

Određivanje katalitičke aktivnosti salivarne alfa amilaze in vitro

Ruška, Matej

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:159958>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matej Ruška

ODREĐIVANJE KATALITIČKE
AKTIVNOSTI SALIVARNE ALFA
AMILAZE *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matej Ruška

ODREĐIVANJE KATALITIČKE
AKTIVNOSTI SALIVARNE ALFA
AMILAZE *IN VITRO*

Završni rad

Osijek, 2020.

Rad je ostvaren pri Zavodu za medicinsku kemiju, biokemiju i laboratorijsku medicinu Medicinskog fakulteta Osijek u sklopu projekta Sortna specifičnost pšenične trave (*Triticum aestivum* L.) s obzirom na sadržaj nutrijenata i nutraceutika HRZZ-UIP-05-2017.

Mentor rada: doc. dr. sc. Katarina Mišković Špoljarić

Rad ima 24 lista, 3 tablice i 8 slika.

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem mentorici doc. dr. soc. Katarini Mišković Špoljarić na pruženoj prilici za suradnju, pomoći, posvećenom vremenu, strpljenju i savjetima za izradu završnoga rada.

Zahvaljujem višoj tehničarki bacc. med. lab. dijagn. Ivani Jelavić na pomoći pri radu u laboratoriju.

Također, neizmjereno hvala mojim roditeljima, djevojci, prijateljima i kolegama na motivaciji i podršci kroz sve godine.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Enzimi..... | 1 |
| 1.1.1. Funkcija enzima | 1 |
| 1.1.2. Probavni enzimi | 3 |
| 1.2. Amilaza..... | 3 |
| 1.2.1. Osnovne značajke amilaze | 3 |
| 1.2.2. Klinički značaj | 5 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 8 |
| 3.1. Ustroj studije..... | 8 |
| 3.2. Materijali | 8 |
| 3.2.1. Oprema..... | 8 |
| 3.2.2. Kemikalije..... | 9 |
| 3.3. Metode | 9 |
| 3.3.1. Uvjeti metode..... | 9 |
| 3.3.2. Priprema kemikalija | 10 |
| 3.3.3. Analiza aktivnosti salivarne α -amilaze | 11 |
| 3.3.4. Statističke metode | 12 |
| 4. REZULTATI..... | 13 |
| 5. RASPRAVA..... | 17 |
| 6. ZAKLJUČAK | 19 |
| 7. SAŽETAK..... | 20 |
| 8. SUMMARY | 21 |
| 9. LITERATURA..... | 22 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 24 |

POPIS KRATICA

AMS-S – salivarna α -amilaza

AMS-1 – salivarna α -amilaza

AMS-P – pankreasna α -amilaza

AMS-2– pankreasna α -amilaza

CNV – varijacije broja kopija (engl. *copy number variation*)

IgG – imunoglobulin G

IgA – imunoglobulin A

DNS – 3,5- dinitrosalicilna kiselina

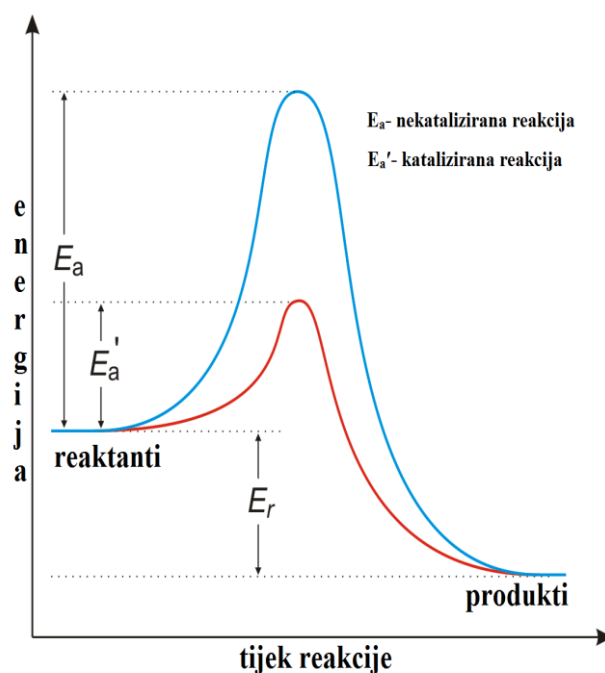
M – mol/dm³

1. UVOD

1.1. Enzimi

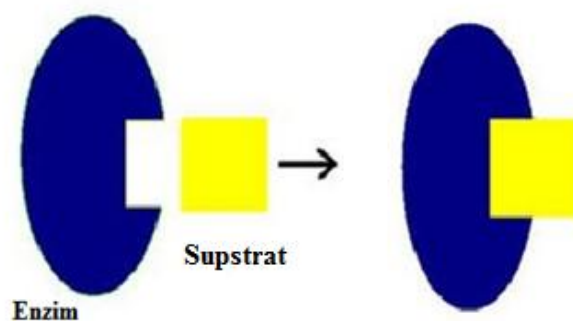
1.1.1. Funkcija enzima

Enzimi, odnosno biokatalizatori, tvari su koje kataliziraju kemijsku reakciju, što znači da je vrijeme potrebno za odvijanje određene kemijske reakcije puno kraće uz prisustvo određenog enzima kojeg je potrebno jako malo kako bi se katalizirala pretvorba velike količine supstrata. Oni su po svojoj kemijskoj strukturi velikom većinom proteini, osim nekoliko katalitičkih RNA molekula. Za aktivnost mnogih enzima bitna je i uloga kofaktora. Kofaktori mogu biti metalni ioni ili prostetičke skupine te imaju razne uloge u tijeku reakcije, kao npr. prijenos elektrona. Također, bitnu ulogu u postizanju maksimalne brzine reakcije katalizirane enzimima imaju optimalni uvjeti u vidu temperature i pH (1). Povišenjem temperature povećava se kinetička energija supstrata i enzima, dok enzimi smanjuju energiju aktivacije te se time ubrzava reakcija (2). Tijekom kemijske reakcije koju kataliziraju, enzimi ostaju nepromijenjeni, dok se supstrat prevodi u produkt. U prirodi se spontano odvijaju samo one reakcije kod kojih je promjena slobodne energije negativnog predznaka, odnosno one reakcije kod kojih se energija oslobađa do postizanja ravnoteže. S obzirom na činjenicu da veliki broj molekula ima preveliku energiju aktivacije, brzina reakcije bila bi jako spora. U našem organizmu su, međutim, metaboličke reakcije pod utjecajem enzima koji smanjuju potrebnu energiju aktivacije kako bi što veći broj molekula sudjelovao u reakciji (Slika 1.).



