

# Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu trudnih žena s preeklampsijom

---

Mrvelj, Jure

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

*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:167:914354>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH ORGANSKIH METABOLITA U  
URINU TRUDNIH ŽENA S PREEKLAMPSIJOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**JURE MRVELJ**

**Matični broj:480**

**Split, lipanj 2022.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ**  
**SMJER: KEMIJA**

**IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH ORGANSKIH METABOLITA U  
URINU TRUDNIH ŽENA S PREEKLAMPSIJOM**

**ZAVRŠNI RAD**

**JURE MRVELJ**

**Matični broj: 480**

**Split, lipanj 2022.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**COURSE: CHEMISTRY**

**IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC METABOLITES IN  
URINE OF PREGNANT WOMAN WITH PREECLAMPSIA**

**BACHELOR THESIS**

**JURE MRVELJ**

**Parent number: 480**

**Split, June 2022**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Preddiplomski studij Kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta

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

Pomoć pri izradi:

### IDENTIFIKACIJA HLAPLJIVIH ORGANSKIH METABOLITA U URINU TRUDNIH ŽENA S PREEKLAMPSIJOM

Jure Mrvelj, 480

**Sažetak:** Različiti organizmi kao što su bakterije, plijesni i ljudi proizvode i oslobađaju relativno nepoznatu klasu metabolita. Ovi hlapljivi organski metaboliti skraćeno nazvani VOM (engl. Volatile organic metabolites) predstavljaju svojevrzni biosignal koji odražava zbroj svih utjecaja, uključujući genetiku, čimbenike okoliša, stanje prehrane i bolesti. Do sada su hlapljivi organski metaboliti kod ljudi otkriven u različitim tjelesnim medijima, kao na primjer u koži, u izdahnutom zraku, te u tjelesnim tekućinama kao što su slina, majčino mlijeko, znoj, krv i urin. Primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi određeni su hlapljivi metaboliti u uzorku urina trudnih žena s preeklampsijom. Za identifikaciju pojedinih metabolita korišteni su spektri masa i knjižnica spektara masa NIST. Od identificiranih metabolita naglasak je stavljen na one koji su povišeni kod oboljelih žena i potencijalni subiljezi za ovu bolest.

**Ključne riječi:** hlapljivi organski metaboliti, urin, preeklampsija, GC-MS, HS-SPME mikroekstrakcija na čvrstoj fazi.

**Rad sadrži:** 44 stranice, 9 slika, 1 tablicu, 2 priloga, 33 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Prof. dr.sc Mladen Miloš, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Marija Bralić, član
3. izv.prof.dr.sc. Mila Radan, član- mentor

**Datum obrane:** 14. srpnja 2022.godine

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, (Ruđera Boškovića 35).

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Ungraduated study of Chemistry**

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. **XXV**.

**Mentor:** Associate professor Mila Radan, PhD

**Technical assistance:**

### **IDENTIFICATION OF VOLATILE ORGANIC METABOLITES IN URINE OF PREGNANT WOMAN WITH PREECLAMPSIA**

Jure Mrvelj, 480

**Abstract:** Various organisms such as bacteria, molds and humans produce and release a relatively unknown class of metabolites. These volatile organic metabolites, abbreviated as VOMs (Volatile organic metabolites), are a kind of biosignal that reflects the number of all influences, including genetics, environmental factors, diet and disease. To date, volatile organic metabolites in humans have been detected in various bodily media, such as skin, exhaled air, and body fluids such as saliva, breast milk, sweat, blood, and urine. Using a coupled system of gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) with prior solid phase microextraction, volatile metabolites were determined in a urine sample of pregnant women with preclampsia. The NIST mass spectrum library was used to identify individual metabolites. Of the identified metabolites, emphasis is placed on those that are elevated in affected women and are potential markers for this disease.

**Keywords:** volatile organic metabolites, urine, preclampsia, GC-MS, HS-SPME microextraction on solid phase

**Thesis contains:** 44 pages, 9 figures, 1 table, 2 attachments, 33 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Professor Mladen Miloš, PhD chair person
2. Professor Marija Bralić, PhD member
3. Associate Professor Mila Radan, PhD supervisor

**Defence date:** July, 14, 2022

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, (Ruđera Boškovića 35).





*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Mile Radan, u razdoblju od ožujka do lipnja 2022.godine.*

*Od srca se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mili Radan na ukazanom strpljenju i velikoj pomoći pri cjelokupnoj izradi ovog završnog rada.*

*Također se zahvaljujem i doc. dr. sc. Zvonimiru Marijanoviću na pomoći i savjetima kod korištenja SPME tehnike.*

*Zahvaljujem se mojim kolegama i prijateljima što su mi napravili studentske dane ljepšima.*

*Najviše se zahvaljujem mojoj obitelji koji su mi bili najveća podrška i vjetar u leđa u teškim trenucima te koji su mi omogućili školovanje.*

## SAŽETAK

Različiti organizmi kao što su bakterije, plijesni i ljudi proizvode i oslobađaju relativno nepoznatu klasu metabolita. Ovi hlapljivi organski metaboliti skraćeno nazvani VOM (engl. Volatile organic metabolites) predstavljaju svojevrsni biosignal koji odražava zbroj svih utjecaja, uključujući genetiku, čimbenike okoliša, stanje prehrane i bolesti. Do sada su hlapljivi organski metaboliti kod ljudi otkriven u različitim tjelesnim medijima, kao na primjer u koži, u izdahnutom zraku, te u tjelesnim tekućinama kao što su slina, majčino mlijeko, znoj, krv i urin. Primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi određeni su hlapljivi metaboliti u uzorku urina trudnih žena s preeklampsijom. Za identifikaciju pojedinih metabolita korišteni su spektri masa i knjižnica spektara masa NIST. Od identificiranih metabolita naglasak je stavljen na one koji su povišeni kod oboljelih žena i potencijalni su biljezi za ovu bolest.

**Ključne riječi:** hlapljivi organski metaboliti, urin, preeklampsija, GC-MS, HS-SPME mikroekstrakcija na čvrstoj fazi.

## **SUMMARY**

Various organisms such as bacteria, molds and humans produce and release a relatively unknown class of metabolites. These volatile organic metabolites, abbreviated as VOMs (Volatile organic metabolites), are a kind of biosignal that reflects the number of all influences, including genetics, environmental factors, diet and disease. To date, volatile organic metabolites in humans have been detected in various bodily media, such as skin, exhaled air, and body fluids such as saliva, breast milk, sweat, blood, and urine.

Using a coupled system of gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) with prior solid phase microextraction, volatile metabolites were determined in a urine sample of pregnant women with preclampsia. The NIST mass spectrum was used to identify individual metabolites.. Of the identified metabolites, emphasis is placed on those that are elevated in affected women and are markers for this disease.

**Key words:** volatile organic metabolites, urine, preeclampsia, GC-MS, HS-SPME microextraction on solid phase

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

- Primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi odrediti hlapljive organske metabolite u uzorku urina trudnih žena s preeklampsijom.
- Obrada dobivenih kromatograma kako bi se pronašao metabolomički profili, te identifikacija dobivenih hlapljivih organskih metabolita.
- Upotrebom baze ljudskog metaboloma istražiti prisutnost identificiranih metabolita u ljudskom urinu i usporediti metabolite iz kontrolnih uzoraka sa metabolitima iz bolesnih uzoraka. Od tih metabolita pronaći one koji su povišeni kod oboljelih žena i potencijalni su biljezi za ovu bolest.



