

Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa

Babić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:657352>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Ana Babić

IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH ORGANSKIH METABOLITA U URINU BOLESNIKA S RAKOM TESTISA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019 godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb pod mentorstvom dr. sc. Alice Pizent, dipl. ing. kem., zn. savj. u tr. zv. i neposrednim vodiojstvom Tanje Živković Semren, dipl. ing. kem. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Nives Galić.

Diplomski rad izrađen je u okviru Projekta namjenskog višegodišnjeg institucijskog financiranja znanstvene djelatnosti, MZOS RH.

Zahvaljujem Tanji Živković Semren, dipl. ing. kem. na pruženoj mogućnosti za izradu ovog diplomskog rada na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada. Hvala Vam na vodstvu i velikom trudu uloženom u ovaj rad.

Hvala mentorici dr. sc. Alici Pizent na svim savjetima i prenesenom znanju, te svima u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam na pomoći i uvijek ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala prof. dr. sc. Nives Galić na svim materijalima, sugestijama i ispravcima.

Hvala svim prijateljima što su svojim prisustvom uljepšali ovaj period studiranja.

Hvala mom Bernardu na beskonačnoj ljubavi i razumijevanju. Hvala što si uvijek nesebično bio uz mene.

Najveće hvala ide mojoj obitelji. Hvala što ste bili tu, vjerovali u mene i gurali me naprijed. Hvala na bezuvjetnoj podršci i pomoći svih ovih godina. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.

Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT	XI
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Tumori.....	2
2.2. Rak testisa.....	3
2.3. Metabolomika.....	5
2.3.1. Analitičke metode u metabolomici	6
2.3.2. Primjena metabolomičkih analiza u istraživanjima raka	7
2.4. Plinska kromatografija.....	9
2.5. Spektrometrija masa.....	11
2.6. Headspace mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HS-SPME).....	15
2.7. Identifikacija.....	16
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.2. Uzorci urina	18
3.3. Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)	19
3.4. Analiza hlapljivih metabolita vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS).....	19
3.5. Identifikacija hlapljivih metabolita u urinu	20
3.6. Ponovljivost analize identificiranih hlapljivih metabolita.....	20
3.7. Pretraživanje <i>Human metabolome database</i> (HMDB)	21
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Identifikacija.....	22
4.2. Ponovljivost analiza	24
4.3. Hlapljivi organski metaboliti u uzorcima urina kao mogući biološki biljezi.....	27
§ 5. ZAKLJUČAK	30
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	31
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	32
§ 8. ŽIVOTOPIS	XXXVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH ORGANSKIH METABOLITA U URINU BOLESNIKA S RAKOM TESTISA

Ana Babić

Provedena je opsežna metabolomička analiza uzoraka urina ispitanika oboljelih od raka testisa i kontrolnih ispitanika. Hlapljivi organski metaboliti analizirani su vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa uz *Headspace* mikroekstrakciju na čvrstoj fazi. Dobiveni spektri masa identificirani su pomoću identifikacijskog sustava AMDIS (engl. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*), indeksa zadržavanja i temperature vrelišta. Sustav AMDIS se pokazao kao pouzdan i moćan automatski sustav koji ubrzava proces identifikacije. Među 128 na taj način identificiranih metabolita izabrano je 45 metabolita koji su zbog zadovoljavajuće stabilnosti i uloge u metabolizmu čovjeka uzeti u obzir pri daljnjem traženju potencijalnih bioloških biljega tumora testisa.

(35 stranica, 9 slika, 1 tablica, 55 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: AMDIS, biološki biljezi, GC-MS, hlapljivi organski metaboliti, HS-SPME, rak testisa, urin

Mentor: dr. sc. Alica Pizent, dipl. ing. kem., zn. savj. u tr. zv.

Neposredni voditelj: Tanja Živković Semren, dipl. ing. kem.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Nives Galić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
 2. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
 3. doc. dr. sc. Ivana Biljan
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 25. veljače 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC METABOLITES IN URINE OF TESTICULAR CANCER PATIENTS

Ana Babić

A comprehensive metabolomic analysis of urine samples was performed in testicular cancer patients and control subjects. Volatile organic metabolites (VOMs) were analysed by the headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). Identification system AMDIS (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*), retention index and boiling temperature of unknown compound were used for identification of unknown VOMs. Our results confirmed the applicability of AMDIS for automated data evaluation as a reliable and powerful tool that reduces the evaluation time. Among the 128 identified metabolites, 45 metabolites were selected due to satisfactory stability and predicted role in human metabolism to be considered in further investigation of potential biological tumour marker.
(35 pages, 9 figures, 1 tables, 55 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: AMDIS, biomarkers, GC-MS, HS-SPME, testicular cancer, urine, volatile organic metabolites

Mentor: Alica Pizent, Ph.D., Senior Scientist

Assistant mentor: Tanja Živković Semren, mag. chem.

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Nives Galić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Nives Galić, Professor
 2. Dr. Biserka Prugovečki, Professor
 3. Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 25. February 2019.

§ 1. UVOD

Tumori, kao abnormalne nakupine tkiva, oduzimaju organizmu hranjive tvari, kisik, hormone i ostale životno bitne sastojke u svrhu vlastitog rasta i razvoja.¹ Prikupljanjem potrebnih građivnih blokova utječu na metabolizam stanice i regulaciju njene funkcije. Potvrđeno je da metaboličko reprogramiranje dovodi do značajnih promjena u razini glukoze i glutamina kako bi se osigurala sinteza potrebnih proteina, lipida i nukleinskih kiselina za brzi rast i proliferaciju stanica tumora.²

Promjene biokemijskih i molekularnih procesa u organizmu moguće je danas pratiti zahvaljujući brzom razvoju analitičkih tehnika i primjenom novih tzv. „omik“-tehnologija koje omogućuju analizu i karakterizaciju pripadnika određene obitelji molekula u jednom eksperimentalnom koraku. Metabolomički pristup omogućava opsežnu analizu metabolita i uočavanje molekularnih biokemijskih promjena unutar pojedinog staničnog sustava.^{3,4}

Hlapljivi organski metaboliti u urinu prepoznati su kao mjerljivi pokazatelji patoloških promjena u organizmu.⁵ Njihova identifikacija može uvelike pridonijeti boljem razumijevanju mehanizama bolesti i odabiru prikladnog liječenja.

Primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi određeni su hlapljivi metaboliti u urinu ispitanika s tumorom testisa te kontrolnih ispitanika. Cilj ovog istraživanja je obrada dobivenih kromatograma u cilju stvaranja metabolomičkog profila te identifikacija dobivenih hlapljivih organskih metabolita. U svrhu identifikacije pojedinih metabolita koristit će se spektri masa i identifikacijski sustav AMDIS (engl. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), knjižnica spektara masa NIST te indeksi zadržavanja uz primjenu homologne serije *n*-alkana.

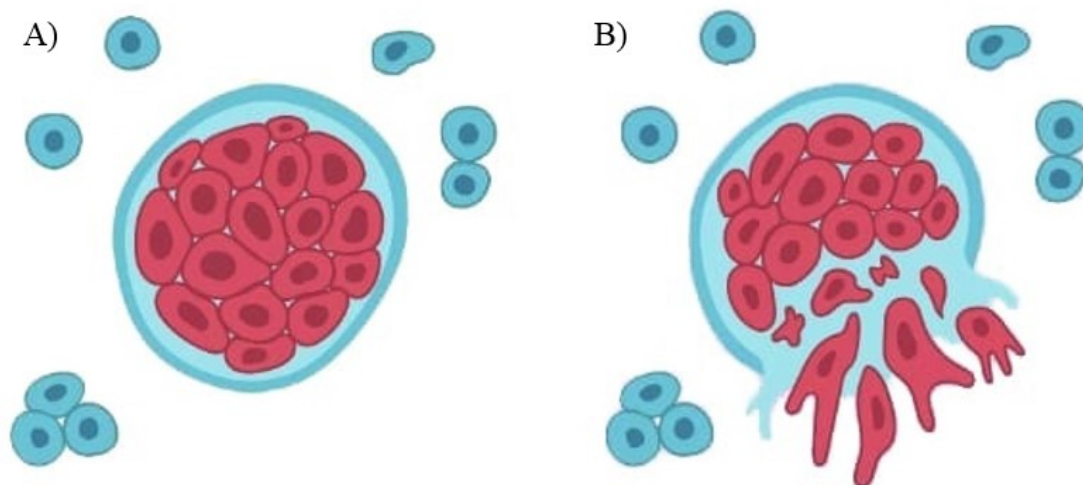
Tumor zametnih stanica testisa najčešći je tumor mlađih muškaraca u dvadesetim i tridesetim godinama života. Porast njegove pojavnosti u mnogim zemljama širom svijeta potiče znanstvena istraživanja sa ciljem pronalaženja rizičnih čimbenika i molekularnih osnova razvoja tumora. Rezultati ovog istraživanja mogu pridonijeti razvoju novih potencijalnih bioloških biljega i ranom otkrivanju tumora testisa.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tumori

Tumori ili novotvorine su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije abnormalnih stanica. Stvaraju se zbog poremećaja temeljnih regulacijskih mehanizama svih vrsta stanica i ne slijede osnovna pravila višestaničnih organizama. Njihov rast je progresivan, nekontroliran i nesvrshodan.¹ Posjeduju dva bitna obilježja koja se ne javljaju u ostalim stanicama, a čine ih opasnima i otežavaju njihovo liječenje; imaju sposobnost neprestane diobe te napadaju i koloniziraju teritorije ostalih stanica. Razlikuju se prema tkivu i tipu stanica iz kojih nastaju, ali i prema prognozi i kliničkoj slici razvoja samog tumora.⁶

Rak ili karcinom nastaje iz epitelnih stanica i najčešći je oblik tumora kod ljudi.⁶ Termin „rak“ koristi se i u kontekstu zloćudnih, po život opasnih, tumora.¹ Sarkom se pojavljuje na vezivnom ili mišićnom tkivu,⁶ a hematološki tumori zahvaćaju krv, limfne čvorove i koštano srž, a uključuju leukemije, limfome i mijelome.⁷ Prema prognozi i kliničkoj slici razvoja postoje benigni (dobroćudni) i maligni (zloćudni) tumori (slika 1). Benigni tumori rastu sporo i njihov stupanj dijeljenja je relativno nizak. Ostaju lokalizirani na mjestu na kojem su nastali i ne šire se na ostale stanice, ali ih s vremenom potiskuju i utječu na njihove funkcije. Od susjednih stanica su odvojeni membranom, te se uglavnom mogu potpuno izliječiti uništavanjem nastale mase ili njezinim odstranjivanjem. Kod malignih tumora dolazi do probijanja membrana, širenja kroz krvotok ili limfni sustav, te metastaziranja i stvaranja sekundarnog tumora na novom mjestu u organizmu.¹

