

Monika Jankovi

**Razvoj metode za mjerenje aktivnosti
ekto-ATPaze u serumu ovjeka**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2015.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Biokemija 1 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Tihane Žani Grubiši .

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Tihani Žani Grubiši na stručnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem asistentici dr. sc. Aniti Somborac Bačura na pomoći i tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela. Posebnu zahvalu dugujem svojim roditeljima, sestri, prijateljima i Mladenu zbog potpore koju su mi pružali tijekom cijelog školovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Ektonukleotidaze	1
1.2. Ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze	2
1.3. Opća svojstva ekto-ATPaze	4
1.3.1. Uloga ekto-ATPaze u purinergičnoj signalizaciji	4
1.4. Metode za mjerenje aktivnosti ekto-ATPaze	6
1.5. Metode za mjerenje anorganskog fosfata	7
1.5.1. Malachite green metoda	7
1.5.2. Fiske-Subbarow metoda	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	9
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Korištene kemikalije, biološki uzorci i uređaji te kratki opis metode	10
3.1.1. Kemikalije	10
3.1.2. Uzorci	10
3.1.3. Uređaji	10
3.1.4. Metoda	11
3.2. Određivanje uvjeta za mjerenje koncentracije fosfata u serumu	12
3.2.1. Ispitivanje stabilnosti ATP-a u vodenom mediju te mediju s puferom i TCA	12
3.2.2. Određivanje koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju seruma	13
3.2.3. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu seruma	14
3.3. Određivanje parametara o kojima ovisi aktivnost ekto-ATPaze	15
3.3.1. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o vremenu inkubacije na 37 °C	15
3.3.2. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o volumenu seruma	16
3.3.3. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o koncentraciji Ca ²⁺ i Mg ²⁺	16
3.3.4. Određivanje optimalne valne duljine za mjerenje fosfata u serumu	16
3.4. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze na kontrolnim uzorcima i miješanom serumu zdravih pojedinaca	17
3.5. Mjerenje apsorbancije standardne otopine fosfata	19
4. REZULTATI	20
4.1. Usporedno mjerenje spontanog raspada ATP-a u vodenom mediju i mediju koji sadrži pufer i TCA	20
4.2. Mjerenje apsorbancije uzorka seruma bez prethodne deproteinizacije	20
4.3. Određivanje koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju seruma	20
4.4. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu seruma	21
4.5. Praćenje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o vremenu inkubacije	21
4.6. Praćenje promjene aktivnosti ekto-ATPaze ovisno o volumenu seruma	22

4.7. Utjecaj Ca^{2+} i Mg^{2+} na aktivnost ekto-ATPaze	22
4.8. Određivanje odgovarajuće valne duljine za mjerenje apsorbancije fosfata	23
4.9. Određivanje preciznosti metode	24
4.10. Aktivnost ekto-ATPaze izmjerena na kontrolnim uzorcima i miješanom serumu zdravih pojedinaca.....	28
5. RASPRAVA.....	31
6. ZAKLJUČCI.....	34
7. LITERATURA.....	35
8. SAŽETAK.....	37
9. SUMMARY	38
Temeljna dokumentacijska kartica	
Basic documentation card	

Popis korištenih kratica:

ADA - adenozin deaminaza

Ado - adenozin

ADP - adenozin difosfat

AK - adenilat kinaza

AMP - adenozin monofosfat

AP / ALP - alkalna fosfataza

ATP - adenozin trifosfat

EDTA - etilen diamino tetraoctena kiselina

EGTA - etilen glikol tetraoctena kiselina

eN / E5NT - ekto-5'-nukleotidaza

E-NPP - ekto-nukleotid pirofosfataze / fosfodiesteraze

E-NTPDaze - ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze

Hyp - hipoksantin

Ino - inozin

NDPK - nukleozid difosfokinaze

NEM - N-etilmaleimid

P - purinergični receptori

PAP - prostatična kiselna fosfataza

PNP - purin nukleozid fosforilaza

Pi - fosfat

PPi - pirofosfat

SDS - natrij dodecil sulfat

TCA - trikloroctena kiselina

Ap - apsorbancija probe

Asp - apsorbancija slijepa probe

KV - koeficijent varijabilnosti

SD - standardna devijacija

1.UVOD

1.1. Ektonukleotidaze

Ektoenzimi su enzimi koji su smješteni u membrani, a njihovo aktivno mjesto orijentirano je prema izvanstani nom prostoru (Goding, 2000). Zahvaljuju i takvoj orijentaciji aktivnog mjesta, ovi enzimi sudjeluju u metabolizmu izvanstani nih molekula.

Ektonukleotidaze su ektoenzimi koji hidroliziraju nukleotide smještene u izvanstani nom prostoru. Ovisno o kojoj skupini pripadaju, ektonukleotidaze hidroliziraju nukleozid monofosfate, nukleozid difosfate, nukleozid trifosfate i dinukleozid polifosfate pri emu nastaju nukleozidi i fosfati, nukleozid monofosfati, difosfati i anorganski pirofosfati. Hidrolizom navedenih nukleotida, mijenja se njihova mogu nost vezanja za receptore, odnosno sprje ava se aktivacija receptora putem nukleotida koji djeluje kao ligand za taj receptor ili se poti e aktivacija receptora pomo u nukleozida koji nastaje kao produkt hidrolize nukleotida, a djeluje kao ligand. Tako er, hidrolizom nukleotida može se sprje iti desenzitizacija receptora, odnosno naglo povla enje receptora s membrane zbog uzastopne aktivacije ligandom (Zimmermann i sur., 2012).

etiri su velike skupine ektonukleotidaza; ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDaze), ekto-5'-nukleotidaze (eN ili E5NT), ekto-nukleotid pirofosfataze /fosfodiesteraze (E-NPP) i alkalne fosfataze (AP ili ALP). Svaki od enzima koji pripadaju navedenim skupinama se razlikuju po afinitetu za supstrat te strukturnim i kataliti kim karakteristikama.

1.2. Ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze

U skupinu NTPDaza ubraja se osam enzima koji su klasificirani prema slijedu njihovih otkrića. NTPDaze 4, 5, 6, i 7 su lokalizirane unutar stanice dok su enzimi 1, 2, 3 i 8 smješteni na površini stanice, te pripadaju u skupinu klasičnih ektoenzima. Enzimi iz ove skupine pokazuju različitu aktivnost ovisno o pH području, s time da pojedini enzimi imaju različiti pH optimum aktivnosti. Tako su E-NTPDaze 2, E-NTPDaza 3 i E-NTPDaza 8 aktivnije u kiselijem pH nego E-NTPDaza 1. Također, za njihovu katalitičku aktivnost potrebni su dvovalentni kationi Ca^{2+} ili Mg^{2+} . Što se supstrata tiče, humana E-NTPDaza 1 i E-NTPDaza 2 imaju veći afinitet za adenozienske nukleotide, a manji za nukleotide s uracilom. Nadalje, E-NTPDaze 1, 2, 3, i 8 brže hidroliziraju ATP od ADP-a, pri čemu hidrolitičkom razgradnjom ATP-a pomoću E-NTPDaza 2, 3 i 8 nastaju veće količine ADP-a koje se naknadno hidroliziraju do AMP-a, dok E-NTPDaza 1 hidrolizira ATP direktno do AMP-a (Zimmermann i sur., 2012).

E-NTPDaze su eksprimirane u svim tkivima. E-NTPDaza 1 je izrazito eksprimirana u vaskularnom endotelu, stanicama glatkih mišića, dendritnim stanicama i limfocitima te je izrazito bitna u hemostazi, upalnom i imunološkom odgovoru. E-NTPDaza 2 je eksprimirana na mikrovaskularnim pericitima, adventicijskim stanicama muskularnih žila gdje pridonosi vrstoći žila, ali i sudjeluje u agregaciji trombocita s obzirom da proizvodi ADP koje djeluje kao proagregacijski faktor. Također se nalazi u vanjskom sloju krvnih žila, glomerularnih arteriola u bubregu, u jetri, žlijezdama slinovnicama i drugim područjima. E-NTPDaza 3 je najviše lokalizirana u gastrointestinalnom sustavu i žlijezdama slinovnicama, a povezuje se s regulacijom izlučivanja inzulina iz Langerhansovih otočića. E-NTPDaza 8 je smještena u jetrenim kanalikulima i cjetkastoj membrani bubrega (Yegutkin, 2014). Svi enzimi iz skupine E-NTPDaza mogu biti koeksprimirani u istom tkivu s drugim enzimima iz te skupine te s alkalnim fosfatazama ili E-NPPazama (Zimmermann, 2000).

E-NTPDaze sadrže N- i C- terminalne citoplazmatske domene, dvije transmembranske domene i ekstracelularnu glikoziliranu katalitičku domenu (Goding, 2000).

Molekulska masa ovih enzima se kreće između 55 kDa, odnosno 70-80 kDa za glikozilirane oblike. Enzimi dolaze kao homo-oligomeri, odnosno kao dimetri, trimeri i tetrameri (Zimmermann, 1999).

Tablica 1.1. Nomenklatura, kodiraju i geni i smještaj na kromosomu za humane enzime u skupini NTPDaza (Robson i sur., 2006)

Naziv enzima	Ostali nazivi	Naziv kodiraju eg gena	Lokacija na kromosomu
NTPDaza 1	CD39, ATPDaza, ekto-apiraza	ENTPD1	10q24
NTPDaza 2	CD39L1, ekto-ATPaza	ENTPD2	9q34
NTPDaza 3	CD39L3, HB6	ENTPD3	3p21.3
NTPDaza 4	UDPaza, LALP70	ENTPD4	8p21
NTPDaza 5	CD39L4,ER-UDPaza, PCPH	ENTPD5	14q24
NTPDaza 6	CD39L2	ENTPD6	20p11.2
NTPDaza 7	LALP1	ENTPD7	10q24
NTPDaza 8	Jetrena kanalikularna ekto-ATPaza, hATPDaza	ENTPD8	9q34

1.3. Op a svojstva ekto-ATPaze

Naziv ekto-ATPaza prvi put je upotrijebio Engelhardt 1957. godine, a odnosi se isključivo na enzime koji hidroliziraju nukleozid difosfate ili nukleozid trifosfate, dok nukleozid monofosfate i druge organske spojeve koji sadrže fosfate ne koriste kao supstrate. Također, ti enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju Ca^{2+} ili Mg^{2+} , a nisu osjetljivi na inhibitore P-, F-, i V-tipova ATP-aza. Moraju biti zadovoljeni svi navedeni uvjeti da bi se moglo reći da enzim posjeduje ekto-ATPaznu aktivnost (Plesner, 1995).

Dokazano je da ekto-ATPaze imaju 30 puta veći afinitet za ATP kao supstrat nego za ADP, a pojedina istraživanja pokazuju da afinitet za supstrat može ovisiti i o stupnju oligomerizacije enzima. Naime, E-NTPDaze mogu doći u više oligomernih formi, a osim što različite forme utječu na afinitet prema supstratu, mogu utjecati i na katalitičku aktivnost enzima (Zimmerman, 2001).

