Utvrđivanje optimalnih uvjeta za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka

Salem, Diana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:501907

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Diana Salem

Utvrđivanje optimalnih uvjeta za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija I, Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Tihane Žanić Grubišić.

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Tihani Žanić Grubišić, na strpljenju, stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada te na korektnom i prijateljskom odnosu.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju na pruženoj pomoći i korištenju sredstava i potrebne opreme Zavoda. Posebice zahvaljujem višoj asistentici dr.sc. Aniti Somborac Bačura na pruženoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na potpori, pomoći i razumijevanju.

SADRŽAJ

1. UVOD 5
1.1. Ekstracelularni ATP 5
1.2. Purinska signalna kaskada 5
1.2.1. Ionotropni P2X receptori 6
1.2.2. Metabotropni P2Y receptori 7
1.2.3. Adenozinski receptori 8
1.3. Glavni enzimi uključeni u metabolizam ekstracelularnih purina 9
1.3.1. Ektoenzimi koji hidroliziraju nukleotide 10
1.3.2. Ekto-5'-nukleotidaza (CD73) 13
1.3.3. Biokemijska karakterizacija membranski vezanih NTPDaza 14
1.4. ATP-regeneracijski put 17
1.4.1. ATP sintaza 17
1.5. Metode za mjerenje enzimske aktivnosti ekto-ATPaze 19
1.6. Fosfati u serumu 20
1.7. Metode za mjerenje fosfata 21
2. OBRAZLOŽENJE TEME 22
3. MATERIJALI I METODE 23
3.1. Kemikalije 23
3.2. Uzorci 23
3.3. Aparatura 23
3.4. Priprema reagensa 24
3.5. Priprema razrijeđenih standarda 27
3.6. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti 28
3.7. Određivanje ektonukletidazne aktivnosti uz korištenje 10 % SDS-a 29
4. REZULTATI I RASPRAVA 32
4.1. Izrada baždarnog pravca za mjerenje koncentracije fosfata 32
4.2. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija TCA na apsorbanciju razrijeđenih standarda na 620 nm i 830 nm 33
4.3. Ispitivanje volumena uzorka krvnog seruma pogodnog za mjerenje enzimske aktivnosti 36
4.4. Ispitivanje različitih načina pripreme slijepe probe uzorka 38
4.5. Ispitivanje reproducibilnosti pripreme radnog reagensa 39
4.6. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti u serumu uz korištenje 10 % SDS-a za prekidanje enzimske reakcije 40
4.7. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija TCA korištene za prekidanje reakcije na izmjerenu aktivnost ekto-ATPaze 41

4.8. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti u uzorcima krvnih seruma na 620 nm 46
4.9. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti u uzorcima krvnih seruma na 830 nm 47
5. ZAKLJUČCI 49
6. LITERATURA 51
7. SAŽETAK/SUMMARY 52
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD 54

1. UVOD

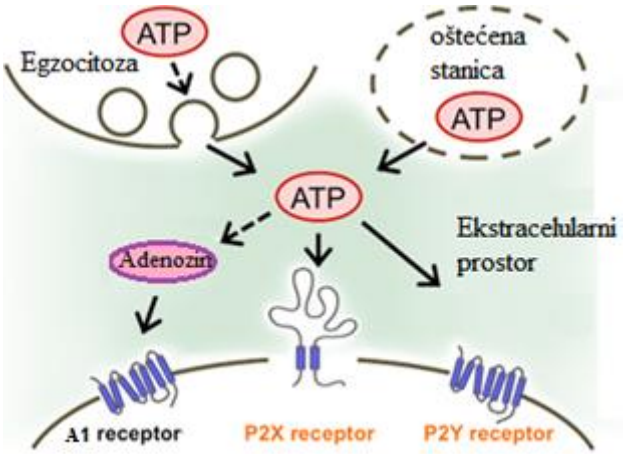
1.1. Ekstracelularni ATP

Ekstracelularni ATP i drugi nukleotidi i nukleozidi (UTP, UDP, CTP, GTP, GDP, adenozin i gvanozin) su vrlo važne signalne molekule koje posreduju u raznim procesima u gotovo svim organima i tkivima, kao što su, neurotransmisija u centralnom živčanom sustavu, regulacija imunološkog odgovora, embriološki razvoj, održavanje homeostaze, kontrola vazodilatacije koronarnih arterija, vaskularni tonus i angiogeneza te aktivacija trombocita. Enzimi koji hidroliziraju vanstanične nukleotide se nazivaju ektonukleotidaze. Najvažniji supstrati ovih enzima su ATP, ADP, UTP i UDP. Eritrociti, endotelne stanice, aktivirani trombociti i neutrofili otpuštaju nukleotide u vanstanični prostor, a zatim ti nukleotidi selektivno aktiviraju ionotropne P2X i metabotropne P2Y receptore i iniciraju brojne stanične odgovore. Razgradnja nukleotida, koju kataliziraju ektonukleotidaze, je važna u regulaciji aktivacije P2 receptora te je odgovorna za brojne fiziološke odgovore i održavanje homeostaze. Aktivacija P2 receptora u različitim tkivima je specifično regulirana zbog tkivnih razlika u ovim izoenzimima. Većina modela purinske signalizacije ovisi o interakciji između različitih procesa kao što su otpuštanje endogenog ATP-a i drugih agonista, signalizacija putem nukleotid selektivnog P2X receptora koji je ovisan o ligandu i metabotropnog P2Y receptora spregnutog s G proteinima, zatim vezanje adenozina na receptor te ektoenzimska inaktivacija purinskih nukleotida, metabolizam i ponovni unos nukleotida u stanicu (Yegutkin, 2014; Souza i sur., 2010; Pedrazza i sur., 2007; Kukulski i sur., 2005).

1.2. Purinska signalna kaskada

Otpuštanje endogenih nukleotida i nukleozida predstavlja početni korak u aktivaciji purinske signalne kaskade. Različite stanice i tkiva otpuštaju ATP i druge nukleotide (ADP, UTP i UDP) i adenozin tijekom mehaničkog oštećenja, nekroze, apoptoze te pod utjecajem različitih mehaničkih i kemijskih stimulansa kao što su stres i farmakološki agonisti. Mehanizam izbacivanja ATP-a uključuje vezikularni i ne-vezikularni transport. Vezikularni transport uključuje egzocitozu, a ne-vezikularni transport uključuje izbacivanje ATP-a iz stanice putem ionskih kanala i transportera. Egzocitoza putem vezikule se dešava u živčanim završecima, endokrinim stanicama i trombocitima. ATP se može transportirati sam ili zajedno s drugim neurotransmitorima i ekstracelularnim medijatorima.

Drugi tip otpuštanja nukleotida se dešava u epitelnim i endotelnim stanicama, limfocitima, astrocitima i hepatocitima te uključuje elektrodifuzijsko kretanje ili olakšanu difuziju kroz ionske kanale i nukleotidne transportere kao što su veliki anionski kanali, koneksin/paneksin hemikanali, cistično fibrozni transmembranski regulator vodljivosti (CFTR), višestruki organski anionski transporteri, višenamjenski transporter lijekova (MDR) te nukleotid specifični transporteri iz ABC (*eng.* ATP-binding cassette) obitelji (Yegutkin, 2014).



Slika 1.1. Otpuštanje ATP-a u ekstracelularni prostor i vezanje na P2X i P2Y receptore (Yegutkin, 2014)

Otpušteni nukleotidi se vežu na specifične receptore te time iniciraju signalizaciju i dovode do posljedičnih unutarstaničnih promjena (Slika 1.1.). Ključnu ulogu imaju nukleotid selektivni P2X i P2Y receptori (Yegutkin, 2014; Souza i sur., 2010; Kukulski i sur., 2005).

1.2.1. Ionotropni P2X receptori

P2X receptori su ionotropni receptori, ionski kanali ovisni o ligandu, koji uključuju sedam različitih podtipova od $P2X_1$ do $P2X_7$. Funkcionalni receptor može biti u obliku homo- ili hetero-trimera te ima dvije transmembranske domene koje formiraju neselektivne kationske kanale. No primijećeno je da $P2X_5$ receptor povećava permeabilnost za anione, a $P2X_7$ je receptor za velike molekule. ATP, koji ima ulogu liganda, veže se na ekstracelularnu domenu i povećava permeabilnost za ione Na^+ i Ca^{2+}. P2X receptori imaju važnu ulogu u različitim fiziološkim procesima kao što su apoptoza, modulacija srčanog ritma i kontraktilnost, modulacija vaskularnog tonusa, agregacija trombocita, aktivacija makrofaga i kontrakcija mokraćnog mjehura (Yegutkin, 2014; Souza i sur., 2010).

1.2.2. Metabotropni P2Y receptori

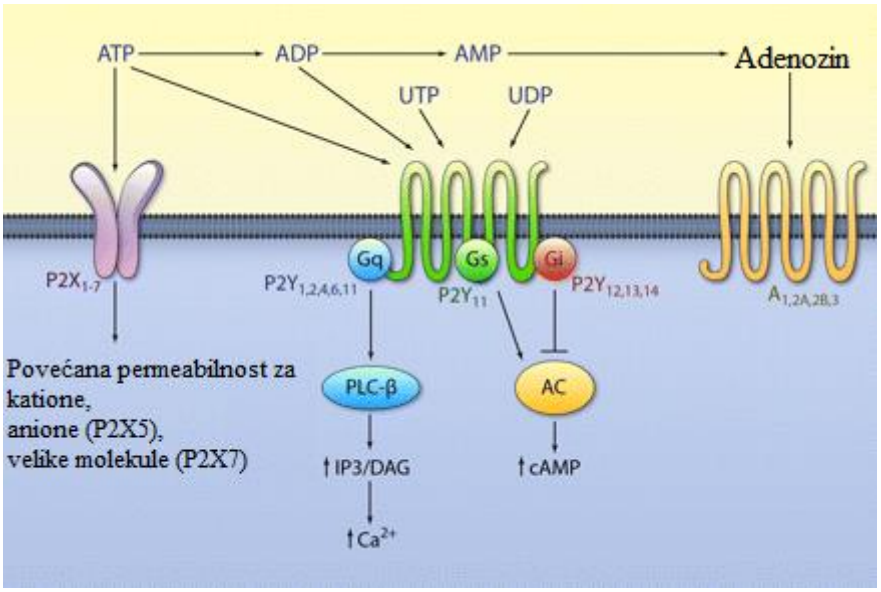
P2Y receptori su metabotropni receptori, spregnuti s G proteinima, a sastoje se od jednog polipeptidnog lanca sa sedam transmembranskih α-heliksa te imaju ekstracelularnu N-terminalnu domenu i intracelularnu C-terminalnu domenu. G proteini se sastoje od tri podjedinice, α, β i γ. Gvaninski nukleotidi se vežu za α-podjedinicu koja ima enzimsku aktivnost i katalizira hidrolizu GTP-a u GDP. Podjedinice β i γ su spojene u βγ-kompleks. Sve tri podjedinice su usidrene u membrani pomoću lanca masnih kiselina, koji je spojen na G protein. G proteini mogu slobodno difundirati površinom membrane te posljedično jedan rezervoar G proteina u stanici može aktivirati razne receptore i efektore. U „mirovanju" G proteini postoje u obliku slobodnog αβγ-trimera, a mjesto na α-podjedinici zauzima GDP. Kad agonist zauzme receptorsko vezno mjesto, to uzrokuje konformacijske promjene receptora, pa citoplazmatska domena receptora postigne veći afinitet za αβγ-trimer. Vezanje s αβγ-trimerom uzrokuje disocijaciju vezanog GDP-a koji zamjeni GTP, a to pak uzrokuje disocijaciju G proteinskog trimera, pa se oslobode α-GTP podjedinica i βγ-podjedinice. Podjedinica α-GTP je aktivni oblik G proteina koja difundira u membranu i reagira s raznim enzimima i ionskim kanalima uzrokujući njihovu aktivaciju ili inaktivaciju. Proces se zaustavlja hidrolizom GTP-a u GDP, što katalizira GTP-azna aktivnost α-podjedinice. Nastala α-GDP podjedinica zatim disocira od efektora i ponovno se ujedinjuje s βγ-kompleksom zatvarajući tako ciklus. Glavne mete G proteina, putem kojih receptori spregnuti s G proteinima kontroliraju razne stanične funkcije su adenilat ciklaza (enzim odgovoran za stvaranje cAMP-a), fosfolipaza C (enzim odgovoran za nastajanje inozitol fosfata i diacilglicerola) i ionski kanali (posebno kalcijevi i kalijevi kanali) (Yegutkin, 2014; Rang i sur., 2006).

P2Y receptori su podijeljeni na receptore koji su pretežno spregnuti s G_q proteinima te aktiviraju fosfolipazu C-β ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$ i $P2Y_{11}$) i na receptore koji su pretežno spregnuti s G_i proteinima, a koji inhibiraju adenilat ciklazu ($P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ i $P2Y_{14}$). Za razliku od ATP specifičnih P2X receptora, različiti podtipovi P2Y receptora selektivno prepoznaju različite agoniste, uključujući ATP i/ili ADP ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$ i $P2Y_{13}$), UTP i UDP ($P2Y_2$, $P2Y_4$ i $P2Y_6$), UDP-glukozu i UDP-galaktozu ($P2Y_{14}$). $P2Y_{11}$ može biti spregnut s G_q i G_s proteinima te dovodi do povećane razine Ca^{2+} i cAMP-a (Yegutkin, 2014; Souza i sur., 2010; Kukulski i sur., 2005).

1.2.3. Adenozinski receptori

Adenozin stupa u interakciju s vlastitim adenozinskim receptorima koji su također spregnuti s G proteinima te može dovesti do aktivacije (A_{2A} i A_{2B}) ili inhibicije (A_1 i A_3) adenilat ciklaze. A_1 i A_{2A} receptori imaju važnu ulogu u regulaciji koronarnog protoka krvi te također imaju važnu ulogu u mozgu gdje reguliraju oslobođenje neurotransmitora poput dopamina i glutamata, dok su A_{2B} i A_3 receptori locirani uglavnom periferno i sudjeluju u procesima kao što su upala i imunološki odgovori (Slika 1.2.) (Yegutkin, 2014; Pedrazza i sur., 2007).

Neke stanice su sposobne održavati bazalnu koncentraciju ATP-a, ADP-a, AMP-a i adenozina te time doprinose konstitutivnoj aktivaciji i/ili desentitizaciji purinergičkih receptora (Yegutkin, 2014).



Slika 1.2. Vezanje ATP-a na P2X i P2Y receptore te vezanje adenozina na adenozinske receptore (Yegutkin, 2014).

1.3. Glavni enzimi uključeni u metabolizam ekstracelularnih purina

Enzimi koji sudjeluju u hidrolizi nukleotida su enzimi članovi nukleozid trifosfat difosfohidrolazne obitelji (NTPDaze), članovi pirofosfatazne/fosfodiesterazne obitelji (NPP), ekto-5'-nukleotidaza/CD73, tkivno-nespecifična alkalna fosfataza (TNAP) te druge alkalne i kisele fosfataze.