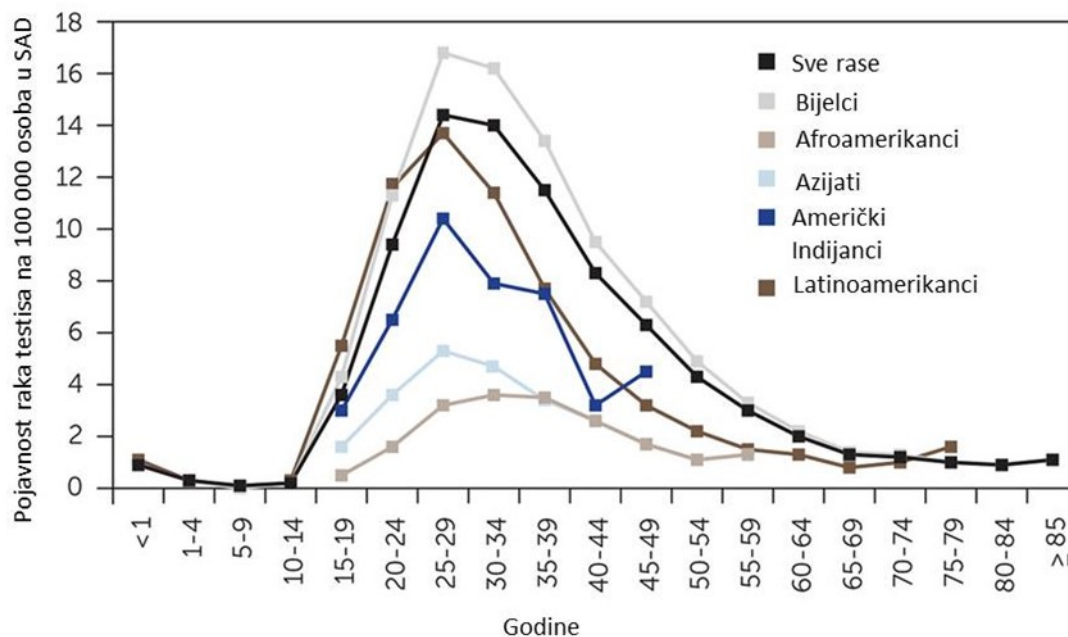


Slika 1. Prikaz podjele tumora prema prognozi i kliničkoj slici razvoja na benigne (A) i maligne tumore (B). (Preuzeto i prilagođeno od Joshua Seong © Verywell, 2007)

Uzroci nastanka tumora mogu biti endogeni (unutarnji) ili egzogeni (vanjski). U endogene uzročnike spadaju nasljedne osobine, poput nasljednog poremećaja u sustavu popravka DNA. Egzogeni uzročnici dijele se na biološke, kemijske i fizičke. To mogu biti razni onkogeni virusi, bakterije i paraziti, te različite kemijske karcinogene tvari ili ionizirajuća zračenja.⁸ Zajednička osobina svih uzročnika je oštećenje DNA i stvaranje mutacija.

2.2. Rak testisa

Rak testisa najčešći je oblik raka u muškaraca u dobi od 15. do 34. godine života te je njegova incidencija alarmantno porasla tijekom posljednjih 50 godina. Najviša incidencija tumora testisa zabilježena je u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) i zemljama sjeverne Europe, dok najnižu stopu bilježi populacija Afrike i Azije ($<1/100\ 000$).^{9,10} Prema podacima Registra za rak, u Hrvatskoj je u periodu od 1983. do 2007. godine prosječno godišnje registrirano 89 novooboljelih i 13 umrlih od tumora testisa, sa stopom incidencije od $7/100\ 000$.^{11,12}



Slika 2. Incidencija raka testisa na 100 000 osoba u ovisnosti o godinama života u SAD u 2017. godini. (Preuzeto i prilagođeno od Baird 2018.)

U velikoj većini zemalja s mješovitim stanovništvom, incidencija tumora testisa među bijelcima je značajno viša nego među ljudima drugih rasa i nacionalnosti (slika 2).⁹ Tako je primjerice u Sjedinjenim Američkim Državama, u periodu između 1998. i 2002., prosječna godišnja stopa incidencije tumora testisa među bijelcima iznosila 6/100 000, a među Afroamerikancima 1,4/100 000.¹⁰ Rezultati studije Pollán i suradnika¹³ pokazali su veću pojavnost tumora testisa u urbanim nego u ruralnim područjima. Etničke i zemljopisne razlike u stopama oboljelih upućuju na to da kombinacija genetskih i okolišnih čimbenika pridonosi razvoju bolesti i njenoj većoj pojavnosti posljednjih desetljeća.

Testis je parna žlijezda muškog spolnog sustava i sastoji se od zametnih i potpornih stanica. Iz zametnih stanica nastaju muške spolne stanice (spermiji) čije stvaranje i sazrijevanje potiče muški spolni hormon testosteron, a njega izlučuju potporne stanice testisa.

Rak testisa može nastati iz obje vrste stanica, no oko 95 % slučajeva odnosi se na tumor zametnih stanica (germinativni tumor testisa prema engl. *testicular germ cell tumours*, TGCT). Prema tijeku bolesti i terapiji, tumori zametnih stanica dijele se u dva histološka tipa: seminomi i neseminomi. Neseminomski tumori dijele se na teratome, embrionalne karcinome,

neoplazme endodermalnog sinusa (tumori žumanjčane vreće) i koriokarcinome, a česte su miješane histološke građe.¹⁴

U dijagnozi tumora testisa koriste se u kliničkoj praksi tri tumorska biljega: alfa-fetoprotein (AFP), humani korionski gonadotropin (β -HCG) i laktat dehidrogenaza (LDH) u serumu. Međutim, oni mogu biti unutar urednih vrijednosti, osobito u početnoj fazi bolesti, ali isto tako se njihove vrijednosti mogu povećati kod drugih tipova tumora ili nemalighnih bolesti.^{15,16,17} Terapija ovisi o vrsti i stadiju raka i uglavnom uključuje kirurško odstranjivanje testisa (tzv. ingvinalna ili potpuna orhidektomija), potom radioterapiju i/ili kemoterapiju citostaticima na bazi platine. Ako se rak otkrije u ranoj fazi dok još nije došlo do metastatskih promjena, može se izliječiti u više od 95 % posto slučajeva. Kod znatnog dijela ovih bolesnika danas se nastoji odrediti terapijski minimum kojim se izbjegava niz nuspojava, a koji dovodi do jednakog uspjeha kao i donedavno agresivniji terapijski pristup.

Unatoč rastućim stopama incidencije tumora testisa, etiologija te bolesti još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Jasna povezanost s povećanjem rizika za nastanak bolesti odnosi se na svega nekoliko čimbenika kao što su dob, rasna pripadnost i kriptorhizam (nespušteni testisi) za koji se smatra da čak 2 - 4 puta povećava rizik od nastanka tumora testisa.^{18,19}

Budući da nema sistemski određenih pregleda aktivnog traženja raka testisa u osjetljivoj populaciji, bolest često ostaje neotkrivena u ranoj fazi kada je njeno izlječenje najuspješnije. Ponekad oboljeli nema nikakve simptome i nema opipljive promijenjene tvorbe u testisu.

2.3. Metabolomika

Detektiranje promjena koje se događaju u različitim genima, proteinima i metabolitima zbog djelovanja okoliša, zdravstvenih poremećaja ili terapije dovelo je do revolucije u istraživanjima na području biokemije i medicine. Razvojem tehnika poput genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike dolazi do napretka medicinske dijagnostike i liječenja. Tzv. „omika“ se smatra moćnim alatom za interpretaciju i razumijevanje složenih bioloških procesa zbog mogućnosti istovremenog promatranja promjena na različitim biološkim razinama, osiguravajući tako pregled fiziološkog i patološkog stanja organizma.²⁰

Metabolomika je jedna od mlađih sastavnica najnovijih „omik“-tehnologija koja omogućava praćenje biokemijskih i molekularnih procesa u organizmu. Ima važnu ulogu u dijagnostici i pronalaženju novih lijekova što je čini interesantnom u personaliziranoj

medicini. Metabolomičke analize se mogu definirati kao opsežne analize (identifikacija i kvantifikacija) metabolita nekog izoliranog organizma, staničnog sustava, tkiva ili bioloških tekućina.²⁰

Metaboliti su organski spojevi mase do 1500 Da i krajnji su produkti metabolizma. Te male molekule kao što su primjerice peptidi, šećeri, aminokiseline, lipidi, ketoni, aldehidi, organske kiseline i alkaloidi, predstavljaju funkcionalni fenotip stanice, tkiva ili organizma i produkti su genetskih i okolišnih čimbenika. Cjelokupan set metabolita proizveden od strane stanice i organizma čine metabolom. Njegove karakteristike se mijenjaju ovisno o fiziologiji, razvoju i patologiji same stanice, tkiva, organa ili organizma, te se takva dinamičnost i reflektiranje promjena u metaboličkim i signalnim putovima može iskoristiti u dijagnostičke i prognostičke svrhe.^{20,21}

U metabolomici postoje dva pristupa analizama: ciljane i ne-ciljane analize. Ciljana analiza uključuje identifikaciju i kvantifikaciju malog seta poznatih metabolita korištenjem najprikladnije analitičke tehnike, dok ne-ciljana analiza uključuje identifikaciju i kvantifikaciju što većeg broja nepoznatih metabolita (koliko je moguće s obzirom na korištenu analitičku tehniku) u cilju kreiranja profila metabolita u biološkom uzorku.²²

2.3.1. Analitičke metode u metabolomici

Metaboliti se mogu analizirati u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama. Nije moguće provesti analizu svih metabolita odjednom primjenom samo jedne instrumentalne tehnike, tako da se tehnika bira ovisno o cilju analize, prirodi uzorka i spojevima koji se istražuju.

