Primjena GC-MS u istraživanju raka

Pranjić, Jozo

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:732185

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PRIMJENA GC-MS U ISTRAŽIVANJU RAKA

ZAVRŠNI RAD

JOZO PRANJIĆ

Matični broj:376

Split, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE

PRIMJENA GC-MS U ISTRAŽIVANJU RAKA

ZAVRŠNI RAD

JOZO PRANJIĆ

Matični broj:376

Split, rujan 2020.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY IN CHEMISTRY

USE OF GC-MS IN RESEARCH OF CANCER

BACHELOR THESIS

JOZO PRANJIĆ

Parent number:376

Split, September 2020.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Preddiplomski studij kemije

Znanstveno područje: prirodne znanosti
Znanstveno polje: kemija
Tema rada je prihvaćena na 28. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko- tehnološkog fakulteta
Mentor: izv.prof. dr. sc. Mila Radan

PRIMJENA GC-MS U ISTRAŽIVANJU RAKA

Jozo Pranjić, 376

Sažetak:

Rak je novotvorina za koju je karakteristična nekontrolirana dioba stanica. Može biti zloćudni ili dobroćudni. Zbog brzog širenja jako je teško na vrijeme otkriti i liječiti ljude oboljele od ove bolesti. Tijekom povijesti su razvijene različite kliničke metode za istraživanje i detektiranje tumorskih bolesti, no ni jedna od razvijenih metoda se ne može iskoristiti za dugoročno liječenje i zaustavljanje bolesti. U svrhu ranijeg otkrivanja i sprječavanja bolest razvija se istraživanje biomarkera. Biomarkeri ili tumorski biljezi su biološke molekule koje ukazuju na normalne ili abnormalne procese u ljudskom tijelu, ili na prisustvo neke bolesti, kao što je rak. Zbog toga je u istraživanju raka sve više u uporabi GC-MS tehnika. Ova metoda koristi različita tkiva i tekućine iz ljudskog organizma u svrhu otkrivanja biomarkera. GC-MS tehnika sastoji se od uređaja za plinsku kromatografiju, koji služi za razdvajanja komponenti iz uzorka, i masenog spektrometra, koji služi kao detektor za identifikaciju odvojenih komponenti. Uporabom ove tehnike otkriven je velik broj molekula koje mogu poslužiti kao biomarkeri, tj. Koje se mogu iskoristiti za pravovremeno otkrivanje raka i kvalitetno praćenje razvijanja bolesti.

Ključne riječi: tumor, GC-MS, biomarkeri, rak

Red sadrži: 20 stranica, 6 slika, 2 tablice, 34 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva za obranu:

1.prof.dr.sc.Ivica Blažević
2.dr.sc.Ivana Carev
3.izv.prof.dr.sc.Mila Radan

Datum obrane:24.09.2020.

Rad je u tiskanom i elektroničnom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Teslina 10 (Ruđera Boškovića 33).

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Techology Split

Undergraduate study in Chemistry

Scientific area: Natural Sciences

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology session no.28

Mentor: izv.prof. dr. sc. Mila Radan

USE OF GC-MS IN RESEARCH OF CANCER

Jozo Pranjić,376

Abstract:

Cancer is a neoplasm which is classified by abnormal cell growth. Cancer can be malign or benign. Because it spreads very fast, it is very difficult to discover this disease and curing people who have cancer. Throughout history variosu clinical methods were developed for the research and detection of tumor diseases, but none of the methods can be used for long term treatment and for stopping the disease. In purpose of early detection and prevention of the disease, the research of biomarkers is developing. Biomarkers or tumor markers are biomolecules which indicate normal and abnormal processes in the human body, or a disease, such as cancer. Because of that the GC-MS tehnique is nowadays more used. This tehnique uses differnt types of tissues and liquids from the human body for the detection of biomarkers. The GC-MS tehnique is composed of the device for gas cromatography, which is used for separation of components from the sample, and the device for mass spectrometry, which is used for the identification of the separated components. By the use of this tehnique a great amont of molecules have been discovered, which can be used as biomarkers, in other words, which can be used in the early detection of cancer and quality tracking of the developing of the disease**.**

Keywords:tumor,GC-MS, biomarkers(VOMs),cancer

Thesis contains: 20 pages, 6 pictures,2 tables, 34 literature refferences

Original in Croatian

Defense committee:

1.prof.dr.sc.Ivica Blažević ,assistant prof., chair person

2..Ivana Carev, phD, member

3Mila Radan, assistant prof.,supervisor

Defense date: 24.09.2020.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is developed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Teslina 10 (Ruđera Boškoviča 33)

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv.prof. dr. sc. Mile Radan, u razdoblju od lipnja 2020. do rujna 2020.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Istražiti mogućnosti upotrebe GC-MS metode u istraživanju tumorskih bolesti te prikazati dosadašnje rezultate korištenja već spomenute metode.

Zahvala

Veliku zahvalnost, u prvom redu moram dati, mentorici izv.prof.dr.sc. Mila Radan na savjetima i pomoći prilikom izrade ovog završnog rada. Također se zahvaljujem svojoj cijeloj obitelji, prijateljima, a posebno roditeljima na razumijevanju i potpori tijekom cijelog mog studiranja.

SAŽETAK

Rak je novotvorina za koju je karakteristična nekontrolirana dioba stanica. Može biti zloćudni ili dobroćudni. Zbog brzog širenja jako je teško na vrijeme otkriti i liječiti ljude oboljele od ove bolesti. Tijekom povijesti su razvijene različite kliničke metode za istraživanje i detektiranje tumorskih bolesti, no ni jedna od razvijenih metoda se ne može iskoristiti za dugoročno liječenje i zaustavljanje bolesti. U svrhu ranijeg otkrivanja i sprječavanja bolest razvija se istraživanje biomarkera. Biomarkeri ili tumorski biljezi su biološke molekule koje ukazuju na normalne ili abnormalne procese u ljudskom tijelu, ili na prisustvo neke bolesti, kao što je rak. Zbog toga je u istraživanju raka sve više u uporabi GC-MS tehnika. Ova tehnika koristi različita tkiva i tekućine iz ljudskog organizma u svrhu otkrivanja biomarkera. GC-MS tehnika sastoji se od uređaja za plinsku kromatografiju, koji služi za razdvajanja komponenti iz uzorka, i masenog spektrometra, koji služi kao detektor za identifikaciju odvojenih komponenti. Uporabom ove tehnike otkriven je velik broj molekula koje mogu poslužiti kao biomarkeri, tj. koje se mogu iskoristiti za pravovremeno otkrivanje raka i kvalitetno praćenje razvijanja bolesti.

Ključne riječi: tumor, GC-MS, biomarkeri, rak

Abstract

Cancer is a neoplasm which is classified by abnormal cell growth. Cancer can be malign or benign. Because it spreads very fast, it is very difficult to discover this disease and curing people who have cancer. Throughout history variosu clinical methods were developed for the research and detection of tumor diseases, but none of the methods can be used for long term treatment and for stopping the disease. In purpose of early detection and prevention of the disease, the research of biomarkers is developing. Biomarkers or tumor markers are biomolecules which indicate normal and abnormal processes in the human body, or a disease, such as cancer. Because of that the GC-MS tehnique is nowadays more used. This tehnique uses differnt types of tissues and liquids from the human body for the detection of biomarkers. The GC-MS tehnique is composed of the device for gas cromatography, which is used for separation of components from the sample, and the device for mass spectrometry, which is used for the identification of the separated components. By the use of this tehnique a great amont of molecules have been discovered, which can be used as biomarkers, in other words, which can be used in the early detection of cancer and quality tracking of the developing of the disease.

