

METABOLIČKA ANALIZA URINA: PRONALAZENJE BIOMARKERA PREEKLAMSIJE KORIŠTENJEM HS-SPME/GC-MS

Živalj, Patricia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:167:079716>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**

Repository / Repozitorij:

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



UNIVERSITY OF SPLIT



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**METABOLIČKA ANALIZA URINA: PRONALAZENJE BIOMARKERA
PREEKLAMPSIJE KORIŠTENJEM HS-SPME/GC-MS**

DIPLOMSKI RAD

PATRICIA ŽIVALJ

Matični broj: 168

Split, listopad 2023.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ
SMJER: ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**METABOLIČKA ANALIZA URINA: PRONALAZENJE BIOMARKERA
PREEKLAMPSIJE KORIŠTENJEM HS-SPME/GC-MS**

DIPLOMSKI RAD

**PATRICIA ŽIVALJ
Matični broj:168**

Split, listopad 2023.

**UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY
COURSE: ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**METABOLIC ANALYSIS OF URINE: DISCOVERING
PREECLAMPSIA BIOMARKERS USING HS-SPME/GC-MS**

DIPLOMA THESIS

**PATRICIA ŽIVALJ
Parent number: 168**

Split, October 2023

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD
Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet
Diplomski studij Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija
Mentor: izv. prof. dr. sc. Mila Radan

METABOLIČKA ANALIZA URINA: PRONALAZENJE BIOMARKERA PREEKLAMPSIJE KORIŠTENJEM HS-SPME/GC-MS Patricia Živalj, 168

Sažetak: Preeklampsija je bolest koja se javlja kod trudnih žena povezana s abnormalnom placentacijom koja se manifestira prvenstveno povišenim krvnim tlakom, a može se razviti ili tijekom trudnoće ili nakon nje. Može uzrokovati trajno oštećenje tkiva što dovodi do drastičnog opadanja kvalitete života i zdravlja djeteta ili majke, a u konačnici može dovesti i do njihove smrti. Nažalost, ova bolest još je nedovoljno istražena i ponekad se ne stigne primijetiti dovoljno rano da ne ostavi posljedice. Ideja ovog rada je obradom uzoraka urina zdravih trudnica i trudnica koje boluju od preeklampsije koristeći metodu HS-SPME/GC-MS, detektirati prisutne hlapljive organske spojeve. Korištenjem spektara masa i knjižnica spektara masa NIST, cilj je identificirati pojedini metabolit koji bi potencijalno mogao poslužiti kao biomarker za preeklampsiju.

Gljučne riječi: preeklampsija, hlapljivi organski spojevi, urin, HS-SPME, GC-MS

Rad sadrži: 50 stranica, 22 slike, 1 tablica, 23 priloga, 24 literaturne reference
Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Franko Burčul, predsjednik
2. doc. dr. sc. Marina Tranfić Bakić, član
3. izv. prof. dr.sc. Mila Radan, mentor

Datum obrane: 31. listopada 2023.godine

Rad je u tiskanom i elektroničkom (PDF) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu, Ruđera Boškovića 35, u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice u Splitu te u javnoj internetskoj bazi diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology

Graduate study of Organic chemistry and biochemistry

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Supervisor: Associate professor Mila Radan, PhD

METABOLIC ANALYSIS OF URINE: DISCOVERING PREECLAMPSIA BIOMARKERS USING HS-SPME/GC-MS

Patricia Živalj, 168

Abstract: Preeclampsia is a disease that occurs in pregnant women and is associated with abnormal placental development. It primarily manifests as high blood pressure and can develop during or after pregnancy. It can cause permanent tissue damage, leading to a decline in the quality of life and health of the child or mother, and ultimately may even lead to their death. Unfortunately, this disease is still insufficiently understood and sometimes goes unnoticed until it is too late to prevent its consequences. The idea of this study is to analyze urine samples from healthy pregnant women and pregnant women with preeclampsia using the HS-SPME/GC-MS method to detect volatile organic compounds. By using mass spectra and NIST-mass libraries, the goal is to identify specific metabolites that could potentially serve as biomarkers for preeclampsia.

Keywords: preeclampsia, volatile organic compounds, urine, HS-SPME, GC-MS

Thesis contains: 50 pages, 22 figures, 1 table, 23 supplements, 24 references

Original in: Croatian

Defence committee for evaluation and defense of diploma thesis:

1. Franko Burčul, PhD, Associate professor, chair person
2. Marina Tranfić Bakić, PhD, Assistant professor, member
3. Mila Radan, PhD, Associate professor, supervisor

Defence date: October 31, 2023

Printed and electronic (PDF) form of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology in Split, Ruđera Boškovića 35, in the public library database of the University of Split Library and in the digital academic archives and repositories of the National and University Library.

Diplomski rad je izrađen u Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv.prof.dr.sc. Mile Radan u razdoblju od travnja do listopada 2023.godine.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Mili Radan na razumijevanju, usmjeravanju, vrijednim savjetima i vremenu koje mi je pružila tijekom pripreme ovog rada. Posebna zahvala ide mojoj obitelji I prijateljima na podršci i pomoći za vrijeme mog školovanja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- objasniti metabolomiku i njezin značaj u dijagnostici bolesti
- objasniti pojavu preeklampsije i predložiti određivanje biomarkera za spomenutu bolest
- pomoću vezanih sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi odrediti hlapljive organske metabolite u uzorku urina trudnica s preeklampsijom
- obraditi dobivene kromatograme u svrhu utvrđivanja metaboličkog profila
- identificirati dobivene hlapljive organske metabolite
- upotrebom baze ljudskog metaboloma istražiti prisutnost identificiranih metabolita u ljudskom urinu i usporediti metabolite iz kontrolnih uzoraka s metabolitima iz bolesnih uzoraka
- izdvojiti metabolite koji su povišeni kod oboljelih žena tj. koji su potencijalni biomarkeri za preeklampsiju

SAŽETAK

Preeklampsija je bolest koja se javlja kod trudnih žena povezana s abnormalnom placentacijom koja se manifestira prvenstveno povišenim krvnim tlakom, a može se razviti ili tijekom trudnoće ili nakon nje. Može uzrokovati trajno oštećenje tkiva što dovodi do drastičnog opadanja kvalitete života i zdravlja djeteta ili majke, a u konačnici može dovesti i do njihove smrti. Nažalost, ova bolest još je nedovoljno istražena i ponekad se ne stigne primijetiti dovoljno rano da ne ostavi posljedice. Ideja ovog rada je obradom uzoraka urina zdravih trudnica i trudnica koje boluju od preeklampsije koristeći metodu HS-SPME/GC-MS, detektirati prisutne hlapljive organske spojeve. Korištenjem spektara masa i knjižnica spektara masa NIST, cilj je identificirati pojedini metabolit koji bi potencijalno mogao poslužiti kao biomarker za preeklampsiju.

Ključne riječi: preeklampsija, hlapljivi organski spojevi, urin, HS-SPME, GC-MS

ABSTRACT

Preeclampsia is a disease that occurs in pregnant women and is associated with abnormal placental development. It primarily manifests as high blood pressure and can develop during or after pregnancy. It can cause permanent tissue damage, leading to a decline in the quality of life and health of the child or mother, and ultimately may even lead to their death. Unfortunately, this disease is still insufficiently understood and sometimes goes unnoticed until it is too late to prevent its consequences. The idea of this study is to analyze urine samples from healthy pregnant women and pregnant women with preeclampsia using the HS-SPME/GC-MS method to detect volatile organic compounds. By using mass spectra and NIST-mass libraries, the goal is to identify specific metabolites that could potentially serve as biomarkers for preeclampsia.

Keywords: preeclampsia, volatile organic compounds, urine, HS-SPME, GC-MS

Sadržaj

UVOD	1
1. OPĆI DIO	3
1.1. Metabolomika	3
1.1.1. Metaboliti	5
1.2. Biomarkeri	6
1.3. Tijek studija metabolomičkog profiliranja	7
1.4. Platforme za metaboličko profiliranje temeljeno na masenoj spektrometriji	7
1.4.1. Plinska kromatografija s masenim spektrometrom (GC-MS)	8
1.4.2. Maseni spektrometar	10
1.4.3. <i>Headspace</i> mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HS-SPME)	12
1.4. Identifikacija metabolita	16
1.5. Preeklampsija	16
1.6. Urin	18
2. EKSPERIMENTALNI DIO	20
2.1. Prikupljanje uzoraka urina	20
2.2. Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (provođenje HS-SPME)	21
2.3. Analiza hlapljivih metabolita vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa	22
2.3. Pretraživanje baze ljudskog metaboza (HMDB)	23
3. REZULTATI I RASPRAVA	24
4. ZAKLJUČCI	33
5. POPIS KRATICA I SIMBOLA	35
6. LITERATURA	36

UVOD

Metabolom stanice, tkiva, organa ili organizma predstavlja potpuni skup metabolita koji su konačni produkti staničnih procesa. Metaboliti su male organske molekule s relativnom molekulskom masom manjom od 1000Da. Promjene metaboloma odraz su promjena na molekulama poput DNA i proteina uslijed djelovanja čimbenika iz okoliša.¹

Metabolomika je tehnika visokoprotočnog analitičkog profiliranja koja uključuje kvantifikaciju i identifikaciju velikog broja metabolita prisutnih u složenim biološkim uzorcima, s naglaskom na metabolite koji razlikuju patološka stanja od zdravih. Prema općoj definiciji, metabolomika sveobuhvatno proučava metaboličke procese koji se odvijaju u stanicama, tkivima, ili organizmima te pruža pregled metaboličkih mehanizama.²

Svaka vrsta stanica i tkiva ima jedinstveni metabolički "otisak prsta", figurativno rečeno, koji može rasvijetliti informacije specifične za organ ili tkivo. Metaboličko profiliranje pruža trenutni snimak fiziologije stanice, odnosno daje kvantitativnu analizu niza metabolita koji pripadaju nekoj skupini spojeva ili sudjeluju u određenim metaboličkim putevima. S obzirom na činjenicu da je svaka bolest jedinstvena, spomenute određene skupine metabolita mogu dovesti do otkrića karakterističnog potpisa bolesti po kojem se bolest može prepoznati i tako pravovremeno prionuti liječenju. Taj potpis bolesti može se mijenjati zajedno s promjenama u stanicama koje izaziva proces u tijeku, te tako odražavati zdravstveno stanje pacijenta kroz prikaz fenotipa.²

Kroz prethodno desetljeće, klinička metabolomika doživjela je svoj procvat, no razvoj nije došao iznenada ni brzo. Kroz povijest, slatkoća urina koristila se za dijagnosticiranje dijabetesa. U 1960-im godinama prošlog stoljeća, plinska kromatografija spregnuta s masenom spektrometrijom postala je uspješno korištena tehnika za dijagnosticiranje metaboličkih poremećaja. Metabolomičko područje se

značajnije razvilo prateći razvoj povećane osjetljivosti instrumenata i alata za statističku analizu pretkraj 20. stoljeća i otada se široko primjenjuje.²

U ovom radu posebno će biti istaknuta metabolomika klase metabolita koje proizvode bakterije, plijesni i ljudi te ih oslobađaju – hlapljive organske metabolite, čija je opća kratica VOM (engl. *Volatile Organic Metabolites*). Oni su zanimljivi jer predstavljaju svojevrsni biološki signal koji reflektira sumu svih utjecaja, od genetike do prehrane i bolesti.³