Najčešće korištene tehnike koje se primjenjuju u metabolomičkim istraživanjima su nuklearna magnetska rezonancija (NMR), spektrometrija masa (MS) te vezani sustavi tekućinske (LC) odnosno plinske kromatografije (GC) sa spektrometrijom masa.²⁰ Prvi metabolomički eksperimenti provodili su se isključivo uz pomoć tehnike NMR, dok se današnje analize zbog značajno veće osjetljivosti i brzog prikupljanja podataka provode uglavnom pomoću spektrometrije masa.²³

Spektroskopija NMR je neinvazivna tehnika koja omogućava identifikaciju i kvantifikaciju širokog raspona organskih spojeva i određivanje njihove molekularne strukture u tekućem i čvrstom stanju bez prethodnog fizičkog odjeljivanja i pročišćavanja uzorka. Primjenjuje se u istraživanjima dinamike i mehanizama transformiranja metabolita prisutnih u biološkom uzorku. Spektroskopijom NMR proučavaju se jezgre čiji su spinovi različiti od

nule, a kako gotovo sve organske molekule sadrže proton, ^1H NMR je najčešće korištena tehnika NMR metabolomičkog pristupa.²⁴

Spektrometrija masa mjeri omjer mase i naboja prethodno ioniziranih atoma ili molekula. Omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu metabolita, visoke je osjetljivosti i selektivnosti, širokog dinamičkog raspona. Omogućava analizu velikog broja metabolita unutar vrlo složene biološke matrice.²⁵ Često se povezuje sa separacijskim tehnikama kao što su tekućinska i plinska kromatografija.

Dok se GC-MS koristi za analizu hlapljivih spojeva, LC-MS je prikladna tehnika za analizu termički nestabilnih spojeva koji se ne mogu prevesti u plinovito stanje, te je pogodna za analizu biološki aktivnih spojeva poput proteina, lipida ili nukleinskih kiselina.²⁶

2.3.2. *Primjena metabolomičkih analiza u istraživanjima raka*

Razvojem tumora nastaju promjene u metabolizmu stanica koje se mogu pratiti analizom metabolita u biološkim uzorcima ispitanika. Kod stanica raka dolazi do reprogramiranja metabolizma, pa se tako, na primjer, glukoza više ne koristi da bi se povećala ATP produkcija kao kod normalnih stanica, nego se koristi da bi se maksimizirala proizvodnja makromolekula potrebnih za replikaciju DNA.^{27,28} Usporedbom metaboličkih profila u zdrave i oboljele osobe moguće je uočiti jedinstvene metabolite, potencijalne biološke markere/biljege kao indikatore razvoja i tijeka bolesti ili učinka terapije.

Stanice raka stvaraju specifične hlapljive metabolite koje zdrava stanica tijekom normalnog fiziološkog procesa nije u mogućnosti proizvesti. Prema podacima iz literature, pojedini hlapljivi organski metaboliti (VOM) u urinu razlikuju se između zdravih osoba i pacijenata oboljelih od raka. Stoga određivanje VOM u urinu i njihova identifikacija može biti korisna u dijagnostici pojedinih poremećaja ili bolesti.

Hlapljive metabolite prvo se počelo proučavati u izdahnutom zraku ispitanika s rakom pluća i pokazano je da je profil hlapljivih metabolita u tih bolesnika različit u odnosu na profil hlapljivih metabolita zdravih ispitanika.²⁹ U istraživanjima ispitanica s rakom dojke analiza hlapljivih metabolita u urinu pokazala je da su koncentracije (-)-4-karena, heptan-3-ona, 1,2,4-trimetilbenzena, 2-metoksitiopena i fenola povišene u odnosu na kontrolu.³ Jin i suradnici su u metabolomičkom istraživanju raka mjehura pokazali da se metabolomički profili urina bolesnih i zdravih ispitanika razlikuju.³⁰ Woo i suradnici su metabolomičkom analizom urina detektirali tri potencijalna biomarkera za karcinom jajnika: 1-metiladenozin,

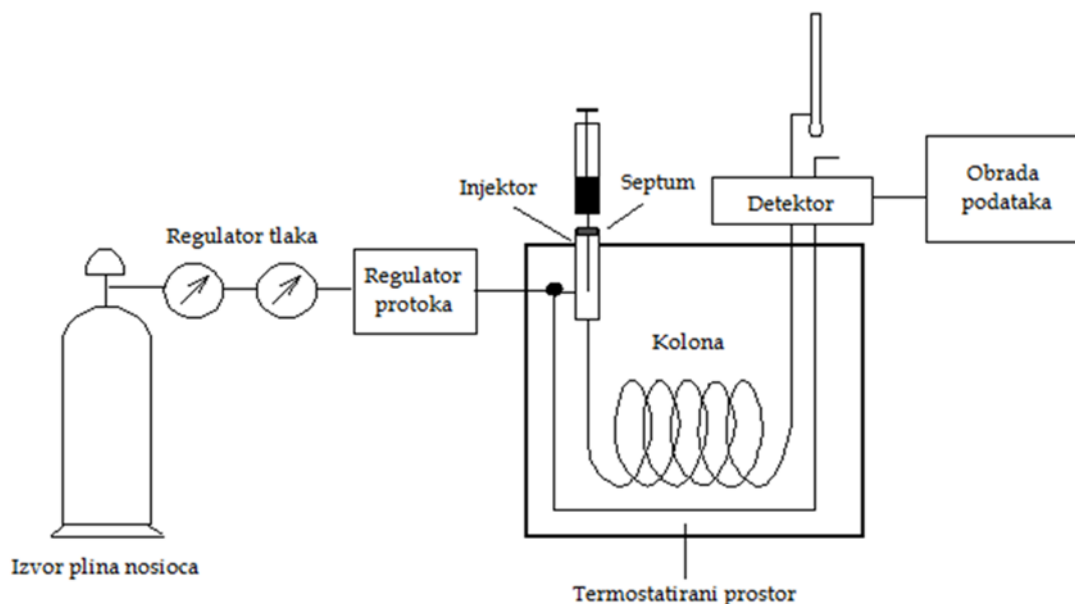
3-metiluridin i 4-androsten-3,17-dion.³¹ Nam i sur. su detektirali 4 potencijalna biomarkera u metabolomičkom istraživanju urina ispitanika s karcinomom dojke: homovanilat, 4-hidroksifenilacetat, 5-hidroksiindolacetat i ureu.³² Međutim, kako bi se nađeni metaboliti potvrdili kao biološki biljezi, potrebna su daljnja istraživanja, kako kod navedenih, tako i kod drugih bolesti.

2.4. Plinska kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja u kojoj dolazi do raspodjele sastojaka između dviju faza, pokretne i nepokretne faze, koje se međusobno ne miješaju. Analizirani uzorak mora biti topljiv u pokretnoj fazi kako bi se nošen njome mogao kretati uzduž nepokretne kolone (kolonska kromatografija) ili čvrste podloge (plošna kromatografija). Pokretna faza može biti plin, tekućina ili fluid pri superkritičnim uvjetima, pa se prema fizičkom stanju pokretne faze kromatografija dijeli na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Sastojci uzorka se na svome putu konstantno raspodjeljuju između faza čime se postiže dobra djelotvornost razdjeljivanja. Molekule uzorka koje se čvršće vežu za nepokretnu fazu zaostaju na koloni (ili podlozi) i putuju sporije od slabije vezanih molekula (ili manje afinitetnih molekula), pa se na temelju razlike u brzini gibanja sastojci smjese mogu razdijeliti.²⁶

Plinska kromatografija je vodeća kromatografska tehnika u razdvajanju hlapljivih spojeva. Spojevi se ulaskom u kromatografski sustav prevode u plinovito stanje, a kolonom se gibaju nošeni strujom inertne plinske pokretne faze. Ovisno o njihovoj hlapljivosti i afinitetu prema nepokretnoj fazi, putuju kolonom različitim brzinama i izlaze iz kolone kao razdvojene komponente. Prema mehanizmu odjeljivanja sastojaka smjese razlikuju se plinska adsorpcijska kromatografija čija je nepokretna faza kolona ispunjena adsorbensom, te plinska tekućinsko-razdjelna kromatografija s nepokretnom fazom sačinjenom od poroznog čvrstog materijala prekrivenog tankim slojem nehlapljive tekućine. Kako i sami nazivi upućuju, razdjeljivanje u adsorpcijskoj tehnici se odvija na osnovu razlike u adsorpciji, dok se kod tekućinsko-razdjelne tehnike sastojci smjese odvajaju na temelju razlike u otapanju ili razdvajanju sastojaka unutar prisutne nehlapljive tekućine.^{26,33}

Osnovni dijelovi plinskog kromatografa su: izvor stalne struje plina nosioca, injektor ili uređaj za unošenje uzoraka, kromatografska termostatisana kolona, detektor, te uređaj za obradu podataka (slika 3).



Slika 3. Dijelovi plinskog kromatografa

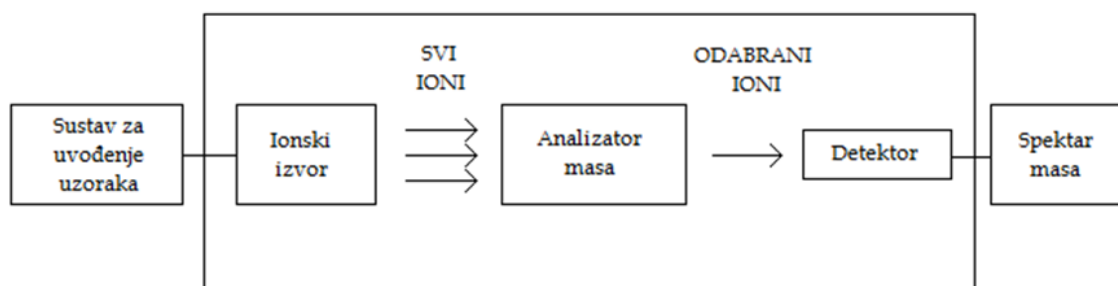
Kao plin nosilac koriste se inertni plinovi visoke čistoće poput helija, dušika, vodika i argona, smješteni u bocama pod tlakom. Plin se odabire prema tipu detektora i vrsti uzorka koji se želi analizirati, te mora biti inertan prema uzorku i nepokretnoj fazi.³³ Podešavanjem ventila i regulatora tlaka osigurava se konstantan protok plina nosioca kroz kolonu. Kromatografska analiza započinje unošenjem uzorka u struju plina nosioca, procesom koji se odvija u dijelu instrumenta zvanom injektor. Plinoviti uzorci ventilima se unose direktno u struju plina nosioca, dok se tekući uzorci prvotno prevode u plinovito stanje zagrijavanjem injektora na temperaturu višu od vrelišta najmanje hlapljive komponente uzorka.²⁶ Zagrijavanje injektora omogućava brzo isparavanje sastojaka, pa se takav potpuni unos uzorka (engl. *Splitless Injection*) upotrebljava pri niskim koncentracijama. Kod visokih koncentracija koristi se djelomičan unos uzorka (engl. *Split Injection*) koji propušta samo mali dio smjese u kolonu, dok se većina otparava kroz ventil u atmosferu.³³ Time se postiže veći protok plina nosioca i brži unos sastojaka na kolonu. Injektiranje se provodi ručno ili automatski pomoću robota (engl. „*autosampler*“), a najčešći način injektiranja tekućeg uzorka je ubrizgavanje mikrolitarskom brizgalicom (špricom) kroz membranu ili septum od silikonske gume. Na taj način se sprječava širenje kromatografske vrpce i povećava razlučivost analize.²⁶

Idealne plinskokromatografske kolone su nehlapljive, toplinski stabilne i kemijski inertne prema uzorku i otapalu, a mogu se podijeliti na preparativne i analitičke. Preparativne kromatografske kolone su dugačke do nekoliko metara i imaju promjer od 10 mm na više, dok su analitičke uglavnom manjih promjera i mogu biti punjene, mikropunjene te kapilarne. Kapilarne kolone su najdjelotvornije i najčešće korištene. Imaju najmanji unutarnji promjer, od 0,1 do 0,75 mm, a njihova duljina može dosegnuti i nekoliko desetaka metara.