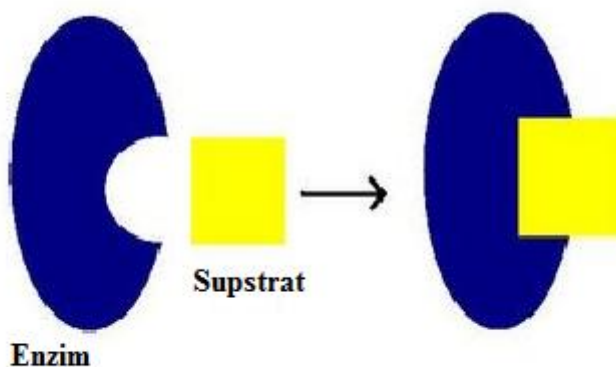
Slika 1. Princip djelovanja enzima (3).

Svaki enzim ima svoje tzv. aktivno mjesto s kojim se supstrat veže pomoću kontaktnih aminokiselina kako bi dio molekule na koji enzim treba djelovati bio okrenut na pravu stranu. Također, aktivno mjesto ima i katalitičke aminokiseline koje sadrže reaktivne skupine koje djeluju na ciljani supstrat, te aminokiseline koje održavaju trodimenzionalnu strukturu aktivnog mjesta kako bi ono bilo kompatibilno sa supstratom (4). Specifičnost vezanja supstrata u aktivno mjesto određeno je strogo definiranim rasporedom atoma u aktivnom mjestu. Postoje dva modela vezanja supstrata u aktivno mjesto, a to su model „ključ brava“ te model induciranog pristajanja. U modelu „ključ brava“ supstrat i aktivno mjesto enzima komplementarni su (Slika 2.).



Slika 2. Model „ključ brava“ (5).

Za razliku od tog modela, kod modela induciranog pristajanja, supstrat i aktivno mjesto komplementarni su tek nakon vezanja supstrata (Slika 3.).



Slika 3. Model induciranog pristajanja (5).

Nakon što se reakcija koju enzim katalizira odvije, enzim se vraća u svoj prvobitan oblik do trenutka ponovnog vezanja supstrata u aktivno mjesto.

1.1.2. Probavni enzimi

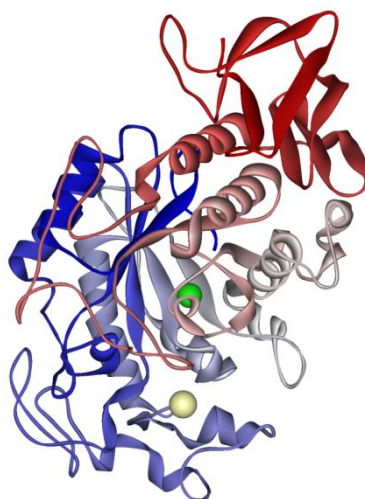
Svi živi organizmi trebaju hranu, odnosno nutrijente iz hrane kako bi rasli i preživjeli. Većina nutritivnih tvari u organizam se unesu kao kompleksni spojevi koji se ne mogu odmah kao takvi koristiti kao metabolička goriva ili strukturne tvari, nego se prvo moraju razgraditi na jednostavnije spojeve. Tako dobiveni jednostavniji spojevi mogu se apsorbirati te prenositi krvlju na ciljna mjesta. Tu zadaću obavljaju mnogobrojni probavni enzimi koji imaju sposobnost razgradnje proteina, masti i ugljikohidrata na jednostavnije, čovjeku za daljnju uporabu prihvatljivije spojeve. Probavni enzimi stvaraju se i luče u gastrointestinalni sustav kako bi razgradili gore navedene tvari te kako bi se one mogle apsorbirati u krv (6). Jednostavnije rečeno, povećavaju biodostupnost nutrijenata. Probava započinje u ustima djelovanjem salivarne α -amilaze koja se u želudcu denaturira pod utjecajem niskog pH (7), nastavlja se u želudcu u kojem se pepsinogen pretvara u pepsin, zatim u tankom crijevu u kojeg se iz gušterače luče pankreasna α -amilaza, lipaza, fosfolipaza i brojni proteolitički enzimi (4).

1.2. Amilaza

1.2.1. Osnovne značajke amilaze

Amilaze su enzimi iz skupine hidrolaza koje razgrađuju polisaharide. Kirchoffovo opažanje da ekstrakt pšenice posjeduje sposobnost razgradnje škroba smatra se prvim opisivanjem neke enzimske reakcije (8). Kao što je prethodno navedeno, probava započinje u ustima i to upravo enzimom salivarnom α -amilazom, zvanom i ptijalin. To radi na način da slučajnim odabirom kida unutarnje α -1,4-glikozidne veze. Salivarna α -amilaza kod nekih pojedinaca iznosi 50 % ukupnih proteina sline, dok je kod drugih ljudi slabo mjerljiva (9, 10). U prirodi razlikujemo dvije vrste amilaza; α ili endoamilaza i β ili egzoamilaza. β -amilaza hidrolizira α -1,4-glikozidne veze samo na kraju molekule i svaki put hidrolizom odstrani po jednu maltozu. Ona je biljni i bakterijski enzim. Za razliku od nje, α -amilaza hidrolizira α -1,4-glikozidne veze u cijeloj molekuli supstrata te je ona enzim u životinjama i ljudima (4). Škrob se sastoji od dviju glavnih sastavnica: amiloze i amilopektina. α -amilaza razgrađuje i ravnolančane polisaharide (amiloze), ali i razgranate polisaharide (amilopektin i glikogen). Razlika između amilopektina i glikogena je u tome što glikogen ima veći stupanj razgranatosti, odnosno više α -1,6-glikozidnih veza (8). Iz amiloze se stvaraju maltoza i