## Sadržaj:

UVOD .....	1
1 OPĆI DIO .....	2
1.1 Preeklampsija .....	2
1.2 Urin .....	4
1.3 Metabolomika .....	6
1.4 Metaboliti .....	8
1.4.1 Analitičke tehnike u metabolomici .....	10
1.5 Plinska kromatografija .....	11
1.6 Spektroskopija masa.....	13
1.7 Headspace mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HP- SPME).....	15
2 EKSPERIMENTALNI DIO .....	17
2.1 Prikupljanje uzoraka urina .....	17
2.2 Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME) .....	18
2.3 Analiza hlapljivih metabolita vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS).....	19
2.4 Pretraživanje baze ljudskog metaboloma( <i>engl.Human metabolome database (HMDB)</i> )	20
3 REZULTATI I RASPRAVA.....	21
4 ZAKLJUČAK .....	25
5 PRILOZI .....	26
5.1 Popis slika .....	26
5.2 Kratice i simboli.....	27
6 Literatura.....	28

## UVOD

Različiti organizmi kao što su bakterije, plijesni i ljudi proizvode i oslobađaju relativno nepoznatu klasu metabolita. Ovi hlapljivi organski metaboliti skraćeno nazvani VOM (*engl. Volatile organic metabolites*) predstavljaju svojevrsni biološki signal koji odražava zbroj svih utjecaja, uključujući genetiku, čimbenike okoliša, stanje prehrane i bolesti. Do sada su hlapljivi organski metaboliti kod ljudi otkriveni u različitim tjelesnim medijima, kao na primjer u koži, u izdahnutom zraku te u tjelesnim tekućinama kao što su slina, majčino mlijeko, znoj, krv i urin. (*Opitz, P. & Herbarth, O. The volatilome – investigation of volatile organic metabolites (VOM) as potential tumor markers in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery.*,**47**(2018),str.224-227)

Primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektroskopije masa uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi određeni su hlapljivi metaboliti u uzorku urina. Namjena ovog rada je obrada dobivenih kromatograma, kako bi se stvorio metabolomički profil te identifikacija dobivenih hlapljivih organskih metabolita. Za identifikacije pojedinih metabolita korišteni su spektri masa i knjižnica spektara masa NIST.

Hlapljivi metaboliti prvo su se počeli proučavati u izdahnutom zraku ispitanika s rakom pluća čime je ustvari pokazano da je profil hlapljivih metabolita u tih bolesnika različit u odnosu na profil hlapljivih metabolita zdravih ispitanika. (*Di Natale, C., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R. & Roscioni, C. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. Biosens Bioelectron.*,**42** (2018), str. 1209-1218) Međutim, kako bi se nađeni metaboliti potvrdili kao biološki biljezi, potrebna su daljnja istraživanja, kako kod navedenih, tako i kod drugih bolesti. (Babić, A. Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb.**58** (2019)

U ovom radu analiziran je uzorak urina zdravih trudnica i trudnica koje razvijaju preeklampsiju, u nastojanju da se dobije već spomenuti profil metabolita. Sada se rezultati dobiveni analizom metabolita zdravih osoba mogu uspoređivati sa onima dobivenima kod oboljelih osoba, te se tako također mogu predvidjeti potencijalni biljezi u razvoju nekih bolesti.

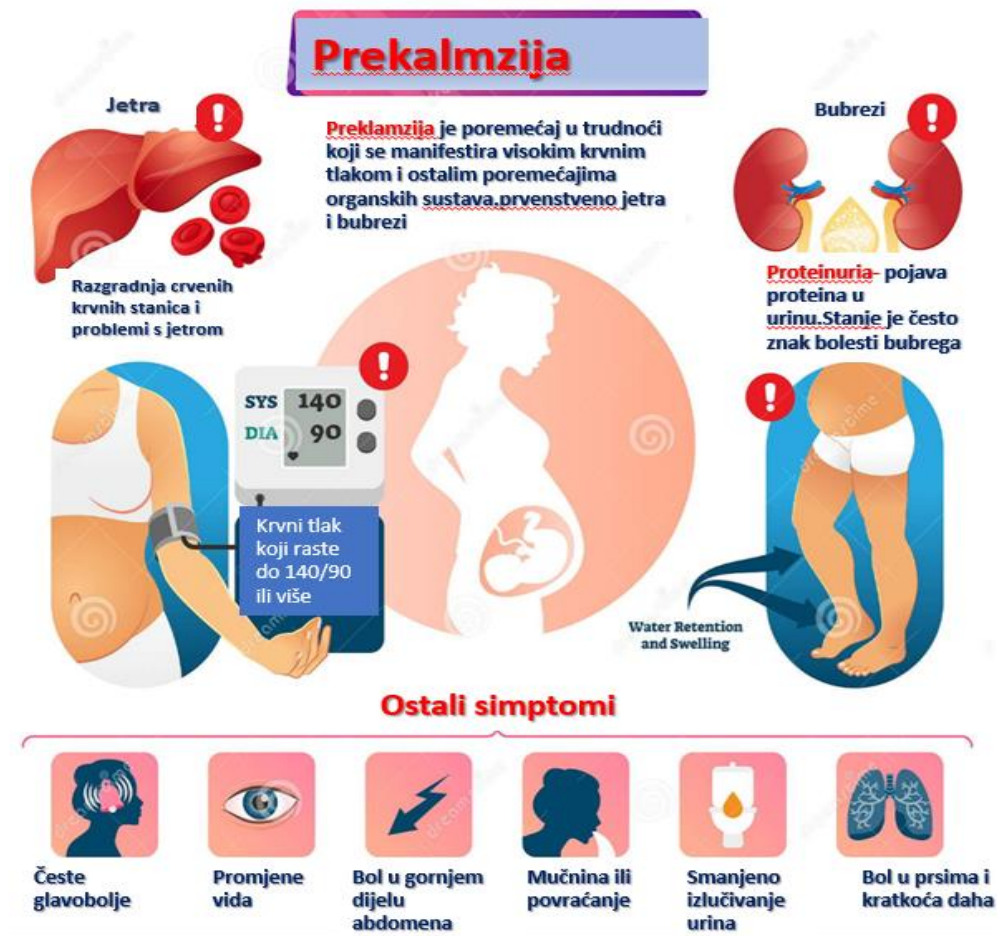


# 1 OPĆI DIO

## 1.1 Preeklampsija

Preeklampsija je bolest odnosno poremećaj kod trudnih žena koji se manifestira visokim krvnim tlakom, koji se razvija tijekom trudnoće ili nakon nje. Često je povezan s visokim razinama proteina u mokraći ili smanjenjem crvenih krvnih stanica, problemima s bubrezima ili jetrom, tekućinom u plućima ili znakovima problema s mozgom, kao što su napadaji i/ili poremećaji vida. Dijagnosticira se povišenjem krvnog tlaka buduće majke obično nakon 20. tjedna trudnoće i jedinstvena je za ljudsku trudnoću. Kod žena s preeklampsijom krvni tlak je povišen (viši od 140/90 mmHg).

Prema smjernicama koje je objavio američki insitut ginekologa, dijagnoza preeklampsije više ne zahtijeva otkrivanje visoke razine proteina u mokraći (proteinurija). Dokazi pokazuju da se problemi s organima poput bubrega i jetre mogu pojaviti bez znakova proteina, te da količina proteina u mokraći ne predviđa koliko će ozbiljno bolest napredovati. Prije ovih novih smjernica, većina zdravstvenih djelatnika tradicionalno se pridržavala stroge dijagnoze preeklampsije na temelju krvnog tlaka i proteina u mokraći. Važni simptomi koji mogu ukazivati na preeklampsiju su glavobolja, bol u truhu, otežano disanje ili peckanje iza prsne kosti, mučnina i povraćanje, zbunjenost, pojačano stanje tjeskobe i/ili poremećaji vida, kao što su preosjetljivost na svjetlost, zamagljen vid ili bljeskanje mrlja ili aure. (slika 1.1) Preeklampsija i srodni hipertenzivni poremećaji trudnoće utječu na 5-8% svih porođaja u Sjedinjenim Državama. Većina žena s preeklampsijom rodit će zdravu bebu i potpuno se oporaviti. Međutim, neke će žene doživjeti komplikacije, od kojih neke mogu biti opasne po život majke i/ili bebe. Zdravstveno stanje može vrlo brzo napredovati u tešku preeklampsiju. Stopa ovog poremećaja u SAD-u porasla je za 25% u posljednja dva desetljeća i vodeći je uzrok bolesti i smrti majki i dojenčadi. (URL: <https://www.preeclampsia.org/what-is-preeclampsia>(2.6.2022)