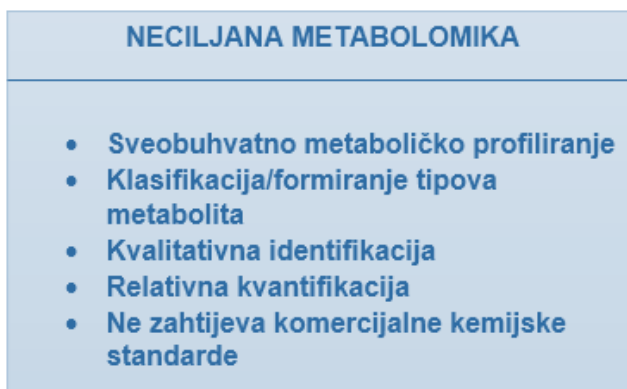
Točni biokemijski mehanizmi nastanka VOM u našem tijelu još uvijek nisu potpuno poznati. Ipak, istraživanja ukazuju na to da reaktivne kisikove vrste, nastale kao nusprodukti staničnog disanja, mogu reagirati s brojnim strukturama, poput stanične membrane, proteina, DNA, RNA te proizvesti VOM koje se emitiraju u različitim tjelesnim fluidima.³

Osim toga, VOM se mogu prevesti u druge spojeve preko enzimskih reakcija koje se odvijaju uglavnom u jetri u prisutnosti enzima CYP 450 (engl. *Cytochrome 450*). U poglavljima koja slijede raspravljat će se o rezultatima analize urina trudnica i o identificiranim metabolitima, VOM, među kojima bi se mogli naći potencijalni biomarkeri.³

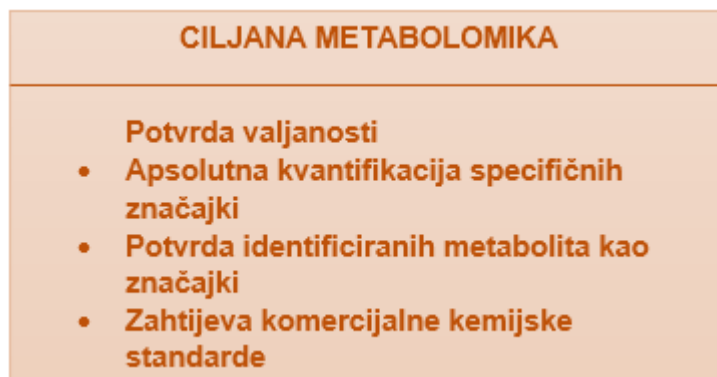
1. OPĆI DIO

1.1. Metabolomika

U uvodu je metabolomika već definirana kao tehnika za identifikaciju metabolita u svrhu dobivanja informacija o trenutnom stanju fiziologije stanice da bi se temeljeno na očitanim promjenama metabolita moglo spoznati postoje li kakvi znakovi bolesti u stanici. Ako postoje, odmah se pristupa dijagnosticiranju i pravovremenom liječenju te bolesti. Tijekom vlastitog razvoja, metabolomika se razgranala u dva smjera: u neciljanu metabolomiku koja sveobuhvatno analizira sve mjerljive analite u uzorku pa čak i one koji su nam kemijski nepoznati, i u ciljanu metabolomiku koja teži kvantitativno odrediti koncentracije prethodno definiranog seta metabolita.⁴



Slika 1.1: Karakteristike neciljane metabolomike



Slika 1.2: Karakteristike ciljane metabolomike

Prilikom istraživanja, u najvećem broju slučajeva prvo se provodi neciljano metaboličko profiliranje, a potom ciljano. Značajke obje vrste metabolomike prikazane su na slikama *Slika 1.1.* i *Slika 1.2.*

Ovaj rad predstavit će slučaj istraživanja uz korištenje neciljane metabolomike, temeljenog na masenoj spektrometriji.⁴

1.1.1. Metaboliti

Metaboliti su mali organski spojevi mase do 1500 Da i krajnji su produkti metabolizma. U metabolite spadaju različite skupine spojeva, kao što su peptidi, šećeri, aminokiseline, ketoni, aldehidi, lipidi, itd. Prisutni metaboliti predstavljaju fenotip stanice, oni su produkti genetskih i okolišnih faktora.

Metaboliti se mogu podijeliti u dvije glavne vrste: primarne metabolite i sekundarne metabolite.³

Primarni metaboliti su spojevi koji su direktno uključeni u metaboličke puteve organizma te su neophodni za rast, razvoj i reprodukciju tog organizma. Usko su povezani s fiziološkim procesima koji se odvijaju u organizmu. Produkcija primarnih metabolita počinje kada se u mediju nađu dostupne hranjive tvari potrebne tijelu. Esencijalni su za metaboličke aktivnosti poput staničnog disanja. Njihova produkcija odvija se veoma brzo jer su konstantno potrebni tijelu.³

Primarni metaboliti mogu se razvrstati u dvije skupine: esencijalni primarni metaboliti, oni uključuju spojeve poput proteina i ugljikohidrata koji su važni za strukturnu i fiziološku organizaciju organizma, te krajnji primarni metabolički proizvodi, koji uključuju primjerice mliječnu kiselinu, i koji su konačni produkti nekog metaboličkog puta.

Sekundarni metaboliti su spojevi koji nisu direktno u vezi s rastom, razvojem i reprodukcijom organizma, ali su bitni za druge funkcije. Njihova prisutnost nije potrebna za preživljavanje organizma, ali je potrebna za zaštitu, kompeticiju i interakciju između različitih vrsta.³

S biološkog stajališta, metaboliti koji sudjeluju u velikom broju različitih metaboličkih puteva zovu se opći metaboliti. S druge strane, ako metaboliti sudjeluju samo u nekoliko metaboličkih puteva, nazivaju se specifičnim metabolitima. Specifični su metaboliti izrazito važni jer oni više govore o tome koja je bolest u pitanju. Također, ako se prilikom identifikacije oslanja na specifične metabolite, metoda će biti pouzdanija i bit će manje lažnih pozitivnih vrijednosti.

1.2. Biomarkeri

Biomarkeri su kemijski spojevi mjerljivi u biološkim sustavima koji su pokazatelji nekih bioloških stanja, odnosno koji indiciraju je li proces koji se odvija normalan biološki proces, patološki ili farmakološki.

Parametri koji su značajni za izvedbu testa biomarkerima su:

- osjetljivost,
- specifičnost,
- pozitivnu predvidljivu vrijednost,
- negativnu predvidljivu vrijednost.

Unatoč tome što teoretski rezultati govore drukčije, u praksi nijedan test biomarkerima nema besprijekornu kliničku i analitičku osjetljivost i specifičnost. Kako bi se potkrijepila ta tvrdnja, nudi se sljedeći primjer. Uzeto je istraživanje uzroka krvi za dijagnozu hepatocelularnog karcinoma. Obilježje te bolesti je povišena koncentracija prisutnog alfa-fetoproteina (AFP) u krvi. Ipak, povišena koncentracija ne znači nužno da je nastupio hepatocelularni karcinom, jer je to ujedno i fetalni antigen i postoji i kod ciroze jetre i kod ostalih bolesti jetre, pa prisutnost tog spoja nije sigurna potvrda kliničkog stanja.⁴

Uzevši u obzir brojne procese koji mogu izazvati bolesti, za detekciju je bolje koristiti panele biomarkera koji se sastoje od različitih komponenti nego pojedinačne biomarkere. Paneli su dosad pokazali bolju osjetljivost i selektivnost.

Nažalost, usprkos procvatu metabolomike, javljaju se teškoće prilikom replikacije podataka dobivenih mjerenjima biomarkera, a uzroci su sljedeći:

- teško je obuhvatiti skupine ljudi koje su dovoljno velike i različite po porijeklu, rodu, geografskom položaju, itd. Prilikom istraživanja, valja podijeliti skupinu na pokusnu i kontrolnu skupinu.
- korištenje različitih tehnika i različitih metoda obrade podataka dovodi do različitih rezultata.

Potreban je izniman trud pri stvaranju velikih baza podataka i standardizacije tijekom rada metabolomike.

1.3. Tijek studija metabolomičkog profiliranja

Istraživanje metabolomike odvija se kroz nekolicinu glavnih koraka koji su navedeni redom i objašnjeni:

1. uzimanje uzoraka
 - potrebno je uzeti i kontrolne i pokusne uzroke,
2. priprema uzoraka za analizu
 - većinu uzoraka potrebno je predobraditi prije podvrgavanja samoj analizi, npr. derivatizacija,
3. identifikacija metabolita
 - pomoću jedne ili više tehnika temeljenih na GC-MS analiza podataka,
4. interpretacija podataka.

1.4. Platforme za metaboličko profiliranje temeljeno na masenoj spektrometriji

U ovom paragrafu prikazana je usporedba prednosti i nedostataka glavnih MS platformi za neciljanu metabolomiku.

- Tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom je najšire korištena tehnika, zahvaljujući brojnim faktorima, među kojima je činjenica da se radi o ionizacijskoj tehnici pri čemu se mogu varirati i stacionarna i mobilna faza. Sve češće se koristi spregnuta tehnika reverzno-fazna tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti – UPLC-MS (engl. *Ultra-Performance Liquid Chromatography*), zbog robusne stacionarne faze i sposobnosti otapanja nepolarnih metabolita. Kao prednosti ove tehnike navode se izvrsna rezolucija i preciznost mase. Ipak, tehnika ima i neke mane: podliježe fluktuaciji retencijskog vremena, pati od nedostatka opsežnih spektralnih baza podataka za identifikaciju metabolita.⁴
- Plinska kromatografija s masenom spektrometrijom – GC-MS, (engl. *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*) je najstarija tehnika spregnuta s MS i

ima dosta prednosti pred LC-MS (engl. *Liquid Chromatography*), a neke od tih prednosti su: reproducibilnija retencijska vremena, veći spektar masa, preciznije i učinkovitije identifikacije metabolita postignute podudaranjem s podacima iz spektralne baze podataka. Kao nedostatak tehnike navodi se: nemogućnost određivanja nehlapljivih spojeva.⁴

1.4.1. Plinska kromatografija s masenim spektrometrom (GC-MS)

Kromatografija je fizikalna metoda razdvajanja koja se temelji na raspodjeli sastojaka između dviju faza – mobilne i fiksne, koje se međusobno ne miješaju. Uzorak koji se analizira mora biti topljiv u mobilnoj fazi da bi se mogao protječući s njom kretati duž fiksne kolone (ako je u pitanju kolonska kromatografija) ili duž čvrste podloge (ako je riječ o plošnoj kromatografiji). Mobilna faza može biti u tekućem ili plinovitom stanju. Agregatno stanje mobilne faze jedna je od osnova za klasificiranje kromatografskih tehnika, a na temelju agregatnog stanja kromatografske tehnike mogu se razvrstati na:

- plinsku kromatografiju – mobilna faza je inertni plin,
- tekućinsku kromatografiju – mobilna faza je tekućina niske viskoznosti,
- fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima – mobilna faza je fluid koji se nalazi iznad svoje kritične temperature i tlaka.

Osim prema agregatnom stanju mobilne faze, kromatografske tehnike mogu se razvrstati i na osnovu prirode ravnoteže između mobilne i fiksne faze:

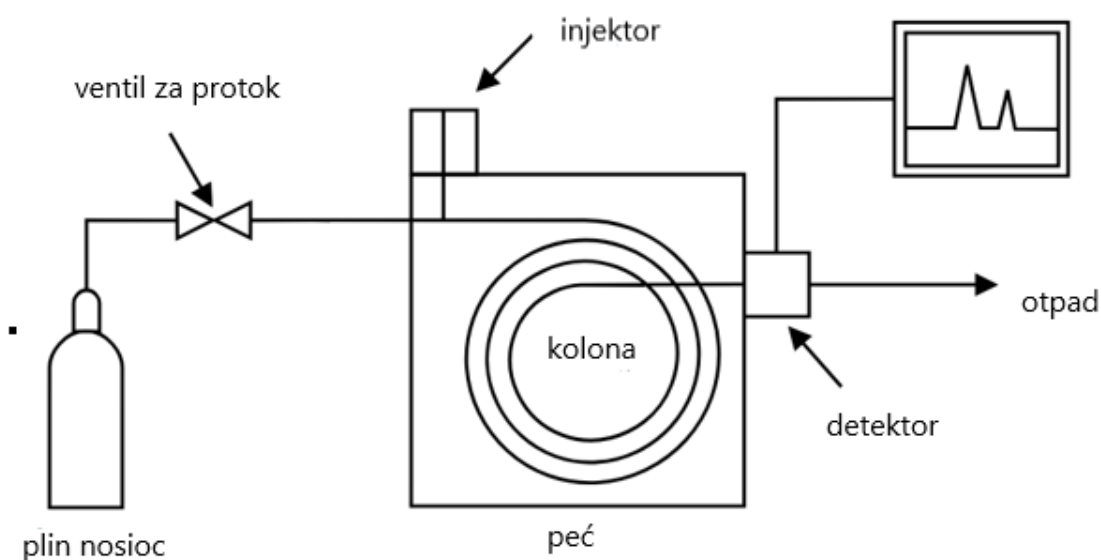
- adsorpcijska kromatografija,
- razdjelna kromatografija,
- afinitetna kromatografija,
- kromatografija isključivanjem,
- kromatografija ionskom izmjenom.⁵

U eksperimentu koji je tema ovog rada koristila se tehnika plinske kromatografije (spregnuta s masenim spektrometrom). Plinska kromatografija se koristi obično za

analizu smjese hlapljivih i poluhlapljivih spojeva. Snaga ove tehnike je u kombinaciji iznimne sposobnosti razlučivanja s brzinom i osjetljivošću.

