

## ОБЩЕКЛИНИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Каликова Л.Б., Бойко Е.Р.

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ АДЕНИНОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ МОДИФИЦИРОВАННЫМ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения РАН ФГБУН Федерального исследовательского центра «Коми научный центр Уральского отделения РАН», 167982, Сыктывкар, Коми Республика, Россия

*Адениновые нуклеотиды (АТФ, АДФ, АМФ) играют центральную роль в регуляции обмена веществ и энергии: обеспечивают энергетический баланс клетки, определяют её окислительно-восстановительное состояние, действуют как аллостерические эффекторы ряда ферментов, модулируют сигнальные и транскрипционные факторы, активируют субстраты окисления или биосинтеза. Для определения уровня АТФ, АДФ, АМФ разработано большое количество методов, но наиболее универсальным и эффективным методом разделения и анализа сложных смесей является метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Цель исследования – определение оптимальных условий для качественного разделения и количественного определения стандартных растворов АТФ (1 ммоль/л), АДФ (0,5 ммоль/л), АМФ (0,1 ммоль/л) методом ОФ ВЭЖХ. Степень разделения адениновых нуклеотидов оценивали по времени выхода пиков на хроматограмме. Для достижения цели поставлены следующие задачи: оценить влияние температуры проведения анализа на разделение и изменение времени выхода анализируемых веществ на хроматограмме; определить оптимальный состав подвижной фазы на разделение АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме (содержание органического растворителя в растворе); выявить влияние рН подвижной фазы на разделение стандартных растворов адениновых нуклеотидов; установить оптимальную молярность подвижной фазы для разделения АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме. Установлено, что температура проведения анализа не влияет на качество разделения пиков, тогда как состав и рН подвижной фазы оказывает значительное влияние на полное и четкое разделение исследуемых нуклеотидов на хроматограмме. Оптимальными для разделения пиков адениновых нуклеотидов являются температура проведения анализа 37°С и подвижная фаза 0,05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (рН 6,0).*

**Ключевые слова:** адениновые нуклеотиды; АТФ; АДФ; АМФ; обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

**Для цитирования:** Каликова Л. Б., Бойко Е. Р. Определение адениновых нуклеотидов модифицированным методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Клиническая лабораторная диагностика, 2021;66 (3): 172-176. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-172-176>

*Kalikova L. B., Boyko E. R.*

#### DETERMINATION OF ADENINE NUCLEOTIDES BY THE MODIFIED METHOD OF HIGH – PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Institute of Physiology of Komi Science Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, FCR Komi SC UB RAS, 167982, Syktывkar, Komi Republic, Russia

*Adenine nucleotides (ATP, ADP and AMP) play a central role in the regulation of metabolism and energy: they provide the energy balance of the cell, determine its redox state, act as allosteric effectors of a number of enzymes, modulate signaling and transcription factors and activate oxidation or biosynthesis substrates. A large number of methods have been developed to determine the level of ATP, ADP and AMP, but the most universal and effective method for the separation and analysis of complex mixtures is the reversed-phase high-performance liquid chromatography method (RP-HPLC). The aim of this study is to determine the optimal conditions for the qualitative separation and quantitative determination of standard solutions of ATP (1 mmol/l), ADP (0,5 mmol/l) and AMP (0,1 mmol/l) by RP-HPLC. The degree of separation of adenine nucleotides was estimated by the time of peak output in the chromatogram. To achieve the goal, the following tasks were set: assess the effect of the temperature of the analysis on the separation and change of the release time of the analytes in the chromatogram; determine the most optimal composition of the mobile phase for the separation of ATP, ADP and AMP in the chromatogram (the content of the organic solvent in the solution); to identify the effect of pH of the mobile phase on the separation of standard solutions of adenine nucleotides; set the optimal molarity of the mobile phase for the separation of ATP, ADP and AMP in the chromatogram. It was found that the temperature of the analysis does not affect the quality of peak separation, while the composition and pH of the mobile phase have a significant effect on the complete and clear separation of the studied nucleotides in the chromatogram. It was determined that the analysis temperature of 37°C and the mobile phase of 0.05 M KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (pH 6.0) are optimal for separating the peaks of adenine nucleotides.*

**Key words:** adenine nucleotides; ATP; ADP; AMP; reversed-phase high-performance liquid chromatography.

**For citation:** Kalikova L. B., Boyko E. R. Determination of adenine nucleotides by the modified method of high-performance liquid chromatography. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (3): 172-176 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-3-172-176>

**For correspondence:** Kalikova Lyubov Borisovna, Junior Researcher, Department of Environmental and Medical Physiology, e-mail: Kalikova\_81@mail.ru

**Information about authors:**

Kalikova L.B., <http://orcid.org/0000-0001-7963-1662>;  
Boyko E.R., <http://orcid.org/0000-0002-8027-898X>.

**Conflict of interests.** The authors are declaring absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The work was performed at the expense of the subsidy funds for the implementation of the State Assignment No. GR AAAA-A17-117012310157-7, GR No. AAAA-A17-117012310153-9.

Received 01.02.2021  
Accepted 01.03.2021

**Введение.** АТФ, АДФ, АМФ играют центральную роль в регуляции обмена веществ и энергии. Они обеспечивают энергетический баланс клетки и определяют её окислительно-восстановительное состояние, действуют как аллостерические эффекторы ряда ферментов, модулируют сигнальные и транскрипционные факторы и активируют субстраты окисления или биосинтеза [1].

Для определения уровня адениновых нуклеотидов разработано большое количество методов: спектрофотометрический, флуоресцентный, ферментативный методы [2], тем не менее, наиболее широко используют билюминесцентный метод или хроматографический метод анализа [3]. Билюминесцентный метод наиболее чувствителен (предел обнаружения анализируемых веществ  $10^{-14}$  М), но дорогостоящий и поэтому мало подходит для серийных анализов [4]. Наиболее универсальным и эффективным методом разделения и анализа сложных смесей является метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ), который позволяет разделить и одновременно определить микроколичества нуклеотидов за короткий промежуток времени [5 – 7]. В ряде случаев время выхода анализируемых веществ на хроматограмме совпадает и полного разделения исследуемых веществ не происходит [8]. На разделение адениновых нуклеотидов влияют такие факторы, как температура проведения анализа, содержание органического растворителя в подвижной фазе, молярность, рН подвижной фазы [6].

Цель исследования – определение оптимальных условий для качественного разделения и количественного определения стандартных растворов АТФ, АДФ, АМФ методом ОФ ВЭЖХ. Для достижения цели поставлены следующие задачи: оценить влияние температуры проведения анализа на разделение и изменение времени выхода анализируемых веществ на хроматограмме; определить оптимальный состав подвижной фазы на разделение АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме (содержание органического растворителя в растворе); выявить влияние рН подвижной фазы на разделение стандартных растворов адениновых нуклеотидов; установить оптимальную молярность подвижной фазы для разделения АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме.

**Материал и методы.** В работе использованы стандартные образцы АТФ, АДФ, АМФ в концентрации 1,0 ммоль/л (АТФ), 0,5 ммоль/л (АДФ), 0,1 ммоль/л (АМФ), что соответствует уровню адениновых нуклеотидов в эритроцитах человека [9]. Подвижную фазу (ПФ) готовили аналогично работе Е.К. Jackson [10], состоящую из 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  и 5% ацетонитрила  $\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1). Разделение образцов проводили на жидкостном хроматографе Shimadzu LC 20 (Япония) с колонкой Диасфер-110-С18 (Россия) (150\* 4,6 мм). Каждый образец исследовали в 3-х повторностях. Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения LC Solution.

Степень разделения адениновых нуклеотидов оценивали по времени выхода пиков на хроматограмме. Для ОФ ВЭЖХ использованы реактивы фирмы Sigma (США), растворы стандартов известной концентрации и ПФ готовили на бидистиллированной воде, приготовленной с использованием системы Milli-Q® Reference (США).

**Результаты.** В качестве условий проведения анализа стандартных образцов адениновых нуклеотидов выбраны следующие характеристики: разделение проводили в изократическом режиме; скорость потока составила 1,0 мл/мин; работу выполняли при комнатной температуре (+24° С – +27° С); давление в системе составляло 4,9 МПа. Объем вводимой пробы 20 мкл. Спектрофотометрическое определение осуществляли при двух длинах волн 254 и 280 нм. Общее время анализа не превышало 15 минут.

При данных условиях проведения анализа время выхода пиков АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме составляет 2,48 мин, 2,82 мин и 4,73 мин соответственно. Время выхода пиков АТФ и АДФ практически совпадает и их полного разделения не происходит (рис. 1).

Проведено исследование по определению факторов, способных оказать влияние на разделение нуклеотидов, включая температуру проведения анализа, содержание органического растворителя в ПФ и др. (см.таблицу).

Влияние температуры проведения анализа на разделение и количественное определение адениновых нуклеотидов оценивали в диапазоне от 27° С до 37° С. При 27° С давление в хроматографической системе составляло 4,9 МПа, тогда как при повышении температуры давление в системе понижалось. При 31° С и 32° С давление было 4,6 МПа, в диапазоне от 33° С до 37° С этот показатель составил всего 4,1 МПа. При увеличении температуры проведения анализа от 27° С до 37° С наблюдается снижение давления в приборе, что, по нашему мнению, положительно сказывается на состоянии работы хроматографической колонки. По времени выхода пиков АТФ, АДФ, АМФ, установлено, что на качество разделения анализируемых веществ температура проведения анализа практически не влияет, поэтому оптимальной рабочей температурой проведения анализа выбрана 37° С, наиболее близкая к температуре ядра тела человека.

По данным литературы на разделение адениновых нуклеотидов может оказывать влияние молярность ПФ и/или процент органического растворителя в растворе [6]. Оценку влияния органической части ПФ проводили следующим образом: 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 5,2), разделяли на семь частей и к каждой части добавляли раствор  $\text{CH}_3\text{CN}$  (10%; 5%; 2%; 1%; 0,5%; 0,1%; 0%) в соотношении 1:1. Установлено, что концентрация органической части ПФ оказывает значительное влияние на разделение и время выхода пиков адениновых нуклеотидов на хроматограмме. При введении в состав ПФ 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$

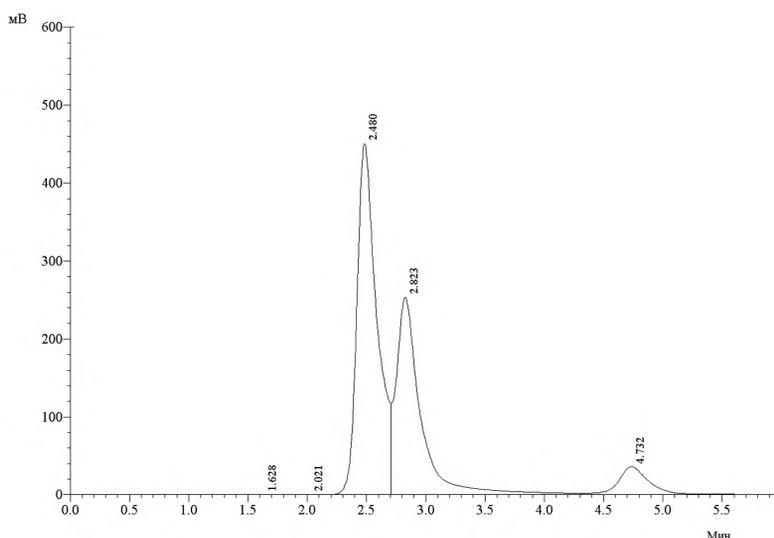


Рис. 1. Разделение стандартных образцов АТФ, АДФ и АМФ методом ОФ ВЭЖХ.  
 Подвижная фаза: 5% ацетонитрил – 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1:1), pH 5,2.

**Влияние отдельных факторов на разделение хроматографических пиков адениновых нуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ**

Скорость потока, мл/мин	Температура проведения анализа, °С	Давление в системе (Р), МПа	Ацетонитрил в подвижной фазе, %	pH подвижной фазы	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , молярность подвижной фазы	Время выхода стандарта АТФ, мин	Время выхода стандарта АДФ, мин	Время выхода стандарта АМФ, мин
Разделение нуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ на подвижной фазе по Джексона [11]								
1,0	Комнатная (24-27)	4,9	5	5,2	0,05	2,48	2,82	4,73
Влияние температуры проведения анализа на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	27	4,9	5	5,2	0,05	2,48	2,82	4,73
	31	4,6				2,39	2,74	4,36
	32	4,6				2,34	2,62	4,19
	33	4,1				2,35	2,62	4,16
	34	4,1				2,27	2,63	4,06
	35	4,1				2,27	2,57	4,01
	37	4,1				2,22	2,46	3,78
Влияние органической части подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	0	5,2	0,05	3,14	4,11	9,00
			0,1			2,98	-	-
			0,5			2,77	3,24	7,49
			1			2,71	3,54	7,53
Влияние органической части подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	2	5,2	0,05	2,41	3,15	6,17
			5			2,27	2,44	4,35
			10			1,78	1,94	2,71
Влияние pH подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	0	5,0	0,05	3,21	4,14	9,18
				5,2		3,14	4,13	9,01
				5,5		3,10	4,08	8,85
				6,0		3,04	3,90	7,75
				6,5		2,95	3,57	5,95
				7,0		2,81	3,18	4,30
Влияние молярности подвижной фазы на хроматографическое разделение стандартов АТФ, АДФ, АМФ								
1,0	37	4,1	0	6,0	0,05	3,04	3,90	7,75
					0,1	3,43	4,24	7,94
					0,3	4,20	4,91	8,40
					0,5	4,66	5,32	8,71
					1	5,67	6,21	9,2

разделение стандартных образцов АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме практически не происходит. При снижении концентрации  $\text{CH}_3\text{CN}$  в растворе с 5% до 0,1% наблюдается небольшое разделение пиков АТФ, АДФ, АМФ. Наиболее выраженное разделение анализируемых веществ выявлено при работе с ПФ, включающей только 0,05 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ . Время выхода адениновых нуклеотидов на хроматограмме составило 3,14 мин для АТФ, 4,11 мин и 9,00 мин для АДФ и АМФ соответственно. Последующее разделение и количественное определение стандартных образцов АТФ, АДФ, АМФ проводили на ПФ, в состав которой входит только 0,05 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ .

Проведён анализ влияния рН ПФ (5,0–7,0) на разделение нуклеотидов. Установлена взаимосвязь между концентрацией ионов водорода ПФ (рН) и временем выхода пиков стандартных растворов АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме. При работе с ПФ (рН 5,0) время выхода пика АТФ приходилось на 3,21 мин, при рН рабочего раствора 6,0, время выхода пика АТФ составило 3,04 мин и 2,81 мин (рН 7,0). Аналогичная зависимость прослеживалась по времени выхода пика АДФ (4,14–3,90 – 3,18 мин) и пика АМФ (9,18–7,75 – 4,30 мин). При работе с ПФ рН 6,0 наблюдали максимальное и почти полное разделение пиков АТФ и АДФ на хроматограмме, тогда как при работе с ПФ (рН 7,0) данные пики перекрывались в большей степени. Принимая во внимание эти результаты, дальнейшее разделение и количественное определение АТФ, АДФ, АМФ проводили на ПФ рН 6,0.

Для оценки влияния молярности ПФ на степень разделение адениновых нуклеотидов использовали 1 М, 0,5 М, 0,3 М, 0,1 М, 0,05 М растворы  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ , не содержащие  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Увеличение молярности  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  в ПФ способствовало изменению времени выхода анализируемых веществ и степени их разделения на хроматограмме. Для АТФ с 3,04 мин (0,05 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ ) до 5,67 мин (1 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ ), для АДФ с 3,90 до 6,21 мин и для АМФ с 7,75 до 9,2 мин соответственно. Максимальное разделение пиков АТФ и АДФ наблюдали при работе с 0,05

М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ , тогда как при работе на 1 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  происходило их частичное слияние. 0,05 М раствор  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  оптимален для разделения адениновых нуклеотидов.

**Обсуждение.** Разделение и количественное определение адениновых нуклеотидов на хроматограмме зависит от целого ряда факторов – температуры проведения анализа, %  $\text{CH}_3\text{CN}$  в ПФ, от рН ПФ и её молярности. По данным литературы анализ адениновых нуклеотидов проводят при разных температурных условиях: при комнатной температуре 23° С – 24° С [11], при 30° С [12, 13], при 75° С [14]. Оценено влияние температуры проведения анализа в диапазоне от 27° С до 37° С. С увеличением температуры проведения анализа наблюдали понижение давления в хроматографической системе. На качество разделения пиков исследуемых образцов адениновых нуклеотидов и время выхода анализируемых веществ на хроматограмме температурный режим не оказывал значительного влияния, поэтому в качестве оптимальной рабочей температуры проведения анализа выбрана 37° С, близкая физиологической температуре тела.

ПФ состоит из двух компонентов – полярного органического растворителя (ацетонитрила или метанола) и неорганической части ( $\text{KN}_2\text{PO}_4$ , фосфатный или цитратный буферные растворы) [6]. В составе ПФ может присутствовать 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$  [15], 10%  $\text{CH}_3\text{CN}$  [16], 5%  $\text{CH}_3\text{CN}$  [17], встречаются исследования, где используется ПФ без органической составляющей [12]. В ходе исследования установлено, что концентрация  $\text{CH}_3\text{CN}$  в ПФ значительно влияет на разделение и время выхода пиков адениновых нуклеотидов на хроматограмме: чем выше процент органического растворителя в растворе, тем сильнее связь между анализируемыми образцами и хуже их разделение. Наиболее чёткое разделение пиков адениновых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) наблюдалось в случае, когда ПФ включала только неорганическую часть (0,05 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ ) без органического компонента.

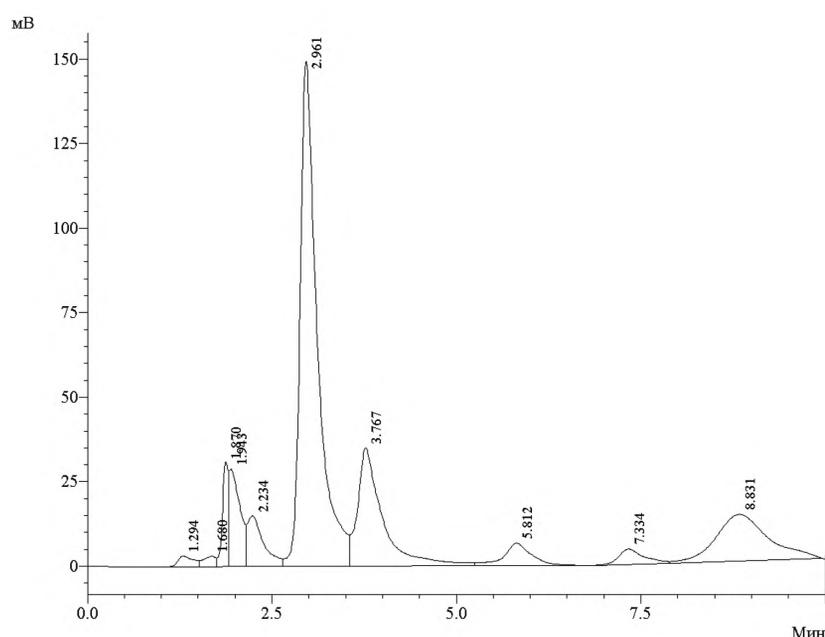


Рис. 2. Разделение адениновых нуклеотидов эритроцитов самцов крыс методом ОФ ВЭЖХ. Подвижная фаза: 0,05 М  $\text{KN}_2\text{PO}_4$ , рН 6,0.

Анализ влияния показателя рН (5,0–7,0) на разделение пиков адениновых нуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ показал, что максимальное разделение пиков АТФ и АДФ на хроматограмме наблюдалось при работе в условиях, когда рН ПФ составляло величину 6,0. При работе с нейтральной подвижной фазой рН 7,0 разделение происходило в меньшей степени. Принимая во внимание эти результаты, в последующем для разделения адениновых нуклеотидов использована ПФ с рН 6,0. Полученные результаты совпадают с данными ряда зарубежных авторов, которые рекомендуют использовать в работе ПФ с рН 6,0 [11, 18, 19]. Изменение молярности ПФ влияет на разделение пиков анализируемых веществ: установлено, что максимальное разделение пиков АТФ и АДФ наблюдалось при работе с ПФ, молярность которой составила 0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Модифицированный нами метод ОФ ВЭЖХ был успешно апробирован для разделения и количественного определения АТФ (время выхода пика на хроматограмме составило 2,96 мин.), АДФ (3,77 мин.) и АМФ (5,81 мин.) эритроцитов самцов крыс линии Wistar (рис. 2).

#### Выводы:

1. Температурный режим не оказывает влияния на качество разделения пиков АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме, поэтому в качестве оптимальной рабочей температуры проведения анализа рекомендуется к использованию температура 37°C, близкая к температуре ядра тела человека.

2. Наиболее выраженное разделение пиков адениновых нуклеотидов наблюдалось при работе на ПФ без включения  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

3. При изменении рН ПФ с 5,0 до 6,0 наблюдается максимальное разделение пиков АТФ, АДФ, АМФ на хроматограмме, тогда как при работе с нейтральной подвижной фазой рН 7,0 разделение происходило в меньшей степени.

4. Изменение молярности ПФ влияет на разделение пиков анализируемых веществ. Максимальное разделение пиков АТФ, АДФ и АМФ наблюдалось при работе с ПФ, молярность которой составила 0,05 М.

**Финансирование.** Работа выполнена за счет средств субсидии на выполнение Государственного задания № ГР АААА-А17-117012310157-7, № ГР АААА-А17-117012310153-9.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–6, 8–19 см. REFERENCES)

7. Хацаюк А. С., Павлова О. Е., Эхова М. Э. Роль и значение высокоэффективной жидкостной хроматографии в практике высокотехнологических лабораторных исследований. *Здоровье. Медицинская Экология. Наука.* 2016; 3(66): 215-9.

#### REFERENCES

1. Xiaorong Fu, Stanislaw Deja, Blanka Kucejova, Joao A.G. Duarte, Jeffrey Glen McDonald, and Shawn C. Burgess. Targeted determination of tissue energy status by LC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2019; 91(9): 5881-7.

2. Khllyntseva S. V., Bazel' Ya. R., Vishnikin A. B., Andruch V. Methods for the determination of Adenosine Triphosphate and other Adenine Nucleotides. *Journal of Analytical Chemistry.* 2009; 64(7): 657-73.

3. Abraham E. H., Salikhova A. Y., Eugen B. Hug. Critical ATP parameters associated with blood and mammalian cells: Relevant measurement techniques. *Drug development research.* 2003; 59(1): 152-60.

4. Ozer N., Aksoy Y., Oguş I.H. New sample preparation method for the capillary electrophoretic determination of adenylate energy charge in human erythrocytes. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2000; 45: 141-6.

5. Karatzaferi C., De Haan A., Offringa C., Sargeant A.J. Improved high-performance liquid chromatographic assay for the determination of «high-energy» phosphates in mammalian skeletal muscle. Application to a single – fibre study in man. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 1999; 730(2): 183-91.

6. Zagrebelnyi S.N., Pupkova V.I., Khripin Yu.L. Methods for the separation and quantitative determination of nucleotides, nucleosides, and bases. *Usp. Khim.* 1988; 57(11): 1913-32.

7. Hatsayuk A.S., Pavlova O.E., Echova M.E. Role and importance of high-performance liquid chromatography in the practice of high-tech laboratory. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya.Nauka.* 2016; 3 (66): 215-9. (in Russian)

8. Zakaria M., Brown P.R. Investigation of clinical methodology for sample collection and processing prior to the reversed-phase liquid chromatographic determination of UV –absorbing plasma constituents. *Anal. Biochem.* 1982; 120: 25-37.

9. Teldcanat K.K., Fox I.H. Isocratic separation of ATP and its degradation products from biological fluids by automated liquid chromatography. *Clin. Chem.* 1988; 34(5): 925-32.

10. Jackson E.K., Ohnishi A. Development and application of a simple microassay for Adenosine in rat plasma. *Hypertension.* 1987; 10: 189-97.

11. Pérez-Milicua M.B., Zenteno-Savín T., Crocker D.E., Gallo-Reynoso J.P. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase and inosine 5'-monophosphate dehydrogenase activities in three mammalian species: Aquatic (*Mirounga angustirostris*), semi-aquatic (*Lontra longicaudis annectens*) and terrestrial (*Sus scrofa*). *Front. Physiol.* 2015; 6(212): 1-7.

12. Shengming Sun, Zhongbao Gu, Hongtuo Fu, Jian Zhu, Xianping Ge and Xugan Wu. Hypoxia Induces changes in AMP – Activated Protein Kinase activity and energy metabolism in muscle tissue of the oriental river prawn *Macrobrachium nipponense*. *Front. Physiol.* 2018; 9(751): 1-13.

13. Garcia-Tardon N., Guigas B. Determination of adenine nucleotide concentrations in cells and tissues by high-performance liquid chromatography. *Chapter in Methods in molecular biology.* 2018; 1732: 229-37.

14. Brown P.R., Parks R.E. Jun. and Herod J. Use of high-pressure liquid chromatography for monitoring nucleotide concentration in human blood: a preliminary study with stored blood cell suspensions. *Clin. Chem.* 1973; 19(8): 919-22.

15. Pereira R.S., Bertoncheli C.M., Adefegha S.A., Castilhos L.G., Silveira K.L., Rezer J.F.P., Doleski P.H., Abdalla F.H., Santos K.F., Leal C.A.M., Santos R.C.V., Casali E.A., Moritz C.E.J., Stainki D.R., Leal D.B.R. Sepsis induced by cecal ligation and perforation (CLP) alters nucleotidase activities in platelets of rats. *Microb. Pathog.* 2017; 111: 345-51.

16. Sikk P., Käämbre T., Vija H., Tepp K., Tiivel T., Nutt A., and Saks V.A. Ultra performance liquid chromatography analysis of adenine nucleotides and creatine derivatives for kinetic studies. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences.* 2009; 58(2): 122-31.

17. Ozkok E., Yorulmaz H., Ates G., Aksu A., Balkis N., Şahin Ö., Tamer S. Amelioration of energy metabolism by Melatonin in skeletal muscle of rats with LPS induced Endotoxemia. *Physiol. Res.* 2016; 65(5): 833-42.

18. Moritz C.E.J., Teixeira B.C., Rockenbach L., Reischak-Oliveira A., Casali E.A., Battastini A.M.O. Altered extracellular ATP, ADP and AMP hydrolysis in blood serum of sedentary individuals after an acute, aerobic, moderate exercise session. *Mol. Cell. Biochem.* 2017; 426: 55-63.

19. Doná F., Conceição I. M., Ulrich H., Ribeiro E.B., Freitas T.A., Nencioni A.L.A., da Silva Fernandes M.J. Variations of ATP and its metabolites in the hippocampus of rats subjected to pilocarpine – induced temporal lobe epilepsy. *Purinergic Signalling.* 2016; 12: 295-302.

Поступила 01.02.21

Принята к печати 01.03.21