*Slika 1.1 Simptomi kod preeklampsije*

## 1.2 Urin

Urin ili mokraća svijetložuta je tekućina putem koje se iz organizma izlučuje većina štetnih tvari uz istovremeno rješavanje suvišne tekućine. Tvari unesene u organizam, a koje se ne uspiju apsorbirati, izlučuju se van putem urina. Kruti otpad putem crijeva, tekući preko bubrega i mokraćovoda, jedan dio tekućine iz organizma izađe putem perspiracije. Analiza urina je, uz analizu krvi i stolice, pri dijagnostici najčešća analiza, jer se na taj način mogu otkriti razni metabolički i prehrambeni problemi i bolesti. Kod zdravog čovjeka urin je svijetložute boje. Tamna boja ili krv u urinu već na pogled daje naslutiti postojanje određenog poremećaja. Urin igra važnu ulogu u Zemljinom ciklusu dušika. U uravnoteženim ekosustavima, urin gnoji tlo i tako pomaže biljkama u rastu. Zbog toga se urin može koristiti i kao gnojivo. Neke životinje ga koriste za obilježavanje svojih teritorija. Tokom povijesti, ostarjeli ili fermentirani urin (poznat kao lant) koristio se za proizvodnju baruta, čišćenje kućanstva, stavljanje kože i bojenje tekstila. On se razlikuje po izgledu, uglavnom ovisno o razini vode prisutne u tijelu, interakcijama s lijekovima, spojevima i pigmentima ili bolestima. U većini slučajeva boja mokrenja dolazi prvenstveno od prisutnosti urobilina. Urobilin je konačni otpadni proizvod koji nastaje razgradnjom hema iz hemoglobina u procesu starenja krvnih stanica. Mnogi proteini i druge tvari koje su korisne za medicinsku terapiju, a sastojci su mnogih lijekova na recept (npr. Ureacin, Urekolin, Urowave), sadržani su u urinu. Kod žena u postmenopauzi bogat je gonadotropinima, spojevima koji mogu proizvesti hormone za terapiju plodnosti. Jedan od primjera takvih spojeva je komercijalni proizvod Pergonal. ( URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Urine>(20.4.2022.))

Urin je dugo bio "omiljeni" biofluid među istraživačima metabolomike zbog činjenice da je sterilan, lako se dobiva u velikim količinama i uglavnom se sastoji bez interferirajućih proteina ili lipida, te je kemijski složen. No kako bilo, ova kemijska složenost također je učinila urin posebno teškim supstratom za potpuno razumijevanje upravo zbog toga što kao biološki otpadni materijal uglavnom sadrži produkte metaboličke razgradnje iz velikog spektra hrane, pića, lijekova, zagađivača okoliša, endogenih otpadnih metabolita i nusproizvoda bakterija, koji su pak slabo okarakterizirani i slabo shvaćeni. U nastojanju poboljšanja razumijevanja ovog zanimljivog biofluida, poduzeta je sveobuhvatna, kvantitativna karakterizacija ljudskog urina u cijelom metabolomu. To je uključivalo i kompjuterski potpomognuto istraživanje literature i sveobuhvatnu, kvantitativnu

eksperimentalnu procjenu.( *Bogumil, R., Bouatra, S., Mandal, R. & Wilson, R. M, The Human Urine Metabolome. Plos One 52(2013),str. 1)*

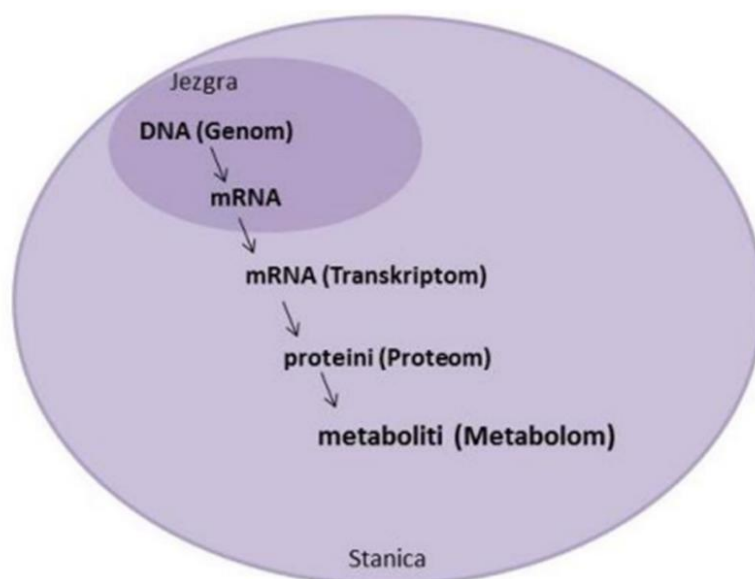


*Slika 1.2 Urin*

### 1.3 Metabolomika

Otkrića u biokemiji tijekom devetnaestog i dvadesetog stoljeća dala su niz vrijednih saznanja, koja uključuju detektiranje promjena koje se događaju u i na različitim genima, proteinima i metabolitima, kako zbog djelovanja okoliša, tako i zbog zdravstvenih poremećaja ili terapije. Usporedbom metaboličkih profila u zdrave i oboljele osobe moguće je uočiti jedinstvene metabolite, potencijalne biološke biljege kao indikatore razvoja i tijeka drugih bolesti ili učinka terapije. Razvoj tehnika poput genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike omogućio je veliki napredak medicinske dijagnostike i liječenja. ( *Babić, A.* Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb. **58** (2019)

Baš kao što genomika proučava DNA i genetske informacije unutar stanice, transkriptomika RNA i razlike u ekspresiji mRNA, proteomika ekspresiju proteina i njihovu funkciju u organizmu tako i metabolomika proučava supstrate i produkte metabolizma na koje utječu i genetski i okolišni čimbenici. (slika 1.3) (URL: <https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/the-metabolome-and-metabolic-reactions/>(26.5.2022.)Tzv.,,omika“se smatra moćnim alatom za interpretaciju i razumijevanje složenih bioloških procesa zbog svoje mogućnosti istovremenog promatranja promjena koje se događaju na različitim biološkim razinama, osiguravajući tako uvid u fiziološko i patološko stanje organizma.



*Slika 1.3 Prijenos informacije u stanici*

Opća definicija metabolomike je sveobuhvatno proučavanje metaboličkih procesa koji se javljaju u stanicama, biotekućinama, tkivima ili organizmima. Metabolomika je znanstvena studija kemijskih procesa koji uključuju metabolite, supstrate malih molekula, međuprodukte i produkte staničnog metabolizma. Predstavlja sustavno proučavanje jedinstvenih kemijskih „otisaka“ prstiju koje specifični stanični procesi ostavljaju za sobom. Metabolom predstavlja kompletan skup metabolita u biološkoj stanici, tkivu, organu ili organizmu, koji su krajnji produkti staničnih procesa. Metabolom također predstavlja i fenotip organizma jer sadrži informacije o krajnjem produktu staničnih procesa. Predstavlja jedan cijeli skup malih molekula koje se nazivaju metaboliti, a prisutni su u stanici. Glasnička RNA (mRNA), podaci o ekspresiji gena i proteomske analize otkrivaju skup genskih proizvoda koji se proizvode u stanici. Suprotno tome, stvaranjem metaboličkih profila možemo dobiti trenutnu sliku fiziologije stanice, pa stoga metabolomika pruža izravno informacije o fiziološkom stanju organizma. Jedan od krajnjih izazova sistemske biologije je integracija metabolomike sa svim ostalim informacijama kako bi se omogućilo bolje razumijevanje stanične biologije. Metaboliti mogu biti analizirani u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama, a zbog njihove velike kemijske raznolikosti u ovom trenutku nije moguće analizirati cijeli metabolom koristeći samo jednu analitičku tehniku. Međutim, analiza jednog određenog dijela metaboloma može se smatrati kao najbolje polazište. U rutinskim kliničkim istraživanjima najčešće se koriste urin ili krv. U urinu su sadržani brojni metaboliti odnosno skupine spojeva od kojih su najčešći alifatski spojevi, alkaloidi, aminokiseline, aromatski spojevi, ugljikohidrati, metali i nemetali (elementi), lipidi, organske kiseline i drugi, od kojih su mnogi od njih prisutni u relativno visokim i lako mjerljivim koncentracijama. (Mochalski, P. & Unterkofler, K. Quantification of selected volatile organic compounds in human urine by gas chromatography selective reagent ionization time of flight mass spectrometry (GC-SRI-TOF-MS) coupled with head-space solid-phase microextraction (HS-SPME). *Analyst*, **141** (2016), str. 4796-4803) (Živković- Sermen, T. Hlapljivi spojevi i aminokiseline u urinu oboljelih od raka testisa. **58** (2019) Doktorska disertacija.)

## 1.4 Metaboliti

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 genetičkih i okolišnih čimbenika. Kako je već kazano, cijeli paket metabolita proizveden u stanici i organizmu čini metabolom. Njegove karakteristike se mijenjaju ovisno o fiziologiji, razvoju i patologiji same stanice, tkiva, organa ili organizma. Metaboliti se mogu grupirati u dvije glavne vrste: primarni i sekundarni.