Osnovni dijelovi plinskog kromatografa (*Slika 1.3*) su:

- izvor stalne struje plina nosioca,
- injektor,
- termostatirana kolona,
- detektor,
- uređaj za obradu podataka.



Slika 1.3: Shema plinskog kromatografa s njegovim osnovnim dijelovima

Kao plin nosioc obično se koriste inertni plinovi velike čistoće kao što su helij, dušik, argon ili vodik, koji se nalaze pod velikim tlakom u boci. Prilikom odabira plina nosioca, gleda se tip detektora i vrsta uzorka koji se analizira, te je važno da je plin nosioc inertan prema uzorku i prema fiksnoj fazi.

Sami proces ove analize odvija se tako da se uzorak unese u struju plina nosioca tj. injektira se u instrument. Injektiranje se može vršiti ručno ili automatski pomoću

instrumenta (engl. *Autosampler*) Jednom injektiran u instrument, uzorak ulazi u struju plina nosioca koji ga prenosi do kolone. Kapilarne kolone su najdjelotvornije. Na koloni se vrši razdvajanje različitih komponenti koje se potom ispiru s kolone i daju odziv na detektoru. Detektor ispisiuje zapise iz kojih je moguće kvalitativno i kvantitativno određivanje eluiranih sastojaka uzorka.³

Usporedbom retencijskih vremena analita i standarda te usporedbom pikova pri istim retencijskim vremenima, dobije se identitet spoja odnosno kvalitativni signal. Površina ispod krivulje daje kvantitativni signal.

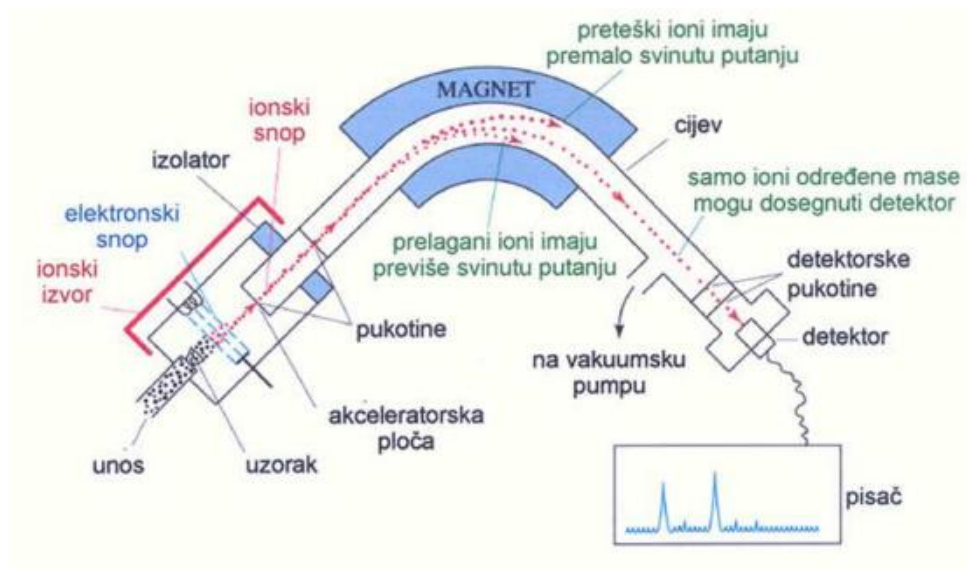
1.4.2. Maseni spektrometar

Masena spektrometrija (MS) je analitička tehnika koja služi za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju spojeva iz uzorka mjerenjem omjera mase i naboja plinske faze. Temelji se na fragmentaciji molekula pod djelovanjem snopa elektrona. Princip rada (*Slika 1.4*) svodi se na to da se uzorak uvodi u instrument u ionizator. U ionizatoru se nalaze po dvije elektrode - anoda i katoda, a između njih protječe elektronska struja visokog napona i energije. Ti elektroni bombardiraju molekulu analita i izbijaju elektron iz njih, tako da nastane pozitivno nabijeni ion. Poslije ionizacije, kationi odlaze kroz akcelerator iona te se fokusiraju u uski snop i ubrzavaju do magnetskog analizatora. Tu upotrebom električnih i magnetskih polja dolazi do razlikovanja iona prema omjeru mase i naboja. Propuštaju se ioni točno određenih m/z i odlaze na detektor. Dobije se odziv u obliku spektra masa – grafičkog prikaza ovisnosti intenziteta iona o omjeru m/z . Spektar masa karakterističan je za svaki pojedini uzorak pa se zato zove "molekulski otisak prsta".

Glavni dijelovi spektrometra masa su:

- ionski izvor,
- analizator masa,
- detektor.

Nužno je osigurati da je sustav u vakuumu kako ne bi došlo do reakcije između molekula uzorka i zraka, odnosno da ne bi došlo do nastajanja neželjenih produkata.



Slika 1.4: Shematski prikaz masenog spektrometra

Najčešće se koristi ionizacija elektronima, posebice za ionizaciju hlapljivih, termički stabilnih molekula u plinskoj fazi. Ionski izvor je zapravo volframova žica koja, kad se zagrije, emitira elektrone. Elektroni koji nastaju zapravo se proizvode akcelerirani razlikom potencijala između katode i anode 70 eV. Dolazi do sudara s molekulama analita, nastaju ioni i oni se dalje usmjeravaju prema detektoru.

Osim ionizacije elektronima, može se koristiti još i kemijska ionizacija, ona se koristi u slučajevima ionizacije manje polarnih, hlapljivih molekula stabilnih pri visokoj temperaturi. U ovoj vrsti kromatografije, kao plinovi nosioci najčešće se koriste metan, izobutan i amonijak.³

Vrste analizatora masa korištenih u masenoj spektroskopiji su sljedeće:

- kvadrupolni,
- sektorski,
- ionska stupica,
- Fourier-transformirana spektrometrija masa,
- Orbitrap,
- analizator mase vremena leta.

Ipak najčešće se koristi kvadrupolni maseni analizator koji je baziran na principu stabilne putanje iona određenog omjera mase i naboja.

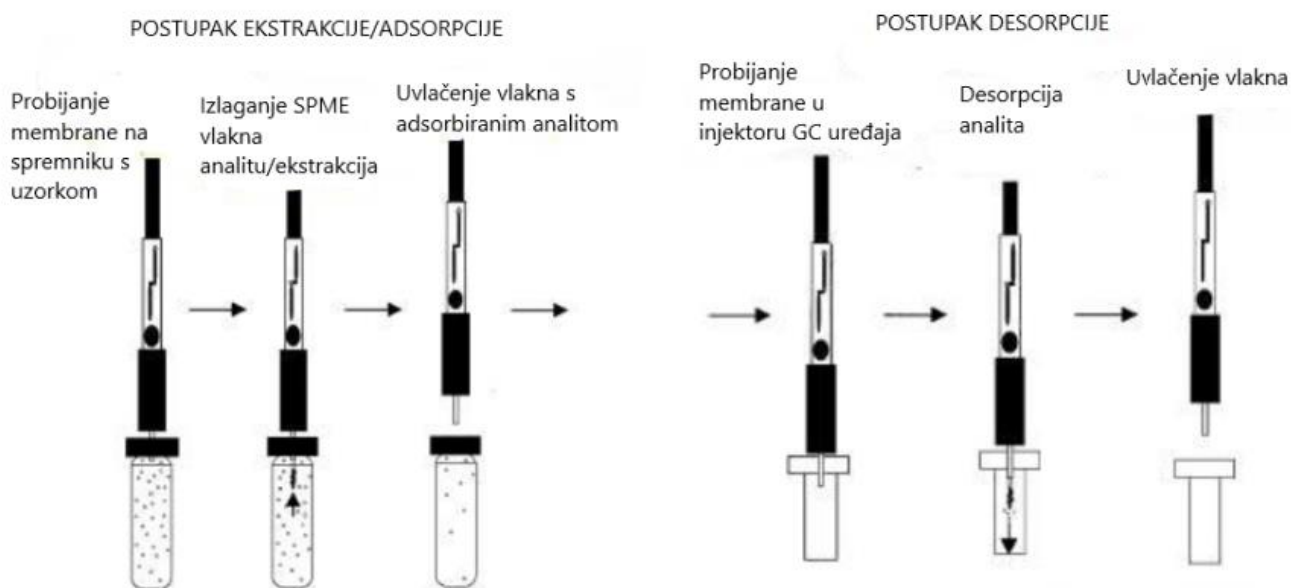
1.4.3. *Headspace* mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (HS-SPME)

Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi ili SPME (engl. *Solid phase microextraction*) je osjetljiva i inovativna tehnologija pripreme uzorka bez otapala. SPME je uveo J. Pawliszyn 1987.godine, što se može smatrati početkom novog pristupa u pripremi bioanalitičkih uzoraka budući da se uzorkovanje, ekstrakcija i ukoncentriravanje analita provode u jednom koraku.⁷ Na temelju principa adsorpcije/apsorpcije i desorpcije, ova tehnika koristi vlakno obloženo adsorbensom, najčešće silikagelom ili polimerom, za koncentriranje hlapljivih i poluhlapljivih spojeva iz promatranog uzorka. Koncentriranje se provodi na način da se vlakno uvodi u uzorak te se u njemu zadrži neko vrijeme dok se ne zasiti hlapljivim analitima. Svako vlakno ima vlastiti kapacitet apsorpcije koji, međuostalim, ovisi i o vrsti sorbensa koji oblaže vlakno i o vremenu kontakta između vlakna i uzorka. Jedan od ključnih čimbenika zbog kojih je tehnika našla tako široku primjenu u ispitivanjima je njezina kompatibilnost s naprednim instrumentalnim tehnikama poput GC-MS.⁷ SPME je korišten za razne svrhe, međuostalim i za uzorke iz okoliša, uzorke iz medicine, hranu i piće. Još jedna od prednosti ove tehnike je što nije potrebno otapalo, čime je automatski smanjeno onečišćenje okoliša, a i gubitak metabolita.

