

# Razvoj metode za mjerjenje aktivnosti ekto-ATPaze u serumu čovjeka

---

**Janković, Monika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:643723>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-05-13**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



**Monika Jankovi**

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

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveu ilištu 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 Baura na pomoći 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. Ekonukleotidaze .....	1
1.2. Ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze .....	2
1.3. Op a svojstva ekto-ATPaze .....	4
1.3.1. Uloga ekto-ATPaze u purinergi noj signalizaciji .....	4
1.4. Metode za mjerjenje aktivnosti ekto-ATPaze .....	6
1.5. Metode za mjerjenje 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 ure aji te kratki opis metode .....	10
3.1.1. Kemikalije .....	10
3.1.2. Uzorci .....	10
3.1.3. Ure aji .....	10
3.1.4. Metoda.....	11
3.2. Odre ivanje uvjeta za mjerjenje 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. Odre ivanje koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju serumu.....	13
3.2.3. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu serumu .....	14
3.3. Odre ivanje 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 serumu .....	16
3.3.3. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o koncentraciji $\text{Ca}^{2+}$ i $\text{Mg}^{2+}$ .....	16
3.3.4. Odre ivanje optimalne valne duljine za mjerjenje fosfata u serumu .....	16
3.4. Odre ivanje aktivnosti ekto-ATPaze na kontrolnim uzorcima i miješanom serumu zdravih pojedinaca.....	17
3.5. Mjerjenje apsorbancije standardne otopine fosfata .....	19
4. REZULTATI .....	20
4.1. Usporedno mjerjenje spontanog raspada ATP-a u vodenom mediju i mediju koji sadrži pufer i TCA .....	20
4.2. Mjerjenje apsorbancije uzorka serumu bez prethodne deproteinizacije.....	20
4.3. Odre ivanje koncentracije TCA potrebne za deproteinizaciju serumu.....	20
4.4. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu serumu .....	21
4.5. Pra enje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o vremenu inkubacije .....	21
4.6. Pra enje promjene aktivnosti ekto-ATPaze ovisno o volumenu serumu .....	22

4.7. Utjecaj $\text{Ca}^{2+}$ i $\text{Mg}^{2+}$ na aktivnost ekto-ATPaze .....	22
4.8. Određivanje odgovarajuće valne duljine za mjerjenje 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. ZAKLJUČI.....	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 - purinergi ni receptori  
PAP - prostatni na kisela fosfataza  
PNP - purin nukleozid fosforilaza  
Pi - fosfat  
PPi - pirofosfat  
SDS - natrij dodecil sulfat  
TCA - trikloroctena kiselina

*Ap - apsorbancija probe*

*Asp - apsorbancija slijepje 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 mesta, 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 mogunost vezanja za receptore, odnosno sprjeava se aktivacija receptora putem nukleotida koji djeluje kao ligand za taj receptor ili se potiče aktivacija receptora pomoću nukleozida koji nastaje kao produkt hidrolize nukleotida, a djeluje kao ligand. Također, hidrolizom nukleotida može se sprjevit desenzitizacija receptora, odnosno naglo povlačenje receptora s membrane zbog uzastopne aktivacije ligandom (Zimmermann i sur., 2012).

Postoji pet velikih skupina ektonukleotidaza: ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDase), 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 katalitičkim 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. Tako je, za njihovu katalitičku aktivnost potrebni su dvovalentni kationi  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$ . Što se supstrata tiče, humana E-NTPDaza 1 i E-NTPDaza 2 imaju veću afinitet za adenozinske nukleotide, a manju za nukleotide s uracilom. Nadalje, E-NTPDaze 1, 2, 3, i 8 brže hidroliziraju ATP od ADP-a, pri čemu hidroliti kom razgradnjom ATP-a pomoći u E-NTPDaza 2, 3 i 8 nastaju veće kolичine 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, dendritima satnicama i limfocitima te je izrazito bitna u hemostazi, upalnom i imunološkom odgovoru. E-NTPDaza 2 je eksprimirana na mikrovaskularnim pericitima, adventičijskim stanicama muskularnih žila gdje pridonosi rastu i žilama, ali i sudjeluje u agregaciji trombocita s obzirom da proizvodi ADP koji djeluje kao proagregacijski faktor. Tako je on 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 i s regulacijom izliva ivanja inzulina iz Langerhansovih otočaka i a. E-NTPDaza 8 je smještena u jetrenim kanalikulama i etkastojoj 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
<b>NTPDaza 1</b>	CD39, ATPDaza, ekto-apiraza	ENTPD1	10q24
<b>NTPDaza 2</b>	<b>CD39L1, ekto-ATPaza</b>	ENTPD2	9q34
<b>NTPDaza 3</b>	CD39L3, HB6	ENTPD3	3p21.3
<b>NTPDaza 4</b>	UDPaza, LALP70	ENTPD4	8p21
<b>NTPDaza 5</b>	CD39L4,ER-UDPaza, PCPH	ENTPD5	14q24
<b>NTPDaza 6</b>	CD39L2	ENTPD6	20p11.2
<b>NTPDaza 7</b>	LALP1	ENTPD7	10q24
<b>NTPDaza 8</b>	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 isklju ivo na enzime koji hidroliziraju nukleozid difosfate ili nukleozid trifosfate, dok nukleozid monofosfate i druge organske spojeve koji sadrže fosfate ne koriste kao supstrate. Tako er, ti enzimi za svoju aktivnost zahtijevaju  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$ , a nisu osjetljivi na inhibitore P-, F-, i V-tipova ATP-aza. Moraju biti zadovoljeni svi navedeni uvjeti da bi se moglo re i da enzim posjeduje ekto-ATPazu aktivnost (Plesner, 1995).

Dokazano je da ekto-ATPaze imaju 30 puta ve i 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 do i u više oligomernih formi, a osim što razli ite forme utje u na afinitet prema supstratu, mogu utjecati i na kataliti ku aktivnost enzima (Zimmerman, 2001).

#### **1.3.1. Uloga ekto-ATPaze u purinergi noj signalizaciji**

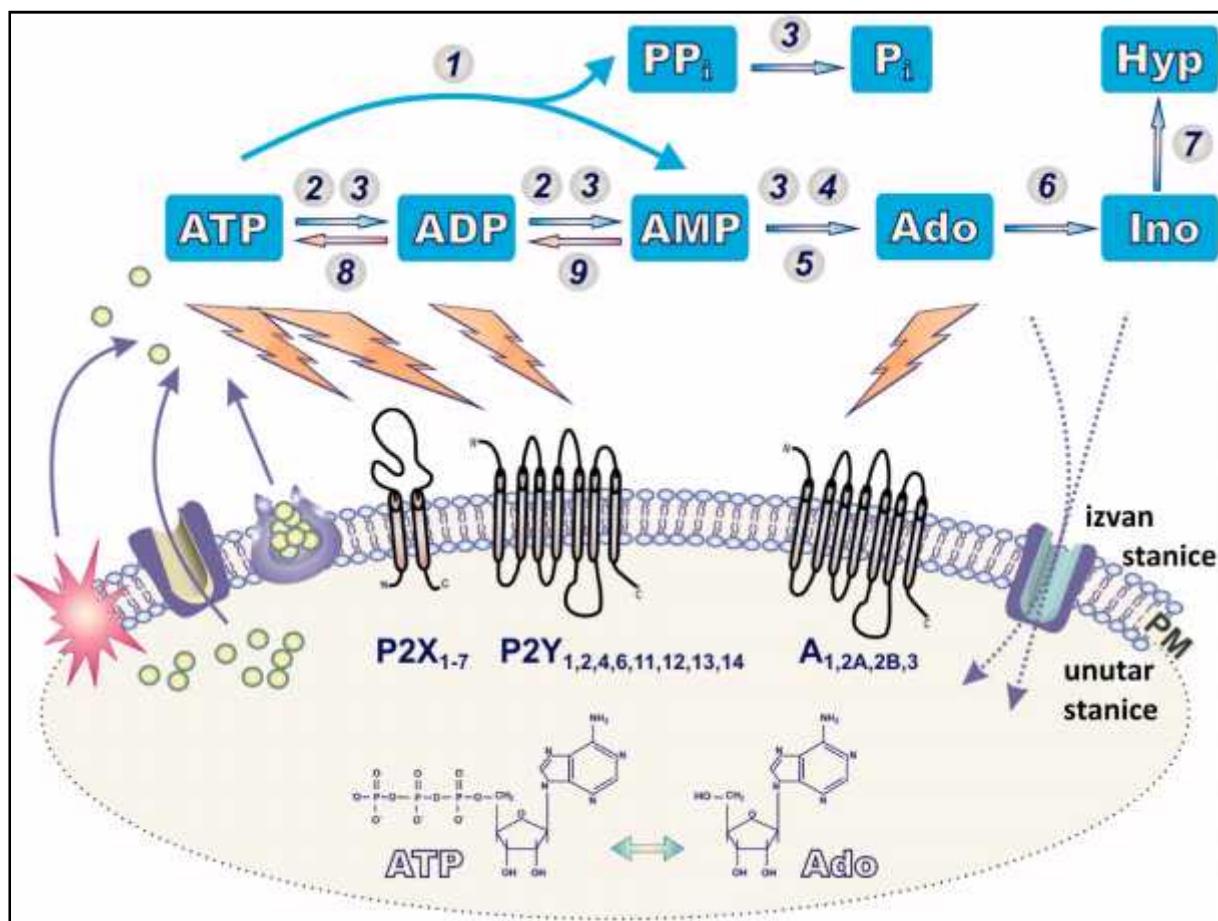
Prvi korak u purinergi noj signalizaciji predstavlja otpuštanje endogenih nukleotida u izvanstani ni prostor. S obzirom da je tema ovoga rada ekto-ATPaza koja kao supstrat prvenstveno koristi ATP, metabolizam ATP-a e biti detaljnije objašnjen u odnosu na druge nukleotide.

Velike koli ine endogenog ATP-a mogu se osloboditi uslijed liti kog procesa stanice, koji je pak posljedica ozlijede, traumatskog šoka ili upalnog stanja. Osim liti kog mehanizma, postoje i drugi mehanizmi osloboanja 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 izlu uju procesom egzocitoze, ovisno o koncentraciji Ca. Iz neekscitacijskih stanica, ATP se otpušta pod utjecajem mehani kih i ostalih stimulatora te kao odgovor na tvari koje mobiliziraju Ca poput bradikinina i serotoninina. S obzirom da se ATP otpušta pod razli itim uvjetima, raznoliki su i putovi kojima izlazi iz endogenog prostora,a neki od njih uklju uju i elektrodifuziju kroz kanale te olakšanu difuziju pomo u transportera (Yegutkin, 2008).

Nakon otpuštanja ATP-a, sljede i korak je vezanje za receptore. Dakle, ATP djeluje kao signalna molekula, odnosno kao agonist purinergi nih receptora. Postoje dvije skupine

purinergi nih receptora, P1 i P2 skupina. Na P1 receptore djeluje adenozin, 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 receptori koji su metabotropni, odnosno spregnuti s proteinom G. Za sada je poznato sedam ionotropnih i osam metabotropnih receptora (Burnstock, 2007).

U sljedećem koraku purinergi ne signalizacije sudjeluju ektonukleotidaze, među njima i ekto-ATPaza, koje hidroliziraju ATP do adenozina koji zatim agonisti koji djeluju na P1 receptore nakon čega 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 (prilagođeno prema: Yegutkin, 2014)

## **1.4. Metode za mjerjenje aktivnosti ekto-ATPaze**

U istraživanju koje su proveli J. P. Osese 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 mjerjenje 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 odreivanje fosfata prema kojima se izračuna enzimska aktivnost. Paralelno su izvršena i mjerena na kontrolama u koje je uzorak dodan nakon što je reakcija prekinuta s TCA. Mjeranjem aktivnosti NTPDaza je pokazano da se ti enzimi aktiviraju s  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$  te da nisu osjetljivi na klasične ATPazne inhibitory; ouabain, NEM, lantan, oligomicin i 0.1 mM natrijev azid, dok se inhibiraju s velikim koncentracijama natrijevog azida (10-20mM) i ortovanadatom (Osese i sur., 2004).

Enzimska aktivnost je mjerena u proteinskom ekstraktu koji je dobiven prethodnom obradom COS-7 stanica transfektiranih s eksprezijskim vektorom koji sadrži gene za humane ili mišje NTPDaze. Navedeni ekstrakt je stavljen u medij koji sadrži 5 mM  $\text{CaCl}_2$  i 80 mM Tris pH 7.4 nakon ega je provedena predinkubacija na 37°C u trajanju od 3 min. Reakcija je započeta dodatkom 25  $\mu\text{L}$  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 je mjerena aktivnost enzima u intaktnim COS-7 stanicama u jažicama uz 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 145 mM NaCl, 0,5 mM supstrat te 100 mM Tris, pH 7.4. Oslobođeni anorganski fosfat je mjerен pomoću malachite green metode.

Ovim istraživanjem je pokazano da je aktivnost NTPDaza linearno ovisna u vremenu od 30 minuta te da ti enzimi imaju veći afinitet za nukleozid trifosfate nego nukleozid difosfate, dok adenosin monofosfat ne hidroliziraju. I humane i mišje NTPDaze zahtjevaju  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$  za svoju aktivnost, u koncentraciji od 1 do 5 mM. Pokazan je izostanak enzimske 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  $\text{Ca}^{2+}$  ima veći afinitet za nukleotide s uracilom kao supstrate. Također je ispitani 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 znatnu aktivnost u pH 4.5-8.5, a zamijeđena 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 tim da je primijenjen i nastanak AMP-a koji je nešto veći kod humanog enzima, ali uzrok tomu može biti više razloga, između ostalog i varijabilnost metoda u vrstama (Kukulski i sur., 2005).

## 1.5. Metode za mjerjenje 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.

Oslabljeni fosfati kod mjerjenja aktivnosti ekto-ATPaze u proteinskom ekstraktu dobivenom od COS-7 stanica (točka 1.4., str. 6.) su izmjereni pomoću jedne od varijanti malachite green metode. Metoda se provodi na sljedeći način: se doda 6N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , i u ulozi povećati topljivost i stabilnost malachite green boje, polagano dodaje u vodu te se otopina ohladi na sobnoj temperaturi nakon čega još 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 mjeri fosfati, u obojenu otopinu se stavi amonijev molibdat i Tween 20 koji djeluje kao stabilizator obojenog kompleksa. Nakon što je napravljen odgovarajući obojeni reagens, jedan volumenski udio tog reagensa se miješa sa pet volumena udjela ispitivane otopine. Dobivena otopina se pomiješa te ostavi na sobnoj temperaturi jer je za nastanak obojenog kompleksa potrebno oko 3 minuta na 25 °C, nakon čega se mjeri apsorbancija na 630 nm (Baykov i sur., 1988).

Malachite green metoda je upotrijebljena i za mjerjenje fosfata u serumu štakora (točka 1.4., str. 6.). Pristup je nešto drugi nego u prethodno objašnjenoj metodi. Amonijev molibdat se otopi u 6 N HCl-u, poluvinski alkohol u kipu ojačava vodi, a malachite green u deioniziranoj vodi te

se pomiješaju u odgovaraju i omjerima s deioniziranim vodom. Primjena polivinilnog alkohola omoguava mjerjenje fosfata bez prethodne deproteinizacije ispitivane otopine. Reagens se priprema na dan primjene te se ostavi na sobnoj temperaturi dok ne poprimi naran astu boju. U konačnosti se pomiješaju pripremljeni reagens i ispitivana otopina, te se mjeri apsorbancija 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 priređenim 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 reducens za fofomolibdenski kompleks najprihvataljivija se pokazala 1,2,6-aminonaftolsulfonska kiselina, za razliku od hidrokinona koji izaziva brzi i nelinearni gubitak boje (Fiske, Subbarow, 1925).

Kod mjerjenja fosfata u uzorku seruma pomoći u Fiske-Subbarow metodi, potrebno je ukloniti interferenciju proteina. Više je kemijskih tvari koje pomažu u otklanjanju interferencije.

U istraživanju gdje je mjerena aktivnost ATPaze na membrani eritrocita, SDS je upotrijebljen za solubilizaciju membranskih proteina. SDS je dodan uzorcima prije mjerjenja, a njegov dodatak je otklonio mogućnost interferencije membranskih proteina, s time da niti on sam nije interferirao kod mjerjenja (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 mjerjenje 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 mjerjenja. U ovom radu će biti opisani i prikazani svi ispitivani imbenici i u konačnosti izmjerena enzimska aktivnost. Kao uzorak za uspostavljanje metode korišten je miješani serum zdravih pojedinaca, a za mjerjenje aktivnosti enzima korišteni su kontrolni uzorci, odnosno pojedinačni serumi 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 ure aji te kratki opis metode**

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

##### **3.1.1. Kemikalije**

1. Hepes (N-(2-Hydroxyethyl)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 (kontrole). 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 mjerjenje.

##### **3.1.3. Ure aji**

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

### **3.1.4. Metoda**

Za svaki ispitivani parametar kod uspostavljanja metode za mjerjenje aktivnosti enzima posebno su detaljno navedeni korišteni reagensi i postupci. Međutim, u konačni, 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 odredi spektrofotometrijski na odgovarajućoj valnoj duljini.

Kada su ispitani i uspostavljeni svi uvjeti, izmjerena je aktivnost ekto-ATPaze u serumu. Kao reagens za mjerjenje aktivnosti korišten je pufer koji sadrži dvovalentne katione  $\text{Ca}^{2+}$  ili  $\text{Mg}^{2+}$ , 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 priređuju svježi, neposredno pred primjenu.

## 3.2. Određivanje uvjeta za mjerjenje 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 način da je ATP smješten samo u vodenim medijima i posebno u kompleksni medij koji sadrži trikloroctenu kiselinu, pufer i vodu, a u kojem nici 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 CaCl<sub>2</sub>, 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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 podatci da je moguće odrediti koncentraciju 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 tablici 3.2.1., str. 12.

*Tablica 3.2. Postupak mjerjenja koncentracije fosfata u serumu bez uporabe TCA*

Uzorak ( $\mu\text{L}$ )	50	250	500	Slijepa proba reakcije
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	450	250	0	500
Radni reagens ( $\mu\text{L}$ )	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
Puffer ( $\mu\text{L}$ )	1000	1000	1000
Uzorak ( $\mu\text{L}$ )	X	-	-
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	-	-	350
Predinkubacija 5-10 min na 37 °C.			
ATP ( $\mu\text{L}$ )	50	50	-
Inkubacija do 60 min na 37 °C, reakcija se prekida dodatkom			
TCA ( $\mu\text{L}$ )	Y	Y	Y
Uzorak ( $\mu\text{L}$ )	-	X	-
Centrifugira se 5 min na 5000 g.			
Supernatant ( $\mu\text{L}$ )	50/25	50/25	50/25
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	450/475	450/475	450/475
Radni reagens ( $\mu\text{L}$ )	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  $\mu\text{L}$ ; Y = 100, 200  $\mu\text{L}$

### **3.2.3. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu seruma**

Aktivnost ekto-ATPaze se mjeri na temelju koliine oslobođenih fosfata nakon enzimske reakcije. Određivanje optimalne apsorbancije fosfata izvršeno je tako da se za enzimsku reakciju koristio isti volumen seruma, ali se mijenjao volumen supernatanta koji je dobio 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 <sub>2</sub> O za slijepu probu reakcije (µL)	800
TCA (µL)	200
Pomiješa se, centrifugira 5 min na 5000 g.	
Supernatant (µL)	50
H <sub>2</sub> O (µl)	450
Radni reagens (µL)	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 priređen 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
Puffer (μL)	1000	1000	1000
Uzorak (μL)	20	-	-
H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O (μL)	450	450	450
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.			

### **3.3.2. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti ekto-ATPaze o volumenu seruma**

Korištenjem različnih volumena seruma, uz ostale iste parametre, odlučno je koji je volumen uzorka najprikladniji za mjerjenje 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 $\text{Ca}^{2+}$ i $\text{Mg}^{2+}$**

Postupak kojim se utvrdilo o kojem kationu ovisi aktivnost enzima je proveden na način na koji su se ispitivala 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 priređen u koncentraciji od 81 mmol/L, dakle prilagodljena je koncentracija kako bi u konačnoj reakcijskoj smjesi iznosila 3 mmol/L. Za pripremu bufera 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 mjerjenja s buferom koji sadrži  $\text{MgCl}_2$  i buferom koji sadrži  $\text{CaCl}_2$ .

### **3.3.4. Određivanje optimalne valne duljine za mjerjenje fosfata u serumu**

Priredjena 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 mjerena, a enzimska aktivnost je izračunata prema sljedećoj formuli:

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

*Ap - apsorbancija probe*

*Asp - apsorbancija slijepo 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 mjereno aktivnosti)*

*t - vrijeme inkubacije na 37°C*

*Vu - volumen uzorka*

#### **Reagensi korišteni za konaci postupak mjerena enzimske 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 CaCl<sub>2</sub>
  - c) 100 mmol/L KCl
  - d) 1 mmol/L levamisol
  - e) 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
- F) Radni reagens - pripredi se neposredno pred primjenu miješanjem 6 dijelova amonijevog heptamolibdata i 1 dijela askorbinske kiseline.
- G) Kao uzorci su korišteni kontrolni serumi zdravih pojedinaca i "pool" serum.
- H) Valna duljina na kojoj je mjerena apsorbancija fosfata iznosi 620 nm.

U redoslijedu dodavanja TCA kod slijepe 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 zamjeni enzima supernatanta nakon centrifugiranja. Također je nastala promjena u reagensima i valnoj duljini na kojoj se mjeri apsorbancija fosfata. Pufer je priređen od HEPES-Tris-a, a ne od Tris-HCl-a ili Tris-baze, a valna duljina za mjerjenje apsorbancije fosfata odredena je na 620 nm, umjesto dosadašnjih 830 nm.

*Tablica 3.6. Postupak mjerjenja aktivnosti ekto-ATPaze u serumu*

	Proba uzorka	Slijepa proba uzorka	Slijepa proba reakcije
Pufer ( $\mu\text{L}$ )	1050	1050	1050
Uzorak ( $\mu\text{L}$ )	50	-	-
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	-	-	100
Predinkubacija 5 min na 37 °C.			
ATP ( $\mu\text{L}$ )	50	50	-
Inkubacija 10 min na 37 °C, reakcija se prekida dodatkom,			
TCA ( $\mu\text{L}$ )	100	100 TCA + 50 SERUMA	100
Uzorak ( $\mu\text{L}$ )	-		-
Centrifugira se 5 min na 10000 g.			
Supernatant ( $\mu\text{L}$ )	50	50	50
$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	450	450	450
Radni reagens ( $\mu\text{L}$ )	500	500	500
Pomiješa se, inkubira na 60 °C tijekom 7 min, stavi na led te mjeri apsorbancija 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 priređivane su u koncentraciji od 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 i 1.5 mmol/L. Baždarni dijagram napravljen je svaki put kada su se priređivali svježi kompletni puferi i TCA, a koeficijent smjera korišten je u formuli za računanje enzimske aktivnosti.

#### Upotrijebljeni reagensi:

- A) Standardan otopina fosfata u koncentraciji od 0.1, 0.3, 0.6, 1.0 i 1.5 mmol/L koje se prirede od 3 mmol/L standardne otopine fosfata.
- B) 1.12 mol/L trikloroctena kiselina
- C) 1.14 mol/L askorbinska kiselina - svježe pripremljena.
- D) 6.8 mmol/L amonijev heptamolibdat
- E) Radni reagens - priredi 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) ( $\mu$ L)	Slijepa proba reakcije ( $\mu$ L)
Standardna otopina fosfata (A) ( $\mu$ L)	Prema ukupnom V reakcijske smjese
$H_2O$ ( $\mu$ L)	-
TCA (B) ( $\mu$ L)	Prema ukupnom V reakcijske smjese
Od A + B ( $\mu$ L)	100
$H_2O$ ( $\mu$ L)	50
Radni reagens ( $\mu$ L)	450
	450
	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 mjerjenje 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. Mjerjenje apsorbancije uzorka seruma bez prethodne deproteinizacije

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

Volumen uzorka ( $\mu\text{L}$ )	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 mutnoći otopine.

	Ap	Asp
<i>Volumen TCA 100 <math>\mu\text{L}</math></i>		
V uzorka 200 $\mu\text{L}$	0.691	0.490
V uzorka 300 $\mu\text{L}$	1.332	1.138
V uzorka 400 $\mu\text{L}$	Nije moguće izmjeriti	Nije moguće izmjeriti
<i>Volumen TCA 200 <math>\mu\text{L}</math></i>		
V uzorka 200 $\mu\text{L}$	0.349	0.309
V uzorka 300 $\mu\text{L}$	0.371	0.324
V uzorka 400 $\mu\text{L}$	0.391	0.335

#### 4.4. Ispitivanje ovisnosti apsorbancije fosfata o volumenu serumra

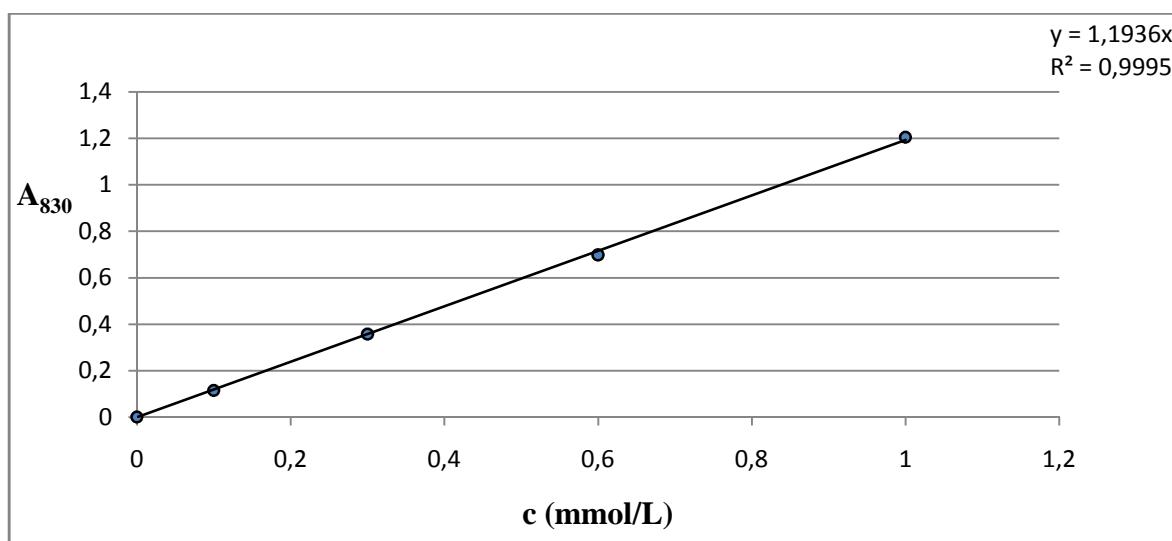
Tablica 4.4. Pra enje proporcionalnosti apsorbancije fosfata i volumena supernatanta ( $\lambda = 830 \text{ nm}$ )

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  $37^\circ\text{C}$  ( $\lambda = 830 \text{ nm}$ )

	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. Prazne promjene aktivnosti ekto-ATPaze ovisno o volumenu seruma

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

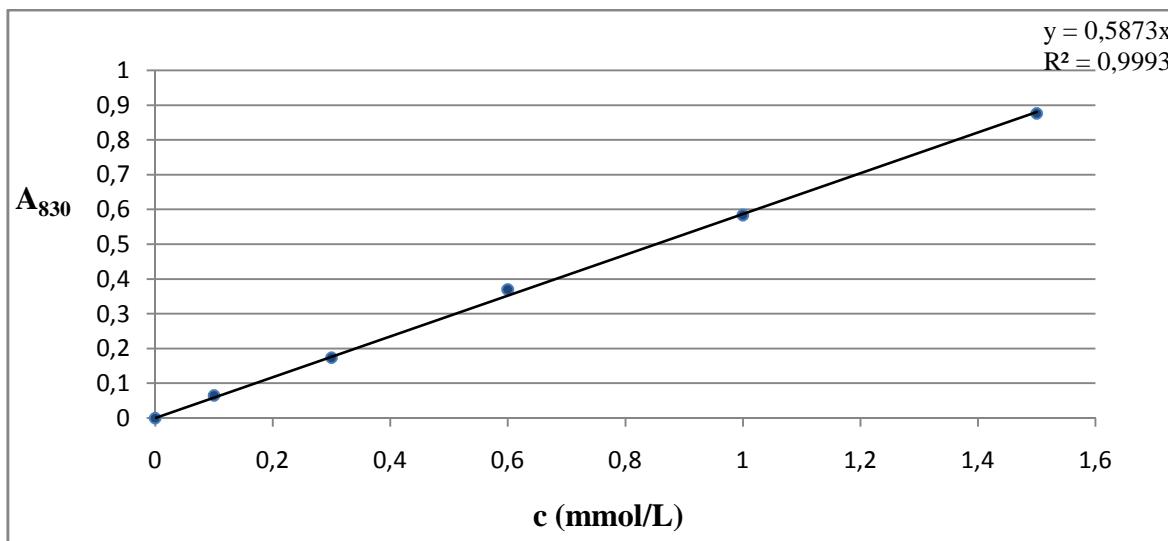
	Ap	Asp	Aktivnost enzima (nmol/mL/h)
Vrijeme inkubacije na $37^\circ\text{C}$ je 60 min.			
V uzorka 30 $\mu\text{L}$	0.551	0.526	1074.2
V uzorka 40 $\mu\text{L}$	0.537	0.502	1138.4
V uzorka 50 $\mu\text{L}$	0.580	0.564	420.1
V uzorka 60 $\mu\text{L}$	0.557	0.553	88.3

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

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

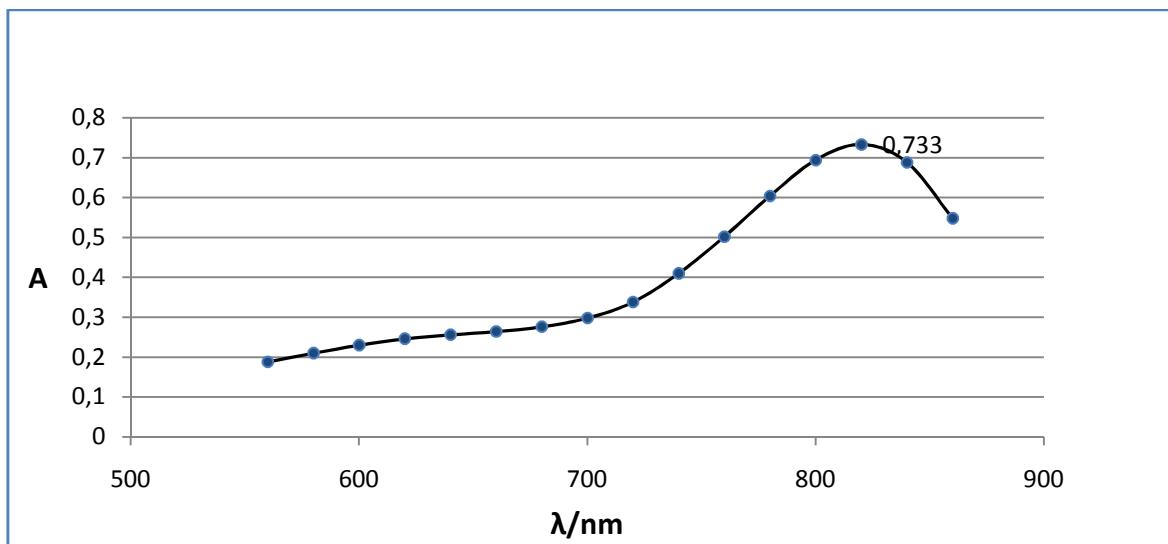
V uzorka ( $\mu\text{L}$ )	Ap	Asp
Pufer s $\text{Mg}^{2+}$		
200	0.345	0.385
250	0.388	0.399
300	0.405	0.402
Pufer s $\text{Ca}^{2+}$		
200	0.356	0.403
250	0.379	0.412
300	0.405	0.439

Napomena: Rezultate nije moguće koristiti za izračun aktivnosti jer je A slijepo probe veća od A probe uzorka.



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

#### 4.8. Određivanje odgovarajuće valne duljine za mjerjenje apsorbancije fosfata

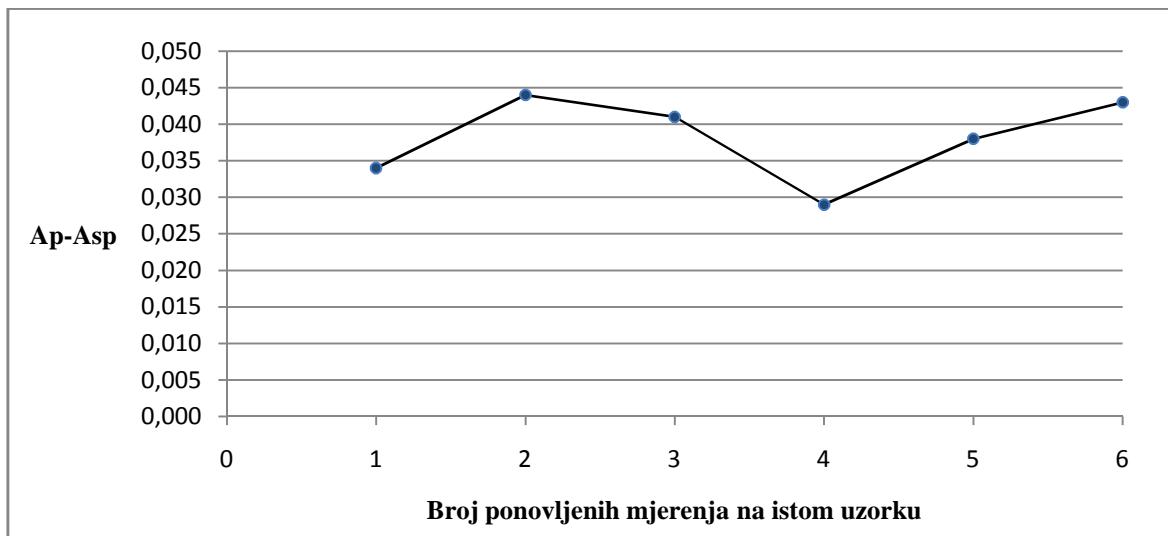


Slika 4.3. Apsorbancija na rasponu valnih duljina od 560 do 860 nm

#### 4.9. Određivanje preciznosti metode

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

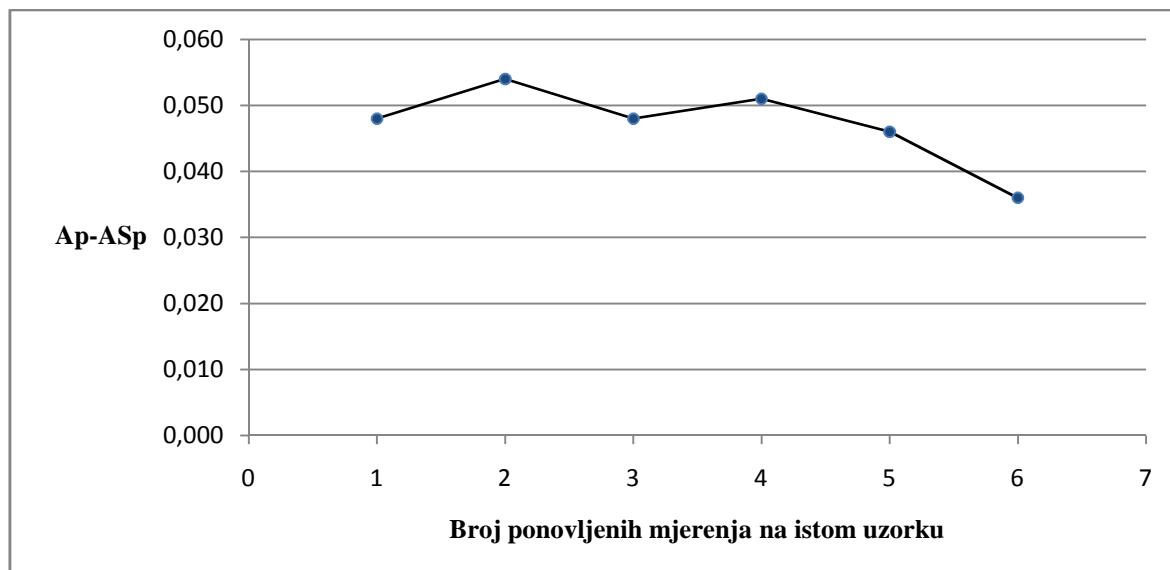
Ap	Asp	Ap-Asp
0.286	0.252	0.034
0.290	0.246	0.044
0.283	0.242	0.041
0.288	0.259	0.029
0.296	0.258	0.038
0.294	0.251	0.043
$(\bar{A}_p - \bar{A}_{sp}) = 0.038$		
SD za (Ap-Asp) = 0.006		
KV za (Ap-Asp) = 15.3 %		



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

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

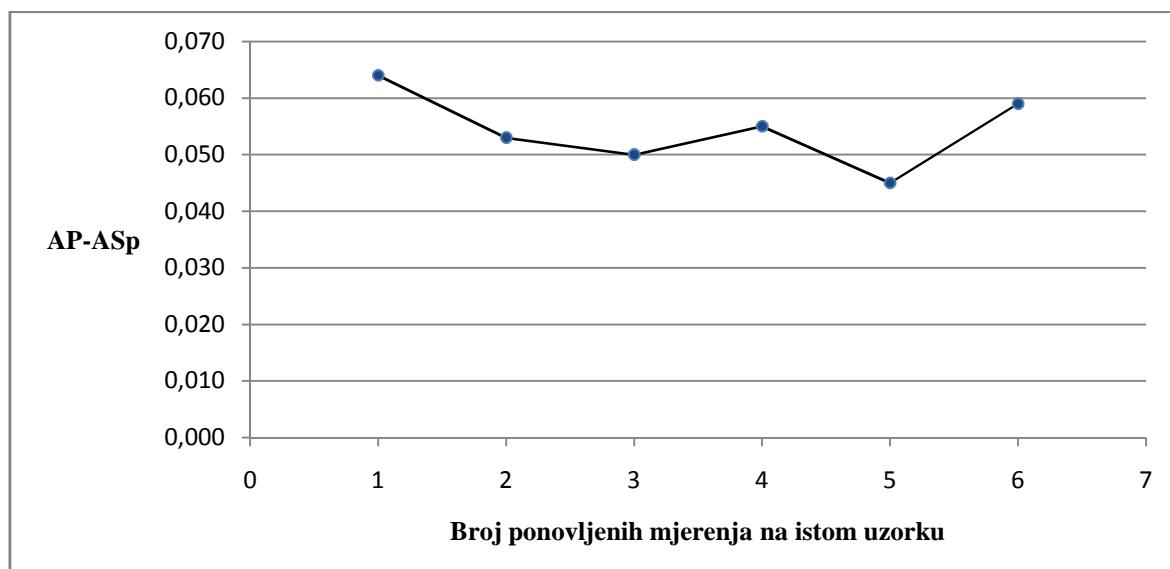
Ap	Asp	Ap-Asp
0.270	0.222	0.048
0.285	0.231	0.054
0.272	0.224	0.048
0.265	0.214	0.051
0.293	0.247	0.046
0.274	0.238	0.036
$(\bar{A}p - \bar{A}sp) = 0.047$		
SD za (Ap-Asp) = 0.006		
KV za (Ap-Asp) = 13.3 %		



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

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

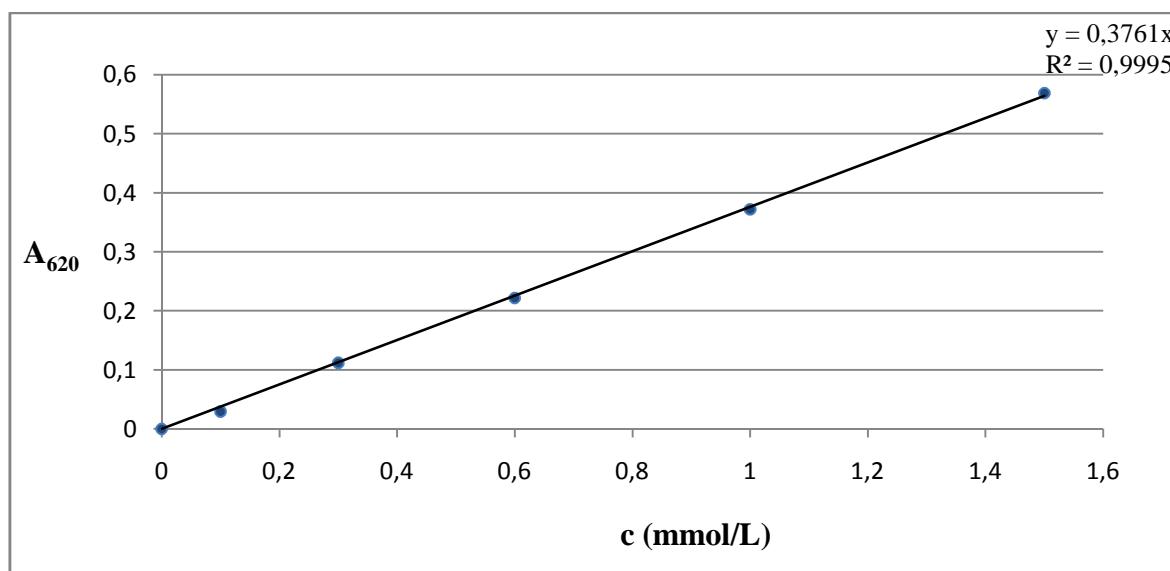
Ap	Asp	Ap-Asp
0.303	0.239	0.064
0.297	0.244	0.053
0.303	0.253	0.050
0.304	0.249	0.055
0.292	0.247	0.045
0.302	0.243	0.059
$(\bar{A}p - \bar{A}sp) = 0.054$		
$SD (A)p - A sp) = 0.007$		
$KV za (A)p - A sp) = 12.3 \%$		



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

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		

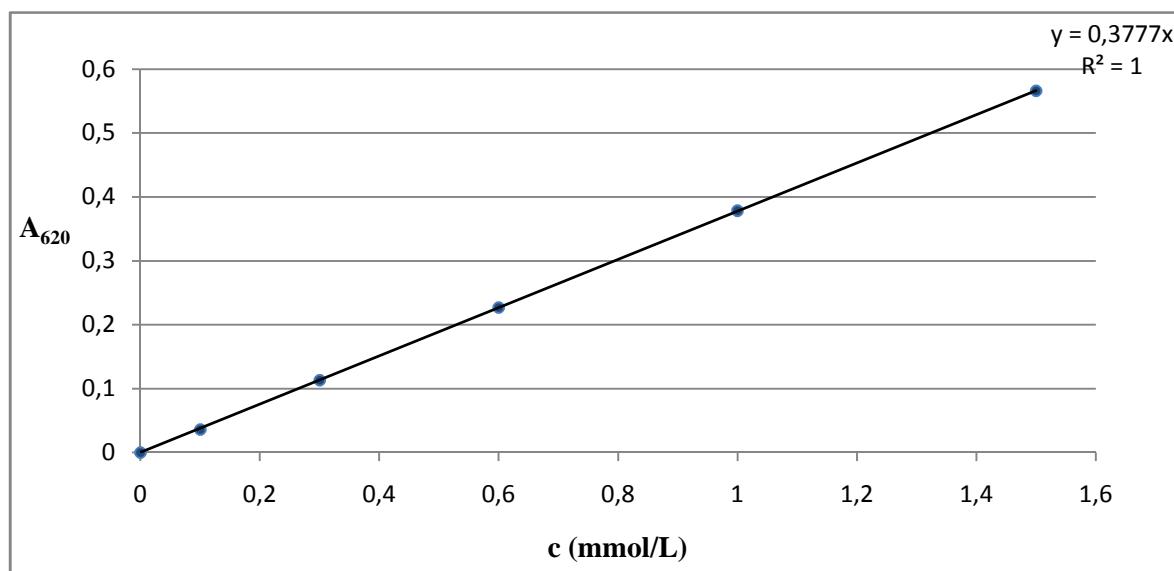


Slika 4.7. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

#### 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



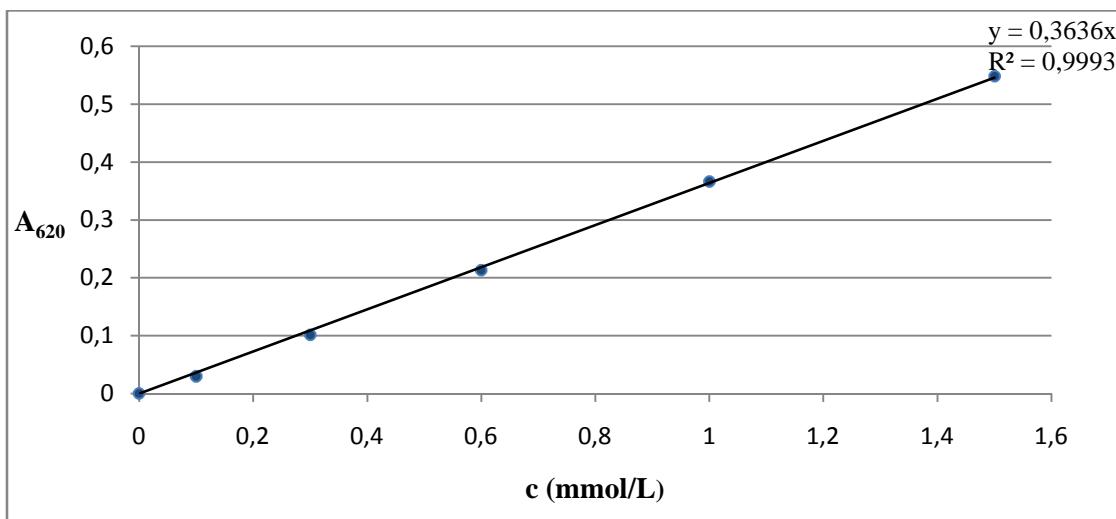
Slika 4.8. Baždarni dijagram koji prikazuje ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji fosfata

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

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 treći dan mjerena

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 ovisnostapsorbancije 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) = $992.3 \pm 281.2$	

## 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) potje u od enzimske razgradnje ATP-a, a ne njegovog spontanog raspada, prvo je koliko se ATP-a raspade u razli itim medijima bez uzorka, odnosno bez enzima. Razli iti mediji su korišteni jer je bitno uo iti da li se više ATP-a spontano raspade u mediju koji sadrži pufer i TCA ili njihovo prisustvo ne utje e 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 izra unata pomo u baždarnog dijagrama koji prikazuje vrijednosti apsorbancije za poznate koncentracije fosfata. ATP korišten kao supstrat je uvijek 3 mmol/L u kona noj reakcijskoj smjesi, a iz baždarnog pravca je o itano da spontanim raspadom nastane 0.43 mmol/L fosfata, odnosno raspadne se 14 % ATP-a.

S obzirom da su po etni volumeni seruma uzeti za mjerjenje aktivnosti izrazito mali, postavilo se pitanje potrebe za trikloroctenom kiselinom koja služi za deproteinizaciju seruma. Rezultati su pokazali da nije mogu e izmjeriti apsorbanciju bez prethodne deproteinizacije s TCA. Tako er je pokazano da što je ve i volumen uzorka upotrijebljen, potreban je i ve i volumen TCA kako bi se istaložili svi proteini. Zamu enje supernatanta nakon centrifugiranja jedan je od jasnijih pokazatelja uspješnosti deproteinizacije.

Tijekom rada uo en je problem sa slijepim probama koje su pokazivale ve u apsorbanciju od probe uzorka, što nije o ekivano 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 prepostavljeno da slijedeće probe pokazuju ve u apsorbanciju jer interferiraju nedovoljno istaloženi proteini. Problem se riješio na na in da se direktno pomiješao serum i TCA u odgovaraju em omjeru te se alikvot toga dodao u ostatak reakcijske smjese.

Nadalje je postavljeno pitanje kako vrijeme inkubacije na 37 °C utje e na aktivnost enzima te da li e se mjeriti ve a aktivnost ako se uzme ve i volumen serumu.

Ispitano je vrijeme inkubacije od 15, 30 i 60 min. Razlika u aktivnosti enzima koji je inkubiran 30 i 60 min je zna ajna. Inkubacijom u trajanju od 60 min izmjerena je puno ve a aktivnost.

Tijekom 60 min inkubacije na 37 °C pravene 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 spontanim raspadom tako da je zaključeno da je potrebno uzeti puno veći volumene seruma za daljnja mjerena. Volumeni seruma u dalnjem tijeku mjerena 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 ak postoji i interferencija nedovoljno istaloženih proteina. S obzirom da je teško odrediti odgovarajući volumen TCA potreban za istaloženje proteina izvećeg volumena uzorka, a da pritom sama TCA ne utječe na uvijete mjerena, odlučeno je koristiti 50 µL seruma kao konstantni volumen uzorka.

S obzirom da je raspon volumena seruma koji je korišten za određivanje aktivnosti enzima velik, u reakciju za mjerjenje 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 upotrijebljeni 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<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>. Iz tog razloga je odlučeno istražiti da li je možda enzim u serumu ovjeka ovisan samo o jednom od navedenih. Iz dobivenih rezultata paralelnih mjerena za oba kationa nije bilo moguće izraziti aktivnost jer su A<sub>1</sub> sljepih proba davale veće vrijednosti od A<sub>2</sub> proba uzorka, međutim te vrijednosti su bile podjednake u oba slučaja tako da je zaključeno da na aktivnost enzima podjednako utječe i Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup>.

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 izmjerena na 820 nm, ta valna duljina se nije pokazala kao najbolji izbor za mjerjenje 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 mjerjenje. Korišteni su uzorci koji su odmrzuti neposredno prije mjerjenja i svježi uzorci. I jedni i drugi su dali podjednake rezultate.

Tako je istražena mogunost da konkavalin A i levamisol, osim specifičnih enzima, inhibiraju i ekto-ATPazu. Dobiveni rezultati mjerjenja s i bez inhibitora nisu pokazali znatnu 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 mjerjenje 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 apsorbancija 620 nm.

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

U koncu nici 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  $992.3 \pm 281.2$  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. Primjeđeno je 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 mjeranjem 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 uspore uju 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. ZAKLJU CI**

U radu su ispitani u inci 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 utje u na aktivnost ekto-ATPaze.

Tako er je ispitana utjecaj Ca<sup>2+</sup> i Mg<sup>2+</sup> na aktivnost enzima, ali aktivnost se nije mogla izraziti jer je apsorbancija slijepe probe bila ve a od apsorbancije probe uzorka. Me utim, izmjerene vrijednosti apsorbancije su bile podjednake za oba kationa stoga je zaklju eno da je njihov utjecaj na aktivnost podjednak.

Prema dobivenim rezultatima te prema zamu enju supernatanta, zaklju eno je da je za deproteinizaciju seruma najbolje upotrijebiti 100 µL 1.12 mol/L TCA.

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

Valna duljina za mjerjenje fosfata izabrana je na 620 nm jer su se na 830 nm pokazali brojni utjecaji nespecifi nih interferencija.

Preciznost metode je odre ena 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 kona nici, na temelju postavljenih uvjeta metode, izmjerena je aktivnost ekto-ATPaze u serumu, me utim puno je parametara koje još treba istražiti i uspostaviti kako bi se metoda u potpunosti optimizirala i potvrdila kao relevantna za mjerjenje aktivnosti ekto-ATPaze u serumu ovjeka.

## 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  $\text{Ca}^{2+}$ -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, Strater 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 zna i da sudjeluju u metabolizmu izvanstani nih molekula. Ekto-ATPaza sudjeluje u metabolizmu nukleozid difosfata i nukleozid trifosfata, s ve im afinitetom prema nukleozid trifosfatima.

Metabolizam izvanstani nih molekula s odgovaraju im enzimima jedan je od koraka u purinergi noj signalizaciji koja pak posreduje u razliitim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Stoga se smatra da vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze u serumu može biti potencijalni imbenik u dijagnostici bolesti povezanih s purinergi nom signalizacijom.

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

Rezultati su pokazali da je za mjerjenje aktivnosti najprikladniji volumen uzorka 50 μL, vrijeme inkubacije na 37 °C 60 min te da je potrebno 100 μL 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  $992.3 \pm 281.2$  nmol/ml/h.

Results showed that the most suitable sample volume for the measuring enzyme activity is 50  $\mu\text{L}$ , incubation time on 37 °C is 60 min and that 100  $\mu\text{L}$  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 zna i da sudjeluju u metabolizmu izvanstani nih molekula. Ekto-ATPaza sudjeluje u metabolizmu nukleozid difosfata i nukleozid trifosfata, s ve im afinitetom prema nukleozid trifosfatima. Metabolizam izvanstani nih molekula s odgovaraju im enzimima jedan je od koraka u purinergi noj signalizaciji koja pak posreduje u razli itim fiziološkim i patofiziološkim procesima. Stoga se smatra da vrijednost aktivnosti ekto-ATPaze u serumu može biti potencijalni imbenik u dijagnostici bolesti povezanih s purinergi nom signalizacijom. Aktivnost ekto-ATPaze u serumu mjerena je pomo u Fiske-Subbarow metode, a srednja vrijednost izmerena na 13 kontrolnih uzoraka iznosi  $992.3 \pm 281.2$  nmol/ml/h. Rezultati su pokazali da je za mjerjenje aktivnosti najprikladniji volumen uzorka 50  $\mu$ L, vrijeme inkubacije na 37 °C 60 min te da je potrebno 100  $\mu$ L 1.12 mol/L TCA za deproteinizaciju uzorka.

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

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

Klju ne rije i: Ektoenzimi, ekto-ATPaza, purinergi na signalizacija, enzimska aktivnost, Fiske-Subbarow metoda

Mentor: **Dr. sc. Tihana Žani Grubiši**, redoviti profesor Sveu ilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocenjiva i: **Dr. sc. Tihana Žani Grubiši**, redoviti profesor Sveu ilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Anita Somborac Ba ura**, viši asistent Sveu ilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Ivan Pepi**, docent Sveu ilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihva en: 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  $992.3 \pm 281.2$  nmol/ml/h. Results showed that the most suitable sample volume for the measuring enzyme activity is 50  $\mu$ L, incubation time on 37 °C is 60 min and that 100  $\mu$ 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.