Nakon izlaska iz kolone, razdvojene komponente dolaze do detektora, uređaja koji na temelju nekog fizikalnog ili kemijskog svojstva mjeri promjenu stanja plina nosioca. Detekcija se može temeljiti na različitim svojstvima poput toplinske ili električne vodljivosti, plamene ionizacije, fotoionizacije, IR i UV spektrofotometrije ili spektrometrije masa. Dobri detektori su brzi uređaji osjetljivi na veliki broj odjeljivanih sastojaka, širokog linearnog odziva s mogućnošću upotrebljavanja unutar širokog temperaturnog raspona.²⁶

2.5. Spektrometrija masa

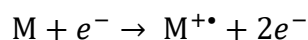
Spektrometrija masa se temelji na ionizaciji i fragmentaciji molekula, nakon čega se nastali ioni razdvajaju u plinskoj fazi, te detektiraju na osnovu njihovog omjera mase i naboja (m/z). Spektar masa je grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta iona o omjeru m/z i predstavlja karakteristiku analiziranog uzorka. Često se naziva i molekulski otisak jer je jedinstven za svaku molekulu.³³ Glavni dijelovi spektrometra masa su ionski izvor, analizator masa i detektor, kako prikazuje slika 4.



Slika 4. Glavni dijelovi spektrometra masa

Molekule analita se ioniziraju unutar ionskog izvora, a nastali ionski snop se usmjerava prema analizatoru masa gdje se ioni odjeljuju u vremenu ili prostoru na temelju njihovog omjera mase i naboja, te nakon toga detektiraju. Sustav za uvođenje uzoraka omogućava uvođenje uzoraka u ionski izvor uz minimalno narušavanje vakuuma. Vakuum je potreban kako bi se spriječila kolizija iona i molekula, te gubitak iona analita ili nastajanje neželjenih produkata. Način na koji se uzorci uvode u spektrometar masa ovisi o samim karakteristikama uzoraka i načinu ionizacije koja se upotrebljava.³⁵ Ionizacijske tehnike se razlikuju prema količini unutarnje energije koju predaju molekulama. Pojedine tehnike prenose veliku količinu energije što uzrokuje jaku ili djelomičnu fragmentaciju molekula. Kao takve, mogu se spomenuti ionizacija elektronima, kemijska ionizacija i ionizacija brzim atomima, tehnike pogodne za analizu molekula koje daju stabilne molekulske i produktne ione. Manja količina prenesene energije dovodi do blage fragmentacije ili njezina izostanka pri čemu nastaje samo molekulski ion. U takve tehnike se ubrajaju ionizacije elektroraspršenjem, termoraspršenje, matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem i ionsko raspršenje. One omogućavaju analizu nestabilnih spojeva velike molekulske mase koji se lako fragmentiraju (proteini, nukleinske kiseline).³⁴ Najčešće korištene ionizacije su ionizacija elektronima i kemijska ionizacija.³³

Ionizacija elektronima se koristi za ionizaciju hlapljivih, termički stabilnih molekula u plinskoj fazi.³⁵ Ionski izvor se sastoji od volframove ili renijeve žice čijim se zagrijavanjem emitiraju elektroni. Nastali elektroni, ubrzani razlikom potencijala katode i anode od 70 eV, sudaraju se s molekulama analita pritom stvarajući ione, prema jednadžbi u nastavku odlomka, koji se usmjeravaju prema analizatoru masa i detektoru.³⁴



Kako je za ionizaciju većine organskih molekula dovoljno 10 eV, suvišak prenesene energije uzrokuje fragmentaciju molekule,³⁵ stoga signal molekulskog iona često izostaje.³⁴ Dobiveni spektri masa su ponovljivi i pohranjeni u spektralnim bazama podataka što omogućava lakšu identifikaciju molekula.

Kemijska ionizacija se koristi za analizu manje polarnih, hlapljivih molekula, stabilnih pri povišenim temperaturama. Ona omogućava posrednu ionizaciju molekula pomoću plina reagensa prisutnog u ionskom izvoru. Najčešće korišteni plinovi su metan, izobutan i

amonijak.^{34,35} Plin reagens se prvo ionizira elektronima, te nakon toga nastali ioni plina reagensa ioniziraju molekule analita stvarajući katione ili anione reakcijama poput prijenosa protona ili zahvata elektrona. Fragmentacija je znatno slabija u odnosu na ionizaciju elektronima jer nastali elektroni posjeduju manju energiju.³⁴

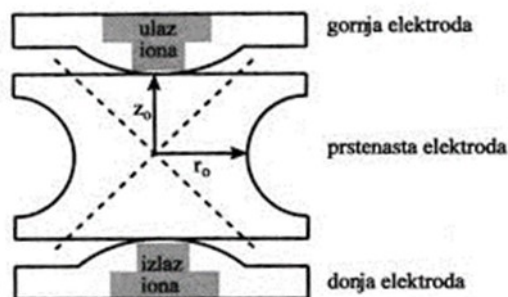
Ostale tehnike ionizacije omogućavaju ionizaciju termički nestabilnih, nehlapljivih spojeva u kojima nastaju ioni u plinskoj fazi direktno iz kondenzirane faze. Na taj se način mogu analizirati veliki biološki spojevi i sintetski polimeri. Njihovi spektri su uglavnom jednostavni i sastoje se od molekulskog ili protoniranog molekulskog iona.

Nakon provedene ionizacije, ioni putuju prema analizatoru masa kako bi se odijelili prema omjeru mase i naboja. Analizatori masa mogu biti kvadrupolni, sektorski, ionska stupica, Fourier-transformirana spektrometrija masa ionsko-ciklotronske rezonancije, *orbitrap* i analizator mase vremena leta. Odabir analizatora ovisi o njihovim karakteristikama poput osjetljivosti, gornje granice mase, brzine analize, razlučivanja, propusnosti i točnosti mjerenja. Osjetljivost analizatora mase je najmanja količina iona koja se može detektirati, dok je gornja granica mase najveća vrijednost m/z koju je moguće izmjeriti. Razlučivanje je sposobnost razdvajanja signala iona s malom razlikom u masama i ono utječe na izgled spektra masa. Propusnost je omjer broja iona koji stižu do detektora i broja iona koji su nastali u ionskom izvoru, dok je točnost mjerenja definirana razlikom između izmjerene i prave vrijednosti m/z .^{34,35}

Sektorski i kvadrupolni analizatori masa sukcesivno propuštaju ione tijekom vremena. Na taj način samo ioni određene vrijednosti m/z prolaze kroz instrument u određeno vrijeme. Ostali analizatori masa simultano analiziraju sve prisutne ione. Analizatori masa se temelje na različitim principima, pa se tako kvadrupol temelji na stabilnoj putanji iona određenog omjera mase i naboja, dok je ionska stupica bazirana na stabilnoj rezonantnoj frekvenciji iona. Kako bi se postigli što bolji uvjeti i ujedinile najbolje karakteristike analizatora, moguće je njihovo povezivanje. Hibridni instrumenti sastoje se od niza međusobno povezanih različitih tipova analizatora masa.³⁵

Ionska stupica, analizator masa korišten pri izradi diplomskog rada, sastoji se od tri elektrode: gornje elektrode s otvorom za ulaz iona, središnje prstenaste elektrode na koju se primjenjuje kombinacija istosmjernog i izmjeničnog napona, te donje elektrode s otvorom za izlaz iona (slika 5). Pod utjecajem polja ioni se sudaraju unutar stupice, rotiraju unutar zatvorene putanje radijusa r_0 i osciliraju oko osi z_0 . Promjenom kombinacije primijenjenog

napona, putanja iona određenog omjera mase i naboja postaje nestabilna, te on izlazi iz stupice.³⁴ Ukoliko je ionska stupica detektor u plinskoj kromatografiji, unutar same stupice odvija se i ionizacija analita elektronima.³⁵

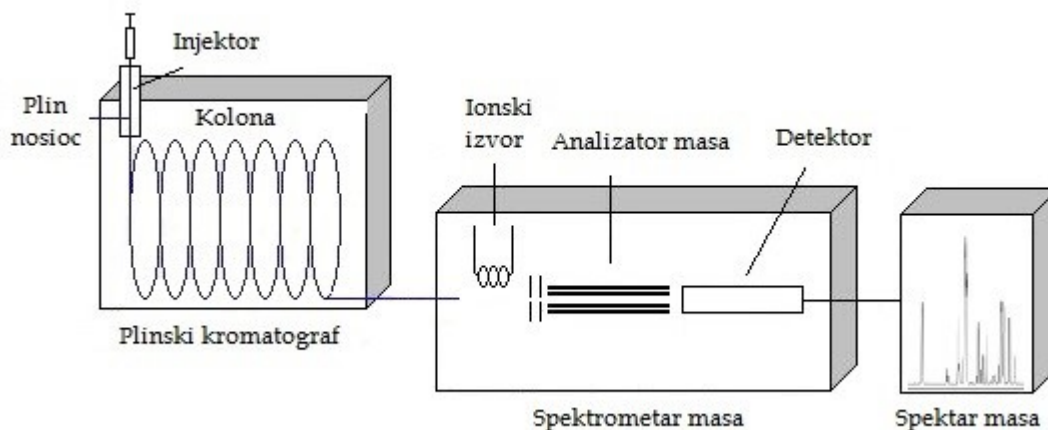


Slika 5. Prikaz ionske stupice³⁴

Ioni razdvojeni analizatorima masa detektiraju se i prevode u mjerljivi signal detektorima poput elektronskih multiplikatora i fotomultiplikatora.³⁵