Tehnika HS-SPME (engl. *Headspace solid phase microextraction*) je osjetljivija nego klasična ekstrakcija zbog velikog kapaciteta vlakna preko kojeg se provodi ekstrakcija. Za razliku od SPME, kod HS-SPME nije u direktnom kontaktu s uzrokom već je u doticaju s plinovitim analitima iz uzorka koji, uslijed zagrijavanja bočice u kojoj se nalazi uzorak, ishlape u prostor iznad uzorka koji se zove *headspace*. Da bi se ispravno provodila HS-SPME, potrebno je imati zatvoren sustav s određenom temperaturom i vremenom trajanja ekstrakcije. Vlakno je napravljeno uglavnom od silikagela i obloženo adsorbensom. Vlakno se izloži uzorku u *headspace* prostoru određeno točno poznato vrijeme i kad se lako hlapljivi spojevi adsorbiraju na vlakno,

ono se izvuče iz otopine s uzorkom i njegov sadržaj se injektira u plinski kromatograf i ide na analizu.³

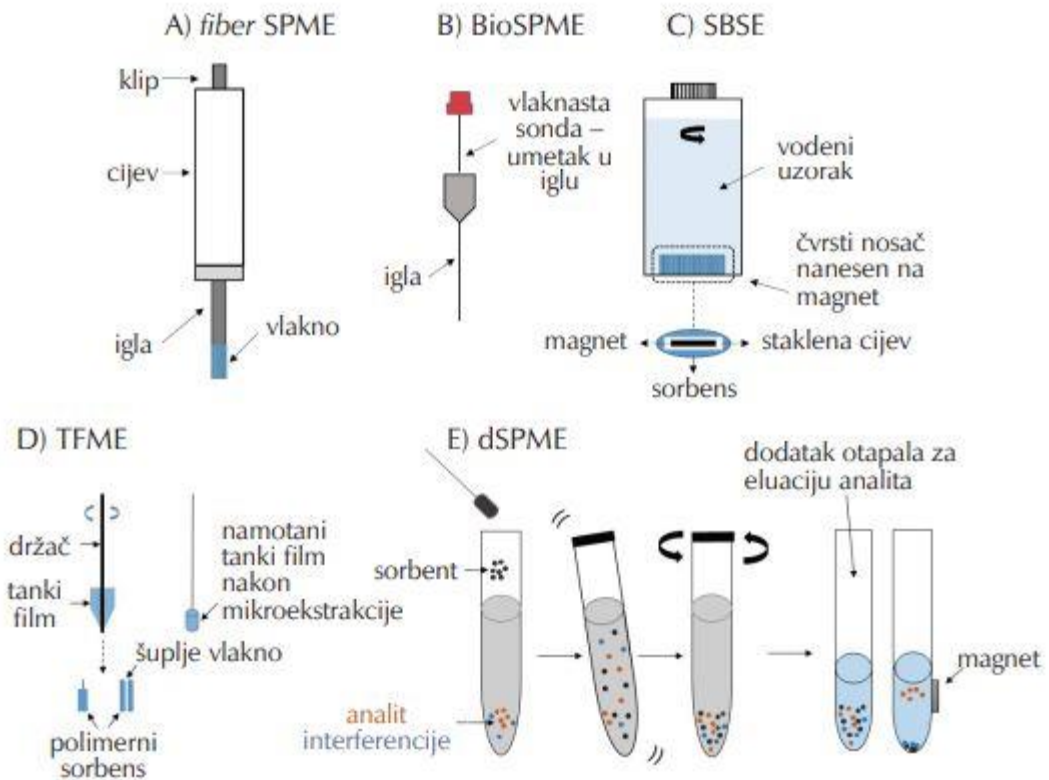
Slika 1.5 prikazuje shemu HS-SPME sustava.



Slika 1.5: Shema HS-SPME sustava

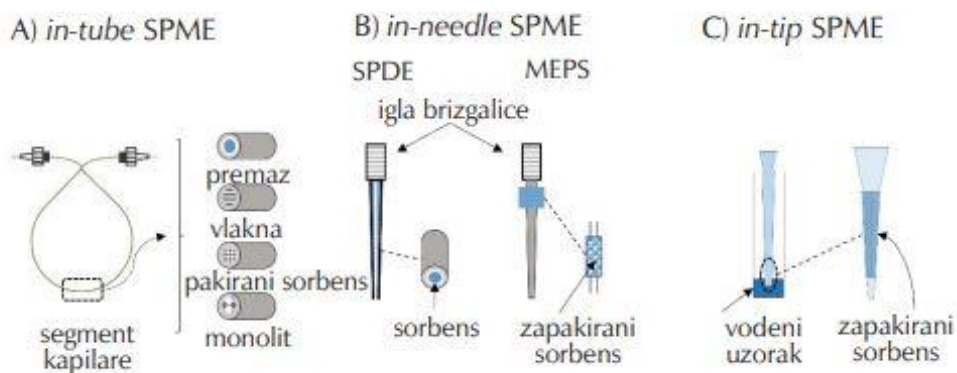
Tehnika SPME može se klasificirati na temelju mehanizma difuzije na:

- Tehnike SPME posredovane miješanjem = statičke tehnike (Slika 1.6):
 - *Fiber* SPME – čvrsti nosač u obliku vlakna
 - *Bio* SPME – modifikacija *fiber*-SPME prilagođena za *in vivo* monitoriranje koncentracije lijekova
 - SBSE(engl.. *Stir bar sorptive microextraction*) – čvrsti nosač smješten je na magnetu u obliku tankog filma
 - TFME (engl.. *Thin-film* SPME) – čvrsti nosač u obliku tankog filma
 - *d*SPME (engl.. *Dispersive solid-phase microextraction*) – čvrsti nosač je u obliku praška.⁹



Slika 1.6: Klasifikacija tehnika SPME posredovane miješanjem

- Tehnike SPME posredovane protokom (Slika 1.7):
 - *in-tube* SPME – čvrsta faza je u kapilari
 - *in-needle* SPME – čvrsta faza smještena u igli; može biti SPDE (engl.. *Solid-phase dynamic microextraction*) - unutrašnja stijenka igle obložena je čvrstom tvari- i MPSE (engl.. *Microextraction by packed sorbent*) - čvrsta tvar smještena je unutar spremnika igle
 - *in-tip* SPME – čvrsta faza je u nastavku za automatske pipete



Slika 1.7: Klasifikacija tehnika SPME posredovane protokom

U eksperimentu ovog diplomskog rada korišten je tip tehnike *fiber*-SPME tj. ekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno.

Glavni dio je igla brizgalice unutar koje se nalazi vlakno obloženo sorbensom.

Ekstrakcijski postupak počinje postavljanjem vlakna u uzorak te raspodjelom analita između uzorka i sorbensa. Budući da je vlakno izloženo direktno tekućem uzorku i to iznad povišene temperature, riječ je o *headspace*-SPME (HS-SPME) tehnici. Nakon postizanja ravnotežne raspodjele analita, vlakno se uklanja iz uzorka i započinje s desorpcijom analita sa sorbensa koja se provodi termalno.

Ključni faktori zbog kojih je *fiber*-SPME ušla u široku primjenu u bioanalitici su sljedeći: jednostavnost, brzina izvođenja, mogućnost automatizacije te dostupnost raznovrsnih sorbensa – najčešći sorbensi su modificirani silikagel, polimeri, materijali na bazi ugljika itd.

Zbog ograničenja u upotrebi, poput fizičke i kemijske nestabilnosti pri visokim pH, niskog kapaciteta i ograničene ponovne upotrebe tih konvencionalnih sorbensa, posljednjih godina provode se brojna istraživanja ne bi li se razvila inovativna vlakna, ponajprije s ciljem povećanja selektivnosti ekstrakcijske učinkovitosti postupka *fiber*-SPME.^{10,11}

1.4. Identifikacija metabolita

Identifikacija spojeva s GC-MS je jednostavnija i preciznija u odnosu na druge MS-metode, što je rezultat dobre reproducibilnosti masenog spektra elektronske ionizacije i vremena zadržavanja GC-MS.

Ipak, identifikacija spojeva s GC-MS nije lagan zadatak. Često su pikovi identificirani samo preko podudarnosti sa spektralnom knjižnicom. To može navesti na krivi trag, posebno kad su u pitanju izomeri.

Kako bi se što više smanjila mogućnost takve pogreške, preporučuje se uvijek vršiti duplu provjeru: osim samih pikova, treba usporediti i retencijska vremena pikova za spojeve koje se promatra.¹³

1.5. Preeklampsija

Normalna trudnoća je niz privremenih precizno upravljanih i složenih tjelesnih događaja, koji uključuju decidualizaciju (proces transformacije stanica fibroblasta endometrija u decidualne stanice pod utjecajem implantirane blastocite), placentaciju (formiranje posteljice) te partum (porod).¹⁴

Kronološki prijelazi su ključni za normalnu trudnoću te svaka promjena može ostaviti posljedice na zdravlje majke i fetusa.

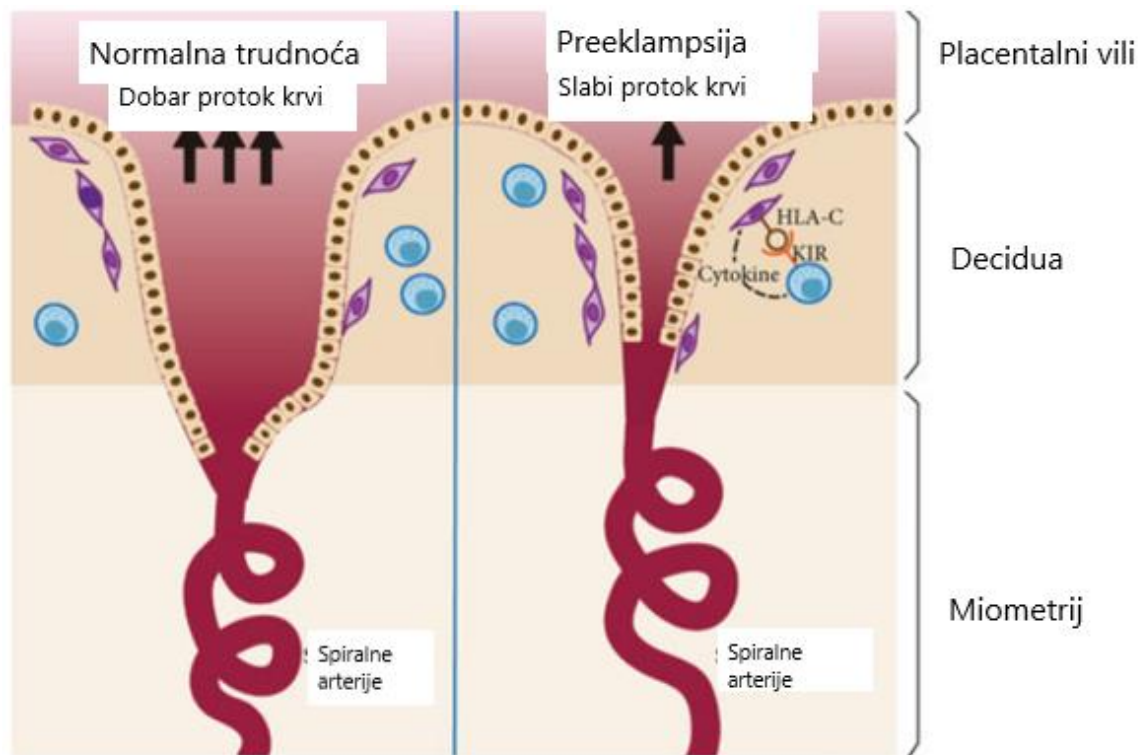
Dobro je poznato da trudnoća povećava oksidacijski stres, fenomen upravljan normalnim upalnim odgovorom sustava, što rezultira velikim količinama cirkulirajućih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Glavni izvor reaktivnih kisikovih vrsta tijekom trudnoće je posteljica. S obzirom na to, povećani oksidacijski stres u trudnoći mogao bi dovesti do oštećenja tkiva. No, taj povećani oksidacijski stres uravnotežen je povećanom sintezom antioksidansa. Ali ako oksidacijski stres nadmašuje/nadjačava antioksidacijsku obranu u posteljici, oksidativno oštećenje moglo bi se proširiti na udaljenija tkiva.¹⁵

U tim uvjetima se može javiti preeklampsija, bolest, odnosno poremećaj, kod trudnih žena povezan s abnormalnom placentacijom koji se manifestira prvenstveno povišenim krvnim tlakom, a može se razviti ili tijekom trudnoće ili nakon nje. Često

je povezan i s proteinurijom (medicinsko stanje karakterizirano prisutnošću neobično visoke količine proteina u urinu), smanjenjem crvenih krvnih stanica, problemima s bubrežima i jetrom, tekućinom u plućima, zamagljenim vidom, problemima s mozgom i napadajima. Najčešće se dijagnosticira otkrivanjem visokog krvnog tlaka trudnice oko 20. tjedna trudnoće, koji doseže i preko 140/90 mmHg. Preeklampsija je bolest specifična za ljudsku vrstu tijekom trudnoće.¹⁶

Dolazi do sužavanja krvnih žila što otežava normalan protok krvi i zato dolazi do povišenog krvnog tlaka. Slijedno tome, smanjuje se i protok krvi kroz posteljicu što može uzrokovati nedostatak kisika i hranjivih tvari za nerođeno dijete.