Ekstracelularni adenozin se može inaktivirati uz djelovanje enzima adenozin deaminaze (ADA) koja se nalazi na površini stanične membrane i enzima purin nukleozid fosforilaze (PNP) ili se može transportirati u stanicu Na^+-ovisnim nukleozidnim transportom. U Tablici 1.1. prikazani su glavni enzimi uključeni u metabolizam ekstracelularnih purina (Yegutkin, 2014).

Tablica 1.1. Glavni enzimi uključeni u metabolizam ekstracelularnih purina

Enzim	Gen	Katalitička reakcija
Nukleozid trifosfat difosfohidrolaza (NTPDaza)	ENTPD	ATP → ADP → AMP NTP→ NDP → NMP
Pirofosfataza/fosfodiesteraza (NPP)	ENPP	ATP → ADP → AMP ATP → AMP + PP_i
Ekto-5'-nukleotidaza	NT5E	AMP → Adenozin
Adenozin deaminaza	ADA	Adenozin → Inozin
Purin nukleozid fosforilaza	PNP	Inozin → Hipoksantin
Adenilat kinaza	AK	ATP + AMP ↔ 2ADP
Alkalna fosfataza	ALP	ATP → ADP → AMP→ Adenozin NTP → NDP → NMP PP_i → P_i

1.3.1. Ektoenzimi koji hidroliziraju nukleotide

Ekto-ATPaza je enzim koji hidrolizira ekstracelularni ATP. Termin ekto-ATPaza je prvi uveo WA Engelhardt 1957. godine, no sve do kraja 1970. godine ova ideja nije bila prihvaćena, pošto se smatralo da se ATP isključivo nalazi intracelularno. No aktivnost ekto-ATPaze je pokazana na različitim staničnim kulturama i tkivima, uključujući intestinalne mukozne stanice, živčane stanice sisavaca te na membrani hepatocita i na eritrocitima (Orlov, 2007).

Većina ekto-ATPaza pokazuje tri zajedničke karakteristike:

1) ovisne su o Mg^{2+} ili Ca^{2+} ionima

2) pokazuju neosjetljivost na specifične inhibitore F-tipa, P-tipa i V-tipa ATPaza

3) sposobne su hidrolizirati nukleozid trifosfate kao i nukleozid difosfate (Yegutkin, 2014; Kukulski i sur., 2005; Yegutkin i Burnstock, 2000).

Prijašnji nazivi za nukleozid trifosfat difosfohidrolaznu obitelj (E-NTPDaza) su ekto-apiraza, ekto-ATPaza, ATP-difosfodihidrolaza i nukleozid difosfohidrolaza. Ta obitelj uključuje osam različitih članova, koji su klasificirani po redoslijedu otkrića. NTPDaze1, 2, 3 i 8 su dominantne ektonukleotidaze i imaju važnu ulogu u kontroli signalizacije pomoću P2 receptora jer su lokalizirane na površini stanične membrane te hidroliziraju nukleotide u koncentraciji koja će aktivirati P2 receptore. Ovi enzimi također imaju zaštitnu ulogu jer održavaju razinu ekstracelularnog ATP-a, ADP-a i adenozina u fiziološkoj koncentraciji. NTPDaze5 i 6 su locirane intracelularno, no mogu biti prisutne na površini stanične membrane, ali zbog visoke K_m vrijednosti i niske specifičnosti vrlo je mala mogućnost da ovi enzimi reguliraju signalizaciju aktivacijom P2 receptora. NTPDaze4 i 7 su locirane intracelularno na luminalnoj strani citoplazmatskih organela kao što su Golgijev aparat i endoplazmatski retikulum. Svi članovi su aktivni u fiziološkom do blago bazičnom pH u rasponu od 7,0 do 8,5, uz milimolarnu koncentraciju dvovalentnih kationa kao što su Mg^{2+} i Ca^{2+}, kako bi se postigla maksimalna aktivnost enzima (Yegutkin, 2014; Souza i sur., 2010; Kukulski i sur., 2005).

Članovi obitelji NTPDaza koji se nalaze na staničnoj membrani su visoko glikozilirani enzimi s molekulskom masom od 70 do 80 kDa. Također ovi enzimi dijele homologiju u redoslijedu nukleotida s posebnim naglaskom na *„apiraznu konzerviranu regiju“* te se sastoje od dvije transmembranske domene na N i C kraju s velikom ekstracelularnom petljom koja čini hidrofobnu regiju. Enzimi mogu biti u monomernom ili homo-oligomernom stanju (Yegutkin, 2014).

Topljive forme humane NTPDaze se sastoje samo od ekstracelularne domene te je primijećena njihova smanjena sposobnost hidrolize nukleotida u usporedbi s NTPDazama koje se nalaze na staničnoj membrani, a koje sadrže dvije transmembranske domene. Ranije je dokazana prisutnost topljive NTPDaze koja slobodno cirkulira u humanom i mišjem krvotoku te doprinosi metabolizmu ADP-a. Topljivi, cirkulirajući ektoenzimi smanjuju razinu nukleotida te zato imaju važnu ulogu u održavanju normalne fiziologije. Enzimi iz krvnog seruma mogu raditi zajedno s enzimima iz trombocita i vaskularnog zida u prevenciji spontane agregacije trombocita i nastanka tromba (Yegutkin, 2014; Pedrazza i sur., 2007).

NTPDaza1, koja se još naziva i CD39, je enzim koji je najbolje opisan i karakteriziran član ove obitelji. Eksprimirana je u velikim količinama na stanicama endotela i stanicama glatkih mišića, dendritičkim stanicama, limfocitima i drugim stanicama te ima vrlo važnu ulogu u održavanju i kontroli homeostaze zbog inhibicije protrombotičkih i proinflamatornih učinka intravaskularnog ATP-a i ADP-a. NTPDaza1 ne dozvoljava akumulaciju ADP-a te na taj način prekida aktivaciju $P2Y_{1,12,13}$ receptora efikasnije od ostalih NTPDaza. Suprotno, NTPDaze2, 3 i 8 promoviraju aktivaciju ADP specifičnih receptora, jer u prisutnosti ATP-a stvaraju i akumuliraju ADP. NTPDaza1/CD39 također ima važnu ulogu u modulaciji imunološkog i inflamatornog odgovora tijekom interakcije patogena sa stanicom domaćina, tumorigeneze i inflamatorne bolesti crijeva. Studije koje su provedene na miševima kojima je mutiran gen za NTPDazu1/CD39 su potvrdile ključnu regulatornu ulogu ovog ektoenzima u reaktivaciji trombocita, prevenciji upale kože koja je stimulirana iritirajućim kemikalijama, lokalnoj regulaciji vaskularnog tonusa i krvnog tlaka, aktivaciji signalnih puteva povezanih s integrinima i inhibiciji angiogeneze tumora i metastaza, očuvanju integriteta pluća tijekom akutne ozljede i zaštiti srca od ishemije (Yegutkin, 2014).

NTPDaza2 je uglavnom lokalizirana na mikrovaskularnim pericitima i adventicijskim stanicama krvnih žila, gdje ima ulogu očuvanja vaskularnog integriteta i olakšava agregaciju trombocita okidanjem ADP-posredovane aktivacije $P2Y_1$ i $P2Y_{12}$ receptora. NTPDaza2 je također eksprimirana u glomerularnim arteriolama bubrega, stanicama gušterače, žlijezdama slinovnicama i stanicama probavnog sustava. U perifernom živčanom sustavu NTPDaza2 je udružena sa Schwannovim stanicama, dok je NTPDaza1 isključivo vezana za krvne žile. Istraživanja su pokazala da je ekspresija NTPDaze2 u mozgu glodavaca drukčije regulirana u embrijskoj, postnatalnoj i odrasloj fazi, što upućuje na regulatornu ulogu ovih ektoenzima u stvaranju novih živčanih stanica i purinskoj kontroli neurogeneze kod embrija i odraslog glodavca. NTPDaza2 ima ključnu ulogu u početnom razvoju očiju zbog aktivacije $P2Y_1$ receptora te je vrlo bitan enzim za hidrolizu ATP-a u okusnim pupoljcima. Genetska mutacija ovog enzima rezultira u desentitizaciji P2 receptora (Yegutkin, 2014).

NTPDaza3 je eksprimirana u gastrointestinalnom traktu i žlijezdama slinovnicama. Također ima ulogu u regulaciji homeostaze u mozgu štakora, sekreciji inzulina kod ljudi i glodavaca te bi mogla predstavljati novi biološki marker tubularne metaplazije u humanom endometriju (Yegutkin, 2014).

Za ***NTPDazu7*** se smatralo da je uglavnom lokalizirana u intracelularnim vezikulama te da preferira UTP i UDP kao supstrate, no noviji podaci su pokazali da je eksprimirana na površini stanice u tankom crijevu gdje regulira razvoj i kontrolu Th17 stanica te imunološki odgovor crijeva hidrolizom luminalnog ATP-a (Yegutkin, 2014).

NTPDaza8 je eksprimirana na membrani stanica jetre gdje kontrolira sekreciju žući te na četkastim membranama bubrega (Yegutkin, 2014).

1.3.2. Ekto-5'-nukleotidaza (CD73)

AMP kao konačni produkt hidrolize ATP-a NTPDazama1, 3 i 8 se dalje defosforilira u adenozin enzimom ekto-5'-nukleotidaza (CD73). Nastali adenozin je biološki aktivna molekula koja ima različite fiziološke učinke koje postiže aktivacijom svojih adenozinskih receptora. Adenozin koji nastaje razgradnjom AMP-a djeluje vazodilatacijski i kardioprotektivno te također modulira kognitivna stanja i povezan je s poremećajima raspoloženja kao što su anksioznost i depresija. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI), poput fluoksetina, su povezani s povećanim rizikom od gastrointestinalnog, intrakranijalnog krvarenja i krvarenja tijekom operacije, zbog toga što dovode do inhibicije agregacije trombocita. Triciklički antidepresivi, poput nortriptilina, su povezani s povećanim rizikom od infarkta miokarda (Pedrazza i sur., 2007). U studiji koju su proveli Pedrazza i sur. (2007) evaluiran je *in vivo* učinak antidepresiva kod akutne i kronične primjene te njihov *in vitro* učinak na hidrolizu ATP-a, ADP-a i AMP-a u krvnom serumu štakora. Primijećeno je da je aktivnost NTPDaza i ekto-5'-nukleotidaze osjetljiva na antidepresive, fluoksetin i nortriptilin, tijekom kronične primjene, dok je kod akutne primjene jedino primjena nortriptilina smanjila hidrolizu ATP-a. U *in vitro* testovima antidepresivi nisu utjecali na aktivnost enzima u svim primijenjenim dozama. Životinje su eutanazirane 1 sat nakon akutne primjene fluoksetina i nortriptilina (10 mg/kg i.p.) te je jedino nortriptilin statistički značajno smanjio hidrolizu ATP-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Kod kronične primjene antidepresiva, fluoksetin i nortriptilin su primijenjeni u dozi od 10 mg/kg tijekom 14 dana te je primijećeno statistički značajno smanjenje hidrolize ATP-a, ADP-a i AMP-a u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati *in vitro* eksperimenta su pokazali da antidepresivi u koncentraciji od 100, 250 i 500 μM nisu utjecali na aktivnost NTPdaze i ekto-5'-nukleotidaze u krvnom serumu štakora u odnosu na kontrolnu skupinu (Pedrazza i sur., 2007).

NTPDaza1 koja hidrolizira ATP u AMP bez značajnije akumulacije ADP-a omogućuje brzo stvaranje adenozina djelovanjem enzima ekto-5'-nukleotidaze. U prisutnosti same NTPDaze2 stvaranje adenozina je onemogućeno zbog toga što je ekto-5'-nukleotidaza inhibirana ADP-om. Također u prisutnosti NTPDaze3 i 8 stvaranje adenozina će biti odgođeno te zbog toga mora proći određeno vrijeme između aktivacije P2 receptora i posljedične aktivacije adenozinskih receptora, u prisutnosti NTPDaze3 i 8, jer je potrebno više vremena da se stvori supstrat, adenin iz AMP-a te da se ukloni inhibitor ekto-5'-nukleotidaze, ADP (Kukulski i sur., 2005).

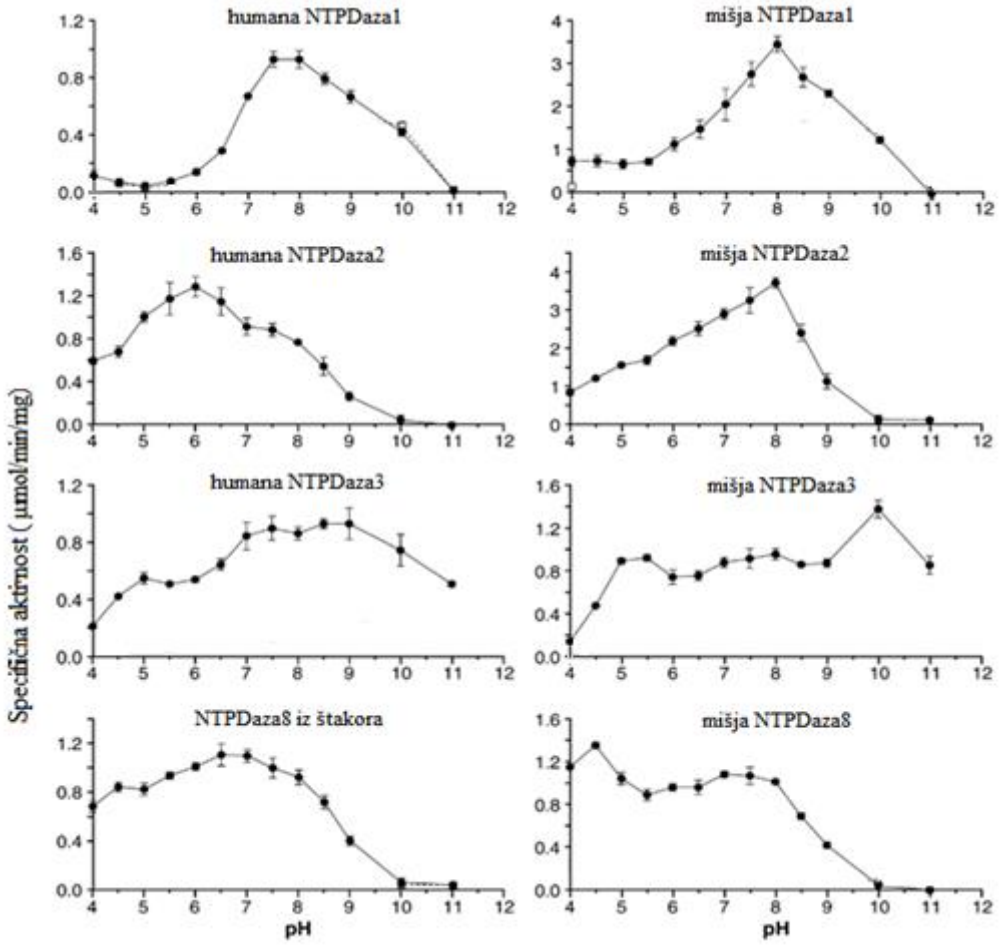
U studiji koju su proveli Souza i sur. (2010), u kojoj je proučavan utjecaj prehrane bogate mastima i šećerima na ektonukleotidaznu aktivnost, je primijećeno da je nakon 4 mjeseci takve prehrane ektonukleotidazna aktivnost smanjena u odnosu na kontrolnu skupinu. Smanjenje ektonukleotidazne aktivnosti dovodi do neravnoteže u vaskularnoj koncentraciji nukleotida i nukleozida. Ektonukleotidaze imaju važnu ulogu u regulaciji trombogeneze u vaskularnom sustavu jer omogućuju hidrolizu ATP-a, ADP-a i AMP-a koji stimuliraju vazokonstrikciju i agregaciju trombocita. Dakle, ektonukleotidazna aktivnost je važna u sprječavanju tromboze i aterogenih procesa. Ektonukleotidaze i NO su opisani kao glavni inhibitori agregacije trombocita u endotelu, ali oni neovisno doprinose inhibiciji agregacije trombocita, zbog različitih mehanizma djelovanja. Ektonukleotidaze brzo metaboliziraju ATP i ADP koji se otpušta iz aktiviranih trombocita te se tako smanjuje agregacija trombocita (Souza i sur., 2010).

1.3.3. Biokemijska karakterizacija membranski vezanih NTPDaza

Biokemijske karakteristike humanih i mišjih membranski vezanih NTPDaza su proučavane koristeći proteinski ekstrakt COS-7 stanica koje su transfektirane s ekspresijskim vektorom (pcDNA3) koji sadrži cDNA koja kodira za svaki enzim. Utvrđeno je da je za sve NTPDaze reakcija hidrolize linearna prvih 30 minuta kada se koristi ATP ili ADP kao supstrat. Sve membranski vezane NTPDaze mogu hidrolizirati tri- i difosfonukleotide, naročito ATP, ADP, UTP i UDP koji mogu inducirati P2 receptore i uzrokovati posljedične odgovore. Sve NTPDaze preferiraju trifosfonukleotide nad difosfonukleotidima, no s drukčijim NTP/NDP omjerom koji je određen mjerenjem fosfata. Niti jedan od ovih enzima ne hidrolizira AMP (Kukulski i sur., 2005).

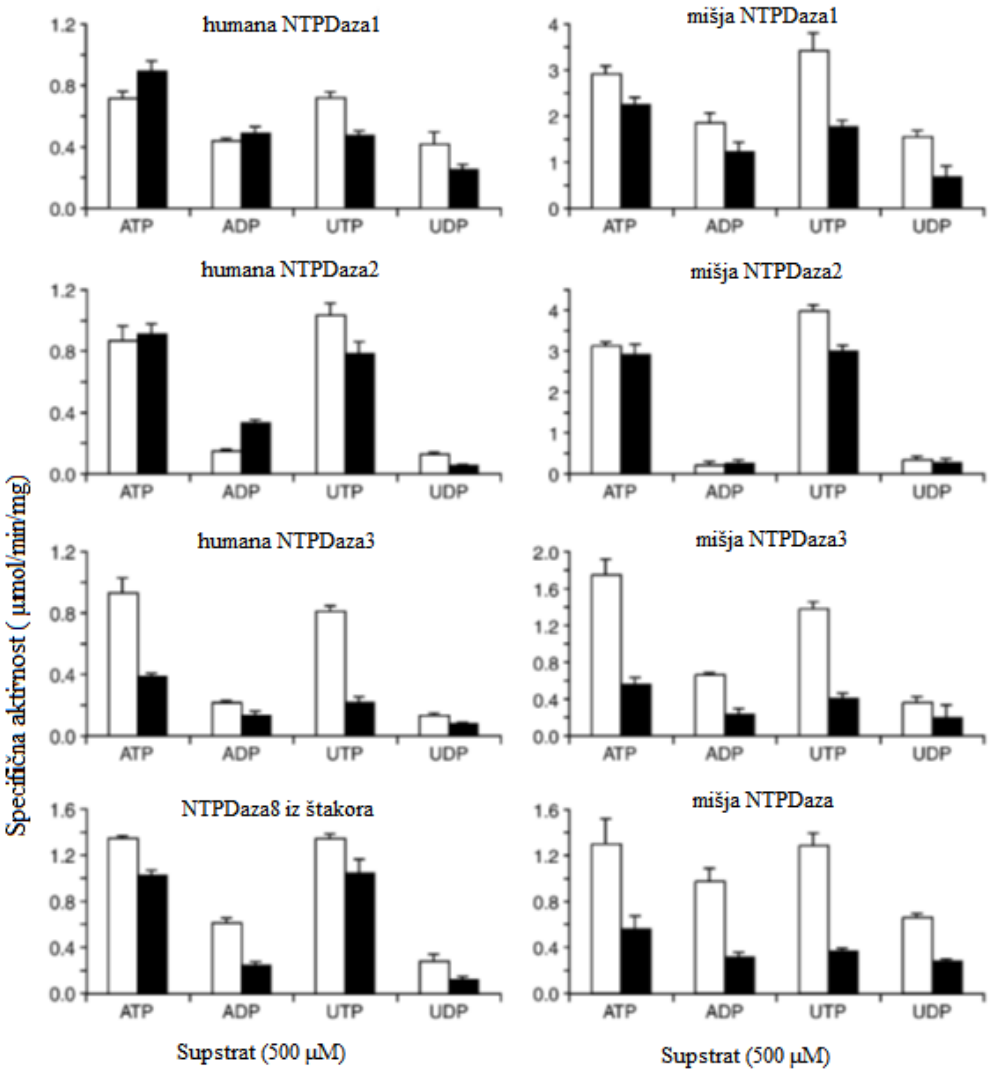
Za aktivnost sve humane i mišje NTPDaze zahtijevaju dvovalentne katione, Mg^{2+} ione ili Ca^{2+} ione s optimalnom koncentracijom između 1 i 5 mM. U prisutnosti agensa koji kelatiraju dvovalentne katione, kao što je EDTA, nije bilo moguće izmjeriti aktivnost ovih enzima. NTPDaze3 i 8 preferiraju Ca^{2+} nad Mg^{2+}, dok za NTPDaze 1 i 2 nije primijećena značajna razlika (Kukulski i sur., 2005).

Sve NTPDaze su aktivne (više od 60% maksimalne aktivnosti) u fiziološkom do blago alkalnom pH mediju (7,0-8,5). Ako se promatra pH u kojem je zadržano najmanje 50 % maksimalne aktivnosti, NTPDaza1 je aktivna u pH mediju od 7 do 10, NTPDaze2 i 8 su aktivne u pH mediju od 4,5 do 8,5, dok je NTPDaza3 aktivna u širokom spektru pH, od 4,5 do 11. U kiselom mediju (pH od 4 do 6) najveću brzinu hidrolize nukleotida ima NTPDaza8, dok najveću brzinu hidrolize nukleotida u alkalnom mediju (pH od 9 do 11) ima NTPDaza3. Iako postoje relativno male razlike između humanih i mišjih NTPDaza, najznačajnija razlika je primijećena kod NTPDaze2, gdje optimalni pH za hidrolizu ATP-a iznosi 6,0, kod humane NTPDaze2, a kod mišje 8,0 (Slika 1.3.) (Kukulski i sur., 2005).



Slika 1.3. Utjecaj pH na aktivnost membranski vezanih NTPDaza (Kukulski i sur., 2005)

Sve membranski vezane NTPDaze slijede Michaelis-Menten-ovu kinetiku hidrolize ATP-a, ADP-a, UTP-a i UDP-a. Iako su K_m vrijednosti humanih i mišjih NTPDaza slične, ipak su K_m vrijednosti humanih NTPDaza veće od njihovih mišjih analoga. Humana i mišja NTPDaza1 hidrolizira ATP u AMP bez akumulacije veće količine ADP-a. Oba enzima hidroliziraju i UTP, no uz nakupljanje UDP-a koji se hidrolizira tek kada koncentracija UTP-a padne. U prisutnosti ATP-a i UTP-a dolazi do hidrolize obaju nukleotida, no adeninski nukleotidi su bolji supstrati za humanu i mišju NTPDazu. Humana i mišja NTPDaza2 hidrolizira ATP i UTP u odgovarajuće difosfonukleotide s tim da humana NTPDaza2 preferira ATP kao supstrat, dok mišja NTPDaza2 hidrolizira podjednako oba supstrata (Slika 1.4.) (Kukulski i sur., 2005).



Slika 1.4. Specifičnost supstrata membranski vezanih NTPDaza gdje bijeli stupci predstavljaju aktivaciju uz Ca^{2+} ione, a crni stupci predstavljaju aktivaciju uz Mg^{2+} ione (Kukulski i sur., 2005)

Postoje manje razlike između NTPDaza iz različitih vrsta, no njihov način hidrolize supstrata je sličan te se zato očekuje da ovi enzimi reguliraju signalizaciju pomoću P2 receptora na isti način u različitim vrstama (Kukulski i sur., 2005).

1.4. ATP-regeneracijski put

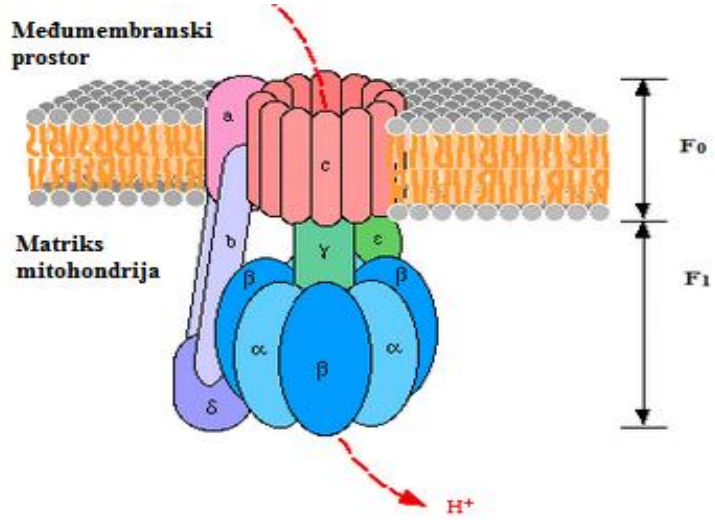
Reducirani koenzimi, NADH i $FADH_2$, nastali u ciklusu limunske kiseline, oksidiraju se u procesu staničnog disanja. Pri prijenosu elektrona s tih nosača na krajnji akceptor O_2 oslobađa se energija za sintezu ATP-a, a kisik se reducira u vodu. Lanac za prijenos elektrona omogućava nastajanje gradijenta protona koji zatim omogućava sintezu ATP-a. Elektroni se s NADH prenose na O_2 pomoću tri velika proteinska kompleksa koji se nazivaju NADH-Q-oksidoreduktaza (kompleks I), Q-citokrom *c* oksidoreduktaza (kompleks III) i citokrom *c* oksidaza (kompleks IV). Tok elektrona kroz ove transmembranske proteine oslobađa energiju i omogućava ispumpavanje protona iz matriksa kroz unutarnju mitohondrijsku membranu u međumembranski prostor. Četvrti veliki proteinski kompleks je sukcinat-Q-reduktaza (kompleks II) koja sadrži sukcinat dehidrogenazu koja u citratnom ciklusu katalizira nastajanje $FADH_2$. Elektroni s $FADH_2$ ulaze u lanac za prijenos elektrona u kompleksu sukcinat-Q-reduktaze. Za razliku od ostalih proteinskih kompleksa sukcinat-Q-reduktaza ne pumpa protone. pH gradijent i membranski potencijal stvaraju proton-motornu silu koja se koristi za sintezu ATP-a (Cooper i Hausman, 2010).

1.4.1. ATP sintaza

ATP sintaza, koja se još naziva i F_0F_1 ATP sintaza ili V kompleks, je veliki proteinski kompleks mase oko 500 kDa, a sastoji se od F_0 podjedinice koja je uronjena u unutarnju membranu mitohondrija i F_1 podjedinice koja se nalazi u matriksu mitohondrija. F_1 podjedinica ima promjer od 85 Å i sadrži katalitičku aktivnost sintaze. F_0 i F_1 podjedinica su međusobno povezane tankom stapkom.

F_1 podjedinicu izgrađuju pet vrsta polipeptida (α3, β3, γ, δ i ε). Tri α i tri β podjedinice naizmjenično se nalaze u heksamernom prstenu. Aktivna mjesta nalaze se na β podjedinicama. Neposredno iznad α i β podjedinica smješteni su γ i ε proteini. Podjedinica γ se proteže do središta α3β3 heksamera. Svaka pojedina β podjedinica se razlikuje u konformaciji od ostalih β podjedinica jer svaka od njih reagira s različitim dijelom γ podjedinice (Slika 1.5.).

F_0 podjedinica koja je uronjena u unutarnju membranu mitohondrija oblikuje kanal kojim se protoni vraćaju iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija. Protok protona kroz F_0 podjedinicu uzrokuje rotaciju dijela F_1 podjedinice koji djeluje kao rotacijski motor za pokretanje sinteze ATP-a. Za sintezu jedne molekule ATP-a na F_1 podjedinici potrebno je vratiti četiri protona kroz F_0 podjedinicu natrag u matriks mitohondrija. Oksidacija jedne molekule NADH stoga omogućuje sintezu triju molekula ATP-a, a oksidacija $FADH_2$ omogućuje sintezu samo dviju molekula ATP-a.



Slika 1.5. Struktura ATP sintaze

ATP sintaza katalizira sintezu ATP-a iz ADP-a i ortofosfata:

$ADP^{3-} + HPO_4^{2-} + H^+ \leftrightarrow ATP^{4-} + H_2O$

Postoje tri aktivna mjesta na enzimu, a svako od njih u određenom trenutku vrši jednu od tri funkcija**.** Proton-motorna sila omogućava da ova tri aktivna mjesta uzastopce mijenjaju funkciju ovisno o protoku protona kroz F_0 podjedinicu

β podjedinica, aktivno mjesto enzima, može izvršiti sve tri funkcije važne u sintezi ATP-a time što mijenja konformaciju, a funkcije koje treba izvršiti su vezanje ADP-a i P_i, sinteza ATP-a i otpuštanja ATP-a. β podjedinica u određenom trenutku može biti u L konformaciji (opuštenoj konformaciji) u kojoj može vezati ADP i P_i, u sljedećem koraku može biti u napetoj T konformaciji u kojoj se ADP i P_i vežu toliko čvrsto da dolazi do sinteze ATP-a te konačno u otvorenoj O konformaciji koja otpušta sintetizirani ATP. Ukoliko nema protoka protona kroz enzim ATP ne napušta katalitičke podjedinice (Lodish i sur., 2012; Cooper i Hausman, 2010).

Smatra se da je ATP sintaza kod sisavaca najviše eksprimirana u unutarnjoj membrani mitohondrija, no novije studije su pokazale da su neke komponente ovog enzimatskog kompleksa prisutne i na vanjskoj strani stanične membrane te da imaju doprinos u angiogenezi, metabolizmu lipida i metastazi tumora (Yegutkin, 2014).