Primarni metaboliti su spojevi koji su izravno uključeni u metaboličke putove organizma nužni za njegov rast, razvoj i reprodukciju. Ti su metaboliti povezani s fiziološkim procesima koji se odvijaju u organizmu. Nastaju u organizmu tijekom faze rasta, kao rezultat mehanizma rasta. Proizvodnja primarnih metabolita započinje kada su hranjive tvari potrebne tijelu dostupne u mediju. Nalaze se u većini stanica u cijelom tijelu i također se nazivaju središnjim metabolitima. Ključni su za različite metaboličke aktivnosti, kao što su na primjer fotosinteza ili stanično disanje. Neki djeluju kao supstrat za te procese, dok drugi djeluju kao katalizatori. Proizvodnja primarnih metabolita obično se događa velikom brzinom, jer su oni stalno potrebni tijelu. Oni se također mogu lako ekstrahirati jednostavnim postupcima ekstrakcije. Primarni metaboliti podijeljeni su u dvije skupine: primarni esencijalni metaboliti i primarni metabolički krajnji proizvodi. Primarni esencijalni metaboliti uključuju spojeve poput proteina i ugljikohidrata koji čine strukturnu i fiziološku organizaciju organizma. Nasuprot tome, primarni metabolički krajnji proizvodi uključuju proizvode poput mliječne kiseline i etanola koji su krajnji proizvodi različitih metaboličkih putova. Primjeri primarnih metabolita uključuju proteine, enzime, ugljikohidrate, lipide, vitamine, etanol, mliječnu kiselinu, butanol itd. (URL: <https://hr.strephonsays.com/primary-and-vs-secondary-metabolites-14300> (27.5.2022))

Sekundarni metaboliti su organski spojevi koje proizvode različiti organizmi koji nisu izravno uključeni u rast, razvoj ili reprodukciju organizma, ali su bitni u ekološkim i drugim aktivnostima. Sekundarni metaboliti se također nazivaju specijalizirani metaboliti ili prirodni proizvodi. Budući da ovi metaboliti nisu uključeni u rast i razvoj organizma, odsutnost ovih spojeva uzrokuje mali ili nikakav učinak na preživljavanje organizma. Iako nisu važni za preživljavanje, mogu biti važni za druge aktivnosti kao što su zaštita,

natjecanje i interakcija između različitih vrsta. Oni se također formiraju tijekom stacionarne faze rasta u većini organizama. Ova faza rasta naziva se "idiofaza". Proizvode se u prilično manjim količinama i teško ih je izdvojiti. Većina sekundarnih metabolita imaju sklonost djelovanju kao obrambeni mehanizam protiv raznih stranih napadača. Neki primjeri sekundarnih metabolita uključuju steroide, eterična ulja, fenole, alkaloide, pigmente, antibiotike itd. ( URL:<https://hr.strephonsays.com/primary-and-vs-secondary-metabolites-14300>(27.5.2022)(URL:<https://microbenotes.com/primary-vs-secondary-metabolites/>.(27.5.2022)

Katabolizam metabolita u organizmu odvija se u više koraka. U prvom se koraku velike molekule iz hrane cijepaju na manje molekule. U drugom se koraku te brojne male molekule razgrađuju do nekoliko jednostavnih jedinica koje imaju središnju ulogu u metabolizmu. Iz većine metabolita (šećera, masnih kiselina i glicerola i aminokiselina) nastaje acetilna jedinica molekule acetil-CoA. U trećem koraku nastaje ATP pri potpunoj oksidaciji acetilne jedinice. ( *Berg, J., Tymoczko, J. L. & Stryer, L.* Biokemija.Školska knjiga, Zagreb,(2013), str. 419-420)



#### 1.4.1 Analitičke tehnike u metabolomici

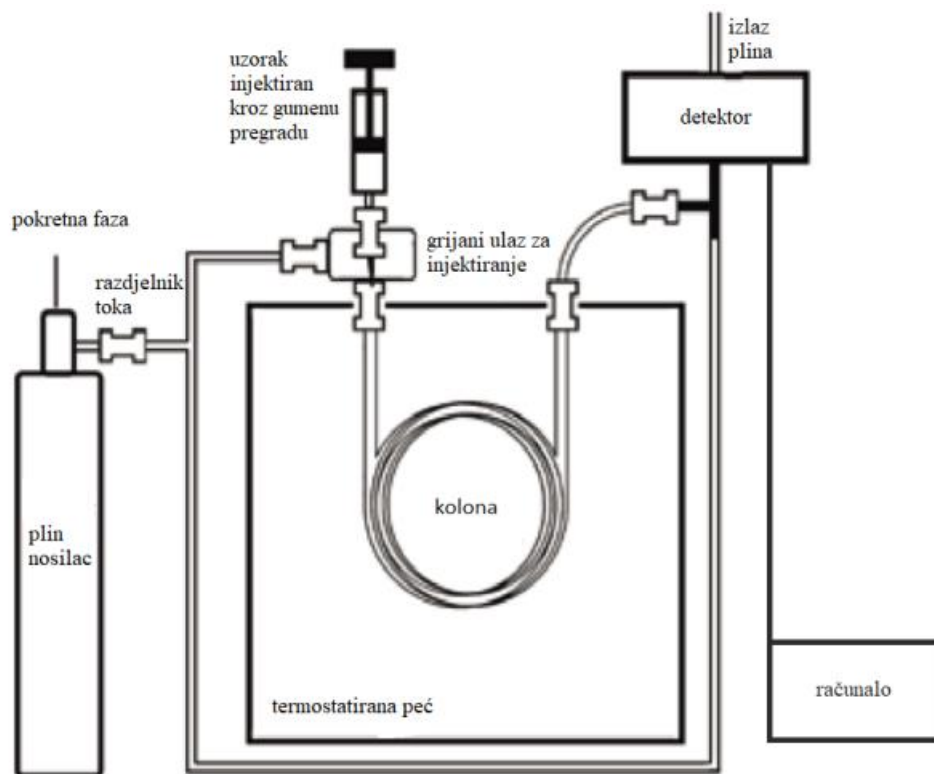
Najčešće korištene tehnike koje se primjenjuju u metabolitičkim istraživanjima su nuklearna magnetska rezonancija (NMR), spektrometrija masa (MS) te vezani sustavi tekućinske, (LC) odnosno plinske kromatografije (GC) sa spektrometrijom masa. Prvi metabolomički eksperimenti provodili su se isključivo uz pomoć tehnike NMR, dok se današnje analize zbog svoje veće osjetljivosti i bržeg prikupljanja podataka provode uglavnom pomoću spektrometrije masa. GC-MS koristi se 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. (Gowda, G. & Djukovic, D. Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol.Biol*, **1198** (2014), str. 3-12.) (Babić, A. Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb. **58** (2019)

## 1.5 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 ili tekućina. Česta je i podjela kromatografskih tehnika s obzirom na agregacijsko stanje pokretne faze. Kod plinske kromatografije pokretna je faza inertan plin, a kod tekućinske je to tekućina male viskoznosti. Razlikujemo još i fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima gdje je pokretna faza fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka. Prema prirodi ravnoteže između pokretne i nepokretne faze kromatografske se tehnike mogu podijeliti na: razdjelnu kromatografiju, adsorpcijsku kromatografiju, afinitetnu kromatografiju, kromatografiju isključivanjem te ionskom izmjenom. (*Kukoč-Modun, L. & Radić, N. Uvod u analitičku kemiju. Školska knjiga, Split, (2016), str. 630-632*)

Plinska kromatografija (GC) uobičajena je analitička tehnika koja se koristi za odvajanje i analizu hlapljivih i poluhlapljivih spojeva u smjesi. GC je popularna analitička tehnika jer kombinira iznimnu moć razlučivanja s brzinom i osjetljivošću. Široko se primjenjuje u mnogim industrijama, uključujući okoliš, naftnu i kemijsku industriju, industriju hrane i pića te farmaceutsku industriju.

Osnovni dijelovi plinskog kromatografa su: izvor stalne struje plina nosioca, injektor ili uređaj za unošenje uzoraka, kromatografska termostatorirana kolona, detektor, te uređaj za obradu podataka. Prikazani su na slici 1.5.



