

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno–matematički fakultet

Biološki odsjek

Ivana Kero

**Razvoj metode za analizu adenozin-fosfata
u ljudskoj krvi**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Marija Cindrića i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Biljane Balen. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Mariju Cindriću na ukazanom povjerenju, pomoći, prijateljskim savjetima i što ste dio svojih znanja uvijek spremno dijelili sa mnom. Hvala Vam što ste se kao izvrstan profesor i mentor pobrinuli da ovo bude jedno predivno iskustvo.

Veliko hvala i suvoditeljici, prof. dr. sc. Biljani Balen na susretljivosti, svim stručnim komentarima i dobronamjernim prijedlozima prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Od srca hvala Luciji Dončević na svakom razgovoru, savjetu i pomoći pri izradi i pisanju ovog rada. Hvala ti na beskrajnom strpljenju i podršci. Zauvijek ću čuvati sve zajedničke trenutke, svaku riječ ohrabrenja te svaki iskren i prijateljski savjet kada sam ih najviše trebala. Hvala ti!

Zahvaljujem se i dr. sc. Ameli Hozić, dr. sc. Marijani Erk, Zuzani Redžović i Emi Svetličić što su uvijek priskakale u pomoć, dijelile korisne savjete i pridonosile divnoj radnoj atmosferi.

Hvala svim prijateljima i obitelji koji su me uvijek bodrili te bili uz mene u svakom važnom trenutku.

Posebnu zahvalu želim uputiti svojim voljenim roditeljima, bez kojih ništa ovo ne bi bilo moguće. Hvala što ste mi kroz cijeli život bili najčvršći oslonac, pružali beskrajnu potporu, riječi ohrabrenja i ljubavi, što ste nesebično sve naše potrebe stavljali ispred svojih. Hvala mojoj divnoj sestri Sari, za sve riječi podrške i što si svaku suzu uvijek pretvorila u osmijeh.

I na kraju, hvala mom Petru na velikom strpljenju, ljubavi i što si uvijek vjerovao u mene i onda kada ja nisam. Hvala što si doista moja najveća potpora sve ove godine.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Razvoj metode za analizu adenozin-fosfata u ljudskoj krvi

Ivana Kero

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Adenozin-fosfati su organske molekule iz skupine nukleotida, u koje se ubrajaju adenozin-5'-trifosfat (ATP), adenozin-5'-difosfat (ADP) i adenozin-5'-monofosfat (AMP). Kvantitativno određivanje adenozin-fosfata ima izraženu dijagnostičku ulogu jer se utjecaj koncentracije adenozin-fosfata na brojna fiziološka stanja izravno korelira s homeostazom organizma, primjerice energetske naboj. Iz navedenih je razloga cilj ovog istraživanja bio razviti široko primjenjivu, točnu i preciznu metodu ekstrakcije adenozin-fosfata iz malog volumena kapilarne krvi. Za postizanje navedenog cilja, uz originalni znanstveni doprinos, bilo je neophodno ispitati vezanje adenozin-fosfata na aktivni ugljen adsorpcijskom kromatografijom u svrhu pročišćavanja krvnih uzoraka mikro-ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Aktivni ugljen se učestalo koristi kao afinitetni adsorbens u cijelom nizu farmaceutskih, medicinskih i bioloških aplikacija zbog svoje široke dostupnosti, velike aktivne površine u odnosu na masu i jedinstvenih bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava. Bilo je neophodno razviti i validirati metodu mikro-ekstrakcije putem tekućinske kromatografije obrnutih faza, koja odjeljuje, detektira i kvantificira adenozin-fosfate ekstrahirane iz uzorka kapilarne krvi. Analizirane koncentracije adenozin-fosfata iz krvi odgovaraju teorijskim vrijednostima pronađenim u literaturnim izvorima, što ukazuje na pouzdanost razvijene ekstrakcijske metode. Shodno do sada navedenom, aktivni ugljen selektivno veže adenozin-fosfate te ponovljivo pročišćava uzorak krvi, a pri tome kromatografski parametri linearno, selektivno i precizno odjeljuju navedene analite.

(52 stranice, 24 slike, 8 tablica, 36 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: adenozin-fosfati, energetske naboj, aktivni ugljen, μ -SPE, HPLC

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Mario Cindrić

Suvoditelj: prof. dr. sc. Biljana Balen

Ocjenjivači: 1. izv. prof. dr. sc. Mario Cindrić

2. prof. dr. sc. Biljana Balen

3. doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Rad prihvaćen: 15.09.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Method development for analysis of adenosine-phosphates in human blood

Ivana Kero

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Adenosine-phosphates are organic molecules from the group of nucleotides, which include adenosine-5'-triphosphate (ATP), adenosine-5'-diphosphate (ADP) and adenosine-5'-monophosphate (AMP). Quantitative determination of adenosine-phosphates has a pronounced diagnostic role because the adenosine-phosphate concentration has influence on many physiological conditions and is directly correlated with the homeostasis of the organism, e.g. energy charge. For these reasons, the aim of this study was to develop a widely applicable, accurate and precise method of adenosine-phosphate extraction from a small volume of capillary blood. To achieve this goal, in addition to the original scientific contribution, it was necessary to examine the binding of adenosine-phosphates to activated carbon by adsorption chromatography for the purpose of blood samples purification by solid phase micro-extraction. Activated carbon is often used as an affinity adsorbent in a range of pharmaceutical, medical and biological applications due to its wide availability, large active surface area relative to mass and unique biological and physicochemical properties. It was necessary to develop and validate micro-extraction method by reverse-phase liquid chromatography, which separates, detects and quantifies adenosine-phosphates extracted from a capillary blood sample. The analyzed concentrations of adenosine-phosphates from the blood correspond to the theoretical values found in literature, which indicates the reliability of developed extraction method. Thus, activated carbon selectively binds adenosine-phosphates and purifies the blood sample, while the chromatographic parameters linearly, selectively and precisely separate these analytes.

(52 pages, 24 figures, 8 tables, 36 references, original in: Croatian)

Keywords: adenosine-phosphates, energy charge, activated carbon, μ -SPE, HPLC

Mentor: Dr. Mario Cindrić, Assoc. Prof.

Assistant mentor: Dr. Biljana Balen, Prof.

Reviewers: 1. Dr. Mario Cindrić, Assoc. Prof.
2. Dr. Biljana Balen, Prof.
3. Dr. Sofia Ana Blažević, Assistant Professor

Thesis accepted: 15.09.2021.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Adenozin–fosfati	1
1.1.1. Energetski naboj adenozin–fosfata	3
1.2. Poremećaj koncentracije ATP u ljudskom organizmu	4
1.3. Hidroliza adenozin-5'-trifosfata	5
1.4. Sinteza adenozin-5'-trifosfata.....	6
1.4.1. Glikoliza.....	7
1.4.2. Ciklus limunske kiseline	10
1.4.3. Oksidacijska fosforilacija.....	12
1.5. Mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>micro-solid phase extraction</i> , μ -SPE).....	14
1.5.1. Aktivni ugljen kao nepokretna faza za selektivno vezanje adenozin-fosfata	15
1.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	16
1.6.1. Kvalitativna analiza	18
1.6.2. Kvantitativna analiza	19
1.6.3. Tekućinska kromatografija obrnutih faza	19
1.6.4. Validacija metode HPLC	20
1.6.5. Metoda standardnog dodatka	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	22
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. Uzorak.....	23
3.1.2. Kemikalije.....	23
3.1.3. Tehnička pomagala, instrumentacija i pribor.....	24
3.2. Metode.....	24
3.2.1. Priprava uzorka	24
3.2.1.1. Priprava standardnih otopina	25
3.2.1.2. Priprava otopine za nacjepljivanje.....	25
3.2.1.3. Postupak metode standardnog dodatka.....	25
3.2.2. Tekućinska kromatografija obrnutih faza	26
3.2.2.1. Kromatografski parametri.....	26

3.2.2.2.	Validacija metode HPLC.....	27
3.2.3.	Mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi	27
3.2.3.1.	Priprava otopina za protokol μ -SPE.....	27
3.2.3.2.	Protokol metode μ -SPE.....	28
4.	REZULTATI.....	30
4.1.	Razvoj kromatografske metode za razdvajanje adenzin-fosfata na uzorcima standarda.....	30
4.2.	Validacija kromatografske metode.....	32
4.3.	Razvoj metode za ekstrakciju adenzin-fosfata iz ljudske krvi	37
4.4.	Koncentracija molekula ATP, ADP, AMP u 50 μ L ljudske krvi.....	38
4.5.	Preciznost metode μ -SPE.....	40
5.	RASPRAVA.....	43
5.1.	Razvoj kromatografske metode za razdvajanje adenzin-fosfata na uzorcima standarda.....	43
5.2.	Validacija kromatografske metode.....	44
5.3.	Razvoj metode za ekstrakciju adenzin-fosfata iz ljudske krvi	45
5.4.	Koncentracija molekula ATP, ADP, AMP u 50 μ L ljudske krvi.....	46
5.5.	Preciznost metode μ -SPE.....	47
6.	ZAKLJUČAK.....	48
7.	LITERATURA	49
8.	ŽIVOTOPIS.....	52

Popis kratica

ADP - adenzin-5'-difosfat

AEC - energetska naboj adenzin-fosfata (*engl. adenylate energy charge*)

AMP - adenzin-5'-monofosfat

ATP - adenzin-5'-trifosfat

cAMP – ciklički adenzin-monofosfat

CoA – koenzim A

DAD – detektor s nizom dioda (*engl. diode array detecton, DAD*)

FAD - flavin adenin-dinukleotid

FADH₂ - dihidroflavin adenin dinukleotid

GDP – gvanozin-difosfat

GTP – gvanozin-trifosfat

HPLC - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. high performance liquid chromatography*)

Mili-Q – ultra čista voda

NAD⁺ - nikotinamid adenin-dinukleotid

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid-fosfat

PCA – perklorna kiselina (*engl. perchloric acid*)

Pi - anorganski fosfat

PPi - pirofosfat

RBC – crvene krvne stanice (*engl. red blood cells*)

RP-HPLC - tekućinska kromatografija obrnutih faza (*engl. reverse-phase high-performance liquid chromatography*)

RSD – relativna standardna devijacija

SPE - ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*)

μ-SPE - mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *micro-solid phase extraction*)

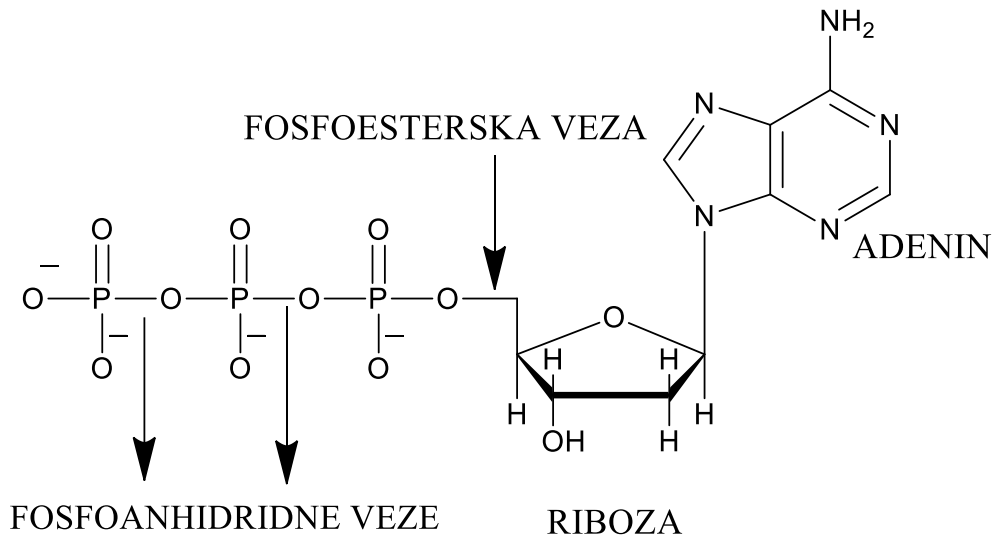
1. UVOD

1.1. Adenozin–fosfati

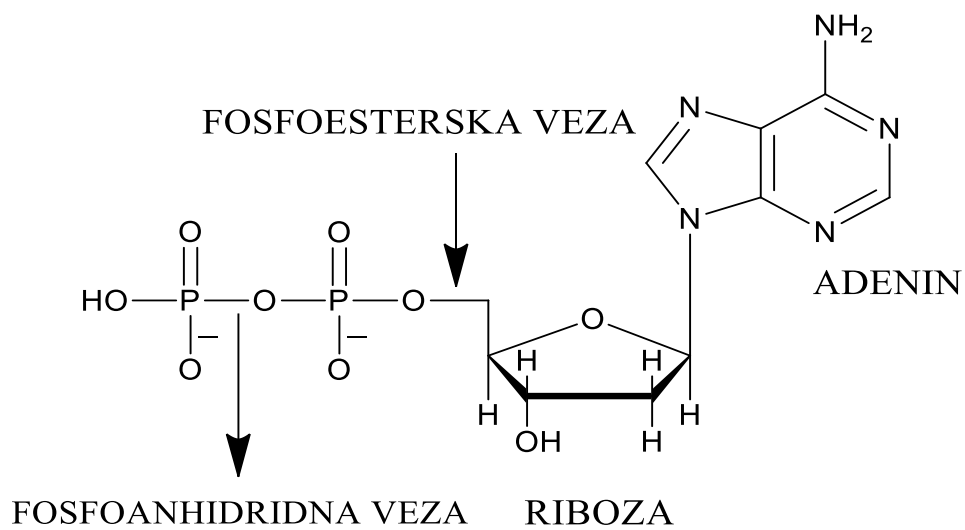
Adenozin-fosfati su skupina organskih molekula kojoj pripadaju adenozin-5'-trifosfat (ATP), adenozin-5'-difosfat (ADP) i adenozin-5'-monofosfat (AMP). Strukturno se opisuju kao nukleotidi koji se sastoje od dušikove baze adenina, šećera riboze i fosfata (Slika 1, 2 i 3). Nukleotidi se laički smatraju kratkoročnim prenositeljima energije gdje ATP služi kao neposredni izvor slobodne energije u stotinama različitih staničnih reakcija. Trifosfatna skupina ATP molekule sadrži dvije, energijom bogate fosfoanhidridne veze. Energija koja se oslobodi hidrolizom fosfatne skupine vezane na pentozni prsten riboze, predstavlja pogonsku energiju u reakcijama potrebnim za glavne metaboličke i fizičke funkcije organizma, kao što je, primjerice, stezanje mišića (Cooper i Hausman 2010). Isto tako, molekule ATP, ADP i AMP mogu prelaziti jedne u drugu. Prikazana je reakcija prijelaza adenozin-fosfata, koja je katalizirana enzimom adenilat-kinazom:



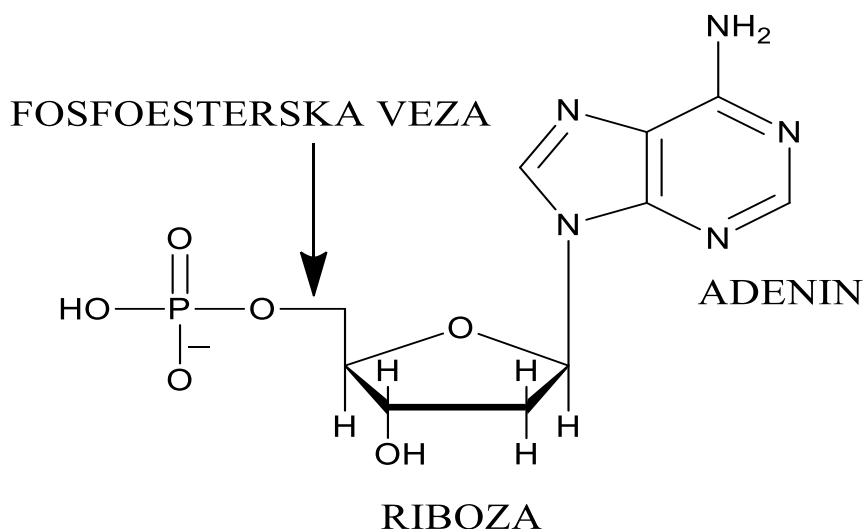
Ukoliko staničnom lizom molekula ATP izađe izvan stanice, takav se izvanstanični ATP u kratkom vremenu degradira, čime nastaju molekule ADP, AMP te konačno adenozin uz enzim 5'-nukleotidazu. Navedeni se metabolički procesi zbivaju u miokardu, kao i u eritrocitima (Yeung i sur. 2008).



Slika 1. Strukturna formula molekule adenzin-5'-trifosfat s označenim adeninom, ribozom, fosfoesterskom vezom između fosfatne skupine i riboze i fosfoanhidridnim vezama između fosfatnih skupina.



Slika 2. Strukturna formula molekule adenzin-5'-difosfat s označenim adeninom, ribozom, fosfoesterskom vezom između fosfatne skupine i riboze i fosfoanhidridnom vezom između dvije fosfatne skupine.



Slika 3. Strukturna formula molekule adenzin-5'-monofosfat s označenim adeninom, ribozom, fosfoesterskom vezom između fosfatne skupine i riboze.

1.1.1. Energetski naboj adenzin-fosfata

Energetski naboj adenzin-fosfata (engl. *adenylate energy charge*, AEC) prvi je predstavljen od strane Atkinsona 1968. godine kao linearna mjera količine metaboličke energije pohranjene u molekulama skupine adenin nukleotida te je definirana jednadžbom:

$$AEC = ([ATP] + 1/2 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP]) \quad (2)$$

Istraživanja u uvjetima *in vitro* su pokazala da promjene AEC mijenjaju katalitička svojstva enzima u kataboličkom kao i u biosintetskom putu. Vrijednost AEC je skalarni indeks koji se kreće od vrijednosti 0 do 1. Kada je sva koncentracija molekule ATP hidrolizirana u AMP, AEC vrijednost iznosi 0. Ujedno vrijedi i obrnuto, tj. kada je sva koncentracija AMP sintetizirana u ATP, AEC iznosi 1. U drugu ruku, istraživanja u uvjetima *in vivo* ukazuju na to da u normalnim stanicama AEC ima vrijednost u rasponu od 0,80 do 0,95. Razine energetskog naboja niže od 0,5 ukazuju na staničnu smrt koja može biti posljedica uzajamnog djelovanja apoptoze, nekroze i autofagije (Zhang i Vertes 2015). Kada su stanice podvrgnute metaboličkom stresu, tako da im se ograniče izvori energije poput izvora dušika ili fosfata, dolazi do male promjene u energetskom naboju, što ukazuje da je AEC strogo kontroliran parametar (Oakhill i sur. 2011).

Isto tako, energetski naboj adenzin-fosfata koristi se i kao pokazatelj ekoloških promjena, stoga se kvantitativno određivanje koncentracije adenzin-fosfata pokazalo od iznimne važnosti, osobito nakon novijih spoznaja kako ekološke katastrofe prijete ekosustavima (Redžović i sur. 2021).

1.2. Poremećaj koncentracije ATP u ljudskom organizmu

Metabolizam ATP u ljudskom je organizmu uključen u procese kao što su neurotransmisija, mehanosenzorička transdukcija, vazodilatacija te ima važnu ulogu u signalizaciji, razvoju i regeneraciji stanica (Burnstock 2006). U stanici, reakcije koje oslobađaju energiju povezane su sa sintezom ATP, a one koje zahtijevaju prinos energije podrazumijevaju hidrolizu ATP. Ukoliko dođe do ozljede organa, staničnom lizom molekula ATP može izaći iz stanice te posredovati kod nekoliko upalnih odgovora poput oslobađanja citokina, faktora nekroze tumora i interleukina 1 iz monocita i makrofaga (Virgilio i sur. 2003). Uloga molekule ATP i adenzina osobito su prepoznate u kardiovaskularnom sustavu. Molekula ATP inhibira agregaciju trombocita, štiti miokard, smanjuje nekrozu i ishemiju tkiva te na taj način održava homeostazu kardiovaskularnog sustava (Yeung i sur. 2008).

Detekcija i kvantifikacija adenzin-fosfata u krvi važna je za procjenu energetskog statusa eritrocita, kao i statusa degradacije fosforiliranih spojeva, koja se zbiva kod patoloških stanja poput kroničnog zatajenja bubrega, dijabetesa izazvanog streptozotocinom, karcinoma i kardiovaskularnih bolesti. Normalne koncentracije adenzin-fosfata u ljudskim crvenim krvnim stanicama (engl. *red blood cells*, RBC) prikazane su u Tablici 1 (Aragon-Martinez i sur. 2014).

Tablica 1. Normalne koncentracije adenzin-fosfata u ljudskim crvenim krvnim stanicama.

Adenzin-fosfat	Normalna razina u ljudskoj krvi (μM)
ATP	1,140 - 2,130
ADP	83,0 - 390
AMP	10,6 - 50

Obzirom na navedene uloge u tijelu i na direktnu povezanost adenozin-fosfata sa patološkim stanjima, određivanje njihove koncentracije je od iznimne važnosti. Taj podatak govori o biološkim procesima unutar stanice te daje uvid u kliničku sliku nekog organizma.

1.3. Hidroliza adenozin-5'-trifosfata

Energetiku biokemijskih reakcija najbolje opisuje Gibbsova slobodna energija (G). Promjena slobodne energije (ΔG) neke reakcije govori je li neka reakcija energetski povoljna. Ako promotrimo zamišljenu reakciju u kojoj molekula A prelazi u molekulu B:



gdje je $\Delta G < 0$, kemijska se reakcija odvija spontano i ide u opisanom smjeru. Ukoliko je $\Delta G > 0$, reakcija se odvija u suprotnom smjeru, tj. molekula B prelazi u molekulu A.

S obzirom na gore navedenu reakciju, promjena slobodne energije, ΔG izražava se:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \left[\frac{[B]}{[A]} \right] \quad (4)$$

gdje se ΔG° označava kao promjena slobodne energije pri standardnim uvjetima, R kao plinska konstanta, a T apsolutna temperatura u kelvinima. Za biokemijske reakcije promjena standardne slobodne energije izražava se kao $\Delta G^{\circ'}$, a odnosi se na promjenu standardne slobodne energije u vodenoj otopini kod pH 7, što približno odgovara uvjetima unutar stanice (Cooper i Hausman 2010).

Molekula ATP koristi ovaj mehanizam za pokretanje mnogih reakcija neophodnih u biološkim sustavima te djeluje kao spremište slobodne energije unutar stanice. Veze između fosfata u molekuli ATP smatraju se visokoenergetskim jer njihovu hidrolizu prati veliko oslobađanje slobodne energije. Hidroliza je kemijska reakcija u kojoj se, dodatkom molekule vode, cijepa kovalentna veza tako da se vodikov atom iz vode spaja s jednim produktom razgradnje, a hidroksilna skupina s drugim produktom razgradnje. Hidroliza molekule ATP do ADP i anorganskog fosfata (Pi) oslobađa energiju od $\Delta G^{\circ'} = -30$ kJ/mol (pri standardnim uvjetima), a u stanici gdje su koncentracije ATP više od ADP, vrijednost $\Delta G^{\circ'} = -50$ kJ/mol. Tako regenerirana molekula ADP dostupna je za neke nove reakcije u kojima je neophodna (Cooper i Hausman 2010).

Živi organizmi neprestano koriste ADP, biljke uz sunčevu energiju, a životinje uz energiju koja se oslobodi razgradnjom hranjivih tvari, pretvaraju ADP u ATP. Adenozin-5'-difosfat je

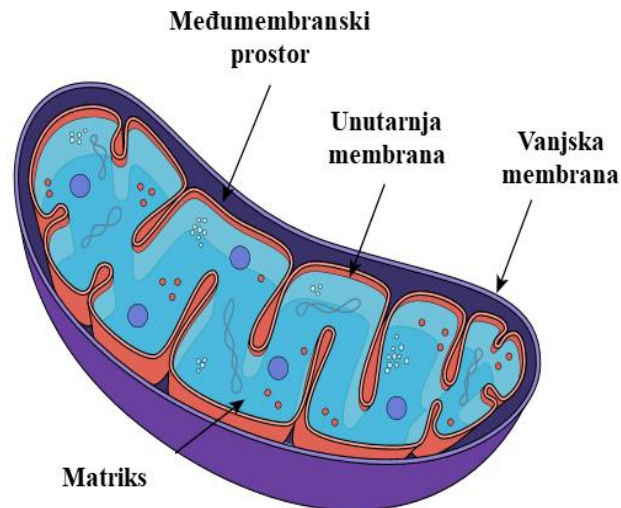
molekula koja je važna, osim za proizvodnju molekule ATP, za mnoge druge biološke funkcije. Molekula ADP sudjeluje u popravku staničnih oštećenja, daje energiju za primanje i slanje signala između neurona te ima veliku ulogu u zacjeljivanju rana gdje, prilikom ozljede, trombociti otpuštaju ADP kako bi privukli ostale trombocite koji zaustavljaju gubitak krvi (Dunn i Grider 2021).

Molekula ATP može hidrolizirati i do AMP i pirofosfata (PPi), prilikom čega se oslobađa približno jednaka energija kao pri hidrolizi molekule ATP do ADP. Međutim, PPi svojevrsno brzo hidrolizira uz promjenu energije sličnu kao pri hidrolizi ATP do AMP i Pi, te se iz tog razloga hidrolizom ATP do AMP i PPi oslobodi dvostruko više slobodne energije ($\Delta G^{\circ} = -61 \text{ kJ/mol}$) (Cooper i Hausman 2010).

Molekula AMP može postojati i u cikličkom obliku (ciklički adenzin-monofosfat, cAMP) tako da enzim adenilat ciklaza katalizira reakciju pretvorbe molekule ATP u cAMP. Molekula cAMP ima jako važnu ulogu u staničnoj signalizaciji gdje djeluje kao sekundarni glasnik. Zbog oslobađanja energije, hidroliza ATP važna je za pokretanje mnogih energetski zahtjevnih reakcija u stanici (Ravnskjaer i sur. 2015).

1.4. Sinteza adenzin-5'-trifosfata

Stanice zahtijevaju konstantnu opskrbu metaboličkom energijom potrebnu za obavljanje osnovnih unutar i izvanstaničnih funkcija koje živi organizam održavaju na životu. Energija u stanicama nastaje katalizom, odnosno razgradnjom organskih molekula, te se koristi u biosintetskim reakcijama makromolekula i drugih staničnih sastojaka neophodnih za održavanje svih bioloških procesa. Razgradnja ugljikohidrata, posebice glukoze, glavni je izvor stanične energije. Potpuna oksidativna razgradnja glukoze proizvodi veliku količinu slobodne energije. Kako bi ova energija bila upotrebljiva, glukoza se u stanici oksidira u nizu koraka koji su povezani sa sintezom ATP. Glikoliza je početna faza razgradnje glukoze i zajednička je svim stanicama. Reakcije glikolize odvijaju se u citosolu većine stanica bez utroška kisika, stoga anaerobnim organizmima može osigurati svu potrebnu metaboličku energiju. Aerobnim organizmima glikoliza je tek prva faza razgradnje glukoze. Druge dvije faze su ciklus limunske kiseline i oksidacijska fosforilacija koje se odvijaju u organelima eukariotskih stanica nazvanih mitohondriji. Mitohondriji imaju dva odjeljka: međumembranski prostor, koji se nalazi između vanjske i unutrašnje membrane te matriks, kojeg omeđuje unutrašnja membrana (Slika 4) (Cooper i Hausman 2010).



Slika 4. Prikaz strukture mitohondrija gdje plavo obojani prostor predstavlja matriks, ljubičasto vanjsku membranu, a crveno unutarnju membranu mitohondrija između kojih se nalazi međumembranski prostor.

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru:

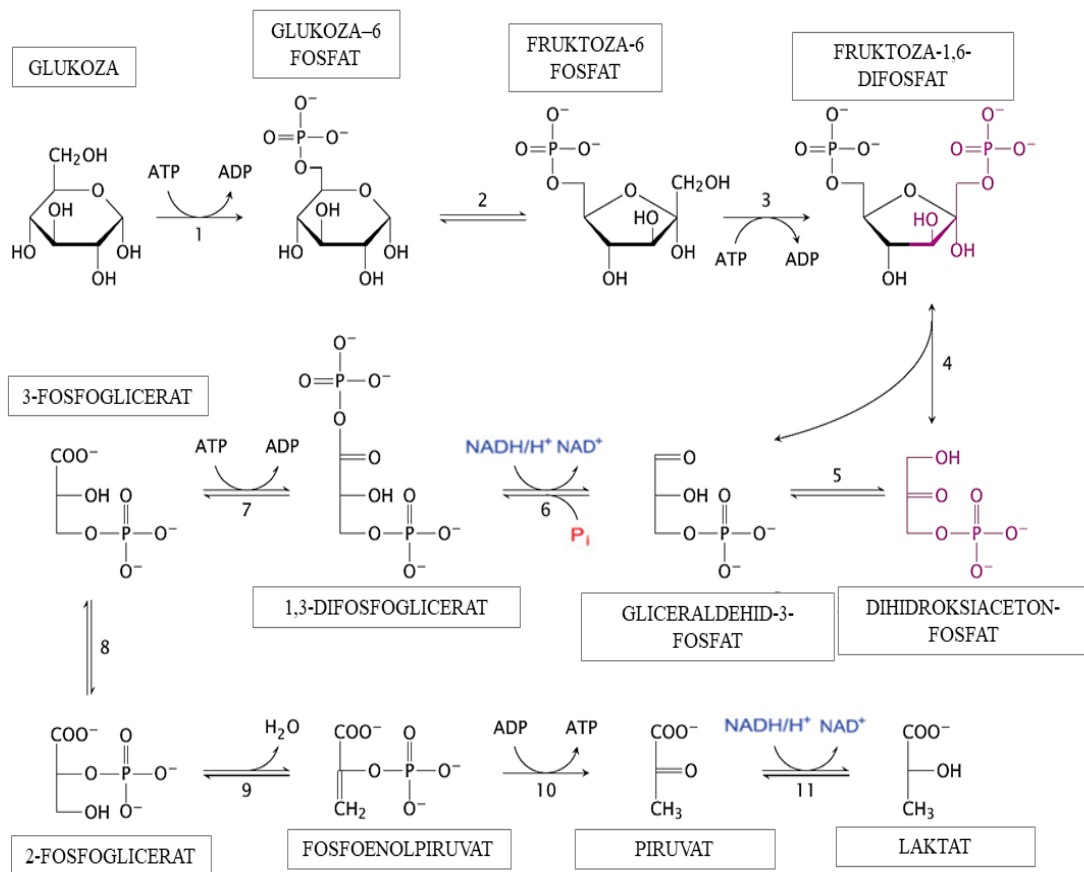
<https://www.nagwa.com/en/explainers/316181371908/>

Ciklus limunske kiseline odvija se u matriksu mitohondrija, dok se proces oksidacijske fosforilacije zbiva na kristama, koje su sastavni dijelovi unutrašnje membrane mitohondija. Uz proizvodnju molekule ATP, stvaraju se i druge aktivne molekule neophodne za transfer energije (Alberts i sur. 2003; Berg i sur. 2019).

1.4.1. Glikoliza

Glikoliza je slijed reakcija u kojima glukoza, molekula sa šest kisikovih atoma, prelazi u dvije molekule piruvata koje imaju svaka po tri ugljikova atoma. Kako bi se osigurala energija za sve reakcije u metaboličkom putu glikolize, neophodna je hidroliza dvije molekule ATP po molekuli glukoze. Na kraju jednog ciklusa glikolize nastanu dvije molekule ATP te dvije molekule nikotinamid adenin dinukleotid-fosfata (NADPH). Molekula NADPH sadrži dva visokoenergetska elektrona te omogućava reakcije redukcije pri biosintezi staničnih sastojaka (Alberts i sur. 2003).

Razlikujemo deset reakcija glikoliznog ciklusa koje su prikazane na Slici 5. U prvom se stupnju glukoza fosforilacijom, izomerizacijom i ponovnom fosforilacijom pretvara u fruktoza-1,6-difosfat. U tim se reakcijama za svaku molekulu glukoze utroše po dvije molekule ATP. U drugom stupnju, enzim aldolaza cijepa fruktoza-1,6-difosfat na dihidroksiaceton-fosfat i gliceraldehid-3-fosfat. Nakon toga, enzim triozafosfat-izomeraza katalizira izomerizaciju dihidroksiaceton-fosfata u gliceraldehid-3-fosfat. Tako se uzastopnim djelovanjem aldolaze i triozafosfat-izomeraze iz jedne molekule fruktoza-1,6-difosfata stvaraju dvije molekule gliceraldehid-3-fosfata. U opisanim stupnjevima glikolize iz jedne molekule glukoze, uz utrošak 2 molekule ATP, nastaju dvije molekule gliceraldehid-3-fosfata. Zatim se gliceraldehid-3-fosfat pretvara u 1,3-difosfoglicerat koji ima visok potencijal za prijenos fosfata te se upravo taj potencijal upotrebljava za stvaranje prve molekule ATP u glikolizi. Tu reakciju katalizira fosfoglicerat-kinaza koja katalizira prijenos fosfatne skupine sa acil-fosfata na molekuli 1,3-difosfoglicerat na ADP. Kao produkt ove reakcije, nastaje prva molekula ATP i 3-fosfoglicerat. U posljednja se tri koraka glikolize 3-fosfoglicerat prevodi u 2-fosfoglicerat, čijom se dehidracijom dobiva fosfoenolpiruvat. Prijenosom fosforilne skupine sa fosfoenolpiruvata na ADP nastaje piruvat i druga molekula ATP. Ovu reakciju katalizira enzim piruvat-kinaza.

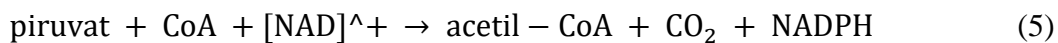


Slika 5. Shematski prikaz reakcija glikolize.

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru

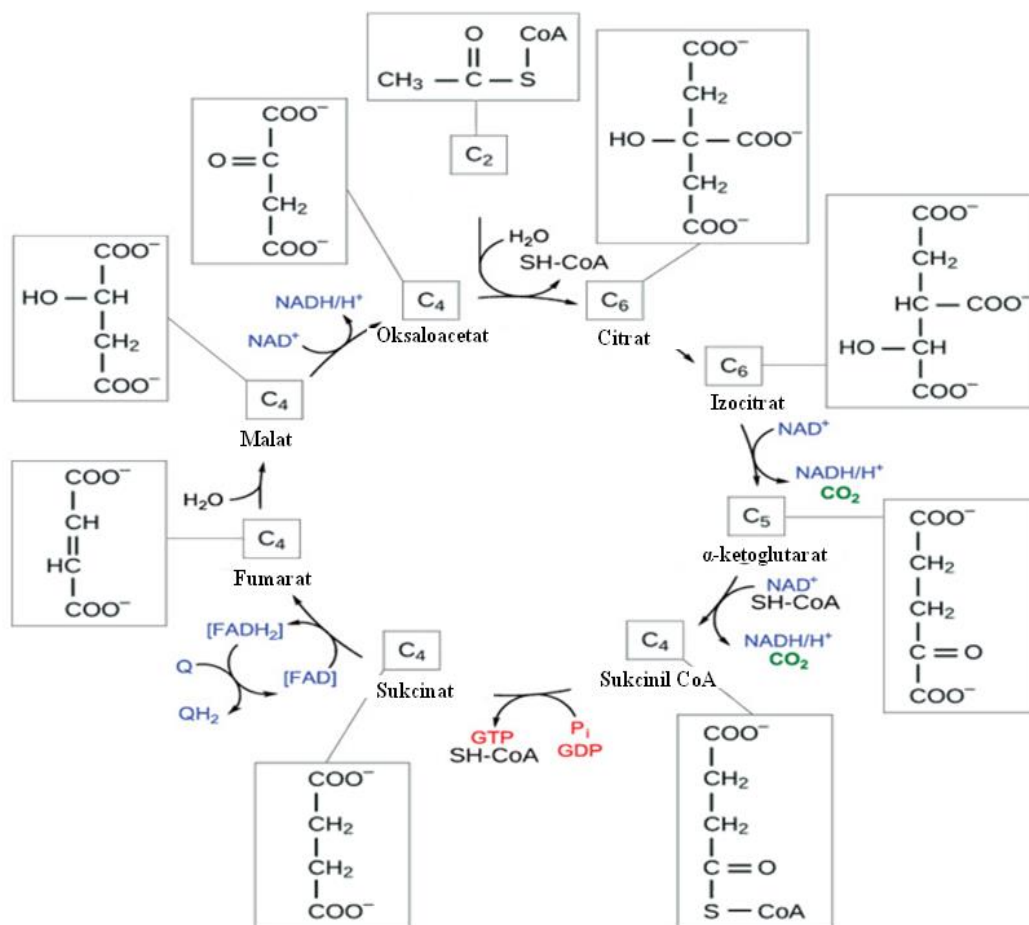
<http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/Glycolysis.html>