2.5.1. Vezani sustav plinske kromatografije sa spektrometrijom masa

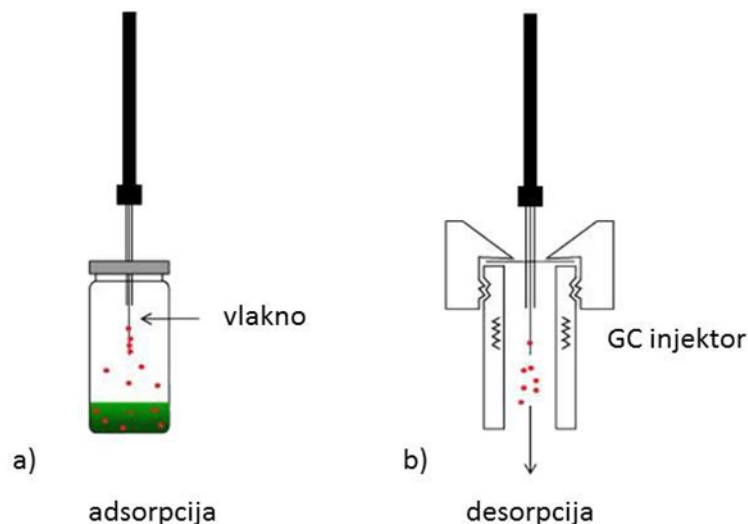
U analizama složenih smjesa, spektrometar masa je često spojen u vezani sustav s plinskim ili tekućinskim kromatografom. Tada on sam ima funkciju detektora, dok se kromatografi promatraju kao sustav za uvođenje uzoraka. Upotrebom kapilarnih kolona plinske kromatografije omogućeno je direktno uvođenje plina nosioca u ionski izvor. Plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MC) omogućava bolje razdvajanje i detekciju različitih spojeva u svrhu njihove identifikacije na temelju molekulske strukture.^{33,35} Osnovne komponente GC-MS sustava prikazuje slika 6.



Slika 6. Prikaz glavnih dijelova GC-MS instrumenta

2.6. *Headspace* mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HS-SPME)

Analiza hlapljivih organskih spojeva u urinu zahtjeva sustave visoke osjetljivosti bez gubitaka i kontaminacije uzorka kao što je HS-SPME tehnika. HS-SPME tehnika ne koristi otapala čime je smanjena mogućnost onečišćenja sustava odnosno gubitak pojedinih metabolita uslijed njihove interakcije s molekulama otapala ili kakvog drugog onečišćivala. Naime, interakcije s prvotnim metabolitima mogu dovesti do nastajanja i nakupljanja novih metabolita, koji inače ne postoje u promatranom sustavu, te samim time do netočnih rezultata i stvaranja pogrešnog zaključka o stanju promatranog sustava.²⁰ Ekstrakcija i ukoncentriravanje odvijaju se u jednom koraku što pridonosi njenoj brzini. Osjetljivija je od klasične ekstrakcije jer se ekstrakcija provodi pomoću vlakna koje ima veliki kapacitet i uzorak se može ukoncentrirati, te se uklanja efekt matrice. HS-SPME tehnika može biti 10 do 100 puta osjetljivija od klasične ekstrakcije. Kako bi se poboljšala ekstrakcija dodaju se soli (npr. NaCl) u suvišku u uzorak. Dodatak soli pomiče ravnotežu između tekuće i plinovite faze, te veći broj hlapljivih spojeva prelazi u plinovitu fazu.³⁶ Da bi se provela priprema uzorka, potreban je zatvoreni sustav s točno definiranom temperaturom i vremenom trajanja ekstrakcije. Tu se uspostavlja ravnoteža između tekuće i plinovite faze. Lako hlapljivi spojevi se izdvajaju iz složene matrice i adsorbiraju na karakteristično vlakno napravljeno od silikagela i prekriveno adsorbensom. Nakon toga se vlakno injektira u plinski kromatograf gdje se provodi analiza (slika 7).



Slika 7. Prikaz HS-SPME sustava: a) adsorpcija analita na vlakno; b) desorpcija analita s vlakna u GC injektoru

2.7. Identifikacija

AMDIS (engl. *Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System*) se koristi kao besplatno dostupan napredni alat kako bi olakšao identifikaciju hlapljivih spojeva analiziranih GC-MS sustavom. Proces identifikacije sustavom AMDIS sastoji se od sljedećih koraka:

1. uklanjanja pozadinskog šuma (AMDIS može detektirati spojeve prisutne u niskim koncentracijama u složenoj matrici)
2. spektralne dekonvolucije
3. detektiranja pojedinog spoja
4. krajnje identifikacije ovisno o postavljenom tipu analize tako da automatski uspoređuje spektar masa nepoznatog spoja s knjižnicom spektara masa NIST i indeksima zadržavanja.

2.7.1. Indeks zadržavanja

Indekse zadržavanja (RI) definirao je E. Kováts 1958. godine. Određivanje indeksa zadržavanja provodi se analiziranjem smjesa homolognog niza alkana, te se vremenu zadržavanja (RT) na kojem pojedini alkan izlazi s kromatografske kolone dodjeljuje indeks ovisno o broju C atoma u alkanu (npr. oktan s 8 C atoma ima RI 800). Potom se računa RI nepoznatog spoja uzimajući u obzir između koja dva alkana spoj izlazi s kromatografske kolone po formuli:

$$RI = 100 \times \left(\frac{t_{R,X} - t_{R,Z}}{t_{R,Z+1} - t_{R,Z}} + Z \right)$$

gdje je $t_{(R,X)}$ retencijsko vrijeme nepoznatog spoja, $t_{(R,Z)}$ retencijsko vrijeme alkana koji s kromatografske kolone izlazi prije nepoznatog spoja, $t_{(R,Z+1)}$ retencijsko vrijeme alkana koji s kromatografske kolone izlazi nakon nepoznatog spoja, a Z je broj ugljikovih atoma u alkanu koji s kromatografske kolone izlazi prije nepoznatog spoja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.1. Kemikalije i pribor

- **klorovodična kiselina** (HCl), VWR International (West Chester, PA, SAD)
- **natrijev klorid** (NaCl), Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- **suprapur dušična kiselina** (65 % -tna HNO₃), Merck (Darmstadt, Njemačka)
- **smjesa standarda C₈-C₂₀ alkana** koncentracije 40 mg L⁻¹ u heksanu, Fluka (Buchs, Švicarska)
- **analitička vaga** Mettler Toledo AG, Švicarska
- **komercijalni držač vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME)** za ručnu upotrebu i **karboksen/polidimetilsiloksansko (PDMS) vlakno** za SPME, 75 µm, Supelco, Bellefonte, SAD
- **SPME staklene bočice** volumena 5 mL (20,5 mm × 38 mm) s **aluminijским čepom** Macherey-Nagel GmbH & Co. (Düren, Njemačka) i **septum** promjera 20 mm Supelco (Bellefonte, SAD)
- **termoblok** Barnstead/Lab Line (Melrose Park, IL, SAD)
- **Vibromix miješalica**, Tehnica, Železniki, Slovenija

3.2. Uzorci urina

Uzorci urina prikupljeni su od 67 zdravih muških ispitanika starosti od 18 do 57 godina i 99 muškaraca oboljelih od tumora testisa starosti od 20 do 53 godine. Ispitanici su prethodno bili informirani o cilju istraživanja te je njihov pisani pristanak dobiven prije uključivanja u istraživanje. Istraživanje je provedeno u skladu s uobičajenim standardnim etičkim načelima u biomedicinskim istraživanjima, uključujući osnove dobre kliničke prakse. Sve postupke istraživanja odobrila su Etička povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

U plastične bočice (bez ftalata) prikupljen je jutarnji urin srednjeg mlaza. Kako bi se spriječio gubitak hlapljivih metabolita, bočice su napunjene do vrha. Korištenjem dušične

kiseline podešena je pH-vrijednost urina na 2 do 3. Uzorci su pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.3. Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)

Postupak mikroekstrakcije uključivao je dodavanje 2 mL urina u staklene bočice volumena 5 mL u koje je prethodno odvagano 1 g natrijevog klorida. Bočice su zatvorene septumom i aluminijskim čepom i, nakon miješanja od 60 sekundi na miješalici, uzorci su inkubirani 15 minuta na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na termobloku. Nakon uspostavljanja ravnoteže između tekuće i plinovite faze, septum je probušen SPME iglom i vlakno je izloženo plinovitoj fazi iznad uzorka. Nakon 45 minuta na $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, vlakno je uvučeno u SPME iglu i uneseno u injektor plinskog kromatografa gdje je izloženo temperaturi od $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 minuta i uz uvjete analize opisane u poglavlju 3.4.

3.4. Analiza hlapljivih metabolita vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Analiza hlapljivih metabolita je provedena na plinskom kromatografu Trace 1300 (Thermo Scientific, Milan, Italija) spregnutim sa spektrometrom masa ITQ 700 (Thermo Scientific, Austin, TX, SAD), s ionskom stupicom kao detektorom. Za kromatografsko razdjeljivanje koristila se kapilarna kolona TG-5MS duljine 30 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm, sa stacionarnom fazom 5 % difenil- i 95 % dimetilpolisiloksana debljine filma 0,25 μm (Thermo Scientific, Runcorn, UK). Kao mobilna faza korišten je helij protoka 1 mL min^{-1} . Temperatura injektora bila je $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. U plinskokromatografskoj pećnici temperatura se na početku održavala na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 2 minute, a zatim se povisila na $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ postupnim zagrijavanjem brzinom od $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ u minuti. Nakon 2 minute na $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura se povisila na $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ brzinom od $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ u minuti, nakon čega slijedi rast brzinom od $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ u minuti do konačne temperature pećnice od $310\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri toj temperaturi eluiraju se svi ekstrahirani metaboliti iz kolone, što je potvrđeno analizom vlakna nakon uzorka urina. Analiza je trajala 42 minute. Radni uvjeti za sustav spektrometrije masa uključuju ionizaciju elektronima pri energiji od 70 eV i temperaturu međuspoja od $260\text{ }^{\circ}\text{C}$, te ionskog izvora od $200\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za prikupljanje

podataka korišten je način snimanja ukupne struje iona, a spektri masa bilježeni su u rasponu m/z od 30 do 400.