Opisani procesi prikazani su na fotografiji *Slika 1.7*.



Slika 1.7: Objašnjenje preeklampsije

Američki institut ginekologa (engl. ACOG – American College of Obstetricians and Gynecologists) objavio je istraživanje prema kojem dijagnoza preeklampsije više ne ovisi nužno o otkrivanju visoke razine proteina u mokraći, dokazali su da se problemi s drugim organima vezano za preeklampsiju, npr. s bubrežima i jetrom, mogu javiti

bez pojave znakova proteinurije. Budući da se više ne treba držati strogo naputaka za dijagnosticiranje na temelju krvnog tlaka i proteina u mokraći, nametnulo se pitanje na koji način pouzdanije i što ranije dijagnosticirati preeklampsiju. Upravo je ta ideja bila polazna misao vodilja za ovaj diplomski rad.

Također postoje istraživanja o tome da preeklampsija utječe na tek 5-8 % svih porođaja u Sjedinjenim Američkim Državama, većina žena rodi zdravu bebu i uspije se oporaviti, ali ipak tu je ostatak koji nema toliko sreće. Neke od tih žena dožive komplikacije, pa čak opasne po život trudnice ili djeteta.³

1.6. Urin

Urin ili mokraća je naziv za svjetložutu tekućinu koja služi za izlučivanje štetnih tvari iz organizma, uz istovremeno rješavanje viška tekućine. U principu, preko urina se izlučuju sve tvari koje čovjek unese u organizam, a ne uspiju se apsorbirati.

Stoljećima je već organoleptička analiza urina olakšavala dijagnosticiranje bolesti, a najkarakterističniji primjeri su specifičan miris urina prisutan kod dijabetesa i infekcija mokraćnog sustava. Analiza urina je danas, uz analizu krvi, najčešća vrsta analize pri dijagnostici jer se njom lako otkriju razni metabolički problemi i bolesti.

Kod zdravog čovjeka urin je svjetložute boje. Tamna boja ili krv već na prvi pogled pokazuje da postoji određeni poremećaj. Urin igra i važnu ulogu u Zemljinom ciklusu kruženja dušika, budući da su većina sastojaka urina upravo dušikovi spojevi. U uravnoteženim ekosustavima urin gnoji tlo i tako pomaže biljkama rast, zato se i može koristiti kao gnojivo.

Dugo vremena, istraživači su smatrali urin omiljenim biofluidom zbog činjenice da je sterilan i lako se dobiva u velikim količinama. VOM mogu biti detektirani u višim koncentracijama budući da je urin relativno manje složen, pa je prisutno manje ometajućih spojeva tj. interferencija u odnosu na npr. krv. No, bilo kako bilo, specifični kemizam urina u kojem su sabrane sve otpadne tvari tijela, i to razgradni metaboliti iz velikog spektra hrane, pića, lijekova, produkata bakterija itd., učinio ga je teškim supstratom za potpuno razumijevanje.

U svrhu poboljšanog razumijevanja urina, poduzeta je sveobuhvatna kvantitativna karakterizacija cijelog ljudskog metaboloma u urinu. Također je bila uključena i iscrpna kompjuterski potpomognuta pretraga literature i sveobuhvatna eksperimentalna procjena.

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Prikupljanje uzoraka urina

Uzorci urina za analizu prikupljeni su od 8 zdravih trudnica te 19 trudnica koje su tijekom trudnoće razvile preeklampsiju. Ispitanice su prethodno bile pravovaljano informirane o namjeni istraživanja te su dale svoj pismeni pristanak za provođenje samog istraživanja.

Prilikom provođenja istraživanja postupalo se u skladu s uobičajenim standardnim etičkim načelima u biomedicinskim istraživanjima.

U plastične posude bez ftalata (*Slika 2.1*) prikupljen je jutarnji urin srednjeg mlaza. Kako bi spriječili gubitak hlapljivih metabolita i zaštitili uzorak, bočice su napunjene što više i dobro začepljene. Uzorci su pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do korištenja.



Slika 2.1: Prikupljanje uzorka urina

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

U postupku mikroekstrakcije dodano je 0,2 mL 25 M sumporne kiseline u 1 mL urina u *headspace* bočice od 10 mL. Bočice su zatvorene septumom i aluminijskim čepom.

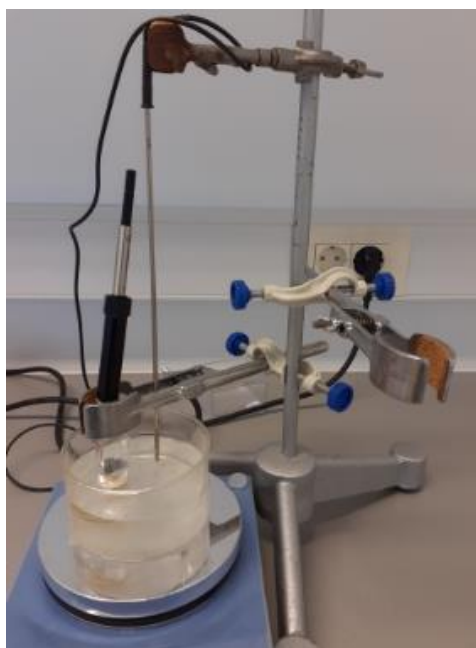
Nakon mućkanja (ručno ili vortexom kroz 10 sekundi otprilike) uzorak urina stavi se na inkubaciju na termoblok pri 60 °C u trajanju od 30 minuta.

Kad se uspostavi ravnoteža između tekuće i plinovite faze, septum se probuši SPME-iglom (*Slika 2.2*) kako bi se moglo izvući vlakno i izložiti ga plinovitoj fazi iznad uzorka.

Ostavi se 20 minuta da se hlapljivi spojevi adsorbiraju na SPME vlakno.

Potom se vlakno uvuče natrag u iglu dok se prenese u injektor plinskog kromatografa gdje se vrši desorpcija s vlakna na 220 °C tijekom 5 minuta.

Prilikom završetka rada sa SPME vlaknom, obavezno ostaviti vlakno da se ohladi prije spremanja.



Slika 2.2: Aparatura za adsorpciju uzorka na sivo SPME vlakno

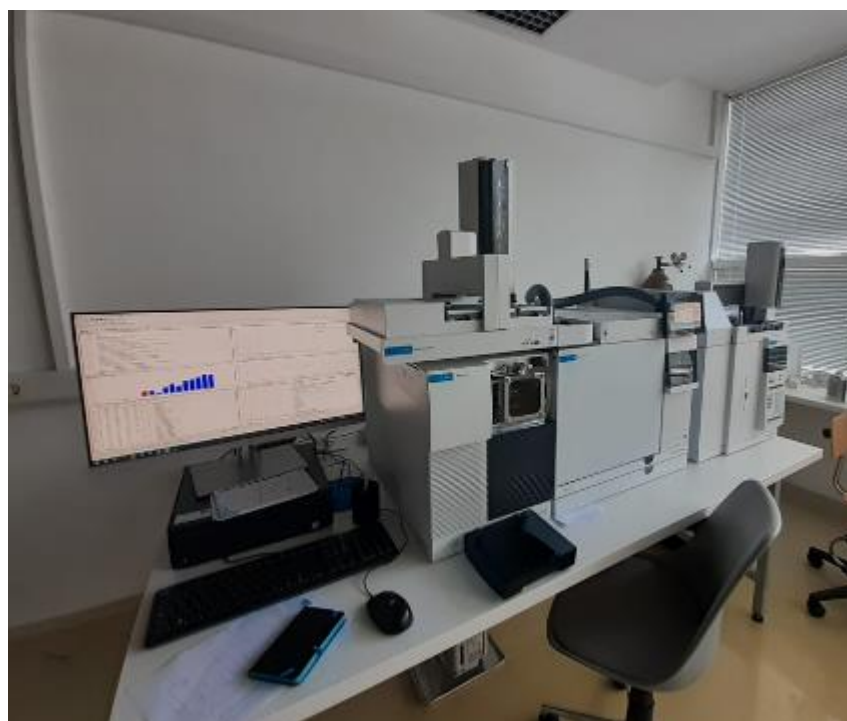
2.3. Analiza hlapljivih metabolita vezanim sustavom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa

Analiza hlapljivih metabolita provodila se na plinskom kromatografu (*Slika 2.3*) modela 8890 GC i trostrukom kvadrupolnom spektrometru masa 7000 D (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, SAD). Za odjeljivanje spojeva korištena je nepolarna kolona HP5MS (30m x 0,25 mm, 0,25 μ m debljina fiksne faze, Agilent, CA, SAD) sa stacionarnom fazom.³

Za mobilnu fazu korišten je helij protoka 1 mL po minuti. Temperatura injektora bila je 280 °C. U pećnici se temperatura na početku održavala na 40 °C tijekom 2 minute, a zatim se povisila na 180 °C postupnim zagrijavanjem po 5 °C u minuti. Nakon toga temperatura se povisila na konačnih 220 °C.

Analiza je trajala 42 minute.

Radni uvjeti za spektrometar masa obuhvaćaju 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 .

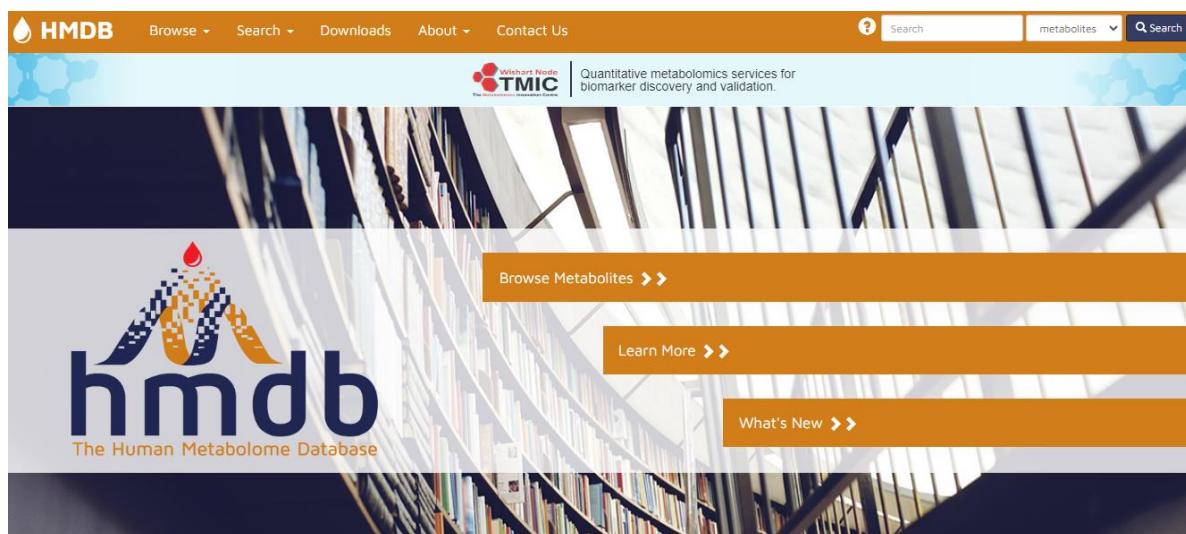


Slika 2.3: GC-MS uređaj

2.3. Pretraživanje baze ljudskog metaboza (HMDB)

Napravljen je metabolomički profil hlapljivih metabolita u urinu te je svaki pojedini metabolit pretražen u bazi ljudskog metaboloma HMDB (engl. *Human metabolome database*). HMDB je besplatna, dostupna baza podataka (Slika 2.4) koja sadrži detaljne informacije o identificiranim metabolitima malih molekula koje se nalaze u ljudskom tijelu.

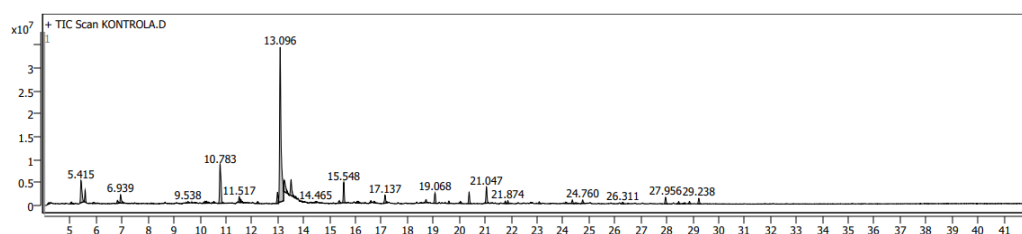
Osim navedenog, HMDB omogućava uvid u dostupne kemijske, biomolekulske, kliničke podatke o svakom identificiranom metabolitu, što zapravo uključuje podrijetlo i ulogu metabolita i organizma.



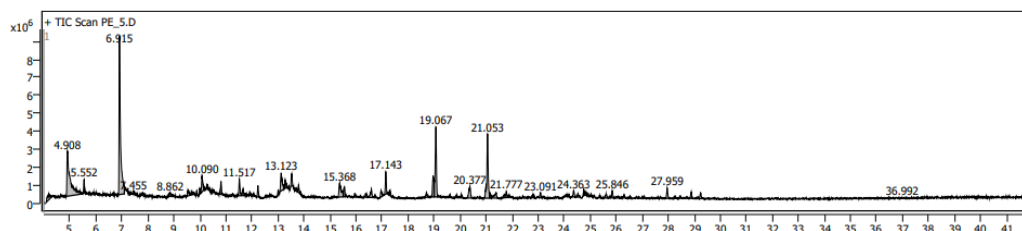
Slika 2.4: Sučelje HMDB baze podataka

3. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom opisanom istraživanju provedena je identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu kontrolne skupine trudnih žena koje boluju od preeklampsije i u urinu skupine zdravih žena s ciljem metaboličkog profiliranja. Analiza urina pomoću HS-SPME GC-MS rezultirala je detekcijom 925 metabolita u svim uzorcima i dala je kromatograme prikazane na slikama *Slika 3.1* i *Slika 3.2*.



Slika 3.1: Primjer kromatograma analiziranog uzorka urina zdrave trudnice

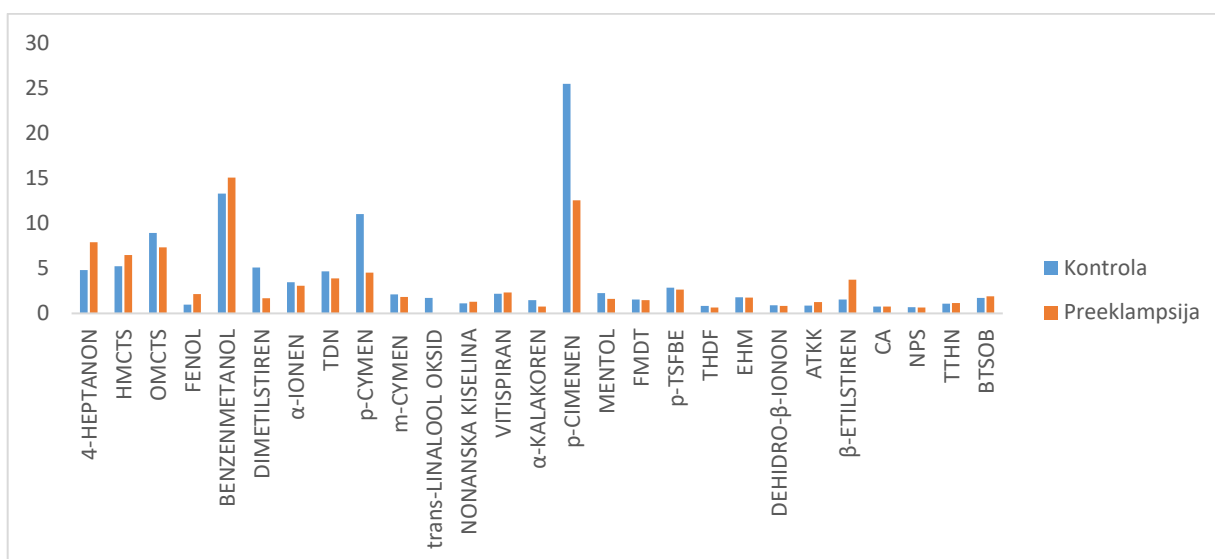


Slika 3.2: Primjer kromatograma analiziranog uzorka urina trudnice s preeklampsijom

Nepoznati metaboliti u uzorku identificirani su uz pomoć pripadajuće knjižnice spektara masa NIST (engl. *National Institute of Standards and Technology, USA*). Za većinu metabolita koji su uspješno identificirani, nije poznato porijeklo i njihova fiziološka funkcija, što je nerijetka pojava kad se uzme u obzir da je riječ o urinu čiji je sastav kompleksan, kao što je prethodno navedeno u radu. Pretragom literature,

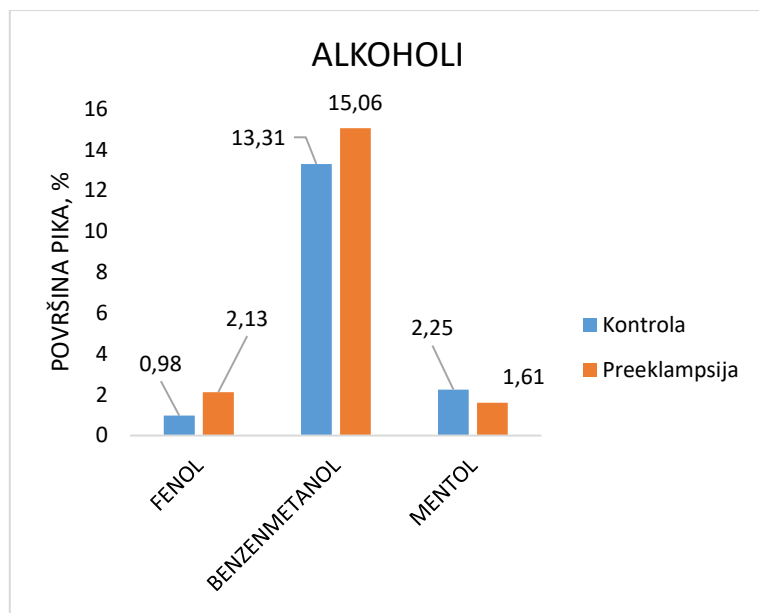
posebice HMDB, otkriveno je 27 prisutnih i zastupljenih metabolita u urinu. Izvršena je deskriptivna statistika te su podaci podvrgnuti ANOVA metodi. ANOVA metoda (engl. *Analysis of Variance*) koristi se za usporedbu nekoliko grupa istovremeno upotrebom varijance te služi za usporedbu nekoliko kohorta istovremeno na temelju jedne varijable, čime se svrstava u metode univarijatne analize.

Od ukupno 27 izabranih identificiranih metabolita dva su ketona (7,4%), jedan je aldehid (3,7%), tri su alkohola (11,1%), tri su organosilikona (11,1%), dva su terpena (7,4%), tri su benzena (11,1%), dva su stirena (7,4%), tri su policiklička aromatska ugljikovodika (11,1%), te preostalih osam spojeva zajedno čini 29,7 %.

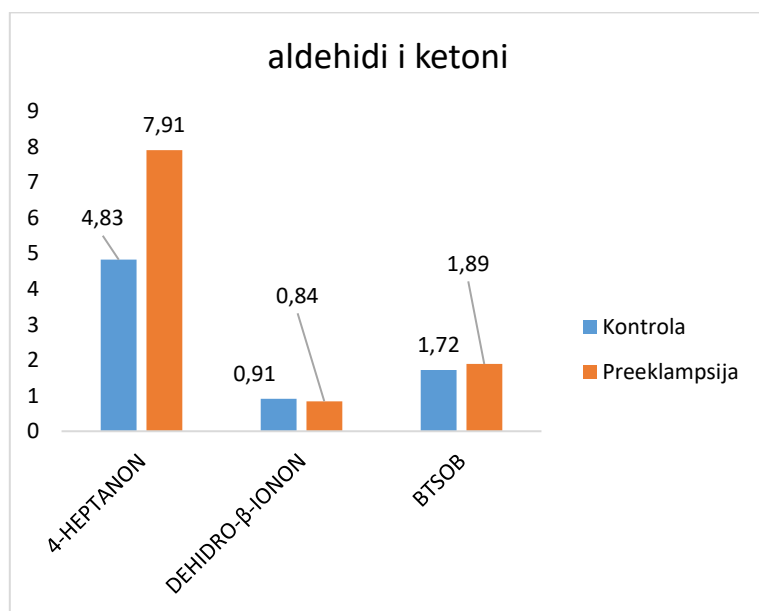


Slika 3.3: Grafički prikaz svih metabolita identificiranih u uzorcima urina trudnica. Potpuni nazivi pojedinih metabolita čiji su nazivi zbog jednostavnosti prikazivanja navedeni kraticom mogu se naći na str.35 u poglavlju 5. Popis kratica i simbola

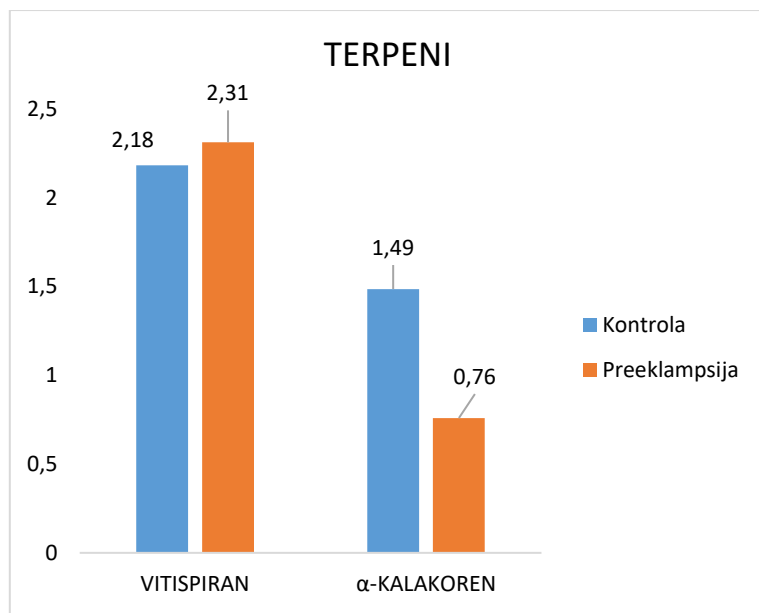
Dobiveni podaci prikazani su u skupnom grafikonu (Slika 3.3) te u sljedećim grafikonima u kojima su zbog jednostavnosti prikaza spojevi klasificirani po funkcijskim skupinama. Kratice naziva spojeva objašnjene u opisu slike Slika 3.3 koristit će se i u sljedećim grafikonima.