Keywords:tumor,GC-MS, biomarkers(VOMs),cancer

SADRŽAJ

UVOD 1
1. TUMORI ILI NOVOTVORINE 2
1.1 Osnovne karakteristike tumora 4
1.2. Dijagnoza i istraživanje tumora 5
1.2.1. Osnovne metode i tehnike u istraživanju raka 5
2. METABOLIZAM STANICA RAKA 6
2.1. Biomarkeri ili tumorski biljezi 7
2.1.1 Detektiranje novih biomarkera 9
3. GC-MS METODA 9
3.1 Plinska kromatografija 9
3.1.1. Uređaj za plinsku kromatografiju 10
3.2. Masena spektrometrija 12
3.3. GC-MS 13
4. ISTRAŽIVANJA RAKA PROVEDENA GC-MS TEHNIKOM 15
4.1. Metaboliti otkriveni u ljudskom dahu 16
4.2. Metaboliti otkriveni u tkivu 17
4.3. Metaboliti otkriveni u tjelesnim tekućinama 18
4.4.Cerumenogram 19
ZAKLJUČAK 20
LITERATURA 21

UVOD

Rak je bolest karakterizirana abnormalnim rastom stanica, koje prolaze kroz i razaraju tkiva i organe i na taj način se mogu proširiti po cijelom organizmu. Jedan od tri smrtnih slučajeva u svijetu uzrokovan je rakom. Učestalost raka kod ljudi ovisna je o više faktora, kao što su starost, životne navike, hormoni i izloženost različitim kancerogenima iz okoliša.(1)

Zbog velikog broja faktora koji uzrokuju rak kao i velike smrtnosti potrebno je što žurnije razviti metodu za što ranije otkrivanje bolesti. U kliničkoj praksi velik broj testova se temelji na vrsti raka na koju se sumnja, kao na primjer biopsija, citologija i krvni test. Ovi testovi su ograničeni i često koriste bolne i invazivne metode, štoviše mnoge vrste raka se ne mogu otkriti ovim testovima. Postojeće neinvazivne metode kao što su računalna tomografija i magnetna rezonancija su povezane sa visokom stopom lažnih pozitivnih testova i zbog izlaganja radijaciji mogu biti štetni za ljudski organizam. S vremenom su stvoreni alternativni pristupi za dijagnozu raka koji uključuju otkrivanje biomarkera korištenjem analitičkih metoda. Međutim, otkrivanje biomarkera za uspostavljane kliničke dijagnoze raka u ranoj fazi povezana je sa invazivnim metodama. Zbog toga su mnogi istraživači svoju pažnju posvetili razvoju neinvazivne metode za kliničku dijagnozu raka, što je dovelo do razvoja proučavanja hlapljivih organskih komponenti(VOMs- *eng*.volatile organic metabolites), koje se mogu naći u ljudskoj i životinjskoj bio matrici. Hlapljive organske molekule su dio područja metabolizma koji se mogu iskoristiti u dijagnozi različitih vrsta bolesti. Hlapljive organske komponente su termostabilne molekule različitih temperatura vrelišta. Postoje endogene i egzogene hlapljive organske komponente. Endogene su cilj u istraživanjima za uspostavu novih dijagnoza, zbog toga što su proizvedene od strane reaktivnih oksidacijskih vrsta i slobodnih radikala u mitohondrijima za vrijeme nekog oksidacijskog procesa. Ove reaktivne oksidacijske vrste razaraju različite vrste molekula, pri čemu nastaju hlapljive organske molekule. Nastajanje reaktivnih oksidacijskih vrsta u stanici je povezano sa različitim kliničkim stanjima, primjerice tumorskim bolestima. Različite količine produkata reaktivnih oksidacijskih vrsta su

pronađene u različitim ljudskim bio matricama kao što su krv, urin, izmet , suze i ušna smola. Identifikacija hlapljivih organskih molekula kao biomarkera je jako važna kako bi se omogućila što brža i lakša klinička dijagnoza neke tumorske bolesti. Zbog toga je potrebno istražiti i razviti metodu koja će napraviti najbolje i najvjerodostojnije rezultate. Različite analitičke metode se mogu koristiti u otkrivanju biomarkera. Pošto većina biomarkera, koji su povezani s tumorskim bolestima, pokazuju hidrofilne osobine, koristi se metoda koja može te hidrofilne molekule najbrže i najsigurnije identificirati. Plinska ili tekućinska kromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom se pokazala kao najmoćnija metoda u otkrivanju novih biomarkera.

1. TUMORI ILI NOVOTVORINE

Tumori su patološke tvorbe koje nastaju kao posljedica prekomjerne proliferacije izmijenjenih stanica. Javljaju se zbog djelovanja vanjskih i unutrašnjih faktora, a nastaju zbog gubitka regulacije kontrolnih mehanizama rasta stanice. Proces tijekom koga dolazi do prelaska normalne stanice u tumorsku stanicu naziva se neoplastična pretvorba. Dolazi do kromosomskih promjena koje se nalaze u svim tumorskim stanicama pa se pretpostavlja da su se razvile iz jedne matične tumorske stanice koja se razlikuje od normalne stance. Pojava raka u određenoj populaciji varira s vremenskim razdobljem, geografskim položajem, spolom i dobi. Prema kliničkoj klasifikaciji dijele se na benigne i maligne, odnosno prema agresivnosti rasta. Benigni ili dobroćudni tumor raste polagano u organu u kojem je nastao i ne ugrožava bitno zdravlje čovjeka. Građeni su od diferenciranih stanica koje nalikuju na stanice organa u kojem je tumor nastao. Maligni ili zloćudni tumori rastu mnogo brže od benignih i pri tom razaraju okolno tkivo. Za zloćudne tumore koji su opasni za život rabi se naziv rak. Zloćudni tumori se limfom i krvlju može prenositi u ostala tkiva. Taj način širenja se naziva metastaziranje.(2)

OBILJEŽJA	**DOBROĆUDNI**	**ZLOĆUDNI**
Makroskopska		
čahura	prava čahura	pseudočahura
rekroza	rijetko	često

ulceracija	rijetko	često
Mikroskopska		
atipija	oskudna	izrazita
piemorfizam	oskudan	izrazit
mitoze	rijetke	brojne, često patološke
omjer jezgra/citoplazma	normalan	povećan
jezgrice	neuočljive	uočljiv
Rast		
način rasta	ekspanzivan	infilterativan
brzina rasta	polagano	polagano ili izrazito brzo
lokalna invazija	ne	da
Metastaze	ne	često prisutne

Tablica1. Razlike između benignog i malignog tumora. (1)

Osim kliničke klasifikacije postoji još:

- Morfološka klasifikacija- na osnovu makroskopskog pregleda vizualni pregled bez posebnih pomagala) tumori se dijele na makroskopski vidljive i makroskopski neuočljive tvorbe. Primjerice, većina se tumora može uočiti takvim pregledom, dok se leukemija može utvrditi tek nakon mikroskopskog pregleda krvi.
- Histogenetska klasifikacija- na osnovu tkivnog podrijetla tumora. Prema toj kvalifikaciji tumori se dijele na epitelne, mezenhimalne, tumore živčanih stanica, spolnih stanica i dr.
- Etiološka klasifikacija tumora- prema ovoj podjeli tumori mogu biti genetski uvjetovani, uzrokovani kemijskim ili fizikalnim kancerogenima (tvar ili smjesa tvari koja uzrokuje rak ili povećava šansu za pojavu raka) i, tumori uzrokovani virusima.(1)

1.1 Osnovne karakteristike tumora

Rast tumora nema nikakve biološke svrhe. Tumorske stanice nisu korisne organizmu i u većini slučajeva mogu biti štetne. Njihov rast je neovisan o fiziološkim kontrolnim mehanizmima organizma. Abnormalno reagiraju na stimulaciju hormonima, čimbenike rasta i druge biološke tvari iz krvi. Jedna od glavnih osobina tumorskih stanica je poremećaj u putevima stanične smrti. (1)