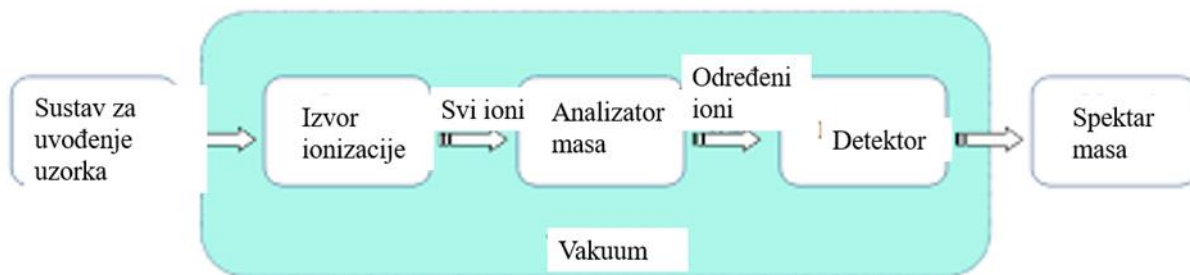
**Slika 1.5 Djelovi plinskog kromatografa**

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. Kromatografska analiza započinje unošenjem uzorka u struju plina nosioca, procesom koji se odvija u dijelu instrumenta zvanom injektor. Uzorak injektiran u instrument ulazi u plinski tok koji ga prenosi do kolone. ( *Babić, A.* Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb. **58**(2019) Na koloni plinskog kromatografa vrši se odjeljivanje različitih komponenti. Te se komponente eluiraju s kolone i određuju na detektoru. Na temelju zapisa detektora moguće je kvalitativno i kvantitativno određivanje eluiranih komponenti uzorka. Mjerenjem vremena zadržavanja te usporedbom s vremenima zadržavanja standarda čistih tvari, može se odrediti o kojem je spoju riječ. To nam predstavlja kvalitativan signal (čega ima), dok nam površina ispod krivulje daje kvantitativan signal (koliko ima). (*Kukoč-Modun, L. & Radić, N.* Uvod u analitičku kemiju. Školska knjiga, Split, (2016), str. 630-632.) Zagrijavanje injektora kolone i detektora omogućava brzo uplinjavanje uzorka, Injektiranje se provodi ručno ili automatski pomoću robota (*engl. „autosampler“*), a

najčešći način injektiranja tekućeg uzorka je ubrizgavanje špricom, čime se povećava razlučivost analize. Što se tiče samih kolona za plinsku kromatografiju, 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. (*Kukoč-Modun, L. & Radić, N. Uvod u analitičku kemiju. Školska knjiga, Split, (2016), str. 630-632.*)

## 1.6 Spektroskopija masa

Masena spektrometrija (MS) je tehnika analitičke kemije koja pomaže identificirati količinu i vrstu kemikalija prisutnih u uzorku mjerenjem omjera mase i naboja i obilja iona plinske faze. To je tehnika koja se temelji na ionizaciji i fragmentaciji molekula. Uzorak se uvodi u instrument u ionizator u kojem su smještene dvije elektrode anoda i katoda između kojih struji elektronski snop visokog potencijala i energije. Ti elektroni bombardiranjem molekula analita izbijaju elektron iz njih pri čemu nastaju pozitivno nabijeni ioni. Nakon provedbe ionizacije kationi odnosno pozitivno nabijeni ioni prolaze kroz dio koji se zove ubrzavatelj iona, fokusiraju se u ionski snop i akceleriraju se do magnetskog analizatora, gdje upotrebom električnih i magnetskih polja dolazi do razlikovanja tih iona na temelju omjera mase i naboja, njihovog propuštanja i u konačnici njihove detekcije na detektoru. (URL: <https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/> (1.6.2022.)) (*Burčul, F. Instrumentne metode analize (dio predavanja) (2021), str. 48*) Magnetski analizator se može podesiti tako da propušta točno određene omjere  $m/z$ . Grafički prikaz koji prikazuje ovisnosti intenziteta iona o omjeru  $m/z$  naziva se spektar masa i karakterističan je za pojedini uzorak pa se upravo zbog toga često naziva molekulski otisak. (*Jurić, A. (n.d.). Korištenje plinske kromatografije sa spektroskopijom masa u analizi meda obične planike, Seminarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu. (2016).* Glavni dijelovi spektrometra masa su ionski izvor, analizator masa i detektor, koji su prikazani na slici 1.6. U sustavu je potreban vakum kako bi se spriječila interakcija iona i molekula zraka, te gubitak iona analita ili nastajanje neželjenih produkata. (*Babić, A. Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb. 58 (2019)*)



**Slika 1.4 Shematski prikaz komponenti masenog spektrometra**

Najčešće korištene ionizacije su ionizacija elektronima i kemijska ionizacija. (Novak, P. & Jednačak, T. Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama. *TIVA*, **52** (2013), str. 78-89.)

Za ionizaciju hlapljivih, termički stabilnih molekula u plinskoj fazi koristi se ionizacija elektronima. Ionski izvor se sastoji od volframove ili renijeve žice čijim se zagrijavanjem emitiraju elektroni. Elektroni koji pri tome nastaju, akcelerirani razlikom potencijala između katode i anode od 70 eV, sudaraju se s molekulama analita, pritom stvarajući ione, koji se usmjeravaju prema analizatoru masa i detektoru.

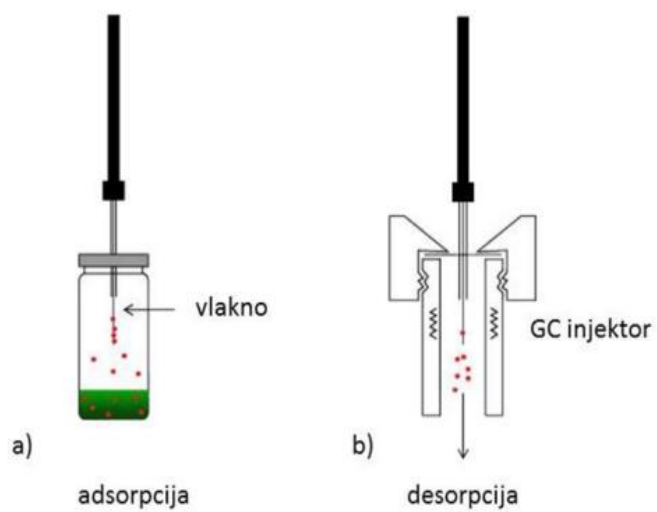
Ionizacija koja se koristi za analizu manje polarnih, hlapljivih molekula, stabilnih pri povišenim temperaturama naziva se kemijska ionizacija. Njome se omogućava posredna ionizacija molekula pomoću plina reagensa prisutnog u ionskom izvoru. Plinovi koji se najčešće koriste su metan, izobutan i amonijak. (Novak, P. & Jednačak, T. Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama. *TIVA*, **52** (2013), str. 78-89.)

Analizatori masa koji se koriste u masenoj spektroskopiji mogu biti kvadrupolni, sektorski, ionska stupica, Fourier-transformirana spektrometrija masa, orbitrap i analizator mase vremena leta. Od svih nabrojanih, najčešće se koristi kvadripolarni maseni analizator. Analizatori masa se temelje na različitim principima, pa se tako kvadrupol temelji na stabilnoj putanji iona određenog omjera mase i naboja. (Galić, N. Spektroskopija masa, Interna skripta- Zavod za analitičku kemiju. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb(2016)

## 1.7 Headspace mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HP- SPME)

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME) je inovativna i osjetljiva tehnologija pripreme uzoraka bez otapala. Na temelju principa adsorpcije/apsorpcije i desorpcije, SPME koristi obloženo vlakno za koncentriranje hlapljivih i poluhlapljivih spojeva iz uzorka.