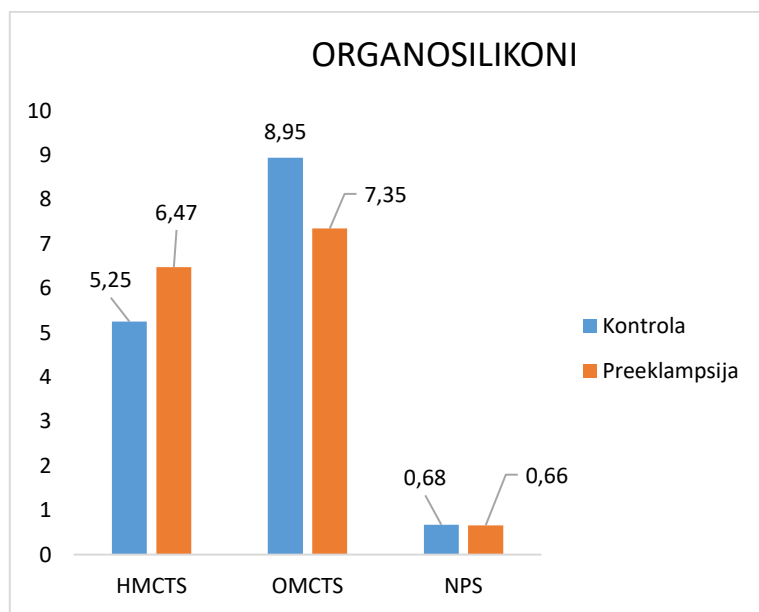
Slika 3.4: Grafički prikaz identificiranih metabolita iz skupine alkohola



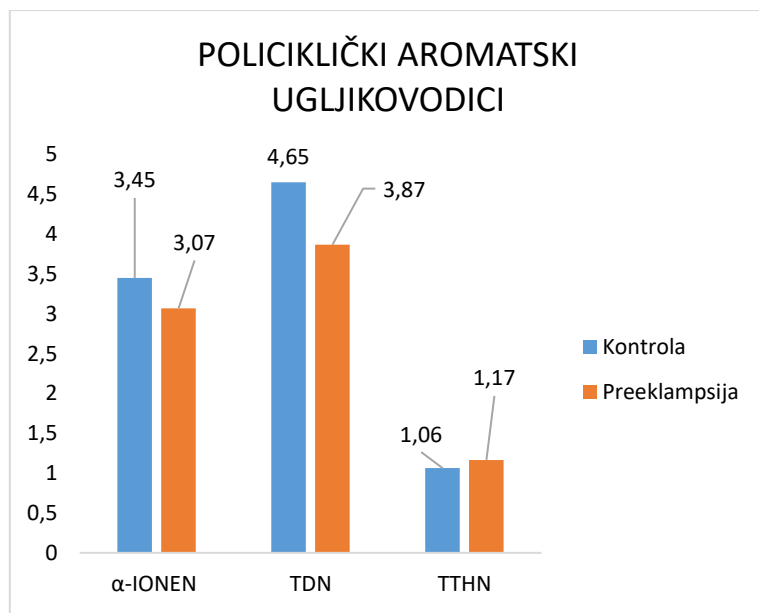
Slika 3.5: Grafički prikaz identificiranih metabolita iz skupine aldehida i ketona. Potpuni nazivi pojedinih metabolita čiji su nazivi zbog jednostavnosti prikazivanja navedeni kraticom mogu se naći na str.35 u poglavlju 5. Popis kratica i simbola



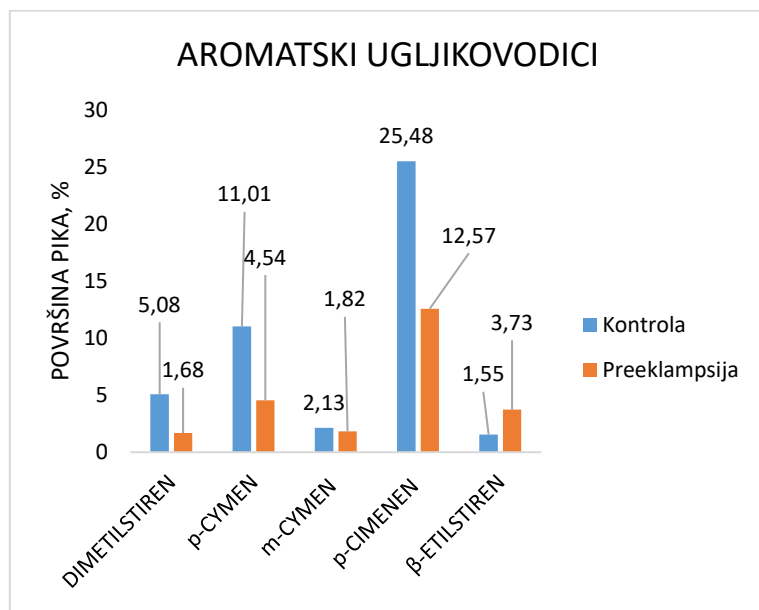
Slika 3.6: Grafički prikaz identificiranih metabolita iz skupine terpena



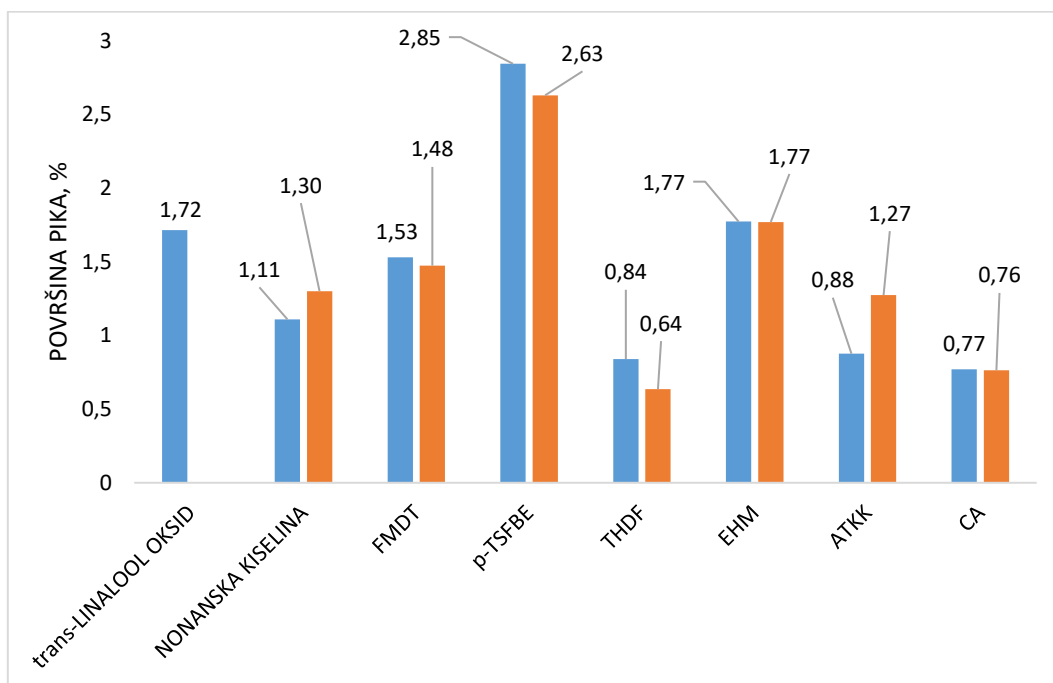
Slika 3.7: Grafički prikaz identificiranih metabolita iz skupine organosilikona. Potpuni nazivi pojedinih metabolita čiji su nazivi zbog jednostavnosti prikazivanja navedeni kraticom mogu se naći na str.35 u poglavlju 5. Popis kratica i simbola



Slika 3.8: Grafički prikaz identificiranih metabolita iz skupine policikličkih aromatskih ugljikovodika. Potpuni nazivi pojedinih metabolita čiji su nazivi zbog jednostavnosti prikazivanja navedeni kraticom mogu se naći na str.35 u poglavlju 5. Popis kratica i simbola



Slika 3.9: Grafički prikaz identificiranih metabolita iz skupine aromatskih ugljikovodika



Slika 3.10: Grafički prikaz preostalih identificiranih metabolita. Potpuni nazivi pojedinih metabolita čiji su nazivi zbog jednostavnosti prikazivanja navedeni kraticom mogu se naći na str.35 u poglavlju 5. Popis kratica i simbola

Deskriptivna statistika pokazala je da su osobe s preeklampsijom imale povišenu, odnosno sniženu razinu nekoliko desetaka spojeva različitog porijekla u odnosu na osobe iz kontrolne skupine, a za pojedine metabolite uočeno je značajnije odstupanje. Ti metaboliti su heptan-4-on, fenol, dimetilstiren, *p*-cimen, β -etilstiren, *p*-cimenen te *trans*-linalool oksid i oni su prikazani u sljedećoj tablici (Tablica 1).

Tablica 1: Prikaz razlikovnih metabolita između zdravih žena i žena s preeklampsijom

% , SREDNJA VRIJEDNOST		
	KONTROLA	PREEKLAMPSIJA
HEPTAN-4-ON	4,83	7,91
FENOL	0,98	2,13
DIMETILSTIREN	5,08	1,68
p-CIMEN	11,01	4,54
β-ETILSTIREN	1,55	3,73
p-CIMENEN	25,48	12,57
trans-LINALOOL OKSID	1,72	0

Sadržaj ketona gotovo je uvijek povećan u urinu tijekom trudnoće. U nekim istraživanjima, navodi se da je uzrok tome što tijekom trudnoće kod većine žena kao simptom javlja povraćanje i jutarnja mučnina što rezultira u tijelu dehidracijom i gladi. Tijekom gladi u organizmu se masti razgrađuju i nastaju ketoni. Često se jave i poremećaji u prehrani u tom periodu, što također vjerojatno ima utjecaja, budući da ketoni u urinu uglavnom potječu od crijevnih bakterija koje dekarboksiliraju oksokiseline.¹³

Iz tablice vidimo da je kod žena s preeklampsijom prosječni sadržaj ketona, heptan-4-ona, veći nego u kontrolnoj skupini žena. Uzrok tome može biti i sadržaj hrane koju žene unose. Heptan-4-on se koristi kao prezervativ za hranu i nalazi se u brojnim namirnicama, ali u kozmetičkim proizvodima tako da se ne može sa sigurnošću reći je li povišeni sadržaj rezultat unosa prehranom ili je rezultat metaboličkih procesa samog organizma.²²

Uz navedeno, heptan-4-on često potječe i iz *in vivo* oksidacije plastifikatora 2-etilheksanske kiseline. Plastifikator je tvar koja se dodaje materijalima kako bi ih učinila mekšim, fleksibilnijim te im povećala plastičnost, a smanjila viskoznost i trenje

pri rukovanju. Dakle, postoji sumnja da se u urbanom okolišu izloženom zagađenju i raznim ispušnim plinovima nalazi izvjesna količina navedenog plastifikatora koju su trudnice imale priliku udahnuti.¹³

Fenoli u urinu su najvećim dijelom rezultat zagađenog zraka u gradskim sredinama, posebice se javlja kao sastav ispušnih plinova motornih vozila. Osim toga, fenol se koristi u proizvodnji lijekova kao početni materijal, npr. za proizvodnju Aspirina, potom u kozmetici u sredstvima za zaštitu od sunca, bojama za kosu, eksfolijantima i slično. Neke bakterije, poput *E. Coli*, mogu sintetizirati fenol iz tirozina direktno pomoću enzima tirozin-fenolijaza. Stoga je moguće da je koncentracija fenola povišena i zbog povećanog unosa proteina kroz prehranu. Imajući to na umu, ne treba se čuditi povećanoj koncentraciji fenola kod trudnica s preeklampsijom budući da je jedno od osnovnih značajki preeklampsije proteinurija tj. povećana koncentracija proteina u organizmu. Kako količina proteina raste, tijelo dobiva signal da razgradi višak proteina, a upravo je fenol produkt razgradnje proteina.²²

Stireni su prisutni kao posljedica onečišćenja zraka karakteristični za život u gradu te dima duhana. Osim toga, može dospjeti u organizam i udisanjem eteričnog ulja ružmarina. Dimetilstiren i β -etilstiren su izomeri. Još nije razjašnjeno u kojim točno uvjetima dolazi do pretvorbe jednog u drugi, ali je iz tablice vidljivo da je kod zdravih trudnica zastupljeniji oblik dimetilstiren, dok je kod žena oboljelih od preeklampsije zastupljeniji β -etilstiren.²²

p-cimen je metabolit iz ulja eukaliptusa i timijana. Nalazi se u brojnim osvježivačima zraka, sredstvima za čišćenje, dezinficijensima, antisepticima, lubrikantima. Također, *p*-cimen je ishodišni spoj iz kojeg crijevna mikroflora proizvodi *p*-krezol. Pronađena koncentracija *p*-cimena u kontrolnoj skupini je više nego dvostruko veća od njegove koncentracije u skupini s preeklampsijom. Nije rasvijetljeno što je uzrok tako velikoj razlici. *p*-cimen je terpen koji se nalazi u začinskom bilju i citrusima.