Mnoge tumorske stanice su otporne na apoptozu (programirana smrt stanice uzrokovana različitim fiziološkim proceima ili zbog nekog patološkog oštećenja pri čemu tkiva i organi održavaju svoj normalan obujam).(3)

Novotvorine se ponašaju poput parazita. Iz krvotoka uzimaju hranjive tvari, hormone, kisik i druge tvari koje su potrebne za život. Rastu nepravilno i neorganizirano, zbog čega ne stvaraju tkiva i organe. Vrlo često ne diferenciraju u zrele stanice zbog čega se nazivaju i nediferenciranim ili atipičnim stanicama. Dijele se brže od normalnih stanica i zbog toga imaju brži metabolizam. Rast kod normalnih stanica ovisi o pristupnosti odgovarajućih faktora rasta koji dolaze najčešće iz seruma i kad oni nisu raspoloživi stanica ulazi u fazu mirovanja G_0. Za razliku od njih tumorske stanice nastavljaju proliferaciju i ne ulaze u G_0 fazu, a u nekim slučajevima tumorske stanice same sebi proizvode faktore rasta. Tumorske stanice također slabije adheriraju s drugim stanicama ili s matriksom. Često je uzrok tome smanjena ekspresija adhezijskih molekula na površini tumorske stanice što omogućava lakše širenje tumorskih stanica. Tumorske stanice proizvode litičke enzime koji razaraju kolagen i bazalnu membranu matriksa što omogućuje prolazak tumorskih stanica kroz matriks. Razaranjem i prolaskom kroz matriks tumorske stanice mogu ući u krvožilni ili limfni sustav i proširiti se u ostala tkiva i organe (tj. Metastazirati) .Mogućnost metastaziranja imaju samo zloćudni tumori koji mogu preživjeti u nepovoljnim uvjetima uz pomoć anaerobne glikolize i tako sebi osigurati dovoljno energije za daljnji rast i razvoj. Tumorske stanice također proizvode više proteina za rast nego za izvanstanični transport. Sva ova svojstva i karakteristike tumorskih stanica uvjetuju učinkovito širenje , teško liječenje i sprječavanje smrti osoba oboljelih od raka. (1)

1.2. Dijagnoza i istraživanje tumora

Tumorske bolesti su drugi uzrok smrtnosti u svijetu odmah iza kardiovaskularnih bolesti. Za njihovo liječenje je najvažnije što ranije otkrivanje. Danas još ne postoji neka laboratorijska ili druga dijagnostička metoda koja bi na vrijeme i jasno pokazala boluje li određena osoba od neke tumorske bolesti. U dijagnozi raka sudjeluje velik broj medicinskih stručnjaka od kirurga, interventnih kardiologa i radiologa koji izvode biopsiju, do patologa koji proučavaju uzorak pod mikroskopom ili nekim drugim kemijskim načinom (PCR metodom) .(1)

Biopsija je medicinska metoda uzimanja uzorka tkiva ili stanica u svrhu otkrivanja istraživanja i određivanja različitih bolesti. Najčešće se koristi na osobama kod kojih se sumnja na tumorsku bolest. Patološko ispitivanje uzorka tkiva uzetog biopsijom obuhvaća mikroskopsku procjenu da li se radi o benignom ili malignom tumoru. Zatim da li se proširio ili postoji daljnja mogućnost širenja. Uzorak mora biti postavljen u alkohol kako nebi došlo do raspada uslijed djelovanja bakterija. Zbog različitih nedostataka mikroskopska dijagnoza često nije dovoljna te se pristupa drugim dijagnostičkim metodama , poput biokemijskih, imunohistokemijskih, molekularnih tehnika i sl.(4)

1.2.1. Osnovne metode i tehnike u istraživanju raka

Rutinske imunohistokemijske metode rabe se za:

- Klasifikaciju zloćudnih tumora
- Određivanja molekula važnih za prognozu i terapiju
- Potvrdu mikroskopske dijagnoze
- Klasifikaciju leukemija
- Određivanje primarnog tumora

Danas se sve više primjenjuju i molekularne tehnike. One služe za određivanje dijagnoze zloćudnih tumora i za određivanje genetske predispozicije za određeni tumor. Od

biokemijskih metoda najvažnije je praćenje tumorskih biljega (biomarkera) . Biomarkere proizvode sami tumori ili organizam kao odgovor na tumor. Koriste se za potvrdu bolesti i za praćenje oporavka bolesnika. Ako je biomarker još uvijek prisutan nakon operacije uklanjanja tumora poveća koncentracija tumorskih biljega to je znak da tumor nije kirurški u potpunosti uklonjen ili postoje metastaze.(1)

Konvencionalnom radiologija- prave se snimke za utvrđivanje točnog položaja tumora. (5)

Ultrazvučna dijagnostika (ehosonografija) - temelji se na tome da određeni materijali unutar električnog polja emitiraju ultrazvučne valove. Koristi se za analizu stijenke cjevastih organa i biopsije vođene ultrazvukom. (5)

Scintigrafija (nuklearno medicinska dijagnostika) - temelji se na tome da određeni organi mogu apsorbirati radiofarmak. Radiofarmak je spoj nekog radioizotopa i njime obilježenog nosača. Koristi se u otkrivanju tumora jetre , limfoma, tumora štitnjače i dr. (5)

Magnetna rezonancija (MRI) - noviji je dijagnostički postupak. Organ se postavi u magnetno polje i primjenom radio valova dolazi do pojave signala koji se pomoću računalnih programa pretvara u sliku. Služi pri određivanju položaja tumora, raširenosti, granice zdravog i bolesnog tkiva i naravi tumora. Najčešće se koristi u dijagnozi tumora mozga i tumora kostiju. Negativna strana je nemogućnost korištenja pri postojanju metalnih materijala u organizmu . (5)

Računalna tomografija (CT) - prikazuje presjek tijela pomoću računalne obrade. Koristi rotirajući rendgenski snop za stvaranje slike i prema tome daje informacije o položaju, veličini i odnosu tumora s okolnim strukturama.(5)

2. METABOLIZAM STANICA RAKA

U normalnim stanicama kisik inhibira glikolizu, iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule piruvata uz nastanak 2 ATP-a. Zatim molekula piruvata prelazi u molekulu acetil-koenzim A, koja ulazi u ciklus limunske kiseline pri čemu ukupno nastaje 38 molekula ATP-a. Stanice raka ne koriste glukozu tako efikasno. Umjesto piruvata

stvaraju laktat. Ovaj alternativni metabolički put koristi se kao primarna meta pri tretiranju kemoterapijom. U stanicama raka glavni izvor energije, odnosno ATP-a su kao i u normalnim stanicama mitohondriji, dok glikoliza proizvodi 17% od ukupnog ATP-a. Jedna od glavnih funkcija mitohondrija je ciklus limunske kiseline. Za razliku od normalnih stanica gdje je ciklus limunske kiseline povezan sa glikolitičkim putem, u stanicama raka nema povezanosti.(1)

Piruvat dehidrogenaza (PDH) je enzim koji omogućuje nastavak razgradnje glukoze u mitohondrije , a on je isključen u stanicama raka. Kako bi zaobišli inhibiciju PDH-a , mitohondriji se koriste alternativnim izvorom ugljika. Taj alternativni izvor je aminokiselina glutamin koja se nalazi u krvi i oni se mogu koristiti kao izvor energije u stanicama raka. Glukoza i glutamin služe normalnim stanicama i stanicama raka za energiju i proizvodnju aminokiselina, nukleinskih kiselina i lipida potrebnih za proliferaciju. Neke druge molekule, koje se pojavljuju u metabolizmu raka, se mogu koristiti kao biomarkeri. Na primjer, aminokiselina alanin ,koja nastaje transaminacijom piruvata, pronađena je u stanicama raka jetre i mozga. Povećana koncentracija nukleotida u urinu služi kao biomarker raka dojke, jetre i crijeva, jer se nukleotidi koji su nastali oksidacijskim raspadom DNA ne upotrebljavaju ponovo, već izlučuju.(6)