Kako bi se kontrolirao analitički sustav korišteni su C_8 - C_{20} alkani, kao referentni standardi. Oni su analizirani kako bi se potvrdila stabilnost uvjeta instrumenta tijekom cijelog provođenja eksperimenta.

3.5. Identifikacija hlapljivih metabolita u urinu

Za identifikaciju hlapljivih metabolita u urinu koristili smo spektre masa hlapljivih spojeva iz uzorka, identifikacijski sustav AMDIS, bazu masenih spektara NIST (verzija 2.2. kreirana 10. 06.2014.), te indekse zadržavanja (retencijski indeks RI) uz primjenu homologne serije n -alkana.

Nakon provedene analize 166 uzoraka urina, dobivene kromatograme smo učitali u sustav AMDIS i proveli postupak identifikacije koji se sastoji od sljedećih koraka:

1. Obrada i dekonvolucija pikova u kromatogramu analiziranog uzorka provodi se u cilju razdvajanja metabolita. Slijedi usporedba spektra masa nepoznatog metabolita s knjižnicom spektara masa NIST.
2. Učitavaju se kromatogrami periodički analizirane homologne serije n -alkana (C_8 - C_{20}) i definiraju vrijeme zadržavanja (RT) i RI svakog pojedinog alkana u svrhu računanja RI nepoznatog metabolita.
3. Uspoređi se RI nepoznatog metabolita s RI pretpostavljene identifikacije. Ako se RI podudaraju, pretpostavljena identifikacija se smatra konačnom.
4. Ako je moguće, identifikacija se dodatno potvrđuje standardom.

3.6. Ponovljivost analize identificiranih hlapljivih metabolita

Kako bi se procijenilo koji se metaboliti mogu uzeti u obzir pri daljnjem traženju potencijalnih bioloških biljega, određena je ponovljivost analize hlapljivih metabolita. Ponovljivost je podudaranje rezultata mjerenja. Dobiva se na način da se standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*, SD) izmjerenih površina ispod pika promatranog metabolita dobivena višekratnom analizom istog uzorka podijeli s aritmetičkom sredinom

(engl. *Average*, AVG) površina ispod pika promatranog metabolita dobivena višekratnom analizom istog uzorka i pomnoži sa 100 % prema formuli

$$\text{Ponovljivost} = \frac{SD}{AVG} \times 100 \%$$

Ponovljivost u našem istraživanju određena je na temelju osam mjerenja istog uzorka urina.

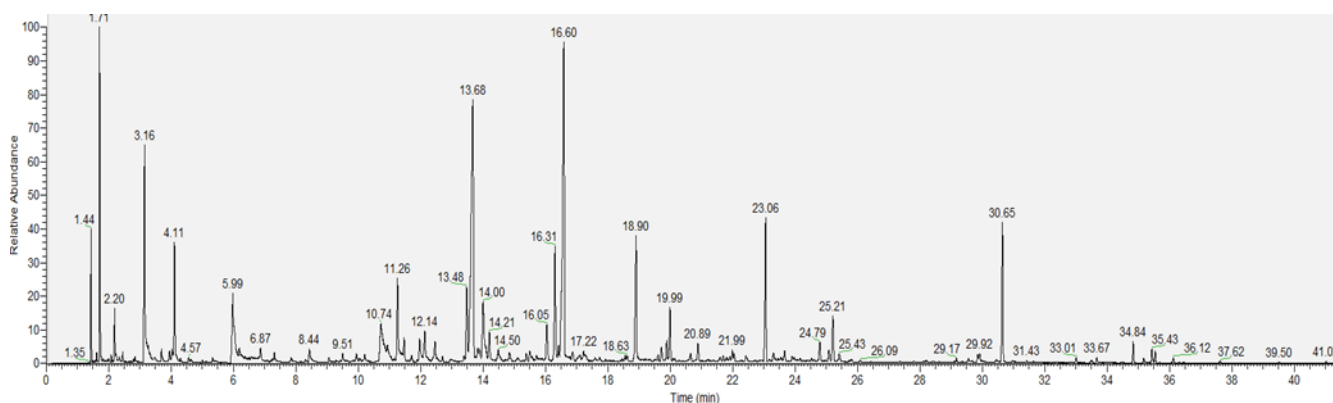
3.7. Pretraživanje *Human metabolome database* (HMDB)

Nakon kreiranja metabolomičkog profila hlapljivih metabolita u urinu, svaki pojedini metabolit je pretražen u *Human Metabolome Database*, HMDB. HMDB (dostupan na web-stranici: <http://www.hmdb.ca/>) slobodno je dostupna baza podataka koja sadrži detaljne informacije o detektiranim metabolitima malih molekula koje se nalaze u ljudskom tijelu. Omogućava uvid u dostupne kemijske, biokemijske i kliničke podatke o svakom detektiranom metabolitu uključujući podrijetlo i ulogu metabolita u organizmu.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Identifikacija

U okviru ovog rada provedena je identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu ispitanika s rakom testisa i kontrolnih ispitanika u cilju stvaranja metabolomičkog profila. Analiza urina pomoću HS-SPME GC-MS rezultirala je pojavom oko 200 pikova u kromatogramu (slika 8). HS-SPME se do sada pokazala uspješnom i često korištenom metodom za pripremu uzoraka urina za GC-MS analizu hlapljivih metabolita.^{3,37,38} Pripremu uzoraka urina moguće je provesti upotrebom derivatizacijskih reagensa, npr. BSTFA (*N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoracetamid) prije GC-MS analize,³⁹ međutim ta metoda se ne koristi tako često, a i manipulacija uzorkom je velika te može doći do gubitka metabolita.



Slika 8. Prikaz kromatograma (eng. *total ion chromatogram*) analiziranog uzorka urina

Nepoznati metaboliti u uzorku identificirani su pomoću slobodno dostupnog sustava AMDIS s pripadajućom knjižnicom spektara masa NIST (slika 9). Kod procesa identifikacije sustavom AMDIS, faktor poklapanja pri usporedbi spektra masa nepoznatog metabolita s podacima u knjižnici spektara masa NIST je postavljen na 70 %. Potom su uspoređivani RI nepoznatih metabolita s podacima iz baze i literature. Ako se vrijednost RI nepoznatog i predloženog metabolita nije razlikovala za više od ± 10 , nepoznati metabolit se smatrao

odredili mu RI kako bi nam pomogao u identifikaciji. Svim metabolitima koji su izašli s kolone prije oktana određen je okvirni RI, a pri njihovoj identifikaciji uzeta je u obzir i njihova temperatura vrelišta. Budući da za njih nije bilo moguće izračunati točan RI, faktor preklapanja postavljen je na 90 %.

U tablici 1 su prikazani RI nepoznatog metabolita izračunatog pomoću homologne serije *n*-alkana i predložene identifikacije iz literature. Pri usporedbi izračunatog RI nepoznatog metabolita s RI iz literature treba obratiti pozornost na korištenu kolonu pri kromatografskom razdjeljivanju jer se RI mijenjaju ovisno o vrsti kolone. Potom su navedene i temperature vrelišta pojedinih metabolita, za koju se očekuje da analogno rastu ovisno o RI.

Nakon provedenih analiza, u uzorcima urina identificirano je 128 nepoznatih hlapljivih organskih metabolita. U istraživanjima drugih autora, bez korištenja RI identificirano je 66 nepoznatih metabolita,³⁹ dok je primjenom podataka o RI identificirano 79 odnosno 181 nepoznati metabolit u urinu ispitanika.^{3,38}

4.2. Ponovljivost analiza

U ne-ciljanim metabolomičkim analizama nije moguće izračunati parametre validacije osim ponovljivosti analize.³⁶ Ponovljivost se izračunava kao mjera varijacije površine ispod pika identificiranog spoja višekratnim mjerenjem istog uzorka. To je mjera koja nam daje i informaciju o stabilnosti identificiranih spojeva što je kod analize hlapljivih metabolita jako bitno, jer pojedini metaboliti upravo zbog temperature vrelišta mogu nestati iz uzorka. Zato smo te rezultate u tablici 1 prikazali kao stabilnost.

Od 49 identificiranih metabolita, za 33 je izračunata stabilnost nakon osam analiza istog uzorka urina. Naz i sur. navode da se pri ne-ciljanim metabolomičkim analizama prihvaća varijacija stabilnosti do 30 %.⁴⁰ Naime, metoda pripreme uzoraka i optimiziranje postupaka mjerenja prilagođava se analizi velikog broja nepoznatih uzoraka te nije moguće prilagoditi uvjete koji najviše odgovaraju svakom pojedinom metabolitu. U našim je rezultatima, devet od 33 identificiranih metabolita pokazalo varijaciju ispod 10 %, 18 između 10 i 20 %, a šest ih je pokazalo varijaciju iznad 20 %. Niti jedan identificirani metabolit nije pokazao varijaciju veću od 30 % te su sva 33 metabolita uključena u daljnje analize traženja biološkog biljega za tumor testisa.

Za 16 identificiranih metabolita nije bilo moguće izračunati ponovljivost odnosno odrediti stabilnost nakon osam analiza istog uzorka zbog nedostatka uzorka. Međutim, njihova stabilnost se pratila četiri sata nakon odmrzavanja na 4 °C. Za tu svrhu je deset uzoraka različitih urina analizirano odmah nakon odmrzavanja i četiri sata poslije te su dobivene površine ispod pikova uspoređene i određena je stabilnost. Pod tim uvjetima dvanaest metabolita pokazalo je zadovoljavajuću stabilnost. Međutim, četiri identificirana metabolita, etanol, nonanal, 1,4,5-trimetilnaftalen i 3-izotiocijanatoprop-1-en nisu se pokazala stabilnima te ih se isključilo iz daljnjih analiza.