SPME se široko koristi za razne primjene uključujući uzorke iz okoliša, biološke i farmaceutske uzorke, hranu i piće, forenziku i toksikologiju. Jedna od prednosti ove tehnike je ta što ne koristi otapala, pa je na taj način smanjena mogućnost onečišćenja sustava odnosno gubitak pojedinih metabolita, do kojeg dolazi zbog njihove interakcije s molekulama otapala ili nekog drugog onečišćivala. Osim što ne koristi otapala tehnika posjeduje veću osjetljivost od klasične ekstrakcije budući da se ekstrakcija provodi pomoću vlakna koje ima veliki kapacitet i uzorak se može ukoncentrirati. U cilju da se poboljša ekstrakcija, dodaju se soli (npr. NaCl) u suvišku u uzorak. Za ovu tehniku potrebno je osigurati zatvoreni sustav s točno određenom temperaturom i vremenom trajanja ekstrakcije. Princip rada je prikazan na slici 1.7. Vlakno napravljeno od silikagela te obloženo adsorbensom izloži se u otopinu analita nakon čega dolazi dolazi do uspostavljanja ravnoteže između tekuće i plinovite faze. Vlakno je potrebno ostaviti u uzorku određeno vrijeme. Lako hlapljivi spojevi se izdvajaju iz složene matrice i adsorbiraju na karakteristično vlakno. Nakon toga se vlakno pažljivo izvuče iz otopine, a zatim se sadržaj injektira u plinski kromatograf gdje se provodi analiza. (Živković-Sermen, T., Brčić-Karačonji, I., Safner, T., & Pizent, A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions, *Talanta*, **57** (2018), str. 537-543.) (Babić, A. Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb. **58** (2019) Još jedna od prednosti ove tehnike je ta što SPME kombinira uzorkovanje analita i izolaciju u jedan jednostavan korak. Kontrolira polaritet i debljinu vlaknastog premaza, održavajući dosljedno vrijeme uzorkovanja i kontrolirajući nekoliko drugih parametara ekstrakcije, pa na taj način omogućuje analitičaru da osigura vrlo dosljedne rezultate iz uzoraka, čak i onda kada su analiti u niskim koncentracijama.



*Slika 1.5 Prikaz HS-SPME sustava: a)adsorpcija analita na vlakno; b)desorpcija analita s vlakna u GC injektoru*

## 2 EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1 Prikupljanje uzoraka urina

Uzorci urina za analizu prikupljeni su od 2 zdrave trudnice i 3 trudnice koje tijekom trudnoće razvijaju ili su razvile preeklampsiju. Ispitanici su prethodno bili informirani o namjeni ovog istraživanja, te je njihov pisani pristanak dobiven prije provođenja samog istraživanja. Istraživanje je provedeno u skladu s uobičajenim standardnim etičkim načelima u biomedicinskim istraživanjima. U plastične posudice (bez ftalata) prikupljen je jutarnji urin srednjeg mlaza. Kako bi se spriječio gubitak hlapljivih metabolita, bočice su napunjene do vrha. Uzorci su pohranjeni na + 4 °C do analize.



## 2.2 Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)

Kod postupka mikroekstrakcije dodano je 2 mL urina u staklene SPME bočice volumena 5 mL u koje je prije toga 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 °C na termobloku. Nakon što se je uspostavila ravnoteža između tekuće i plinovite faze, septum je probušen SPME iglom, a vlakno je zatim izloženo plinovitoj fazi iznad uzorka. Nakon 45 minuta na 60 °C, vlakno je uvučeno u SPME iglu i uneseno u injektor plinskog kromatografa, gdje je izloženo temperaturi od 280 °C u trajanju od 10 minuta i to uz uvjete analize koji su opisani u poglavlju 2.4.



*Slika 2.1 Aparatura za adsorpciju uzorka na sivo vlakno*

### 2.3 Analiza hlapljivih metabolita vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS)

Analiza hlapljivih metabolita je provedena na plinskom kromatografu. GC-MS instrument korišten pri ovoj analizi sastoji se od plinskog kromatografa model 8890 GC i trostrukog kvadropolnog spektrometra masa 7000D (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD). Za odjeljivanje spojeva korištena je nepolarna kolona HP5MS (30m x 0,25mm, 0,25 $\mu$ m debljina nepokretne faze, Agilent, CA, SAD) sa stacionarnom fazom (5%-fenil)-metilpolisiloksan. Za mobilnu fazu korišten je helij protoka 1 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura injektora bila je 280 °C. U pećnici se temperatura na početku održavala na 40 °C tijekom 2 minute, a zatim se povisila na 150 °C postupnim zagrijavanjem brzinom od 5 °C u minuti. Nakon 2 minute na 150 °C, temperatura se povisila na konačnih 280 °C brzinom od 7 °C u minuti. Analiza je trajala 38 minuta. Radni uvjeti za spektrometar masa uključuje ionizaciju elektronima pri energiji od 70 eV i temperaturu međuspoja od 260 °C, te ionskog izvora od 200 °C. Maseni spektri su bilježeni u rasponu m/z od 30 do 400.



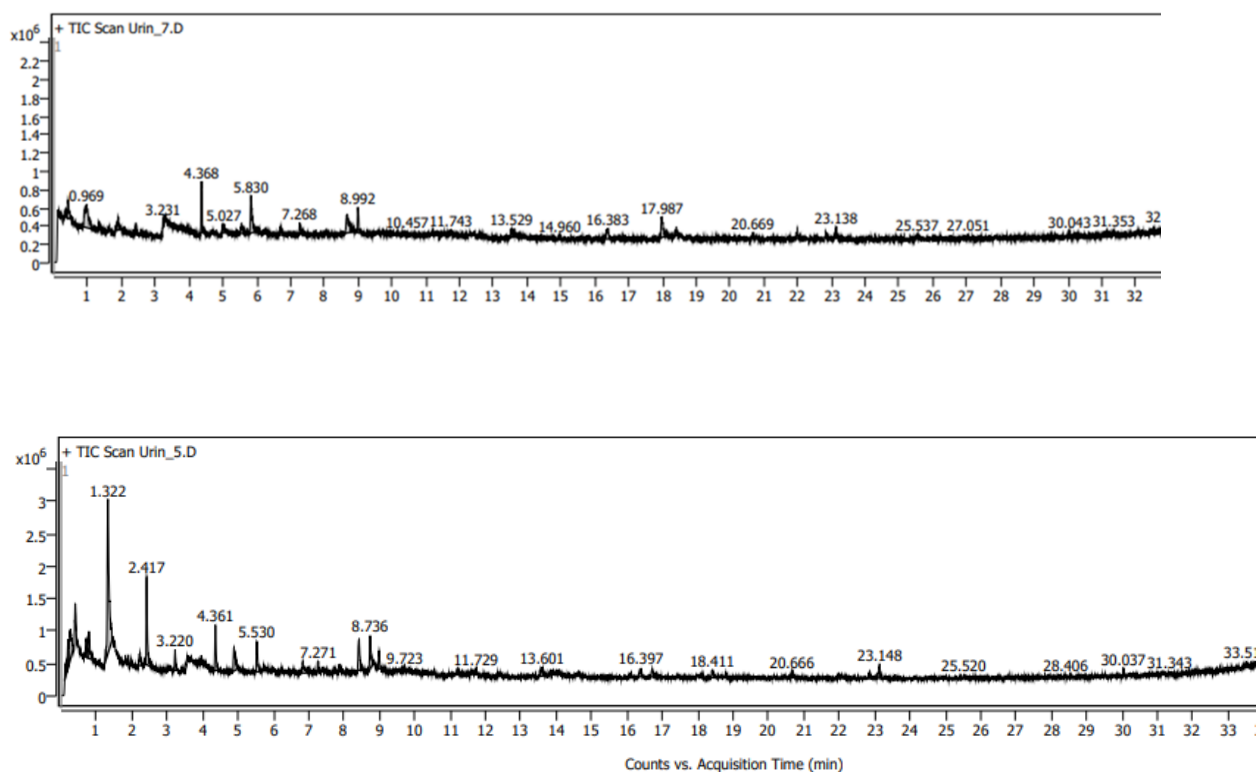
*Slika 2.2 GC-MS uređaj*

## 2.4 Pretraživanje baze ljudskog metaboloma (*engl. Human metabolome database (HMDB)*)

Nakon što je napravljen metabolomički profil hlapljivih metabolita u urinu, svaki je pojedini metabolit pretražen u bazi ljudskog metaboloma (*engl. Human Metabolome Database*). HMDB slobodno je dostupna baza podataka koja sadrži detaljne informacije o identificiranim metabolitima malih molekula koje se nalaze u ljudskom tijelu. Također omogućava uvid u dostupne kemijske, biokemijske i kliničke podatke o svakom identificiranom metabolitu, što uključuje podrijetlo i ulogu metabolita u organizmu.

### 3 REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovoga završnog rada provedena je identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu trudnih žena koje imaju preeklampsiju i kontrolnih žena u cilju stvaranja metabolomičkog profila. Analiza urina pomoću HS-SPME GC-MS rezultirala je pojavom 134 pika u svim uzorcima. Slika 3.1 prikazuje kromatogram za kontrolnu (zdravu) osobu (a) i osobu koja ima preeklampsiju (b). Metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi se do sada pokazala uspješnom i često korištenom metodom za pripremu uzoraka urina iz kojeg se pomoću GC-MS-a analiziraju hlapljivi metaboliti. Nepoznati metaboliti u uzorku identificirani su pomoću pripadajuće knjižnice spektara masa NIST.



**Slika 3.1 Prikaz kromatograma analiziranog uzorka urina: a) kontrolne osobe i b) bolesne osobe**

U ovom istraživanju analizom uzoraka urina detektirano je oko 134 metabolita, a njih 60 je identificirano. Za većinu onih metabolita koji su identificirani, nepoznato je njihovo porijeklo i fiziološka funkcija. Pretražujući literaturu (HMDB), za 25 identificiranih metabolita je pronađena njihova prisutnost u metabolizmu čovjeka, a oni su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Prikaz identificiranih metabolita koji su pronađeni u metabolizmu čovjeka razvrstanih ovisno o funkcionalnim skupinama

Metabolit	RT (min)	% kontrola	% PE
KETONI			
Heksan-2-on	13,01	0,47	0,30
Heksan-3-on	12,80	0,9	0,80
Heptan-2-on	15,46	0,24	0,18
acetone	4,05	0,13	0,12
Heptan-4-on	3,22	1,10	0,93
Pentan-2-on	1,32	1,10	4,61
6-metil-heptan-2-on	5,53	1,90	2,40
KARBOKSILNE KISELINE			
Etanska kiselina	9,10	0,35	0,28
Ftalna kiselina	10,25	0,11	0,09
Mravlja kiselina	11,72	0,55	0,31
<b>3-hidroksivalerijanska kiselina</b>	23,14	0,43	1,23
<b>Benzenkarboksilna kiselina</b>	4,46	1,12	3,23
ALDEHIDI			
heksanal	6,82	0,10	0,15
4-izopropilbenzaldehyd	15,01	0,25	0,14
<b>Oktanal</b>	16,39	0,80	1,15
acetaldehyd	2,46	1,50	4,61
ALHOLI			
3,7-dimetiloktan-3-ol	24,54	0,38	0,27
mentol	14,12	0,13	0,11
Etanol	12,40	0,12	0,18
FENOLI			
2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol	25,18	0,34	0,31
HETEROCIKLI			

2,3-dihidro-1-benzofuran	6,07	0,08	0,072
MONOCIKLIČKI			
1,2,3,4-tetrametilbenzen	17,52	0,07	0,06
OSTALI			
dodekan	19,58	0,24	0,19
<b>Urična kiselina</b>	7,26	0,70	1,97
Heksametil ciklotrisiloksan*	31,90	0,25	0,20
Oktametil ciklotetrasiloxane *	32.50	0,46	0,39

\*nisu još do sada identificirani i potvrđeni u ljudskom urinu; RT-retencijsko vrijeme; PE-preeklampsija; način identifikacije: identifikacija je izvršena na osnovu MS-a

Analizom uzoraka urina detektirano je oko 134 metabolita te ih je 60 identificirano. Za većinu metabolita nepoznato je njihovo porijeklo i fiziološka funkcija. Pretragom baze metabolita (HMDB), za 25 identificiranih metabolita je pronađena njihova prisutnost u metabolizmu čovjeka i njihove karakteristike su prikazane u tablici 1. Od 25 izabranih metabolita, sedam (28 %) je ketona, šest (24%) karboksilnih (14 %), četiri aldehida (16 %), tri su alkohola (12 %), jedan fenol (4 %), jedan heterociklički spoj (4%), jedan monociklički (4%), jedan kondenzirani policiklički spoj (4%) te jedan ugljikovodik (4%).Uz njih su još uvrštena u tablicu i dva ciklosiloksana.

Ketoni su se uz karboksilne kiseline pokazali kao najzastupljenija skupina spojeva u urinu. Neki od navedenih metabolita su navedeni kao razlikovni metaboliti između zdravih ispitanika i žena koje su razvile preeklampsiju. Takvi metaboliti su u tablici označeni crvenom bojom. To su oktanal, urična kiselina, benzenkarboksilna kiselina i 3-hidroksivalerijanska kiselina. Na povećanje navedenih spojeva u uzorcima bolesnih žena ukazuju i postotci koji odgovaraju površini ispod krivulje. Za 3-hidroksivalerijansku kiselinu 1,23%, oktanal 1,15%, benzenkarboksilnu kiselinu 3,23% i uričnu kiselinu 1,97%. Ti spojevi su potvrđeni i u istraživanjima drugih autora kao potencijalni biljezi. Skupina znanstvenika je uočila značajno povećanje urične kiseline u urinu žena s preeklampsijom u odnosu na kontrolne uzorke.( *Muller-Deile, J., & Schiffer, M. Preeclampsia from a renal point of view: Insides into disease models, biomarkers and therapy. World Journal of Nephrology, 53(2014), str. 169-181*) Skupina kineskih znanstvenika je također otkrila da 3-hidroksivalerijanska kiselina predstavlja biljeg za

ovaj poremećaj.( *Mengxin, Y., Yue, X., Fei, L., Zuoqiao, Y., & Wenxin, G.* Identification of Biomarkers for Preeclampsia Based on Metabolomics. *Clinical epidemiology*, **60** (2021), str. 337-360) Također je istraženo kako je u urinu trudnica s preeklampsijom povišena i benzenkarboksilna kiselina u odnosu na kontrolne uzorke.

Kod uzoraka oboljelih osoba ekspresija aldehida je gotovo uvijek značajno povećana, što ukazuje na povećanu proizvodnju takvih i sličnih organskih metabolita patološkim procesima povezanim s preeklampsijom. Njihova prisutnost u urinu oboljelih osoba dokazana je ovim istraživanjem. Njihovo se pojavljivanje povezuje s brojnim oboljenjima i upalnim procesima čiji su uzrok povećana produkcija reaktivnih kisikovih spojeva. Iako je uvršten u tablicu 1 kao metabolit koji je pronađen u metabolizmu čovjeka i kojeg je sustav identificirao, oktanal do sada nije identificiran kao metabolit prisutan u urinu. Međutim pronađen je u slini i fecesu zdravih osoba, kao i slini i u izdahu žena s preeklampsijom i povišen je u odnosu na zdrave ispitanike.( *Morad, N., Shira, B. & Rannen, J.* Artificially Intelligent Nanoarray for the Detection of Preeclampsia under Real-World Clinical Conditions, *Advanced Materials Technologies*, **54** (2015), str. 4)

Pristup u metabolomičkim istraživanjima bioloških biljega upravo se temelji na se na pretpostavci da jedan stimulans, poput preeklampsije ili bilo koji drugi poremećaj ili bolest organizma, mijenja biokemiju sustava, i tako dovodi do promjena u biokemijskim sintetskim ili razgradnim putovima i tako direktno utječe na promjene u metabolomu.( *Babić, A.* Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad. Zagreb. **58**(2019). Zbog svoje mogućnosti pokrivanja cijelog metaboloma, metabolomika nam omogućava puno bolju procjenu biološkog i fiziološkog stanja pacijenta. Istraživanja hlapljivih metabolita u urinu u zadnjih nekoliko godina zaokupljaju pažnju sve većeg broja znanstvenika. I rezultati ovog rada sugeriraju da su hlapljivi metaboliti iz urina bolesnih osoba potencijalni biološki biljezi za različite zdravstvene poremećaje i oboljenja.

## 4 ZAKLJUČAK

- Analizom hlapljivih metabolita u urinu ispitanika s preeklampsijom i kontrolnih ispitanika, primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa nakon mikroekstrakcije na čvrstoj fazi, detektirana su 134 metabolita.
- Metaboliti su identificirani pomoću knjižnice spektara NIST. Na taj je način identificirano 60 metabolita.
- Pretraživanjem baze podataka ljudskog metaboloma, za 25 metabolita potvrđena je prisutnost u ljudskom metabolomu .
- Stvaranjem metaboličkog profila analizom urina, izdvojeni su neki metaboliti koji se pojavljuju i kod zdravih i kod bolesnih osoba. Od tih metabolita istaknuti su oni koji su povišeni kod žena oboljelih od preeklampsije. Ti spojevi su u tablici označeni crvenom bojom. To su oktanal (1,15%), urična kiselina, (1,97%) benzenkarboksilna kiselina (3,23). Oni predstavljaju potencijalni biljeg za preeklampsiju, pa se mogu dalje razmotriti u drugim analizama za otkrivanje ovog poremećaja.