ostatne molekule glukoze, dok se iz amilopektina i glikogena uz maltozu i glukozu stvaraju i dekstrini zbog nemogućnosti amilaze da kida α -1,6-glikozidne veze tih spojeva. α -amilaza jedini je enzim, uz lizozim i pepsinogen, koji se fiziološki filtrira kroz glomerularnu membranu i izlučuje mokraćom zahvaljujući svojoj veličini. Enzimi molekularne mase manje od 70 kDa mogu prijeći glomerularnu membranu. Izgrađena je od polipeptidnog lanca dugačkog 510 aminokiselina, dok joj relativna molekulska masa iznosi 45 do 50 kDa. Aktivna je u širokom pH području od pH 3,8 do pH 9,4, s optimumom djelovanja između pH 6,7 i pH 7,2 (4). Termostabilan je enzim, pa mu se aktivnost ne mijenja i do temperature od 50 °C. Aktivnost ovog enzima na sobnoj se temperaturi ne mijenja do 7 dana, dok se na temperaturi od 4 °C njegova aktivnost ne mijenja više od dva mjeseca. Amilaza se ubraja u metaloenzime, odnosno za njezin rad potreban je kalcij za održavanje funkcionalne cjelovitosti (Slika 4.). Osim kalcija, na njezin rad pozitivno utječu i razni anioni kao što su bromidi i kloridi, koji na nju djeluju stabilizirajuće i najučinkovitiji su stabilizatori (11). Afinitet kalcija za α -amilazu puno je jači od drugih iona. Broj kalcijevih iona vezanih za α -amilazu varira od 1 do 10 te što je veći broj vezanih kalcijevih iona za enzim, to je njegova termostabilnost veća. Amilazna aktivnost prisutna je u brojnim tkivima. Najviše je ima u acinarnim stanicama gušterače te u žlijezdama slinovnicama, dok je manje ima u bubregu, jetri, mišićima i masnome tkivu. (1, 4, 8). Također je ima u mokraći, mlijeku, a u tragovima i u likvoru.



Slika 4. Shematski prikaz strukture α -amilaze s kalcijevim ionom (zelena kuglica) (12).

U 90 % ljudi nalaze se dva glavna izoenzima amilaze, salivarni S-izoenzim (AMS-S, AMS-1) i gušteračni P-izoenzim (AMS-P, AMS-2). Iako amilaze ima u mnogim tkivima, smatra se dosta specifičnom za gušteraču. Strukturni geni koji kodiraju ova dva izoenzima

nalaze se na 1. kromosomu. Studije su pokazale da CNV (eng. *copy number variation*) gena AMS-1 igra ulogu u razini aktivnosti salivarne α -amilaze (13). AMS-S i AMS-P imaju slična katalitička i imunološka svojstva. Izoenzimi se mogu razlikovati iz uzoraka seruma i urina izoelektričnim fokusiranjem i elektroforezom (11). Elektroforetska procjena izoenzima amilaze govori više o enzimskim promjenama tijekom bolesti nego mjerenje ukupne aktivnosti enzima. AMS-1 se nakon elektroforeze nalazi u području β -globulina, dok se AMS-2 nalazi u zoni γ -globulina. Međutim, na genu za svaki izoenzim može doći do alelnih varijacija, što dovodi do polimorfizma s podfrakcijama obaju izoenzima pa tako na elektroforezi možemo vidjeti AMS-S₁ i AMS-S₂, kao i AMS-P₁ i AMS-P₂. Osim toga, izoenzimi se mogu još i posttranslacijski modificirati u ugljikohidratnom dijelu enzima ili deamidacijom asparagina i glutamina, što dovodi do dodatnih izoforma enzima (4). S obzirom da je klirens pankreasne α -amilaze veći nego od salivarne, odnosno brže se odstranjuje mokraćom pa je omjer AMS-1/AMS-2 u serumu $1,71 \pm 1,1$, a u mokraći $0,7 \pm 0,1$. Poluživot amilaze u krvi je 3 – 6 sati. Ponekad se u serumu amilaza može pronaći u kompleksu sa imunoglobulinima kao makroamilaza s molekularnom masom većom od 200 kDa (4). Koncentracije α -amilaze slijede cirkadijalni ritam lučenja, s niskim vrijednostima u jutarnjim satima, nakon čega slijedi kontinuirani rast s najvišim vrijednostima u večernjim satima (14).

1.2.2. Klinički značaj

Dijagnostički značaj amilaze najveći je kod bolesti gušterače i upalne bolesti žlijezda slinovnica. Pri akutnom pankreatitisu aktivnost amilaze u serumu povećava se unutar 5 – 8 sati nakon pojave simptoma. Nakon 3 – 4 dana vrijednosti aktivnosti amilaze u serumu vraćaju se u normalu (23 - 91 U/l). Ipak, aktivnost amilaze u serumu nije klinički specifična za dijagnozu akutnog pankreatitisa jer su povećane vrijednosti amilaze moguće i u drugim kliničkim stanjima. Povećanje od 4 do 6 puta iznad referentnih vrijednosti je normalno, ali ako je povećanje veće, ne znači da je i jakost upale veća, no što je povećanje veće, veća je vjerojatnost akutnog pankreatitisa. Manjak specifičnosti ukupne serumske amilaze te uvođenje određivanja AMS-P, uz značaj povećanja od tri puta od referentne vrijednosti, dovelo je do specifičnosti ove pretrage na više od 90 % (11). Kod kroničnog pankreatitisa povećanje aktivnosti u serumu nije toliko izraženo, ali tijekom pogoršanja bolesti vrijednosti se ponašaju slično kao i kod akutnog pankreatitisa. Kod karcinoma gušterače većinom je povišena aktivnost u mokraći, dok je aktivnost u serumu varijabilna. Zbog ranije spomenutog izlučivanja amilaze mokraćom, uz analizu seruma uvijek treba napraviti i analizu mokraće zbog mogućnosti normalnih vrijednosti amilaze u serumu, ali povećanih u mokraći. Osim

povećane aktivnosti amilaze pri akutnom i kroničnom pankreatitisu, smanjene vrijednosti mogu biti prisutne pri nekrozi gušterače. Povišene vrijednosti aktivnosti amilaze pronađene su u nekim bolestima trbušne šupljine i kod nekih poremećaja koji nisu povezani s gušteračom. Nadalje, kolecistitis, upala žučnog mjehura, također može uzrokovati aktivnost amilaze do 4 puta veću od referentnih vrijednosti. Aktivnost amilaze u serumu i mokraći povećana je i kod zaušnjaka, perforacije želučanog čira, tromboze mezenterijalnih vena, uremije, crijevne opstrukcije i postoperativnih stanja, često nakon operacije srca. Povećana aktivnost amilaze uočena je i kod teških opekлина, pri šećernoj bolesti (osobito s ketoacidozom), te zbog ektopičnog lučenja amilaze iz zloćudnih tumora. Kod svih ovih stanja uobičajeno je jače povećanje aktivnosti u mokraći nego u serumu. Također, istraživanja su pokazala da je salivarna α -amilaza indirektni biomarker aktivnosti središnjeg živčanog sustava te da se može koristiti kao pokazatelj stresa (15). Ukoliko dođe do povećanja aktivnosti u serumu, ali bez prikladnog povećanja aktivnosti u mokraći, znači da se radi o bubrežnoj insuficijenciji ili o makroamilazemiji. Makroamilazemija je stanje prisutno kod 1 % populacije, a radi se o stvaranju kompleksa između amilaze (obično AMS-S) i imunoglobulina (IgG ili IgA). Takvi kompleksi veći su od 200 kDa, pa se stoga ne mogu filtrirati kroz glomerularnu membranu i izlučiti mokraćom, nego dolazi do povišene aktivnosti amilaze u serumu 2 do 8 puta. Uz makroamilazemiju se ne povezuju nikakvi klinički simptomi (11).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je istraživanja odrediti aktivnost salivarne alfa amilaze proizašle iz različitih proizvodnih serija *in vitro*.

3. MATERIJAL I METODE

Rad je odobren od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku Medicinskog fakulteta Osijek (URBROJ: 2158-61-07-20-97) u lipnju 2020. godine.

3.1. Ustroj studije

Istraživanje je ustrojeno kao presječno.

3.2. Materijali

3.2.1. Oprema

- shaker
- termo blok
- vodena kupelj
- pipete od 1000, 200 i 100 μL
- kivete
- tubice od 2 mL
- posuda s ledom
- termometar
- vortex
- štoperica
- spektrofotometar: Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS.



Slika 5. Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotometar. (izradio autor)

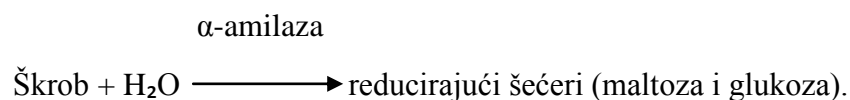
3.2.2. Kemikalije

- α -amilaza iz ljudske sline (lot# SLBX2676); tip IX-A (1,4- α -D-glukan-glukanohidrolaza) (isporuka dva puta s vremenskim odmakom od 2 mjeseca) → Sigma Aldrich, SAD
- škrob → Sigma Aldrich, SAD
- D-maltoza monohidrat → Sigma Aldrich, SAD
- natrijev fosfat (NaH_2PO_4) → Acros Organics, Belgium
- dinatrijev fosfat (Na_2HPO_4) → Acros Organics, Belgium
- 3,5-dinitrosalicilna kiselina → Alfa Aesar, SAD
- natrijev klorid → Carlo Erba, Spain
- kalij-natrij-tartarat-tetrahidrat → Kemika, Hrvatska
- natrij-hidroksid → T.T.T. d.o.o., Hrvatska.

3.3. Metode

3.3.1. Uvjeti metode

Metoda koja je korištena za određivanje aktivnosti salivarne α -amilaze je modificirana metoda po Bernfeldu. Modifikacija je učinjena jer su uzorci humanog podrijetla te je shodno tomu i volumen ukupne reakcijske smjese smanjen 10 puta. Škrob se djelovanjem salivarne α -amilaze razlaže na maltozu i glukozu:



Reakcija se temelji na mogućnosti maltoze da reducira blijedožuti DNS (3,5- dinitrosalicilna kiselina) reagens, koji nakon toga poprima narančasto-crvenu boju. Intenzitet promjene boje proporcionalan je nastaloj maltozi. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 540 nm jer je to područje u kojem se apsorbira narančasto-crvena boja. S obzirom da se određuje aktivnost humane salivarne α -amilaze, protokol je prilagođen optimalnim uvjetima za funkcioniranje tog enzima, pa je stoga temperatura inkubacije 37 °C te pH 7,0.

3.3.2. Priprema kemikalija

Od otopina se trebao pripremiti natrij-fosfatni pufer, škrobna otopina, DNS (3,5-dinitrosalicilna kiselina) reagens te maltozni standard.

- Natrij-fosfatni pufer

Pripremljeno je 100 mL 20 mM natrij-fosfatnog pufera (Na_2HPO_4 i NaH_2PO_4) u koji je dodan 6,7 mM NaCl. Zatim je pH namješten na 7,0 dodatkom 1 M NaOH.

- Škrobna otopina

Pripremljena je 1 %-tna škrobna otopina u fosfatnom puferu. Za pripremu otopine potrebna je odmjerne tikvica od 25 mL. U tikvicu je odvagano 0,25 g škroba te 20 mL fosfatnog pufera. Smjesa je zagrijana na temperaturu malo nižu od temperature vrenja dok se škrob nije otopio. Otopina je stajanjem ohlađena na sobnu temperaturu i nadopunjena do 25 mL sa pročišćenom vodom.

- DNS reagens

Priprema DNS reagensa teče u tri koraka:

1. Priprema $5,3 \text{ mol/dm}^3$ (M) otopine Na-K-tartarata u 2M NaOH. Otopina NaOH zagrijana je na 60°C te je u nju dodana potrebna količina Na-K-tartarata. Otopina je miješana dok se sav Na-K-tartarat nije otopio, uz napomenu da ne smije doći do vrenja otopine.
2. Priprema 96 mM otopine dinitrosalicilne kiseline u vodi otapanjem na 60°C .
3. Zagrijano je 12 mL destilirane vode na 60°C i polako dodano 8 mL otopine Na-K-tartarata. Nakon toga dodano je 20 mL dinitrosalicilne kiseline te je miješano dok se sve ne ujednači.

Dobivena otopina pohranjena je u tamnu bocu.

- Maltozni standard

Maltozni standard je 0,2 %-tna otopina maltoze. Kako bi otopina bila pripremljena, odvagano je 0,02 g maltoze te otopljeno u 10 mL destilirane vode.