2.1. Biomarkeri ili tumorski biljezi

Biomarkeri su biološke molekule koje se mogu pronaći u krvi, drugim tjelesnim tekućinama i tkivima, a koje ukazuju na normalne ili abnormalne procese u tijelu, ili na prisustvo neke bolesti, kao na primjer raka. Postoji ogroman broj biomarkera, kao što su proteini, nukleinske kiseline, antitijela i dr. . Biomarkeri mogu biti i kolekcija promjena različitih ekspresija gena i metaboličkih potpisa. Biomarkeri se mogu pronaći u cijeloj krvi, serumu i u plazmi, sekretu, urinu i u tkivu. Prisutni su kao antigeni na površini stanica koje proizvodi tumorska stanica, a zatim se otpuštaju u krv. Koriste se kod dijagnoze zloćudnih tumora, procjene rizika oboljenja, razlikovanja zloćudnih od dobroćudnih oboljenja, procjene razvoja bolesti kod osoba kod kojih je dijagnosticiran rak i za praćenje tijeka bolesti. Transformacija obične stanice u stanicu raka je praćena različitim metaboličkim reakcijama. Identifikacija tih produkata na početku bolesti povećava šansu da će oboljeli preživjeti. Takve metaboličke promjene u stanici uzrokuju

lučenje molekula koje služe kao biomarkeri. Neki biomarkeri su specifični za samo jednu upotrebu, a drugi se mogu koristiti za više od jedne. Pomoću biomarkera se može odrediti koliki je rizik od oboljenja za određenu osobu. Kao na primjer, kod žene koja u obitelji ima povijest oboljenja od raka dojke ili maternice postoji mogućnost genetske pretrage u svrhu otkrivanja nosača BRCA1, koji povećava rizik za oboljenje od raka dojke ili maternice.Kod pacijenata koji imaju rak, biomarkeri mogu poslužiti za procjenu bolesti i procjenu vjerojatnoće vraćanja bolesti. Također mogu poslužiti za odabir terapije koja će najbolje suzbijati bolest, ali ta svrha je tek u razvoju. Različiti znanstveni radovi govore i o mogućnosti upotrebe biomarkera u procjeni reakcije tumora na kemoterapiju, no takva upotreba nije još dopuštena u kliničkoj analizi. Danas su u upotrebi razni biomarkeri.(6)

Naziv / Name		Benigna stanja / Benign conditions	Tumorska sijela / Tumour locations
Karcinoembrionalni antigen CEA / Carcinoembrional antigen CEA	Do 3,4 µg/L / Up to 3.4 µg/L	Pušači, ciroza jetre, polipi, hepatitis, bolesti pluća, ulcerozni kolitis / Smokers, liver cirrhosis, polyps, hepatitis, lung diseases, ulcerous colitis	Dojka, pluća, kolon, jajnik, grlo maternice / Breast, lung, colon, ovaries, uterine cervix
Ugljikohidratni antigen CA 15-3 / Carbohydrate antigen CA 15-3	Do 25 kIU/L / Up to 25 kIU/L	Upalne bolesti jetre, tbc, reumatske bolesti, mastopatija, fibroadenom, benigne bolesti pluća / Inflammatory liver diseases, tuberculosis, rheumatic diseases, mastopathia, fibroadenoma, benign lung diseases	Dojka, jajnik, endometrij, želudac, jetra, gušterača / Breast, ovaries, endometrium, gastric, liver, pancreas
Ugljikohidratni antigen CA 125 / Carbohydrate antigen CA 125	Do 35 kIU/L / Up to 35 kIU/L	Folikularna faza ciklusa, ciroza, hepatitis, endometrioza, ciste jajnika / Follicular phase of menstrual cycle, liver cirrhosis, hepatitis, endometriosis, ovarial cysts	Jajnik, dojka, maternica, endometrij, kolon, rektum, pluća / Ovaries, breast, uterus, endometrium, colon, rectum, lungs
Ugljikohidratni antigen CA 19-9 / Carbohydrate antigen CA 19-9	Do 39 kIU/L / Up to 39 kIU/L	Pankreatitis, kolecistitis, kolangitis, ciroza, hepatitis, cistična fibroza, neregulirani diabetes mellitus, plućne bolesti, hemodijaliza, pseudociste i ciste gušterače i drugih lokacija / Pancreatitis, cholecystitis, cholangitis, cirrhosis, cystic fibrosis, unregulated diabetes mellitus, lung diseases, haemodialysis, pancreatic cysts and pseudocysts	Gušterača i svi gastrointestinalni tumori s jetrenim metastazama / Pancreatic tumours and gastrointestinal tumours with liver metastases
Korionski gonadotropin HCG-beta-podjedinica / Chorionic gonadotropin HCG beta subunit		Trudnoća, hidatiformna mola / Pregnancy, hydatiform mole	Koriokarcinom / Choriocarcinoma
Alfa-fetoprotein αFP / Alpha-foetoprotein αFP	Do 13,6 µg/L / Up to 13.6 µg/L	Trudnoća, ciroza, hepatitis, fetus, novorođenče, dojenče / Pregnancy, cirrhosis, hepatitis, foetus, newborns, babies	Testis, jetra / Testis, liver

Tablica 2. Lista osnovnih kliničkih biomarkera (1)

Jedan od važnijih biomarkera je karcinoembrijski antigen (CEA) koji nastaje u normalnim embrionalnim tkivima, ali se njegovo prisustvo ne može dokazati kod zdravih osoba. Štiti stanične membrane malignih stanica. Njegova povećana vrijednost se pojavljuje kod osoba sa cirozom, Crohnovom bolešću, hepatitisom i pušača. Kod zloćudnih bolesti važan je u dijagnostici i praćenju ljudi s kolo rektalnim, karcinomom gušterače, dojke, želudca i drugih karcinoma. Drugi važan biomarker je α-fetoprotein (αFP) koji se stvara u fetalnoj dobi u jetri i probavnom sustavu, a nakon rođenja njegova koncentracija se smanjuje. Njegova povećana koncentracija se koristi kod praćenja ciroze jetre i hepatitisa. Kad je koncentracija αFP izrazito povišena, taj biomarker može poslužiti kao znak karcinoma zametnih stanica jajnika i karcinoma jetre.(7)

2.1.1 Detektiranje novih biomarkera

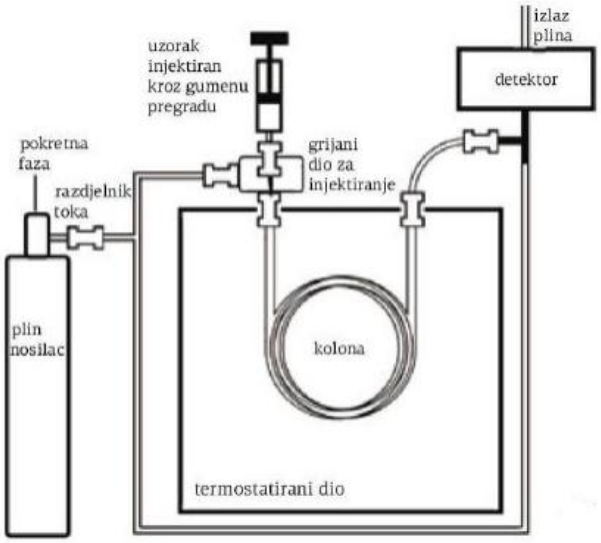
Postoji određen broj prepreka koje potencijalni biomarker mora proći da bi se mogao koristiti u medicini. Mora biti analitički ispravan , to jest mora proći testove specifičnosti, senzitivnosti i robusnosti. Biomarker mora biti visoko specifičan. Mora biti prisutan u oboljelih osoba, a ne smije se pojavljivati kod zdravih osoba. Također mora pokazivati visoku osjetljivost u ranoj fazi bolesti kad je u organizmu prisutan manji broj malignih stanica. Koncentracija biomarkera mora biti proporcionalna sa aktivnošću tumora. Također, mora biti specifičan za određeni organ. Tek tada se određeni biomarker može koristiti u medicinskoj dijagnostici.(6)

3. GC-MS METODA

3.1 Plinska kromatografija

U plinskoj kromatografiji nositelj ili pokretna faza je inertni plin, koji eluira sastojke iz smjese koji se nalaze u koloni napunjena stacionarnom fazom. Helij se najčešće upotrebljava kao mobilna faza u plinskoj kromatografiji. Postoje dvije vrste plinske kromatografije. Adsorpcijska kod koje je pokretna faza plin, a nepokretna čvrsta tvar velike specifične površine, na kojoj se adsorbiraju analizirani uzorci. Ona omogućuje razlučivanje plinovitih smjesa niske molekularne mase, a sastojci se odjeljuju na osnovu ravnoteže koja se uspostavlja između sastojka uzorka iz mobilne faze i čvrste stacionarne faze. Razdjelna kromatografija kod koje je pokretna faza također plin, a nepokretna faza je nehalapljiva tekućina koja je adsorpcijom ili kemijskim vezanjem vezana na čvrstom nosaču. Dvije osnovne uloge plinske kromatografije su odjeljivanje i analiza uzorka. Koristi se za kvalitativnu analizu, to jest za određivanje prisutnosti i odsutnosti sastojaka u nekoj smjesi i kvantitativnu, kojom se određuje količina određenog sastojka u smjesi.(8)

3.1.1. Uređaj za plinsku kromatografiju



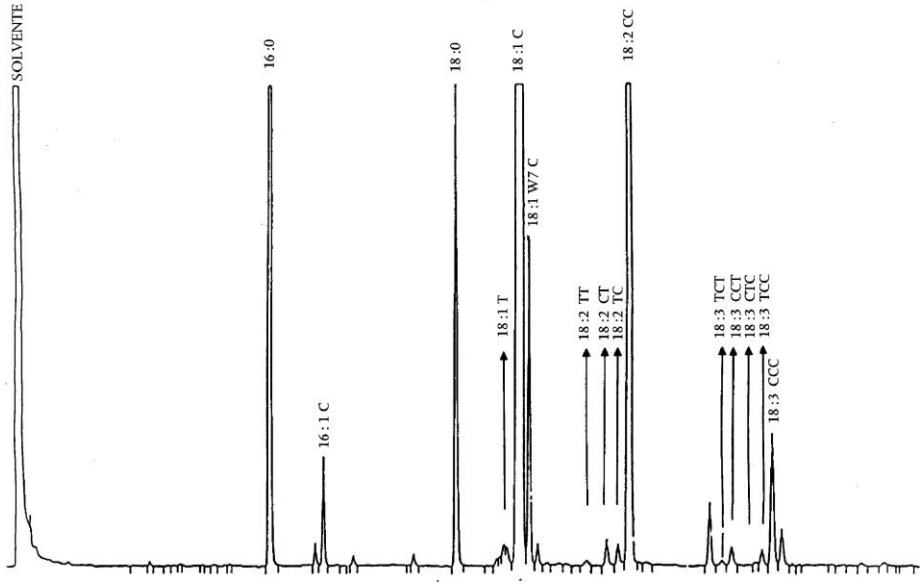
SLIKA 1. Shematski prikaz plinske kromatografije(8)

Početni dio uređaja za plinsku kromatografiju je injektor inertnog plina. Izbor inertnog plina nositelja ovisi o odabiru detektora. Injektor plina često sadrži različite mjerne uređaje, zatim regulatore tlaka te ponekad molekularna sita koja služe za uklanjanje vode i ostalih nečistoća. Injektor je zagrijan na višoj temperaturi od kromatografske kolone kako bi se omogućilo brzo uplinjavanje uzorka u injektoru i spriječila kondenzacija uzorka u detektoru. Sljedeći dio uređaja je sustav za uštrcavanje uzorka. U kolonu treba unijeti malu količinu uzorka, i to brzo. Za to se najčešće koristi mikrolitarska štrcaljka, koja je zagrijana 50 ˚C iznad temperature vrelišta najmanje hlapljiva sastojka, jer u suprotnom uzorak za vrijeme unošenja nebi ispario trenutno. Zatim slijedi kromatografska kolona koja može biti punjena ili kapilarna. Punjena kolona se sastoji od staklenih ili metalnih cijevi unutarnjeg promjera 2-4 mm u koje je postavljena stacionarna faza. Dok su kod kapilarnih kolona cijevi izrađene od različitih materijala, promjera < 30µm ispunjene tankim slojem stacionarne faze. Za pravilan rad kolona mora biti termostatirana, to jest njena temperatura se mora održavati u određenoj uskoj granici. Kolone služe za odjeljivanje sastojaka smjese. Kapilarne kolone su zbog svog manjeg promjera djelotvornije, ali su se zbog problema smanjenog kapaciteta uzorka, lomljivosti, i mogućnosti začepljenja masovno počele primjenjivati tek nekoliko zadnjih godina kad su ti problemi riješeni. (8)

Detektori koji se upotrebljavaju u plinskoj kromatografiji mogu biti:

- Detektori toplinske vodljivosti ili katarometri
- Plamenoionizacijski detektori
- Detektori apsorpcije elektrona
- Različiti spektroskopski ili elektroanalitički detektori

Analizom s detektorom komponente uzorka se mog kvalitativno i kvantitativno odrediti. Mjerenjem vremena zadržavanja (vrijeme koje je prošlo od injektiranja uzorka do vremena maksimalnog odziva za razmatranu kolonu) moguće je kvalitativno odrediti koji je spoj u pitanju, a površina ispod pika je kvantitativni signal jer je proporcionalna koncentraciji uzorka u smjesi.(9)



SLIKA 2. Primjer kromatograma(9)

3.2. Masena spektrometrija



SLIKA 3. Shematski prikaz masenog spektrometra(10)

Masena spektrometrija je jedna od najznačajnijih analitičkih metoda u svijetu. Za njenu uporabu potrebno je jako malo uzorka (10^{-3}g), a u kombinaciji sa plinskom kromatografijom još manje (10^{-6}g). Osnovni princip masenog spektrometra pri analizi nekog uzorka je stvaranje plinovitih iona tog uzorka, električnom ionizacijom.

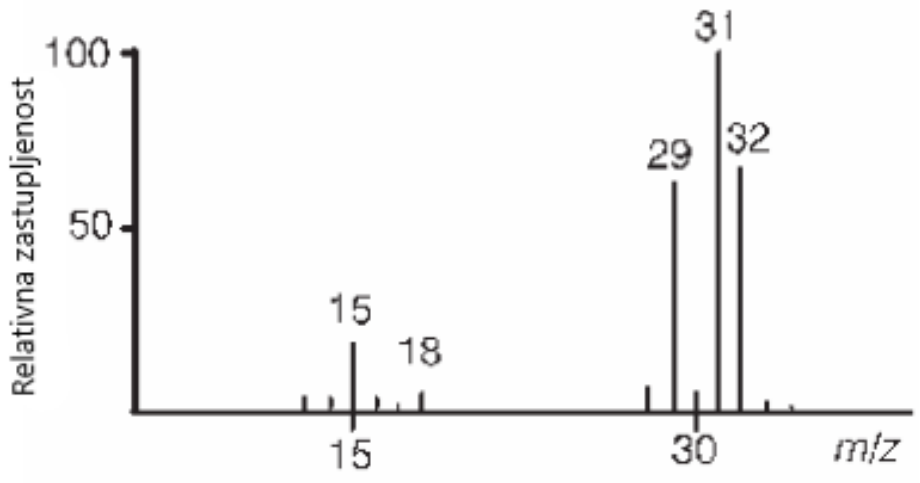
$$M + e^- \rightarrow M^{\bullet +} + 2e^-$$

Nastali pozitivni ioni dalje fragmentiraju u pozitivno nabijen kation i radikal.

$$M^{\bullet +} \rightarrow m_1^+ + m_2^{\bullet}$$

Ovi pozitivni ioni nastaju u ionizacijskoj koloni ,pri tlaku od 10^{-6}mm Hg, bombardiranjem snopom elektrona visoke energije što dovodi do izbacivanja elektrona iz molekule i nastajanja molekulskog iona.. Nastali pozitivni ioni ubrzavaju se pomoću negativno nabijenih ploča. Ubrzani pozitivni ioni ulaze u promjenjivo magnetno polje koje se nalazi u polukružnoj cijevi. Ovisno o svojoj masi i naboju fragmenti imaju različitu putanju. Veličina skretanja je obrnuto proporcionalna masi iona. Lakši

fragmenti skreću više. Fragmenti se skupljaju na kolektoru.Podaci odlaze u računalo, a rezultati se bilježe kao funkcija omjera mase i naboja iona i nastaje zapis. Zapis se naziva spektrogramom masa. (11)



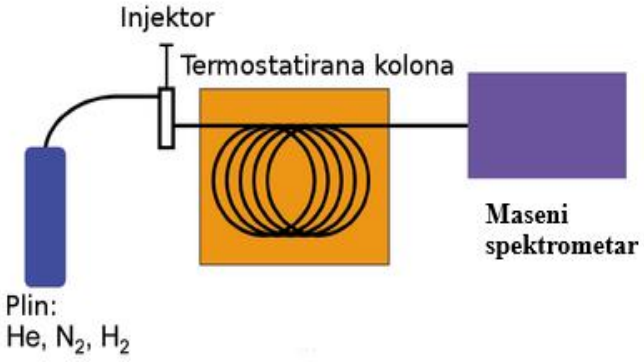
SLIKA 4. Primjer spektra masa (10)

Ordinata označuje relativnu zastupljenost, a apscisa omjer mase i naboja iona m/Z. Mnogi postojeći izdavački časopisi ordinatu masenog spektrometra označuju kao broj iona. Rezultati su prikazani u obliku vertikalnih linija gdje svaka linija označava ion s određenim omjerom mase i naboja, a visina linije označuje relativnu zastupljenost određenog iona u uzorku izraženu u postocima. Najviša linija na grafu ima vrijednost 100 i naziva se osnovnim signalom i prema njoj se mjere ostali signali. Podatci iz spektrograma masa se mogu koristiti za određivanje relativne molekulske mase nepoznatog spoja, postavljanje molekularne formule i određivanje određenih strukturnih elemenata nekog nepoznatog spoja.(10)

3.3. GC-MS

GC-MS je analitička metoda koja kombinira obilježja plinske kromatografije i masene spektrometrije za određivanje različitih tvari unutar nekog uzorka. Primjenu GC-MS metode uključuje otkrivanje droge, kriminalistička forenzika, istraživanja požara, istraživanja vezana za okoliš, medicinskoj dijagnostici. Može se iskoristiti za

identifikaciju tragova elemenata u materijalima za koje se smatra da su uništeni do neprepoznatljivosti. GC-MS se smatra " zlatnim standardom" za forenzičnu identifikaciju tvari jer pravi 100% specifične testove, koji pozitivno identificira da je tražena tvar sadržana u uzorku. Kada su spojene ove dvije komponente omogućuju mnogo finiju identifikaciju, nego kad su odvojene. Nemoguće je u potpunosti identificirat neku molekulu iz uzorka kada se ove dvije metode koriste zasebno. Masena spektrometrija zahtjeva jako čist uzorak, dok plinska kromatografija u sastavu sa nekim drugim detektorom ne može razlikovati dvije molekule koje imaju isto retencijsko vrijeme. Prvi GC-MS spoj načinjen je 1959. godine. S vremenom zbog razvoja sve manjih i bržih računala, došlo je do skraćivanja vremena koje je bilo potrebno analizu nekog uzorka.

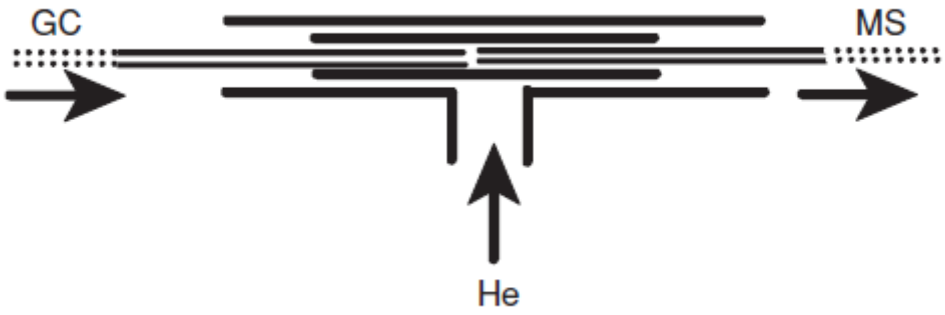


SLIKA 5. Shematski prikaz GC-MS(12)

GC-MS je sačinjen od dva osnovna dijela: uređaja za plinsku kromatografiju i masenog spektrometra. U dijelu kromatografije na osnovu različitog afiniteta sastojaka iz uzorka, koji su nošeni nekim inertnim plinom nosačem, dolazi do njihovog razdvajanja. Koriste se kapilarne kolone jer protok plina nosioca u njima ($1cm^3min^{-1}$) odgovora protoku kojeg može podnijeti maseni spektrometar. Punjene kolone imaju protok plina nosioca od $20cm^3min^{-1}$, što ne odgovara dopuštenim vrijednostima. Molekule se razdvajaju u koloni i izlaze iz nje u različitim vremenskim razmacima, što omogućuje odvojenu ionizaciju, ubrzanje i detekciju molekula iz uzorka.(13)

Uređaj za plinsku kromatografiju i masenu spektrometriju mogu biti povezana na dva načina i to: otvorenim spojem i direktnim spojem. Kod otvorenog spoja kromatografska kolona je spojena na cijev koja je u obliku slova T, koja sadrži manju cijev u sebi. Kroz unutarnju cijev prolazi kapilara od platine koja odvodi uzorak do spektrometra. Kapilara

se nalazi u vakuumu i zagrijava se kako nebi došlo do kondenzacije. Cijev T-oblika je zatvorena s obje strane, ali ne i zapečaćena kako bi se u njoj održavao tlak sličan atmosferskom. U istu cijev se uvodi helij kako bi se spriječila oksidacija sastojaka uzorka sa kisikom iz zraka. Ovakva vrsta spoja ne zahtijeva posebne uvjete, koristi se u normalnim uvjetima za plinsku kromatografiju i jednostavna je zamjena kolone.(11)



SLIKA 6. Shematski prikaz otvorenog spoja (11)

Kod direktnog spoja kapilara je direktno spojena s masenim spekrometrom preko seta vakuumski zatvorenih spojki. Zbog teškoća u zamjeni i potrebe za puno dužom kapilarom direktni spoj je manje korišten od otvorenog. GC-MS je postala snažna platforma za detekciju i istraživanje metabolita. Da bi se neki analit istraživao GC-MS metodom on mora biti hlapljiv i termostabilan pri temperaturi od 300 ˚CZbog različitosti biomarkera, najlakši način za njihovo istraživanje je podjela biomarkera u kategorije ovisno o tkivu ili organu gdje su detektirani.(11)