Tablica 1. Prikaz identificiranih metabolita koji su potencijalno važni za razlikovanje oboljelih od zdravih ispitanika razvrstanih ovisno o funkcionalnim skupinama.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	<i>t</i> / °C	Literatura ^c
KETONI					
propanon	std ^d		10.7	56	3, 41, 42, 43, 44, 45, 46
pent-3-en-2-on	716 ^e		+ ^f		41,44
heksan-3-on	786 ^e	784	6.8	123	3, 41, 42, 44, 46
heksan-2-on	std ^d		+ ^f		41, 43, 46
heptan-4-on	870	869	8.1	147	3, 41, 42, 43, 44, 45, 46
heptan-2-on	std ^d		6.6	151	3, 42, 42, 43, 44, 46
2-metilciklopent-2-en-1-on	905		+ ^f		44
hept-3-en-2-on	937		12.1		41, 44
3-metilheptan-2-on	943	937	8.2	158	41
2,2,6-trimetilcikloheksan-1-on	1026	1023	15.8	177	3, 41, 42
5-metil-5-vinildihidro-2(3H)-furanon	1040	1041	13.3		41
3-metilcikloheks-2-en-1-on	1060		12	199	41
1-(4-metilcikloheks-3-enil)etanon	1133	1131	12.4		41, 44
1-(2,6,6-trimetilcikloheksa-1,3-dien-1-il)-2-buten-1-on	1391	1388	12		3, 41, 42, 44
2,6-di(<i>tert</i> -butil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion	1476	1485	16.7		25
5-izopropenil-2-metilcikloheks-2-en-1-on	1246	1243	8.1		3, 41 42, 44

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	<i>t</i> / °C	Literatura ^c
HETEROCIKLI					
2,4-dimetilfuran	736 ^e	735	17	94	47
2-etil-5-metilfuran	803	800	10.2	117	47
2,3,5-trimetilfuran	815	815	8.7	122	44
2-metil-5-(metilsulfanil)furan	974		25		3, 41, 42
2,2-dimetil-5-[(1 <i>E</i>)-1-metil-1-propenil]tetrahidrofuran	1048	1046	14.8		47
2,3-dihidro-1-benzofuran	1221	1219	12.4		25
indol	1296	1290	8.6	254	3, 41, 42, 48
ALDEHIDI					
2-oksopropanal	663 ^e		+ ^f		38
heksanal	800	800	8	130	3,41, 42, 44, 49
fenilmetanal	959	960	11.3	179	41, 44
nonanal	1103		- ^f		3, 41, 42, 49
4-izopropilbenzaldehyd	1242	1242	22.3		3, 41, 42
3-fenil-2-metilprop-2-enal	1292		+ ^f		3, 42
KARBOKSILNE KISELINE					
etanska kiselina	std ^d		+ ^f		3, 41, 42, 44, 50
2-metilbutanska kiselina	866		+ ^f		3, 42
benzenkarboksilna kiselina	1182	1178	29.1		47
oktanska kiselina	1189	1191	10.7		3, 42, 43, 44
feniletanska kiselina	1253		+ ^f		50
ALKOHOLI					
etanol	std ^d		- ^f		47
3,7-dimetiloktan-3-ol	1099	1097	13.5	195	41
(4-izopropilfenil) metanol	1292	1291	20.4		47
MONOCIKLIČKI UGLJIKOVODICI					
1,2,3,4-tetrametilbenzen	1152	1147	26.9	205	3, 42
izopropenilbenzen	982		+ ^f		38

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	<i>t</i> / °C	Literatura ^c
FENOLI					
2-metoksifenol	1091		+ ^f		3, 41, 42
4-etenil-2-metoksifenol	1315	1315	20.4		3, 42
SULFIDI					
(metildisulfanil)metan	758 ^e	755	6.9	109	41
3-(metildisulfanil)prop-1-en	915		+ ^f		-
(metiltrisulfanil)metan	967	963	11.5		41
OSTALI					
metantioi	665 ^e	464	18.3	6	3, 41, 42, 43, 44
3-izotiocijanatoprop-1-en	884		- ^f		41, 45
1-izopropil-4-metil-7-oksabiciklo [2.2.1]heptan	1016	1016	13.3		47
dodekan	1199		+ ^f		41, 49
1,4,5-trimetilnaftalen	1571		- ^f		3, 42

a - indeks zadržavanja izračunat sustavom AMDIS

b - indeks zadržavanja u knjižnici NIST

c - literaturni izvori u kojima su detektirani identificirani metaboliti

d - identitet metabolita potvrđen standardom

e - indeks zadržavanja izračunat okvirno uz pomoć indeksa zadržavanja heksana

f - stabilnost kroz četiri sata nakon odležavanja na 4 °C. Metaboliti koji se nisu pokazali stabilnima pri navedenim uvjetima isključeni su iz daljnjih analiza i označeni su sa „-“.

4.3. Hlapljivi organski metaboliti u uzorcima urina kao mogući biološki biljezi

Metabolomički pristup u istraživanjima bioloških biljega temelji se na pretpostavci da jedan stimulans, poput raka ili bilo koje bolesti organizma, mijenja biokemiju sustava, dovodi do promjena u biokemijskim putovima i direktno utječe na promjene u metabolomu.⁵¹ Zbog mogućnosti prekrivanja cijelog metaboloma, metabolomika omogućava puno bolju sveobuhvatnu procjenu biološkog i fiziološkog stanja pacijenta, u odnosu na konvencionalne metode temeljene na mjerenju pojedinog metabolita. Istraživanja hlapljivih urinarnih

metabolita metabolomičkim pristupom zadnjih godina okuplja sve veći broj znanstvenika. Rezultati iz literature sugeriraju da su hlapljivi metaboliti iz urina mogući biološki biljezi za različite zdravstvene poremećaje i oboljenja.⁵²

Idealni biološki biljeg treba biti prisutan u lako dostupnim i minimalno invazivnim izvorima uzorkovanja, poput urina i krvi. Njegova visoka osjetljivost je izuzetno bitna za postavljanje rane dijagnoze, a velika važnost se posvećuje i visokoj selektivnosti. Bitno je da brzo reagira na promjenu tretmana i razvoj bolesti, ali ipak ostaje nepromijenjen u prisutnosti raznih interferencija. Njegova prisutnost ili odsutnost treba omogućavati dublje razumijevanje mehanizma bolesti, te davati korisne informacije o potrebnim metodama liječenja.⁵¹

U našem istraživanju analizom uzoraka urina detektirano je oko 200 metabolita te ih je 128 identificirano. Za većinu metabolita nepoznato je njihovo porijeklo i fiziološka funkcija. Pretražujući literaturu (HMDB), za 49 identificiranih metabolita smo pretpostavili da su prisutni u metabolizmu čovjeka i njihove karakteristike su prikazane u tablici 1. Od 49 izabranih metabolita, 16 (33 %) je ketona, sedam heterocikličkih spojeva (14 %), šest aldehida (12 %), pet karboksilnih kiselina (11 %), tri su alkohola (6 %), tri sulfida (6 %), dva fenola (4 %), dva monociklička ugljikovodika (4 %), jedan biciklički eter (2 %), jedan izotiocijanat (2%), jedan kondezirani policiklički ugljikovodik (2 %), jedan tiol (2 %) te jedan ugljikovodik (2 %). Ketoni su se pokazali kao najzastupljenija skupina u urinu što je potvrđeno i rezultatima drugih autora.^{3,53} 48 metabolita koji su identificirani u ovom istraživanju nađeno je i identificirano također u istraživanjima drugih autora što je i navedeno u tablici 1. Neki od navedenih metabolita su u dosadašnjim istraživanjima navedeni kao potencijalni razlikovni metaboliti između zdravih ispitanika i ispitanika s tumorskim oboljenjem. Monteiro i sur. su uočili značajno povećanje 2-oksopropanala u urinu ispitanika s rakom bubrežnih stanica u odnosu na zdrave ispitanike.³⁸ Silva i sur. su uočili značajno povećanje 3-fenil-2-metilprop-2-enala u grupi ispitanika s tumorskim oboljenjem u odnosu na zdrave ispitanike.⁴² 2-Oksopropanal i 3-fenil-2-metilprop-2-enal se s obzirom na funkcionalnu skupinu ubrajaju u aldehide. Oba metabolita su poznatog porijekla i fiziološke funkcije, prisutni su u metabolizmu čovjeka. U uzorcima oboljelih osoba, produkcija aldehida je uvijek značajno povećana, stoga se njihovo pojavljivanje povezuje s brojnim tumorskim oboljenjima i upalnim procesima, uzrokovanim povećanom produkcijom reaktivnih kisikovih spojeva.⁴¹ Reaktivni kisikovi spojevi poznati su prema svom štetnom djelovanju na lipide, sastavne dijelove membrana, uzrokujući lipidnu peroksidaciju, odnosno degradaciju višestruko

nezasićenih masnih kiselina. Navedeni procesi mogu se pripisati rastu i širenju tumorskih stanica, te njihovom karakterističnom svojstvu da razaranjem membrana koloniziraju ostale stanice. Ostali identificirani metaboliti uglavnom se mogu pripisati spojevima koji su potrebni za normalnu funkciju organizma.

Pregledom dostupne literature ustanovili smo da spoj metil-prop-2-enil-disulfid do sada nije identificiran u urinu, međutim detektiran je u fecesu zdravih ispitanika i ispitanika oboljelih od ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti.^{54,55}

§ 5. ZAKLJUČAK

- Analiza hlapljivih metabolita u urinu 99 ispitanika s tumorom testisa i 67 kontrolnih ispitanika, primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa nakon mikroekstrakcije na čvrstoj fazi, rezultirala je detekcijom oko 200 metabolita.
- Metaboliti su identificirani pomoću identifikacijskog sustava AMDIS, knjižnice spektara NIST, indeksa zadržavanja i temperature vrelišta. Na taj je način identificirano 128 metabolita. Identifikacija dijela metabolita potvrđena je primjenom raspoloživih standarda.
- Uz korištenje vremena zadržavanja i temperature vrelišta, sustav AMDIS se pokazao kao pouzdan automatski sustav koji ubrzava proces identifikacije.
- Pretragom baze HMDB, za 49 identificiranih metabolita nađeni su podaci o njihovoj pretpostavljenoj prisutnosti u metabolizmu čovjeka.
- Za 45 metabolita utvrđena je zadovoljavajuća ponovljivost. To ih čini dobrim kandidatima za praćenje promjena uzrokovanih tumorskim oboljenjem pa će biti uključeni u daljnje analize traženja novog potencijalnog biološkog biljega tumora testisa.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AFP	alfa-fetoprotein (engl. <i>alpha-fetoprotein</i>)
AMDIS	Automatizirani sustav za dekonvoluciju i identifikaciju spektara masa (engl. <i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>)
AVG	aritmetička sredina (engl. <i>Average</i>)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoracetamid (engl. <i>N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i>)
β-HCG	humani korionski gonadotropin (engl. <i>human chorionic gonadotropin</i>)
GC	plinska kromatografija (engl. <i>gas chromatography</i>)
GC-MS	vezni sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. <i>gas chromatography–mass spectrometry</i>)
HMDB	Baza podataka ljudskih metaboloma (engl. <i>Human Metabolome Database</i>)
HS-SPME	Miroekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>Headspace–Solid Phase Microextraction</i>)
IR	infracrveno (engl. <i>infrared</i>)
LC	tekućinska kromatografija (engl. <i>liquid chromatography</i>)
LC-MS	vezni sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (engl. <i>liquid chromatography–mass spectrometry</i>)
LDH	laktat dehidrogenaza (engl. <i>lactate dehydrogenase</i>)
MS	spektrometrija masa (engl. <i>mass spectrometry</i>)
NIST	Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (engl. <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
NMR	nuklearna magnetska rezonancija (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
RI	indeks zadržavanja (engl. <i>retention indeks</i>)
RT	vrijeme zadržavanja (engl. <i>retention time</i>)
SD	standardna devijacija (engl. <i>standard deviation</i>)
UV	ultraljubičasto zračenje (engl. <i>ultraviolet</i>)
VOM	hlapljivi organski metaboliti (engl. <i>volatile organic metabolites</i>)
Z	broj ugljikovih atoma u alkanu