Piruvat koji nastaje procesom glikolize može prijeći iz citosola u mitohondrij gdje se u aerobnim uvjetima odvija reakcija oksidacijske dekarboksilacije piruvata te nastaje acetilkoenzim A. Upravo ova reakcija povezuje glikolizu i ciklus limunske kiseline, a opisana je kao:



1.4.2. *Ciklus limunske kiseline*

Ciklus limunske kiseline je konačni opći put oksidacije hranjivih tvari, a služi i kao izvor građevnih molekula neophodnih za biosintetske reakcije. U ovom se ciklusu acetyl-CoA potpuno oksidira do ugljikovog (IV) oksida (CO₂). Usporedbom s glikolizom koja se odvija aerobno i anaerobno, ciklus limunske kiseline strogo je aeroban proces. Većina molekula ulazi u ciklus limunske kiseline u obliku acetyl-CoA koji nastaje iz piruvata reakcijom oksidacijske dekarboksilacije (jednadžba 5). Ciklus započinje reakcijom aldolne kondenzacije tetrakarbonskog oksaloacetata i dikarbonskog acetila iz acetyl-CoA, uz enzim citrat-sintetazu (Slika 6). Prvo se stvara citril-CoA koji potom hidrolizira u citrat i CoA. Nastali citrat izomerizacijom prelazi u izocitrat što katalizira enzim akonitaza, a odvija se ponajprije reakcijom dehidracije nakon čega slijedi hidracija. Prva od četiri reakcije oksidacije i redukcije je oksidacija i dekarboksilacija izocitrata u α -ketoglutarat. Zatim dolazi do sljedeće oksidacijske fosforilacije α -ketoglutarata i stvaranja produkta sukcinil-CoA, što katalizira kompleks enzima α -ketoglutarat-dehidrogenaze. Veza sukcinil-tioester koenzima A bogata je energijom gdje vrijednost ΔG° hidrolize sukcinil-CoA iznosi -33 kJ/mol te je slična vrijednosti hidrolize molekule ATP ($\Delta G^{\circ} = -30,5$ kJ/mol). Cijepanjem tioesterske veze, uz djelovanje enzima sukcinil-CoA-sintetaze, fosforilira se gvanozin-difosfat (GDP) i kao produkti nastaju sukcinat i gvanozin-trifosfat (GTP). Fosforilna skupina molekule GTP lako prelazi na ADP čime nastaje ATP. Tu reakciju katalizira enzim nukleozid-difosfokinaza. Kao posljednji stupanj ciklusa limunske kiseline jesu reakcije u kojima se obnavlja oksaloacetat tako da se sukcinat prevodi u fumarat oksidacijom, fumarat hidracijom prelazi u malat i konačno se malat oksidira u oksaloacetat. U četiri oksidacijsko-redukcijske reakcije ciklusa limunske kiseline, elektroni se prenose na reducirane nosače elektrona; tri para elektrona prenose se na nikotinamid adenin-dinukleotid (NAD⁺), a jedan se par prenosi na flavin adenin-dinukleotid (FAD) (Cooper i Hausman 2010).



Slika 6. Shematski prikaz lančanih reakcija ciklusa limunske kiseline

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru:

<https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/the-citric-acid-krebs-cycle/>

Molekule NADPH i dihidroflavin adenin dinukleotid (FADH₂), koje su na prethodno opisan način stvorene u ciklusu limunske kiseline, oksidiraju u reakcijama oksidacijske fosforilacije, tako da prenose svoje elektrone na kisik i konačno stvaraju ATP.

1.4.3. Oksidacijska fosforilacija

Oksidacijska fosforilacija je proces u kojem razgradnjom ugljikohidrata, masti i aminokiselina dolazi do prijenosa elektrona s NADPH i FADH₂ na molekularni kisik (O₂) te nastaje ATP. Najveći dio energije nastaje razgradnjom ugljikohidrata i masti upravo procesom oksidacijske fosforilacije, stoga je to glavni izvor molekule ATP kod aerobnih organizama. Razgradnjom glukoze u procesu glikolize i ciklusu limunske kiseline nastaju ukupno četiri molekule ATP, a u procesu oksidacijske fosforilacije nastaju dodatne 32 do 34 molekule ATP. Elektronski nosači NADPH i FADH₂ energetske su bogate molekule obzirom da sadrže par elektrona s visokim potencijalom prijenosa na druge molekule. Prijenosom elektrona se oslobađa velika količina energije koja se zatim upotrebljava za sintezu ATP.

Pri oksidaciji hranjivih tvari, glavni akceptor elektrona je NAD⁺. Nikotinamidski prsten molekule NAD⁺ prima slobodan vodikov ion i dva elektrona te nastaje njegov reducirani oblik (NADPH). Drugi glavni prijenosnik elektrona u oksidaciji je molekula FAD, koja je također akceptor dva elektrona, no za razliku od NAD⁺ koji prima jedan, prima dva vodikova atoma i konačno nastaje FADH₂ (Berg i sur. 2019).

Molekule NADPH i FADH₂ prenose elektrone, koji su nastali u prethodno opisanim reakcijama u procesu glikolize i ciklusa limunske kiseline, kroz seriju nosača na transportnom lancu elektrona (Slika 7). Transportni lanac elektrona je smješten na unutrašnjoj membrani mitohondrija te ga sačinjavaju elektron akceptorske i donorske molekule organizirane u četiri proteinska kompleksa. Na taj se način otpušta energija koja se potom koristi za prijenos protona (iona H⁺) iz unutarnjeg odjeljka mitohondrija u vanjski. Oksidacijska fosforilacija mora se odvijati na membranama mitohondrija jer se nastali gradijent protona između dva stanična prostora koristi kao pokretačka sila za sintezu molekule ATP iz ADP.

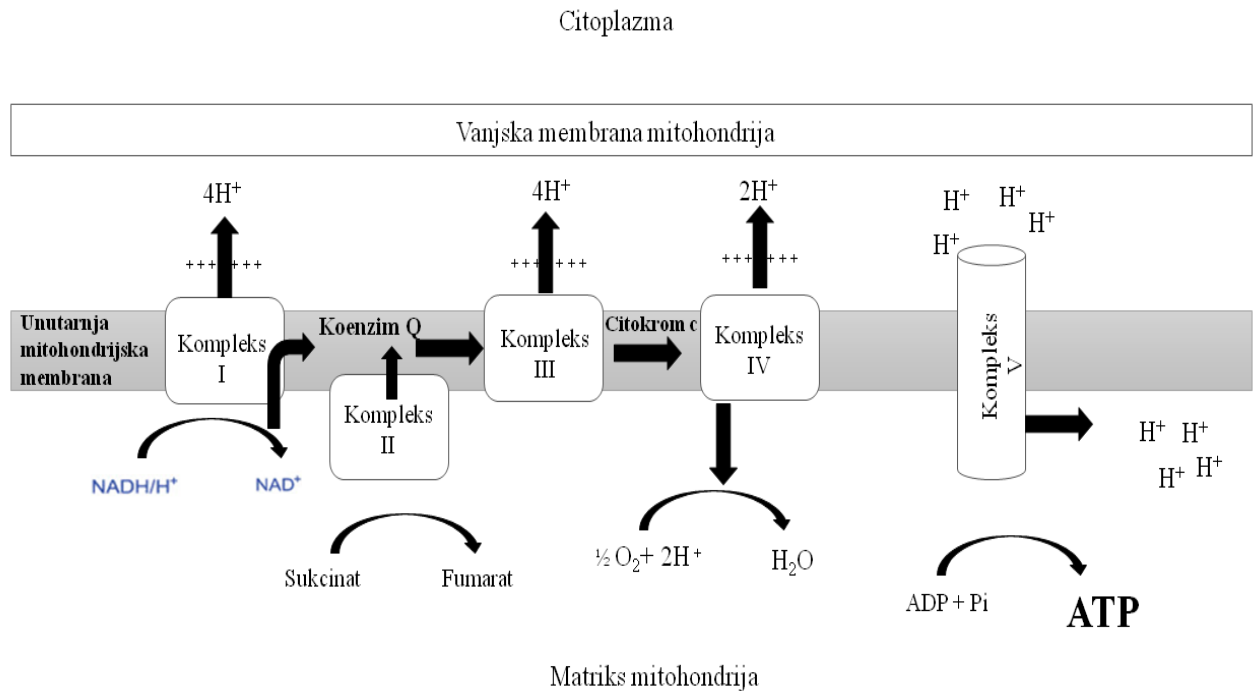
Proces prijenosa elektrona započinje kada se hidridni ion (H⁻ ion) ukloni s NADH (s ciljem regeneracije NAD⁺), pri čemu nastaju protona i dva elektrona:



Elektroni sa NADH ulaze u transportni lanac elektrona preko kompleksa I, tako da se prenose na koenzim Q. Koenzim Q je lipidna molekula koja prenosi elektrone kroz membranu sa kompleksa I na kompleks III koji se sastoji od deset polipeptida.

Dva elektrona, koja su nastala od molekule NADH, prenose se na prvi od petnaest različitih nosača elektrona u respiratornom lancu. Elektroni započinju svoj prijenos sa jako visokom

razinom energije, koja se postupno gubi kako se oni prenose dalje u lancu. Kompleks II je sukcinat dehidrogenaza koja prenosi elektrone sa sukcinata na koenzim Q i osigurava dotok elektrona s FADH_2 na respiracijski lanac.



Slika 7. Shematski prikaz reakcija oksidacijske fosforilacije.

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru

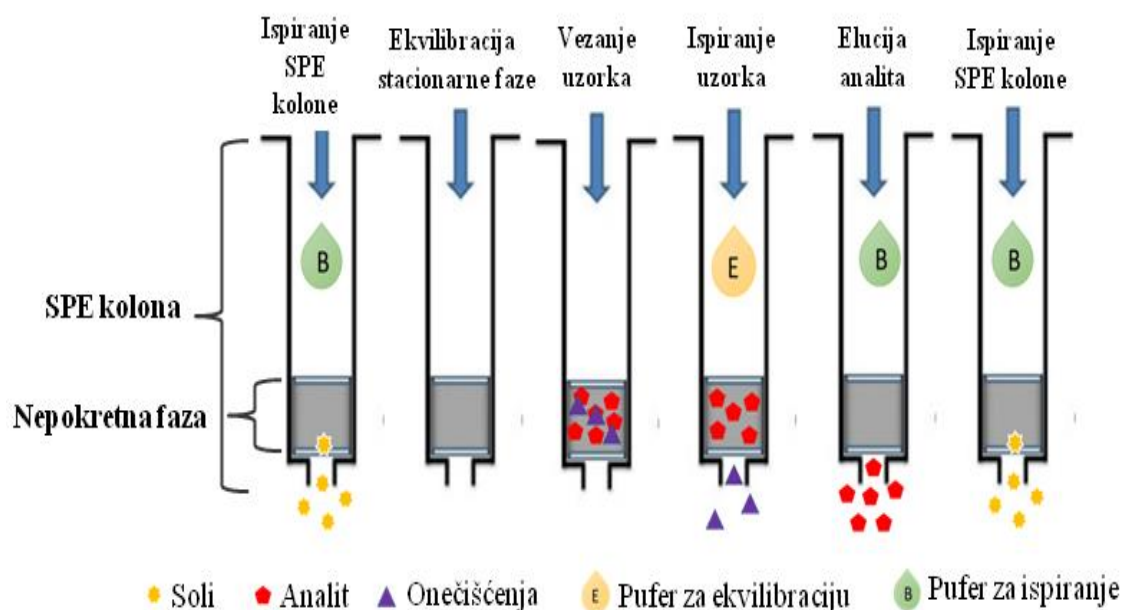
<https://microbenotes.com/oxidative-phosphorylation/>

Kompleks III se sastoji od proteina citokrom c oksidoreduktaze, koja prenosi elektrone s koenzima Q na citokrom c. Na kraju ovog lanca, elektroni su dosegli najnižu energetska razinu. U kompleksu IV, citokrom c oksidaza prenosi po jedan elektron na krajnji akceptor elektrona što je molekularni kisik. Kompleksi I, III i IV su protonske pumpe te osiguravaju dovoljno energije za sintezu ATP. Kompleks II nije protonska pumpa te za razliku od navedenih kompleksa ne osigurava slobodnu energiju potrebnu za sintezu ATP (Berg i sur. 2019; Cardol i sur. 2009).

1.5. Mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *micro-solid phase extraction*, μ -SPE)

Tijekom analize bioloških uzoraka, nerijetko je neophodno pročišćavanje uzorka prije njegove kvantitativne i kvalitativne analize. Konvencionalna metoda pročišćavanja uzorka jest ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE), koja omogućuje ukoncentriravanje i pročišćavanje jednog ili više analita od interesa. Tim se postupkom uklanjaju neželjeni interferirajući spojevi i izoliraju željeni analiti iz složenih bioloških uzoraka, poput krvi. Najčešće korišteni SPE uređaji su u obliku cilindričnih kolona koje su ispunjene nepokretnom fazom, premda su dostupne i membrane impregnirane nepokretnom fazom (Naing i sur. 2019). Najveći nedostatak pročišćavanja uzorka metodom SPE je činjenica da metoda zahtijeva velike količine uzorka, što često predstavlja izazov pri analizi bioloških analita. Iz tog se razloga koristi mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *micro-solid phase extraction*, μ -SPE), u kojoj se upotrebljavaju znatno manji volumeni tekućeg uzorka. Želja za razvijanjem minijaturnih procedura javlja se iz težnje da se eliminiraju nedostaci konvencionalnih metoda poput utroška velikih količina organskih otapala i prevelikog broja operativnih koraka. Metoda se zasniva na prolasku otopljenog uzorka kroz μ -SPE kolonu ispunjenu čvrstim materijalom za razdvajanje, tzv. nepokretnom fazom.

Shematski prikaz SPE protokola prikazan je na Slici 8. Pročišćavanje uzorka metodom μ -SPE započinje ispiranjem μ -SPE kolone puferom za ispiranje, nakon čega slijedi ekvilibracija nepokretne faze ekvilibracijskim puferom. Korak ekvilibracije omogućuje kondicioniranje nepokretne faze, čime se postiže bolje vezanje analita od interesa u sljedećem koraku ove metode. Nakon toga se na kolonu dodaje uzorak gdje analit, koji stupa u interakciju s nepokretnom fazom, ostaje zadržan na μ -SPE koloni. Interakcije između nepokretne faze, korištene u metodi SPE, ali i kromatografskim metodama, i analita mogu nastati djelovanjem: adsorpcije, ionske izmjene, razdiobe među fazama ili veličine analita koji se razdvajaju. Nasuprot toga, prisutni se analiti u uzorku, koji ne stvaraju interakcije sa čvrstom fazom, ispiru sa kolone ekvilibracijskim puferom u idućem koraku. Na kraju se analiti vezani na nepokretnoj fazi eluiraju elucijskim puferom i dalje obrađuju ili analiziraju (Hennion 1999).



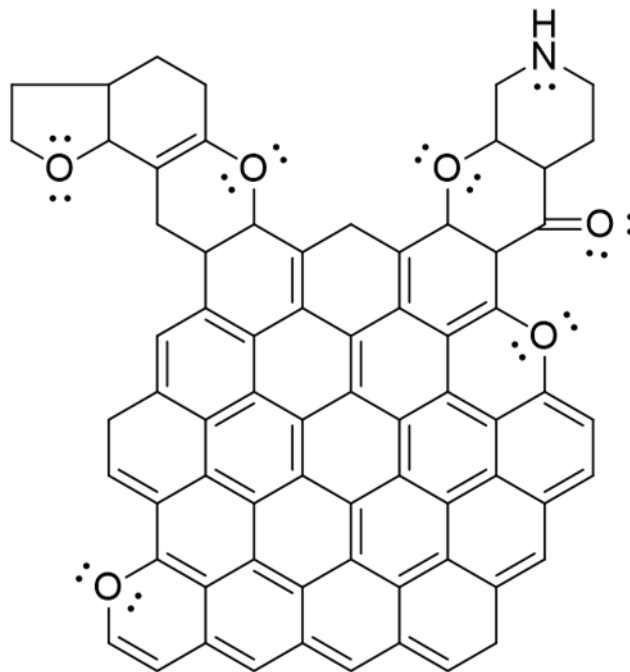
Slika 8. Shematski prikaz SPE protokola. Protokol započinje ispiranjem μ -SPE kolone puferom za ispiranje, zatim se nepokretna faza kondicionira ekvilibracijskim puferom, nakon čega slijedi vezanje uzorka koji se želi pročitati. Na kraju se analiti od interesa ispiru s kolone elucijskim puferom.

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru Lucci i sur. (2012)

1.5.1. Aktivni ugljen kao nepokretna faza za selektivno vezanje adenozin-fosfata

Zbog brzih promjena u metabolizmu stanica, koji su posljedice enzimatskih reakcija, kvantitativna analiza nukleotida u uzorku zahtijeva pažljivu pripremu uzorka (Magdenoska i sur. 2013). Velika je raznolikost krutina koje se koriste kao nepokretne faze u metodi μ -SPE. Nepokretne faze koje su danas dostupne na tržištu pokrivaju gotovo sve potencijalne interakcije s analitima (Chisvert i sur. 2019). Kromatografske kolone punjene aktivnim ugljenom kao nepokretnom fazom koriste se prilikom pročišćavanja nukleotida i šećera (Pabst i sur. 2010). Aktivni ugljen stvara čvrste interakcije s analitima zahvaljujući velikom broju π -elektrona u njegovoj strukturi (Slika 9). Adsorpcija nukleotida na aktivni ugljen temelji se na interakciji elektrona iz aromatskog prstena purina ili pirimidina sa slobodnim π -elektronima aktivnog ugljena. Upravo je ta interakcija temelj pročišćavanja adenozin-trifosfata μ -SPE metodom (Magdenoska i sur. 2013). Aktivni je ugljen često korišteno punilo μ -SPE kolona jer ga, osim mogućnosti ostvarivanja interakcija sa molekulama koje imaju aromatske strukture,

odlikuju i niska cijena, dobra termalna stabilnost i visoka mehanička snaga (Naing i sur. 2019).

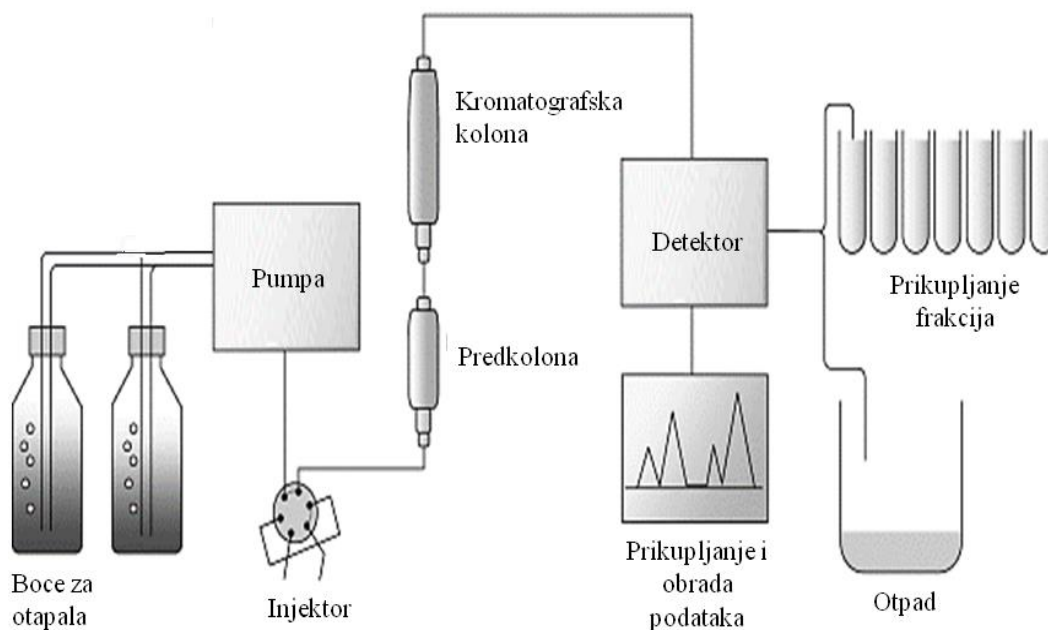


Slika 9. Strukturni prikaz aktivnog ugljena.

1.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je tehnika u kojoj se sastojci smjese odjeljuju ovisno o duljini zadržavanja na koloni nepokretne faze. Kromatografska analiza služi za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka prisutnih u složenim smjesama (Skoog i sur. 2014)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je višenamjenska metoda koja se koristi za separaciju i analizu širokog raspona molekula od polimera, malih molekula farmaceutika i njihovih metabolita te peptida i proteina. Ova se tehnika koristi u mnogim srodnim područjima molekularne biologije, kao što su analitička i preparativna kemija. Na Slici 10 prikazan je shematski prikaz sustava HPLC s označenim komponentama.



Slika 10. Shematski prikaz komponenti tipičnog sustava HPLC.

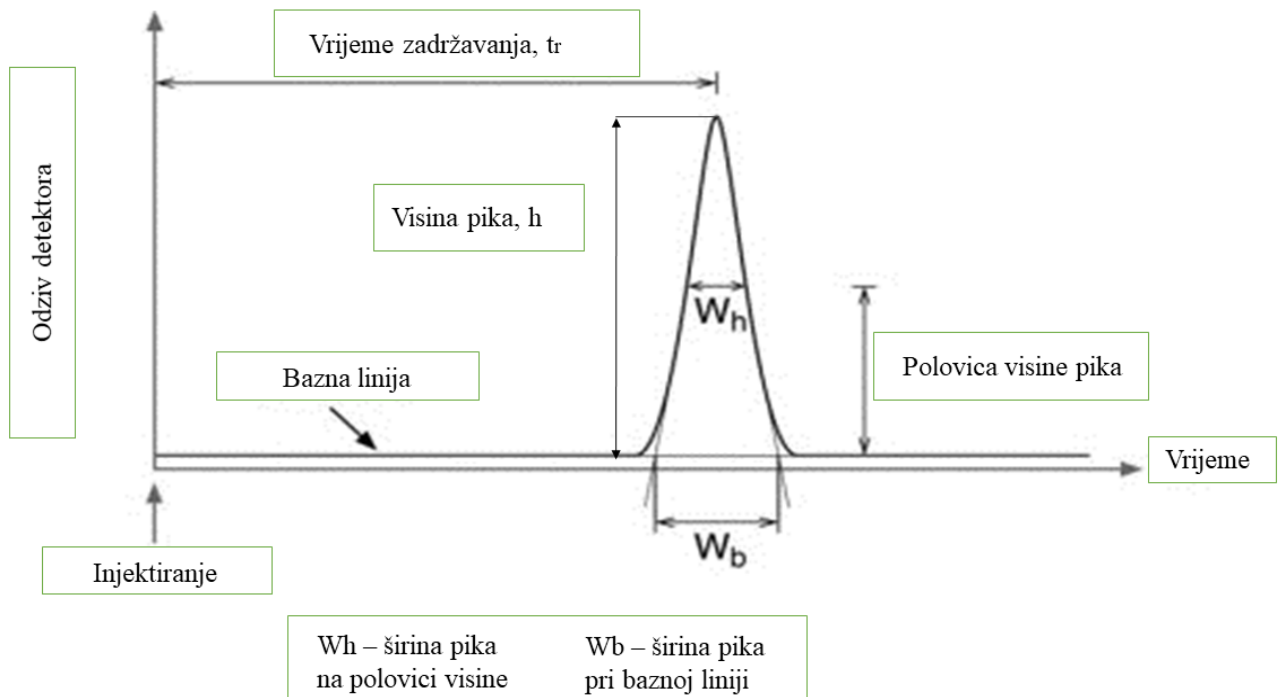
Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru

<https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>

Metoda kromatografskog razdvajanja zasniva se na injektiranju otopljenog uzorka od interesa u protok otapala koji se naziva pokretna faza. Pokretna faza prolazi kroz kromatografsku kolonu ispunjenu nepokretnom fazom. Razdvajanje se postiže interakcijama između otopljenih molekula analita i nepokretne faze. Tijekom prolaska pokretne faze kroz kolonu s vezanim molekulama analita, afinitet vezanja analita za nepokretnu fazu slabi pod utjecajem protoka pokretne faze. Tada se analit otpušta s nepokretne u pokretnu fazu te se postupak ponavlja kada se molekule analita ponovno vežu za nepokretnu fazu. Molekula s najvećim afinitetom za nepokretnu fazu više će se puta vezati i otpustiti s nepokretne faze te će time biti i dulje vezana za nju.

Kada se na izlaz kolone postavi detektor, čiji odziv ovisi o koncentraciji sastojka u uzorku, kao rezultat nastaje niz simetričnih elucijskih krivulja (pikova). Takav se prikaz naziva kromatogram (Slika 11) i koristan je za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Položaj kromatografskog pika o vremenskoj osi može poslužiti za identifikaciju sastojaka, a iz površine ispod pika može se izračunati količina svakog odijeljenog sastojka (Skoog i sur.

2014). Vremenska os pika predstavlja vrijeme od nanošenja analita na kromatografsku kolonu do njegovog maksimalnog odziva na detektoru i definira se kao ukupno vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme (t_r) (McMaster 2007; Weiss 2016).



Slika 11. Shematski prikaz kromatograma s opisanim parametrima koji opisuju kromatogram te tipični kromatografski pik.

Ilustracija preuzeta i prilagođena prema literaturnom izvoru Stauffer i sur. (2008)

1.6.1. Kvalitativna analiza

Kvalitativna analiza podrazumijeva asignaciju pojedinog kromatografskog pika prilikom analize željenog uzorka metodom HPLC. Najvažniji parametar kvalitativne kromatografske analize jest vrijeme zadržavanja. S obzirom na to da i male strukturalne promjene između dva analita mogu rezultirati različitim vremenom zadržavanja na kromatografskoj koloni, moguće je usporedbom vremena zadržavanja vanjskog standarda identificirati pikove nepoznate smjese analiza analiziranog uzorka. Neophodno je naglasiti da kromatogram ne mora nužno potvrditi prisutnost nekog sastojka, ali zasigurno potvrđuje njegovu odsutnost (Skoog i sur. 2014).

1.6.2. Kvantitativna analiza

Kvantitativna kromatografska analiza temelji se na usporedbi visine ili površine analiziranog pika s visinom ili površinom pika standardne otopine. Ukoliko se kvantitativna analiza temelji na određivanju visine pika, mjeri se duljina okomice spuštene od lokalnog maksimuma promatranog pika do bazne linije tog pika (h) (Slika 11). Pri analizi je neophodno nadzirati kromatografske parametre poput temperature kolone, opterećenja kolone i brzine protoka pokretne faze jer male promjene navedenih parametara mogu znatno utjecati na izgled kromatografskog pika. U odnosu na opisanu vrstu kvantitativne analize temeljene na visini pika, analiza koja se temelji na površini pika ne ovisi o utjecajima širenja pika te je površina prikladniji parametar od visine pika. Iako je visinu pika jednostavnije i točnije izmjeriti od njegove površine, suvremeni kromatografski uređaji sadrže elektroničke integratore koji automatizirano određuju površne pikova (Skoog i sur. 2014).

1.6.3. Tekućinska kromatografija obrnutih faza

Razlikujemo nekoliko principa razdvajanja u tekućinskoj kromatografiji, od kojih su najčešće kromatografija normalne faze, kromatografija obrnutih faza, kromatografija ionske izmjene, afinitetna kromatografija i kromatografija isključivanjem. Vrsta tekućinske kromatografije odabire se ovisno o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita koji se istražuje (Richard 2000).

Tekućinska kromatografija obrnutih faza (engl. *reverse-phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) je najčešće upotrebljavana vrsta HPLC metode razdvajanja. U RP-HPLC metodi, čvrsti materijali su alkilni lanci koji su kovalentno vezani na nepokretnu fazu. Najčešće korištene nepokretne faze su hidrofobni oktilsilicijev dioksid (C8), oktadecilsilicijev dioksid (C18) i butilsilicijev dioksid (C4), koji imaju afinitet za stupanje u interakciju s hidrofilnim molekulama analita. U kromatografiji obrnutih faza kao pokretne faze koriste se polarna otapala, koja su uglavnom smjese polarnih organskih molekula i vode, u kojima je neophodno kontrolirati pH završne otopine (McMaster 2007).

1.6.4. Validacija metode HPLC

Validacija metode HPLC provodi se u svrhu provjeravanja pouzdanosti novorazvijene metode. Prilikom validacije analitičke metode definiraju se parametri poput linearnosti, granica detekcije i kvantifikacije, preciznosti (koja se mjeri unutar istoga i između različitih dana), ponovljivosti i selektivnosti. Navedeni parametri se po potrebi mogu proširiti i na ostale kritične elemente validnosti metode.

Linearnost metode određuje se analizom standardne otopine poznate koncentracije te se kreira baždarni pravac ovisnosti površine pika o odgovarajućoj koncentraciji standarda. Iz baždarnog pravca rade se statistički izračuni kao npr. linearna regresija, u kojoj se u obzir uzimaju parametri poput nagiba pravca, odsjeka na osi y i koeficijenta korelacije (r).

Preciznost je stupanj podudarnosti između rezultata dobivenih uzastopnom analizom istog uzorka. Računa se kao postotak relativne standardne devijacije (% RSD) rezultata ispitivanja prema formuli:

$$\text{RSD} = \left(\frac{\sigma}{\bar{x}} \right) * 100 \quad (8)$$

gdje je σ standardna devijacija, a \bar{x} aritmetička sredina. Što je postotak relativne standardne devijacije manji, preciznost je bolja.

Selektivnost je svojstvo metode da se analit koji se mjeri razlikuje od drugih specija unutar istog uzorka. U metodi HPLC, selektivnost se određuje faktorom separacije susjednih pikova, koji podrazumijeva udaljenost između njihovih vrhova (Redžović i sur. 2021).

1.6.5. Metoda standardnog dodatka

Metoda standardnog dodatka je osmišljena kako bi se izbjegla pogreška koja nastaje zbog utjecaja otapala uzorka na odziv detektora, odnosno kromatografski signal. Tim se načinom omogućuju nepristrani rezultati kada otapalo ispitivane otopine nepredvidivo varira od testa do testa i time utječe na osjetljivost analize. Kako bi se izračunalo iskorištenje, u biološki se uzorak doda poznata koncentracija otopine za nacjepljivanje (engl. *spike*) i iz kromatograma odredi površina pika analita te odredi njegova koncentracija iz jednadžbe baždarnog pravca. Metoda podrazumijeva tri koraka:

- mjerenje signala analita otapala,
- dodavanje poznate koncentracija analita u mjereno otapalo te se izmjeri novi signal,

- računanje koncentracije analita u uzorku prema formuli za iskorištenje:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{[(\text{koncentracija analita sa } \textit{spike} \text{ otopinom} - \text{koncentracija analita})]}{\text{koncentracija } \textit{spike} \text{ otopine}} \times 100 \quad (7)$$

Najprecizniji se rezultati dobiju kada je dodana koncentracija analita barem četiri puta veća od koncentracije analita u uzorku (Ellison i Thompson, 2008).

Izračunato iskorištenje metodom standardnog dodatka ukazuje na postotak detektirane količine analita u odnosu na stvarnu količinu analita prisutnom u uzorku. Točnije, prilikom pripreme uzorka nerijetko dolazi do degradacije promatranog analita. Dodavanjem poznate količine analita (otopine za nacjepljivanje) u uzorak i određivanjem iskorištenja, može se odrediti postotak njegove degradacije. Izračunata vrijednost iskorištenja se uzima u obzir za kvantitativno određivanje ekstrahiranog analita iz uzorka kako je opisano u primjeru:

- primjer: ako je dobivena vrijednost iskorištenja 90%, zaključeno je kako je prilikom pripreme uzorka degradiralo 10% promatranog analita te se stoga izmjerena količina analita mora uvećati za 10% (Kościelniak i Wietecha, 2003).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Molekule ATP, ADP i AMP neophodne su za većinu važnih metaboličkih procesa u ljudskom organizmu. Određivanje njihove koncentracije u ljudskoj krvi ima veliki značaj u dijagnostici mnogih metaboličkih poremećaja, patoloških stanja te općenito u praćenju energetske stanja organizma. Iz tog je razloga kao cilj ovoga istraživanja postavljen razvoj jednostavne, brze, precizne i široko primjenjive metode ekstrakcije adenzin-fosfata iz najmanjeg mogućeg volumena kapilarne krvi. Biološki uzorci, poput krvi, zahtijevaju dodatan korak pročišćavanja od prisutnih onečišćenja lipidnog, anorganskog, proteinskog i organskog porijekla. Da bi ostvarili navedeni cilj, bilo je potrebno pronaći adekvatnu nepokretnu fazu metode μ -SPE, pogodnu za višekratnu upotrebu, široko primjenjivu, dostupnu i jednostavnu za primjenu daljnje metode HPLC, koja selektivno i s najvećim kapacitetom veže adenzin-fosfate. Dodatni uvjet je da nepokretna μ -SPE faza ne veže analitički interferirajuće specije iz uzorka krvi. U konačnici, djelotvornost i validnost metode ekstrakcije adenzin-fosfata iz krvi je provjerena i potvrđena tekućinskom kromatografijom.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorak

U svrhu izrade ovoga rada, analizirala sam uzorke kapilarne krvi zdrave osobe u dobi od 24 godine.

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene za pripremu uzorka:

- ultra čista (milli-Q) voda (18 MΩ cm Merck Milipore, Burlington, MA, SAD),
- perklorna kiselina, HClO₄ (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA),
- natrijev karbonat, Na₂CO₃ (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- natrijev hidroksid, NaOH (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Kemikalije korištene za pripremu standarda:

- adenzin-5'-trifosfat, ATP (≥ 98% Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA),
- adenzin-5'-difosfat, ADP (≥ 98% Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA),
- adenzin-5'-monofosfat, AMP (≥ 98% Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Kemikalije korištene za pripremu mobilne faze:

- kalijev hidrogenfosfat, K₂HPO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- klijev dihidrogenfosfat, KH₂PO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- metanol, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Kemikalije korištene za pripremu otopina za μ-SPE metodu:

- acetonitril (≥ 99,9% Merck Milipore, Burlington, MA, SAD),
- mravlja kiselina (> 98% Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- amonijev hidroksid, NH₄OH (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA),
- aktivni ugljen kao nepokretna faza (Harvard Apparatus, Holliston MA, USA).

3.1.3. Tehnička pomagala, instrumentacija i pribor

Iz potrebe određivanja koncentracija adenozin-fosfata iz ljudske krvi, korišten je slijedeći pribor, pomagala i instrumentacija:

- kromatografska kolona reverzne faze Hypersil ODS column C18 (125 mm × 4 mm, 5 μm veličine čestica) s pretkolonom Hypersil ODS (10 × 4 mm, 5 μm),
- sustav HPLC, Agilent serije 1100 (St. Clara, CA, USA),
- centrifuga 5415 R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- sušionik (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- automatizirana platforma za rukovanje tekućim uzorcima AssayMAP Bravo Protein Sample Prep Platform, Agilent (St. Clara, CA, USA),
- uređaj za mjerenje pH (Mettler Toledo, Švicarska),
- mikrotubice za centrifugu 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- filter Microcon-10 kDa, 0,5 mL s Ultracel-10 membranom (Merck Milipore, Burlington, MA, SAD),
- HPLC vijale,
- μ-SPE kolone

3.2. Metode

3.2.1. Priprava uzorka

Priprava uzorka prilagođena je prema literaturnom izvoru Coolen i sur. (2008). Odmah nakon uzorkovanja, 50 μL kapilarne krvi pomiješala sam s jednakim volumenom hladne 8% perklorne kiseline (PCA) u mikrotubici za centrifugu, nakon čega sam sve daljnje korake izvodila držeći uzorak u mikrotubici na ledu. Nakon dodatka PCA, uzorku sam odijelila talog pomoću uređaja za centrifugiranje brzinom od 12 000 rpm, u vremenu od 10 min i pri temperaturi od 4 °C. Zatim sam izdvojila 65 μL supernatanta i dodala 4 μL otopine 2 M natrijevog karbonata u 6 M natrijevom hidroksidu. Odmah nakon dodatka puferne otopine, ponovila sam postupak centrifugiranja pri istim uvjetima kao u prethodnom koraku. Nakon centrifugiranja, izdvojeni sam supernatant pročistila pomoću filtera Microcon-10 kDa. Nakon toga, 40 μL filtrirane otopine obradila sam za daljnju analizu metodom HPLC.

3.2.1.1. Priprava standardnih otopina

Za kreiranje baždarnih krivulje pripremila sam standardne otopine 8 mM ATP, 4 mM ADP i 4 mM AMP otapanjem potrebne mase u 50 mM fosfatnom puferu, pH 6. Pomiješala sam 200 μ L svake od tri otopine standarda adenozin-fosfata te dodala 200 μ L 50 mM fosfatnog pufera, čime je konačni volumen iznosio 800 μ L. Dodala sam jednaki volumen 8% PCA i tretirala standarde poput uzorka sa svim potrebnim koracima opisanim u poglavlju 3.2.1. *Priprava uzorka*. Nakon posljednjeg koraka, koncentracija ATP u otopini iznosila je 2000 μ M, a koncentracija ADP i AMP 1000 μ M. Ovako pripremljene otopine koristila sam za daljnja razrjeđenja do konačnih koncentracija: 1200 μ M, 600 μ M, 240 μ M i 40 μ M za ATP te 600 μ M, 300 μ M, 120 μ M, 20 μ M za ADP i AMP. Nakon provedene analize navedenih standardnih otopina metodom HPLC, kreirala sam baždarnu krivulju u ovisnosti površine pika i koncentracije. Pomoću jednadžbe pravca u konačnici sam određivala koncentracije adenozin-fosfata u uzorku ljudske krvi.

3.2.1.2. Priprava otopine za nacjepljivanje

U svrhu točnog određivanja koncentracije željenih analita u krvi, koristila sam metodu standardnog dodatka. Kako bih dodala poznatu koncentraciju standardnih otopina u uzorak krvi (engl. *spiking*), pripremila sam standardne otopine 4 mM ATP, 4 mM ADP i 4 mM AMP u 8% PCA otopini. Standarde sam pomiješala u jednakim volumenima te razrijedila s 8% PCA, tako da konačna koncentracija svakog standarda u otopini bude 200 μ M. Pripremljenu sam otopinu koristila kao otopinu za nacjepljivanje u metodi standardnog dodatka.

3.2.1.3. Postupak metode standardnog dodatka

Isti uzorak krvi odijelila sam u dva jednaka dijela u volumenu od 50 μ L. U prvi sam dio uzorka krvi dodala 50 μ L 8% PCA te isti obradila po opisanom postupku za ekstrakciju adenozin-fosfata u poglavlju 3.2.1. *Priprava uzorka*. Nakon ekstrakcije i pročišćavanja uzorka pomoću filtera, uzorak sam odmah podvrgnula analizi metodom HPLC. U drugi dio uzorka krvi dodala sam jednak volumen otopine za nacjepljivanje, točnije 50 μ L 8% PCA s otopljenim standardima adenozin-fosfata u koncentraciji od 200 μ M. Daljni postupak obrade i analize drugog dijela bio je identičan kao i kod pripreme prvog dijela uzorka krvi. Pomoću dobivenih rezultata nakon analize metodom HPLC, izračunala sam iskorištenje korištene metode jednadžbom 7.

3.2.2. Tekućinska kromatografija obrnutih faza

Ekstrahirane adenzin-fosfate iz uzorka kapilarne krvi analizirala sam tekućinskom kromatografijom obrnutih faza tako da sam 40 μL rezultirane otopine nakon filtracije primjenom filtera Microcon-10 kDa pomiješala s 160 μL 50 mM fosfatnog pufera, pH 6. Korištenu metodu RP-HPLC sam razvila i prilagodila po literaturnom izvoru Coolen i sur. (2008).

3.2.2.1. Kromatografski parametri

Adenzin-fosfate iz otopina standarda, kao i iz uzoraka krvi međusobno sam odijeljelila na HPLC sustavu Agilent 1100 s brzinom protoka 0,6 mL/min, koristeći kromatografsku kolonu Hypersil ODS C18 (125 mm \times 4 mm, 5 μm veličine čestica) s pretkolonom Hypersil ODS (10 \times 4 mm, 5 μm). Temperatura kolone bila je održavana na 20 °C. Ukupna analiza trajala je 30 minuta uz gradijentnu eluciju pokretne faze koja se sastojala od 50 mM fosfatnog pufera, pH 6, kao otapala A i 100% metanola kao otapala B. Otapalo A, 50 mM fosfatni pufer, pH 6 pripremila sam tako da sam 0,522 g K_2HPO_4 i 6,392 g KH_2PO_4 otopila u 1 L milli-Q vode. Vremenski gradijent miješanja otapala prikazan je u Tablici 2. Volumen ubrizganog uzorka iznosio je 25 μL , a valna duljina pri kojom su detektirani analiti iznosila je 260 nm.

Tablica 2. Vremenski gradijent miješanja otapala kanala A i B korišten tijekom analize ekstrahiranih adenzin-fosfata metodom RP-HPLC.

Vrijeme (min)	Brzina protoka (mL min ⁻¹)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
Početno	0,6	100,0	0
2,0	0,6	100,0	0
10,0	0,6	87,5	12,5
12,0	0,6	87,5	12,5
20,0	0,6	100,0	0
30,0	0,6	100,0	0

3.2.2.2. Validacija metode HPLC

Nakon prilagodbe kromatografskih parametara, validaciju metode HPLC provela sam određivanjem selektivnosti, linearnosti, i preciznosti.

Selektivnost modificirane metode HPLC odredila sam promatranjem razlučivanja i simetrije pikova standardne otopine adenzin-fosfata.

Pomoću baždarnih pravaca ovisnosti površine pika o koncentraciji standardnih otopina molekula ATP, ADP i AMP, odredila sam nagib i presijek pravca te koeficijent korelacije linearnom metodom namjanih kvadrata.

Preciznost metode odredila sam usporedbom tri rezultata analiziranih otopina standarda, dobivenih unutar istog i između tri različita dana mjerenja. Nakon analize otopina standarda i analita iz krvi metodom HPLC, odredila sam prosječne površine pika i standardnu devijaciju za četiri razine koncentracije (10, 50, 100, 300 μM) svakog adenzin-fosfata. Mjeru preciznosti, točnije postotak relativne standardne devijacije (engl. *relative standard deviation*, RSD), izračunala sam prema formuli 8, kao omjer standardne devijacije (σ) i aritmetičke sredine (\bar{x}), pomnožen sa 100.

3.2.3. Mikro-ekstrakcija na čvrstoj fazi

Ekstrahirane adenzin-fosfate iz uzorka krvi pročistila sam metodom μ -SPE na uređaju Agilent AssayMAP Bravo. Vezanje, pročišćavanje i ispiranje provedeno je primjenom kolone μ -SPE ispunjene aktivnim ugljenom kao nepokretnom fazom.

3.2.3.1. Priprava otopina za protokol μ -SPE

Otopine koje su potrebne za protokol μ -SPE su pufer za kondicioniranje, ekvibracijski pufer i elucijski pufer, a prikazane su u Tablici 3. Protokol je prilagođen prema literaturnom izvoru Pabst i sur. (2010).

Tablica 3. Otopine korištene u protokolu μ -SPE.

Pufer za kondicioniranje kolone	Ekvibracijski pufer	Elucijski pufer
Acetonitril u 3% HCOOH, pH 9 (60:40; v/v)	Milli-Q voda	Acetonitril u 3% HCOOH, pH 9 (60:40; v/v)

3.2.3.2. Protokol metode μ -SPE

U svrhu optimizacije metode μ -SPE vezanja i pročišćavanja adenzin-fosfata za aktivni ugljen kao nepokretnu fazu, pripremila sam standardnu otopinu adenzin-fosfata tako da sam najprije odgovarajuću masu ATP, ADP i AMP otopila u 50 mM fosfatnom puferu, pH 6. U otopini je koncentracija standarda ATP iznosila 459 μ M, koncentracija ADP iznosila je 372 μ M, a koncentracija AMP bila je 225 μ M. Volumen od 40 μ L pripremljene otopine razrijedila sam s 160 μ L mili-Q vode.

Nakon potvrde vezanja standarda ATP, ADP i AMP na kolonu μ -SPE ispunjenu aktivnim ugljenom, isti sam protokol primjenila na ekstrahiranim adenzin-fosfatima iz uzorka kapilarne krvi prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.3. *Postupak metode standardnog dodatka*. U konačnici sam 40 μ L filtrata razrijedila u 160 μ L ekvibracijskog pufera, odnosno mili-Q vode.

Postupak μ -SPE proveden je na isti način prilikom pročišćavanja standardne otopine i uzorka kapilarne krvi. Prvi korak protokola μ -SPE uključuje ispiranje kolone μ -SPE u kojoj se nalazi nepokretna faza aktivni ugljen. Kroz kolonu je propušten pufer za ispiranje (acetonitril u 3% HCOOH, pH 9 (60:40; v/v)) u volumenu od 100 μ L brzinom protoka od 300 μ L/min. Zatim je slijedio korak kondicioniranja nepokretne faze, u kojem je kroz kolonu propušteno 100 μ L milli-Q vode protokom od 100 μ L/min. Nakon što se kolona kondicioniranjem prilagodila za vezanje adenzin-fosfata, nanoseno je 100 μ L standarda ili uzorka krvi po protoku brzine 5 μ L/min. Vezani adenzin-fosfati su prije elucije isprani s 25 μ L ekvibracijskog pufera uz brzinu protoka od 5 μ L/min. U zadnjem su koraku vezani adenzin-fosfati eluirani s nepokretne faze elucijskim puferom (acetonitril u 3% HCOOH, pH 9 (60:40, v/v)) u volumenu od 100 μ L i brzini protoka od 5 μ L/min. Eluat sam naposljetku osušila u sušioniku, otopila u 100 μ L 50 mM fosfatnog pufera, pH 6, prebacila u HPLC vijalu i analizirala prema opisanoj HPLC metodi. Sažeti prikaz cijelog protokola μ -SPE nalazi se u Tablici 4.

Tablica 4. Shematski prikaz protokola metode μ -SPE koji je korišten za pročišćavanje uzorka kapilarne krvi primjenom aktivnog ugljena kao nepokretne faze za selektivno vezanje adenozin-fosfata.

Korak	Volumen (μL)	Brzina protoka (μL/min)
Ispiranje	100	300
Kondicioniranje	100	100
Nanošenje uzorka	100	5
Ispiranje uzorka ekvilibracijskim puferom	100	5
Elucija	25	5

Uzorak krvi sa otopinom za nacjepljivanje, analizirala sam u triplikatima. Pomoću jednadžbe 7, izračunala sam koncentraciju pojedinog adenozin-fosfata prije i nakon protokola pročišćavanja te prema srednjoj vrijednosti izračunala % RSD za svaki adenozin-fosfat.

4. REZULTATI

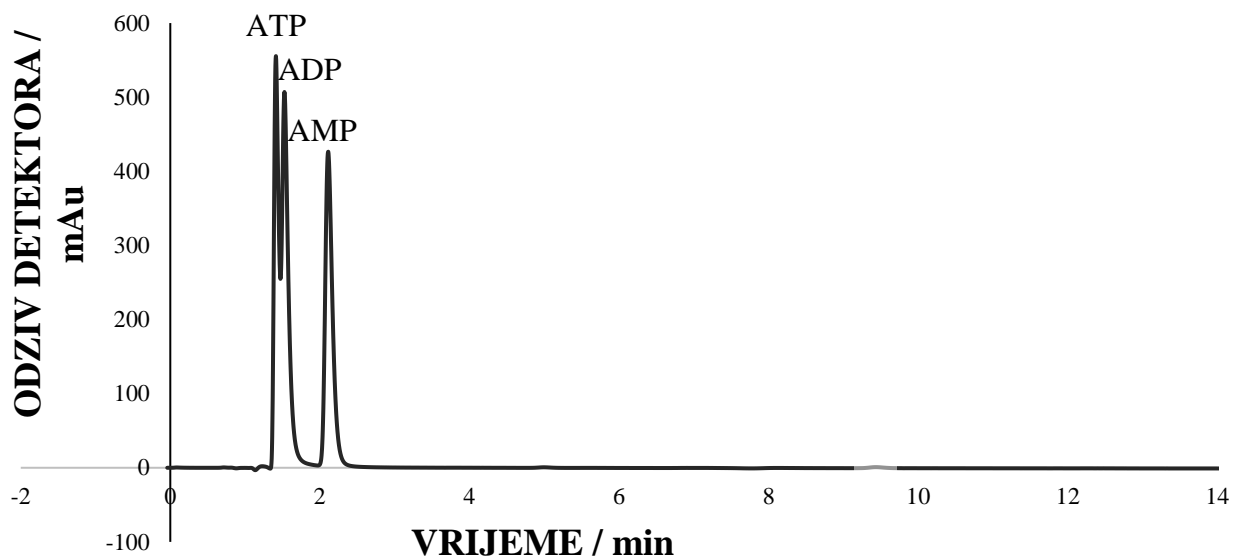
4.1. Razvoj kromatografske metode za razdvajanje adenzin-fosfata na uzorcima standarda

Odabrana kromatografska metoda iz literaturnog izvora Coolen i sur. (2008), gdje je korišten sustav HPLC Agilent serije 1100 opremljen kromatografskom kolonom C18, prilagođena je prema potrebama ekstrakcijske metode, kako je nadalje i opisano. Razdvajanje je provedeno protokom gradijentne elucije (Tablica 5) uz 50 mM fosfatni pufer pH 6 kao pokretna faza A i 100% metanol kao pokretna faza B. Volumen injektiranja u navedenom radu iznosio je 25 μ L, brzina pokretne faze 1 mL/min, a kromatografska kolona održavana na 20 °C. Detekcija analita provedena je detektorom s nizom dioda (engl. *diode array detecton*, DAD) pri valnoj duljini 260 nm.

Tablica 5. Vremenski gradijent miješanja otapala kanala A i B korišten tijekom RP-HPLC analize ekstrahiranih adenzin-fosfata prema radu Coolen i sur. (2008).

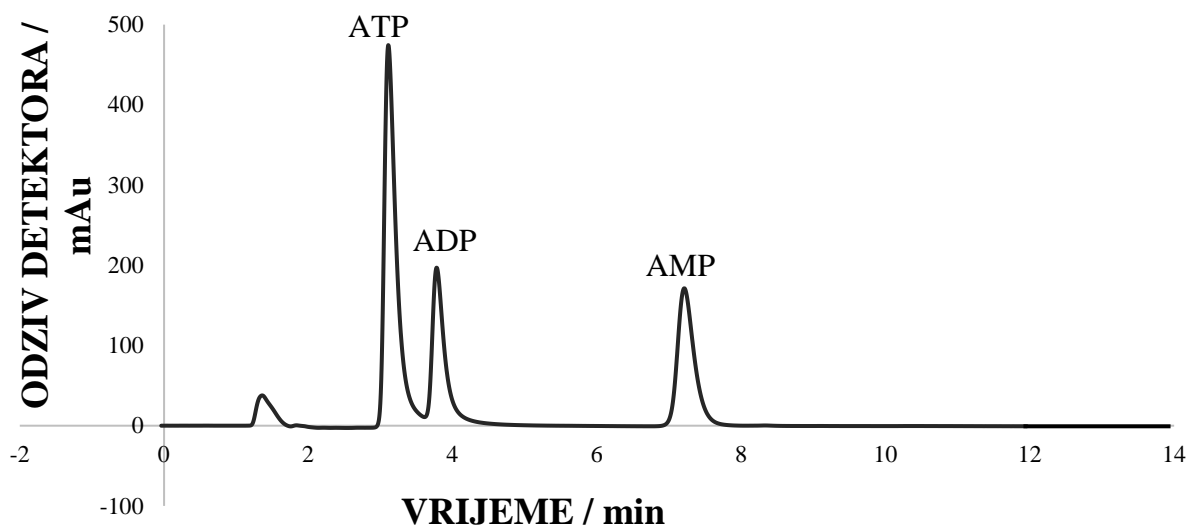
Vrijeme (min)	Brzina protoka (mL min ⁻¹)	Otapalo A (%)	Otapalo B (%)
0	1,0	100,0	0
2,0	1,0	100,0	0
10,0	1,0	87,5	12,5
12,0	1,0	87,5	12,5
17,0	1,0	100,0	0
19,0	1,0	100,0	0

Budući da analizom standardne otopine ATP, ADP i AMP navedenim kromatografskim parametrima nisu zadovoljeni kriteriji selektivnosti dobre HPLC metode, (Slika 12), metodu sam modificirala i validirala u svrhu dobrog razdvajanja adenzin-fosfata.



Slika 12. Uvećani kromatogram smjese standarda od 0 do 14 min u kojem koncentracije ATP, ADP i AMP iznose 1000 μ M. Adenozin-fosfati razdvojeni su gradijentnom metodom prema izvoru Coolen i sur. (2008). Vrijeme zadržavanja molekule ATP iznosilo je 1,41 min, ADP 1,53 min, a AMP 2,11 min.

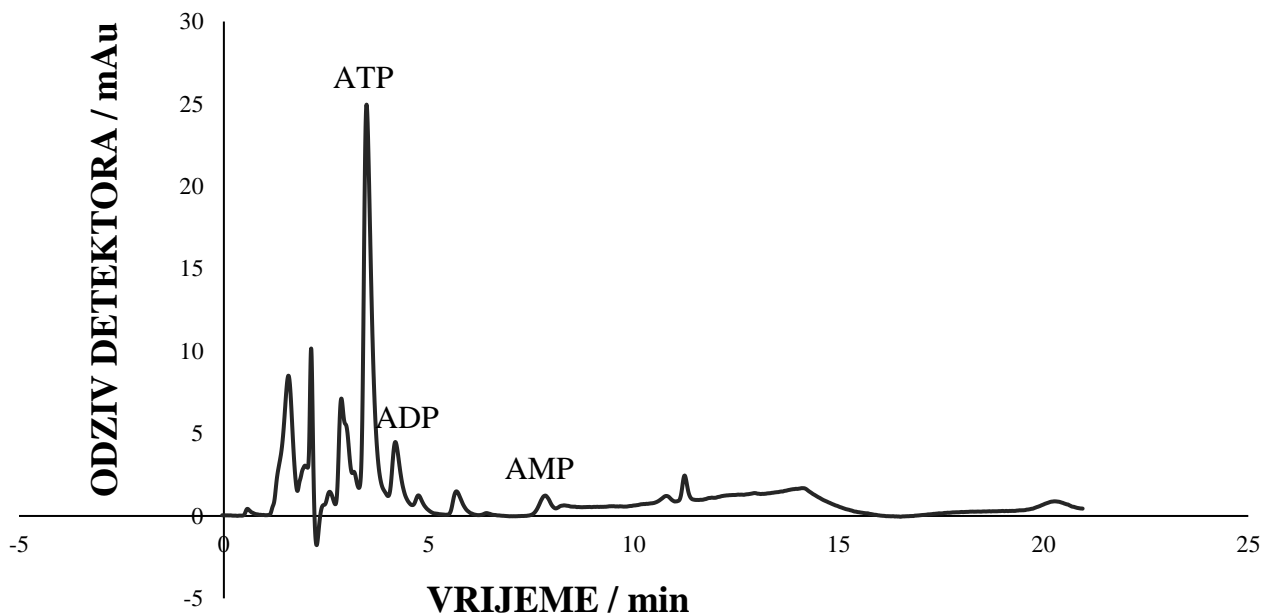
U konačnici su se kromatografski parametri korišteni u ovom diplomskom radu, opisani u poglavlju 3.2.2.1. *Kromatografski parametri*, pokazali kao zadovoljavajući (Slika 13) jer su rezultirali boljim razlučivanjem pikova adenozin-fosfata iz smjese standarda.



Slika 13. Uvećani kromatogram smjese standarda od 0 do 14 min, u kojem je koncentracija ATP 1000 μM , a koncentracija ADP i AMP iznosi 500 μM . Adenozin-fosfati razdvojeni su modificiranom metodom. Vrijeme zadržavanja molekule ATP iznosilo je 3,49 min, molekule ADP 4,17 min, a molekule AMP 7,78 min.

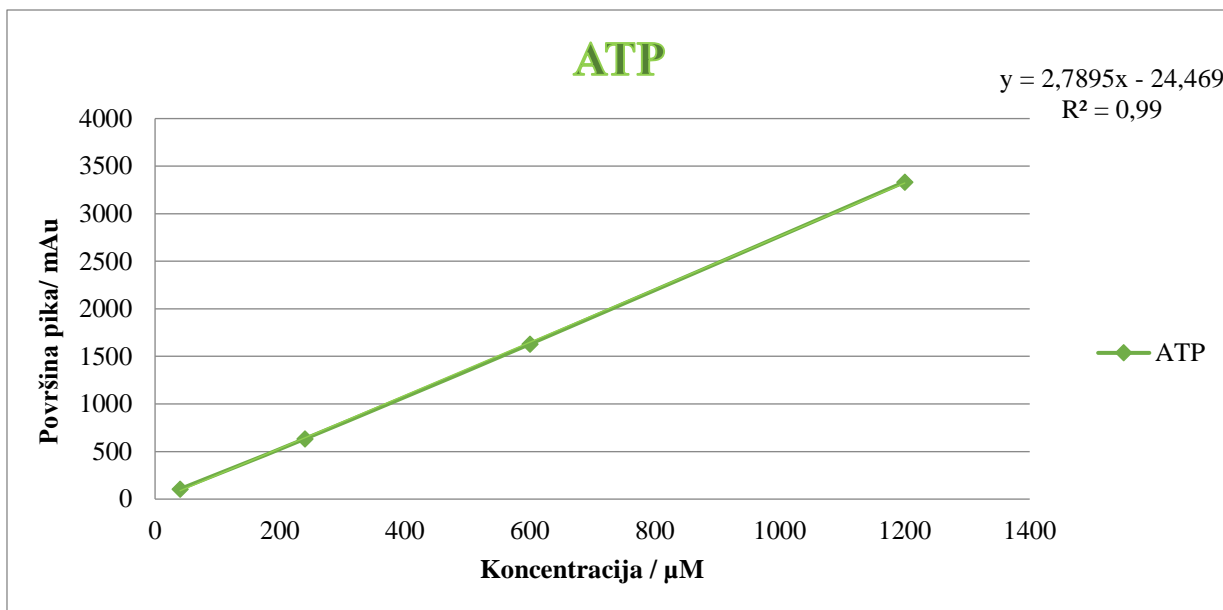
4.2. Validacija kromatografske metode

Dobro razlučivanje i simetrija pikova molekula ATP, ADP i AMP u smjesi standarda (Slika 13) i u uzorku krvi (Slika 14) od ostalih pikova, ukazuju na zadovoljavajuću selektivnost metode. U smjesi standarda molekula adenozin-fosfata, simetrija pika za ATP iznosila je 0.51, ADP 0,53 te AMP 0,68, dok je u uzorku krvi simetrija pika za ATP iznosila 0.58, ADP 0.64 te AMP 1.30.

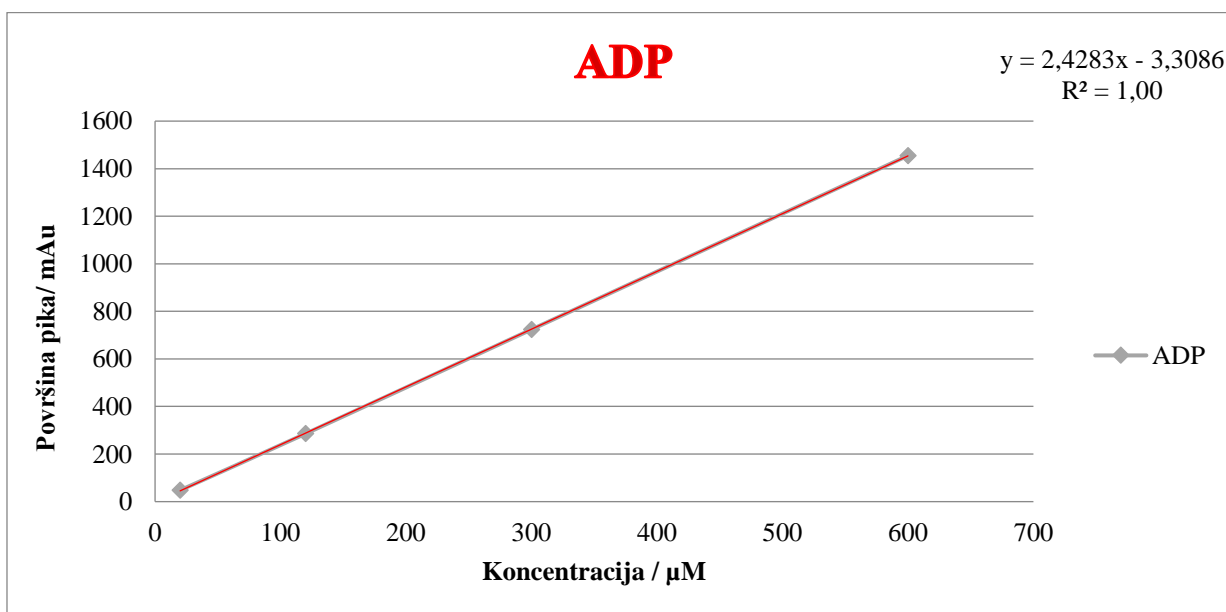


Slika 14. Uvećani kromatogram uzorka krvi od 0 do 20 min na kojem su označeni pikovi ATP, ADP i AMP.

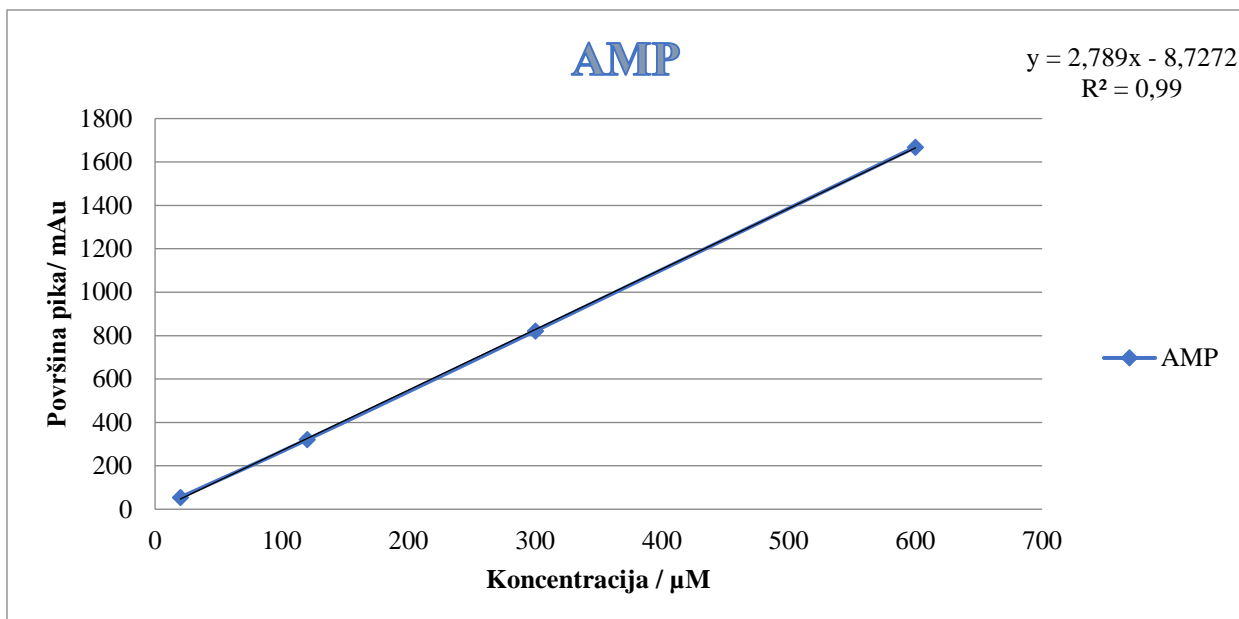
Podaci o linearnosti dobiveni su iz baždarnih pravaca ovisnosti površine pika pojedinog adenozin-fosfata u odnosu na njegovu odgovarajuću koncentraciju (Slike 15-17). U svrhu izrade baždarnog pravca, standardne otopine različitih koncentracija analizirane su u triplikatima. Koeficijent korelacije, nagib i presjek pravca određeni su linearnom metodom namjanih kvadrata. Baždarni pravci prikazuju dobru linearnost metode za sve tri ispitivane komponente obzirom da su vrijednosti $R^2 > 0,99$ za ATP, ADP i AMP. Slika 18 prikazuje preklopljene kromatograme smjesa svih koncentracija standarda adenozin-fosfata koji su korišteni pri konstruiranju baždarnog pravca.



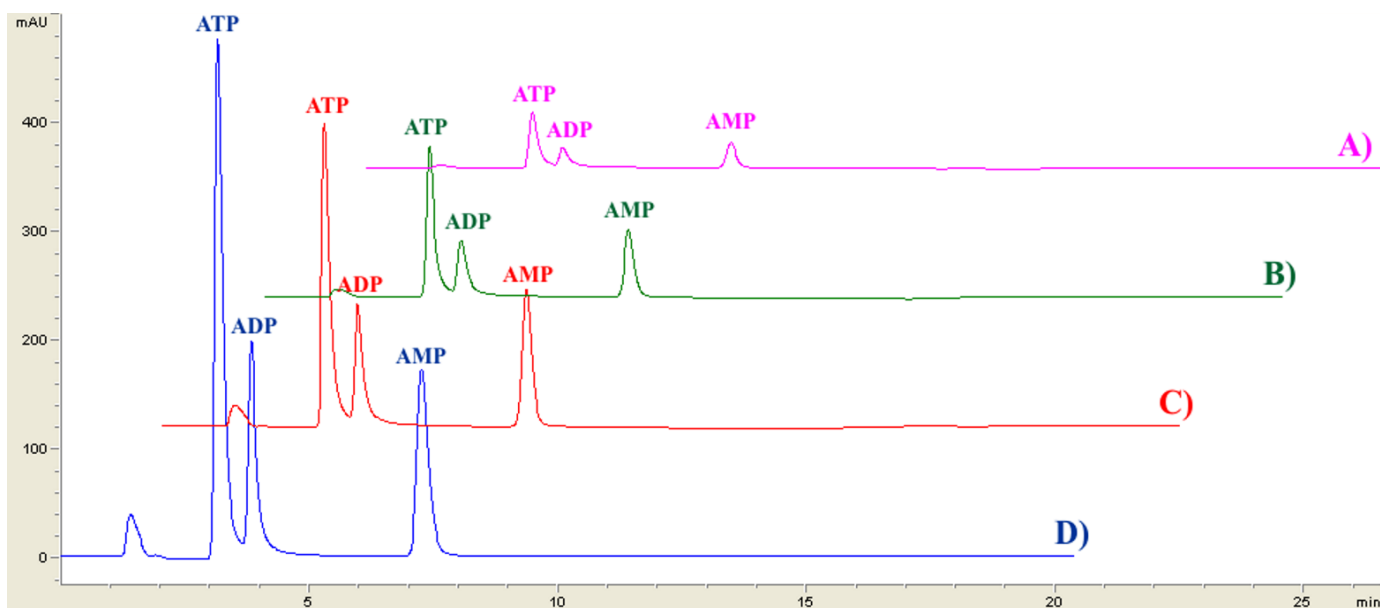
Slika 15. Baždarni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine pika o koncentraciji standardne otopine ATP u koncentraciji od 1200, 600, 240 i 40 μM . Svaka od navedenih koncentracija je analizirana u triplikatu s izračunatim % RSD ≤ 1 .



Slika 16. Baždarni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine pika o koncentraciji standardne otopine ADP u koncentraciji od 600, 300, 120 i 20 μM . Svaka od navedenih koncentracija je analizirana u triplikatu s izračunatim % RSD ≤ 1 .



Slika 17. Baždarni pravac ovisnosti srednje vrijednosti površine pika o koncentraciji standardne otopine AMP u koncentraciji od 600, 300, 120 i 10 μM . Svaka od navedenih koncentracija je analizirana u triplicatu s izračunatim % RSD ≤ 1 .



Slika 18. Preklapljeni kromatogrami otopina standarda koji su korišteni za konstruiranje baždarnog pravca (A-D) gdje su korištene koncentracije ATP od 40 μM (A), 240 μM (B), 600 μM (C) i 1200 μM (D) te koncentracije ADP i AMP od 20 μM (A), 120 μM (B), 300 μM (C) i 600 μM (D).

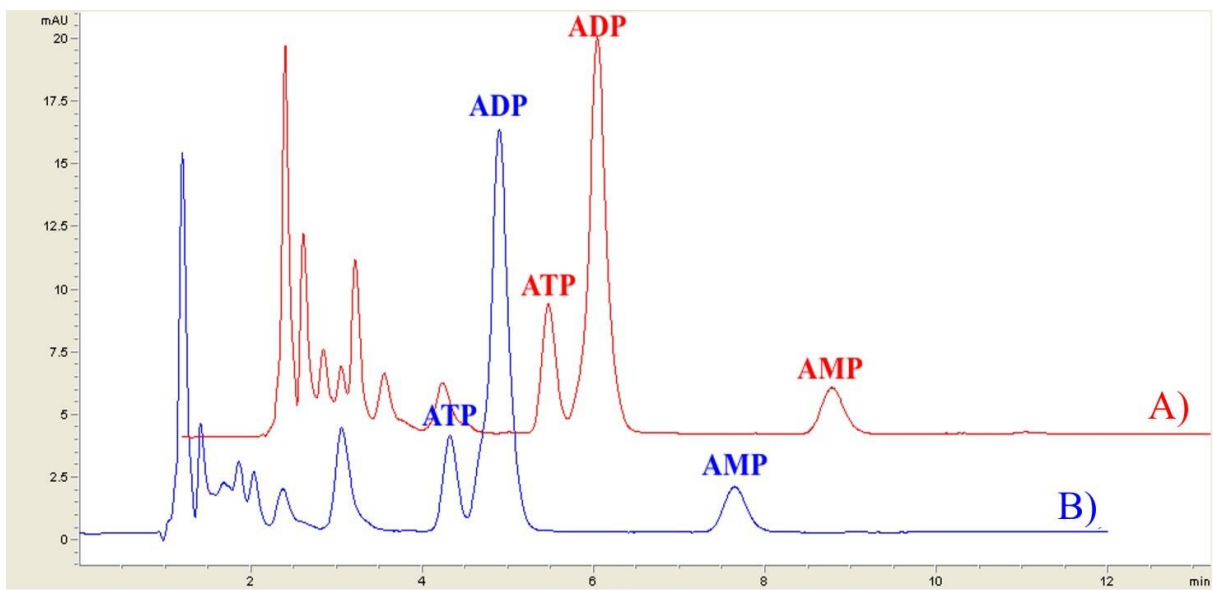
Preciznost metode prikazana je pomoću uzastopne analize standardnih otopina ATP, ADP i AMP metodom HPLC u koncentracijama od unutar istoga dana i između tri različita dana. Rezultati preciznosti prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Preciznost rezultata analize istih otopina standarda ATP, ADP i AMP u koncentracijama 10, 50, 100 i 300 μM metodom HPLC unutar istog dana i između različitih dana analize. Rezultat preciznosti izražen je kao postotak relativne standardne devijacije (% RSD).

Adenozin- fosfat	Teoretska koncentracija (μM)	Unutar istoga dana		Između različitih dana	
		Izmjerena koncentracija (μM)	RSD (%)	Izmjerena koncentracija (μM)	RSD (%)
ATP	10	9,78	0.20	9,80	0.82
	50	50,10	0.04	50,14	0.26
	100	100,07	0.14	99,85	0.14
	300	299,70	0.04	299,76	0.04
ADP	10	10,22	1.17	10,13	0.20
	50	49,84	0.08	49,90	0.04
	100	99,64	0.14	99,39	0.43
	300	300,33	0.11	299,97	0.06
AMP	10	10,43	0.10	10,46	0.38
	50	49,48	0.08	49,46	0.04
	100	99,41	0.15	99,07	0.32
	300	300,15	0.03	300,22	0.01

4.3. Razvoj metode za ekstrakciju adenzin-fosfata iz ljudske krvi

Kao što je već navedeno, jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je razvoj metode kojom bi se ekstrahirali adenzin-fosfati iz što manjeg volumena kapilarne krvi. Slika 19 prikazuje dva preklopljena kromatograma koji ukazuju na jednako uspješnu ekstrakciju adenzin-fosfata iz 500 μL i iz 50 μL krvi. Slika 20. prikazuje uzorak krvi nakon protokola ekstrakcije, ali prije filtracije primjenom filtera Microcon-10 kDa.