3.3.3. Analiza aktivnosti salivarne α -amilaze

Nakon što su pripremljene sve otopine i oprema, vodena kupelj zagrijana je na 100 °C, a termo blok na 37 °C kako bi odgovarali potrebama protokola. Prvi je korak u tubice od 2 mL otpipetirati 0,1 mL otopine škroba te staviti na temperiranje na 37 °C. Potom se u svaku tubicu doda određeni volumen otopine enzima (prema tablici 1.), promiješa i inkubira 3 minute na 37 °C. Sljedeći je korak zaustavljanje reakcije DNS reagensom, koje se radi tako da se u tubicu odpipetira 0,1 mL DNS reagensa i stavi u kipuću vodenu kupelj (100 °C) te se doda ostatak otopine enzima tako da ukupni volumen enzimske otopine uvijek bude isti. Zatim se dobivena otopina kuha u kipućej kupelji 15 minuta. Tubica se prenosi na led i hladi nekoliko minuta, nakon čega mu se dodaje 0,9 mL pročišćene vode te se promiješa. Otopina se prenosi u kivetu i mjeri se apsorbancija na 540 nm.

Tablica 1. Volumen otopina koji se dodaje u uzorak.

| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | Slijepa proba |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------------|
| Supstrat (μ l) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enzim 1x (μ l) | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | - |
| Reagens (μ l) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Enzim 2x (μ l) | 80 | 60 | 40 | 20 | - | 100 |
| H ₂ O (μ l) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |
| V_{ukupni} (μl) | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 |

Nakon izmjerenih vrijednosti apsorbancije pripremljenih uzoraka također je izmjerena i apsorbancija pripremljenog maltoznog standarda (prema tablici 2.) koja je korištena za pripremu baždarnog dijagrama.

Tablica 2. Volumeni potrebni za pripremu razrijeđenja maltoznog standarda.

| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 | Slijepa proba |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Otopina maltoze (μ l) | - | 20 | 40 | 60 | 80 | 100 | 120 | - |
| H ₂ O (μ l) | 200 | 180 | 160 | 140 | 120 | 100 | 80 | 200 |
| Reagens (μ l) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| H ₂ O (μ l) | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 | 900 |
| V_{ukupni} (μl) | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 | 1200 |

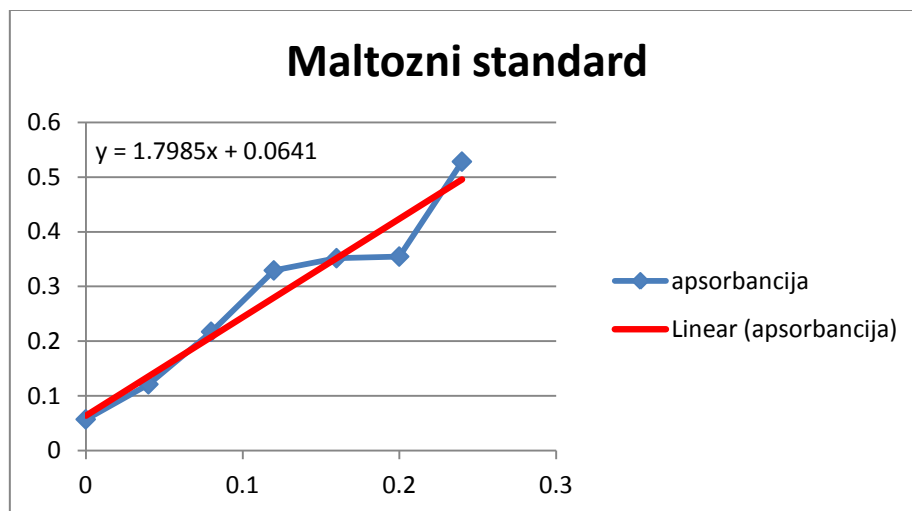
3.3.4. Statističke metode

Numerički podaci su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ili medijanom i interkvartilnim rasponom te prikazani grafički nakon obrade u EXCEL programu. Za usporedbu između pojedinih mjerenja koristio se neparametrijski Mann-Whitney U test za dva nezavisna uzorka. Podaci su analizirani pomoću analitičkog programa TIBCO STATISTICA 13.3 .0. (TIBCO Software Inc, Palo Alto, SAD). Statistička značajnost je postavljena na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

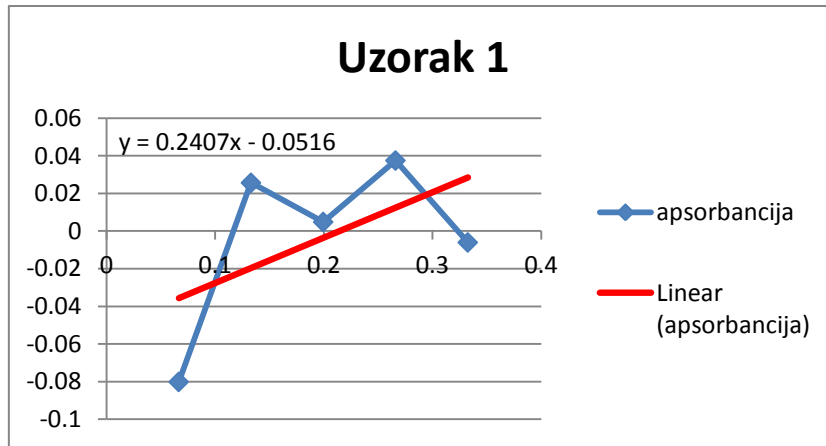
Za izračun prave vrijednosti apsorbancije primijenjen je račun:

$\Delta A_{540} (\text{Standard}) = A_{540} (\text{Standard}) - A_{540} (\text{Standard Blank})$. Također je izračunata masa maltoze u svakom uzorku pripremljenog standarda u nizu od 7 kako slijedi:

