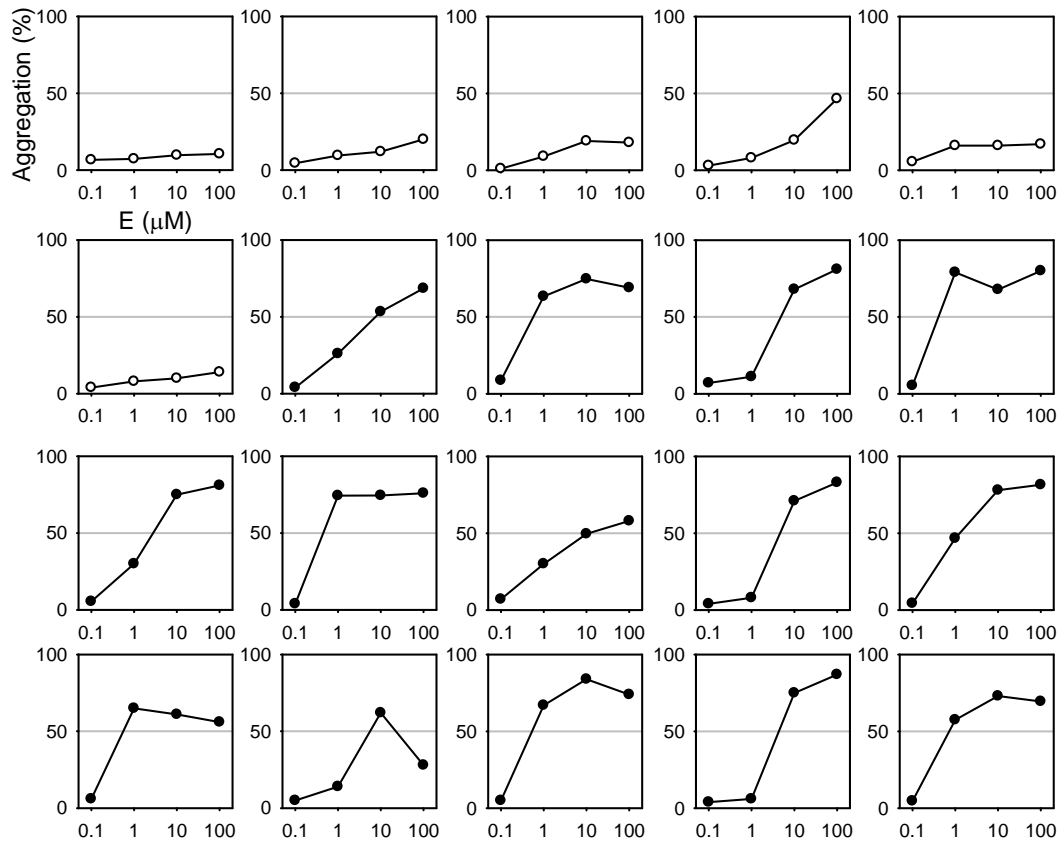
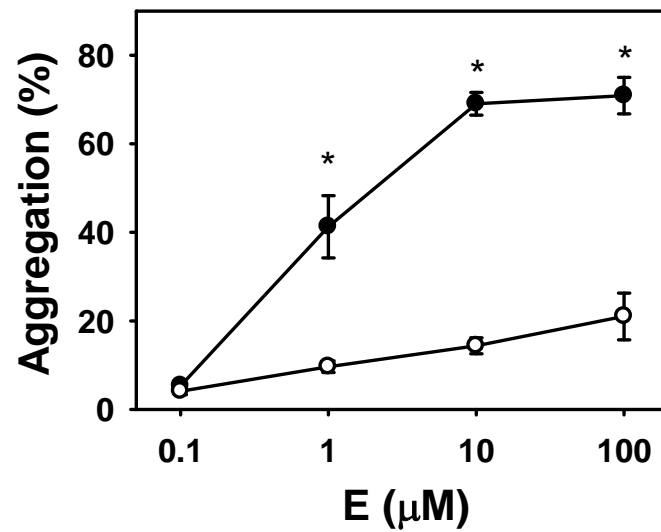


Figure 2. Individual variation in platelet response to neurotransmitters.

PRP from 20 healthy volunteers were undergone aggregation as described in Materials and Methods. Epinephrine (0.1–100 μ M) was used as an agonist. Values are the mean of two to three independent experiments.

(A)



(B)

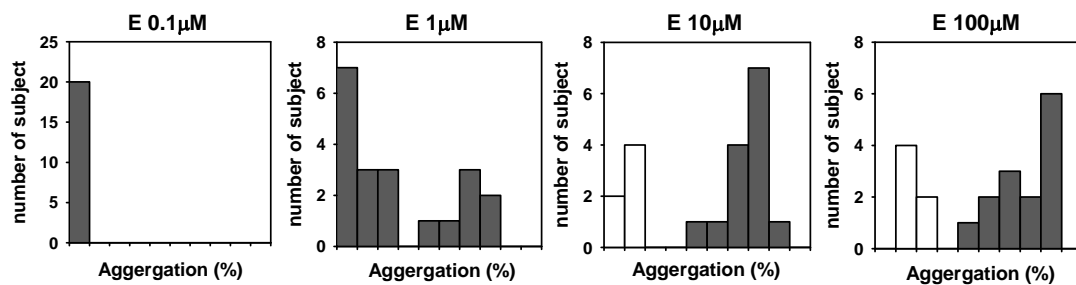


Figure 3. Platelet response to neurotransmitters. (Healthy volunteers)

(A) 20 healthy volunteers were divided into two groups : responder to epinephrine (black) vs. non-responder to epinephrine (white).

(B) Non-responder to Epinephrine are characterized as low aggregation reaction (below 40 %) induced by high concentration of epinephrine (up to 100 μM). Values are the mean \pm SEM of independent experiments. * represents significant differences between responder to epinephrine (black) and non-responder to epinephrine (white) ($p < 0.05$).

