Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

**Ivana Fileš i Marko Tomljanović**

**Serumske aktivnosti enzima 5'-nukleotidaze, adenozin-deaminaze i dipeptidil-peptidaze IV u osoba oboljelih od fibromialgije**

Zagreb, 2015.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

**KRATICE**

ADA adenozin-deaminaza

Ado adenozin

ADP adenozin-difosfat

AMP adenozin-monofosfat

ATP adenozin-trifosfat

cAMP ciklički adenozin-monofosfat

DPP IV dipeptidil-peptidaza IV

e5'-NT ekto-5'-nukleotidaza

EHSPT N-Etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3-metilanilin

GPI glikozil-fosfatidil-inozitol

Hyp hipoksantin

IMP inozin-monofosfat

Ino inozin

MAPK protein-kinaza aktivirana mitogenom

NPP nukleotid-pirofosfataza/fosfodiesteraza

NTPD nukleozid-trifosfat-difosfohidrolaza

PI-3K fosfatidil-inozitol-3-kinaza

POD peroksidaza

tRNA transportna ribonukleinska kiselina

XOD ksantin-oksidoreduktaza

SADRŽAJ

[1. UVOD 1](#_Toc418090166)

[1.1. Fibromialgija 1](#_Toc418090167)

[1.1.1.Patofiziologija fibromialgije 1](#_Toc418090168)

[1.1.2. Klinička slika fibromialgije 4](#_Toc418090169)

[1.1.3. Dijagnoza fibromialgije 4](#_Toc418090170)

[1.1.4. Liječenje fibromialgije 6](#_Toc418090171)

[1.2. Adenozin 6](#_Toc418090172)

[1.2.1.Učinak adenozina na bol 8](#_Toc418090173)

[1.2.2. Metabolizam adenozina 8](#_Toc418090174)

[1.3. Inozin 10](#_Toc418090175)

[1.3.1. Metabolizam inozina 11](#_Toc418090176)

[1.4. Ekto-5'-nukleotidaza 12](#_Toc418090177)

[1.5. Adenozin deaminaza 13](#_Toc418090178)

[2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA 16](#_Toc418090179)

[3. MATERIJALI I METODE 17](#_Toc418090180)

[3.1. Ispitanici 17](#_Toc418090181)

[3.2. Aparati, pribor i kemikalije 17](#_Toc418090182)

[3.3. Određivanje aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (e5'-NT) 19](#_Toc418090183)

[3.4. Određivanje aktivnosti adenozin-deaminaze (ADA) 20](#_Toc418090184)

[3.5. Određivanje aktivnosti dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV) 21](#_Toc418090185)

[3.6. Statistička analiza 21](#_Toc418090186)

[4. REZULTATI 22](#_Toc418090187)

[4.1. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (e5'-NT) 22](#_Toc418090188)

[4.2. Rezultati mjerenja ukupne enzimske aktivnosti adenozin-deaminaze (ADA) 23](#_Toc418090189)

[4.3. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti ADA2 24](#_Toc418090190)

[4.4. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti ADA1 24](#_Toc418090191)

[4.5. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV) 25](#_Toc418090192)

[4.5. Rezultati svih provedenih mjerenja enzimskih aktivnosti 26](#_Toc418090193)

[5. RASPRAVA 27](#_Toc418090194)

[6. ZAKLJUČCI 30](#_Toc418090195)

[7. ZAHVALE 31](#_Toc418090196)

[8. POPIS LITERATURE 32](#_Toc418090197)

[9. SAŽETAK 37](#_Toc418090198)

[10. SUMMARY 38](#_Toc418090199)

[11. DODATAK 39](#_Toc418090200)

# 1. UVOD

## 1.1. Fibromialgija

Fibromialgija je sindrom karakteriziran kroničnom boli koštano-mišićnog sustava, ukočenošću zglobova i sistemskim simptomima kao što su umor, nesanica, poremećaji raspoloženja i kognitivne smetnje. Nema utvrđenu osnovnu organsku bolest, ali može biti udružena sa specifičnim bolestima kao što su reumatske bolesti, psihički i neurološki poremećaji, infekcije i dijabetes (Bellato i sur., 2012).

Prvi put opisana je početkom 19. stoljeća kad je nazvana „fibrozitis“. Taj se naziv zadržao sve do osamdesetih godina prošlog stoljeća kad je otkriveno da središnji živčani sustav ima važnu ulogu u nastanku i razvoju bolesti. Graham je 1950. predstavio koncept ove bolesti kao „bolni sindrom“ u odsutnosti specifične organske bolesti. Sredinom sedamdesetih godina prošlog stoljeća Smythe i Moldofsky osmislili su novi termin „fibromialgija“ te identificirali područja iznimne osjetljivosti, takozvane „osjetljive točke“. Odbor Američkog fakulteta reumatologije (ACR) utvrdio je 1990. godine dijagnostičke kriterije koji su postali temelj za dijagnozu ove bolesti (Bellato i sur., 2012).

Prevalencija fibromialgije iznosi 1-3% ukupnog stanovništva, a predominantno od nje obolijevaju žene. Smatra se da je prevalencija bolesti i veća, međutim, često nije dijagnosticirana kao posljedica nedovoljnog znanja, ignoriranja i podcjenjivanja ove kronične bolesti kako od medicinskih profesionalaca tako i od zdravstvenih autoriteta i šire javnosti (Tomašević-Todorović i sur., 2010). Koristeći ACR-ove klasifikacijske kriterije iz 1990. godine prevalencija fibromialgije u Sjedinjenim Američkim Državama procijenjena je na 3,4 % kod žena i 0,5 % kod muškaraca. Fibromialgija se obično smatra poremećajem kod žena između 20 i 50 godina starosti, ali također pogađa i muškarce, djecu, adolescente i starije osobe. Češća je kod rođaka oboljelih osoba što upućuje na važnu ulogu genetskih čimbenika. Psihološki faktori povezani s ovim sindromom obuhvaćaju različite psihijatrijske poremećaje te anksioznost i depresiju (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

### 1.1.1.Patofiziologija fibromialgije

Iako se još uvijek ne zna točan uzrok bolesti, u patofiziologiju fibromialgije uključeni su brojni faktori, od poremećaja endokrinog i autonomnog živčanog sustava do genetskih i psihosocijalnih faktora te različitih oblika stresa (Bradley, 2009).

1. Središnji živčani sustav

Centralna senzitizacija smatra se glavnim mehanizmom nastanka boli i definirana je kao pojačan odgovor na stimulaciju središnjeg živčanog sustava. Posljedica je spontane živčane aktivnosti i pojačanog stimulativnog odgovora koji se primarno prenosi aferentim živčanim vlaknima. Nakon bolnog podražaja, sljedeći podražaj istog intenziteta percipiran je kao jači, što se normalno pojavljuje kod svih ljudi, ali u izrazitoj mjeri kod pacijenata s fibromialgijom. Ovaj fenomen izraz je neuroplastičnosti i uglavnom je posredovan N-metil-D-aspartat (NMDA) receptorima lociranim u postsinaptičkoj membrani u dorzalnom rogu kralježnične moždine (Bellato i sur., 2012).

Drugi pretpostavljeni mehanizam uključuje silazne inhibitorne putove boli koji moduliraju odgovor kralježnične moždine na bolne podražaje. Oni su vjerojatno oštećeni kod pacijenata s fibromialgijom, što pojačava centralnu senzitizaciju. Pokazalo se da glija stanice također imaju važnu ulogu u patogenezi. Glija stanice, aktivirane različitim bolnim podražajima, otpuštaju proupalne citokine, dušikov oksid, prostaglandine i reaktivne kisikove spojeve koji stimuliraju i prolongiraju hiperekscitabilnost kralježnične moždine (Bradley, 2009).

Dokazana je i smanjena razina serotonina i noradrenalina kod bolesnika, a to su glavni neurotransmiteri uključeni u inhibitorne putove boli. Serotonin je također uključen i u regulaciju raspoloženja i spavanja čime se može objasniti povezanost fibromialgije i nesanice te psihičkih poremećaja (Stisi i sur., 2008).

Pretpostavlja se da su peptidi endogenog opioidnog sustava hiperaktivni, ali nisu u mogućnosti modulirati osjet boli kod ovih pacijenata. To se može dovesti u svezu sa smanjenom učinkovitošću egzogenih opijata kod bolesnika. Koristeći radioaktivno označen opioid karfentanil Harris i suradnici pokušali su objasniti naizgled paradoksalnu hiperaktivnost endogenog opioidnog sustava. Pokazali su značajno smanjeni potencijal njegova vezanja za µ opioidne receptore kod pacijenata s fibromialgijom (Harris i sur., 2007).

b) Neuroendokrini i autonomni živčani sustav

Fibromialgija je sindrom povezan sa stresom, pa je u patogenezu uključena hipotalamično-pituitarno-adrenalna (HPA) os. Različite studije pokazale su povišenu razinu kortizola, posebice navečer, povezanu s poremećajem cirkadijalnog ritma. Kod pacijenata je također dokazana povišena razina adrenokortikotropnog hormona (ACTH), kako bazalno tako i u odgovoru na stres, najvjerojatnije kao posljedica kronične hiposekrecije kortikotropin oslobađajućeg hormona (CRH). Ove su promjene vjerojatno povezane s niskom razinom serotonina, zato što serotoninergična vlakna reguliraju funkciju HPA osi (Neeck, 2000).

Razina hormona rasta normalna je tijekom dana, ali snižena za vrijeme spavanja. Za ovu pojavu moguća su dva objašnjenja. Prvo, hormon rasta najviše se luči tijekom četvrte faze spavanja, a ona je kod fibromialgičnih pacijenata poremećena. Drugo, kod ovih je pacijenata povišena razina somatostatina. Somatostatin je inhibitor hormona rasta. Njegovo lučenje inducira ACTH čija je koncentracija povišena (Jones i sur., 2007).

Promjene u autonomnom živčanom sustavu uključuju smanjenu vazokonstrikciju mikrocirkulacije i ortostatsku hipotenziju. Poteškoće u održavanju krvnog tlaka mogu se povezati s nekim simptomima fibromialgije kao što su umor i vrtoglavice te pojačan psihološki odgovor na stres (Bradley, 2009).

1. Poremećaji spavanja

Pretragama elektroencefalogramom otkriveno je da je četvrta faza spavanja najviše promijenjena što direktno uzrokuje deficit hormona rasta i faktora rasta koji je sličan inzulinu (IGF-1). Ovi su hormoni uključeni u oporavak mišićnog tkiva pa poremećaj spavanja može utjecati na cijeljenje ovog tkiva (Bellato i sur., 2012).

1. Genetski faktori

Istraživanja pacijenata i njihovih najbližih srodnika potvrđuju hipotezu da postoji genetski utjecaj na razvoj fibromialgije. Način nasljeđivanja je nepoznat. Pretpostavlja se da je nasljeđivanje poligensko. Istraživanja ukazuju da važnu ulogu u etiologiji fibromialgije imaju polimorfizmi gena za serotoninski, dopaminski i kateholaminski sustav (Buskila i Sarzi-Puttini, 2006).

1. Psihički aspekt

Psihički problemi znatno pridonose razvoju fibromialgije, a razlog tome je abnormalnost u neuroendokrinoj funkciji. Najčešći poremećaji su anksioznost, somatizacija, distimija, panični poremećaj, posttraumatski stres i depresija (Katon i sur., 2001). Depresija pogoršava simptome ove bolesti tako da se antidepresivi intenzivno koriste u njenu liječenju (Arnold i sur., 2000).

1. Periferna tkiva

Pobliže se istražuju periferna tkiva kao što su koža, mišići i kapilare. Smatra se da potencijalnu ulogu u fibromialgiji imaju vaskularna deregulacija u mišićima, neadekvatan odgovor na oksidativni stres, povećan interleukin 1 (IL-1) u kutanom tkivu, povećana supstancija P i fragmentacija DNA u mišićima (Bellato i sur., 2012).

1. Okidači

Određeni faktori mogu izazvati neprimjeren odgovor organizma na stres i tako pridonijeti razvoju fibromialgije. Takvim okidačima smatraju se virusne ili bakterijske infekcije, fizičke traume, emocionalni stres, hormonske promjene, lijekovi te različite kemijske supstancije (Schmidt-Wilcke i Clauw, 2011).

### 1.1.2. Klinička slika fibromialgije

Prisutni simptomi su bol na osjetljivim točkama, umor i nesanica. Javlja se bol u donjem dijelu leđa, koja se širi prema stražnjici i nogama ili bol i ukočenost vrata i ramena. Ukočenost se pojačava tijekom dana. Pacijenti se žale da su iscrpljeni, čak i nakon ustajanja. Mnogi se bude tijekom noći i ne mogu ponovno zaspati. Dvije bitne karakteristike su subjektivan osjećaj otečenosti zglobova bez objektivnih oteklina i parestezije bez objektivnih neuroloških nalaza. Mnogi se pacijenti žale na kognitivne poteškoće kao što su problemi s pamćenjem i komunikacijom. Česte su i glavobolje tipa migrene. Javljaju se i nepromišljenost, vrtoglavice, anksioznost i depresija. Toplo i suho vrijeme, umjerena fizička aktivnost, adekvatan san i opuštanje mogu smanjiti navedene simptome (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

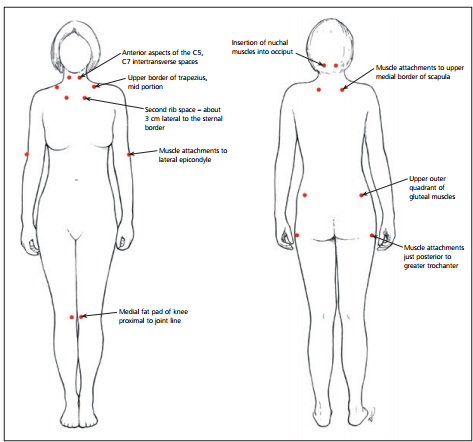
### 1.1.3. Dijagnoza fibromialgije

Zbog nedostatka potpuno definiranih dijagnostičkih kriterija koji bi se mogli univerzalno primjenjivati, zdravstveni djelatnici često utvrđuju ovu dijagnozu nakon što se testovi za druge bolesti pokažu negativnima. Pet najčešćih dijagnoza koje treba razmotriti kod pacijenata sa simptomima fibromialgije su psihički poremećaji, hipotiroidizam, reumatoidni artritis, adrenalna disfunkcija i multipli mijelom. Fibromialgiju je teško dijagnosticirati jer su simptomi nejasni i generalizirani. Unatoč tome, tri se simptoma pojavljuju kod gotovo svakog pacijenta: bol, umor i nesanica. Liječnik treba detaljno utvrditi vrstu boli (difuzna, multifokalna, duboka, tupa ili žareća), koliko često se pojavljuje, je li migrirajuća te isključiti bol kao posljedicu eventualnoga upalnog procesa. Također je važno procijeniti dodatne simptome koji se mogu činiti nepovezani s fibromialgijom kao što su oscilacije tjelesne težine, jutarnja ukočenost, iritabilna bolest crijeva, kognitivne smetnje, glavobolja, intolerancija na hladnoću i toplinu, sindrom nemirnih nogu, sindrom iritabilnog mjehura i Raynaudov fenomen (Bellato i sur., 2012).

Dijagnoza se temelji na dijagnostičkom kriteriju kojega je napravio ACR 1990. godine. Prvi uvjet je prisutnost mišićno-koštane boli koja traje najmanje 3 mjeseca i uključuje obje strane tijela, ispod i iznad struka te aksijalni koštani sustav. Drugi uvjet je osjetljivost na 11 od ukupno 18 osjetljivih točaka prikazanih na slici 1 (Chakrabarty i Zoorob, 2007).

Laboratorijski testovi ograničeni su na kompletnu krvnu sliku, rutinske testove seruma, tiroidni stimulirajući hormon i sedimentaciju eritrocita i/ili C-reaktivni protein. Uobičajeno nema specifičnih promjena u gore navedenim parametrima koji su povezani s fibromialgijom (Clauw, 2009).

Novi ACR-ovi kriteriji iz 2000. godine također se temelje na distribuciji boli i njezinoj kronologiji, pri čemu se određuje indeks boli (WPI). Uz to, novi kriteriji uzimaju u obzir prisutnost i jačinu pratećih simptoma putem ljestvice jačine simptoma (SS) (Wolfe i sur., 2010). Kriteriji su naknadno modificirani 2010. godine. Modificirani kriteriji obuhvaćaju WPI i subjektivnu procjenu specifičnih simptoma, međutim, eliminirana je liječnikova procjena SS rezultata te zamijenjena s 3 dihotomna „da/ne“ pitanja o prisutnosti abdominalne boli, depresije i glavobolje u zadnjih 6 mjeseci (Wolfe i sur., 2011).



Slika 1. Osjetljive točke za dijagnozu fibromialgije prema ACR-ovim kriterijima (preuzeto iz Chakrabarty i Zoorob, 2007).

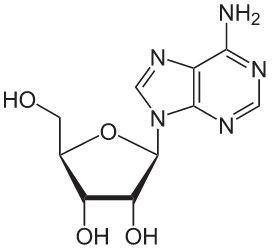
### 1.1.4. Liječenje fibromialgije

Najbolji pristup liječenju uključuje farmakološke i nefarmakološke mjere, uz aktivno uključenje pacijenta u proces terapije. Cilj je ublažiti bol, poboljšati kvalitetu sna i poboljšati fizičke funkcije (Bellato i sur., 2012). Učinkovita farmakološka terapija uglavnom smanjuje aktivnost ekscitatornih neurotransmitera ili povećava aktivnost inhibitornih neurotransmitera kao što su serotonin ili noradrenalin (Clauw, 2014). Food and Drug Administration (FDA) odobrila je 3 lijeka za liječenje boli kod fibromialgije, a to su pregabalin, duloksetin i milnacipran. Pregabalin je antiepileptik koji se veže za α2δ podjedinicu na presinaptičkim kalcijevim kanalima ovisnim o naponu, smanjuje ulazak kalcija u živčane završetke i tako smanjuje izlučivanje ekscitatornih neurotransmitera. Antidepresivi duloksetin i milnacipran selektivno inhibiraju ponovnu pohranu serotonina, odnosno noradrenalina. Koriste se i nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID) te tramadol, jer postoje dokazi da djeluju sinergistički s ostalim lijekovima i na taj način smanjuju simptome fibromialgije (Schmidt-Wilcke i Clauw, 2011).

Nefarmakološki postupci uključuju edukaciju, kognitivno-bihevioralnu terapiju i tjelovježbu. Tai-chi, tjelovježba u vodi i balneoterapija pokazale su se učinkovitima u smanjenju simptoma, poboljšanju fizičkih funkcija i kvalitete sna te pomažu u obavljanju svakodnevnih aktivnosti (Bellato i sur., 2012).

## 1.2. Adenozin

Adenozin je purinski nukleozid koji se sastoji od dušične baze adenina koja je preko β-N9-glikozidne veze povezana s molekulom D-ribofuranoze (slika 2). Unutar stanice adenozin i njegovi derivati imaju nekoliko važnih uloga. Osim što je sastavni dio nukleinskih kiselina, fosforilirani derivati adenozina – adenozin-trifosfat (ATP), adenozin-difosfat (ADP) i adenozin-monofosfat (AMP) imaju ključne uloge u staničnom metabolizmu. Pod utjecajem enzima adenilat-ciklaze adenozin-trifosfat pretvara se u još jedan fosforilirani derivat adenozina – ciklički adenozin-monofosfat (cAMP). cAMP djeluje u stanici kao sekundarni glasnik koji aktivira proteinsku kinazu ovisnu o cAMP (protein-kinaza A) vežući se za njezine regulatorne podjedinice (Taskén i Aandahl, 2004). Osim aktiviranja proteinske kinaze A, cAMP se može vezati i aktivirati kanale aktivirane cikličkim nukleotidima (Kaupp i Seifert, 2002) te vezati za proteine koji vežu cikličke nukleotide.



Slika 2. Molekula adenozina

U izvanstaničnom okruženju adenozin ima brojne učinke. Zapažen je njegov citoprotektivni učinak u odgovoru na stresne čimbenike koji se manifestira povećanim krvnim protokom, indukcijom tolerancije na hipoksiju, poticanjem angiogeneze, supresijom upalnog odgovora i supresijom apoptoze inducirane citokinima (Boison, 2013; Jacobson, 2009). Adenozin također djeluje kao modulator različitih neurotransmitera. Zapaženo je da smanjuje izlučivanje stimulatornih neurotransmitera poput glutamata čime se može spriječiti ekscitotoksičnost koja nastaje zbog pretjerane stimulacije neurona glutamatom (Popoli i sur., 2003). U posljednje vrijeme veliko zanimanje za adenozin potakla su saznanja o njegovom utjecaju na osjet boli i moduliranje istoga što je otvorilo vrata za mogućnost njegove primjene u liječenju boli.

Izvanstanični adenozin ispoljava svoje učinke preko adenozinskih receptora. Postoje četiri vrste adenozinskih receptora: A1 , A2A , A2B , A3 . Sve četiri vrste receptora jesu receptori spregnuti s G proteinom. Sastoje se od jednoga polipeptidnog lanca sa sedam transmembranskih domena. N kraj smješten je izvanstanično, a C kraj unutarstanično. Transmembranske domene povezane su omčama, tri su izvanstanične omče ujedno i mjesta za posttranslacijske modifikacije receptora, a tri unutarstanične omče zajedno s C krajem polipeptidnoga lanca potencijalna su mjesta palmitoilacije (Jacobson, 2009).

Aktivacijom adenozinskih receptora primarno se utječe na unutarstaničnu koncentraciju drugog glasnika cAMP-a. Receptori A1 i A3 smanjuju unutarstaničnu koncentraciju cAMP-a zbog toga što su spregnuti s G proteinom koji inhibira adenilat-ciklazu, dok je aktivacija receptora A2A i A2B povezana s povećanjem koncentracije cAMP-a zbog stimulacije adenilat-ciklaze (Fredholm i sur., 2001).

Osim s cAMP-om adenozinski receptori povezani su i s drugim signalnim putovima kao što je aktivacija fosfolipaze C, fosfatidil-inozitol-3-kinaze (PI-3K) te protein-kinaze aktivirane mitogenom (MAPK) (Schulte i Fredholm, 2003). Aktivacija MAPK-a i PI-3K-a utječe na staničnu diferencijaciju, proliferaciju i apoptozu (Lauring i sur., 2013; Molina i Adjei, 2006). Svi se ovi procesi povezuju sa citoprotektivnim učincima adenozina.

### 1.2.1.Učinak adenozina na bol

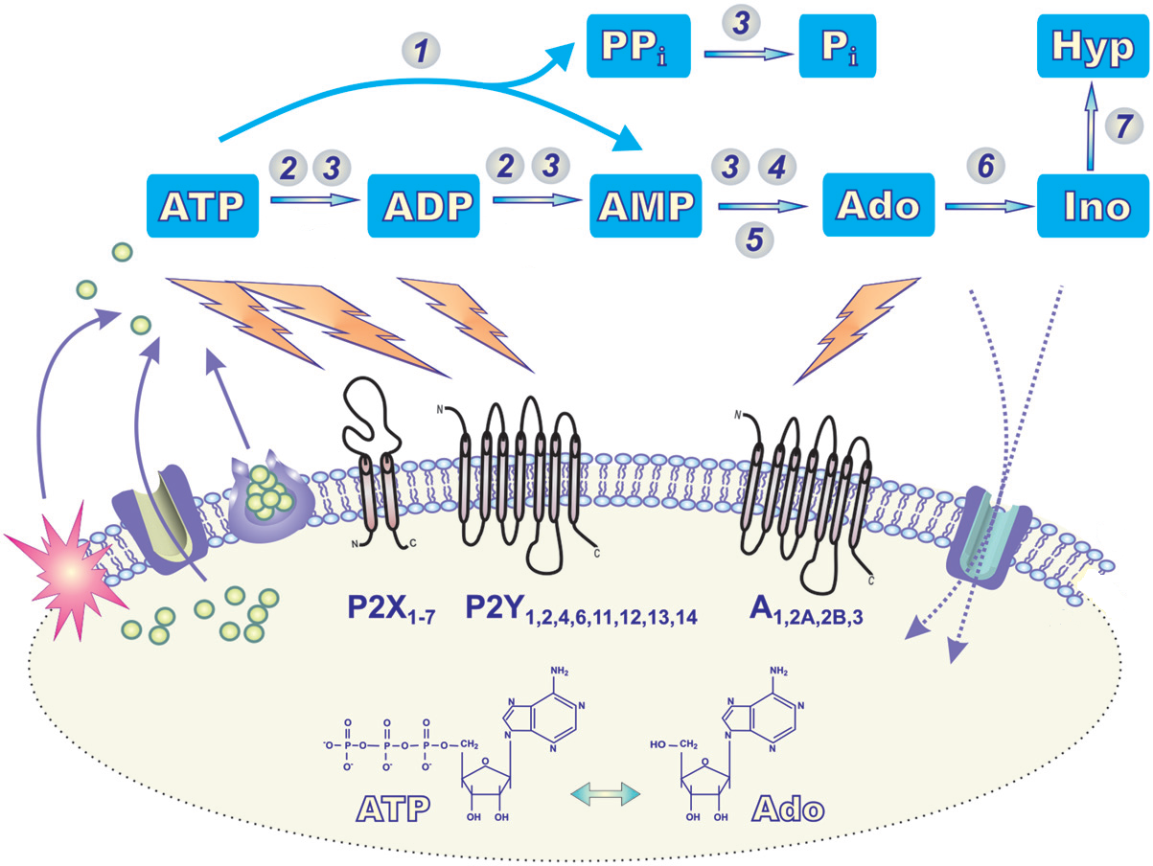
Osim brojnih gore spomenutih citoprotektivnih učinaka adenozina na stanice uočena su i njegova potentna antinociceptivna svojstva. Studije na štakorima pokazale su distribuciju adenozinskih receptora na nociceptivnim neuronima, neuronima dorzalnog roga kralježnične moždine, kao i na neuronima u dijelovima mozga uključenima u obradu bolnih signala (Ferré i sur., 2007; Schulte i sur., 2003; Reppert i sur., 1991). Navedene studije potaknule su istraživanje utjecaja adenozinskih receptora na nocicepciju. Pokusi na štakorima pokazali su da aktivacija adenozinskih receptora uzrokuje analgetski učinak te da smanjuje alodiniju i hiperalgeziju pri neuropatskoj boli (Little i sur., 2014). Slični rezultati pokazali su se i u ljudi gdje je intravenska primjena adenozina ublažila neuropatsku bol i hiperalgeziju (Lynch i sur., 2003).

### 1.2.2. Metabolizam adenozina

Adenozin dospijeva u izvanstanični prostor na dva načina. Prvi je način razgradnjom izvanstaničnog ATP-a i njegovih metabolita, a drugi je način preko ravnotežnog nukleozidnog transportera koji prebacuje adenozin iz citosola u izvanstanični prostor u uvjetima više koncentracija adenozina u unutrašnjosti stanice u odnosu na njegovu koncentraciju u izvanstaničnom prostoru (Jacobson, 2009).

Oslobađanje ATP-a u izvanstanični prostor smatralo se posljedicom različitih patoloških procesa koji su uzrokovali oštećenje i lizu stanica te otpuštanje unutarstaničnih zaliha ATP-a u izvanstanični prostor. Međutim, danas je dokazano da većina stanica u fiziološkim uvjetima otpušta male količine ATP-a (Burnstock, 2009). ATP se iz stanica izlučuje egzocitozom, transportom putem ionskih kanala i transportera. Jednom oslobođeni ATP i ADP mogu djelovati na 2 tipa purinskih receptora, P2X (ionski kanali regulirani ligandom) i P2Y (receptori spregnuti s G proteinom) (Yegutkin, 2014).

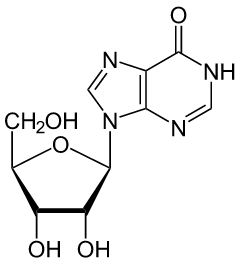
Oslobođeni ATP brzo se metabolizira topljivim izvanstaničnim enzimima i izvanstaničnim enzimima vezanim za membranu (slika 3). ATP se enzimima nukleotid-pirofosfataza/fosfodiesteraza (NPP), nukleozid-trifosfat-difosfohidrolaza (NTPD) i alkalna- fosfataza (AP) metabolizira do AMP-a. AMP se primarno pretvara u adenozin pomoću ekto-5'-nukleotidaze (e5'-NT). Adenozin se ravnotežnim nukleozidnim transporterom vraća natrag u stanicu kada njegova izvanstanična koncentracija postane veća od unutarstanične ili se dalje metabolizira enzimom adenozin-deaminazom (ADA) u inozin te dalje u hipoksantin purin-nukleozid-fosforilazom (PNP) (Yegutkin, 2014).



Slika 3. Shematski prikaz metabolizma ATP-a nakon što se iz stanice oslobodi zbog puknuća membrane, egzocitozom ili putem transportera. Enzimi uključeni u metabolizam označeni su brojevima: 1. nukleotid-pirofosfataza/fosfodiesteraza (NPP), 2. nukleozid-trifosfat-difosfohidrolaza (NTPD), 3. alkalna-fosfataza (AP), 4. ekto-5'-nukleotidaza(e5'-NT), 5. prostatična kisela-fosfataza (PAP), 6. adenozin-deaminaza(ADA), 7. purin-nukleozid-fosforilaza (PNP). Preuzeto i prilagođeno iz: Yegutkin, 2014.

## 1.3. Inozin

Inozin je purinski nukleozid koji se sastoji od dušične baze hipoksantina koja je β-N9-glikozidnom vezom povezana s D-ribofuranozom (slika 4). Osim što je temeljna komponenta transportne RNA (tRNA), gdje igra važnu ulogu u pravilnom spajanju s odgovarajućim kodonima mRNA, o fiziološkoj ulozi inozina dugo se nije znalo puno. Prevladavajuće mišljenje do početka 21. stoljeća bilo je da je inozin inaktivni metabolit adenozina nastao njegovom deaminacijom. Naknadno su se u literaturi pojavili dokazi da inozin ima ulogu u staničnom signaliziranju (Haskó i sur., 2004).



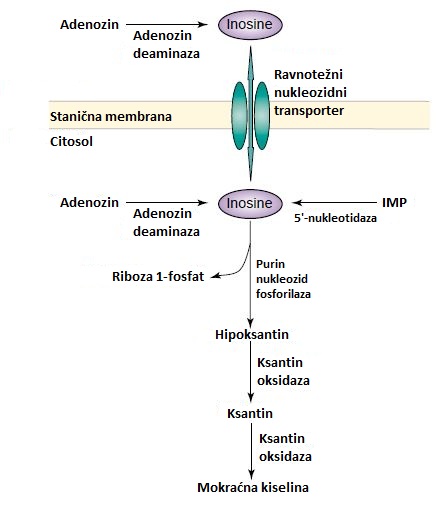
Slika 4. Molekula inozina

Ustanovljeno je da inozin ima imunomodulatorna svojstva koja su posredovana adenozinskim receptorima. Jin i suradnici (1997) otkrili su da inozin aktivira A3 receptor za adenozin na mastocitima i da stimulira njihovu degranulaciju. Osim aktivacije stanica imunološkog sustava pokazalo se da inozin posjeduje i protuupalna svojstva. Haskó i suradnici (2000) pokazali su da inozin u miševa smanjuje upalni odgovor makrofaga i otpuštanje proupalnih citokina u odgovoru na stimulaciju endotoksinom. Protuupalna svojstva inozina pokazala su se odgovornima i za njegov zaštitni učinak prilikom ishemijsko-reperfuzijske ozljede tkiva. Suprimirajući upalni odgovor makrofaga, neutrofila i drugih imunoloških stanica ublažava se oštećenje tkiva koje nastaje zbog aktivacije imunološkog sustava (Wakai i sur., 2001).

### 1.3.1. Metabolizam inozina

Inozin u izvanstaničnom prostoru nastaje deaminacijom adenozina enzimom adenozin-deaminaza. Inozin može nastati i unutar stanice deaminacijom adenozina, kao i reakcijom enzima 5'-nukleotidaze koja katalizira pretvorbu inozin-monofosfata (IMP) u inozin (Haskó i sur., 2004). Nastali inozin može se ravnotežnim nukleozidnim transporterom prebaciti u izvanstanični prostor u uvjetima više unutarstanične koncentracije.

U izvanstaničnom prostoru, kao i u unutrašnjosti stanice, inozin se uklanja enzimskom reakcijom purin-nukleozid-fosforilaze, pri čemu nastaje hipoksantin koji se ksantin-oksidazom pretvara u ksantin te potom u mokraćnu kiselinu (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz unutarstaničnog metabolizma inozina (preuzeto iz Haskó i sur., 2004).

## 1.4. Ekto-5'-nukleotidaza

Ekto-5'-nukleotidaza (e5'-NT, EC 3.1.3.5.) je hidrolaza koja katalizira reakciju hidrolize ribo- i deoksiribonukleozid-5'-monofosfata prema općoj shemi:

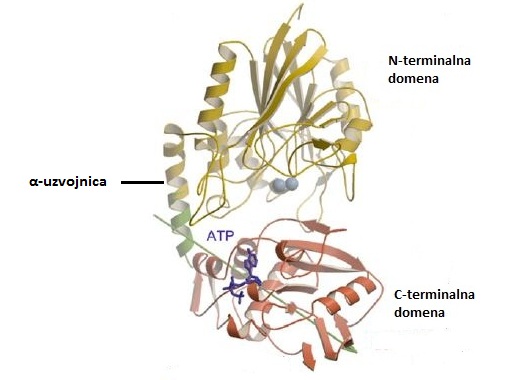
5'-nukleotid + H2O 🡪 nukleozid + fosfat

Supstrati ovoga enzima najčešće su ribo- i deoksiribonukleotidi te nikotinamid-adenin-dinukleotid. Enzim ima slabiji afinitet prema deoksiribonukleotidima, a najveći afinitet ima prema AMP-u. e5'-NT je jedna od sedam identificiranih humanih nukleotidaza, ostalih šest nukleotidaza smješteno je unutar stanice, od toga pet u citosolu te jedna u mitohondriju. Enzim postoji u dva oblika: obliku koji je glikozil-fosfatidil-inozitolnim (GPI) sidrom vezan za staničnu membranu i topljivom obliku koji se nalazi u izvanstaničnom prostoru, a nastaje iz membranskog hidrolizom GPI-sidra (Sträter, 2006).

e5'-NT (UniProt unos P21589) je metaloprotein molekulske mase oko 65 kDa (Sträter, 2006). Sastoji se od dvije jednake podjedinice koje su povezane nekovalentnim vezama (Martinez-Martinez i sur., 2000). Svaka od podjedinica sastoji se od dvije domene, N- i C-terminalne domene koje su povezane α-uzvojnicom. Podjedinice su kodirane genom NT5E koji se nalazi na 6. kromosomu, na lokaciji q14.3 i sadrži 8 egzona. Nastala mRNA kodira polipeptid od 574 aminokiselinska ostataka. Zreli polipeptidni lanac od 523 aminokiselinska ostatka nastaje nakon uklanjanja signalnog slijeda na N-kraju te hidrofobnog ostatka na C-kraju. Svaka podjedinica sadrži četiri intramolekularne disulfidne veze (51-57, 353-358, 365-387, 476-479). Mjesta za glikozilaciju su četiri asparaginska ostatka: Asn 53, Asn 311, Asn 333 i Asn 403.

N-terminalna domena (aminokiselinski ostatci 25 – 342) srodna je kalcineurinskoj superporodici metalo-fosfataza i veže dva cinkova atoma. Sekundarna struktura sastoji se od osamnaest β ploča i jedanaest α uzvojnica. N-terminalna domena odgovorna je za katalitičko djelovanje enzima (Zimmermann, 1992). C-terminalna domena (aminokiselinski ostatci 362 - 550) sadrži jedanaest β ploča i devet α uzvojnica. Jedinstvena je za e5'-NT i sadrži vezno mjesto za supstrat i GPI-sidro ukoliko se radi o obliku enzima koji je vezan za staničnu membranu (Zimmermann i sur., 2012).

Osnovna fiziološka uloga e5'-NT jest stvaranje adenozina iz AMP-a. Adenozin potom funkcionira kao važna signalna molekula koja može aktivirati adenozinske receptore što rezultira širokim spektrom fizioloških funkcija koje su navedene u poglavlju 1.2.



Slika 6. Kristalna struktura ekto-5'-nukleotidaze s inhibitorom (ATP-om) na veznom mjestu supstrata. Žuto označeno – N terminalna domena, crveno – C terminalna domena, svijetlo plavo- Zn2+ (preuzeto i prilagođeno iz Sträter, 2006).

## 1.5. Adenozin deaminaza

Adenozin-deaminaza (ADA, EC 3.5.4.4.), poznata i pod nazivom adenozin-aminohidrolaza, je hidrolaza koja katalizira ireverzibilnu reakciju deaminacije adenozina i 2'-deoksiadenozina:

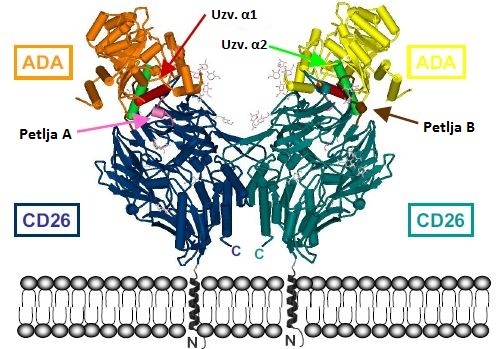
Adenozin + H2O 🡪 inozin + NH3

2'-deoksiadenozin + H2O 🡪 2'-deoksiinozin + NH3

Postoje dva izoenzima ADA-e, ADA1 i ADA2. ADA1 je prisutna u gotovo svim stanicama gdje je uključena u metabolizam purina, dok se ADA2 predominantno nalazi u stanicama jetre, monocitima i serumu.

ADA1 (UniProt unos P00813) je metaloenzim izražen u gotovo svim ljudskim stanicama, a povećana ekspresija ovog enzima zapažena je u T-limfocita. Iako je ADA1 predominantno locirana u citosolu može biti eksprimirana i kao ektoenzim na površini stanice vezan za proteine CD26 ili adenozinske receptore te kao topljivi enzim koji se nalazi u izvanstaničnom okruženju (Yegutkin, 2014). Gen koji kodira ADA1 sadrži 32 kbp i 12 egzona (Valerio i sur., 1985), a nalazi se na 20. kromosomu, na poziciji q13.12. Enzim je monomer molekulske mase ~ 40kDa koji se sastoji od 362 aminokiseline. Ne sadrži mjesta za glikozilaciju, niti disulfidne veze, međutim ima tri acetilirana aminokiselinska ostatka na sljedećim pozicijama: 2. - N-acetilalanin, 54. - N6- acetillizin i 232. - N6-acetillizin. Enzim sadrži dobro poznati motiv nazvan TIM-bačva koji se sastoji od osam paralelnih β-ploča i osam α-uzvojnica koje se izmjenjuju duž polipeptidne okosnice. U aktivnom mjestu enzima nalazi se cinkov ion koji je nužan za aktivnost enzima (Niu i sur., 2010).

ADA1 koja se nalazi na membrani vezana je za membranske enzime CD26 ili adenozinske receptore A1 i A2B (Franco i sur., 2007). CD26, poznat i pod imenom dipeptidil-peptidaza IV (DPP IV), jest serinska egzopeptidaza koja kida X-prolin-dipeptid s N-kraja polipeptida. DPP IV ima široki spektar supstrata koji obuhvaća različite faktore rasta, citokine, inkretine i dr.(Pala i Rotella, 2013). Sastoji se od dvije identične podjedinice molekularne mase ~100 kDa, usidrene u membranu svojim N-krajevima koji sadrži hidrofobni transmembranski segment od 22 aminokiselinska ostatka.



Slika 7. Struktura kompleksa CD26 i ADA1. Podjedinice CD26 označene su tamnoplavom i svijetloplavom bojom. ADA1 označena je narančastom i žutom bojom. Na slici su naznačene uzvojnice adenozin-deaminaze i omče DPP IV gdje dolazi do interakcije dvaju enzima (preuzeto iz Franco i sur., 2007).

ADA2 (UniProt unos Q9NZK5) je izoenzim ADA-e. Sastoji se od dvije identične podjedinice molekulske mase ~59 kDa. Svaka od podjedinica kodirana je genom CECR1 (od eng. Cat eye syndrome chromosome region, candidate 1) koji je smješten na 22. kromosomu na lokaciji q11.2. mRNA kodira polipeptidni lanac od 511 aminokiselinskih ostataka koji se reduciraju do 482 ostatka kod funkcionalne podjedinice, a nakon uklanjanja signalnog slijeda na N-kraju. Svaka podjedinica veže jedan ion cinka, glikozilirana je na četiri asparaginska ostatka (na mjestu 127, 174, 185 i 378) te sadrži intramolekulsku disulfidnu vezu koja spaja mjesta 137-159. Podjedinice sadrže motiv za dimerizaciju, PRB domenu koja služi za aktivaciju receptora i mjesto za vezanje supstrata.

ADA1 i ADA2 su izoenzimi što znači da kataliziraju istu kemijsku reakciju, međutim, afinitet ADA2 prema adenozinu je višestruko manji od afiniteta ADA1 (ADA1: Km~ 40-70 µmol/L; ADA2: Km~ 2 mmol/L). Osim različitog afiniteta prema supstratu enzimi se značajno razlikuju i prema ostalim karakteristikama. ADA1 je predominantno unutarstanični enzim, dok je ADA2 zastupljenija u izvanstaničnom prostoru. ADA2 je homodimer, za razliku od ADA1, a i podjedinice im se značajno razlikuju u molekularnoj masi (ADA2: ~59kDa; ADA1: ~40kDa). ADA2 posjeduje i ekstraenzimske funkcije koje nisu još u potpunosti razjašnjene. Studijama je utvrđeno da se ADA2 otpušta iz antigen prezentirajućih stanica te da stimulira aktivaciju makrofaga i limfocita vežući se za površinske receptore za citokine (Zavialov i sur., 2010).

# 2. SVRHA I CILJ ISTRAŽIVANJA

Posljednjih godina u znanstvenoj su literaturi objavljeni rezultati istraživanja koja ukazuju na razliku u koncentracijama purinskih metabolita u plazmi i serumu osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih osoba (Fais i sur., 2013; Guieu i sur., 2012). Fais i suradnici uočili su statistički značajnu razliku u koncentraciji adenozina, inozina, hipoksantina i ksantina u serumu zdravih pojedinaca i oboljelih od fibromialgije. Otkriće snižene koncentracije adenozina posebno je zanimljivo budući da su dokazana njegova potentna analgetska svojstva.

Ovaj je rad imao za cilj utvrditi jesu li promijenjene koncentracije purinskih metabolita, posebice snižene koncentracije adenozina, u osoba oboljelih od fibromialgije posljedica promijenjenih aktivnosti enzima koji sudjeluju u njihovu metabolizmu. S tim u svezi postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. Odrediti koncentraciju katalitičke aktivnosti topljivog oblika enzima ekto-5'-nukleotidaze (e5'-NT) u serumu pacijenata oboljelih od fibromialgije i kontrolnom uzorku (zdravi dobrovoljci);
2. Odrediti koncentraciju katalitičke aktivnosti topljivog oblika enzima adenozin-deaminaze, (ADA) kao i izoenzima ADA1 i ADA2 u serumu pacijenata oboljelih od fibromialgije i kontrolnom uzorku (zdravi dobrovoljci);
3. Odrediti koncentraciju katalitičke aktivnosti DPP IV, membranskoga enzima za koji je vezana ADA, u serumu pacijenata oboljelih od fibromialgije i kontrolnom uzorku (zdravi dobrovoljci);
4. Usporediti aktivnosti enzima e5'-NT, ADA (ADA1, ADA2) te DPP utvrđene u ispitivanim skupinama (skupina oboljelih od fibromialgije i skupina zdravih dobrovoljaca).

Rezultati opisanoga istraživanja trebali bi pokazati koji su enzimi potencijalno odgovorni za promijenjenu koncentraciju purinskih metabolita u serumu oboljelih od fibromialgije. Očekuje se da će rezultati biti poticajni za dizajniranje novih istraživanja koja bi uključile veći broj ispitanika i bila fokusirane na procjenu dijagnostičkoga i terapijskoga značenja ovih enzima s obzirom da za fibromialgiju nisu utvrđeni pouzdani biokemijski pokazatelji, a nužno je i propitivanje novih terapijskih mogućnosti.

# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Ispitanici

Istraživanje prikazano u ovome radu obuhvatilo je dvije ispitivane skupine, skupina osoba oboljelih od fibromialgije te skupina zdravih dobrovoljaca. Obje ispitivane skupine obuhvatile su samo osobe ženskoga spola. Za određivanje koncentracije katalitičkih aktivnosti enzima uključenih u metabolizam adenozina korišteni su serumi koji su dobiveni uz suglasnost ispitanika. Serumi su prikupljeni i stavljeni na raspolaganje za prikazano istraživanje ljubaznošću dr. sc. Maria D. Cordera (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Deparment).

Skupina oboljelih od fibromialgije Skupina zdravih dobrovoljaca

Broj ispitanika: 24 Broj ispitanika 32

Dob (godine): 51,67 ± 8,60 Dob (godine): 49,78 ± 6,72

Broj osjetljivih točaka: 15,38 ± 2,87

Trajanje bolesti (godine): 14,96 ± 9,54

Kod svih pacijenata (24) fibromialgija je dijagnosticirana na temelju dijagnostičkog kriterija ACR-a iz 1990. godine. Pojedinačni podatci o pacijentima prikazani su u Tablici 1., a o zdravim dobrovoljcima u Tablici 2. (poglavlje 11. DODATAK).

## 3.2. Aparati, pribor i kemikalije

Sva mjerenja izvršena su na spektrofotometru Aquarius 7000 Series, proizvođača Cecil Instruments Limited (Velika Britanija). Od ostalog laboratorijskog pribora koristile su se pipete sljedećih volumena: 1-10 µL, 10-100µL, 100-1000 µL i za njih odgovarajući nastavci, epruvete od 1,5 mL te termomikser Thermomixer comfort. Sav navedeni pribor nabavljen je od proizvođača Eppendorf (Njemačka).

Za mjerenje aktivnosti ADA-e korišten je komercijalno dostupan test komplet Adenosine Deaminase Assay Kit (oznaka DZ117A-K; Diazyme Laboratories, SAD). Test komplet je sadržavao reagense R1 i R2 slijedećeg sastava:

Reagens R1

Tris HCl, pH 8,0 50mM

4-aminoantipirin 2mM

Purin nukleozid fosforilaza 0,1 U/mL

Ksantin oksidaza 0,2 U/mL

Peroksidaza 0,6 U/mL

Stabilizatori

Reagens R2

Tris-HCl, pH 4,0 50mM

Adenozin 10mM

N-Etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3-metilanilin 2mM

Kao kalibrator korišten je Adenosine Deaminase Calibrator Set (oznaka DZ117A-CAL; Diazyme Laboratories, SAD). Kalibrator je kupljen u obliku liofiliziranog praha koji je otopljen u 1 mL fiziološke otopine i ostavljen preko noći da se uravnoteži. Enzimska aktivnost kalibratora iznosila je 48 U/L. Za mjerenje aktivnosti izoenzima ADA2 korišten je EHNA [eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil)adenin; Sigma-Aldrich, Njemačka], selektivni inhibitor ADA1.

Za mjerenje aktivnosti e5'-NT korišten je komercijalno dostupan test komplet 5'-Nucleotidase (oznaka DZ123A-K; Diazyme Laboratories, SAD). Test komplet je sadržavao slijedeće reagense:

Reagens R1

Goodov pufer, pH 7,6 100mM

4-aminoantipirin 2mM

Purin nukleozid fosforilaza 1,1 U/mL

Ksantin oksidaza 1,2 U/mL

Peroksidaza 0,6 U/mL

Stabilizatori

Reagens R2

Goodov pufer, pH 7,6 100mM

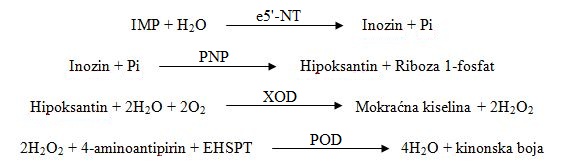
5'-inozin monofosfat 10 mM

N-Etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3-metilanilin 2mM

Kao kalibrator korišten je 5'NT Calibrator (oznaka DZ123A-CAL; Diazyme Laboratories, SAD). Kalibrator je kupljen u obliku liofiliziranog praha koji je otopljen u 1 mL deionizirane vode i ostavljen preko noći da se uravnoteži. Enzimska aktivnost kalibratora iznosila je 65,3 U/L.

## 3.3. Određivanje aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (e5'-NT)

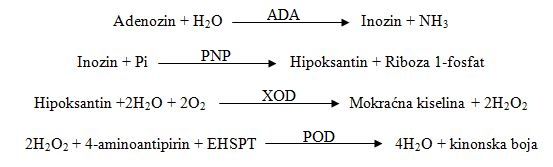
Princip određivanja enzimske aktivnosti e5'-NT temelji se na enzimskoj hidrolizi IMP-a pri čemu nastaje inozin kojega PNP pretvara u hipoksantin. Enzim ksantin oksidaza (XOD) pretvara nastali hipoksantin u mokraćnu kiselinu pri čemu nastaje vodikov peroksid. Pod utjecajem peroksidaze (POD) H2O2 reagira s N-etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3-metilanilinom (EHSPT) i 4-aminoantipirinom. Produkt te reakcije je kinonska boja koja ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 550 nm. Promjena apsorbancije na toj valnoj duljini proporcionalna je enzimskoj aktivnosti 5'-NT. Sve navedene reakcije prikazane su na shemi:



Određivanje aktivnosti započelo je miješanjem 180 µL reagensa R1 i 10µL seruma u eppendorf epruveti. Epruveta je ostavljena na mikseru termostatiranom na 37ºC s uključenim miješanjem brzinom od 350 okretaja u minuti. Nakon 5 minuta inkubacije u reakcijsku smjesu dodano je 90 µL reagensa R2. Nakon dodatka reagensa R2 reakcijska prenosi se u kivetu koja se potom stavi u spektrofotometar. U spektrofotometru je reakcijska smjesa dalje inkubirana na 37ºC, a prethodno je odabrana valna duljina. Kao slijepa proba korištena je deionizirana voda. Apsorbancije su izmjerne u 8., 9. i 10. Minuti od trenutka kada su pomiješani reagensi R1 i uzorak. Iz očitanih apsorbancija izračuna se ΔA/min.

## 3.4. Određivanje aktivnosti adenozin-deaminaze (ADA)

Princip određivanja enzimske aktivnosti ADA-e temelji se na enzimskoj deaminaciji adenozina pri čemu nastaje inozin, kojega enzim PNP pretvara u hipoksantin. XOD pretvara nastali hipoksantin u mokraćnu kiselinu pri čemu nastaje vodikov peroksid. Pod utjecajem POD-e H2O2 reagira s EHSPT-om i 4-aminoantipirinom. Produkt te reakcije je kinonska boja koja ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini 550 nm. Promjena apsorbancije na toj valnoj duljini proporcionalna je enzimskoj aktivnosti ADA-e. Sve navedene reakcije prikazane su na shemi:



Određivanje aktivnosti započelo je miješanjem 180 µL reagensa R1 i 5µL seruma u eppendorf epruveti. Epruveta je ostavljena na mikseru termostatiranom na 37ºC s uključenim miješanjem brzinom od 350 okretaja u minuti. Nakon 3 minute inkubacije u reakcijsku smjesu dodano je 90 µL reagensa R2. Nakon dodatka reagensa R2 smjesa se inkubira 3 minute, a potom se prenosi u kivetu koja se stavlja u spektrofotometar. U spektrofotometru reakcijska smjesa je dalje inkubirana na 37ºC, a prethodno je odabrana valna duljina. Kao slijepa proba korištena je fiziološka otopina. Apsorbancije su izmjerene u 8., 9., 10. i 11. minuti od trenutka kada se pomiješaju reagens R1 i uzorak. Iz očitanih apsorbancija izračuna se ΔA/min.

Za određivanje aktivnosti pojedinih izoenzima ADA-e korišten je selektivni inhibitor ADA1, EHNA. Koncentracija inhibitora u reakcijskoj smjesi iznosila je 20 µmol/L. Inhibitor je otopio u reagensu R1 i ostatak mjerenja je izvršen identično kao i za određivanje ukupne aktivnosti ADA-e.

## 3.5. Određivanje aktivnosti dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV)

Određivanje enzimske aktivnosti DPP IV nije bilo moguće provesti na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, stoga je određivanje povedeno na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci pod vodstvom prof. dr. sc. Jadranke Varljen. Za mjerenje koncentracije katalitičke aktivnosti PPD IV korištena je metoda opisana u Nagatsu i sur., 1976.

## 3.6. Statistička analiza

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija i analizirani T-testom. Odabrana razina značajnosti iznosila je p < 0,05.

# 4. REZULTATI

## 4.1. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti ekto-5'-nukleotidaze (e5'-NT)

Izvršenim mjerenjima dobivene su vrijednosti apsorbancija temeljem kojih se izračuna ΔA/min. Pri izračunu enzimske aktivnosti korištena je aritmetička sredina svih utvrđenih ΔA/min. Za izračun koncentracije katalitičke aktivnosti enzima korištena je sljedeća formula:

Enzimska akt. (uzorak) = [ΔA/min (uzorak) / ΔA/min (standard)] x enzimska akt.(standard)

Tijekom svakog radnog dana napravljena su mjerenja aktivnosti standarda u triplikatu na isti način kao što su napravljena mjerenja uzoraka te se aritmetička sredina triju mjerenja koristila u gore navedenoj formuli za izračun enzimske aktivnosti u uzorku. Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Enzimska aktivnost u 24 uzorka seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 3,4395 ± 1,0776 U/L . Enzimska aktivnost u 32 kontrolna uzorka seruma iznosi 3,4909 ± 1,2119 U/L. P vrijednost dobivena t-testom iznosi p= 0,870. Pojedinačne aktivnosti e5'-NT za skupinu oboljelih od fibromialgije prikazani su u Tablici 3., a za kontrolnu skupinu u Tablici 4. (poglavlje 11. DODATAK).

Slika 8. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti enzimske aktivnosti e5'-NT izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; p=0,870.

## 4.2. Rezultati mjerenja ukupne enzimske aktivnosti adenozin-deaminaze (ADA)

Izvršenim mjerenjima dobivene su vrijednosti apsorbancija koje su iskorištene za računanje ΔA/min. Pri izračunu enzimske aktivnosti korištena je aritmetička sredina utvrđenih ΔA/min. Enzimska aktivnost utvrđena je prema sljedećoj formuli:

Enzimska akt. (uzorak) = [ΔA/min (uzorak) / ΔA/min (standard)] x enzimska akt.(standard)

Tijekom svakog radnog dana napravljena su mjerenja aktivnosti standarda u triplikatu na isti način kao i za uzorke te se aritmetička sredina triju mjerenja koristila u gore navedenoj formuli za izračun enzimske aktivnosti uzorka. Dobiveni rezultati izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

Enzimska aktivnost u 24 uzorka seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 12,8926 ± 3,0340 U/L. Enzimska aktivnost u 32 kontrolna uzorka seruma iznosi 11,2231 ± 2,4832 U/L. P vrijednost dobivena t-testom iznosi p= 0,0276. Pojedinačne aktivnosti ADA-e za skupinu oboljelih od fibromialgije prikazani su u Tablici 3., a za kontrolnu skupinu u Tablici 4. (poglavlje 11. DODATAK).

Slika 9. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti ukupne enzimske aktivnosti ADA-e izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; p=0,0276.

## 4.3. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti ADA2

Mjerenje i računanje enzimske aktivnosti ADA2 izvršeno je na isti način kao i za ukupnu enzimsku aktivnost ADA-e uz korištenje EHNA-e, selektivnog inhibitora ADA1. Izmjerena enzimska aktivnost u 24 uzorka seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 11,3234 ± 2,6510 U/L. Enzimska aktivnost u 32 kontrolna uzorka iznosi 9,2240 ± 2,5012 U/L. P vrijednost dobivena t-testom iznosi p= 0,0038. Pojedinačne aktivnosti ADA2 za skupinu oboljelih od fibromialgije prikazani su u Tablici 3., a za kontrolnu skupinu u Tablici 4. (poglavlje 11. DODATAK).

Slika 10. Grafički prikaz izmjerenih vrijednosti enzimske aktivnosti ADA2 izraženo kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; p= 0,0038.

## 4.4. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti ADA1

Enzimska aktivnost ADA1 nije mjerena izravno, nego je izračunata prema formuli:

Enzimska aktivnost ADA1= Ukupna enzimska aktivnost ADA - Enzimska aktivnost ADA2

Izračunata aktivnost za 24 uzoraka seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 1,5691 ± 1,5106 U/L. Enzimska aktivnost 32 kontrolnih uzoraka iznosi 2,0187 ± 1,7755 U/L. P vrijednost dobivena t-testom iznosi p=0,323. Pojedinačne aktivnosti ADA1 za skupinu oboljelih od fibromialgije prikazani su u Tablici 3., a za kontrolnu skupinu u Tablici 4. (poglavlje 11. DODATAK).

Slika 11. Grafički prikaz izračunatih vrijednosti enzimske aktivnosti ADA1 izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija; p=0,323.

## 4.5. Rezultati mjerenja enzimske aktivnosti dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV)

Mjerenje enzimske aktivnosti DPP IV izvršeno je na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Određena aktivnost za uzorke seruma pacijenata oboljelih od fibromialgije iznosi 53,5128 ± 12,5514 U/L. Enzimska aktivnost u kontrolnim uzorcima iznosi 46,1391 ± 10,7891 U/L. P vrijednost dobivena T-testom iznosi p= 0,0043.

Slika 12. Grafički prikaz izračunatih vrijednosti enzimske aktivnosti DPP IV izraženi kao srednja vrijednosti ± standardna devijacija; p=0,0043.

## 4.5. Rezultati svih provedenih mjerenja enzimskih aktivnosti

U Tablici 5. prikazane su aktivnosti enzima uključenih u metabolizam purinskih nukleotida/nukleozida, e5'-NT, ADA, ADA1, ADA2 i DPP IV, izražene kao srednja vrijednost i standardna devijacija. Osim toga, Tablica 5. sadrži i p vrijednosti dobivene usporedbom (t-test) enzimskih aktivnosti skupine bolesnika oboljelih od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca. Uočava se da su aktivnosti enzima ADA-e, ADA2 i DPP IV statistički značajno više u osoba oboljelih od fibromialgije.

Tablica 5. Prikaz aktivnosti enzima uključenih u metabolizam purinskih nukleotida/nukleozida. Zvjezdicom označene p vrijednosti su statistički značajne.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Enzim | Kontrola  U/L | | Fibromialgija  U/L | | t-test |
|  | Srednja vrijednost | Standardna dev. | Srednja vrijednost | Standardna dev. | p |
| e5'-NT | 3,4909 | 1,2119 | 3,4395 | 1,0776 | 0,870 |
| ADA | 11,2231 | 2,4832 | 12,8926 | 3,0340 | 0,0276\* |
| ADA1 | 2,0187 | 1,7755 | 1,5691 | 1,5106 | 0,323 |
| ADA2 | 9,2240 | 2,5012 | 11,3234 | 2,6510 | 0,0038\* |
| DPP IV | 46,1391 | 10,7891 | 53,5128 | 12,5514 | 0,0043\* |

# 5. RASPRAVA

Fibromialgija je sindrom karakteriziran kroničnom boli koštano-mišićnog sustava, ukočenošću zglobova i sistemskim simptomima kao što su umor, nesanica, poremećaji raspoloženja i kognitivne smetnje. Ne postoji osnovna organska bolest i dobro definirani biokemijski pokazatelji što uvelike otežava postavljanje pravilne dijagnoze. Nedavno je objavljeno da su utvrđene promjene u koncentraciji purinskih metabolita u serumu pacijenata kojima je dijagnosticirana fibromialgija (Fais i sur., 2013; Guieu i sur., 2012). Uočene su smanjene koncentracije adenozina za kojega je dokazano ima potentna analgetska svojstva (Lynch i sur., 2003; Little i sur., 2014). Uzevši u obzir da upravo pacijenti koji boluju od fibromialgije pate od kronične boli i budući da je svaka dokazana promjena biokemijskih pokazatelja koji se mogu pratiti laboratorijskim testovima od potencijalno velikog dijagnostičkog značenja, nužno je istražiti pozadinu takvih abnormalnosti.

U ovom radu ispitivano je postoje li razlike u enzimskim aktivnostima topljivih oblika enzima ekto-5'-nukleotidaze (e-5'-NT), adenozin-deaminaze (ADA) i dipeptidil-peptidaze (DPP IV) u serumu pacijenata i zdravih dobrovoljaca. Navedeni enzimi odabrani su zbog njihove uloge u stvaranju i daljnjem metabolizmu izvanstaničnog adenozina (slika 3). Potrebno je napomenuti da su analizirani uzorci seruma koji sadrže samo topljive oblike enzima te da mjerenjima nisu obuhvaćeni drugi oblici enzima, poput membranski vezanih enzima.

Iako postoje tri enzima koji kataliziraju pretvorbu izvanstaničnog AMP-a u adenozin smatra se da je 5'-NT najzaslužniji za pretvorbu (Yegutkin, 2014). Budući da je 5'-NT zaslužna za nastajanje adenozina pretpostavljeno je da je smanjena aktivnost enzima djelomično odgovorna za utvrđene snižene koncentracije adenozina u serumu pacijenata. Rezultati prikazani u ovom radu nisu potvrdili tu pretpostavku. Utvrđeno je da ne postoji značajna razlika u enzimskoj aktivnosti 5'-NT-a u zdravih dobrovoljaca i pacijenata; p= 0,87 (slika 8). Iako su ovi rezultati isključili mogući utjecaj topljivog oblika 5'-NT-a na opaženu smanjenu razinu adenozina potrebno je napomenuti da se temeljem njih ne može procijeniti eventualni utjecaj membranskog oblika enzima te da su potrebna dodatna istraživanja aktivnosti membranskog oblika enzima.

Drugi enzim koji je bio predmet provedenog istraživanja jest ADA. Navedeni enzim igra ključnu ulogu u uklanjanju adenozina iz izvanstaničnog prostora deaminacijom u inozin. Poremećaji aktivnosti ovoga enzima mogu se odraziti na koncentracije adenozina. Mjerenja ukupne enzimske aktivnosti topljivog oblika ADA-e pokazala su da je aktivnost enzima veća u pacijenata oboljelih od fibromialgije nego u zdravih dobrovoljaca; p= 0,0276 (slika 9). Povećanje aktivnosti ADA-e u bolesnika uzrokuje intenzivniju pretvorbu adenozina u inozin što je u skladu s literaturnim podacima o sniženim koncentracijama adenozina u osoba oboljelih od fibromialgije. Osim ukupne aktivnosti ADA-e izmjerene su i enzimske aktivnosti pojedinih izoformi, ADA1 i ADA2. Mjerenjem aktivnosti ADA1 nije utvrđena razlika između zdravih dobrovoljaca i pacijenata; p= 0,323 (slika 11), međutim opažena je značajno povećana aktivnost ADA2 u pacijenata; p= 0,0038 (slika 10).

Aktivnost DPP IV značajno je povišena kod osoba oboljelih od fibromialgije u odnosu na zdrave dobrovoljce (p= 0,0043). Ovaj je rezultat vrlo zanimljiv s obzirom da je ADA1, čija aktivnost nije značajno promijenjena, vezana na taj enzim. Značenje ovog rezultata trebalo bi dodatno rasvijetliti utvrđivanjem izraženosti enzima čije su aktivnosti povišene u fibromialgiji, ponajprije DPP IV i ADA-e, ali i njenih izoformi.

Uočene razlike u aktivnosti ADA, ADA2 i DPP IV temelj su za daljnja istraživanja navedenih enzima. Istraživanjem točnog uzroka povećane aktivnosti ADA2 mogao bi se steći važan uvid u etiologiju i patofiziologiju fibromialgije koje nisu do kraja razjašnjene. Primjerice povišene su enzimske aktivnosti ADA2 opažene kod različitih infektivnih bolesti, primjerice tuberkuloze (Gakis, 1996; Mohammadtaheri i sur., 2005), a dokazano je da su infekcije potencijalni okidač fibromialgije (Bellato i sur., 2012). Moguće je da povišene razine ADA2 perzistiraju i nakon prolaska infekcije te reduciraju izvanstaničnu koncentraciju adenozina.

Rezultati prikazani u ovome radu ukazuju na mogućnost korištenja povišene aktivnosti ADA2 i DPP IV zajedno sa smanjenom koncentracijom adenozina, kao važne dijagnostičke parametre koji bi mogli olakšati dijagnozu fibromialgije. Budući da trenutno ne postoje biokemijski pokazatelji dovoljno specifični da bi se koristili za potvrdu dijagnoze fibromialgije.

Osim dijagnostičkog značenja, povišena aktivnost ADA2 omogućuje neke nove terapijske mogućnosti. Postojeća terapija, iako učinkovita do određene mjere, nije dovoljno dobra. Neki od lijekova koji se primjenjuju imaju ozbiljne nuspojave, prvenstveno TCA i antiepileptici. Budući da je fibromialgija bolest koja može trajati desetljećima dugotrajnom primjenom NSAID-a mogu se javiti ozbiljni kardiovaskularni (Singh i sur., 2013) i gastrointestinalni (Shah i sur., 1999) problemi, dok dugotrajna primjena tramadola može dovesti do razvoja ovisnosti. Razvoj selektivnih inhibitora ADA2 mogao bi se pokazati značajnim napretkom u liječenju fibromialgije. Inhibitorima bi se postiglo povećanje koncentracije adenozina, a posljedično i povećanje njegovih analgetskih učinaka. Nuspojave ovakve selektivne terapije trebale bi biti značajno manje nego kod već postojeće terapije, što bi značilo poboljšanje kvalitete života pacijenata.

# 6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između serumske aktivnosti ekto 5'-nukleotidaze (e5'-NT) između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca (p= 0,87).
2. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između ukupne serumske aktivnosti adenozin-deaminaze (ADA) između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca (p=0,0276).
3. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u serumskoj aktivnosti izoenzima ADA1 između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca (p=0,323).
4. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između serumske aktivnosti izoenzima ADA2 između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca (p=0,0038).
5. Utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između serumske aktivnosti enzima dipeptidil-peptidaze (DPP IV) između osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih pojedinaca (p=0,0043).

# 7. ZAHVALE

Zahvaljujemo se mentorici, prof. dr. sc. Karmeli Barišić, na ukazanom povjerenju te svim savjetima i pruženoj pomoći tijekom eksperimentalnog rada kao i samog pisanja ovoga rada. Bez nje bili bismo zakinuti za vrijedno iskustvo znanstvenoga rada i izašli bi s fakulteta time siromašniji.

Također se zahvaljujemo svim zaposlenicima Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju koji su nam pomogli oko izvođenja eksperimentalnog dijela rada, pogotovo višoj tehničkoj suradnici Vesni Boričević koja je uvijek izdvojila vrijeme za odgovoriti na naša brojna pitanja i pomoći nam pri radu.

Zahvaljujemo dr. sc. Mariu D. Corderu (Universidad de Sevilla, Research Laboratory, Oral Medicine Deparment) na ustupanju uzoraka, prof. dr. sc. Jadranki Varljen (Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Zavod za kemiju i biokemiju) i njenim suradnicama, doc. dr. sc. Dijani Detel i dr. sc. Lari Batičić Pučar, te dr. sc. Ognjenu Čuliću na pomoći u eksperimentalnom dijelu rada.

# 8. POPIS LITERATURE

Arnold LM, Keck PE, Welge JA. Antidepressant treatment of fibromyalgia. A meta-analysis and review. *Psychosomatics*, 2000, 41(2), 104-113.

Bellato E, Marini E, Castoldi F, Barbasetti N, Mattei L, Bonasia DE, Blonna D. Fibromyalgia Syndrome: Etiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Pain Res Treat,* 2012.

Boison D. Adenosine Kinase: Exploitation for Therapeutic Gain. *Pharmacol Rev*, 2013, 65, 906-943.

Bradley LA. Pathophysiology of Fibromyalgia. *Am J Med*, 2009, 122(12), 22-30.

Burnstock G. Purinergic Receptors and Pain. *Curr Pharm Design*, 2009, 15(15), 1717-1735.

Buskila D, Sarzi-Puttini P. Biology and therapy of fibromyalgia. Genetic aspects of fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(5), 218.

Chakrabarty S, Zoorob R. Fibromyalgia. *Am Fam Physician,* 2007, 76(2), 247-254.

Clauw DJ. Fibromyalgia: a clinical review. *JAMA*, 2014, 311(15), 1547-1555.

Clauw DJ. Fibromyalgia: an overview. *Am J Med*, 2009, 122(12), 3-13.

Fais A, Cacace E, Corda M, Era B, Peri M, Utzeri S, Ruggiero V. Purine metabolites in fibromyalgia syndrome. *Clin Biochem*, 2013, 46, 37-39.

Ferré S, Diamond I, Goldberg SR, Yao L, Hourani SMO, Huang ZL, Urade Y, Kitchen I. Adenosine A2A receptors in ventral striatum, hypothalamus and nociceptive circuitry. Implications for drug addiction, sleep and pain. *Prog Neurobiol*, 2007, 83(5), 332-347.

Franco R, Pacheco R, Gatell JM, Gallart T, Lluis C. Enzymatic and Extraenzymatic Role of Adenosine Deaminase 1 in T-Cell-Dendritic Cell Contacts and in Alterations of the Immune Function. *Crc Cr Rev Immunol*, 2007, 27(3).

Fredholm BB, IJezerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*, 2001, 53(4), 527-552.

Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur Respir J*, 1996, 9(4), 632-633.

Guieu R, Guedj E, Giorgi R, Dousset A, Tuzzolino V, By Y, Leveque JM, Peragut JC, Régis J, Ruf J, Fenouillet E, Roussel P. High cell surface CD26-associated activities and low plasma adenosine concentration in fibromyalgia. *Ann Rheum Dis*, 2012, 71(8), 1427-1428.

Harris RE, Clauw DJ, Scott DJ, McLean SA, Gracely RH, Zubieta JK. Decreased central µ-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci*, 2007, 27(37), 10000-10006.

Haskó G, Kuhel DG, Németh ZH, Mabley JG, Stachlewitz RF, Virág L, Lohinai Z, Southan GJ, Salzman AL, Szabó C. Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *J Immunol*, 2000, 164(2), 1013-1019.

Haskó G, Sitkovsky MV, Szabó C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine. *Trends Pharmacol Sci,* 2004, 25(3), 152-157.

Jacobson KA. Introduction to Adenosine receptors as Therapeutic Targets. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, 193, 1-24.

Jin X, Shepherd RK, Duling BR, Linden J. Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation. *J Clin Invest*, 1997, 100(11), 2849-2857.

Jones KD, Deodhar P, Lorentzen A, Bennett RM, Deodhar AA. Growth hormone perturbations in Fibromyalgia: a review. *Semin Arthritis Rheu*, 2007, 36(6), 357-379.

Katon W, Sullivan M, Walker E. Medical symptoms without identified pathology: relationship to psyhiatric disorders, childhood and adult trauma, and personality traits. *Ann Intern Med*, 2001, 134(9), 917-925.

Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*, 2002, 82(3), 769-824.

Lauring J, Park BH, Wolff AC. The Phosphoinositide-3-Kinase-Akt-mTOR Pathway as a Therapeutic Target in Breast Cancer*. J Natl Compr Canc Netw*, 2013, 11(6), 670-678.

Little JW, Ford A, Symons-Liguori AM, Chen Z, Janes K, Doyle T, Xie J, Luongo L, Tosh DK, Maione S, Bannister K, Dickenson AH, Vanderah TW, Porreca F, Jacobson KA, Salvemini D. Endogenous adenosine A3 receptor activation selectively alleviates persistent pain states. *Brain*, 2014, 138(1), 28-35.

Lynch ME, Clark AJ, Sawynok J. Intravenous adenosine alleviates neuropathic pain: a double blind placebo controlled crossover trial using an enriched enrolment design*. Pain*, 2003, 103(1), 111-117.

Martinez-Martinez A, Muñdoz-Delgado E, Campoy FJ, Flores-Flores C, Rodriguez-López JN, Fini C, Vidal CJ. The ecto-5'-nucleotidase subunits in dimers are not linked by disulfide bridges but by non-covalent bonds. *Biochim Biophy Acta*, 2000, 1478, 300-308.

Mohammadtaheri Z, Mashayekhpour S, Mohammadi F, Mansoori D, Masjedi MR. Diagnostic Value of Adenosine Deaminase Isoenzyme (ADA2) and Total ADA in Tuberculous Pleural Effusion. *Tanaffos*, 2005, 4(15), 37-42.

Molina JR, Adjei AA. The Ras/Raf/MAPK pathway. *J Thorac Oncol*, 2006, 1, 7-9.

Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, Sakakibara S. New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Anal Biochem*, 1976, 74, 466-476.

Neeck G. Neuroendocrine and hormonal perturbations and relations to the serotonergic system in fibromyalgia patients. *Scand J Rheumatol*, 2000, 29(113), 8-12.

Niu W, Shu Q, Chen Z, Mathews S, Di Cera E, Frieden C. The Role of Zn2+ on the Structure and Stability of Murine Adenosine Deaminase. *J Phys Chem B*, 2010, 114(49), 16156-16165.

Pala L, Rotella CM. The Role of DPP4 Activity in Cardiovascular Districts: In Vivo and In Vitro Evidence. *J Diabetes Res*, 2013.

Popoli P, Frank C, Tebano MT, Potenza RL, Pintor A, Domenici MR, Nazzicone V,  Pèzzola A, Reggio R. Modulation of glutamate release and excitotoxicity by adenosine A2A receptors. *Neurology*, 2003, 61 (11 Suppl 6), 69-71.

Reppert SM, Weaver DR, Stehle JH, Rivkees SA. Molecular Cloning and Characterization of a Rat A1-Adenosine Receptor that is Widely Expressed in Brain and Spinal Cord. *Mol Endocrinol*, 1991, 5(8), 1037-1048.

Schmidt-Wilcke T, Clauw DJ. Fibromyalgia: from pathophysiology to therapy. *Nat Rev Rheumatol*, 2011, 7(9), 518-527.

Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal*, 2003, 15, 813-827.

Schulte G, Robertson B, Fredholm BB, DeLander GE, Shortland P, Molander C. Distribution of antinociceptive adenosine A1 receptors in the spinal cord dorsal horn, and relationship to primary afferents and neuronal subpopulations. *Neuroscience*, 2003, 121(4), 907-916.

Shah AA, Fitzgerald DJ, Murray FE. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and gastro-intestinal toxicity: current issues. *Ir J Med Sci*, 1999, 168(4), 242-245.

Singh BK, Haque SE, Pillai KK. Assessment of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced cardiotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013, 10(2), 143-156.

Stisi S, Cazzola M, Buskila D, Spath M, Giamberardino MA, Sarzi-Puttini P, Arioli G, Alciati A, Leardini G, Gorla R, Marsico M, Ceccherelli F, Bazzichi L, Carignola R, Gracely RH, Salaffi F, Altomonte L, Atzeni F. Etiopathogenetic mechanisms of fibromyalgia syndrome. *Reumatismo*, 2008, 60(1), 25-35.

Sträter N. Ecto-5’-nucleotidase: Structure function relationships. *Purinerg Signal*, 2006, 2, 343-350.

Taskén K, Aandahl EM. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 2004, 84(1), 137-167.

Tomašević-Todorović S, Pjević M, Bošković K. Fibromyalgia: Up to date aspects of patophysiology, diagnosis, and treatment. *Medicinski pregled*, 2010, 63(7-8), 507-511.

Valerio D, Duyvesteyn MGC, Dekker BMM, Weeda G, Berkvens TM, van der Voorn L, van Ormondt H, van der Eb AJ. Adenosine deaminase: characterization and expression of a gene with a remarkable promoter. *EMBO J*, 1985, 4, 437-443.

Wakai A, Winter DC, Street JT, O’Sullivan RG, Wang JH, Redmond HP. Inosine Attenuates Tourniquet-Induced Skeletal Muscle Reperfusion Injury.  *J Surg Res*, 2001, 99, 311-315.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Häuser W, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB. Fibromyalgia Criteria and Severity Scales for Clinical and Epidemiological Studies: A Modification of the ACR Preliminary Diagnostic Criteria for Fibromyalgia. *J Rheumatol,* 2011, 38(6), 1113-1122.

Wolfe F, Clauw DJ, Fitzcharles MA, Goldenberg DL, Katz RS, Mease P, Russell AS, Russell IJ, Winfield JB, Yunus MB. The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptoms severity. *Arthrit Care Res*, 2010, 62(5), 600-610.

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

Zavialov AV, Yu X, Spillmann D, Lauvau G, Zavialov AV. Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2. *J Biol Chem*, 2010, 285(16), 12367-12377.

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

Zimmermann H. 5’-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J*, 1992, 285, 345-365.

# 9. SAŽETAK

**Ivana Fileš i Marko Tomljanović**

**Serumske aktivnosti enzima 5'-nukleotidaze, adenozin-deaminaze i dipeptidil-peptidaze IV u osoba oboljelih od fibromialgije**

Nedavno utvrđene razlike u koncentracijama purinskih metabolita u plazmi i serumu osoba oboljelih od fibromialgije i zdravih osoba potakle su istraživanja koja bi objasnila utvrđene razlike i potencijalno ih iskoristila u dijagnostičke i terapijske svrhe. U ovome je istraživanju ispitano jesu li promijenjene koncentracije purinskih metabolita, posebice snižene koncentracije adenozina, posljedica promijenjenih aktivnosti enzima koji sudjeluju u njihovom metabolizmu. Korištenjem komercijalno dostupnih test kompleta izmjerene su serumske aktivnosti enzima 5'-nukleotidaze (e5'-NT), adenozin-deaminaze (ADA) i dipeptidil-peptidaze IV (DPP IV). Utvrđeno je da ne postoji razlika u enzimskoj aktivnosti e5'-NT i ADA1 između pacijenata oboljelih od fibromialgije i zdravih dobrovoljaca. Međutim utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnoj enzimskoj aktivnosti ADA-e, kao i u aktivnosti izoenzima ADA2 te DPP IV između dvije grupe ispitanika. Navedeni enzimi statistički značajno su povišeni u osoba oboljelih od fibromialgije (ADA: p=0,0276; ADA2: p=o,0038; DPP IV: p=0,0043). Rezultati ovoga istraživanja poslužiti će kao osnova daljnjeg ispitivanja aktivnosti navedenih enzima na većem uzorku s ciljem procjene njihova dijagnostičkog značenja budući da za fibromialgiju nisu utvrđeni pouzdani biokemijski pokazatelji. Osim toga rezultati ovog istraživanja bit će poticaj za propitivanje novih terapijskih mogućnosti.

Ključne riječi: fibromialgija, adenozin, ADA, e5'-NT, DPP IV

# 10. SUMMARY

**Ivana Fileš and Marko Tomljanović**

**Serum activities of enzymes 5’-nucleotidase, adenosine-deaminase and dipeptidyl-peptidase IV in people suffering from fibromyalgia**

Recently determined differences in concentrations of purine metabolites in plasma and serum of people suffering from fibromyalgia and healthy people have stimulated research which would like to explain observed differences and their potential use for diagnostic and therapeutic purposes. In this research it has been tested whether concentrations of purine metabolites, especially reduced concentration of adenosine, are result of changed activities of enzymes involved in their metabolism. Using commercially available test kits serum activities of enzymes 5’-nucleotidase (e5’-NT), adenosine-deaminase (ADA), and dipeptidyl-peptidase (DPP IV) have been measured. It has been determined that there is no difference in enzyme activities of e5’-NT and ADA1 between the people suffering from fibromyalgia and healthy volunteers. However, ADA, ADA2 and DPP IV activities were significantly higher in patients than in healthy volunteers (ADA: p=0,0276; ADA2: p=0,0038; DPP IV: p=0,0043). Results of this research could be the basis for further research of these enzymes, with intention of evaluating their diagnostic application. This is important because there are no reliable biochemical markers for fibromyalgia. Other than diagnostics this research will also bring novel therapeutic options for treatment of fibromyalgia.

Key words: fibromyalgia, adenosine, ADA, e5'-NT, DPP IV

# 11. DODATAK

Tablica 1. Prikaz podataka za pojedine ispitanike

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Oznaka | Spol | Dob (god) | Br. osjetljivih točaka | Trajanje bolesti (god) |
| F1 | Ž | 41 | 16 | 17 |
| F3 | Ž | 53 | 15 | 12 |
| F5 | Ž | 53 | 12 | 3 |
| F6 | Ž | 56 | 13 | 31 |
| F8 | Ž | 61 | 18 | 30 |
| F9 | Ž | 46 | 11 | 20 |
| F11 | Ž | 47 | 16 | 6 |
| F12 | Ž | 58 | 11 | 12 |
| F15 | Ž | 64 | 11 | 32 |
| F16 | Ž | 44 | 12 | 4 |
| F17 | Ž | 30 | 13 | 11 |
| F25 | Ž | 51 | 11 | 16 |
| F26 | Ž | 40 | 18 | 12 |
| F27 | Ž | 44 | 18 | 6 |
| F28 | Ž | 58 | 18 | 30 |
| F29 | Ž | 57 | 14 | 11 |
| F30 | Ž | 54 | 18 | 4 |
| F31 | Ž | 54 | 18 | 10 |
| F33 | Ž | 55 | 18 | 10 |
| F34 | Ž | 71 | 18 | 10 |
| F35 | Ž | 48 | 16 | 33 |
| F37 | Ž | 50 | 18 | 18 |
| F38 | Ž | 56 | 18 | 8 |
| F39 | Ž | 49 | 18 | 13 |

Tablica 2. Prikaz podataka za pojedine kontrolne uzorke

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Oznaka | Spol | Dob |
| k1 | Ž | 51 |
| k2 | Ž | 55 |
| k3 | Ž | 54 |
| k4 | Ž | 43 |
| k5 | Ž | 56 |
| k6 | Ž | 55 |
| k8 | Ž | 58 |
| k10 | Ž | 44 |
| k12 | Ž | 44 |
| k14 | Ž | 53 |
| k15 | Ž | 44 |
| k19 | Ž | 54 |
| k21 | Ž | 45 |
| k22 | Ž | 59 |
| k24 | Ž | 46 |
| k26 | Ž | 54 |
| k29 | Ž | 55 |
| k31 | Ž | 48 |
| k32 | Ž | 40 |
| k33 | Ž | 60 |
| k34 | Ž | 48 |
| k36 | Ž | 56 |
| k37 | Ž | 58 |
| k38 | Ž | 39 |
| k39 | Ž | 48 |
| k40 | Ž | 40 |
| k42 | Ž | 59 |
| k45 | Ž | 40 |
| k46 | Ž | 41 |
| k47 | Ž | 52 |
| k48 | Ž | 53 |
| k50 | Ž | 41 |

Tablica 3. Prikaz rezultata mjerenja za pojedine ispitanike

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Oznaka | 5'-NT (U/L) | ADA1 (U/L) | ADA2 (U/L) | ADA (U/L) |
| F1 | 2,822 | 0 | 10,4347 | 10,4348 |
| F3 | 3,3086 | 3,4789 | 14,6086 | 18,0877 |
| F5 | 0,8029 | 0 | 8,3478 | 8,3478 |
| F6 | 2,7654 | 1,392 | 10,4347 | 11,8268 |
| F8 | 4,5736 | 3,4706 | 9,7398 | 13,2104 |
| F9 | 3,0331 | 2,0869 | 9,7398 | 11,8268 |
| F11 | 3,3899 | 2,7902 | 9,0365 | 11,8268 |
| F12 | 4,0143 | 4,1739 | 17,3843 | 21,5583 |
| F15 | 4,9957 | 0 | 13,92 | 13,9200 |
| F16 | 3,6823 | 0,6886 | 12,5217 | 13,2104 |
| F17 | 5,3524 | 1,92 | 8,3136 | 10,2336 |
| F25 | 3,5683 | 0 | 12,1536 | 12,1536 |
| F26 | 2,3794 | 0 | 9,6 | 9,6000 |
| F27 | 4,8002 | 2,5593 | 8,9606 | 11,5200 |
| F28 | 3,3105 | 2,7566 | 10,9647 | 13,7213 |
| F29 | 3,8484 | 0 | 15,0852 | 15,0852 |
| F30 | 5,2761 | 2,0571 | 14,4002 | 16,4574 |
| F31 | 2,7932 | 0,685 | 12,343 | 13,0281 |
| F33 | 3,9608 | 2,743 | 8,9143 | 11,6574 |
| F34 | 2,5946 | 4,8002 | 8,9143 | 13,7146 |
| F35 | 1,7794 | 0 | 10,2858 | 10,2859 |
| F37 | 3,1449 | 1,3714 | 14,4002 | 15,7717 |
| F38 | 3,0208 | 0,6857 | 7,5429 | 8,2287 |
| F39 | 3,3312 | 0 | 13,7151 | 13,7152 |

Tablica 4. Prikaz rezultata mjerenja za pojedine kontrolne uzorke

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Oznaka | 5'-NT (U/L) | ADA1 (U/L) | ADA2 (U/L) | ADA (U/L) |
| k1 | 3,3457 | 2,4 | 10,392 | 12,7920 |
| k2 | 4,0379 | 2,4273 | 9,1254 | 11,5529 |
| k3 | 5,4416 | 1,608 | 14,4 | 16,0080 |
| k4 | 4,6148 | 0 | 10,3482 | 10,3483 |
| k5 | 4,1927 | 2,4273 | 7,3003 | 9,7278 |
| k6 | 3,3457 | 1,825 | 9,1254 | 10,9506 |
| k8 | 0,5999 | 0 | 11,208 | 11,2008 |
| k10 | 5,307 | 3,0399 | 14,6086 | 17,6487 |
| k12 | 2,8546 | 0 | 9,746 | 9,1255 |
| k14 | 4,3105 | 2,0869 | 9,0365 | 11,1235 |
| k15 | 3,3292 | 4,1739 | 6,2608 | 10,4348 |
| k19 | 4,8455 | 2,7965 | 9,0365 | 11,8330 |
| k21 | 3,479 | 4,3015 | 8,6215 | 12,9231 |
| k22 | 6,23 | 1,2369 | 11,6861 | 12,9231 |
| k24 | 2,8308 | 1,224 | 8,616 | 9,8400 |
| k26 | 3,5604 | 1,2369 | 9,84 | 11,0769 |
| k29 | 2,9476 | 3,083 | 7,3846 | 10,4677 |
| k31 | 3,8304 | 4,9292 | 11,0769 | 16,0062 |
| k32 | 4,8373 | 2,4553 | 5,5384 | 7,9938 |
| k33 | 4,1368 | 1,2369 | 11,0769 | 12,3138 |
| k34 | 3,1596 | 4,9292 | 7,3846 | 12,3138 |
| k36 | 2,6484 | 0 | 7,2912 | 7,2912 |
| k37 | 2,8016 | 0 | 13,3611 | 13,3612 |
| k38 | 1,6124 | 1,2158 | 7,2912 | 8,5070 |
| k39 | 3,9252 | 7,2912 | 4,2471 | 11,5384 |
| k40 | 2,8892 | 1,2212 | 9,7155 | 10,9368 |
| k42 | 3,0096 | 3,044 | 7,8927 | 10,9368 |
| k45 | 3,3452 | 0,4557 | 9,114 | 9,5697 |
| k46 | 3,1628 | 0 | 10,3353 | 10,3353 |
| k47 | 1,1796 | 0,6142 | 4,2471 | 4,8614 |
| k48 | 4,1286 | 3,3357 | 8,2026 | 11,5384 |
| k50 | 1,7693 | 0,0015 | 11,6573 | 11,6588 |