1.5. Metode za mjerenje enzimske aktivnosti ekto-ATPaze

U literaturi nije opisano određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka, već samo u serumu štakora te u stanicama. U studiji koju su proveli Pedrazza i sur. (2007), određena je hidroliza ATP-a u serumu štakora, prema sljedećem postupku. Reakcijska smjesa, koja sadrži 3,0 mM ATP kao supstrat i 112,5 mM Tris-HCl, pH 8,0, je inkubirana s 0,7 mg do 1,0 mg serumskih proteina na 37 °C u vremenu od 40 minuta, a konačni volumen iznosio je 2,0 mL. Reakcija je zaustavljena dodatkom 0,2 mL 10% TCA. Uzorci su ohlađeni na ledu te je mjerena količina oslobođenog anorganskog fosfata. Vrijeme inkubacije i koncentracija proteina je izabrana tako da osigura linearnost reakcije. Kako bi se eliminirao utjecaj ne-enzimske hidrolize ATP-a, slijepe probe su napravljene tako da se nakon inkubacije od 40 minuta dodaje TCA te nakon toga serum. Svi uzorci su centrifugirani 5 minuta na 5 000 *g*, a zatim je 100 μL supernatanta korišteno u daljnjoj analizi te je spektrofotometrijski mjerena količina oslobođenog anorganskog fosfata. Svi uzorci su rađeni u duplikatu, a enzimska aktivnost je prikazana u nanomolima fosfata koji je oslobođen po minuti, po miligramu proteina te je iznosila oko 1,25 nmol P_i/min/mg proteina (Pedrazza i sur., 2007). Također, prema istom postupku je određena i brzina hidrolize ATP-a u serumu štakora u studiji koju su proveli Souza i sur. (2010), a enzimska aktivnost je iznosila oko 0,7 nmol P_i/min/mg proteina. (Souza i sur., 2010).

U studiji koju su proveli Medzihradsky i sur. (1980) određena je aktivnost ekto-ATPaze u ljudskim leukocitima. 50 μL suspenzije stanica koje su se nalazile u Tris mediju (pH 7,4) su pomiješane s 50 μL otopine koja je sadržavala 3 mM ATP u epruvetama od 1,5 mL. Inkubacija se odvijala 30 minuta na 37 °C. Nakon 30 minuta reakcija je prekinuta dodatkom 400 μL ledene 0,6 M $HClO_4$. Zatim su uzorci centrifugirani 10 minuta na 1900 *g* u hladnom. 250 μL supernatanta je uzeto u daljnju analizu te je spektrofotometrijski izmjerena količina oslobođenog anorganskog fosfata (Medzihradsky i sur., 1980).

1.6. Fosfati u serumu

Ljudski organizam sadrži fosfate u anorganskom i organskom obliku, ali se samo anorganski fosfat može mjeriti. Referentni interval za koncentraciju fosfata u serumu za odrasle osobe iznosi od 0.81 do 1.45 mmol/L. Anorganski fosfat postoji kao monovalentan ($H_2PO_4^-$) i dvovalentan (HPO_4^{2-}) fosfatni anion. Omjer $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} ovisi o pH i približno iznosi 1:1 u kiselom mediju, 1:4 pri pH 7,4 i 1:9 u alkalnom mediju. Približno 10% fosfata u serumu je vezano za proteine, 35% je vezano u obliku kompleksa s natrijem, kalcijem i magnezijem, a ostatak od 55% je slobodan. Organski fosfatni esteri su primarno lokalizirani intracelularno. Anorganski fosfat je glavna komponenta hidroksiapatita u kostima te stoga ima važnu ulogu u izgradnji kosti. U mekim tkivima, većina fosfata se nalazi intracelularno. Iako je i anorganski fosfat prisutan u stanicama većinu ipak čini organski fosfat koji je inkorporiran u nukleinske kiseline, fosfolipide, fosfoproteine i komponente koje su bogate energijom i uključene u metabolizam. ATP i drugi fosfati, poput kreatinin fosfata su uključeni u brojne energetski intenzivne fiziološke funkcije kao što su transport molekula protiv gradijenta i neurološke funkcije. Fosfat je također esencijalni element cikličkih nukleotida (kao što je ciklički AMP) i sastavni dio brojnih kofaktora kao što su nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP), nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), flavin adenin dinukleotid (FAD), acetil koenzim A. Također je važan za aktivnost nekoliko enzima, uključujući adenilat ciklazu, 25-hidroksivitamin-D-1α-hidroksilazu te enzima koji sudjeluju u produkciji 2,3-difosfoglicerata. Intracelularni fosfat je stoga vrlo bitan u regulaciji metabolizma proteina, masti i ugljikohidrata te u regulaciji transkripcije gena i rasta stanica (Burtis i sur., 2012).

1.7. Metode za mjerenje fosfata

Većina metoda koje se koriste za mjerenje anorganskog fosfata u serumu se temelje na reakciji fosfatnih iona s amonijevim molibdatom pri čemu se formira fosfomolibdenov kompleks, koji se onda može mjeriti spektrofotometrijski.

$$7H_3PO_4 + 12(NH_4)_6Mo_7O_{24} \bullet 4H_2O \rightarrow 7(NH_4)_3[PO_4(MoO_3)_{12}] + 51NH^{4+} + 51OH^- + 33H_2O$$

Apsorbancija bezbojnog fosfomolibdenovog kompleksa se može direktno mjeriti u UV području, na 340 nm ili se kompleks može reducirati u molibden plavo te se onda mjeri apsorbancija na 600 do 700 nm. Da bi došlo do formiranja oba kompleksa potreban je kiseli pH. Također je potrebno kontrolirati pH medija, jer manje kiseli pH može rezultirati u spontanoj redukciji fosfomolibdenovog kompleksa. Na brzinu formiranja kompleksa utječe koncentracija proteina, pa se koriste solubilizirajući agensi, poput Tweena 80, kako bi spriječili precipitaciju proteina. Mjerenje nereduciranog bezbojnog fosfomolibdenovog kompleksa ima nekoliko prednosti poput jednostavnosti, stabilnosti kompleksa i brzine mjerenja te se stoga takvo mjerenje koristi u većini laboratorija. Nedostaci mjerenja nereduciranog fosfomolibdenovog kompleksa uključuju veće interferencije na 340 nm. Mnogi reducirajući agensi se koriste u svrhu nastanka plavog fosfomolibdenovog kompleksa uključujući aminonaftolsulfonsku kiselinu, kositrov klorid, metil-p-aminofenol sulfat, željezov amonijev sulfat, askorbinsku kiselinu i N-fenil-p-fenildiamin HCl. Svaki od ovih agensa ima svoje prednosti poput povećavanja stabilnosti kompleksa, povećavanja stabilnosti boje ili reduciranja hidrolize organskih estera. Askorbinska kiselina se vrlo često koristi u biološkim uzorcima koji sadrže organske estere jer uzrokuje manji raspad labilnih fosfatnih estera. Aminonaftolsulfonska kiselina je široko korištena, no nestabilna je, teži precipitaciji i zahtjeva pažljivo biranje vremena jer intenzitet boje nastavlja rasti nekoliko sati. Također, intenzitet boje s ovim reagensom raste zagrijavanjem. Kositrov klorid daje veći intenzitet boje te mu se dodaje hidrazin kako bi se poboljšala linearnost te zbog stabilizacije (Burtis i sur., 2012).

Koncentracija fosfata se također može odrediti i drugim postupcima, uključujući vanadij-molibdat i enzimskim metodama. Vanadij i molibdat formiraju žuti kompleks s fosfatom pri kiselom pH mediju, no zbog hidrolize organskih estera, metoda može precijeniti anorganski fosfat. Enzimske metode se vrlo rijetko koriste (Burtis i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Svrha ovog diplomskog rada je optimirati metodu za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka, pošto u literaturi nije opisano određivanje katalitičke aktivnosti u serumu čovjeka, već samo u stanicama te kod životinja.

Aktivnost ekto-ATPaze će se određivati mjerenjem koncentracije oslobođenog fosfata nastalog hidrolizom 3 mM ATP-a u puferu, pH 7,4, a koji se sastoji od 50 mM HEPES-Trisa, 5 mM kalcijevog klorida i 100 mM kalijevog klorida, uz dodatak inhibitora alkalne fosfataze, 1 mM levamisola i dodatka inhibitora ekto-5'-nukleotidaze, 56 mM konkavalina A, u reakciji trajanja od 60 minuta na temperaturi od 37 °C.

Koncentracija fosfata određivat će se spektrofotometrijski, mjerenjem koncentracije fosfomolibdenovog kompleksa koji nastaje u reakciji fosfatnih iona s amonijevim heptamolibdatom, uz redukciju s askorbinskom kiselinom na valnim duljinama od 620 i 830 nm (Burtis i sur., 2012).

Potrebno je odrediti:

1. Interval koncentracija u kojem je moguće pouzdano mjeriti koncentraciju fosfata postavljanjem odgovarajućeg baždarnog pravca
2. Odrediti prikladnu valnu duljinu mjerenja na kojoj će se moći izmjeriti pouzdani rezultati
3. Odrediti optimalni volumen uzorka ljudskog seruma koji će katalizirati nastajanje dovoljne količine fosfata, pogodne za mjerenje
4. Ispitati optimalan način pripravljanja slijepe probe
5. Odrediti uspješnost primjene 10 % SDS-a za prekidanje enzimske reakcije
6. Odrediti optimalnu koncentraciju TCA za deproteinizaciju i prekidanje enzimske reakcije
7. Odrediti utjecaj koncentracije trikloroctene kiseline, kao sredstva za deproteinizaciju i prekidanje enzimske reakcije, na rezultat mjerenja fosfata
8. Odrediti reproducibilnost mjerenja na valnim duljinama 620 nm i 830 nm
9. Odrediti aktivnost ekto-ATPaze u serumima zdravih osoba

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

- Adenozin-5'-trifosfat, Sigma
- Amonijev heptamolibdat, Kemika
- Hepes (N-(2-Hydroxyetil)piperazin-N-(2-etan-sulfonska kiselina), Sigma
- Kalcijev klorid, oko 96%, Kemika
- Kalij dihidrogenfosfat, Kemika
- Kalijev klorid, Kemika
- Konkavalin A, Sigma
- L-Askorbinska kiselina, Sigma
- Levamisol hidroklorid, Sigma
- 10 % SDS, Sigma
- Sumporna kiselina 96%, Kemika
- Trikloroctena kiselina, Sigma Aldrich
- Tris-baza, Sigma

3.2. Uzorci

- Krvni serum, uzorci zdravih osoba (n = 41)
- Miješani serum – serum koji je prikupljen od zdravih osoba i pomiješan zajedno te alikvotiran u Eppendorf epruvete od 2 mL

3.3. Aparatura

- Vodena kupelj, 37 °C
- Vodena kupelj, 60 °C
- Vortex miješalica
- Ledomat
- Cecil UV/VIS spektrofotometar

3.4. Priprema reagensa

Pufer bez inhibitora: 50 mmol/L HEPES-Tris, pH 7,4

5 mmol/L kalcijev klorid

100 mmol/L kalijev klorid

s dodatkom inhibitora: 1 mmol/L levamisol

56 mmol/L konkavalin A

1,7 M Tris (Mr = 121,14 g/mol)

$$c = \frac{\gamma}{Mr}$$

γ = 205,93 g/L

Odvaže se 10,29 g Tris baze i otopi u 50 mL vode

50 mmol/L HEPES (Mr = 238,3 g/mol)

γ = 11,91 g/L

5 mmol/L kalcijev klorid (Mr = 110,99 g/L)

γ = 0,55 g/L

100 mmol/L kalijev klorid (Mr = 74,56 g/mol)

γ = 7,45 g/L

1 mmol/L levamisol (Mr = 240,8 g/mol) – inhibitor alkalne fosfataze

γ = 0,24 g/L

56 mmol/L konkavalin A – inhibitor ekto-5'-nukleotidaze

γ = 0,005 g/L

Pufer bez inhibitora se pripremi tako da se odvaže 5,95 g HEPES-a, 0,27 g kalcijevog klorida, 3,72 g kalijevog klorida i otopi se u 400 mL destilirane vode te se pH podesi na 7,4 s 1,7 M Trisom i nadopuni se do 500 mL s destiliranom vodom.

Pufer s inhibitorima se pripremi tako da se na 100 mL pufera bez inhibitora doda 0,0241 g levamisola i 0,0005 g konkavalina A.

Supstrat ATP - konačna koncentracija u smjesi 3 mmol/L (Mr = 551,1 g/mol)

Razrjeđenje supstrata u reakcijskoj smjesi priređuje se prema sljedećem postupku:

V_2 = 1050 μL pufera + 50 μL ATP-a + 50 μL uzorka = 1150 μL

c_2= 3 mmol/L

V_1=50 μL

$c_1V_1 = c_2V_2$

c_1 = 69 mmol/L

γ = 38,02 g/L

0,0380 g ATP-a se otopi u 1 mL destilirane vode

ATP se pripravlja svježi te ga je potrebno držati na ledu i zaštiti od svjetlosti, uz provjeru pH vrijednosti indikatorskim papirom.

1,1 M trikloroctena kiselina (Mr = 163,39 g/mol)

γ = 183,38 g/L

18,34 g trikloroctene kiseline se otopi u 100 mL destilirane vode

Za pripremu 3,0 mol/L trikloroctene kiseline potrebno je otopiti 49,02 g u 100 mL destilirane vode, a za pripremu 5,0 mol/L trikloroctene kiseline potrebno je otopiti 81,70 g u 100 mL destilirane vode

1,14 mol/L askorbinska kiselina (Mr = 176,1 g/mol)

γ = 200,75 g/L

0,2 g askorbinske kiseline se otopi u 1 mL destilirane vode te se otopina pripravlja svježa, neposredno prije primjene.

6,8 mmol/L amonijev heptamolibdat (Mr = 1235,86 g/mol)

γ = 8,40 g/L

0,84 g amonijevog heptamolibdata se otopi u malom volumenu 1M sumporne kiseline, pošto je teško topljiv te se nadopuni do 100 mL s 1M H_2SO_4.

Otopinu amonijevog heptamolibdata treba zaštiti od svjetla i držati je u tamnom, hladnom prostoru.

Radni reagens

Priređuje se neposredno prije upotrebe miješanjem 6 dijelova otopine amonijeva heptamolibdata i 1 dijela otopine askorbinske kiseline.

1 mol/L sumporna kiselina

1M H_2SO_4 se priprema razrjeđivanjem koncentrirane, 96 % H_2SO_4.

$$V(96\ \%\ H_2SO_4) = \frac{m(H_2SO_4)}{w(H_2SO_4) \times\ \rho(\text{konc.}\ H_2SO_4)} = \frac{n(H_2SO_4) \times M(H_2SO_4)}{w(H_2SO_4) \times\ \rho(\text{konc.}\ H_2SO_4)} =$$

$$= \frac{c(H_2SO_4) \times\ V(\text{otop.}\ H_2SO_4) \times M(H_2SO_4)}{w(H_2SO_4) \times\ \rho(\text{konc.}\ H_2SO_4)} = \frac{1\frac{\text{mol}}{\text{L}} \times\ 1\ \text{L} \times 98{,}08\frac{\text{g}}{\text{mol}}}{0{,}96 \times\ 1{,}84\frac{\text{g}}{\text{mL}}}$$

$$= 55{,}5\ \text{mL}$$

55,5 mL koncentrirane, 96 % H_2SO_4 se dodaje u 1 L vode, u digestoru.