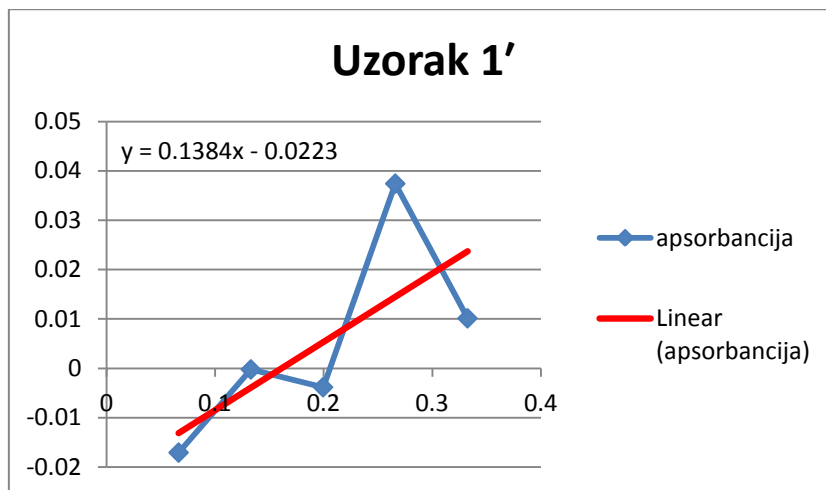


Slika 6. Baždarni dijagram maltoznog standarda. Na slici je u gornjem lijevom kutu prikazana jednadžba pravca. Graf prikazuje ovisnost apsorbancije o masi maltoze, Na apscisi se nalazi masa (mg) maltoze, a na ordinati apsorbancija (A) pri 540nm.

Kako bi se dobile konačne vrijednosti apsorbancije uzoraka nakon reakcije potrebno je koristiti račun $\Delta A_{540} (\text{Uzorak}) = A_{540} (\text{Test}) - A_{540} (\text{Test Blank})$. Za svaki uzorak koji je sudjelovao u reakciji izračunata je i masa enzima.

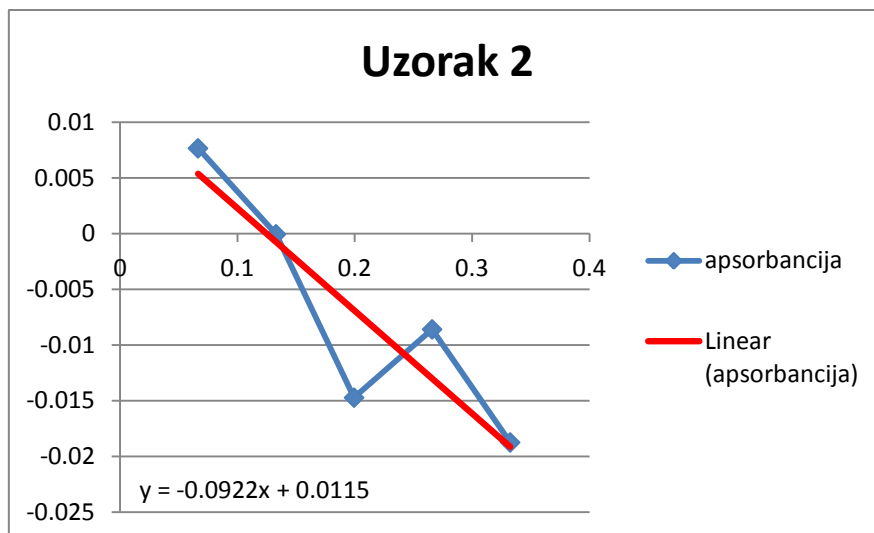


7.a)

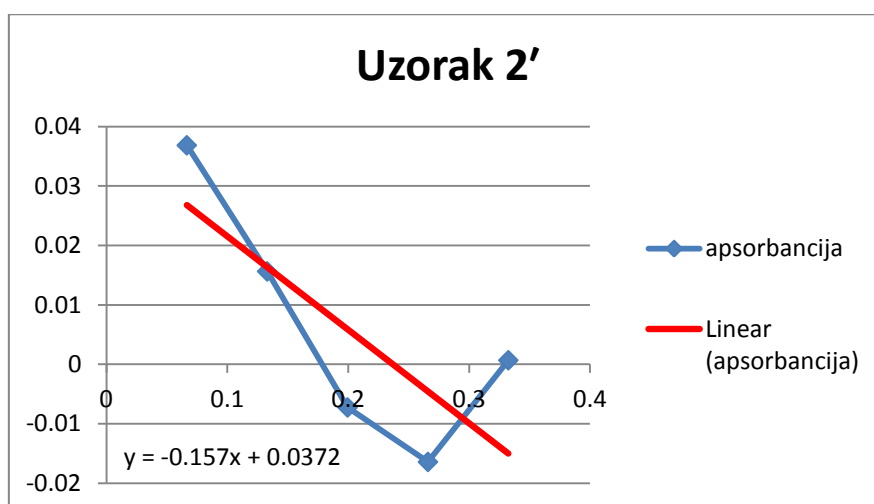


7.b)

Slika 7. Krivulja promjene apsorbancije u ovisnosti o masi dodane amilaze za: a) Uzorak 1 i b) Uzorak 1'. Na apscisi se nalazi masa (mg) amilaze, a na ordinati apsorbancija (A) pri 540nm. Na slikama se u gornjem lijevom kutu nalaze jednadžbe dobivenih pravaca.



8.a)



8.b)

Slika 8. Krivulja promjene apsorbancije u ovisnosti o masi dodane amilaze za: a) Uzorak 2 i b) Uzorak 2'. Na apscisi se nalazi masa (mg) amilaze, a na ordinati apsorbancija (A) pri 540nm. Na slikama se u donjem lijevom kutu nalaze jednadžbe dobivenih pravaca.

Izračun U/mg praha enzima se radi po sljedećoj formuli:

$U/mg \text{ praha} = (A_{540}(\text{Uzorak}) - b) / (a \cdot x)$ gdje je a-nagib pravca maltoznog standarda, a b-odsječak na osi ordinata tog istog pravca, a x je masa (mg) amilaze koja je dodana u reakcijsku smjesu prije zaustavljanja reakcije.

Tablica 3. Aktivnost (U/mg) enzima

| U/mg | | | | | |
|--------|----------|----------|----------|----------|----------|
| uzorak | a | b | c | d | e |
| 1 | -0,60293 | -0,16054 | -0,16502 | -0,05554 | -0,11706 |
| 1' | -0,67876 | -0,26894 | -0,18933 | -0,05579 | -0,09025 |
| 2 | -0,47191 | -0,26823 | -0,21968 | -0,15194 | -0,13853 |
| 2' | -0,22793 | -0,20268 | -0,19891 | -0,16833 | -0,10607 |

Izračunate aktivnosti enzima u analiziranim uzorcima primijenjene su za međusobnu usporedbu. Tako su uspoređeni uzorci 1 i 1', 2 i 2' te 1 i 2 pomoću neparametrijskog Mann–Whitney U testa za dva nezavisna uzorka uz statističku značajnost postavljenu na $p < 0,05$. Ni za jedan uzorak nije utvrđena statistički značajna razlika.

5. RASPRAVA

U posljednje vrijeme, zbog jednostavnosti, neinvazivnosti i ekonomičnosti prikupljanja uzoraka raste interes za otkrivanjem uloga salivarne α -amilaze u ljudskom organizmu. Također, za uzorkovanje sline nije potrebno obučeno osoblje te zbog nekorištenja igala nema rizika od perkutanih ozljeda osoblja. Zbog toga se u posljednjih nekoliko godina provode opsežna istraživanja sline kao uzorka za procjenu stanja usne šupljine, ali i cjelokupne fiziološke ravnoteže organizma. Trenutno je najistraživanija uloga salivarne α -amilaze kod njezina povećanog izlučivanja nakon aktivacije autonomnog živčanog sustava, između ostalog i kod stresa (16). Stres je isključivo subjektivni doživljaj, a javlja se kao odgovor organizma na nastalu situaciju koju osoba doživljava kao ugrožavajuću. U modernom društvu gotovo je nemoguće živjeti bez stresa koji se pojavljuje iz različitih razloga: briga o egzistenciji i poslu, briga o bližnjima ili samome sebi te briga o mišljenju drugih ljudi. Broj oboljelih od depresije i onih s anksioznim poremećajem povećava se: 1990. godine bilo je 416 milijuna oboljelih dok je do 2013. godine njihov broj porastao na 615 milijuna (17). S obzirom da je jako puno ljudi podložno stresu, upoznati smo i s njegovim negativnim posljedicama ukoliko smo konstantno pod stresom. Ljudi mogu razviti brojne probleme kao što su probavne smetnje, mučnina, moguća pojava akni, ispadanje kose, slabije pamćenje, glavobolja, povećan rizik od srčanog i moždanog udara te sklonost depresivnim raspoloženjima.

Upravo zbog jednostavnosti dobivanja uzoraka i sve većeg interesa za istraživanje salivarne α -amilaze očekuje se bitan napredak u tom polju. Nedavno je napravljen ručni uređaj koji mjeri aktivnost salivarne α -amilaze. Uređaj se također temelji na mjerenju nastalih reducirajućih šećera iz škroba. Oni reduciraju DNS reagens koji se nalazi na jednokratnim trakicama (18). Daljnji razvoj ovog uređaja potencijalno bi mogao igrati značajnu ulogu u brzom i jednostavnoj dijagnozi stresa dostupnoj široj populaciji, te na taj način čak i smanjiti incidenciju ranije spomenutih negativnih posljedica stresa, ali i potrošnju svih lijekova koji se koriste u liječenju istih. Na primjer, samo na antidepresive se godišnje u Hrvatskoj potroši oko 90 milijuna kuna (19).

Ovo istraživanje provedeno je kako bi se utvrdilo postoji li klinički značajna razlika koristimo li različite proizvodne serije istog enzima. Korištene su dvije humane salivarne α -amilaze u svrhu određivanja i usporedbe njihove aktivnosti *in vitro*. Za uzorke 1 i 2 odlučili smo napraviti ponovljena mjerenja 1' te 2' jer je rad s enzimima izrazito osjetljiv i zahtjeva vještinu i brzinu rada. Na taj način je napravljena kontrola kvalitete rada, jer su ponovljena mjerenja 1' i 2' pratila iste trendove kao i mjerenja 1 i 2. Kako su to studije pokazale, možemo

zaključiti da α -amilaza djeluje na način da se s povećanjem koncentracije α -amilaze u uzorku povećava i njezina aktivnost (20). Takav trend pokazuju i uzorci 1 i 1' iz ovog istraživanja, ali za razliku od njih, uzorci 2 i 2', suprotno očekivanjima, ne slijede taj trend. Mogući razlog ovih neočekivanih rezultata je korištenje modificiranoga protokola umjesto originalnoga, s obzirom na to da je korištena α -amilaza humanog porijekla, pa su i uvjeti metode (pH i temperatura) bili prilagođeni uvjetima u ljudskom organizmu. Statističkim ispitivanjem ovih uzoraka utvrđeno je kako nema značajne statističke razlike između aktivnosti ovih dviju salivarnih α -amilaza te da su one jednako učinkovite.

6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem dolazimo do sljedećih zaključaka:

- Metoda po Bernfeldu treba dodatnu prilagodbu kako bi se poboljšali i optimizirali reakcijski uvjeti za analizu uzoraka humane α -amilaze.
- Oba analizirana uzorka α -amilaze su aktivna bez obzira na različito vrijeme isporuke.

7. SAŽETAK**ODREĐIVANJE KATALITIČKE AKTIVNOSTI SALIVARNE ALFA AMILAZE *IN VITRO***

CILJ ISTRAŽIVANJA: Odrediti aktivnost salivarne alfa amilaze proizašle iz različitih proizvodnih serija *in vitro*.

NACRT STUDIJE: Presječno istraživanje.

MATERIJALI I METODE: Analizirana je aktivnost dviju komercionalno dostupnih alfa-amilaza. Korištena alfa-amilaza (ptijalin) kupljena je od tvrtke Sigma Aldrich. Korištene su sljedeće kemikalije: škrob, D-maltoza monohidrat, 3,5-dinitrosalicilna kiselina, natrijev klorid, natrij-hidroksid i kalij-natrij-tartarat-4-hidrat. Za određivanje salivarne α -amilaze korištena je modificirana metoda po Bernfeldu koja se temelji na svojstvu maltoze da reducira 3,5-dinitrosalicilnu kiselinu i stvara narančasto-crvenu otopinu. Intenzitet promjene boje proporcionalan je nastaloj maltozi, a apsorbancija se mjeri na valnoj duljini 540 nm.

REZULTATI: Neparometrijskim Mann-Whitney U testom za dva nezavisna uzorka utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u enzimskoj aktivnosti između ovih dviju salivarnih alfa amilaza proizašlih iz različitih proizvodnih serija *in vitro*.

ZAKLJUČAK: Provedenim istraživanjem dolazimo do zaključka da su obje serije analizirane α -amilaze jednako učinkovite te da nema značajne statističke razlike u njihovoj enzimskoj aktivnosti unatoč različitom vremenu isporuke. Metoda po Bernfeldu treba dodatnu prilagodbu kako bi se poboljšali i optimizirali reakcijski uvjeti za analizu uzoraka humane α -amilaze.

KLJUČNE RIJEČI: salivarna α -amilaza; enzimska aktivnost; metoda po Bernfeldu.

8. SUMMARY**DETERMINATION OF THE CATALYTIC ACTIVITY OF SALIVARY ALPHA AMYLASE *IN VITRO***

OBJECTIVES: The aim of this study was to determine salivary α -amylase activity bought from two different commercially available production batches.

STUDY DESIGN: A cross sectional study.

MATERIAL AND METHODS: Salivary α -amylase activity was determined from two commercially bought samples. α -amylase (ptijalin) was bought from Sigma Aldrich. The following solutions were made: sodium phosphate buffer, starch solution, DNS reagent and maltose standard by using these chemicals : starch, D-maltose monohydrate, 3,5,-dinitrosalicylic acid, sodium chloride, sodium hydroxid and potassium sodium tartrate 4-hydrate. For the determination of salivary α -amylase activity modified Bernfeld method was used. This method is based on the properties of maltose to reduce 3,5-dinitrosalicylic acid into the orange-red solution. The intensity of the colour is proportional to the maltose released.

RESULTS: Using nonparametric Mann-Whitney U test for two independent samples it was determined that there is no statistically significant difference in the enzymatic activity between these two samples.

CONCLUSION: The conducted research leads to the conclusion that there is no statistically significant difference in enzymatic activity between two different commercially available production batches despite different delivery times. Bernfeld method needs additional adjustment to improve and optimize reaction conditions for analysis of human α -amylase.

KEYWORDS: α -amylase; Bernfeld method; enzymatic activity.

9. LITERATURA

1. Larson DL. Clinical Chemistry: Fundamentals and Laboratory Techniques. 1. Izd. Kanada: Elsevier; 2016.
2. Wolfenbarger L Jr. Enzyme Regulation in Metabolic Pathways. Hoboken: New Jersey: Wiley Blackwell; 2017.
3. Glossary.periodni.com [Internet]. Katalizator. Dostupno na adresi: <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=katalizator>. Datum pristupa: 20.08.2020.
4. Štraus B. Petrik J. Štrausova medicinska biokemija. 3. Izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
5. Wikipedia.org [Internet]. Enzim. Dostupno na adresi: <https://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim>. Datum pristupa: 26.08.2020.
6. Ianiro G, Pecere S, Giorgio V, Gasbarrini A, Cammarota G. Digestive Enzyme Supplementation in Gastrointestinal Diseases. *Curr Drug Metab.* 2016; 17(2): 187–193. doi : 10.2174/138920021702160114150137.
7. Peyrot des Gachons C, Breslin PAS. Salivary Amylase: Digestion and Metabolic Syndrome. *Curr Diab Rep.* 2016; 102(16) doi: 10.1007/s11892-016-0794-7.
8. BERNFELD P. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem.* 1951;12:379-428. doi:10.1002/9780470122570.ch7.
9. Mandel AL, Breslin PAS. High Endogenous Salivary Amylase Is Associated with Improved Glycemic Homeostasis following Starch Ingestion in Adults. *J Nutr.* 2012; 142(5): 853–858. doi: 10.3945/jn.111.156984.
10. Marković M, Slina: uzorak u temeljnim i kliničkim istraživanjima, Zagreb, 2013.
11. Burtis CA, Burns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7. Izd. USA; Elsevier; 2015.
12. Wikipedia.org. [Internet] Alfa amilaza. Dostupno na adresi: https://sh.wikipedia.org/wiki/Alfa_amilaza. Datum pristupa: 28.08.2020.
13. Carpenter D, Mitchell LM, Armour JAL. Copy number variation of human *AMY1* is a minor contributor to variation in salivary amylase expression and activity. *Hum Genomics.* 2017; 11(2). doi: 10.1186/s40246-017-0097-3.
14. Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology.* 2007; 32(4): 392-401 doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.02.007.

15. Rashkova MR, Ribagin LS, Toneva NG. Correlation between salivary alpha-amylase and stress-related anxiety. *Folia Med (Plovdiv)*. 2012; 54(2):46-51 doi: 10.2478/v10153-011-0088-4.
16. Cozma S, Dima-Cozma LC, Ghiciuc CM, Pasquali V, Saponaro A, Patacchioli FR. Salivary cortisol and α - amylase: subclinical indicators of stress as cardiometabolic risk. *Braz J Med Biol Res*. 2017; 50(2) doi: 10.1590/1414-431X20165577.
17. Hzzj.hr [Internet]. Depresija. Dostupno na adresi: <https://www.hzzj.hr/sluzba-promicanje-zdravlja/depresija/>. Datum pristupa: 02.09.2020.
18. Hsiao HY, Chen RLC, Chou CC, Cheng TJ. Hand- held Colorimetry Sensor Platform for Determining Salivary α -Amylase Activity and Its Applications for Stress Assessment. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(7).
19. dnevnik.hr [Internet]. Postaje li Hrvatska država na antidepresivima? Sve više Hrvata traži pomoć psihijatra. Dostupno na adresi: <https://dnevnik.hr/vijesti/hrvatska/sve-vise-hrvata-pije-lijekove-za-smirenje-i-trazi-pomoc-psihijatarara---552458.html>. Datum pristupa: 02.09.2020.
20. Carban A, Popa V, Macocian E, Filip S. Spectrophotometric studies about amylase activity in starch hydrolysis reaction. University of Oradea, Romania. Internal report. 2012.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Matej Ruška

Datum rođenja: 11.07.1998.

Adresa: Hvarska 24, 31000 Osijek

E-mail: matejruska@gmail.com

Broj mobitela: 0955752288

OBRAZOVANJE

2017.- 2020. Medicinski fakultet Osijek, Preddiplomski sveučilišni studij
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2013.- 2017. II. Gimnazija Osijek

2005.- 2013. Osnovna škola Grigor Vitez Osijek