4. ISTRAŽIVANJA RAKA PROVEDENA GC-MS TEHNIKOM

Kao što je već spomenuto, određivanje biomarkera kompliciranа je dijelom što je rak jako heterogena bolest i ovisna je o tipu stanica u kojem se nalazi i proizvodi metabolite koji su slični metabolitim koje proizvode stanice iz drugih tkiva. Zbog toga je potrebno strože kliničko potvrđivanje markera. Napredak analitičkih metoda i u hardveru i softveru, stvorilo je oružje za istraživače pomoću kojeg mogu razlikovati metabolite proizvedene od strane normalnih stanica i od metabolita koje proizvode stanice raka. Jedna od takvih analitičkih metoda koja se može koristiti za analizu hlapljivih metabolita je plinska kromatografija spojena sa masenom spektrometrijom. Karakterizacija metabolita

povezanih s rakom postala je esencijalna za postavljana ključnih aspekata metabolizma tumorskih stanica.(14)

4.1. Metaboliti otkriveni u ljudskom dahu

Najopsežnija istraživanja u potrazi za hlapljivim organskim spojevima učinjena su na izdahnutom dahu, koji je povezan sa bolestima pluća. Rak pluća je ja jako agresivan i jedan je od glavnih uzročnika smrti u svijetu. Glavni razlog tolikoj smrtnosti je manjak kvalitetne metode za ranu detekciju bolesti. Više od 1000ppm (*eng.* parts per milion) hlapljivih organskih spojeva pronađeno je u ljudskom dahu.(14)

Istraživanjem 12 uzoraka uzetih od ljudi koji su bolovali od raka pluća te analizom nastalih GC-MS profila, detektirana su tri pika (aceton, metiletil keton, n-propanol).Svi metaboliti koji su pronađeni u izdahnutom zraku se mogu podijeliti u razrede i podrazrede. Na primjer, ugljikohidrati koji nastaju uglavnom peroksidacijom polinezasićenih masnih kiselina mogu se podijeliti u tri razreda: razgranate alkane, ravnolančane alkane i alkene. Alkoholi uglavnom nastaju uzimanjem hrane i piće te razgradnjom ugljikohidrata. Iz grupe alkohola, n-propanol i n-butanol su pronađeni u većim koncentracijama kod osoba oboljelih od raka pluća, nasuprot zdravim osobama. Aldehidi su najvažnija skupina metabolita pronađenih u dahu zbog svoje slabe topljivosti u krvi. Izbacuju se u samo nekoliko minuta nakon njihovog nastanka u tkivu. Glavni izvor aldehida u ljudskom tijelu je je redukcija hiperperoksida citokromom P450, a koji su nastali oksidacijom $\acute{\omega}_6$ i $\acute{\omega}_3$ masnih kiselina. Ostali izvori aldehida su iz metabolizma alkohola te unos dimom cigareta. Aldehidi nastali u organizmu se oksidiraju u karboksilne kiseline pomoću enzima aldehid dehidrogenaze(ALDH). Analizom aldehida uzoraka osoba oboljelih od raka pluća te uzoraka zdravih osoba pomoću GC-MS tehnike, utvrđeno je da su koncentracije aldehida povišene kod oboljelih osoba. Ovo istraživanje je pokazalo povezanost izdahnutih aldehida s rakom pluća, uključujući i prvi i drugi stadij bolesti. Za razliku od aldehida, ketoni se ne proizvode različitim mehanizmima. Njihov nastanak je usko vezan s oksidacijom masnih kiselina. Prema istraživanjima GC-MS metodom koncentracija ketona je bila veća kod osoba oboljelih od raka pluća, nego kod zdravih osoba. Od ostalih metabolita, s rakom pluća se mogu povezati aromatski spojevi te esteri. Esteri su uglavnom nastali raspadom lipida. Samo su butil acetat i etil acetat

uspješno povezani s rakom pluća, ali njihov odnos s bolešću još nije razjašnjen. Aromatske tvari,, kao što su toluen ili benzen, povezani su sa vanjskim izvorima, kao što su duhanski dim i zagađenost okoliša. Velika je povezanost raka pluća sa pušenjem . Razina aromatskih spojeva u dahu je povišena kod pušača i osoba oboljelih od raka pluća.(15)

4.2. Metaboliti otkriveni u tkivu

Provedeno je nekoliko istraživanja koja bi metabolite pronađene u tkivu povezalo s tumorskim bolestima. U slučaju, trbušnih i kolorektalnih tkiva problem čine mikroorganizmi koji također proizvode različite metabolite. Istraživanjem uzoraka tkiva debelog crijeva GC-MS metodom otkriveno je ukupno 18 metabolita. Sedam metabolita je pronađeno u uzorcima tkiva ljudi koji imaju rak debelog crijeva i u uzorcima zdravih ljudi. N-propanol i ugljikov disulfid su pronađeni u većim koncentracijama kod ljudi koji su oboljeli od raka debelog crijeva, a njihova prisutnost se pripisuje djelovanju bakterija iz crijeva. Također, pomoću GC-MS tehnike analizirano je tkivo iz predjela usta. Otkriveno je da su razine beta-alanina, triptofana i 3- hidroksiglutarata povećane kod osoba kod kojih su postojale kancerogene stanice u predjelu glave i vrata.(Još jedno tkivo koje stvara probleme pri ranoj dijagnozi bolesti je tkivo prostate. Rak prostate je drugi najčešći tip raka u svijetu i treći najčešći uzrok smrti kod muškaraca. Uzrok velike smrtnosti je nemogućnost ranog otkrivanja i nepostojanje kvalitetne metode za dijagnozu. Biomarker koji se koristi za detekciju ove vrste raka je prostatin specifični antigen, no on zbog svoje niske specifičnosti stvara velik broj lažno pozitivnih testova. Kroz prošlost provedena su mnoga istraživanja u sklopu potrage za biomarkerima koji bi omogućili rano otkrivanje raka prostate. Otkriveni su mnogi metaboliti koji bi se mogli koristiti i pomoću kojih bi se normalne stanice mogle razlikovati od stanica raka kao na primjer: sarkozin, kolin, glutamat, glicerol i dr..(14)

S druge strane rak dojke je glavni uzrok smrti kod osoba ženskog spola. Rano otkrivanje bi dovelo do velikog smanjenja smrtnosti. Od dijagnostičkih metoda danas se najviše rabi mamografija (rendgenska metoda pregleda krvi), ali pomoću nje se ne mogu otkriti sve vrste raka dojke. Studija koja je koristila NMR u kombinaciji sa GC-MS otkrila je 11 potencijalnih biomarkera u tkivu dojke za rano otkrivanje raka dojke.(16)

Drugo istraživanje sa GC-MS tehnikom je pokazalo mogućnost razlikovanja pacijenata sa benignim tumorom dojke od onih sa malignim tumorom. Otkriveno je da dolazi do metaboličkih promjena prilikom prijelaza iz benignog u maligno stanje. D-laktoza monohidrat je potencijalni biomarker za praćenje prijelaza iz benignog u maligno stanje.(17)

4.3. Metaboliti otkriveni u tjelesnim tekućinama

Analiza tjelesnih tekućina (krv, znoj, urin), u odnosu na ostale analize, sadržava mnoge prednosti. Uzimanje i pripremanje uzorka za analizu je mnogo lakše. Različiti uvjeti se mogu uzeti u obzir prilikom analize, kao što su temperatura uzorka, pH, ionski sastav itd., koji svi imaju utjecaj na rezultate analize. Još jedna prednost je ta da se hlapljivi organski spojevi prije otpuste u krv nego što se izdahnu. Prema tome, smatra se da će analize krvi GC-MS tehnikom predstavljati osnovni način za dijagnozu tumorskih bolesti.

GC-MS tehnikom uspoređeni su uzorci zdravih osoba s uzorcima osoba oboljelih raka. Primijećeno je da osobe oboljele od raka imaju specifičan metabolički profil. Tri metabolita su pronađena u nižim koncentracijama kod osoba oboljelih od raka (fenil-metilkarbamat, etilheksanol, 6-butil-2,2,9,9-tetrametil-3,5-dekadien-7-in). Kod osoba oboljelih od raka pluća pronađene su povećane koncentracije maltoze, aldoze te glutamata. Pomoću uzoraka krvi GC-MS metodom otkriveno je da se razina mnogih metabolita razlikuje kod osoba koji su imali rak jetre, od osoba sa cirozom jetre. Od ostalih tjelesnih tekućina valja napomenuti slinu i urin. Njihova prednost u odnosu na krv je ta da se lako sakupljaju i skladište. Istraživanjima uzoraka sline pušača i nepušača otkriveno je 13 metabolita(tiramin, adenozin, glukoza-6-fosfat) koji se mogu povezati sa smetnjama i bolestima koje su povezane s pušenjem. Više pažnje od strane znanstvenika dato je analizama urina. Analizom urina napravljeno je više od 2000 masenih spektrograma koji su sadržavali metabolite pomoću kojih bi se moglo prepoznati da je osoba oboljela od raka jetre. Novija studija urina pokazala je da dolazi do promjena u metaboličkom mehanizmu raka prije i nakon operacije.(14)

4.4.Cerumenogram

Cerumen je već bio korišten za određivanja tipa dijabetesa,za informacije o rasi, genetskom podrijetlu te za informacije o životinjskom metabolizmu. Tek su nedavno počela istraživanja GC-MS tehnikom uzoraka ušne smole u svrhu pronalaska metabolita koji bi omogućili pravovremenu dijagnozu bolesti. Metoda je nazvana cerumenogramom.

Uzorci su uzimani od osoba oboljelih od raka sa različitim vremenom bolovanja i zdravih osoba. Uzorci oboljelih osoba su podijeljeni u skupine. Oboljele osobe su imale ili limfom ili karcinom ili leukemiju. Dio uzoraka je uzeto od osoba koji su liječeni nekom vrstom terapije, a drugi dio nije liječen nikakvom vrstom terapije. Analizom pomoću GC-MS tehnike detektirano je 158 hlapljivih organskih spojeva, u donosu na urin gdje je detektirano 130 metabolita i slinu sa 120 detektiranih metabolita , koristeći istu GC-MS tehniku. Prema tome cerumen se može koristiti kao glavni izvor metabolita. Nastali metabolički profil se nije razlikovao ovisno o rasi. Od 158 detektiranih hlapljivih organskih spojeva najviše je bilo ketona, zatim ugljkikohidrata, amina, amida, estera, karboksilnih kiselina, aldehida i alkohola. Statističkom analizom utvrđeno je da se 27 metabolita mogu koristiti kao potencijalni biomarkeri jer su se u 100% slučajeva razlikovali između bolesne i zdrave osobe bez obzira na rasu i spol. Najbrojnija detektirana skupina organskih spojeva su ketoni. Njihovo prisustvo se može povezati sa različitim metaboličkim procesima kao što je beta oksidacija masnih kiselina, dekarboksilacija acetil-CoA. Otkriveno je da se tri ketona mogu povezati s rastom stanica raka, a to su 2-butanon, 2-pentanon i 5-oktadekanon. Od aldehida kao biomarker je odabran n-oktadekanal. Ovaj aldehid se također može pronaći kod osoba koji boluju od Sjorgen-Larsson sindroma. Pojedini ciklički spojevi, kao što su na primjer furani , su odabrani kao biomarkeri kod raka pluća i raka dojke. Cerumen u svom sastavnom dijelu sadrži mnoge estere i etere kao i kolesterol, a tri su odabrana kao biomarkeri. Detektirani su još jedan alkohol, tri amina i tri ugljikohidrata su prvi put detektirani kao biomarkeri. Cerumen služi kao otisak prsta mnogih organskih spojeva koji nastaju u biokemijskim reakcijama u tijelu, a pritom postoje razlike između onih što ih stvaraju stanice raka i onih što proizvode zdrave stanice. Ove razlike se mogu pratiti, kako bi se omogućilo rano otkrivanje raka , jer se ušna smola stalno izlučuje. Testiranje je dosta brže i jeftinije u odnosu na ostala. Test se može provesti u vremenu od 3 sata, a analiza jednog uzorka

iznosi 50 €. Ovaj test također omogućuje praćenje 27 biomarkera rutinskim ili hitim testovima i smanjujući pri tom smrtnost od raka.(18)

ZAKLJUČAK

U ovom radu razrađena je tema o važnosti plinske kromatografije u kombinaciji s drugim analitičkim tehnikama u svrhu otkrivanja isparljivih ili djelomično isparljivim molekula, pomoću kojih bi došlo do mogućnosti razlikovanja normalnih stanica od tumorskih stanica. Različita istraživanja su pokazala mogućnost korištenja ove neinvazivne tehnike za rano otkrivanje raka. Do ovog trenutka, još je prerano za korištenje GC-MS tehnike kao samostalne kliničke procedure, no može se koristiti kao dodatna analitička tehniku uz postojeće kliničke tehnike i metode za otkrivanje i istraživanje raka. Budućnost razvoja upotrebe ove tehnike će biti usredotočeno na poznavanje biokemijskih puteva, koji dovode do stvaranja različitih vrsta molekula za osjetljiviju i specifičniju detekciju tumorskih stanica. Štoviše, buduća istraživanja bi morala dovesti do standardnije i vrijednije metode istraživanja raka. Iako je ovo područje u istraživanju raka jako mlado i nerazvijeno, ono je i obećavajuće te može dovesti do razvitka personaliziranih terapija za oboljele osobe.

LITERATURA

(1) I.Damjanov, D.Jukić, Specijalna patologija, 2007. 128-147.str.

(2). https://www.onkologija.hr/sto-je-rak/

(3) A. Strasser , L. O'Connor , and V. M. Dixit Apostosis signaling, Melbourne, 2000.

(4) https://en.wikipedia.org/wiki/Biopsy 04.08.2020

(5) https://www.onkologija.hr/dijagnostika-raka/ 04.08.2020.

(6) N. L. Henrya,, D. F. Hayesb Cancer biomarkers, Michigan, 2012

(7) https://www.kvantum-timhr/news/index/view/?id=265

(8) N.Radić,L.K.Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga ,Zagreb,2016. 654-655. Str.

(9) D.A.Skoog, D.M.West, F.J.Holler, Foundamentals of analytical chemistry sixth edition, , Kentucky, 1999, 674-690. Str.

(10) https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf 05.08.2020.

(11) E. de Hoffman, V.Stroombant, Mass spectrometry- principles and applications, third edition, 2007 217-232.str

(12) https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/HR/TXT/HTML/?uri=CELEX:01991R2568-20150101&from=LV 08.08.2020

(13)https://en.wikipedia.org/wiki/Gas_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry 05.08.2020.

(14) G.Lubes, M.Goodarzi, GC-MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds biomarkers, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, 2017.

(15) . S. M. Gordon, J. P. Szidon, B. K. Krotoszynski, R. D. Gibbons, H. J. O'Neill, Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. Clin. Chem. 2016.

(16) V. M. Asiago, L. Z. Alvarado, N. Shanaiah, G. N. Gowda, K. Owusu-Sarfo,R. A. Ballas, D. Raftery, Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling. Cancer 2010

(17) J. H. Huang, L. Fu, B. Li, H. L. Xie, X. Zhang, Y. Chen, D. Liao, Distinguishing the serum metabolite profiles differences in breast cancer by gas chromatography mass spectrometry and random forest method 2015

(18) J. M.G.Barbosa , N. Z.P., L. C. David , C. G. de Oliveira , M. F.G. Soares, M.Ameloti G. Avelino, A. E. de Oliveira, E. Shokry & N. R. A. Filho Cerumenogram: A new frontier in cancer diagnosis in humans, 2019