Aktivnost salivarne alfa amilaze u ovisnosti o metodi uzorkovanja

Radiček, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:163:185114

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Marija Radiček

Aktivnost salivarne α-amilaze u ovisnosti o metodi uzorkovanja

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagreb, a izrađen je dijelom u DZ Križevci te u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić.

Najveći dio financijske konstrukcije istraživanja odnosi se na laboratorijsku obradu. Reagencije su bile osigurane donacijom tvrtke Siemens Healthcare Diagnostics Inc. Newark, DE, SAD.

ZAHVALA

Posebno zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić na uloženom trudu, strpljenju te brojnim korisnim savjetima pri pisanju ovog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Marini Pavić, spec. med. biokem. koja je pomogla pri predobradi uzoraka i samoj analizi, te dozvolila korištenje aparata u prostorijama Odjela za medicinsku biokemiju u traumatologiji i ortopediji.

Zahvaljujem tvrtki Siemens Hrvatska na donaciji regensa.

Zahvaljujem osoblju KBC Sestre Milosrdnice Kliničkog zavoda za kemiju te Odjela za medicinsku biokemiju u traumatologiji i ortopediju koje je pomoglo pri izradi praktičnog dijela rada.

Zahvaljujem i svim ispitanicima bez kojih ovo istraživanje ne bi bilo moguće provesti.

Velika hvala svim mojim kolegama i prijateljima koji su me pratili kroz sve ove godine studiranja.

Na kraju, najveće zahvale upućujem svojoj obitelji posebice sestri Mateji i baki Juliji.

SADRŽAJ

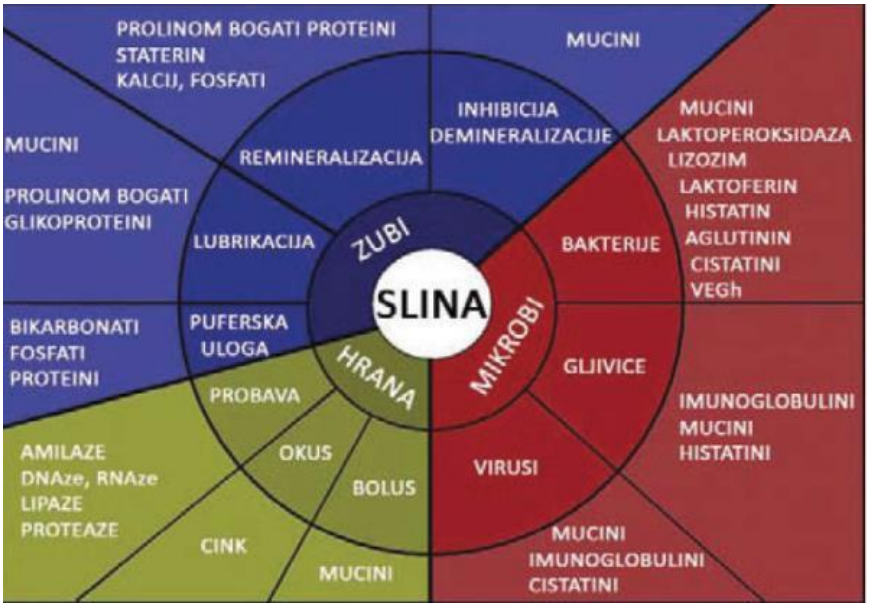
1. Uvod 1
1.1. Slina 1
1.1.1. Funkcija i lučenje sline 1
1.1.2. Tehnike sakupljanja sline 4
1.1.3. Prednosti i nedostatci sline kao uzorka 5
1.2. Stres 7
1.2.1. Akutni stres 8
1.2.2. Kronični stres 8
1.2.3. Psihički stres 8
1.2.4. Fizički stres 9
1.3. Biokemijski pokazatelji stresa u slini 9
2. Opći i specifični ciljevi 11
3. Ispitanici i metode 12
3.1. Ispitanici 12
3.2. Metode 13
3.2.1. Uzorkovanje 13
3.2.2. Određivanje koncentracije α-amilaze u slini 14
3.2.3. Statističke metode 15
4. Rezultati 17
4.1. Deskriptivna statistika ispitivanih skupina 17
4.2. Usporedba koncentracije α-amilaze između spolova i između pojedinih uzorkovanja. 18
4. 3 Povezanost koncentracije α-amilaze sa životnom dobi 21
5. Rasprava 22
6. Zaključci 26
8. Popis literature 27
9. Sažetak 29
10. Summary 30
11.Prilozi 32
12. Temeljna dokumentacijska kartica
13. Basic documentation card

1. Uvod

1.1. Slina

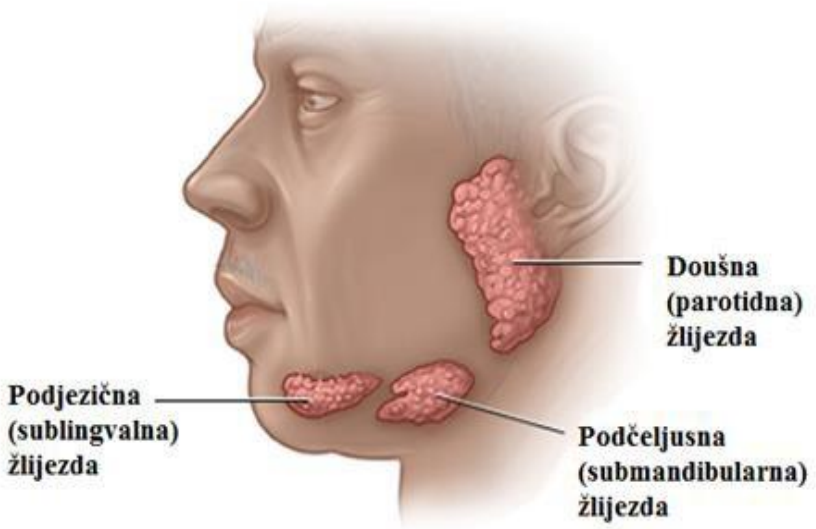
1.1.1. Funkcija i lučenje sline

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava. Izlučevina je iz velikih i malih žlijezda slinovnica, čijim lučenjem upravlja autonomni živčani sustav. Sekrecija sline iz slinovnica mijenja se tijekom dana, a razlikuje se bazalna i stimulirana sekrecija.Ukupna slina nastaje miješanjem sline iz slinovnica s ostalim tekućinama i tvarima koje dospiju u usnu šupljinu. Slina čovjeka ima razne funkcije u usnoj šupljini, uključujući: održavanje homeostaze, pospješivanje zarastanja rana, olakšavanje mineralizacije zubne površine, probavljanje ugljikohidrata djelovanjem alfa-amilaze, lipida pomoću lipaze, olakšavanje procesa žvakanja, govora, gutanja, osjeta okusa, te je lubrikant usne šupljine. Iako usna šupljina omogućuje dobre uvjete za rast mnogih mikroorganizama, antibakterijsko djelovanje sline pomaže održavanju oralne higijene čisteći i inhibirajući njihov rast.



Slika 1. Funkcija sline (preuzeto iz rada Lipovec R.,Radiček M., 2014.)

Egzokrine žlijezde proizvode slinu, koja u ustima ima probavnu, mehaničku (podmazivanje) i zaštitnu ulogu. Uz mnogo malih žlijezda slinovnica smještenih unutar stijenke usne šupljine, postoje i tri para velikih žlijezda slinovnica: doušna, podčeljusna i podjezična.



Slika 2. Žlijezde slinovnice (preuzeto iz rada Lipovec R., Radiček M.,2014.)

Žlijezde slinovnice i mukozne žlijezde izlučuju svoje sekrete u usnu šupljinu, u kojoj se miješaju, dajući mješoviti sekret koji je poznat pod nazivom mješovita slina ili saliva. Proces lučenja sline naziva se salivacija. Mješovita slina je sredstvo oralne homeostaze. Za njeno usklađeno lučenje potrebno je regulatorno djelovanje endokrinološkog sustava i središnjeg živčanog sustava (SŽS).

U stresnim stanjima, koji su praćeni pojačanim lučenjem adrenalina u krv, luči se gusta slina (tzv. simpatikusna slina) oskudnog volumena. I druge endokrine žlijezde utječu izravno ili neizravno na volumen i sastav mješovite sline (npr. tijekom trudnoće značajno povećanje koncentracije izlučenog IgA).

SŽS ima najznačajniju ulogu u regulaciji salivacije. U inervaciji žlijezda slinovnica sudjeluju simpatikus i parasimpatikus, ali je presudan utjecaj parasimpatikusa. Podraživanjem simpatikusa nastaje prolazno lučenje sline bogate proteinima, koje ubrzo prestaje. Podraživanjem parasimpatikusa nastaje konstantno lučenje sline (posebno iz podčeljusne žlijezde), koja je razrijeđena i sadrži malo organskog sadržaja.Iz fiziologije je poznato kako postoje tri centra koji usklađuju funkcioniranje žlijezda slinovnica i salivaciju u određenim uvjetima u kojim se organizam nalazi. To su: primarni centar salivacije koji se nalazi u

produženoj moždini (*medula oblogata*), sekundarni centar salivacije u talamusu i tercijarni centar salivacije u operkularno- insularnoj zoni kore velikog mozga (*Fissura Sylvii*).Stimulacijom svakog od navedenih centara može se dobiti efekt pojačanog lučenja sline, što se odražava u određenoj količini izlučene sline. Ipak, najznačajniju funkciju u lučenju i usklađivanju sekrecije žlijezda slinovnica ima primarni salivacijski centar (Anđić, 2000.).Ovisno o trenutnom stanju oralne sredine, stanju primarnog centra za salivaciju, kao i stanju određenih dijelova kore velikog mozga ovisi kvantitet i kvalitet izlučene sline. Zbog toga slinu (ukupnu slinu) možemo grubo podijeliti na nestimuliranu (bazalnu) i stimuliranu.

Bazalna ukupna slina nastaje kao proizvod sekrecije cjelokupnog žljezdanog sustava usne šupljine u uvjetima nestimulacije, tj. onda kada nikakve nutritivne tvari ne djeluju na okusne i ostale receptore usne šupljine (Humphrey, Williamson, 2001.).

U prilog tvrdnji da pojedini dijelovi kore velikog mozga utječu na aktivnost primarnog salivacijskog centra govori podatak da je salivacija smanjena kod slijepih osoba, što ukazuje kako centar za vid koji je smiješten u okciptalnom dijelu kore velikog mozga normalno, refleksnim putem, ostvaruje svoj utjecaj na primarni salivacijski centar. Zbog toga je količina izlučene sline, bez neke značajnije stimulacije, prosječno 75% manja kod slijepih nego kod zdravih pojedinaca. Da stanje kore velikog mozga i njegovih drugih centara utječe na stanje aktivnosti primarnog salivacijskog centra najbolje pokazuju podatci dobiveni kateterizacijom izvodnih kanala žlijezda slinovnica dobrovoljaca, u svrhu sakupljanja sline i mjerenja količine salivacije. Istraživanje je pokazalo kako postoji ustaljeni dnevni ritam salivacije, po kojem sekrecija sline praktički prestaje od ponoći do 6h ujutro, nakon čega slijedi spontani porast do 18h, kada nestimulirana salivacija doseže svoj maksimun, nakon čega se smanjuje do prestanka lučenja u ponoć (Dickmeis, 2009.).

Stimulirana ukupna slina, naprotiv nastaje kao logična posljedica djelovanja različitih čimbenika koji, djelujući izravno u usnoj šupljini na brojne i raznovrsne receptore i neizravno preko osjetila vida, sluha i mirisa, uzrokuju pojačano izlučivanje ukupne sline u znatno većim količinama, nego bez njihova utjecaja. Ukupna slina je karakterizirana pisutnošću enzima amilaze u velikim količinama.Po prestanku stimulacije i lučenja ukupne sline, smanjuje se količina izlučene salivarne amilaze, salivacija prelazi u fazu mirovanja, kada se izlučuju male količine tzv. bazalne ukupne sline. Ukupna slina sadrži više pufera, praktički se radi o puferskom mehanizmu sline koji se sastoji od; bikarbonatnog pufera, fosfatnog pufera, uree,

preventivnog pufera tipa salivarne amilaze, preventivno-profilaktičkog pufera tipa fluorida (Anđić,2000.).

Slina sadrži niz imunoloških i neimunoloških proteina s izrazitim antibakterijskim svojstvima važnim u obrani. Neki od tih proteina su nužni jer sprječavaju spontano taloženje kalcijevih i fosfatnih iona u žlijezdama slinovnicama i njihovim izlučevinama (Axelsson, 2000.).
Među neimunološke salivarne proteine spadaju enzimi (lizozim, laktoferin i peroksidaze), glikoproteini mucina, aglutinini, histatini, proteini bogati prolinom i cistatini (Axelsson, 2000.; Schenkels i sur., 1995.).
Sekrecijski IgA je najzastupljenija imunološka sastavnica sline. Otporniji je od ostalih imunoglobulina na proteolizu bakterijskim hidrolazama, a njegov omjer prema IgG je oko 400 puta veći nego li omjer IgA : IgG u serumu (Veerman, Amerongen, 1995.; Ten, 1998.;Humphrey, Williamson,2001.). Time je smanjeno izlučivanje i prisutstvo sAA u takvoj slini. Međutim, djelovanje sAA se nastavlja zbog tog jer je tjekom stimulirane salivacije ovaj enzim dospio u velikim količinama do retencijskih mjesta usne šupljine, gdje natapanjem zaostalih čestica hrane dolazi u kontakt s škrobnim makromolekulama, koje nastavlja hidrolitički cijepati i u uvjetima kad je salivacija svedena na najmanju mjeru (Marković, 2013.).

Brzina lučenja sline povezana je sa nekoliko faktora: uočavanjem stresa i depresije, razlikama u godinama, konzumacijom alkohola, intenzitetom vježbanja, liječenjem karcinoma-radiacijskom terapijom. Fluktuacija brzine lučenja sline podudara se sa fluktuacijom sAA koncentracija. Nejasno je međutim da li je fluktuacija sAA koncentracija učinak drugačije brzine lučenja sline ili direktno ovisi o faktorima stresa. Mnogi autori navode da utjecaj može biti različit oviso o tehnikama sakupljanja, vremenu uzimanja uzorka (Arhakis i sur., 2013.).

1.1.2. Tehnike sakupljanja sline

Jedina praktična metoda sakupljanja sline je mješana slina koje se koristi za rutinske potrebe, za istraživanja otvorenog tipa te kod uzimanja uzoraka vanjskih pacijenata.

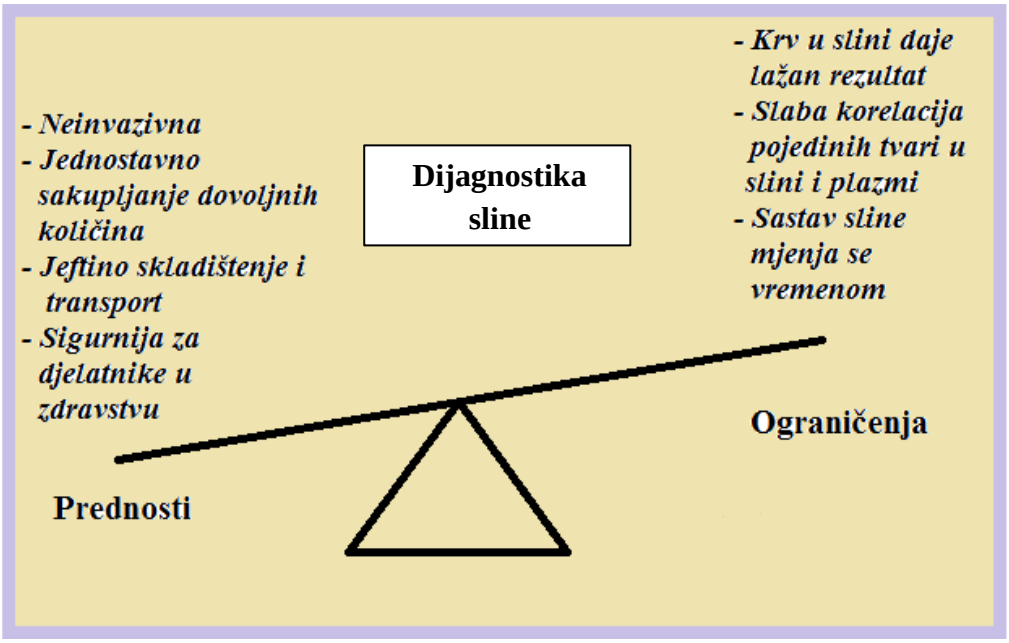
U mnogim istraživanjima se traži pacijente da ispljunu slinu izravno u epruvetu (posudu). Takav direktan način sakupljanja ima nekoliko nedostataka: odrediti dovoljnu socijalnu barijeru ua ispljuvavanje (osobito u gerijatrijskih pacijenata), problem se također javlja kod kserostomije (suha usta) koja je često prisutna kod starijih osoba. Izlučivanje sline može se

stimulirati stavljanjem limunske kiseline na jezik, no korištenje limunske kiseline može izazvati interferencije kod imunoodgovora u tijeku analize povećanjem pH sakupljenog uzorka. Posljedično se u mnogim istraživanjima slina sakuplja tkaninama u ustima te potom centrifugira. Procedura sakupljanja uzorka ne smije utjecati na salivarne koncentracije ni apsorpcijom ni modifikacijom analita. Materijali poput parafilma i pamuka apsorbiraju određene molekule iz sline te dovode do lažno sniženih rezultata mjerenja.

Najčešće korišteni sustavi za sakupljanje sline su Salivette, Quantisal i Intercept. Svi sistemi sadrže jastučiće koji se stave u usta ili ispod jezika ili uz obraze. Apsorbirajući jastučići drže se u ustima tako da upijaju slinu, čije se stvaranje povećava žvakanjem, standardiziran period od 1 - 2 minute. Potom se jastučić vraća u epruvetu. Nakon toga slijedi centrifugiranje gdje se slina odvaja od jastučića. Sustavi za uzimanje sline pokazali su reproducibilne rezultate za analizu mnogih steroidnih i peptidnih hormona (Gröschl, 2008.).

1.1.3. Prednosti i nedostatci sline kao uzorka

Zbog svog sastava, ukupna slina je pogodna za cijeli niz dijagnostičkih postupaka. Činjenica da se u slini nalaze komponente plazme omogućuje njihovu detekciju i kvantifikaciju iz uzorka sline. Korištenje sline u laboratorijskoj dijagnostici, umjesto uobičajene krvi ili urina ima brojne prednosti.



Slika 3. Prednosti i ograničenja sline kao uzorka (preuzeto iz Lipovec R.,Radiček M., 2014.)

Iako je poznato kako slina sadrži brojne komponente pogodne za laboratorijsku dijagnostiku, njihova niska koncentracija u odnosu na koncentracije u krvi dugo vremena bila je ograničenje za kliničku primjenu salivarne dijagnostike. Međutim, zbog razvoja novih visoko osjetljivih tehnologija niske koncentracije analita više nisu ograničenje.

Kao dijagnostički uzorak slina se jednostavnije može sakupiti u većim količinama te se mnogo lakše skladišti i transportira u odnosu na krv ili urin. Kako se slina ne zgrušava olakšano je rukovanje tijekom dijagnostičkog postupka, a višestruko je smanjen i broj manipulacija uzorkom, što značajno smanjuje i troškove. Za zdravstvene djelatnike korištenje sline u odnosu na serum sigurnije je zbog smanjenog rizika infekcijama npr. HIV-om ili hepatitisom jer nema izravnog kontakta s uzorkom (Yi, Moochhala, 2013.).

No, postoje i ograničenja pri korištenju sline kao dijagnostičkog medija. Da bi bilo koji test iz sline bio klinički koristan mora postojati pouzdana korelacija između koncentracije biljega u slini i krvnoj plazmi. Tako npr. mjerenje glukoze u slini nije pouzdan način praćenja šećerne bolesti zbog slabe korelacije sa plazmatskom koncentracijom. Nadalje, prisutnost čak i najmanje količine krvi u slini primjerice prilikom korištenja zubnog konca, uzrokuje pogreške u mjerenju i povećanje broja lažno pozitivnih rezultata testova.

Mogućnost točne procjene biljega u uzorku usne šupljine ovisi o biokemijskim karakteristikama biljega, korištenom uzorku, načinu uzorkovanja, rukovanju uzorkom, skladištenje, odabir analitičke metode kao i samom mehanizmu ulaska biljega u prostor usne šupljine.

Slina čovjeka je ultrafiltrat plazme i sadrži proteine koji su sintetizirani in situ u žlijezdama slinovnicama ili iz krvi. Sadrži biljege iz seruma, gingivalne tekućine i transudata mukoze. Do danas istraživači su identificirali 2340 proteina od kojih 20-30% se nađu i u krvi što je ohrabrujući indikator u kliničkoj upotrebi sline kao dijagnostičke tekućine. Načelno, općenita analiza ljudskog proteoma sline omogućuje opsežan uvid u oralno i sistemsko zdravlje (Bandhakavi i sur., 2009.).

U slini se nalaze analiti u svom aktivnom obliku te su zbog toga koncentracije analita određivanih u slini dobro kolerireju s koncentracijama tih analita u serumu/plazmi (Marković, 2013.).

1.2. Stres

Stres jestanje u kojem je poremećena unutrašnja (psihofiziološka) ravnoteža organizma i koje zahtjeva ulaganje dodatnih napora radi prilagodbe. Uz pojam stresa vezani su i pojmovi kao što su stresni podražaji, stresna situacija i stresni doživljaj. Stresni podražaj (stresor) je svaki podražaj koji dovodi pojedinca u stanje stresa. To mogu biti vrlo raznoliki podražaji, koji ne izazivaju stres kod svakog pojedinca nego njihovo djelovanje ovisi osubjektivnom značenju podražaja za pojedinca. Prema tome, stresna situacija, kao. npr. medvjed u šumi, može predstavljati stresni podražaj za pojedinca koji se suoči s takvim podražajem. Međutim, da li će doći dostresne reakcije, ovisi otome percipira li pojedinac situaciju kao ugrožavajuću ili ne. Ako se osjeća zaštićen, stresna rekcija se ne javlja i obratno. Stresni doživljaji su ona doživljavanja koja se zbivaju pod utjecajem stresnog podražaja. Promjene koje se u organizmu događaju pod utjecajem stresa mogu u određenim uvjetima izazvati lažne organske smetnje koje nazivamo psihosomatskirn poremećajima i psihosomatskim bolestima (Havelka, 1995.).

Stres aktivira dva velika biološka sistemahipotalamusno-hipofizna-adrenalna osovina (HPA engl. *hypotalamis-pituarity-adrenocortical-axis*) i simpato-adrenalno-medularna osovina (SAM engl. *symatho-adrenomedullary-axis*). Kod ljudi aktivacija HPA rezultira povećanom sekrecijom hormona kortizola. Kortizol ima cirkadijalni ritam u kojem su koncentracije veće ujutro, a niže uvečer. Aktivacija SAM uzrokuje otpuštanje epinefrina i norepinefrina iz CNS-a. Salivarne koncentracije kortizola odnose se na slobodnu formu i dobro koreliraju sa koncentracijama slobodnog kortizola u serumu koji se smatra biološki aktivnom komponentom. Obećavajući kandidat za sličnu, neinvazivnu i jednostavnu metodu daje i marker SAM osovine, alfa amilaza u slini (sAA). Ona je enzim za probavu ugljikohidrata njegova je sekrecija pod snažnom neurohormonskom kontrolom, uzima se kao marker simpatičke aktivnosti (Wolf, Nicholls, Chen, 2007.).

Reakcija na stres je sastavni dio alostaze, jer svojim fiziološkim i bihevioralnim odgovorom omogućava preživljavanje u iznenadnoj opasnosti, a njezini glavni medijatori su isti oni koji sudjeluju u održavanju dnevnih ciklusa aktivnosti i mirovanja HPA-o i simpatikoadrenalni sustav. Ona korisna, poželjna i neophodna adaptivna reakcija koja ima za cilj izvući organizam iz stanja nefiziološkog stanja i ponovno uspostaviti homeostazu.

Stresor odnosno, štetni agens koji uzrokuje stres, može biti fizički (izloženost buci, hladnoći, ekstremnom naporu, traumi, senzornoj deprivaciji), psihički (strah, tjeskoba, krivnja, tuga, mobbing, frustracije), ekonomski (gubitak posla, velike ekonomske krize, rat, rastava).

Postoji nekoliko tipova stresa koji se po trajanju i učestalosti dijele na: akutni stres, kronični stres, psihički stres i fizički stres.

1.2.1. Akutni stres

Akutni stres je najčešći oblik koji proizlazi iz pritiska i zahtjeva iz neposredne prošlosti, aktualnih zahtjeva okoline, te pritisaka i očekivanja od skore budućnosti. Rezultira fiziološkom reakcijom „borbe ili bijega“ kada se tijelo dovodi u stanje uzbune i pripravnosti da reagira ili se adaptira na iznenadnu promjenu ili opasnost. Epizodički akutni stres javlja se kod osoba koje često proživljavaju i perpetuiraju akutne stresne situacije, čiji su životi tako nesređeni, da se ne znaju organizirati između vlastitih ciljeva i mogućnosti, često katastrofičnih pogleda na život. Postrtraumatski stresni poremećaj nastaje u situacijama izloženosti ekstremnom akutnom stresu koji reverberira godinama s permanentnom repeticijom traumatskih iskustva. Stresor perzistira unutar organizma (Šupe i sur., 2011.).

1.2.2. Kronični stres

Kronični stres je izloženost stresnim i iscrpljujućim situacijama tijekom dužeg razdoblja, osobito na poslu ili u obiteljskom okruženju. Često je povezan sa lošim socioekonomskim statusom, društvenom izolacijom, nemogućnosti kontroliranja i utjecanja na događaje, padom samopouzdanja i suicidnim mislima (Šupe i sur., 2011.).

1.2.3. Psihički stres

Emocionalni ili kronični stres je vrlo opasan i on se nalazi na drugom mjestu izazivanja bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija (WHOengl. *World Health Organization*) proglasila je stres na radnom mjestu svjetskom epidemijom, a sada je on veći zbog recesije, globalne krize i bojazni gubitka radnog mjesta (izvor opstanka).

"Burn out" je sindrom potpune emocionalne iscrpljenosti zbog poteškoća na poslu (uzaludan trud na poslu).Zahvaćeni takvim stresom opisuju ga: Imamo osjećaj da smo izgubili kontrolu

nad novonastalom situacijom, osjećamo se ugroženo, stalno smo pod pritiskom. Međuljudski odnosi su potpuno poremećeni, obiteljski odnosi narušeni, stalno dobivamo signale pogoršanja i opasnosti (http://www.zdravljeizprirode.hr).

Psihički stres također je prisutan kod pisanja ispita. Mnoga istraživanja bave se doživljavanjem stresa izazvanim ispitima i njegovim posljedicama na funkcioniranje stanične imunosti. Tijekom ispitnog perida ispitanici doživljavaju viši stupanj stresa uz značajno smanjenje funkcije različitih indikatora stanične imunosti (Hudek-Knežević, Kardum, 2005.).

1.2.4. Fizički stres

Fizički stres nastaje kada je tijelo u neposrednoj opasnosti - fizička borba, prometna nesreća, ranjavanje, kada nam je život u opasnosti (borba za opstanak) ili vožnja biciklom, trčanje, izloženost hladnoći. Čini se da su naši preci poznavali samo takav stres. U tijelu se događaju gore opisane reakcije. Ovaj stres traje obično kraće i tijelo se poslije toga vraća u normalu (ravnotežu). Tijelo je potrošilo povećane količine glukoze, tlak se normalizira, hormoni nadbubrežne žlijezde u krvi su u normalnoj količini. Tijelo je opušteno (http://www.zdravljeizprirode.hr; Arhakis i sur., 2013.).

1.3. Biokemijski pokazatelji stresa u slini

Salivarni biomarkeri popularniji su u istraživanjima vezanim za stres jer je dokazano da su bolji od provođenja testiranja biomarkera iz krvi (Yi, Moochhala, 2013.). Napretkom u području imunologije i molekularne biologije znanstvenici su pronašli nove načine analiziranja salivarnih biomarkera i njihove primjene u istraživanjima stresa. Postoje mnoge prednosti korištenja salivarnih biomarkera u odnosu na biomarkere iz krvi u istraživanjima stresa. Prednosti su toga što je metoda neinvazivna, uklanja se rizik uboda iglom prilikom vađenja krvi, te uzrokuje minimalnu nelagodu kod pojedinca. Također je uklonjen stres koji se javlja prilikom uboda igle za vrijeme uzorkovanja, što je korisno kod djece, jer kod njih flebotomija može biti traumatična.

Trenutno se u istraživanju stresa koristi nekoliko salivarnih biomarkera kao što su: koncentracije salivarnog kortizola, sAA, sIgA i dehidroepiandrosteron (DHEA) (Yi, Moochhala, 2013.).

1.3.1. sAA

sAA je digestivni hormon, sintetizira se u acinarnim stanicama, te pohranjuje u granulama i otpušta u slinu kao odgovor na neurohormonsku stimulaciju.

Ovaj enzim dospjeva u usnu šupljinu iz tri glavna izvora: parotidnih, sublingvalnih i submandibularnih žlijezda slinovnica. Parotidna žlijezda je najznačajniji izvor salivarne amilaze, a to je i najznačajniji sastojak sline koju ona stvara. Ona sintetizira 80% ovog enzima, dok ostatak nastaje u submandibularnim žlijezdama. Ovaj enzim je dobar pokazatelj funkcioniranja žlijezda slinovnica, jer čini 40% do 50% ukupnih proteina sline (Marković, 2013.).

Koncentracija sAA je neovisna o količini proizvedene sline. Značajno je da je koncentracija ovog enzima u slini proporcionalna koncentraciji IgA, a obrnuto proporcionalna stupnju stresa. sAA se koristi kao marker stresa, te je visoko osjetljiv u stresnim situacijama uključujući i psihički stres (npr. izloženost pacijenta slikama koje potiču negativne emocije, rješavanje psiholoških testova)te fizički stres (npr. vožnja biciklom, trčanje, izloženost hladnoći) (Lipovec, Radiček, 2014.).

Izlučivanje sAA više je povezano sa psihoneuroendokrinim odgovorom na stres nego sa brzinom lučenja sline i dobi. sAA jedna je od bogatijih komponenti u slini te čini 10-20 % ukupnog sadržaja proteina. Sudjeluje u digestiji hrane hidrolizirajući škrob u glukozu i maltozu. Sprečava bakterijske infekcije usne šupljine i onemogućuje bakterijski klirens u ustima. Prijašnja razmatranja pokazuju vezu između sekrecije sAA i izlaganja stresnom stanju (Arhakis i sur., 2013.; Scannapieco i sur., 1993.).

2. Opći i specifični ciljevi

Opći cilj

Cilj je ovog rada izmjeriti i usporediti koncentracije α-amilaze biokemijskog pokazatelja stresa u slini, , u zdravoj populaciji kojoj je slina uzorkovana pomoću dvije metode - pasivnim uzimanjem i stimulirannjem lučenja sline.

Specifični ciljevi

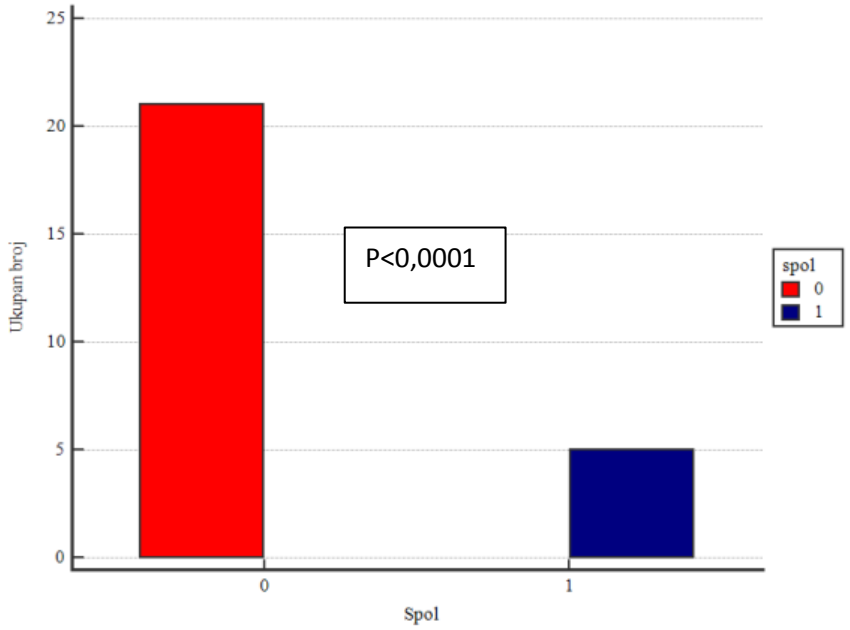
1. Izmjeriti bazalnu jutarnju koncentracijuα-amilaze u slini zdrave populacije u tri navrata
   1.1.pasivnom metodom
   1.2.stimuliranom metodom
   1.3.pasivnom metodom
2. Izmjeriti bazalnu jutarnju koncentracijuα-amilaze u slini zdrave populacije, te uočiti razlike u odabiru uzorkovane metode ako postoje
3. Izmjeriti bazalnu jutarnju koncentraciju α-amilaze u slini zdrave populacije i provjeriti utječe li stimulirana metoda uzorkovanja na pasivnu ako se provodi 15 minuta nakon stimulirane metode uzorkovanja
4. Ispitati razlike u koncentracijama biokemijskog biljega stresa između spolova ispitivane populacije i metoda uzorkovanja
5. Zaključiti utječu li metode uzorkovanja na koncentracije α-amilaze u slini, i može li pasivna metoda biti pod utjecajem stimulirane ako se pasivna provodi nakon stimuliranog načina uzorkovanja

3. Ispitanici i metode

3.1. Ispitanici

U istraživanje je bilo uključeno 26 dobrovoljaca (N=26) zdrave populacije. Skupina ispitanika nije bila je ujednačena po spolu. Ženskih ispitanica (N=21) bilo je znatno više od muških ispšitanika (N=5). Prvi uzorci sline uzeti su 23.07.2015. 1 ispitaniku, potom 24.07.2015. 6 ispitanika, 27.08.2015. 6 ispitanika, 29.07.2015. 2 ispitanika, 9.08.3015. 1 ispitaniku te su posljednji uzorci uzeti 14.8.2015. za 9 ispitanika. Uzorci su bili obilježeni šiframa. Jedini osobni podaci uzeti od ispitanika bili su dob i spol ispitanika. Na svakom uzorku je također bilo obilježeno vrijeme i datum uzimanja uzorka.

Informirani pristanak sadržavao je svrhu istraživanja, opis istraživanja, tok istraživanja i cilj istraživanja, a ispitanici su dodatno upoznati usmeno sa informiranim pristankom, te su ga u konačnici i sami pročitali i potpisali.



Slika 4. Podjela ispitanika prema spolu
(spol 0-žene, spol 1-muškarci)

3.2. Metode

Svi ispitanici su pristupili davanju sline na neagresivni način, koji je uključivao pasivnu metodu uzorkovanja sline u plastične epruvete s čepom pomoću lijevka, te stimuliranom metodom uz pomoć standardiziranog sustava dvostrukih epruveta (Sarsted,Njemačka). Takve plastične epruvete s čepom i duple epruvete podvrgnute su centrifugiranju što je kroz otvor na dnu manje epruvete omogućilo odvajanje tekućine (sline) iz natopljenog jastučića. Veća epruveta sa sadržajem sline i ostacima eventualnih raspadnutih dijelova stanica i ostalih čestica sabijenih u uski konusni završetrak epruvte, pohranila se u hladnjak na +4 do +8 ºC kroz najviše mjesec dana nakon čega se analizirala koncentracija sAA.

Koncentracija sAA određivana je kolorimetrijskom enzimatskom metodaom u Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice.

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka koristio se računalni programi, a prikazuju se skupni prikaza udjela starosne dobi i spola ispitanika.

3.2.1. Uzorkovanje

Prije uzimanja uzoraka ispitanici nisu smjeli konzumirati piće, jelo, žvakati, pušiti ni prati zube 12 sati prije uzimanja uzorka. Dakle, ispitanici su bili natašte, a ujedno su dobili i uputu da ne smiju imati dekorativnu kozmetiku na usnama koja bi mogla kontaminirati uzorak bojom ili tvarima iz kozmetičkih preparata.

Kod uzimanja uzoraka koristili smo plastične epruvete s čepom za pasivnu metodu uzorkovanja, te standardiziran postupak uzimanja uz sustav Salivetta (Sarsted, Njemačka) koji je stumuliran način uzimanja sline i provodili smo ga 15 minuta nakon pasivnog načina uzimanja, a 15 minuta nakon stimuliranog uzorkovanja ponosno smo provodili pasivno uzorkovanje. Svim ispitanicima uzorci su uzeti u vremenu između 10 i 12 sati. Svim ispitanicima uzorci su uzeti u KBC Sestre Milosrdnice te u DZ Križevci. Prvi uzorak pasivnom metodom uzimali smo na način da su ispitanici sakupljali slinu u ustima 1 minutu, te su potom ispljunuli slinu u plastičnu epruvetu kroz stakleni lijevak, a uzorak sline začepio se čepom. Drugi uzorak sline uzimali smo 15 minuta nakon prvog stimuliranom metodom koja se sastoji od dvije epruvete, u manjoj epruveti nalazi se sterilan jastučić, a u većoj epruveti centrifugiranjem dobivamo uzorak sline. Uzimanje uzorka provodi se stavljanjem sterilnog jastučića u usta, izravno iz epruvete, potom se postupkom žvakanja, na neagresivan način, jastučić puni slinom u trajanju od 1 minute, te ponovno vraća izravno iz usta u epruvetu. Treće uzorkovanje provodili smo 15 minuta nakon drugog uzorkovanja ponovno na

pasivan način. Postupak uzorkovanja sastojao se od sakupljanja sline u ustima tijekom vremena od jedne minute i ispitanik je potom ispljunuo slinu kroz stakleni lijevak u plastičnu epruvetu koja se potom začepila čepom. Nakon uzorkovanja slijedi centrifugiranje na standardnoj centrifugi na 3500 okretaja 10 minuta (u centrifugi promjera 30 cm). Centrifugiranjem smo dobili od 1.1 ± 0.3 ml uzorka sline. Centrifugirane uzorke potom smo pohranili u hladnjak do dana analiziranja, 25.08.2015.

Slika 5.Salivette- preuzeto sa:
http://cvi.asm.org/content/5/4/419.full

3.2.2. Određivanje koncentracije α-amilaze u slini Amy metodom

Prije analize uzorke sline bilo je potrebno razrijediti. Razrijeđenje smo radili u omjeru 1:1000. Po uzorku smo uzimali 950 µl destilirane vode i 50 µl uzorka. Potom smo razrijeđene uzorke stavili u epruvete za analizu na automatskom biokemijskom analizatoru Dimension expand (Siemens, Njemačka).

Amy metoda koristi kromogeni supstrat 2-kloro-4-nitrofenol obilježen sa maltotriozom. α-amilaza direktno reagira sa supstratom, te nastaje 2-kloro-4-nitrofenol koji se određuje spektrofotometrijski.

α-amilaza katalizira hidrolizu sintetskog supstrata 2-kloro-4-nitrofenil-a-D-maltotriozida CNPGD3). Nakon inkubacije od 70 sekundi na 37 °C, slijedi apsorbancija uz formiranje 2-

kloro-4-nitrofenola (CNP). Apsorbancija se mjeri na 405 nm te sekundarnom korekcijskom valnom duljinom od 577 nm.

Proizvođač reagensa ugodio je metodu za određivanje ukupne α-amilaze (pankreatične i salivarne) u serumu/plazmi i u mokraći. Mjerno je područje je od 0 do 2000 U/L, a za kliničke slučajeve visokih koncentracija, osobito u mokraći, predviđen je postupak razređivanja uzorka. Slina kao uzorak nije predviđena pa nije spomenuta u uputama regencije. U slini su visoke koncentracije salivarne amilaze što podrazumijeva da primjena ovakvog reagensa zahtjeva veća razređenja nego ona koja se primjenjuju za visoke koncentracije amilaze u serumu i mokraći. Interferencije su u slini manje izražene nego li mogu biti u serumu ili mokraći zbog niskih koncentracija metabolita i supstrata, a pogotovo uz velika razređenja. Stoga nije bilo opasnosti od interferenata, a slina je razređivana tako da je mjerenje bilo omogućeno u mjernom području metode.

3.2.3. Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v. 12.2.1.0.. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Metodom deskriptivne analize prikazane su karakteristike skupova podataka, a Kruskal Wallisovim testom, inačicom ANOVA testa za neparametrijske uzorke, uspoređivani su skupovi podataka za tri vrste uzoraka.

Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije r prema Coltonu

KOEFICIJENT KORELACIJE (r)	**POVEZANOST**
0 do ± 0,25	Nema povezanosti
± 0,26 do ± 0,50	Slaba povezanost
± 0,51 do ± 0,75	Umjereno do dobra povezanost
± 0,76 do ± 1	Dobra do izvrsna povezanost

Ako distribucija podataka ne bude slijedila Gaussovu raspodjelu koristi ćemo neparametrijske testove te podatke opisivati medijanom i rasponom izmjerenih vrijednosti. Za ispitivanje povezanosti varijabli korišten je statistički postupak po Pearsonu ili Spearmanu za parametrijske, odnosno neparametrijske testove s pripadajućim koeficijentom korelacije r i njegovom statističkom značajnošću P. Koeficijenti korelacije tumačili smo prema Coltonu (Tablica 1.). Modelom linearne regresije procjenjivali smo ovisnu varijablu prema predikcijskoj na razini statističke značajnosti $P<0,05$. Koeficijentom determinacije (R^2) utvrđivali smo u kojoj je mjeri matematički model primjenjiv za predviđanje ovisne varijable. Rezultati su prikazani grafičkim prikazom histograma kojim se ilustrira slijedi li skup podataka Gaussovu krivulju. Zatim, pravcem regresije jednadžbom $y = a + bx$, gdje „a“ predstavlja odsječak na osi y u kojem pravac siječe ordinatu, a „b“ nagib pravca, tj. porast na osi y za jedinični porast na osi x, uz naznačenegranice pouzdanosti od 95% i granice predviđenih vrijednosti od 95%.

Za usporedbu varijabli korišten je neparametrijski ANOVA test. Često korišteni testovi u okviru neparametrijskih inačica za više nezavisnih uzoraka su prošireni medijan test, te posebno Kruskal-Wallis test (K-W). Kruskal-Wallis test je u osnovi zamjena za analizu varijance. Za razliku od analize varijance K-W test koristi rangove umjesto 'sirovih' podataka. K-W test koristi više informacija od proširenog medijan testa, te je po svojoj prirodi 'snažniji' test. Prema tome, može se dogoditi da prošireni medijan test ne pokaže značajnu razliku između više uzoraka u promatranom mjerenju, dok isti rezultati kod K-W testa pokazuju značajnu razliku. Kruskal-Wallis test u osnovi uspoređuje medijane dvaju ili više nezavisnih uzoraka. Značajn rezultat testa znači statistički značajno različite medijane. Interpretacija K-W testa jednaka je interpretaciji analize varijance, osim što je K-W test neparametrijski test baziran na medijanu, a ne na aritmetičkoj sredini. Tipična situacija kada koristimo Kruskal-Wallis test je: podaci su nezavisni, podaci mogu biti ordinalni, distribucije podataka ne moraju biti normalne, varijance pojedinih skupina rezultata ne moraju biti jednake, uzorci trebaju biti slične, ali ne nužno i jednake veličine. Svi rezultati interpretirat će se na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Deskriptivna statistika ispitivanih skupina

U Tablici 2. prikazani su rezultati dobiveni određivanjem sAA u tri točke najprije pasivnom metodom uzimanja sline, zatim stimulirajućom metodom uzimanja sline uz pomoć Salivetta te ponovno pasivnom metodom uzimanja sline. Prikazani su statistički podatci koji uključuju srednje vrijednosti koncentracije sAA te pripadajuće standardna devijacija (SD), medijan, minimum i maksimum, broj ispitanika i dob ispitanika te testiranje normalnosti distribucije podataka. Sve rezultate interpretirali smo na razini statističke značajnosti $P < 0.05$. Dobivene P vrijednosti pokazuju da skupine podataka ne slijede normalnu distribuciju osim podataka za 3. etapu uzorkovanja.

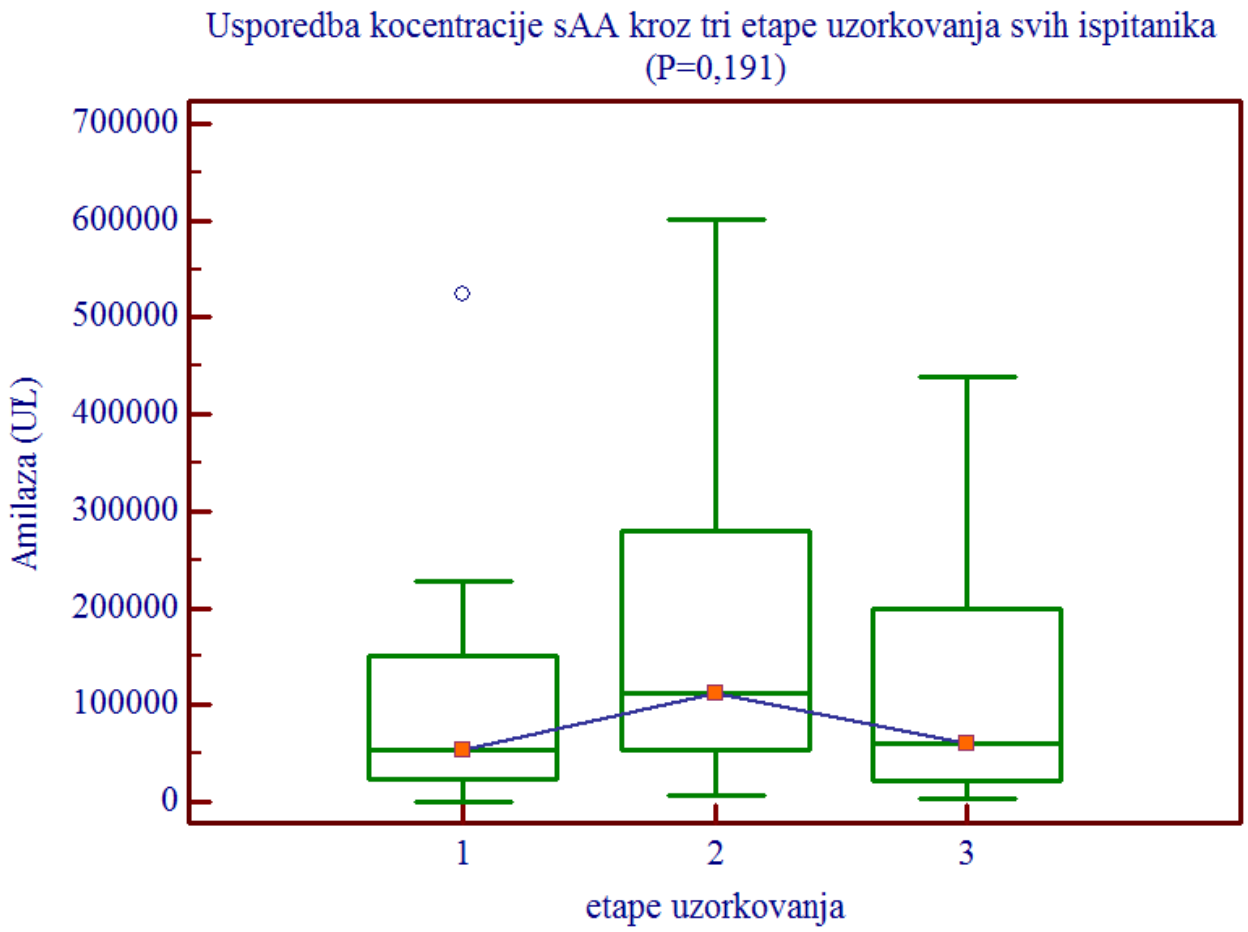
Tablica 2. Prikaz rezultata koncentracije sAA u uzorcima sline sakupljenih pasivnom i stimulacijskom metodom

	AMY (U/L)			dob (godine)
etape uzorkovanja	1	2	3	
N	26	26	26	26
Srednja vrijednost	98.217	158.186	123.367	29
95% CI	52741,68 - 143693,85	99051,05 - 217321,48	70292,61 - 176442,30	24 - 34
SD	112.590	146.407	131.403	13
Median	54.140	112.116	59.791	24
95% CI	34787,71 - 126550,35	54,67 – 207,44	29,40 – 178,57	23, - 26
Minimum	401.000	5.871	3.345	16
Maksimum	523.380	601.440	438.740	63
5 - 95 P	1.452 – 286.308	10.519 – 419.944	6.277 – 398.788	18- 62
Testiranje normalne distribucije	<0,0001	0,0065	0,0607	<0,0001

1 = pasivno uzorkovanje; 2 = uzorkovanje sustavom Salivetta; 3 = pasivno uzorkovanje 15 min nakon stimulacije Salivettom

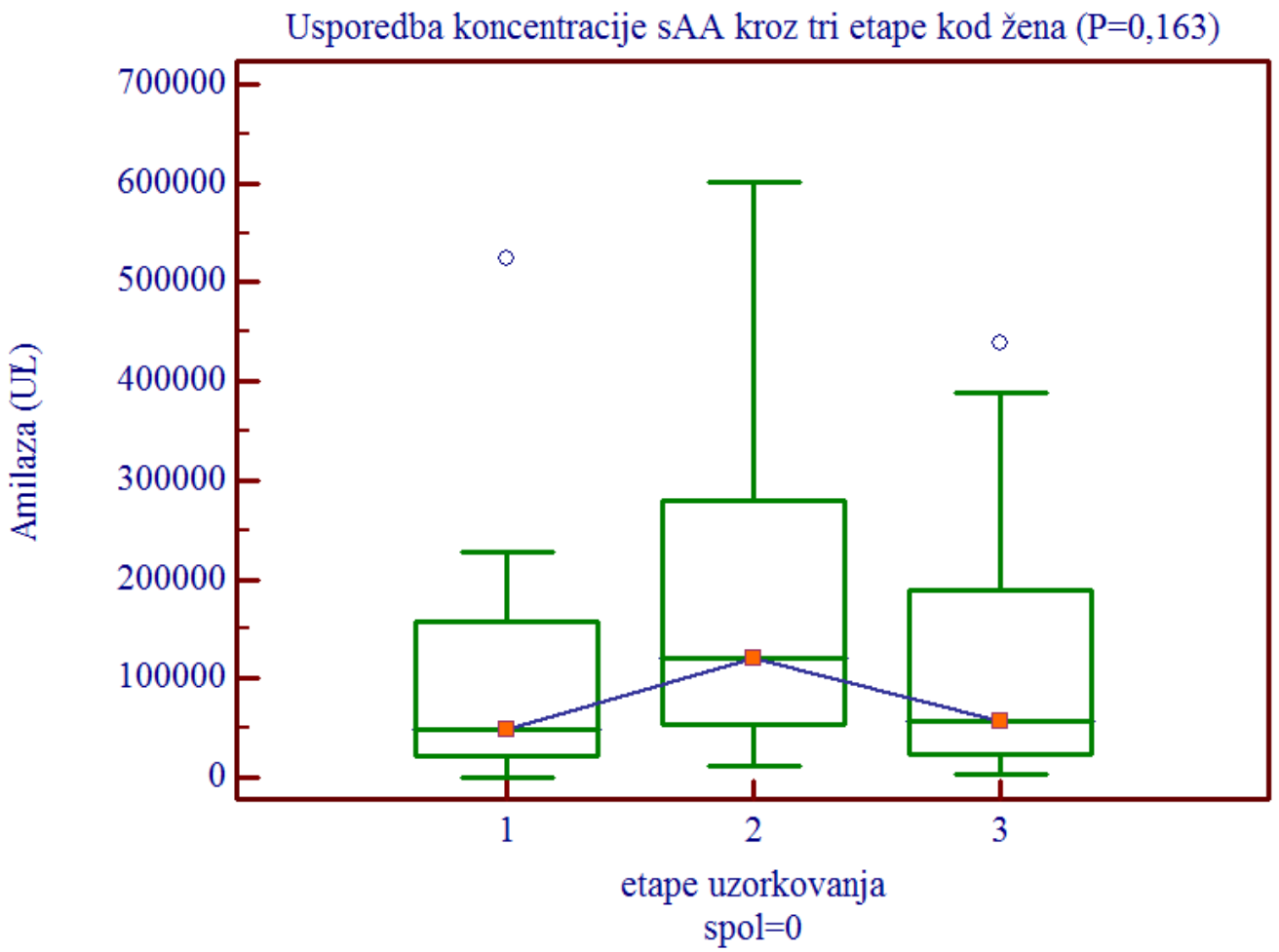
4.2. Usporedba koncentracije α-amilaze između spolova i između pojedinih uzorkovanja

Statistički smo interpretirali rezultate prema vrijednosti $P < 0.05$ te nismo dobili statističku značajnost za vrijednosti sAA među ovim skupinama. Rezultati tih mjerenja prikazani su na Slici 6., 7. i 8. gdje centralni zeleni kvadrat obuhvaća vrijednosti od 25. do 75. percentile, središnja crta u kvadratu predstavlja medijan, narančastom točkicom označena je srednja vrijednost, horizontalne linije se protežu od minimuna do maksimuma isključujući „outside“ (1,5 puta veće od interkvartilne vrijednosti) i „far out“ vrijednosti (3 puta veće od interkvartilne vrijednosti koje se prikazuju kao zasebne točke). Plavom linijom povezane su središnje vrijednosti dviju skupina. Na navedenim slikama može se uočiti da je vrijednost sAA nakon prvog pasivnog uzorkovanja na slijedećem stimuliranom uzorkovanju porasla te na pasivnom uzorkovanju nakon stimuliranog uzorkovanja opet pala. Ta vizualna impresija međutim nema statističko uporište. Usporedbom koncentracija sAA između pojedinih uzorkovanja gdje su sudjelovali svi ispitanici nismo dobili statističku značajnost prema vrijednosti P koja iznosi $P=0,191$. Usporedbom koncentracija sAA između pojedinih uzorkovanja između žena dobivana je vrijednost $P=0,163$, a između muškaraca $P= 0,960$ što dokazuje da ne postoji statistička značajnost ni za usporedbu ovih dviju skupina, odnosno da ne postoji razlika između spolova.



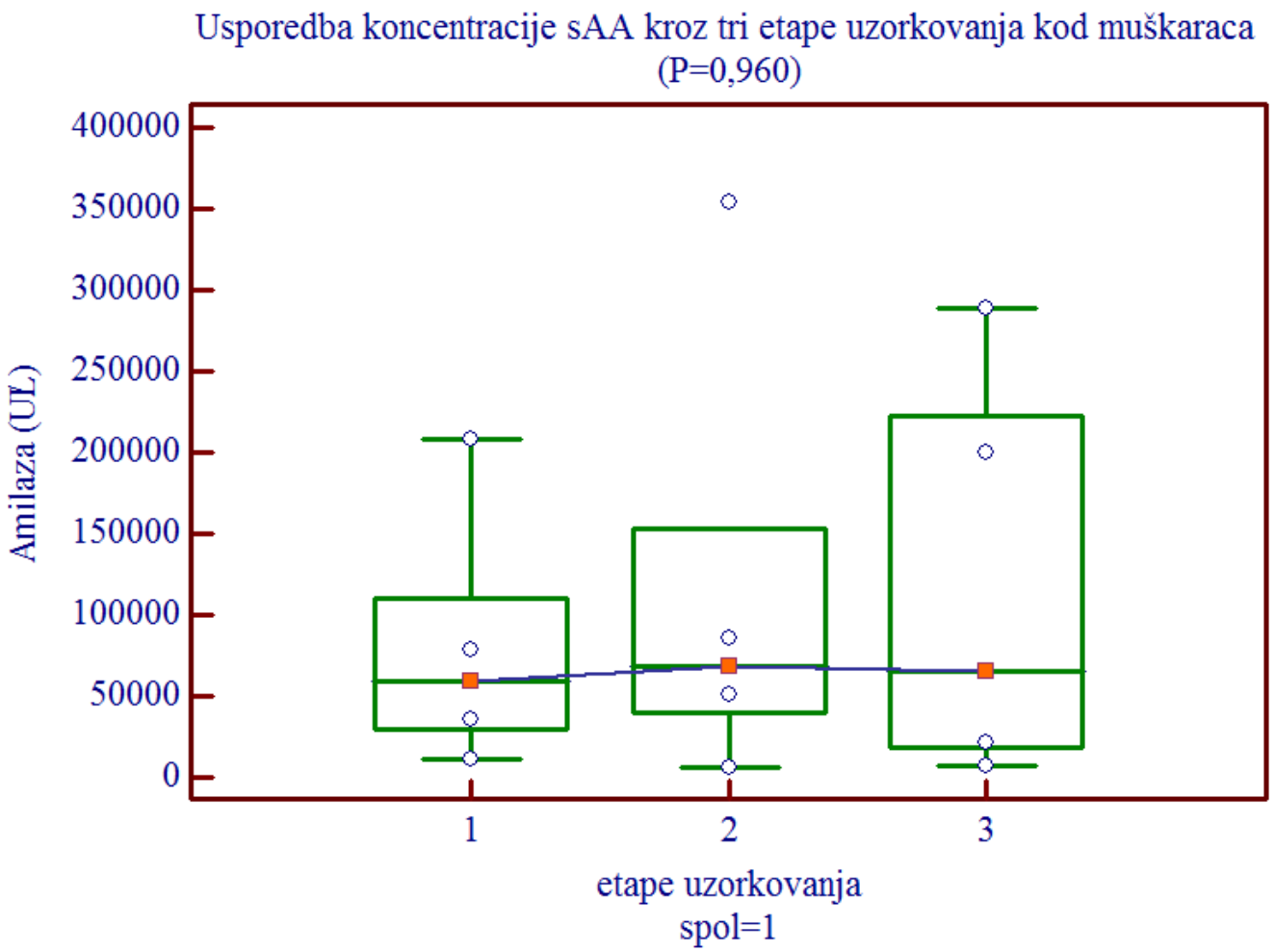
Slika 6. Prikaz usporedbe koncentracije sAA u tri vrste uzorkovanja sline za sve ispitanike (N=26)

1 = pasino uzorkovanje; 2 = uzorkovanje stimulirano sustavom Salivette; 3 = pasivno uzorkovanje 15 min nakon stimulacije Salivettom



Slika 7. Prikaz usporedbe koncentracije sAA u tri vrste uzorkovane sline za ženske ispitanike (N=21)

1 = pasino uzorkovanje; 2 = uzorkovanje stimulirano sustavom Salivette; 3 = pasivno uzorkovanje 15 min nakon stimulacije Salivettom; Spol 0 = ženski spol



Slika 8. Prikaz usporedbe koncentracije sAA u tri vrste uzorkovanja sline za muške ispitanike (N=5)

1 = pasino uzorkovanje; 2 = uzorkovanje stimulirano sustavom Salivette; 3 = pasivno uzorkovanje 15 min nakon stimulacije Salivettom; Spol 1 = muški spol

4. 3 Povezanost koncentracije α-amilaze sa životnom dobi

Mogući utjecaj životne dobi ispitali smo korelacijskim testom prema Spearmanu. Rezultati su pokazali da ne postoji povezanost (r=0,0362; P=0,8608). Premda smo imali široki raspon dobi, moramo naglasiti da je broj ispitanika nedovoljan da bismo bili sigurni da ne postoji povezanost.

5. Rasprava

Posljednih desetak godina slina je postala vrlo popularan laboratorijski uzorak, radi samog načina uzorkovanja koji je u odnosu na dobivanje ostalih uzoraka neinvazivan i brz te se može provesti pod nadzorom bilo koje educirane osobe. Prednost sline u odnosu na urin koji se također dobiva neinvazivnim načinom i sadrži brojne analite (metabolite lijekova, hormone, proteine) je u tome što u njoj nalazimo analite u njihovom aktivnom obliku te zbog toga koncentracije analita određivanih u slini dobro koleriraju s koncentracijama tih analita u serumu/plazmi. Salivarni biomarkeri popularniji su u istraživanjima vezanim za stres jer je dokazano da su bolji od provođenja testiranja biomarkera iz krvi (Yi, Moochhala, 2013.). Napretkom u području imunologije i molekularne biologije znanstvenici su pronašli nove načine analiziranja salivarnih biomarkera i njihove primjene u istraživanjima stresa. sAA i salivarni kortizol odabrani su za biljege kojima je moguće procijeniti razinu stresa jer su mnoga istraživanja pokazala njihovu obećavajuću primjenu (Yi, Moochhala, 2013.). O stresu se danas puno govori, drži se da je bolest modernog doba i da je odgovoran za nastanak mnogih akutnih i kroničnih bolesti, uključujući sveprisutnije kardiovaskularne, gastrointestinalne, imunološke, psihičke, metaboličke i maligne bolesti. Stres može nastati kao posljedica različitih stresora bilo da su oni psihičke ili fizičke prirode kao npr. buka, intenzivno vježbanje,bavljenje ekstremnim sportovima, fizičko ili psihičko zlostavljanje, nesuglasice u obitelji, s prijateljima ili kolegama. Kako se u potrazi za sličnim neinvazivnim biljegom mentalnog i fizičkog stresa koji će biti pokazatelj aktivacije SAM osovine, najbolje je rezutate pokazala koncentracija sAA čije se lučenje poremeti u stresnim okolnostima. Sekreciju sAA, enzima važnog za probavu ugljikohidrata, snažno neurohumoralno nadzire simpatikus. Stoga je utemeljena pretpostavka da sAA odražava aktivnost simpatikusa.

Vrlo slične studije provođene su proteklih godina kao npr. istraživanje 2014. (Van den Bos i sur., 2014.). Njihovu ispitivanu skupinu činilo je 49 zdravih muškaraca i 34 zdrave žene. Koncentracije salivarnog kortizola pozitivno i snažno koreliraju kod muškaraca u rizičnim situacijama što je značajno različito od slabe negativne povezanosti u rizičnim situacijama kod žena. Za razliku od negativne korelacije s kortizolom kod žena je zapaženo da α-amilaza pozitivno korelira s rizikom posla koji im je bio zadan. Ovim israživanjem možemo zaključiti da su koncentracije α-amilaze bile to veće što je veći bio stres, te da takav zaključak možemo primjeniti samo za žene, muškarci su imali negativnu korelaciju α-amilaze sa stresom.

U istraživanju Wolfa i suradnika (Wolf, 2007.) uspoređivana je vrijednost salivarnog kortizola i sAA kod zdrave djece i djece s astmom te je dobiveno da kronični stres i astma uzrokuju povišene vrijednosti salivarnog kortizola i snižene vrijednosti sAA u djece sa astmom u odnosu na zdravu djecu. U istraživanju je sudjelovalo 45 zdravih ispitanika od toga 24 dječaka i 21 djevojčica, te 47 astmatičara od čega 31 dječak i 16 djevojčica. Na temelju istraživanja vidljivo je da bolesna djeca asmatičari imaju snižene vrijednosti sAA te se takve vrijednosti mogu pripisati stresu na staničnoj razini kod bolesne djece gdje bi se dalo zaključiti da bolešću stječemo određenu vrstu stresa i da nam vrijednosti sAA ukazuju na povećan stres u odnosu na zdravu djecu.

U istraživanju (Van Stegeren, 2008.) u kojem je sudjelovalo 40 zdravih osoba, 11 muškaraca i 29 žena koji su bili izloženi stresu na način da su držali ruku 10-20 minuta u vodi sa kockicama leda. Muškarci su imali više koncentracije sAA od žena za vrijeme istraživanja što ukazuje na razliku koncentracije između spolova (snižene u odnosu na kontrolnu skupinu). Međutim, ona nije statistički značajna. Također, praćene su na isti način i koncentracije salivarnog kortizola gdje se pokazalo da spol nema utjecaj na koncentracije kortizola, no koncentracije kortizola u odnosu na kontrolnu grupu bile su povišene. I ovom studijom možemo zaključiti da se u stresnim situacijama koncentracija sAA smanjuje, ali možemo također i primjetiti da postoje razlike u izlučivanju sAA po spolovima. Razlike salivarne alfa amilaze po spolovima pokazuju da su koncentracije kod muškaraca bila nešto veće nego kod žena što znači da su žene doživjele veći stres uranjanjem ruke u ledenu vodu.

Istraživanje (Williamson, 2012.) je pokazalo da nema značajne korelacije između vrijednosti citokina u uzorcima plazme i uzorcima sline uzete filter papirom. Između uzoraka plazme i uzoraka sline uzorkovane pasivnim načinom statistički povezana bila su samo tri citokina (Il-6, IFN-gamma i MIP-1 beta). Uspoređivanjem uzoraka sline uzorkovane pasivnim načinom i uzorkovanjem sline na filter papir statistički značajna povezanost pronađena je kod 16 od ukupno 27 testiranih citokina, uključujući : IL-1beta, IL -1ra, IL -4, IL -7, IL -8, IL -9, IL -10 IL -12, IL -13, IL -15, G -CSF, IFN -gamma, IP-10, MCP -1, MIP -1beta i VGF. Ovom studijom može se zaključiti da način uzorkovanja sline ne utječe na rezultate kocentracija citokina.

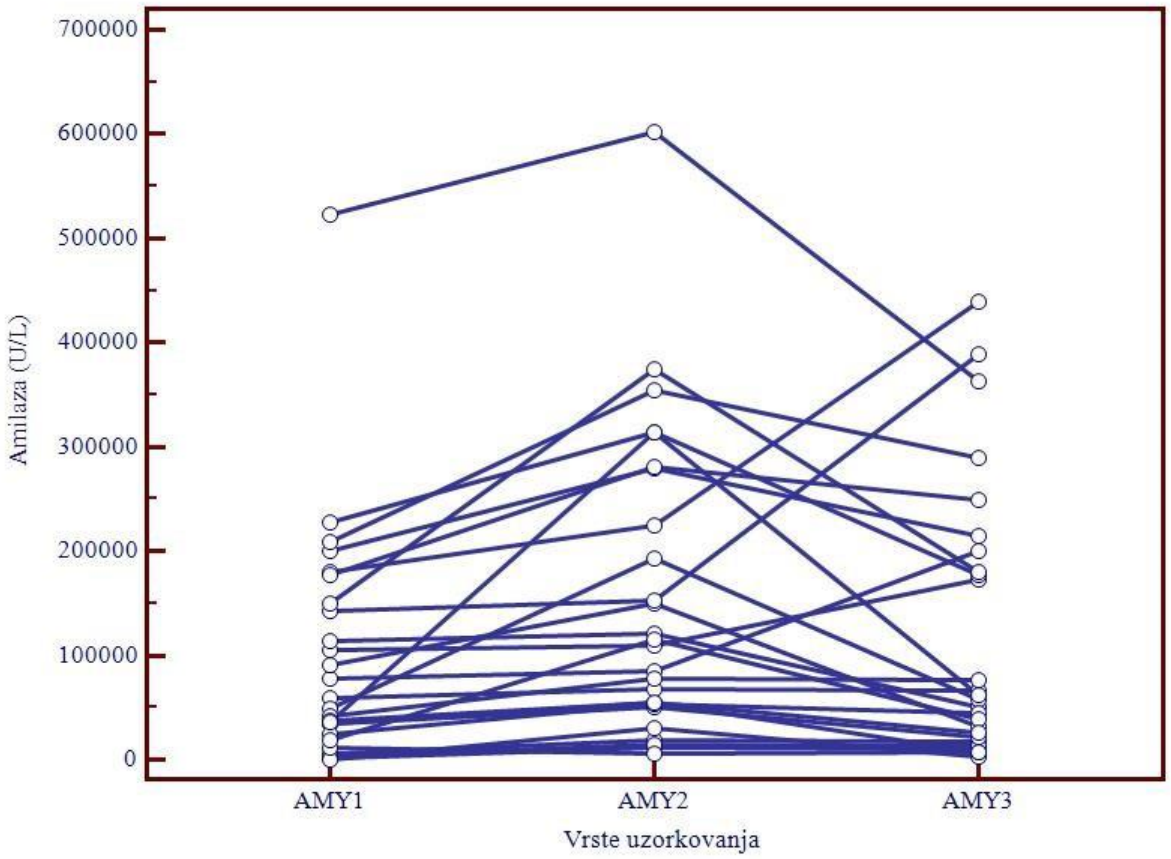
U istraživanju (Jessie i sur.; 2010.) pokazalo se da se slina uzeta pušačima i nepušačima značajno ralikuje te da su u slini pušača prisutni antagonisti receptora interleukina 1, tioredoksin i lipokalin-1, a također su prisutne i promijenjene izoforme lipokalina-1.

Istraživanje ukazuje da bi se spomenuti proteini mogli koristiti kao markeri rizika od nastanka bolesti uzrokovanih duhanom.

Vrlo zanimljivo istraživanje (Stegener i sur., 2005.) dizajnirano je na način da su ispitanici podijeljeni u dvije grupe, svim ispitanicima na početku je izmjeren tlak i broj otkucaja srca te su rezultati pokazali da ispitanici nemaju probleme sa tlakom. Potom je jednoj grupi ispitanika dan placebo, a drugoj grupi ispitanika beta-blokator. Nakon 90 minuta uzorkovana je slina sistemom Salivetta. Rezultati su pokazali da su ispitanici koji su primili beta-blokator imali niže koncentracije sAA od onih koji su primili placebo.

Primjena markera iz sline vrlo je široka, te postoji mogućnost da će biomarkeri iz sline predviđati rizik od nastanka akutnog infarkta miokarda te tip 2 dijabetesa (Rahim i sur.; 2014.) .

Koncentracije amilaze koje je polučilo ovo istraživanje podudaraju se s nekim sličnim istraživanjima (Valls i sur., 2012.), a dok se s nekim drugima ne slaže u potpunosti (Anda van Steregan i sur, 2006.). U literaturi smo pronašli iste zaključke da način uzorkovanja ne utječe na rezultate određivanja mnogih analita (Williamson, 2012.) te da mogući akutni stres prouzrokovan mehaničkim stimulusom pamučnog jastučića ne utječe značajno na promjenu sastava sline. Premda smo dokazali da nema statistički značajne razlike, moramo uočiti da promjena u koncentraciji nakon stimuliranja znatno smanjuje raspršenost rezultata i velike koncentracijske razlike između ispitanika. Dok su se u prvom uzorkovanju minimalne i maksimalne vrijednosti razlikovale 1300 puta, u drugom su se smanjila na 100 puta, a u trećem povećala na 130 puta. To nam pokazuje da su se niske bazične vrijednosti pasivnog uzorkovanja puno više narasle i približile se vrijednostima onih ispitanika koji su imali početne visoke vrijednosti. Nakon stresa mehaničkim, a vjerojatno i psihičkim stimulusom, u većine ispitanika vrijednosti su se počele vraćati na niže. No, u nekih su i dalje rasle (Slika 9.) što se dade naslutiti da je stimulacija zbroj fiziološkog i psihološkog te da je varijabilna reakcija ispitanika uvjetovana dvjema varijablama - fiziološkoj i psihološkoj, kako je i svojstveno biologiji.



Slika 9. Koncentracije sAA prikazane za svakog ispitanika u tri načina uzorkovanja sline AMY1 = pasino uzorkovanje; AMY2 = uzorkovanje stimulirano sustavom Salivette; AMY3 = pasivno uzorkovanje 15 min nakon stimulacije Salivettom; Spol 1 = muški spol

6. Zaključci

1. Nije dokazan statistički značajan utjecaj na koncentraciju salivarne alfa-amilaze nakon stimulacije pamučnim valjkom u odnosu na pasivno uzorkovanje prije i poslije stimulacije.
2. Zabilježen je porast koncentracije salivarne alfa-amilaze nakon stimuliranog uzorkovanja, ali nije statistički značajan.
3. Porast koncentracije alfa-amilaze nakon stimuliranog uzorkovanja pokazuje da je postoji fiziološka reakcija, ali nedovoljna da bi se statistički dokazala.
4. Ne postoji statistički značajna razlika između koncentracije alfa-amilaze kod žena i kod muškaraca. Međutim, skupina ispitanika muškog spola bila je vrlo mala.
5. Dinamika koncentracije alfa-amilaze ovisno o načinu uzorkovanja jednako se razvijala kod oba spola.
6. Nije pronađena povezanost između koncentracije salivarne alfa-amilaze i životne dobi.
7. Razina koncentracije salivarne alfa-amilaze nije se mogla ocijeniti u odnosu na referentne intervale jer istraživanja daju različite rezultate za zdravu populaciju.
8. Budući da je salivarna alfa-amilaza vrlo osjetljiv biljeg stresa, zaključujemo da mehaničko stimuliranje sline neće utjecati na sastav sline, odnosno na rezultate određivanja i drugih analita.

8. Popis literature

1. Anda van Steregan, Rohleder Nicolas, EveraerdWalter, Wolf Oliver T. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress : Effect of betablockade. Psychoneuroendocrinology.2006;13-141.
2. Anđić J. Oralna homeostaza, Rijeka, Nauka; 2000, str.2-14.
3. Arhakis A, Karagiannis V, Kalfas S. Salivary alpha-amylase activity and salivary flow rate in young adults. Open Dent J. 2013;7:7-15.
4. Axelsson P. Diagnosis and risk prediction of dental caries. Quintessence books. 2000.
5. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. J Endocrinol. 2009;200:3-22.
6. Gröschl M. Current Status of Salivary Hormone Analysis. Clin Chem. 2008;54:11, 1759-1769.
7. Havelka M, Zdravstvena psihologija, Zagreb, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1995.
8. http://cvi.asm.org/content/5/4/419.full, pristupljeno 15.02.2016.
9. http://www.zdravljeizprirode.hr/tema.php?id=19, pristupljeno 29.12.2015.
10. Hudek-Knežević J, Kardum I. Psihosocijalne odrednice tjelesnog zdravlja, Stres i tjelesno zdravlje, Naklada Slap, Sveučilište u Rijeci, 2005.
11. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85:162-169.
12. Jessie K., Pang W.W., Rahim Z.H.A., Hashim O.H. Proteomic Analysis of Whole Human Saliva Detects Enhanced Expression of Interleukin-1 Receptor Anatgonist, Thioredoxin and Lipocalin-1 in Cigarette Smokers Compared to Non-Smokers. Molecular Science. 2010; 4488-4505.
13. Lipovec R., Radiček M. Povezanost salivarnih biokemijskih biljega stresa s psihološkim pokazateljima i stupnjem tjelesne aktivnosti u studentskoj populaciji, Sveučilište u Zagrebu, 2014.
14. Marković M, Slina: uzorak u temeljnim i kliničkim istraživanjima, Zagreb, 2013.
15. Scannapieco FA, Torres G, Levine MJ. Salivary α-amylase: Role in dental plaque and caries formation. Crit Rev Oral Biol Med.1993;4:301-7.
16. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. Crit Rev Oral Biol Med. 1995;6:161-75.

17. Šupe S, Poljaković Z, Kondić Lj, Unušić L, Alvir D. Neurološke osnove stresa i rizik razvoja moždanog udara. Neurol. Croat. Vol. 60. 1. 2011; 21-28.
18. Uputstvo za upotrebu, Dimension® clinical chemistry system, Flex® reagent cartride, 18.04.2012.
19. Williamson S., Munro C., Pickler R., Grap M.J., Elwick R.K. Comparision of Biomarkers in Blood and Saliva in Healty Adults. Researc Article.2012.
20. Wolf JM, Nicholls E, Chen E. Chronic stress, salivary cortisol, and α-amylase in children with asthma and healthy children. Biol Psychol. 2008;78:20-8.
21. Yia TC, Moochhalab S. Mini-Review Article – Current Opinion on Salivary Biomarkers as a Measurement for Stress and Fatigue. The Open Biomarkers Journal. 2013;6: 9-14.

9. Sažetak

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava. Izlučevina je iz velikih i malih žlijezda slinovnica, čijim lučenjem upravlja autonomni živčani sustav.

SŽS ima najznačajniju ulogu u regulaciji salivacije. U inervaciji žlijezda slinovnica sudjeluju simpatikus i parasimpatikus, ali je presudan utjecaj parasimpatikusa.

Ukupna slina je karakterizirana pisutnošću enzima amilaze u velikim količinama.Po prestanku stimulacije i lučenja ukupne sline, smanjuje se količina izlučene salivarne amilaze, salivacija prelazi u fazu mirovanja, kada se izlučuju male količine tzv. bazalne ukupne sline.

Jedina praktična metoda sakupljanja sline je mješana slina koje se koristi za rutinske potrebe, za istraživanja otvorenog tipa te kod uzimanja uzoraka vanjskih pacijenata.

Zbog svog sastava, ukupna slina je pogodna za cijeli niz dijagnostičkih postupaka. Činjenica da se u slini nalaze komponente plazme omogućuje njihovu detekciju i kvantifikaciju iz uzorka sline.

Stres jestanje u kojem je poremećena unutrašnja (psihofiziološka) ravnoteža organizma i koje zahtjeva ulaganje dodatnih napora radi prilagodbe.

Trenutno se u istraživanju stresa koristi nekoliko salivarnih biomarkera kao što su: koncentracije salivarnog kortizola, sAA, sIgA i dehidroepiandrosteron (DHEA).

Koncentracija sAA je neovisna o količini proizvedene sline. Značajno je da je koncentracija ovog enzima u slini proporcionalna koncentraciji IgA, a obrnuto proporcionalna stupnju stresa. sAA se koristi kao marker stresa, te je visoko osjetljiv u stresnim situacijama uključujući i psihički stres (npr. izloženost pacijenta slikama koje potiču negativne emocije, rješavanje psiholoških testova)te fizički stres (npr. vožnja biciklom, trčanje, izloženost hladnoći).

Cilj je ovog rada izmjeriti u slini koncentracije α-amilaze biokemijskog pokazatelja stresa, u zdravoj populaciji. Nadalje, želimo provjeriti postoje li razlike u vrijednostima α-amilaze uzorkovane na pasivan način, te na stimuliran pomoću Salivetta i postoji li razlika u slini koju uzimamo na pasivan način, a da je pacijentu prethodno uzorkovana slina stimuliranom metodom.

Nije dobivena statistički značajna povezanost na utjecaj koncentracije salivarne alfa amilaze ako prije pasivne metode uzorkovanja provodimo stimuliranu, iako je zabilježen porast koncentracije salivarne alfa amilaze nakon stimuliranog uzorkovanja

Ključne riječi: slina, salivarna alfa amilaza, stres

10. Summary

Saliva is bodily fluid of complex composition. It is excreeted from large and small salivary glands, whose production is controlled by autonomous nervous system.

Central nervous system has main role in regulation of salivation. Both sympaticus and parasympaticus innerve salivary glands, but parasympaticus has crucial influence.

Total saliva is characterised with presence of amylase in large quantities. When stimulation and salivating of all saliva ends, quantity of excreeted salivary amylase drops and salivation is in stagnation phase, when small quantity of so called basal saliva is excreeted. One practical method of colelcting saliva is mixed saliva which is used for routine, for open-type research and for sample collection of external patients.

Because of its composure, total saliva is acceptable for a lot of diagnostic methods. The fact that some components from plasma are found in saliva allows their detection and quantification from sample of saliva.

Stress is a state of uneven internal (psycophisiological) balance of organism which requres extra measures for adjustment.

Currently, in research of stress, several salivary biomarkers are used, like: concentration of salivary cotisole, sAA, sIgA and dehydroepiandrosterone (DHEA).

sAA concentration is not affected by quantity of produced saliva. It is important to know that concentration fo this ensyme in saliva is proprtional to IgA concentration, and inversely proportional to level of stress. sAA is used as stress marker, and is highly sensitive in stress situations which include psyhical stress (for example exposure of patient to pictures which invoke negative emotions, sloving psychological test) and physical stress (for example riding bike, running, exposure to cold).

Aim of this thesis is to measure salivary concentration of alpha amylase, biochemical stress marker, in healthy population. Also, we want to see whether there are differences in values of alpha amylase in saliva sample taken by passive way, and taken by using Salivetta and to see whether there is difference in taking sample of saliva passively, but patient had previosly given saliva sample by stimulation method.

In work I didn't get the statistical significant correlation on the impact on the concentration of salivary alpha amylase when we conduct stimulative method before passive however salivary alfa amylase was higher after stimulative sampling.

Key words: saliva, salivary alpha amylase, stress

11.Prilozi

Popis kratica

CNS - centrani nervni sustav

DHEA- dehidroepiandrosteron

DZ - dom zdravlja

G-CSF - stimulirajući faktor rasta kolonija

HIV - virus humane imunodeficijencije

HPA - hipotalamusno-hipofizna-adrenalna osovina (engl.*hypotalamis-pituarity-adrenocortical-axis*)

IFN-gamma - interferon- gamma

IL - 10 - inteleukin 10

IL - 12- interleukin 12

IL - 13 - interleukin 13

IL - 7 - inteleukin 7

IL - 9 - inteleukin 9

IL -15- interleukin 15

IL -4 - inteleukin -4

IL -8 -inteleukin 8

IL-1beta - interleukin -1beta

Il-6 - inteleukin 6

IP-gamma- interferonom induciran protein - gamma

KBC - klinički bolnički centar

MCP-1 - monocitni kemotaktni protein -1

MIP-1 beta - makrofag upalni protein -1 beta

sAA – alfa amilaza u slini (engl. *alpha amylase saliva*)

SAM - simpato-adrenalno-medularna osovina (engl. *symatho-adrenomedullary-axis*)

sIgA - imunoglobulin A u slini

SŽS – središnji živčani sustav

VEGF - vaskularni endotelni faktor rasta

WHO – svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization)*

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za KBC Sestre Milosrdnice
Vinogradska cesta 29, 10 000 Zagreb

Diplomski rad

Aktivnost salivarne α-amilaze u ovisnosti o metodi uzorkovanja

Marija Radiček

SAŽETAK

Slina je tjelesna tekućina složenog sastava. Izlučevina je iz velikih i malih žlijezda slinovnica, čijim lučenjem upravlja autonomni živčani sustav. Ukupna slina je karakterizirana pisutnošću enzima amilaze u velikim količinama. Zbog svog sastava, ukupna slina je pogodna za cijeli niz dijagnostičkih postupaka. Činjenica da se u slini nalaze komponente plazme omogućuje njihovu detekciju i kvantifikaciju iz uzorka sline. Stres je stanje u kojem je poremećena unutrašnja (psihofiziološka) ravnoteža organizma i koje zahtjeva ulaganje dodatnih napora radi prilagodbe. Trenutno se u istraživanju stresa koristi nekoliko salivarnih biomarkera kao što su: koncentracije salivarnog kortizola, sAA, sIgA i dehidroepiandrosteron (DHEA). sAA se koristi kao marker stresa te je visoko osjetljiv u stresnim situacijama uključujući i psihički stres te fizički stres. Cilj je ovog rada izmjeriti u slini koncentracije α-amilaze biokemijskog pokazatelja stresa, u zdravoj populaciji. Nadalje, želimo provjeriti postoje li razlike u vrijednostima α-amilaze uzorkovane na pasivan način te na stimuliran pomoću Salivetta i postoji li razlika u slini koju uzimamo na pasivan način, a da je pacijentu prethodno uzorkovana slina stimuliranom metodom. Nije dobivena statistički značajna povezanost na utjecaj koncentracije sAA ako prije pasivne metode uzorkovanja provodimo stimuliranu, iako je zabilježen porast koncentracije salivarne sAA nakon stimuliranog uzorkovanja.

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

Rad sadrži: 32 stranica, 5 grafičkih prikaza, 2 tablica i 21 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Slina, salivarna alfa amilaza, stres

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesororica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Suzana Inić, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2016.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: medical biochemistry and laboratory medicine
Department of UHC Sestre Milosrdnice
Vinogradska cesta 29, 10 000 Zagreb

Diploma thesis

Activity of alpha amylase in dependence of the sampling method

Marija Radiček

SUMMARY

Saliva is bodily fluid of complex composition. Total saliva is characterised with presence of amylase in large quantities. Because of its composure, total saliva is acceptable for a lot of diagnostic methods. The fact that some components from plasma are found in saliva allows their detection and quantification from sample of saliva. Stress is a state of uneven internal (psycophisiological) balance of organism which requires extra measures for adjustment.Currently, in research of stress, several salivary biomarkers are used, like: concentration of salivary cotisole, sAA, sIgA and dehydroepiandrosterone (DHEA). sAA is used as stress marker, and is highly sensitive in stress situations which include psyhical stress and physical stress. Aim of this thesis is to measure salivary concentration of alpha amylase, biochemical stress marker, in healthy population. Also, we want to see the differences in values of alpha amylase in saliva sample taken by passive way, and taken by using Salivetta and to see if there is difference in taking sample of saliva passively, but patient had previosly given saliva sample by stimulation method. There is no statistical significant correlation on the impact on the concentration of salivary alpha amylase when we conduct stimulative method before passive however salivary alfa amylase was higher after stimulative sampling.

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

Thesis includes: 32 pages, 5 figures, 2 tables and 21 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Saliva, salivary alpha amylase, stress

Mentor: **Nada Vrkić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić**, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, **Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, **Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2016.