3 mmol/L standardna otopina fosfata [Mr(KH_2PO_4)] = 136,0 g/L

γ = 0,408 g/L

0,0408 g kalijevog dihidrogenfosfata, KH_2PO_4 se otopi u 100 mL 0,5M sulfatne kiseline u odmjernoj tikvici.

3.5. Priprema razrijeđenih standarda

Nakon pripreme 3 mmol/L standardne otopine fosfata, pripreme se razrijeđeni standardi (0 µmol/L, 100 µmol/L, 300 µmol/L, 600 µmol/L, 1 mmol/L, 1,5 mmol/L), prema sljedećem postupku, razrjeđivanjem s vodom, kao što je prikazano u Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Postupak pripreme razrijeđenih standarda

	3 mmol/L standard µL	1 mmol/L standard µL	H_20 µL
0 µmol/L	-	-	2000
100 µmol/L	-	200	1800
300 µmol/L	200	-	1800
600 µmol/L	400	-	1600
1 mmol/L	1000	-	2000
1,5 mmol/L	1000	-	1000

Zatim se otpipetira 1150 µL priređenih razrijeđenih standarda u Eppendorf epruvete od 2 mL i doda 100 µL TCA te se promiješa na Vortex mješalici. Potom se, u duplikatu, otpipetira 50 µL smjese razrijeđenog standarda i TCA te doda 450 µL vode i 500 µL radnog reagensa. Sve se promiješa na Vortex mješalici te inkubira u vodenoj kupelji na 60 °C tijekom 7 minuta. Zatim se uzorci stave na led i mjeri se apsorbancija prema slijepoj probi na 620 nm, kao što je prikazano u Tablici 3.2.

Tablica 3.2. Postupak pripreme uzorka razrijeđenih standarda za mjerenje apsorbancije

Standard (A) / µL	1150 H_2O	1150	1150	1150	1150
TCA (B) / µL	100	100	100	100	100
Od A + B / µL	50	50	50	50	50
H_2O / µL	450	450	450	450	450
Radni reagens / µL	500	500	500	500	500
Promiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 minuta, stavi na led te se mjeri apsorbancija prema slijepoj probi na 620 nm.					

3.6. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti

Ektonukleotidazna aktivnost određuje se tako da se pripreme probe uzorka, slijepe probe uzorka, slijepa proba reagensa i slijepa proba mjerenja, prema sljedećem postupku koji je opisan u Tablici 3.3.

Tablica 3.3. Postupak pripreme probe uzorka, slijepe probe uzorka, slijepe probe reagensa i slijepe probe mjerenja

	2x	2x	1x	1x
	Proba uzorka /µL	Slijepa proba uzorka/ µL	Slijepa proba reagensa	Slijepa proba mjerenja/µL
Pufer	1050	1050	1050	1050
Uzorak	**50**	-	-	-
H_2O	-	-	**50**	**100**
	Predinkubacija 5 min na 37°C			
ATP	50	50	50	-
	Inkubacija točno 60 min na 37°C, reakcija se prekida dodatkom,			
TCA	100	150 (100 TCA + 50 uzorka)	100	100
Uzorak	-		-	-
	Centrifuga 5 min na 10000 g			
Supernatant	50	50	50	50
H_2O	450	450	450	450
Radni reagens	500	500	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60°C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri prema slijepoj probi mjerenja na 620 i 830 nm.				

Probe uzorka se pripreme tako da se otpipetira 1050 µL pufera s inhibitorima u Eppendorf epruvetu od 2 mL, zatim se otpipetira 50 µL uzorka krvnog seruma zdravih osoba. Uzorci su prethodno odmrznuti i promiješani na Vortex mješalici te se svaka proba uzorka izrađuje u duplikatu. Za slijepu probu uzorka je potrebno otpipetirati 1050 µL pufera s inhibitorima te se također slijepa proba uzorka izrađuje u duplikatu. Za slijepu probu regensa se otpipetira 1050 µL pufera s inhibitorima i 50 µL vode, a za slijepu probu mjerenja se otpipetira 1050 µL pufera s inhibitorima i 100 µL vode.

Sve probe uzorka, slijepe probe uzorka, slijepa proba reagensa i slijepa proba mjerenja se promiješaju na Vortex mješalici te se predinkubiraju 5 minuta u vodenoj kupelji na 37 °C kako bi se sve komponente zagrijale na istu temperaturu prije dodatka supstrata. Nakon predinkubacije otpipetira se 50 μL supstrata, ATP-a, koji je svježe pripremljen i držan na ledu, u probu uzorka, slijepu probu uzorka i slijepu probu reagensa. Nakon dodatka ATP-a, sve Eppendorf epruvete se promiješaju na Vortex mješalici te se sve inkubira u vodenoj kupelji na 37 °C točno 60 minuta. Nakon inkubacije od 60 minuta potrebno je zaustaviti reakciju dodatkom trikloroctene kiseline koja će istaložiti proteine, a time i ispitivani enzim, ekto-ATPazu. 100 μL 3,0 M TCA se otpipetira u probe uzorka, slijepu probu reagensa i slijepu probu mjerenja te je potrebno odmah nakon dodatka 3,0 M TCA Eppendorf epruvete promiješati na Vortex mješalici. U slijepu probu uzorka se otpipetira 150 μL smjese koja se sastoji od 100 μL 1,1 M TCA i 50 μL uzorka te se također Eppendorf epruvete promiješaju na Vortex mješalici. Nakon toga probe uzorka i slijepe probe uzorka se centrifugiraju 5 minuta na 10 000 g. Zatim se otpipetira 50 μL supernatanta u nove Eppendorf epruvete od 2 mL i u svaku epruvetu se još doda 450 μL vode i 500 μL radnog reagensa. Nakon toga sve epruvete se promiješaju na Vortex miješalici te se inkubiraju u vodenoj kupelji od 60 °C tijekom 7 minuta. Zatim se sve Eppendorf epruvete stave na led i mjeri se apsorbancija na 620 nm i 830 nm prema slijepoj probi mjerenja.

3.7. Određivanje ektonukletidazne aktivnosti uz korištenje 10 % SDS-a

Reagensi:

1) pufer s inhibitorima: 50 mmol/L HEPES-Tris, pH 7,4
5 mmol/L kalcijev klorid
100 mmol/L kalijev klorid
1 mmol/L levamisol
56 mmol/L konkavalin A

2) supstrat 75 mmol/L ATP – konačna koncentracija u smjesi je 3 mmol/L (0,0413 g ATP-a se otapa u 1 mL destilirane vode; potrebno je svježe pripremiti i držati na ledu)

3) 10 % SDS

4) 10 % askorbinska kiselina (0,2 g askorbinske kiseline se otapa u 2 mL destilirane vode; potrebno je svježe pripremiti)

5) 3,4 mmol/L amonijev heptamolibdat (pripremi se otapanjem 0,4202 g amonijevog heptamolibdata u 100 mL 0,5 M sumporne kiseline)

6) radni reagens – priređuje se neposredno pred upotrebu miješanjem 6 dijelova otopine amonijevog heptamolibdata i 1 dijela otopine askorbinske kiseline; potrebno je svježe pripremiti i držati zaštićeno od svjetla

7) uzorak – miješani serum (Tablica 3.4.)

Tablica 3.4. Postupak pripreme probe uzorka, slijepe probe, slijepe probe reagensa i slijepe probe mjerenja

	6x	6x	1x	1x
	Proba uzorka /µL	Slijepa proba uzorka/ µL	Slijepa proba reagensa	Slijepa proba mjerenja /µL
Pufer	450	450	450	450
Uzorak	**50**	-	-	-
H_2O	-	-	50	75
	Predinkubacija 5 min na 37°C			
ATP	25	25	25	-
	Inkubacija točno 60 min na 37°C, reakcija se prekida dodatkom,			
SDS	50	50	50	50
Uzorak	-	50	-	-
H_2O	175	175	175	175
Radni reagens	500	500	500	500
Promiješa se, inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi te mjeri prema slijepoj probi mjerenja na 620 nm				
Zamućenje koje nastaje dodatkom SDS-a se zanemaruje, jer nestane dodatkom radnog reagensa				

Nakon pripreme 3 mmol/L standardne otopine fosfata, pripreme se razrijeđeni standardi (0 µmol/L, 100 µmol/L, 300 µmol/L, 600 µmol/L, 1 mmol/L, 1,5 mmol/L) u Eppendorf epruvetama od 2 mL razrjeđivanjem s vodom, prema već opisanom postupku. Potom se za mjerenje apsorbancije na 620 nm pripreme uzorci standarda prema sljedećem postupku koji je opisan u Tablici 3.5.

Tablica 3.5. Postupak pripreme uzorka standarda (0 µmol/L, 100 µmol/L, 300 µmol/L, 600 µmol/L, 1 mmol/L, 1,5 mmol/L) za mjerenje apsorbancije

Standard (A) / µL	525	525	525	525	525	525
SDS (B) / µL	50	50	50	50	50	50
H_2O / µL	175	175	175	175	175	175
Radni reagens / µL	500	500	500	500	500	500
Promiješa se, inkubira 60 minuta na sobnoj temperaturi te mjeri na 620 nm prema slijepoj probi						

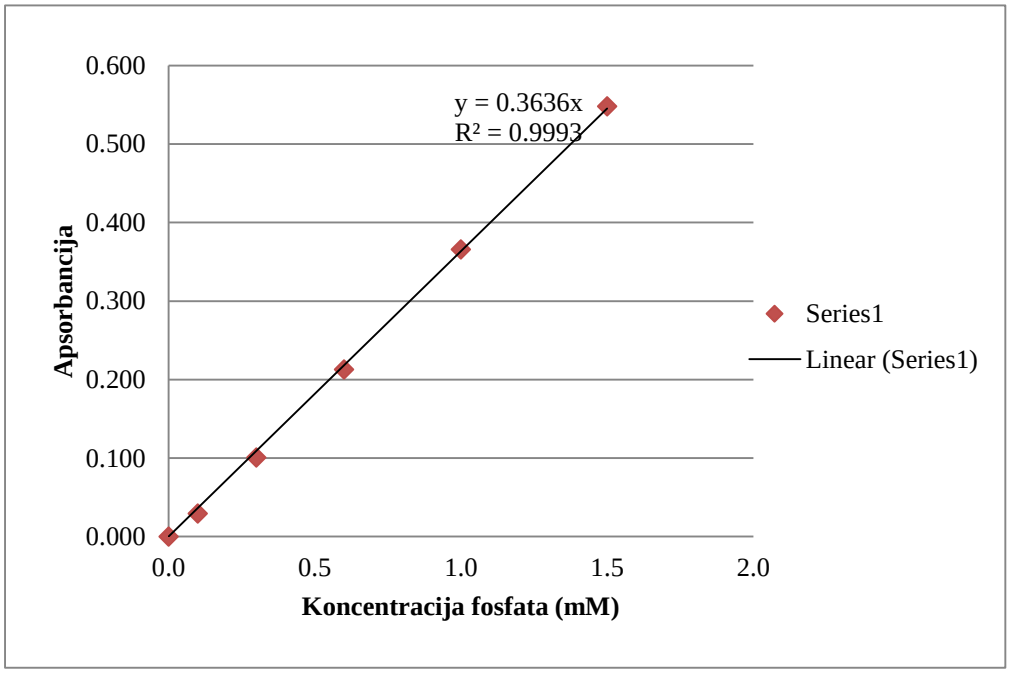
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Izrada baždarnog pravca za mjerenje koncentracije fosfata

Potrebno je odrediti interval koncentracija u kojem je moguće pouzdano mjeriti koncentraciju fosfata postavljanjem odgovarajućeg baždarnog pravca. Nakon pripreme razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata, prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode, izmjerena je apsorbancija razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm kako bismo dobili baždarni pravac (Slika 4.1.). U Tablici 4.1. prikazani su rezultati apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata.

Tablica 4.1. Apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm koristeći 1,1 M TCA

C/mM	A1	A2	Ā
0,0	0	0	0,000
0,1	0,026	0,033	0,0295
0,3	0,098	0,104	0,101
0,6	0,210	0,216	0,2130
1,0	0,360	0,372	0,3660
1,5	0,533	0,563	0,5480



Slika 4.1. Određivanje baždarnog pravca koristeći 1,1 M TCA

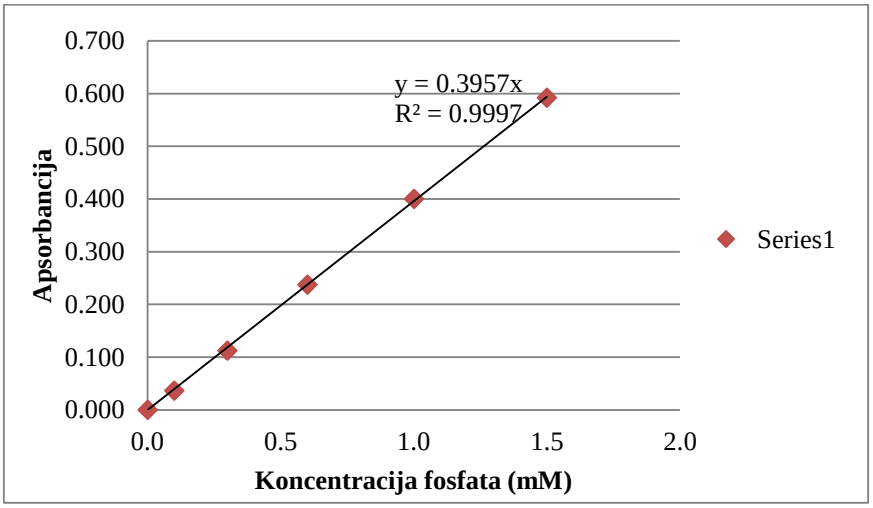
Iz baždarnog pravca se može utvrditi da je koncentracija fosfata linearno proporcionalna apsorbanciji dakle, vrijedi Beer-Lambertov zakon i zato je moguće spektrofotometrijski odrediti koncentraciju fosfata.

4.2. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija TCA na apsorbanciju razrijeđenih standarda na 620 nm i 830 nm

Određena je apsorbancija razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm i 830 nm, koristeći 3,0 M TCA te je izrađen baždarni pravac za apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm (Slika 4.2.) i 830 nm (Slika 4.3.). U Tablici 4.2. prikazani su rezultati apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm, koristeći 3,0 M TCA, a Tablica 4.3. prikazuje rezultate apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 830 nm, koristeći 3,0 M TCA.