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. Damjanov, S. Jukić, M. Nola, *Patologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2008, str. 127-168.
2. L. W. S. Finley, J. Zhang, J. Ye, P. S. Ward, C. B. Thompson, *Cell Metab.* **17** (2013) 466-466.e2.
3. C.L. Silva, M. Passos, J.S. Câmara, *Talanta*, **89** (2012) 360–368.
4. S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A. C. Guo, M. R. Wilson, C. Knox, et al., *PLoS One* **8** (2013) e73076.
5. A. Sreekumar, L. Poisson, T. Rajendiran, A.P. Khan, Q. Cao, J. Yu, *Nature* **457** (2009) 910–914.
6. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *Molecular Biology of the cell*, 5th ed., Garland Science, New York, 2008, str. 1205-1223.
7. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/hematologic-cancer> (datum pristupa 21. siječnja 2019.)
8. S. Gamulin, *Patofiziologija*, Skripta, 2004, str. 18-1-18-6.
9. D. C. Baird, G. J. Meyers, C. R. Darnall, J. S. Hu, *Am. Fam. Physician.* **97** (2018) 261-268.
10. V. M. Chia, S. M. Quraishi, S. S. Devesa, M. P. Purdue, M. B. Cook, K. A. McGlynn, *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* **19** (2010) 1151–1159.
11. N. Sincic, T. Kulis, A. Znaor, F. Bray, *Cancer Epidemiol.* **36** (2012) 11–15.
12. A. Znaor, C. van den Hurk, M. Primic-Zakelj, D. Agius, D. Coza, A. Demetriou, N. Dimitrova, S. Eser, H. Karakilinc, S. Zivkovic, F. Bray, J. W. Coebergh, *Eur. J. Cancer.* **49** (2013) 1683-1691.
13. M. Pollán, P. Gustavsson, M. I. Cano, *Annals of epidemiology.* **11** (2001) 554-62.
14. US EPA National Center for Environmental Assessment (2009). SEER cancer statistics review, 1975-2005.
15. A. Colli, M. Fraquelli, G. Casazza, S. Massironi, A. Colucci, D. Conte, P. Duca, *Am. J. Gastroenterol.* **101** (2006) 513–523.
16. H. S. Kim, H. E. Lee, H-K. Yang, W. H. Kim, *Pathobiology* **81** (2014) 78–85.

17. J. M. Trigo, J. M. Tabernero, L. Paz-Ares, J. L. García-Llano, J. Mora, P. Lianes, *Cancer* **88** (2000) 162–168.
18. D. Schottenfeld, M. E. Warshauer, S. Sherlock, A. G. Zauber, M. Leder, R. Payne, *Am. J. Epidemiol.* **112** (1980) 232–246.
19. A. J. Swerdlow, C. D. Higgins, M. C. Pike, *BMJ* **314** (1997) 1507–1507.
20. M.S. Monteiro, M. Carvalho, M. L. Bastos, P. Guedes de Pinho, *Curr. Med.Chem.* **20** (2013) 257-271.
21. M. Monteiro, M. Carvalho, R. Henrique, C. Jerónimo, N. Moreira, M. de Lourdes Bastos, P. Guedes de Pinho, *Europ. J. Cancer* **50** (2014) 1993– 2002.
22. E. G. Armitage, C. Barbas, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **87** (2013) 1-11.
23. G. A. N. Gowda, D. Djukovic, *Methods Mol. Biol.* **1198** (2014) 3-12.
24. J. L. Markley, R. Bruschweiler, A. S. Edison, H. R. Eghbalnia1, R. Powers, D. Raftery, D. S. Wishart, *Curr. Opin. Biotechnol.* **43** (2017) 34–40.
25. A. Zhang, H. Sun, P. Wang, Y. Han, X. Wang, *Analyst* **137** (2012) 293-300.
26. N. Galić, V. Drevenkar, *Kromatografija*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2006.
27. M. G. Vander Heiden, *Nat. Rev. Drug Discov.* **10** (2011) 671-684.
28. J-W. Kim, C. V. Dang, *Cancer Res* **66** (2006) 8927-8930.
29. C. Di Natale, A. Macagnano, E. Martinelli, R. Paolesse, G. D’Arcangelo, C. Roscioni, A. Finazzi-Agro, A. D’Amico, *Biosens. Bioelectron.* **18** (2003) 1209-1218.
30. X. Jin, S. Joong Yun, P. Jeong, I. Yi Kim, W-J. Kim, S. Park, *Oncotarget* **5** (2014) 1635-1645.
31. H. M. Woo, K. M. Kim, M. H. Choi, B. H. Jung, J. Lee, G. Kong, S. J. Nam, S. Kim, S. W. Bai, B. C. Chung, *Clin. Chim. Acta* **400** (2009) 63–69.
32. H. Nam, B. C. Chung, Y. Kim, K. Lee, D. Lee, *Bioinformatics* **25** (2009) 3151–3157.
33. A. Jurič, *Korištenje plinske kromatografije sa spektrometrijom masa u analizi meda obične planike*, Seminarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
34. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, str. 78-89.
35. N. Galić, *Spektrometrija masa*, Interna skripta, Zavod za analitičku kemiju, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2016.

36. T. Živković Semren, I. Brčić Karačonji, T. Safner, N. Brajenović, B. Tariba Lovaković, A. Pizent, *Talanta* **176** (2018) 537–543.
37. Y. Hanai, K. Shimono, K. Matsumra, A. Vachani, S. Albelda, K. Yamazaki, G. K. Beauchamp, H. Oka, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76** (2012) 679-684.
38. M. Monteiro, N. Moreira, J. Pinto, A. S. Pires-Luis, R. Henrique, C. Jerónimo, M. de Lourdes Bastos, A. M. Gil, M. Carvalho, P. Guedesde Pinho, *J. Cell. Mol. Med.* **20** (2017) 1-14.
39. H. Wua, R. Xuea, L. Donga, T. Liua, C. Dengb, H. Zengc, X. Shen, *Analyt. Chim. Acta* **648** (2009) 98–104.
40. S. Naz, M. Vallejo, A. García, C. Barbas, *J. Chromatogr. A* **1353** (2014) 99-105.
41. T. Khalid, R. Aggio, P. White, B. D. L. Costello, R. Persad, H. Al-Kateb, P. Jones, C. S. Probert, N. Ratcliffe, *PLoS One* **10** (2015) e0143283.
42. C. L. Silva, M. Passos, J.S. Câmara, *Br. J. Cancer* **105** (2011), 1894 – 1904.
43. A. Jiménez-Pacheco, M. Salinero-Bachiller, M. C. Iribar, A. López-Luque, J. L. Miján-Ortiz, J. M. Peinado, *Urol. Oncol.* **36** (2018) 243.e21-243.e27.
44. R. Cozzolino, B. De Giulio, P. Marena, A. Martignetti, K. Günther, F. Lauria, P. Russo, M. Stocchero, A. Siani, *Sci. Rep.* **7** (2017) 1-13.
45. R. P. Arasaradnam, M. J. McFarlane, C. Ryan-Fisher, E. Westenbrink, P. Hodges, M. G. Thomas, S. Chambers, N. O’Connell, C. Bailey, C. Harmston, C. U. Nwokolo, K. D. Bardhan, J. A. Covington, *PLoS One* **9** (2014) 1-6.
46. P. Mochalski, K. Unterkoflera, *Analyst* **141** (2016) 4796–4803.
47. B. de Lacy Costello, A. Amann, H. Al-Kateb, C. Flynn, W. Filipiak, T. Khalid, D. Osborne, N. M. Ratcliffe, *J. Breath Res.* **8** (2014) 1-29.
48. W. Struck-Lewicka, M. Kordalewska, R. Bujak, A. Y. Mpanga, M. Markuszewski, J. Jacyna, M. Matuszewski, R. Kaliszan, M. J. Markuszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **111** (2015) 351-361.
49. S. M. Rocha, M. Caldeira, J. Carrola, M. Santos, N. Cruz, I. F. Duarte, *J. Chromatogr. A* **1252** (2012) 155-163.
50. H. Wu, R. Xue, C. Lu, C. Deng, T. Liu, H. Zeng, Q. Wang, X. Shen, *J. Chromatogr. B*, **877** (2009) 3111-3117.
51. G. Lubes, M. Goodarzi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **147** (2018) 313-322.

52. A. Amann, B. de Lacy Costello, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby, *J. Breath Res.* **8** (2014) 1-17.
53. G. A. Mills, V. Walker, *J. Chromatograp. B*, **753** (2001) 259–268.
54. M. Raman, I. Ahmed, P. M. Gillevet, C. S. Probert, N. M. Ratcliffe, S. Smith, R. Greenwood, M. Sikaroodi, V. Lam, P. Crotty, J. Bailey, R. P. Myers, K. P. Rioux, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **11** (2013) 868-875.
55. V. De Preter, K. Machiels, M. Joossens, I. Arijs, C. Matthys, S. Vermeire, P. Rutgeerts, K. Verbeke, *Gut.* **64** (2015) 447-458.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Ana Babić

Datum rođenja: 12. veljače 1993.

Mjesto rođenja: Sisak

Obrazovanje

1999–2007	Osnovna škola Braća Ribar Sisak, Sisak
2007–2011	Tehnička škola Sisak, Sisak
2013–2016	Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
2016–2019	Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2016	Simpozij studenata kemičara, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2017	Otvoreni dan kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2018	Sajam ideja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu