

# Procjena protokola za pripremu uzoraka krvne plazme za određivanje butirata GC/MS metodom

---

Krpan, Tara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:250786>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-12**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Tara Krpan**  
0058221172

**PROCJENA PROTOKOLA ZA PRIPREMU UZORAKA KRVNE PLAZME ZA  
ODREĐIVANJE BUTIRATA GC/MS METODOM  
ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Digitalna biotehnologija

**Mentor:** prof. dr. sc. Jurica Žučko

**Zagreb, 2024.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za bioinformatiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Procjena protokola za pripremu uzoraka krvne plazme za određivanje butirata GC/MS metodom

Tara Krpan, 0058221172

### Sažetak:

U ovom radu ispitivala se učinkovitost pripreme uzoraka krvne plazme za određivanje koncentracije butirata prema dva protokola. Koncentracija butirata indikator je zdravlja organizma, a butirat je važan zbog mnogih pozitivnih učinaka koje ima na ljudski organizam. Provedena su dva protokola pripreme uzorka i na kraju se uspoređivala njihova pogodnost za daljnju analizu na uređaju za GC/MS. Kao rezultat dobiveno je da su oba protokola dala zadovoljavajuće odvajanje faza i ekstrakciju kratkolančanih masnih kiselina, ali za daljnju analizu ostalih uzoraka koristio bi se Protokol 1 zbog preciznijeg odvajanja faza i manje mogućnosti kontaminacije talogom.

**Ključne riječi:** butirat, GC/MS, odvajanje faza

**Rad sadrži:** 25 stranica, 9 slika, 30 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Jurica Žučko

**Pomoć pri izradi:** Andrijana Meščić Macan, dr. sc.

**Datum obrane:** 16. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of biochemical engineering  
Laboratory for bioinformatics

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

**Evaluation of the protocols for the preparation of blood plasma samples for determination of butyrate by the GC/MS method**

**Tara Krpan, 0058221172**

**Abstract:**

In this study, we compared the efficiency of two protocols for preparing blood plasma samples for butyrate concentration determination using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). Butyrate is a crucial biomarker of health due to its numerous beneficial effects on the human body. Both protocols achieved satisfactory phase separation and extraction of short-chain fatty acids. However, Protocol 1 exhibited superior performance, demonstrating more precise phase separation and a reduced risk of sediment contamination. Therefore, Protocol 1 is recommended for future sample preparation in this context to ensure accurate and reliable butyrate concentration measurements using GC/MS.

**Keywords:** butyric acid, GC/MS analysis, phase separation

**Thesis contains:** 25 pages, 9 figures, 30 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Jurica Žučko, PhD, Full Professor

**Technical support and assistance:** Andrijana Meščić Macan, PhD

**Thesis defended:** September 16<sup>th</sup> 2024

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. UVOD U MIKROBIOTU.....	2
2.2. METODE ODREĐIVANJA CRIJEVNE MIKROBIOTE.....	5
2.3. NASTAJANJE I ZNAČAJ MASLAČNE KISELINE.....	7
2.4. ODREĐIVANJE BUTIRATA U BIOLOŠKIM UZORCIMA .....	10
2.4.1. GC/MS ANALIZA (GC – PLINSKA KROMATOGRAFIJA, MS – MASENA SPEKTROMetriJA) .....	11
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
3.1. PROTOKOL 1: PRIPREMA UZORAKA ZA KVANTITATIVNU ANALIZU KRATKOLANČANIH MASNIH KISELINA (SCFA) IZ LJUDSKE PLAZME GC/MS-OM, ANALITIČKOM I BIOANALITIČKOM KEMIJOM .....	14
3.1.1. MATERIJALI .....	14
3.1.2. OPREMA .....	14
3.1.3. METODE.....	15
3.2. PROTOKOL 2: POBOLJŠANA METODA ZA PRIPREMU UZORAKA KORIŠTENIH ZA KVANTIFIKACIJU KRATKOLANČANIH MASNIH KISELINA U BIOLOŠKIM UZORCIMA KORISTEĆI GC/MS ANALIZU.....	16
3.2.1. BIOLOŠKI UZORCI.....	16
3.2.2. MATERIJALI .....	16
3.2.3. OPREMA .....	16
3.2.4. METODE.....	16
3.3. OBJAŠNJENJE IZA NEKIH KORAKA PROTOKOLA.....	17
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>18</b>
4.1. REZULTATI PRIPREME UZORKA PREMA PROTOKOLU 1 .....	18
4.2. REZULTATI PRIPREME UZORKA PREMA PROTOKOLU 2 .....	19
4.3. USPOREDBA IZGLEDA UZORAKA NA KRAJU OBA PROTOKOLA .....	20
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>21</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>22</b>

## 1. UVOD

Mikrobiota jedan je od najvažnijih „prijatelja“ ljudskog organizma. Može se reći da mikroorganizmi nastanjeni u i na tijelu čovjeka žive u simbiozi s domaćinom, ljudskim organizmom. Domaćin njima omogućuje dom, hranu i povoljne uvjete za preživljavanje i rast, a oni za njega imaju iznimno važnu ulogu u održavanju ravnoteže u organizmu te poboljšanju zdravlja organizma.

Najveći centar kolonizacije mikroorganizama nalazi se unutar probavnog trakta čovjeka. U njemu mikrobiota metabolizira i probavlja sve ono što sam organizam nije uspio. Kao produkt aktivnosti mikroorganizama unutar crijeva čovjeka nastaju kratkolančane masne kiseline. U najvećoj koncentraciji nastaju acetatna, propionatna i maslačna kiselina, koje se dijelom apsorbiraju u krv unutar debelog crijeva, a drugi neapsorbirani dio se izbacuje iz organizma putem fecesa. U ovom radu naglasak je na određivanju koncentracije maslačne kiseline unutar uzetih uzoraka krvne plazme ispitanika.

Kako nam koncentracija butirata u fecesu ili krvi može puno toga reći o trenutnom zdravstvenom stanju organizma i zbog velikog značaja butirata za sami organizam ustanovljene su metode kojima se ona određuje. Najčešće korištena metoda za određivanje koncentracije butirata, koja bi se također primijenila i u nastavku ovog projekta, je kombinacija plinske kromatografije i masene spektrofotometrije (GC/MS metoda).

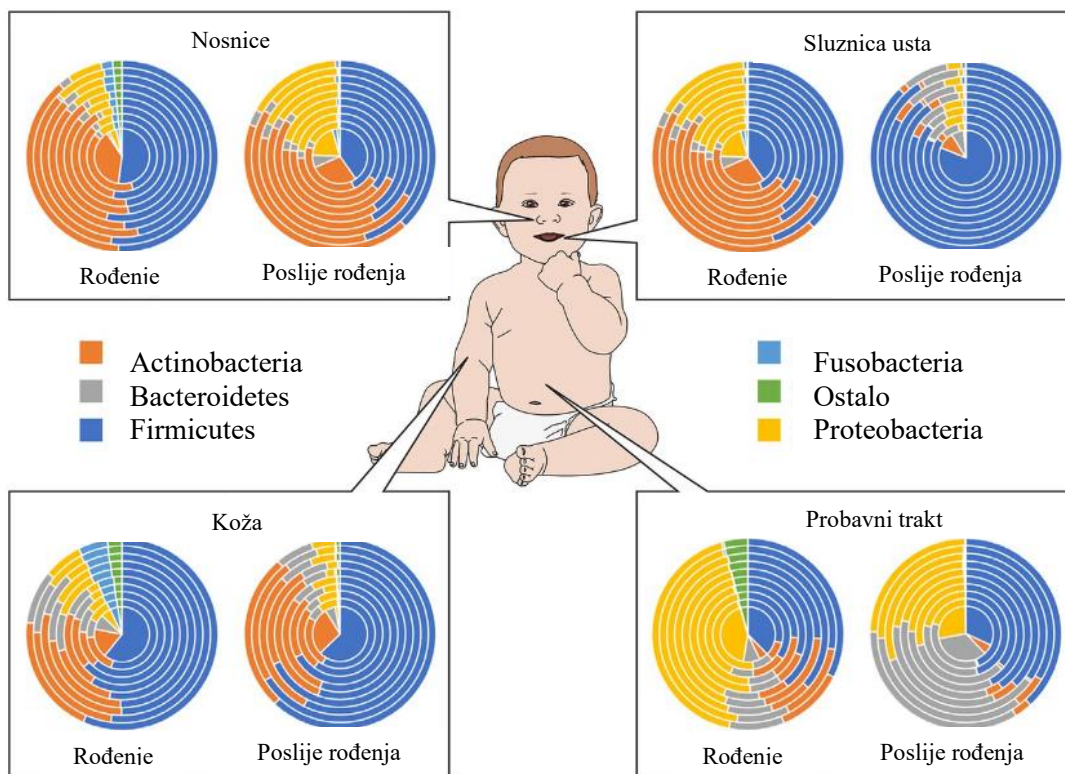
Ovaj rad fokusirao se na promatranju uspješnosti i pogodnosti pripreme uzoraka krvne plazme koji se onda mogu u nastavku koristiti za određivanje koncentracije butirata GC/MS metodom. Uzorak se pripremao prema dva različita protokola koja su nakon provedbe same pripreme uspoređena za uspješniji nastavak daljnjeg projekta.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Uvod u mikrobiotu

Često dolazi do zabune između pojmova ljudska „mikrobiota“ i ljudski „mikrobiom“. Razlika je ta da se mikrobiota definira kao određena zajednica mikroorganizama koji se nalaze u/na tijelu čovjeka, a ljudski mikrobiom je ukupni genetički materijal svih tih mikroorganizama (Ursell i sur., 2012). Stavimo li u usporedbu broj gena koji čine ljudski genom i broj gena koji čine mikrobiom dobijemo omjer 1:150 što daje jasan uvid u važnost istraživanja mikrobiote. Kada je u pitanju ljudska mikrobiota radi se o 10 – 100 triliona stanica mikroorganizama, 50 koljena bakterija te 100 – 1000 bakterijskih vrsta koje žive većinom u simbiozi s ljudskim organizmom (Adak i Khan, 2018). Mikroorganizmi humane mikrobiote potječu iz svake od tri domene života: Eukariota, Bakterija ili Arheja, a među njima se znaju nalaziti i virusi, koji čine tzv. virom, i mogu varirati između toga da s ljudskim organizmom imaju simbiotski odnos, do toga da se ponašaju kao paraziti (Milani i sur., 2017). Antonie van Leewenhoek je 1680. godine bio prvi koji je započeo istraživanja o ljudskoj mikrobioti usporedivši mikroorganizme koji su se nalazili unutar usne šupljine i one iz fekalija te je shvatio kako je razlika znatna, što je dalje potaknulo znanstvenike u istraživanje ove teme. U to vrijeme bilo je moguće samo utvrditi morfološku razliku između mikroorganizama na različitim dijelovima tijela, ali danas se više istražuje zašto ta razlika postoji i kako se na nju može utjecati (Ursell i sur., 2012).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da se mikrobiota istih dijelova tijela kod različitih ljudi znatno ne razlikuje, dok se sastav mikroorganizama na različitim dijelovima tijela istog čovjeka razlikuje poprilično (slika 1). Isto kao što se i sastav mikrobiote na istom dijelu tijela jednog čovjeka može razlikovati obzirom na njegovu dob (Davenport i sur., 2017).



**Slika 1.** Prikaz glavnih skupina mikroorganizama na različitim dijelovima tijela dojenčadi prilikom rođenja i u ranoj fazi života (Milani i sur., 2017)

Najveća koncentracija mikroorganizama nalazi se unutar ljudskog probavnog trakta, ona se naziva crijevna mikrobiota te je upravo na njoj naglasak ovog rada (Milani i sur., 2017). Ljudski organizam sadrži otprilike  $10^{14}$  stanica, a samo unutar probavnog trakta nalazi se  $10^{13} - 10^{14}$  bakterijskih stanica bez kojih čovjek ne bi mogao preživljavati (Sossai, 2012). Najčešća četiri koljena bakterija koja su prisutna u crijevnoj mikrobioti čovjeka su: *Bacteroidetes* i *Firmicutes* kao dva najzastupljenija koljena, a slijede ih *Proteobacteria* i *Actinobacteria* (Davenport i sur., 2017).

Formiranje crijevne mikrobiote započinje već pri rođenju gdje novorođenče, ovisno o načinu porođaja, nasljeđuje mikroorganizme s kože majke (ako se radi o carskom rezu) ili mikroorganizme slične onima iz majčinog vaginalnog otvora (ako se radi o porođaju prirodnim putem) (M Chu i sur., 2017). Prije nego što neka vrsta uopće može kolonizirati u probavnom traktu, ona mora imati određene karakteristike da tamo i opstane. Za početak, mora imati odgovarajući oblik stanice kako bi se uopće mogla prihvatiti unutar probavnog trakta čovjeka, zatim, da bi uspjela preživjeti važno je da može unutar stanica sintetizirati enzime kojima može probaviti



dostupne nutrijente, mora imati sposobnost zaštite od bakteriofaga i na kraju, mora moći preživjeti u „stresnim“ uvjetima kada se prebacuje s jednog domaćina na drugog (Adak i Khan, 2018). Još jedan prirodni proces koji usmjerava razvoj crijevne mikrobiote čovjeka naziva se „filtrar staništa“ u kojemu neke vrste mikroorganizama unutar crijeva preživljavaju ili izumiru ovisno o uvjetima unutar, u ovom slučaju, crijeva domaćina. Postoje neka pravila po kojima se može zaključiti hoće li određena vrsta opstati u određenim uvjetima, ali je moguće da dođe do iznimke. To su slučajevi kada određena vrsta mutira ili rekombinira s nekom drugom vrstom (Milani i sur., 2017).

Tri glavna organa čine ljudski probavni trakt: želudac, tanko i debelo crijevo. Unutar želudca, za koji su znanstvenici dugo smatrali da je sterilan zbog kiseline koja se izlučuje u njemu, ispostavilo se da više od pola vrsta mikroorganizama potječe iz usne šupljine i to samo one koje su rezistentne na kisele uvjete i mogu u njima preživljavati (Adak i Khan, 2018). Tanko crijevo se metaforički naziva „mjesto za održavanje sastanaka domaćina i mikrobiote“ jer je ono glavni organ za apsorpciju i razgradnju nutrijenata unesenih u ljudski organizam i iznimno utječe na zdravlje čovjeka (Delbaere i sur., 2023). Debelo crijevo je „nastanjeno“ s otprilike  $10^{14}$  stanica mikroorganizama dok je npr. tanko crijevo domaćin samo njih  $10^8$  i zato je prilikom istraživanja crijevne mikrobiote naglasak upravo na debelom crijevu, također i uz prednost lakšega dobivanja uzorka. U njemu se neprobavljena hrana fermentira i apsorbira se voda. Dva koljena koja prevladavaju unutar debelog crijeva su *Firmicutes* i *Bacteroidetes* te je omjer koncentracije tih dvaju koljena indikator bolesti ili zdravlja čovjekova organizma (Davenport i sur., 2017).

Za ljudsko tijelo se smatra da je jedna vrsta eko-sustava kojemu je, za opstanak, važna ravnoteža svih njegovih članova pod koje spadaju sve stanice čovjeka i mikrobiota u/na njegovom tijelu (Milani i sur., 2017). Koliko se za čovjekov probavni trakt može reći da služi kao „dom“ za mikroorganizme toliko je i njihova uloga za čovjeka važna. Oni imaju strukturnu, metaboličku i zaštitničku ulogu u organizmu čovjeka (Adak i Khan, 2018). Neke od uloga crijevne mikrobiote su fiksacija dušika, razgradnja i ponovno iskorištenje minerala, proizvodnja sekundarnih metabolita i vitamina te je važna za imunološki odgovor organizma domaćina (Bharti i Grimm, 2021). Poznavanje mikrobiote čovjeka iznimno je korisno i kada su u pitanju zarazne i ne zarazne bolesti jer gubitak ravnoteže unutar mikrobiote može odrediti ishod oboljenja organizma takvim bolestima, kao npr. zarazu virusom COVID-19 ili oboljenje od dijabetesa. Uočavanje promjena unutar mikrobiote može rano prepoznati razvitak neke bolesti pa ju se pravovremeno može i spriječiti, također mikrobiota je velika pomoć pri formiranju nemedicinskih pristupa liječenju određenih bolesti (El-Sayes i sur., 2021).

## 2.2. Metode određivanja crijevne mikrobiote

Metode određivanja crijevne mikrobiote mogu se podijeliti na ovisne i neovisne o kultivaciji mikroorganizama. Metode ovisne o uzgoju mikroorganizama ustanovio je Robert Koch i one se zasnivaju na metodama kulturomike, uzgoju i identifikaciji mikroorganizama na temelju njihovih fizioloških i biokemijskih svojstava. Za uzgoj se koriste različite selektivne hranjive agar podloge uz dodatak nutrijenata kojima je omogućen uzgoj, do sada, teško uzgojivih kultura, makar i uz dodatak određenih nutrijenata još uvijek dominantne kulture bakterija prikrivaju one manje dominantne i time otežavaju njihovu izolaciju. Glavni problem identifikacije mikroorganizama metodama ovisnim o uzgoju mikrobnih zajednica je nemogućnost održavanja svih mikroorganizama u laboratorijskim uvjetima što dovodi do smanjene raznovrsnosti određenih mikrobnih zajednica. Stoga se koriste drugi oblici poboljšanja hranjive podloge i selektivan uzgoj kultura od interesa kao što su bakteriofazi, antibiotici i filtracija (Adak i Khan, 2018). Iako je došlo do velikog napretka u uzgoju što većeg broja vrsta iz crijevne mikrobiote, nakon napravljenih prvih sekvenciranja mikrobioma crijeva ispostavilo se da više od 80% detektiranih vrsta nije do tada bilo uzgojeno metodama kulturomike (Lagier i sur., 2015). Zato su odlučili promijeniti uvjete uzgoja i predstavili su tri nova modela uzgoja: dodatak ovčje krvi, dodatak tekućine iz buraga i pred inkubacija u krvnoj kulturi. Primjenom novih modela uzgoja izolacija bakterijskih kultura povećana je za 25, 40 i 56% što uvelike poboljšava učinkovitost metoda identifikacije mikroorganizama ovisnih o kultivaciji (Adak i Khan, 2018). Usporedbom metoda ovisnih i neovisnih o kulturi znanstvenici su ustanovili da nije moguće samo metodama kulturomike dobiti dovoljno dobar uvid u sve vrste mikroorganizama koje se nalaze u ljudskom probavnom traktu pa su započeli provoditi kombinaciju tih dviju metoda uz dodatnu provjeru masenom spektrometrijom (Lagier i sur., 2015).

Najvažnija metoda neovisna o kultivaciji je sekvenciranje 16S rRNA gena koja je razvijena nastavno na postojeće sekvenciranje koje su postavili Carl Woese i suradnici korištenjem Sangerovog sekvenciranja (Adak i Khan, 2018). 16S rRNA sekvenciranje pripada novoj generaciji sekvenciranja i pripada tzv. amplikon tipu sekvenciranja. Ono se bazira na sekvenciranju ciljane regije DNA molekule koja je umnožena reakcijom lančane polimeraze. Najveća prednost ove metode je mogućnost identifikacije vrsta koje nije moguće uzgojiti metodama kulturomike. 16S rRNA gen jako je pogodan za sekvenciranje jer je regija za sekvenciranje poprilično kratka što olakšava sam postupak, prisutan je u svim vrstama bakterija, visoko je

konzerviran i sadrži devet regija koje su hipervarijabilne. One su te koje se koriste za određivanje razlike među vrstama bakterija i omogućavaju njihovu identifikaciju (Wensel i sur., 2022). 16S rRNA gen, u većini arheja i bakterija, kodira za 30S (malu) podjedinicu 70S ribosomalnog kompleksa (Bharti i Grimm, 2021). Obzirom da obavlja ključnu ulogu u organizmu povezanu sa sintezom proteina mora se nalaziti u svim vrstama bakterija jer bez 30S podjedinice ribosoma bakterije ne bi mogle opstati. Ova metoda započinje izolacijom DNA iz uzorka mikrobne zajednice, koju slijedi PCR (Polymerase Chain Reaction, odn. Lančana Reakcija Polimerazom) kojom se umnaža 16S rRNA regija, koristeći početnice koje se komplementarno sparuju na konzervirane regije, a umnažaju odabrane hipervarijabilne regije (V1-V9). Kao standard za identifikaciju mikroorganizama Projekt Zemljinog mikrobioma (eng. Earth Microbiome project) definirao je hipervarijabilnu regiju V4, međutim u znanstvenim istraživanjima može se koristiti svaka od hipervarijabilnih regija ili njihova kombinacija kako bi se povećala specifičnost i osjetljivost metode. Zatim slijedi sekvenciranje umnoženih regija kojem prethodi pročišćavanje i provjera stvorene genomske knjižnice, tj. provjera rezultata PCR reakcije. Nakon sekvenciranja slijedi „čišćenje podataka“. Ono se odnosi na uklanjanje sekvencije početnica i adaptera, uklanjanje sekvenci loše kvalitete očitavanja te uklanjanje sekvencija koje se smatraju kontaminacijama, npr. kimernih sekvencija. Kada su se uklonile sve moguće smetnje u procesu slijedi slaganje podataka u operacijske taksonomske jedinice (OTU, Operational Taxonomic Units) ili sekvenci amplikonskih varijanti (ASV, Amplicon Sequence Variants) koje se računalno uspoređuju s podacima koji se nalaze u taksonomskim bazama, konstruiranim ranije koje povezuju određeni slijed nukleotida s taksonomijom. Usporedbom sljedova očitanih nukleotida sekvenciranjem amplikona i njihovom usporedbom s taksonomskom bazom identificira se određena vrsta, rod ili koljeno bakterije (Wensel i sur., 2022).

Druga metoda sekvencioniranja mikrobioma temelji se na metagenomici. U tom slučaju se radi tzv. „shotgun“ sekvenciranje svih genoma koji se nalaze na mjestu s kojeg je uzet uzorak, bez umnažanja dijela genoma kao kod amplikon sekvenciranja. Njome se mogu detektirati svi prisutni mikroorganizmi unutar crijevne mikrobiote, uključujući i viruse koji se inače teško izoliraju (Bharti i Grimm, 2021). Kod metagenomičkog sekvenciranja prvi korak je ekstrakcija DNA ili RNA iz uzorka. Ako se radi o ekstrakciji DNA, ona može odmah na daljnju analizu dok ako je u pitanju RNA, ona se prvo mora PCR-om, pomoću enzima reverzne transkriptaze, prevesti u komplementarnu DNA kako bi bila pogodna za daljnje odvijanje analize. Nakon toga slijedi nasumično cijepanje DNA u fragmente duljine koje korištena tehnologija sekvenciranja može očitati, te analiza podataka (Wensel i sur., 2022).

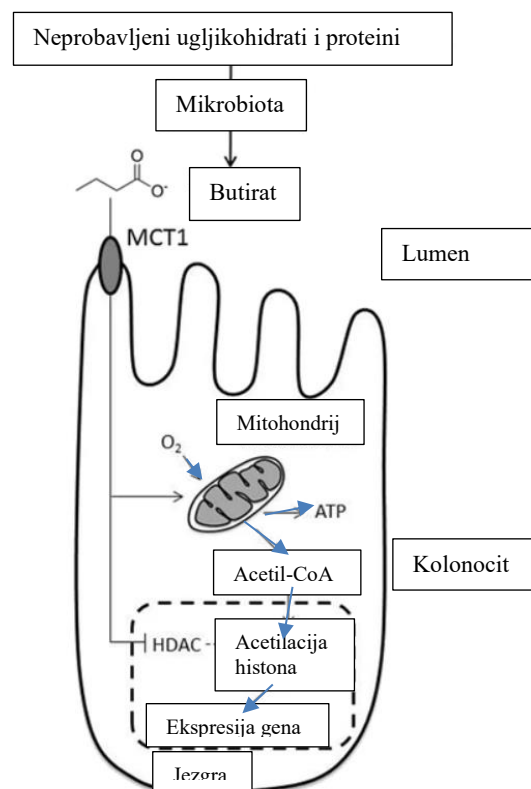
### 2.3. Nastajanje i značaj maslačne kiseline

Crijevna mikrobiota ima ključnu ulogu u fermentaciji neprobavljenih ugljikohidrata, pri čemu kao produkti nastaju kratkolančane masne kiseline. To su masne kiseline od 2 do 5 C atoma, a najvažnija karakteristika im je topljivost u vodi, za razliku od dugolančanih masnih kiselina koje su u potpunosti hidrofobne (Sossai, 2012). Predstavnici kratkolančanih masnih kiselina su valerinska kis. (5 C), malačna kis. (4 C), propionska kis. (3 C) i acetatna kis. (2 C). U najvećoj koncentraciji nastaju unutar debelog crijeva i to u sastavu 15 % maslačna kis., 25 % propionatna i u najvećoj mjeri nastaje acetatna kis. i to oko 60 % (Canani i sur., 2011). Kratkolančane masne kiseline su slabe kiseline koje imaju negativni logaritam konstantne disocijacije (pK) oko 4,8, što upućuje na to da se unutar probavnog trakta nalaze većinom u anionskom obliku jer je pH probavnog trakta uglavnom neutralan (pH oko 7) (Guilloteau i sur., 2010).

Nastankom ovih organskih kiselina, u debelom crijevu, dolazi do snižavanja pH-a okoline, što pogoduje bakterijama koje proizvode maslačnu kiselinu da „nadjačaju“ Gram-negativne bakterije koje probavljaju ugljikohidrate i izbore se za izvor energije i ugljika (Canani i sur., 2011). Maslačna kiselina još se naziva i butirat, karboksilna ili butanska kiselina. Ima molekulsku formulu  $C_4H_8O_2$ , strukturna formula joj je  $CH_3CH_2CH_2COOH$ , a molarna masa joj iznosi  $88,11 \text{ g mol}^{-1}$  (Goldberg i Rokem, 2009). Ona nastaje mikrobnom fermentacijom škroba, dijetalnih vlakana, psilijuma, inulina, pšeničnog brašna i ostalih ugljikohidrata koji neprobavljeni dospiju do debelog crijeva, a može se unositi i oralno, kao dodatak prehrani, najčešće u formi soli (Stø i sur., 2022). Osim u lumenu debelog crijeva nalazi se još i u krvi, mlijeku, fecesu i znoju većine sisavaca (Guilloteau i sur., 2010). Na proizvodnju maslačne kiseline najviše utječe sastav mikroorganizama unutar crijevne mikrobiote. (Blachier i sur., 2018). Dvije najveće skupine bakterija koje proizvode maslačnu kiselinu u probavnom traktu čovjeka su *Faecalibacterium prausnitzii* i *Eubacterium rectale/Roseburia spp.* (Canani i sur., 2011). Maslačna kiselina ima protuupalna svojstva te joj se uloge koje ima za ljudski organizam mogu podijeliti na ekstraintestinalna (van probavnog sustava) i intestinalne (one koje su važne za probavni sustav).

Važnost maslačne kiseline za probavni sustav bolje je i više istražena, a uključuje: zaštitu i sprječavanje karcinoma debelog crijeva, modulaciju visceralne pokretljivosti i osjetljivosti, jačanje sluzničke barijere, regulaciju transepitelnog transporta, smanjenje upalnih stanja i oksidativnog stresa crijevne sluznice, poboljšana apsorpcija iona, diferencijacija i proliferacija stanica te imunosna regulacija. Uz sve ove, ipak jedna od najvažnijih uloga maslačne kiseline za

probavni sustav je što služi kao izvor energije stanicama koje obavijaju debelo crijevo, kolonocitima (Sossai, 2012; Canani i sur., 2011). Butirat difuzijom prolazi kroz sluznicu i ulazi u kolonocite pomoću proteina monokarboksilatnog transportera 1. U mitohondrijima kolonocita dolazi do oksidacije jednog dijela butirata do acetil-CoA uz oslobađanje energije (u obliku ATP-a) koji se koristi za acetilaciju histona. Drugi dio butirata, koji nije išao u proces oksidacije, inhibira histon deacetilazu. Proces acetilacije ili deacetilacije histona utječe na ekspresiju gena unutar stanica kolonocita (slika 2) (Blachier i sur., 2018). Kada su histoni acetilirani dolazi do njihovog slabijeg povezivanja s DNA te je ona dostupnija transkripcijskim faktorima, što potiče ekspresiju gena (Pavlica, 2024).



**Slika 2.** Shematski prikaz ulaska i metabolizma butirata unutar kolonocita (Blachier i sur., 2018)

Butirat pomaže u jačanju sluzničke barijere na način da sudjeluje u sintezi mucina, glikoproteina velike molekulske mase koji su sastavni dio tjelesne sluznice. Oni su važni jer služe kao supstrat određenim vrstama bakterija u debelom crijevu te štite sluznicu od bakterija i toksina. Fizička aktivnost jedan je od parametara koji poboljšava rast butirata-proizvodnih mikroorganizama. Njome se simulira proizvodnja proteina toplinskog šoka 70 (Hsp 70) koji, u nepovoljnim staničnim uvjetima, osigurava funkcionalnu i strukturalnu stabilnost epitelnih stanica tkiva

(Blachier i sur., 2018). Način na koji proizvodnja butirata sprečava karcinom debelog crijeva naziva se „paradoks butirata“. Butirat, u isto vrijeme, potiče proliferaciju zdravih stanica enterocita i inhibira proliferaciju stanica karcinoma debelog crijeva, pojačanom acetilacijom histona odnosno inhibicijom enzima histon deacetilaze (Sossai, 2012). U tom slučaju dolazi do poremećaja ravnoteže kod acetilacije histona koja može dovesti do utišavanja nekih gena koji sudjeluju u razvitku karcinoma (Canani i sur., 2011).

Ekstraintestinalne uloge maslačne kiseline manje su istraživane kod ljudi, one su utjecaj butirata na hiperkolesterolemiju i hemoglobinopatiju, a na životinjama istražene su smanjenje šanse ishemijskog moždanog udara, smanjenje rezistencije na inzulin i tretiranje pretilosti proizrokovane ishranom (Sossai, 2012).

Hemoglobinopatije su nasljedne bolesti nastale zbog promijene u građi molekule hemoglobina ili promjenom brzine sinteze polipeptidnih lanaca globina (Hrvatska enciklopedija, 2013 – 2024). Maslačna kiselina je pokazala da potiče hiperacetilaciju histona što rezultira sintezom fetalnog hemoglobina (HbF) i tako povećava učinkovitost nastanka crvenih krvnih stanica te smanjuje učinak bolesti (Canani i sur., 2011). Kod hiperkolesterolemije dolazi do povišene koncentracije LDL kolesterola u krvi zbog kojega je oboljela osoba u velikom riziku od kardiovaskularnih bolesti i ateroskleroze (Herceg-Čavrak, 2016). Butirat ovdje ima veliku ulogu jer može inhibirati ekspresiju devet ključnih gena koji potiču biosintezu kolesterola te spriječiti i samo daljnje nastajanje i nakupljanje kolesterola u krvi. Uz ove navedene bolesti čijim oboljelima butirat ima važnu ulogu, on pomaže i u ostalim genetskim bolestima metabolizma. Pacijentima kod kojih ne dolazi do sinteze dovoljne količine enzima uključenih u urea ciklus butirat također može imati važno značenje. Naime, sol butirata pod imenom natrijev fenilbutirat 4 (4-PBA), u organizmu pacijenta oksidira se do fenilacetata te se u ovom obliku veže na aminokiselinu glutamin. Ona je uključena u urea ciklus i može ga ubrzati te upravljati izlučivanjem mokraće. 4-PBA može imati ulogu i u poboljšanju kontrole metabolizma i povećanju unosa prirodnih proteina kod pacijenata kojima nedostaje dovoljna količina ornitin transkarbamilaza, čiji nedostatak rezultira nenormalnim nakupljanjem ornitina u organizmu (Canani i sur., 2011).

Utjecaj butirata kod liječenja pretilosti i rezistencije na inzulin istraživali li su Gao i sur. (2009), kod inducirano pretilih miševa. Istraživanje je pokazalo da su nakon petotjednog unošenja butirata kao dodatak uz visoko – masnu dijetu pretili miševi izgubili 10,2 % svoje tjelesne mase, a rezistencija stanica na inzulinski signal je smanjena u pola, što je automatski rezultiralo smanjenjem koncentracije inzulina u krvi. Dokazali su također da je i na nivou stanica butirat pojačao stanično disanje u mitohondrijima.

Također, potaknuti trenutnim statistikama, da su kardiovaskularne bolesti jedan od najčešćih uzroka smrti današnjice, znanstvenici su u novijim istraživanjima počeli dokazivati i učinkovitost butirata direktno na kardiovaskularne bolesti. Postoje dva glavna načina na koja normalna razina butirata može spriječiti razvitak bolesti kardiovaskularnog sustava. Prvi je taj da, kao i kod hemoglobinopatije potiče acetilaciju histona, inhibicijom histon deacetilaze. U tom slučaju dolazi do povećane acetilacije transkripcijskih faktora koji su odgovorni za ekspresiju gena i regulaciju transkripcije. Drugi pozitivan učinak butirata je taj da se može vezati i posljedično tome aktivirati specifične receptore FFAR2 i FFAR3, koji su receptori za slobodne masne kiseline (Amiri i sur., 2022). Dok FFAR2 ima nešto veći afinitet za vezanje propionske kiseline nego za ostale kratkolančane masne kiseline nastale u probanom traktu, FFAR3 ima jednaki afinitet za butirat, propionat i acetat. Ova dva receptora eksprimirana su unutar masnog tkiva gdje se izlučuje hormon pod imenom leptin (Skoglund, 2016). Leptin je hormon koji ima važnu ulogu u regulaciji razine energije. Pri njegovom izlučivanju suprimira se glad pri čemu posljedično dolazi do smanjenja masti unutar adipoznog tkiva (Al-hussaniy i sur., 2021). Stoddart i sur. (2008) provedenim istraživanjima uvidjeli su znatnu korelaciju između koncentracije leptina unutar adipoznog tkiva i količine nastalih masnih kiselina u crijevima, uključujući butirat. Rezultati do kojih su došli pokazali su da što je koncentracija nastalih masnih kiselina veća to je i koncentracija hormona leptina veća, što znači da se povećanom sintezom leptina smanjio apetit organizma i automatski dolazi do manjeg rizika od nastanka bolesti kardiovaskularnog sustava. Stoga, ukoliko dođe do disbalansa unutar crijevne mikrobiote dolazi do premalene količine sintetiziranih produkata, u ovom slučaju naglasak je na maslačnoj kiselini, što može dovesti do razvitka upravo bolesti kardiovaskularnog sustava.

#### **2.4. Određivanje butirata u biološkim uzorcima**

Maslačna kiselina, uz ostale kratkolančane masne kiseline koje nastaju u probavnom traktu čovjeka, nakon nastanka ne ostaje samo u crijevima. Dapače, oko 90 % nastalih kratkolančanih masnih kiselina se apsorbiraju preko debelog crijeva i putem jetrene vene odlaze do jetre. Ostatak koji ostane unutar debelog crijeva (oko 10%) uklanja se iz organizma putem fecesa. Dok je koncentracija acetata apsorbirana u krv veća nego ostalih masnih kiselina jer on može služiti kao izvor energije ljudskom organizmu, butirata u krvi nema toliko. Njegova primarna uloga je lokalna opskrba stanica crijeva (enterocita i kolonocita) energijom. Ne postoji fiksna koncentracija butirata koja se može apsorbirati u krv ili ukloniti u obliku fecesa jer to ovisi o

načinu prehrane, vrsti mikroorganizama koji se nalaze u crijevima, količini neprobavljenih ugljikohidrata koji dopijaju do crijeva i dr. Iz ovog razloga, što se dio nastalog butirata iz crijeva nalazi u krvi, a dio u fecesu, postoje dvije vrste uzoraka iz kojih se može mjeriti njegova koncentracija. Kao najčešća metoda analize uzoraka koristi se GC/MS analiza, analiza koja kombinira plinsku kromatografiju i detekciju na masenom spektrofotometru.

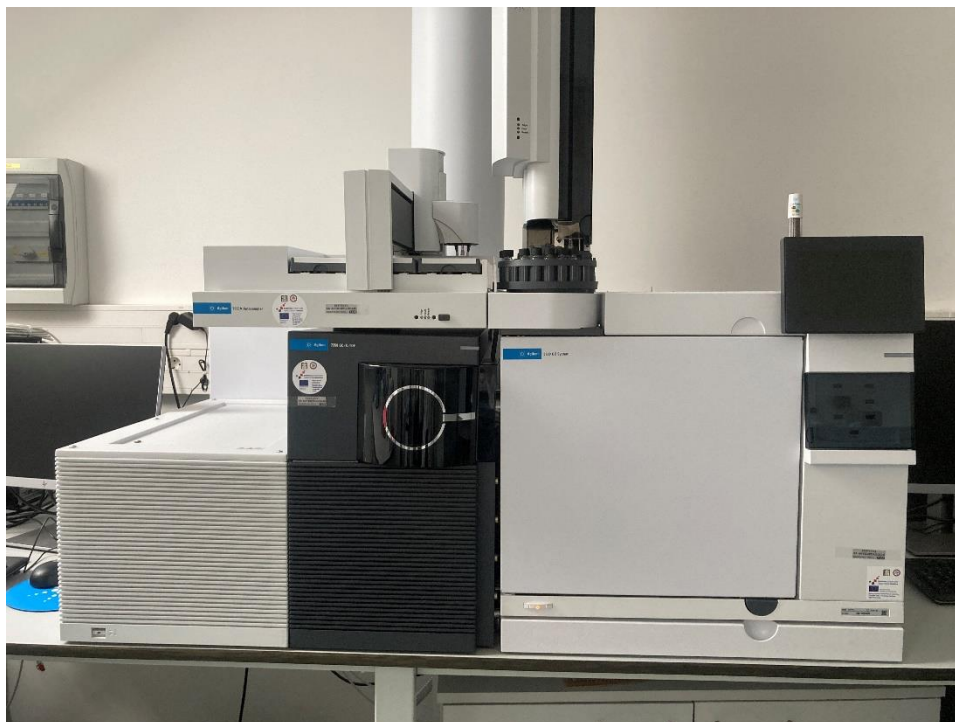
Kada je u pitanju odabir vrste uzorka, sami postupak uzimanja uzorka od ispitanika lakši je kada se butirat mjeri iz fecesa, a kada je riječ o krvi može se koristiti krvna plazma ili krvni serum. U većini slučajeva znanstvenici biraju mjerenje butirata iz krvnog seruma jer je sama injekcija uzorka na GC kolonu lakša i preciznija zbog manje količine proteina u serumu nego u plazmi (Skoglund, 2016). Isto tako, pošto je količina butirata koja nastaje unutar probavnog trakta znatno veća u fecesu nego u krvi, primarni izbor vrste uzorka bio bi feces zbog točnije analize i pouzdanijih podataka (Stø i sur., 2022).

Ostale metode koje se mogu koristiti za određivanje butirata u uzorcima nisu tako često korištene. Jedna od metoda kojom se može mjeriti koncentracija butirata iz fecesa je GC-FID metoda. U njoj se koristi prvo plinska kromatografija (GC) i zatim detekcija ionizirajućim plamenom (FID). Uz GC mogu se koristiti i visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC), kapilarna elektroforeza (CE) ili nuklearna magnetna rezonancija (NMR), ali niti jedna se ne koristi tako često jer GC ima najbolje uvjete provedbe metode. Ima izvrsnu osjetljivost na kratkolančane masne kiseline, dobru razlučivost, cijena postupka i same pripreme uzoraka za nanošenje na kolonu je puno niža od ostalih metoda te je zbog hlapljivosti masnih kiselina pogodna za određivanje njihove koncentracije. Za njeno poboljšanje GC se najčešće uparuje s masenom spektrofotometrijom (Scortichini i sur., 2020).

#### **2.4.1. GC/MS analiza (GC – plinska kromatografija, MS – masena spektrometrija)**

GC/MS analiza je vrlo često korištena tehnika koja kombinira plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju (slika 3) za identifikaciju i kvantifikaciju metabolita s molarnom masom manjom od 650 Da, a u to spadaju: toksini, lijekovi, steroli, masne kiseline, šećeri, aminokiseline, hidroksilne kiseline, alkoholi, manje kiseline i dr. Ovom metodom može se prepoznati i kvantificirati više od 200 komponenti tekućina iz ljudskog tijela (Fiehn, 2016).





**Slika 3.** Uređaj za GC/MS analizu (vlastita fotografija)

MS spada u analitičke metode jer se njome može odrediti količina neke komponente u uzorku dok samo s GC to nije moguće. Plinskom kromatografijom može se dobiti samo informacija o prisutnosti neke komponente u uzorku. Kombinacijom ovih dvaju tehnika dobije se trodimenzionalni uvid u koncentraciju komponente u mjerenom uzorku (Turner, 2024). Kod plinske kromatografije uzorak mora biti hlapljiv kako bi ga inertni plin mogao provoditi kroz kapilarnu kolonu obavijenu staklom, to se naziva mobilna faza, a stacionarna faza se nalazi na unutarnjoj površini kolone (Eurofins Scientific, 2015 – 2024). Uzorak se na kolonu može nanositi automatski ili ručno. U koloni za GC komponente uzorka se, prema razlici u podjeli između mobilne i stacionarne faze, razdvajaju i posljedično toj razlici imaju različito vrijeme elucije (Turner, 2024). Nakon što uzorak napušta kolonu za GC, prelazi na uređaj za masenu spektrometriju gdje je fragmentiran na pozitivno nabijene radikale, djelovanjem elektrona (elektronska ionizacija). Kationski radikali početne molekule su ti koji se razdvajaju prema omjeru mase i naboja, na analizatoru mase. Nakon razdvajanja i prolaska kroz analizator mase idu na ionski detektor koji šalje signal na računalo i dobije se kromatogram i maseni spektar. Spektar i kromatogram koji se dobije uspoređuje se s referentnim spektrom iz literature i identificira se komponenta od interesa (Turner, 2024; Eurofins Scientific, 2015 – 2024).

Pri kvantifikaciji masnih kiselina, u većini slučajeva, one se prvo prevode u svoje metil-ester ili trimetil-ester derivate jer je u ovoj vrsti analize bitno da su spojevi koji se određuju prilagođeni

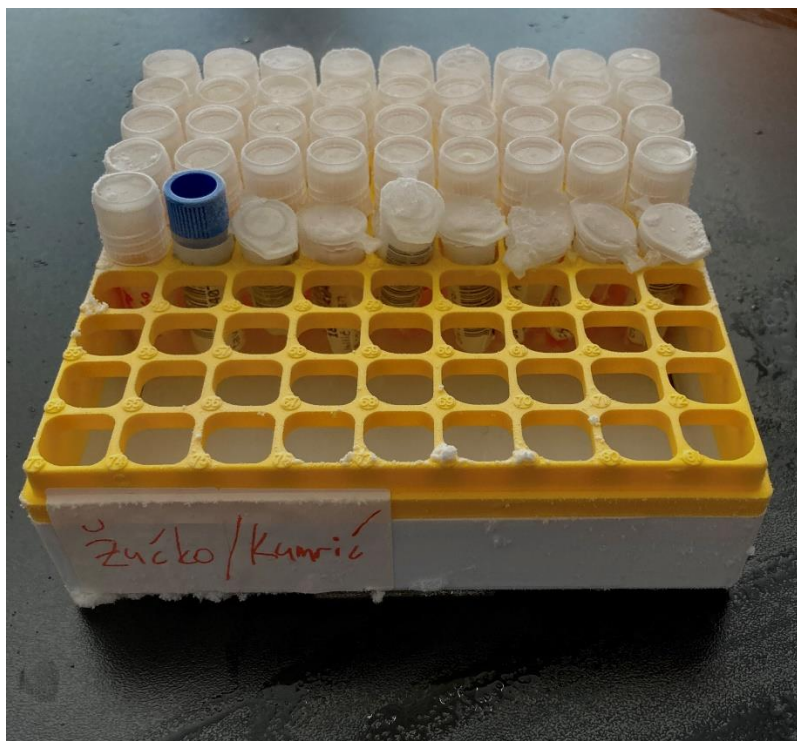
metodi i hlapljivi. Naime, agensi koji se najčešće koriste za derivatizaciju nisu pogodni za prevođenje masnih kiselina u njihove derivate jer masne kiseline imaju nisku točku unutrašnjeg vrelišta koja je slična točki vrelišta korištenih agensa. U tom slučaju može doći do preklapanja signala prilikom analize i netočnih rezultata pa je odabir odgovarajućeg agensa za derivatizaciju iznimno bitan. Novije GC/MS metode rade na tome da se izbjegne derivatizacija pa je jedan način za to, korištenje mikroekstrakcije u čvrstoj fazi za čišćenje uzorka, a drugi princip je zakiseljavanje vode tj. ekstrakta pomoću kolorovodične ili fosforne kiselina i direktna analiza uzorka (Rohde, 2022).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. **Protokol 1:** priprema uzoraka za kvantitativnu analizu kratkolančanih masnih kiselina (SCFA) iz ljudske plazme GC/MS-om, analitičkom i bioanalitičkom kemijom

#### 3.1.1. Materijali

- Uzorci plazme čuvani na -80 °C (slika 4)



Slika 4. Uzorci plazme netom nakon vađenja iz hladnjaka (vlastita fotografija)

- Hladna otopina unutarnjeg standarda (4 – metilvalerinska kiselina, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  u 2 M HCl)
- Hladan metil tert-butil eter (MTBE)
- Klorovodična kiselina
- Eppendorfove mikropruvete ili staklene vijale (ako se određuje acetat)
- Pipete i nastavci za pipete
- Automatske vijale sa staklenim umetkom

#### 3.1.2. Oprema

- Hladnjak namješten na 4 °C
- Zamrzivač namješten na -80 °C

- Vorteks mikser
- Centrifugator s kapacitetom 3,000 g

### 3.1.3. Metode

1. Odmrzavanje uzoraka plazme
  - Premještanje uzoraka plazme s -80 °C u hladnjak na 4 °C
  - Uzorke plazme homogenizirati povremenim miješanjem (periodično micanje uzoraka iz hladnjaka i nježno miješanje okretanjem ili laganim vorteksiranjem do stanja homogenosti)
2. Dodatak unutarnjeg standarda
  - U 200 µL otopljene plazme dodati 24 µL hladne otopine unutarnjeg standarda (koja sadrži 50 µg mL<sup>-1</sup> unutarnjeg standarda u 2 M HCl)
  - Lagano vorteksirati napravljenu smjesu pet sekundi da se osigura pravilno miješanje unutarnjeg standarda s plazmom
3. Ekstrakcija s MTBE
  - Dodati 360 µL hladnog MTBE u smjesu plazma – unutarnji standard
  - Snažno vorteksirati 15 sekundi za olakšavanje procesa ekstrakcije
4. Centrifugiranje
  - Centrifugirati smjesu na 3,000 g 10 minuta na 4 °C
  - Nakon centrifugiranja pričekati separaciju faza
5. Skupljanje gornjeg sloja
  - Pažljivo odvojiti oko 60 µL gornjeg MTBE sloja (u njemu se nalaze ekstrahirane SCFA-e)
  - Spremiti skupljeni MTBE sloj na – 20 °C do daljnje analize

**3.2. Protokol 2:** Poboljšana metoda za pripremu uzoraka korištenih za kvantifikaciju kratkolančanih masnih kiselina u biološkim uzorcima koristeći GC/MS analizu

**3.2.1. Biološki uzorci**

- Uzorci ljudske plazme uzeti iz zdravih dobrovoljaca natašte

**3.2.2. Materijali**

- Uzorci plazme na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Otopina unutarnjeg standarda (4 – metilvalerinska kiselina, u vodi,  $10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ )  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 37 % HCl, pripremiti 1 M HCl
- Metil tert-butil eter (MTBE)
- 1,5 ml plastične mikroeprovete
- Pipete i nastavci za pipete
- Automatske vijale sa staklenim umetkom

**3.2.3. Oprema**

- Hladnjak namješten na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Zamrzivač namješten na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Vorteks mikser
- Centrifugator s kapacitetom 18,341 g i namješten na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

**3.2.4. Metode**

1. Odmrzavanje uzoraka plazme
  - Premještanje uzoraka plazme s  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  u hladnjak na  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
  - Uzorke plazme homogenizirati povremenim miješanjem (periodično micanje uzoraka iz hladnjaka i nježno miješanje okretanjem ili laganim vorteksiranjem do stanja homogenosti)
  - Premjestiti  $100\text{ }\mu\text{L}$  plazme u odvojene plastične mikropipete od  $1,5\text{ mL}$
2. Dodatak kiseline
  - Dodati  $10\text{ }\mu\text{L}$   $1,0\text{ M HCL}$  u uzorak plazme za zakiseljavanje smjese
3. Dodatak unutarnjeg standarda (IS)
  - Dodati  $10\text{ }\mu\text{L}$  pripremljene otopine unutarnjeg standarda u uzorak
  - Vorteksirati jednu minutu kako bi se osiguralo temeljito miješanje

#### 4. Prvo centrifugiranje

- Centrifugirati uzorke na 18,341 g pet minuta na 4 °C

#### 5. Ekstrakcija s MTBE

- Pažljivo prebaciti 100 µL supernatanta iz uzorka u novu plastičnu mikropipetu od 1,5 mL
- Dodati 200 µL MTBE u uzorak sa supernatantom
- Vorteksirati smjesu snažno 20 minuta da se osigura uspješna ekstrakcija SCFA u MTBE fazu
- Centrifugirati uzorak ponovno na 18,341 g pet minuta na 4 °C
- Nakon centrifuge pričekati odvajanje faza

#### 6. Premještanje MTBE faze

- Pažljivo prebaciti 100 µL gornje MTBE faze iz uzorka u automatske vijale sa staklenim umetkom

### 3.3. Objašnjenje iza nekih koraka protokola

Dodatak klorovodične kiseline važan nam je zbog prevođenja butirata iz oblika soli u oblik kiseline. MTBE kao otapalo za ekstrakciju odabrali smo nakon usporedbe s još nekoliko ne polarnih otapala. Druge opcija izbora otapala bili su N-heksan, diklor metan, etil acetat i dietil eter koji ima također dobru perspektivu ali je vrlo lako hlapljiv. Ekstrakcija se morala provoditi s ne polarnim otapalom, a mi smo izabrali MTBE i provjeravali smo uspješnost ekstrakcije s njim. Dodani interni standard i nije nam pretjerano važan za ovaj pripremni dio projekta, ali je za kasniju GC/MS analizu koja će se provoditi iznimno važan. Naime, to je spoj, u našem slučaju 4 – metilvalerinska kiselina, koji po svojstvima mora biti sličan spoju koji se određuje. Važno je da se prilikom ekstrakcije ponaša isto kao maslačna kiselina i da se ekstrahira skupa s njom. On je indikator uspješnosti provedbe cijelog eksperimenta jer kada se nakon analize radi grafikon ovisnosti intenziteta vrha pika na spektru o koncentraciji maslačne kiseline, na y – os stavlja se omjer intenziteta pika butirata i intenziteta pika internog standarda. Pošto internom standardu znamo početnu koncentraciju onda znamo, prema grafikonu, kolika je bila pogreška instrumenta, ako je do nje došlo.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Rezultati pripreme uzorka prema Protokolu 1

U Protokolu 1 koristili smo 200  $\mu\text{L}$  uzorka plazme koji smo izvadili iz zamrzivača. Uzorak se lako homogenizirao te je nakon dodatka internog standarda i ekstrakcije s MTBE izgledao kako je prikazano na slici 5:



**Slika 5.** Uzorak nakon provedbe prva tri koraka Protokola 1 (vlastita fotografija)

Nakon dodatka MTBE-a došlo je do odvajanja faza koje je bilo vidljivo golim okom, što znači da je ekstrakcija uspješno provedena. Idući korak bio je centrifugiranje kako bi se u potpunosti odvojila faza u kojoj se nalaze kratkolančane masne kiseline i interni standard u smjesi s MTBE od ostatka otopine plazme. Centrifugiranje se provodilo i kako bi se ekstrahirao što veći postotak maslačne kiseline zbog preciznijeg kasnijeg mjerenja na GC/MS-u i da bi se lakše mogao uzeti supernatant, koji sadrži željeni spoj. Nakon centrifuge uzorak je izgledao kako je prikazano na slici 6:



**Slika 6.** Uzorak nakon odvajanja faza pomoću centrifuge (vlastita fotografija)

Daljnja analiza koja bi bila provedena nakon pripreme uzorka bila bi GC/MS analiza. Za analizu je potrebno 60  $\mu\text{L}$  uzorka injektirati na polarnu DB WAX Ultranert (30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) kolonu za GC/MS.

#### 4.2. Rezultati pripreme uzorka prema Protokolu 2

Za razliku od Protokola 1 u ovom slučaju uzeli smo u pola manje krvne plazme, 100  $\mu\text{L}$ . Razlika je i ta što smo interni standard pripremali u vodi, a ne u kiselom mediju pa smo prije dodatka internog standarda medij zakiselili dodatkom 1 M klorovodične kiseline. Nakon dodatka kiseline i standarda uslijedila je prva centrifuga uzorka nakon koje je uzorak izgledao ovako kako je prikazano na slici 7:



**Slika 7.** Uzorak nakon prvog centrifugiranja prema Protokolu 2 (vlastita fotografija)

Već nakon prvog centrifugiranja vidljivo je odvajanje faza supernatanta i donjeg sloja. Daljnji korak bio je ekstrakcija s MTBE nakon čega je uslijedilo vorteksiranje i ponovno centrifugiranje. Nakon provedene ekstrakcije i drugog centrifugiranja uzorak je izgledao kako je prikazano na slici 8:



**Slika 8.** Uzorak na kraju pripreme prema Protokolu 2 (vlastita fotografija)



Sljedeći korak ovog protokola bio bi uzimanje 100  $\mu$ L supernatanta i analiza na GC/MS-u, na polarnoj koloni DB FFAP (kolona slobodnih masnih kiselina, 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m).

#### 4.3. Usporedba izgleda uzoraka na kraju oba protokola

Na kraju provedbe oba protokola uvidjeli smo razliku između odvajanja faza kod uzoraka. U prvom uzorku vidi se jasna granica između gornjeg i donjeg sloja, dok se kod drugog uzorka sloj s talogom održavao približno na sredini faze unutar koje se nalazi maslačna kiselina (slika 9):



**Slika 9.** Usporedba uzoraka na kraju pripreme (vlastita fotografija)

## 5. ZAKLJUČCI

1. Prilikom usporedbe dva protokola za pripremu uzorka krvne plazme za određivanje koncentracije butirata korištenjem GC/MS metode, oba protokola su dala zadovoljavajuće rezultate i prinos supernatanta, u kojem se nalazi butirat, veći od količine potrebne za daljnju analizu na GC/MS uređaju.
2. Metil tert-butil eter pogodno je otapalo za ekstrakciju kratkolančanih masnih kiselina.
3. Za pripremu ostalih uzoraka za GC/MS analizu butirata izabrali bismo Protokol 1 zbog jasnijeg razdvajanja faza i manje mogućnosti kontaminacije uzorka za analizu talogom.
4. Protokol za pripremu uzoraka krvne plazme za određivanje koncentracije butirata korištenjem GC/MS metode izabrati će se nakon GC/MS analize ovih uzoraka na osnovu određene koncentracije internog standarda.

## 6. LITERATURA

Adak A, Khan MR (2019) An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell Mol Life Sci.* **76**, 473-493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>

Al-Hussaniy HA, Alburghaif AH, Naji MA (2021) Leptin hormone and its effectiveness in reproduction, metabolism, immunity, diabetes, hopes and ambitions. *J Med Life.* **14**, 600-605. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0153>

Amiri P, Hosseini SA, Ghaffari S, Tutunchi H, Ghaffari S, Mosharkesh E i sur. (2022) Role of Butyrate, a Gut Microbiota Derived Metabolite, in Cardiovascular Diseases: A comprehensive narrative review. *Front Pharmacol.* <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.837509>

Bharti R i Grimm DG (2021) Current challenges and best-practice protocols for microbiome analysis. *Briefings in Bioinformatics* **22**, 178–193. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz155>

Blachier F, de Sá Resende A, da Silva Fogaça Leite G, da Costa AV, Lancha Junior AH (2018) Colon epithelial cells luminal environment and physiopathological consequences: impact of nutrition and exercise. *Nutrire* **43**, 2. <https://doi.org/10.1186/s41110-018-0061-6>

Canani RB, Costanzo MD, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A (2011) Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology* **17**, 1519-1528. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i12.1519>

Chu DM, Meyer KM, Prince AL, Aagaard KM (2017) Impact of maternal nutrition in pregnancy and lactation on offspring gut microbial composition and function. *Gut Microbes* **8**, 457-470. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1308719>

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R (2009) Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* **326**, 1694-1697. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>

Davenport ER, Sanders JG, Song SJ, Amato KR, Clark AG, Knight R (2017) The human microbiome in evolution. *BMC Biol.* **15**, 127. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0454-7>

Delbaere K, Roegiers I, Bron A, Durif C, Van de Wiele T, Blanquet-Diot S i sur. (2023) The small intestine: dining table of host-microbiota meetings. *FEMS Microbiol Rev* **19**, fuad022. <https://org.doi/10.1093/femsre/fuad022>

El-Sayed A, Aleya L, Kamel M (2021) Microbiota's role in health and diseases. *Environ Sci Pollut Res Int* **28**, 36967-36983. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14593-z>

Eurofins Scientific (2015) Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms/> . Pristupljeno 25. srpnja 2024.

Fiehn O (2016) Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Current protocols in molecular biology* **114**, 30.4.1–30.4.32. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb3004s114>

Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M i sur. (2009) Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice. *Diabetes* **58**, 1509–1517. <https://doi.org/10.2337/db08-1637>

Goldberg I i Rokem JS (2009) Organic and Fatty Acid Production, Microbial. *Encyclopedia of Microbiology* **3**

Guilloteau P, Martin L, Eeckhaut V, Ducatelle R, Zabielski R, Van Immerseel F (2010) From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews* **23**, 366-384. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000247>

Herceg-Čavrak Vesna (2016) Hiperkolesterolemija, U: Sanja Kolaček, Iva Hojsak, Tena Niseteo (ured.) Prehrana u općoj i kliničkoj pedijatriji, Medicinska naklada, Zagreb, str. 351-361.

Hrvatska enciklopedija (2013) Hemoglobinopatije <https://www.enciklopedija.hr/clanak/hemoglobinopatije> . Pristupljeno 28. srpnja 2024.

Lagier J, Hugon P, Khelaifia S, Fournier P, La Scola B, Raoult (2015) The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota. *Clinical Microbiology Review* **28**, 1. <https://doi.org/10.1128/cmr.00014-14>

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone FMahony J, Belzer C i sur. (2017) The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **81**, 4.

<https://doi.org/10.1128/membr.00036-17>

Pavlica M (2024) Ekspresija eukariotskih gena, Mrežni udžbenik iz genetike [Ekspresija eukariotskih gena - Mrežni udžbenik iz genetike \(pmf.hr\)](#) . Pristupljeno 1. kolovoza 2024.

Rohde JK, Fuh MM, Evangelakos I, Pauly MJ, Schaltenberg N, Siracusa F i sur. (2022) A Gas Chromatography Mass Spectrometry-Based Method for the Quantification of Short Chain Fatty Acids. *Metabolites* **12**, 170. <https://doi.org/10.3390/metabo12020170>

Scortichini S, Boarelli MC, Silvi S, Fiorini D (2020) Development and validation of a GC-FID method for the analysis of short chain fatty acids in rat and human faeces and in fermentation fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.121972>

Skoglund J (2016) Quantification of Short Chain Fatty Acids in Serum and Plasma (završni rad), Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala

Sossai P (2012) Butyric acid: what is the future for this old substance?. *Swiss medical weekly* **142**, 13596. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13596>

Stoddart LA, Smith NJ i Milligan G (2008) Free fatty acid receptors FFA1, - 2 and -3: Pharmacology and pathophysiological functions. *Pharmacological Reviews* **60**, 405-417.

Stø K, Valeur J, Ueland T, Malmstrom GH, Bjerkeli V, Troseid M i sur. (2022) Fecal level of butyric acid, a microbiome-derived metabolite, is increased in patients with severe carotid atherosclerosis. *Scientific Reports* **12**, 22378. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26759-x>

Turner D (2022) GC-MS Principle, Instrument and Analyses and GC-MS/MS. *Technology Networks*, objavljeno: 10. lipnja 2022., zadnja izmjena: 16. veljače 2024.

Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012) Defining the human microbiome. *Nutrition reviews* **70**, 38-44. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x>

Wensel CR, Pluznick JL, Salzberg SL, Sears CL (2022) Next-generation sequencing: insights to advance clinical investigations of the microbiome. *The Journal of Clinical Investigation* **132**, 7. e154944. <https://doi.org/10.1172/JCI154944>

## **Izjava o izvornosti**

Ja Tara Krpan izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis