

# Aktivnost salivarne alfa amilaze u zdravoj populaciji adolescenata

---

Konta, Ružica

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:296636>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-27**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija  
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ružica Konta**

**AKTIVNOST SALIVARNE ALFA AMILAZE U ZDRAVOJ  
POPULACIJI ADOLESCENATA**

**Završni rad**

Split, 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

**Ružica Konta**

**AKTIVNOST SALIVARNE ALFA AMILAZE U ZDRAVOJ  
POPULACIJI ADOLESCENATA  
SALIVARY ALPHA AMYLASE ACTIVITY IN HEALTHY  
ADOLESCENT POPULATION**

**Završni rad/Bachelor's Thesis**

Mentor:

**Dr. sc. Daniela Šupe Domić, mag. med. biochem.**

Split, 2018.

*Zahvaljujem se mentorici dr. sc. Danieli Šupe-Domić na sveukupnoj pomoći, uloženom  
trudu i strpljenju pri izradi završnog rada.*

*Hvala svim prijateljima i obitelji na podršci za vrijeme studiranja.*

*Najveća hvala mojim roditeljima. Za sve.*

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Slina .....	1
1.1.1. Sastav i funkcija sline .....	1
1.1.2. Lučenje sline.....	3
1.2. Amilaza .....	4
1.2.1. Osnovne značajke amilaze.....	4
1.2.2. Izoenzimi amilaze.....	7
1.2.3. Kliničko značenje .....	9
1.2.4. Salivarna alfa amilaza – pokazatelj stresa .....	10
<b>2. Cilj rada</b> .....	11
<b>3. Materijali i metode</b> .....	12
3.1. Ispitanici.....	12
3.2. Mjerenje fizikalnih parametara .....	12
3.3. Uzorkovanje sline .....	13
3.4. Analiza aktivnosti salivarne alfa-amilaze .....	14
3.5. Statistička analiza .....	15
<b>4. Rezultati</b> .....	17
<b>5. Rasprava</b> .....	22
<b>6. Zaključak</b> .....	24
<b>7. Literatura</b> .....	25
<b>8. Sažetci</b> .....	27
8.1. Sažetak .....	27
8.2. Summary .....	28
<b>9. Životopis</b> .....	29
<b>10. Prilozi</b> .....	30
10.1. Popis slika .....	30
10.2. Popis tablica.....	30

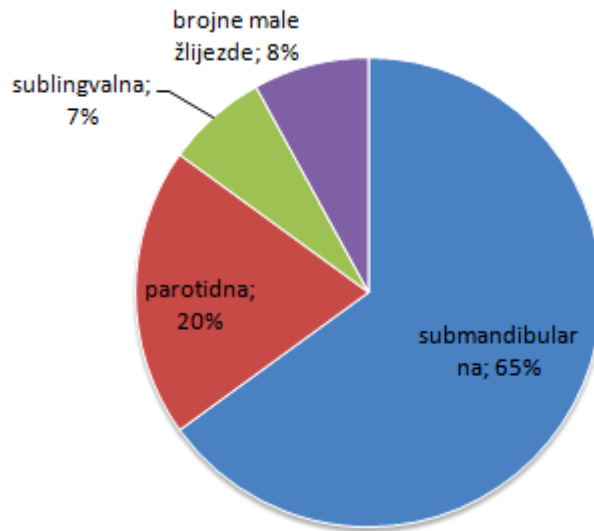
# **1. Uvod**

## **1.1. Slina**

### **1.1.1. Sastav i funkcija sline**

Slina je bistra, slabo kisela tjelesna tekućina koju luče žlijezde s egzokrinim lučenjem. Vrlo je razrijeđena otopina sastavljena od više od 99% vode. Ukupna slina se sastoji od sline sintetizirane iz velikih i malih žlijezda slinovnica i od molekula koje su iz krvi procesima pasivne difuzije ili aktivnog transporta preko acinarnih stanica ušle u slinu. Tri velike žlijezde slinovnice su parne parotidne, smještene u udubini iza donje čeljusti i submandibularna i sublingvalna, smještene na donjoj površini usne šupljine. Male žlijezde koje također luče slinu nalaze se na području donje usne, jezika, nepca, obraza i ždrijela.

Prosječan dnevni protok sline kod zdravih osoba mijenja se od 1 do 1.5 litre. Postotak nestimuliranog lučenja žlijezda slinovnica je sljedeći: 20% sline luči parotidna žlijezda, 65% submandibularna, 7-8% sublingvalna i manje od 10% brojne male žlijezde. Kod stimuliranog lučenja se znatno mijenjaju postotci, s tim da parotidna žlijezda luči više od 50% ukupne sline.



Slika 1. Grafički prikaz postotka nestimuliranog lučenja žlijezda slinovnica

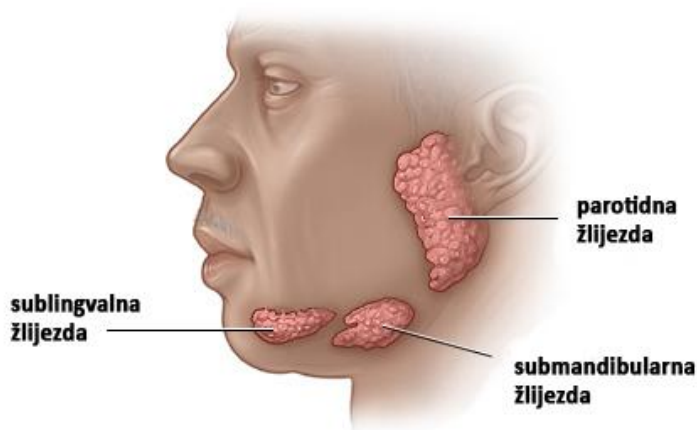
Slina se sastoji od različitih elektrolita, uključujući natrij, kalij, kalcij, magnezij, bikarbonata i fosfata. U slini se također nalaze i imunoglobulini, proteini, enzimi, mucini, i dušični proizvodi kao što su urea i amonijak. U početku lučenja u acinusu slina je izotonična, a prolaskom kroz mrežu kanalića postaje hipotonična (1).

Slina pomaže u održavanju oralnog zdravlja i odgovarajuće ravnoteže usne šupljine te se njene funkcije mogu podijeliti u sljedeće skupine:

- 1) pomaže čišćenju zuba ispirući bakterije i ostatke hrane i osvježavajući dah
- 2) salivarna amilaza katalizira hidrolizu složenih šećera i tako započinje proces probave
- 3) lizozimi i tiocijanati iz sline djeluju baktericidno osiguravajući nespecifičan imunološki odgovor
- 4) percepcija oralnih osjetila (okus, temperatura, dodir), vlaženje, žvakanje, gutanje i probava hrane
- 5) puferskim djelovanjem pojačava remineralizaciju i sprječava demineralizaciju zubne cakline
- 6) predstavlja spremnik sastojaka iz krvi i onih koji su lokalno sintetizirani u usnoj šupljini te tako može poslužiti kao indikator lokalnih i sistemskih infekcija (2).

### 1.1.2. Lučenje sline

Glavne žlijezde slinovnice su zaušna (parotidna), potčeljusna (submandibularna) i podjezična (sublingvalna) žlijezda, a uz njih ima i 300-400 sitnih bukalnih žlijezda. Dnevno se normalno luči između 800 i 1 500 mL sline. Slina sadrži dvije osnovne bjelančevinske lučevine: 1) serozni sekret, koji sadrži ptijalin (jednu  $\alpha$ -amilazu), enzim što služi za probavu škroba i 2) mukozni sekret, koji sadrži mucin, a služi za podmazivanje i zaštitu površina. Parotidne žlijezde luče gotovo isključivo serozni sekret, a submandibularne i sublingvalne luče i serozni i mukozni. Bukalne žlijezde luče samo sluz. Slina ima pH između 6,0 i 7,0, što je najpovoljniji raspon za probavno djelovanje ptijalina.