Isto vrijedi i za sljedeći metabolit, *p*-cimenen, koji je kod oboljelih od preeklampsije u dvostruko manjoj koncentraciji nego kod zdravih žena. Poznato je da se spomenuti spoj koristi u aromaterapiji te je sastav namirnica poput začinskog bilja.¹³

Ono što je najzanimljivije u cijeloj tablici jest razlika u koncentraciji t-linalool oksida. Kod zdravih trudnica njegova koncentracija je prilično niska, ali s druge strane to je

jedini metabolit koji se kod trudnica s preeklampsijom uopće ne pojavljuje. Smatra se da je najpoznatiji kao sastojak mirisne lavande, odnosno njezinog eteričnog ulja. Nalazi se i u čajevima, parfemima, losionima.¹³

Kod osoba koje boluju od preeklampsije, gotovo je uvijek povećan sadržaj ketona. Iz toga se može prepoznati da je proizvodnja takvih i sličnih organskih metabolita svojstvena patološkim procesima koji su vezani s preeklampsijom, ali i općenito procesima upale prilikom kojih dolazi do porasta koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva. Ovaj rad je potvrdio njihovu nazočnost u urinu trudnica s preeklampsijom.

4. ZAKLJUČCI

Ovaj rad bio je usmjeren na pronalazak biomarkera koji bi omogućili razlikovanje osoba oboljelih od preeklampsije i zdravih osoba. Metabolička analiza usmjerena prema potrazi za biomarkerima bazirana je upravo na hipotezi da neki fiziološki podražaj, ovdje konkretno u vidu pojave preeklampsije, mijenja kemijski sastav stanica i tako dovede automatski do značajne promjene u metaboličkim putevima. Pod pojmom promjena misli se na promjenu u obliku izmijenjene koncentracije određenog metabolita, potencijalnog biomarkera, koji bi sa sigurnošću mogao biti potvrda tog stanja svaki sljedeći put kad ono nastupi.

Da je takav biomarker uspješno identificiran i proglašen u ovom radu, to bi omogućilo da se pravovremeno pristupi medicinskom tretmanu trudnica kod kojih se pojave simptomi preeklampsije i tako se spriječi oštećenje tkiva, u konačnici i ugroza života, majke i fetusa.

Ipak, istraživanje nije polučilo dovoljno sigurnim rezultatom ni za jedan metabolit na temelju kojeg bi ga se moglo proglasiti biomarkerom. Postoji nekoliko mogućih razloga zašto je očekivani rezultat izostao. Kao prvi od tih razloga valja istaknuti nedovoljan broj uzoraka koji su u vremenu izrade ovog rada bili dostupni za korištenje u eksperimentu. Pri sljedećoj analizi ovakvog tipa valjalo bi prikupiti veći broj uzoraka. Uz to, bilo bi optimalno iste uzorke obraditi više puta, najmanje tri puta, i izvršiti statističku analizu i testove kako bi se dobili relevantniji rezultati. To također nije moguće u okviru fakulteta zbog velikog broja ljudi koji koriste laboratorij u kojem se izvodio sam eksperiment te nemogućnosti okupiranja laboratorija na toliko dugo vrijeme.

Nadalje, bitno je naglasiti i da je upuštanje u metaboličke analize vrlo kompleksno zbog velike količine spojeva koji se na kromatogramu mogu nalaziti vrlo blizu jedan drugome te postoji šansa da je preklapanje samo sa spektralnih knjižnica dovelo do krivog traga, dajući rezultate za izomer koji zapravo nije prisutan.

Ipak, unatoč tome što glavni cilj nije uspješno ispunjen, podaci dobiveni tijekom ovog istraživanja otvaraju nove mogućnosti i ostavljaju prostora kako za daljnje proučavanje razlika između dviju skupina trudnica, zdravih i oboljelih od

preeklampsije, tako i za proučavanje razlika, koje su u određenim slučajevima zaista velike, između koncentracija istih spojeva u nizu uzoraka samo kontrolne ili samo uzoraka oboljelih trudnica. Kod nekih zdravih trudnica neki spojevi su tek u manjim količinama, dok su kod nekih ti isti spojevi u prilično visokim koncentracijama. Pomoglo bi i dodatno istraživanje sastava urina općenito u svrhu pronalaska određenog standarda po sastavu. Prema tome, može se optimistično zaključiti kako za budućnost ima puno materijala koje treba obrazložiti i koji će potencijalno također doprinijeti dobivanju medicinski korisnih činjenica.

5. POPIS KRATICA I SIMBOLA

- HS-SPME – Headspace solidphase microextraction
- GC-MS – gas chromatography – mass spectrometry
- VOM – volatile organic metabolites
- VOC – volatile organic compounds
- CYP 450 – cytochrome 450
- TDN – 1,2-dihidro-1,1,6-trimetilnaftalen
- HMCTS – heksametilciklotrisiloksan
- OMCTS – oktametilkiklotetrasiloksan
- FMDT – 3-formil-N-metil-9-(feniletinil)dibenzo[2,3-a:5,6-a'](1,4)tiazin
- *P*-TSFBE – *p*-trimetilsililoksifenil-bis(trimetilsililoksi)etan
- THDF – tetrahidro-2,2-dimetil-5-(1-metil-1-propenil)furan
- EHM – etil – hidroksimandelat
- ATKK – 2-amino-4-izopropil-5-okso-5,6,7,8-tetrahidro-4H-kromen-3-karbonitril
- CA – ciklopropilen adamantan
- NPS – 1,1,1,3,5,7,9,9,9-nonametilpentasiloksan
- TTHN – trimetiltetrahidronaftalen
- BTSOB – 2,5-bis[(trimetilsilil)oksi]benzaldehyd
- ANOVA – Analysis of variance
- NIST – National Institute of Standards and Technology
- HMDB – Human Metabolome Database

6. LITERATURA

- [1] URL:<https://en.wikipedia.org/wiki/Metabolomics#Metabolome>, (rujan 2023).
- [2] X. Quo, D.Reed, Gas chromatography in metabolomics study, , Advances in Gas Chromatography, IntechOpen , 2014, doi:<https://dx.doi.org/10.5772/57397>.
- [3] J. Mrvelj, Identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu trudnih žena s preeklampsijom, Završni rad, Split, Kemijsko-Tehnološki fakultet, (2022), URL:<https://urn.nsk.hr/nrn.nbn:hr:167:914354>.
- [4] X. Zang, M. E. Monge, F.M. Fernandez, Mass spectrometry-based non-targeted metabolomic profiling for disease detection: Recent development, Trends Analyt. Chem. **118** (2019), 158-169, doi: [10.1016/j.trac.2019.05.030](https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.030).
- [5] L. Kukoč-Modun., N. Radić, Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga, Split, (2016), 630-632.
- [6] URL:<http://www.mhhe.com>, (rujan 2023).
- [7] A. Mornar, I. Marinac-Andić, D. Amidžić Klarić, J. Kovačić, Mikroekstrakcija čvrstom fazom – inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima, Kemija u industriji: Časopis kemičara I kemijskih inženjera Hrvatske, **71** , (2022), 9-10, doi:<https://doi.org/10.15255/KUI.2022.003>.
- [8] URL:<https://zir.nsk.hr/islandora/object/pbf:309/preview> , (rujan 2023).
- [9] C. Vejar-Vivar, M. T. García-Valverde, C. Mardones, R. Lucena, S. Cárdenas, Polydopamine coated hypodermic needles as a microextraction device for the determination of tricyclic antidepressants in oral fluid by direct infusion MS/MS, RSC Adv. **11** (2021), 22683–22690, doi:<https://doi.org/10.1039/d1ra02721b>.
- [10] F. Duraton, G.Cohen, R.D.Smet, M.Rodriquez, J.Jankowski, R.Vanholder, A.Argiles, Normal and pathologic concentrations of uremic toxins, Am. J. Nephrol., **23** (2013), 1258-70, doi:<https://10.1681/ASN.2011121175>.
- [11] M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M. M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical

applications: an overview, *J. Chromatogr. A* **1616** (2020), 460-790, doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460790>.

[12] *B. Hashemi, P. Zohrabi, M. Shamsipur*, Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples, *Talanta, Int. Res. J. Pure Appl. Chem.* **187** (2018), 337–347, doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.053>.

[13] *T.Ligor, J. Zawadzka, G. Straczynski, R. M. G. Paredes, A. Wenda-Piesik*, Searching for potential markers of glomerulopathy in urine by HS-SPME – GCXGC TOFMS, *Molecules*, **26** (2022), 1817., doi:[10.3390/molecules26071817](https://doi.org/10.3390/molecules26071817).

[14] *B. d .L. Costello, A. Amann, H. Al-Kateb, C. Flynn, W. Filipiak, T. Khalid, D. Osborne, N. M. Ratcliffe*, A review of the volatiles from the healthy human body, *J Breath Res.* **8** (2013), 014001, doi:[https://10.1088/1752-7155/8/1/014001](https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/1/014001).

[15] *J. Cha, X. Sun, S. K. Dey*, Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy, *Nat. Med.* **18** (2012), 1754–1767, doi:[10.1038/nm.3012](https://doi.org/10.1038/nm.3012).

[16] *Z. Serdar, E. Gur, M. Colakoethullary, O. Develioethlu, E. Sarandol*, Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia, *Arch. Gynecol. Obstet.* **268** (2003), 19–25., doi:[10.1007/s00404-002-0302-y](https://doi.org/10.1007/s00404-002-0302-y).

[17] *D. I. Chiarello, C. Abad, D. Rojas, F. Toledo, C.M. Varquez, A. Mate, L. Sobrevia, R. Martin*, Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, **1866** (2020), 165354 doi:[10.1016/j.bbadis.2018.12.005](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.005).

[18] *A. Q. Zhang, S. C. Mitchell, R. Ayes, R. L. Smith*, Determination of trimethylamine and related aliphatic amines in human urine by head-space gas chromatography, *J.Chromatogr.* **584** (1992), 141-5, doi:[10.1016/0378-4347\(92\)80569-c](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80569-c).

- [19] A. Amann, B. de Lacy Costello, W. Miekisch, J. Schubert, J. Buszewski, J. Pleil, N. Ratcliffe, T. Risby. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J. Breath Res.*; **8** (2014) , 034001 doi: <https://10.1088/1752-7155/8/3/034001>.
- [20] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A. C. Guo, M. R. Wilson, C. Knox, F. Saleem, P. Liu, J. Huynh,, N. Psychogios, E. Dong, The human urine metabolome, *PLoS One*, **8** (2013), 73076, doi: [10.1371/journal.pone.0073076](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076).
- [21] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, (kolovoz, 2023).
- [22] URL: <https://www.nist.gov/>, (rujan, 2023).
- [23] URL: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0040284>, (rujan 2023).
- [24] URL: <https://www.smolecule.com/>, (listopad, 2023).