Tablica 4.2. Apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata koristeći 3,0 M TCA na 620 nm

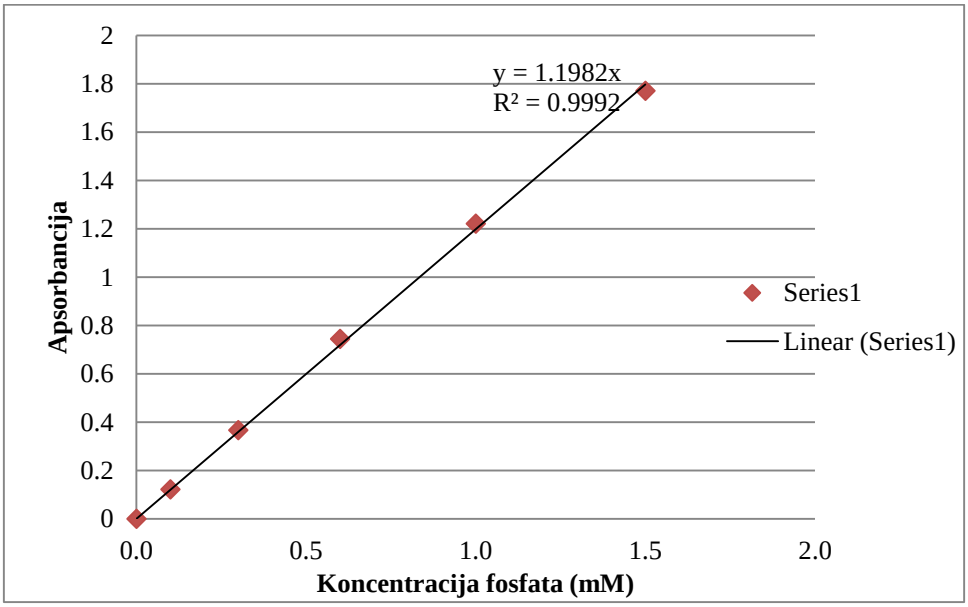
C/mM	A_1	A_2	$\bar{A}$
0,0	0	0	0,000
0,1	0,034	0,039	0,0365
0,3	0,111	0,114	0,1125
0,6	0,239	0,236	0,2375
1,0	0,402	0,398	0,4000
1,5	0,587	0,597	0,5920



Slika 4.2. Određivanje baždarnog pravca koristeći 3,0 M TCA na 620 nm

Tablica 4.3. Apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata koristeći 3,0 M na 830 nm

C/mM	A_1	A_2	$\bar{A}$
0,0	0	0	0
0,1	0,12	0,125	0,1225
0,3	0,366	0,368	0,367
0,6	0,747	0,741	0,744
1,0	1,234	1,208	1,221
1,5	1,758	1,783	1,7705



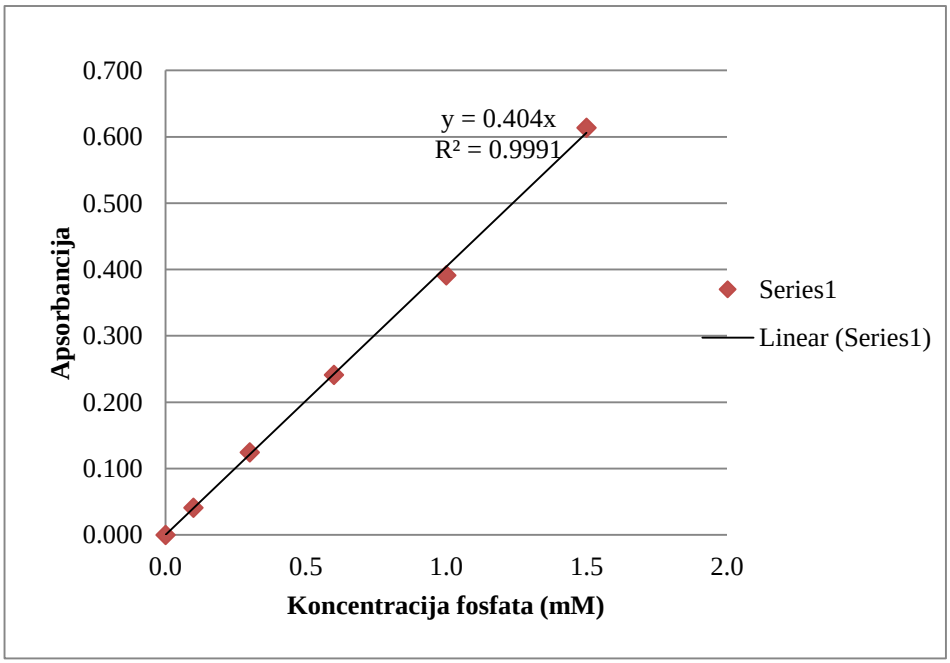
Slika 4.3. Određivanje baždarnog pravca koristeći 3,0 M TCA na 830 nm

Mjerenje apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm se pokazalo prikladnijim nego na 830 nm, pošto su apsorbancije na 830 nm visoke i prelaze 1,5, što nije optimalno za mjerenje.

Također je ispitan utjecaj različitih koncentracija TCA na apsorbanciju razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata. Zbog promjene molariteta TCA s 1,1 M na 3,0 i 5,0 M, izmjerena je apsorbancija razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm i napravljen je baždarni pravac (Slika 4.4.). U Tablici 4.4. prikazani su rezultati apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata, koristeći 5,0 M TCA.

Tablica 4.4. Apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm, koristeći 5,0 M TCA

C/mM	A_1	A_2	$\bar{A}$
0,0	0	0	0,000
0,1	0,041	0,041	0,041
0,3	0,122	0,127	0,1245
0,6	0,246	0,237	0,2415
1,0	0,388	0,395	0,3915



Slika 4.4. Određivanje baždarnog pravca koristeći 5,0 M TCA

Pokazalo se da promjena molariteta TCA s 1,1 M na 3,0 M i 5,0 M nije značajno utjecala na apsorbanciju standarda.

4.3. Ispitivanje volumena uzorka krvnog seruma pogodnog za mjerenje enzimske aktivnosti

Ispitivan je volumen uzorka krvnog seruma od 50 µL i 100 µL te su pripremljene probe uzorka i slijepe probe uzorka na 2 načina:

P_1 – otpipetira se 100 µL 3,0 M TCA u rekcijsku smjesu s 50 µL uzorka krvnog seruma te se promiješa na Vortex mješalici i centrifugira 5 minuta na 10 000 g

S_1 – izvan reakcijske smjese se pomiješa 150 µL uzorka krvnog seruma i 300 µL 1,1 M TCA, pa se 150 µL te smjese doda u rekcijsku smjesu

P_2 – otpipetira se 100 µL 3,0 M TCA u reakcijsku smjesu s 100 µL uzorka krvnog seruma te se promiješa na Vortex mješalici i centrifugira 5 minuta na 10 000 g

S_2 – izvan reakcijske smjese se pomiješa 300 µL uzorka krvnog seruma i 300 µL 1,1 M TCA, pa se 200 µL te smjese doda u rekcijsku smjesu

U Tablici 4.5. prikazani su rezultati apsorbancija probe uzorka i slijepe probe uzorka krvnog seruma kada se koristi 50 µL uzorka krvnog seruma, a Tablica 4.6. prikazuje rezultate apsorbancija probe uzorka i slijepe probe uzorka krvnog seruma kada se koristi 100 µL uzorka krvnog seruma.

Tablica 4.5. Apsorbancije probe uzorka i slijepe probe uzorka krvnog seruma, koristeći 50 µL uzorka krvnog seruma

	A	**$\bar{A}$**	**$A_P - A_{Sp}$**
P_1	0,237	0,239	0,007
	0,238		
	0,244		
S_1	0,229	0,232	
	0,231		
	0,237		

Tablica 4.6. Apsorbancije probe uzorka i slijepe probe uzorka krvnog seruma, koristeći 100 µL uzorka krvnog seruma

	A	**Ā**	**A_P - A_{Sp}**
P_2	0,262	0,263	0,009
	0,263		
	0,265		
S_2	0,250	0,254	
	0,252		
	0,260		

Apsorbancije probe uzorka su veće kada je dodano 100 µL uzorka krvnog seruma, no veće su i apsorbancije slijepih proba uzorka, a razlika između apsorbancije probe uzorka i slijepe probe uzorka kada je korišteno 100 µL uzorka krvnog seruma, u odnosu na razliku apsorbancija probe uzorka i slijepe probe uzorka kada je korišteno 50 µL uzorka krvnog seruma nije značajno veća.

4.4. Ispitivanje različitih načina pripreme slijepe probe uzorka

Ispitana su dva načina pripreme slijepe probe uzorka:

1) Proba uzorka: otpipetira se 100 µL 5,0 M TCA u probu uzorka te se promiješa na Vortex mješalici i centrifugira 5 minuta na 10 000 g

Slijepa proba uzorka: otpipetira se 100 µL 5,0 M TCA u slijepu probu uzorka, pa se nakon toga dodaje 50 µL uzorka te se promiješa na Vortex mješalici i centrifugira 5 minuta na 10 000 g

2) Proba uzorka: otpipetira se 100 µL 5,0 M TCA u probu uzorka te se promiješa na Vortex mješalici i centrifugira 5 minuta na 10 000 g

Slijepa proba uzorka: otpipetira se 300 µL 5,0 M TCA i 150 µL uzorka te se promiješa na Vortex mješalici i centrifugira 5 minuta na 10 000 g. Zatim se u slijepu probu uzorka otpipetira 150 µL supernatanta. U Tablici 4.7. prikazani su rezultati apsorbancija probe uzorka i slijepe probe uzorka mješanog seruma koristeći 5,0 M TCA

Tablica 4.7. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u miješanom serumu korištenjem 5,0 M TCA

	A	**$\bar{A}_P$**	**$A_P - A_{Sp}$**	**ekto-ATPaza (µmol/L/min)**
P	0,268	0,26125		
P	0,259			
P	0,266			
P	0,252			
	A	**$\bar{A}_{Sp1}$**	**$A_P - A_{Sp1}$**	
S_1	0,272	0,2795	-0,018	**0,0**
S_1	0,304			
S_1	0,276			
S_1	0,266			
	A	**$\bar{A}_{Sp2}$**	**$A_P - A_{Sp2}$**	
S_2	0,212	0,25	0,011	**1,74**
S_2	0,264			
S_2	0,270			
S_2	0,254			

Oba načina pripreme slijepe probe uzorka s 5,0 M TCA su se pokazali neuspješnima. Kod prvog načina pripreme slijepe probe uzorka, pokazalo se da su apsorbancije slijepe probe uzorka veće od apsorbancija probe uzorka, a kod drugog načina pripreme nakon centrifugiranja i dodatka supernatanta u probu uzorka ponovno je došlo do nastanka taloga koji se morao centrifugirati.

Najveći problem kod određivanja ekto-ATPazne aktivnosti u serumu čovjeka, predstavlja priprema slijepe probe. Rezultati pokazuju da kada se slijepa proba pripremi na klasični način, odnosno kada se u reakcijsku smjesu doda sredstvo za deproteinizaciju, pa zatim serum apsorbancije slijepe probe ispadnu veće od apsorbancija probe. Dakle, u serumu čovjeka postoje interferencije koje ometaju mjerenje te je ovaj problem riješen na način da se izvan reakcijske smjese pomiješaju serum i sredstvo za deproteinizaciju te se zatim ta smjesa doda u slijepu probu.

4.5. Ispitivanje reproducibilnosti pripreme radnog reagensa

Pošto se radni reagens priprema svježe, neposredno prije uporabe, izmjerena je apsorbancija standarda kako bi se eliminirali eventualni utjecaji svakodnevne pripreme radnog reagensa na apsorbanciju. U Tablici 4.8. prikazani su rezultati apsorbancija razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata, koristeći 5,0 M TCA

Tablica 4.8. Apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata, koristeći 5,0 M TCA

C/mM	**A_1**	**A_2**	**$\bar{A}$**
0	0	0	0
0,1	0,032	0,032	0,032
1	0,381	0,388	0,3845

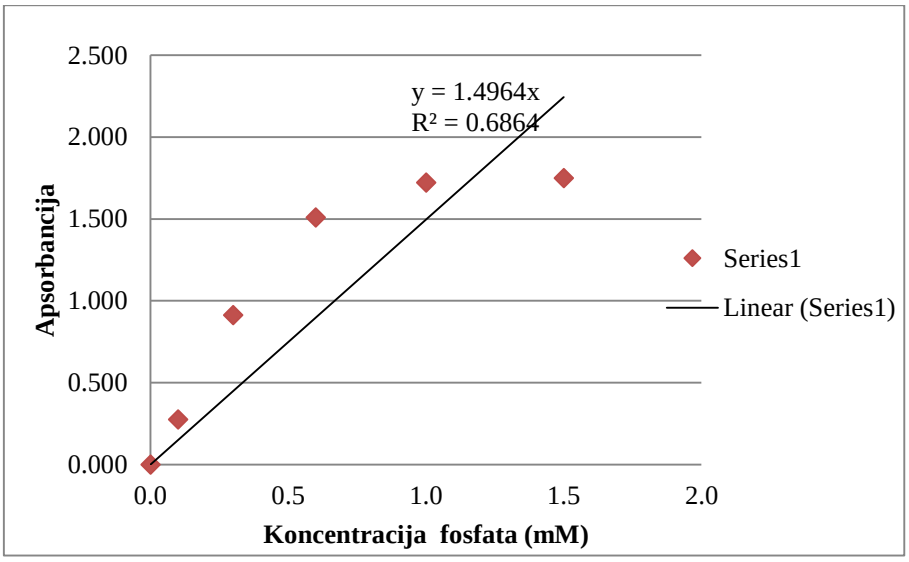
Rezultati prikazuju da svakodnevna priprema radnog reagensa ne utječe značajno na apsorbanciju razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata.

4.6. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti u serumu uz korištenje 10 % SDS-a za prekidanje enzimske reakcije

Osim promjene molariteta TCA pokušano je taloženje proteina s drugim sredstvom, 10 % SDS-om, no metoda određivanja ektonukletidazne aktivnosti u serumu uz korištenje 10 % SDS-a za taloženje proteina se nije pokazala uspješnom, jer talog koji je nastao dodatkom SDS-a nije nestao nakon dodatka radnog reagensa. Probe uzorka i slijepe probe uzorka je bilo potrebno centrifugirati, no nakon centrifugiranja proba nije bilo moguće očitati apsorbanciju jer probe uzorka i slijepe probe uzorka nisu bile transparentne. Također je izmjerena apsorbancija razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata, a rezultati su prikazani u Tablici 4.9. te je napravljen baždarni pravac prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode (Slika 4.5.).

Tablica 4.9. Apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata, koristeći 10 % SDS

C/mM	A_1	A_2	$\bar{A}$
0,0	0	0	0
0,1	0,250	0,302	0,276
0,3	0,896	0,928	0,912
0,6	1,490	1,526	1,5080
1,0	1,728	1,716	1,7220
1,5	1,748	1,750	1,7490



Slika 4.5. Određivanje baždarnog pravca koristeći 10 % SDS

4.7. Ispitivanje utjecaja različitih koncentracija TCA korištene za prekidanje reakcije na izmjerenu aktivnost ekto-ATPaze

Katalitička aktivnost enzima ekto-ATPaze se određuje prema sljedećoj formuli:

$$\mathrm{AE}\left(\frac{\frac{\mathrm{mmol}}{\mathrm{L}}}{\mathrm{min}}\right) = \frac{(\mathrm{Ap} - \mathrm{Asp}) * \mathrm{V} * \mathrm{a}}{\mathrm{t} * \mathrm{Vu}}$$

pri čemu je,

Ap = apsorbancija probe uzorka

Asp = apsorbancija slijepe probe uzorka

V = ukupni volumen reakcijske smjese pufera, ATP-a i uzorka te iznosi 1150 µL

a = nagib pravca, očita se iz baždarnog pravca

t = vrijeme inkubacije u vodenoj kupelji na 37 °C te iznosi 60 minuta

Vu = volumen uzorka te iznosi 50 µL

U mješanom serumu je određivana katalitička aktivnost ekto-ATPaze, prema postupku opisanom u poglavlju Materijali i metode, pri čemu je korištena 1,1 M TCA u probi uzorka i slijepoj probi uzorka, a rezultati apsorbancija su prikazani u Tablici 4.10.

Tablica 4.10. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u miješanom serumu korištenjem 1,1 M TCA

Mješani serum	**A proba**	**Ā proba**	**A slijepa proba**	**Ā slijepa proba**	**$\bar{A}_P - \bar{A}_{Sp}$**	**ekto-ATPaza (µmol/L/min)**
	0,257	0,258	0,218	0,223	0,035	**4,57**
	0,261		0,222			
	0,255		0,221			
	0,254		0,225			
	0,263		0,221			
	-		0,228			

Katalitička aktivnost ekto-ATPaze je određivana u uzorcima zdravih osoba, pri čemu je korištena 1,1 M TCA u probi uzorka i slijepoj probi uzorka, a rezultati apsorbancija su prikazani u Tablici 4.11.

Tablica 4.11. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u pojedinačnim serumima korištenjem 1,1 M TCA

	A_1 proba	A_2 proba	$\bar{A}$ proba	A_1 slijepa proba	A_2 slijepa proba	$\bar{A}$ slijepa proba	$\bar{A}_P - \bar{A}_{sp}$	ekto-ATPaza (μmol/L/min)
1.	0,390	0,372	**0,381**	0,237	0,233	**0,235**	**0,146**	**20,35**
2.	0,342	0,407	**0,375**	0,263	0,262	**0,263**	**0,112**	**15,61**
3.	0,330	0,355	**0,343**	0,258	0,252	**0,255**	**0,088**	**12,20**
4.	0,353	0,333	**0,343**	0,258	0,253	**0,256**	**0,088**	**12,20**
5.	0,341	0,326	**0,334**	0,262	0,250	**0,256**	**0,078**	**10,80**
6.	0,312	0,356	**0,334**	0,247	0,244	**0,246**	**0,089**	**12,34**
7.	0,302	0,326	**0,314**	0,250	0,242	**0,246**	**0,068**	**9,48**
8.	0,326	0,334	**0,330**	0,230	0,228	**0,229**	**0,101**	**14,08**
9.	0,383	0,340	**0,362**	0,234	0,238	**0,236**	**0,126**	**17,49**
10.	0,362	0,365	**0,364**	0,260	0,253	**0,257**	**0,107**	**14,91**
11.	0,320	0,329	**0,325**	0,243	0,252	**0,248**	**0,077**	**10,66**
12.	0,311	0,295	**0,303**	0,259	0,245	**0,252**	**0,051**	**7,06**
13.	0,327	0,336	**0,332**	0,263	0,267	**0,265**	**0,067**	**9,21**

Određivanje ektonukletidazne aktivnosti u uzorcima zdravih osoba, koristeći 1,1 M TCA za taloženje proteina u probi uzorka i slijepoj probi uzorka, se nije pokazalo učinkovitim zbog nedovoljnog taloženja proteina u probi uzorka koji povećavaju apsorbanciju probe uzorka. Nakon završetka centrifugiranja probe uzorka i slijepe probe uzorka, prisutno je zamućenje probe uzorka u odnosu na slijepu probu uzorka te je u sljedećim mjerenjima povećan molaritet TCA, kako bi se bolje istaložili proteini te kako bi proba uzorka nakon centrifugiranja bila bistra, pa je tako povećan molaritet TCA s 1,1 M na 5,0 M i određivana je ektonukletidazna aktivnost u uzorcima zdravih osoba, a rezultati apsorbancija su prikazani u Tablici 4.12.

Tablica 4.12. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u pojedinačnim serumima korištenjem 5,0 M TCA

	A_1 proba	A_2 proba	$\bar{A}$ proba	A_1 slijepa proba	A_2 slijepa proba	$\bar{A}$ slijepa proba	$\bar{A}_P - \bar{A}_{sp}$	ekto-ATPaza (μmol/L/min)
1.	0,341	0,284	**0,313**	0,291	0,270	**0,281**	**0,032**	**4,96**
2.	0,283	0,281	**0,282**	0,271	0,290	**0,281**	**0,002**	**0,23**
3.	0,301	0,298	**0,300**	0,167	0,289	**0,228**	**0,072**	**11,07**
4.	0,325	0,318	**0,322**	0,310	0,294	**0,302**	**0,020**	**3,02**

Određivanje ektonukletidazne aktivnosti u uzorcima zdravih osoba, koristeći 5,0 M TCA za taloženje proteina u probi uzorka i slijepoj probi uzorka, se također nije pokazalo učinkovitim zbog toga što dodatkom 5,0 M TCA u slijepu probu uzorka dolazi do nastanka teškog, grumenastog taloga koji se ne može pipetirati.

Ektonukleotidazna aktivnost je određena u krvnim serumima na dva načina:

1) za taloženje proteina u probi uzorka korištena je 3,0 M TCA, a u slijepoj probi uzorka 1,1 M TCA te su rezultati apsorbancija prikazani u Tablici 4.13.

2) za taloženje proteina u probi uzorka korištena je 1,1 M TCA, a u slijepoj probi uzorka 1,1 M TCA te su rezultati apsorbancija prikazani u Tablici 4.14.

Tablica 4.13. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u pojedinačnim serumima korištenjem 3,0 M TCA u probi uzorka i 1,1 M TCA u slijepoj probi uzorka

3,0 M TCA	**A_1 proba**	**A_2 proba**	**$\bar{A}$ proba**	**A_1 slijepa proba**	**A_2 slijepa proba**	**$\bar{A}$ slijepa proba**	**$\bar{A}_P - \bar{A}_{sp}$**	**ekto-ATPaza (µmol/L/min)**
1.	0,243	0,241	**0,242**	0,236	0,236	**0,236**	**0,006**	**0,83**

Tablica 4.14. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u pojedinačnim serumima korištenjem 1,1 M TCA

1,1 M TCA		**A_2 proba**	**$\bar{A}$ proba**	**A_1 slijepa proba**	**A_2 slijepa proba**	**$\bar{A}$ slijepa proba**	**$\bar{A}_P - \bar{A}_{sp}$**	**ekto-ATPaza (µmol/L/min)**
1.	0,315	0,338	**0,327**	0,247	0,250	**0,249**	**0,078**	**10,80**
2.	0,320	0,321	**0,321**	0,236	0,236	**0,236**	**0,085**	**11,70**
3.	0,362	0,380	**0,371**	0,249	0,262	**0,256**	**0,116**	**16,00**

Apsorbancije probe uzorka su veće kada se koristi 1,1 M TCA za taloženje proteina zbog toga što je prisutno zamućenje u probama uzorka nakon centrifugiranja te one nisu bistre kao slijepe probe uzorka. 1,1 M TCA nije dovoljna za taloženje proteina u probama uzorka te prisutno zamućenje uzrokuje povećanu apsorbanciju. 3,0 M TCA se pokazala boljom za taloženje proteina u probama uzorka, no korištenje 3,0 M TCA u slijepim probama uzorka nije prikladno jer nastaje talog s prevelikim česticama koje se ne mogu pipetirati. Povećavanjem molariteta TCA dobiveno je bolje taloženje proteina u probama uzorka. Probe uzorka su bistrije nakon centrifugiranja, no za pripremu slijepe probe uzorka molaritet ne odgovara jer nastaje talog kojeg je teško pipetirati zbog veličine čestica koje zaostaju na stijenci nastavka za pipete. Pokazalo se optimalnim da se za taloženje proteina u probi uzorka koristi 3,0 M TCA, a u slijepoj probi uzorka 1,1 M TCA.

4.8. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti u uzorcima krvnih seruma na 620 nm

Određivana je ektonukletidazna aktivnost u uzorcima krvnih seruma zdravih osoba, pri čemu je korištena 3,0 M TCA za taloženje proteina u probi uzorka te 1,1 M TCA za taloženje proteina u slijepoj probi uzorka i mjerena je apsorbancija na 620 nm, a rezultati apsorbancija su prikazani u Tablici 4.15.

Tablica 4.15. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u pojedinačnim serumima korištenjem 3,0 M TCA na 620 nm

	A_1 proba	**A_2 proba**	**$\bar{A}$ proba**	**A_1 slijepa proba**	**A_2 slijepa proba**	**$\bar{A}$ slijepa proba**	**$\bar{A}_P - \bar{A}_{sp}$**	**ekto-ATPaza (µmol/L/min)**
1.	0,205	0,209	**0,207**	0,202	0,204	**0,203**	**0,004**	**0,61**
2.	0,219	0,221	**0,220**	0,208	0,209	**0,209**	**0,012**	**1,74**
3.	0,212	0,218	**0,215**	0,204	0,208	**0,206**	**0,009**	**1,37**
4.	0,208	0,219	**0,214**	0,207	0,210	**0,209**	**0,005**	**0,76**
5.	0,226	0,223	**0,225**	0,218	0,216	**0,217**	**0,008**	**1,14**
6.	0,216	0,210	**0,213**	0,190	0,201	**0,196**	**0,018**	**2,65**
7.	0,212	0,222	**0,217**	0,208	0,211	**0,210**	**0,008**	**1,14**
8.	0,233	0,252	**0,243**	0,241	0,239	**0,240**	**0,003**	**0,38**
9.	0,255	0,251	**0,253**	0,245	0,240	**0,243**	**0,011**	**1,59**
10.	0,253	0,257	**0,255**	0,248	0,246	**0,247**	**0,008**	**1,21**
11.	0,258	0,260	**0,259**	0,247	0,245	**0,246**	**0,013**	**1,97**
12.	0,263	0,259	**0,261**	0,247	0,243	**0,245**	**0,016**	**2,43**
13.	0,225	0,223	**0,224**	0,219	0,218	**0,219**	**0,006**	**0,83**
14.	0,222	0,220	**0,221**	0,222	0,219	**0,221**	**0,001**	**0,08**
15.	0,222	0,218	**0,220**	0,211	0,216	**0,214**	**0,007**	**0,99**
16.	0,221	0,223	**0,222**	0,215	0,219	**0,217**	**0,005**	**0,76**

4.9. Određivanje ektonukleotidazne aktivnosti u uzorcima krvnih seruma na 830 nm

Određivana je ektonukletidazna aktivnost u uzorcima krvnih seruma zdravih osoba, pri čemu je korištena 3,0 M TCA za taloženje proteina u probi uzorka te 1,1 M TCA za taloženje proteina u slijepoj probi uzorka i mjerena je apsorbancija na 830 nm, a rezultati apsorbancije su prikazani u Tablici 4.16.

Tablica 4.16. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u pojedinačnim serumima korištenjem 3,0 M TCA na 830 nm

	A_1 proba	A_2 proba	$\bar{A}$ proba	A_1 slijepa proba	A_2 slijepa proba	$\bar{A}$ slijepa proba	$\bar{A}_P - \bar{A}_{sp}$	ekto-ATPaza (μmol/L/min)
1.	0,525	0,532	**0,529**	0,504	0,504	**0,504**	**0,025**	**11,25**
2.	0,577	0,538	**0,558**	0,520	0,532	**0,526**	**0,032**	**14,47**
3.	0,552	0,57	**0,561**	0,518	0,521	**0,520**	**0,041**	**19,06**
4.	0,538	0,570	**0,554**	0,522	0,525	**0,524**	**0,031**	**14,01**
5.	0,587	0,575	**0,581**	0,532	0,536	**0,534**	**0,047**	**21,59**
6.	0,560	0,552	**0,556**	0,435	0,445	**0,440**	**0,116**	**53,28**
7.	0,556	0,550	**0,553**	0,530	0,527	**0,529**	**0,025**	**11,25**
8.	0,544	0,581	**0,563**	0,528	0,537	**0,533**	**0,030**	**13,78**
9.	0,558	0,563	**0,561**	0,549	0,560	**0,555**	**0,006**	**2,76**
10.	0,556	0,553	**0,555**	0,494	0,485	**0,490**	**0,065**	**29,86**
11.	0,594	0,643	**0,619**	0,587	0,584	**0,586**	**0,033**	**15,16**
12.	0,618	0,642	**0,630**	0,591	0,583	**0,587**	**0,043**	**19,75**
13.	0,636	0,602	**0,619**	0,596	0,599	**0,598**	**0,022**	**9,88**
14.	0,634	0,613	**0,624**	0,599	0,597	**0,598**	**0,026**	**11,71**
15.	0,633	0,612	**0,623**	0,601	0,591	**0,596**	**0,027**	**12,17**
16.	0,557	0,566	**0,562**	0,558	0,547	**0,553**	**0,009**	**4,13**
17.	0,584	0,580	**0,582**	0,547	0,547	**0,547**	**0,035**	**16,08**
18.	0,576	0,557	**0,567**	0,559	0,552	**0,556**	**0,011**	**5,05**
19.	0,575	0,565	**0,570**	0,532	0,536	**0,534**	**0,036**	**16,54**
20.	0,566	0,578	**0,572**	0,538	0,547	**0,543**	**0,030**	**13,55**

Normalnost razdiobe je ispitana Kolmogorov-Smirnovim testom te je raspodjela za rezultate na 620 nm normalna, što znači da se razdioba ne razlikuje statistički značajno od teorijske normalne razdiobe, pošto je P veći od 0,05, a razdioba na 830 nm nije normalna, pošto je P manji od 0,05, što znači da se razdioba razlikuje statistički značajno od teorijske normalne razdiobe, kao što je prikazano u Tablici 4.17. Rezultati deskriptivne statistike su prikazani u Tablici 4.18.

Tablica 4.17. Ispitivanje normalnosti razdiobe

ekto-ATPaza 620 nm (µmol/L/min)	P > 0,200	Normalna razdioba
ekto-ATPaza 830 nm (µmol/L/min)	P = 0,011	Nije normalna razdioba

Tablica 4.18. Rezultati deskriptivne statistike

	Aritmetička Sredina	**Standardna Devijacija**	**Standardna pogreška**	**Medijan**	**Interkvartilni raspon**
ekto-ATPaza 620 nm (µmol/L/min)	1,20	0,69	0,16		
ekto-ATPaza 830 nm (µmol/L/min)				13,89	11,25 - 17,80

Na uzorku od 17 zdravih ispitanika ustanovljeno je da srednja vrijednost aktivnosti ektoATPaze iznosi 1,20 ± 0,69 µmol/L/min

Mjerenje apsorbancije ispitivanih uzoraka krvnih seruma na 620 nm se pokazalo prikladnijim od mjerenja apsorbancije na 830 nm pošto je razdioba, ispitana Kolmogorov-Smirnovim testom, normalna. Na 830 nm se pojavljuju interferencije koje ometaju mjerenje.

5. ZAKLJUČCI

Ispitana je metoda za određivanje aktivnosti ekto-ATPaze u ljudskom serumu. Određivanje se izvodi u puferu, pH 7,4, koji se sastoji od 50 mM HEPES-Trisa, 5 mM kalcijevog klorida i 100 mM kalijevog klorida uz dodatak inhibitora alkalne fosfataze, 1 mM levamisola i dodatka inhibitora ekto-5'-nukleotidaze, 56 mM konkavalina A, u reakciji trajanja od 60 minuta na temperaturi od 37 °C. Koncentracija fosfata se određuje spektrofotometrijski, mjerenjem koncentracije fosfomolibdenovog kompleksa koji nastaje u reakciji fosfatnih iona s amonijevim heptamolibdatom, uz redukciju s askorbinskom kiselinom, a na temelju rezultata i rasprave mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Prekidanje enzimske reakcije dodatkom 10 % SDS-a kao sredstva za deproteinizaciju u probi uzorka i slijepoj probi uzorka se pokazalo neuspješnim, jer talog koji je nastao dodatkom SDS-a nije nestao dodatkom radnog reagensa, a nakon centrifugiranja proba nije bilo moguće izmjeriti apsorbanciju, jer probe uzorka i slijepe probe uzorka nisu bile transparentne
2. Prekidanje enzimske reakcije dodatkom 1,1 M TCA kao sredstva za deproteinizaciju, se nije pokazalo prikladnim, jer reakcijska smjesa nakon centrifugiranja nije bistra te su apsorbancije probe uzorka veće zbog nedovoljnog taloženja proteina
3. Prekidanje enzimske reakcije dodatkom 5,0 M TCA kao sredstva za deproteinizaciju u probi uzorka se pokazalo boljim, reakcijska smjesa nakon centrifugiranja je bistra, no 5,0 M TCA se ne može koristiti za pripremu slijepe probe uzorka zbog toga što dolazi do nastanka teškog grumenastog taloga koji se ne može pipetirati.
4. Prekidanje enzimske reakcije dodatkom 3,0 M TCA kao sredstva za deproteinizaciju u probi uzorka se pokazalo optimalnim, pošto je reakcijska smjesa nakon centrifugiranja bistra, no za taloženje proteina u slijepim probama uzorka optimalnom se pokazala 1,1 M TCA
5. Ispitan je utjecaj 3,0 M i 1,1 M TCA na apsorbanciju razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata te se iz baždarnih pravaca može zaključiti da razlika u molaritetu TCA ne utječe na apsorbanciju razrijeđenih standarda. Stoga je moguće koristiti 3,0 M TCA za taloženje proteina u probama uzorka, a 1,1 M TCA za taloženje proteina u slijepim probama uzorka
6. Ispitan je optimalni volumen uzorka ljudskog seruma koji će katalizirati nastajanje dovoljne količine fosfata, pogodne za mjerenje te on iznosi 50 μL

7. Ispitani su različiti načini pripreme slijepe probe, pošto kada se ona pripremi na klasični način, odnosno kada se u reakcijsku smjesu doda sredstvo za deproteinizaciju, pa zatim serum, apsorbancije slijepe probe ispadnu veće od apsorbancija probe. Dakle, u serumu čovjeka postoje interferencije koje ometaju mjerenje te se pokazalo optimalnim da se slijepa proba pripremi na taj način da se izvan reakcijske smjese pomiješaju serum i sredstvo za deproteinizaciju te se zatim ta smjesa doda u slijepu probu.
8. Ispitano je mjerenje apsorbancije razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata na 620 nm i 830 nm te su rezultati apsorbancija na 620 nm prikladniji od apsorbancija na 830 nm, koje su visoke i prelaze 1,5, što nije optimalno za mjerenje apsorbancije
9. Statistička razdioba aktivnosti kod zdravih osoba, mjerena na 620 nm ispitana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Rezultati su pokazali da se radi o normalnoj razdiobi.
10. Na uzorku od 17 zdravih ispitanika ustanovljeno je da srednja vrijednost aktivnosti ektoATPaze iznosi 1,20 ± 0,69 μmol/L/min
11. Na temelju svega iznesenog može se predložiti metoda za određivanje aktivnosti ekto-ATPaze mjerenjem koncentracije oslobođenog fosfata, tako da se spektrofotometrijski određuje koncentracija stvorenog fosfomolibdenovog kompleksa koji nastaje u reakciji fosfatnih iona s amonijevim heptamolibdatom, uz redukciju s askorbinskom kiselinom i mjerenjem apsorbancije na 620 nm.

6. LITERATURA

1) Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Bone and Mineral Metabolism. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5th Edition. Elsevier, 2012, str. 1748-1751.

2) Cooper GM, Hausman RE. Bioenergetika i metabolizam. U: Stanica - molekularni pristup peto izdanje. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 445-452.

3) Daly JA, Ertingshausen G. Direct Method for Determining Inorganic Phosphate in Serum with the "CentrifiChem". *Clin Chem* 1972, 18, 264-265.

4) Kukulski F, Lévesque SA, Lavoie ÉG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, Robson SC, Kirley TL, Sévigny J. Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purin signal*, 2005, 1, 193-204.

5) Lodish H, Kaiser CA, Bretscher A, Amon A, Berk A, Krieger M, Ploegh H, Scott MP. Cellular energetics. U: Molecular Cell Biology 7th ed. New York, Freeman WH and Company, 2012, str. 532-550.

6) Medzihradsky F, Cullen EI, Lin HL, Bole GG. Drug-sensitive ekto-ATPase in human leukocytes. *Biochem Pharmac,* 1980, 29, 2285-2290.

7) Orlov SN. On the history of ecto-ATPases: The role of W. A. Engelhardt. *Purin Signal*, 2007, 3(3), 231–232.

8) Pedrazza EL, Senger MR, Rico EP, Zimmermann FF, Pedrazza L, Sarkis JJ, Bonan CD. Fluoxetine and nortriptyline affect NTPDase and 5′-nucleotidase activities in rat blood serum. *Life Sci*, 2007, 81, 1205-1210.

9) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 2006, str. 325.

10) Souza CG, Böhmer AE. Müller AP, Oses JP, Viola GG, Lesczinski DN, Souza DG, Knorr L, Moreira JD, Lhullier F, Souza DO, Perry MLS. Effects of a highly palatable diet on lipid and glucose parameters, nitric oxide, and ectonucleotidases activity. A*ppl Physiol Nutr Metab,* 2010, 35, 591-597.

11) Yegutkin GG. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Crit Rev Biochem Mol Biol,* 2014, 49(6), 473-497.

12) Yegutkin GG, Burnstock G. Inhibitory efects of some purinergic agents on ecto-ATPase activity and pattern of stepwise ATP hydrolysis in rat liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta,* 2000, 1466, 234-244.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Diana Salem

Utvrđivanje optimalnih uvjeta za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka

Ekstracelularni ATP aktivira ionotropne P2X receptore i metabotropne P2Y receptore i time inicira brojne stanične odgovore. Ekto-ATPaza je enzim koji hidrolizira vanstanični ATP te je stoga bitna u regulaciji aktivacije P2 receptora i održavanju homeostaze. Nukleozid trifosfat difosfohidrolaznu obitelj (NTPDaza) uključuje osam različitih članova. NTPDaze1, 2, 3 i 8 su dominantne ektonukleotidaze koje su lokalizirane na površini stanične membrane. Topljive forme humane NTPDaze se sastoje samo od ekstracelularne domene te je primijećena njihova smanjena sposobnost hidrolize nukleotida u usporedbi s NTPDazama koje se nalaze na staničnoj membrani, a koje sadrže dvije transmembranske domene. Za aktivnost NTPDaze zahtijevaju dvovalentne katione, Mg^{2+} ione ili Ca^{2+} ione s optimalnom koncentracijom između 1 i 5 mM te su aktivne u fiziološkom do blago alkalnom pH mediju (7,0-8,5). Svrha ovog istraživanja je bila optimirati metodu za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka. Za deproteinizaciju u probama uzorka optimalnom se pokazala 3,0 M TCA, a za deproteinizaciju u slijepim probama uzorka optimalnom se pokazala 1,1 M TCA. Također je pokazano da razlika u molaritetu TCA ne utječe na apsorbanciju razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata. Katalitička aktivnost ekto-ATPaze je određivana u uzorcima seruma zdravih osoba, pri čemu je mjerena koncentracija oslobođenog fosfata nastalog hidrolizom 3 mM ATP-a, spektrofotometrijski na 620 nm i 830 nm, te je razdioba aktivnosti ispitana Kolmogorov-Smirnovim testom na 620 nm normalna. Na uzorku od 17 zdravih ispitanika ustanovljeno je da srednja vrijednost aktivnosti ektoATPaze iznosi $1,20 \pm 0,69$ μmol/L/min.

Diana Salem

Optimization of the method for determination of the catalytic activity of ecto-ATPase in human blood serum

Extracellular ATP activates ionotropic P2X receptors and metabotropic P2Y receptors and initiates multiple cellular response. Ecto-ATPase is an enzyme whose role is hydrolysis of extracellular ATP, thus this enzyme has an important role in regulation and activation of P2 receptors and maintenance of homeostasis. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family comprise of eight different members with four of the NTPDases (NTPDase1, 2, 3 and 8) being expressed as cell surface-located enzymes. Soluble forms of human NTPDases comprise of only extracellular domains and the nucleotide-hydrolyzing capabillities of these soluble enzymes were diminished in comparison with membrane-embedded NTPDases containing two transmembrane domains. For their activity NTPDases require Mg^{2+} or Ca^{2+} ions with optimal concentration between 1-5 mM and they are active in physiological to slightly basic pH range (7.0-8.5). The aim of this study was to optimize the method for determination of the catalytic activity of ecto-ATPase in human serum. The results showed that 3.0 M TCA is optimal for deproteinization in probe, and 1.1 M TCA is optimal for deproteinization in blind probe. Also it has been shown that the difference in molarity of TCA does not effect on absorbance of diluted standards. Catalytic activity of ecto-ATPase was determined in blood serum samples, where the absorbance of realsed phosphate, developed by hydrolysis of 3 mM ATP, was measured by spectrofotometar on two wavelength 620 and 830 nm, and distribution of activity tested by Kolmogorov-Smirnov test for 620 nm was normal. The mean of ecto-ATPase activity, for 17 serum blood samples, was 1.20 ± 0.69 μmol/L/min.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Utvrđivanje optimalnih uvjeta za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka

Diana Salem

SAŽETAK

Ekstracelularni ATP aktivira ionotropne P2X receptore i metabotropne P2Y receptore i time inicira brojne stanične odgovore. Ekto-ATPaza je enzim koji hidrolizira vanstanični ATP te je stoga bitna u regulaciji aktivacije P2 receptora i održavanju homeostaze. Nukleozid trifosfat difosfohidrolazna obitelj (NTPDaza) uključuje osam različitih članova. NTPDaze1, 2, 3 i 8 su dominantne ektonukleotidaze koje su lokalizirane na površini stanične membrane. Topljive forme humane NTPDaze se sastoje samo od ekstracelularne domene te je primijećena njihova smanjena sposobnost hidrolize nukleotida u usporedbi s NTPDazama koje se nalaze na staničnoj membrani, a koje sadrže dvije transmembranske domene. Za aktivnost NTPDaze zahtijevaju dvovalentne katione, Mg^{2+} ione ili Ca^{2+} ione s optimalnom koncentracijom između 1 i 5 mM te su aktivne u fiziološkom do blago alkalnom pH mediju (7,0-8,5). Svrha ovog istraživanja je bila optimirati metodu za određivanje katalitičke aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka. Za deproteinizaciju u probama uzorka optimalnom se pokazala 3,0 M TCA, a za deproteinizaciju u slijepim probama uzorka optimalnom se pokazala 1,1 M TCA. Također je pokazano da razlika u molaritetu TCA ne utječe na apsorbanciju razrijeđenih standarda kalijevog dihidrogenfosfata. Katalitička aktivnost ekto-ATPaze je određivana u uzorcima seruma zdravih osoba, pri čemu je mjerena koncentracija oslobođenog fosfata nastalog hidrolizom 3 mM ATP-a, spektrofotometrijski na 620 nm i 830 nm, te je razdioba aktivnosti ispitana Kolmogorov-Smirnovim testom na 620 nm normalna. Na uzorku od 17 zdravih ispitanika ustanovljeno je da srednja vrijednost aktivnosti ektoATPaze iznosi 1,20 ± 0,69 μmol/L/min

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži:	55 stranica, 10 grafičkih prikaza, 24 tablica i 12 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Ekto-ATPaza, NTPDaze, ektonukleotidaze, ekstracelularni ATP, purinska signalizacija, optimizacija metode, krvni serum
Mentor:	**Prof. dr. sc. Tihana Žanić Grubišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Ocjenjivači:	**Prof. dr. sc. Tihana Žanić Grubišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Lovorka Vujić**, *viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Optimization of the method for determination of catalytic activity of ecto-ATPase in human blood serum

Diana Salem

SUMMARY

Extracellular ATP activates ionotropic P2X receptors and metabotropic P2Y receptors and initiates multiple cellular response. Ecto-ATPase is an enzyme whose role is hydrolysis of extracellular ATP, thus this enzyme has an important role in regulation and activation of P2 receptors and maintenance of homeostasis. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase family comprise of eight different members with four of the NTPDases (NTPDase1, 2, 3 and 8) being expressed as cell surface-located enzymes. Soluble forms of human NTPDases comprise of only extracellular domains and the nucleotide-hydrolyzing capabillities of these soluble enzymes were diminished in comparison with membrane-embedded NTPDases containing two transmembrane domains. For their activity NTPDases require Mg^{2+} or Ca^{2+} ions with optimal concentration between 1-5 mM and they are active in physiological to slightly basic pH range (7.0-8.5). The aim of this study was to optimize the method for determination of the catalytic activity of ecto-ATPase in human serum. The results showed that 3.0 M TCA is optimal for deproteinization in probe, and 1.1 M TCA is optimal for deproteinization in blind probe. Also it has been shown that the difference in molarity of TCA does not effect on absorbance of diluted standards. Catalytic activity of ecto-ATPase was determined in blood serum samples, where the absorbance of realsed phosphate, developed by hydrolysis of 3 mM ATP, was measured by spectrofotometar on two wavelength 620 and 830 nm, and distribution of activity tested by Kolmogorov-Smirnov test for 620 nm was normal. The mean of ecto-ATPase activity, for 17 serum blood samples, was 1.20 ± 0.69 μmol/L/min.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 55 pages, 10 figures, 24 tables and 12 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ecto-ATPase, NTPDase, ectonucleotidase, extracellular ATP, purinergic signaling, optimization of the method, blood serum

Mentor: **Tihana Žanić Grubišić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Tihana Žanić Grubišić**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Somborac Bačura, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lovorka Vujić, **Ph.D.** *Senior Assistant,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.