## 5 PRILOZI

### 5.1 Popis slika

<i>Slika 1.1 Simptomi kod preklamzije</i> .....	3
<i>Slika 1.2 Urin</i> .....	5
<i>Slika 1.3 Prijenos informacije u stanici</i> .....	6
<i>Slika 1.5 Djelovi plinskog kromatografa</i> .....	12
<i>Slika 1.6 Shematski prikaz komponenti masenog spektrometra</i> .....	14
<i>Slika 1.7 Prikaz HS-SPME sustava: a) adsorpcija analita na vlakno; b)desorpcija analita s vlakna u GC injektoru</i> .....	16
<i>Slika 2.2 Aparatura za adsorpciju uzorka na sivo vlakno</i> .....	18
<i>Slika 2.3 GC-MS uređaj</i> .....	19
<i>Slika 3.1 Prikaz kromatoghrama anlizoiranog uzorka urina: a) kontrolne osobe i b) bolesne osobe</i> .....	21

## 5.2 Kratice i simboli

GC -plinska kromatografija (*engl. gas chromatography*)

GC-MS -vezni sustav plinske kromatografije i spektromerije masa (*engl. gas chromatography–mass spectrometry*)

HMDB -Baza podataka ljudskih metaboloma (*engl. Human Metabolome Database*)

HS-SPME -Miroekstrakcija na čvrstoj fazi (*engl. Headspace–Solid Phase Microextraction*)

MS -spektrometrija masa (*engl. mass spectrometry*)

NIST- Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (*engl. National Institute of Standards and Technology*)

RI -indeks zadržavanja (*engl. retention indeks*)

RT -vrijeme zadržavanja (*engl. retention time*)

VOM- hlapljivi organski metaboliti (*engl. volatile organic metabolites*)

## 6 Literatura

1. Slika 1.1 Simptomi kod preeklampsije; URL : <https://www.dreamstime.com/preeclampsia-vector-illustration-labeled-pregnancy-complication-scheme-female-disease-diagram-symptoms-causes-infographic-image155165422> (27.5.2022.)
2. *Anupama, S. (n.d.)*. URL: <https://microbenotes.com/primary-vs-secondary-metabolites/>.(27.5.2022)
3. *Babić, A.* Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu bolesnika s rakom testisa; Diplomski rad.**58** (2019) Zagreb.
4. *Berg, J., Tymoczko, J. L. & Stryer, L.* Biokemija.Školska knjiga, Zagreb,(2013),str. 419-420
5. *Biology online. (n.d.)*. URL: <https://www.biologyonline.com/dictionary/metabolite>(24.5.2022)
6. *Bogumil, R., Bouatra, S. Mandal, R. & Wilson, R. M.* The Human Urine Metabolome. *Plos One* **52**(2013),str. 1
7. *Burčul, F.* (2021). Istrumentne metode analize(dio predavanja).(str. 48)
8. *Di Natale, C., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R. & Roscioni, C.* Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron*,**42** (2018), str. 1209-1218.
9. *Galić, N.* (2016). Spektroskopija masa, Interna skripta- Zavod za analitičku kemiju. Sveučilište u Zgrebu, Zagreb.
10. *Gowda, G. & Djukovic, D.* Overview of Mass Spectrometry-Based Metabolomics: Opportunities and Challenges. *Methods Mol.Biol*,**1198** (2014), str. 3-12.
11. *Jurič, A.* (n.d.). Korištenje plinske kromatografije sa spektroskopijom masa u analizi meda obične planike, Seminarski rad,Prehrambeno-biotehnološki fakultet,Sveučilište u Zagrebu.(2016)
12. *Kukoč-Modun, L.& Radić, N.* Uvod u analitičku kemiju.Školska knjiga, Split, (2016), str. 630-632
13. *Lassen, C., Libak Hansen, C., Hagen-Mikkelsen, S. & Maag, J.* Siloxanes-Consumption, Toxicity and alternatives. (2005),**44**,str. 7-8
14. *Mengxin, Y., Yue, X., Fei, L., Zuoqiao, Y. & Wenxin, G.* Identification of Biomarkers for Preeclampsia Based on Metabolomics.*Clinical epidemiology*,**60**(2021), str. 337-360
15. *Mochalski, P. & Unterkofler, K.* Quantification of selected volatile organic compounds in human urine by gas chromatography selective reagent ionization

- time of flight mass spectrometry (GC-SRI-TOF-MS) coupled with head-space solid-phase microextraction (HS-SPME). *Analyst*, **141** (2016), str. 4796-4803.
16. *Muller-Deile, J. & Schiffer, M.* Preeclampsia from a renal point of view: Insides into disease models, biomarkers and therapy. *World Journal of Nephrology*, **53** (2014), str. 169-181
  17. *Novak, P. & Jednačak, T.* Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama. *TIVA*, **52** (2013), str. 78-89.
  18. *Opitz, P. & Herbarth, O.* The volatilome – investigation of volatile organic metabolites (VOM) as potential tumor markers in patients with head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery*, **47** (2018)
  19. *Sagar, A. (n.d.).* *Microbe Notes*. URL: [https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/\(1.6.2022.\)](https://microbenotes.com/mass-spectrometry-ms-principle-working-instrumentation-steps-applications/(1.6.2022.))
  20. *Silva, C. L., Passos, M. & Camara, J.* Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarker. *Talanta*, **51**(2012), str. 360-368.
  21. *Sreekumar, A., Poisson, L., Rajendiran, T., Khan, A. & Cao, Q.* Metabolomic Profiles Delineate Potential Role for Sarcosine in Prostate Cancer Progression. *Nature*, **48** (2009), str. 910-914.
  22. *Strephonsays. (n.d.).* URL: [https://hr.strephonsays.com/primary-and-vs-secondary-metabolites-14300\(27.5.2022\)](https://hr.strephonsays.com/primary-and-vs-secondary-metabolites-14300(27.5.2022))
  23. *What is metabolomics?-EMBL-EBI. (n.d.).* URL: [https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/the-metabolome-and-metabolic-reactions/\(26.5.2022.\)](https://www.ebi.ac.uk/training/online/courses/metabolomics-introduction/the-metabolome-and-metabolic-reactions/(26.5.2022.))
  24. *What is preeclampsia. (n.d.).* URL: [https://www.preeclampsia.org/what-is-preeclampsia\(2.6.2022\)](https://www.preeclampsia.org/what-is-preeclampsia(2.6.2022))
  25. *Wikipedia. (n.d.).* URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Urine\(20.4.2022.\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Urine(20.4.2022.))
  26. *Živković- Sermen, T.* Hlapljivi spojevi i aminokiseline u urinu oboljelih od raka testisa. **58** (2019) *Doktorska disertacija*.
  27. *Živković-Sermen, T., Brčić-Karačonji, I., Safner, T., & Pizent, A.* Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions, *Talanta*, **57**(2018), str. 537-543.
  28. Slika 1,2 Urin; URL: <https://miss7zdrava.24sata.hr/zdravlje/sedam-razloga-radi-kojih-tvoj-urin-ima-neugodan-miris-12948> (5.6.2022.)
  29. Slika 1.3 Protok informacija u stanici; URL: <https://nmrweb.chem.ox.ac.uk/metabolomics.aspx> (7.6.2022.)

30. Slika 1.5 Dijelovi plinskog kromatograma; NJ.Radić, L.Kukoč-Modun, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Split, 2016, str. 655
31. Slika 1.6 Shematski prikaz komponenti masenog spektrometra; Ana Babić, Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu osoba s rakom testisa, Diplomski rad, **58** 2019, str.11
32. Slika 1.7 Prikaz HS-SPME sustava; Ana Babić, Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu osoba s rakom testisa, Diplomski rad, **58** 2019, str. 16
33. *Morad, N., Shira, B., & Rannen, J.* Artificially Intelligent Nanoarray for the Detection of Preeclampsia under Real-World Clinical Conditions, *Advanced Materials Technologies*, **54** (2015), str. 4