Slika 2. Žlijezde slinovnice (preuzeto i prilagođeno prema:

<https://myhealth.alberta.ca/Health/pages/conditions.aspx?hwid=tp12480>; 23.6.2018.)

Lučenje iz salivarnih žlijezda odvija se u dva stadija: prvi se zbiva u acinusima, a drugi u izvodnim kanalima. Acinusi luče primarni sekret koji sadrži ptijalin, mucin ili oba, u otopini iona čija se koncentracija bitno ne razlikuje od one u uobičajenoj izvanstaničnoj tekućini. Dok primarni sekret protječe izvodnim kanalima, zbivaju se dva važna procesa aktivnog prijenosa koji znatno mijenjaju ionski sastav sline.



Prvo, natrijevi ioni aktivno se reapsorbiraju iz svih izvodnih kanala slinovnica, a u zamjenu za njih aktivno se secerniraju kalijevi ioni. Stoga se koncentracija natrija u slini smanjuje, a kalija povećava. Ipak, reapsorpcija je natrija veća od sekrecije kalija. To izaziva pasivnu reapsorpciju klorida, što smanjuje njihovu koncentraciju u slini na vrlo male vrijednosti, koje odgovaraju smanjenju koncentracije natrijevih iona u kanalima (3).

Mnogi čimbenici mogu povećati ili smanjiti brzinu lučenja sline. Tri glavna podražaja koja pojačavaju lučenje su: mehanički (čin žvakanja), okusni (kiselina kao najjači okidač, slatkost najslabiji) i mirisni (razmjerno slab podražaj). Ostali čimbenici koji utječu na lučenje sline su psihički – bol, pojedine vrste lijekova i različite lokalne i sistemske bolesti koje utječu na same žlijezde slinovnice (4).

Drugo, u kanale se iz epitelnih stanica luče hidrogenkarbonatni ioni. To djelomice nastaje zamjenom hidrogenkarbonata za kloride, a možda djelomice, i aktivnom sekrecijom.

Žlijezde slinovnice su uglavnom pod nadzorom autonomnog živčanog sustava, posebice parasimpatičkih živčanih signala koji potječu iz gornjih i donjih salivacijskih jezgara u moždanom deblu. Te se jezgre nalaze otprilike na granici produžene moždine i ponsa, a pobuđuju ih okusni i dodirni podražaji s jezika i drugih dijelova usne šupljine i ždrijela.

Simpatičko podraživanje također može umjereno pojačati salivaciju, ali mnogo manje od parasimpatičkoga. Simpatički živci potječu iz gornjeg cervikalnog ganglija (3).

## **1.2. Amilaza**

### **1.2.1. Osnovne značajke amilaze**

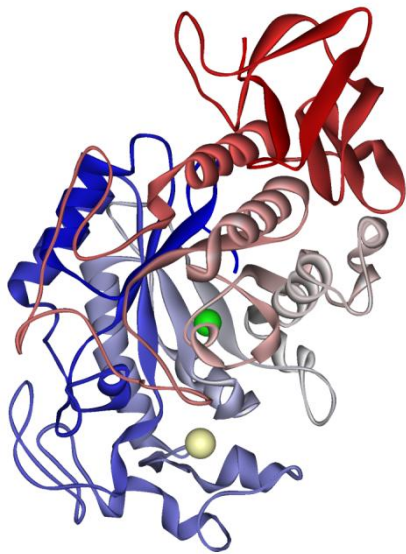
Amilaza (alfa-1,4-glukan: 4-glukanohidrolaza, AMS) je enzim razreda hidrolaza koji katalizira cijepanje 1,4-glikozidne veze u polisaharidima. Amilaza razgrađuje

ravnolančane polisaharide (amiloze) i razgranate polisaharide (amilopektin i glikogen), ali različitim brzinama (5). Iz amiloze se stvara maltoza i ostatne molekule glukoze, a iz amilopektina i glikogena uz maltozu i glukozu stvaraju se i dekstrini jer amilaza ne razgrađuje 1,6-glikozidne veze iz tih spojeva.

Postoje dvije amilaze, alfa amilaza ( $\alpha$ -1,4-glukan: 4-glukanohidrolaza, EC. 3.2.1.1.,  $\alpha$ -AMS ) ili endoamilaza i beta amilaza ( $\alpha$ -1,4-glukan-maltohidrolaza, EC. 3.2.1.2.,  $\beta$ -AMS) ili egzoamilaza.  $\alpha$ -AMS čini 40 do 50% ukupnih proteina koje sintetiziraju žlijezde slinovnice. Ona djeluje na 1,4-glikozidne veze u cijeloj molekuli supstrata, dok  $\beta$ -AMS djeluje samo na kraju lanca i svaki put odcjepljuje po jednu maltozu.  $\alpha$ -AMS se nalazi u životinjskim organizmima i u čovjeka, a  $\beta$ -AMS su bakterijski i biljni enzimi (6).

Amilaze su metaloenzimi koji sadrže kalcij, koji je apsolutno potreban za održavanje njihove funkcionalne cjelovitosti. Ipak, potpunu aktivnost pokazuju tek u prisutnosti aniona kao što su kloridi, bromidi, nitrati, kolati i monohidrogen fosfati. Kloridi i bromidi djeluju stabilizirajuće i najučinkovitiji su aktivatori (5).

Amilaza je aktivna u širokom području od pH 3,8 do pH 9,4 s optimumom djelovanja kod pH 6,7 do 7,2. Čini je polipeptidni lanac sastavljen od 510 aminokiselina. Alfa amilaza je enzim relativno male molekularne mase, oko 45 do 50 kDa, lako prolazi glomerularni filtrat i izlučuje se u mokraću. Enzim je dosta termostabilan i zadržava aktivnost jos i pri 50 °C. Na sobnoj se temperaturi aktivnost ne mijenja do 7 dana, a na +4 °C više od dva mjeseca.

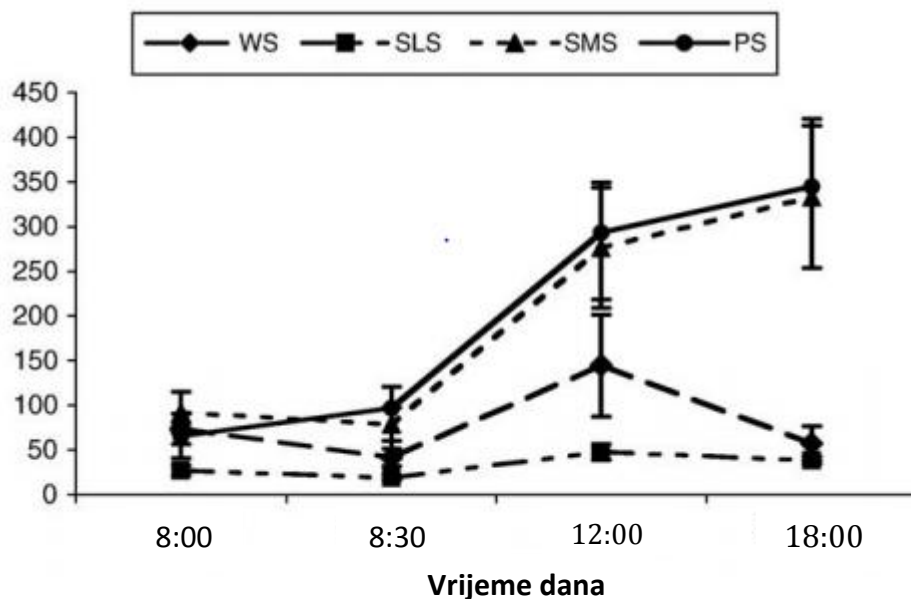


Slika 3. *Struktura alfa amilaze* (preuzeto s: <https://en.wikipedia.org/wiki/Alpha-amylase>; 22.6.2018.)

Amilaza se smatra dosta specifičnom za gušteraču, iako je ima i u drugim organima. Najviše je ima u gušterači, zatim u slinovnicama, a manje u jetri, bubregu, masnome tkivu i mišićima. Amilazu sadrže i gušteračni sok, serum, slina, mokraćna, mlijeko i u tragovima likvor.

U gušterači se AMS sintetizira u acinarnim stanicama i luči gušteračnim sokom u dvanaesnik, gdje slabo alkalna sredina pogoduje njevoj aktivnosti. Jedan dio dopijeva u izvanstaničnu tekućinu pa tako i u cirkulaciju, odakle se izlučuje glomerularnom filtracijom u mokraću. U krvi je poluživot amilaze 3-6 sati. U krvnom serumu se amilaza ponekad pojavljuje u kompleksu s imunoglobulinima kao makroamilaza s molekularnom masom većom od 200 kDa (6).

Koncentracije  $\alpha$ -amilaze slijede cirkadijalni ritam lučenja, s nižim koncentracijama u jutarnjim satima, dok u ostatku dana rastu i postižu najviše vrijednosti navečer (7).



Slika 4. Dnevni ritam lučenja alfa amilaze; WS - ukupna slina (od engl. whole saliva), SLS – slina iz sublingvalne žlijezde (od engl. sublingual saliva), SMS – slina iz submandibularne žlijezde (od engl. submandibular saliva), PS – slina iz parotidne žlijezde (parotid saliva)

(preuzeto i prilagođeno prema: Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* 32(4):392-401)

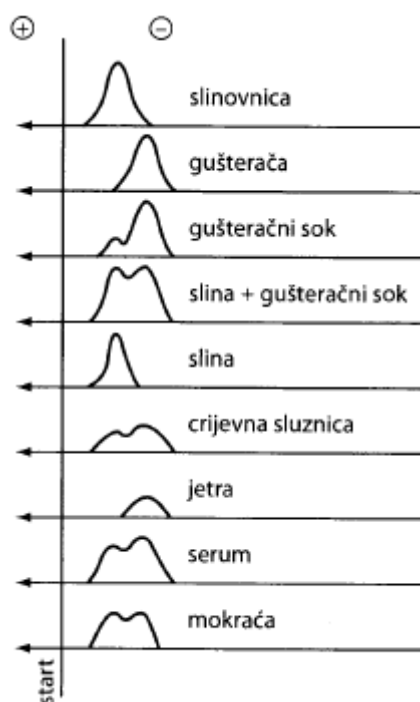
### 1.2.2. Izoenzimi amilaze

Amilaza se u serumu i mokraći može elektroforetski razdvojiti na raznim nosačima (agar, celogel i drugi) na nekoliko frakcija. Broj i lokalizacija frakcija ovise o tehnici elektroforeze, a u literaturi se spominje najviše 6-7 različitih oblika enzima (6). Procjena izoenzima amilaze pruža više informacija o enzimskim promjenama tijekom bolesti od samog mjerenja ukupne aktivnosti (8). Elektroforezom se u 90% osoba nalaze salivarni S-izoenzim (S-AMS, AMS-1) i gušteračni P-izoenzim (P-AMS, AMS-2) i. To su pravi izoenzimi koji se sintetiziraju od dvaju srodnih strukturnih gena koji se nalaze na kromosomu 1. S-AMS i P-AMS imaju slična katalitička i imunološka svojstva pa se mogu razlikovati samo s monoklonskim antitijelima (6).

AMS-1 nalazi se u području  $\beta$ -globulina, AMS-2 u zoni  $\gamma$ -globulina. Katkad se u području tih izoenzima pojavljuju dvostruke frakcije aktivnosti, AMS-11 i AMS-12, odnosno AMS-21 i AMS-22. U manjem dijelu populacije pronalazimo više genskih varijanti, jer na svakom genu može doći do alelnih varijacija, što dovodi do polimorfizma s podfrakcijama obaju izoenzima. Osim toga, izoenzimi se mogu ili posttranslacijski modificirati u ugljikohidratnom dijelu molekule enzima ili deamidacijom asparagina i glutamina, što sve dovodi do dodatnih multiplih oblika (izoforma).

AMS-2 ima veći klirens od AMS-1, tj. brže se uklanja mokraćom. Zato je u serumu zdravih osoba omjer AMS-1/AMS-2 u prosjeku  $1,71 \pm 1,1$ , dok je u mokraći  $0,7 \pm 0,1$ .

AMS-1 nalazi se i u znoju, suzama i mlijeku (6).



Slika 5. Shematski prikaz lokalizacije izoenzima amilaze (preuzeto iz: Božidar Štraus, Štrausova medicinska biokemija, Zagreb: Medicinska naklada; 2009.)

### 1.2.3. Kliničko značenje

Dijagnostička vrijednost određivanja aktivnosti amilaze najveća je kod bolesti gušterače i upale žlijezda slinovnica (6). Aktivnost amilaze u serumu pri akutnom pankreatitisu povećava se unutar 5 do 8 sati nakon pojave simptoma. Nakon 3 do 4 dana aktivnosti se vraćaju u referenti interval (23-91 U/l) (9). Ipak, klinička specifičnost amilaze za dijagnozu akutnog pankreatitisa je niska jer su povećane vrijednosti amilaze pronađene u određenom broju poremećaja trbušne šupljine i kod nekoliko poremećaja koji nisu povezani s gušteračom (5). U kroničnom je pankreatitisu povećanje aktivnosti manje izraženo, ali tijekom pogoršanja bolesti vrijednosti se povećavaju slično kao u akutnom pankreatitisu. Zbog izlučivanja amilaze mokraćom, uvijek treba napraviti analizu i seruma i mokraće, jer ima slučajeva da se u serumu, nalaze normalne vrijednosti, dok je u mokraći aktivnost povećana. U karcinomu gušterače aktivnost je u serumu varijabilna, a češće je povećana u mokraći. Općenito, od svih gušteračnih bolesti aktivnost amilaze najveća je u akutnom pankreatitisu, a smanjenu aktivnost mogu prouzročiti teške nekroze gušterače.

Aktivnost amilaze u serumu i mokraći povećana je, dalje, kod parotitisa (zaušnjaci), a može se povećati i u peritonitisu, bolestima bilijarnog trakta, perforaciji želučanog čira, crijevnoj opstrukciji, ileusu, trombozi mezenterijalnih vena, uremiji i u poslijeoperacijskim stanjima, a često je povećana nakon operacija na srcu. Nadalje, aktivnost može biti povećana i zbog ektopičnog stvaranja amilaze u zloćudnim tumorima, u šećernoj bolesti, osobito s ketoacidozom, i pri teškim opeklinama. U svim tim stanjima jače je povećanje aktivnosti enzima u mokraći. Visoka aktivnost amilaze u serumu, bez odgovarajućeg povećanja u mokraći nalazi se samo u bubrežnoj insuficijenciji, ili kod makroamilazemije, jer se amilaza ne može izlučiti u mokraću zbog oštećenog bubrega, odnosno, u slučaju makroamilazemije, zbog velikog kompleksa amilaze i IgA-a ili IgG-a koji ne može proći glomerule. Zbog toga je važno da se aktivnost amilaze uvijek određuje i u serumu i u mokraći.

Određivanjem izoenzima dobiva se uvid u podrijetlo amilaza. Dok je u slučaju parotitisa, karcinoma bronha ili ovarija povećana aktivnost salivarnog izoenzima, u pankreatitisu i intraabdominalnim procesima povećana je aktivnost gušteračnog

izoenzima. U teškim slučajevima pankreatitisa može se uz uobičajeni AMS-2 izoenzim pojaviti i podoblici AMS-2.

Pri ektopičnom stvaranju amilaze u bolesnika s karcinomima pluća i jajnika obično su nađene povećane aktivnosti AMS-1 te atipični salivarni izoenzimi (6).

#### **1.2.4. Salivarna alfa amilaza – pokazatelj stresa**

Stres je nespecifičan biološki odgovor (psihički i fizički) na svaki neuobičajeni zahtjev koji nadilazi adaptivne sposobnosti organizma (10). Slina pruža mogućnosti za istraživanja biološki aktivnih tvari koje čije se koncentracije u tjelesnim tekućinama mogu povezati s različitim fiziološkim stanjima ili bolestima. Kada te tvari pokažu dijagnostičku ili prognostičku vrijednost nazivaju se biološki markeri (biomarkeri) (11). Biomarkeri sline omogućavaju pouzdano, neinvazivno i objektivno mjerenje kroničnog psihosocijalnog stresa i pomažu u procjeni ključne uloge stresa kao uročnika mnogobrojnih zdravstvenih problema (12).

Glavni sustavi u ljudskom tijelu povezani sa stresom su hipotalamusno-hipofizna-adrenalna osovina (engl. hypothalamic-pituitary-adrenal axis) i simpatički živčani sustav (engl. sympathetic nervous system). Dva osnovna biomarkera sline su salivarni kortizol, povezan s prvim sustavom i salivarna alfa amilaza, povezana s drugim. Za razliku od drugih dijagnostički važnih sastojaka sline koji u slinu dolaze kroz sistemsku cirkulaciju, aktivnim transportom ili pasivnom difuzijom, salivarna alfa amilaza nastaje u stanicama žlijezda slinovnica i na nju direktno utječe simpatička inervacija žlijezda. Pokazalo se da je salivarna alfa amilaza mnogo precizniji pokazatelj individualnog odgovora na stres od kortizola zbog mnogo veće osjetljivosti simpatičkog živčanog sustava u usporedbi sa složenim hormonskim sustavom hipotalamusno-hipofizne-adrenalne osi.

Istraživanja su pokazala da se salivarna alfa amilaza može koristiti kao indirektni biomarker aktivnosti simpatičkog živčanog sustava. Dokazano je da postoje individualne razlike u razinama alfa amilaze koje su povezane s različitim ponašanjem pojedinca u stresu (11).

## 2. Cilj rada

Ciljevi ovog završnog rada su sljedeći:

- odrediti aktivnost salivarne alfa amilaze, u zdravoj populaciji adolescenata, u bazalnim i nekliničkim uvjetima, neposredno po buđenju
- testirati normalnost raspodjele aktivnosti salivarne alfa amilaze
- dokazati prisutnost ili odsutnost statistički značajne razlike u izmjerenoj aktivnosti salivarne alfa amilaze između učenika i učenica u navedenoj populaciji.



### **3. Materijali i metode**

#### **3.1. Ispitanici**

Prikupljanje podataka i uzoraka za rad odvijalo se u sklopu presječnog istraživanja projekta "Modernizacijski stres, mladi i migracije", kojeg je financirala Hrvatska naklada za znanost. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Split.

Ispitanici su bili učenici trećih i četvrtih razreda iz pet škola grada Splita: tri strukovne škole i dvije gimnazije. U istraživanje je uključeno 194 učenika kojima su urađena antropometrijska mjerenja (opsega struka i bokova) te mjerenje krvnog tlaka.

Svi ispitanici koji su dobrovoljno pristali na sudjelovanje potpisali su informirani pristanak, dok su maloljetni učenici koji su željeli sudjelovati bili obvezni donijeti informirani pristanak kojeg su potpisali njihovi roditelji i/ili skrbnici.

#### **3.2. Mjerenje fizikalnih parametara**

Sistolički i dijastolički krvni tlak prikazani su kao srednja vrijednost triju uzastopnih mjerenja u trima položajima: ležećem, sjedećem i stojećem.

Ispitanicima se izmjerila visina na Harpenden stadiometru, a kao konačna vrijednost uzeta je aritmetička sredina triju mjerenja u razmaku od pet minuta.

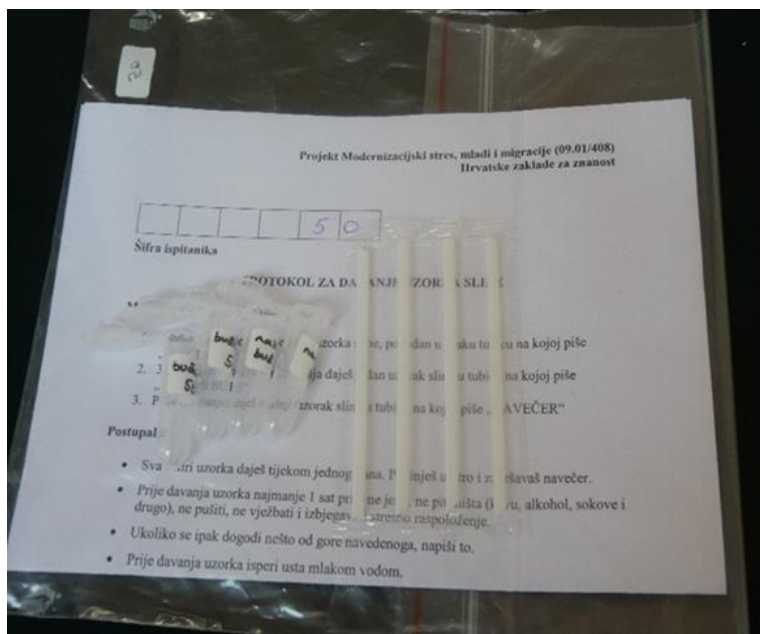
Vrijednost tjelesne mase dobivene u laganoj odjeći i bez obuće izmjerena je na analognoj vagi preciznosti 0,1 kg. Indeks tjelesne mase izračunat je po standardnoj formuli omjera tjelesne mase u kilogramima i kvadrata tjelesne visine u metrima.

### 3.3. Uzorkovanje sline

Uzorci sline su prikupljeni prema protokolu za nestimulirano, pasivno uzorkovanje ukupnog volumena sline, bez korištenja bilo kakvih stimulatora lučenja sline. Zbog cirkadijalnog ritma lučenja, sudionici u istraživanju su prikupljali uzorke nestimulirane sline u jednom danu tijekom radnog tjedna po točno utvrđenom redosljedu: jedan uzorak za aktivnost alfa amilaze, neposredno po buđenju.

Poznato je da adsorbensi koji su korišteni u spravama za skupljanje sline (npr. materijali na bazi pamuka) mogu utjecati na smanjenje ukupnog volumena sline i interferirati u imunokemijskim analizama, dok stimulansi (npr. žvakaće gume, zubni vosak, kristali šećera) također interferiraju tijekom mjerenja analita koji su ovisni o protoku sline. Iz tih razloga, odabran je protokol koji ima najmanje negativnih učinaka na valjanost, to je onaj za nestimulirano, pasivno uzorkovanje sline (13).

Učenici, sudionici u istraživanju su u školi dobili vrećicu s kompletom za uzorkovanje, koja se sastojala od pisanih uputa s instrukcijama, četiri obilježene polipropilenske tubice (proizvođača Nal von Minden, Moers, Njemačka) sa slamkama. U istoj studiji se ispitivala i koncentracija kortizola pa su se preostale tri tubice koristile za ispitivanja na kortizolu. Također su dobili kartice za obilježavanje vremena davanja uzorka, mogućih akutnih bolesti na dan uzorkovanja, terapije lijekovima, korištenja oralne kontracepcije i točnog dana ciklusa. Istraživači su prilikom podijele vrećica učenicima detaljno objasnili protokol uzorkovanja, značenje pridržavanja protokola i preciznog bilježenja vremena uzorkovanja.



Slika 6. Vrećica s kompletom za uzorkovanje

Idući dan, učenici su prikupljali uzorke sline kod kuće. Prije uzimanja uzoraka nisu smijeli konzumirati hranu, piće, žvakaće gume ni prati zube 12 sati prije uzimanja uzoraka. Kako bi omogućili nakupljanje sline u ustima prema prethodnim instrukcijama ispitanici su blago pomicali vilice te potom, kroz slamčicu, prikupili slinu u polipropilensku tubicu. Minimalni volumen uzorka u svakoj tubici bio je 1 mililitar.

Učenicima je objašnjeno da uzorke preko dana pohrane u kućni hladnjak, na +2 do +8 °C te da ih sljedeći dan donesu u školu. Nakon što su prikupljeni uzorci u školama, dopremljeni su smrznuti u hladnjacima na -20 °C u Klinički bolnički centar Split na Zavod za Medicinsko laboratorijsku dijagnostiku.

### 3.4. Analiza aktivnosti salivarne alfa amilaze

Mjerenje aktivnosti alfa amilaze provedeno je kinetičkom kolorimetrijskom metodom pomoću kita LUCIO-Medical ELISA  $\alpha$ -Amylase, prema preporukama proizvođača (Nal von Minden, Moers, Njemačka).

Nakon odmrzavanja na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani na 1500 x g, 15 minuta. Supstrat za reakciju bio je 2-kloro-4-nitrofenil- $\alpha$ -maltotriozid vezan na molekule polimera glukoze i kratkih lanaca p-nitrofenil-oligosaharida. Tijekom reakcije hidrolize kroz 3 minute na temperaturi 37 °C nastaje produkt 2-kloro-4-nitrofenol. Promjena intenziteta obojenja mjeri se sprektrofotometrijski na 405 nanometara dva puta, nakon 1 minute i drugi put nakon 5 minuta od završetka inkubacije, te je proporcionalna aktivnosti alfa amilaze u slini. Aktivnost alfa amilaze izražena je u U/ml, a nakon provedenog mjerenja dobiva se računski iz formule:

$$\Delta A/\text{min} \times 253 = U/\text{ml}$$

gdje  $\Delta A/\text{min}$  označava razliku izmjerenih apsorbancija u petoj i prvoj minuti podjeljeno s 4 ( $\Delta A/\text{min}=(A5 \text{ min} - A1 \text{ min})/4$ ) dok je faktor 253 dobiven iz jednadžbe koja uključuje ukupni volumen reakcijske smjese 0,31 ml (TV), faktor razrjeđenja 100 (DF), milimolarni apsorpcijski koeficijent 2-kloro-4-nitrofenola 12,9 (MMA), volumen uzorka 0,01 ml (SV) i dužinu puta svijetla od 0,95 cm definiranu vrstom mikrotitarske pločice (LP):

$$(\Delta A/\text{min} \times \text{TV} \times \text{DF}) / (\text{MMA} \times \text{SV} \times \text{LP}) = \Delta A/\text{min} \times 253 = \text{aktivnost alfa amilaze u U/ml}$$

Koeficijent varijacije, prema podacima samog proizvođača, u seriji i između serija bio je <1,5 % s dinamičkim rasponom od 4 – 400 U/ml. Najniža aktivnost alfa amilaze koja se može razlikovati od nule je 2,5 U/ml (uz 95 %-tni interval pouzdanosti).

### 3.5. Statistička analiza

Korištena statistička metoda za analizu rezultata ovog istraživanja je T-test. To je statistički postupak za testiranje značajnosti razlike između dva uzorka usporedbom njihovih aritmetičkih sredina. T-test nam zapravo služi za provjeru nul-hipoteze koju postavljamo prilikom formiranja nacrt istraživanja te spada u inferencijalnu statistiku (14).

Druga korištena metoda za testiranje normalnosti distribucije aktivnosti salivarne alfa amilaze je Kolmogorov-Smirnovljev test (KS). To je statistički test koji se

upotrebljava za ispitivanje hipoteze, uspoređujući kumulativnu raspodjelu podataka s očekivanom kumulativnom normalnom raspodjelom. Za razliku od hkvadrat-testa, Kolmogorov-Smirnovljev test ne zahtijeva razvrstavanje podataka u skupine (15).

Statističke analize provedene su koristeći statistički paket MedCalc za Windows, verzija 11.5.1.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Statistička obrada dobivenih podataka učinjena je programskom podrškom Microsoft Excel 2007. Za analizirane vrijednosti izračunata je aritmetička sredina, standardna devijacija i P vrijednost. Rezultati su prikazani grafički i tabelarno.

Statistički smo interpretirali rezultate prema P vrijednosti koja pokazuje kolika je vjerojatnost da su razlike između skupina slučajne i da nisu statistički značajne. U svim analizama vjerojatnost od  $P < 0,05$  uzeta je kao statistički značajna.

## 4. Rezultati

Tablica 1. Opis uzorka

		Frekvencije	Postoci
Spol	muško	70	36,1
	žensko	124	63,9
Dob		$\bar{x}$	$\pm$ SD
		18,79	$\pm$ 0,47
	Školski uspjeh	4,01	$\pm$ 0,80

U istraživanje je bilo uključeno ukupno 194 ispitanika, od kojih je 70 učenika i 124 učenice, odnosno izraženo u postocima 36,1% učenika i 63,9% učenica. Srednja vrijednost za dob ispitanika iznosi 18,79, a za školski uspjeh 4,01.

Tablica 2. Dob i školski uspjeh po spolu

	Učenici (N=70)			Učenice (N=124)			P
	$\bar{x}$	$\pm$	SD	$\bar{x}$	$\pm$	SD	
Dob	18,89	$\pm$	0,47	18,74	$\pm$	0,46	0,036
Školski uspjeh	3,81	$\pm$	0,94	4,11	$\pm$	0,70	0,022

Iz statističke analize možemo zaključiti da su ispitanici učenici stariji u odnosu na učenice i da je ta razlika statistički značajna sa P vrijednošću od 0,036.

Školski uspjeh se pokazao boljim kod učenica, sa statistički značajnom razlikom od 0,022.

**Tablica 3. Deskriptivni podaci antropometrijskih mjera**

	Učenici (N=70)			Učenicice (N=124)			P
	$\bar{x}$	$\pm$	SD	$\bar{x}$	$\pm$	SD	
<b>Visina tijela (m)</b>	1,84	$\pm$	0,06	1,70	$\pm$	0,06	<0,001
<b>Težina tijela (kg)</b>	77,91	$\pm$	10,34	63,44	$\pm$	9,47	<0,001
<b>BMI</b>	23,06	$\pm$	2,35	21,82	$\pm$	2,97	0,003
<b>Sistolički krvni tlak</b>	126,14	$\pm$	15,86	114,69	$\pm$	11,94	<0,001
<b>Dijastolički krvni tlak</b>	72,86	$\pm$	10,09	69,68	$\pm$	9,17	0,026

Rezultati su pokazali da statistički značajne razlike između spolova postoje u svim antropometrijskim mjerama, te su tako učenici viši i teži od učenica, odnosno imaju veći indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*, BMI). Sistolički i dijastolički krvni tlak je također veći kod učenika nego kod učenica.

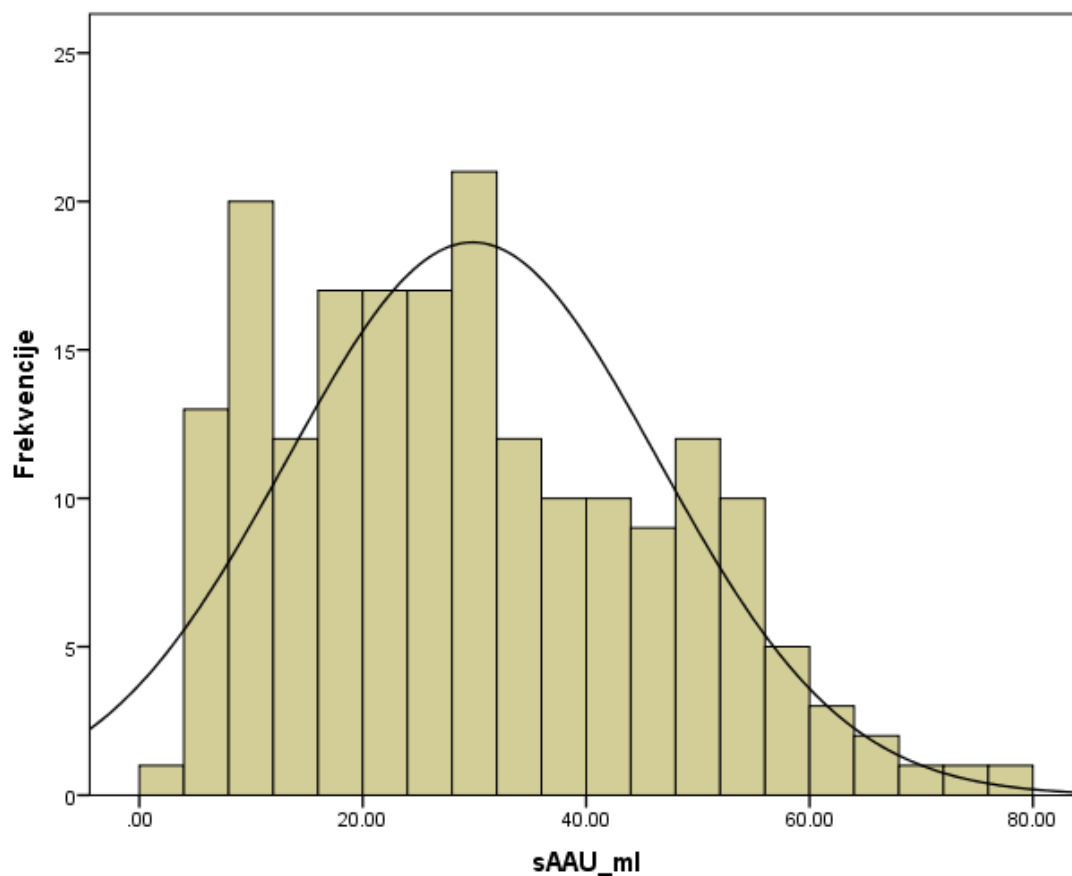
**Tablica 4. Testiranje normalnosti distribucije aktivnosti alfa amilaze na cijelom uzorku te učenicima i učenicama**

	Asimetrija	Spljoštenost	Kolmogorov-Smirnov test	P
<b>Cijeli uzorak</b>	0,51	-0,52	0,080	0,005
<b>Učenici</b>	0,38	-0,86	0,095	0,193
<b>Učenicice</b>	0,55	-0,45	0,076	0,078

Na temelju Kolmogorov-Smirnovljevog testa možemo zaključiti da mjera aktivnosti salivarne alfa amilaze na cijelom uzorku ne pokazuje normalnu raspodjelu, sa P vrijednošću manjom od 0,05, dok aktivnost na uzorku učenika i učenica pokazuje normalnu razdiobu.

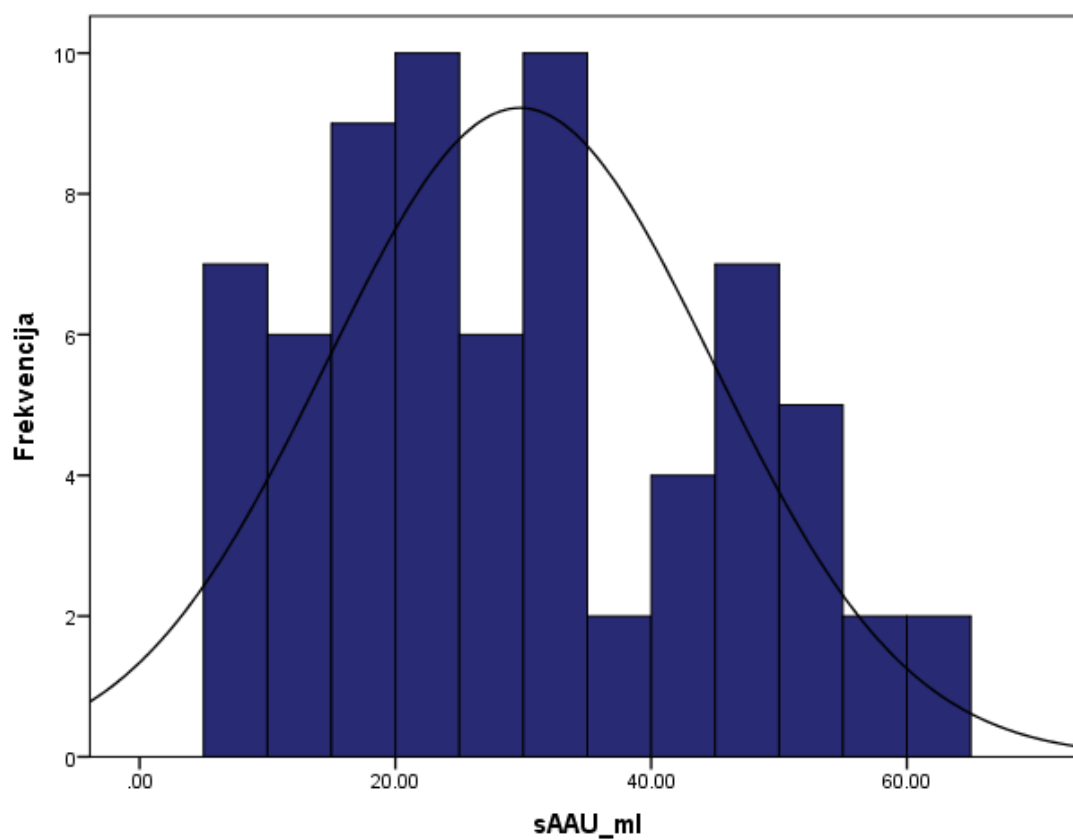
Asimetričnost (engl. skewness) mjera je odstupanja od simetričnosti i njom se mjeri način rasporeda podataka prema aritmetičkoj sredini ili nekoj drugoj veličini,

normalna distribucija ima vrijednost 0, dozvoljeno odstupanje je u granicama  $\pm 1$ . Spljoštenost (engl. kurtosis) mjera je zaobljenosti ili zaoštrenosti vrha distribucije, normalna distribucija ima vrijednost 0, dozvoljeno odstupanje je u granicama  $\pm 2$ . (16)

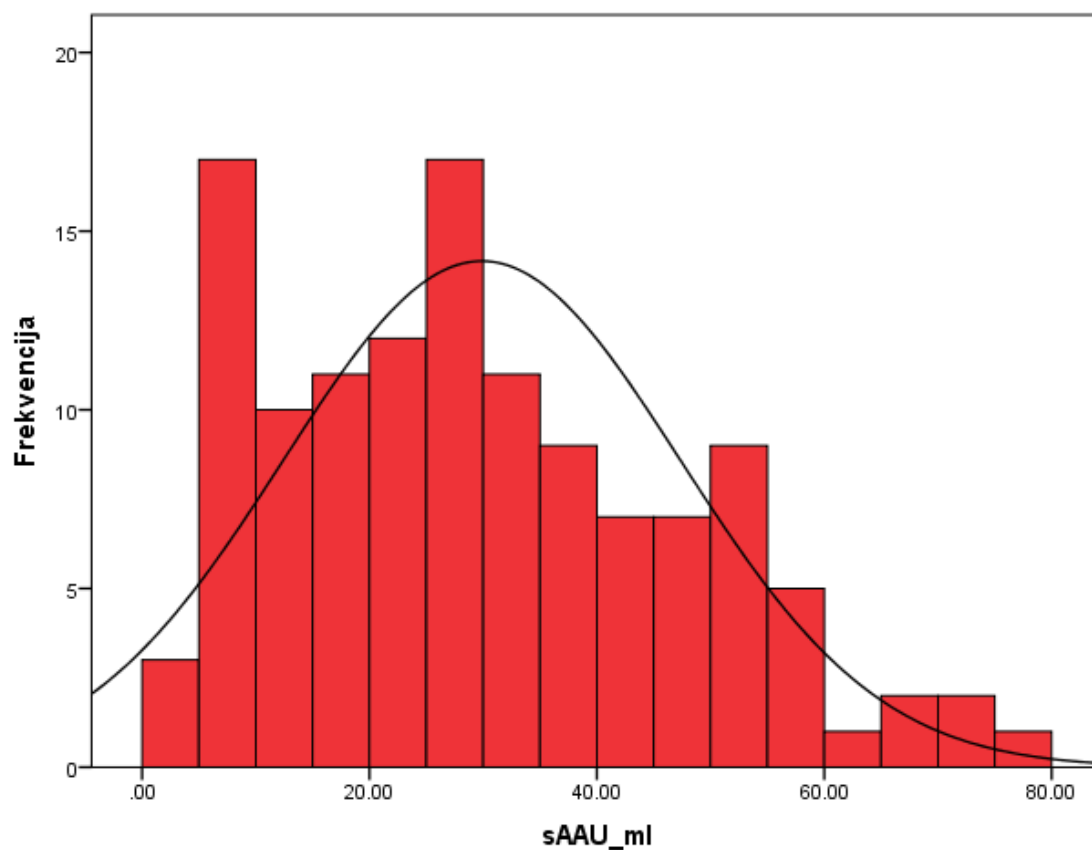


Slika 7. Raspodjela rezultata aktivnosti salivarne amilaze: cijeli uzorak (Kolmogorov-Smirnov test=0,08;  $P < 0,01$ )





Slika 8. Raspodjela rezultata aktivnosti salivarne amilaze: učenici (Kolmogorov-Smirnov test=0,10; P=0,19)



Slika 9. Raspodjela rezultata aktivnosti salivarne amilaze: učenice (Kolmogorov-Smirnov test=0,08; P=0,08)

Tablica 5. Deskriptivni podaci aktivnosti alfa amilaze na cijelom uzorku te učenicima i učenicama

	$\bar{x}$	$\pm$	SD	P
<b>Cijeli uzorak</b>	29,83	$\pm$	16,62	
<b>Učenici</b>	29,74	$\pm$	15,14	0,959
<b>Učenice</b>	29,88	$\pm$	17,46	

Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u aktivnosti salivarne alfa amilaze između učenika i učenica.

## 5. Rasprava

Zadnjih nekoliko godina poraslo je zanimanje za neinvazivnim i brzim dijagnostičkim testovima, što je dovelo do opsežnih istraživanja sline kao vrijednog uzorka za procjenu ne samo usne šupljine, nego i fiziološkog stanja cijelog organizma (17, 18). Slina ima brojne prednosti u odnosu na krv i urin, dva najčešće korištena laboratorijska uzorka.

Prikupljanje sline je brzo, jednostavno, neinvazivno i ekonomično. Ne zahtjeva obučeno medicinsko osoblje pa je pogodan za uzorkovanje kod kuće kao i za epidemiološka istraživanja (19). Sam postupak, osim što je puno ugodniji za pacijenta jer ne postoji potreba za korištenjem igle za uzimanje uzorka, pokazao je i smanjene anksioznosti kod pacijenta. Kod sline je manja mogućnost prenošenja zaraznih bolesti u odnosu na krv i smanjuje rizik perkutane ozljede medicinskog osoblja. Također, nisu potrebni posebni uvjeti tijekom transporta i skladištenja te odražava trenutno fiziološko stanje pojedinca jer se molekule iz krvi nalaze i u slini u aktivnom obliku.

Nedostaci sline kao uzorka su nepotpuno standardizirane metode uzorkovanja u smislu različitih fizioloških stanja i korištenja komercijalnog pribora za uzorkovanje, te u smislu je li uzorak žljezdano specifičan ili je riječ o ukupnom uzorku (18). Biomarkeri u slini su prisutni u vrlo niskim koncentracijama pa postoji potreba za razvojem analitičkih metoda s većom osjetljivošću i specifičnošću (16). Uzorci mogu biti kontaminirani krvlju iz sluznice usne šupljine ili ostacima hrane.

Premda su istraživanja temeljena na slini i njezina primjena u dijagnostičkim postupcima tek u začetku, u budućnosti se zbog brojnih prednosti ovog uzorka očekuje da će salivarna dijagnostika postati dio personalizirane medicine i uključivati u donošenje kliničkih odluka (19).

Kao što sam već navela, moje istraživanje o aktivnosti salivarne alfa amilaze bilo je dio većeg presječnog istraživanja provedenog u sklopu projekta "Modernizacijski stres, mladi i migracije" (09.01/408). Zaključak navedenog istraživanja bio je da postoje statistički značajne razlike u aktivnosti salivarne alfa amilaze između učenika i učenica ( $P=0,04$ ), odnosno pokazalo se da je aktivnost statistički značajno veća kod učenika. Mi

na našem uzorku od 194 ispitanika nismo dokazali statističku značajnost, što ne znači da ona zaista ne postoji. Smatramo da je razlika po spolu u aktivnosti salivarne alfa amilaze u istraživanju na većem broju ispitanika multiplicirana velikim brojem uzoraka, a možda može biti povezana i sa različitostima u poimanju stresnih podražaja.

Također, tijekom testiranja normalnosti distribucije podataka u poduzorcima po spolu rezultati su isključivo posljedica premalog broja uzoraka i mogu ukazati samo na smjer odnosa među varijablama. Trebalo bi se provesti detaljnije istraživanje na većem broju ispitanika.

## 6. Zaključak

- Statistički značajna razlika između učenika i učenica postoji u dobi, školskom uspjehu, u svim antropometrijskim mjerama (visina, težina, indeks tjelesne mase) te u sistoličkom i dijastoličkom tlaku.
- Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u aktivnosti salivarne alfa amilaze između učenika i učenica.
- Mjera aktivnosti salivarne alfa amilaze na cijelom uzorku ne pokazuje normalnu raspodjelu, dok aktivnost na uzorku učenika i učenica pokazuje normalnu raspodjelu podataka.

## 7. Literatura

1. Humphrey S. and Williamson R. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 2001 Feb;85(2):162-9.
2. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1995; 6(2):161-75.
3. Guyton CA, Hall EJ. *Medicinska fiziologija*. Medicinska naklada; 2017. (819-820)
4. Aaron M. Bailey. Protein secretions of the parotid gland: a comparison of stimulated and unstimulated flow. Scholar Archive, Oregon Health & Science University. December 2006; 2870.
5. Burtis C, Bruns D, Ashwood E, Tietz N. *Tietz fundamentals of clinical chemistry*. Saunders Elsevier. 2008. (330-332)
6. Štraus B. Petrik J. *Štrausova medicinska biokemija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. (305-309)
7. Nater UM, Rohleder N, Schlotz W, Ehlert U, Kirschbaum C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* 32(4):392-401)
8. Skrha J, Stěpán J. Clinical significance of amylase isoenzyme determination. *Acta Univ Carol Med Monogr*. 1987;120:1-81.
9. Čvorišćec D, Flegar-Meštrić Z, Juretić D. Harmonizacija općih pretraga iz područja opće medicinske-biokemije. Zagreb: Medicinska naklada, 2007. (11-30)
10. Šupe S, Poljaković Z, Kondić Lj, Unušić L, Alvir D. Neurološke osnove stresa i rizik razvoja moždanog udara. *Neurol. Croat*. Vol. 60, 1, 2011
11. Rashkova MR, Ribagin LS, Toneva NG. Correlation between salivary alpha-amylase and stress-related anxiety. *Folia Med (Plovdiv)*. 2012 Apr-Jun; 54(2):46-51.

12. Vineetha R, Pai KM, Vengal M, Gopalakrishna K, Narayanakurup D. Usefulness of salivary alpha amylase as a biomarker of chronic stress and stress related oral mucosal changes - a pilot study. *J Clin Exp Dent*. 2014 Apr 1;6(2):132-7.
13. Granger DA, Fortunato CK, Beltzer EK, Virag M, Bright MA, Out D. Focus on methodology: salivary bioscience and research on adolescence: an integrated perspective. *J Adolesc*. 2012 Aug; 35(4):1081-95
14. Kim TK. T test as a parametric statistic. *Korean J Anesthesiol*. 2015 Dec; 68(6): 540–546.
15. <http://struna.ihjj.hr/naziv/kolmogorov-smirnovljev-test/30938/> (28.6.2018.)
16. Šošić I. Primijenjena statistika. Zagreb: Školska knjiga; 2004. (117, 122)
17. Nunes LA, Mussavira S., Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015 Jun 5; 25(2):177-92.
18. Rahim MAA, Rahim ZHA, Ahmad WAW, Hashim OH. Can Saliva Proteins Be Used to Predict the Onset of Acute Myocardial Infarction among High-Risk Patients. *Int J Med Sci*. 2015; 12(4): 329–335.
19. Kaczor-Urbanowicz KE, Carreras-Presas CM, Aro K, Tu M, Garcia-Godoy F, Wong D. Saliva diagnostics – Current views and directions. *Exp Biol Med*. 2017 Mar; 242(5): 459–472.
20. Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. *Int J Oral Sci*. 2016 Sep; 8(3): 133–137.

## 8. Sažetci

### 8.1. Sažetak

**Uvod:** Slina je složena tjelesna tekućina koju luče velike i male žlijezde slinovnice. Pomaže u održavanju oralnog zdravlja i odgovarajuće ravnoteže usne šupljine. Slina se zbog mnogobrojnih prednosti pokazala kao visoko vrijedni uzorak čiji se sadržani analiti mijenjaju tijekom raznih fizioloških i patoloških stanja. Jedan od najvažnijih enzima sline je salivarna alfa amilaza koja je privukla zanimanje kao pokazatelj stresa, ali ima bogato značenje i u drugim kliničkim stanjima. To je metaloenzim koji cijepa alfa-1,4 glikozidne veze škroba na glukozu i maltozu.

**Cilj:** Ciljevi ovog rada su odrediti aktivnost salivarne alfa amilaze, u zdravoj populaciji adolescenata, testirati normalnost raspodjele aktivnosti salivarne alfa amilaze i dokazati prisutnost ili odsutnost statistički značajne razlike u izmjerenoj aktivnosti salivarne alfa amilaze između između učenika i učenica.

**Materijali i metode:** Ispitivan je uzorak od 194 učenika (70 učenika, 124 učenice) srednjih škola na području grada Splita. Ispitanicima su urađena antropometrijska mjerenja te su prikupljeni uzorci sline prema protokolu za pasivno, nestimulirano lučenje.

**Rezultati:** Dobivena je statistički značajna razlika između učenika i učenica u dobi, školskom uspjehu, u svim antropometrijskim mjerama (visina, težina, indeks tjelesne mase) te u sistoličkom i dijastoličkom tlaku. Nije utvrđeno postojanje statistički značajne razlike u aktivnosti salivarne alfa amilaze između učenika i učenica. Mjera aktivnosti salivarne alfa amilaze na cijelom uzorku ne pokazuje normalnu raspodjelu, dok aktivnost na uzorku učenika i učenica pokazuje normalnu raspodjelu podataka.

**Zaključak:** Potrebno je provesti detaljnije istraživanje na većem broju ispitanika.

**Ključne riječi:** slina, salivarna alfa amilaza, aktivnost, usporedba



## 8.2. Summary

**Introduction:** Saliva is a complex body fluid secreted by both, the major and the minor salivary glands. It helps maintain oral health and an appropriate balance of the oral cavity. Due to its many advantages saliva has proven to be a highly valuable sample whose analytes change during various physiological and pathological conditions. One of the most important enzymes in the saliva is salivary alpha-amylase which prompt an interest as a stress indicator, but it also has a broad meaning in other clinical conditions. It is a metalloenzyme which hydrolyses alpha-1,4 glycosidic linkages of starch into glucose and maltose.

**Aim:** The aim of this study was to determine the activity of the salivary alpha-amylase in a healthy adolescent population, to test the normality of distributing activity of the salivary alpha-amylase and establish the presence or absence of a statistically significant difference between male and female students in the measured activity of the salivary alpha-amylase.

**Materials and methods:** The sample of 194 students (70 male and 124 female) from high schools in Split was tested. The respondents underwent anthropometric measurements and saliva samples were collected according to the protocol for the passive, unstimulated secretion.

**Results:** There was a statistically significant difference between male and female students in age, educational results, in all anthropometric measurements (height, weight, body mass index) and systolic and diastolic pressures. A statistically significant difference in the activity of the salivary alpha-amylase between male and female students was not determined. Activity measure of the salivary alpha-amylase for the whole sample does not demonstrate a normal distribution, while the activity in the male/female students sample does show a normal data distribution.

**Conclusion:** It is necessary to conduct a more detailed research with more participants included.

**Key words:** saliva, salivary alpha-amylase, activity, comparison

## 9. Životopis

### Osobni podaci

Ime i prezime	Ružica Konta
Datum rođenja	24. 08. 1996.
Mjesto rođenja	Livno
Državljanstvo	Hrvatsko
Broj mobitela	095/806 7660
E-mail adresa	<a href="mailto:konta.ruzica96@gmail.com">konta.ruzica96@gmail.com</a>

### Školovanje

2003. - 2011. Osnovna škola Ivana Gorana Kovačića, Livno (Bosna i Hercegovina)

2011. - 2015. Opća gimnazija, Livno

2015. – 2018. Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Split (Hrvatska)

### Osobne vještine i kompetencije

Strani jezik	Engleski	Samostalni korisnik
Strani jezik	Njemački	Početak
Korištenje računala	Napredno	
Vozačka dozvola	B kategorija	

## 10. Prilozi

### 10.1. Popis slika

Slika 1. <i>Grafički prikaz postotka nestimuliranog lučenja žlijezda slinovnica</i> .....	2
Slika 2. <i>Žlijezde slinovnice</i> .....	3
Slika 3. <i>Struktura alfa amilaze</i> .....	6
Slika 4. <i>Dnevni ritam lučenja alfa amilaze</i> .....	7
Slika 5. <i>Shematski prikaz lokalizacije izoenzima</i> .....	8
Slika 6. <i>Vrećica s kompletom za uzorkovanje</i> .....	14
Slika 7. <i>Raspodjela rezultata aktivnosti salivarne amilaze: cijeli uzorak</i> .....	19
Slika 8. <i>Raspodjela rezultata aktivnosti salivarne amilaze: učenici</i> .....	20
Slika 9. <i>Raspodjela rezultata aktivnosti salivarne amilaze: učenice</i> .....	21

### 10.2. Popis tablica

<b>Tablica 1. Opis uzorka</b> .....	17
<b>Tablica 2. Dob i školski uspjeh po spolu</b> .....	17
<b>Tablica 3. Deskriptivni podaci antropometrijskih mjera</b> .....	18
<b>Tablica 4. Testiranje normalnosti distribucije aktivnosti alfa amilaze na cijelom uzorku te učenicima i učenicama</b> .....	18
<b>Tablica 5. Deskriptivni podaci aktivnosti alfa amilaze na cijelom uzorku te učenicima i učenicama</b> .....	21