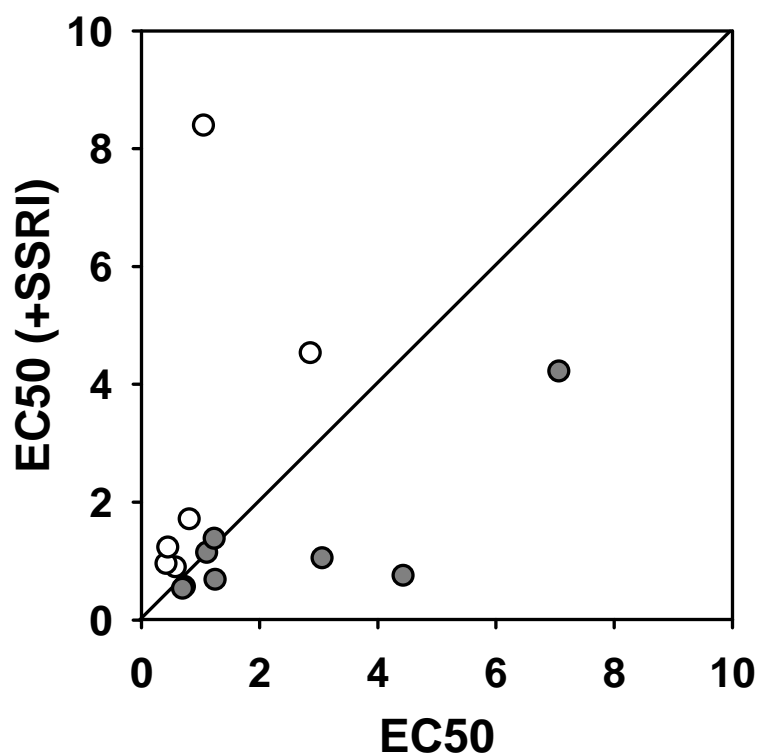


Figure 4. Platelet Response to SSRI. (Healthy volunteer)

After incubation with SSRI (Fluoxetine 1 μ M) for 10 min at 37 $^{\circ}$ C, platelets were applied to aggregation reaction as described in Materials and Methods. Effect of SSRI was determined in a change of EC50 of epinephrine. Each point represents EC50 of a healthy volunteer with or without incubation with SSRI. White points (above a diagonal line) means increased EC50 (decreased aggregation reaction) by SSRI incubation.

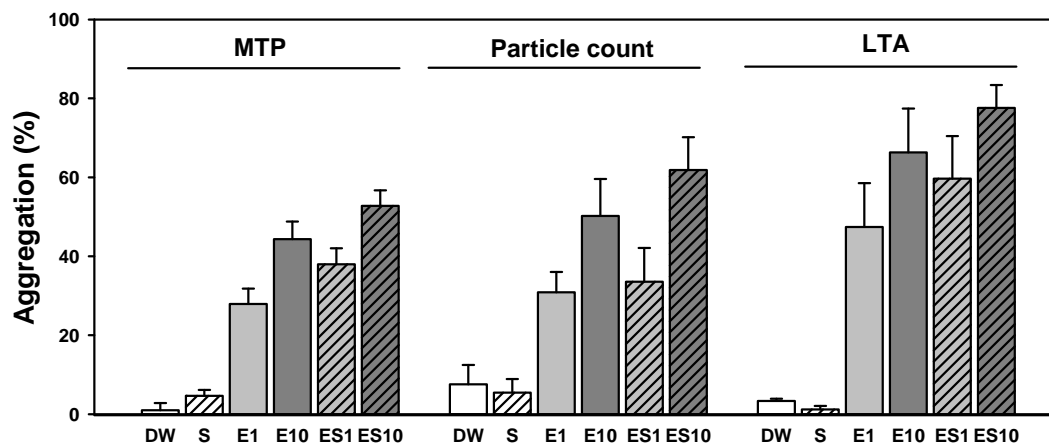


Figure 5. Optimization of platelet aggregation methods.

Microtiter plate (MTP) method, particle count method and light transmittance aggregometer (LTA) showed similar results for aggregation reaction induced by epinephrine and serotonin ; S (Serotonin 10 μ M), E1 (Epinephrine 1 μ M), E10 (Epinephrine 10 μ M), ES1 (Epinephrine 1 μ M + Serotonin 10 μ M), ES10 (Epinephrine 10 μ M + Serotonin 10 μ M). Values are the mean \pm SEM of four to ten independent experiments.

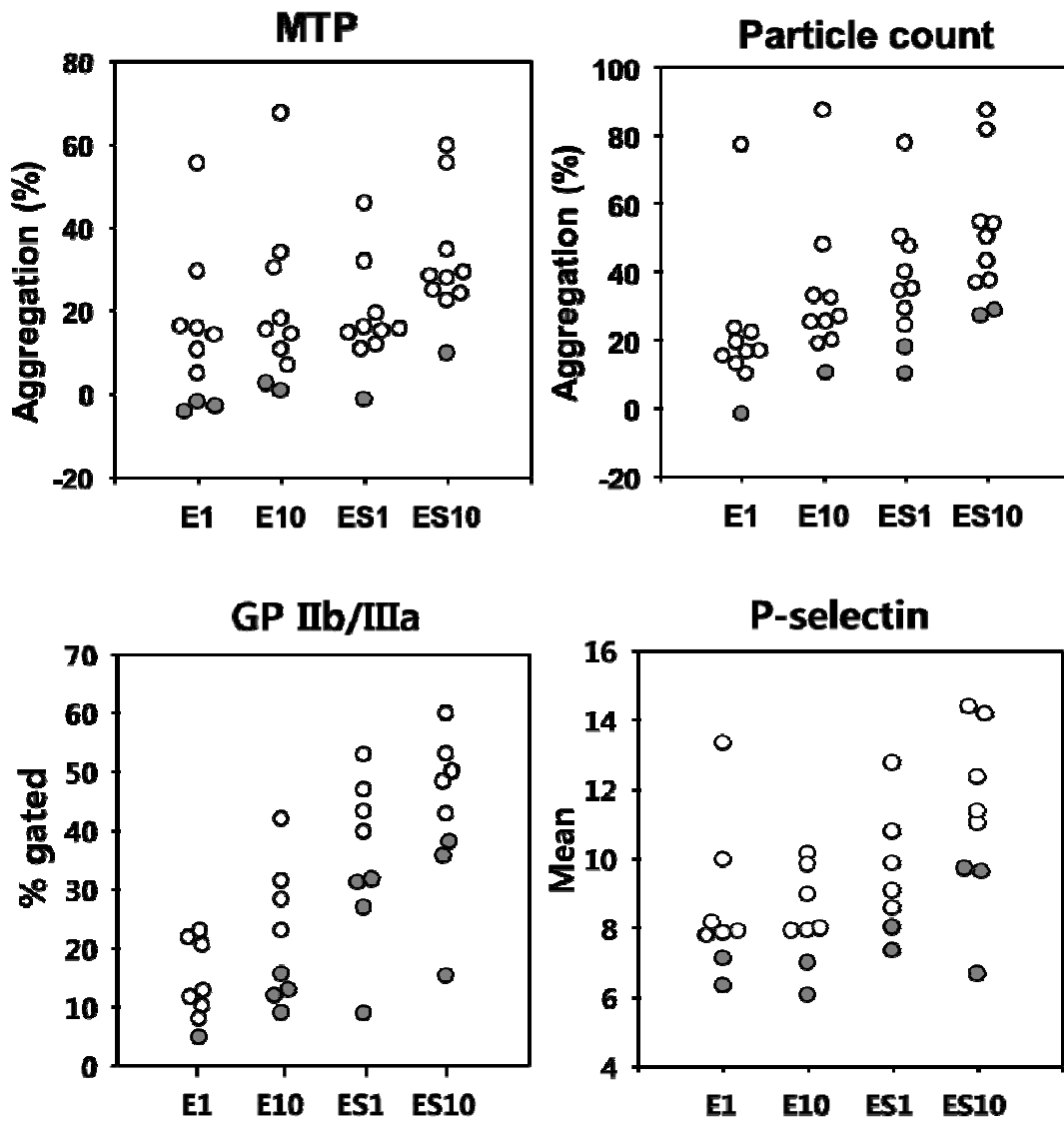


Figure 6. Platelet response to neurotransmitters. (Depression patients)

Isolated platelets from depression patient were applied to aggregation, GPIIb/IIIa activation and P-selectin expression assay induced by neurotransmitters ; S (Serotonin 10 μ M), E1 (Epinephrine 1 μ M), E10 (Epinephrine 10 μ M), ES1 (Epinephrine 1 μ M + Serotonin 10 μ M), ES10 (Epinephrine 10 μ M + Serotonin 10 μ M). Each point represents of the platelet response of a patient. Red points show lower platelet responses of some patients.

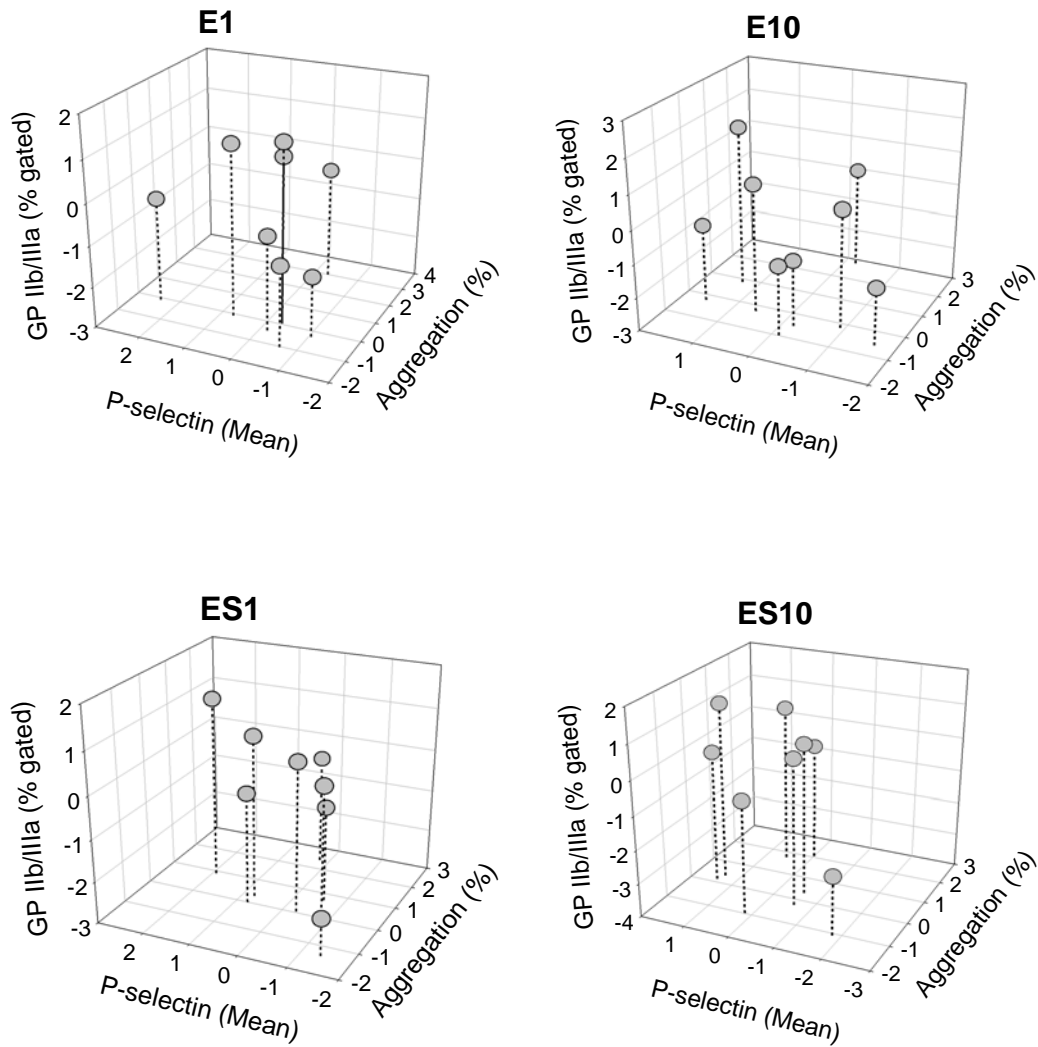


Figure 7. Platelet response to neurotransmitters.

Experimental results of isolated platelets from depression patient were presented ; platelet aggregation (particle count method), P-selectin expression, GP IIb/IIIa activation. Every results are standardized ; $(\text{data} - \text{mean}) / \text{standard deviation}$. Each point represents of the platelet response of a patient.

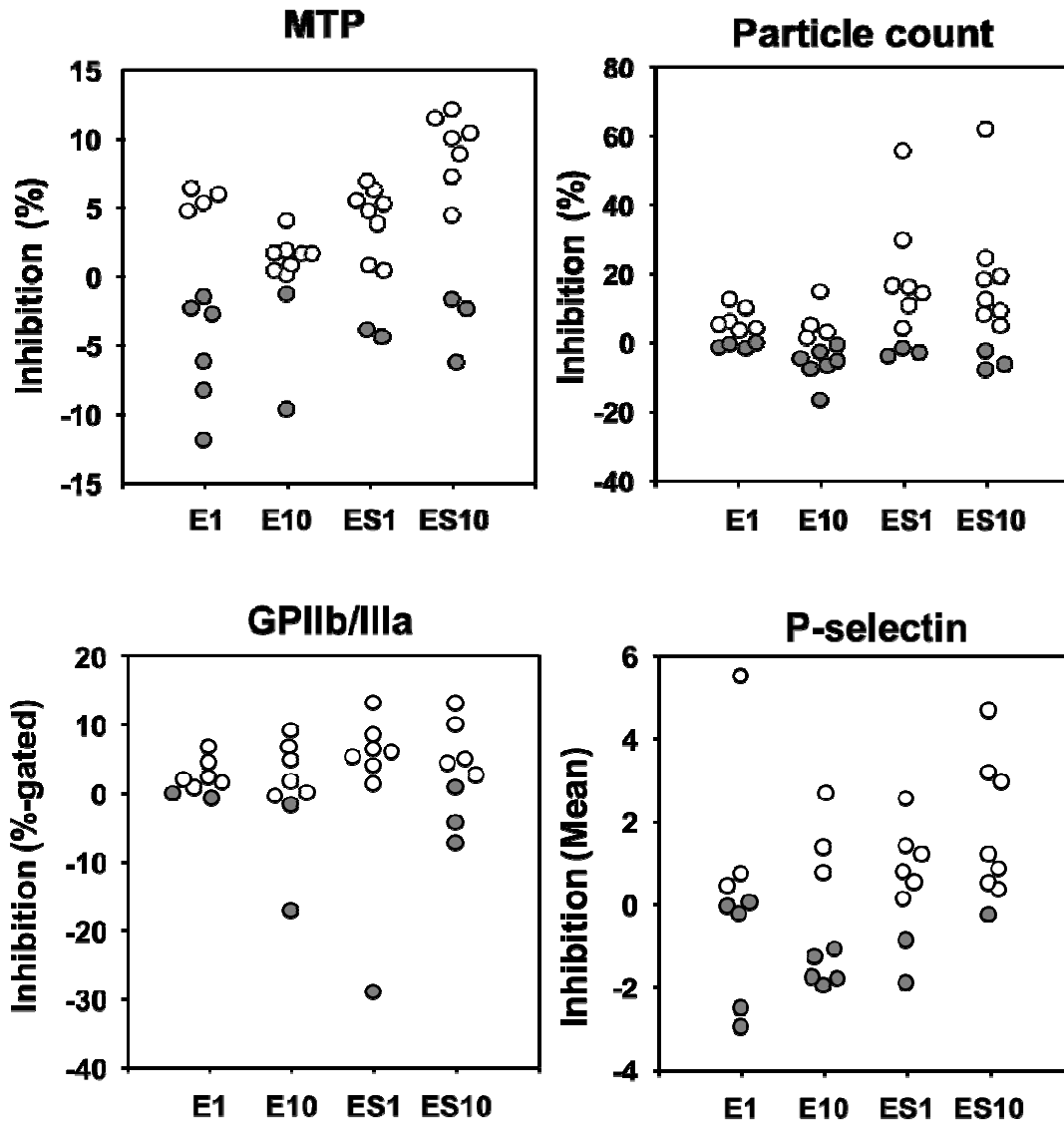


Figure 8. Platelet response to SSRI. (Depression patients)

Isolated platelets from depression patient were applied the experiment to measure the effect of SSRI to platelet response. After incubation with SSRI (Escitalopram 200 nM) for 60 min at 37 °C, aggregation, GPIIb/IIIa activation and P-selectin expression induced by neurotransmitters were measured. ; S (Serotonin 10 μ M), E1 (Epinephrine 1 μ M), E10 (Epinephrine 10 μ M), ES1 (Epinephrine 1 μ M + Serotonin 10 μ M), ES10 (Epinephrine 10 μ M + Serotonin 10 μ M). Each point represents of the inhibition effect (%) of SSRI for platelet response. Red points show lower inhibition effect of SSRI of some patients.

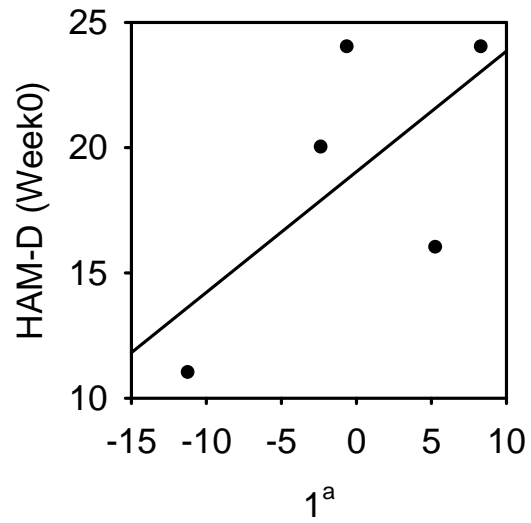


Figure 9. Relationship between severity of depression and response of platelet.

^a Reduction of aggregation (induced by epinephrine 1 μ M, particle count method) due to preincubation of SSRI

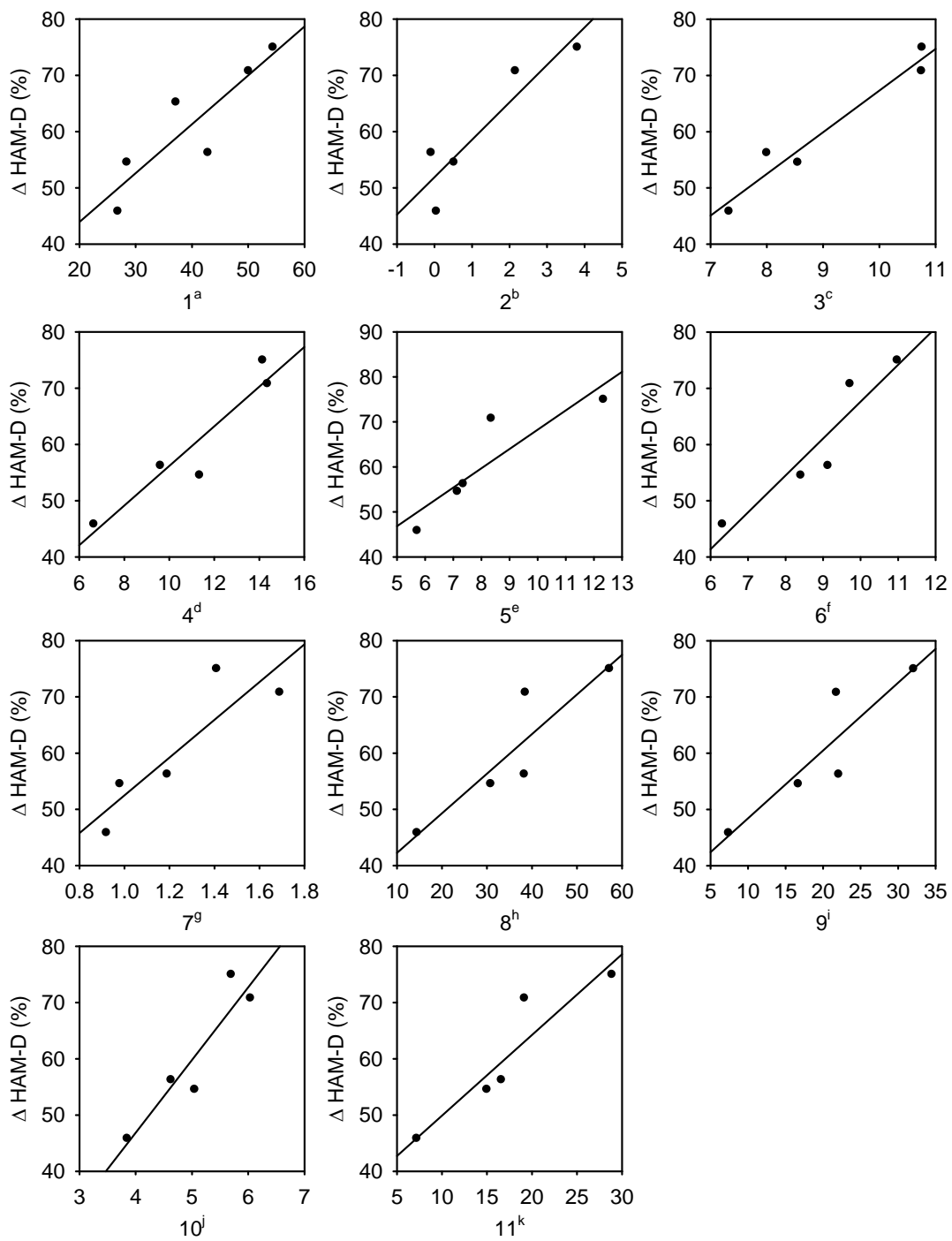


Figure 10. Relationship between clinical improvement of depression and response of platelet.

Note.

^a Aggregation (induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M, particle count method);

^b Reduction of GPIIb/IIIa activation (induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M) due to preincubation of SSRI;

^c GPIIb/IIIa activation (Mean; induced by epinephrine 1 μ M and serotonin 10 μ M);

^d GPIIb/IIIa activation (Mean; induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M);

^e GPIIb/IIIa activation (Mean; induced by serotonin 10 μ M, preincubation of SSRI) ;

^f GPIIb/IIIa activation (Mean; induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M, preincubation of SSRI) ;

^g P-selectin expression (%-gated; induced by serotonin 10 μ M);

^h P-selectin expression (%-gated; induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M, preincubation of SSRI);

ⁱ P-selectin expression (Mean; induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M);

^j P-selectin expression (Mean; induced by serotonin 10 μ M, preincubation of SSRI);

^k P-selectin expression (Mean; induced by epinephrine 10 μ M and serotonin 10 μ M, preincubation of SSRI)

Table 1. Characteristics of Patients

		n	Mean	Range
Age			66.8	(47-75)
Gender	Male	3		
	Female	7		
HAM-D score	Week 0		19.4	(11-24)
	Week 6 ^a		7.5	(5-13)

Note. ^a HAM-D score of week 6 (n=6)

Table. 2. Relationship between initial severity of depression and platelet response.

		1 ^a
HAM-D 0	Pearson Coefficient	.66*
	Regression Coefficient	.41*
	F	6.34*
	R ²	.44

Note. * p < .05. ** p < .01.

^a Reduction of aggregation (induced by epinephrine 1μM, particle count method) due to preincubation of SSRI

Table 3. Relationship between clinical improvement of SSRI treatment and platelet response.

		1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d	5 ^e	6 ^f
ΔHAM-D (%)	Pearson Coefficient	.89*	.92*	.97**	.94*	.89*	.94*
	Regression Coefficient	.87*	6.65*	7.41**	3.52*	4.29*	6.56*
	F	15.10*	16.14*	56.30**	24.73*	11.31*	21.83*
	R ²	.79	.84	.95	.89	.79	.88
		7 ^g	8 ^h	9 ⁱ	10 ^j	11 ^k	
ΔHAM-D (%)	Pearson Coefficient	.88*	.90*	.90*	.93*	.93*	
	Regression Coefficient	33.56*	.70*	1.21*	12.92*	1.44*	
	F	10.49*	12.56*	12.06*	18.68*	18.90*	
	R ²	.78	.81	.80	.86	.86	

Note. * p < .05. ** p < .01.

^a Aggregation (induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM, particle count method);

^b Reduction of GP II b/IIIa activation (%-gated; induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM) due to preincubation of SSRI;

^c GP II b/IIIa activation (Mean; induced by epinephrine 1 μM and serotonin 10 μM);

^d GP II b/IIIa activation (Mean; induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM);

^e GP II b/IIIa activation (Mean; induced by serotonin 10 μM, preincubation of SSRI);

^f GP II b/IIIa activation (Mean; induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM, preincubation of SSRI);

^g P-selectin expression (%-gated; induced by serotonin 10 μM);

^h P-selectin expression (%-gated; induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM, preincubation of SSRI)

ⁱ P-selectin expression (Mean; induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM);

^j P-selectin expression (Mean; induced by serotonin 10 μM, preincubation of SSRI);

^k P-selectin expression (Mean; induced by epinephrine 10 μM and serotonin 10 μM, preincubation of SSRI);

고 찰

본 연구에서는 혈소판의 반응성과 우울증 치료제인 SSRI 의 치료 효과 사이의 상관 관계를 확인하고자, 정상인과 우울증 환자를 대상으로 실험을 진행하였다. 혈소판은 그 구조적 유사성으로 인하여 신경세포의 기능을 연구하기 위한 peripheral model 로 주목 받아 왔으며, 실제 우울증 환자에서 혈소판 반응성이 정상인과 다르다는 점이 지속적으로 보고되고 있다.

본 연구에서는 혈소판의 기능 및 상태를 가장 잘 반영할 것으로 기대되는 Aggregation 반응을 일차 평가지표로 선정하였으며, agonist 로는 neurotransmitter 이며 혈소판에 해당 receptor 를 가지고 있는 serotonin 과 epinephrine 을 선정하였다. Serotonin 은 SSRI 의 주요 target 인 neurotransmitter 로, 혈소판에는 serotonin receptor 와 transporter 가 존재하여 뇌세포와 비슷한 특징을 가지며, 혈소판은 혈액 내의 serotonin 을 저장했다가 외부 자극에 의해 분비하여 aggregation 및 혈소판 기능에 영향을 주게 된다. Serotonin 은 자체로는 weak agonist 로써, 낮은 반응성을 나타내기 때문에 (Vanags, Rodgers et al. 1992) 본 실험에서는 epinephrine 을 함께 처리하여 혈소판 반응의 potentiation 을 유도하였다. Epinephrine 은 혈소판의 aggregation 을 유도하는 agonist 로 작용하며, (Mills and Roberts 1967) serotonin 과 혈소판의 5-HT_{2A} receptor 의 affinity 에 영향을 주지 않으면서 maximum response 는 증가시켜, serotonin 에 의한 혈소판 반응을 관찰하기 용이하게 한다고 보고되어 있다. (Shah and Saeed 1995; Shimbo, Child et al. 2002) 또한, 여러 연구에서 epinephrine 에

의한 aggregation 반응이 혈소판 기능의 개인차를 확인하는데 중요한 지표로 작용한다는 사실이 보고되고 있어, 우울증 환자에서 혈소판 반응성의 개인차를 평가하는데 epinephrine 이 적절한 agonist 로 이용될 수 있을 것으로 사료된다. (Nakahashi, Kambayashi et al. 2001; Shimbo, Child et al. 2002; Yee, Sun et al. 2005; Zhou and Schmaier 2005; Yee, Bergeron et al. 2006; Kunicki and Nugent 2010)

본 연구에서 정상인을 대상으로 실험 한 결과, serotonin 과 epinephrine 에 의한 potentiation 을 확인하였으며, 이를 바탕으로 serotonin 및 epinephrine 을 이용한 aggregation 실험계에서 epinephrine 에 대한 혈소판 aggregation 반응에 개인차가 있음을 확인하였다. Epinephrine 1~100 μ M 을 혈소판에 처리하였을 때 약 30% 에서 낮은 반응성을 나타냈으며, 이는 한국인 및 일본인을 대상으로 한 기존 연구 결과와 비슷한 수치이다.(Kambayashi, Shinoki et al. 1996; Nakamura, Ariyoshi et al. 1997; Pyo, Yun-Choi et al. 2003) 정상인에서 확인한 serotonin 및 epinephrine 의 혈소판 반응성을 바탕으로, 우울증 환자의 혈소판을 이용한 실험에서 aggregation 반응 및 혈소판 activation marker 인 P-selectin expression, GP IIb/IIIa activation 확인 실험을 진행하였고, 역시 반응의 개인차가 존재함을 확인하였다.

SSRI 를 복용한 환자에서 혈소판 반응성에 변화가 관찰된다는 것은 여러 연구를 통해 알려져 있다. 우울증 치료 전후 혈소판의 SERT activity (Axelson, Perel et al. 2005; Fišar, Kališová et al. 2008) 및 혈소판 aggregation, P-selectin expression 등의 혈소판 activation marker 의 발현이 감소한다는 연구가 결과가 보고되어 있다. (Maurer-Spurej, Pittendreigh et al. 2004; McCloskey, Postolache et al. 2008;

Bismuth–Evenzal, Gonopolsky et al. 2012) 또한, 일부 연구에서는 이러한 혈소판의 반응성 변화가 mood disorder 치료에서 SSRI 의 치료효과를 monitoring 하는데 중요한 지표로 작용할 수 있음을 제시하고 있다. (Fišar, Kališová et al. 2008) 이는 SSRI 에 의한 혈소판의 반응성 변화는 우울증의 임상적 치료 경과와 연계성을 가진다는 것을 시사하며, SSRI 에 의한 혈소판 반응성 변화를 통해 우울증 치료효과를 예측하고자하는 본 연구 목적에 부합한다. 기존 연구에서, in vitro 조건에서도 SSRI 에 의해 혈소판 반응성 변화가 확인되었으며, aggregation 및 activation 을 억제시킨다는 것이 알려져 있다. (Serebruany, Gurbel et al. 2001; Maurer–Spurej, Pittendreigh et al. 2004; Galan, Lopez–Vilchez et al. 2009) in vitro 에서 SSRI 전처리에 의한 혈소판의 반응성 변화와, 실제 SSRI 를 복용했을 때의 임상적 우울증 치료 결과를 비교 분석한 연구결과는 아직 나와있지 않으며, 이에 본 연구에서는 실제 우울증 환자에서 이러한 상관관계를 확인하고자 하였다. 정상인 혈소판을 대상으로 SSRI 인 fluoxetine 을 전처리 하였을 때 혈소판 aggregation 에 변화가 나타났으며, 이때 개인별로 SSRI 에 대한 반응성에 큰 차이를 보임을 확인하였고, 우울증 환자의 혈소판을 대상으로 한 실험에서도 SSRI 가 혈소판에 미치는 영향에 개인차가 존재함을 확인하였다.

본 연구에서는, 혈소판의 반응성의 개인차를 확인하기 위해 aggregation(MTP method 및 particle count method), GPⅡb/Ⅲa 활성화, P-selectin 발현 등 여러 실험을 동시 실시하였고, 각 실험계 별로 agonist 종류 및 SSRI 전처리 조건을 도입하여 다양한 조건에서 혈소판의 반응성을 측정하였다. 이 결과를 환자의 우울증 치료 결과와 비

교 분석한 결과, 일부 혈소판 반응성 지표에서 HAM-D score 변화와 경향성이 일치하는 것을 확인하였다.(Table 3) 이는, 환자가 실제 SSRI 를 복용하기 전에, 혈액검사를 통해 혈소판 반응성을 확인하고 이를 토 대로 SSRI 반응성을 예측할 수 있을 것이라는 본 연구의 가설과 부합한 다.

단, 연구에 참여한 환자의 수가 매우 적으며 (n=10), 일부 환자의 경우 약물치료에 끝까지 참여하지 않아, 실제 통계처리에 이용된 n 수 가 6 명에 불과했다는 점은 본 연구의 한계점이다. 통상적인 SSRI 반응 률이 50-60% 인데 비해, 본 연구에서는 임상적 치료 결과를 확인한 6 명의 환자 중 1 명 만이 non-responder 로 판명되는 등, 모집단 수가 작기 때문에 통계결과가 기존 보고와 다르게 나타나고 있다. 이에, 몇몇 혈소판 반응성 지표에서 임상적 우울증 치료결과와 correlation 을 보이 는 결과를 얻었으나, 상관관계를 명확히 설명하는 것은 어렵다고 생각된 다. 향후 참여 환자 수를 늘려 해당 연구 결과를 검토한다면, 보다 신빙 성 있는 결과를 얻을 수 있을 것이라고 생각된다.

본 연구에서는, 혈소판 반응성에 개인차가 존재한다는 점을 정상인 과 우울증 환자의 혈액을 대상으로 확인하였다. In vitro 실험계에서 Neurotransmitter 및 SSRI 를 혈소판에 처리했을 때, 반응성은 개인 별로 다르게 나타났으며, 이를 실제 우울증 환자의 SSRI 치료 결과와 비교, 분석하였을 때 유의적으로 관련성을 가지는 지표들을 확인하였다. 이를 통해, 혈소판이 우울증 환자의 약물치료에서 responder 와 non-responder 를 예측하는데 유용한 functional prediction marker 로 작용 할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

참 고 문 헌

- Anderson, I. M. (2000). "Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability." Journal of affective disorders **58**(1): 19.
- Armstrong, P., N. Truss, et al. (2008). "Aspirin and the in vitro linear relationship between thromboxane A2-mediated platelet aggregation and platelet production of thromboxane A2." Journal of Thrombosis and Haemostasis **6**(11): 1933–1943.
- Atar, D., A. Malinin, et al. (2007). "Antiplatelet properties of escitalopram in patients with the metabolic syndrome: a dose-ranging in vitro study." Neuropsychopharmacology **32**(11): 2369–2374.
- Axelson, D. A., J. M. Perel, et al. (2005). "Platelet serotonin reuptake inhibition and response to SSRIs in depressed adolescents." American Journal of Psychiatry **162**(4): 802–804.
- Bismuth–Evenzal, Y., Y. Gonopolsky, et al. (2012). "Decreased serotonin content and reduced agonist-induced aggregation in platelets of patients chronically medicated with SSRI drugs." Journal of affective disorders **136**(1): 99–103.
- Chan, M. V., P. C. J. Armstrong, et al. (2011). "Optical multichannel (optimul) platelet aggregometry in 96-well plates as an additional method of platelet reactivity testing." Platelets **22**(7): 485–494.
- Cook Jr, E. H., K. E. Fletcher, et al. (1994). "Primary Structure of the Human Platelet Serotonin 5-HT_{2A} Receptor: Identity with Frontal Cortex Serotonin 5-HT_{2A} Receptor." Journal of neurochemistry **63**(2): 465–469.
- Fava, M. (2000). "Management of nonresponse and intolerance: switching strategies." The Journal of clinical psychiatry **61**: 10.
- Fišar, Z., L. Kališová, et al. (2008). "Platelet serotonin uptake in drug-naive depressive patients before and after treatment with

- citalopram." Psychiatry research **161**(2): 185–194.
- Fournier, J. C., R. J. DeRubeis, et al. (2010). "Antidepressant drug effects and depression severity." JAMA: the journal of the American Medical Association **303**(1): 47–53.
- Fox, S., R. Sasae, et al. (2004). "Quantitation of platelet aggregation and microaggregate formation in whole blood by flow cytometry." Platelets **15**(2): 85–93.
- Galan, A. M., I. Lopez–Vilchez, et al. (2009). "Serotonergic mechanisms enhance platelet–mediated thrombogenicity." Thromb Haemost **102**(3): 511–519.
- Halperin, D. and G. Reber (2007). "Influence of antidepressants on hemostasis." Dialogues in clinical neuroscience **9**(1): 47.
- Ho, C. H. and I. H. Chan (1995). "The influence of time of storage, temperature of storage, platelet number in platelet–rich plasma, packed cell, mean platelet volume, hemoglobin concentration, age, and sex on platelet aggregation test." Annals of hematology **71**(3): 129–133.
- Hyttel, J. (1994). "Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)." International clinical psychopharmacology.
- Jy, W., L. L. Horstman, et al. (1998). "Platelet aggregates as markers of platelet activation: characterization of flow cytometric method suitable for clinical applications." American journal of hematology **57**(1): 33–42.
- Kambayashi, J., N. Shinoki, et al. (1996). "Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese." Thrombosis research **81**(1): 85–90.
- Kim, H., S. W. Lim, et al. (2006). "Monoamine transporter gene polymorphisms and antidepressant response in Koreans with late–life depression." JAMA: the journal of the American Medical Association **296**(13): 1609–1618.

- Kirsch, I., B. J. Deacon, et al. (2008). "Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration." PLoS Medicine **5**(2): e45.
- Kunicki, T. J. and D. J. Nugent (2010). "The genetics of normal platelet reactivity." Blood **116**(15): 2627–2634.
- LAKE, M. B., B. BIRMAHER, et al. (2000). "Bleeding and selective serotonin reuptake inhibitors in childhood and adolescence." Journal of child and adolescent psychopharmacology **10**(1): 35–38.
- Lesch, K.-P., B. L. Wolozin, et al. (1993). "Primary Structure of the Human Platelet Serotonin Uptake Site: Identity with the Brain Serotonin Transporter." Journal of neurochemistry **60**(6): 2319–2322.
- Lesurtel, M., R. Graf, et al. (2006). "Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration." Science Signalling **312**(5770): 104.
- Matzdorff, A. and R. Voss (2006). "Upregulation of GP IIb/IIIa receptors during platelet activation: influence on efficacy of receptor blockade." Thrombosis research **117**(3): 307.
- Maurer-Spurej, E., C. Pittendreigh, et al. (2004). "The influence of selective serotonin reuptake inhibitors on human platelet serotonin." THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART **91**(1): 119–128.
- McCloskey, D. J., T. T. Postolache, et al. (2008). "Selective serotonin reuptake inhibitors: measurement of effect on platelet function." Translational Research **151**(3): 168–172.
- Mills, D. and G. Roberts (1967). "Effects of adrenaline on human blood platelets." The Journal of physiology **193**(2): 443–453.
- Nakahashi, T. K., J. Kambayashi, et al. (2001). "Platelets in nonresponders to epinephrine stimulation showed reduced response to ADP." Thrombosis research **104**(2): 127–135.
- Nakamura, T., H. Ariyoshi, et al. (1997). "Signal transduction system in epinephrine stimulated platelets; comparison between epinephrine

- sensitive and insensitive platelets." Thrombosis research **85**(2): 83–93.
- Ni, W. and S. W. Watts (2006). "5-HYDROXYTRYPTAMINE IN THE CARDIOVASCULAR SYSTEM: FOCUS ON THE SEROTONIN TRANSPORTER (SERT)." Clinical and experimental pharmacology and physiology **33**(7): 575–583.
- Nutt, D. (2008). "Relationship of neurotransmitters to the symptoms of major depressive disorder." The Journal of clinical psychiatry **69**: 4.
- Pyo, M. K., H. S. Yun–Choi, et al. (2003). "Apparent heterogeneous responsiveness of human platelet rich plasma to catecholamines." Platelets **14**(3): 171–178.
- Satoh, K., Y. Yatomi, et al. (2002). "Small aggregates of platelets can be detected sensitively by a flow cytometer equipped with an imaging device: Mechanisms of epinephrine-induced aggregation and antiplatelet effects of beraprost." Cytometry **48**(4): 194–201.
- Serebruany, V. L. (2006). "Selective serotonin reuptake inhibitors and increased bleeding risk: are we missing something?" The American journal of medicine **119**(2): 113.
- Serebruany, V. L., P. A. Gurbel, et al. (2001). "Platelet inhibition by sertraline and N–desmethylsertraline: a possible missing link between depression, coronary events, and mortality benefits of selective serotonin reuptake inhibitors." Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society **43**(5): 453.
- Seyfert, U. T., H. Haubelt, et al. (2007). "Variables influencing Multiplate™ whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals." Platelets **18**(3): 199–206.
- Shah, B. H. and S. A. Saeed (1995). "Phosphatidylinositol 3–kinase inhibitor, wortmannin, inhibits 5–hydroxytryptamine–mediated potentiation of platelet aggregation induced by epinephrine."

Research communications in molecular pathology and pharmacology
89(2): 157.

Shimbo, D., J. Child, et al. (2002). "Exaggerated serotonin-mediated platelet reactivity as a possible link in depression and acute coronary syndromes." The American journal of cardiology **89**(3): 331–333.

Spear, B. B., M. Heath-Chiozzi, et al. (2001). "Clinical application of pharmacogenetics." Trends in molecular medicine **7**(5): 201–204.

Sweeney, J., L. Hoernig, et al. (1989). "Whole blood aggregometry. Influence of sample collection and delay in study performance on test results." American journal of clinical pathology **92**(5): 676.

Vanags, D., S. Rodgers, et al. (1992). "Potentiation of ADP-induced aggregation in human platelet-rich plasma by 5-hydroxytryptamine and adrenaline." British journal of pharmacology **106**(4): 917–923.

Yee, D. L., A. L. Bergeron, et al. (2006). "Platelet hyperreactivity generalizes to multiple forms of stimulation." Journal of Thrombosis and Haemostasis **4**(9): 2043–2050.

Yee, D. L., C. W. Sun, et al. (2005). "Aggregometry detects platelet hyperreactivity in healthy individuals." Blood **106**(8): 2723–2729.

Zanardi, R., F. Benedetti, et al. (2000). "Efficacy of paroxetine in depression is influenced by a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene." Journal of clinical psychopharmacology **20**(1): 105–107.

Zhou, L. and A. H. Schmaier (2005). "Platelet Aggregation Testing in Platelet-Rich Plasma Description of Procedures With the Aim to Develop Standards in the Field." American journal of clinical pathology **123**(2): 172–183.

Abstract

Development of functional prediction marker for SSRIs response capitalizing on platelets

Park Sojin

Preventive Pharmacology, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Dysregulation of neurotransmitters is one of the major causes of depression. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), the most prescribed drug for the treatment of depression, suppress reuptake of serotonin through blocking serotonin transporters (SERT) in pre-synaptic neurons. SSRIs are widely used but some patients do not get any clinical improvement from treatment. To sort out non-responders to SSRIs before taking medicine, many efforts have been made to develop prediction marker for SSRI responsiveness. Platelets have been frequently investigated as a potential peripheral marker to predict neuronal functions, because platelets and neurons share many points (i.e., SERT, serotonin receptor and adrenergic receptors) in common.

Here, we presumed that platelets could be a peripheral marker to predict SSRI responsiveness. Especially, we hypothesized that differences in platelet physiological function could be linked to different neurological features in the depression treatments. To estimate physiological function of platelet, platelet aggregation, GP II b/IIIa and P-selectin expression were detected using platelet from healthy volunteers and depression patients. Serotonin and epinephrine were

used as agonists for aggregation reaction. PRP were pre-incubated with or without SSRI. There were marked differences in individual aggregation reactions, i.e., the extent of aggregation induced by epinephrine and attenuation of aggregation by SSRI preincubation.

Reliable correlation between clinical improvement of patient and some kind of platelet response were detected. With this study, we found possibility for development of functional prediction marker of SSRI treatment, capitalizing on platelet response.

Key words : Platelet, Serotonin reuptake inhibitor, Depression,

Epinephrine, Serotonin, Aggregation

Student number : 2011-21721