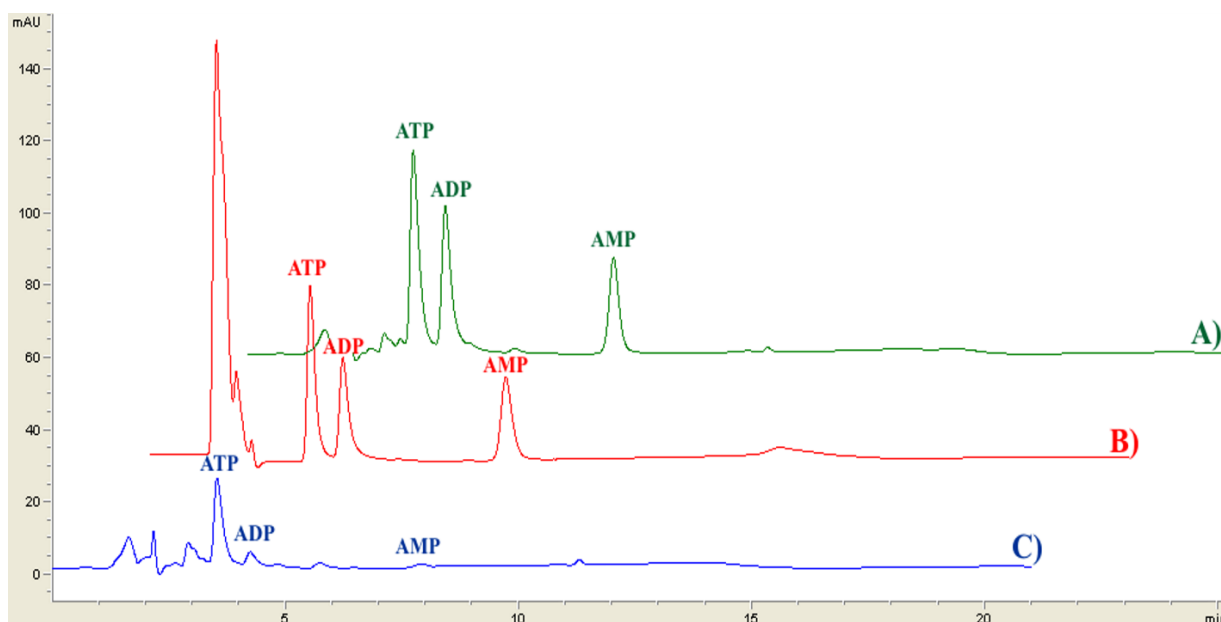
Slika 19. Preklopljeni kromatogrami ekstrahiranih adenzin-fosfata iz 500 μL (A) i 50 μL krvi (B).



Slika 20. Zamućena crvena otopina ekstrahiranih adenzin-fosfata iz kapilarne ljudske krvi prije pročišćavanja primjenom filtera Microcon-10 kDa.

4.4. Koncentracija molekula ATP, ADP, AMP u 50 μ L ljudske krvi

Iskorištenje metodom standardnog dodatka provedeno je analizom istog uzorka krvi koji je odijeljen na dva dijela. Jednom je dijelu dodana otopina za najepljivanje poznate koncentracije adenzin-fosfata od 200 μ M, dok je druga otopina analizirana standardnim postupkom ekstrakcije ATP, ADP i AMP iz kapilarne ljudske krvi. Svi su uzorci analizirani u triplikatima te su izračunate srednje vrijednosti dobivenih rezultata. Iz navedenih podataka, izračunato je iskorištenje ekstrakcijske metode prema jednadžbi 7, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 7. Preklopljeni kromatogrami otopine za najepljivanje, uzorka krvi sa standardnim dodatkom te istog uzorka krvi bez dodanog standardnog dodatka prikazani su na Slici 21. Iz koncentracija adenzin-fosfata u krvi prikazanih u Tablici 7, izračunata je vrijednost AEC prema formuli 2 i iznosi 0,87.



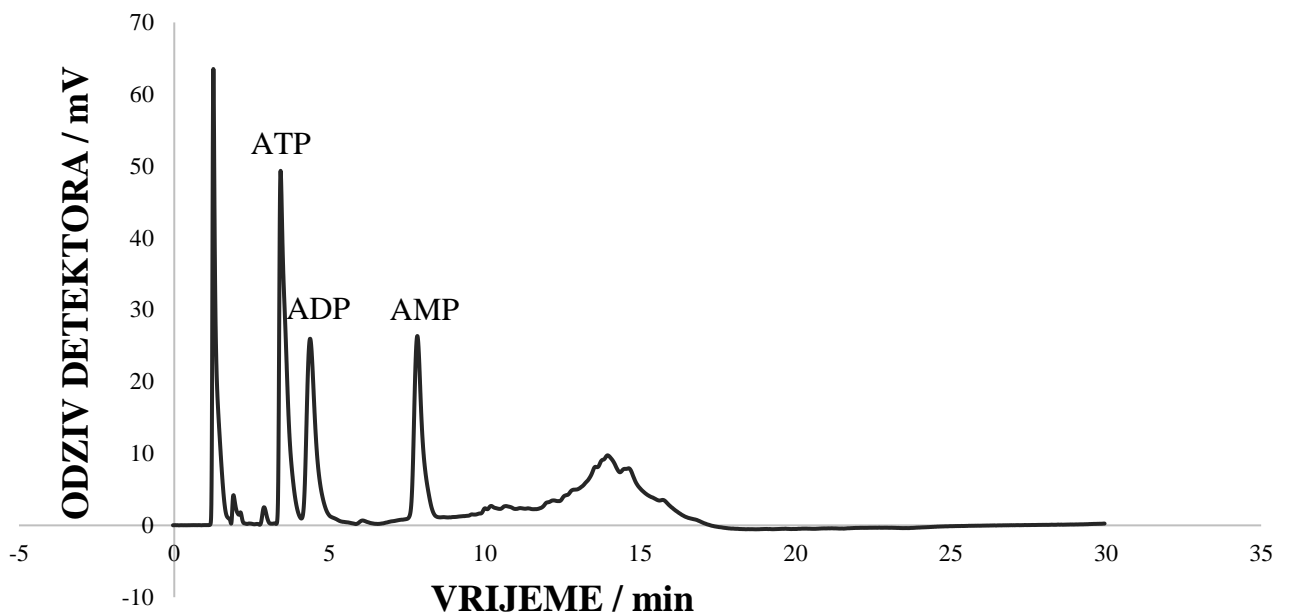
Slika 21. Preklapljeni kromatogrami adenozin-fosfata (A-C) koji prikazuju ekstrahirane adenozin-fosfate iz uzorka krvi kojemu je dodan standardni dodatak ATP, ADP i AMP u koncentraciji od 200 μM (A), adenozin-fosfati standardnog dodatka koncentracije 200 μM (B), ekstrahirani adenozin-fosfati iz 50 μL kapilarne krvi (C).

Tablica 7. Tablični prikaz srednje vrijednosti koncentracija molekula ATP, ADP i AMP u tri uzorka kapilarne krvi, eksperimentalna koncentracija standardnog dodatka, koncentracija uzorka krvi kojemu je dodana poznata koncentracija standardnog dodatka (200 μM) s izračunatim iskorištenjem.

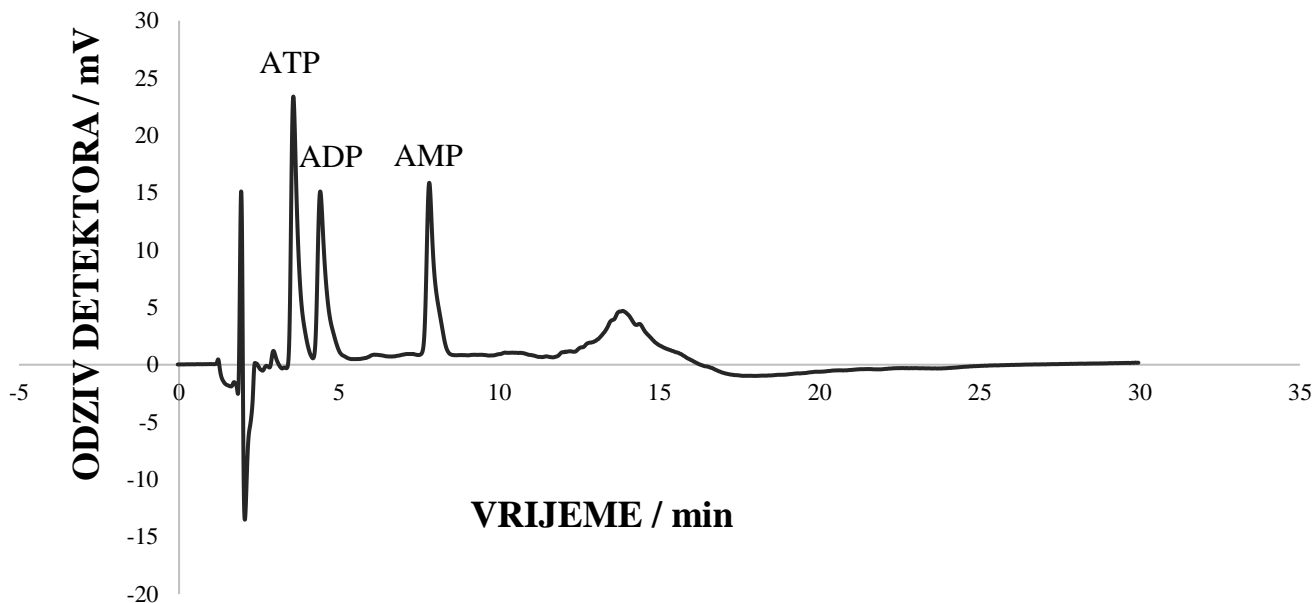
Adenozin-fosfat	Koncentracija u krvi (μM)	Koncentracija standardnog dodatka (μM)	Koncentracija krv + standardni dodatak (μM)	Iskorištenje (%)
ATP	1390,522	2307,804	2881,153	77,86
ADP	260,187	1733,991	2319,861	129,53
AMP	96,032	1466,227	1519,073	109,91

4.5. Preciznost metode μ -SPE

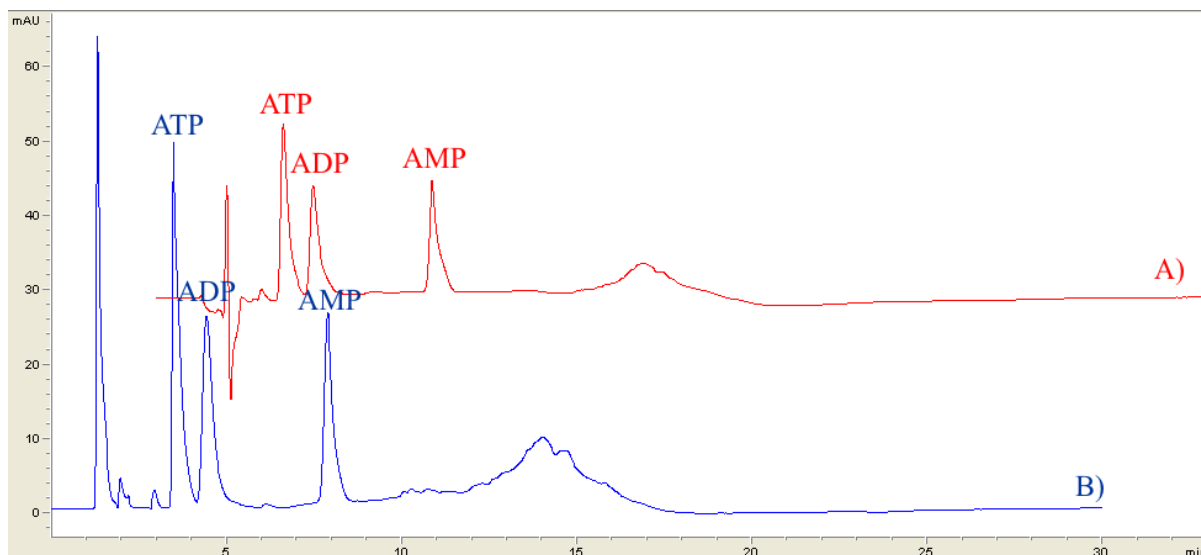
Zbog potrebe pročišćavanja uzorka kapilarne krvi od prisutnih onečišćenja, korištena je metoda μ -SPE s kolonom ispunjenom aktivnim ugljenom kao nepokretnom fazom. U svrhu validacije metode, korištena je metoda standardnog dodatka. Na Slici 22 prikazan je kromatogram uzorka krvi, kojemu je dodana poznata koncentracija standardnog dodatka prije pročišćavanja. Kromatogram na Slici 23. predstavlja uzorak krvi sa poznatom koncentracijom standardnog dodatka nakon pročišćavanja, a Slika 24 predstavlja preklopljene kromatograme prikazane na Slikama 22 i 23.



Slika 22. Kromatogram uzorka ljudske kapilarne krvi kojemu je dodana poznata koncentracija standardnog dodatka ($200 \mu\text{M}$) prije pročišćavanja metodom μ -SPE. Na kromatogramu su označeni pikovi ATP, ADP i AMP.



Slika 23. Kromatogram uzorka ljudske kapilarne krvi prikazane na Slici 22, nakon pročišćavanja adenozin-fosfata metodom μ -SPE uz primjenu aktivnog ugljena kao nepokretne faze. Na kromatogramu su označeni pikovi ATP, ADP i AMP.



Slika 24. Preklapljeni kromatogrami uzorka ljudske kapilarne krvi prikazani na Slici 22 i 23, nakon pročišćavanja adenozin-fosfata metodom μ -SPE uz primjenu aktivnog ugljena kao nepokretne faze (A) i prije pročišćavanja adenozin-fosfata metodom μ -SPE uz primjenu aktivnog ugljena kao nepokretne faze (B).

Preciznost metode izračunata je kao relativna standardna devijacija koncentracija adenozin-fosfata tako da su tri uzorka krvi sa standardnim dodatkom injektirani u triplikatima. Podaci o preciznosti metode prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8. Preciznost μ -SPE metode, u kojoj je korišten aktivni ugljen kao nepokretna faza, izražena kao postotak relativne standardne devijacije (% RSD) koncentracija molekula ATP, ADP i AMP ekstrahiranih iz tri uzorka krvi kojima je dodana otopina za nacjepljivanje s koncentracijom adenozin-fosfata od 200 μ M.

Adenozin-fosfat	Koncentracija u krvi prije pročišćavanja (μ M)	Koncentracija u krvi nakon pročišćavanja (μ M)	RSD (%)	Gubitak uzorka nakon pročišćavanja (%)
ATP	2731,31	1353,29	10,25	50,51
ADP	2148,47	1133,93	10,69	47,22
AMP	1622,99	947,40	11,20	41,68

5. RASPRAVA

5.1. Razvoj kromatografske metode za razdvajanje adenozin-fosfata na uzorcima standarda

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je razviti te validirati HPLC metodu, koja ponovljivo i u kratkom vremenu može međusobno odijeliti ATP, ADP i AMP analite te tako kvantitativno odrediti koncentraciju pojedinog adenozin-fosfata u uzorku ljudske kapilarne krvi. Razvijena metoda pokazala je dobro razdvajanje adenozin-fosfata u smjesi u kratkom vremenu analize.

Prvi kromatografski uvjeti odabrani su prema istraživanju Coolen i sur. (2008), koji su koristili gradijentnu metodu elucije s 50 mM fosfatnim puferom, pH 6, kao pokretnu fazu A i 100% metanolom kao pokretnu fazu B. Volumen injektiranja je bio 25 μ L, a protok 1 mL/min. Vremenski gradijent miješanja otapala kanala A i B korišten u ovome radu, prikazan je u Tablici 5. Koristeći takve kromatografske parametre, molekula ATP imala je najmanje vrijeme zadržavanja ($t_r = 1,41$) te se eluirala prva s kromatografske kolone, dok je molekula ADP eluirana netom nakon molekule ATP ($t_r = 1,53$), a molekula AMP imala je najveće vrijeme zadržavanja ($t_r = 2,11$) i eluirala se posljednja od sva tri analizirana adenozin-fosfata. Nakon pokušaja razdvajanja smjese standardnih otopina adenozin-fosfata, iz kromatograma (Rezultati 4.1., Slika 12) uočena je loša selektivnost metode. Pikovi molekula ATP i AMP bili su spojeni, stoga je bilo potrebno modificirati HPLC metodu razdvajanja. Isto tako, pokretna faza A bila je pripremljena prema uputama navedenim u materijalima i metodama navedenog istraživanja gdje je pH pripremljene otopine trebao biti 6. Međutim, mjerenjem vrijednosti pH pokretna faze A ustanovljeno je kako je otopina lužnatija, odnosno pH je iznosio 7,7. Iz tog je razloga pripremljena nova pokretna faza A, 50 mM fosfatni pufer kojem je vrijednost pH podešen na 6. Sniženje vrijednosti pH pokretne faze znatno je utjecao na kromatografiju, tako da su se pikovi molekula ATP i ADP međusobno odijelili. U svrhu još boljeg odjeljivanja analita ATP i ADP, smanjena je brzina protoka mobilne faze sa 1 mL/min na zadovoljavajuću brzinu od 0,6 mL/min.

Nova gradijentna metoda, s novom pokretnom fazom i protokom smanjenim na 0,6 mL/min, omogućila je razdvajanje pikova molekula ATP i ADP uz promjenu vremena zadržavanja (Rezultati 4.1., Slika 13). Najkraće vrijeme zadržavanja imala je molekula ATP (3,49 min), zatim molekula ADP (4,17 min) te molekula AMP (7,78 min).

Ukupno vrijeme analize modificirane gradijentne HPLC metode iznosilo je 30 minuta. Premda su se sva tri analizirana adenozin-fosfata eluirala do osme minute, na kromatogramu

uzorka krvi referentnog rada prisutni su pikovi drugih krvnih komponenti eluirani nakon 16. minute. Isto tako, obzirom da je korištena gradijentna metoda, vrijeme analize je produljeno kako bi se u potpunosti isprao metanol kao pokretna faza B te omogućilo kondicioniranje kolone prije injektiranja drugog uzorka. U suprotnom bi zaostala količina metanola uzrokovala neujednačeno i neponovljivo kromatografsko razdvajanje uz lošu simetriju kromatografskih pikova.

5.2. Validacija kromatografske metode

Pouzdanost korištene HPLC metode utvrđena je validacijom metode određivanjem njene selektivnosti, linearosti i preciznosti. Svaki je korak validacije bio proveden na standardnim otopinama smjese ATP, ADP i AMP.

Selektivnost je određena obzervacijom dva susjedna kromatografska pika od interesa. U odnosu na kromatografsku metodu koju su koristili Coolen i sur. (2008), novorazvijena HPLC metoda pokazala je zadovoljavajuću selektivnost, što je vidljivo iz kromatograma prikazanog na Slici 13, budući da su pikovi sva tri analizirana analita u potpunosti razdvojeni. Visoka simetrija promatranih kromatografskih pikova adenzin-fosfata ukazuje na dobru kvantitativnu HPLC metodu kojom se pouzdano može odrediti koncentracija pojedinog analita.

Linearnost kromatografske metode određena je iz baždarnih pravaca ovisnosti površine pika o koncentraciji standarda sva tri analizirana adenzin-fosfata. Baždarni pravci konstruirani su tako da su se standardne otopine za svaki adenzin-fosfat analizirale u triplikovima te se uzela srednja vrijednost površine pika za svaku koncentraciju. Koeficijent korelacije (R^2) bio je veći od 0,99 za sva tri analita, stoga je linearnost metode izrazito dobra. Visoko linearan odziv detektora prema koncentraciji analita osigurao je kvantitativno određivanje nepoznatih koncentracija molekula ATP, ADP i AMP u uzorku ljudske krvi.

Preciznost metode prikazana je kao relativna standardna devijacija. Koncentracije standardnih otopina adenzin-fosfata određene su se u triplikovima unutar istog te između tri različita dana analize metodom HPLC. Vrijednosti relativne standardne devijacije unutar istoga dana analize otopine standarda bili su u rasponu od 0,03% do 1,17%, a između tri različita dana analize od 0,01% do 0,82%. Niske vrijednosti RSD ukazuju na to da su uzastopnom analizom iste otopine standarda dobivene jednake vrijednosti površine pikova, a time i iste vrijednosti

njihovih koncentracija. Drugim riječima, dobivene vrijednosti RSD ukazuju na preciznost i ponovljivost razvijene HPLC metode.

5.3. Razvoj metode za ekstrakciju adenzin-fosfata iz ljudske krvi

Uz razvoj odgovarajuće HPLC metode, drugi cilj ovog rada bio je ekstrahirati adenzin-fosfate iz što manjeg volumena kapilarne krvi. Martinez i sur. (2014) te Coolen i sur. (2008) određivali su adenzin-fosfate ekstrahirane iz 500 μL ljudske krvi. U tu su svrhu morali uzorkovati čak 8 mL venske krvi koja je bila uskladištena u epruvetama s antikoagulansom. Poznato je da antikoagulansi utječu na hidrolizu molekule ATP do ADP, AMP i adenzina (Wu i sur. 2008). Stoga je prednost novorazvijene metode ekstrakcije u ovom diplomskom radu ta da se iz 50 μL kapilarne krvi jednako pouzdano mogu analizirati adenzin-fosfati, a samim time bez potrebe skladištenja krvi u epruvetama s antikoagulansom. Ekstrakcija molekula ATP, ADP i AMP iz 50 μL kapilarne krvi postigla se na način da se modificirala metoda ekstrakcije iz 500 μL venske krvi prema radu Coolen i sur. (2008) (Rezultati 4.3., Slika 19). Perklorna kiselina dodana je u jednakom volumnom omjeru u uzorak krvi kako bi se razgradili eritrociti i ekstrahirali adenzin-fosfati te u konačnici precipitali neželjeni proteini. Dodatak perklorne kiseline jedan je od najčešćih pristupa prilikom ekstrakcije nukleotida iz bioloških uzoraka (Redžović i sur. 2021). Nakon dodatka perklorne kiseline, uzorak je bilo nužno neutralizirati obzirom da se zbog zaostatka kiseline u uzorku događa hidroliza molekula adenzin-fosfata. Kako bi se uzorak neutralizirao, dodana je otopina 2 M natrijevog karbonata u 6 M natrijevom hidroksidu, koji formira netopljivi talog natrijeva perklorata. Odmah nakon neutralizacije, supernatant su u navedenim istraživanjima direktno analizirali HPLC uređajem. Međutim, otopina iznad taloga nakon neutralizacije bila je zamućena te sadržavala onečišćenja te je prilikom analize uzrokovala začepljenje HPLC sustava (Slika 20). Iz tog je razloga uzorak krvi u ovom radu pročišćen pomoću filtera Microcon-10 kDa, što nije utjecalo na gubitak ili degradaciju molekula ATP, ADP ili AMP (rezultati nisu prikazani).

5.4. Koncentracija molekula ATP, ADP, AMP u 50 μ L ljudske krvi

Koncentracija analita u krvi izračunata je primjenom metode standardnog dodatka. Kako je već objašnjeno, metoda standardnog dodatka podrazumijeva analizu uzorka krvi, uzorka krvi u koji je dodana poznata koncentracija analita u otopini za nacjepljivanje te analizom otopine za nacjepljivanje. Iz dobivenih vrijednosti površina sve tri analizirane otopine, određena je vrijednost iskorištenja. Iskorištenje za molekulu ATP bilo je 77,86%, dok je vrijednost iskorištenja za molekulu ADP bila 129,53%, a za molekulu AMP iznosila je 109,91%. Može se zaključiti da veća vrijednost iskorištenja od 100% za molekulu ADP i AMP nije pogreška u metodi ekstrakcije, već to da je zbog hidrolize molekule ATP došlo do njegove degradacije u molekulu ADP i AMP. Također, jedna od mogućnosti je da se molekula ATP koprecipitirala zajedno s proteinima u početnom koraku pripreve uzorka (Coolen i sur. 2008). Dobivene vrijednosti iskorištenja korištene su za korekciju analiziranih i izračunatih koncentracija molekula ATP, ADP i AMP iz uzorka kapilarne krvi. Time je koncentracija ATP uvećana za 22,14%, dok su koncentracije ADP i AMP umanjene za 29,53% odnosno 9,91%.

Određene koncentracije adenozin-fosfata iz tri uzorka kapilarne ljudske krvi odgovaraju literaturnim vrijednostima (Tablica 1). Time je utvrđeno da je razvijena metoda ekstrakcije iz 50 μ L uzorka i analize metodom HPLC točna i precizna za određivanje koncentracije molekula ATP, ADP i AMP iz ljudske krvi. Isto tako, kako je AEC pokazatelj energetskog stanja stanice, odnosno pokazatelj zdravlja organizma, njegove vrijednosti kod zdrave osobe u rasponu od 0,8 – 0,9 (Zhang i Vertes 2015). Vrijednost AEC određena je primjenom srednje vrijednosti koncentracija molekula ATP, ADP i AMP dobivenih analizom tri uzorka kapilarne ljudske krvi te iznosi 0,87. Zaključno tome, analizirani uzorak krvi, koji je donirala zdrava osoba u dobi od 24 godine, ima AEC koji odgovara normalnim vrijednostima.

5.5. Preciznost metode μ -SPE

Određivanje adenozin-fosfata, primarno molekule ATP, pronašlo je svrhu prilikom analize ekosustava (Redžović i sur. 2021), cerebrospinalne tekućine (Czarnecka i sur. 2005), kod određivanja kardiovaskularnih (Smolenski i sur. 1990), metaboličkih (Werner 1993) i ostalih skupina bolesti i poremećaja. Iz tog je razloga razvoj selektivnih i ponovljivih metoda pročišćavanja od iznimne važnosti prilikom takvih analiza. Prethodna istraživanja provodila su postupak vezanja i pročišćavanja nukleotida metodom SPE koristeći kolonu Strata X (Czarnecka i sur. 2005) te metodom μ -SPE s nepokretnom fazom Affi-gel Boronat (Redžović i sur. 2021). Rezultati ovih radova nisu rezultirali s dobrim omjerima adenozin-fosfata, kao ni uspješnom validacijom.

Koristeći klasičan protokol ekstrakcije opisan u radu Coolen i sur. (2008), uzorak je prije HPLC analize bio crvene boje te je golim okom sadržavao onečišćenja (Rezultati 4.3., Slika 20). Kako bi se potpuno uklonila pristuna onečišćenja, razvijena je metoda μ -SPE u kojoj su se analiti vezali za aktivni ugljen kao nepokretnu fazu. Za razliku od kromatograma koji prikazuje uzorak krvi prije pročišćavanja (Rezultati 4.5., Slika 22), kromatogram uzorka krvi nakon primjene protokola μ -SPE (Rezultati 4.5., Slika 23) pokazuje da su sva onečišćenja nestala te da su svi analiti (molekule ATP, ADP i AMP) uspješno vezani na aktivni ugljen.

Usporedbom kromatograma uzorka krvi prije i nakon pročišćavanja metodom μ -SPE (Rezultati 4.5., Slika 22 i Slika 23), može se opaziti da dodatni korak pročišćavanja također smanjuje interferirajuće pikove prisutne u uzorku krvi koji su eluirani od prve do treće minute. Izostanak interferirajućih pikova ukazuje na selektivno vezanje adenozin-fosfata na aktivni ugljen, čime se ostale tvari ne vežu na nepokretnu fazu, odnosno ispiru s kolone μ -SPE, a samim time i iz uzorka.

Osim navedenog, velika prednost razvoja metode μ -SPE je u održavanju HPLC sustava u neprekinutom radu (izbjegava se učestalo blokiranje rada kolone i kapilara uzrokovano makromolekulama i partikulama iz krvi). Nakon primjene protokola μ -SPE, biološki uzorak ne analizira se direktno te pogoduje ponovljivosti analitičke metode.

Niske vrijednosti RSD (Rezultati 4.5., Tablica 7) ukazuju na to da je metoda precizna i ponovljiva. Srednje vrijednosti gubitka nakon pročišćavanja iznosile su 50,51% za molekulu ATP, 47,22% za molekulu ADP, i 41,68% za molekulu AMP, što u konačnici ne utječe na točnost i preciznost rezultata.

6. ZAKLJUČAK

Metoda mikro-ekstrakcije adenozin-fosfata s aktivnim ugljenom ima utrošak od najmanje 50 μL kapilarne ljudske krvi, što je prema literaturnim navodima, najmanja količina potrebne krvi korištene za analizu adenozin-fosfata. Zbog uzorkovanja malog volumena krvi, nije bilo potrebno skladištenje krvi u epruvetama s antikoagulansima koji potiču hidrolizu molekule ATP do ADP, AMP i adozina i tako smanjuju uspješnost ekstrakcije.

Razvijena metoda $\mu\text{-SPE}$ za pročišćavanje adenozin-fosfata iz uzorka krvi ima veliku prednost nad cijelim nizom ostalih ekstrakcijskih metoda jer selektivno uklanja matriks, a veže analite i, nakon njihova ispiranja, omogućava višekratnu upotrebu. Nastavno na navedeno, ova metoda omogućava nesmetanu obradu velikog broja krvnih uzoraka u kratkom vremenu, uz sačuvanu točnost, preciznost i ponovljivost mjerenja.

Uspješnost primjene metode $\mu\text{-SPE}$ utvrđena je testiranjem selektivnosti, linearnosti i ponovljivosti uz pomoć HPLC-UV/VIS mjerenja na koloni obrnutih faza. Potvrđeno je da je metoda selektivna za sve navedene analite. Utvrđena linearnost u rasponu koncentracija 1200, 600, 240 i 40 μM za ATP te 600, 300, 120 i 20 μM za ADP i AMP te preciznost rezultata (% RSD za sva tri analita je u rasponu od 0,01% do 1,17%) ukazuju na uspješno razvijenu metodu.

7. LITERATURA

1. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2003): *Molecular biology of the cell*. Oxford University Press, Oxford.
2. Aragon-Martinez O. H, Galicia O., Isiordia-Espinoza M. A., Martinez-Morales F. (2014): A novel method for measuring the ATP-related compounds in human erythrocytes. *Tohoku J Exp Med* 233: 205–214.
3. Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2019): *Biochemistry*. MacMillan, New York.
4. Burnstock G. (2006): Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacol Rev* 58: 58–86.
5. Cardol P., Figueroa F., Remacle C., Franzén L. G., González-Halphen D. (2009): Oxidative phosphorylation: building blocks and related components. U: Harris E. H., Stern D.B., Witman G.,B. (ur.) *Chlamydomonas Sourcebook*. Elsevier Inc str. 469–502.
6. Chisvert A., Cárdenas S., Lucena R. (2019): Dispersive micro-solid phase extraction. *Trends Anal Chem* 112: 226–233.
7. Coolen E. J. C. M., Arts I. C. W., Swennen E. L. R., Bast A., Stuart M. A. C., Dagnelie P. C. (2008): Simultaneous determination of adenosine triphosphate and its metabolites in human whole blood by RP-HPLC and UV-detection. *J Chromatogr B* 864: 43–51.
8. Cooper G. M., Hausman R. E. (2010). *The cell. A molecular approach*. Oxford University Press, Oxford.
9. Czarnecka J., Cieślak M., Michał K. (2005): Application of solid phase extraction and high-performance liquid chromatography to qualitative and quantitative analysis of nucleotides and nucleosides in human cerebrospinal fluid. *J Chromatogr B* 822: 85–90.
10. Dunn J., Grider M. H. (2021): *Physiology, adenosine triphosphate*. StatPearls, Treasure Island, FL.
11. Ellison S. L. R., Thompson M. (2008): Standard additions: Myth and reality. *Analyst* 133: 992–997.
12. Hennion M. (1999): Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A* 856: 3–54.
13. Lucci P., Pacetti D., Nunez O., Frega N. G. (2012): Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis. U: Calderon L. (ur.) *Chromatography - the most versatile method of chemical analysis*. IntechOpen, London, str. 127-164.
14. Kościelniak P., Wietecha R. (2003): A critical look at the recovery test as a way for evaluation of analytical accuracy. *Anal Lett* 36: 861–870.

15. Magdenoska O., Martinussen J., Thykaer J., Nielsen K. F. (2013): Dispersive solid phase extraction combined with ion-pair ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for quantification of nucleotides in *Lactococcus lactis*. *Anal Biochem* 440: 166–177.
16. McMaster, M. C.(2007): HPLC a practical user's guide. Wiley-Interscience. str. 3–15.
17. Naing N. N, Tan S. C, Lee H. K. (2019): Micro-solid-phase extraction. U: Poole C. (ur.) *Solid-Phase Extraction*. Elsevier Inc, str. 434-471.
18. Oakhill J. S., Steel R., Chen Z. P., Scott J. W., Ling N., Tam S. (2011): AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332: 1433–1435.
19. Pabst M., Grass J., Fischl R., Léonard R., Jin C., Hinterkörner G. (2010): Nucleotide and nucleotide sugar analysis by liquid chromatography - electrospray ionization-mass spectrometry on surface-conditioned porous graphitic carbon. *Anal Chem* 82: 9782–9788.
20. Ravnskjaer K., Ravnskjaer M. A., Madiraju K., A., Montminy M. (2015): Role of the cAMP pathway in glucose and lipid metabolism. Springer International Publishing, Switzerland.
21. Redžović Z., Erk M., Svetličić E., Dončević L., Gottstein S., Hozić A., Cindrić M. (2021): Determination of adenylate nucleotides in amphipod *gammarus fossarum* by ion-pair reverse phase liquid chromatography: possibilities of positive pressure micro-solid phase extraction. *Separations* 8: 1-20.
22. Richard F. V. (2008): Principles and practice of bioanalysis. CRC Press, FL.
23. Skoog D. A, West D. M., Holler F. J., Crouch S. R. (2014): Fundamentals of analytical chemistry. Brooks/Cole, Belmont, CA.
24. Smolenski R. T., Lachno D. R., Ledingham S. J. M., Yacoub M. H. (1990): Determination of sixteen nucleotides, nucleosides and bases using high-performance liquid chromatography and its application to the study of purine metabolism in hearts for transplantation. *J Chromatogr B* 527: 414–420.
25. Stauffer E., Dolan J. A., Newman R. (2008): Gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. U: Stauffer E., Dolan J. A., Newman R. (ur.) *Fire Debris Analysis*. Elsevier Inc, str. 235–293
26. Virgilio F., Ferrari D., Idzko M., Panther E., Norgauer J., Sala A. (2003): Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. *Drug Dev Res* 59: 171–174.
27. Weiss J. (2016): Handbook of ion chromatography. Wiley-VCH, Weinheim.
28. Werner A. (1993): Reversed-phase and ion-pair separations of nucleotides, nucleosides and nucleobases: analysis of biological samples in health and disease. *J Chromatogr B*

618: 3–14.

29. Wu F., Zhang E. Y., Zhang J., Bache R. J., Beard D. A. (2008): Phosphate metabolite concentrations and ATP hydrolysis potential in normal and ischaemic hearts. *J Physiol* 586: 4193-4208.
30. Yeung P., Ding L., Casley W. L. (2008): HPLC assay with UV detection for determination of RBC purine nucleotide concentrations and application for biomarker study in vivo. *J Pharm Biomed Anal* 47: 377–382.
31. Zhang L., Vertes A. (2015): Energy charge, redox state, and metabolite turnover in single human hepatocytes revealed by capillary microsampling mass spectrometry. *Anal Chem* 87: 10397–10405.
32. <https://www.nagwa.com/en/explainers/316181371908/> (pristupljeno: 30. 7. 2021.)
33. <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/Glycolysis.html> (pristupljeno: 24. 7 . 2021.)
34. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-microbiology/chapter/the-citric-acid-krebs-cycle/>(pristupljeno: 20. 7. 2021.)
35. <https://microbenotes.com/oxidative-phosphorylation/>(pristupljeno: 20. 7. 2021.)
36. <https://www.analyticaltoxicology.com/en/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>(pristupljeno: 19. 8. 2021.)

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 16. svibnja 1997. godine u Splitu. Pohađala sam Osnovnu školu „Split 3“ od 2004. do 2012. godine. Srednjoškolsko obrazovanje stekla sam u „Druvoj gimnaziji Split“ u Splitu, koje sam završila odličnim uspjehom 2016. godine. Iste godine upisala sam preddiplomski studij Biologije i kemije u trajanju od tri godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Splitu. Preddiplomski studij završila sam odličnim uspjehom 2019. godine i stekla zvanje sveučilišnog prvostupnika biologije i kemije. U rujnu 2019. godine upisala sam diplomski studij Molekularne biologije u trajanju od dvije godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tokom studija aktivno sam sudjelovala na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima, školama i manifestacijama. Aktivno poznajem engleski i talijanski jezik.

e-mail adresa: iker0@stud.biol.pmf.hr