

Analiza modela metabolizma triptofana

Karatović, Anja

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:977054>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported / Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Anja Karatović

1187/N

**ANALIZA MODELA
METABOLIZMA TRIPTOFANA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Jurinjak Tušek na velikoj pomoći pri odabiru teme te izradi ovoga rada, svim uputama i savjetima koje mi je nesebično pružila.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, roditeljima i sestrama, jer su mi bili velika podrška i oslonac tijekom godina moga studiranja, podupirali me i bezuvjetno vjerovali u mene. Bez njih ovo ne bi bilo moguće.

Veliko hvala Sandri, Tei i Dodo za sve prekrasne trenutke tijekom našeg zajedničkog studiranja. Hvala i Ani na svim riječima ohrabrenja i podrške. Uz vas je sve bilo lakše i učinile ste posljednje godine jednim od najljepših perioda moga života.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

ANALIZA MODELA METABOLIZMA TRIPTOFANA

Anja Karatović, 1187/N

Sažetak: Matematičko modeliranje daje nam na jednostavan i ponovljiv način detaljan uvid na metaboličke procese koji se zbivaju u stanicama. Metabolizam triptofana uglavnom se odvija preko kinureninskoga puta pri kojem nastaju metaboliti zajedničkoga naziva kinurenini. U ovom radu provedena je analiza modela metabolizma triptofana programima *CellDesigner* i *WR Mathematica*. Primjenom analize parametarske osjetljivosti identificirane su najosjetljivije reakcije modela. Rezultati provedene analize pokazuju da su reakcija sinteze proteina i reakcije transporta triptofana između cirkulacije i pojedinih tkiva najosjetljivije reakcije u modelu. Enzim aril formamidaza (AFD) uključen u kinureninski put pokazao se kao ključni enzim za analizirani model metabolizma. Ovaj model uspješno simulira metabolizam triptofana kinureninskim putem te se može koristiti za buduća eksperimentalna istraživanja.

Ključne riječi: triptofan, metabolizam, modeliranje, analiza osjetljivosti

Rad sadrži: 48 stranica, 15 slika, 6 tablica, 51 literaturni navod

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc.dr.sc. Ana Jurinjak Tušek*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*
2. Doc.dr.sc. *Ana Jurinjak Tušek*
3. Doc.dr.sc. *Maja Benković*
4. Izv.prof.dr.sc. *Irena Keser* (zamjena)

Datum obrane: 21. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatisation

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

ANALYSIS OF MODEL OF TRYPTOPHAN METABOLISM

Anja Karatović, 1187/N

Abstract: Mathematical modeling gives us a simple and reproducible detailed insight into the metabolic processes that take place in cells. Tryptophan metabolism is mainly happening via the kynurenin pathway, which produces metabolites collectively known as kynurenines. In this paper the analysis of tryptophan metabolism model was performed by *CellDesigner* and *WR Mathematica*. By applying parametric sensitivity analysis, the most sensitive reactions of the model were identified. The results of the analysis show that the protein synthesis reaction and the tryptophan transport between the circulation and individual tissues are the most sensitive reactions in the model. The enzyme aryl formamidase (AFD) involved in the kynurenine pathway has been shown to be a key enzyme for the analyzed metabolism model. This model successfully simulates tryptophan metabolism by the kynurenin pathway and can be used for future experimental research.

Keywords: tryptophan, metabolism, modeling, sensitivity analysis

Thesis contains: 48 pages, 15 figures, 6 tables, 51 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Ana Jurinjak Tušek, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Jasenka Gajdoš Kljusurić*, Full professor
2. PhD. *Ana Jurinjak Tušek*, Assistant professor
3. PhD. *Maja Benković* Assistant professor
4. PhD. *Irena Keser* Associate professor (substitute)

Thesis defended: July 21st 2020

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. PLANIRANJE PREHRANE PRIMJENOM MODELIRANJA NA RAZINI STANICE	2
2.2.1. Izvori vitamina i potreba za njihovim unosom	6
2.2.2. Poremećaji metabolizma povezani s nedostatkom vitamina.....	9
2.3. METABOLIZAM TRIPTOFANA	11
2.3.1. Važnost triptofana.....	13
2.3.2. Triptofan u prehrani	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI.....	16
3.1.1. CellDesigner.....	16
3.1.2. WR Mathematica 10	19
3.1.3. Opis modela metabolizma triptofana.....	20
3.1.4. Preporuke korištene za planiranje jelovnika	23
3.2. METODE	24
3.2.1. Izrada modela i simulacija u programu CellDesigner	24
3.2.2. Analiza parametarske osjetljivosti	24
3.2.2.1. Lokalna parametarska osjetljivost.....	24
3.2.2.2. Globalna parametarska osjetljivost	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. PRIKAZ MODELA METABOLIZMA TRIPTOFANA IZRAĐENOG U RAČUNALNOM PROGRAMU CellDesigner.....	27
4.2. JELOVNICI ZA PROCJENU DNEVNOG UNOSA TRIPTOFANA	29
4.3. SIMULACIJA MODELA METABOLIZMA TRIPTOFANA U RAČUNALNOM PROGRAMU CellDesigner.....	31
4.4. ANALIZA LOKALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI.....	35
4.5. ANALIZA GLOBALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI	39
5. ZAKLJUČCI	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

Metabolizam je skup kemijskih procesa koji se odvijaju u živom organizmu, a sastoji se od brojnih metaboličkih puteva. Metaboličke mreže su složeni reakcijski sustavi čije glavne funkcije utječu na zadovoljavanje fizioloških uvjeta organizma. Na njih utječu brojne komponente među kojima su i nutrijenti, no još uvijek nije u potpunosti objašnjeno razumijevanje regulacije i interakcija nutritivnih i nenutritivnih komponenti hrane na metabolizam. Matematičko modeliranje metaboličkih sustava dobar je alat za proučavanje prehrambenog utjecaja na metaboličke sustave i takvi modeli često mogu pojasniti i pružiti nove uvide u metabolizam. Modeli zapravo predstavljaju pojednostavljenu stvarnost, odnosno pojednostavljeni prikaz staničnog metabolizma.

Triptofan je jedna od devet esencijalnih aminokiselina koje moramo unositi hranom budući da ih naš organizam ne sintetizira samostalno. Sam triptofan sudjeluje u sintezi proteina, a njegovi metaboliti imaju brojne uloge u našem organizmu, prvenstveno imaju utjecaj na neuropsihološki sustav. Postoji nekoliko puteva razgradnje triptofana, no većina ove aminokiseline u ljudskom organizmu razgrađuje se metaboličkim putem koji se naziva kinureninski put razgradnje triptofana. Osim samog triptofana, bitnu ulogu u ovom putu ima i vitamin B₆ jer njegov aktivni oblik piridoksal-5-fosfat ima ulogu koenzima enzimima kinurenin-amilotransfereaz i kinureninazi te utječe na njihovu regulaciju i inhibiciju.

U ovome radu provesti će se analiza matematičkog modela metabolizma triptofana, a njegove ključne točke definirati će se primjenom analize lokalne i globalne parametarske osjetljivosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. PLANIRANJE PREHRANE PRIMJENOM MODELIRANJA NA RAZINI STANICE

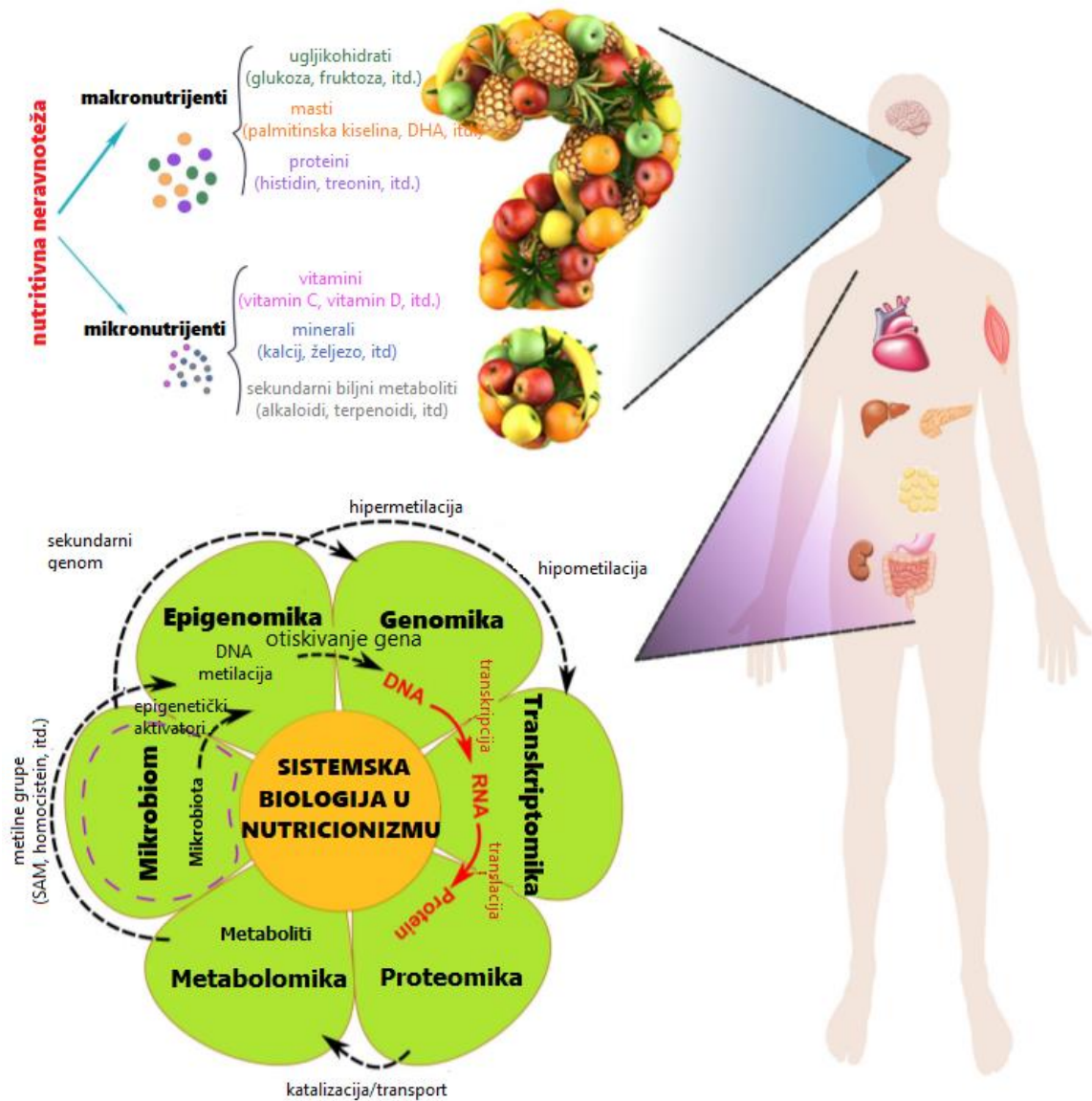
Hrana i zdravlje su usko povezani i naš način prehrane ima veliku utjecaj na naš zdravstveni status, a znanost koja proučava taj odnos je osnova za globalne zdravstvene prehrambene preporuke. Vodeći se tom spoznajom, razna medicinska udruženja uspostavljaju prehrambene smjernice za pojedine grupe pacijenata ovisno o njihovim medicinskim stanjima kao što su hiperglikemija, hipertenzija, hiperkolesterolemija i druge bolesti koje su usko povezane s prehranom (Van Ommen i sur., 2017). Glavni cilj nutricionističkih istraživanja je razumjeti poveznicu između prehrane i zdravlja kako bi se mogle spriječiti bolesti uzrokovane nepravilnom prehranom. Upravo zbog toga, znanost o prehrani obuhvaća velik broj područja istraživanja kako bi se što bolje razumjeli molekularni mehanizmi koji imaju ulogu u prevenciji i zaštiti od bolesti. Primjena sistemske biologije pokazala se kao dobar alat pomoću kojeg se mogu razumjeti mehanizmi djelovanja pojedinih nutrijenata i načina na koji oni promiču zdravlje i sprječavaju bolesti (Badimon i sur., 2016).

Sistemska biologija predstavlja integrirani pristup proučavanja bioloških sustava na razini stanice, organa ili organizma mjerenjem i integriranjem genomskih, proteomskih i metabolomskih podataka (Panagiotou i Nielsen, 2009). Ti prikupljeni podatci stvaraju molekularne skupove podataka koji, nakon što se integriraju u računalne modele, daju modele za predviđanje pomoću kojih se može lakše razumjeti i predvidjeti kako će se određeni biološki sustav ponašati u određenim situacijama. Sistemska biologija uključuje takozvane „omics“ discipline:

- (i) transkriptomika pruža sveukupan prikaz gena koji su aktivni u određenom trenutku u nekom uzorku,
- (ii) proteomska platforma omogućuje identifikaciju i kvantificira ekspresiju proteina te karakterizira posttranslacijske modifikacije,
- (iii) metabolomika je usredotočena na analizu metabolita i njihova sastava, na njihovu dinamiku i interakcije te se smatra da, od ove tri discipline, ona pruža najfunkcionalnije podatke (Badimon i sur., 2016).

Sistemska biologija u nutricionizmu procjenjuje unos hranjivih tvari te je cilj izmjeriti posljedice unosa kao transkriptomске, epigenomske, proteomske i metabolomske signale koji se mogu integrirati u sveobuhvatne, specifične mrežne prikaze kako bi se prikazale

prehrambene varijacije (Zhao i sur., 2015). Na slici 1 prikazani su nutrijenti i tehnologije koje se koriste u sistenskoj biologiji u nutricionizmu.



Slika 1. Prehrambeni faktori i „omic“ tehnologije koje se koriste u sistenskoj biologiji u nutricionizmu (Zhao i sur., 2015)

Ekspresija gena i sinteza proteina, zajedno sa metaboličkim podacima u prehrambenim sustavima omogućuju detaljniju analizu individualnog odgovora organizma na određenu nutritivnu intervenciju što onda omogućava razumijevanje utjecaja komponenti hrane na zdravlje pojedinca i može poslužiti u planiranju prehrane (Badimon i sur., 2016).

Sama primjena računalnog modeliranja i simuliranja porasla je na svim biološkim poljima, no usprkos potencijalu ove tehnike, ona se ipak najviše primjenjuje samo u nutricionizmu. Modeliranje se pokazalo kao izvrsna tehnika za dobivanje odgovora na važna nutricionistička pitanja sve od stanične pa do fiziološke razine. Stoga sve veći broj istraživanja na području znanosti o prehrani uključuje metode upravo iz genomike, transkriptomije, proteomike i metabolomike (de Graaf i sur., 2009). Jedan od primjera je istraživanje u kojem su Pearson i sur. (2016) korištenjem matematičkog modela ljudskog metabolizma proučavali pojavu inzulinske rezistencije u pojedinačnim tkivima ljudskoga organizma. König i sur. (2012) u svom radu predstavljaju detaljan kinetički model glikolize, glukoneogeneze i metabolizma glikogena u hepatocitima ljudi zajedno s hormonalnom kontrolom ovih puteva pomoću inzulina, glukagona i epinefrina te ističu kako njihov model može poslužiti za razumijevanje metabolizma glukoze u cijelom tijelu te razumijevanje uloge jetre u homeostazi glukoze u normalnim uvjetima, ali i kod bolesti kao što je na primjer dijabetesa. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji 422 milijuna ljudi širom cijelog svijeta boluje od dijabetesa, a taj broj te rasprostranjenost dijabetesa se stalno povećava. Dijabetes je kronična bolest koja posljedično može dovest do brojnih komplikacija i oštećenja krvožilnog sustava, bubrega, živčanog sustava i vida (WHO, 2020). Stoga ovakvi modeli metabolizma mogu biti korisni u proučavanju poveznice prehrane i dijabetesa. Na isti način može se proučavati i povezanost unosa prehrambenih lipida i zdravlja. Upravo to su opisali Pratt i sur. u svom radu iz 2015. godine gdje su predstavili matematički model metabolizma lipida u jetri. Postoje brojna druga istraživanja i radovi u kojima se primjenom matematičkih modela i sistemske biologije prikazuje povezanost pojedinih nutrijenata i određenih bolesti te se može zaključiti da ovaj način proučavanja hrane može pomoći za planiranje prehrane pojedinaca.

2.2. VITAMINI U PREHRANI

Otkriće prvih vitamina početkom 20. stoljeća obilježava nutricionizam kao znanost te se to razdoblje smatra početkom znanosti o prehrani. Kroz prošlost je bilo poznato da su pojedine bolesti povezane s prehranom te su se liječile konzumacijom određenih namirnica. Te spoznaje nisu bile prihvaćene u medicinskim krugovima sve do 1912. godine kada je Casimir Funk otkrio da je tvar topljiva u vodi odgovorna za prevenciju bolesti beri-beri, koju je Christian Eijkman izolirao iz neljuštene riže, zapravo amin, a Funk joj je dao naziv „vitamin“ budući da je to amin koji je od životne važnosti (Vranešić Bender i Krstev, 2008).

Vitamini se smatraju esencijalnim organskim mikronutrijentima što znači da su u prehrani čovjeka potrebni u malim količinama. Iako su to nutrijenti čiji unos u malim količinama zadovoljava potrebe organizma za istima, oni imaju značajnu ulogu u održavanju ljudskoga zdravlja (Vranešić Bender i Krstev, 2008). Za vitamine je poznato da su to organski spojevi koji se ne svrstavaju u makronutrijente, ali su jednako važni za naš organizam jer se u njemu ne sintetiziraju stoga je potrebe važno zadovoljiti unosom hrane. Budući da su vitamini važni za brojne fiziološke funkcije, njihov manjak može dovesti do različitih štetnih posljedica u našem organizmu.

Uobičajena su komponenta hrane, a dijele se na one koji su topljivi u mastima i one koji su topljivi u vodi. Vitamini topljivi u mastima su vitamin A, D, E i K, a u topljive u vodi ubrajamo vitamin C te vitamine B skupine (Solan, 2019).

2.2.1. Izvori vitamina i potreba za njihovim unosom

Vitamini su važna sastavnica ljudske prehrane jer se u našem organizmu ne sintetiziraju dovoljno ili se uopće ne sintetiziraju. Bitni su za očuvanje zdravlja jer sudjeluju u metabolizmu masti, ugljikohidrata i proteina kao kofaktori enzimima i koenzimi (Kennedy, 2018). Poznato je da svi vitamini skupine B te vitamini C i K djeluju kao kofaktori u enzimskim reakcijama te određuju aktivnost brojnih enzima. Njihova važnost nije jedino bitna zbog sudjelovanja u metabolizmu, oni imaju brojne druge funkcije. Djeluju kao antioksidansi, kao ligandi za stanične receptore ili u proteinima koji prenose svjetlost (Stolz i Daniel, 2012).

Budući da se vitamini ne sintetiziraju u našem tijelu važna je raznovrsna i uravnotežena prehrana kako bi osigurali dovoljne količine za održavanje zdravlja. Vitamini su organske tvari koje proizvode i biljke i životinje te je najbolji način za dostatan unos konzumacija velikog broja namirnica. Ako u svoju prehranu uključimo raznoliko voće i povrće, cjelovite žitarice, leguminoze te mlijeko i mliječne proizvode, lako ćemo zadovoljiti dnevne potrebe za svim vitaminima (Solan, 2016).

Vitamin A

Skupinu retinoida topivih u mastima, uključujući retinol, retinal i retinilne estere, zajedno nazivamo vitamin A. Vitamin A važan je za funkciju našeg organizma jer je uključen u imunološki sustav, vid, reprodukciju i komunikaciju među stanicama te njihov rast i diferencijaciju. Nutritivne potrebe za ovim vitaminom osiguravaju se iz dva oblika, retinolom u namirnicama životinjskog porijekla i provitamin A karotenoidima prisutnim u namirnicama biljnog porijekla. Najbogatiji izvor ovog vitamina su jetrica i riba, a ostali dobri izvori mogu biti mlijeko, jaja, zeleno lisnato povrće, rajčica, mrkva te drugo povrće i voće (NIH, 2020).

Vitamin D

Našem organizmu potreban je vitamin D kako bi održao normalne razine kalcija i fosfora u krvi što posljedično dovodi do njegove potrebe u mineralizaciji kostiju, mišićnoj kontrakciji te općenito funkciji svih stanica u tijelu. Potrebe našeg organizma za vitaminom D možemo zadovoljiti na dva načina. Jedan način je njegova sinteza u koži iz prekursora 7-dehidrokolesterola izlaganjem suncu, a drugi način je prehranom (FAO/WHO, 2004). Namirnice kojima unosimo vitamin D su obogaćene žitarice i mlijeko te masna riba (Solan, 2019).

Vitamin E

Najvažniji antioksidant topiv u lipidima u staničnom obrambenom sustavu je vitamin E koji se u organizmu dobiva isključivo iz prehrane. Pojam vitamin E zapravo se odnosi na skupinu od osam prirodnih homologa koji se sintetiziraju u biljkama iz homogentisične kiseline, četiri homologa tokoferola i četiri tokotrienola, a u prehrambene svrhe aktivnost vitamina E izražena je u ekvivalentima α -tokoferola (FAO/WHO, 2004). Vitamin E u našem tijelu djeluje kao antioksidant, odnosno štiti naše tkivo od oštećenja izazvanih slobodnim radikalima te ima ulogu u određenim stanjima povezanim sa starenjem. Ovaj vitamin nam je potreban za jačanje imunog sustava protiv virusa i bakterija te je važan za stvaranje crvenih krvnih zrnaca, pomaže pri širenju krvnih žila te sprječava grušanje krvi. Prehrambeni izvori vitamina E uključuju biljna ulja, orašaste plodove, sjemenke te zeleno lisnato povrće (Wax, 2020).

Vitamin K

Vitamin K je esencijalan mikronutrijent topiv u mastima koji je potreban za kemijske modifikacije male grupe proteina nakon njihove translacije. Ti proteini imaju svojstvo vezivanja kalcija te su poznati pod nazivom vitamin K-ovisni proteini ili Gla proteini, a najvažnija zdravstvena uloga ovog vitamina je održavanje normalne koagulacije krvi. Najvažniji prehrambeni izvor vitamina K su zeleno lisnato povrće i biljna ulja (FAO/WHO, 2004).

Vitamin C

Vitamin C, koji je još poznat i kao askorbinska kiselina, ima nekoliko važnih uloga u ljudskom organizmu. On štiti naše stanice budući da ima antioksidativnu aktivnost te održavajući ih zdravim ujedno održava i našu kožu, krvne žile, kosti i hrskavice zdravima, a također pomaže pri zacjeljivanju rana. Vitamin C je prisutan u brojnom voću i povrću kao što su citrusi i sok od citrusa, paprika, jagode, ribiz, krumpir, brokula, prokulice i drugo. Kako je ovaj vitamin raspoloživ u velikom broju biljnih namirnica, blagi nedostatak se može javiti kod osoba za siromašnom i vrlo ograničenom prehranom (NHS, 2017).

Vitamini B skupine

U ovo skupinu ubrajamo tiamin (B_1), riboflavin (B_2), niacin (B_3), pantotenska kiselina (B_5), piridoksin (B_6), biotin (B_7), folat (B_9) i kobalamin (B_{12}), a glavna uloga u organizmu im je da djeluju kao koenzimi. Tiamin ima bitnu ulogu u stvaranju energije, u sklopu koenzim tiamin

pirofosfat (TPP) sudjeluje u metabolizmu ugljikohidrata i razgranatih aminokiselina, a vitamin B₆ ima ulogu koenzima u metabolizmu aminokiselina, glikogena i sfingoidnih baza. Riboflavin ima ulogu koenzima u brojnim oksidacijskim i redukcijskim reakcijama, dok niacin sudjeluje kao kosupstrat i koenzim brojnih dehidrogenaza u prijenosu vodika. Pantotenska kiselina je dio koenzima A i fosfopanteteina uključenih u metabolizam masnih kiselina. Biotin ima ulogu koenzima u bikarbonat-ovisnim karboksilacijama. Budući da ovi vitamini sudjeluju u brojnim bitnim metabolizmima vrlo je važno zadovoljiti potrebne količine, a to se postiže raznovrsnom i uravnoteženom prehranom. Dobri izvori vitamina B skupine su svinjetina, iznutrice, mlijeko i mliječni proizvodi, cjelovite žitarice te leguminoze (FAO/WHO, 2004).

2.2.2. Poremećaji metabolizma povezani s nedostatkom vitamina

Biološki aktivni oblici vitamina B skupine imaju ulogu u nekoliko vitalnih metaboličkih procesa, uključeni su u metabolizam ugljikohidrata važnog za proizvodnju energije, metabolizam aminokiselina i masnih kiselina te lipida, stoga se određeni poremećaji metabolizma povezuju s nedostatkom upravo ovih vitamina. Poseban rizik za nedostatnim unosom vitamina B skupine imaju osobe starije dobi, siromašni, kronični alkoholičari, vegetarijanci i vegani, pacijenti s gastrointestinalnim, srčanim i neuropsihološkim poremećajima i pacijenti na parenteralnoj prehrani koja nije adekvatna (Sechi i sur., 2016).

Uloga tiamina je da djeluje kao specifični kofaktor u određenim enzimskim sustavima koji uključuju dekarboksilaciju i transketolaciju, a dostupnost tiamina preduvjet je normalne stanične funkcije. Svaki poremećaj na razini nedostatka tiamina može za posljedicu imati ozbiljne neurološke probleme jer dolazi do poremećaja u metabolizmu energije potrebne mozgu (Jhala i Hazell, 2011). Ukoliko dođe do nedostatka tiamina, dolazi do poremećaja metabolizma ugljikohidrata i njegove povezanosti s metabolizmom aminokiselina što ima ozbiljne posljedice poput smanjenog stvaranja acetilkolina bitnog za održavanje normalne neuralne funkcije (FAO/WHO, 2004). Enzimski sustavi u kojima vitamin B₁ ima bitnu ulogu u obliku tiamin difosfata su kompleks piruvat dehidrogenaza, organizirani skup enzima koji povezuje glikolizu s ciklusom limunske kiseline, α -ketogkutarat dehidrogenaza kompleks, višekomponentni enzimski kompleks povezan s ciklusom limunske kiseline te transketolaze koji su ključni sudionici pentoza fosfatnog šanta koji je uključen u biosintezu nukleinske kiseline i lipida (Jhala i Hazell, 2011).

Riboflavin ima ulogu prekursora koenzimima flavin adenin dinukleotida (FAD) i flavin mononukleotida (FAM) koji su uključeni u ključne regulatorne puteve mitohondrija kao što su metabolizam aminokiselina, masnih kiselina i purina te oksidacijsko-redukcijske reakcije koje su potrebne za normalan stanični rast i razvoj (Udhayabanu i sur., 2017). Riboflavin se smatra ključnom sastavnicom za proizvodnju energije unutar mitohondrija, a posebno je važan za normalnu proizvodnju ATP-a što dovodi do stabilnosti membrane u održavanju adekvatne stanične funkcije povezane s energijom (Colombo i sur., 2014).

Niacin je izraz koji se koristi za nikotinsku kiselinu, ali i nikotinamid. Nikotinamid je drugi oblik vitamina B₃ te se nalazi unutar redoks aktivnih koenzima nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) i njegovog fosfata (NADP), a ti koenzimi djeluju u dehidrogenaza-reduktaza sustavima koji zahtijevaju prijenos vodikovog iona. NAD je potreban za reakcije adenozin difosfat riboze

uključene u obnavljanje DNK te sudjeluje u staničnom disanju s enzimima koji sudjeluju u oksidaciji gliceraldehid-3-fosfata, laktata, alkohola, 3-hidroksibutirata u piruvata, a NADP ima ulogu u reduktivnim biosintezama kao što su sinteza masnih kiselina i steroida te u oksidaciji glukoza-6-fosfata do riboza-5-fosfata u put pentoza-fosfatu (FAO/WHO, 2004).

Povezanost vitamina B₆ i ljudskog metabolizma uključuje sintezu i interkonverziju aminokiselina, neurotransmitera, nukleinskih kiselina, hema i lipida te također ima važnu ulogu u energetske homeostazi kroz razgradnju glikogena i glukoneogenezu. Aktivni oblik ovog vitamina je piridoksal-5-fosfat (PLP) koji ima ulogu koenzima u svim većim enzimskim klasama, osim ligaza (Ulvik i sur., 2019). Nedostatak ovog vitamina najčešće se javlja kod pothranjenosti, malapsorpcije, kao nuspojava korištenja određenih lijekova te kod alkoholizma. Unos alkohola djeluje na proizvodnju acetaldehida koji se natječe sa PLP za vezna mjesta na PLP ovisnim enzimima (Sechi i sur., 2016). PLP je uključen u metabolizam brojnih aminokiselina, ali najranije opisani indikator nedostatka vitamina B₆ je povećano izlučivanje ksanturenske kiseline urinom koja je katabolit triptofana (Ulvik i sur., 2019).

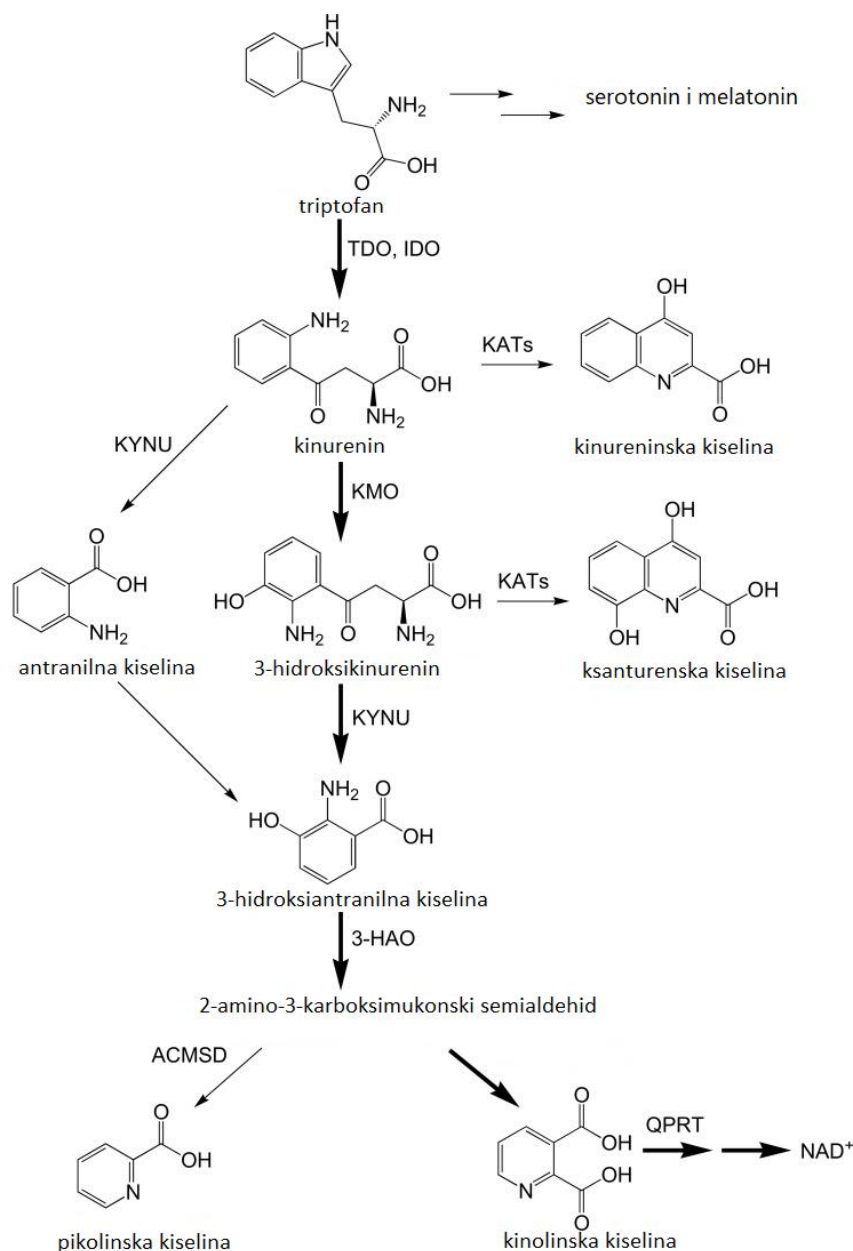
2.3. METABOLIZAM TRIPTOFANA

Glavna uloga triptofana u ljudskom organizmu je ta da je on sastavni dio sinteze proteina. To je aminokiselina koja zajedno s devetnaest drugih gradi sve proteine u našem organizmu. Triptofan se skladišti u tkivu u niskim koncentracijama, a sveukupna razina triptofana u organizmu je niska te je on manje dostupan u odnosu na ostale aminokiseline potrebne za sintezu proteina. Iz tog razloga, triptofan predstavlja ograničavajući faktor u sintezi proteina te brzina sinteze ovisi o dostupnosti triptofana (Richard i sur., 2009).

Osim što triptofan ima nezamjenjivu ulogu u sintezi proteina, ta esencijalna aminokiselina je prekursor mnogih metabolita koji imaju značajnu fiziološku ulogu, a nastaju tijekom njegove razgradnje. Razgradnja triptofana odvija se putem četiri različita puta od koji tri imaju manji kvantitativni značaj, a to su hidrosilacija gdje kao najvažniji produkti nastaju 5-hidroksitriptamin, odnosno serotonin te melatonin, dekarboksilacija pri kojoj nastaje triptamin i na kraju transaminacija čiji važni produkt je indolepiruinska kiselina. Četvrti mogući put razgradnje je kinureninski put koji čini oko 95 % ukupne razgradnje triptofana. Ovaj put razgradnje proizvodi brojne biološki aktivne metabolite kao što su važni redoks kofaktori nikotinamid adenin dinukleotid i nikotinamid dinukleotid fosfat, niacin koji se odnosi na nikotinamid i nikotin zajedno, pikolinska kiselina, kinolinska i kinureninska kiselina te 3-hidroksikinurenin i 3-hidroksiantranilna kiselina (Badawy, 2017).

Kinureninski put razgradnje triptofana (slika 2) odvija se u jetri gdje prvo dolazi do oksidacije triptofana u N-formilkinurenin reakcijom koju katalizira enzim triptofan 2,3-dioksidogenaza (TDO), a istu tu reakciju u nejetrenim tkivima katalizira indolamin 2,3-dioksidogenaza (IDO) te ta dva enzima imaju bitnu ulogu u homeostazi triptofana (Rios-Avila i sur., 2013). N-formilkinurenin se nakon toga razgrađuje do L-kinurenina (Kyn) reakcijom kataliziranom aril formamidazom (AFD), a iz nastalog L-kinurenin mogu nastati tri različita produkta pomoću tri različita puta. Ta tri produkta uključuju kinureninsku kiselinu (KA) koji nastaje reakcijom koju katalizira kinurenin-amilotransferaza (KAT), antranilnu kiselinu (AA) uz enzim kinureninazu (KYNU) te 3-hidroksikinurenin (HK) koji nastaje reakcijom kataliziranom kinurenin 3-monooksigenazom (KMO) (González i sur., 2017). Iz 3-hidroksikinurenina daljnjom razgradnjom nastaju ksanturenska kiselina (XA) reakcijom kataliziranom kinurenin-amilotransferazom te reakcijom kataliziranom kinureninazom nastaje 3-hidroksiantranilna kiselina (HaA) koja se dalje razgrađuje do kinolinske kiseline (Qa) reakcijom kataliziranom enzimom oksidogenaza 3-hidroksiantranilne kiseline (3-HAO) (Rios-Avila i sur., 2013). Enzim

fosforinozil transferaza kinolinske kiseline (QPRT) pretvara kinolinsku kiselinu u nikotinamid ribonukleotid (NANM), što je prvi korak *de novo* sinteze NAD^+ . Još jedan mogući produkt je pikolinska kiselina koja nastaje iz 1-amino-karboksimumkenskog semialdehida djelovanjem enzima dekarboksilaze aminokarboksimumkenskog semialdehida (ACMSD).



Slika 2. Pojednostavljeni prikaz kinureninskog puta razgradnje triptofana (Jacobs i sur., 2017)

Vitamin B₆ ima važnu ulogu u kinureninskom putu jer je piridoksal-5-fosfat, koji je aktivni oblik vitamina B₆, djeluje kao koenzim enzimima kinureninazi i kinurenin-amilotransferazi. Kako su ti enzimi ovisni o PLP-u, njihova aktivnost smanjena je u slučaju nedostatka vitamina B₆ (Badawy, 2017).

Jedan od spomenutih puteva metabolizma triptofana je onaj gdje kao produkt nastaje 5-hidroksitriptamin, odnosno serotonin. Sinteza serotonina odvija se u probavnom sustavu i u mozgu. U probavnom sustavu serotonin se sintetizira unutar crijevnih neurona i enterokromafinskih stanica, a u mozgu unutar neurona u jezgrama rafe (Jenkins i sur., 2016). Za sintezu serotonina u mozgu prvo je potrebno da triptofan uđe u središnji živčani sustav preko krv-mozak barijere. Triptofan je supstrat za neutralni aminokiselinski transportni sustav te se natječe s nekoliko drugih aminokiselina esencijalnih za rad mozga za transport. Nakon što triptofan dospije u mozak, djelovanjem enzima hidroksilaze tip 2, triptofan se hidroksilira do 5-hidroksitriptofana. Nakon toga slijedi dekarboksilacija 5-hidroksitriptofana uz enzim dekarboksilazu L-aromatske kiseline do 5-hidroksitriptamina, odnosno serotonina (Jenkins i sur., 2016). Iako se uglavnom povezuje s mozgom, većina serotonina nalazi se u crijevima gdje se sintetizira iz triptofana u enterokromafinskim stanicama gastrointestinalnog trakta. Sinteza serotonina u probavnom sustavu slična je sintezi u mozgu. Prvi korak je hidroksilacija triptofana uz enzim triptofan hidroksilazu koji kod normalne koncentracije triptofana nije zasićen, a kod povećane koncentracije triptofana može rezultirati povećanim metabolizmom. Sljedeći korak je dekarboksilacije novonastalog međuprodukta uz enzim dekarboksilazu aromatski aminokiselina pri čemu iz 5-hidroksitriptofana nastaje 5-hidroksitriptamin (O'Mahony i sur., 2015).

2.3.1. Važnost triptofana

Triptofan je jedna od devet esencijalnih aminokiselina, što znači da je potreban našem organizmu za normalno funkcioniranje, a ne sintetiziramo ga sami već potrebe za njim moramo zadovoljiti prehranom. Samo mali udio triptofana u organizmu koristi se za biosintezu proteina, a ostatak služi za pretvorbu u biomolekule od velike važnosti, a uglavnom su to spojevi bitni za neuroimunološke procese signalizacije (Strasser i sur., 2016). Najveći udio triptofana metabolizira se kinureninskim putem pri čemu nastaje veliki broj metabolita zajednički nazvanim kinureini koji su uključeni u upalne i imunološke odgovore te u neurotransmisiju. Osim proizvodnje kinureina, triptofan se metabolizira do serotonina koji je važan

neurotransmitter uključen u kontrolu i odgovor na podražaje u središnjem živčanom sustavu (Cervenka i sur., 2017).

Na metabolizam triptofana utjecaj ima regulacija imunološkog sustava. U imunološkim stanicama kao i u većini ekstrahepatičkih tkiva, kinureninski put pokreće enzim IDO koji ima afinitet prema triptofanu, ali i drugim supstratima uključujući 5-hidroksitriptofan i serotonin. IDO je visoko reguliran u imunološkom sustavu, a aktivnost mu je pojačana interferonom-g (IFN-g), tumor nekroza faktorom α (TNF α) te patogenim infekcijama (Cervenka i sur., 2017). Kako IDO katalizira reakciju pretvorbe triptofana u kinurenin, u kliničkim stanjima koja uključuju akutnu ili kroničnu aktivaciju imunološkog sustava te stanjima gdje se pristupa terapiji citokinima dolazi do nižih razina triptofana i većeg omjera kinurenina prema triptofanu što se često povezuje s povećanim rizikom od neuropsihijatrijskih poremećaja poput depresije (Strasser i sur., 2016).

Najviše proučavani poremećaji vezani uz metabolizam triptofana su poremećaji živčanog sustava te on ima učinak na depresiju, shizofreniju, Alzheimerovu i Parkinsonovu bolest. Jedna od uloga triptofana u ljudskom organizmu je nastanak serotonina pri čemu ova esencijalna aminokiselina služi kao prekursor.

Metabolizam triptofana i serotonina ima bitnu ulogu u raspoloženju i kognitivnim funkcijama. Glavni simptom depresije je pad raspoloženja, a glavna terapijska sredstva za liječenje te sve raširenije bolesti su antidepresivi, uglavnom su to selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina ili kombinacija inhibitora ponovne pohrane serotonina i noradrenalina (Jenkins i sur., 2016). Ovi lijekovi djeluju tako da blokirajući ponovnu pohranu serotonina povećavaju koncentraciju ovog neurotransmitera u sinapsi što dovodi do pojačane postsinaptičke aktivnosti neurona (Strasser i sur., 2016). Učinak serotonina na raspoloženje ispituje se tehnikom akutnog smanjenja triptofana gdje se smanjenjem razine triptofana u prehrani uzrokuje smanjenje razine serotonina što omogućuje analizu ponašanja ovisnog o serotoninu (Jenkins i sur., 2016).

2.3.2. Triptofan u prehrani

Triptofan je esencijalna aminokiselina koja je našem organizmu potrebna za normalna rast te služi kao prekursor brojnih bioaktivnih spojeva i zbog toga ima velik utjecaj na pojavu raznih bolesti i stanja. S obzirom na to da je triptofan esencijalna aminokiselina i ne sintetizira se u našem organizmu, potrebe za njim potrebno je zadovoljiti prehranom. Preporučena dnevna doza triptofana za odrasle osobe procjenjuje se na 3,5 do 6 mg triptofana po kilogramu tjelesne mase što znači da je potrebni prehrambeni unos između 250 i 425 mg na dan za prosječnu odraslu osobu. Većina pojedinaca dnevno unosi između 900 i 1000 mg ove esencijalne aminokiseline što znači da su dnevne potrebe i više nego zadovoljene, a neki uobičajeni prehrambeni izvori triptofana su mlijeko, sir, tuna, piletina, puretina, čokolada (Richard i sur., 2009).

Hrana koja obiluje triptofanom su također i namirnice biljnog porijekla kao što su orašasti plodovi poput oraha, kikirikija, badema i indijskih oraščića, sjemenke kao što su sezam, bućine i suncokretove sjemenke, zatim soja, pšenica, riža, kukuruz. Unos ovih namirnica povećava udio triptofana u našem organizmu što posljedično inducira enzimske mehanizme u jetri i krvi. Kao posljedica te reakcije na povišene razine triptofana u krvi dolazi do povećanja koncentracije metabolita triptofana poput serotonina, kinurenina i njegovih katabolita (Strasser i sur., 2016).

Namirnice bogate triptofanom mogu se smatrati hranom za raspoloženje i hranom za mozak. Takvom hranom obično se smatra ona hrana koja posjeduje svojstvo zaštite moždanog tkiva od oštećenja uzrokovanih oksidativnim stresom i ona hrana koja utječe na sintezu neurotransmitera serotonina, adrenalina (epinefrin) i noradrenalin (norepinefrin), koji potječu od prekursora aminokiselina triptofana, fenilalanina i tirozina. Biosinteza tih neurotransmitera odvija se reakcijama koje uključuju enzime triptofan 5-hidroksilazu, fenilalanin 4-hidroksilazu i tirozin 3-hidroksilazu, a svi ti enzimi zahtijevaju BH_4 kao kofaktor. BH_4 je snažno redukcijsko sredstvo te lako podliježe oksidaciji, stoga okolina bogata antioksidansima može produžiti životni vijek BH_4 i doprinijeti povećanju aktivnost ovih enzima ovisnih o BH_4 te biosintezi navedenih neurotransmitera. Ova poveznica može objasniti zašto se hrana bogata antioksidansima i određenim aminokiselinama, uključujući i triptofan, smatra hranom koja utječe na dobro raspoloženja i poboljšavanje kognitivnih sposobnosti (Strasser i sur., 2016).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za izradu ovoga rada korišten je računalni program namijenjen za prikazivanje gensko-regulatornih i biokemijskih mreža *CellDesigner 4.4.2* (Systems Biology Institute, Tokyo, Japan), sustav za tehničko računanje *WR Mathematica 10* (Wolfram Research, Champaign, Illions, SAD) te *MS Excel 365* (Microsoft, Redmond, Washington, SAD).

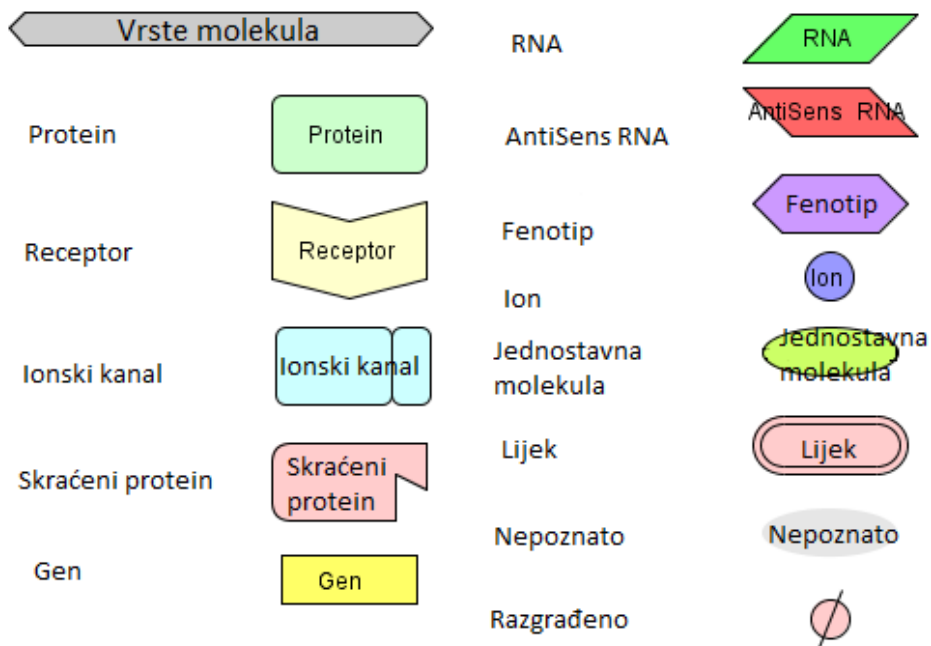
3.1.1. CellDesigner

Sistemska biologija predstavlja integrirani pristup proučavanja bioloških sustava kombiniranjem teorije i računalnih modela za što je bilo nužno razviti softver kojim će se omogućiti ovakav pristup. *CellDesigner* je alat namijenjen za modeliranje biokemijskih mreža s grafičkim korisničkim sučeljem, omogućuje crtanje gensko-regulatornih i metaboličkih mreža na temelju dijagrama te se pohranjuju korištenjem SBML (Systems Biology Markup Language) što je standard za predstavljanje mreža (SBI, 2020).

Glavne značajke ovog programa su:

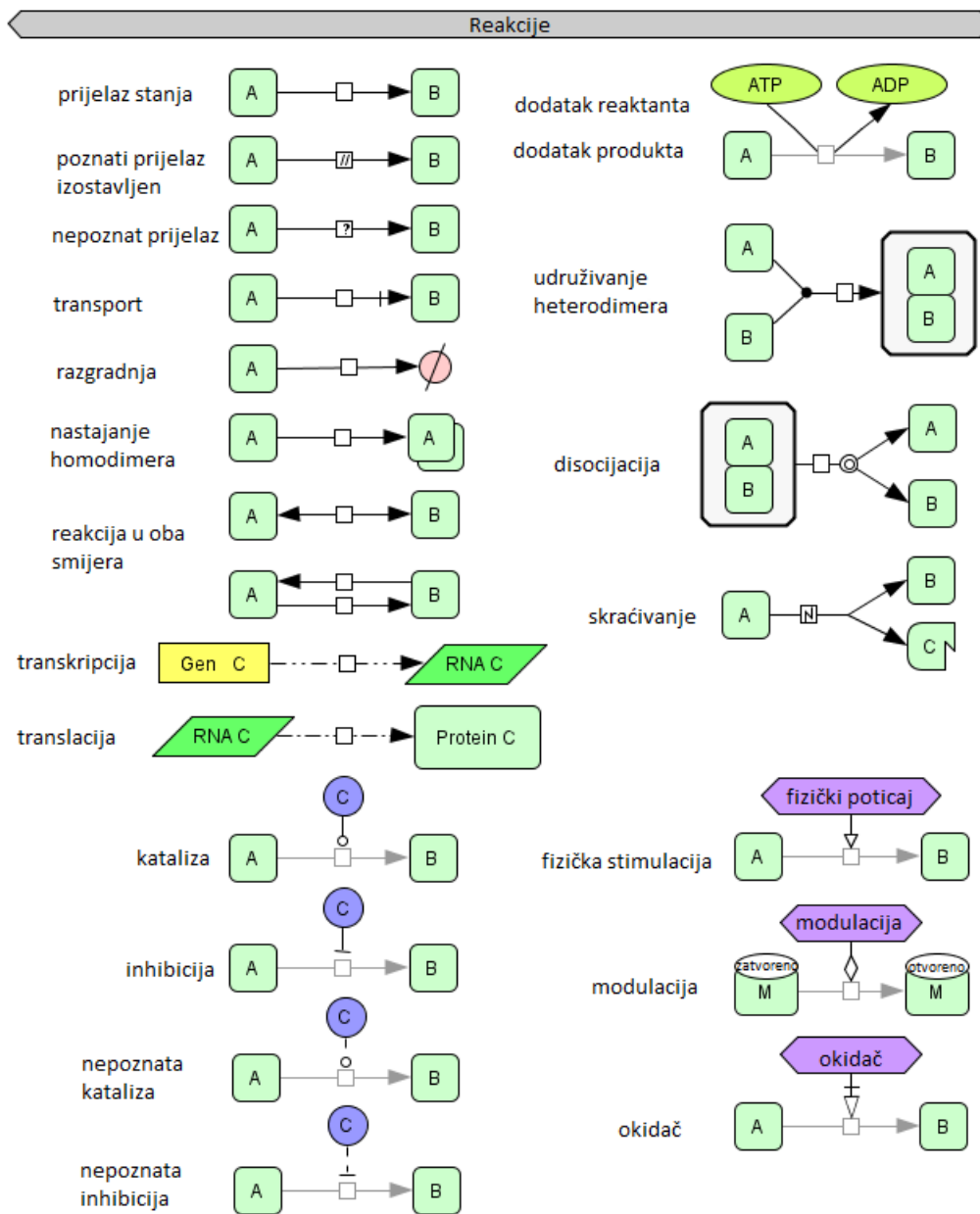
- omogućuje modeliranje biokemijskih mreža regulatornih gena
- vizualni prikaz biokemijske semantike
- sveobuhvatni grafički prikaz
- sukladan s SBML-om
- povezuje se s bazama podataka (SBI, 2019)

Izrada modela pomoću programa *CellDesigner* prilično je jednostavna. Kako bi se stvorio novi model u izborniku "Datoteka" odabire se "Novo" čime se otvara prozor za upis naziva modela i dimenzija te se stvara novi dokument za model. Nakon toga, korisnik može odabrati odgovarajuću vrstu molekule, kao što su proteini, geni, RNA, ioni, jednostavne molekule i druge, prikazane na slici 3, iz alatne trake te im dodjeljuje željeni naziv i veličinu i smješta ih unutar radnog prozora. Svim molekulama naknadno se može mijenjati veličina te pozicija unutar modela (Funahashi i sur., 2003).



Slika 3. Vrste simbola u programu *CellDesigner* (SBI, 2010)

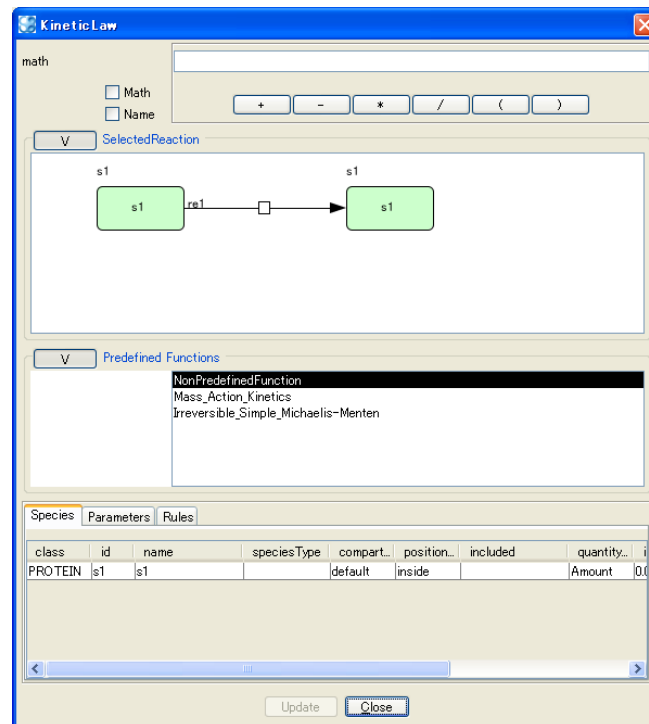
Nakon što se dodaju molekule, one se međusobno povezuju strelicama s alatne trake koje predstavljaju različite reakcije poput transporta, katalize, inhibicije, aktivacije i slično (slika 4). Prvo se odabire vrsta reakcije, zatim se označi reaktant te se povezuje s produktom, a također postoji i mogućnost dodatka više reaktanata (Funahashi i sur., 2003).



Slika 4. Reakcije u programu *CellDesigner* (SBI, 2010a)

Kako bi se omogućila simulacija modela potrebno je navesti početne vrijednosti komponenti te kinetičke zakone i parametre za reakcije. Kinetički zakon za reakciju upisuje se na način da se desnim klikom pokazivača miša na strelicu reakcije odabere unos kinetičkog zakona [Edit Kinetic Law], time se otvara novi prozor prikazan na slici 5, gdje se mogu upisati jednadžba reakcije i kinetički parametri (SBI, 2010b). Kada imamo upisane sve kinetičke reakcije, parametre i početne koncentracije molekula pokreće se simulacija te dobivamo rezultate u numeričkom i grafičkom obliku. Izrađeni model spremljen je u SBML dokumentu koji sadrži

sve informacije koje se odnose na molekule, reakcije, modifikatore, podatke o rasporedu, transporte, modifikacije ostataka i tako dalje (Funahashi i sur., 2003).



Slika 5. Prozor za unos kinetičkog zakona i parametara (SBI, 2010b)

3.1.2. *WR Mathematica*

Wolfram Mathematica je računalni sustav koji omogućava tehničko računanje čitavog niza složenih računskih operacija. Objedinjuje matematičko znanje iz priručnika, ali koristi i kompleksnije algoritme kako bi se mogla proširiti primjena ovoga sustava. *WR Mathematica* omogućuje unos podataka u svim formatima te upravljanje njima pomoću fleksibilnih funkcija što omogućuje kombinaciju teksta, tablica, grafičkih prikaza, proračuna i drugih elemenata. Sustav se sastoji od dijela koji obavlja računski dio, jezgre, te radnog sučelja kojeg korisnik koristi kako bi se unijeli podaci, radna bilježnica (Wolfram, 2003).

3.1.3. Opis modela metabolizma triptofana

U ovom radu provedena je analiza matematičkog modela metabolizma triptofana preko kinureninskoga puta predloženog od strane Rios-Avila i sur. u radu iz 2013. godine. Model se temelji na već objavljenim podacima o koncentraciji triptofana i njegovih metabolita u jetri sisavaca, kinetici transportera koji su uključeni u transport triptofana između različitih tkiva te kinetici enzima uključenih u kinureninski put razgradnje.

Model se sastoji od 16 varijabli, 22 biokemijske reakcije koje su navedene u tablici 1. uz pripadajuće kinetičke izraze i 44 kinetička parametra. Korištene kinetičke konstante uzete su od različitih vrsta, odnosno od čovjeka, štakora i miševa, kako bi se točnije procijenio metabolizam triptofana u cijelom tijelu i njihove vrijednosti su dane u tablici 2. U model je uključeno šest odjeljaka, a to su jetra, želudac, portalna i periferna cirkulacija, mišići i mozak.

Tablica 1. Popis biokemijskih reakcija i pripadajući kinetički izrazi (V_{max} – maksimalna brzina reakcije; K_m – konstanta zasićenosti; K_i – inhibicijska konstanta; k – brzina reakcije; d – koeficijent uklanjanja; AA – antranilna kiselina; HaA – 3-hidroksiantranilna kiselina; HaA – 3-hidroksiantranilna kiselina; HK – 3- hidroksikinurenin; KA – kinureninska kiselina; Kyn – L-kinurenin; NFK – N-formilkinurenin; PLP – piridoksal-5-fosfat; QA – kinolinska kiselina; XA – ksanturenska kiselina; trp- triptofan u jetri; trp_mi – triptofan u mišićima; trp_per – triptofan u perifernoj cirkulaciji; trp_por – triptofan u portalnoj cirkulaciji) (Rios-Avila i sur., 2013)

REAKCIJA	KINETIČKI IZRAZ
triptofan (želudac) → triptofan (portalna cirkulacija)	$V_1 = k_1 \cdot trp$
triptofan (portalna cirkulacija) → triptofan (jetra)	$V_2 = k_2 \cdot trp$
triptofan (jetra) → jpool	$V_3 = k_3 \cdot trp$
triptofan → n-formil-kinurenin	$V_4 = \frac{V_{max4} \cdot trp^2}{K_{mtrp} + trp + \frac{trp^2}{K_{trp}}} \cdot \frac{2 \cdot trp^3}{(20,15)^3 + trp^3}$
n-formil-kinurenin → kinurenin	$V_5 = \frac{V_{max5} \cdot NFK}{K_m \cdot \left(1 + \frac{K_{yn}}{K_i}\right) + NFK}$
kinurenin + piridoksal-5-fosfat → kinureninska kiselina	$V_6 = \frac{V_{max6} \cdot Kyn \cdot PLP}{(K_{mKyn} + Kyn) \cdot (K_{mPLP} + PLP)}$

kinurenin + piridoksal-5-fosfat → antranilna kiselina	$V_7 = \frac{V_{max7} \cdot Kyn \cdot PLP}{(K_{mKyn} \cdot \left(1 + \frac{Kyn}{K_{iKyn}}\right) + Kyn) \cdot (K_{mPLP} + PLP)}$
kinurenin → 3-hidroksikinurenin	$V_8 = \frac{V_{max8} \cdot Kyn}{K_{mKyn} + Kyn}$
3-hidroksikinurenin + piridoksal-5-fosfat → ksanturenska kiselina	$V_9 = \frac{V_{max9} \cdot HK \cdot PLP}{(K_{mHK} + HK) \cdot (K_{mPLP} + PLP)}$
5-hidroksikinurenin + PLP → 3-hidroksiantranilna kiselina	$V_{10} = \frac{V_{max10} \cdot HK \times PLP}{(K_{mHK} \cdot \left(1 + \frac{Kyn}{K_{iKyn}}\right) + HK) \cdot (K_{mPLP} + PLP)}$
3-hidroksiantranilna kiselina → kinolinska kiselina	$V_{11} = \frac{V_{max11} \cdot HaA}{K_{mHaA} + HaA}$
triptofan (portalna cirkulacija) → triptofan (periferna cirkulacija)	$V_{12} = k_{12} \cdot trp_{por}$
triptofan (periferna cirkulacija) → triptofan (mišić)	$V_{13} = k_{13} \cdot trp_{per}$
triptofan (mišić) → mpool	$V_{14} = k_{14} \cdot trp_{mi}$
triptofan (periferna cirkulacija) → triptofan (mozak)	$V_{15} = k_{15} \cdot trp_{per}$
kinurenin →	$V_{16} = d_3 \cdot Kyn$
kinureninska kiselina → ∅	$V_{17} = d_4 \cdot KA$
antranilna kiselina → ∅	$V_{18} = d_5 \cdot AA$
3-hidroksikinurenin → ∅	$V_{19} = d_6 \cdot HK$
ksanturenska kiselina → ∅	$V_{20} = d_7 \cdot XA$
3- hidroksiantranilna kiselina → ∅	$V_{21} = d_8 \cdot HaA$
kinolinska kiselina → ∅	$V_{22} = d_9 \cdot QA$

Tablica 2. Popis kinetičkih parametara (Rios-Avila i sur., 2013) (V_{max} – maksimalna brzina reakcije; K_m – konstanta zasićenosti; K_i – inhibicijska konstanta; AFD – aril formamidaza; HAO – oksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline; KAT – kinurenin-amilotransferaza; KMO – kinurenin 3-monooksigenaza; KYN – kinureninaza; PRO – sinteza proteina; TDO – triptofan 2,3-dioksigenaza; TRPGS – triptofan od želuca do portalne cirkulacije; TRPSL – triptofan iz portalne cirkulacije u jetru; TRPSM – triptofan iz periferne cirkulacije do mišića; hk – 3-hidroksikinurenin; kyn – L-kinurenin; d – koeficijenti uklanjanja; k – brzina reakcije; m – konstanta miješanja portalne i periferne cirkulacije)

	PARAMETAR	VRIJEDNOST		PARAMETAR	VRIJEDNOST
1	K_{mPRO}	25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	23	$K_{iKYN2kyn}$	20 $\mu\text{mol L}^{-1}$
2	V_{maxPRO}	30 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	24	$V_{maxKYN2}$	512 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
3	K_{mTRPGS}	64 $\mu\text{mol L}^{-1}$	25	$K_{mKAT1kyn}$	4700 $\mu\text{mol L}^{-1}$
4	$V_{maxTRPGS}$	400 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	26	$K_{mKAT1plp}$	0,85 $\mu\text{mol L}^{-1}$
5	K_{mTRPSM}	64 $\mu\text{mol L}^{-1}$	27	$V_{max1KAT}$	1998 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
6	$V_{maxTRPSM}$	840 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	28	$K_{mKAT2hk}$	5000 $\mu\text{mol L}^{-1}$
7	K_{mTRPSL}	64 $\mu\text{mol L}^{-1}$	29	$K_{mKAT2plp}$	0,85 $\mu\text{mol L}^{-1}$
8	$V_{maxTRPSL}$	2000 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	30	$V_{maxKAT2}$	47,952 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
9	K_{mTDO}	43 $\mu\text{mol L}^{-1}$	31	K_{mHAO}	10 $\mu\text{mol L}^{-1}$
10	V_{maxTDO}	100,5 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	32	V_{maxHAO}	2000 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$
11	K_{iTDO}	170 $\mu\text{mol L}^{-1}$	33	d_3	0,2 h^{-1}
12	K_{mAfd}	50 $\mu\text{mol L}^{-1}$	34	d_4	3 h^{-1}
13	V_{maxAFD}	2000 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	35	d_5	240 h^{-1}
14	K_{iAFD}	250 $\mu\text{mol L}^{-1}$	36	d_6	8 h^{-1}
15	K_{mKMO}	25 $\mu\text{mol L}^{-1}$	37	d_7	6 h^{-1}
16	V_{maxKMO}	78,4 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	38	d_8	40 h^{-1}
17	$K_{mKYNkyn}$	240 $\mu\text{mol L}^{-1}$	39	d_9	0,2 h^{-1}
18	$K_{mKYN1plp}$	0,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$	40	k_2	0,0002 h^{-1}
19	$K_{iKYN1kyn}$	20 $\mu\text{mol L}^{-1}$	41	k_{13}	1 h^{-1}
20	$V_{maxKYN1}$	128,46 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{h}^{-1}$	42	k_{14}	1,2 h^{-1}
21	$K_{mKYN2hk}$	3 $\mu\text{mol L}^{-1}$	43	m	7 h^{-1}
22	$K_{mKYNplp}$	0,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$	44	k_1	0.1 h^{-1}

3.1.4. Preporuke korištene za planiranje jelovnika

Pri planiranju prehrane za opću populaciju važno je da je ona raznolika, umjerena i uravnotežena te je neograničen broj namirnica koje se mogu uključiti u svakodnevnu prehranu. No s druge strane, određene prehrane uključuju izbacivanje pojedinih namirnica, bilo zbog bolesti, intolerancija ili određenog načina života. Planiranjem prehrane pomoću baza podataka namirnica može se procijeniti unos pojedinih nutrijenata, a u ovom radu su za potrebe procjene unosa triptofana osmišljena tri jelovnika. Odabrane su tri različita obrasca prehrane, mediteranska i veganska prehrana te redukcijska dijeta. Redukcijska dijeta preporučuje se preuhranjenim i pretilim osobama, a energetska unos bi trebao biti 15-25 % manji od procijenjenih energetske potrebe, mediteranska prehrana se zbog svog povoljnog utjecaja na zdravlje preporučuje između ostalog bolesnicima s kardiovaskularnim bolestima, a veganska prehrana podrazumijeva ne konzumaciju namirnica životinjskog podrijetla kao samostalnih ili kao dio jela ili proizvoda (NN 59/2015). Jelovnici su osmišljeni pomoću USDA baze namirnica koja sadrži veliki broj namirnica te je korištena USDA baza nutrijenata za dobivanje podataka za izračunavanje sadržaja triptofana u pojedinom obroku.

3.2. METODE

3.2.1. Izrada modela i simulacija u programu *CellDesigner*

U ovom radu provedena je simulacija metabolizma triptofana u stanicama jetre, prema modelu kojeg su predložili Rios-Avila i sur. (2013), pomoću računalnog programa *CellDesigner*. Kao ulazni parametar mijenjala je se početna koncentracija triptofana ($c_{o,Trp} = 678,65, 682,56, 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$) te su se pratile promjene vrijednosti koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji, želucu, mišićima i jetri. Vrijednosti dobivene provedenom *CellDesigner* simulacijom prikazane su grafički programom *MS Excel 365*.

3.2.2. Analiza parametarske osjetljivosti

Izbor vrijednosti parametara koje bi trebale odraziti svojstva stvarnog sustava u matematičkom modeliraju predstavlja opći problem. Često je nemoguće točno procijeniti kakve bi te vrijednosti trebale biti te su stoga, u dosta slučajeva, vrijednosti parametara u modelu upitne. Stoga je važno pomno proučiti modele kako bi se ustanovilo koliko vrijednosti parametara zapravo utječu na rezultat modeliranja. Analiza osjetljivosti se koristi za procjenu relativne važnosti ulaznih parametara modela na izlazni rezultat (Kent i sur., 2013). Analiza osjetljivosti je metoda kvantificiranja nesigurnosti kompleksnoga modela bilo koje vrste, a cilj joj je otkriti kritične parametre i početne uvjete modela te kako ulazna nesigurnost utječe na ishod modela. (Marino i sur., 2008).

3.2.2.1. Lokalna parametarska osjetljivost

Analiza lokalne parametarske osjetljivosti predstavlja najjednostavniji način analize parametarske osjetljivosti i podrazumijeva promjenu jednog po jednog ulaznog parametra modela, dok drugi parametri ostaju konstantni. Takve metode pripisuju važnost ulaznim parametrima prema njihovom utjecaju na izlazne rezultate modela. Lokalni pristup može biti koristan ako postoje male nesigurnosti u ulaznim parametrima ili ako je mala interakcija između ulaznih parametara (Link i sur., 2018).

U ovom radu metoda analize lokalne parametarske osjetljivosti primijenjena je na način da se promatrala osjetljivost koncentracija triptofana i njegovih metabolita na promjene vrijednosti kinetičkih parametara. Prema jednadžbi 1 računa se relativna osjetljivost izlaznih veličina, gdje S_{Xi} predstavlja parametarski koeficijent osjetljivosti, k_i vektor koncentracija, c_x vektor parametara sustava, a izraz $\frac{\partial c_x}{\partial k_i}$ je koeficijent lokalne osjetljivosti prvoga reda.

$$S_{X/i} \% = \frac{k_i}{c_x} \cdot \frac{\partial c_x}{\partial k_i} \cdot 100\% \approx \frac{k_i \cdot \Delta c_x}{c_x \cdot \Delta k_i} \cdot 100\% = = \frac{k_i}{c_x} \cdot \frac{c_x \cdot (1,03k_i) - c_x \cdot k_i}{0,3 \cdot k_i} \cdot 100\% \quad [1]$$

Za provođenje ove metode korišten je program *WR Mathematica 10* gdje je se promatrao utjecaj promjena 44 kinetičkih varijabli pojedinačno na 16 veličina modela, odnosno koncentracije triptofana i njegovih metabolita. Rezultati provedene analize obrađeni su u programu *MS Excel*.

3.2.2.2. Globalna parametarska osjetljivost

Analiza globalne parametarske osjetljivosti računa vrijednosti osjetljivosti koeficijenata u širem rasponu od početne vrijednosti definirane modelom ili odabirom odgovarajućeg raspona. Globalna analiza daje niz mogućih vrijednosti, a raspon potencijalnih osjetljivosti za pojedini parametar može obuhvatiti nekoliko redova veličine. Potencijalna osjetljivost za pojedini parametar može obuhvatiti i pozitivne i negativne vrijednosti što pokazuje da parametar može imati pozitivan i negativan utjecaj na sustav (Kent i sur., 2013).

Fourierova analiza (FAST, *Fourier Amplitude Sensitivity Test*) je jedna od najčešće primijenjenih metoda za analizu globalne parametarske osjetljivosti i nesigurnosti u modelima. Ova metoda koristi pristup periodičnog uzorkovanja i Fourierovih transformacija kako bi se razdvojile varijance izlaza modela na djelomične varijance dobivene promjenama različitih parametara modela kako bi se odredila važnost pojedinog parametra za doprinos izlazu modela (Xu i Gertner, 2011).

FAST metoda se temelji na transformaciji višedimenzionalnog skupa parametara u jednodimenzionalno područje pojedinačnog parametra s , nelinearnom transformacijom parametara x_i koje su povezane s parametrom frekvencije ω_i i parametra faznog kuta φ_i (jednadžba 2) :

$$x_i = \frac{1}{2} + \frac{1}{\pi} \arcsin \cdot (\sin (\pi \cdot \omega_i \cdot s + \varphi_i)) \quad [2]$$

Vrijednost parametra s nalazi se u području $s \in [-1, +1]$, što znači da se varijabla s ispituje u tom rasponu prilikom čega se frekvencija i fazni kut odabiru na način da daju nepovezane varijacije parametra. Frekvencije su cijeli brojevi koje čine nerazmjern skup, a fazni kut je proizvoljno odabrana vrijednost iz raspona $\varphi_i \in [-\pi, +\pi]$. Jednadžba 3 definira transformaciju normaliziranog parametra x_i u realni parametar k_i .

$$k_i = \frac{\hat{k}_1}{2} [10^n + 10^{-n} + x(10^n - 10^{-n})] \quad [3]$$

\hat{k}_1 se pri tom odnosi na nominalnu vrijednost parametra, a raspon mu je $k_i \in [10^{-n} \cdot \hat{k}_1, 10^n \cdot \hat{k}_1]$, gdje n označava raspon varijacije parametra.

Izlazne varijable se proširuju na skup Fourierovih serija, a sveukupna varijanca D izlazne funkcije raščlanjuje se na zbrojeve kvadrata Fourierovih koeficijenata A_ω i B_ω (jednadžba 4-6):

$$D = 2 \sum_{\omega=1}^{\infty} (A_\omega^2 + B_\omega^2) \quad [4]$$

$$A_\omega = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\pi}^{\pi} y(s) \cdot \cos(\omega s) \cdot ds \quad [5]$$

$$B_\omega = \frac{1}{2\pi} \cdot \int_{-\pi}^{\pi} y(s) \cdot \sin(\omega s) \cdot ds \quad [6]$$

Koeficijenti osjetljivosti S_i procijenjeni su prema Fourierovim koeficijentima usklađenim utjecajem parametara, a djelomična suma usklađenosti određena je sljedećim izrazom (jednadžba 7-8):

$$D_i = 2 \cdot \sum_{p=1}^M A_{p\omega_i}^2 + B_{p\omega_i}^2 \quad [7]$$

$$S_i = \frac{D_i}{D} \quad [8]$$

pri čemu je M maksimalna frekvencija koja se uzima u obzir u Fourierovom proširenju.

Analiza lokalne i globalne parametarske osjetljivosti provedena je pomoću *WR Mathematica*, a rezultati su obrađeni pomoću *MS Excel 365*.

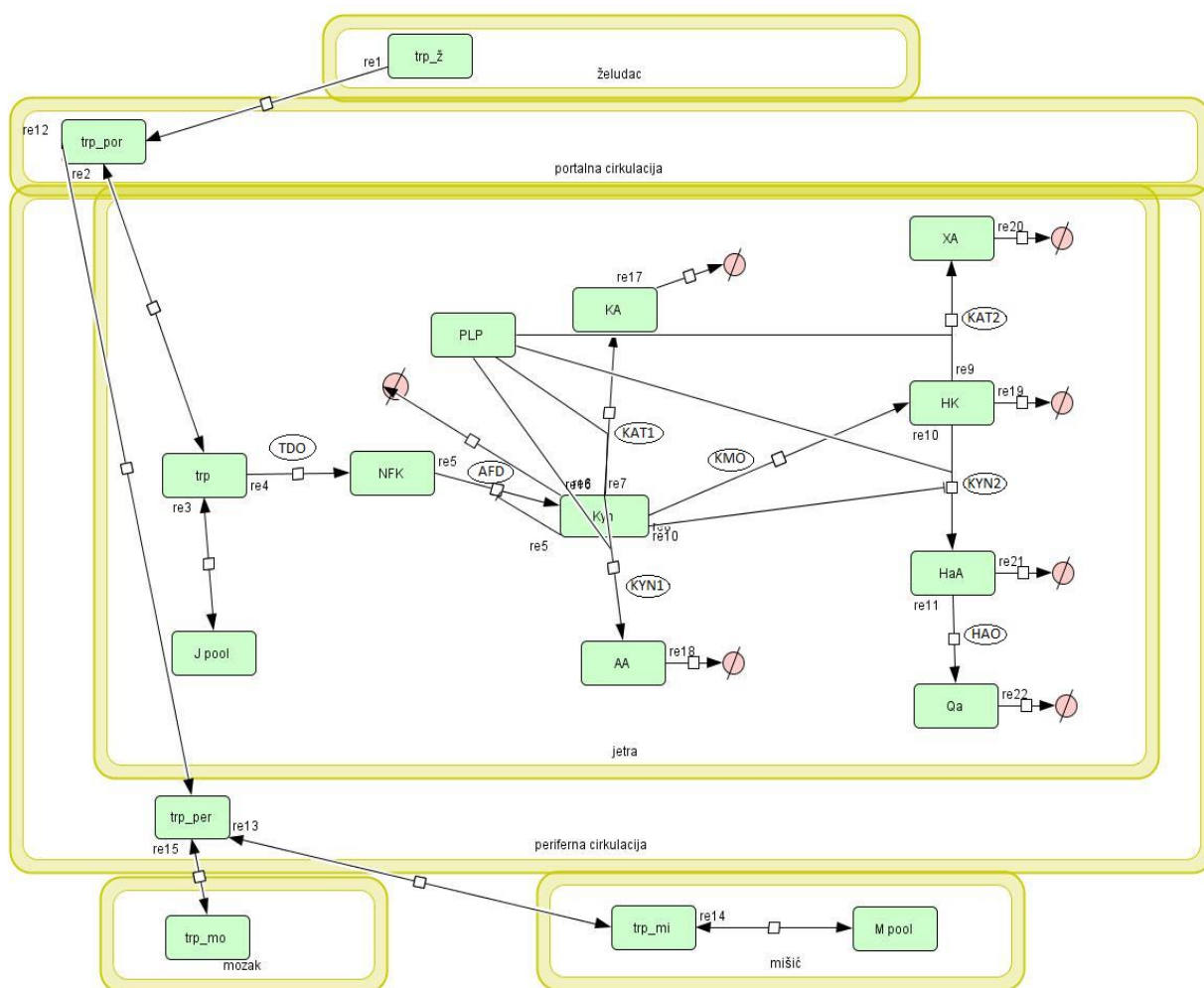
4. REZULTATI I RASPRAVA

U okviru ovoga rada provedena je analiza modela metabolizma triptofana u stanicama jetre putem kinureninskog puta razgradnje. Pomoću provedene simulacije u programu *CellDesigner* praćena je promjena koncentracije triptofana u pojedinim tkivima ljudskoga organizma tijekom 24 sata. Analiza lokalne i globalne parametarske osjetljivosti provedena je pomoću programa *WR Mathematica* što je omogućilo određivanje ključnih kinetičkih parametara u ovom modelu. Model je prikazan na slici 6, a rezultati analize na slikama 7 – 15 i tablici 6.

4.1. PRIKAZ MODELA METABOLIZMA TRIPTOFANA IZRAĐENOG U RAČUNALNOM PROGRAMU *CellDesigner*

U ovom radu prikazan je transport triptofana iz želudca u jetru, mišiće i mozak te portalnu i perifernu cirkulaciju preko modela izrađenog u računalnom programu *CellDesigner*. Model se sastoji od 22 biokemijske reakcije koje opisuju transport triptofana u organizmu i kinureninski put razgradnje triptofana u hepatocitnim stanicama do metabolita te uključuje 16 varijabli. Prvi korak je transport triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju od kud odlazi do jetre. Miješanjem portalne i periferne cirkulacije, triptofan dopijeva u perifernu cirkulaciju od kud se transportira do mišića i mozga. Sami metabolizam, odnosno razgradnja triptofana odvija se u stanicama jetre putem kinureninskog puta koji se sastoji od 8 reakcija pri čemu nastaju metaboliti triptofana koji se zajednički nazivaju kinurenini. U 4 reakcije ovoga puta koje su katalizirane enzimima kinurenin-amilotransfereaza i kinureninaza, piridoksal-5-fosfata (PLP) ima ulogu kofaktora, a metaboliti koji nastaju oslobađaju se iz jetre u cirkulaciju i izlučuju urinom, no u ovom modelu taj korak je zamijenjen linearnim uklanjanjem svakog metabolita kako bi se pojednostavio postupak. Popis reakcija i kinetičkih izraza navedenih reakcija dan je u tablici 1, a popis 44 kinetička parametra dan je u tablici 2 ovoga rada.

Model metabolizma triptofana u stanicama jetre izrađen u programu *CellDesigner* sa svim uključenim enzimima prikazan je na slici 6. Modeliranje i analiza biokemijskih puteva pomoću *CellDesignera* ima vrlo raširenu primjenu zbog iznimno jednostavne vizualizacije i prikaza složenih reakcija u metaboličkim putevima. Prednost ovog programa je u tome što se koristi standardiziranom tehnologijom za sve računalne platforme, koristi jednostavan i nedvosmislen sustav grafičkog prikaza te ga podržavaju mnogi operacijski sustavi.



Slika 6. Prikaz modela metabolizma triptofana u stanicama jetre izrađen u programu CellDesigner (AA – antranilna kiselina, AFD – aril formamidaza, HaA – hidoksiantranilna kiselina, HAO – oksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline, HK – 3 – hidroksikinurenin, J pool – pool triptofana u jetri, KA – kinureninska kiselina, KAT – kinurenin-amilotransfereaza, KMO – kinurenin-3-monooksigenaza, Kyn – kinurenin, KYN – kinureninaza, M pool – pool triptofana u mišićima, NFK – N-formilkinurenin, PLP – piridoksal-5-fosfat, TDO – triptofan-2,3-dioksigenaza, Qa – kinolinska kiselina, trp – triptofan u jetri, trp_mi – triptofan u mišićima, trp_mo – triptofan u mozgu, trp_per – triptofan u perifernoj cirkulaciji, trp_por – triptofan u portalnoj cirkulaciji, trp_ž – triptofan u želucu, XA – ksanturenska kiselina)

4.2. JELOVNICI ZA PROCJENU DNEVNOG UNOSA TRIPTOFANA

Model metabolizma triptofana izrađen je prema matematičkom modelu opisanom u radu RioAvila i sur. iz 2013. godine, a početne koncentracije triptofana u jednodnevnoj prehrani izračunate su prema jelovnicima izrađenim pomoću USDA baza podataka namirnica i nutrijenata. Izrađeni su jelovnici za tri različita obrasca prehrane, mediteranska (tablica 3) i veganska (tablica 4) prehrana (1800 ± 10 % kcal) te za restriksijsku dijetu (1300 kcal) (tablica 5). Jelovnici se prvenstveno razlikuju u odabiru namirnica, budući da veganska prehrana isključuje sve namirnice životinjskoga porijekla, bilo kao samostalnu namirnicu ili kao komponentu nekoga složenoga jela. U ljudskoj prehrani glavni izvor triptofana predstavljaju upravo te namirnice, a najviše mlijeko, riba te meso peradi. Nešto manje količine triptofana nalaze se u orašastim plodovima, sjemenkama te određenim žitaricama (Richard i sur., 2009, Strasser i sur., 2016). Pri planiranju ovih jelovnika težilo se raznovrsnom i raznolikom odabiru namirnica koje USDA baze podataka pružaju kako bi se osigurao dostatan unos ove esencijalne aminokiseline. Prema literaturi, dnevne potrebe odrasle osobe za triptofanom iznose 250 i 425 mg (Richard i sur., 2009), što znači da ovi jelovnici i više nego zadovoljavaju te dnevne potrebe (mediteranska prehrana- 1082 mg, veganska prehrana – 693 mg, restriksijska dijeta – 697 mg).

Tablica 3. Jelovnik mediteranske prehrane s ukupnim unosom energije, proteina i triptofana

MEDITERANSKA PREHRANA			
OBROK	energija / kcal	proteini / g	triptofan / mg
ZAJUTRAK			
raženi kruh	206,4	6,8	77
kuhana jaja	93	7,5	92
mozzarella	150	11,1	258
krastavac	6	0,4	4
DORUČAK			
jabuka	62,4	0,3	1
šaka badema	287,5	10,6	107
RUČAK			
juneća juha s povrćem	106	7,6	34
rižoto od morskih plodova	369,1	22	264
rajčica	14,4	0,7	5
limunada	25,2	0	-
smokve	88,8	0,9	7
MEĐUOBROK			
jogurt s jagodama, malinama i medom	190,6	7,938	41
VEČERA			
salata od slanotka, feta sira, zelene salate, mrkve i kukuruza začinjena maslinovim uljem i sokom od limuna	382,4	17,324	192
UKUPNO	1981,8 kcal	93,162 g	1082 mg

Tablica 4. Jelovnik veganske prehrane s ukupnim unosom energije, proteina i triptofana

VEGANSKA PREHRANA			
OBROK	energija / kcal	proteini / g	triptofan / g
ZAJUTRAK			
zobene pahuljice na sojinom mlijeku s bananom i javorovim sirupom	347,3	12,615	166
DORUČAK			
integralni tost s kikiriki maslacem	274,4	10,82	104
RUČAK			
juha od brokule	139,2	3,4	-
burrito s rižom, avokadom i povrćem	359,9	9,115	104
MEĐUOBROK			
krekeri	128,1	3,2	42
humus	66,4	3,2	23
celer	8	0,3	4
VEČERA			
tofu u soja sosu	222,1	14,269	223
pečeni krumpir, mrkva i tikvica na maslinovom ulju	115	1,746	23
sok od naranče	108	0,4	4
UKUPNO	1768,4 kcal	59,065 g	693 mg

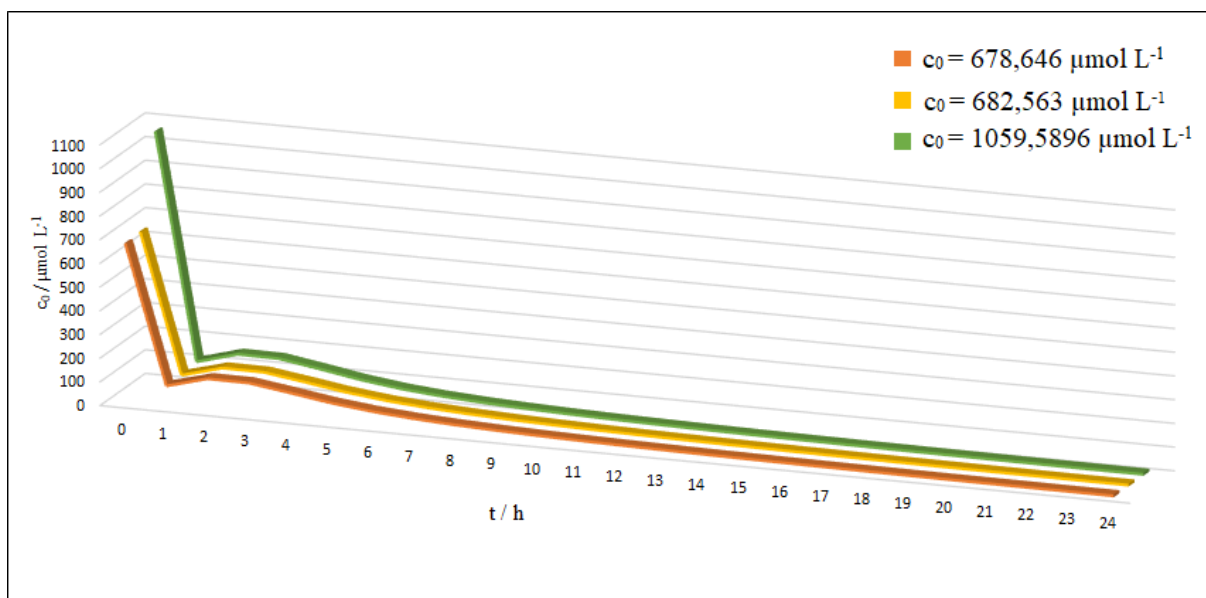
Tablica 5. Jelovnik restriktivne dijete s ukupnim unosom energije, proteina i triptofana

RESTRIKCIJSKA DIJETA			
OBROK	energija / kcal	proteini / g	triptofan / g
ZAJUTRAK			
zobene pahuljice s jogurtom i medom	319,5	14,7	153
DORUČAK			
kruh s džemom	187,8	5,175	60
RUČAK			
juha od rajčice	33	1,2	24
oslić	137,6	19,6	219
kuhani krumpir i brokula	73,3	2,4	35
zelena salata s maslinovim uljem	61	1,1	11
sok od naranče	135	0,5	5
MEĐUOBROK			
jabuka	62,4	0,3	1
VEČERA			
salata od piletine, rajčice, krastavaca i paprike začinjena maslinovim uljem	336,9	15,4	189
UKUPNO	1346,5 kcal	60,375 g	697 mg

4.3. SIMULACIJA MODELA METABOLIZMA TRIPTOFANA U RAČUNALNOM PROGRAMU *CellDesigner*

Primarna funkcija triptofana je ta da on služi kao gradivni blok u sintezi proteina, no njegovi ključni metaboliti imaju ulogu neurotransmitera, reguliraju imunološki odgovor i funkciju živčanog sustava. Zbog toga je adekvatan unos triptofana važan za metabolizam, fiziologiju te rast i razvoj organizma (Yao i sur., 2011).

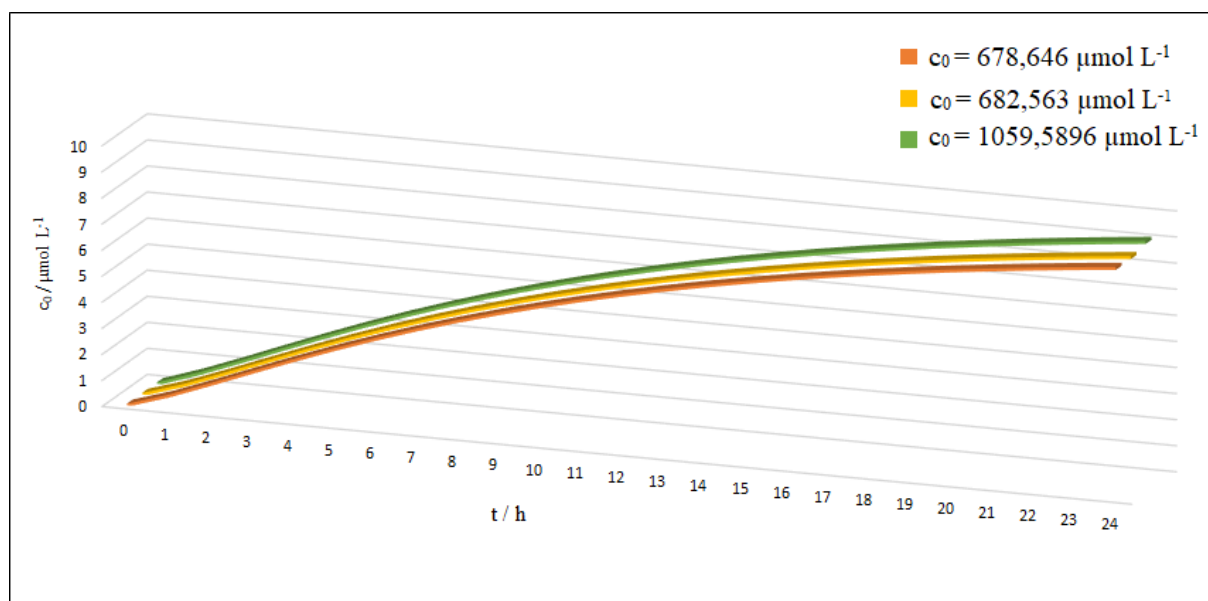
Prema podacima o dnevnom unosu triptofana izračunata je njegova koncentracija u krvotoku te iznosi $1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ za mediteransku prehranu, $678,65 \mu\text{mol L}^{-1}$ za vegansku prehranu i $682,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ za restriktivnu dijetu. Te koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji uzete su kao početne te su promatrane promjene koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji, želucu mišićima te stanicama jetre tijekom 24 sata simulacijom modela metabolizma u programu *CellDesigner*.



Slika 7. Promjena koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji za različite početne koncentracije tijekom 24 sata

Na slici 7 grafički je prikazana promjena koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji tijekom 24 sata za tri različite početne koncentracije. Za sve tri početne koncentracije vrijednosti se mijenjaju na isti način. Najveća promjena je vidljiva u prvih sat vremena gdje se vrijednosti koncentracija naglo smanjuju, kod $c_0 = 678,646$ i $682,563 \mu\text{mol L}^{-1}$ je to vrlo sličan pad budući da su to koncentracije bliskih vrijednosti i spuštaju se na vrijednost od $93,73$ odnosno $93,84$

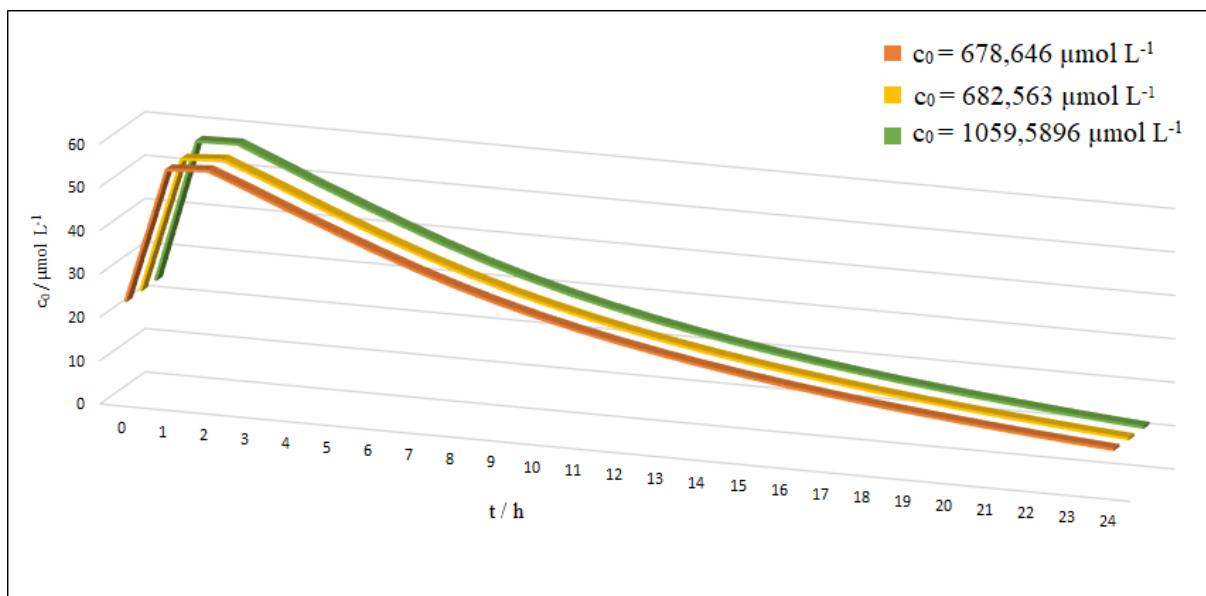
$\mu\text{mol L}^{-1}$. Za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ taj pad koncentracije izraženiji jer se radi o smanjenju za 10 puta, odnosno do vrijednosti $105,23 \mu\text{mol L}^{-1}$. Nakon početnog pada koncentracije, narednih 60 minuta dolazi do rasta kod sve tri promatrane c_0 do vrijednosti oko $140 \mu\text{mol L}^{-1}$ za prve dvije c_0 , odnosno $153 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$. Zatim te vrijednosti stagniraju idućih sat vremena nakon čega se koncentracija smanjuje budući da se triptofan iz portalne cirkulacije prenosi u jetru i perifernu cirkulaciju od kud dalje ide u mozak i mišiće.



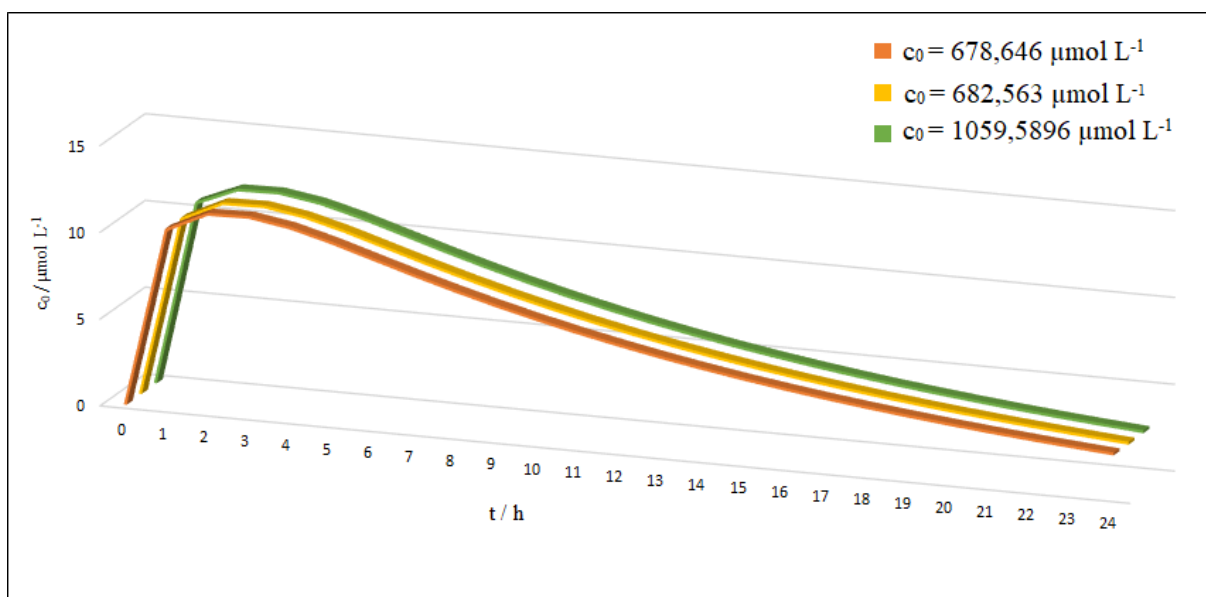
Slika 8. Promjena koncentracije triptofana u želucu za različite početne koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji tijekom 24 sata

Na početku simulacije, koncentracija triptofana u želucu iznosi $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ bez obzira na to kolika je njegova koncentracija u portalnoj cirkulaciji. Iz slike 8 vidljivo je da s vremenom količina triptofana u želucu raste linearno za sve tri početne koncentracije te na kraju iznosi $8,83 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 678,646$ i $682,563 \mu\text{mol L}^{-1}$ te $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Slika 9 pokazuje promjene koncentracije triptofana koje se događaju u mišićima tijekom 24 sata za različite početne koncentracije portalnog triptofana. Početna koncentracija triptofana za sva tri promatrana slučaja iznosi $23,27 \mu\text{mol L}^{-1}$ i ta koncentracija raste u prva dva sata do vrijednosti od $55,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 678,646$ i $682,563 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $56,19$ za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$. Idućih 60 minuta ta se vrijednost održava te u 4. satu koncentracija triptofana krene opadati.



Slika 9. Promjena koncentracije triptofana u mišićima za različite početne koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji tijekom 24 sata



Slika 10. Promjena koncentracije triptofana u jetri za različite početne koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji tijekom 24 sata

Promjene koncentracije triptofana koje se zbivaju u jetri tijekom 24 sata prikazane su na slici 10. Početna koncentracija samog triptofana u jetrenim stanicama iznosi $0 \mu\text{mol L}^{-1}$ te u prvih sat vremena ona naglo raste zbog transporta triptofana iz portalne cirkulacije u jetru, a idućih sat vremena se događa blagi rast koncentracije i ta dostignuta vrijednost se održava iduća dva sata nakon čega dolazi do pada koncentracije triptofana. Do tog pada dolazi jer su upravo jetrene stanice mjesto metabolizma triptofana do kinureina.

U našem organizmu postoje dva izvora triptofana, prehrana i unutarstanična razgradnja proteina u manjem udjelu. Budući da se triptofan ne sintetizira u našem organizmu, krajnji izvor ove aminokiseline je prehrana te najviše o njoj ovisi koncentracija triptofana u cirkulaciji i tkivima. Većina prehrambenog triptofana metabolizira se u jetri, a mnogi međuprodukti su važni za mozak (Cervenka i sur., 2017).

Iz grafičkih prikaza promjene koncentracije triptofana tijekom 24 sata, vidljivo je da se koncentracije mijenja na sličan način, neovisno o početnoj koncentraciji triptofana u portalnoj cirkulaciji. Jedna od većih razlika je promjena koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji u prvih sat vremena gdje je kod početne koncentracije $1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ linija pada koncentracije strmija. U želucu, mišićnim te jetrenim stanicama promjena koncentracije se događa na isti način kod sve tri početne koncentracije. Pri isteku 24 sata, koncentracija triptofana je oko iste vrijednosti za sve početne koncentracije u svim promatranim mjestima. Za portalnu cirkulaciju je to $8,12 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 678,646 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $682,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ dok se za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$ razlikuje i iznosi $8,27 \mu\text{mol L}^{-1}$. U želucu je $8,83 \mu\text{mol L}^{-1}$, odnosno $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$, a u mišićnim stanicama je $10,66 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 678,646 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $682,56 \mu\text{mol L}^{-1}$ te $10,83 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$. Koncentracija triptofana u stanicama jetre nakon 24 sata iznosi $2,53 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 678,646 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $682,56 \mu\text{mol L}^{-1}$, odnosno $2,58 \mu\text{mol L}^{-1}$ za $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$. Prisutnost triptofana u želucu i crijevima te mozgu je izrazito važna zbog sinteze serotonina što povezuje dostupnost triptofana s poremećajima raspoloženja. Zbog nedovoljne koncentracije triptofana može doći do poremećaja serotonergičke funkcije mozga što dovodi do afektivnih poremećaja, anksioznosti, agresivnosti, stresa, poremećaja u hranjenju i drugih psiholoških poremećaja (Le Floc'h i sur., 2010). Nedovoljan unos triptofana može uzrokovati patološke promjene kao što su katarakta i vaskularizacija rožnice, anemija i smanjena koncentracija proteina u plazmi, masna jetra, atrofija gušterače, a te promjene se mogu povezati s ulogom triptofana na sintezu proteina (Moehn i sur., 2012). Ako je adekvatan prehrambeni unos triptofana, njegova koncentracija u krvi i tkivima će biti dostatna za izbjegavanje ovih negativnih posljedica.

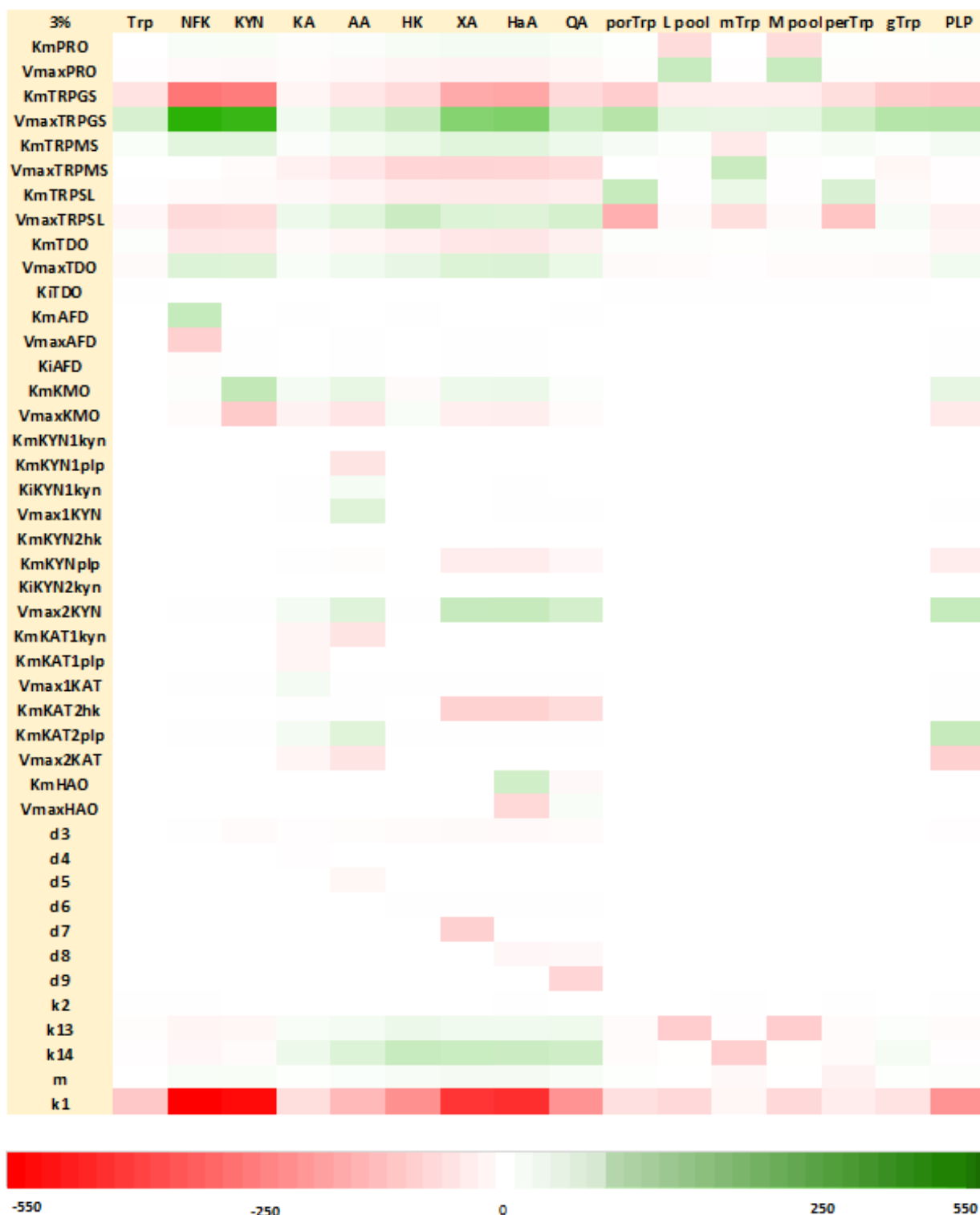
4.4. ANALIZA LOKALNE PARAMETARSKE OSJETLJIVOSTI

Matematički modeli su po svom opisu zapravo pojednostavljene stvarnosti, no unatoč tome, kada prikupljamo podatke i primjenjujemo model često pretpostavljamo da je model istinit i da su pružene pretpostavke stvarne. Zaključci koje dobivamo iz takve analize osjetljivi su na razne promjene u modelu, odstupanja od pretpostavki ili neke druge perturbacije ulaznih varijabli i stoga je važno znati utjecaj svakog pojedinog parametra na konačne rezultate. Upotreba analize lokalne parametarske osjetljivosti omogućuje nam procjenu učinka promjena ulaznih vrijednosti na izlazne varijable modela. U konačnici nam omogućuje detektiranje odstupanja od pretpostavki, otkrivanje pogreški, optimiziranje resursa, smanjenje troškova istraživanja te izbjegavanje neočekivanih problema (Castillo i sur., 2006).

Provedena je analiza lokalne parametarske osjetljivosti modela metabolizma triptofana na način da je se vrijednosti svakog parametra pojedinačno povećavala za 3 % te su se pratile promjene vrijednosti koncentracija samog triptofana i njegovih metabolita. Analiza je provedena programom *WR Mathematica*, a rezultati su prikazani pomoću *MS Excel-a*.

Parametarski koeficijenti osjetljivosti modela metabolizma triptofana mogu pokazivati pozitivnu i negativnu promjenu vrijednosti kod uvođenja 3 % perturbacije. Promjene koncentracija metabolita prikazane su crvenom bojom ako se radi o negativnoj vrijednosti, a zelenom ako se radi o pozitivnoj vrijednosti. Bijela boja pokazuje područja s najmanjom osjetljivošću, a intenzitet crvene i zelene boje pruža informaciju o tome u kojoj mjeri povećanje pojedinog parametra daje najveći odaziv u smislu koncentracije triptofana, odnosno njegovih metabolita.

Na slici 11 prikazana je osjetljivost koncentracije metabolita modela metabolizma triptofana na 3 %-tno povećanje vrijednosti kinetičkih parametara pojedinačno.



Slika 11. Grafički prikaz lokalne osjetljivosti koncentracija metabolita na povećanje vrijednosti kinetičkih parametara za 3 % (V_{max} – maksimalna brzina reakcije; K_m – konstanta zasićenosti; K_i – inhibicijska konstanta; AFD – aril formamidaza; HAO – oksigenaza 3-hidroksiantranilne kiseline; KAT – kinurenin-amilotransferaza; KMO – kinurenin 3-monooksigenaza; KYN – kinureninaza; PRO – sinteza proteina; TDO – triptofan 2,3-dioksigenaza; TRPGS – triptofan

od želuca do portalne cirkulacije; TRPSL – triptofan iz portalne cirkulacije u jetru; TRPSM – triptofan iz periferne cirkulacije do mišića; d – koeficijenti uklanjanja; k – brzina reakcije; m – konstanta miješanja portalne i periferne cirkulacije; AA – antranilna kiselina; HaA – 3-hidroksiantranilna kiselina; HK – 3- hidroksikinurenin; KA – kinureninska kiselina; Kyn – L-kinurenin; NFK – N-formilkinurenin; QA – kinolinska kiselina; XA – ksanturenska kiselina; Trp- triptofan u jetri; gTrp – triptofan u želucu; L pool – pool triptofana u jetri; M pool – pool triptofana u mišićima; mTrp – triptofan u mišićima; perTrp – triptofan u perifernoj cirkulaciji; porTrp – triptofan u portalnoj cirkulaciji; PLP – piridoksal-5-fosfat)

Najveću osjetljivost pokazuju metaboliti N-formilkinurenin (NFK) i kinurenin (Kyn) za promjenu parametara K_{MTRPGS} – konstanta zasićenosti u reakciji prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju, $V_{maxTRPGS}$ – maksimalna brzina reakcije prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju i k_l – brzina reakcije prijenosa triptofana iz jetre u perifernu cirkulaciju. Na promjenu parametra k_l osjetljivost pokazuju i ksanturenska kiselina (XA) te 3-hidroksiantranilna kiselina (HaA). Parametri K_{MTRPGS} i $V_{maxTRPGS}$ uključeni su u reakciju prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju preko L-transportera. Količina triptofana dostupna u portalnoj cirkulaciji utječe i na koncentraciju triptofana u jetri gdje metabolizmom nastaju NFK i Kyn. Parametar k_l uključen je u reakciju transporta triptofana iz jetre u perifernu cirkulaciju, što je ta reakcija brža to je količina triptofana u jetri dostupna za razgradnju do metabolita manja.

U tablici 6 prikazane su relativne osjetljivosti metabolita te kinetički parametri čije povećanje uzrokuje tu promjenu. Vidljivo je da metabolit N –fenilkinurenin pokazuje najveću i pozitivnu i negativnu osjetljivost. Povećanje maksimalne brzine reakcije prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju za 3 % ima za posljedicu povećanje koncentracije NFK, a povećanje brzine reakcije prijenosa triptofana iz jetre u portalnu cirkulaciju uzrokuje smanjenje koncentracije N-fenilkinureinina.

Tablica 6. Metaboliti koji pokazuju najveću pozitivnu (zelena boja) ili negativnu (crvena boja) promjenu koncentracije s obzirom na povećanje vrijednosti pojedinog parametara za 3 %

METABOLIT	UVEĆANI PARAMETAR	RELATIVNA OSJETLJIVOST METABOLITA (%)
NFK	Km_{TRPGS}	-289,74
Kyn	Km_{TRPGS}	-274,97
NFK	$V_{maxTRPGS}$	366,328
Kyn	$V_{maxTRPGS}$	346,22
NFK	k_l	-539,37
Kyn	k_l	-519,05
XA	k_l	-427,97
HaA	k_l	-441,28

Iz slike 11 može se također zaključiti da koncentracija triptofana i većina njegovih metabolita u modelu metabolizma pokazuju izrazito malu ili ne pokazuju osjetljivost na promjene vrijednosti kinetičkih parametara uključenih u model.

Zi u svom radu iz 2011. analizu lokalne osjetljivosti opisuje kao uobičajeni pristup za određivanje osjetljivosti izlaznih varijabli modela, a provodi se računanjem parcijalne derivacija izlazna modela u odnosu na ulazne parametre koji se mogu promatrati kao gradijenti višedimenzionalnog prostora referentnih parametara. U svom radu iz 2006. van Riel navodi kako ovakva analiza omogućuje promjenu samo jednog parametra za svaku simulaciju te se bavi samo njima, odnosno analiza lokalne osjetljivosti se odnosi na točno određenu točku u prostoru parametara.

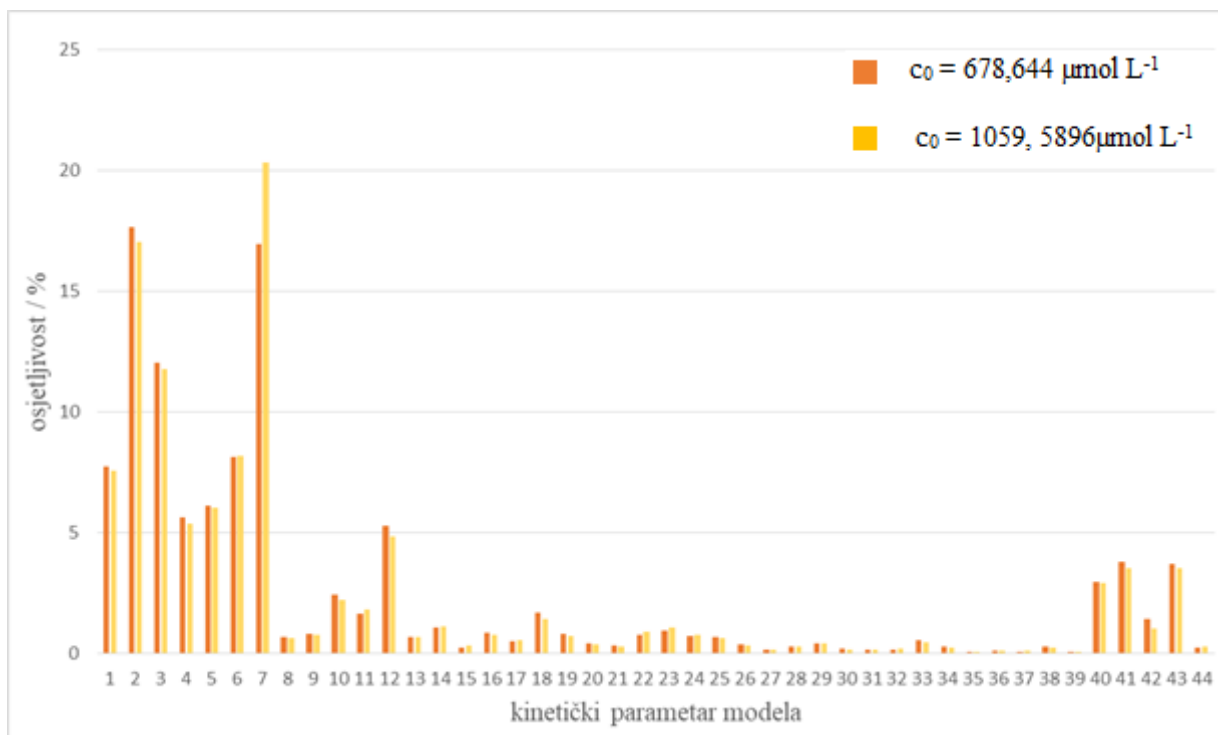
Primjenom ovakve analize za model metabolizma triptofana ustanovljeno je da se najveća osjetljivost javlja na promjene ulaznih kinetičkih parametara vezanih uz reakciju prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju preko L-transportera te uz reakciju transporta triptofana iz jetre u perifernu cirkulaciju.

4.5. ANALIZA GLOBALNE PARAMETARSKJE OSJETLJIVOSTI

Za analizu globalne parametarske osjetljivosti primijenjena je Fourierova analiza (Fourier Amplitude Sensitivity Test, FAST). U FAST metodi variraju se parametri pri različitim frekvencijama te se mjere amplitude svakog parametra u izlazu modela (Marino i sur., 2008). Prema Crosetto i sur., (2000) značajke ove metode uključuju neovisnost modela, odnosno mjerenje osjetljivosti je neovisno o modelu, mjerenje sadrži utjecaj raspona varijacija svakog faktora, mjerenje sadrži efektne interakcije, skupove faktora moguće je promatrati kao pojedinačne faktore.

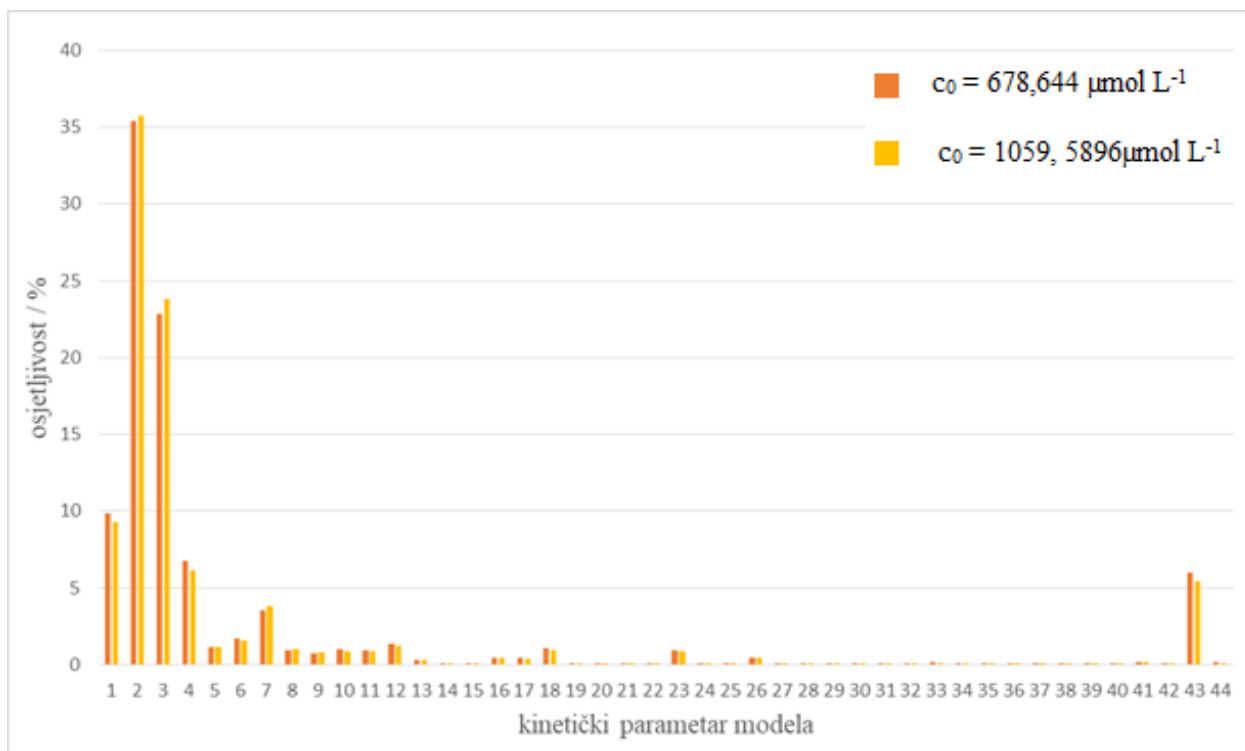
U ovom radu globalna osjetljivost određena je istovremenim promjenama parametara. Provedena je analiza kinetičkih parametara metabolizma triptofana kojih u ovom modelu ima 44 za dvije različite početne koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji, $c_0 = 678,64 \mu\text{mol L}^{-1}$ i $c_0 = 1059,59 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ova metoda omogućava određivanje osjetljivosti na istovremene promjene parametara. Ispitana je osjetljivost koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji, želucu, mišićima i jetri na promjene parametara tijekom 24 sata pomoću programa *WR Mathematica* te je grafički prikazana pomoću *MS Excel-a*.

Na slici 12 grafički je prikazano koji su parametri najvažniji za vrijednost koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji. To su kinetički parametri (2), (3) i (7), odnosno V_{maxPRO} – maksimalna brzina reakcije sinteze proteina, K_{mTRPGS} – konstanta zasićenosti u reakciji prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju i K_{mTRPSL} – konstanta zasićenosti u reakciji prijenosa triptofana iz portalne cirkulacije u jetru. V_{maxPRO} odnosi se na maksimalnu brzinu reakcije kojom dolazi od sinteze proteina u mišićima čime dolazi do iskorištavanja triptofana gdje on sudjeluje kao gradivni blok. K_{mTRPGS} i K_{mTRPSL} odnose se na reakcije koje opisuju prijenos triptofana u organizmu. K_{mTRPGS} odnosi se na prijenos triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju, a K_{mTRPSL} na prijenos triptofana iz portalne cirkulacije u jetru.



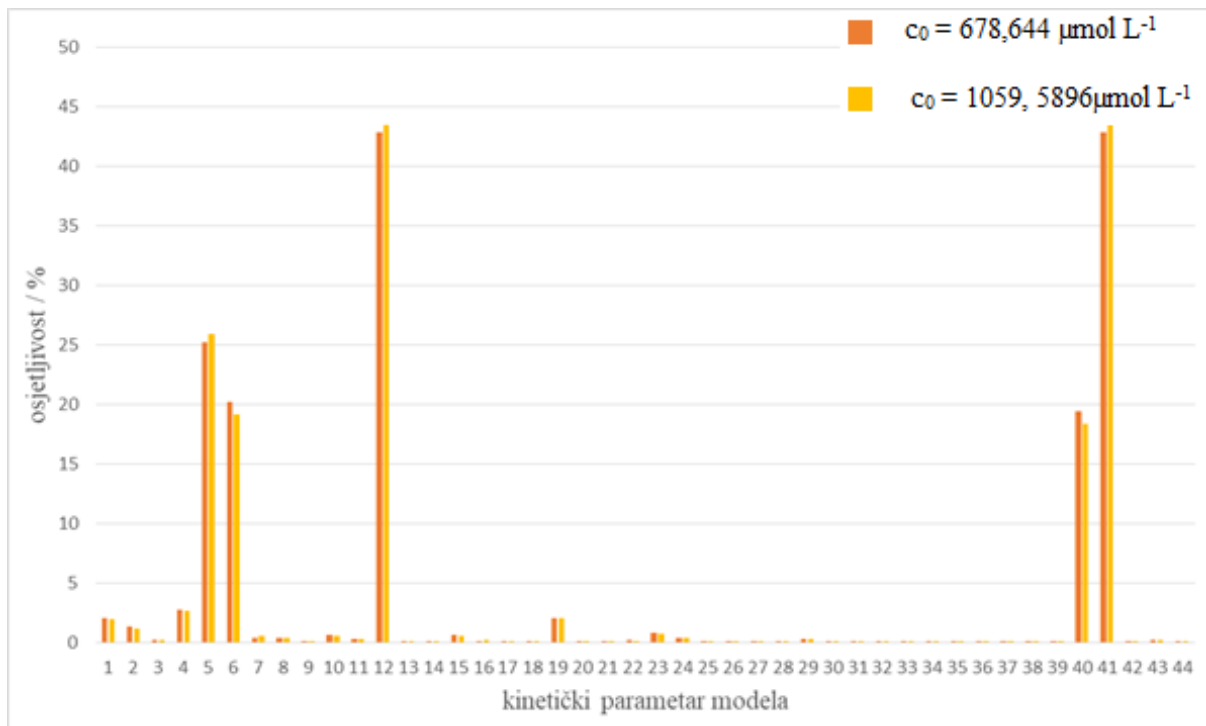
Slika 12. Osjetljivost koncentracije triptofana u portalnoj cirkulaciji na promjene kinetičkih parametara

Koncentracija triptofana u želucu najviše ovisi o 2 kinetička parametra uključena u metabolizam ove aminokiseline. To su parametri također parametri (2) V_{maxPRO} – maksimalna brzina reakcije sinteze proteina, i (3) K_{mTRPGS} – konstanta zasićenosti u reakciji prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju. Ta osjetljivost je vidljiva iz grafičkog prikaza na slici 13.

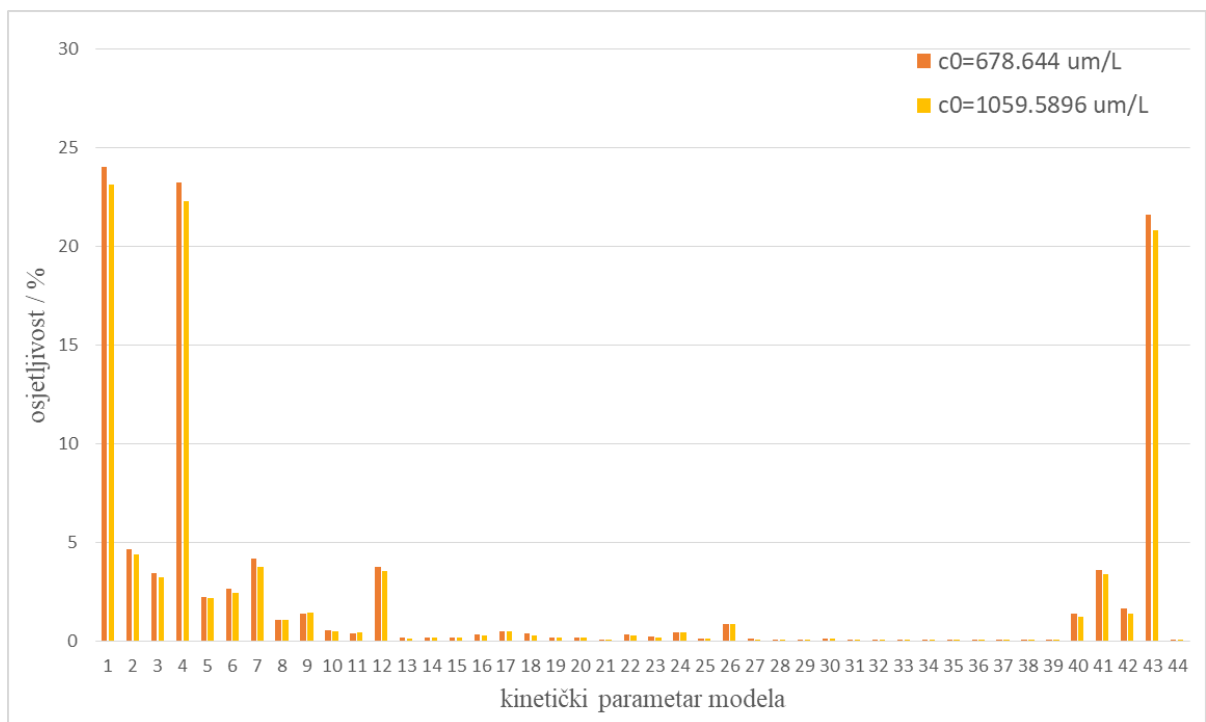


Slika 13. Osjetljivost koncentracije triptofana u želucu na promjene kinetičkih parametara

Slika 14 pokazuje u kojoj mjeri pojedini kinetički parametri utječu na koncentraciju triptofana u mišićnim stanicama. Najveći utjecaj imaju parametri (12) i (41), a nešto manji (5), (6) i (40). Parametri (5) i (6) su kinetički parametri koji su uključeni u reakciju prijenosa triptofana iz periferne cirkulacije u mišić, K_{mTRPMS} – konstanta zasićenosti u reakciji (5) i $V_{maxTRPMS}$ – maksimalna brzina te reakcije (6). Kinetički parametar (12) je K_{mAFD} , odnosno konstanta zasićenosti u reakciji nastanka kinurenina iz N-formilkinurenina kataliziranoj enzimom aril formamidaza (AFD) koja se odvija u stanicama jetre, a parametar (41) je brzina reakcije transporta triptofana iz mišića u perifernu cirkulaciju, k_{13} . Iz grafičkog prikaza je vidljivo da parametar (40) također ima utjecaj na koncentraciju triptofana u mišićima, taj kinetički parametar označava se s k_2 , a predstavlja brzinu reakcije transporta iz periferne cirkulacije u mozak.



Slika 14. Osjetljivost koncentracije triptofana u mišićima na promjene kinetičkih parametara



Slika 15. Osjetljivost koncentracije triptofana u jetri na promjene kinetičkih parametara

Rezultati pokazuju da su najvažniji parametri za koncentraciju triptofana u stanicama jetre kinetički parametri (1), (4) i (43), što je prikazano na slici 15. Parametar (1) odnosi se na K_{mPRO} te označava konstantu zasićenosti u reakciji sinteze proteina, a parametar (4) je maksimalna brzina reakcije prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju, $V_{maxTRPGS}$. Na koncentraciju triptofana u stanicama jetre utjecaj ima i parametar m , odnosno konstanta miješanja portalne i periferne koncentracije koja je označena kao kinetički parametar (43).

Prema Di Maggio i sur. (2010), dinamični modeli metaboličkih mreža sadrže nelinearni algebarski sustav diferencijalnih jednadžbi koji se dobije od masenih ravnoteža metabolita koji su uključeni u metaboličke puteve, no nesigurnost pojedinih parametara može uzrokovati blage varijacije u procesu, dok drugi mogu doprinijeti velikim varijacijama u rezultatima modela. Zbog toga je određivanje najutjecajnijih parametara na izlaz modela temelj za razvoj pouzdanog modela. Analiza globalne parametarske osjetljivosti ima bitnu ulogu u rangiranju parametara što omogućuje smanjenje broja parametara uključenih u model. Stoga su oni u svom radu primijenili analizu globalne osjetljivosti maksimalne brzine reakcija i kinetičkih konstanti povezanih s metaboličkom mrežom. Rand u svome radu iz 2008. navodi da globalni pristup analizi osjetljivosti metaboličke mreže omogućuje da se odredi koje varijable su pod utjecajem kojeg parametra bez da se unaprijed odabire koja će se varijabla ili parametar promatrati budući da ovakav pristup obuhvaća varijacije cjelokupnog izlaza modela, a ne usmjerava se samo na jednu izlaznu varijablu.

Analizom metaboličkog puta triptofana primjenom analize globalne parametarske osjetljivosti dolazi se do najosjetljivijih ulaznih parametara, odnosno maksimalne brzine reakcija i kinetičkih konstanti koje imaju najveći utjecaj na izlazne varijable. To su maksimalna brzina i konstanta zasićenosti u reakciji sinteze proteina, konstante zasićenosti u reakcijama transporta triptofana u organizmu, točnije iz želuca u portalnu cirkulaciju, iz portalne cirkulacije u jetru te iz periferne cirkulacije u mišić. Brzina reakcije transporta iz mišića u perifernu cirkulaciju te iz periferne cirkulacije u mozak, kao i konstanta miješanja portalne i periferne cirkulacije pokazale su se osjetljivim parametrima ovoga modela. Konstanta zasićenosti reakcije nastanka kinurenina iz N-formilkinurenina u kinureninskom putu također ima znatan utjecaj na izlazne varijable modela.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedene analize i prikazanih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci o modelu metabolizma triptofana:

1. Provedbom simulacije modela zaključuje se da se najveće promjene koncentracije triptofana događaju u portalnoj cirkulaciji jer se od tamo triptofan prenosi u druga tkiva i perifernu cirkulaciju.
2. Analiza lokalne parametarske osjetljivosti pokazala je najznačajnije parametre za metabolizam triptofana u području od -539 do 366 %
3. Uvođenje 3 % perturbacije vrijednosti parametara modela pokazuje da su reakcije prijenosa triptofana iz želuca u portalnu cirkulaciju te reakcija transporta triptofana iz jetre u perifernu cirkulaciju odgovorne za regulaciju procesa.
4. Metaboliti N-formilkinurenin, kinurenin, ksanturenska kiselina i hidrokisiantranilna kiselina pokazuju najveću osjetljivost na promjene kinetičkih parametara.
5. Provedbom analize globalne parametarske osjetljivosti ustanovljeno je da reakcija sinteze proteina te reakcije transporta triptofana u organizmu imaju ključnu ulogu u modelu, a ključni enzim u samom kinureninskom putu je aril formamidaza (AFD)
6. Model uspješno simulira metabolizam triptofana kinureninskim putem te se može koristiti za buduća eksperimentalna istraživanja.

6. LITERATURA

1. Badawy, A. A.-B. (2017) Kynurenine Pathway of Tryptophan Metabolism: Regulatory and Functional Aspects. *Int. J. Tryptophan Res.* **10**, 1-20.
2. Badimon, L., Vilahur, G., Padro, T. (2016) Systems biology approaches to understand the effects of nutrition and promote health. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **83**, 38–45.
3. Castillo, E., Conejo, A.J., Minguez, R., Castillo, C. (2006) A closed formula for local sensitivity analysis in mathematical programming. *Eng. Optimiz.* **38**, 93-112.
4. Cervenka, I., Agudelo, L. Z., Ruas, J. L. (2017) Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science* **357**, 1-8.
5. Colombo, B., Saraceno, L., Comi, G. (2014) Riboflavin and migraine: the bridge over troubled mitochondria. *Neurol. Sci.* **35**, 141–144.
6. De Graaf, A.A., Freidig, A.P., De Roos, B., Jamshidi, N., Heinemann, M., Rullmann, J.A.C., Hall, K.D., Adiels, M., van Ommen, B. (2009) Nutritional Systems Biology Modeling: From Molecular Mechanisms to Physiology. *PloS Comput. Biol.* [online] **5**, 1-12.
<https://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1000554>.
Pristupljeno 22. svibnja 2020.
7. Di Maggio, J., Diaz Ricci, J.C., Diaz, M.S. (2010) Global sensitivity analysis in dynamic metabolic networks. *Comput. Chem. Eng.* **34**, 770-781.
8. FAO/WHO (2004) Vitamin and mineral requirements in human nutrition, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42716/9241546123.pdf?sequence=1> >. Pristupljeno 20. travnja 2020.
9. Funahashi, A., Morohashi, M., Kitano, H., Tanimura, N. (2003) CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks. *Biosilico* **1**, 159–162.
10. González Esquivel, D., Ramírez-Ortega, D., Pineda, B., Castro, N., Ríos, C., Pérez de la Cruz, V. (2017) Kynurenine pathway metabolites and enzymes involved in redox reactions. *Neuropharmacology* **112**, 331–345.
11. Jacobs, K.R., Castellano-Gonzalez, G., Guillemin, G.J., Lovejoy, D.B. (2017) Major Developments in the Design of Inhibitors Along the Kynurenine Pathway. *Curr. Med. Chem.* **24**, 2471-2495.
12. Jenkins, T., Nguyen, J., Polglaze, K., Bertrand, P. (2016) Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients* **8**, 1-15.

13. Jhala, S. S., Hazell, A. S. (2011) Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: Consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem. Int.* **58**, 248–260.
14. Kennedy, M. (2018) The vitamin epidemic: what is the evidence for harm or value? *Intern. Med. J.* **48**, 901–907.
15. Kent, E., Neumann, S., Kummer, U., Mendes, P. (2013) What Can We Learn from Global Sensitivity Analysis of Biochemical Systems? *Plos One* **8**, 1-13.
16. König, M., Bulik, S., Holzhütter, H.-G. (2012) Quantifying the Contribution of the Liver to Glucose Homeostasis: A Detailed Kinetic Model of Human Hepatic Glucose Metabolism. *Plos Comput. Biol.* **8**, 1-18.
17. Le Floc'h, N, Otten, W., Merlot, E. (2010) Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* **41**, 1195-1205.
18. Link, K.G., Stobb, M.T., Di Paola, J., Neeves, K.B., Fogelson, A.L., Sindi, S.S., Leiderman, K. (2018) A local and global sensitivity analysis of a mathematical model of coagulation and platelet deposition under flow. *Plos One* **13**, 1-38.
19. Marino, S., Hogue, I.B., Ray, C.J., Kirschner, D.E. (2008) A methodology for performing global uncertainty and sensitivity analysis in systems biology. *Theoretical Biology* **254**, 178-196.
20. Moehn, S., Pencharz, P.B., Ball, R.O (2012) Lessons Learned Regarding Symptoms of Tryptophan Deficiency and Excess from Animal Requirement Studies
21. NHS (2017) Vitamin C, United Kingdom National Health Service, <<https://www.nhs.uk/conditions/vitamins-and-minerals/vitamin-c/>>. Pristupljeno 4. lipnja 2020.
22. NIH (2020) Vitamin A, National Institutes of Health, <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminA-HealthProfessional/>>. Pristupljeno 4. lipnja 2020.
23. O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., Cryan, J. F. (2015) Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* **277**, 32–48. *J. Nutr.* **142**, 2231-2235.
24. Odluka o standardu prehrane bolesnika u bolnicama (2015) *Narodne novine* **59**, Zagreb.
25. Panagiotou, G., Nielsen, J. (2009) Nutritional Systems Biology: Definitions and Approaches. *Annu. Rev. Nutr.* **29**, 329–339.

26. Pearson, T., Wattis, J.A.D., King, J.R., MacDonald, I.A., Mazzatti, D.J. (2016) The Effects of Insulin Resistance on Individual Tissues: An Application of a Mathematical Model of Metabolism in Humans. *Bull. Math. Biol.* **78**, 1189-1217.
27. Pratt, A. C., Wattis, J.A.D., Salter, A.M. (2015) Mathematical modelling of hepatic lipid. *Math. Biosci.* **262**, 167-181.
28. Rand, D. A. (2008) Mapping global sensitivity of cellular network dynamics: sensitivity heat maps and a global summation law. *J. R. Soc. Interface* **5**, 59-69.
29. Richard, D. M., Dawes, M. A., Mathias, C. W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N., Dougherty, D. M. (2009) L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. *Int. J. Tryptophan Res.* **2**, 45-60.
30. Rios-Avila, L., Nijhout, H. F., Reed, M. C., Sitren, H. S., & Gregory, J. F. (2013) A Mathematical Model of Tryptophan Metabolism via the Kynurenine Pathway Provides Insights into the Effects of Vitamin B-6 Deficiency, Tryptophan Loading, and Induction of Tryptophan 2,3-Dioxygenase on Tryptophan Metabolites. *J. Nutr.* **143**, 1509–1519.
31. SBI (2020) CellDesigner™: A modeling tool of biochemical networks, Systems Biology Institute, <<http://www.celldesigner.org/>>. Pristupljeno 5. lipnja 2020.
32. SBI (2010) What is a Species and a SpeciesAlias?, Systems Biology Institute, <http://www.celldesigner.org/help/CDH_Species_00.html>. Pristupljeno 10. lipnja 2020.
33. SBI (2010a) What is a Reaction, Systems Biology Institute, <http://www.celldesigner.org/help/CDH_Reaction_00.html>. Pristupljeno 10. lipnja 2020.
34. SBI (2010b) Setting the Kinetic Laws / Parameters (The KineticLaw dialog), Systems Biology Institute <http://www.celldesigner.org/help/CDH_Reaction_14.html>. Pristupljeno 10. lipnja 2020.
35. SBI (2019) Major Features of CellDesigner, Systems Biology Institute, <<http://www.celldesigner.org/features.html#1>>. Pristupljeno 5. lipnja 2020.
36. Sechi, G., Sechi, E., Fois, C., Kumar, N. (2016) Advances in clinical determinants and neurological manifestations of B vitamin deficiency in adults. *Nutr Rev.* **74**, 281-300.
37. Solan, M. (2019) The best foods for vitamins and minerals <<https://www.health.harvard.edu/staying-healthy/the-best-foods-for-vitamins-and-minerals>>. Pristupljeno 21. travnja 2020.
38. Stolz, J., Daniel, H. (2012) A celebration of 100 years of vitamin research but time to revitalise the science. *Br. J. Nutr.* **108**, 574-576.

39. Strasser, B., Gostner, J. M., Fuchs, D. (2016) Mood, food, and cognition. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* **19**, 55–61.
40. Udhayabanu, T. , Manole, A., Rajeshwari, M., Varalakshmi, P., Houlden, H., Ashokkumar, B. (2017) Riboflavin Responsive Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *J. Clin. Med.* **6**, 1-13.
41. Ulvik, A., Middttun, Ø., McCann, A., Meyer, K., Tell, G., Nygård, O., Ueland, P. M. (2019) Tryptophan catabolites as metabolic markers of vitamin B-6 status evaluated in cohorts of healthy adults and cardiovascular patients. *Am. J. Clin. Nutr.* **111**, 1-9.
42. Van Ommen, B., van den Broek, T., de Hoogh, I., van Erk, M., van Someren, E., Rouhani-Rankouhi, T., Anthony, J.C., Hogenelst, K., Pasman, W., Boorsma, A., Wopereis, S. (2017) Systems biology of personalized nutrition. *Nutr. Rev.* **75**, 579–599.
43. Van Riel, N. A. W. (2006) Dynamic modelling and analysis of biochemical networks: mechanism-based models and model-based experiments. *Brief. Bioinform.* **7**, 364-374.
44. Vranešić Bender, D., Krstev, S. (2008) Makronutrijenti i mikronutrijenti u prehrani čovjeka. *Medicus.* **17**, 19-25.
45. Wax, E. (2020) Vitamin E <<https://medlineplus.gov/ency/article/002406.htm>>. Pristupljeno 4. lipnja 2020.
46. WHO (2020) Diabetes, World Health Organization, <https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1>. Pristupljeno 22. svibnja 2020.
47. Wolfram, S. (2003) The Mathematica Book, 5. izd., Wolfram Media, Champaign.
48. Xu, C., Gertner, G. (2011) Understanding and comparisons of different sampling approaches for the Fourier Amplitudes Sensitivity Test (FAST). *Comput. Stat. Data An.* **55**, 184-198.
49. Yao, K., Fang, J., Yin, Y., Feng, Z., Tang, Z. W, G. (2011) Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health. *Front. Biosci.* **3**, 286-297.
50. Zi, Z. (2011) Sensitivity analysis approaches applied to systems biology models. *IET Syst. Biol.* **5**, 336-346.
51. Zhao, Y., Barrere-Cain, R.E., Yang, X. (2015) Nutritional systems biology of type 2 diabetes. *Genes. Nutr.* **10**, 1-18.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Anja Karatović

Anja Karatović