1.3.1. Uloga ekto-ATPaze u purinergičnoj signalizaciji

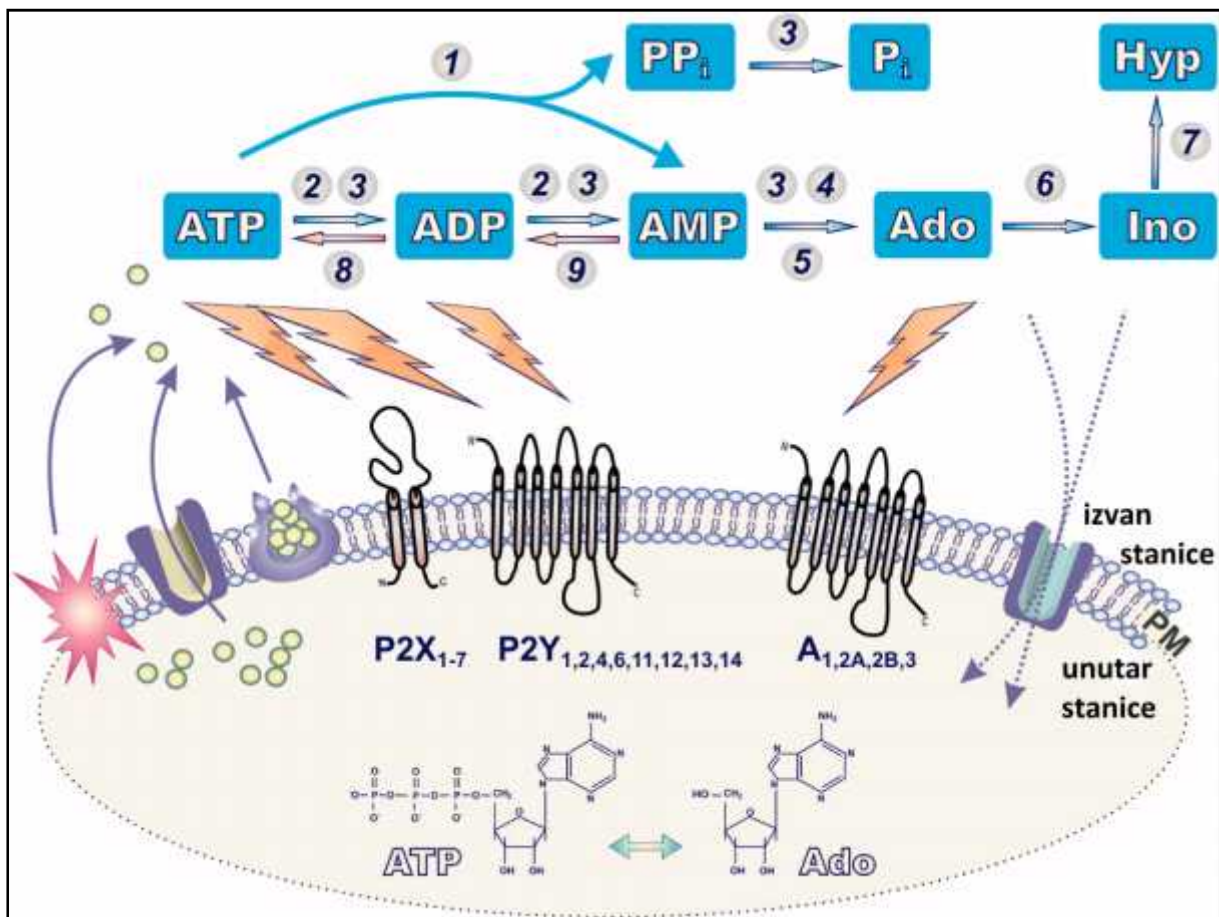
Prvi korak u purinergičnoj signalizaciji predstavlja otpuštanje endogenih nukleotida u izvanstanični prostor. S obzirom da je tema ovoga rada ekto-ATPaza koja kao supstrat prvenstveno koristi ATP, metabolizam ATP-a će biti detaljnije objašnjen u odnosu na druge nukleotide.

Velike količine endogenog ATP-a mogu se osloboditi uslijed litičkog procesa stanice, koji je pak posljedica ozlijeđe, traumatskog šoka ili upalnog stanja. Osim litičkog mehanizma, postoje i drugi mehanizmi oslobađanja ATP-a koji su vidljivi kod raznih ekscitacijskih, odnosno sekrecijskih tkiva. Naime, stanice u tim tkivima pohranjuju ATP zajedno s drugim neurotransmiterima i medijatorima u posebne granule koje se izlučuju procesom egzocitoze, ovisno o koncentraciji Ca. Iz neekscitacijskih stanica, ATP se otpušta pod utjecajem mehaničkih i ostalih stimulatora te kao odgovor na tvari koje mobiliziraju Ca poput bradikinina i serotonina. S obzirom da se ATP otpušta pod različitim uvjetima, raznoliki su i putevi kojima izlazi iz endogenog prostora, a neki od njih uključuju i elektrodifuziju kroz kanale te olakšanu difuziju pomoću transporterata (Yegutkin, 2008).

Nakon otpuštanja ATP-a, sljedeći korak je vezanje za receptore. Dakle, ATP djeluje kao signalna molekula, odnosno kao agonist purinergičnih receptora. Postoje dvije skupine

purinergi nih receptora, P1 i P2 skupina. Na P1 receptore djeluje adenzin, koji nastaje kao produkt razgradnje nukleotida pomo u ektonukleotidaza, dok se na P2 receptore veže ATP i ostali purini te neki pirimidini. Dvije su podskupine P2 receptora. P2X receptori koji su ionotropni i P2Y recptori koji su metabotropni, odnosno spregnuti s proteinom G. Za sada je poznato sedam ionotropnih i osam metabotropnih receptora (Burnstock, 2007).

U sljede em koraku purinergi ne signalizacije sudjeluju ektonukleotidaze, me u njima i ekto-ATPaza, koje hidroliziraju ATP do adenzina koji zatim agonisti ki djeluje na P1 receptore nakon ega se produkt može metabolizirati do hipoksantina ili ponovno unijeti u stanicu i regenerirati do ATP-a (Yegutkin, 2014).



Slika 1.1. Prikaz purinergi ne signalne kaskade. (1)E-NPP, (2)E-NTPDaze, (3)AP, (4)eN, (5)PAP, (6)ADA, (7) PNP, (8) AK, (9) NDPK (prilago eno prema: Yegutkin, 2014)

1.4. Metode za mjerenje aktivnosti ekto-ATPaze

U istraživanju koje su proveli J. P. Oses i suradnici, aktivnost ekto-ATPaze mjerena je u serumu štakora, a u istraživanju od F. Kukulskog i suradnika u proteinskom ekstraktu dobivenom obradom COS-7 stanica u koje je transfektiran gen za humanu ili mišju ekto-ATPazu.

Za mjerenje aktivnosti NTPDaza i PDE u serumu štakora kao supstrati su korišteni ATP i ADP ija je kona na koncentracija u reakcijskoj smjesi 3mM. Ostale komponente smjese su Tris-HCl, pH 8.0 i 1 mg serumskih proteina, a smjesa je inkubirana 40 min na 37°C. Kona ni volumen reakcijske smjese je 2 ml. Reakcija je zaustavljena dodatkom 0.2 mL 10 % TCA nakon ega je smjesa centrifugirana 5 min na 5000 g. Supernatant je korišten za odre ivanje fosfata prema kojima se izra unala enzimska aktivnost. Paralelno su izvršena i mjerenja na kontrolama u koje je uzorak dodan nakon što je reakcija prekinuta s TCA. Mjerenjem aktivnosti NTPDaza je pokazano da se ti enzimi aktiviraju s Ca^{2+} ili Mg^{2+} te da nisu osjetljivi na klasi ne ATPazne inhibitore; ouabain, NEM, lantan, oligomicin i 0.1 mM natrijev azid, dok se inhibiraju s velikim koncentracijama natrijevog azida (10-20mM) i ortovanadatom (Oses i sur., 2004).

Enzimska aktivnost je mjerena u proteinskom ekstraktu koji je dobiven prethodnom obradom COS-7 stanica transfektiranih s ekspresijskim vektorom koji sadrži gene za humane ili mišje NTPDaze. Navedeni ekstrakt je stavljen u medij koji sadrži 5 mM CaCl_2 i 80 mM Tris pH 7.4 nakon ega je provedena predinkubacija na 37°C u trajanju od 3 min. Reakcija je zapo eta dodatkom 25 μL supstrata, adeninskih ili uracilskih nukleotida, koji u kona noj reakcijskoj smjesi ima koncentraciju od 0.5 mM, a zaustavljena je dodatkom 0.125 mM malchite green reagensa. Kao kontrole služile su otopine u koje je proteinski ekstrakt dodan nakon što je zaustavljena reakcija. Tako er je mjerena aktivnost enzima u intaktnim COS-7 stanicama u jažicama uz 5 mM CaCl_2 , 145 mM NaCl, 0,5 mM supstrat te 100 mM Tris, pH 7.4. Oslobo eni anorganski fosfat je mjereno u malachite green metode.

Ovim istraživanjem je pokazano da je aktivnost NTPDaza linearno ovisna u vremenu od 30 minuta te da ti enzimi imaju ve i afinitet za nukleozid trifosfate nego nukleozid difosfate, dok adenozin monofosfat ne hidroliziraju. I humane i mišje NTPDaze zahtjevaju Ca^{2+} ili Mg^{2+} za svoju aktivnost, u koncentraciji od 1 do 5 mM. Pokazan je izostanak enzimске aktivnosti u prisustvu EDTA ili EGTA koja kelira navedene katione. Ekto-ATPaza je pokazala

podjednaku aktivnost u prisustvu oba kationa, a kao i ostali enzimi u prisustvu Ca^{2+} ima veći afinitet za nukleotide s uracilom kao supstrate. Također je ispitan utjecaj pH na aktivnost enzima. Sve NTPD-aze su aktivne u pH području od 7-8.5, međutim svaki enzim pokazuje veću aktivnost u određenom pH intervalu. Tako ekto-ATPaza pokazuje značajniju aktivnost u pH 4.5-8.5, a zamijetna je i razlika u aktivnosti mišje i humane ekto-ATPaze. Optimalni pH za aktivnost humanog enzima je 6, dok je za mišji 8. Humana ekto-ATPaza hidrolizira ATP i UTP do nukleozid difosfata, s time da je primijećen i nastanak AMP-a koji je nešto veći kod humanog enzima, ali uzrok tomu može biti više razloga, između ostalog i varijabilnost među vrstama (Kukulski i sur., 2005).

1.5. Metode za mjerenje anorganskog fosfata

1.5.1. Malachite green metoda

Princip ove metode je taj da prisutni fosfati s amonijevim molibdatom stvaraju kompleks koji se oboji s malachite green bojom te se nastalom kompleksu mjeri apsorbancija na određenoj valnoj duljini. Postoji više modifikacija ove metode, a ovdje su navedene dvije.

Oslobodeni fosfati kod mjerenja aktivnosti ekto-ATPaze u proteinskom ekstraktu dobivenom od COS-7 stanica (točka 1.4., str. 6.) su izmjereni pomoću jedne od varijanti malchite green metode. Metoda se provodi na način da se 6N H_2SO_4 , čija je uloga povećati topljivost i stabilnost malachite green boje, polagano dodaje u vodu te se otopina ohladi na sobnoj temperaturi nakon čega joj se dodaje malachite green boja. Otopina koja nastane dobije narančastu boju koja bi trebala biti stabilna barem jedan sat na sobnoj temperaturi. Na dan kada se mjere fosfati, u obojenu otopinu se stavi amonijev molibdat i Tween 20 koji djeluje kao stabilizator obojenog kompleksa. Nakon što je napravljen odgovarajući i obojeni reagens, jedan volumni udio tog reagensa se miješa s četiri volumna udjela ispitivane otopine. Dobivena otopina se pomiješa te ostavi na sobnoj temperaturi jer je za nastanak obojenog kompleksa potrebno oko 3 min na 25 °C, nakon čega se mjeri apsorbancija na 630 nm (Baykov i sur., 1988).

Malachit green metoda je upotrijebljena i za mjerenje fosfata u serumu štakora (točka 1.4., str. 6.). Pristup je nešto drukčiji nego u prethodno objašnjenjenu metodi. Amonijev molibdat se otopi u 6 N HCl-u, polivni alkohol u kipućoj vodi, a malachite green u deioniziranoj vodi te

se pomiješaju u odgovaraju i omjerima s deioniziranom vodom. Primjena polivinilnog alkohola omogućeva mjerenje fosfata bez prethodne deproteinizacije ispitivane otopine. Reagens se priprema na dan primjene te se ostavi na sobnoj temperaturi dok ne poprimi naranastu boju. U konačnosti se pomiješaju pripremljeni reagens i ispitivana otopina, te se mjeri apsorbanija fosfata na 630 nm (Chan i sur., 1986).

1.5.2. Fiske-Subbarow metoda

Princip navedene metode je taj da fosfati iz uzorka reagiraju s amonijevim molibdatom prije nego otapanjem u sumpornoj kiselini, nakon čega nastaje fosfomolibdenski kompleks koji se reducira s odgovarajućim reagensom u spoj plave boje koji se zatim mjeri spektrofotometrijski. Pri uspostavljanju ove metode kao reagens za fosfomolibdenski kompleks najprihvatljivija se pokazala 1,2,6-aminonaftolsulfonska kiselina, za razliku od hidrokinona koji izaziva brzi i nelinearni gubitak boje (Fiske, Subbarow, 1925).

Kod mjerenja fosfata u uzorku seruma pomoću Fiske-Subbarow metode, potrebno je ukloniti interferenciju proteina. Više je kemijskih tvari koje pomažu u otklanjanju interferencija.

U istraživanju gdje je mjerena aktivnost ATPaze na membrani eritrocita, SDS je upotrijebljen za solubilizaciju membranskih proteina. SDS je dodan uzorcima prije mjerenja, a njegov dodatak je otklonio mogućnost interferencije membranskih proteina, s time da niti on sam nije interferirao kod mjerenja (Tashima, 1975).

Za taloženje proteina iz bioloških uzorka, najviše se koristi TCA. Nakon dodatka TCA u uzorak, proteini se istalože te se uzorak podvrgne centrifugiranju nakon čega se odvoje supernatant od sedimentiranih proteina. Osim TCA rjeđe se koristi i wolframova kiselina (Hunter, 1957) te perklorna kiselina koja može izazvati taloženje reagensa koje je teško naknadno ukloniti (Chan i sur., 1986).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog diplomskog rada je uspostaviti metodu za mjerenje aktivnosti ekto-ATPaze u serumu ovjeka. Da bi se dobila metoda na temelju koje se vjerodostojno može izmjeriti aktivnost, prvo je potrebno uspostaviti sve uvjete i parametre mjerenja. U ovom radu će biti opisani i prikazani svi ispitivani imbenici i u konačnosti izmjerena enzimsko aktivnost. Kao uzorak za uspostavljanje metode korišten je miješani serum zdravih pojedinaca, a za mjerenje aktivnosti enzima korišteni su kontrolni uzorci, odnosno pojedinačni serumski uzorci zdravih osoba.

Vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze u serumu mogla bi biti potencijalni imbenik u dijagnostici nekih bolesti. Kada bi se znala aktivnost u serumu zdravih osoba, ista bi se mogla upotrijebiti za usporedbu s vrijednostima u serumu osoba koje boluju od bolesti povezanih s aktivacijom receptora osjetljivih na adeninske nukleotide i stoga je to jedan od razloga zbog kojeg je potrebno optimizirati metodu kojom bi se ta aktivnost mogla izmjeriti.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Korištene kemikalije, biološki uzorci i uređaji te kratki opis metode

Navedeni su svi potrebni podaci o korištenim kemikalijama i uređajima kako bi se svi postupci iz ovoga rada mogli ponoviti.

3.1.1. Kemikalije

1. HEPES (N-(2-Hydroxyetil)piperazin-N-(2-etan-sulfonska kiselina)), Sigma
2. Tris-baza, Sigma
3. Tris-hidroklorid, Sigma
4. Kalcijev klorid, oko 96%, Kemika
5. Magnezijev klorid, Kemika
6. Kalijev klorid, Kemika
7. Levamisol hidroklorid, Sigma
8. Konkavalin A, Sigma
9. Adenozin-5'-trifosfat, Sigma
10. Trikloroctena kiselina, Sigma Aldrich
11. L-Askorbinska kiselina, Sigma
12. Amonijev heptamolibdat, Kemika
13. Sumporna kiselina (96%), Kemika
14. Kalij dihidrogenfosfat, Kemika

3.1.2. Uzorci

Kao uzorak korišten je "pool" serum i pojedina ni serumi zdravih osoba (kontrola). Svi serumi su dobiveni sa Zavoda za transfuzijsku medicinu u Petrovoj bolnici. U radu su korišteni serumi koji su bili zamrznuti nekoliko mjeseci te svježi kako bi se uočilo da li svježina uzorka utječe na mjerenje.

3.1.3. Uređaji

Korištena je digitalna vaga, vodene kupelji od 37 °C i 60 °C, uređaj za miješanje, uređaj za centrifugiranje i spektrofotometar.

3.1.4. Metoda

Za svaki ispitivani parametar kod uspostavljanja metode za mjerenje aktivnosti enzima posebno su detaljno navedeni korišteni reagensi i postupci. Međutim, u konačnici, cijeli postupak se završi određivanjem fosfata prema Fiske-Subbarow metodi te se na temelju dobivenih rezultata donesu zaključci o ispitivanom parametru. Princip Fiske-Subbarow metode je taj da fosfatni ioni s molibden sumpornom kiselinom stvaraju fosfomolibdenski kompleks koji se reducira s askorbinskom kiselinom u plave molibdenove okside ija se intenzitet određi spektrofotometrijski na odgovarajućoj valnoj duljini.

Kada su ispitani i uspostavljeni svi uvjeti, izmjerena je aktivnost ekto-ATPaze u serumu. Kao reagens za mjerenje aktivnosti korišten je pufer koji sadrži dvovalentne katione Ca^{2+} ili Mg^{2+} , levamisol koji djeluje kao inhibitor alkalne fosfataze te konkavalin A koji inhibira 5' - nukleotidazu. Osim pufera, koristi se i ATP kao supstrat te TCA koja deproteinizira uzorak i tako uklanja mogućnost interferencije proteina. U završnom koraku koristi se radni reagens koji se dobije miješanjem amonijevog heptamolibdata i askorbinske kiseline u odgovarajućem omjeru. Askorbinska kiselina i ATP se pripremaju svježi, neposredno pred primjenu.

3.2. Određivanje uvjeta za mjerenje koncentracije fosfata u serumu

3.2.1. Ispitivanje stabilnosti ATP-a u vodenom mediju te mediju s puferom i TCA

Stabilnost ATP-a je ispitana na in da je ATP smješten samo u vodeni medij i posebno u kompleksni medij koji sadrži trikloroctenu kiselinu, pufer i vodu, a u konačnici je mjerena apsorbancija obje otopine prema navedenom postupku.

Korišteni reagensi:

- A) 72 mmol/L ATP - svježe pripremljen.
- B) Pufer koji se sastoji od: 112.5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 5 mmol/L CaCl₂, 100 mmol/L KCl, 1 mmol/L levamisol, 56 mmol/L konkavalin A.
- C) 1.12 mol/L trikloroctena kiselina
- D) 1.14 mol/L askorbinska kiselina - svježe pripremljena.
- E) 6.8 mmol/L amonijev heptamolibdat - priredi se otapanjem amonijeva heptamolibdata u 1 mol/L sumpornoj kiselini.
- F) Radni reagens - priredi se miješanjem 6 dijelova 6.8 mmol/L amonijevog heptamolibdata i 1 dijela 1.14 mol/L askorbinske kiseline, neposredno pred primjenu.

Tablica 3.1. Postupak ispitivanja stabilnosti ATP-a u vodenom i mediju s puferom i TCA

	ATP samo u vodenom mediju	Slijepa proba reakcije	ATP uz TCA i pufer	Slijepa proba reakcije
Pufer (μL)	-	-	1000	1000
H ₂ O (μL)	1150	1200	50	100
ATP (μL)	50	-	50	-
TCA (μL)	-	-	100	100
Komponente se pomiješaju te se uzme alikvot u daljnji postupak.				
Alikvot (μL)	50	50	50	50
H ₂ O (μL)	450	450	450	450
Radni reagens (μL)	500	500	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 minuta, stavi na led te mjeri apsorbancija prema slijepoj probi reakcije na 830 nm.				

3.2.2. Određivanje koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju seruma

Ispitana je optimalna koncentracija TCA potrebna za deproteinizaciju seruma kod određivanja koncentracije fosfata. S obzirom da u literaturi postoje podaci da je moguće određivanje fosfata u serumu bez prethodne deproteinizacije, prvo je ispitana ta mogućnost.

Korištena je 1.12 mol/L TCA, a ostali reagensi su isti navedenima u točki 3.2.1., str. 12.

Tablica 3.2. Postupak mjerenja koncentracije fosfata u serumu bez uporabe TCA

Uzorak (μL)	50	250	500	Slijepa proba reakcije
H ₂ O (μL)	450	250	0	500
Radni reagens (μL)	500	500	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbancija prema slijepoj probi reakcije na 830 nm.				

Tablica 3.3. Postupak određivanja koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju seruma

	Proba uzorka	Slijepa proba uzorka	Slijepa proba reakcije
Pufer (μL)	1000	1000	1000
Uzorak (μL)	X	-	-
H ₂ O (μL)	-	-	350
Predinkubacija 5-10 min na 37 °C.			
ATP (μL)	50	50	-
Inkubacija točno 60 min na 37 °C, reakcija se prekida dodatkom			
TCA (μL)	Y	Y	Y
Uzorak (μL)	-	X	-
Centrifugira se 5 min na 5000 g.			
Supernatant (μL)	50/25	50/25	50/25
H ₂ O (μL)	450/475	450/475	450/475
Radni reagens (μL)	500	500	500
Pomiješa se, inkubira 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbancija prema slijepoj probi reakcije na 830 nm.			

X = 200, 300, 400 μL ; Y = 100, 200 μL

3.2.3. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu seruma

Aktivnost ekto-ATPaze se mjeri na temelju koli ine oslobo enih fosfata nakon enzimske reakcije. Odre ivanje optimalne apsorbancije fosfata izvršeno je tako da se za enzimsku reakciju koristio uvijek isti volumen seruma, ali se mijenjao volumen supernatanta koji je dobiven nakon deproteinizacije seruma s TCA. Ispitani su volumeni supernatanta od 25 i 50 μL .

Korišteni reagensi su 6.8. mmol/L amonijev heptamolibdat i 1.14 mol/L askorbinska kiselina koji se pomiješaju u omjeru 6:1, neposredno pred primjenu te "pool" serum.

Tablica 3.4. Postupak ispitivanja ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu seruma

"Pool" serum / H ₂ O za slijepu probu reakcije (μL)		800
TCA (μL)		200
Pomiješa se, centrifugira 5 min na 5000 g.		
Supernatant (μL)	50	25
H ₂ O (μl)	450	475
Radni reagens (μL)	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbancija prema slijepoj probi reakcije na 830 nm.		

3.3. Određivanje parametara o kojima ovisi aktivnost ekto-ATPaze

3.3.1. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o vremenu inkubacije na 37 °C

Da bi se utvrdilo optimalno vrijeme inkubacije, isti volumen uzorka je podvrgnut inkubaciji u trajanju od 30 i 60 minuta.

Upotrijebljeni reagensi odgovaraju reagensima navedenima pod to kom 3.2.1., str. 12., osim ATP-a koji je pripremljen u koncentraciji od 64.2 mmol/L kako bi njegova koncentracija u konačnoj reakcijskoj smjesi iznosila 3 mmol/L.

Tablica 3.5. Postupak ispitivanja ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu inkubacije na 37 °C

	Proba uzorka	Slijepa proba uzorka	Slijepa proba reakcije
Pufer (μL)	1000	1000	1000
Uzorak (μL)	20	-	-
H ₂ O (μL)	-	-	70
Predinkubacija 5-10 min na 37 °C.			
ATP (μL)	50	50	-
Inkubacija određeno vrijeme na 37 °C, prekida se dodatkom			
TCA (μL)	100	100	100
Uzorak (μL)	-	20	-
Centrifugira se 5 min na 5000 g.			
Supernatant (μL)	50	50	50
H ₂ O (μL)	450	450	450
Radni reagens (μL)	500	500	500
Pomiješa se, inkubira 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbanciju prema slijepoj probi reakcije na 830 nm.			

3.3.2. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o volumenu seruma

Korištenjem različitih volumena seruma, uz ostale iste parametre, određeno je koji je volumen uzorka najprikladniji za mjerenje aktivnosti enzima.

Korišteni reagensi isti su kao reagensi navedeni u točki 3.2.1., str. 12., a postupak je isti kao postupak za ispitivanje ovisnosti enzimske aktivnosti o vremenu inkubacije, točka 3.3.1., str. 15. Razlika je u tome što je vrijeme inkubacije na 37 °C konstantno i iznosi 60 min, a promjenjiva varijabla je volumen uzorka. Korišteni su volumeni uzorka od 30, 40, 50 i 60 µL.

3.3.3. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o koncentraciji Ca²⁺ i Mg²⁺

Postupak kojim se utvrdilo o kojem kationu ovisi aktivnost enzima je proveden na način koji su se ispitala prethodna dva parametra, vrijeme inkubacije i volumen uzorka, što je prikazano u točkama 3.3.1., str. 15. i 3.3.2., str. 16. Upotrijebljeni reagensi su isti kao u navedenim točkama, osim što je ATP pripremljen u koncentraciji od 81 mmol/L, dakle prilagođena je koncentracija kako bi u konačnoj reakcijskoj smjesi iznosila 3 mmol/L. Za pripremu pufera korištena je Tris-baza, umjesto dosadašnjeg Tris-HCl, međutim pH ostaje 8.0. Upotrijebljeni "pool" serum je potpuno svjež, nije prethodno smrznut. Korišteni volumeni uzorka su 200, 250 i 300 µL, volumen TCA 200 µL, a volumen supernatanta 25 µL.

Paralelno su rađena mjerenja s puferom koji sadrži MgCl₂ i puferom koji sadrži CaCl₂.

3.3.4. Određivanje optimalne valne duljine za mjerenje fosfata u serumu

Pripremljena je standardna otopina fosfata u koncentraciji od 0.6 mmol/L i na rasponu od 560 do 860 nm je mjerena apsorbancija. Korišteni reagensi i postupak su isti kao u točki 3.5., str. 19.

3.4. Određivanje aktivnosti ekto-ATPaze na kontrolnim uzorcima i miješanom serumu zdravih pojedinaca

Nakon što su ispitani svi parametri potrebni za određivanje aktivnosti enzima, uspostavljen je postupak i reagensi koji se koriste za sva daljnja mjerenja, a enzimska aktivnost je izražena prema sljedećoj formuli:

$$\text{Aktivnost enzima} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L} \cdot \text{min}} \right) = \frac{(A_p - A_{sp}) * V * a}{t * V_u}$$

A_p - apsorbancija probe

A_{sp} - apsorbancija slijepa probe

V - ukupni volumen reakcijske koja se sastoji od pufera, ATP-a i uzorka

a - koeficijent smjera baždarnog pravca (iz baždarnog pravca za standarde napravljen isti dan kada i mjerenje aktivnosti)

t - vrijeme inkubacije na 37°C

V_u - volumen uzorka

Reagensi korišteni za konačni postupak mjerenja enzimске aktivnosti:

- A) 69 mmol/L ATP - svježe pripremljen.
- B) Pufer koji se sastoji od:
 - a) 50 mmol/L HEPES-Tris, pH 7.4
 - b) 5 mmol/L CaCl₂
 - c) 100 mmol/L KCl
 - d) 1 mmol/L levamisol
 - e) 56 mmol/L konkavalin A
- C) 1.12 mol/L trikloroetena kiselina
- D) 1.14 mol/L askorbinska kiselina - svježe pripremljena.
- E) 6.8 mmol/L amonijev heptamolibdat
- F) Radni reagens - pripremi se neposredno pred primjenu miješanjem 6 dijelova amonijevog heptamolibdata i 1 dijela askorbinske kiseline.
- G) Kao uzorci su korišteni kontrolni serum zdravih pojedinaca i "pool" serum.
- H) Valna duljina na kojoj je mjerena apsorbancija fosfata iznosi 620 nm.

U redosljedu dodavanja TCA kod slijepa probe nastala je promjena. Naime, prije je u reakcijsku smjesu prvo dodana TCA, a zatim uzorak, dok je sada TCA pomiješana s uzorkom u odgovarajućem volumenu te je alikvot takve smjese dodan u ostatak reakcijske smjese. Na taj način je postignuta bolja deproteinizacija što je vidljivo i prema zamutjenju supernatanta nakon centrifugiranja. Također je nastala promjena u reagensima i valnoj duljini na kojoj se mjeri apsorbanca fosfata. Pufer je pripremljen od HEPES-Tris-a, a ne od Tris-HCl-a ili Tris-baze, a valna duljina za mjerenje apsorbanca fosfata određena je na 620 nm, umjesto dosadašnjih 830 nm.

Tablica 3.6. Postupak mjerenja aktivnosti ekto-ATPaze u serumu

	Proba uzorka	Slijepa proba uzorka	Slijepa proba reakcije
Pufer (μL)	1050	1050	1050
Uzorak (μL)	50	-	-
H ₂ O (μL)	-	-	100
Predinkubacija 5 min na 37 °C.			
ATP (μL)	50	50	-
Inkubacija točno 60 min na 37 °C, reakcija se prekida dodatkom,			
TCA (μL)	100	100 TCA + 50 SERUMA	100
Uzorak (μL)	-	-	-
Centrifugira se 5 min na 10000 g.			
Supernatant (μL)	50	50	50
H ₂ O (μL)	450	450	450
Radni reagens (μL)	500	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbanca prema slijepoj probi reakcije na 620 nm.			

3.5. Mjerenje apsorbancije standardne otopine fosfata

Volumen standardne otopine fosfata prilagođen je volumenu reakcijske smjese, koja se sastoji od pufera, uzorka i ATP. Standardne otopine pripremljene su u koncentraciji od 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 i 1.5 mmol/L. Baždarni dijagram napravljen je svaki puta kada su se pripremljeni svježi kompletni puferi i TCA, a koeficijent smjera korišten je u formuli za račun enzimske aktivnosti.

Upotrijebljeni reagensi:

- A) Standardna otopina fosfata u koncentraciji od 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 i 1.5 mmol/L koje se priprede od 3 mmol/L standardne otopine fosfata.
- B) 1.12 mol/L trikloroocetna kiselina
- C) 1.14 mol/L askorbinska kiselina - svježe pripremljena.
- D) 6.8 mmol/L amonijev heptamolibdat
- E) Radni reagens - priprema se neposredno pred primjenu miješanje 6 dijelova 6.8 mmol/L amonijevog heptamolibdata i 1 dijela 1.14 mol/L askorbinske kiseline.

Tablica 3.7. Postupak mjerenja apsorbancije standardne otopine fosfata

	Standard (A) (μL)	Slijepa proba reakcije (μL)
Standardna otopina fosfata (A) (μL)	Prema ukupnom V reakcijske smjese	-
H ₂ O (μL)	-	Prema ukupnom V reakcijske smjese
TCA (B) (μL)	100	100
Od A + B (μL)	50	50
H ₂ O (μL)	450	450
Radni reagens (μL)	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbancija prema slijepoj probi reakcije na 620 / 830 nm.		

4. REZULTATI

4.1. Usporedno mjerenje spontanog raspada ATP-a u vodenom mediju i mediju koji sadrži pufer i TCA

Tablica 4.1. Razlika u apsorbanciji otopine koja sadrži ATP i otopine koja sadrži ATP, TCA i pufer. Koncentracija ATP-a u navedenim medijima je 3 mmol/L. ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

	A
ATP u vodenom mediju	0.592
ATP uz TCA i pufer	0.582

4.2. Mjerenje apsorbancije uzorka seruma bez prethodne deproteinizacije

Tablica 4.2. Apsorbancije različitih volumena uzoraka koji nisu deproteinizirani ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

Volumen uzorka (μL)	A
50	2.4
250	Nije moguće izmjeriti
500	Nije moguće izmjeriti

4.3. Određivanje koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju seruma

Tablica 4.3. Utjecaj različitog volumena 1.12 mol/L TCA na taloženje proteina. ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

U inkovitost TCA vidljiva je i prema mutnosti otopine.

	Ap	Asp
<i>Volumen TCA 100 μL</i>		
V uzorka 200 μL	0.691	0.490
V uzorka 300 μL	1.332	1.138
V uzorka 400 μL	Nije moguće izmjeriti	Nije moguće izmjeriti
<i>Volumen TCA 200 μL</i>		
V uzorka 200 μL	0.349	0.309
V uzorka 300 μL	0.371	0.324
V uzorka 400 μL	0.391	0.335

4.4. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu seruma

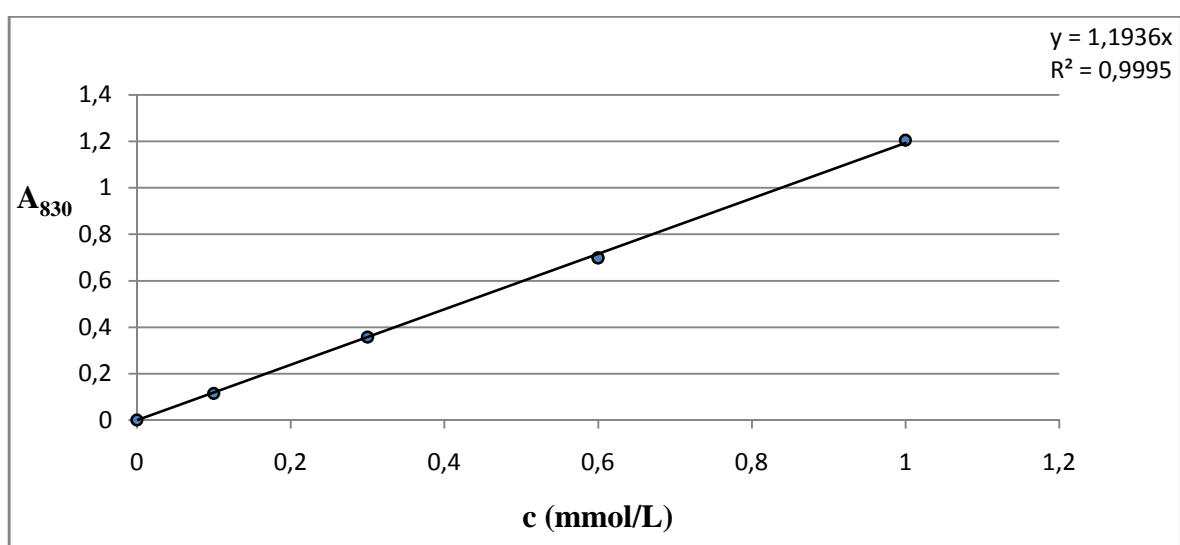
Tablica 4.4. Pra enje proporcionalnosti apsorbancije fosfata i volumena supernatanta ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

V supernatanta (μL)	A
25	0.473
50	0.936

4.5. Pra enje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o vremenu inkubacije

Tablica 4.5. Ovisnost aktivnosti ekto-ATPaze o vremenu inkubacije na 37°C ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

	Ap	Asp	Aktivnost enzima (nmol/mL/h)
Vrijeme inkubacije 30 min			
V uzorka 20 μL	0.486	0.483	383.1
Vrijeme inkubacije 60 min			
V uzorka 20 μL	0.466	0.435	1979.6



Slika 4.1. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

4.6. Pra enje promjene aktivnosti ekto-ATPaze ovisno o volumenu seruma

Tablica 4.6. Ovisnost aktivnosti ekto-ATPaze o volumenu uzorka ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

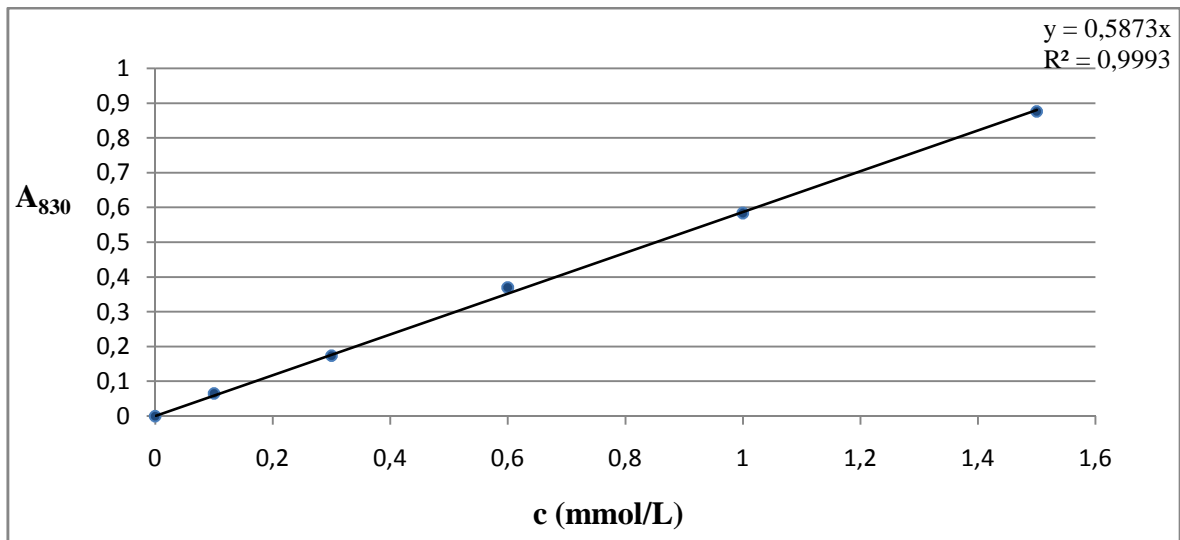
	Ap	Asp	Aktivnost enzima (nmol/mL/h)
Vrijeme inkubacije na 37 °C je 60 min.			
V uzorka 30 μL	0.551	0.526	1074.2
V uzorka 40 μL	0.537	0.502	1138.4
V uzorka 50 μL	0.580	0.564	420.1
V uzorka 60 μL	0.557	0.553	88.3

4.7. Utjecaj Ca^{2+} i Mg^{2+} na aktivnost ekto-ATPaze

Tablica 4.7. Ovisnost aktivnosti enzima o koncentraciji dvovalentnih kationa ($\lambda = 830 \text{ nm}$)

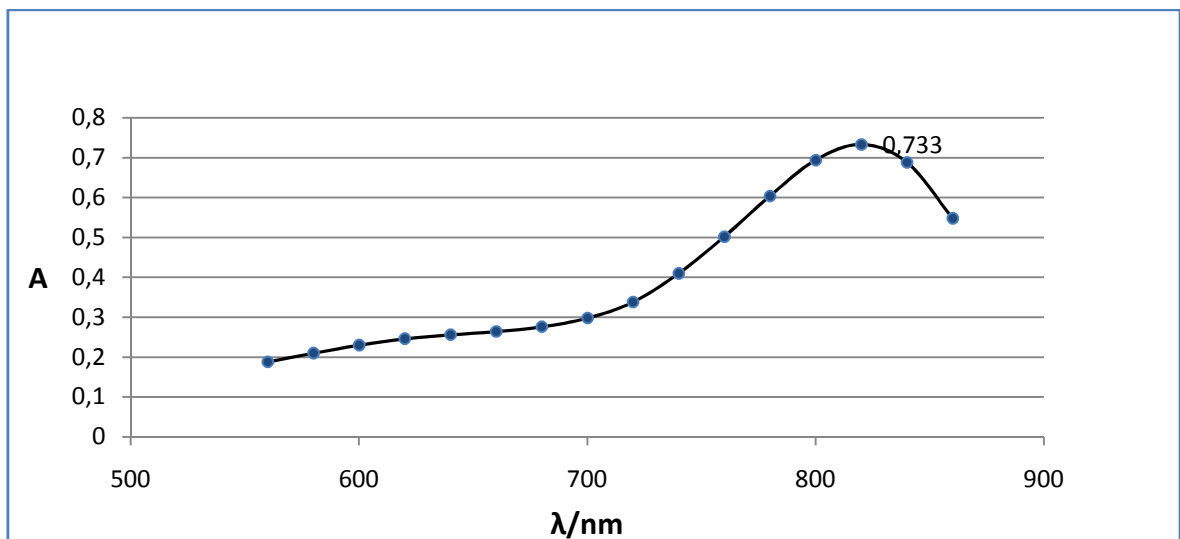
V uzorka (μL)	Ap	Asp
Puffer s Mg^{2+}		
200	0.345	0.385
250	0.388	0.399
300	0.405	0.402
Puffer s Ca^{2+}		
200	0.356	0.403
250	0.379	0.412
300	0.405	0.439

Napomena: Rezultate nije mogu e koristiti za izra un aktivnosti jer je A slijepe probe ve a od A probe uzorka.



Slika 4.2. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

4.8. Određivanje odgovarajuće valne duljine za mjerenje apsorbancije fosfata

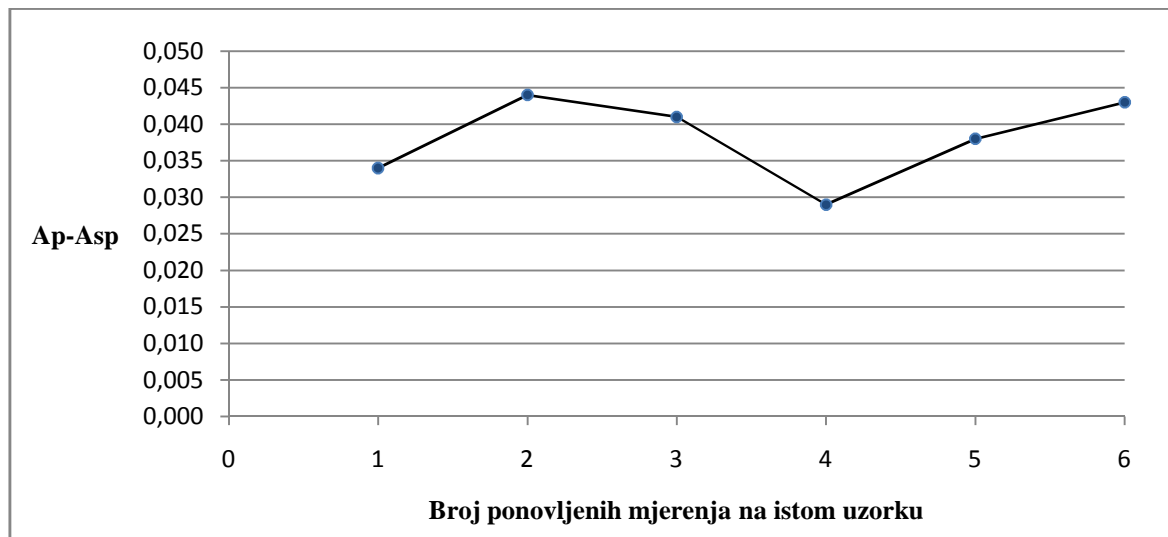


Slika 4.3. Apsorbancija na rasponu valnih duljina od 560 do 860 nm

4.9. Određivanje preciznosti metode

Tablica 4.8. Prikaz rezultata dobivenih prvi dan mjerenja preciznosti ($\lambda = 620 \text{ nm}$)

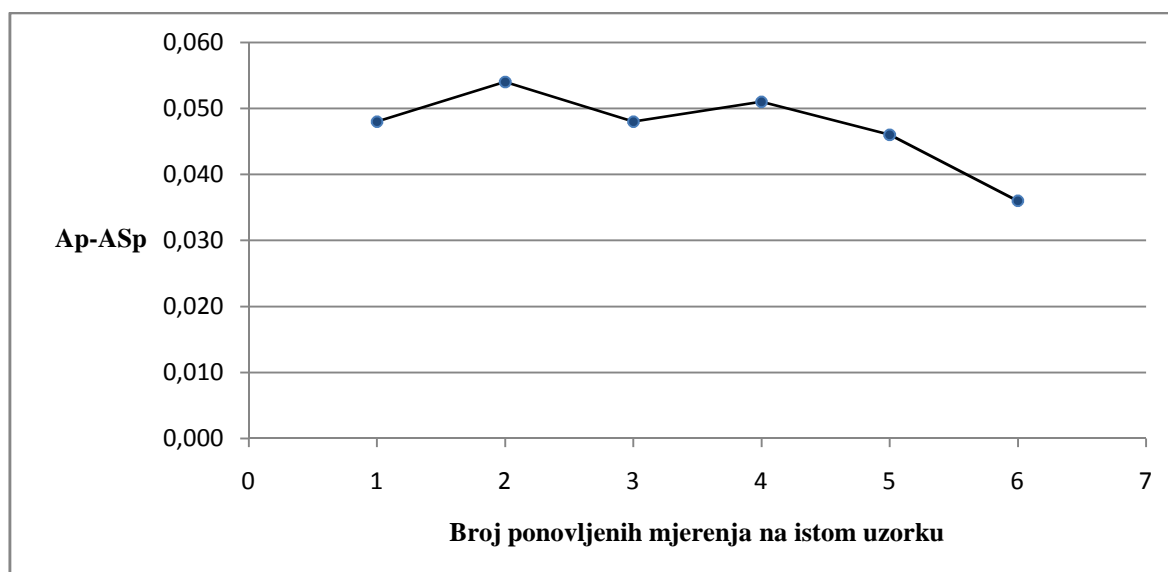
Ap	Asp	Ap-Asp
0.286	0.252	0.034
0.290	0.246	0.044
0.283	0.242	0.041
0.288	0.259	0.029
0.296	0.258	0.038
0.294	0.251	0.043
$(\bar{A}_p - \bar{A}_{sp}) = 0.038$		
SD za (Ap-Asp) = 0.006		
KV za (Ap-Asp) = 15.3 %		



Slika 4.4. Preciznost u prvom danu mjerenja ($\lambda = 620 \text{ nm}$)

Tablica 4.9. Prikaz rezultata dobivenih drugi uzastopni dan mjerenja preciznosti ($\lambda = 620 \text{ nm}$)

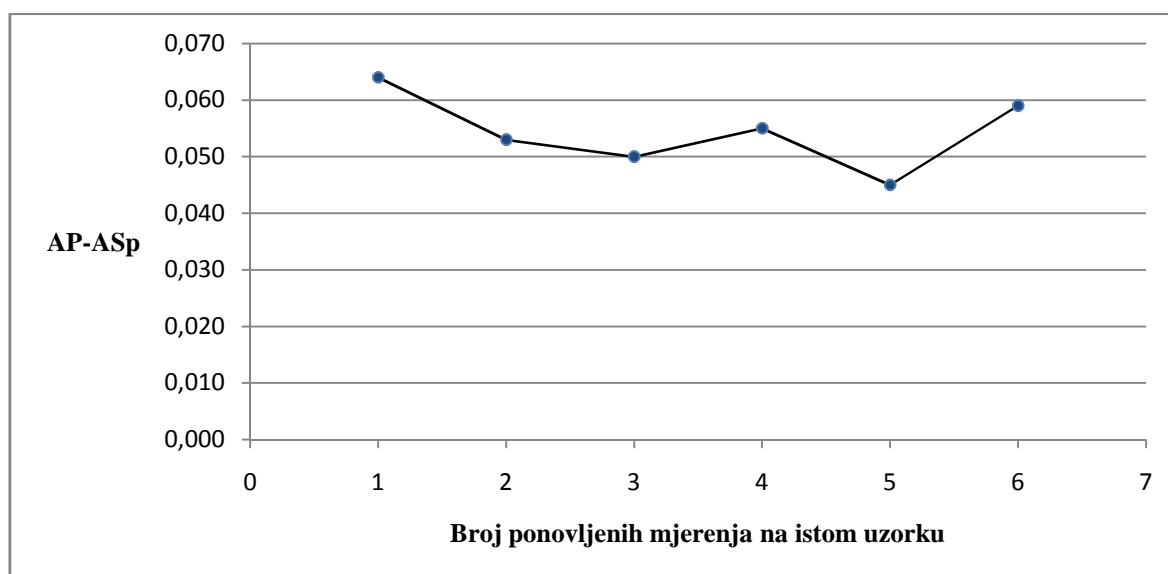
Ap	Asp	Ap-Asp
0.270	0.222	0.048
0.285	0.231	0.054
0.272	0.224	0.048
0.265	0.214	0.051
0.293	0.247	0.046
0.274	0.238	0.036
($\bar{A}_p - \bar{A}_{sp}$)=0.047		
SD za (Ap-Asp)=0.006		
KV za (Ap-Asp)=13.3 %		



Slika 4.5. Preciznost u drugom danu mjerenja ($\lambda = 620 \text{ nm}$)

Tablica 4.10. Prikaz rezultata dobivenih tre i uzastopni dan mjerenja ($\lambda = 620 \text{ nm}$)

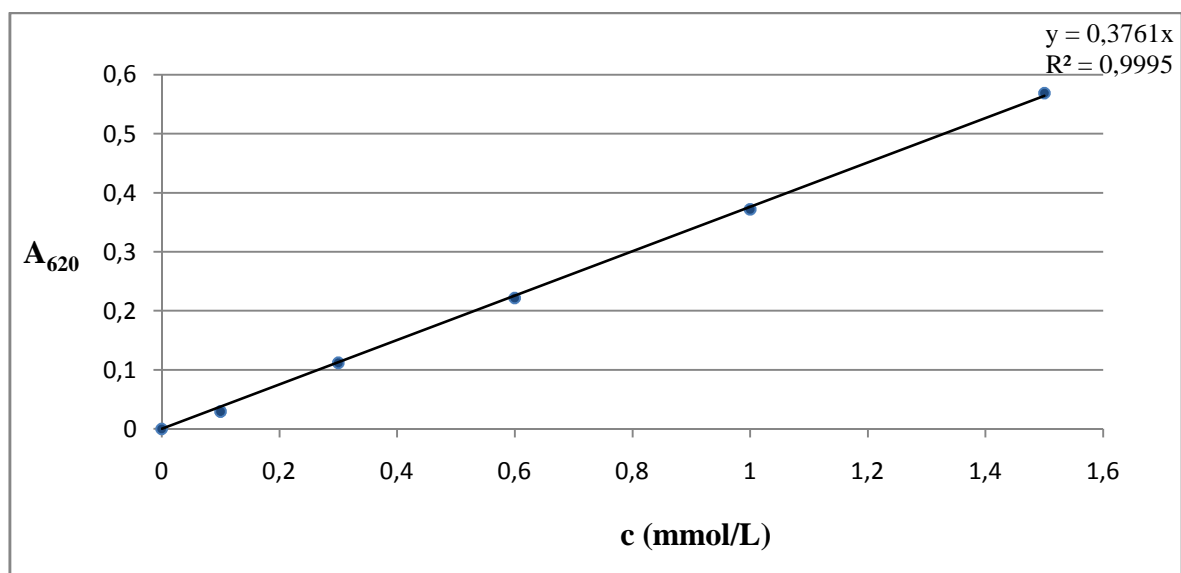
Ap	Asp	Ap-Asp
0.303	0.239	0.064
0.297	0.244	0.053
0.303	0.253	0.050
0.304	0.249	0.055
0.292	0.247	0.045
0.302	0.243	0.059
$(\bar{A}_p - \bar{A}_{sp}) = 0.054$		
$SD(A_p - A_{sp}) = 0.007$		
KV za $(A_p - A_{sp}) = 12.3 \%$		



Slika 4.6. Preciznost u tre em danu mjerenja ($\lambda = 620 \text{ nm}$)

Tablica 4.11. Srednje vrijednosti parametara za određivanje preciznosti za sva tri uzastopna dana

Ap	Asp	Ap-Asp
0.289	0.242	0.047
SD za (Ap-Asp)=0.009		
KV za (Ap-Asp)=19.26 %		
Koeficijent smjera pravca=0.3761		
Srednja vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze (nmol/mL/h)=406.6		

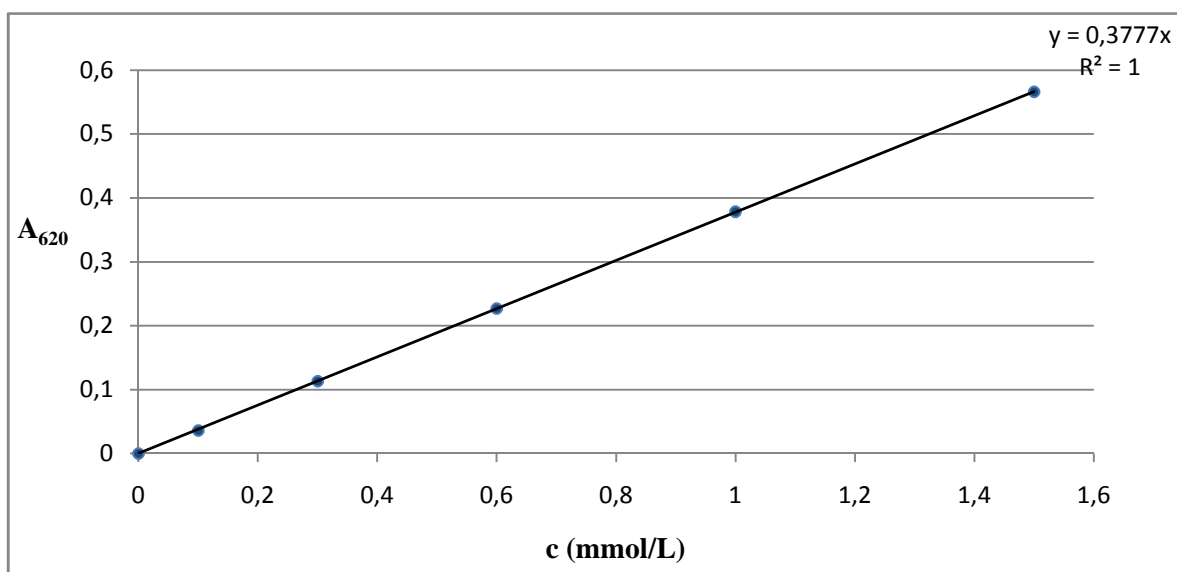


Slika 4.7. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

4.10. Aktivnost ekto-ATPaze izmjerena na kontrolnim uzorcima i miješanom serumu zdravih pojedinaca

Tablica 4.12. Aktivnost ekto-ATPaze u serumu zdravih pojedinaca izmjerena u jednom nizu prvi dan mjerenja

Oznaka uzorka	Ekto-ATPaza (nmol/mL/h)
Koeficijent smjera pravca=0.3777	
K7	673.3
K8	1029.4
K9	1016.4
K10	1029.4
K11	1515.9
"Pool" serum	1164.1



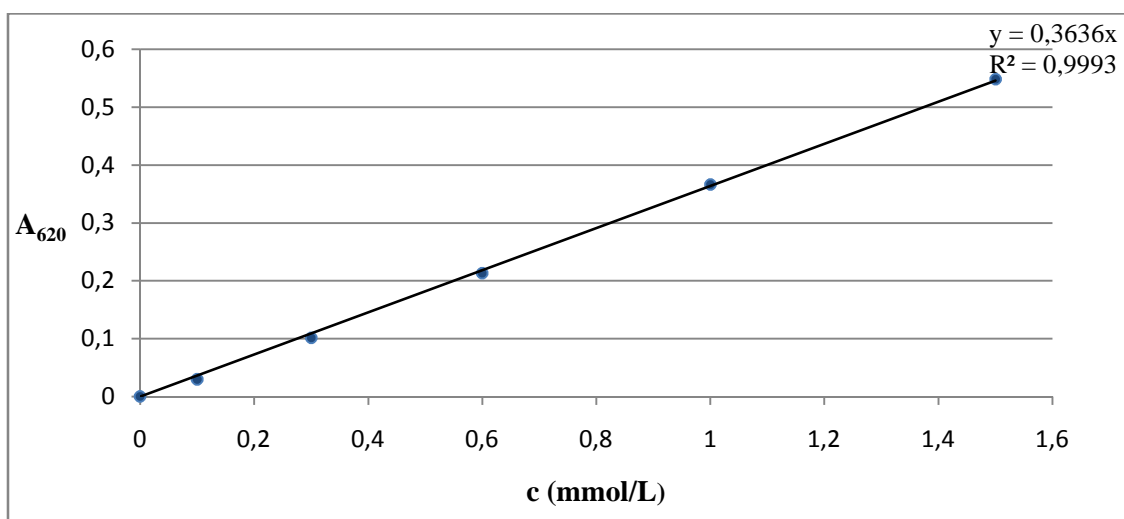
Slika 4.8. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

Tablica 4.13. Aktivnost ekto-ATPaze u serumu zdravih pojedinaca izmjerena u jednom nizu drugi dan mjerenja

Oznaka uzorka	Ekto-ATPaza (nmol/mL/h)
Koeficijent smjera pravca=0.3636	
K12	1221.0
K13	936.6
K14	731.7
K15	731.7
K16	648.1
"Pool" serum	1760.4

Tablica 4.14. Aktivnost ekto-ATPaze u serumu zdravih pojedinaca izmjerena u jednom nizu tre i dan mjerenja

Oznaka uzorka	Ekto-ATPaza (nmol/mL/h)
Koeficijent smjera pravca=0.3636	
K17	765.2
K18	1204.2
K19	1396.6
K17+K18+K19	1701.8



Slika 4.9. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

Tablica 4.15. Sumarni prikaz izmjerene aktivnosti ekto-ATPaze u serumu zdravih pojedinaca

Oznaka uzorka	Ekto-ATPaza (nmol/ml/h)
K7	673.3
K8	1029.4
K9	1016.4
K10	1029.4
K11	1515.9
K12	1221.0
K13	936.6
K14	731.7
K15	731.7
K16	648.1
K17	765.2
K18	1204.2
K19	1396.6
Srednja vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze (nmol/ml/h) = 992.3 ± 281.2	

5. RASPRAVA

Kao supstrat za ekto-ATPazu upotrijebljen je ATP. Kako bi se utvrdilo da fosfati koji daju apsorbanciju uzorka (uz fosfate normalno prisutne u serumu) potječu od enzimske razgradnje ATP-a, a ne njegovog spontanog raspada, proučeno je koliko se ATP-a raspadne u različitim medijima bez uzorka, odnosno bez enzima. Različiti mediji su korišteni jer je bitno utvrditi da li se više ATP-a spontano raspadne u mediju koji sadrži pufer i TCA ili njihovo prisustvo ne utječe na raspad ATP. Stoga se kao kontrolni medij koristila samo voda. Rezultati su pokazali da je spontani raspad ATP podjednak u oba medija, a iznosi oko 14 %. Ta vrijednost je izražena u pomoćnom baždarnom dijagramu koji prikazuje vrijednosti apsorbancije za poznate koncentracije fosfata. ATP korišten kao supstrat je uvijek 3 mmol/L u konačnoj reakcijskoj smjesi, a iz baždarnog pravca je očitano da spontanom raspadom nastane 0.43 mmol/L fosfata, odnosno raspadne se 14 % ATP-a.

S obzirom da su početni volumeni seruma uzeti za mjerenje aktivnosti izrazito mali, postavilo se pitanje potrebe za trikloroocetnom kiselinom koja služi za deproteinizaciju seruma. Rezultati su pokazali da nije moguće izmjeriti apsorbanciju bez prethodne deproteinizacije s TCA. Također je pokazano da što je veći volumen uzorka upotrijebljen, potreban je i veći volumen TCA kako bi se istaložili svi proteini. Zamjenjuje supernatanta nakon centrifugiranja jedan je od jasnijih pokazatelja uspješnosti deproteinizacije.

Tijekom rada utvrdio se problem sa slijepim probama koje su pokazivale veću apsorbanciju od probe uzorka, što nije otkriveno jer je serum u slijepu probu uzorka dodan tek nakon inkubacije na 37 °C, odnosno enzim nije bio izložen temperaturi potrebnoj za njegovu aktivnost. Stoga je pretpostavljeno da slijepa probe pokazuju veću apsorbanciju jer interferiraju nedovoljno istaloženi proteini. Problem se riješio tako da se direktno pomiješao serum i TCA u odgovarajućem omjeru te se alikvot toga dodao u ostatak reakcijske smjese.

Nadalje je postavljeno pitanje kako vrijeme inkubacije na 37 °C utječe na aktivnost enzima te da li se može mjeriti veću aktivnost ako se uzme veći volumen seruma.

Ispitano je vrijeme inkubacije od 15, 30 i 60 min. Razlika u aktivnosti enzima koji je inkubiran 30 i 60 min je značajna. Inkubacijom u trajanju od 60 min izmjerena je puno veća aktivnost.

Tijekom 60 min inkubacije na 37 °C pronašene su vrijednosti apsorbancije za volumen uzorka od 30, 40, 50 i 60 μL . Vrijednosti apsorbancija, a time i aktivnost enzima, bile su skoro identične, i vrlo bliske vrijednostima koje je davao ATP svojim spontanom raspadom tako da je zaključeno da je potrebno uzeti puno veće volumene seruma za daljnja mjerenja. Volumeni seruma u daljnjem tijeku mjerenja su se kretali u rasponu od 50 do 400 μL . Uočeno je da je primjenom većeg volumena, mjerena i veća apsorbancija fosfata. Međutim, nije se moglo sa sigurnošću utvrditi da li apsorbiraju samo fosfati ili čak postoji i interferencija nedovoljno istaloženih proteina. S obzirom da je teško odrediti odgovarajući volumen TCA potreban za taloženje proteina iz većeg volumena uzorka, a da pritom sama TCA ne utječe na uvjete mjerenja, odlučeno je koristiti 50 μL seruma kao konačni volumen uzorka.

S obzirom da je raspon volumena seruma koji je korišten za određivanje aktivnosti enzima velik, u reakciju za mjerenje fosfata se koristio različiti volumen supernatanta. Odnosno, kada je upotrijebljen veliki volumen seruma, npr. 300 μL , volumen supernatanta potreban za reakciju fosfata je bio manji. U slučaju da je upotrijebljen volumen seruma iznosio najviše 150 μL , volumen supernatanta je bio veći. Time se željela ukloniti mogućnost da kod upotrijebljenih velikih volumena, izmjerena apsorbancija pokazuje velike, znanstveno neprihvatljive vrijednosti. Da bi se pokazalo da se s promjenom volumena supernatanta proporcionalno mijenja i apsorbancija, za isti volumen uzorka korišteni su različiti volumeni supernatanta te je tako potvrđena proporcionalnost s apsorbancijom.

Ekto-ATPaza se u literaturi spominje kao enzim ovisan o Ca^{2+} i Mg^{2+} . Iz tog razloga je odlučeno istražiti da li je možda enzim u serumu uvijek ovisan samo o jednom od navedenih. Iz dobivenih rezultata paralelnih mjerenja za oba kationa nije bilo moguće izraziti aktivnost jer su A slijepih proba davale veće vrijednosti od A proba uzoraka, međutim te vrijednosti su bile podjednake u oba slučaja tako da je zaključeno da na aktivnost enzima podjednako utječu i Ca^{2+} i Mg^{2+} .

Prema literaturi, apsorbancija fosfata se mjeri na različitim valnim duljinama. Da bi se odredila najprikladnija valna duljina, apsorbancija je mjerena na rasponu od 560 do 860 nm. Premda je apsorpcijski maksimum izmjeren na 820 nm, ta valna duljina se nije pokazala kao najbolji izbor za mjerenje aktivnosti ekto-ATPaze u serumu. Razlog je taj da je na toj valnoj duljini najveća apsorbancija pokazivala otopina koja sadrži samo ATP, dok su smjese ATP-a i uzorka, kod kojih se pretpostavlja veća apsorbancija jer fosfati, osim što su prisutni u uzorku, nastaju i enzimatskom razgradnjom ATP-a, pokazivale niže vrijednosti.

Osim navedenih parametara, istraženo je i da li svježina uzorka utječe na mjerenje. Korišteni su uzorci koji su odmrzuti neposredno prije mjerenja i svježi uzorci. I jedni i drugi su dali podjednake rezultate.

Također je istražena mogućnost da konkavalin A i levamisol, osim specifičnih enzima, inhibiraju i ekto-ATPazu. Dobiveni rezultati mjerenja s i bez inhibitora nisu pokazali značajnu razliku.

Kada su uspostavljeni svi uvjeti, provjeravala se preciznost metode, a nakon toga se mjerila aktivnost enzima u kontrolnim uzorcima i na "pool" serumu zdravih pojedinaca.

Konačni uvjeti za mjerenje enzimske aktivnosti su: volumen seruma 50 μL , vrijeme inkubacije na 37 °C 60 min, volumen pufera 1050 μL , volumen 1.12 mol/L TCA 100 μL , a valna duljina na kojoj se mjeri apsorbanacija 620 nm.

Preciznost metode se određivala kroz tri uzastopna radna dana. Svaki dan su korišteni isti uređaji i reagensi i mjerenja su izvršena pod istim uvjetima na istom uzorku "pool" seruma.

U konačnici je dobivena vrijednost koeficijenta varijacije od 19.26 % koja je prihvaćena kao relevantna za našu metodu.

Srednja vrijednost izmjerene aktivnosti enzima na 13 kontrolnih uzoraka iznosi 992.3 ± 281.2 nmol/mL/h. Ne možemo dobivenu vrijednost nazvati referentnom jer je aktivnost mjerena na malom broju uzoraka.

Paralelno s kontrolnim uzorcima mjerena je aktivnost enzima i u "pool" serumu, istom na kojem je ispitivana preciznost metode. Primijetilo se da se vrijednosti izmjerene aktivnosti enzima na istom "pool" serumu znatno razlikuju iz dana u dan. Naime, kada je ispitivana preciznost, srednja vrijednost aktivnosti enzima iznosila je 406.6 nmol/mL/h, što se znatno razlikuje od vrijednosti dobivenih mjerenjem aktivnosti na istom uzorku paralelno kada i na kontrolnim uzorcima. Tada je aktivnost enzima u istom "pool" serumu bila puno veća, a iznosila je 1164.1 nmol/ml/h.

Osim toga, kada se uspoređuju vrijednosti aktivnosti enzima u "pool" serumu i u pojedinačnim uzorcima, vidljivo je da je aktivnost enzima u "pool" serumu veća. Stoga je pretpostavljeno da se nespecifična interferencija povećava kada se pomiješaju različiti uzorci.

6. ZAKLJUČCI

U radu su ispitani uinci vremena inkubacije uzorka na 37 °C i volumena uzorka na aktivnost enzima te utjecaj inhibitora drugih fosfataza. Rezultati pokazuju da je najprikladnije vrijeme inkubacije 60 min, a najprikladniji volumen seruma iznosi 50 µL što odgovara 3.5 mg serumskih proteina. Inhibitori drugih fosfataza, levamisol i konkavalin A, ne utječu na aktivnost ekto-ATPaze.

Također je ispitan utjecaj Ca^{2+} i Mg^{2+} na aktivnost enzima, ali aktivnost se nije mogla izraziti jer je apsorbancija slijepe probe bila veća od apsorbancije probe uzorka. Međutim, izmjerene vrijednosti apsorbancije su bile podjednake za oba kationa stoga je zaključeno da je njihov utjecaj na aktivnost podjednak.

Prema dobivenim rezultatima te prema zamunjenju supernatanta, zaključeno je da je za deproteinizaciju seruma najbolje upotrijebiti 100 µL 1.12 mol/L TCA.

Koncentracija supstrata (ATP) u konačnoj reakcijskoj smjesi, koja još sadrži pufer (pH 7.4) i serum, treba biti 3 mmol/L.

Valna duljina za mjerenje fosfata izabrana je na 620 nm jer su se na 830 nm pokazali brojni utjecaji nespecifičnih interferencija.

Preciznost metode je određena kroz tri uzastopna radna dana, a dobivena KV vrijednost iznosi 19.26 %.

Aktivnost ekto-ATPaze je mjerena na 13 kontrolnih uzoraka i srednja vrijednost iznosi 992.3 ± 281.2 nmol/mL/h.

U konačnici, na temelju postavljenih uvjeta metode, izmjerena je aktivnost ekto-ATPaze u serumu, međutim puno je parametara koje još treba istražiti i uspostaviti kako bi se metoda u potpunosti optimizirala i potvrdila kao relevantna za mjerenje aktivnosti ekto-ATPaze u serumu ovdjeka.

7. LITERATURA

Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. A malchite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem*, 1988, 171, 266-270.

Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64, 1471-1483.

Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem*, 1986, 157, 375-380.

Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem*, 1925, 66, 375-400.

Goding JW. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. *J Leukoc Biol*, 2000, 67, 285-311.

Hunter G. A method for deproteinization of blood and other body fluids. *J Clin Phatol*, 1957, 10, 161-164.

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. *Purinergic Signal*, 2005, 1, 193-204.

Oses JP, Cardoso CM, Germano RA, Kirst IB, Rücker B, Fürstenau CR, Wink MR, Bonan CD, Battasini AM, Sarkis JJ. Soluble NTPDase: An additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum. *Life Sci*, 2004, 74, 3275-3284.

Plesner L. Ecto-ATPases: Identities and functions. *Int Rev Cytol*, 1995, 158, 141-214.

Robson SC, Sévigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic signal*, 2006, 2, 409-430.

Tashima Y. Removal of protein interference in the Fiske-Subbarow method by sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem*, 1975, 69, 410-414.

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

Yegutkin GG. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783, 673-694.

Zimmermann H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res*, 2001, 52, 44-56.

Zimmermann H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2000, 362, 299-309.

Zimmermann H. Two novel families of ectonucleotidase: molecular structures, catalytic properties and a search for function. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20, 231-236.

Zimmermann H, Zebisch M, Sträter N. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signal*, 2012, 8, 437-502.

8. SAŽETAK

Ekto-ATPaza je enzim koji pripada skupini E-NTPDaza. Navedeni enzimi su ektoenzimi, što znači da sudjeluju u metabolizmu izvanstaničnih molekula. Ekto-ATPaza sudjeluje u metabolizmu nukleozid difosfata i nukleozid trifosfata, s visokom afinitetom prema nukleozid trifosfatima.

Metabolizam izvanstaničnih molekula odgovarajućim enzimima jedan je od koraka u purinergičnoj signalizaciji koja pak posreduje u različitim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Stoga se smatra da vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze u serumu može biti potencijalni marker u dijagnostici bolesti povezanih s purinergičnom signalizacijom.

Aktivnost ekto-ATPaze u serumu mjerena je pomoću Fiske-Subbarow metode, a srednja vrijednost izmjerena na 13 kontrolnih uzoraka iznosi 992.3 ± 281.2 nmol/ml/h.

Rezultati su pokazali da je za mjerenje aktivnosti najprikladniji volumen uzorka 50 μ L, vrijeme inkubacije na 37 °C 60 min te da je potrebno 100 μ L 1.12 mol/L TCA za deproteinizaciju uzorka.

9. SUMMARY

Ecto-ATPase is an enzyme which belongs to the group of the E-NTPDases. Those enzymes are ectoenzymes, and that they participate in the metabolism of extracellular molecules. Ecto-ATPase participate in metabolism of nucleoside triphosphate and nucleoside diphosphate with higher affinity for the nucleoside triphosphate.

The metabolism of extracellular molecules with the appropriate enzymes is one of the steps in purinergic signaling that mediates a variety of physiological and pathophysiological processes. Therefore it is considered that value of ecto-ATPase activity in human serum may be a potential factor in the diagnosis of diseases associated with purinergic signaling.

Ecto-ATPase activity in the human serum was measured by Fiske-Subbarow method, and the average value of 13 healthy samples was 992.3 ± 281.2 nmol/ml/h.

Results showed that the most suitable sample volume for the measuring enzyme activity is 50 μ L, incubation time on 37 °C is 60 min and that 100 μ L 1.12 mol/L TCA is required for deproteinization of serum.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveu ilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

RAZVOJ METODE ZA MJERENJE AKTIVNOSTI EKTO-ATPaze U SERUMU OVJEKA

Monika Jankovi

SAŽETAK

Ekto-ATPaza je enzim koji pripada skupini E-NTPDaza. Navedeni enzimi su ektoenzimi, što znači da sudjeluju u metabolizmu izvanstanih molekula. Ekto-ATPaza sudjeluje u metabolizmu nukleozid difosfata i nukleozid trifosfata, s veći afinitetom prema nukleozid trifosfatima. Metabolizam izvanstanih molekula odgovarajućim enzimima jedan je od koraka u purinergičnoj signalizaciji koja pak posreduje u različitim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Stoga se smatra da vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze u serumu može biti potencijalni marker u dijagnostici bolesti povezanih s purinergičnom signalizacijom. Aktivnost ekto-ATPaze u serumu mjerena je pomoću Fiske-Subbarow metode, a srednja vrijednost izmjerena na 13 kontrolnih uzoraka iznosi 992.3 ± 281.2 nmol/ml/h. Rezultati su pokazali da je za mjerenje aktivnosti najprikladniji volumen uzorka 50 μ L, vrijeme inkubacije na 37 °C 60 min te da je potrebno 100 μ L 1.12 mol/L TCA za deproteinizaciju uzorka.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 10 grafičkih prikaza, 23 tablica i 17 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Glavne riječi: Ektoenzimi, ekto-ATPaza, purinergična signalizacija, enzimska aktivnost, Fiske-Subbarow metoda

Mentor: **Dr. sc. Tihana Žani Grubišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Tihana Žani Grubišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Anita Somborac Bačura, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Ivan Pepi, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: svibanj 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Haematology
Domagojeva 2 , 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

DEVELOPMENT OF METHOD FOR MEASURING ECTO-ATPase ACTIVITY IN HUMAN BLOOD SERUM

Monika Jankovi

SUMMARY

Ecto-ATPase is an enzyme which belongs to the group of the E-NTPDases. Those enzymes are ectoenzymes, and that they participate in the metabolism of extracellular molecules. Ecto-ATPase participate in metabolism of nucleoside triphosphate and nucleoside diphosphate with higher affinity for the nucleoside triphosphate. The metabolism of extracellular molecules with the appropriate enzymes is one of the steps in purinergic signaling that mediates a variety of physiological and pathophysiological processes. Therefore it is considered that value of ecto-ATPase activity in human serum may be a potential factor in the diagnosis of diseases associated with purinergic signaling. Ecto-ATPase activity in the human serum was measured by Fiske-Subbarow method, and the average value of 13 healthy samples was 992.3 ± 281.2 nmol/ml/h. Results showed that the most suitable sample volume for the measuring enzyme activity is 50 μ L, incubation time on 37 °C is 60 min and that 100 μ L 1.12 mol/L TCA is required for deproteinization of serum.

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

Thesis includes: 38 pages, 10 figures, 23 tables and 17 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Ectoenzymes, ecto-ATPase, purinergic signaling, enzymatic activity, Fiske-Subbarow method

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

Reviewers: **Tihana Žani Grubiši** , **Ph.D. Full Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Anita Somborac Ba ura, **Ph.D. Senior Assistant**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivan Pepi , **Ph.D. Assistant Professor**, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: May 2015.

