

Hlapljivi spojevi i aminokiseline u urinu oboljelih od tumora testisa

Živković Semren, Tanja

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:397682>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tanja Živković Semren

HLAPLJIVI SPOJEVI I AMINOKISELINE U URINU OBOLJELIH OD TUMORA TESTISA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2019.



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tanja Živković Semren

HLAPLJIVI SPOJEVI I AMINOKISELINE U URINU OBOLJELIH OD TUMORA TESTISA

DOKTORSKI RAD

Mentori:

dr. sc. Alica Pizent, znan. savj. u trajnom zvanju

dr. sc. Ana Mornar Turk, red. prof.

Zagreb, 2019.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Tanja Živković Semren

VOLATILE COMPOUNDS AND AMINO ACIDS IN THE URINE OF TESTICULAR TUMOUR PATIENTS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

Alica Pizent, Ph.D., Scientific Advisor
Ana Mornar Turk, Ph.D., Full Professor

Zagreb, 2019

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu te manjim dijelom na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Provedeno istraživanje započelo je unutar znanstvenoistraživačkog projekta „Učinci toksičnih i esencijalnih metala na reproduksijsko zdravlje muškaraca“ Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa (br. 022-0222411-2408, voditeljica projekta dr. sc. Alica Pizent).

Tijekom provedenog istraživanja upoznala sam divne ljude koji su svojim zalaganjem pripomogli da se izradi ovaj doktorski rad.

Veliku zahvalnost dugujem mentorici dr. sc. Alici Pizent koja je uvijek bila tu i imala strpljenja za bezbroj mojih pitanja. Sretna sam što ste mi Vi mentor i hvala Vam što ste mi pružili priliku da učim od Vas.

Hvala mojoj komentorici dr. sc. Ani Mornar Turk na pomoći, savjetima i vremenu koje mi je posvetila.

Hvala mojoj prijateljici i kolegici Blanki Tariha Lovaković na podršci i nesebičnoj pomoći pri provedbi istraživanja. S tobom je ovaj put bio zabavan, veselim se svemu što nas čeka.

Hvala dr. sc. Ireni Brčić Karačonji što tako rado dijeli svoje znanje i što joj nikad nije bilo teško odgovoriti na moja pitanja.

Hvala predstojnici Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam dr. sc. Jasni Jurasović što je podržala provedeno istraživanje i odobrila dodatne financije kada je to bilo potrebno.

Hvala ravnateljici Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada prof. dr. sc. Ani Lucić Vrdoljak što je pomogla kada sam mislila da nema izlaza.

Hvala dr. sc. Steli Jokić i dr. sc. Krunoslavu Aladiću što imaju veliko srce. Iako me nisu poznavali pomogli su u situaciji kada nitko drugi nije.

Hvala prof. dr. sc. Jasni Vorkapić-Furač što je nesebično pomogla oko usklađivanja naziva identificiranih organskih spojeva s važećom hrvatskom kemijskom nomenklaturom.

Hvala prof. Maji Radić i njenim učenicima Tari i Ninu što su pomogli u crtanju struktura aminokiselina.

Hvala kolegici Andreji što je pomogla da brže završim beskrajne analize. Hvala Nataši i Zorani što su uvijek tu da nasmiju dan. Hvala Vesni i Kreši što su pomogli kad god je trebalo.

Hvala svim liječnicima i osoblju u suradnim kliničkim ustanovama koji su sudjelovali u regrutiranju bolesnika, prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka. Također, hvala svim ispitanicima koji su pristali sudjelovati u studiji jer bez njih ova disertacija ne bi bila moguća.

Posebnu zahvalu upućujem profesoru Nenadu Judašu koji je u meni potaknuo istraživački duh.

Hvala Maji Lazarus što je prijateljica.

Hvala mojim roditeljima što su vjerovali u mene. Da bi čovjek postigao uspjeh potrebno je da mu netko kaže da on to može. Hvala mom bratu Filipu što me može slušati satima i nasmejati kad je to potrebno.

Hvala mojim srednjoškolskim i studentskim prijateljicama što su cijelo vrijeme uz mene.

Hvala najboljem mužu na svijetu što je sa mnom proslavio svaki uspjeh i preživio sve krize. Uz tebe sam najsretnija žena na svijetu.

Na ovom veselom i izazovnom putu bilo je trenutaka koji bi smanjili moj entuzijizam. U jednom od tih trenutaka moja me dvo i pol godišnja kćer, nakon što me nije vidjela par dana jer sam radila, pitala: „Mama, zašto toliko radiš?“ Ja, onako, već na rubu snaga odgovaram: „Stvarno nemam pojma ni ja više.“ A ona mi veselo odgovara: „Pa mama, da biješ doktorica.“ Kako komplicirano, a opet jednostavno. Hvala joj na tome.

Mojoj obitelji...

SAŽETAK

Razvojem tumora nastaju promjene u metabolizmu stanica koje se mogu pratiti analizom metabolita u biološkim uzorcima ispitanika što može biti koristan alat za procjenu stanja organizma i liječenje bolesti.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti kvantitativni profil slobodnih aminokiselina i elemenata u urinu i vrijednosti parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u krvi ispitanika s tumorom testisa u odnosu na vrijednosti u kontrolnih ispitanika, ispitati utjecaj kemoterapije nakon dva ciklusa i godinu dana nakon završetka kemoterapije na te vrijednosti. Osim toga, kreiran je kvalitativni profil hlapljivih organskih metabolita u urinu ispitanika s tumorom testisa prije terapije kako bi detektirali koje se vrste, ovisno o funkcionalnim skupinama, javljaju u urinu.

U ispitanika s tumorom testisa izmjerene su značajno povišene koncentracije asparaginske kiseline, mangana i cinka te aktivnost superoksid dismutaze, dok su koncentracije treonina, serina, histidina, kobalta i glutationa te ukupni oksidacijski status bili značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike. Nadalje, provedena je linearna diskriminantna analiza kako bi se ispitalo razdvaja li kreirani profil aminokiselina ispitanike s tumorom testisa od kontrolnih ispitanika, a uspješnost diskriminacije iznosila je 86 %. Nakon primljene kemoterapije, u ispitanika s tumorom testisa izmjerene su značajno povišene koncentracije većine aminokiselina i elemenata u urinu te glutationa u krvnoj plazmi u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije. Godinu dana nakon kemoterapije, koncentracije mangana i platine bile su i dalje značajno povišene, a koncentracije treonina, serina i žive značajno snižene u ispitanika koji su bolovali od tumora testisa u odnosu na kontrolne ispitanike. Koncentracije ostalih parametara bile su slične u obje skupine ispitanika. Rezultati upućuju na postupni oporavak metabolizma nakon prestanka kemoterapije. U urinu ispitanika s tumorom testisa detektirano je oko 200 hlapljivih organskih metabolita te su identificirana 123 metabolita.

Ovim istraživanjem dobiveni su rezultati koji upućuju na to da razvojem tumora u testisima dolazi do poremećaja u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja o ulozi međuprodukata navedenih ciklusa u tumorogenezi što može pridonijeti eventualnom otkrivanju novih bioloških biljega tumora testisa.

Ključne riječi: tumor testisa, aminokiseline, elementi, oksidacijski stres, hlapljivi organski metaboliti, ciklus limunske kiseline, ciklus uree

SUMMARY

BACKGROUND: Testicular cancer is the most common malignancy in young men and in recent decades its occurrence has been growing rapidly. Tumour development induces changes in cell metabolism that can be monitored by analysing the metabolites in biological samples of the subject. This can be a useful tool for estimating the condition of an organism and treatment of the disease. Previous metabolomic studies have outlined amino acids as metabolites of interest in the research of tumour markers. Amino acids are a source of energy and the building blocks for many specific molecules such as nucleotides and coenzymes. The optimal functioning of amino acids is, among other things, influenced by numerous elements (metals and metalloids) that are inevitably introduced into the body. Depending on their quantity and their role in the body, elements can favourably or adversely affect human health. In cancer cells, the reprogramming of the metabolism affects the homeostasis of oxidation-reduction processes. As a result of the changed oxidation-reduction balance in the body, altered profiles of certain volatile organic compounds can also be detected. Volatile organic metabolites (VOM) are produced in large quantities by cells, and pathological processes such as cancer affect their type and their secretion, whether by exhaled air, skin, sweat, urine, stool or blood.

AIM: The aim of this study was to compare a quantitative profile of free amino acids and elements in urine and levels of oxidative stress parameters in the blood between men with testicular cancer and control subjects. The study also aimed to investigate the impact of combined chemotherapy by bleomycin, etoposide and cisplatin on these parameters in testicular cancer patients after completing two cycles of chemotherapy, and one year after the chemotherapy is finished. In addition, a qualitative profile of VOM in urine of testicular cancer patients was created.

METHODS: In patients with testicular cancer and control subjects, the following variables were measured: concentrations of 30 free amino acids in urine (by GC-MS using Phenomenex EZ:faast kit); concentrations of 21 elements in urine (by ICP-MS); concentration of GSH, total antioxidative capacity (TAC) and total oxidative status (TOS) in plasma, activity of SOD in erythrocytes and GPx in whole blood (by spectrophotometry). In addition, VOM in urine of testicular cancer patients (obtained before chemotherapy) were analysed by GC-MS after headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) procedure has been evaluated and

optimised, and stability regarding different storage conditions and freeze-thaw processes of urine samples has been investigated.

RESULTS: Significantly higher concentrations of aspartic acid, manganese and zinc as well as higher activity of SOD were measured in the subjects with testicular cancer than in control subjects. On the other hand, concentration of threonine, serine, histidine, cobalt and GSH and TOS were significantly lower in patients than in control. Additionally, linear discriminant analysis (LDA) was performed to examine whether the created amino acid profile discriminates the subjects with testicular cancer from control subjects. The results of LDA showed that the discrimination rate was 86%.

The results obtained after two cycles of chemotherapy showed a significant increase of the majority of amino acids and elements in urine and GSH in blood plasma, and significant decrease of potassium and molybdenum in urine, as well as SOD in erythrocytes when compared to the values obtained before chemotherapy.

One year after chemotherapy, the patients had a significantly increased concentration of β -aminoisobutyric acid in urine and activity of SOD in blood, and a significantly decreased concentration of glycine, valine, leucine, aloisoleucine, threonine, proline, asparagine and tyrosine, and sodium, magnesium, aluminium, iron, nickel, copper, cadmium, platinum and mercury in urine when compared to the values obtained immediately after chemotherapy. When the results obtained in the testicular cancer patients one year after chemotherapy were compared to the results obtained in the control subjects, a significant increase of manganese, platinum and SOD, and a significant decrease in threonine, serine, mercury, GSH and TOS was found. There were no significant differences in other measured parameters between two groups. Results indicated a gradual metabolism recover following chemotherapy.

Parameters affecting the HS-SPME procedure for GC-MS analysis of VOM in urine have been optimised by evaluating the influence of incubation and extraction temperatures and times using reduced factorial and Doehlert matrix designs. The results showed optimum values for temperature to be 60 °C, extraction time 50 min, and incubation time 35 min. Evaluation of sample storage conditions at 4 °C, -20 °C, and -80 °C up to six months with one to four freeze/thaw cycles showed a time dependent decrease of the sum of peak areas of analysed urine. Our results showed that urine samples for VOM analysis could be stored for up to six months only if stored at -80 °C with no more than two cycles of freezing/thawing due to the volatile nature of the analysed compounds.

In the urine of subjects with testicular cancer, a qualitative profile of volatile organic metabolites was created to detect which species, depending on their functional groups, can be detected in the urine. GC-MS analysis of urine detected about 200 peaks of volatile organic metabolites, and 123 of them were identified by the AMDIS identification system (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*), retention index and boiling temperature.

CONCLUSION: The results of this study suggest that the development of a tumour in the testicles leads to a disorder in the citric acid cycle and the urea cycle. The obtained results can be used as a basis for further research on the role of the intermediates of the above mentioned cycles in tumorigenesis, which could contribute to the possible discovery of new biomarkers for testicular tumours.

Key words: testicular tumour, amino acids, elements, oxidative stress, volatile organic metabolites, citric acid cycle, urea cycle

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Tumor testisa	3
2.2. Biologija tumora	8
2.3. Metabolomika	9
2.4. Profil aminokiselina.....	12
2.5. Multielementni profil.....	17
2.6. Oksidacijski stres.....	18
2.7. Profil hlapljivih organskih metabolita	19
<i>Analiza VOM-a</i>	19
<i>Identifikacija VOM-a</i>	21
2.8. Analiza metaboličkih putova (engl. <i>Pathway Analysis</i>).....	21
<i>MetaboAnalyst</i>	22
2.9. Primjena multivarijantne analize rezultata mjerenja u metabolomici	23
3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	24
3.1. Hipoteza.....	24
3.2. Ciljevi	24
4. MATERIJALI I METODE.....	25
4.1. Ispitanici	25
4.2. Prikupljanje podataka o ispitanicima anketnim upitnikom	25
4.3. Poštivanje etičnosti	25
4.4. Popis upotrijebljenih kemikalija	26
4.5. Uređaji i oprema rabljeni u eksperimentalnom radu	28
4.6. Skupljanje i pohrana uzoraka krvi i urina.....	29
4.7. Plan istraživanja.....	29
4.8. Metode	31
4.8.1. Određivanje koncentracije slobodnih aminokiselina u urinu.....	31
<i>Linearnost i raspon metode</i>	35
<i>Ispitivanje ponovljivosti metode</i>	35
<i>Ispitivanje točnosti metode</i>	35
<i>Analiza metaboličkog puta (Pathway analysis)</i>	35
4.8.2. Određivanje koncentracije elemenata u urinu primjenom ICP-MS tehnike	35

4.8.3. Određivanje koncentracije kreatinina u urinu	36
4.8.4. Analiza parametara oksidacijskog stresa	36
<i>Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a u eritrocitima</i>	36
<i>Određivanje katalitičke aktivnosti GPx-a u krvi</i>	37
<i>Određivanje koncentracije hemoglobina (Hb) u krvi i eritrocitima</i>	37
<i>Određivanje GSH u plazmi</i>	37
<i>Određivanje ukupnih proteina u plazmi</i>	37
<i>Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) u plazmi</i>	38
<i>Određivanje ukupnog oksidacijskog statusa (TOS) u plazmi</i>	38
4.8.5. Određivanje hlapljivih metabolita u urinu	38
<i>GC-MS metoda za analizu hlapljivih metabolita u urinu</i>	38
<i>Razvoj i optimizacija postupka mikroekstrakcije hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)</i>	39
<i>Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)</i>	40
<i>Ispitivanje stabilnosti hlapljivih metabolita u uzorcima urina pri različitim uvjetima</i> <i>pohranjivanja</i>	41
<i>Identifikacija hlapljivih metabolita u urinu</i>	43
<i>Ponovljivost analize identificiranih hlapljivih metabolita</i>	44
<i>Pretraživanje Human metabolome database (HMDB)</i>	44
4.8.6. Statistička analiza	44
5. REZULTATI	46
5.1. Rezultati ciljane analize u razlikovanju ispitanika s tumorom testisa od kontrolnih ispitanika	46
5.1.1. Osobine ispitanika	46
5.1.2. Profil aminokiselina u urinu	48
<i>Parametri validacije metode za određivanje aminokiselina primjenom GC-MS tehnike</i>	48
<i>Aminokiseline u urinu</i>	49
<i>Metabolički putovi</i>	52
<i>Utjecaj histološkog tipa i stadija tumora na profil aminokiselina</i>	53
5.1.3. Multielementni profil u urinu	54
<i>Utjecaj histološkog tipa i stadija tumora na multielementni profil</i>	54
5.1.4. Parametri oksidacijsko-redukcijske ravnoteže	57
5.2. Utjecaj kemoterapije na koncentracije aminokiselina, elemenata i parametre oksidacijskog stresa	58

5.2.1. Osobine ispitanika.....	58
5.2.2. Profil aminokiselina u urinu.....	59
5.2.3. Multielementni profil u urinu.....	61
5.2.4. Oksidacijsko-redukcijska ravnoteža	64
5.3. Studija praćenja	65
5.3.1. Osobine ispitanika.....	65
5.3.2. Profil aminokiselina	65
5.3.3. Multielementni profil u urinu.....	71
5.3.4. Parametri oksidacijsko-redukcijske ravnoteže.....	76
5.4. Hlapljivi organski metaboliti (VOM)	78
5.4.1. Razvoj i optimizacija postupka mikroekstrakcije hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME).....	78
<i>Procjena značajnih varijabli uključenih u HS-SPME</i>	78
<i>Optimalne vrijednosti varijabli važnih za HS-SPME</i>	80
<i>Ponovljivost metode</i>	81
5.4.2. Ispitivanje stabilnosti hlapljivih metabolita u uzorcima urina pri različitim uvjetima pohranjivanja.....	82
<i>Stabilnost uzoraka urina pohranjenih na 4 °C, -20 °C i -80 °C</i>	82
<i>Stabilnost urina uslijed višekratnog zamrzavanja i odmrzavanja</i>	83
5.4.3. Identifikacija hlapljivih metabolita u urinu.....	85
<i>Ponovljivost analiza za identificirane metabolite</i>	87
<i>Identificirani hlapljivi organski metaboliti klasificirani po karakterističnim skupinama</i>	88
6. RASPRAVA.....	97
6.1. Ciljane analize	98
<i>Usporedba rezultata u ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika</i>	98
<i>Utjecaj kemoterapije bleomicinom, etopozidom i cisplatinom (BEP) na mjerene parametre</i>	108
<i>Studija praćenja</i>	112
6.2. Ne-ciljana analiza: Kvalitativni profil hlapljivih organskih metabolita u urinu.....	114
<i>Procjena značajnih varijabli uključenih u HS-SPME</i>	114
<i>Stabilnost uzoraka urina</i>	115
<i>Hlapljivi organski metaboliti u uzorcima urina kao mogući biološki biljezi</i>	116
ZAKLJUČCI	119

LITERATURA	122
POPIS KORIŠTENIH KRATICA	133
PRILOG.....	136
ŽIVOTOPIS.....	
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTARY CARD.....	

1. UVOD

Maligna oboljenja jedan su od glavnih uzroka smrti ljudi širom svijeta te je rak vodeći javnozdravstveni problem. Prema projekciji Svjetske zdravstvene organizacije broj novooboljelih od raka će i dalje rasti, a time neminovno i broj umrlih ako se ne pronađu novi i bolji modeli prevencije, ranog otkrivanja, dijagnoze i liječenja (Baselga i sur., 2015). Posebno zabrinjava sve veći porast obolijevanja osoba mlađe životne dobi.

Nastanak tumorskih stanica povezan je s brojnim biokemijskim i molekularnim promjenama u organizmu čije uočavanje na razini gena, proteina ili metabolita ima veliki potencijal u ranoj dijagnostici i liječenju. Razvoj novih metoda i tehnologija pruža velike mogućnosti istraživanja čiji bi rezultati trebali pridonijeti boljem razumijevanju fizioloških procesa i patoloških zbivanja u organizmu. Analizom i profiliranjem pripadnika određene obitelji molekula moguće je identificirati one koji imaju važnu biološku ulogu te među njima odrediti potencijalne biološke biljege koji bi se mogli koristiti kao tumorski prediktori ili ciljna meta protutumorskog liječenja.

Među brojnim metabolitima na čiju promjenu u koncentraciji utječe razvoj raka svakako su aminokiseline. One su izvor energije, imaju važnu ulogu u izgradnji proteina te kao fiziološki regulatori neophodne su za rast, razvoj i zdravlje ljudi (Nakamura i sur., 2016; Wu, 2010). Posljednjih godina raste interes istraživača kako bi se identificirali promijenjeni metabolički putevi i uloga aminokiselina koje u njima sudjeluju u nastanku, razvoju i liječenju raka (Bi i Henry, 2017). Na optimalno funkcioniranje aminokiselina mogu utjecati mnogi elementi (metali, nemetali, polumetali) koji sudjeluju u njihovom metabolizmu bilo kao aktivne ili strukturne komponente brojnih enzima ili kao esencijalne komponente u ekspresiji gena. Nedovoljan unos ili povišena izloženost pojedinim elementima može poremetiti ravnotežu fizioloških funkcija različitih metaloproteina i tkiva djelujući tako i na promjenu metabolizma aminokiselina. Čovjek je elementima neizbježno izložen te ih svakodnevno unosi u organizam hranom, zrakom i vodom, alkoholnim i bezalkoholnim pićima te udisanjem cigaretnog dima. Ovisno o njihovoj količini, kemijskom obliku i ulozi odnosno učincima koje imaju u organizmu, elementi mogu povoljno ili nepovoljno utjecati na reproduktivno zdravlje muškaraca (Telisman i sur., 1997; Telišman i sur., 2000; Jurasović i sur., 2004; Pizent i sur., 2009, 2012). Reprogramiranje metabolizma stanica raka utječe na homeostazu oksidacijsko-redukcijskih procesa, a kao posljedica promijenjene oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u organizmu nastaju specifični hlapljivi metaboliti koji se mogu mjeriti u izdahnutom zraku,

tkivima i tjelesnim tekućinama. Do promjene metabolomičkog profila u oboljelih od raka može doći i zbog primijenjene terapije, a njene posljedice često su dugotrajne.

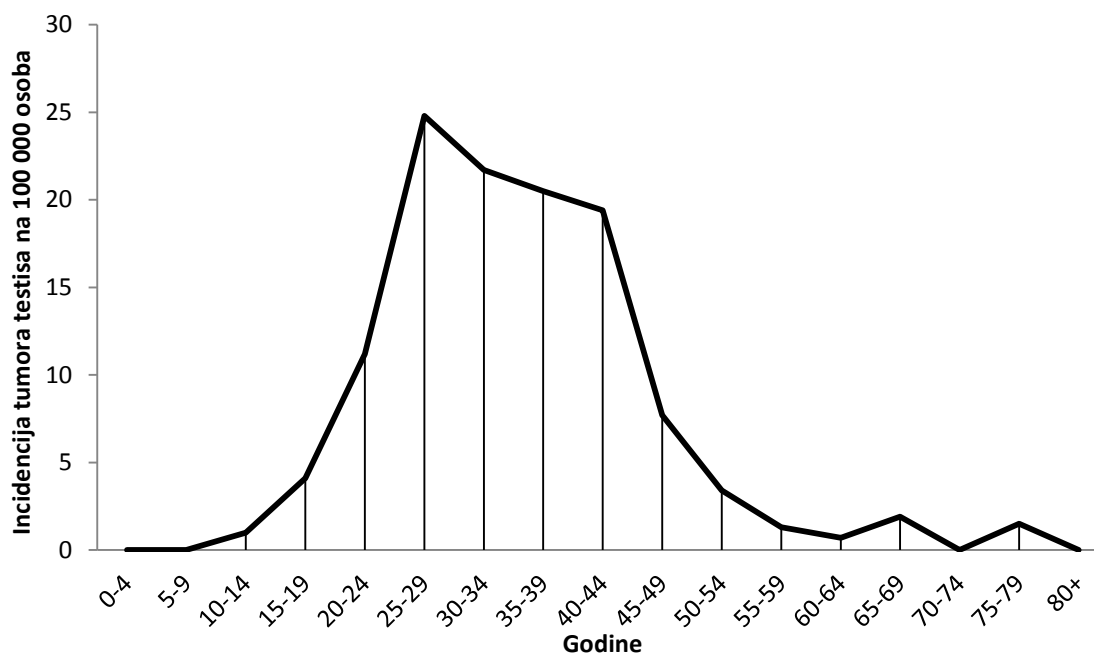
U ovom doktorskom radu, uz pomoć metabolomičkog pristupa, uspoređeni su kvantitativni profili slobodnih aminokiselina i elemenata u urinu te vrijednosti parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u uzorcima krvi između ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika. Nadalje, procijenjen je učinak kombinirane kemoterapije bleomicinom, etopozidom i cisplatinom na te vrijednosti odmah nakon završetka drugog ciklusa kemoterapije te godinu dana nakon završetka kemoterapije. U ispitanika s tumorom testisa kreiran je također kvalitativni profil hlapljivih organskih metabolita. Analiza metabolita u neinvazivno skupljenim uzorcima urina može pridonijeti njenoj primjeni u prediktivnoj medicini kao metodi probira ranog otkrivanja tumora testisa.

Od tumora testisa najčešće obolijevaju mlade osobe u fertilnoj dobi pa terapija i njene posljedice mogu bitno utjecati na smanjenje reproduktivne i radne sposobnosti oboljele osobe. Kako postojeći tumorski biljezi nisu dovoljno specifični, a razlog porasta incidencije tumora posljednjih godina u mnogim zemljama širom svijeta nije jasan, raste interes istraživača i kliničara za primjenom novih tehnologija u cilju pronalaženja rizičnih čimbenika i molekularnih osnova nastanka tumora. Rezultati ovog istraživanja mogu pridonijeti razvoju novih potencijalnih bioloških biljega tumora testisa te praćenju uspješnosti liječenja. Rana detekcija oboljenja prije nastanka većih tumorskih tvorbi i presadnica (metastaza) smanjila bi potrebu za agresivnom terapijom i povećala šansu za preživljenjem.

2. LITERATURNI PREGLED

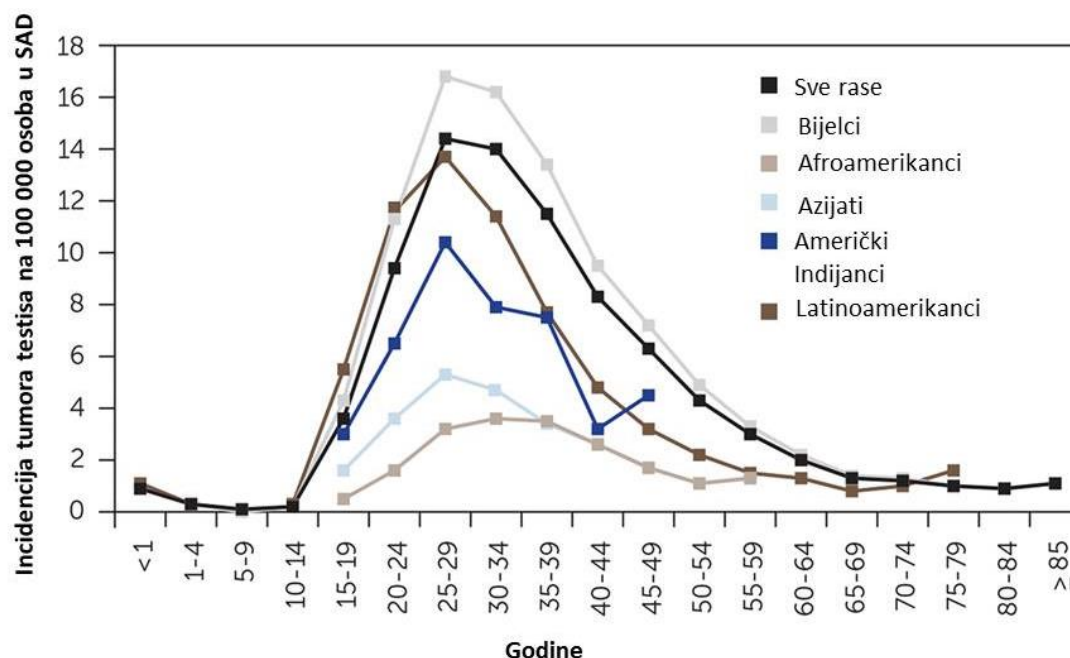
2.1. Tumor testisa

Tumor testisa, iako relativno rijetka maligna bolest, predstavlja najčešći solidni tumor u mladih muškaraca. Najčešće se javlja u dobi od 14. do 44. godine života. Posljednjih 50 godina njegova pojavnost raste (Cheng i sur., 2018). Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (engl. *Internacional Agency for Research on Cancer*, IARC) najviša stopa incidencije zabilježena je u industrijski razvijenim zemljama Europe poput Norveške (12,2/100 000), Nizozemske (10,5/100 000) i Francuske (10,2/100 000) dok je najniža stopa zabilježena među muškarcima Afrike i Azije (1/100 000). Prema podacima IARC-a za 2018. godinu, Hrvatska je s dobno-standardiziranom stopom incidencije od 12,5/100 000 u hrvatskoj muškoj populaciji među zemljama s najvišom pojavnosti tumora testisa. Na slici 1. prikazana je stopa incidencije tumora testisa u ovisnosti o dobi u Hrvatskoj za 2015. godinu (Registar za rak, 2015).



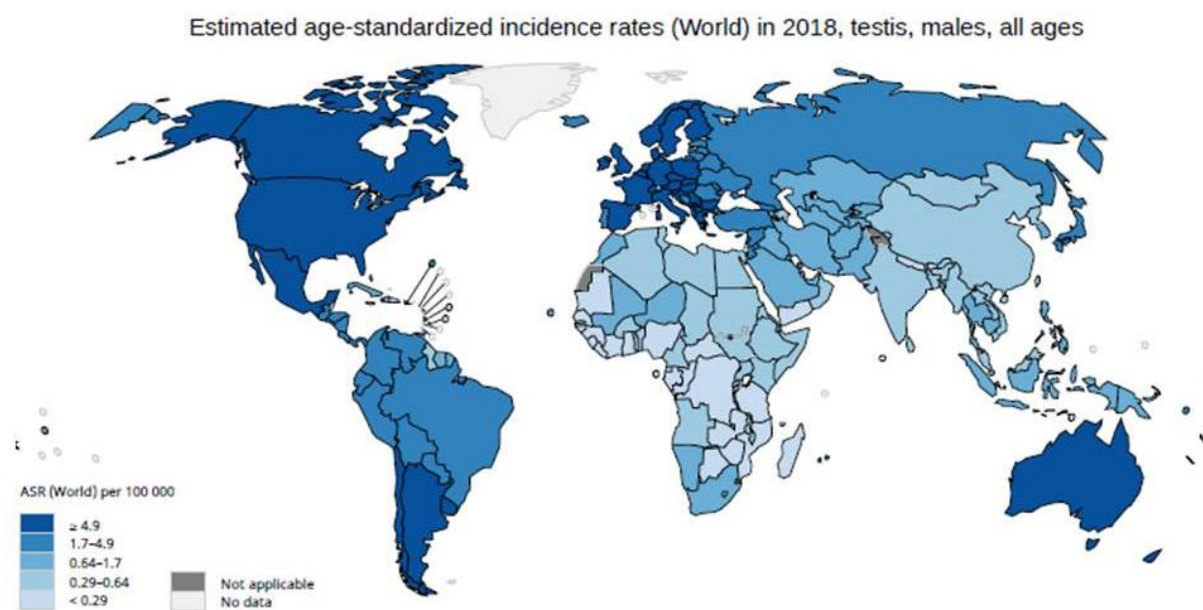
Slika 1. Incidencija tumora testisa na 100 000 osoba u ovisnosti o godinama života u Hrvatskoj u 2015. godini.

U SAD-u je uočena značajno viša pojavnost tumora testisa među bijelcima nego među pripadnicima drugih rasa (slika 2) te je u periodu između 1998. i 2002. prosječna godišnja stopa incidencije među bijelcima iznosila 6/100 000, a među Afroamerikancima 1,4/100 000 (Chia i sur., 2010).

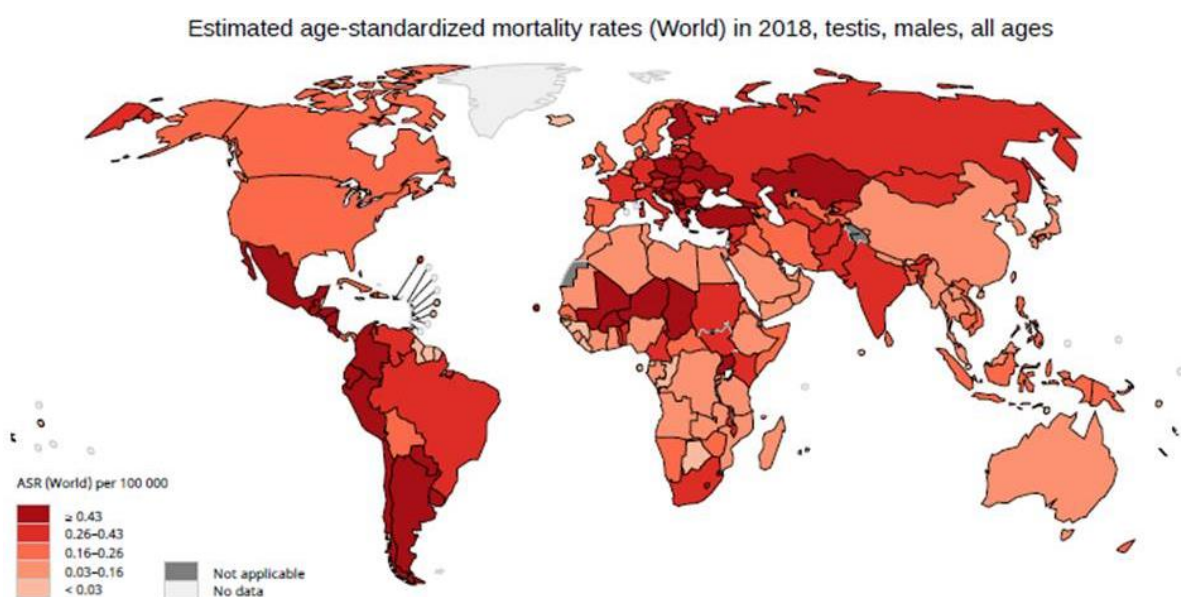


Slika 2. Incidencija tumora testisa na 100 000 osoba u ovisnosti o godinama života u SAD-u u 2017. godini. (Preuzeto i prilagođeno od Baird i sur., 2018).

Pollán i suradnici (2001) proveli su istraživanje o pojavnosti tumora testisa ovisno o mjestu stanovanja te su uočili veću pojavnost u urbanim nego u ruralnim područjima. Etničke i zemljopisne razlike (slika 3) u pojavnosti upućuju na to da kombinacija genetičkih i okolišnih čimbenika pridonosi razvoju bolesti i njenoj većoj pojavnosti posljednjih desetljeća, ali sami uzroci i rizični čimbenici nisu posve jasni. Na stopu smrtnosti, osim genetičkih i okolišnih čimbenika, utječe raspoloživost i primjenjivost moderne dijagnostike i učinkovitijih lijekova. Slika 4. prikazuje stopu smrtnosti od tumora testisa u svijetu prema bazi podataka IARC-a za 2018. godinu.



Slika 3. Incidencija tumora testisa u svijetu. (Preuzeto iz IARC-a 2018)



Slika 4. Stopa smrtnosti od tumora testisa u svijetu. (Preuzeto iz IARC-a 2018)

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

Rak testisa može nastati iz obje vrste stanica, no oko 95 % slučajeva odnosi se na tumor zametnih stanica (germinativni tumor testisa prema engl. *testicular germ cell tumours*, TGCT). Ti su tumori podijeljeni u dva osnovna histološka tipa, seminomi i neseminomi. Seminomi su najčešći tip tumora zametnih stanica testisa. U neseminomskim tumorima spadaju teratomi, embrionalni karcinomi, neoplazme endodermalnog sinusa (tumori žumanjčane vreće) i koriokarcinomi, a česti su tumori miješane histološke građe. Stadiji bolesti određuju se prema TNM-klasifikaciji, pri čemu T označava prisutnost, odnosno opseg primarnog tumora, N označava zahvaćenost limfnih čvorova, a M označava postojanje presadnica (metastaza). Stadiji I-III označavaju ograničenost (stadij I) odnosno raširenost tumora (II-III) (Grgić i sur., 2013).

Plan liječenja ovisi o proširenosti bolesti, patohistološkoj dijagnozi, radiološkoj obradi i vrijednostima tumorskih biljega. U kliničkoj praksi koriste se tri tumorska biljega: alfa-fetoprotein (AFP), humani korionski gonadotropin (β -HCG) i laktat dehidrogenaza (LDH) u serumu. Međutim, navedeni biljezi nisu specifični za tumor testisa i mogu biti unutar referentnih vrijednosti, osobito u početnoj fazi bolesti, ali isto tako se njihove vrijednosti mogu povisiti kod drugih tipova tumora ili nemalighnih bolesti (npr. infarkt miokarda, progresivna mišićna distrofija) (Trigo i sur., 2000; Colli i sur., 2006; Kim i sur., 2014). Dijagnoza se potvrđuje nakon radikalnog kirurškog zahvata uklanjanja testisa (orhidektomija) te se potom primjenjuje adjuvantna kemoterapija ili radioterapija ukoliko se rak testisa proširio na regionalne limfne čvorove ili kada već postoje udaljenije presadnice (metastaze). Iznimno, ako se radi o vrlo uznapredovaloj bolesti s popratnim plućnim ili neurološkim simptomima, preporučuje se liječenje početi kemoterapijom, a tek kasnije provesti orhidektomiju.

Ako se rak otkrije u ranoj fazi dok još nije došlo do metastatskih promjena, može se izliječiti u više od 95 % posto slučajeva. Uspješnosti izlječenja također pridonosi adekvatna terapija. Kod znatnog dijela bolesnika danas se nastoji odrediti terapijski minimum kojim se izbjegava niz nuspojava, a koji dovodi do jednakog uspjeha kao i donedavno agresivniji terapijski pristup (Grgić i sur., 2013).

Liječenje tumora testisa citostaticima provodi se po standardnom protokolu (Grgić i sur., 2013; Baird i sur., 2018), ovisno o histološkom tipu, raširenosti tumora i vrijednostima tumorskih biljega. Najčešće se koristi monokemoterapija karboplatinom ili polikemoterapija kombinacijom bleomicina, etopozida i cisplatine (BEP) u dva do četiri ciklusa. Ako je nužno izbjeći davanje bleomicina, primjenjuju se tri ili četiri ciklusa etopozidom i cisplatinom (EP). Standardna terapija prema BEP ili EP protokolu provodi se svaka 3 tjedna (bleomicin, 30 jedinica *i. v.* tjedno; etoposid, 100 mg/m² *i. v.* tjedno; cisplatina: 20 mg/m² *i. v.* tjedno).

Cisplatina, kompleks na bazi platine (Pt), je citostatik koji je doveo do značajnog napretka u kemoterapijskom liječenju te se ubraja među najčešće primjenjivane citostatike u liječenju malignih oboljenja (Kelland, 2007; Cepeda i sur., 2007). Pretpostavlja se da cisplatina dovodi do stvaranja kovalentnih poprečnih veza unutar i između uzvojnica DNK, te tako inhibira sintezu DNK. Sami cisplatiniski adukti predstavljaju fizičku barijeru za replikacijske rašlje, što je jedan od uzroka inhibicije replikacije i zaustavljanja stanice u S-fazi staničnog ciklusa (Siddik, 2003). Istraživanja su pokazala kako djelovanje cisplatine inhibira aktivnost antioksidacijskih enzima poput superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation peroksidaze (GPx) (Tanaka-Kagawa i sur., 1999; Olas i sur., 2005). Primjena protutumorskih lijekova na bazi Pt značajno pridonosi porastu koncentracije Pt u organizmu oboljelih od malignih bolesti pa je cirkulirajuća Pt prisutna u plazmi i urinu više od desetljeća nakon kemoterapije (Hohnloser i sur., 1996; Gerl i Schierl, 2000; Gietema i sur., 2000; Brouwers i sur., 2008). Cisplatina se nakuplja u tkivu bubrega uz kumulativnu nefrotoksičnost ovisnu o dozi. Kako od raka testisa najčešće obolijevaju mlade osobe u fertilnoj dobi, tako terapija i njene posljedice mogu bitno utjecati na smanjenje reproduktivne i radne sposobnosti oboljelih muškaraca.

Unatoč rastućim stopama incidencije tumora testisa, etiologija te bolesti još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Jasna povezanost povećanja rizika za nastanak bolesti postoji samo s nekoliko čimbenika kao što su dob, rasna pripadnost i kriptorhizam (nespušteni testisi) za koji se smatra da čak dva do četiri puta povećava rizik nastanka tumora testisa (Schottenfeld i sur., 1980; Swerdlow i sur., 1997).

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

2.2. Biologija tumora

Tumori su skupina bolesti pri kojima, uz promjene u staničnom genskom materijalu, nastaju promjene u staničnom metabolizmu što dovodi do reprogramiranja staničnog fenotipa i tumorigeneze (Vander Heiden i DeBerardini, 2017). Višestrukim promjenama u ekspresiji gena dolazi do neravnoteže između stanične proliferacije i stanične smrti uzrokujući nekontrolirano stvaranje nakupina stanica koje mogu naseljavati tkiva te se širiti (metastazirati) na udaljena mjesta. Kao abnormalne nakupine tkiva, tumori oduzimaju organizmu hranjive tvari, kisik, hormone i ostale neophodne životne sastojke u svrhu vlastitog rasta te tako utječu na metabolizam stanice i regulaciju njene funkcije. Za proizvodnju energije normalne stanice pretežno koriste aerobnu respiraciju. U prisutnosti kisika glukoza se metabolizira putem glikolize te se nastali piruvat oksidacijskom dekarboksilacijom pretvara u acetil-koenzim A koji ulazi u daljnji proces stvaranja metaboličke energije preko ciklusa limunske kiseline (tj. ciklusa trikarboksilne kiseline, TCA) i oksidativne fosforilacije u mitohondrijima. Ugljik iz glukoze potpuno oksidira do ugljikovog dioksida, a molekula kisika reducira se do molekule vode. Pri ograničenoj opskrbi kisikom, nakon glikolize nastali piruvat reducira se u laktat pri čemu je smanjena proizvodnja energije. U usporedbi s normalnim stanicama, stanice raka preferiraju pretvorbu piruvata u laktat čak i u izobilju kisika. Taj fenomen je poznatiji pod imenom Warburgov efekt. Ovaj metabolički fenomen nazvan je po dr. Ottu Warburgu koji ga je prvi zabilježio 1939. godine (Warburg, 1956). Stanice raka u početku nastanka nemaju dovoljno razvijenu mrežu kapilara za dopremanje hranjivih tvari i kisika pa žive u uvjetima hipoksije. Stoga stanice raka ovise o anaerobnoj glikolizi kako bi stvorile potreban ATP (Vander Heiden i sur., 2009).

Promjene u metabolizmu tumorskih stanica uključuju povećanje glikolize, povećanje glutaminolitičkog protoka, povećanje metabolizma aminokiselina i lipida te indukciju pentoza-fosfatnog puta. Navedeni metabolički putovi osiguravaju stanicama raka energiju i metabolite koji potiču biosintezu makromolekula, kontinuiranu proliferaciju i druge glavne procese tumorske geneze (Hanahan i Weinberg, 2011; Brian J. Altman i sur., 2016). Kao posljedica promijenjene oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u organizmu koja se često smatra uzrokom kancerogeneze, mogu nastati promijenjeni profili pojedinih hlapljivih organskih spojeva (Di Natale i sur., 2003; Silva i sur., 2012). Također, do promjene metabolizma pojedinih metabolita može doći uslijed primijenjene terapije, bilo zračenja bilo terapije lijekovima.

2.3. Metabolomika

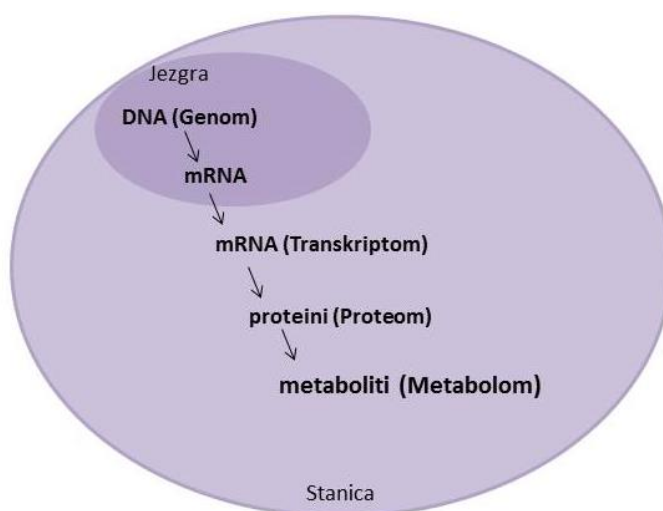
„Napredak u znanosti ovisi o novim tehnikama, novim otkrićima i novim idejama, vjerojatno tim redosljedom.“

Sydney Benner (Nature, 5. lipnja 1980.)

Posljednjih godina raste interes istraživača, ali i kliničara za primjenom novih tehnologija u istraživanju raka te drugih zdravstvenih poremećaja i bolesti u smislu personalizirane medicine. Kako bi se ljude moglo liječiti individualiziranom terapijom, bolesti se moraju definirati i okarakterizirati na molekularnoj razini.

Otkrića u biokemiji tijekom devetnaestog i dvadesetog stoljeća pružila su niz vrijednih saznanja koja uključuju detektiranje promjena koje se događaju u različitim genima, proteinima i metabolitima zbog djelovanja okoliša, zdravstvenih poremećaja ili terapije. Poznavanje i razumijevanje metaboličkih razlika između normalnih stanica i stanica raka prepoznato je kao moguća meta za ubijanje tumorskih stanica. Usporedbom metaboličkih profila u zdrave i oboljele osobe moguće je uočiti jedinstvene metabolite, potencijalne biološke biljege kao indikatore razvoja i tijeka bolesti ili učinka terapije.

Razvojem tehnika poput genomike, transkriptomike, proteomike i metabolomike dolazi do napretka medicinske dijagnostike i liječenja. Tzv. „omika“ se smatra moćnim alatom za interpretaciju i razumijevanje složenih bioloških procesa zbog mogućnosti istovremenog promatranja promjena na različitim biološkim razinama, osiguravajući tako uvid u fiziološko i patološko stanje organizma (slika 5) (Monteiro i sur., 2013).



Slika 5. Protok informacija u stanici

Metabolomika je naziv za studiju kompletnog metaboloma te je jedna od temeljnih disciplina sistemske biologije. Metabolom predstavlja fenotip organizma jer sadrži informacije o krajnjem produktu staničnih procesa. Metabolomičke analize se mogu definirati kao opsežne analize (identifikacija i kvantifikacija) metabolita nekog izoliranog organizma, staničnog sustava, tkiva ili bioloških tekućina te se primjenjuju kako bi se detektirale promjene u razinama metabolita povezanih s genetičkim, biološkim i okolišnim utjecajem. Metaboliti se mogu analizirati u stanicama, tkivima i biološkim tekućinama. Zbog kemijske raznolikosti metabolita trenutno nije moguće analizirati cijeli metabolom koristeći jednu analitičku tehniku. Međutim, s obzirom na kliničko stanje i dosadašnje poznavanje patofizioloških procesa, analiza jedne određene frakcije metaboloma može se smatrati kao najbolje polazište.

U rutinskim kliničkim istraživanjima najčešće se koriste urin, krv, plazma ili serum te u manjoj mjeri feces, svaki sa svojim specifičnim karakteristikama. Posljednjih godina je upotreba urina u rutinskim analizama privukla pažnju istraživača upravo zbog bezbolnog i neinvazivnog uzorkovanja. Urin stvaraju bubrezi glomerularnom filtracijom, reapsorpcijom tvari iz bubrežnih kanalića u krv te sekrecijom tvari iz krvi u bubrežne kanaliće. Stoga sastav urina ovisi o zdravlju bubrega i ostatka organizma. Patološke promjene kao što su promjene metabolizma ili maligne bolesti mogu utjecati na sastav urina (Guyton, 2003; Štraus, 2009). Urin sadrži brojne metabolite tj. skupine spojeva kao što su alifatski spojevi, alkaloidi, aminokiseline, aromatski spojevi, ugljikohidrati, metali i nemetali (elementi), lipidi, organske kiseline i druge (do sada ih je detektirano nekoliko tisuća), od kojih su mnogi prisutni u relativno visokim, lako mjerljivim koncentracijama. Mjerenje tih metabolita omogućuje otkrivanje promjena u metabolizmu stanica/tkiva povezanih s razvojem bolesti, uključujući rak (Mochalski i Unterkofler, 2016).

Metabolomičke analize omogućuju kvantifikaciju velikog broja različitih metabolita u određenom uzorku koristeći osjetljive analitičke tehnike kao što su plinska (GC) ili tekućinska kromatografija (LC) vezane sa spektrometrijom masa (MS) te nuklearna magnetna rezonancija (NMR).

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. Cjelokupan set metabolita proizveden od strane stanice i organizma čini metabolom. Njegove karakteristike se mijenjaju ovisno o fiziologiji, razvoju i patologiji same stanice, tkiva, organa ili organizma, te se takva dinamičnost i reflektiranje

promjena u metaboličkim i signalnim putovima može iskoristiti u dijagnostičke i prognostičke svrhe (Monteiro i sur., 2013, 2014).

U metabolomici se definiraju dvije vrste analiza: **ciljana i ne-ciljana analiza**. Pri poznavanju biološki značajnih metabolita prije eksperimenta primjenjuje se ciljana analiza koja uključuje identifikaciju i kvantifikaciju definiranog broja poznatih metabolita korištenjem najprikladnije analitičke tehnike. Ne-ciljana analiza uključuje identifikaciju i relativnu kvantifikaciju što većeg broja nepoznatih metabolita (koliko je moguće s obzirom na korištenu analitičku tehniku) u cilju kreiranja profila metabolita u biološkom uzorku. U ne-ciljanim analizama moguće je otkriti na tisuće metabolita u jednom uzorku, ne znajući koji su metaboliti od specifičnog interesa.

Iako ne-ciljana metabolomička analiza potencijalno može pružiti mnogo informacija, postoje neka praktična ograničenja. To uključuje potrebu za mjerenjem velikog broja metabolita, poteškoće u obradi podataka i velike troškove. Za dobivanje kompletnog metabolomičkog profila potrebno je kombinirati nekoliko instrumentalnih tehnika koje se biraju ovisno o cilju analize, prirodi uzorka i spojevima koji se istražuju. Međutim, odgovarajućom pripremom uzoraka i primjenom adekvatne analitičke tehnike moguće je provesti analize koje rezultiraju detekcijom velikog broja metabolita (Mamas i sur., 2011). Veliki broj dobivenih podataka potrebno je obraditi kompleksnim statističkim analizama uz čiju pomoć je moguće uočiti relativne promjene u razinama metabolita. Nemoguće je odrediti apsolutne koncentracije svih metabolita. Primjenom kromatografskih tehnika prati se površina pika određenog metabolita i njegov udio u ukupnoj površini svih promatranih pikova te se uočena promjena naziva relativnom. Daljnjom ciljanom analizom definira se broj metabolita koji će se dalje istražiti na temelju njihove uloge u organizmu i kemijskim karakteristikama. Uz primjenu odgovarajućih standarda, tim se metabolitima može odrediti koncentracija.

2.4. Profil aminokiselina

Aminokiseline su se pokazale kao interesantni metaboliti u ciljanim metabolomičkim analizama. Osim što su osnovne strukturne jedinice proteina, aminokiseline imaju i neproteinske funkcije. One su izvor energije koju stvaraju formiranjem ketokiselina iz ketogenih aminokiselina ili glukoneogenezom iz glukogenih aminokiselina. Aminokiseline su preteče mnogih specifičnih molekula kao što su nukleotidi, porfirini, hormoni, neuroprijenosnici, koenzimi itd. (Kaspar i sur., 2008). Kada aminokiseline nisu vezane u proteinima nego se nalaze samostalno u biološkim tekućinama nazivamo ih slobodnim aminokiselinama.

Naziv im potječe od njihove kemijske strukture jer sadrže amino ($-NH_2$) i karboksilnu skupinu ($-COOH$). Pri pH 7 amino skupina je protonirana, a karboksi skupina je deprotonirana. Pozitivni i negativni naboji su jednaki što rezultira neutralnim nabojem te je aminokiselina u dipolarnom obliku (*zwitterion*).

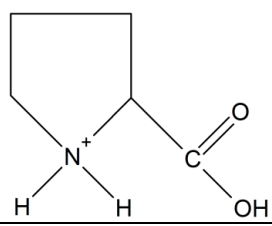
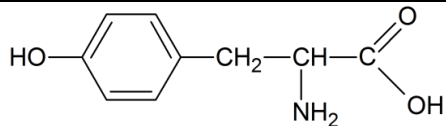
Proteine izgrađuje 20 aminokiselina (proteogene aminokiseline). Sisavci mogu sintetizirati 11 proteogenih aminokiselina: alanin (Ala), arginin (Arg), asparagin (Asn), asparaginsku kiselinu (Asp), cistein (Cis), glicin (Gly), glutamin (Gln), glutaminsku kiselinu (Glu), prolin (Pro), serin (Ser) i tirozin (Tyr) te su one poznate kao neesencijalne aminokiseline. Na primjer, tirozin se može sintetizirati iz fenilalanina te je reakcija katalizirana enzimom fenilalanin monooksigenaza. Enzimi aminotransferaze kataliziraju pretvorbu α -ketokiselina u odgovarajuće aminokiseline. Transaminacija piruvata, oksaloacetata i α -ketoglutarata daje alanin, asparaginsku kiselinu i glutaminsku kiselinu. Iz glutaminske kiseline mogu nastati aminokiseline glutamin, prolin i arginin, a asparagin se može sintetizirati iz asparaginske kiseline. Serin, glicin i cistein nastaju od intermedijarne 3-fosfoglicerinske kiseline, formirane od glikozida. Ostalih devet aminokiselina, fenilalanin (Phe), histidin (His), izoleucin (Ile), leucin (Leu), lizin (Lys), metionin (Met), treonin (Thr), triptofan (Trp) i valin (Val), ne mogu se sintetizirati u sisavaca i moraju se unositi prehranom te se nazivaju esencijalne aminokiseline.

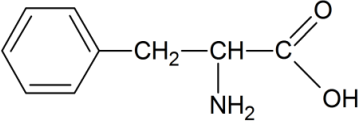
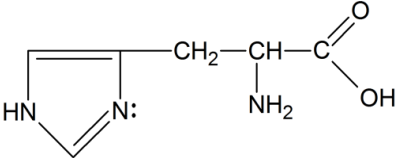
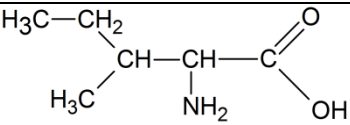
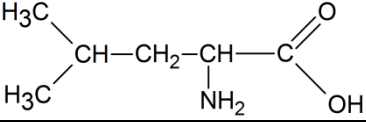
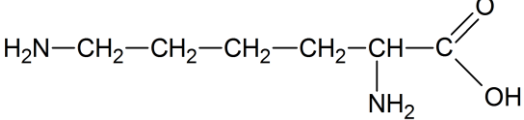
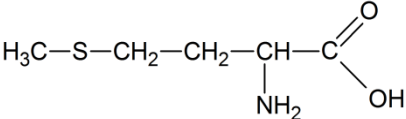
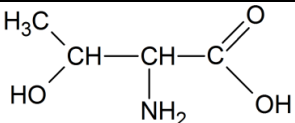
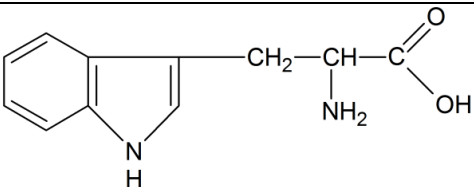
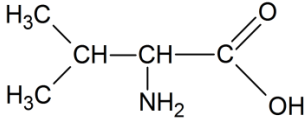
Navedene proteogene aminokiseline predstavljaju mali udio (~2 %) ukupnog broja aminokiselina koje postoje u prirodi (Rodgers, 2014). U organizmu postoji čitav niz aminokiselina koje ne izgrađuju proteine nego su produkti metaboličkih procesa (neproteogene aminokiseline). Između ostalih to su aloizoleucin (aIle), α -aminoadipinska kiselina (Aaa), α -aminomaslačna kiselina (Aba), β -aminoizomaslačna kiselina (β -AiB), α -

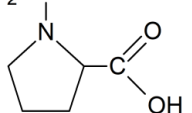
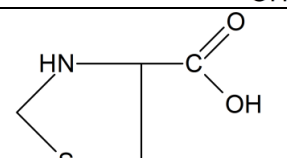
aminopimelna kiselina (Apa), cistationin (Cth), cistin (C-C), glicil-prolin (Gpr), hidroksilizin (Hly), ornitin (Orn), sarkozin (Sar) i tioprolin (Tpr). Aloizoleucin je stereoizomer izoleucina te se potencijalno može koristiti u dijagnostici sindroma javorova sirupa (Schadewaldt i sur., 1999). α -Aminoadipinska kiselina nastaje u procesu razgradnje lizina (Wu i sur., 1995). Sarkozin je normalno prisutan u organizmu te se može detektirati u mišićima i drugim tkivima. Sarkozin se metabolizira djelovanjem enzima sarkozin dehidrogenaze u glicin u metabolizmu kolina (Wargo, 2013). Ornitin sudjeluje u ciklusu uree kao preteča arginina i citrulina (Morizono i sur., 2005). Aminokiseline uključene u ovo istraživanje prikazane su u tablici 1.

Poznato je da pojedini zdravstveni poremećaji odnosno oboljenja mogu utjecati na profile aminokiselina (Miyagi i sur., 2011). Kako stanice raka karakteriziraju promijenjeni metabolički putovi, određivanje metabolita male molekulske mase, kao što su slobodne aminokiseline, u biološkim tekućinama ima dijagnostički potencijal (Dereziński i sur., 2017).

Tablica 1. Aminokiseline uključene u ovo istraživanje.

PROTEOGENE AMINOKISELINE		
Aminokiselina	Kratice	Struktura
Neesencijalne aminokiseline		
Alanin	Ala, A	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Arginin	Arg, R	$\begin{array}{c} \text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}=\text{NH} \quad \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
Asparagin	Asn, N	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \quad \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Asparaginska kiselina	Asp, D	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \quad \quad \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Cistein	Cys, C	$\begin{array}{c} \text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Glicin	Gly, G	$\begin{array}{c} \text{H}-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Glutamin	Gln, Q	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Glutaminska kiselina	Glu, E	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \\ \text{HO}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \quad \quad \quad \diagup \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Prolin	Pro, P	
Serin	Ser, S	$\begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH}_2 \quad \text{O} \quad \text{OH} \end{array}$
Tirozin	Tyr, Y	

PROTEOGENE AMINOKISELINE		
Aminokiselina	Kratice	Struktura
Esencijalne aminokiseline		
Fenilalanin	Phe, F	
Histidin	His, H	
Izoleucin	Ile, I	
Leucin	Leu, L	
Lizin	Lys, K	
Metionin	Met, M	
Treonin	Thr, T	
Triptofan	Trp, W	
Valin	Val, V	

NEPROTEOGENE AMINOKISELINE		
Aminokiselina	Kratika	Struktura
Aloizoleucin	alle	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
α -Aminoadipinska kiselina	Aaa	$\text{HO}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO} \end{matrix}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
α -Aminomaslačna kiselina	Aba	$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
β -Aminoizomaslačna kiselina	β -AiB	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
α -Aminopimelna kiselina	Apa	$\text{HO}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO} \end{matrix}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
Cistationin	Cth	$\text{HO}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO} \end{matrix}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
Cistin	C-C	$\text{HO}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO} \end{matrix}-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
Glicil-prolin	Gpr	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{N} \end{matrix}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$ 
Hidroksilizin	Hly	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
Ornitin	Orn, O	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
Sarkozin	Sar	$\text{H}_3\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{matrix}$
Tioprolin	Tpr	

2.5. Multielementni profil

Na optimalno funkcioniranje brojnih metabolita, npr. metaloproteina, metaloenzima pa tako i aminokiselina, utječu brojni elementi (metali, nemetali, polumetali) koje neizbježno i svakodnevno unosimo u organizam hranom, zrakom i vodom, konzumacijom alkoholnih pića (npr. olovo) i pušenjem cigareta (npr. kadmij i arsen) te tako postaju dio svih naših tjelesnih struktura. Ovisno o njihovoj količini, kemijskom obliku i ulozi odnosno učincima koje imaju u organizmu, elementi mogu povoljno ili nepovoljno utjecati na ljudsko zdravlje. Esencijalnim elementima nazivamo elemente neophodne za odvijanje fizioloških funkcija u organizmu. Nužni su za optimalan rast i zdravlje, sastavni su dio mnogih enzima, metaloproteina i nalaze se u svim tkivima i organima. Na primjer, željezo je neophodno za funkciju katalaze, citokroma i ribonukleotid reduktaze, a cink se nalazi u strukturi više od 300 enzima od kojih su mnogi bitni za ekspresiju gena. Osim njihove uloge u enzimskoj funkciji, elementi su također potrebni za brojne biološke procese kao što je na primjer transport kisika u krvi, koji je posredovan hemoglobinom koji sadrži željezo. Pri tome ne djeluju pojedinačno već zajedno s drugim esencijalnim elementima s kojima su u ravnoteži. Nedostatak ili višak bilo kojeg od ovih elemenata može dovesti do razvoja patoloških stanja. Elementi se ne produciraju i ne metaboliziraju te njihov status u organizmu ovisi o unosu kao i o dobi, stresu te fiziološkom stanju. Ovisno o prisutnim količinama u organizmu dijelimo ih na makroelemente (>100 mg), elemente u tragovima (1-100 mg) i elemente u ultratragovima (<1 mg).

Brojni elementi također mogu imati i negativan utjecaj na zdravlje organizma. Elementi za koje nije dokazana fiziološka uloga, a mogu prouzročiti nepovoljne i štetne učinke u organizmu već i pri niskim koncentracijama nazivamo toksičnim elementima. Okolišna izloženost arsenu (As), kadmiju (Cd), olovu (Pb) i niklu (Ni) može imati kancerogene posljedice jer aktiviraju onkogene signalne putove, izazivaju oksidacijski stres ili inhibiraju sustav za popravak DNK. Navedeni elementi mogu poremetiti aktivnost brojnih enzima. Na primjer, kadmij, zbog vrlo slične atomske strukture može zauzeti mjesto cinka u enzimima (Callejón-Leblic i sur., 2018). Već i pri niskim razinama izloženosti navedeni elementi mogu pridonijeti nastanku različitih bolesti i poremećaja u organizmu, uključujući poremećaj reproduktivnog zdravlja muškaraca (Telišman i sur., 2007; Pizent i sur., 2012).

Unatoč tome što se elementi ne metaboliziraju, proučavanje njihovih razina u tkivima i biološkim tekućinama može pružiti zanimljive i korisne informacije o promjenama koje se događaju tijekom bioloških procesa uključenih u napredovanje bolesti kao što je rak.

2.6. Oksidacijski stres

Izloženost pojedinim metalima i njihovo međudjelovanje može dovesti do poremećaja metabolizma energije te narušiti strukturu stanične membrane i dovesti do oksidacijskog stresa i stanične apoptoze (García-Sevillano i sur., 2014). Oksidacijski stres se definira kao neravnoteža između proizvodnje pro-oksidansa i njihove eliminacije zaštitnim mehanizmima u koje su uključene antioksidacijske molekule (Reuter i sur., 2010). Reaktivni kisikovi spojevi (ROS) su visoko reaktivne molekule ili atomi koji imaju pro-oksidacijsko djelovanje, konstantno se stvaraju u organizmu te sudjeluju u brojnim signalnim putovima. U fiziološkim uvjetima, njihova prisutnost je potrebna za normalno funkcioniranje brojnih mehanizama u stanici (Pizzimenti i sur., 2010).

U ROS se ubrajaju slobodni radikali i neradikalne vrste. U slobodne radikale kisika ubrajaju se hidroksilni radikal $\text{HO}^\bullet$, superoksidni radikal $\text{O}_2^{\bullet-}$ i peroksilni radikal $\text{RO}_2^\bullet$ te su njihove karakteristike kratko vrijeme trajanja u organizmu i visoka reaktivnost jer imaju nespareni elektron u vanjskoj ljusci. Neradikalne vrste su spojevi koji mogu pokrenuti reakcije u kojima nastaju slobodni radikali te u njih ubrajamo vodikov peroksid H_2O_2 , hipoklorastu kiselinu HClO , reaktivni (singlet) kisik $^1\text{O}_2$ te ozon O_3 (Hecht i sur., 2016). Reaktivni spojevi u reakciji s lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama oštećuju makromolekule što se povezuje s nastankom raznih patoloških stanja kao što su šećerna bolest, kardiovaskularne i neurološke bolesti te rak (Pizzimenti i sur., 2010). Kako bi se obranio od djelovanja ROS-a, organizam je razvio brojne antioksidacijske mehanizme koji se dijele na enzimске i ne-enzimске. U enzimске obrambene mehanizme se ubrajaju SOD, CAT, GPx, glutation reduktaza (GR) i glutation-S-transferaza (GST). SOD je jedna od primarnih antioksidacijskih obrana u tijelu te ima ključnu ulogu u smanjenju oksidacijskog stresa jer sprječava daljnje stvaranje slobodnih radikala katalizom dismutacije superoksidnih radikala u kisik i vodikov peroksid. CAT i GPx kataliziraju pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i molekularni kisik. U ne-enzimске obrambene mehanizme ubrajaju se brojne molekule kao na primjer glutation (GSH), α -tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina (vitamin C) i mokraćna kiselina.

2.7. Profil hlapljivih organskih metabolita

Iako je identifikacija hlapljivih organskih metabolita (engl. *Volatile Organic Metabolites*, VOM) omogućena tek u posljednja dva desetljeća razvojem modernih analitičkih tehnika, pretpostavka je da se VOM može koristiti kao biljeg bolesti još iz antičkog doba. Još je Hipokrat (4. st. pr. Kr.) prepoznao dijagnostički potencijal mirisa ljudskog tijela i povezoao određene mirise urina i iskašljaja s određenim bolestima.

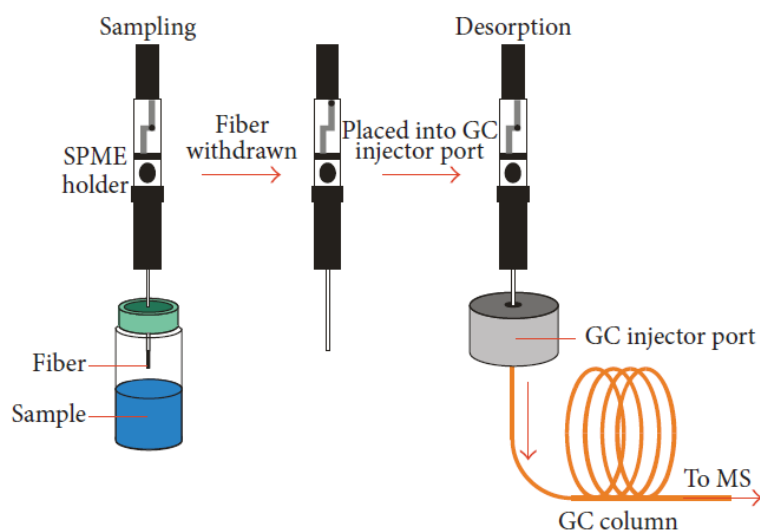
VOM je skupina organskih molekula koja uključuje alkohole, ketone, aldehide, ugljikovodike, izotiocijanate, amine, sulfide itd. koji su produkti metaboličkih reakcija. Uobičajeno VOM sadrži do 12 ugljikovih atoma, male je molekulske mase te ima temperaturu vrenja nižu od 300 °C (Živković Semren i sur., 2018). Naše tjelesne stanice proizvode stotine VOM-a koji se izlučuju izdahnutim zrakom, kožom, znojem, urinom, stolicom i krvlju. Patološki procesi u organizmu, kao što su razne infekcije, metabolički poremećaji ili rak utječu na vrstu i količinu svakodnevno izlučenih VOM-a (Hong-Geller i Adikari, 2017).

Stanice raka stvaraju specifične VOM-e koje zdrava stanica tijekom normalnog fiziološkog procesa nije u mogućnosti proizvesti. Prema podacima iz literature, pojedini VOM-i u urinu razlikuje se između zdravih osoba i pacijenata oboljelih od raka. Stoga određivanje VOM-a u urinu i njegova identifikacija može biti korisna u dijagnostici pojedinih poremećaja ili bolesti (Matsumura i sur., 2010; Schmidt i Podmore, 2015). Promjena u profilu VOM-a povezuje se s promijenjenom oksidacijsko-redukcijskom ravnotežom u organizmu koja se često smatra uzrokom kancerogeneze (Pereira i sur., 2014). Prema podatcima iz literature VOM-i se ističu kao potencijalni specifični biološki biljezi raka pluća, dojke i bubrega (Matsumura i sur., 2010; Silva i sur., 2012; Monteiro i sur., 2014).

Analiza VOM-a

Vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) trenutno se smatra zlatnim standardom za odjeljivanje, pronalaženje, potvrđivanje identiteta i mjerenje koncentracije VOM-a. GC-MS je učinkovita, osjetljiva i reproducibilna tehnika za analizu malih hlapljivih molekula. Uzorci koji se analiziraju GC-MS tehnikom moraju biti u plinovitoj fazi tako da inertni noseći plin može transportirati uzorak kroz kromatografsku kolonu.

Instrumentalnoj analizi prethodi proces ekstrakcije s ciljem odvajanja željenih analita. Arthur i Pawliszyn (1990) su razvili postupak mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid phase microextraction*, SPME) koja pojednostavljuje pripremu uzoraka jer spaja ekstrakciju i ukoncentriravanje analita u jednom koraku. Mikroekstrakcija hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka (engl. *Headspace*, HS-SPME) zadovoljava uvjete visoke osjetljivosti bez gubitaka i kontaminacije uzorka potrebnog za analizu VOM-a u urinu. HS-SPME tehnika ne koristi otapala čime je smanjena mogućnost onečišćenja sustava odnosno gubitak pojedinih metabolita uslijed njihove interakcije s molekulama otapala ili kakvog drugog onečišćivala. HS-SPME tehnika je 10 do 100 puta osjetljivija od klasične ekstrakcije jer se ekstrakcija provodi pomoću vlakna koje ima veliki kapacitet i uzorak se može ukoncentrirati te se uklanja efekt matrice. Dodatak soli (npr. natrijevog klorida) u suvišku u uzorak poboljšava ekstrakciju te pomiče ravnotežu između tekuće i plinovite faze pa veći broj hlapljivih spojeva prelazi u plinovitu fazu (Živković Semren i sur., 2018). Kod pripreme uzorka potreban je zatvoreni sustav s točno definiranom temperaturom i vremenom trajanja ekstrakcije gdje se uspostavlja ravnoteža između tekuće i plinovite faze. Lako hlapljivi spojevi se izdvajaju iz složene matrice i adsorbiraju na vlakno napravljeno od taljenog silicija i prekriveno adsorbensom. Nakon toga se vlakno injektira u plinski kromatograf gdje se provodi analiza (slika 6).



Slika 6. Prikaz HS-SPME sustava: adsorpcija analita na vlakno i desorpcija analita s vlakna u GC injektoru (Preuzeto: Schmidt i sur.,2015)

Identifikacija VOM-a

Identifikacija spojeva analiziranih GC-MS tehnikom je pojednostavljena jer se kao produkt analize dobivaju maseni spektri s reproducibilnim obrascima fragmentacije ovisno o ionskom izvoru koji omogućuju stvaranje javnih baza podataka. U ovom doktorskom radu korištena je knjižnica spektara masa NIST kao pomoć u identifikaciji VOM-a.

AMDIS (engl. *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*) je besplatno dostupan napredni alat koji se koristi kako bi olakšao identifikaciju hlapljivih spojeva analiziranih GC-MS tehnikom. Sustav AMDIS obrađuje kromatograme uklanjajući pozadinski šum te provodi spektralnu dekonvoluciju. Potom detektira pojedini spoj te njegov spektar masa automatski uspoređuje s knjižnicom spektara masa NIST i indeksima zadržavanja.

E. Kováts (1958) je definirao indekse zadržavanja (engl. *retention index*, RI) koji se određuju tako da se analizira smjesa homolognog niza alkana, te se vremenu zadržavanja (engl. *retention time*, RT) na kojem pojedini alkan izlazi s kromatografske kolone dodjeljuje indeks ovisno o broju C atoma u alkanu (npr. dekan s 10 C atoma ima RI 1000). Potom se računa RI nepoznatog spoja uzimajući u obzir između koja dva alkana spoj izlazi s kromatografske kolone po formuli:

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

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

2.8. Analiza metaboličkih putova (engl. *Pathway Analysis*)

Nakon metaboličke analize potrebno je odrediti ulogu značajnih metabolita u organizmu. U metabolomičkim eksperimentima koristi se nekoliko baza kao što su: HMDB (engl. *Human Metabolome Data Base*), KEGG (engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), SMPDB (engl. *Small Molecule Pathway Database*), itd.

HMDB (dostupno na web-stranici: <http://www.hmdb.ca/>) slobodno je dostupna baza podataka koja sadrži detaljne informacije o detektiranim metabolitima, malim molekulama koje se nalaze u ljudskom tijelu. Omogućava uvid u dostupne kemijske, biokemijske i kliničke podatke o svakom detektiranom metabolitu uključujući podrijetlo i ulogu metabolita u organizmu.

KEGG (dostupno na web-stranici: <https://www.genome.jp/kegg/>) slobodno je dostupna baza koja pruža uvid u funkciju i svrhu biološkog sustava na molekularnoj i genomskoj razini. Riječ je o računalnom prikazu biološkog sustava koji se sastoji od gena i proteina (genomske informacije) i kemijskih tvari (kemijskih informacija) koje su integrirane sa znanjem o molekulskim interakcijama i reakcijama. Također sadrži informacije o bolestima i utjecaju lijekova na biološki sustav.

SMPDB (dostupno na web-stranici: <http://smpdb.ca/>) slobodno je dostupna baza podataka. Interaktivna je i vizualna baza koja sadrži više od 30 000 metabolomičkih putova malih molekula u čovjeku. SMPDB je dizajniran posebno za pomoć pri razumijevanju i otkrivanju putova u metabolomici, transkriptomici i proteomici. Pruža detaljne, lako pretražive, povezane dijagrame uobičajenih metaboličkih putova, metaboličkih putova bolesti, metaboličkih signalnih putova i putova djelovanja lijekova.

MetaboAnalyst

MetaboAnalyst (dostupno na web-stranici: <http://www.metaboanalyst.ca>) je alat za obradu podataka dobivenih metabolomičkim analizama. Prihvaća različite ulazne podatke (NMR i MS spektre, kvalitativne i kvantitativne podatke). Također nudi brojne mogućnosti za obradu metabolomičkih podataka, normalizaciju podataka, multivarijantnu statističku analizu, grafičku obradu, identifikaciju metabolita i detektiranje metabolomičkih putova. MetaboAnalyst omogućava statističke analize poput t-testa, analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA), diskriminantne analize parcijalnih projekcija najmanjih kvadrata (engl. *Partial Least Square Discriminant Analysis*, PLS-DA), hijerarhijsko klasteriranje i druge. Također koristi veliku knjižnicu referentnih spektara kako bi se olakšala identifikacija spoja iz većine vrsta ulaznih spektara. Automatski koristi navedene baze HMDB i KEGG u pretraživanju metaboličkih putova.

2.9. Primjena multivarijantne analize rezultata mjerenja u metabolomici

Primjenom univarijantne statističke analize podataka varijable se analiziraju pojedinačno. Međutim, metabolomička istraživanja prate povećani broj svojstava određene grupe. Dolazi do gomilanja podataka koji su u kompleksnim odnosima te je potrebno primijeniti statistički model koji će objediniti višestruka opažanja i pružiti cjelovitu sliku o povezanosti svih praćenih varijabla. Multivarijantna analiza je grana statistike koja analizira višestruke izmjere većeg broja varijabli na jednom ili više uzoraka (Cooley i Lohnes, 1973). Metode multivarijantne analize su analiza glavnih komponenti PCA, faktorska analiza (engl. *Factor Analysis*, FA), uopćena Mahalanobisova udaljenost (engl. *Mahalanobis Generalized Distance*, D_M), diskriminantna analiza (engl. *Discriminant Analysis*, DA), multipla regresija (engl. *Multiple Regression*), kanonička korelacija (engl. *Canonical Correlation*), klaster analiza (engl. *Cluster Analysis*) i multidimenzionalno skaliranje (engl. *Multidimensional Scaling*, MDS). U ovom doktorskom istraživanju uz univarijantne analize primijenjena je linearna diskriminantna analiza (LDA).

LDA je često korištena klasifikacijska metoda. Temelji se na građenju linearno diskriminantnih funkcija koje povećavaju razliku između uzoraka koji pripadaju različitim klasama na račun smanjenja razlike između uzoraka koji pripadaju istoj klasi. LDA određuje pravce u kojima je razlika između klasa najveća te joj je cilj identifikacija varijabli odgovornih za klasifikaciju uzoraka i konstrukciju modela za predviđanje klasifikacije novih uzoraka čija grupna pripadnost nije poznata. Broj diskriminantnih funkcija jednak je broju klasa minus jedan te je uključena predikcija uspješnosti klasifikacije (Giansante i sur., 2003).

3. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Hipoteza

Promjene biokemijskih i molekularnih procesa u organizmu pacijenata oboljelih od tumora testisa nastale zbog bolesti odnosno terapije moguće je pratiti kreiranjem metabolomičkih profila aminokiselina i hlapljivih spojeva te multielementnog profila u urinu što može pridonijeti objašnjenju etiologije bolesti.

3.2. Ciljevi

- kreirati kvantitativni profil slobodnih aminokiselina i elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa i odrediti vrijednosti parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u krvi te ih usporediti s kontrolnim ispitanicima
- procijeniti učinak kombinirane kemoterapije bleomicinom, etopozidom i cisplatinom na te vrijednosti odmah nakon završetka drugog ciklusa kemoterapije te godinu dana nakon završetka kemoterapije
- kreirati kvalitativni profil hlapljivih organskih metabolita kako bi detektirali koje se vrste, ovisno o funkcionalnim skupinama, javljaju u urinu.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u 167 muškaraca, starijih od 18 godina, bez profesionalne izloženosti metalima ili organskim otapalima:

- 99 ispitanika s novo-dijagnosticiranim, histološki potvrđenim germinativnim tumorom testisa, pacijenata Klinike za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Uključeni su u istraživanje prije početka bilo kakve terapije odnosno prije kirurškog zahvata (I. uzorkovanje, N=99). Ispitanici koji su bili tretirani kemoterapijom prema BEP protokolu (tj. koja je sadržavala bleomicin, etopozid i cisplatinu) praćeni su nakon završetka drugog ciklusa kemoterapije (II. uzorkovanje, N=86). Dio tih ispitanika praćen je godinu dana nakon kemoterapije (III. uzorkovanje, N=40).
- 68 kontrolnih ispitanika bez maligne bolesti u anamnezi, dobrovoljni darivatelji krvi pri Hrvatskom zavodu za transfuzijsku medicinu u Zagrebu.

4.2. Prikupljanje podataka o ispitanicima anketnim upitnikom

Uz pomoć liječnika, za svakog ispitanika popunjen je anketni upitnik. Upitnici su sadržavali informacije o dobi, prehrambenim navikama, pušenju i konzumiranju alkohola, prijašnjem i sadašnjem zaposlenju i zdravstvenom stanju.

4.3. Poštivanje etičnosti

Istraživanje je provedeno u skladu s uobičajenim standardnim etičkim načelima u biomedicinskim istraživanjima, uključujući osnove dobre kliničke prakse. Sve postupke istraživanja odobrila su Etička povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Ispitanici su bili upoznati sa svrhom i ciljevima istraživanja te su svojim potpisom obrasca obaviještenog ispitanika potvrdili pristanak sudjelovanja u istraživanju i odobrili uzimanje bioloških uzoraka za planirane analize, uporabu osobnih podataka te rezultata analiza isključivo u znanstvene svrhe uz zaštitu privatnosti i anonimnost ispitanika.

4.4. Popis upotrijebljenih kemikalija

- **2-metilfuran**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat], ABTS**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **2,5-dimetilfuran**, 99 %-tni, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **aceton**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **amonijev željezov (II) sulfat heksahidrat**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **β -nikotinamid adenin dinukleotid 2'-fosfat, β -NADPH**, ≥ 97 %-tni, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **boja za proteine 'Serva-Blue G'**, Serva, Heidelberg, Njemačka
- **dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline, Na_2EDTA** , Merck, Darmstadt, Njemačka
- **dl-ditiotreitol**, min 99 %-tni, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **etanol**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **etil-etanoat**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **etilendiamin-tetraoctena kiselina** stupnja čistoće *pro analysi*, **EDTA**, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **fenol**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **fosforna kiselina**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **glicerol**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **glutation reduktaza, GR**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **glutation, GSH**, 98-100 %-tni, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **goveđi serumski albumin, BSA**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **heksanal**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **heksan-3-on**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **heptan-2-on**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **heptan-4-on**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **individualne standardne otopine elemenata Na, Mg, Al, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Mo, Cd, Sn, Pt, Hg, Tl i Pb, te Sc, Ge, Rh, Tb, Ir, Lu** (1000 ± 7 mg/L u 4 %-tnoj dušičnoj kiselini ili 20 %-tnoj klorovodičnoj kiselini), SCP Science, Baie D'Urfé, Kanada
- **kalijev cijanid**, Merck, Darmstadt, Njemačka

- **kalijev dihidrogenfosfat**, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **kalijev heksacijanoferat**, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **kalijev hidrogenfosfat**, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **klorovodična kiselina**, VWR International, West Chester, PA, SAD
- **kreatinin**, stupnja čistoće *pro analysi*, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **ksilenol oranž**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **l-glutation**, *cryst. research grade*, Serva, Feinbiochemica, Heidelberg, Njemačka
- **(metildisulfanil)metan**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **metilfenol**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **mravlja kiselina**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **natrijev acetat**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **natrijev acetat**, Sigma, St. Louis, Missouri, SAD
- **natrijev dihidrogenfosfat**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **natrijev hidrogenfosfat**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **natrijev hidrogenkarbonat**, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **natrijev hidroksid**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **natrijev klorid**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **octena kiselina**, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **o-dianizidin dihidroklorid**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **pikrinska kiselina**, stupnja čistoće *pro analysi*, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **Phenomenex EZ:faast test paket** za određivanje slobodnih aminokiselina primjenom GC-MS tehnike, Phenomenex, Aschaffenburg, Njemačka
- **RanSod fosfatni pufer** 0,01 mol/L, pH 7,0; Ransod Sample Diluent SD124, Randox, Crumlin, UK
- **RanSod test paket**, Randox, Crumlin, UK
- **redestilirana voda**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **smjesa standarda C₈-C₂₀ alkana** koncentracije 40 mg/L u heksanu, Fluka, Buchs, Švicarska
- **sumporna kiselina**, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- **suprapur** dušična kiselina, 65 %-tna, Merck, Darmstadt, Njemačka
- **t-butil hidroperoksid**, 70 %-tni, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **TCL Volatiles Mix 1**, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **triton X-100**, 0,2 %-tni, TX-100, BDH Chemicals Ltd., UK

- **trolox** ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), 97%-tna, Sigma, St. Louis, MO, SAD
- **ultra čista voda** specifične vodljivosti 0,055 µS/cm
- **vodikov peroksid**, 30 %-tni, Sigma, St. Louis, MO, SAD

4.5. Uređaji i oprema rabljeni u eksperimentalnom radu

- **analitička vaga** Mettler Toledo AG, Švicarska
- **centrifuga** Eppendorf 5415-C, Hamburg, Njemačka
- **čitač mikrotitarskih pločica** TECAN Infinite M200Pro, TECAN Group Ltd, Švicarska
- **kapilarna kolona za kromatografsko razdjeljivanje** TG-5MS duljine 30 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm, sa stacionarnom fazom 5% difenil- i 95% dimetilpolisiloksana debljine filma 0,25 µm, Thermo Scientific, Runcorn, UK
- **karboksen/polidimetilsiloksansko (Carboxen/PDMS)** vlakno za SPME, 75 µm, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- **klipne pipete** Eppendorf s nastavcima
- **komercijalni držač vlakna za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME)** za ručnu upotrebu, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- **polidimetilsiloksan (PDMS)** vlakno za SPME, 100 µm, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- **polidimetilsiloksan/divinilbenzen (PDMS/DVB)** vlakno za SPME, 65 µm, Supelco, Bellefonte, SAD
- **staklene bočice za ekstrakciju para iznad otopina (engl. *Headspace vials*)** volumena 5 mL (20,5 mm × 38 mm) s **aluminijским čepom** Macherey-Nagel GmbH & Co. (Düren, Njemačka) i **septum** promjera 20 mm Supelco (Bellefonte, PA, SAD)
- **SubPur sustav** za pročišćavanje kiseline Milestone S.r.l., Italija
- **termoblok** Barnstead/Lab Line, Melrose Park, IL, SAD
- **termostatirani spektrofotometar** Cary® 50 UV-Vis, Varian, Inc., Mulgrave, Australija
- **uređaj za pročišćavanje vode** GenPur UV (Ultra pure water system), TKA Wasseraufbereitung systeme GmbH, Njemačka
- **uređaj za spektrometriju masa s induktivno spregnutom plazmom, ICP-MS 7500cx** Agilent Technologies, Njemačka

- **vezani sustav plinski kromatograf-spektrometar masa s kvadrupolom kao detektorom, GC-MS, GC 7890 A, MS 5975 C, Agilent Technologies Palo Alto, CA, SAD**
- **vezani sustav plinski kromatograf-spektrometar masa s ionskom stupicom kao detektorom, GC-MS, GC Trace 1300, Thermo Scientific, Milan, Italija; MS ITQ 700, Thermo Scientific, Austin, TX, SAD**
- **Vibromix miješalica, Tehnica, Železniki, Slovenija**

4.6. Skupljanje i pohrana uzoraka krvi i urina

Posebna pažnja posvećena je izbjegavanju kontaminacije uzoraka tijekom sakupljanja, pohrane i analize.

Uzorci krvi iz kubitalne vene vađeni su u epruvete obložene heparinom (*BD Vacutainer Trace element Heparine*, Becton Dickinson, SAD) za analizu GPx-a, SOD-a, GSH, ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (engl. *Total Antioxidant Capacity*, TAC) i ukupnog oksidacijskog statusa (engl. *Total Oxidant Status*, TOS).

Aktivnost GPx-a određena je u uzorcima pune krvi, aktivnost SOD-a u hemolizatu ispranih eritrocita, a koncentracija GSH, ukupni TAC i TOS određeni su u uzorcima plazme. Odijeljeni uzorci pune krvi, eritrocita i plazme pohranjeni su na -80 °C do analize.

Jednokratni uzorci jutarnjeg urina (srednji mlaz) sakupljeni su u polietilenske bočice volumena 100 mL i alikvotirani dekantiranjem u čiste polietilenske epruvete za multielementnu analizu te analizu aminokiselina i hlapljivih metabolita. Uzorci za multielementnu analizu i analizu hlapljivih spojeva zakiseljeni su sa 100 µL 65 %-tne (v/v) HNO₃ na 10 mL urina. Nezakiseljeni uzorci urina korišteni su za analizu aminokiselina i određivanje koncentracije kreatinina. Alikvotirani uzorci urina pohranjeni su na -80 °C do analize.

4.7. Plan istraživanja

U ovom doktorskom radu korištena su dva osnovna metodološka pristupa u svrhu metabolomičkog profiliranja uzoraka urina u skupinama ispitanika: ciljane (engl. *target*) i ne-ciljane (engl. *non-target*) analiza.

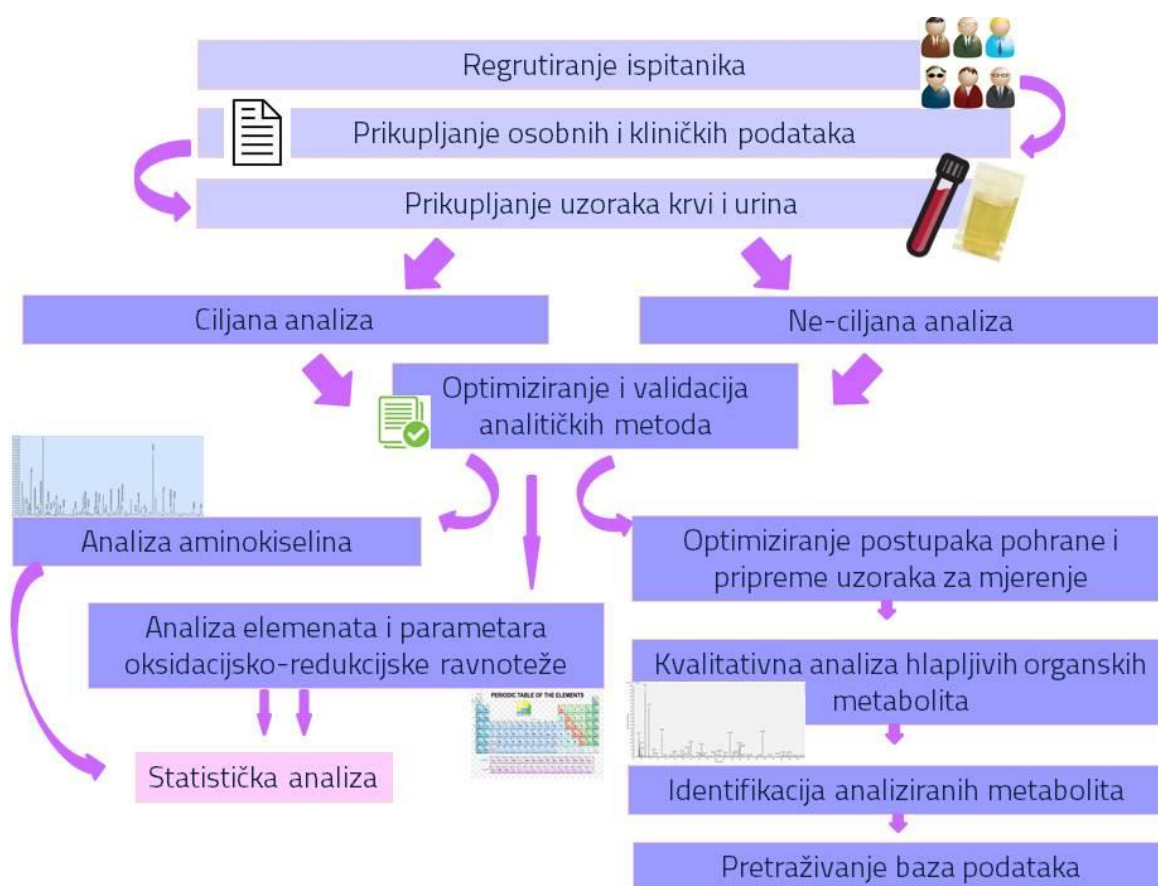
Ciljane analize uključivale su:

- ❖ određivanje profila aminokiselina
 - određivanje koncentracije aminokiselina u urinu ispitanika uz validaciju metode i statističku obradu dobivenih rezultata
 - analizu razlike u koncentraciji aminokiselina izmjerenih u uspoređenim skupinama ispitanika
 - pretraživanje funkcionalnih baza podataka uz pomoć specijaliziranih računalnih algoritama i literaturnih navoda u svrhu određivanja uloge razlikovnih aminokiselina u metabolizmu čovjeka
- ❖ određivanje multielementnog profila
 - određivanje koncentracije elemenata u urinu ispitanika
 - analizu razlike u koncentraciji elemenata izmjerenih u uspoređenim skupinama ispitanika
- ❖ određivanje parametara oksidacijskog stresa u uzorcima krvi i analiza razlike između skupina ispitanika.

Ne-ciljana analiza uključivala je:

- ❖ određivanje profila hlapljivih organskih spojeva
 - razvoj i optimizaciju postupka pripreme i mjerenja uzoraka urina primjenom eksperimentalnog dizajna (reducirani faktorski dizajn i Doehlertov dizajn matrice)
 - ispitivanje stabilnosti hlapljivih metabolita u uzorcima urina
 - kvalitativnu analizu hlapljivih spojeva
 - identifikaciju hlapljivih metabolita u urinu
 - validaciju analitičke metode za identificirane metabolite
 - kreiranje profila hlapljivih metabolita
 - pretraživanje funkcionalnih baza podataka i literaturnih navoda u svrhu određivanja podrijetla i uloge identificiranih metabolita u organizmu.

Shematski prikaz plana istraživanja prikazan je na slici 7.



Slika 7. Plan istraživanja

4.8. Metode

4.8.1. Određivanje koncentracije slobodnih aminokiselina u urinu

Analiza slobodnih aminokiselina u urinu provedena je upotrebom Agilent Technologies (Palo Alto, CA, SAD) vezanog sustava plinske kromatografije (7890 A) i spektrometrije masa (5975 C) uz uporabu komercijalnog test-paketa EZ:faast za analizu slobodnih aminokiselina GC-MS tehnikom (Phenomenex, Aschaffenburg, Njemačka). Test-paket sadrži sve potrebne kemikalije navedene u tablici 2.

Reagencije i uzorci za analizu aminokiselina u urinu pripremljene su prema uputi proizvođača. Postupak se sastoji od ekstrakcije aminokiselina na čvrstoj fazi pomoću sorbensa kojim su punjeni nastavci nakon čega slijede derivatizacija na sobnoj temperaturi i ekstrakcija između dvije tekuće faze.

Tablica 2. Sadržaj test-paketa EZ:faast za analizu slobodnih aminokiselina GC-MS tehnikom

Reagensi	Sastojci reagensa
Reagens 1 Interni standard	Norvalin 0,2 mol/L n-propanol 10 %-tni
Reagens 2 Otopina za ispiranje	n-propanol
Reagens 3A Otopina za eluiranje I	natrijev hidroksid
Reagens 3B Otopina za eluiranje II	n-propanol 3-pikolin
Reagens 4 Organska otopina I	kloroform propil kloroformat
Reagens 5 Organska otopina II	izooktan
Reagens 6 Otapalo	izooktan 80 %-tni kloroform 20 %-tni
Standardi aminokiselina Standardi 1, 2 i 3	Standard 1: alanin, sarkozin, glicin, α -aminomaslačna kiselina, valin, β -aminoizomaslačna kiselina, leucin, aloizoleucin, izoleucin, treonin, serin, prolin, asparaginska kiselina, metionin, glutaminska kiselina, fenilalanin, α -aminoadipinska kiselina, ornitin, lizin, histidin, hidroksilizin, tirozin, cistin Standard 2: asparagin, glutamin, triptofan Standard 3: alo-izoleucin, α -aminopimelna kiselina, cistationin, glicil-prolin, hidroksilizin, tioprolin.

U staklenu epruvetu dodano je po 100 μ L uzorka urina odmrznutog na sobnoj temperaturi i 100 μ L otopine internog standarda (reagens 1). Dobivena otopina je pomoću šprice polako uvučena kroz priloženi plastični nastavak (*tips*) punjen sorbensom kako bi se aminokiseline iz uzorka uspjele vezati na sorbens. U otopini koja je uvučena u špricu ostali su smetajući spojevi te se ta otopina bacila. Zatim je u epruvetu dodano 200 μ L otopine za ispiranje (reagens 2) te je dobivena otopina pomoću šprice postupno uvučena kroz isti nastavak sa sorbensom. Otopina koja je uvučena u špricu se bacila. Nadalje je u epruvetu dodano 200 μ L svježe pripravljene otopine za eluiranje dobivene miješanjem reagensa 3A i 3B u omjeru 3:2. Ta je otopina polako pomoću šprice uvučena u nastavak sve do filtera, a zatim je naglo istisnuta natrag u epruvetu te je postupak ponavljan višekratno sve dok sav sorbens nije izašao iz nastavka. Zatim je u epruvetu dodano 50 μ L organske otopine I (reagens 4) kako bi se aminokiseline derivatizirale u dovoljno hlapljive derivate prikladne za plinskokromatografsku

analizu. Nakon deset sekundi miješanja na miješalici, uzorak je ostavljen stajati jednu minutu na sobnoj temperaturi te je ponovo promiješan na miješalici pet sekundi i ostavljen stajati. Zatim je u epruvetu dodano 100 μL izooktana (reagens 5) te je dobivena otopina, nakon miješanja na miješalici pet sekundi, ostavljena stajati jednu minutu da se odijele vodeni i organski sloj. Gornji organski sloj volumena 50 do 100 μL otpipetiran je u vijalicu za autosampler. Nakon uparavanja u struji dušika, suhi ostatak je otopljen dodatkom 100 μL reagensa 6 i promiješan na miješalici pet sekundi. Tako pripremljeni uzorak analiziran je pomoću GC-MS tehnike.

Za kromatografsko razdvajanje korištena je Zebron ZB-AAA kolona duljine 10 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm (Phenomenex, Aschaffenburg, Njemačka). Kao mobilna faza korišten je helij protoka 1,1 mL/min. Temperatura injektora je postavljena na 250 °C te je korištena opcija djelomičnog unosa uzorka na kolonu (engl. *Split Injection*) u omjeru 1:15. U plinskrokromatografskoj pećnici početna temperatura je postavljena na 110 °C te je povišena na 320 °C postupnim zagrijavanjem brzinom od 30 °C u minuti. Analiza je trajala 7 minuta. Radni uvjeti za sustav spektrometrije masa uključivali su ionizaciju elektronima pri energiji od 70 eV, temperaturu ionskog izvora od 240 °C i temperaturu detektora od 180 °C. Za prikupljanje podataka korišten je način snimanja ukupne struje iona, a spektri masa bilježeni su u rasponu m/z od 45-450.

Granice detekcije su definirane od strane proizvođača te su prikazane u tablici 3.

Tablica 3. Granice detekcije za analizirane aminokiseline definirane od strane proizvođača.

Aminokiselina	LOD (nmol/L)
alanin sarkozin glicin leucin prolin tioprolin asparaginska kiselina triptofan	0,1
α -aminomaslačna kiselina valin β -aminizomaslačna kiselina izoleucin treonin serin metionin glutaminska kiselina fenilalanin α -aminoadipinska kiselina ornitin lizin histidin tirozin	0,2
α -aminopimelna kiselina	0,4
asparagin	2,5
glicil prolin	5
glutamin hidroksilizin cistationin cistin	10

Linearnost i raspon metode

Linearnost metode provjerena je analizom standardnih otopina aminokiselina pripremljenih u koncentracijskom rasponu od 20 do 200 nmol/L za sve analizirane aminokiseline u urinu.

Ispitivanje ponovljivosti metode

Za ispitivanje ponovljivosti plinskokromatografskog određivanja aminokiselina u urinu pripravljeno je šest uzoraka urina u kojima je koncentracija aminokiselina bila 50 nmol/mL i šest uzoraka urina u kojima je koncentracija aminokiselina bila 100 nmol/mL. Ponovljivost je izračunata kao omjer standardne devijacije i aritmetičke sredine mjerenja, tj. kao relativna standardna devijacija (RSD) prema formuli

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

Ispitivanje točnosti metode

Točnost metode provjerena je pomoću testa iskorištenja, dodatkom poznate koncentracije aminokiselina u šest uzoraka urina. Aminokiseline su dodane u koncentraciji od 50 nmol/mL i 100 nmol/mL. Stvarne koncentracije aminokiselina u tim uzorcima očitane su iz baždarnog pravca i izražene u postocima na teorijsku koncentraciju.

Analiza metaboličkog puta (Pathway analysis)

MetaboAnalyst 4.0 korišten je za identifikaciju metaboličkih putova u kojima sudjeluju aminokiseline koje su se pokazale statistički značajno različite između razmatranih skupina ispitanika.

Pri identifikaciji metaboličkog puta korištena je knjižnica *Homo sapiens* (čovjek).

4.8.2. Određivanje koncentracije elemenata u urinu primjenom ICP-MS tehnike

Određivanje koncentracije elemenata (metala i polumetala) u uzorcima urina provedeno je nakon razrjeđenja uzoraka urina 10 puta 1 %-tnom otopinom dušične kiseline (tj. 0,3 mL urina i 2,7 mL otopine). Određeni su sljedeći izotopi elemenata: ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{39}K , ^{43}Ca , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{68}Zn , ^{75}As , ^{78}Se , ^{95}Mo , ^{114}Cd , ^{118}Sn , ^{195}Pt , ^{202}Hg , ^{205}Tl i ^{208}Pb prema metodi Živković i sur. (2014).

Određivanje koncentracije elemenata u urinu provedeno je primjenom tehnike spektrometrije masa induktivno spregnute plazme s kolizijskom/reakcijskom komorom (ICP-MS, 7500cx Agilent Technologies, Njemačka). Za mjerenje su korišteni inertni plinovi argon, helij i vodik visoke čistoće (99,999 %). Postavke instrumenta optimizirane su svakodnevno kako bi se postigla dobra osjetljivost te niski udio interferirajućih oksida (< 1 %) i dvostruko nabijenih iona (< 2 %).

Kao unutarnji standardi korišteni su skandij (^{45}Sc), germanij (^{72}Ge , ^{74}Ge), rodij (^{103}Rh), terbij (^{159}Tb), iridij (^{193}Ir) i lutecij (^{175}Lu). Konačna koncentracija pojedinog unutarnjeg standarda u kalibracijskim standardima i svim uzorcima iznosila je 2 µg/L.

Analizom komercijalno dostupnih referentnih materijala s certificiranim vrijednostima ispitivanih elemenata potvrđena je kvaliteta rezultata određivanja koncentracija metala i polumetala u urinu. Upotrijebljeni su referentni uzorci urina: *Urine Control Level I* i *Level II* (Recipe ClinChek®, Njemačka) i *Seronorm™ Trace elements Urine* (Sero AS, Norveška).

4.8.3. Određivanje koncentracije kreatinina u urinu

Koncentracija kreatinina je mjerena u uzorcima urina prema metodi po Jaffeu (Štraus, 1992). Metoda se zasniva na reakciji kreatinina s pikrinskom kiselinom u alkalnom mediju koja se prati spektrofotometrijski na valnoj duljini 492 nm.

4.8.4. Analiza parametara oksidacijskog stresa

Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a u eritrocitima

Katalitička aktivnost SOD-a u eritrocitima izmjerena je prema Europskoj standardiziranoj metodi (EC-FLAIR) (Belsten i Wright, 1995a) uz primjenu komercijalno dostupnog test-paketa RanSod (Randox, Crumlin, UK). Metoda se zasniva na praćenju reakcije pretvorbe ksantina u mokraćnu kiselinu koju katalizira ksantin oksidaza. Pri tome nastaju superoksidni radikali koji u reakciji s INT-om (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolijev klorid) stvaraju formazonsko crveno obojenje. Što je u uzorku veća aktivnost SOD-a, to je redukcija INT-a sporija te je koncentracija formazonskog crvenog obojenja manja. Redukcija INT-a u obojeni formazon praćena je spektrofotometrijski na valnoj duljini 505 nm. Reagensi su pripremljeni prema uputi proizvođača. Dobivena vrijednost aktivnosti SOD-a izražena je po gramu hemoglobina.

Određivanje katalitičke aktivnosti GPx-a u krvi

Aktivnost enzima GPx u krvi izmjerena je prema Europskoj standardiziranoj metodi (EC-FLAIR) (Belsten i Wright, 1995b). Metoda se zasniva na praćenju reakcije redukcije tert-butil hidroperoksida koju katalizira GPx uz istodobnu oksidaciju glutationa. Stvoreni oksidirani glutation djelovanjem enzima GR iznova prelazi u reducirani oblik uz istovremenu oksidaciju NADPH, a brzina oksidacije NADPH proporcionalna je aktivnosti GPx-a u uzorku. Reakcija brzine raspada NADPH praćena je spektrofotometrijski na valnoj duljini 340 nm. Dobivena vrijednost aktivnosti GPx-a izražena je po gramu hemoglobina.

Određivanje koncentracije hemoglobina (Hb) u krvi i eritrocitima

Hb u eritrocitima i punoj krvi izmjeren je prema standardiziranoj metodi (ICSH, 1995). Metoda se zasniva na reakciji oksidacije željeza kalijevim heksacijanoferatom (III) u hemu i formiranju methemoglobina koji se djelovanjem kalijevog cijanida pretvara u hemiglobincijanid (HiCN) te se njegova apsorbancija mjeri spektrofotometrijski na valnoj duljini 540 nm.

Određivanje GSH u plazmi

Koncentracija GSH u krvnoj plazmi izmjerena je izvornom spektrofotometrijskom metodom po Ellmanu (1958). Metoda se temelji na vezanju GSH s DTNB-om (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoičnom kiselinom). U ovoj brznoj reakciji cijepa se disulfidna veza te nastaje 2-nitro-5-tiobenzoat (NTB⁻), koji se ionizira do NTB²⁻ koji je žute boje i apsorbira svjetlost valne duljine 412 nm. Dobivena vrijednost GSH izražena je po miligramu proteina.

Određivanje ukupnih proteina u plazmi

Koncentracija ukupnih proteina u krvnoj plazmi izmjerena je izvornom spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (1976). Metoda se temelji na reakciji proteina s bojom *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno s pobočnim grupama arginina, a u manjoj mjeri i s pobočnim grupama histidina, lizina, tirozina, triptofana i fenilalanina. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Pri tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski.

Određivanje ukupnog antioksidacijskog kapaciteta (TAC) u plazmi

TAC u krvnoj plazmi izmjeren je spektrofotometrijski prema objavljenoj metodi (Erel, 2004). U kiselom mediju ABTS (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) se oksidira vodikovim peroksidom u $ABTS^+$ te nastaje plavo-zeleno obojenje. S vremenom $ABTS^+$ prelazi u reducirani oblik i obojenje blijedi, a antioksidansi prisutni u uzorku ubrzavaju redukciju $ABTS^+$. Proporcionalno koncentraciji u uzorku, antioksidansi ubrzavaju smanjenje intenziteta obojenja što se registrira mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini 420 nm. Mjerenje apsorbancije provedeno je na uređaju TECAN Infinite M200Pro. Dobiveni rezultati su izraženi u mmol Trolox ekvivalenta po litri (mmol Trolox ekviv./L).

Određivanje ukupnog oksidacijskog statusa (TOS) u plazmi

TOS u krvnoj plazmi izmjeren je spektrofotometrijski prema objavljenoj metodi (Erel, 2005). Ova metoda se bazira na oksidaciji Fe^{2+} – orto-dianizidnog kompleksa u Fe^{3+} ion u prisutnosti oksidansa iz uzorka. Reakciju oksidacije pospješuje molekula glicerola koja je prisutna u reakcijskom mediju. Nastali Fe^{3+} ion zatim gradi obojeni kompleks sa ksilenol oranžom u kiseloj sredini. Dobiveni rezultati su izraženi u $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekvivalenta po litri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekviv./L).

4.8.5. Određivanje hlapljivih metabolita u urinu

Hlapljivi metaboliti u urinu određeni su primjenom HS-SPME-GC-MS tehnike. U procesu razvoja i optimizacije analitičkog postupka korišteni su uzorci urina trojice zdravih muškaraca u dobi od 25 do 38 godina, nepušača, bez profesionalne izloženosti metalima ili otapalima. Pri odabiru optimalnih eksperimentalnih uvjeta pratio se i uspoređivao zbroj površina ispod pikova analita različite polarosti i hlapljivosti duž cijelog kromatograma ukupne struje iona. Površina pikova odabranih spojeva izračunata je pomoću sustava Xcalibur (ver. 2.1, Thermo Scientific, San Jose, CA, SAD). Sva mjerenja provedena su u duplikatu.

GC-MS metoda za analizu hlapljivih metabolita u urinu

Analiza hlapljivih metabolita je provedena na plinskom kromatografu Trace 1300 (Thermo Scientific, Milan, Italija) spregnutim sa spektrometrom masa ITQ 700 (Thermo Scientific, Austin, TX, SAD) s ionskom stupicom kao detektorom. Za kromatografsko razdjeljivanje koristila se kapilarna kolona TG-5MS duljine 30 m i unutarnjeg promjera 0,25 mm, sa stacionarnom fazom 5 % difenil- i 95 % dimetilpolisiloksana debljine filma 0,25 μm (Thermo Scientific, Runcorn, UK). Kao mobilna faza korišten je inertni plin helij protoka 1 mL/min.

Temperatura injektora bila je 280 °C. U plinskokromatografskoj pećnici temperatura se 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 280 °C brzinom od 7 °C u minuti, nakon čega slijedi rast od po 50 °C u minuti do konačne temperature pećnice od 310 °C. Pri toj temperaturi eluiraju se svi ekstrahirani spojevi iz kolone, što je potvrđeno analizom vlakna nakon analize uzorka urina. Analiza je trajala 42 minute. Radni uvjeti za sustav spektrometrije masa uključuju ionizaciju elektronima pri energiji od 70 eV i temperaturu međuspoja od 260 °C te ionskog izvora od 200 °C. Za prikupljanje podataka korišten je način snimanja ukupne struje iona, a spektri masa bilježeni su u rasponu m/z od 30 do 400 brzinom od 5 snimaka u sekundi.

Kako bi se kontrolirao analitički sustav, kao referentni standardi korišteni su C₈-C₂₀ alkani. Oni su analizirani kako bi se potvrdila stabilnost uvjeta instrumenta tijekom cijelog provođenja eksperimenta.

Razvoj i optimizacija postupka mikroekstrakcije hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)

U preliminarnom eksperimentu proveden je izbor vlakna za ekstrakciju pri čemu je uspoređena učinkovitost ekstrakcije s tri različita SPME vlakna (100 µm-PDMS, 65 µm-PDMS/DVB i 75 µm-Carboxen/PDMS). U bočicu je odvagano 1 g natrijevog klorida te je dodano 2 mL zakiseljenog uzorka urina (pH 2 do 3). Bočice su zatvorene septumom i aluminijskim čepom. Nakon miješanja na miješalici (60 sekundi), uzorak urina je inkubiran u termobloku 60 minuta na 60 °C kako bi se uspostavila ravnoteža između tekuće i plinovite faze. Zatim je septum probušeno SPME iglom i vlakno je izloženo plinovitoj fazi para iznad uzorka 60 minuta na 60 °C. Nakon ekstrakcije 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 uz prethodno opisane uvjete analize. Rezultati ovog dijela istraživanja pokazali su da se hlapljivi metaboliti najučinkovitije ekstrahiraju uz vlakno Carboxen/PDMS te je ono korišteno u daljnjim analizama.

Optimizacija HS-SPME postupka za ekstrakciju hlapljivih metabolita iz uzoraka urina uključivala je ispitivanje sljedećih varijabli: utjecaj količine natrijevog klorida, trajanje miješanja prije inkubacije, temperaturu inkubacije i ekstrakcije te duljinu trajanja inkubacije i ekstrakcije. Vrijednosti ispitivanih varijabli prikazane su u tablici 4. Najmanja i najveća

vrijednost svake od ispitivanih varijabli bile su proizvoljno odabrane tako da pokriju širok raspon eksperimentalnih uvjeta.

Tablica 4. Izbor eksperimentalnih točaka za svaku ispitivanu varijablu pri optimizaciji HS-SPME postupka primjenom reduciranog faktorskog dizajna (engl. *reduced factorial design*).

Varijabla	Minimum	Centralna točka	Maksimum
Miješanje prije inkubacije / min	10	65	120
Trajanje inkubacije / min	10	35	60
Trajanje ekstrakcije / min	10	35	60
Temperatura / °C	40	60	80
NaCl / g	0,10	0,55	1,00

Kako bi se racionalizirao daljnji postupak optimizacije i smanjio broj potrebnih eksperimenata, u daljnjem postupku određene su varijable koje najviše utječu na HS-SPME postupak. Kao početni korak proveden je 2^{5-1} reducirani faktorski dizajn koji omogućava istovremeno praćenje utjecaja svih pet razmatranih varijabli te određivanje koje varijable najviše pridonose optimizaciji HS-SPME postupka. Nakon toga proveden je Doehlertov dizajn matrice koji je omogućio izbor njihovih optimalnih vrijednosti. U tim postupcima pratili smo zbroj površina ispod pikova odabranih 25 hlapljivih metabolita koji pokrivaju cijeli kromatogram, a kriteriji odabira pika bili su različito vrijeme zadržavanja analita za svaki odabrani pik. Kako bi se detaljnije procijenio utjecaj temperature na ekstrakciju hlapljivih spojeva, provedena je dodatna GC-MS analiza te je u obzir uzet zbroj površina pikova 15 najhlapljivijih metabolita.

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

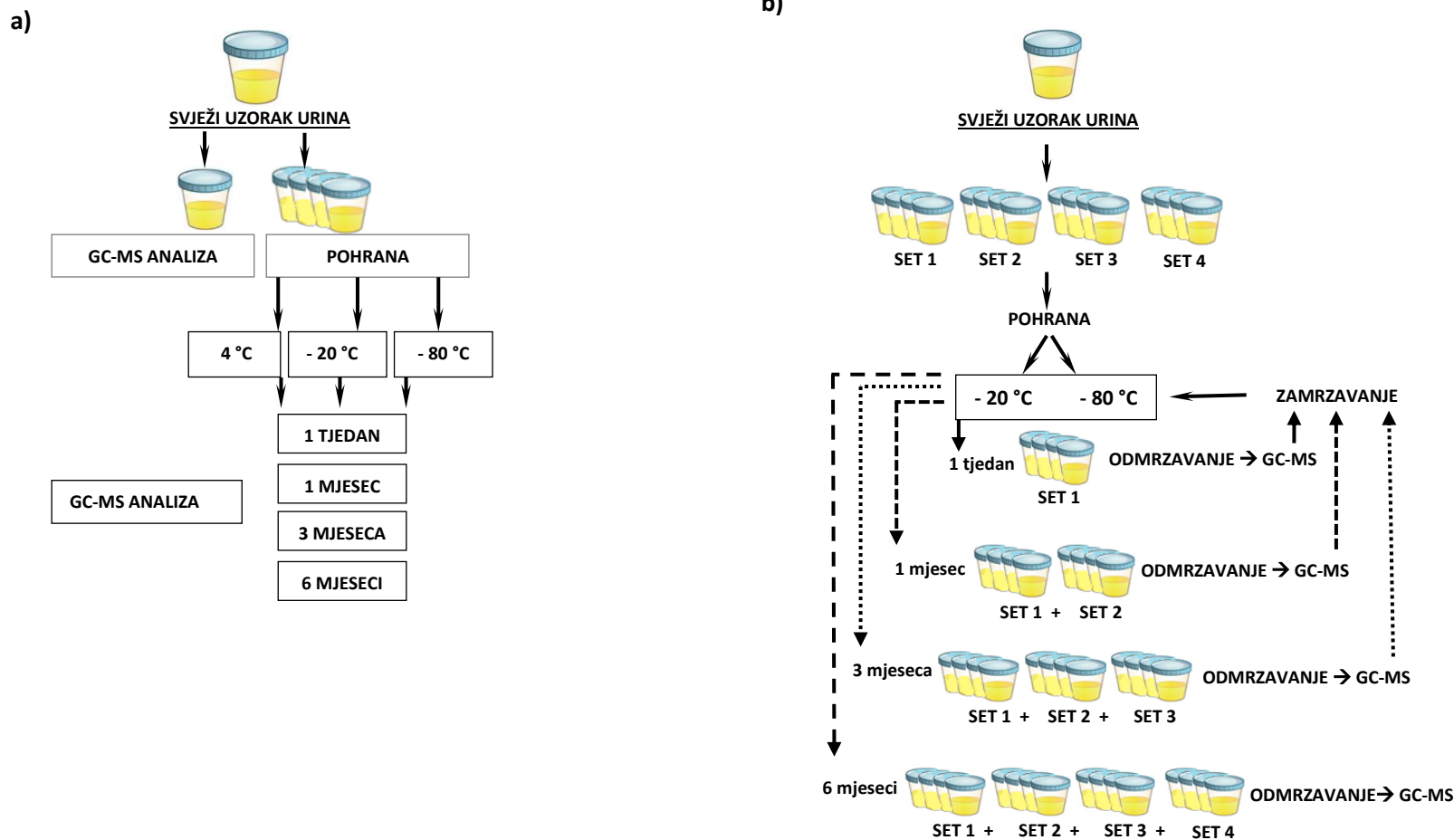
Optimizirani postupak mikroekstrakcije uključivao je dodavanje 2 mL urina u staklene bočice volumena 5 mL u koje je prethodno odvagano 1 g natrijevog klorida. Bočice su zatvorene septumom i aluminijskim čepom. Nakon 60 sekundi miješanja na miješalici, uzorci su inkubirani 35 minuta na 60 °C u termobloku kako bi se uspostavila ravnoteža između tekuće i

plinovite faze. Zatim je septum probušen SPME iglom i vlakno je izloženo plinovitoj fazi iznad uzorka. Nakon 50 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 uz prethodno opisane uvjete analize.

Ispitivanje stabilnosti hlapljivih metabolita u uzorcima urina pri različitim uvjetima pohranjivanja

Za ispitivanje stabilnosti uzorka, uzorci urina alikvotirani su u odvojene epruvete i pohranjeni do analize u setovima. Jedan set sadržavao je tri pojedinačna uzorka urina te kontrolni uzorak nastao miješanjem jednakih volumena svakog od tri pojedinačna uzorka. Dizajn studije je prikazan na slici 8. Setovi uzoraka pohranjeni su do šest mjeseci na 4 °C, -20 °C ili -80 °C. Prvi set uzoraka (svježi uzorci) analiziran je na dan uzorkovanja dok su ostali setovi analizirani tjedan dana, jedan mjesec, tri mjeseca i šest mjeseci nakon prikupljanja (slika 8 a). Stabilnost urina tijekom višekratnog zamrzavanja i odmrzavanja ispitana je na uzorcima urina pohranjenima u setove na isti način kao i za šestomjesečno ispitivanje stabilnosti. Osam setova uzoraka urina od kojih su četiri bila pohranjena na -20 °C, a četiri na -80 °C, podvrgnuto je jednom do četiri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja tijekom šest mjeseci (Slika 8 b). Prvi ciklus zamrzavanja i odmrzavanja proveden je nakon tjedan dana, drugi nakon mjesec dana, treći nakon tri mjeseca, a četvrti nakon šest mjeseci. Uzorci su analizirani nakon svakog ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja.

Zbroj površina pikova odabranih analita dobivenih u svježim uzorcima korišten je kao referenca za određivanje relativne stabilnosti. Za ukupnu usporedbu analiziranih setova uzoraka, zbroj površina pikova odabranih analita u različitim uvjetima skladištenja podijeljen je sa zbrojem površina pikova u svježem uzorku urina.



Slika 8. Dizajn studije o stabilnosti hlapljivih metabolita u uzorku urina ovisno o načinu i duljini pohrane: a) pojedinačni uzorci urina i kontrolni uzorak pohranjeni na 4 °C, -20 °C i -80 °C u trajanju od 1 tjedna, 1, 3 i 6 mjeseci; b) uzorci pohranjeni na -20 °C i -80 °C u navedenom periodu odleživani i zaleđivani 1-4 puta.

Identifikacija hlapljivih metabolita u urinu

Za identifikaciju hlapljivih metabolita u urinu korišteni su spektri masa hlapljivih spojeva iz uzorka, identifikacijski sustav AMDIS, knjižnica spektara masa NIST (verzija 2.2. kreirana 10. 06. 2014.) te indeksi zadržavanja (retencijski indeksi, RI) uz primjenu homologne serije n-alkana. Nakon provedene analize 167 uzoraka urina GC-MS tehnikom, dobiveni kromatogrami učitani su u sustav AMDIS te je proveden postupak identifikacije koji se sastojao od sljedećih koraka:

1. analiza i uklanjanje pozadinskog šuma
2. dekonvolucija pikova u kromatogramu analiziranog uzorka
3. ekstrakcija čistog spektra masa nepoznatog analita iz kompleksnog kromatograma
4. usporedba spektra masa nepoznatog analita s knjižnicom spektara masa koja može biti kreirana u laboratoriju ili komercijalno dostupna
5. računanje faktora poklapanja ovisno o poklapanju spektara masa
Kada je taj faktor jednak ili veći od minimalne vrijednosti faktora poklapanja postavljenog tijekom analiza, pretpostavljena identifikacija se dodaje na „popis pogodaka“ koji se gradi za tu komponentu. Ovaj postupak se ponavlja za svaku komponentu. Faktor poklapanja je postavljen na 70.
6. Pri korištenju RI kao dodatne pomoći u identifikaciji učitavaju se kromatogrami periodički analizirane homologne serije n-alkana (C_8 - C_{20}). Definira se vrijeme zadržavanja (RT) i indeks zadržavanja (RI) svakog pojedinog alkana u svrhu računanja RI nepoznatog analita.
7. Nakon što se izračuna RI nepoznatog analita, dobivena vrijednost se uspoređuje s vrijednostima iz knjižnice spektara masa NIST.
8. Sukladno sličnosti spektara masa, AMDIS računa faktor poklapanja u skladu s podudaranjem RI. Kada vrijednost RI pada izvan određenog raspona, program izračunava umanjeње bodova koji pridonose faktoru podudaranja i time točnosti identifikacije.
9. Konačno, komponenta s najvišom vrijednošću faktora podudaranja u „popisu pogodaka“ postaje cilj tj. identifikacija.
10. Ako je moguće, identifikacija se dodatno potvrđuje standardom.

Ponovljivost analize identificiranih hlapljivih metabolita

Kako bi se procijenilo koji se metaboliti mogu uzeti u obzir pri daljnjem traženju potencijalnih bioloških biljega, određena je ponovljivost analize hlapljivih metabolita. Ponovljivost je bliskost ponovljenih mjerenja pri istim uvjetima. Dobiva se na način da se standardna devijacija (engl. *Standard Deviation*, SD) površina ispod pika promatranog metabolita dobivena višekratnom analizom istog uzorka podijeli s aritmetičkom sredinom (engl. *Average*, AVG) površina ispod pika promatranog metabolita dobivena višekratnom analizom istog uzorka i pomnoži sa 100 % prema formuli

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

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

Pretraživanje *Human metabolome database (HMDB)*

Nakon kreiranja metabolomičkog profila hlapljivih metabolita u urinu, svaki pojedini metabolit je pretražen u bazi podataka HMDB opisanoj u poglavlju 2.8.

4.8.6. Statistička analiza

Za statističku analizu rezultata dobivenih mjerenjem koncentracija aminokiselina, koncentracija elemenata i parametara oksidacijskog stresa korišten je računalni program Statistica (StatSoft, ver. 10, Tulsa, OK, SAD).

Kako bi se kontrolirala pogreška I. vrste u višestrukom statističkom testiranju odnosa koncentracija aminokiselina i elemenata u ispitivanim skupinama, primijenjena je Bonferonijeva korekcija. Razina značajnosti podijeljena je s brojem testiranih aminokiselina (0,05/30) odnosno s brojem testiranih elemenata (0,05/21) te je razina značajnosti postavljena na 1,6 % ($p < 0,0016$) odnosno 2,3 % ($p < 0,0023$). Razina statističke značajnosti kod parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže određena je na 5 % ($p < 0,05$).

Hipoteza o normalnosti ispitivanih parametara ispitana je *Shapiro-Wilk*-ovim testom.

χ^2 testom ispitana je značajnost razlike u udjelu pušača i gradskog stanovništva između pojedinih skupina ispitanika.

Za ocjenu značajnosti razlika između pojedinih skupina ispitanika (ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika) korišten je *Mann Whitney U*-test (zbog nesimetrične distribucije većine mjerenih parametara). *Wilcoxon matched pairs* testom ispitana je značajnost razlike u

vrijednostima određivanih parametara u skupini istih ispitanika s tumorom testisa u uzorcima uzorkovanim prije početka kemoterapije (I. uzorkovanje) i nakon kemoterapije (II. uzorkovanje). Pomoću statističkog testa *Friedman ANOVA*, procijenjena je razlika u vrijednostima izmjerenih parametara u skupini istih ispitanika s germinativnim tumorom testisa u uzorcima uzorkovanim prije početka kemoterapije (I. uzorkovanje), nakon kemoterapije (II. uzorkovanje) te godinu dana nakon kemoterapije (III. uzorkovanje).

Pomoću *Mann-Whitney U*-testa ispitana je značajnost razlike u vrijednostima određivanih parametara ispitanika s tumorom testisa u uzorcima uzorkovanim prije početka kemoterapije (I. uzorkovanje), nakon kemoterapije (II. uzorkovanje) odnosno godinu dana nakon kemoterapije (III. uzorkovanje) u odnosu na kontrolnu skupinu.

Primjenom linearne diskriminantne analize (LDA) se ispitala uspješnost diskriminacije skupine ispitanika s tumorom testisa i kontrolne skupine.

Dizajn eksperimenata za optimizaciju HS-SPME metode (reducirani faktorski dizajn i *Doehlertov* dizajn matrice) proveden je korištenjem statističkih računalnih programa Minitab 17 (Minitab Inc, Pennsylvania State University, PA, SAD) i SAS 9.4. sustava (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD). Kako bi se odredile varijable koje najviše utječu na HS-SPME postupak, značaj analiziranih čimbenika i njihovih jednosmjernih interakcija na ukupni zbroj površina 25, odnosno 15 odabranih pikova hlapljivih spojeva procijenjen je pomoću faktorske regresije.

Statističke analize korištene u ispitivanju stabilnosti uzorka provedene su pomoću statističkog računalnog programa Statistica for Windows (verzija 13; StatSoft, Tulsa, OK, SAD). Rezultati Shapiro testa su pokazali nesimetričnu distribuciju većine mjerenih parametara pa je *Mann-Whitney U*-test primijenjen za usporedbu zbroja površina pikova metabolita dobivenih u pojedinim uvjetima u odnosu na zbroj površina pikova u svježim uzorcima. Razina statističke značajnosti postavljena je na 5 % ($p < 0,05$).

5. REZULTATI

5.1. Rezultati ciljane analize u razlikovanju ispitanika s tumorom testisa od kontrolnih ispitanika

5.1.1. Osobine ispitanika

Opće karakteristike ispitanika prikazane su u tablici 5. U istraživanje je bilo uključeno 167 ispitanika, 68 kontrolnih ispitanika i 99 ispitanika s tumorom testisa. Srednja dob kontrolnih ispitanika bila je 35 godina (raspon 18 do 55), prevladavali su nepušači (62 %) te je većina živjela u urbanom području (91 %). Srednja dob ispitanika s tumorom testisa bila je 32 godine, prevladavali su nepušači (54 %) te je većina također živjela u urbanom području (61 %). Srednja vrijednost indeksa tjelesne mase (BMI, kg/m²) bila je gotovo identična za obje grupe ispitanika (27,7 u kontrolnih ispitanika vs 27,0 u ispitanika s tumorom), mada je raspon vrijednosti u ispitanika s tumorom testisa (17,5 do 42,4) bio širi nego u kontrolnih ispitanika (20,9 do 37,4). Ispitanici obje skupine bili su približno iste dobi i nisu se značajno razlikovali u vrijednostima za BMI. Udio gradskog stanovništva unutar kontrolne skupine se pokazao značajno višim u odnosu na skupinu ispitanika s tumorom testisa (91 % vs. 61 %; $\chi^2=12,89$; $p=0,0003$), dok se udio pušača nije pokazao značajno različitim.

Tablica 5. Antropometrijski pokazatelji ispitanika. Rezultati su prikazani kao medijan (raspon) ili broj (postotak).

Parametar	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa
N	68	99
dob (godine)	35 (18–55)	32 (18–50)
BMI (kg/m²)	27,7 (20,9–37,4)	27,0 (17,5–42,4)
pušači	26 (38 %)	46 (46 %)
gradsko / seosko prebivalište	62 (91 %) / 6 (8 %)	60 (61 %) / 34 (34 %) nepoznato 5 (5 %)

BMI: indeks tjelesne mase

Pušači: aktivni pušači i osobe koje su prestale pušiti prije manje od 6 mjeseci

Klinički i patološki podatci (American Joint Committee on Cancer, 2010) za skupinu ispitanika s tumorom testisa prikazani su u tablici 6. Prema rezultatima histološke analize 35 (35 %) ispitanika je bilo sa seminomom, a 64 (65 %) s neseminomom. Prilikom regrutiranja u 65 % ispitanika razine serumskih tumorskih biljega (AFP, β -HCG i LDH) bile su unutar referentnih vrijednosti (S0). Istovremeno, u 59 % ispitanika bile su prisutne metastaze koje su zahvatile jedan ili više limfnih čvorova (N1, N2, N3) te su kod 18 % ispitanika bile prisutne udaljene metastaze.

Tablica 6. Klinički i patološki pokazatelji ispitanika s tumorom testisa.

Parametar ^a	Medijan ili broj (postotak)
Histološka podjela seminomi / neseminomi	35 (35 %) / 64 (65 %)
TNM-stadij tumora	
I A	7 (7 %)
I B	16 (16 %)
II A	12 (12 %)
II B	16 (16 %)
II C	12 (12 %)
III A	14 (14 %)
III B	7 (7 %)
III C	6 (6 %)
IS	4 (4 %)
Nepoznato	5 (5 %)
Klasifikacija tumorskih biljega	
S0	64 (65 %)
S1	15 (15 %)
S2	7 (7 %)
S3	5 (5 %)
Nepoznato	8 (8 %)
Limfni čvorovi	
N0	36 (36 %)
N1, N2, N3	58 (59 %)
Nepoznato	5 (5 %)
Metastaze	
M0	75 (76%)
M1, M1a, M1b	18 (18 %)
Nepoznato	6 (6 %)

^a Prema American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual, 7th Edition, 2010, Springer Science and Business Media

5.1.2. Profil aminokiselina u urinu

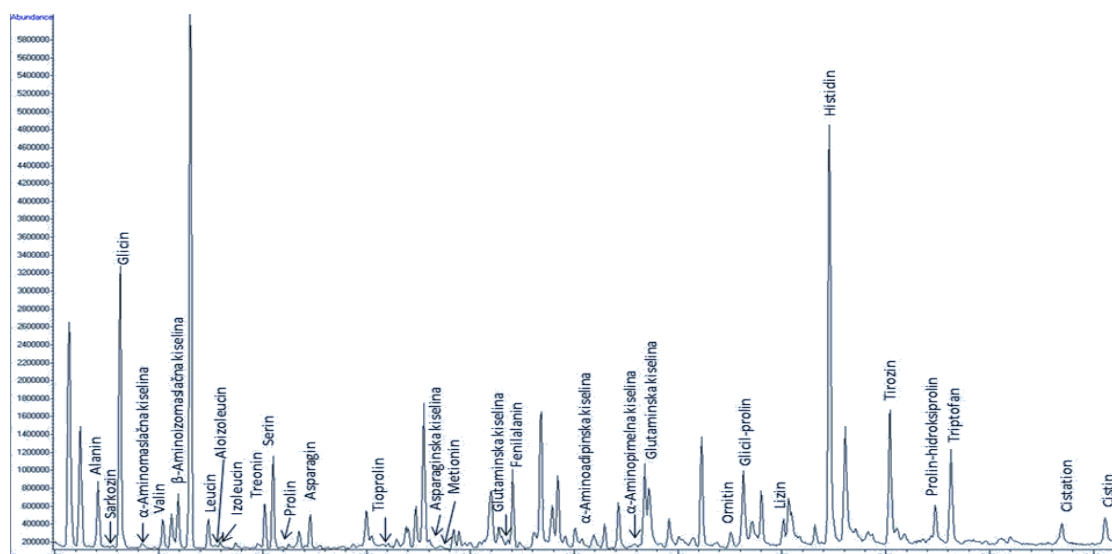
Parametri validacije metode za određivanje aminokiselina primjenom GC-MS tehnike

Validacija metode provedena je u skladu s uputama i raspoloživim kemikalijama proizvođača komercijalnog testnog paketa EZ:faast. Postupci su opisani u poglavlju 4.8.1.

Linearnost odziva detektora ispitana je analizom standardnih otopina aminokiselina čiji je raspon koncentracija bio 20-200 nmol/L za sve analizirane aminokiseline u urinu. Visoki koeficijenti korelacije kalibracijskih pravaca ($R^2 > 0,9900$) potvrdili su linearnost u ispitivanom rasponu koncentracija.

Relativna standardna devijacija određivanja aminokiselina u urinu bila je $\leq 15,5 \%$ što upućuje na vrlo dobru ponovljivost plinskrokromatografske metode.

Točnost metode provjerena je pomoću testa iskorištenja i određena je analizom aminokiselina dodanih u po šest uzoraka urina. Dodaci aminokiselina bili su koncentracija 50 i 100 nmol/mL. Analitički povrat za pojedine aminokiseline bio je u rasponu 83 do 115 %. Na slici 9. prikazan je kromatogram dobiven nakon GC-MS analize uzorka urina pripremljenog po uputama proizvođača komercijalnog testnog paketa EZ:faast.



Slika 9. Prikaz kromatograma ukupne struje iona (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC) analiziranog urina ispitanika pripremljenog po uputama proizvođača komercijalnog testnog paketa EZ:faast.

Aminokiseline u urinu

Primjenom metode koju je propisao proizvođač, u urinu 68 kontrolnih ispitanika i 86 ispitanika s tumorom testisa bilo je moguće izmjeriti koncentracije trideset aminokiselina sa zadovoljavajućim parametrima validacije metode. Rezultati deskriptivne statističke analize, prikazani kao medijan i raspon (5. do 95. percentil), prikazani su u tablici 7.

Primijenjena je univarijantna statistička analiza kako bi se detektirale aminokiseline čije su koncentracije u urinu bile statistički značajno različite u ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike. *Mann-Whitneyevim U-testom* ispitana je značajnost te razlike. Primjenom Bonferonijeve korekcije razina značajnosti postavljena je na $p < 0,0016$.

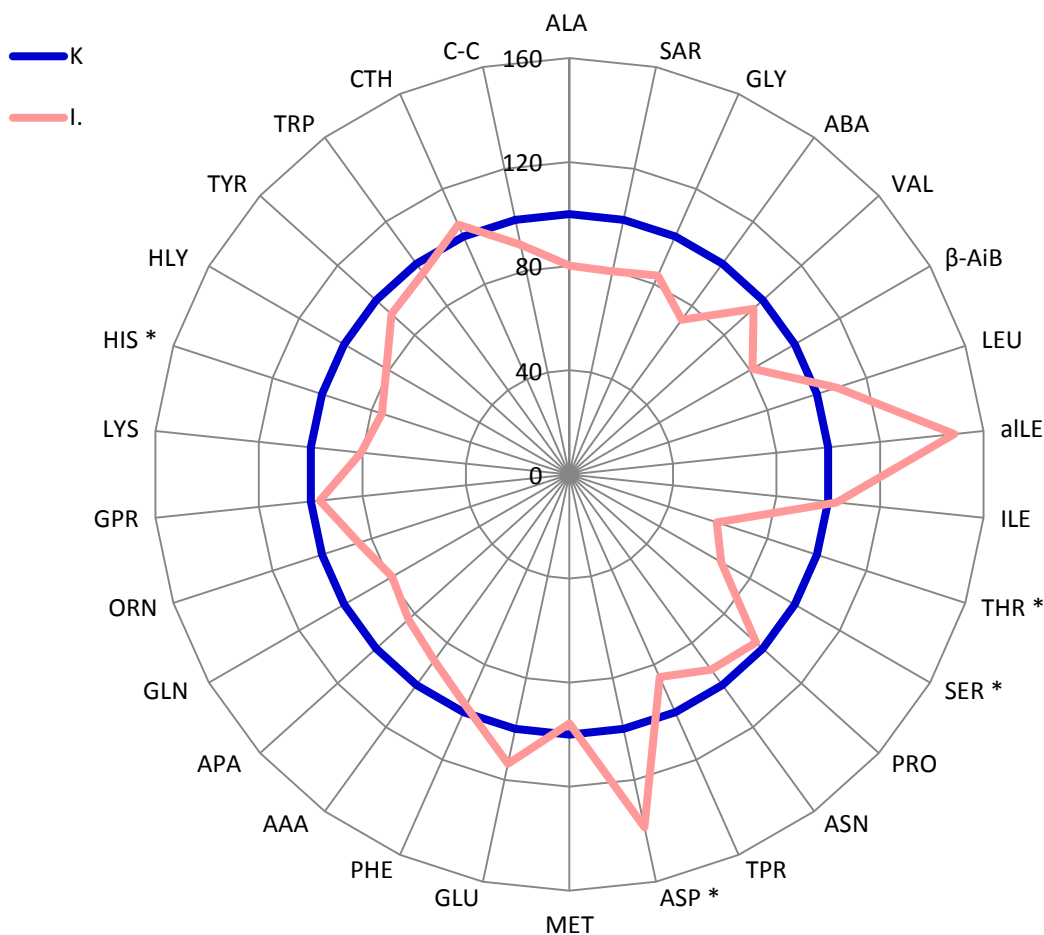
Ispitanici s tumorom testisa imali su statistički značajno višu koncentraciju asparaginske kiseline (39 %) te statistički značajno niže koncentracije treonina (60 %), serina (67 %) i histidina (76 %) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u koncentracijama ostalih aminokiselina (tablica 7). Relativan odnos koncentracija aminokiselina u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike prikazan je na slici 10.

Tablica 7. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) koncentracija aminokiselina u skupini kontrolnih ispitanika (N=68) i ispitanika s tumorom testisa (N=86). Značajnost razlike određivanih parametara između skupina ispitanika ispitana je *Mann-Whitney U*-testom uz Bonferonijevu korekciju, $p < 0,0016$.

Aminokiselina (nmol/mg kreat.)	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa	Aminokiselina (nmol/mg kreat.)	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa
alanin	220,7 (71,0–437,5)	161,0 (67,8–311,6)	metionin	2,83 (0,76–5,06)	2,70 (0,73–4,97)
sarkozin	2,20 (0,97–6,18)	1,76 (0,80–4,37)	glutaminska kiselina	15,56 (8,46–75,10)	17,69 (8,59–140,01)
glicin	605,9 (219,6–1215,2)	472,5 (198,6–937,4)	fenilalanin	37,13 (23,13–68,86)	36,22 (19,91–68,16)
α -aminomaslačna kiselina	8,00 (3,36–21,02)	5,87 (1,90–13,79)	α -aminoadipinska kiselina	24,88 (9,52–62,53)	22,00 (10,26–45,75)
valin	34,37 (20,34–52,71)	32,69 (19,20–57,38)	α -aminopimelna kiselina	0,930 (0,480–3,1767)	0,774 (0,394–2,205)
β -aminoizomaslačna kiselina	61,30 (11,63–150,97)	49,82 (17,09–183,40)	glutamin	223,5 (80,0–491,3)	175,8 (31,1–357,6)
leucin	16,99 (7,66–28,85)	18,35 (8,98–34,77)	ornitin	11,89 (2,38–20,26)	10,12 (3,20–22,47)
aloizoleucin	1,90 (0,74–10,39)	2,83 (0,63–49,82)	glicil-prolin	9,68 (5,79–19,53)	9,34 (5,32–25,01)
izoleucin	8,44 (5,15–12,46)	8,71 (4,65–14,19)	lizin	98,4 (34,5–357,5)	79,2 (33,4–253,2)
treonin	71,2 (25,6–221,3)	42,4* (<GD–110,0)	histidin	713,1 (309,9–1515,8)	540,1* (151,2–1451,8)
serin	146,1 (76,5–356,0)	98,5* (0,3–204,5)	hidroksilizin	4,97 (2,77–10,97)	4,04 (1,82–11,05)
prolin	3,73 (<GD–12,95)	3,60 (1,36–11,30)	tirozin	36,21 (16,96–86,98)	33,33 (16,14–74,74)
asparagin	60,6 (35,2–137,5)	56,3 (31,1–143,7)	triptofan	51,34 (28,29–97,40)	49,14 (20,71–91,79)
tioprolin	5,87 (0,72–5,13)	1,22 (0,61–5,03)	cistationin	10,51 (4,08–25,24)	11,03 (3,75–57,46)
asparaginska kiselina	3,97 (2,20–9,37)	5,50* (2,64–17,19)	cistin	20,49 (4,66–43,81)	18,47 (8,28–35,46)

< GD – vrijednosti ispod granice detekcije

*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu

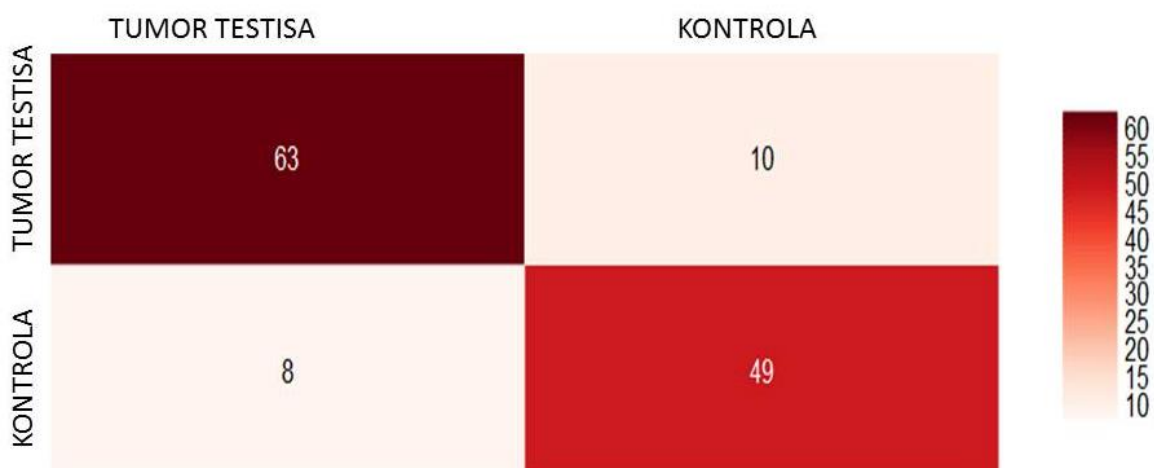


Slika 10. Prikaz relativnog odnosa koncentracije aminokiselina u ispitanika s tumorom testisa (I.) u odnosu na kontrolne ispitanike (K). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Plava linija (100 %) predstavlja kontrolnu skupinu (K).

*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano *Mann-Whitney U*-testom uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0016$).

Rezultati univarijantne statističke analize sugerirali su da se ispitanici s tumorom testisa i kontrolni ispitanici mogu međusobno razlikovati s obzirom na koncentracije pojedinih aminokiselina u urinu. Nadalje, provedena je linearna diskriminantna analiza (LDA) kako bi se ispitalo razdvaja li kreirani profil aminokiselina ispitanike s tumorom testisa od kontrolnih ispitanika. U analizu je bilo uključeno 57 kontrolnih ispitanika i 73 ispitanika s tumorom testisa (ukupno 130 ispitanika). Analizom je utvrđeno da su treonin ($p < 0,002$), serin ($p < 0,001$) i aloizoleucin ($p < 0,014$) najviše pridonijeli razdvajanju skupina ispitanika. Na slici 11 je prikazana uspješnost diskriminacije ispitivanih skupina. Diskriminanta po profilu

aminokiselina svrstala je 63 (86 %) od 73 ispitanika s tumorom testisa u grupu oboljelih, dok je 10 (14 %) od 73 ispitanika s tumorom testisa svrstala pod zdrave ispitanike. Nadalje, 49 (86 %) od 57 kontrolnih ispitanika svrstano je u grupu zdravih ispitanika, dok ih je 8 (14 %) od 57 kontrolnih ispitanika svrstano u grupu oboljelih ispitanika.



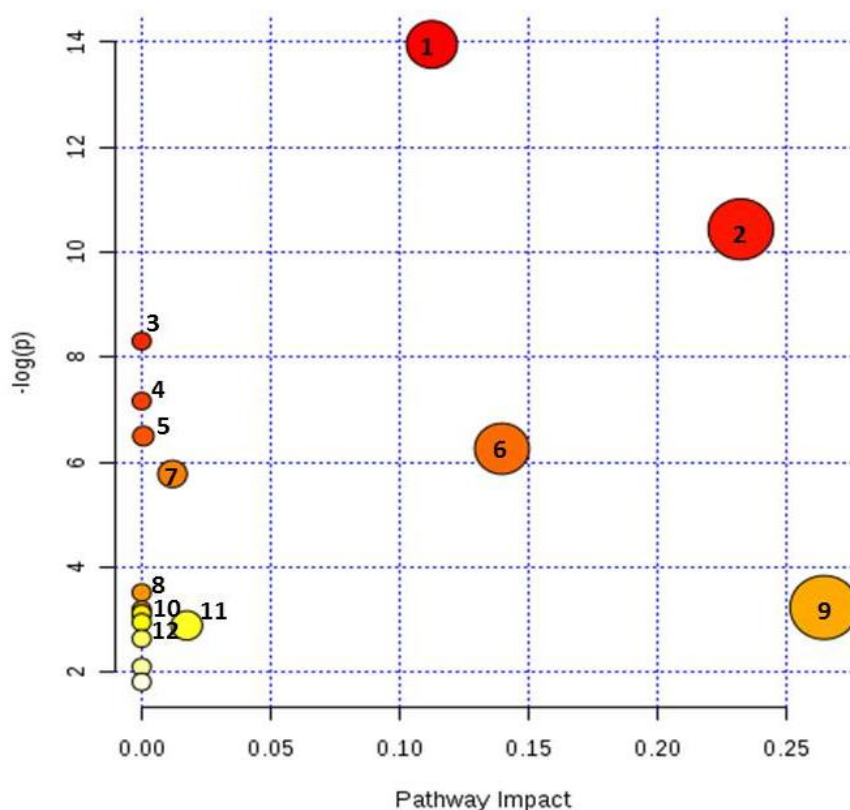
Slika 11. Uspješnost diskriminacije ispitivanih skupina primjenom linearne diskriminacijske analize.

Metabolički putovi

Kako bi se identificirali metabolički putovi koji su promijenjeni u ispitanika s tumorom testisa u usporedbi sa zdravim ispitanicima, korišten je sustav MetaboAnalyst. Ispitani su metabolički putovi u kojima sudjeluju asparaginska kiselina, treonin, serin i histidin koje su se u prethodnim statističkim analizama pokazale značajno različite u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike.

Primjenom odgovarajućih algoritama za analizu metaboličkih putova u kojima sudjeluju navedene aminokiseline predloženi su sljedeći metabolički putovi: biosinteza aminoacil-tRNA, metabolizam glicina, serina i treonina, metabolizam cijanoaminokiselina, metabolizam beta-alanina, metabolizam dušika, metabolizam histidina, metabolizam cisteina i metionina, metabolizam sumpora, metabolizam alanina, aspartata i glutamata, metabolizam sfingolipida, biosinteza valina, leucina i izoleucina i biosinteza pantotenata i CoA. Rezultati su pokazali da su metabolički putovi s najvećim faktorom utjecaja bili metabolizam glicina, serina i treonina (0,23) u kojem sudjeluju asparaginska kiselina, treonin i serin te metabolizam alanina, aspartata i glutamata (0,26) u kojem sudjeluje asparaginska kiselina. Sažetak tih putova

prikazan je na slici 12. Na x-osi je prikazan faktor utjecaja aminokiselina na određeni metabolički put, dok je na y-osi prikazan negativni logaritam p vrijednosti ($p < 0,05$).



Slika 12. Prikaz statistički značajnih metaboličkih putova u koje su uključene asparaginska kiselina, treonin, serin i histidin: 1. biosinteza aminoacil-tRNA, 2. metabolizam glicina, serina i treonina, 3. metabolizam cijanoaminokiselina, 4. metabolizam beta-alanina, 5. metabolizam dušika, 6. metabolizam histidina, 7. metabolizam cisteina i metionina, 8. metabolizam sumpora, 9. metabolizam alanina, aspartata i glutamata, 10. metabolizam sfingolipida, 11. biosinteza valina, leucina i isoleucina, 12. biosinteza pantotenata i CoA. (MetaboAnalyst 4.0, *Hipergeometric test*, $p < 0,05$).

Utjecaj histološkog tipa i stadija tumora na profil aminokiselina

Kada su profili aminokiselina koji su dobiveni unutar skupine ispitanika s tumorom testisa uspoređeni s obzirom na histološki tip tumora, rezultati nisu pokazali značajnu razliku između seminoma i neseminoma. Također, profili aminokiselina nisu se međusobno razlikovali s obzirom na stadij tumora.

5.1.3. Multielementni profil u urinu

Koncentracije elemenata u urinu izmjerene su ICP-MS tehnikom. Ukupni rezultati deskriptivne statističke analize za koncentracije elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa (N=97) i kontrolnih ispitanika (N=67) prikazani su u tablici 8.

Primjenom univarijantne statističke analize određeni su elementi čije su koncentracije u urinu bile statistički značajno različitih vrijednosti u ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike. *Mann-Whitneyevim U*-testom ispitana je značajnost te razlike. Primjenom Bonferonijeve korekcije razina značajnosti postavljena je na $p < 0,0023$.

Ispitanici s tumorom testisa imali su statistički značajno nižu koncentraciju Co (44 %) te statistički značajno više koncentracije Mn (88 %) i Zn (64 %). Nije bilo statistički značajne razlike između tih skupina ispitanika u koncentracijama ostalih elemenata (tablica 8). Grafički prikaz relativnog odnosa koncentracija izmjerenih elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike prikazan je na slici 13.

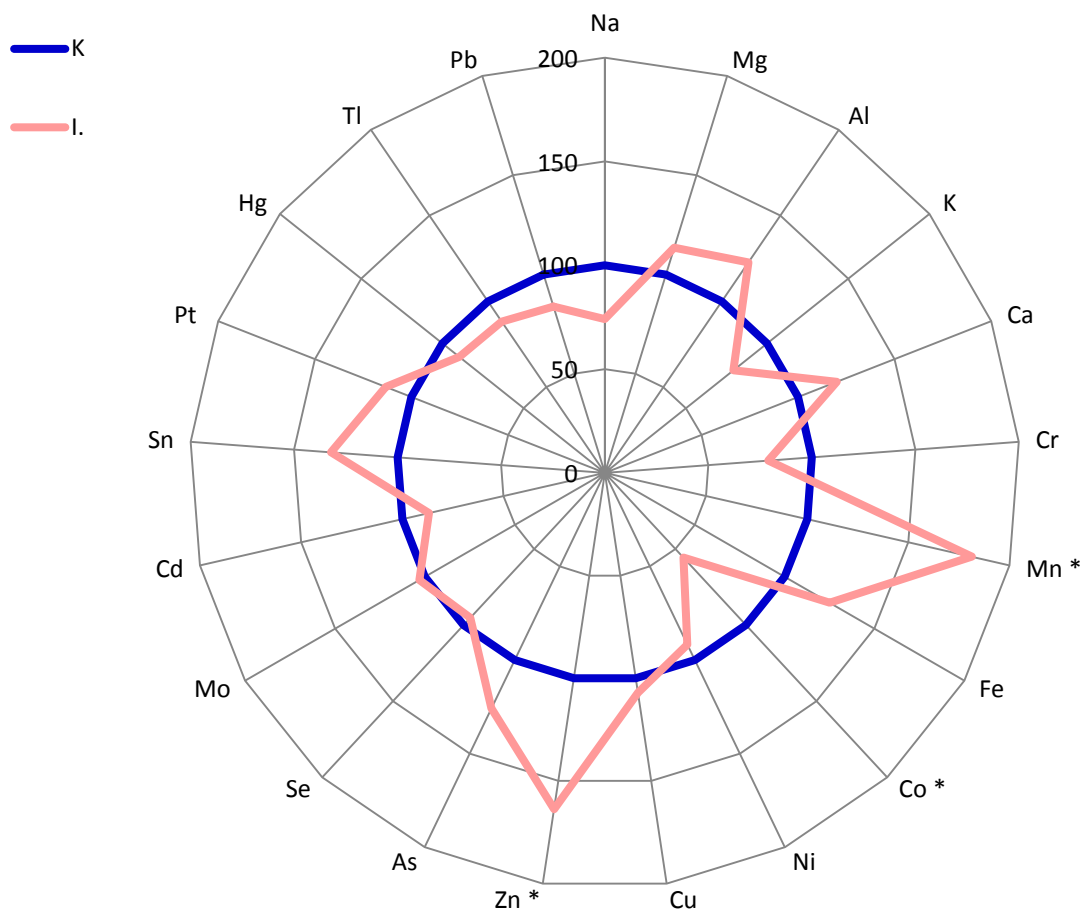
Utjecaj histološkog tipa i stadija tumora na multielementni profil

Uspoređujući koncentracije elemenata u urinu unutar skupine ispitanika s tumorom testisa s obzirom na histološki tip tumora, rezultati su pokazali značajno višu koncentraciju Hg u ispitanika sa seminomima nego u ispitanika s neseminomima. Nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama elemenata između skupina ispitanika s obzirom na stupanj tumora.

Tablica 8. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) koncentracija elemenata u skupini kontrolnih ispitanika (N=67) i ispitanika s tumorom testisa (N=97). Značajnost razlike određivanih parametara između skupina ispitanika ispitana je *Mann-Whitney U*-testom uz Bonferonijevu korekciju, $p < 0,0023$.

Parametar	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa	Parametar	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa
Na (mg/g kreat.)	2656 (686–7547)	1899 (347–4865)	Zn (µg/g kreat.)	249,0 (113,3–679,1)	408,0* (167,7–1389,1)
Mg (mg/g kreat.)	45,31 (21,22–75,24)	51,43 (23,36–100,60)	As (µg/g kreat.)	3,51 (1,42–70,72)	4,41 (1,42–100,43)
Al (µg/g kreat.)	3,75 (1,61–13,89)	4,60 (1,45–18,76)	Se (µg/g kreat.)	17,45 (11,12–25,17)	16,61 (9,34–34,58)
K (mg/g kreat.)	1722 (753–3099)	1365 (584–3131)	Mo (µg/g kreat.)	21,28 (11,79–38,84)	21,95 (6,54–59,88)
Ca (mg/g kreat.)	77,1 (15,8–198,3)	92,5 (21,6–198,2)	Cd (µg/g kreat.)	0,317 (0,133–1,018)	0,275 (0,097–1,590)
Cr (µg/g kreat.)	1,11 (0,42–2,83)	0,87 (0,34–1,79)	Sn (µg/g kreat.)	0,137 (0,058–1,571)	0,181 (0,054–2,820)
Mn (µg/g kreat.)	0,083 (0,022–0,565)	0,150* (0,045–1,097)	Pt (µg/g kreat.)	0,009 (0,004–0,022)	0,010 (0,002–0,034)
Fe (µg/g kreat.)	9,50 (4,45–36,53)	11,90 (6,17–39,32)	Hg (µg/g kreat.)	1,38 (0,38–6,57)	1,23 (0,24–7,01)
Co (µg/g kreat.)	0,358 (0,135–0,999)	0,199* (0,110–0,485)	Tl (µg/g kreat.)	0,189 (0,086–0,392)	0,166 (0,080–0,321)
Ni (µg/g kreat.)	1,19 (0,48–2,76)	1,09 (0,44–2,89)	Pb (µg/g kreat.)	1,12 (0,40–2,62)	0,94 (0,42–2,60)
Cu (µg/g kreat.)	6,76 (5,00–12,90)	7,23 (4,19–23,50)			

*Statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu



Slika 13. Prikaz relativnog odnosa koncentracije elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike. Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Plava linija (100 %) predstavlja kontrolnu skupinu (K).

*Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolnu skupinu, testirano *Mann-Whitney U*-testom uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0023$).

5.1.4. Parametri oksidacijsko-redukcijske ravnoteže

Kako bi se odredio oksidacijsko-redukcijski status ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika, analizirani su SOD, GPx, GSH, TOS i TAC u krvi. Rezultati su prikazani kao medijan i raspon (5. do 95. percentil) u tablici 9.

Ispitanici s tumorom testisa imali su statistički značajno višu vrijednost aktivnosti SOD-a te niže vrijednosti za GSH i TOS od kontrolnih ispitanika. Nije bilo statistički značajne razlike između tih skupina ispitanika u vrijednostima GPx-a i TAC-a.

Tablica 9. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) određivanih parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u skupini kontrolnih ispitanika i ispitanika s tumorom testisa. Značajnost razlike određivanih parametara između skupina ispitanika ispitana je *Mann-Whitney U*-testom, $p < 0,05$.

Parametar	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa
SOD (U/g Hb)	1201 (960–1483) (N = 64)	1295* (717–2105) (N = 99)
GPx (U/g Hb)	143,9 (116,9–185,6) (N = 64)	145,2 (100,5–216,2) (N = 99)
GSH (μ g/mg proteina)	6,17 (1,86–20,18) (N = 61)	3,04* (1,21–11,55) (N = 95)
TAC (mmol Trolox ekviv./L)	1,44 (0,07–4,60) (N = 62)	1,73 (0,27–4,40) (N = 95)
TOS (μ mol H ₂ O ₂ ekviv./L)	50,07 (30,91–61,19) (N = 61)	27,44* (9,09–47,02) (N = 66)

* Statistički značajno različito od kontrolnih ispitanika

5.2. Utjecaj kemoterapije na koncentracije aminokiselina i elemenata te parametre oksidacijsko-redukcijske ravnoteže

5.2.1. Osobine ispitanika

Opće karakteristike ispitanika drugog dijela doktorskog istraživanja prikazane su u tablici 10. U studiju istraživanja utjecaja kemoterapije na određivane parametre bilo je uključeno 86 ispitanika s tumorom testisa koji su primili kemoterapiju po BEP protokolu. Krv i urin uzorkovani su prije i nakon kemoterapije. Srednja dob ove grupe ispitanika bila je 33 godine (raspon 18 do 50). Pušača je bilo 46 (53%) te su 52 ispitanika (60 %) živjela u urbanom području. Srednja vrijednost za BMI (kg/m^2) bila je 27,2 (raspon 17,6 do 42,6). Nije bilo značajnih razlika u općim karakteristikama te kliničkim i patološkim karakteristikama ispitanika s tumorom testisa drugog dijela istraživanja u odnosu na ispitanike s tumorom iz početnog dijela istraživanja. Tablica 10 ujedno sadrži podatke o vrijednostima serumskih tumorskih biljega u ispitanika prije (I.) i nakon (II.) kemoterapije.

Tablica 10. Klinički i patološki podaci u ispitanika s tumorom testisa prije (I.) i nakon kemoterapije (II.). Rezultati su prikazani kao medijan (raspon) ili broj (postotak).

Parametar	Ispitanici s tumorom testisa	
	(I.)	(II.)
N	86	
dob (godine)	33 (18–50)	
BMI (kg/m ²)	27,2 (17,6–42,6)	
pušači	46 (53 %)	
gradsko / seosko prebivalište	52 (60 %) / 29 (34 %) Nepoznato 5 (6 %)	
histološka podjela		
seminomi / neseminomi	32 (37 %) / 54 (63 %)	
vrijednosti serumskih tumorskih biljega		
AFP (U/L)	3,88 (0,50–19032)	3,60 (1,00–321,40)
β-HCG (mLU/mL)	0,0 (0,0–78636)	0,0 (0,0–146,50)
LDH (μg/L)	186 (96–3774)	169 (117–363)

5.2.2. Profil aminokiselina u urinu

Kako bi se ispitalo utječe li primijenjena kemoterapija na razine aminokiselina u urinu ispitanika s tumorom testisa, određene su koncentracije aminokiselina u urinu ispitanika (N=60) prije (I.) i nakon (II.) provedene kemoterapije. Rezultati deskriptivne statističke analize prikazani su u tablici 11.

Primijenjena je univarijantna statistička analiza kako bi se odredile aminokiseline čije su koncentracije bile statistički značajno različite u urinu ispitanika s tumorom testisa nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.). Primjenom Bonferonijeve korekcije razina značajnosti postavljena je na $p < 0,0016$.

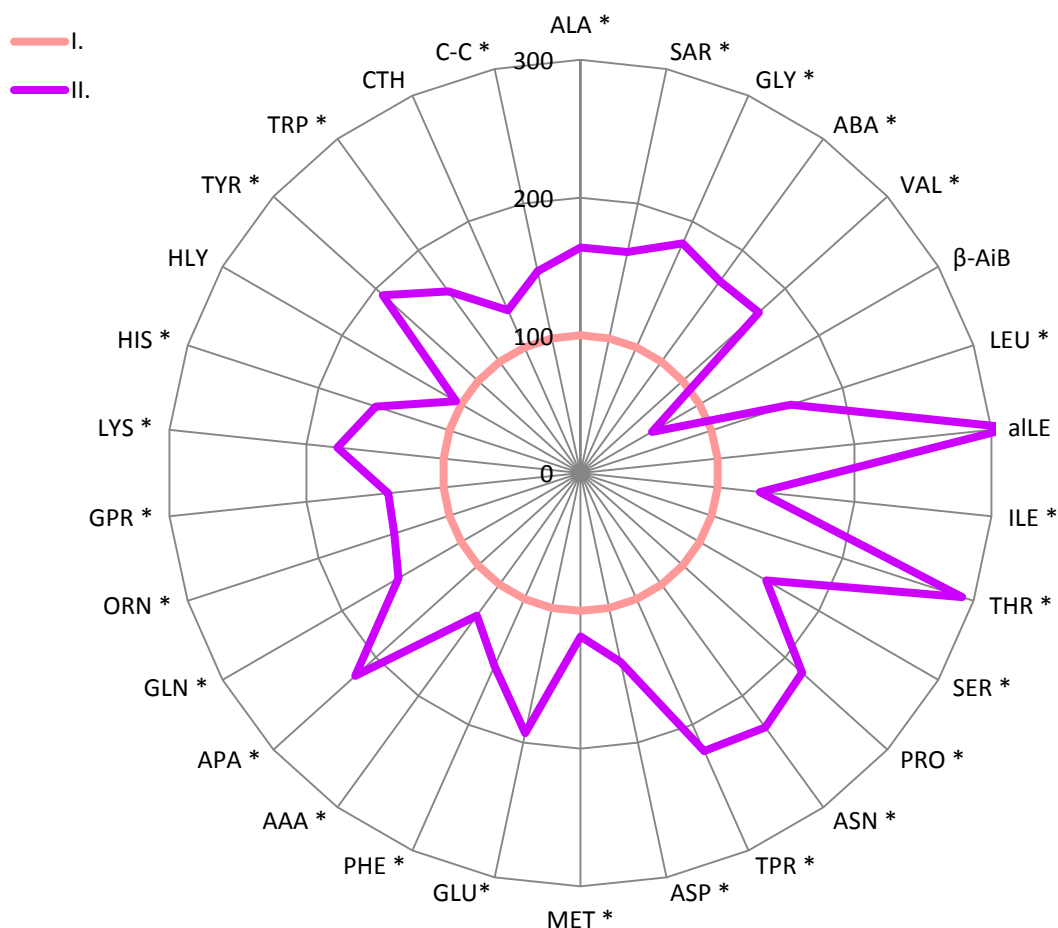
Nakon primljenog drugog ciklusa kemoterapije (II.), rezultati statističke analize (*Wilcoxon matched pairs test*) pokazali su značajno više koncentracije alanina (64 %), sarkozina (64 %), glicina (83 %), α -aminomaslačne kiseline (72 %), valina (74 %), leucina (61 %), izoleucina (31 %), treonina (192 %), serina (56 %), prolina (117 %), asparagina (128 %), tioprolina (121 %), asparaginske kiseline (40 %), metionina (19 %), glutaminske kiseline (93 %), fenilalanina (53 %), α -aminoadipinske kiseline (28 %), α -aminopimelne kiseline (120 %), glutamina (53 %), ornitina (42 %), glicil-prolina (40 %), lizina (78 %), histidina (56 %), tirozina (93 %), triptofana (63 %) i cistina (50 %) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije. Nije bilo statistički značajne razlike između navedenih skupina jedino u koncentracijama β -aminoizomaslačne kiseline, aloizoleucina, hidroksilizina i cistationina (tablica 11). Relativan odnos koncentracija aminokiselina u urinu ispitanika s tumorom testisa prije (I.) i nakon (II.) kemoterapije prikazan je na slici 14.

Tablica 11. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) koncentracija aminokiselina u 60 ispitanika s tumorom testisa prije (I.) i nakon kemoterapije (II.). Značajnost razlike određivanih parametara između skupina ispitanika ispitana je *Wilcoxon matched pairs* testom uz Bonferonijevu korekciju, $p < 0,0016$.

Aminokiselina (nmol/mg kreat.)	Ispitanici s tumorom testisa		Aminokiselina (nmol/mg kreat.)	Ispitanici s tumorom testisa	
	(I.)	(II.)		(I.)	(II.)
alanin	159,9 (64,2–377,9)	261,7* (92,7–770,1)	metionin	2,91 (0,78–4,90)	3,45* (0,92–12,99)
sarkozin	1,63 (0,73–4,88)	2,67* (0,72–7,53)	glutaminska kiselina	16,88 (7,46–64,02)	32,58* (13,00–316,38)
glicin	456,3 (178,8 – 829,2)	833,4* (333,0–1812,4)	fenilalanin	36,28 (19,34–64,79)	55,60* (24,19–120,08)
α-aminomaslačna kiselina	6,38 (2,17–14,32)	10,99* (3,85–30,47)	α- aminoadipinska kiselina	22,42 (9,20–43,44)	28,70* (10,03–83,21)
valin	31,65 (18,81–52,49)	55,17* (21,23–128,46)	α-aminopimelna kiselina	0,73 (0,39–2,47)	1,62* (0,45–3,90)
β- aminoizomaslačna kiselina	57,64 (19,74–191,00)	34,55 (2,44–246,49)	glutamin	183,3 (43,2–392,4)	279,8 (60,5–1004,3)
leucin	18,06 (8,80–32,31)	29,01* (14,19–81,19)	ornitin	9,97 (3,02–23,94)	14,18* (4,17–52,67)
aloizoleucin	4,86 (0,65–45,31)	15,31 (0,76–110,84)	glicil-prolin	9,23 (5,54– 25,34)	12,97 (5,40–27,29)
izoleucin	8,53 (4,61–15,87)	11,19* (6,25–24,78)	lizin	76,8 (33,5–280,4)	136,2* (27,3–759,7)
treonin	41,7 (<GD–113,5)	121,5* (<GD–804,5)	histidin	555,4 (144,3–1570,6)	868,5* (259,0–2541,6)
serin	95,0 (0,4–210,5)	147,9 (0,4–746,5)	hidroksilizin	3,88 (1,60–10,39)	4,05 (1,61–12,74)
prolin	3,13 (1,25–10,92)	6,77* (1,18–19,10)	tirozin	33,59 (16,02–73,13)	64,88* (22,04–164,27)
asparagin	51,6 (30,4–166,1)	117,8* (29,7–554,9)	triptofan	50,93 (20,86–103,67)	83,06* (22,29–196,76)
tioprolin	1,17 (0,61–4,30)	2,58* (0,81–6,14)	cistationin	10,95 (4,15–80,42)	16,42 (5,95–45,96)
asparaginska kiselina	5,00 (2,42–12,30)	7,01* (3,27–58,27)	cistin	18,19 (7,07–36,77)	23,57* (8,20–123,57)

< GD – vrijednosti ispod granice detekcije

* Statistički značajno različito od vrijednosti prije kemoterapije



Slika 14. Prikaz relativnog odnosa koncentracija aminokiselina u ispitanika s tumorom testisa nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Roza linija (100 %) predstavlja rezultate prije kemoterapije (I.). *Statistički značajna razlika u odnosu na I. uzorkovanje, testirano *Wilcoxon matched pairs* testom uz Bonferonijevu korekciju, $p < 0,0016$.

5.2.3. Multielementni profil u urinu

Kako bi se ispitao utjecaj kemoterapije na razine elemenata u urinu, uspoređene su koncentracije 21 elementa u urinu ispitanika s tumorom testisa (N=84) prije i nakon kemoterapije. Rezultati deskriptivne statističke analize prikazani su u tablici 12.

Primjenom univarijantne statističke analize, *Wilcoxon matched pairs* testom ispitana je značajnost razlike u koncentracijama elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa prije (I.) i nakon (II.) kemoterapije. Primjenom Bonferonijeve korekcije razina značajnosti postavljena je na $p < 0,0023$.

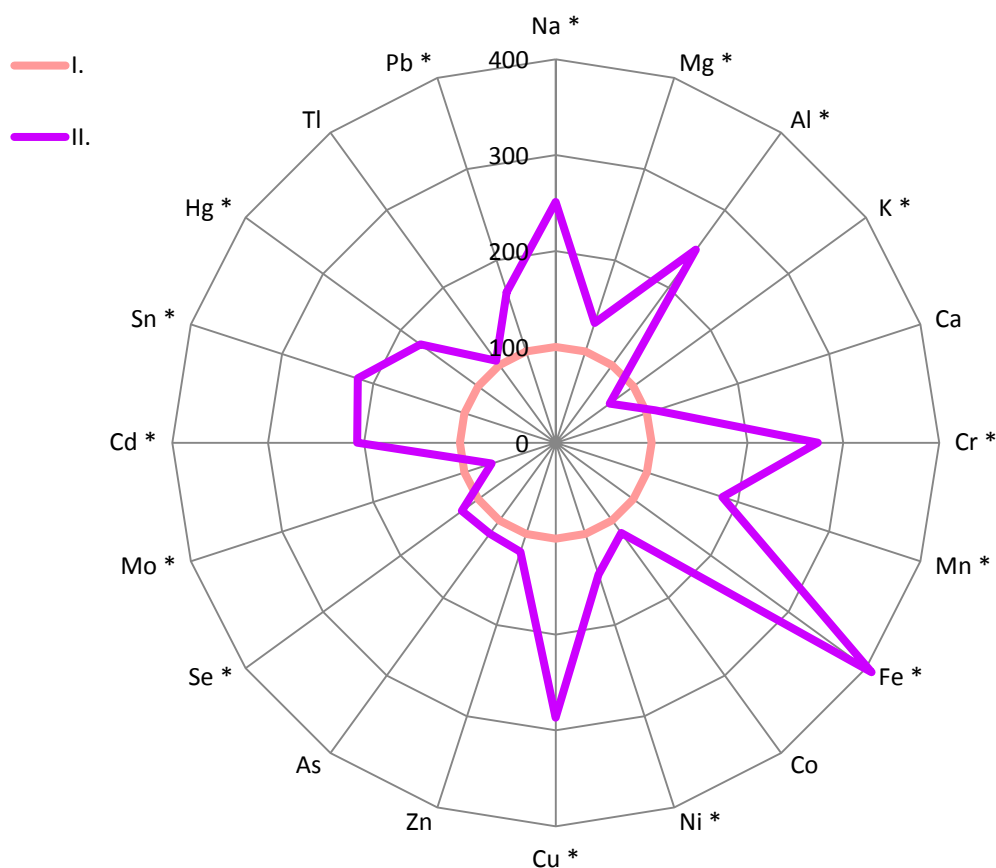
Tablica 12. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) koncentracija elemenata u skupini ispitanika s tumorom testisa (N=84) prije (I.) i nakon kemoterapije (II.). Značajnost razlike određivanih parametara između skupina ispitanika ispitana je *Wilcoxon matched pairs* testom uz Bonferonijevu korekciju, $p < 0,0023$.

Parametar	Ispitanici s tumorom testisa		Parametar	Ispitanici s tumorom testisa	
	(I.)	(II.)		(I.)	(II.)
Na (mg/g kreat.)	1884 (298–4865)	4730* (709–13267)	Zn (µg/g kreat.)	389,1 (167,7–1055,9)	465,3 (95,2–1428,1)
Mg (mg/g kreat.)	50,10 (23,58–90,67)	65,87* (28,86–145,88)	As (µg/g kreat.)	4,64 (1,56–39,12)	5,44 (1,48–28,29)
Al (µg/g kreat.)	4,44 (1,44–14,06)	11,05* (2,67–48,94)	Se (µg/g kreat.)	16,89 (10,65–34,58)	20,48* (10,67–42,84)
K (mg/g kreat.)	1354 (658–3093)	943* (404–2738)	Mo (µg/g kreat.)	22,00 (6,54–59,88)	15,46* (3,90–35,17)
Ca (mg/g kreat.)	91,90 (27,68–198,18)	102,30 (17,10–351,50)	Cd (µg/g kreat.)	0,277 (0,107–1,239)	0,573* (0,190–2,513)
Cr (µg/g kreat.)	0,87 (0,36–1,78)	2,38* (0,58–10,74)	Sn (µg/g kreat.)	0,180 (0,054–2,820)	0,390* (0,078–7,155)
Mn (µg/g kreat.)	0,144 (0,039–1,097)	0,264* (0,048–6,578)	Pt (µg/g kreat.)	0,010 (0,006–0,024)	2869* (366–30818)
Fe (µg/g kreat.)	11,33 (6,19–39,32)	46,13* (11,75–135,50)	Hg (µg/g kreat.)	1,28 (0,32–7,01)	2,23* (0,69–12,43)
Co (µg/g kreat.)	0,188 (0,111–0,469)	0,219 (0,108–1,232)	Tl (µg/g kreat.)	0,176 (0,080–0,321)	0,186* (0,084–0,429)
Ni (µg/g kreat.)	1,06 (0,44–2,29)	1,53* (0,72–5,18)	Pb (µg/g kreat.)	0,87 (0,42–2,25)	1,44* (0,55–5,84)
Cu (µg/g kreat.)	7,19 (4,18–17,57)	20,61* (8,93–59,56)			

< GD – vrijednosti ispod granice detekcije

* statistički značajno različito ($p < 0,0023$) od vrijednosti prije kemoterapije

Nakon primljene kemoterapije (II.), rezultati statističke analize pokazali su značajan porast koncentracija Na (151 %), Mg (31 %), Al (149 %), Cr (173 %), Mn (83 %), Fe (307 %), Ni (44 %), Cu (187 %), Se (21 %), Cd (107 %), Sn (117 %), Pt (465 143 %), Hg (74 %) i Pb (65 %) te značajno sniženje K (30 %) i Mo (30 %) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I). Nije bilo statistički značajne razlike između tih skupina ispitanika u koncentracijama ostalih elemenata. Relativni odnos koncentracija elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa nakon kemoterapije u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije prikazan je na slici 15. Na slici nisu prikazane vrijednosti za platinu, jer je koncentracije platine u urinu nakon kemoterapije mnogostruko veća u odnosu na vrijednost prije kemoterapije.



Slika 15. Prikaz relativnog odnosa koncentracija elemenata u ispitanika s tumorom testisa nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Roza linija (100 %) predstavlja rezultate prije kemoterapije (I.).

*Statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije, testirano *Wilcoxon matched pairs* testom uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0023$).

5.2.4. Oksidacijsko-redukcijska ravnoteža

Ispitan je utjecaj kemoterapije na parametre oksidacijsko-redukcijske ravnoteže te su rezultati deskriptivne statističke analize za određivane parametre prikazani u tablici 13. Rezultati su prikazani kao medijan i raspon (5. do 95. percentil). Primjenom univarijantne statističke analize, *Wilcoxon matched pairs* testom ($p < 0,05$) ispitana je značajnost razlike u vrijednostima određivanih parametara u ispitanika s tumorom testisa u uzorcima uzorkovanim prije (I.) i nakon kemoterapije (II.).

Nakon primljene kemoterapije (II.) uočeno je značajno sniženje SOD-a, te značajno povišenje GSH u odnosu na vrijednosti izmjerene prije početka kemoterapije (I.). Nije bilo statistički značajne razlike između tih skupina ispitanika u vrijednostima GPx-a te TAC-a i TOS-a.

Tablica 13. Medijan i raspon određivanih parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u skupini ispitanika s tumorom testisa u uzorcima uzorkovanim prije početka kemoterapije (I.) i nakon kemoterapije (II.). Značajnost razlike određivanih parametara između skupina ispitanika ispitana je *Wilcoxon matched pairs* testom, $p < 0,05$.

Parametar	N	Ispitanici s tumorom testisa	
		(I.)	(II.)
SOD (U/g Hb)	85	1330 (792–2101)	1038* (524–1652)
GPx (U/g Hb)	86	149,9 (104,5–216,2)	155,7 (54,9–267,7)
GSH (μg/mg proteina)	76	3,06 (1,20–11,55)	4,12* (1,12–11,36)
TAC (mmol Trolox ekviv./L)	79	1,80 (0,11–4,41)	1,95 (0,66–5,50)
TOS (μmol H ₂ O ₂ ekviv./L)	54	28,18 (8,61–49,37)	27,90 (7,79–43,01)

* statistički značajna razlika u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije

5.3. Studija praćenja

5.3.1. Osobine ispitanika

U 40 ispitanika za koje je prikupljen uzorak krvi i urina godinu dana nakon kemoterapije provedeno je istraživanje praćenja koncentracija aminokiselina i elemenata te parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u urinu tijekom tri uzorkovanja. Uzorci su prikupljeni prije (I.), nakon (II.) i godinu dana nakon (III.) kemoterapije.

Opće karakteristike ispitanika prikazane su u tablici 14. Srednja dob ispitanika bila je 34 godine (raspon 18 do 49). Pušača je bilo 25 (63 %) te su 32 ispitanika (80 %) živjela u urbanom području. Srednja vrijednost BMI-a (kg/m^2) bila je 27,3 (raspon 17,5 do 41,7). Nije bilo značajnih razlika u općim karakteristikama te kliničkim i patološkim karakteristikama ispitanika s tumorom testisa trećeg dijela istraživanja u odnosu na ispitanike s tumorom testisa iz početnog istraživanja.

Mjereni parametri u urinu i krvi koji su uzorkovani godinu dana nakon kemoterapije uspoređeni su s vrijednostima parametara u urinu i krvi kontrolnih ispitanika uzorkovanih na početku istraživanja. Kontrolni ispitanici se nisu pratili kroz vrijeme te za njih nemamo dostupne podatke o vrijednostima parametara u istoj vremenskoj točki kao za oboljele ispitanike.

5.3.2. Profil aminokiselina

Rezultati deskriptivne statističke analize za izmjerene koncentracije aminokiselina u urinu kod ispitanika s tumorom testisa (N=30) za sva tri uzorkovanja te u urinu kontrolnih ispitanika (N=68) prikazane su u tablici 15.

Pri statističkoj analizi izmjerenih koncentracija aminokiselina primijenjena je Bonferonijeva korekcija te je razina značajnosti postavljena na $p < 0,0016$.

Kada su se koncentracije aminokiselina u urinu ispitanika dobivene prilikom I., II. i III. uzorkovanja usporedile međusobno (*Friedman ANOVA*), rezultati su pokazali statistički značajnu razliku između skupina. *Post-hoc* testiranjem (*Wilcoxon matched pairs test*) uočene su značajno više koncentracije sarkozina (53 %), glicina (55 %), valina (70 %), leucina (55 %), prolina (92 %), asparagina (48 %), tioprolina (92 %), fenilalanina (29 %), α -aminopimelne kiseline (83 %) i tirozina (42 %) u urinu ispitanika nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti izmjerene prije početka kemoterapije (I.). Također su uočene značajno

niže koncentracije glicina (44 %), valina (43 %), leucina (37 %), aloizoleucina (62 %), treonina (56 %), prolina (52 %), asparagina (31 %) i tirozina (41 %) te značajno viša koncentracija β -aminoizomaslačne kiseline (108 %) u urinu ispitanika godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije (II.). Nije bilo statistički značajne razlike između I., II. i III. uzorkovanja u koncentracijama ostalih aminokiselina. Relativni odnos koncentracija aminokiselina u urinu između ispitanika s tumorom testisa kod I. II. i III. uzorkovanja prikazan je na slici 16, vrijednosti za β -aminoizomaslačnu kiselinu nisu prikazane jer odstupaju od ostalih vrijednosti prikazanih na slici.

Tablica 14. Klinički i patološki podaci u ispitanika s tumorom testisa prije (I.), nakon (II.) i godinu dana nakon kemoterapije (III.).

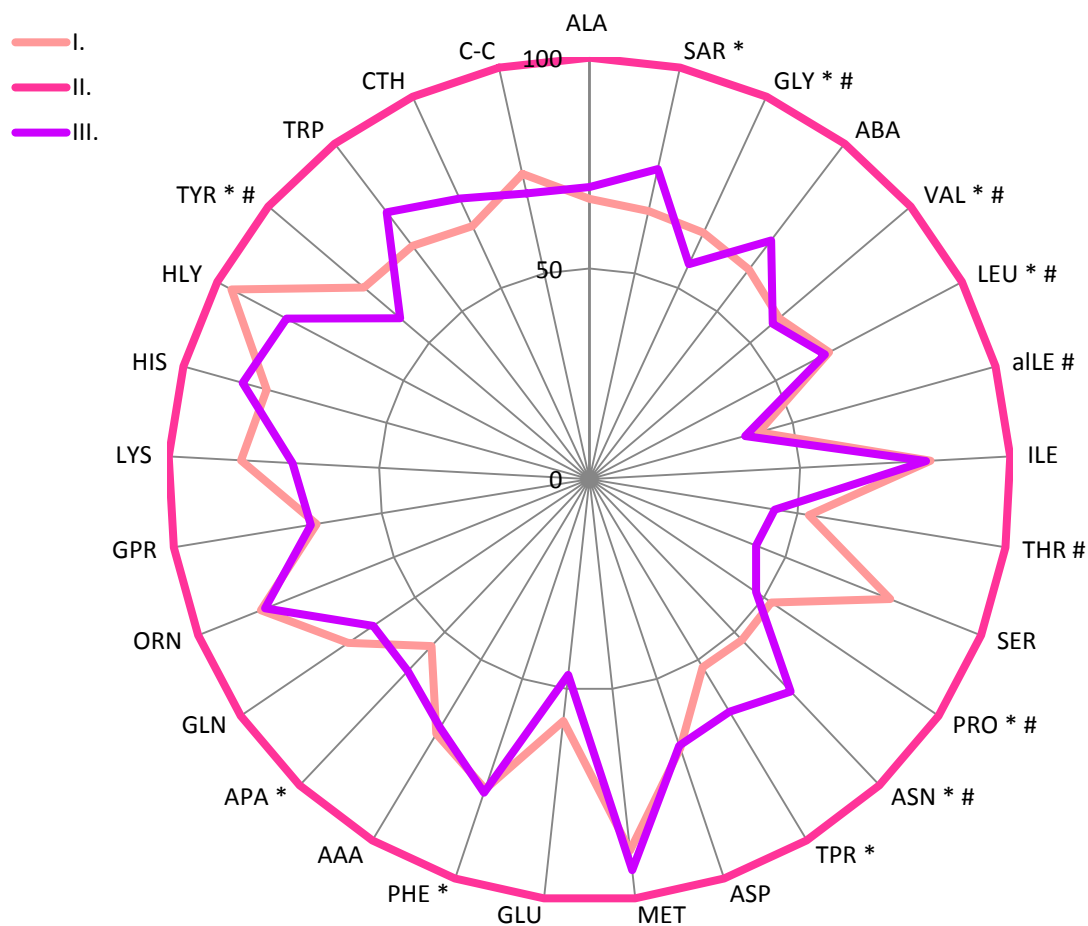
Parametar	Ispitanici s tumorom testisa		
	(I.)	(II.)	(III.)
N	40		
dob (godine)	34 (18–49)		
BMI (kg/m ²)	27,3 (17,5–41,7)		
pušači	25 (63 %)		
gradsko / seosko prebivalište	32 (80 %) / 8 (20 %)		
Histološka podjela			
seminomi / neseminomi	13 (33 %) / 27 (67 %)		
Serumski tumorski biljezi			
AFP (U/L)	4,00 (0,84–19032)	3,54 (1,00–81,00)	3,00 (1,00–12,00)
β-HCG (mLU/mL)	0,6 (0,0–14101)	0,0 (0,0–16,0)	0,0 (0,0–1,2)
LDH (μg/L)	178 (96–1726)	169 (127–250)	168 (110–215)

Tablica 15. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) koncentracija aminokiselina u skupini kontrolnih ispitanika (N=68) te ispitanika s tumorom testisa (N=30) prije (I.), nakon (II.) te godinu dana nakon kemoterapije (III.). Značajnost razlike određivanih parametara između I., II. i III. uzorkovanja ispitana je *Friedman ANOVA* te *post-hoc Wilcoxon matched pairs* testom uz Bonferonijevu korekciju, $p < 0,0016$.

Aminokiselina (nmol/mg kreat.)	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa			Aminokiselina (nmol/mg kreat.)	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa		
		(I.)	(II.)	(III.)			(I.)	(II.)	(III.)
alanin	220,7 (71,0–437,5)	168,5 (99,5–555,5)	253,4 (71,3–773,9)	175,7 (103,7–333,0)	metionin	2,83 (0,76–5,06)	3,13 (1,16–5,01)	3,53 (0,47–12,50)	3,30 (1,30–5,26)
sarkozin	2,20 (0,97–6,18)	1,64 (0,80–5,11)	2,51* (1,29–7,72)	1,89 (<GD–4,73)	glutaminska kiselina	15,56 (8,46–75,10)	16,45 (7,50–63,11)	28,48 (13,50–218,39)	13,30 (8,55–44,71)
glicin	605,9 (219,6–1215,2)	467,0 (181,7–898,5)	724,5* (277,8–1667,3)	407,1 [#] (227,6–752,8)	fenilalanin	37,13 (23,13–68,86)	38,61 (21,81–71,70)	49,74* (26,17–212,35)	39,06 (26,28–71,84)
α -aminomaslačna kiselina	8,00 (3,36–21,02)	6,85 (2,33–15,61)	10,97 (3,95–30,11)	7,81 (4,17–16,00)	α -aminoadipinska kiselina	24,88 (9,52–62,53)	22,44 (11,23–58,24)	31,82 (11,56–97,69)	21,90 (8,43–64,50)
valin	34,37 (20,34–52,71)	33,72 (25,98–77,93)	57,18* (27,89–119,13)	32,62 [#] (22,97–64,52)	α -aminopimelna kiselina	0,93 (0,48–3,18)	0,78 (0,45–1,64)	1,43* (0,43–3,81)	0,90 (0,42–3,74)
β -aminoizomasla- čna kiselina	61,30 (11,63–150,97)	58,63 (17,50–167,62)	30,94 (2,44–135,52)	64,38 [#] (17,50–203,66)	glutamin	223,5 (80,0–491,3)	185,7 (46,4–461,3)	268,2 (67,6–970,5)	166,2 (32,6–396,8)
leucin	16,99 (7,66–28,85)	18,28 (10,60–37,99)	28,42* (16,05–84,69)	17,96 [#] (12,10–33,93)	ornitin	11,89 (2,38–20,26)	9,40 (2,49–25,42)	11,19 (2,36–43,53)	9,27 (2,61–18,80)
aloizoleucin	1,90 (0,74–10,39)	4,83 (0,63–33,41)	11,61* (0,78–105,62)	4,44 [#] (0,84–44,46)	glicil-prolin	9,68 (5,79–19,53)	8,51 (5,75–29,51)	12,95 (5,70–23,53)	8,68 (4,80–16,40)
izoleucin	8,44 (5,15–12,46)	8,89 (5,29–19,43)	10,97 (6,02–25,42)	8,77 (5,59–15,70)	lizin	98,4 (34,5–357,5)	75,12 (35,53–535,58)	90,71 (26,27–788,51)	64,03 (31,66–296,31)
treonin	71,20 (25,60–221,30)	45,56 (<GD–91,60)	86,45 (<GD–695,31)	38,46 [#] ^{\$} (<GD–136,09)	histidin	713,1 (309,9–1515,8)	572,5 (151,2–1825,7)	719,7 (238,8–2931,5)	615,1 (201,9–1565,5)
serin	146,1 (76,5–356,0)	91,7 (0,5–204,5)	119,3 (0,4–707,1)	50,7 ^{\$} (0,3–186,4)	hidroksilizin	4,97 (2,77–10,97)	3,85 (1,70–11,29)	4,01 (1,54–10,24)	3,26 (1,11–11,39)
prolin	3,73 (<GD–12,95)	3,55 (1,99–11,30)	6,81* (1,09–21,08)	3,25 [#] (1,28–6,58)	tirozin	36,21 (16,96–86,98)	42,82 (22,49–84,57)	61,00* (23,58–213,49)	35,98 [#] (22,97–77,24)
asparagin	60,6 (35,2–137,5)	49,63 (31,11–207,69)	94,42* (48,26–580,67)	65,49 [#] (32,22–151,33)	triptofan	51,34 (28,29–97,40)	52,16 (20,76–134,01)	75,03 (30,46–211,81)	59,68 (18,97–120,48)
tioprolin	5,87 (0,72–5,13)	1,18 (0,60–2,26)	2,27* (0,65–6,15)	1,46 (0,49–5,74)	cistationin	10,51 (4,08–25,24)	10,14 (4,70–82,70)	15,33 (5,20–43,17)	11,25 (4,61–24,69)
asparaginska kiselina	3,97 (2,20–9,37)	4,46 (2,32–14,32)	6,61 (3,51–37,16)	4,41 (2,25–21,91)	cistin	20,49 (4,66–43,81)	17,94 (11,11–65,74)	24,20 (8,19–77,81)	16,80 (8,56–34,56)

< GD – vrijednosti ispod granice detekcije ; * statistički značajno različito ($p < 0,0016$) od vrijednosti prije kemoterapije (I.);

[#] statistički značajno različito ($p < 0,0016$) od vrijednosti nakon kemoterapije (II.); ^{\$} statistički značajno različito ($p < 0,0016$) od vrijednosti kontrolnih ispitanika



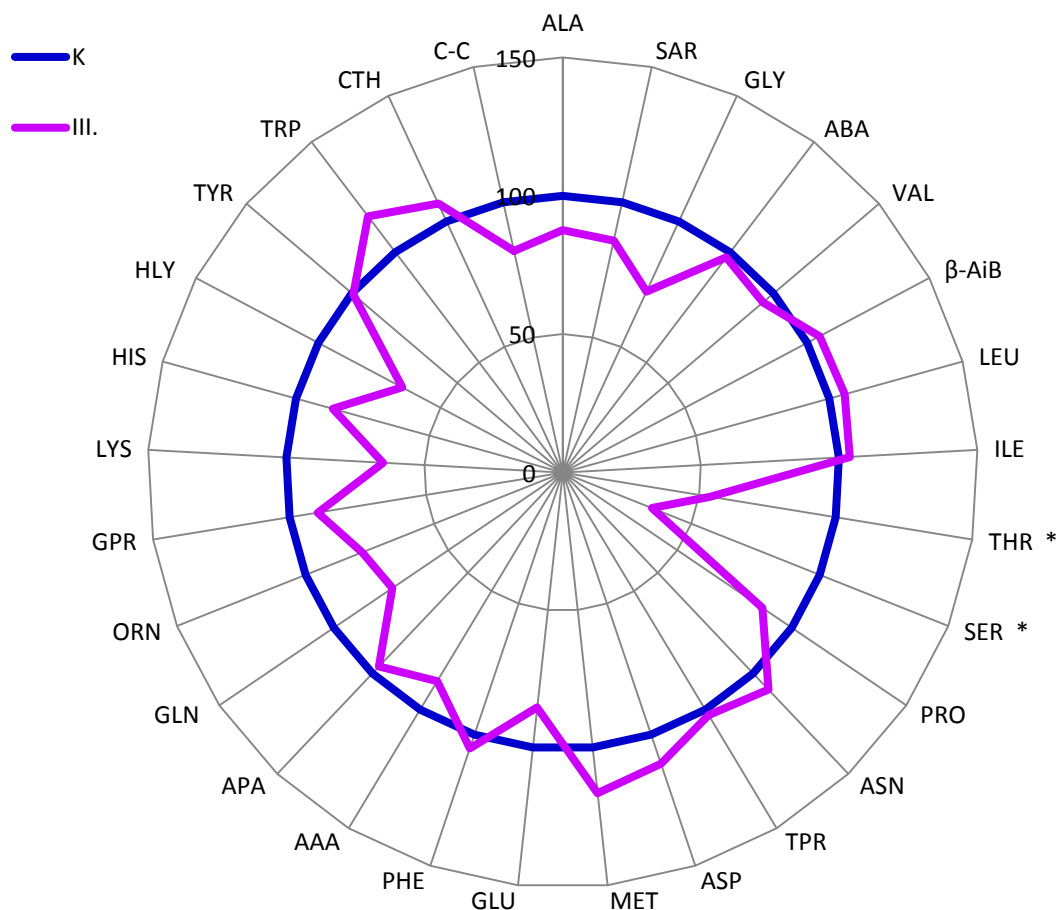
Slika 16. Prikaz relativnog odnosa koncentracija aminokiselina u ispitanika s tumorom testisa prije (I.) i godinu dana nakon (III.) kemoterapije u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije (II.). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Ružičasta linija (100 %) predstavlja rezultate nakon kemoterapije (II.).

*Statistički značajno različite vrijednosti nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.), *Wilcoxon matched pairs test* uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0016$).

#Statistički značajno različite vrijednosti godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (II.), *Wilcoxon matched pairs test* uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0016$).

Kada su vrijednosti dobivene godinu dana nakon kemoterapije (III.) uspoređene s kontrolnim vrijednostima (tablica 15), rezultati su pokazali da se vrijednosti za većinu aminokiselina približavaju vrijednostima dobivenim u kontrolnih ispitanika. Primijenjena je univarijantna statistička analiza kako bi se detektirale aminokiseline čije su koncentracije bile statistički značajno različite u ispitanika s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na kontrolne ispitanike (K). *Mann-Whitneyevim U-testom* ispitana je značajnost te razlike. Primjenom Bonferonijeve korekcije razina značajnosti postavljena je na $p < 0,0016$.

Ispitanici s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije imali su statistički značajno niže koncentracije treonina (46 %) i serina (65 %) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u koncentracijama ostalih aminokiselina. Relativan odnos koncentracija aminokiselina u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike prikazan je na slici 17. Na slici nisu prikazane vrijednosti za aloizoleucin jer odstupaju od ostalih vrijednosti prikazanih na slici.



Slika 17. Prikaz relativnog odnosa koncentracija aminokiselina u kontrolnih ispitanika i ispitanika s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije (III.). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Plava linija (100 %) predstavlja kontrolne ispitanike (K).

*Statistički značajno različite vrijednosti godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na vrijednosti kontrolnih ispitanika (K.), *Mann-Whitney U-test* uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0016$).

5.3.3. Multielementni profil u urinu

Rezultati deskriptivne statističke analize, prikazani kao medijan i raspon (5. do 95. percentil) za određene koncentracije elemenata u urinu kod ispitanika s tumorom testisa (N=35) u sva tri uzorkovanja te u urinu kontrolnih ispitanika (N=67) prikazani su u tablici 16.

Pri statističkoj analizi izmjerenih koncentracija elemenata primijenjena je Bonferonijeva korekcija te je razina značajnosti postavljena na $p < 0,0023$.

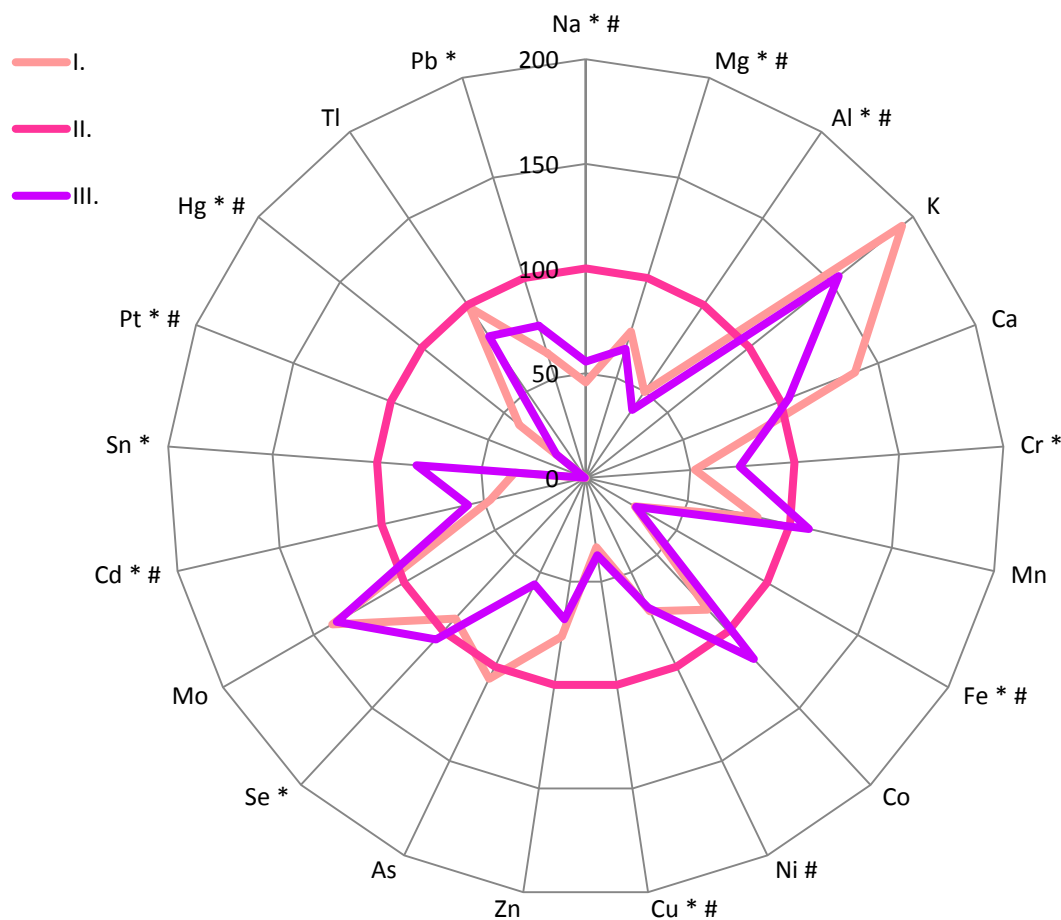
Pomoću statističkog testa *Friedman* ANOVA, procijenjena je razlika u koncentraciji elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa uzorkovanom prije (I.), nakon (II.) i godinu dana nakon kemoterapije (III.) te je uočena statistički značajna razlika između skupina. *Post-hoc* testiranjem (*Wilcoxon matched pairs test*) uočene su značajno više koncentracije Na (54 %), Mg (27 %), Al (50 %), Cr (48 %), Fe (73 %), Cu (66 %), Se (9 %), Cd (53 %), Sn (66 %), Pt (99 %), Hg (59 %) i Pb (38 %) nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.). Također je uočeno značajno sniženje koncentracija Na (45 %), Mg (35 %), Al (60 %), Fe (72 %), Ni (31 %), Cu (63 %), Cd (42 %), Pt (99 %) i Hg (82 %) godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na koncentracije izmjerene odmah nakon kemoterapije (II.). Nije bilo statistički značajne razlike između I., II. i III. uzorkovanja u koncentracijama ostalih elemenata. Relativni odnos koncentracija elemenata u urinu između ispitanika s tumorom testisa kod I. II. i III. uzorkovanja prikazan je na slici 18.

Tablica 16. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) koncentracije elemenata u skupini kontrolnih ispitanika (N=67) te ispitanika s tumorom testisa (N=35): prije (I.), nakon (II.) te godinu dana nakon kemoterapije (III.). Značajnost razlike određivanih parametara između I., II. i III. uzorkovanja ispitana je *Friedman ANOVA* te *post-hoc Wilcoxon matched pairs* testom ($p < 0,0023$).

Element	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa			Element	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa		
		(I.)	(II.)	(III.)			(I.)	(II.)	(III.)
Na (mg/g kreat.)	2656 (686–7547)	2093 (876–4864)	4588* (870–16603)	2547 [#] (787–4702)	Zn (μg/g kreat.)	249,0 (113,3–679,1)	356,4 (157,4–856,8)	465,6 (45,5–912,7)	317,4 (134,9–823,1)
Mg (mg/g kreat.)	45,31 (21,22–75,24)	50,99 (24,00–100,84)	69,60* (28,86–464,89)	44,95 [#] (20,77–81,27)	As (μg/g kreat.)	3,51 (1,42–70,72)	5,52 (1,21–39,12)	5,19 (1,07–28,29)	2,93 (1,58–61,58)
Al (μg/g kreat.)	3,75 (1,61–13,89)	4,37 (2,07–11,77)	8,81* (2,03–49,86)	3,47 [#] (1,25–16,86)	Se (μg/g kreat.)	17,45 (11,12–25,17)	16,70 (8,64–21,40)	18,24* (9,76–43,80)	19,18 (13,14–31,37)
K (mg/g kreat.)	1722 (753–3099)	1801 (783–3390)	933 (403–2944)	1442 (395–2984)	Mo (μg/g kreat.)	21,28 (11,79–38,84)	22,18 (8,14–64,73)	15,87 (3,90–49,19)	21,79 (5,13–102,87)
Ca (mg/g kreat.)	77,10 (15,80–198,30)	94,92 (18,05–218,65)	68,72 (9,62–349,90)	71,59 (22,70–171,46)	Cd (μg/g kreat.)	0,317 (0,133–1,018)	0,273 (0,100–1,608)	0,585* (0,142–2,841)	0,337 [#] (0,072–2,122)
Cr (μg/g kreat.)	1,11 (0,42–2,83)	0,99 (0,39–1,96)	1,89* (0,28–14,38)	1,40 (0,35–3,32)	Sn (μg/g kreat.)	0,137 (0,058–1,571)	0,133 (0,062–0,736)	0,392* (0,107–7,733)	0,318 (0,020–1,931)
Mn (μg/g kreat.)	0,083 (0,022–0,565)	0,165 (0,038–0,920)	0,196 (0,036–2,706)	0,214 ^s (0,052–1,114)	Pt (μg/g kreat.)	0,009 (0,004–0,022)	0,009 (0,002–0,032)	2627* (333 – 30520)	11,70 ^{#s} (4,34 – 55,57)
Fe (μg/g kreat.)	9,50 (4,45–36,53)	11,89 (6,19–36,79)	43,99* (13,54–114,91)	12,21 [#] (7,93–51,22)	Hg (μg/g kreat.)	1,38 (0,38–6,57)	0,77 (0,10–7,01)	1,89* (0,31–11,45)	0,34 ^{#s} (0,03–2,12)
Co (μg/g kreat.)	0,358 (0,135–0,999)	0,196 (0,102–0,479)	0,228 (0,090–1,232)	0,269 (0,105–1,294)	Tl (μg/g kreat.)	0,189 (0,086–0,392)	0,186 (0,080–0,321)	0,189 (0,090–0,616)	0,154 (0,083–0,402)
Ni (μg/g kreat.)	1,19 (0,48–2,76)	1,03 (0,38–2,18)	1,46 (0,72–6,21)	1,01 [#] (0,48–1,91)	Pb (μg/g kreat.)	1,12 (0,40–2,62)	0,82 (0,42–4,06)	1,32* (0,56–8,43)	1,00 (0,33–4,04)
Cu (μg/g kreat.)	6,76 (5,00–12,90)	7,13 (4,19–14,61)	21,29* (6,12–65,62)	7,94 [#] (4,47–13,48)					

* statistički značajno različito ($p < 0,0023$) od vrijednosti prije kemoterapije (I.); [#] statistički značajno različito ($p < 0,0023$) od vrijednosti nakon kemoterapije (II.)

^s statistički značajno različito ($p < 0,0023$) od vrijednosti kontrolnih ispitanika



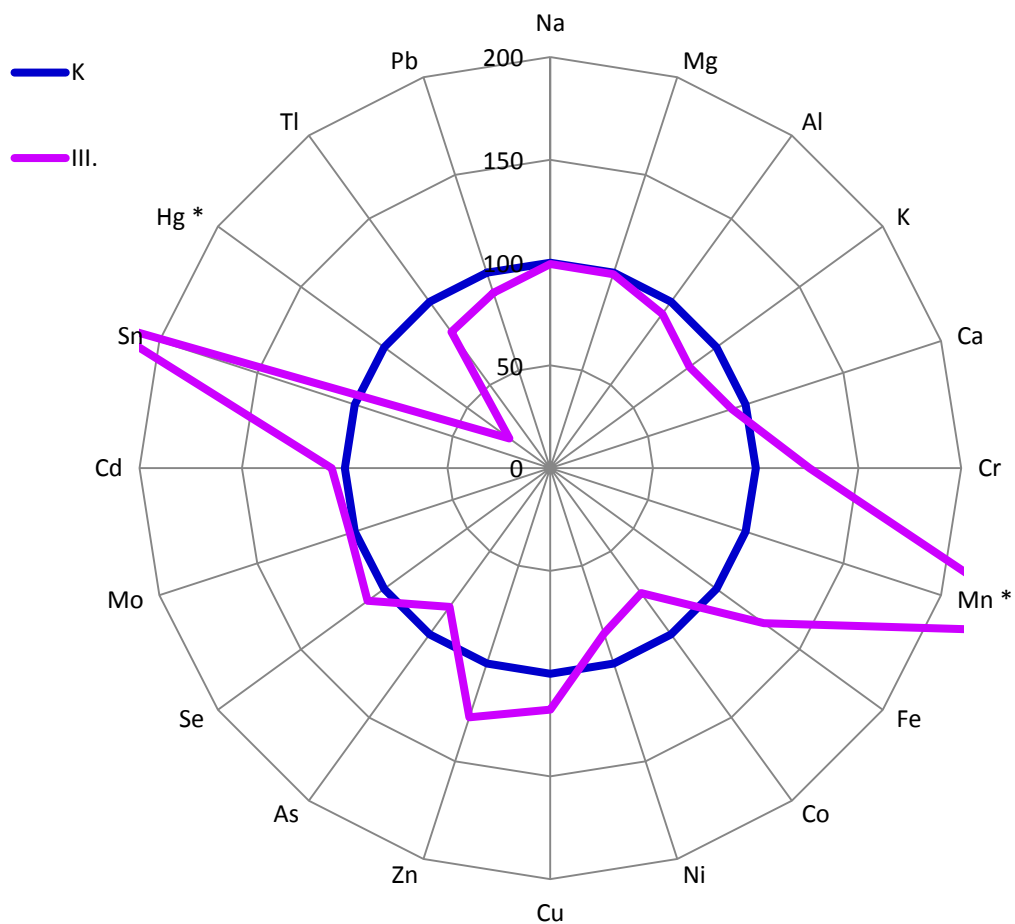
Slika 18. Prikaz relativnog odnosa koncentracija elemenata u ispitanika s tumorom testisa prije (I.) i godinu dana nakon (III.) kemoterapije u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije (II.). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Ružičasta linija (100 %) predstavlja rezultate nakon kemoterapije (II.).

*Statistički značajno različite vrijednosti nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.), *Wilcoxon matched pairs test* ($p < 0,0023$).

#Statistički značajno različite vrijednosti godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije (II.), *Wilcoxon matched pairs test* ($p < 0,0023$).

Kada su vrijednosti dobivene godinu dana nakon kemoterapije uspoređene s kontrolnim vrijednostima (tablica 16), rezultati su pokazali da se vrijednosti za većinu elemenata približavaju vrijednostima dobivenim u kontrolnih ispitanika. Primijenjena je univarijantna statistička analiza kako bi se detektirali elementi čije su koncentracije statistički značajno različite u urinu ispitanika s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije u odnosu na kontrolne ispitanike. *Mann-Whitneyevim U-testom* ispitana je značajnost te razlike. Primjenom Bonferonijeve korekcije razina značajnosti postavljena je na $p < 0,0023$.

Ispitanici s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije imali su statistički značajno višu koncentraciju Mn (158 %) i Pt (138 932 %) te statistički značajno nižu koncentraciju Hg (75 %) u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u koncentracijama ostalih elemenata (tablica 16). Relativan odnos koncentracija elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike prikazan je na slici 19. Vrijednosti za Pt nisu prikazane jer višestruko odstupaju od ostalih vrijednosti prikazanih na slici.



Slika 19. Prikaz relativnog odnosa koncentracija elemenata u kontrolnih ispitanika i ispitanika s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije (III.). Rezultati su prikazani kao postotna vrijednost. Plava linija (100 %) predstavlja kontrolne ispitanike (K).

*Statistički značajno različite vrijednosti godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na vrijednosti kontrolnih ispitanika (K.), *Mann-Whitney U-test* uz Bonferonijevu korekciju ($p < 0,0023$).

5.3.4. Parametri oksidacijsko-redukcijske ravnoteže

Rezultati deskriptivne statističke analize, prikazani kao medijan i raspon (5. do 95. percentil) za određene parametre oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u krvi ispitanika s tumorom testisa u sva tri uzorkovanja te kontrolnih ispitanika prikazani su u tablici 17.

Primjenom statističkog testa *Friedman ANOVA* ($p < 0,05$) ispitana je značajnost razlike u vrijednostima izmjerenih parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u ispitanika s tumorom testisa u krvi prije (I.), nakon (II.) i godinu dana nakon (III.) kemoterapije te je uočena statistički značajna razlika između skupina ispitanika s tumorom za SOD, TAC i TOS. *Post-hoc* testiranjem (*Wilcoxon matched pairs test*, $p < 0,05$) uočeno je značajno sniženje aktivnosti SOD-a te značajno povišenje vrijednosti GSH nakon kemoterapije (II.) u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije (I.). Uočeno je značajno povišenje aktivnosti SOD-a i vrijednosti za TOS, dok su aktivnost GPx-a i vrijednosti za TAC bile statistički značajno niže godinu dana nakon kemoterapije (III.) u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije (II.).

Kada su vrijednosti dobivene godinu dana nakon kemoterapije uspoređene s kontrolnim vrijednostima (tablica 17), rezultati su pokazali da se vrijednosti za većinu parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže približavaju vrijednostima dobivenim u kontrolnih ispitanika. Primijenjena je univarijantna statistička analiza kako bi se detektirali parametri koji su različiti u krvi ispitanika s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije u odnosu na kontrolne ispitanike. *Mann-Whitneyevim U-testom* ispitana je značajnost razlike u razinama parametara u urinu.

Ispitanici s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije imali su statistički značajno višu aktivnost SOD-a te značajno niže razine GSH i TOS-a u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitivanih skupina u vrijednostima za GPx i TAC (tablica 17).

Tablica 17. Medijan i raspon (5. do 95. percentil) određivanih parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u skupini kontrolnih ispitanika te ispitanika s tumorom testisa: prije (I.), nakon (II.) te godinu dana nakon kemoterapije (III.). Značajnost razlike određivanih parametara između I. II. i III. uzorkovanja ispitana je *Friedman* ANOVA testom, te *post-hoc Wilcoxon matched pairs* testom ($p < 0,05$).

Parametar	Kontrolni ispitanici	Ispitanici s tumorom testisa		
		I.	II.	III.
SOD (U/g Hb)	1201 (960–1483) (N = 64)	1439 (661–2158) (N = 40)	1023* (383–1886) (N = 40)	1733 [#] (949–3048) (N = 40)
GPx (U/g Hb)	143,9 (116,9–185,6) (N = 64)	154,2 (75,6–219,2) (N = 40)	162,0 (41,4–357,5) (N = 40)	142,3 [#] (95,8–191,5) (N = 40)
GSH (μg/mg proteina)	6,17 (1,86–20,18) (N = 61)	3,41 (0,66–13,92) (N = 33)	4,44* (0,32–53,24) (N = 33)	3,84 ^{\$} (1,19–8,38) (N = 33)
TAC (mmol Trolox ekviv./L)	1,44 (0,07–4,60) (N = 62)	1,81 (0,40–4,41) (N = 32)	1,89 (0,07–5,98) (N = 32)	1,35 [#] ($< GD$ –5,47) (N = 32)
TOS (μmol H₂O₂ ekviv./L)	50,07 (30,91–61,19) (N = 61)	25,28 (7,21–49,37) (N = 26)	28,54 (6,43–44,69) (N = 26)	37,06 [#] (17,08–102,90) (N = 26)

$< GD$ – vrijednosti ispod granice detekcije

* statistički značajno različito ($p < 0,005$) od vrijednosti prije kemoterapije (I.)

[#] statistički značajno različito ($p < 0,005$) od vrijednosti nakon kemoterapije (II.)

^{\$} statistički značajno različito ($p < 0,005$) od vrijednosti kontrolnih ispitanika

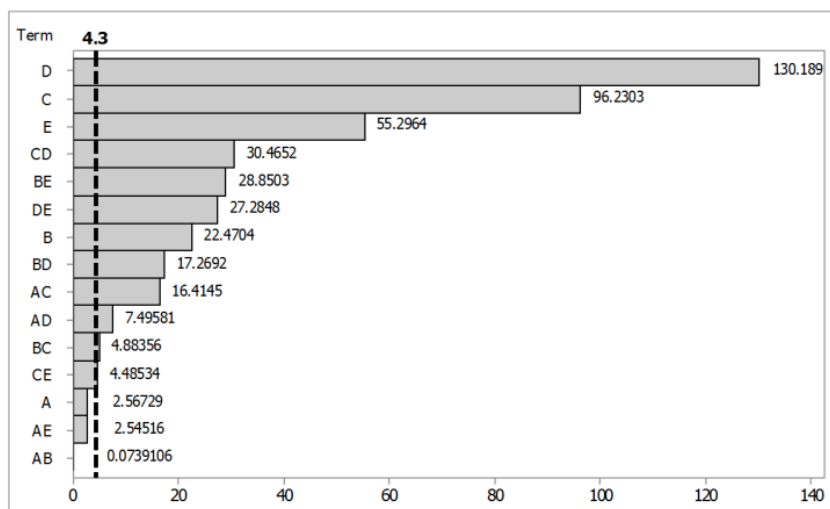
5.4. Hlapljivi organski metaboliti (VOM)

5.4.1. Razvoj i optimizacija postupka mikroekstrakcije hlapljivih metabolita iz para iznad uzorka urina (HS-SPME)

Procjena značajnih varijabli uključenih u HS-SPME

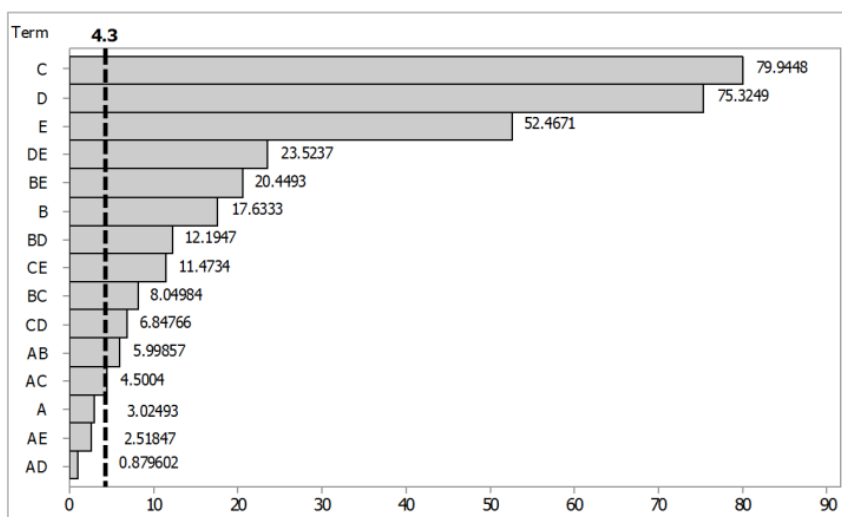
Pri optimizaciji i razvoju postupaka analize hlapljivih spojeva nastojala se postići dobra osjetljivost bez gubitka analita i kontaminacije uzoraka. Budući da HS-SPME ne koristi otapala već se ekstrakcija i ukoncentriravanje analita odvijaju u jednom koraku pomoću vlakna visokog kapaciteta za ukoncentriravanje analita, uklanjanje se učinak matrice i postiže visoka osjetljivost. Kako bi se postigli optimalni uvjeti, ispitan je utjecaj temperature i trajanja inkubacije i ekstrakcije, dodatka soli te trajanja miješanja na djelotvornost ekstrakcije. Pareto dijagrami na slici 19 prikazuju doprinos svake pojedine analizirane varijable i doprinos međudjelovanja između pojedinih varijabli ukupnoj površini pikova odabranih 25 hlapljivih, odnosno 15 najhlapljivijih spojeva. Varijable kod kojih se standardizirani učinak proteže iza vertikalne linije smatraju se da statistički značajno pridonose povećanju ukupne površine pikova odnosno djelotvornosti ekstrakcije. Rezultati su pokazali statistički značajan utjecaj trajanja inkubacije (B), trajanja ekstrakcije (C), temperature inkubacije i ekstrakcije (D) i količine dodanog NaCl (E) na zbroj površina pikova koje odgovaraju površinama 25 i 15 odabranih hlapljivih spojeva. Utjecaj trajanja miješanja uzorka prije inkubacije (A) nije bila statistički značajna varijabla. Osim toga, sve jednosmjerne interakcije, osim interakcije između trajanja ekstrakcije i količine NaCl (CE), trajanja miješanja i količine NaCl (AE) te trajanja miješanja i trajanja inkubacije (AB) značajno su utjecale na zbroj površina pikova 25 hlapljivih spojeva. Slično tome, sve jednosmjerne interakcije, osim onih između trajanja miješanja i temperature (AD), količine NaCl (AE) te trajanja ekstrakcije (AC) statistički su značajno utjecale na zbroj površina pikova 15 najhlapljivijih spojeva.

a)



Standardizirani učinak

b)



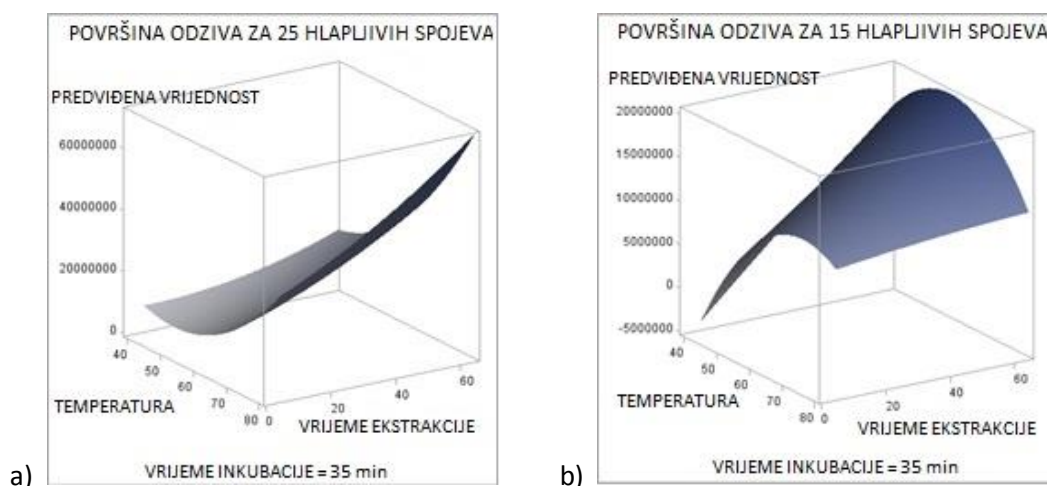
Standardizirani učinak

Slika 20. Pareto dijagrami ovisnosti površine pikova dobivenih analizom hlapljivih spojeva o različitim prediktorima kao rezultat standardiziranog učinka 2^{5-1} reduciranog faktorskog dizajna. Učinci pojedinih prediktora na: a) ukupnu površinu kromatografskih pikova 25 hlapljivih spojeva odabranih za optimizaciju HS-SPME metode i b) zbroj površina pikova 15 najhlapljivijih spojeva. Prediktori su označeni slovima: A – trajanje miješanja prije inkubacije, B – trajanje inkubacije, C – trajanje ekstrakcije, D – temperatura inkubacije i ekstrakcije, E – količina dodanog natrijevog klorida. Jednosmjerna međudjelovanja između pojedinih učinaka označena su kombinacijama gore navedenih slova.

Optimalne vrijednosti varijabli važnih za HS-SPME

Prema rezultatima reduciranog faktorskog dizajna (slika 20), četiri pojedinačne varijable koje su najviše utjecale na učinkovitost HS-SPME bile su trajanje inkubacije (B), trajanje ekstrakcije (C), temperatura (D) i količina NaCl (E). Primijećeno je da se zbroj površina pikova povećavao s porastom dodanog NaCl. Budući da je količina od 1 g NaCl u 2 mL uzorka urina bila dovoljna za postizanje prezasićene otopine čime se postigao maksimalni mogući učinak na učinkovitost ekstrakcije, nije bilo potrebe za daljnjom optimizacijom te varijable. Ostale varijable za koje je nađeno da značajno pridonose djelotvornosti ekstrakcije, kao što su trajanje i temperatura inkubacije i ekstrakcije, dodatno su optimizirane korištenjem Doehlertovog dizajna trećeg reda.

Kako bi pronašli optimalne vrijednosti odabranih varijabli, provedena je analiza površine odziva. Slika 21 ilustrira grafove površine odziva za zbroj površina pikova 25 (slika 21a) odnosno 15 odabranih hlapljivih spojeva (slika 21b). Greben maksimalnog odziva za zbroj površina pikova 25 hlapljivih spojeva pokazao je optimalne vrijednosti za trajanje ekstrakcije između 44 i 46 minuta, temperaturu inkubacije i ekstrakcije između 72 °C i 75 °C i trajanje inkubacije između 35 i 36 minuta. Što se tiče zbroja površina pikova za 15 najhlapljivijih spojeva, model je predvidio da je optimalni odgovor definiran trajanjem ekstrakcije između 50 i 60 minuta, temperaturom inkubacije i ekstrakcije između 58 °C i 60 °C i trajanjem inkubacije između 34 i 35 minuta. Za grafički prikaz površine odziva, trajanje inkubacije je fiksirano na 35 minuta s obzirom da je to varijabla koja ima slične procijenjene optimalne razine u oba modela i najmanje utjecaja na zbroj površina pikova. Stoga je trajanje inkubacije od 35 minuta odabrano za daljnju analizu u skladu s predviđenim modelom. Temperatura inkubacije i ekstrakcije od 60 °C i trajanje ekstrakcije od 50 minuta odabrani su za daljnja mjerenja kao optimalne vrijednosti za uspješnu ekstrakciju odabranih hlapljivih spojeva.



Slika 21. Grafovi površine odziva za zbroj površina pikova 25 (a) odnosno 15 (b) odabranih hlapljivih spojeva.

Nakon optimizacije eksperimentalnih uvjeta, odabran je **postupak za ekstrakciju hlapljivih spojeva**. Sljedeći postupak korišten je u daljnjim istraživanjima za ekstrakciju hlapljivih spojeva iz uzoraka urina: 2 mL uzorka urina podešenog na $\text{pH} = 2-3$ doda se u bočicu za SPME od 5 mL koja sadrži 1 g NaCl. Bočica se začepi PTFE čepom i aluminijskim čepom s otvorom i miješa 60 s. Bočica se zatim stavi u termoblok na temperaturu od 60 °C. Nakon 35 minuta inkubacije, SPME igla se umetne kroz septum i 75 μm -Carboxen/PDMS vlakno se izloži prostoru iznad urina tijekom 50 minuta. Nakon ekstrakcije, SPME vlakno se povuče u iglu, ukloni iz bočice i umetne u otvor injektora GC-MS sustava gdje se analiti termički desorbiraju i prenesu u analitičku kolonu na 280 °C tijekom 10 minuta.

Ponovljivost metode

Kod ne-ciljane metabolomičke analize, ponovljivost metode jedini je parametar koji se može izračunati s obzirom na analitičku validaciju. U analizi su praćene površine pikova metabolita prisutnih u svježem kontrolnom uzorku koje obuhvaćaju vremena zadržavanja kroz cijeli ionski kromatogram. Naz i sur. (2014) predlažu da RSD vrijednosti za ne-ciljane metabolomičke analize, provedene tekućinskom kromatografijom uz maseni spektrometar kao detektor (LC-MS), trebaju biti ispod 30 %, a da analiti s višim RSD, zbog velike varijabilnosti, nisu prikladni da bi se smatrali biološkim markerom. Stoga je u naše daljnje analize uključeno 57 hlapljivih spojeva koji su bili prisutni u više od 70 % pojedinačnih uzoraka i s RSD-om nižim od 30 %. Rezultati su pokazali da je RSD površina pika u šest

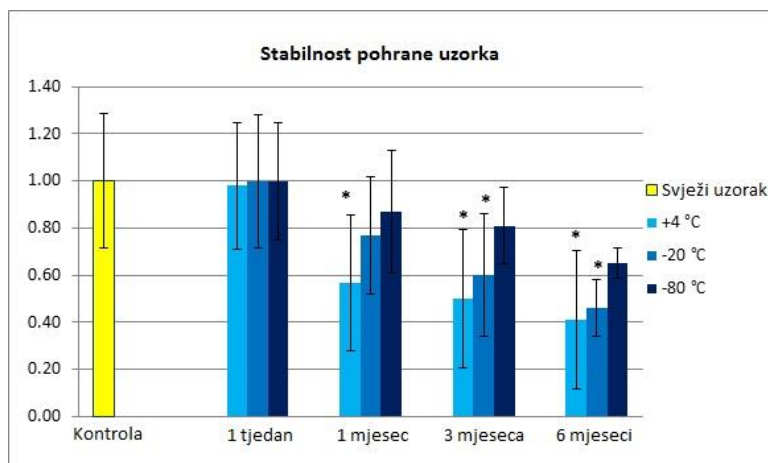
replikata analiza bila manja od 10 % za 30 pikova (53 %), manja od 20 % za 21 (37 %) pik, te manja od 30 % za sve preostale pikove (6/57, 10 %).

5.4.2. Ispitivanje stabilnosti hlapljivih metabolita u uzorcima urina pri različitim uvjetima pohranjivanja

U sljedećoj fazi istraživanja ispitana je stabilnost hlapljivih metabolita. Optimizirana metoda primijenjena je za procjenu utjecaja duljine pohranjivanja, temperature pohranjivanja te višekratnog zamrzavanja i odmrzavanja na površinu 57 pikova iz uzoraka urina.

Stabilnost uzoraka urina pohranjenih na 4 °C, -20 °C i -80 °C

Uzorci urina tri različita ispitanika i kontrolni uzorak (dobiven miješanjem jednakih volumena svakog od tri pojedinačna uzorka) analizirani su nakon što su pohranjeni jedan tjedan odnosno jedan, tri i šest mjeseci na 4 °C, -20 °C i -80 °C (prema dizajnu prikazanom na slici 8a). Dobiveni kromatogrami uspoređeni su s kromatogramima svježih uzoraka. Rezultati su prikazani kao relativna vrijednost zbroja površine pikova u odnosu na uzorak svježeg urina pri čemu je omjer za referentni uzorak jednak 1 (slika 22). Kod uzoraka urina pohranjenih u hladnjaku (4 °C) došlo je do najvećeg smanjenja zbroja površina pikova bez obzira na duljinu pohrane s time da se zbroj površina pikova značajno smanjio u uzorcima koji su bili pohranjeni jedan mjesec i dulje. Pohranjivanje na -20 °C rezultiralo je značajnim smanjenjem zbroja površina pikova nakon tri mjeseca (smanjenje od 40 %) i šest mjeseci (54 %) dok se kod uzoraka pohranjenih na -80 °C zbroj površina pikova nije statistički značajno smanjio ni nakon 6 mjeseci, u odnosu na svježi uzorak.

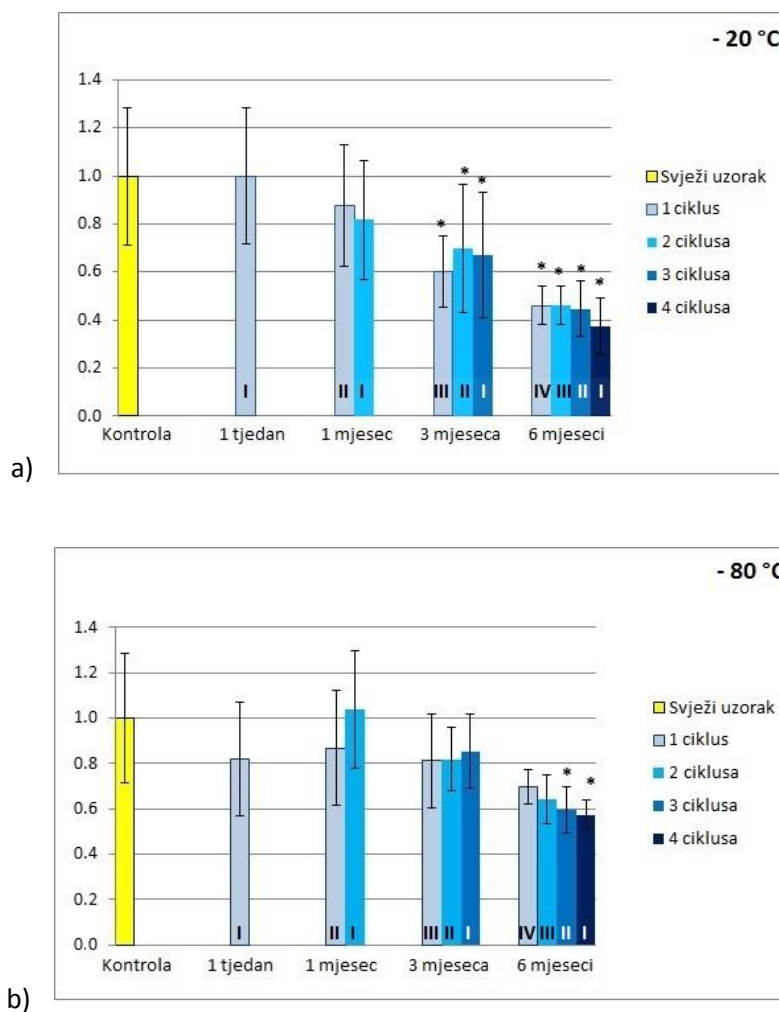


Slika 22. Stabilnost pohrane uzoraka urina na 4 °C, -20 °C i -80 °C tijekom jednog tjedna, jednog mjeseca, tri mjeseca i šest mjeseci. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija relativne površine pikova četiri uzorka urina. *Mann-Whitney U-test*, * $p < 0,05$ u usporedbi sa svježim uzorkom (kontrola).

Stabilnost urina uslijed višekratnog zamrzavanja i odmrzavanja

Postoji značajan rizik gubitka hlapljivih tvari tijekom procesa zamrzavanja i odmrzavanja urina što može promijeniti profil hlapljivih metabolita u uzorku. Kako bi se provjerili ti učinci, uzorci su bili podvrgnuti procesima zamrzavanja i odmrzavanja prema dizajnu prikazanom na slici 8b. Zbroj površina pikova 57 hlapljivih spojeva iz uzoraka pohranjenih na -20 °C i -80 °C koji su odmrznuti jedan, dva, tri ili četiri puta nakon jednog tjedna, jednog mjeseca, tri mjeseca, odnosno šest mjeseci, uspoređen je sa zbrojem površina pikova iz svježeg uzorka. Zbroj površina pikova u svježem uzorku koji predstavlja referentni uzorak s omjerom 1, u usporedbi s onima analiziranim nakon određenog broja ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja prikazan je na slici 23. Rezultati pokazuju da proces zamrzavanja i odmrzavanja utječe na stabilnost uzorka. Kod uzoraka pohranjenih na -20 °C dulje od jednog mjeseca, uočeno je značajno smanjenje zbroja površina pikova (>40 %) bez obzira na broj ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Uzorci urina pohranjeni na -80 °C i podvrgnuti ponovljenim ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja tijekom šest mjeseci imali su manje promjene u površinama metabolita u usporedbi s urinom pohranjenim na -20 °C. Prema dobivenim rezultatima, prihvatljiva su tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja ako su uzorci urina pohranjeni na -80 °C do tri mjeseca. Značajno smanjenje zbroja površine pikova nakon šest mjeseci pohrane uzorka opaženo je nakon tri i četiri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja,

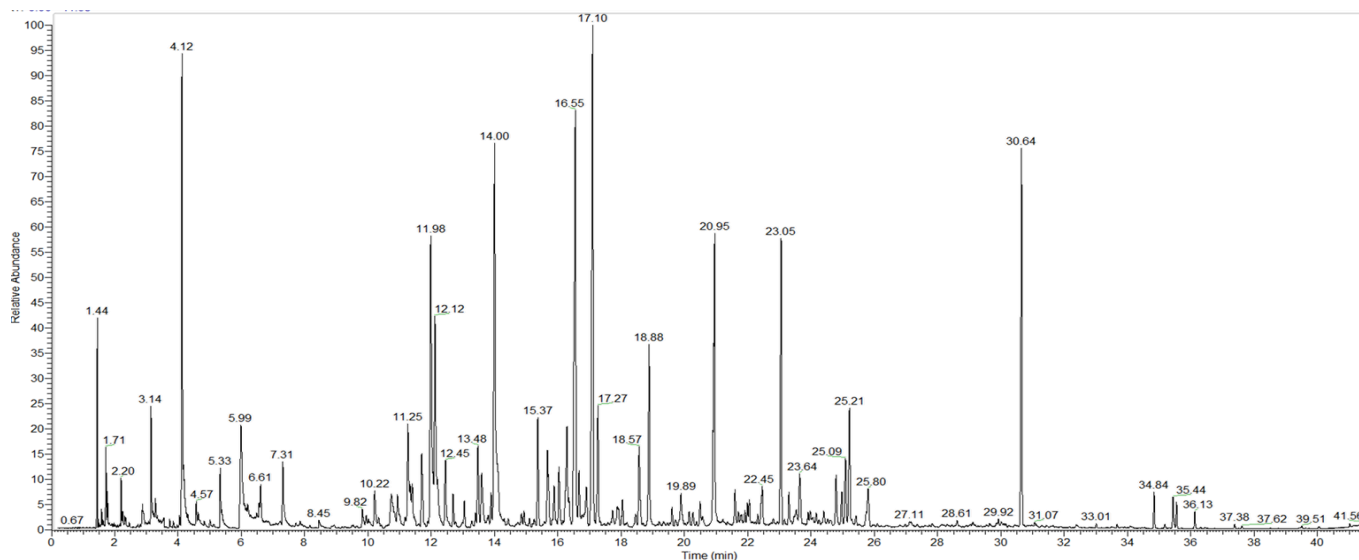
stoga, ako je moguće, treba izbjegavati više od dva ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja uzorka urina koji je pohranjen šest mjeseci na -80°C .



Slika 23. Stabilnost hlapljivih spojeva uslijed višekratnog zamrzavanja i odmrzavanja uzoraka urina pohranjenih na a) -20°C i b) -80°C tijekom jednog tjedna, jednog mjeseca, tri mjeseca i šest mjeseci, podvrgnutih jednom do četiri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja. Rimski brojevi označavaju broj setova uzoraka. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija relativne površine pikova četiri uzorka urina. Mann-Whitney U-test, * $p < 0,05$ u usporedbi sa svježim uzorkom (kontrola).

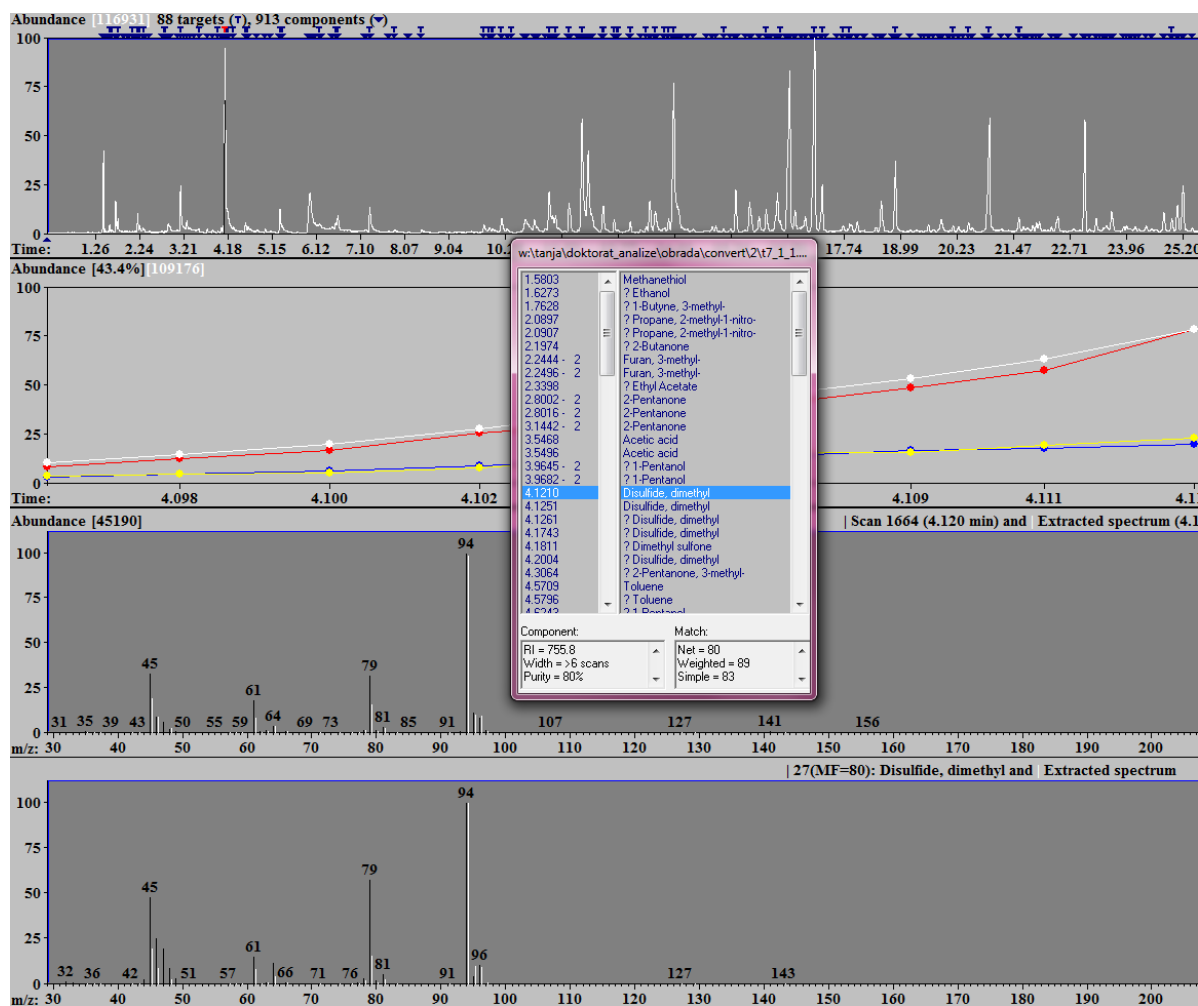
5.4.3. Identifikacija hlapljivih metabolita u urinu

U cilju stvaranja metabolomičkog profila provedena je identifikacija hlapljivih organskih metabolita u urinu ispitanika s rakom testisa i kontrolnih ispitanika. Analiza urina pomoću HS-SPME GC-MS rezultirala je pojavom oko 200 pikova u kromatogramu (slika 24).



Slika 24. Prikaz kromatograma ukupne struje iona (engl. *Total Ion Chromatogram, TIC*) analiziranog urina

Nepoznati metaboliti u uzorku identificirani su pomoću slobodno dostupnog sustava AMDIS (slika 25) uz korištenje knjižnice spektara masa NIST. Faktor poklapanja pri usporedbi spektra masa nepoznatog metabolita s podacima u knjižnici spektara masa NIST postavljen je na 70 %. Potom su računani RI nepoznatih metabolita pomoću homologne serije alkana ($C_8 - C_{20}$) i uspoređivani s podacima iz literature. Ako se vrijednosti RI nepoznatog i predloženog metabolita nije razlikovao za više od ± 10 , nepoznati metabolit se smatrao identificiranim. Kako homologni niz alkana $C_8 - C_{20}$ započinje oktanom čiji RI je 800, za metabolite koji su s kromatografske kolone izlazili prije oktana injektirali smo heksan i odredili mu RI kako bi nam pomogao u identifikaciji. Svim metabolitima koji su izašli s kolone prije oktana određen je okvirni RI. Budući da za njih nije bilo moguće izračunati točan RI, faktor preklapanja postavljen je na 90 %. Za potvrdu identifikacije nepoznatog metabolita provjeravala se također temperatura vrenja. Za 17 metabolita identifikacija je potvrđena standardom.



Slika 25. Prikaz obrade kromatograma sustavom AMDIS

U tablici 18 su prikazane predložene identifikacije nepoznatih metabolita čiji je RI izračunat pomoću homologne serije n-alkana te uspoređen s podacima iz literature. Pri usporedbi izračunatog RI nepoznatog metabolita s RI iz literature treba obratiti pozornost na korištenu kolonu pri kromatografskom razdjeljivanju jer se RI mijenjaju ovisno o vrsti kolone. U tablici je navedena i temperatura vrenja pojedinog metabolita za koju se očekuje da analogno raste ovisno o RI.

Nakon provedenih analiza, u uzorcima urina identificirana su 123 hlapljiva organska metabolita.

Ponovljivost analiza za identificirane metabolite

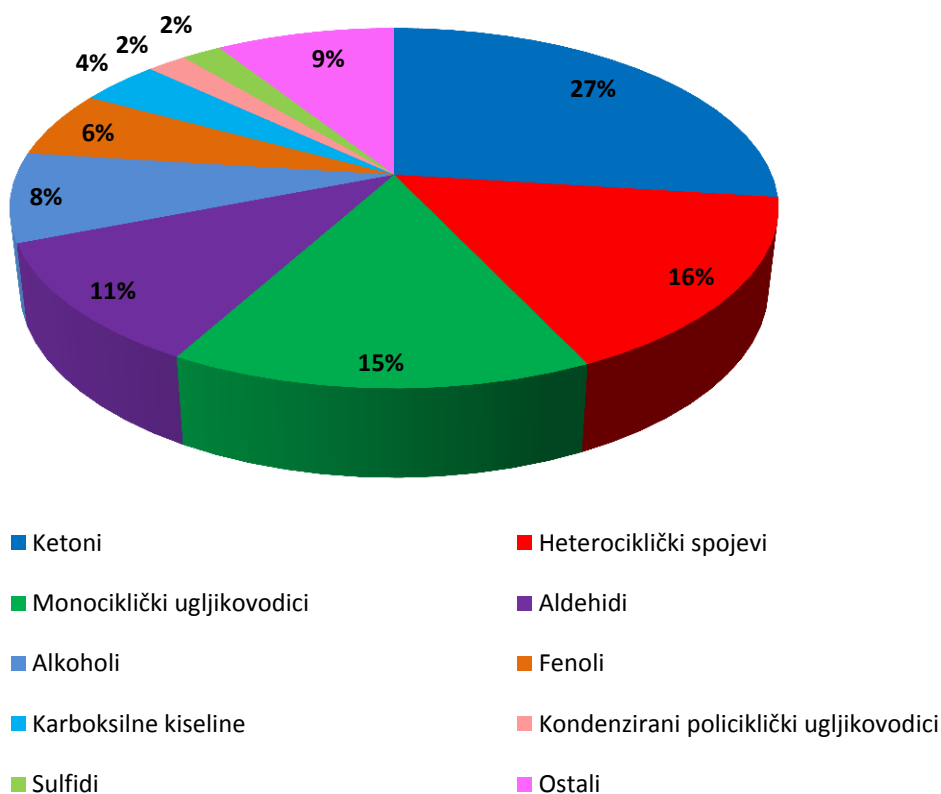
Ponovljivost se izračunava kao mjera varijacije površine ispod pika identificiranog spoja višekratnim mjerenjem istog uzorka. To je mjera koja ujedno daje informaciju o stabilnosti identificiranih spojeva. Kod analize hlapljivih metabolita ta informacija je jako bitna, jer pojedini metaboliti upravo zbog temperature vrenja mogu nestati iz uzorka. Zato su ti rezultati u tablici 18 prikazani kao stabilnost.

Od 123 identificirana metabolita, za 73 je izračunata stabilnost nakon osam analiza istog uzorka urina. Rezultati mjerenja su za 17 od 73 identificiranih metabolita pokazali varijaciju manju od 10 %, za 33 varijaciju između 10 i 20 %, za 18 metabolita između 20 i 30 % te za 5 metabolita tj. za dimetilpirazin, 5-etildihidro-2(3H)-furanon, 4-metilfenilmetanal, diizobutil-benzen-1,2-dikarboksilat i dibutil benzen-1,2-dikarboksilat varijaciju iznad 30 %. Metaboliti koji su pokazali varijaciju iznad 30 % isključeni su iz daljnjih analiza tako da će u studiju traženja biološkog biljega za tumor testisa biti uključeno 68 od 73 metabolita.

Za 50 identificiranih metabolita nije bilo moguće izračunati ponovljivost odnosno odrediti stabilnost nakon osam analiza istog uzorka zbog nedostatka uzorka. Međutim, njihova stabilnost se pratila četiri sata nakon odmrzavanja na 4 °C. Za tu svrhu je deset uzoraka različitih urina analizirano odmah nakon odmrzavanja i četiri sata poslije te su dobivene površine ispod pikova uspoređene i na temelju dobivenih podataka određena je stabilnost. Pod tim uvjetima 38 metabolita pokazalo je zadovoljavajuću stabilnost. Međutim, 12 identificiranih metabolita (tj. etanol, butan-2-on, pirazin, 3-metilpirol, 1-etil-5,5-dimetilciklopenta-1,3-dien, izotiocijanatokiklopropan, 3-izotiocijanatoprop-1-en, oktan-2-on, fenilmetanol, nonanal, 2-izopropil-5-metilfenol i 1,4,5-trimetilnaftalen) nisu se pokazali stabilnima te ih se isključilo iz daljnjih analiza.

Identificirani hlapljivi organski metaboliti klasificirani po karakterističnim skupinama

Od 123 identificirana metabolita, 32 (27 %) je ketona, 20 heterocikličkih spojeva (16 %), 18 monocikličkih ugljikovodika (15 %), 13 aldehida (11 %), 10 alkohola (8 %), osam fenola (6 %), pet karboksilnih kiselina (4 %), tri kondenzirana policiklička ugljikovodika (2 %), tri sulfida (2 %), dva estera dikarboksilne kiseline (1,6 %), dva ugljikovodika (1,6 %), dva biciklička etera (1,6 %), jedan izotiocijanat (0,8%), jedan tiol (0,8 %), jedan amin (0,8 %), jedan halogeni derivat (0,8 %) i jedan ester karboksilne kiseline (0,8 %).



Slika 26. Distribucija VOM-a u urinu ovisno o karakterističnim skupinama.

Tablice 18 a-j. Prikaz identificiranih metabolita koji su potencijalno važni za razlikovanje oboljelih od zdravih ispitanika razvrstanih prema funkcionalnim skupinama.

a) Identificirani ketoni.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
KETONI					
propanon		std ^f	10.7	56	Arasradnam i sur., 2014; Cozzolino i sur., 2017; Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Mochalski i Unterkofer, 2016; Jiménez-Pacheco i sur., 2018.
but-3-en-2-on	685 ^d		+ ^e	83	Lima i sur., 2016.
butan-2-on	696 ^d		- ^e		Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Khalid i sur., 2015; Mochalski i sur., 2016; Silva i sur., 2012.
pentan-2-on	709 ^d	686	29,4	101	Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Hanai i sur., 2012; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Khalid i sur., 2015; Mochalski i sur., 2016; Silva i sur., 2012.
pent-3-en-2-on	716 ^e		+ ^f		Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Khalid i sur., 2015.
4-metilpentan-2-on	756 ^d	749	26,4	116	Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012.
3-metilpentan-2-on	763 ^d		+ ^e		Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015.
heksan-3-on	786 ^e	784	6.8	123	Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017; Mochalski i sur., 2016.
heksan-2-on		std ^f	+ ^f		Khalid i sur., 2015; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Mochalski i sur., 2016.
3-metilciklopentan-1-on	844	845	5,2	145	Bouatra i sur., 2013.
heptan-4-on	870	869	8.1	147	Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Cozzolino i sur., 2017; Arasradnam i sur., 2014; Mochalski i sur., 2016.
heptan-2-on		std ^f	6.6	151	Silva i sur., 2012; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Cozzolino i sur., 2017; Mochalski i sur., 2016.
2-metilciklopent-2-en-1-on	905		+ ^e		Cozzolino i sur., 2017.
1-(furan-2-il)etanon	910	914	7,1	173	Silva i sur., 2012.
hept-3-en-2-on	937		12,1		Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017.
3-metilheptan-2-on	943	937	8,2	158	Khalid i sur., 2015.

Nastavak: a) Identificirani ketoni.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
KETONI					
3-etilciklopentan-1-on	956		6,7		Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017.
oktan-2-on	990		- ^e		Khalid i sur., 2015; Lima i sur., 2016; Bouatra i sur., 2013.
2,2,6-trimetilcikloheksan-1-on	1026	1023	15,8	177	Silva i sur., 2012, Khalid i sur., 2015.
5-metil-5-vinildihidro-2(3H)-furanon	1040	1041	13,3		Khalid i sur., 2015.
5-etildihidro(3H)furan-2-on	1054	1056	50,9	219	-
3-metilcikloheks-2-en-1-on	1061		12	199	Khalid i sur., 2015.
1-feniletanon	1065		+ ^e		Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017.
5-etil-5-metildihidro(3H)furan-2-on	1097	1090	13,1		-
3,5,5-trimetilcikloheks-2-en-1-on	1124	1124	8,9		Khalid i sur., 2015; Hanai i sur., 2014; Cozzolino i sur., 2017; Bouatra i sur., 2013.
1-(4-metilcikloheks-3-enil)etanon	1133	1131	12,4		Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017.
1-(4-metilfenil)etanon	1185	1183	15,4	226	Silva i sur., 2012.
2,6,6-trimetilciklohepta-2,4-dien-1-on	1223		+ ^e		Bouatra i sur., 2013.
5-izopropenil-2-metilcikloheks-2-en-1-on	1246	1243	8,1		Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017.
2-metil-5-izopropenilcikloheks-2-en-1-on	1257	1253	9,1		Khalid i sur., 2015.
1-(2,6,6-trimetilcikloheksa-1,3-dien-1-il) -2-buten-1-on	1391	1388	12		Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017.
2,6-di(tert-butil)cikloheksa-2,5-dien-1,4-dion	1476	1485	16,7		Zhang i sur., 2012

b) Identificirani heterociklički spojevi.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
HETEROCIKLI					
furan	670 ^d		20,5	67	Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Hanai i sur., 2014; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Khalid i sur., 2015; Mochalski i sur., 2016; Silva i sur., 2012.
metilfuran*	std ^f		25,4	66	Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Khalid i sur., 2015; Mochalski i sur., 2016; Silva i sur., 2012.
tiofen	713 ^d		+ ^e		Bouatra i sur., 2013.
2-etilfuran	728 ^d		+ ^e		Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015.
2,5-dimetilfuran	std ^f		17,4	94	Bouatra i sur., 2013; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012.
2,4-dimetilfuran	736 ^d	735	17	94	de Lacy Costello i sur., 2014
pirazin	750 ^d		- ^e		Bouatra i sur., 2013.
metilpirol*	752 ^d		- ^e		Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Khalid i sur., 2015; Lima i sur., 2016.
pirol	765 ^d	758	12,8	131	Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Lima i sur., 2018; Cozzolino i sur., 2017.
2-etil-5-metilfuran	803	800	10,2	117	de Lacy Costello i sur., 2014.
2,3,5-trimetilfuran	815	815	8,7	122	Cozzolino i sur., 2017.
(2-hidroksimetil)furan	856		+ ^e		Bouatra i sur., 2013; Silva i sur., 2012; Cozzolino i sur., 2017.
izotiocijanatciklopropan	881		- ^e		Bouatra i sur., 2013.
dimetiltiofen*	903	908	8,3	145	Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015.
dimetilpirazin*	917	912	52,5	154	Cozzolino i sur., 2017; Bouatra i sur., 2013.
2-metil-5-(metilsulfanil)furan	974		25		Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015.
2-etil-6-metilpirazin	999	1001	19,3		Cozzolino i sur., 2017.
2,2-dimetil-5-[(1E)-1-metil-1-propenil]tetrahidrofuran	1048	1046	14,8		de Lacy Costello i sur., 2014.
2,3-dihidro-1-benzofuran	1221	1219	12,4		Zhang i sur., 2012.
indol	1296	1290	8,6	254	Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Struck-Lewicka i sur., 2015.

c) Identificirani monociklički ugljikovodici.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
MONOCIKLIČKI UGLJIKOVODICI					
benzen	std ^f		+ ^e		Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Song i sur., 2017.
metilbenzen	std ^f		24	111	Bouatra i sur., 2013; Song i sur., 2019; Silva i sur., 2012. Khalid i sur., 2015;
1-etil-5,5-dimetilciklopenta-1,3-dien	863		- ^e		Bouatra i sur., 2013;
dimetilbenzen*	std ^f		9	144	Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012, Jiménez-Pacheco i sur., 2018.
vinilbenzen	std ^f		+ ^e		Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015.
izopropilbenzen	923		+ ^e		-
tert-butilbenzen	std ^f		+ ^e		-
izopropenilbenzen	982		+ ^e		Monteiro i sur., 2017.
1-izopropil-4-metilcikloheks-1-en	983	986	21,7	167	Khalid i sur., 2015.
1,5,5-trimetil-3-metilcikloheks-1-en	993		+ ^e		Khalid i sur., 2015.
4-izopropil-1-metilcikloheksa-1,3-dien	1017		+ ^e		Khalid i sur., 2015., Bouatra i sur., 2013.
1-izopropilmetilbenzen*	1024	1027	7,2	177	Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012, Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Cozzolino i sur., 2017;
4-izopropenil-1-metilcikloheks-1-en	1028	1033	14,8	178	Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012, Monteiro i sur., 2014; Cozzolino i sur., 2017; Bouatra i sur., 2013;
4-izopropil-1-metilcikloheksa-1,5-dien	1059	1064	+ ^e		Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017; Bouatra i sur., 2013;
1-isopropenil-4-metilcikloheks-1-en	1072	1073	+ ^e		Khalid i sur., 2015;
1-izopropenil-4-metilbenzen	1084	1092	10	182	Khalid i sur., 2015; Bouatra i sur., 2013;
4-isopropil-1-metilcikloheks-1-en	1087	1089	10,7	185	Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015;
1,2,3,4-tetrametil benzen	1152	1147	26,9	205	Silva i sur., 2012

d) Identificirani aldehidi.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	<i>t</i> / °C	Literatura ^c
ALDEHIDI					
2-oksopropanal	663 ^d		+ ^e		Monteiro i sur., 2017.
1-metilbutanal*	728 ^d	700	14	92	Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012.
heksanal	std ^f		8	130	Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017; Rocha i sur., 2012.
furan-3-karbaldehid	832	833	24,7	144	Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015;
heptanal	900		+ ^e		Bouatra i sur., 2013;
fenilmetanal	959	949	11,3	179	Khalid i sur., 2015; Cozzolino i sur., 2017;
5-metilfuran-2-karbaldehid	963		+ ^e		Nam i sur., 2009.
feniletanal	1044		+ ^e		-
(4-metilfenil)metanal	1083	1081	30		-
nonanal	1103		- ^e		Silva i sur., 2012; Khalid i sur., 2015; Rocha i sur., 2012;
dimetilbenzaldehyd*	1215		28		Silva i sur., 2012, Jiménez-Pacheco i sur., 2018;
4-izopropilbenzaldehyd	1242	1240	22,3		Silva i sur., 2012, Khalid i sur., 2015;
3-fenil-2-metilprop-2-enal	1292		+ ^e		Silva i sur., 2012,

e) Identificirani alkoholi.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
ALKOHOLI					
2-metilpropan-2-ol	679 ^d	507	20,5	82	-
etanol	std ^f		- ^e		de Lacy Costello i sur., 2014.
fenilmetanol	1056		- ^e		Bouatra i sur., 2013.
1-isopropenil-4-metilcikloheks-1-en	1072	1073	+ ^e		Khalid i sur., 2015.
3,7-dimetiloktan-3-ol	1099	1097	13,5	195	Khalid i sur., 2015.
1,7,7-trimetilbiciklo[2.2.1]hept-5-en-2-ol(biciklički spoj)	1126		+ ^e		Khalid i sur., 2015.
4-isopropil-1-metilcikloheks-3-en-1-ol	1136		+ ^e		Khalid i sur., 2015.
2-izopropil-5-metilcikloheksan-1-ol	1176		+ ^e		Silva i sur., 2012, Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Cozzolino i sur., 2017.
2-(4-metilcikloheks-3-en-1-il)propan-2-ol	1192	1190	12,7		Khalid i sur., 2015; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Cozzolino i sur., 2017; Bouatra i sur., 2013.
(4-izopropilfenil)metanol	1290	1291	20,4		de Lacy Costello i sur., 2014.

f) Identificirani fenoli.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
FENOLI					
fenol	std ^f		28,1		Khalid i sur., 2015; Hanai i sur., 2014; Monteiro i sur., 2014; Silva i sur., 2012, Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Bouatra i sur., 2013.
metilfenol*	std ^f		29,2	191	Bouatra i sur., 2013.
2-metoksifenol	1091		+ ^e		Silva i sur., 2012, Khalid i sur., 2015.
2-izopropil-5-metilfenol	1304	1302	- ^e		Khalid i sur., 2015.
4-etenil-2-metoksifenol	1315	1315	20,4		Silva i sur., 2012.
2-metoksi-4-(prop-2-en-1-il)fenol	1360		+ ^e		Monteiro i sur., 2014; Silva i sur., 2012,.
2,6-ditert-butil-4-metilfenol	1518	1512	27,6	265	-
2,4-ditert-butilfenol	1520		+ ^e		Silva i sur., 2012.

g) Identificirane karboksilne kiseline.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
KARBOKSILNE KISELINE					
etanska kiselina	std ^d		+ ^e		Cozzolino i sur., 2017; Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012; Wu i sur., 2009.
2-metilbutanska kiselina	866		+ ^e		Silva i sur., 2012.
benzenkarboksilna kiselina	1182	1178	29,1		de Lacy Costello i sur., 2014.
oktanska kiselina	1189	1191	10,7		Silva i sur., 2012, Jiménez-Pacheco i sur., 2018.
feniletanska kiselina	1253		+ ^e		Wu i sur., 2009.

h) Identificirani kondenzirani policiklički ugljikovodici.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
KONDENZIRANI POLICIKLIČKI UGLJIKOVODICI					
1,5,7-trimetil-1,2,3,4-tetrahidro naftalen	1213		15,4		Monteiro i sur., 2014; Silva i sur., 2012.
1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen	1357	1355	16,7		Bouatra i sur., 2013; Monteiro i sur., 2014; Silva i sur., 2012.
1,4,5-trimetilnaftalen	1571		- ^e		Silva i sur., 2012.

i) Identificirani sulfidi.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
SULFIDI					
(metildisulfanil)metan	std ^f		6,9	109	Khalid i sur., 2015.
3-(metildisulfanil) prop-1-en	915		+ ^e		-
(metiltrisulfanil)metan	967	963	11,5		Khalid i sur., 2015.

j) Identificirani ostali spojevi.

Pretpostavljeni identitet	RI ^a	RI NIST ^b	Stabilnost / %	t / °C	Literatura ^c
OSTALI					
metantiol	665 ^d	464	18,3	6	Cozzolino i sur., 2017; Jiménez-Pacheco i sur., 2018; Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012.
dimetilamin	666 ^d	426	15,4	7	Bouatra i sur., 2013; Cozzolino i sur., 2017; Lima i sur., 2016.
3-metilbut-1-in	674 ^d		+ ^e		Bouatra i sur., 2013.
triklormetan	692 ^d		+ ^e		Bouatra i sur., 2013.
etil-etanoat	std ^f		23,4	77	Bouatra i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Silva i sur., 2012.
3-izotiocijanatoprop-1-en	884		- ^e		Khalid i sur., 2015; Arasaradnam i sur., 2014.
2,6,6-trimetilbiciklo[3.1.1]heptan	945		11,8	167	-
1-izopropil-4-metil-7-oksabiklo [2.2.1]heptan	1016	1016	13,3		de Lacy Costello i sur., 2014;
dodekan	1199		+ ^e		Khalid i sur., 2015; Rocha i sur., 2012.
diizobutil-benzen-1,2-dikarboksilat	1870	1872	33,1	320	Zhang i sur., 2012.
dibutil-benzen-1,2-dikarboksilat	1964	1970	34,6		Jiménez-Pacheco i sur., 2018

*nepoznati izomer

a – indeks zadržavanja izračunat sustavom AMDIS

b – indeks zadržavanja u knjižnici NIST

c – literaturni izvori u kojima su detektirani identificirani metaboliti

d – indeks zadržavanja izračunat okvirno uz pomoć indeksa zadržavanja heksana

e – stabilnost kroz četiri sata nakon odležavanja na 4 °C.

Metaboliti koji se nisu pokazali stabilnima pri navedenim uvjetima isključeni su iz daljnjih analiza i označeni su sa „-“

f – identitet metabolita potvrđen standardom.

6. RASPRAVA

Rak je vrlo kompleksna bolest povezana s brojnim promjenama u organizmu koje se mogu pratiti na razini gena, proteina ili metabolita. Razvoj novih metoda i tehnologija svojim širim pristupom i integracijom velikog broja podataka omogućuje sveobuhvatniji uvid u fiziološka i patološka zbivanja u organizmu te omogućava bolje razumijevanje nastalih promjena. Promjene u metabolizmu stanica mogu se pratiti analizom metabolita u biološkim uzorcima ispitanika.

Tumor testisa najčešće je maligno oboljenje u muškaraca mlađe životne dobi i najčešći je uzrok smrti od solidnih tumora u toj dobi. Posljednjih desetljeća njegova pojavnost raste te se očekuje da će broj novooboljelih i umrlih i dalje rasti (Le Cornet i sur., 2014). Heterogenost samog tumora koji može biti miješane histološke građe komplicira klinička istraživanja usmjerena na pronalaženje čimbenika rizika i razumijevanje mehanizama njegova nastanka. Uz to, postojeći tumorski biljezi nisu dovoljno specifični što otežava praćenje bolesnika od dijagnoze do izlječenja ili recidiva. Izostanak specifičnog biljega koji bi omogućio ranu dijagnostiku, razlikovanje histološkog tipa tumora, identifikaciju pacijenata koji mogu imati koristi od adjuvantne terapije, usmjeravanje izbora kemoterapije i praćenje odgovora na terapiju kao i predviđanje recidiva upućuje na nužnost provođenja daljnjih istraživanja u cilju pronalaska novih bioloških biljega (Baselga i sur., 2015).

U tom smislu, metabolomički pristup ima veliki dijagnostički i prognostički potencijal jer pruža informacije o velikom broju metabolita. Novija istraživanja sugeriraju da je usporedbom metabolomičkih profila u zdrave i oboljele osobe, odnosno u oboljele osobe prije i nakon terapije, uz primjenu složenih statističkih analiza, moguće identificirati nove kandidate, potencijalne nove biljege kao indikatore razvoja i tijeka bolesti ili učinka terapije (Holmes i sur., 2008; Wang i sur., 2018).

Korištenjem metabolomičkog pristupa ciljane i ne-ciljane analize, u okviru ovog istraživanja kreiran je kvantitativni profil aminokiselina i elemenata u urinu, te su određeni parametri oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u uzorcima krvi. Primjenom ne-ciljanog pristupa kreiran je kvalitativni profil hlapljivih metabolita u urinu.

6.1. Ciljane analize

Usporedba rezultata u ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika

U ovom dijelu istraživanja ispitana je razlika u koncentraciji aminokiselina i elemenata u urinu te parametara oksidacijskog stresa i antioksidacijske obrane u uzorcima krvi između ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika. Rezultati su pokazali značajnu razliku u koncentracijama treonina, serina, asparaginske kiseline i histidina, mangana, kobalta i cinka, te superoksid dismutaze, glutationa i ukupnog oksidacijskog statusa.

Metabolički put stanice sastoji se od mreže proteina, gena i reakcija metabolita kontroliranih složenim regulatornim strukturama. Poremećaj u tim mrežama u stanicama raka rezultira nekontroliranim rastom i proliferacijom. Stanice raka izazivaju reprogramiranje metaboličkih putova, uključujući metabolizme aminokiselina, šećera i masnih kiselina u cilju namirivanja potrebe za energijom te sintezom proteina i nukleinskih kiselina (Hiller i Metallo, 2013; Cala i sur., 2018). U svrhu identifikacije novih metaboličkih biljega, nekoliko je autora identificiralo pojedine aminokiseline kao potencijalne kandidate s dijagnostičkom i/ili prognostičkom vrijednošću kod različitih oboljenja (Miyagi i sur., 2011; Gu i sur., 2015).

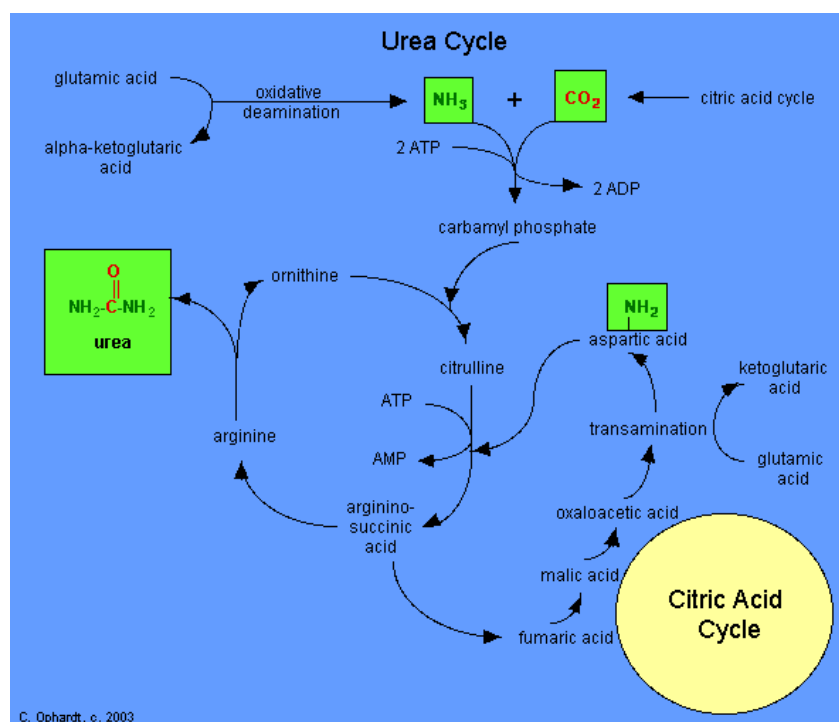
U ovom istraživanju kreiran je profil s 30 slobodnih aminokiselina čije su koncentracije izmjerene u urinu primjenom plinske kromatografije uz spektrometriju masa te je ispitan njihov potencijal u razlikovanju promatranih skupina ispitanika. Primjenom univarijantne statističke analize uspoređene su vrijednosti koncentracija pojedinačnih aminokiselina u urinu oboljelih od tumora testisa u odnosu na kontrolne ispitanike. Uočene su značajno više koncentracije asparaginske kiseline te značajno niže koncentracije treonina, serina i histidina. Drugi autori nisu uspoređivali koncentracije aminokiselina u ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike pa su rezultati ovog istraživanja komentirani u odnosu na literaturne podatke dobivene u ispitanika s drugim vrstama raka. Pri tome je većina istraživača određivala koncentracije aminokiselina u plazmi, dok je istraživanja o aminokiselinama u urinu oboljelih od raka malo. Nekoliko je autora ustanovilo značajne razlike u profilu aminokiselina u ispitanika oboljelih od raka prostate. Heger i sur. (2014) su uočili značajno povišenje koncentracija asparaginske kiseline, ali i treonina, prolina, metionina, izoleucina, leucina, tirozina, arginina i sarkozina. Autori osobito ističu značajnost nalaza dobivenog za povišeni sarkozin i prolin budući da te aminokiseline nisu nađene u kontrolnih ispitanika. Štoviše, predlažu uključivanje analiza tih dviju aminokiselina u urinu, uz prostatni specifični antigen (PSA) i mokraćnu kiselinu, u dijagnostičke pretrage za rak prostate. Duskova i sur.

(2018) su proveli analizu aminokiselina u urinu ispitanika oboljelih od uroloških tumora (prostata, mjehur, bubreg). U ispitanika s rakom prostate pronađene su značajno snižene koncentracije histidina, a u ispitanika s rakom bubrega značajno snižene koncentracije treonina i serina u odnosu na kontrolu. Koncentraciju asparaginske kiseline nisu mjerene. U studiji su još pronađene značajno povišene koncentracije sarkozina te prolina i alanina u ispitanika s rakom prostate. Kod ispitanika s rakom mjehura, pronađene su značajno povišene koncentracije metionina, leucina i fenilalanina te značajno snižene koncentracije asparagina, prolina i arginina, a kod ispitanika s rakom bubrega, značajno povišene koncentracije sarkozina i fenilalanina te značajno snižene koncentracije asparagina, glutaminske kiseline, glicina, tirozina i arginina. Za razliku od prethodne dvije grupe autora (Heger i sur., 2014; Duskova i sur., 2018) koji su uočili značajno povišeni sarkozin u ispitanika s rakom prostate, Dereziński i sur. (2017) odbacili su sarkozin kao biljeg raka prostate jer se njegova koncentracija u pacijenata nije razlikovala od koncentracije u kontrolnih ispitanika. U sveobuhvatnoj analizi koja je uključivala 42 proteogene i neproteogene aminokiseline, nađene su snižene koncentracije serina i histidina u urinu što je u skladu s našim rezultatima, ali asparaginska kiselina i treonin u njihovom istraživanju nisu bili statistički značajno različiti u odnosu na kontrolne ispitanike. U njihovoj studiji su još arginin, asparagin, cistationin, cistin, glutaminska kiselina, glutamin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, ornitin, fenilalanin, triptofan, tirozin i α -aminoadipinska kiselina bile značajno snižene u oboljelih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike. U istoj studiji izmjerene su i koncentracije aminokiselina u serumu te su koncentracije histidina bile snižene, a koncentracije asparaginske kiseline povišene u oboljelih ispitanika, dok se koncentracije serina i treonina nisu značajno razlikovale između ove dvije skupine ispitanika. Autori smatraju da etanolamin i arginin te osobito aminokiseline razgranatih lanaca (engl. *branched-chain amino acids*, BCAA), tj. leucin, izoleucin i valin, zaslužuju posebnu pažnju u daljnjim istraživanjima potencijalnih biljega za rak prostate. Chen i sur. (2016) su proveli metabolomičku analizu u urinu oboljelih od raka želuca. Izmjerene su povišene koncentracije serina i treonina u urinu, dok asparaginska kiselina i histidin nisu bili statistički značajno različiti u odnosu na kontrolne ispitanike. U njihovoj studiji su još alanin, glicin, valin, izoleucin, prolin, metionin, tirozin i triptofan bili značajno povišeni u oboljelih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike. Nadalje, Miyagi i sur. (2011) su proveli istraživanje o koncentraciji aminokiselina u krvnoj plazmi oboljelih od raka pluća, želuca, debelog crijeva i dojke. Prema njihovim rezultatima, serin je bio značajno povišen u oboljelih od raka pluća i dojke, histidin značajno snižen u oboljelih od raka pluća, želuca, debelog crijeva i dojke, dok je treonin bio značajno povišen u

oboljelih od raka dojke, a značajno snižen u oboljelih od raka želuca i debelog crijeva. Ni ova grupa autora nije određivala koncentraciju asparaginske kiseline. Osim toga, ispitanici s rakom želuca imali su značajno snižene koncentracije alanina i izoleucina, ispitanici s rakom debelog crijeva snižen ornitin, a koncentracije asparagina, glutamina, valina, metionina, leucina, tirozina, fenilalanina, triptofana, i arginina bile su značajno snižene u obje vrste raka. Wang i sur. (2015) su proveli istraživanje u ispitanika s tumorima probavnog sustava. Analizirali su aminokiseline u krvnoj plazmi te koncentracije serina nisu bile značajno različite dok su leucin, lizin i prolin bili značajno sniženi, a arginin, asparagin, glicin, ornitin, tirozin i valin značajno povišeni. Potrebno je, međutim, naglasiti kako navedeni autori nisu koristili Bonferonijevu korekciju koja bi snizila broj značajno različitih aminokiselina između uspoređivanih skupina ispitanika.

Rezultati gore opisanih radova kao i naši rezultati potvrđuju da u oboljelih od raka dolazi do promjena u metabolizmu aminokiselina. Prema Geck i Toker (2016), sniženje koncentracija aminokiselina upućuje na njihovo iskorištenje od strane tumorskih stanica za proliferaciju. Naime, tumorske stanice pokazuju povećanu brzinu potrošnje hranjivih tvari i preusmjeravanje metaboličkih procesa kako bi potrebne tvari bile uvijek dostupne za *de novo* biosintezu. Iako nakon Bonferonijeve korekcije promjena velikog broja aminokiselina u našem istraživanju više nije bila statistički značajna, uočeno je da su koncentracije većine aminokiselina u urinu ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolu bile snižene, a povišene su bile samo koncentracije aloizoleucina, asparaginske kiseline, glutaminske kiseline i cistationina. No, značajno su se promijenile samo koncentracije asparaginske kiseline, serina, treonina i histidina. Asparaginska kiselina i serin su neesencijalne aminokiseline koje se produciraju u organizmu, dok su treonin i histidin esencijalne kiseline koje organizam ne može sam sintetizirati.

Slika 27 prikazuje ciklus limunske kiseline i ciklus uree. Pri razgradnji aminokiselina nastaju amonijevi ioni koji se troše za biosintezu dušičnih spojeva te se višak pretvara u ureu i izlučuje iz organizma. Urea se sintetizira u ciklusu uree, a fumarat je jedan od međuprodukata tog ciklusa. Nastanak fumarata u ciklusu uree je važan jer povezuje ciklus uree s ciklusom limunske kiseline. U ciklusu limunske kiseline fumarat se hidratizira u malat, on se oksidira u oksaloacetat koji se transaminira u asparaginsku kiselinu (aspartat). Aspartat ulazi u ciklus uree u reakciji s citrulinom gdje nastaje argininosukcinat koji se cijepa na arginin i fumarat (Xie i sur., 2015).



Slika 27. Prikaz ciklusa limunske kiseline i ciklusa uree

(Preuzeto s: <http://chemistry.elmhurst.edu/vchembook/633ureacycle.html> (11.03.2019.))

Birsoy i sur. (2015) smatraju da aspartat ima važnu ulogu u tumorskoj proliferaciji. Autori su proveli istraživanje o ulozi inhibiranog mitohondrijskog puta prijenosa elektrona (ETC) u zaustavljanju proliferacije tumorskih stanica te zašto dodatak piruvata ipak omogućava proliferaciju tumorskih stanica unatoč inhibiranom ETC-u. Uočili su da je esencijalna funkcija ETC-a u proliferaciji omogućavanje sinteze asparaginske kiseline koja je preteča u sintezi purina i pirimidina. Pri inhibiciji ETC-a koncentracije aspartata su ograničene te suplementacija piruvatom omogućava ponovnu sintezu aspartata unatoč inhibiranom ETC-u. Do sličnih zaključaka došli su Sullivan i sur. (2018) koji su u istraživanju u *in vitro* uvjetima zaključili da asparaginska kiselina ima bitnu ulogu u proliferaciji, ali ne svih vrsta tumora.

Asparaginska kiselina ima važnu ulogu i u reproduksijskom zdravlju muškaraca. D-asparaginska kiselina je fiziološka aminokiselina u hipofizi i testisima gdje nastaje iz D-aspartat racemaze koja L-asparaginsku kiselinu prevodi u D-asparaginsku kiselinu (Matsuda i sur., 2015). D-asparaginska kiselina sudjeluje u biosintezi i lučenju spolnih hormona, luteinizirajućeg hormona i testosterona (Topo i sur., 2009). Niže koncentracije D-

asparaginske kiseline nađene su u sjemenoj plazmi i spermijima muškaraca sa smanjenim brojem i smanjenom pokretljivošću spermija (D'Aniello i sur., 2005).

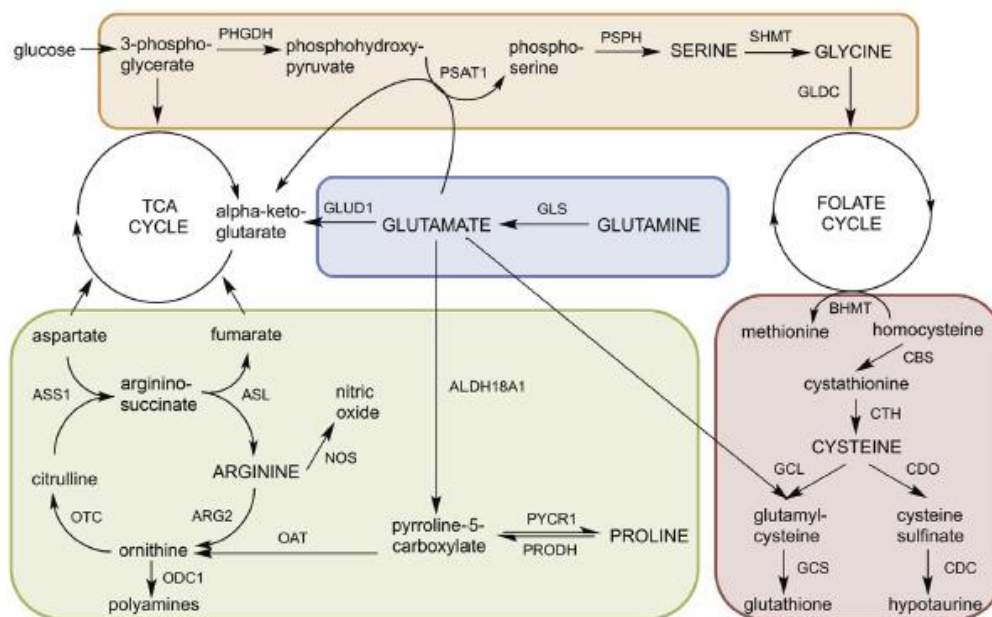
Batool i sur. (2019) su pokazali da i u tkivima tumora testisa dolazi do poremećaja u ciklusu limunske kiseline. Naime, cilj njihovog istraživanja bio je usporediti transkripcijski i metabolomički profil između dva histološka tipa tumora testisa, seminoma i neseminoma, koristeći pri tome podatke za Tcam-2 stanice kao predstavnice seminomskih stanica i NT2 stanice kao predstavnice embrionalnog karcinoma koji pripada grupi neseminomskih tumora. Integrirani rezultati sustavne analize aktivnosti gena i metabolita su pokazali značajnu razliku između te dvije vrste stanica u metabolizmu aminokiselina, masnih kiselina, sfingolipida i nukleotida. U stanicama Tcam-2 uočeno je smanjenje aktivnosti ciklusa limunske kiseline. Autori zaključuju da neseminomske stanice NT2 preferiraju proizvodnju energije reakcijama oksidativne fosforilacije, dok seminomske Tcam-2, kao i ostali solidni tumori, preferiraju fermentaciju glukoze do laktata (Warburgov efekt). U našem istraživanju, usporedbom koncentracija mjerenih aminokiselina u urinu ispitanika sa seminomom i ispitanika s neseminomom nije nađena statistički značajna razlika.

Nadalje, provedena je linearna diskriminantna analiza kako bi se ispitalo razlikuju li se ispitanici s tumorom testisa od kontrolnih ispitanika na temelju ukupnog profila aminokiselina. Uspješnost diskriminacije ispitivanih skupina bila je 86 % te aminokiseline koje su najviše pridonijele razdvajanju ispitivanih skupina bile su treonin, serin i aloizoleucin. Značajan doprinos serina i treonina potvrđen je primjenom univarijantne i multivarijantne statističke analize. Kada je provedena linearna diskriminantna analiza u koju su bile uključene samo aminokiseline koje su se u ranijoj analizi pokazale statistički značajno različite (tj. asparaginska kiselina, treonin, serin i histidin) te aminokiseline koje sudjeluju u metabolizmu tih aminokiselina (alanin, valin, β -aminoizomaslačna kiselina, prolin, glicin, cistationin, glutaminska kiselina, glutamin, tirozin, asparagin i sarkozin), uspješnost diskriminacije ispitivanih skupina se smanjila i iznosila je 65 %. U tom modelu aminokiseline koje su najviše pridonijele razdvajanju ispitivanih skupina bile su alanin, treonin, serin, histidin i tirozin. Rezultati su pokazali da cjelokupni profil aminokiselina uspješnije razdvaja ispitivane skupine nego kada se razmatraju samo pojedine aminokiseline.

Kako bi se ispitalo na promjenu kojeg metabolizma utječu asparaginska kiselina, treonin, serin, histidin i aloizoleucin, aminokiseline koje su se pokazale značajne u našim prethodnim modelima, korišten je računalni sustav MetaboAnalyst. Rezultati su pokazali da kombinacija navedenih aminokiselina ima najznačajnije uloge u metabolizmu glicina, serina i treonina te u

metabolizmu alanina, aspartata i glutaminske kiseline. Metabolički putovi serina i glicina prikazani su na slici 28. Serin se sintetizira iz međuprodukta glikolize 3-fosfoglicerata te se glicin sintetizira iz serina. Reakcija pretvorbe serina u glicin je glavni izvor C_1 -jedinica koje se vežu na tetrahidrofolat čime nastaje N^5,N^{10} -metilentetrahidrofolat. Derivati tetrahidrofolata služe kao donori C_1 -jedinica pri različitim biosintezama koje koriste i stanice raka za sintezu proteina, nukleinskih kiselina, lipida i kofaktora. Glicin i serin su uključeni i u sintezu antioksidansa (Amelio i sur., 2014; Ananieva, 2015; Geck i Toker, 2016). Naši rezultati su sukladni rezultatima studije Chen i sur. (2016) koji su proveli metabolomičku analizu u urinu oboljelih od raka želuca. Nakon provedene analize ispitano je na metabolizam kojih aminokiselina utječu metaboliti za koje je nađena značajna promjena u oboljelih ispitanika. Pokazalo se da promjene u metabolizmu glicina, serina i treonina imaju najveći značaj.

Od svih aminokiselina stanice raka najviše koriste glutamin. Koriste ga za biosintezu nukleotida i lipida te za sintezu glutaminske kiseline (glutaminoliza) koja se može konvertirati u α -ketoglutarat. α -ketoglutarat sudjeluje u ciklusu limunske kiseline kojom se proizvodi energija. Stanice raka iskorištavaju glutaminolizu za proizvodnju α -ketoglutarata potrebnog za ciklus limunske kiseline kako bi mogle iskoristiti piruvat za sintezu laktata (Erickson i Cerione, 2010). Metabolizam stanica raka se oslanja na aerobnu glikolizu i katabolizam glutamina u svom rastu (Mishra i Ambs, 2015). Promjene u ovim metaboličkim putovima mogu biti potencijalne terapijske mete kod liječenja raka (Geck i Toker, 2016).

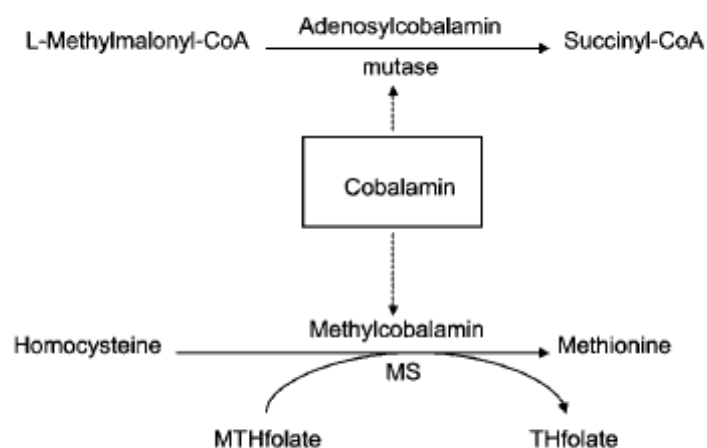


Slika 28. Prikaz metaboličkih putova neesencijalnih aminokiselina. Narančasto: metabolizam serina i glicina; plavo: metabolizam glutamina i glutaminske kiseline; zeleno: metabolizam arginina i prolina; crveno: metabolizam cisteina. (Preuzeto iz: Geck i Toker, 2016)

Čovjek je svakodnevno i neizbježno izložen brojnim elementima koje najčešće zrakom, vodom i hranom unosi u svoj organizam. Mnogi od njih imaju važnu fiziološku funkciju u organizmu, kao neophodne komponente proteina, uključujući enzime, proteine za skladištenje i prijenos te transkripcijske faktore ili kao njihove strukturne komponente. Smatra se da elementi, uglavnom Cu, Fe, Zn ili Mo, pridonose optimalnom funkcioniranju oko trećine svih proteina u organizmu (Mounicou i sur., 2009). Nedovoljan unos pojedinih elemenata kao i njihova prisutnost u većim koncentracijama može uzrokovati ozbiljan poremećaj homeostaze u organizmu što može dovesti do razvoja raznih zdravstvenih poremećaja i bolesti (Zitka i sur., 2012). U ovom istraživanju provedena je ciljana analiza 21 elementa u urinu ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika kako bi se definirao njihov status u odnosu na prisutnu patologiju. Primjenom univarijantne statističke analize uspoređene su vrijednosti koncentracija pojedinačnih elemenata u urinu između grupa ispitanika te su uočene značajno više koncentracije Mn i Zn te značajno niža koncentracija Co. U dostupnoj literaturi nađen je samo jedan rad o vrijednostima koncentracija elemenata u ispitanika s tumorom testisa i to u serumu (Kaba i sur., 2015). Ti rezultati multielementne analize su pokazali značajno više vrijednosti Co, Cu, Mg i Pb te značajno niže vrijednosti Zn, Fe i Mn u oboljelih ispitanika u

odnosu na kontrolne ispitanike. Podataka o vrijednostima koncentracija elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa nema. Nekoliko je istraživača provelo multielementne analize u različitim tjelesnim tekućinama ispitanika oboljelih od raka. Ispitanice s rakom dojke imale su značajno više vrijednosti koncentracija Pb i Cu u urinu nego kontrolne ispitanice, dok se vrijednosti Zn, Co i ostalih osamnaest elemenata nisu značajno razlikovale između uspoređenih skupina ispitanica (Burton i sur., 2016). Callejón-Leblic i suradnici (2018) odredili su koncentracije elemenata u serumu, urinu i bronhoalveolarnoj tekućini pacijenata s rakom pluća. Uočili su značajno niže koncentracije Co te značajno više koncentracije Fe i Cd u urinu oboljelih ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike dok se koncentracije Mn i Zn i ostalih šest elemenata nisu značajno razlikovale između skupina. Mao i Huang (2013) su proveli sistemski pregled i meta analizu studija koje su provele istraživanje o razinama Cu i Zn u serumu i urinu oboljelih od raka mjehura te su zaključili da su značajno više koncentracije Cu u serumu i Zn u urinu te značajno niže koncentracije Zn u serumu u odnosu na kontrolne ispitanike.

Co je neophodna komponenta kobalamina (vitamina B12) i igra vrlo važnu ulogu u formiranju aminokiselina i proteina u živčanim stanicama (Blom i sur., 2007; Czarnek i sur., 2015). Kobalaminski enzimi kataliziraju reakciju pregradnje L-metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA (5'-deoksiadenozilkobalamin, koenzim metilmalonil-CoA-mutaze) koji ulazi u ciklus limunske kiseline i metiliranja kod regeneracije metionina prijenosom metilne skupine s N⁵-metiltetrahidrofolata na homocistein (metilkobalamin, koenzim homocistein-metiltransferaze). Povišene vrijednosti koncentracija kobalamina u plazmi se povezuju s povećanom incidencijom raka (Arendt i sur., 2013; Ryg i sur., 2013). Slika 29 shematski prikazuje ulogu kobalamina u metabolizmu metilmalonil-CoA i homocisteina.



Slika 29. Uloga kobalamina u metabolizmu. (Preuzeto iz: Blom i sur., 2007)

Zn je jedan od najzastupljenijih mikroelemenata u ljudskom tijelu te je prisutan u svim tkivima i tjelesnim tekućinama gdje ima važnu katalitičku, strukturnu i regulatornu funkciju. Sastavni je dio brojnih proteina, transkripcijskih faktora, hormona, hormonskih receptora te neuropeptida. Ima važnu ulogu u ekspresiji gena. Neophodan je za katalitičku aktivnost tristotinjak enzima, posebno onih koji sudjeluju u sintezi proteina i nukleinskih kiselina (Shenkin, 2008) te popravku DNK i RNK (Laity i sur., 2001). Ima važnu ulogu u sintezi testosterona i sekreciji Leydigovih stanica kao i regulaciji estrogena (Wong i sur., 2000).

Mn ima ključnu ulogu u mnogim staničnim procesima, uključujući metabolizam lipida, proteina i ugljikohidrata. Pridonosi zaštiti od oksidacijskog stresa, djeluje kao ko-faktor u aktivnim centrima različitih enzima, te je potreban za normalan razvoj, održavanje funkcija živaca i imunoloških stanica, te regulaciju šećera u krvi i vitamina (O'Neal i Zheng, 2015). Sastavni je dio enzima arginaze uključenih u sintezu uree (Ash, 2004; Bichell i sur., 2017) te metabolizam piruvata (Chen, 2018).

Zn i Mn također sudjeluju u antioksidacijskoj zaštiti u organizmu te su uključeni u djelovanje enzima SOD. U organizmu čovjeka, prisutna su tri izoenzimska oblika SOD-a: bakar, cink-ovisna SOD (CuZnSOD), mangan-ovisna SOD (MnSOD) i vanstanična SOD (ECSOD). Sva tri izoenzima imaju funkciju dismutacije superoksidnog aniona, ali se razlikuju po strukturi, svojstvima, lokaciji unutar stanice i distribuciji u tkivima, te mehanizmima koji utječu na njihovu ekspresiju (Valko i sur., 2006).

Brojna istraživanja povezuju dugotrajan i prekomjeran oksidacijski stres s velikim brojem zdravstvenih poremećaja i oboljenja, uključujući rak. Do oksidacijskog stresa dolazi zbog

prekomjernog stvaranja i nakupljanja pro-oksidansa ili smanjene sposobnosti antioksidacijske obrane organizma, što dovodi do pomaka oksidacijsko-redukcijske ravnoteže. Rezultati naših istraživanja pokazali su statistički značajne promjene u aktivnostima SOD-a, GPx-a i GSH u naših ispitanika što ukazuje na poremećaj ravnoteže oksidacijsko-redukcijskog sustava. Aktivnost SOD-a bila je statistički značajno viša, a koncentracija GSH značajno niža u ispitanika s tumorom testisa nego u kontrolnih ispitanika, dok se aktivnost GPx-a nije značajno promijenila. Rezultati našeg istraživanja u skladu su s rezultatima Battisti i sur. (2011) koji su uočili značajno višu aktivnost SOD-a te Surapaneni i Venkata (2006) koji su također uočili značajno višu aktivnost SOD-a te značajno niže koncentracije GSH u oboljelih od raka prostate u odnosu na kontrolne ispitanike. Suprotno tome, Iynem i sur. (2004) Yilmaz i sur. (2004), Aydin i sur. (2006) Yossepowitch i sur (2007), Arsova-Saradinovska i sur. (2009) uočili su značajno sniženje aktivnosti SOD-a i GPx-a u oboljelih od raka prostate u odnosu na kontrolu. Akinloye i sur. (2009) te Srivastava i Mittal (2005) uočili su značajno snižene koncentracije GSH u oboljelih od raka prostate u odnosu na kontrolu što je u skladu s našim rezultatima.

SOD je prvi enzim antioksidacijske obrane i katalizira dismutaciju superoksidnog radikala na molekulu kisika (oksidacija) i vodikov peroksid (redukcija). Nastali vodikov peroksid se dalje reducira u reakciji koju katalizira GPx u prisutnosti GSH. GPx uz to katalizira i lipidne hidroperokside u odgovarajuće aldehide. Naši rezultati ukazuju na postojanje reaktivnih vrsta u ispitanika s rakom testisa koji su aktivirali antioksidacijski sustav rezultirajući povišenjem aktivnosti SOD-a. Značajno niže koncentracije GSH u ispitanika s tumorom u odnosu na kontrolu mogu ukazivati na trošenje GSH u reakciji s reaktivnim vrstama što međutim nije pridonijelo značajnoj promjeni aktivnosti GPx-a. Budući da slobodni radikali i reaktivni spojevi pridonose ukupnom oksidacijskom statusu organizma, očekivali smo značajno više vrijednosti TOS-a u ispitanika s tumorom testisa. Naime, smatra se da prisutnost tumora inducira povećanu produkciju reaktivnih vrsta iako nije poznato uolikoj mjeri. Međutim, naši ispitanici s tumorom testisa imali su statistički značajno niže vrijednosti TOS-a u odnosu na kontrolu, a TAC se nije značajno promijenio. Suprotno našim rezultatima, Huang i sur. (2017) su uočili statistički značajno više vrijednosti TOS-a u ispitanika s rakom jednjaka u odnosu na kontrolne ispitanike, dok Buico i sur. (2009) nisu uočili razlike u vrijednostima TOS-a između ispitanika s leukemijom i kontrolnih ispitanika.

Rezultati ovog dijela istraživanja upućuju na postojanje promjena u ispitanika s tumorom testisa, najvjerojatnije u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree. U idealnom slučaju, tumorski biološki biljeg trebao bi odražavati promjene nastale uslijed razvoja tumora i kasnije

se povećavati s daljnjom progresijom i širenjem bolesti, snižavati se u odgovoru na liječenje te se s vremenom normalizirati. U našem prethodnom istraživanju traženja potencijalnog novog biljega tumora testisa istraživali smo ulogu metalotioneina. Istraživanje je bilo potaknuto rezultatima drugih autora koji su zbog pojačane sinteze metalotioneina u brzo proliferirajućim tkivima sugerirali njegovu ključnu ulogu u razlikovanju zdrave od tumorske stanice. U našem istraživanju (Tariba i sur., 2016) uočen je potencijal metalotioneina s obzirom na razlikovanje histološkog tipa (seminoma vs neseminoma) te porast koncentracije u serumu s porastom stadija tumora. Međutim, rezultati istraživanja unutar ovog doktorskog rada nisu pokazali značajno razlikovanje pojedinih metabolita unutar profila aminokiselina odnosno elemenata u urinu između seminoma i neseminoma odnosno s obzirom na porast stadija tumora. Mogući razlog tome je nedostatak statističke snage testa zbog malog broja ispitanika unutar podskupina i dodatne Bonferonijeve korekcija korištene zbog velikog broja promatranih varijabli koja je pooštrila kriterij za značajnost razlike između (pod)skupina ispitanika. No, dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj daljnjih istraživanja o ulozi međuprodukata gore navedenih ciklusa u tumorigenezi i eventualnom otkrivanju novih bioloških biljega tumora testisa.

Utjecaj kemoterapije bleomicinom, etopozidom i cisplatinom (BEP) na mjerene parametre

Citostatici na bazi platine se koriste za liječenje brojnih vrsta raka uključujući rak mjehura, glave, vrata, pluća, jajnika i testisa. U našem istraživanju pri liječenju tumora testisa koristio se koktel lijekova sastavljen od bleomicina, etopozida i cisplatine. Uzorci krvi i urina uzorkovani su nakon drugog ciklusa kemoterapije na redovnom pregledu.

Jedan od glavnih neželjenih učinaka cisplatine je njena nefrotoksičnost (Yao i sur., 2007; Dasari i Tchounwou, 2014). Pt se nakon unosa raspodjeljuje u tjelesnim tekućinama i tkivima te tri sata nakon infuzije lijek dostiže svoju maksimalnu koncentraciju u bubrežima, a nakon četrdeset sati u ostalim tkivima, uključujući testise. Cisplatina i njeni metaboliti se vežu za proteine tkiva i plazme, a samo oko 10 % ostaje aktivno u nevezanom obliku (Weiner i Jacobs, 1983). Glavni put izlučivanja cisplatine je bubreg. Koncentracija cisplatine u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića je oko pet puta viša nego u serumu pa nakupljanje cisplatine u bubregu pridonosi oštećenju bubrega (Yao i sur., 2007). Kao posljedica oštećenja bubrežnih kanalića nastaje bubrežna insuficijencija koju karakterizira smanjeni protok krvi kroz bubreg, porast vaskularnog otpora uz porast koncentracije kreatinina i ureje u krvi. Posljedica toga je hipomagnezijemija, a mogu nastati hiponatremija, hipokalcemija i

hipokalijemija. Nastale promjene u glomerularnoj filtraciji pridonose povišenom izlučivanju proteina, glukoze, aminokiselina te metabolita TCA ciklusa, a remeti se i izlučivanje elemenata urinom.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju značajan porast koncentracija 26 od 30 aminokiselina u urinu nakon primijenjene kemoterapije. Povišene aminokiseline su alanin, glicin, valin, leucin, izoleucin, treonin, serin, prolin, asparagin, asparaginska kiselina, metionin, glutaminska kiselina, fenilalanin, glutamin, ornitin, lizin, histidin, tirozin, triptofan, sarkozin, α -aminomaslačna kiselina, tioprolin, α -aminoadipinska kiselina, α -aminopimelna kiselina, glicil-prolin i cistin. Kod stanica raka dolazi do reprogramiranja metabolizma, pa se glukoza više ne koristi da bi se povećala proizvodnja ATP-a kao kod normalnih stanica, nego se koristi da bi se maksimizirala proizvodnja makromolekula potrebnih za replikaciju DNK (Warburg, 1956). Nekontrolirana proliferacija je osnovno svojstvo tumorskih stanica koje trebaju dovoljnu količinu nukleotida potrebnih za sintezu DNK. Npr. za sintezu purinskog prstena purinskih nukleotida potrebni su glicin, asparaginska kiselina i glutamin kao donori ugljikovih i dušikovih atoma (Moffatt i Ashihara, 2002). Primjenom citostatika inhibira se transkripcija i replikacija DNK što posljedično uzrokuje apoptozu tumorskih stanica, tj. zaustavlja se proliferacija (Oun i sur., 2018). Moguće je da, aminokiseline koje su se producirale u cilju sinteze DNK tj. proliferacije, više nisu potrebne u organizmu te se izlučuju urinom.

Yu i sur. (2013) su proveli istraživanje o koncentracijama organskih kiselina i aminokiselina u urinu ispitanica s rakom dojke te o utjecaju kemoterapije na njihove koncentracije. Ispitanice su nakon kemoterapije podijeljene u dvije grupe, ispitanice osjetljive na kemoterapiju i ispitanice otporne na kemoterapiju kod kojih je tumor stagnirao ili je narastao. U urinu ispitanica osjetljivih na kemoterapiju uočene su snižene koncentracije glicina, histidina, triptofana, cisteina i cistina, dok kod ispitanica otpornih na kemoterapiju koncentracije aminokiselina se nisu značajno promijenile u odnosu na koncentracije prije kemoterapije. Treba uzeti u obzir da je u istraživanju sudjelovala samo 21 ispitanica s rakom dojke, te su one podijeljene u dvije grupe, osjetljive na kemoterapiju (N=8) i otporne na kemoterapiju (N=13).

Wang i sur. (2015) su proveli istraživanje o koncentracijama aminokiselina u krvnoj plazmi u ispitanika s rakom želuca te su pratili koncentracije aminokiselina nakon primijenjene kemoterapije. Pokazali su da su 1. i 14. dan nakon kemoterapije koncentracije arginina,

glutamina, metionina, prolina, tirozina i valina značajno snižene što se slaže s našim rezultatima.

Uvođenje cisplatine u široku kliničku uporabu dovelo je do značajnog napretka u kemoterapijskom liječenju, unatoč posljedicama poput nefrotoksičnosti, ototoksičnosti, neurotoksičnosti i mijelosupresije te mogućeg razvoja rezistencije na terapiju (Dasari i Tchounwou, 2014). U ovom istraživanju pratili smo koncentracije elemenata u urinu nakon primljene kemoterapije. Koncentracije Na, Mg, Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Se, Cd, Sn, Pt, Hg i Pb su bile značajno povišene u urinu nakon primijenjene kemoterapije. Kako terapija sadrži lijek na bazi Pt, koncentracija Pt u urinu nakon primljene kemoterapije bila je očekivano višestruko povišena. Medijan vrijednosti koncentracije Pt u urinu ispitanika s tumorom testisa nakon kemoterapije iznosio je 2869 $\mu\text{g/g}$ kreatinina dok je prije kemoterapije iznosio 0,010 $\mu\text{g/g}$ kreatinina. Prijašnje studije na eksperimentalnim modelima laboratorijskih životinja pokazale su da primjena citostatika na bazi Pt narušava homeostazu Ca (Aggarwal, 1993) i Mg (Lajer i sur., 2005). Istraživanja u ljudi su također pokazala da terapija na bazi cisplatine utječe na koncentracije elemenata u tjelesnim tekućinama. Snižene koncentracije esencijalnih elemenata (Zn, Fe, Cu i Mn) izmjerene su u serumu ispitanika s rakom jednjaka (Akutsu i sur., 2012) te Se u krvnoj plazmi ispitanika s tumorom testisa (Vernie i sur., 1988) nakon primljene kemoterapije. Rezultati istraživanja Román i sur. (2012) u skupini ispitanika s različitim tumorima navode na zaključak kako kod tretmana cisplatinom raste izlučivanje Se putem urina. Koncentracije Fe u plazmi u četiri ispitanika s rakom jednjaka i dva ispitanika s rakom pluća bile su 3,5 puta više, a Zn u serumu 1,8 puta više nakon tretmana cisplatinom nego prije tretmana (Nakamura i sur., 2016). Pezonaga i sur. (1996) su proveli istraživanje o utjecaju primijenjene kemoterapije cisplatinom na koncentracije Cu, Zn, Se, Na, K, Ca i Mg u serumu i urinu. Uočili su značajno snižene koncentracije Cu, Zn i Mg u serumu uz značajno povišene koncentracije tih elemenata u urinu.

Pretpostavlja se da je jedan od glavnih uzroka povišenog izlučivanja elemenata urinom poremećaj glomerularne filtracije bubrega zbog nefrotoksičnog djelovanja cisplatine. Nakon filtracije krvi kroz bubrežne glomerule filtrat dalje protječe sustavom bubrežnih kanalića te tubularni epitel apsorbira više od 99 % vode te veliku količinu elektrolita i drugih tvari (Guyton, 2003). Tvari koje se nisu apsorbirale izlučuju se urinom (Moret i sur., 2007). Moguće je da zbog unesenih velikih doza platine dolazi do blokiranja tubularne apsorpcije platinom te se metali pojačano izlučuju urinom.

Izloženost pojedinim toksičnim elementima može potaknuti sintezu proteina male molekulske mase, metalotioneina. To je protein bogat cisteinom te zbog velikog broja tiolnih skupina ima veliki afinitet vezanja elemenata kao što su Cd, Pb i Hg. Glavna mu je uloga održavanje homeostaze Zn i Cu u organizmu te njihovo pohranjivanje i prijenos. Stoga metalotionein ima važnu ulogu u zaštiti organizma od toksičnog djelovanja pojedinih elemenata u suvišku te osiguravanju provođenja fizioloških funkcija osiguravanjem bioraspoloživosti potrebnih esencijalnih elemenata. Posljednjih desetljeća nekoliko je izvješća sugeriralo pojačanu ekspresiju metalotioneina kao koristan dijagnostički alat u otkrivanju različitih vrsta tumora, ali i otpornosti na pojedine lijekove pri različitim sijelima raka. U našoj prethodnoj studiji istraživali smo sposobnost metalotioneina u učinkovitom hvatanju Pt iz cisplatine. Rezultati su pokazali da je većina cirkulirajuće Pt vezana na proteine srednje molekulske mase, vjerojatno albumin, a samo mala količina Pt vezana je za proteine male molekulske mase kao što je metalotionein (Tariba i sur., 2015).

Primijenjeni koktel lijekova može inducirati oksidacijski stres pri čemu bleomicin koristi to svojstvo kao mehanizam uništavanja stanica raka (Chen i sur., 2007). Cisplatina se metabolizira u reaktivne međuprodukte koji dovode do stvaranja poprečnih veza unutar i između uzvojnica DNK te inhibicije sinteze DNK. Etopozid, koji inhibira aktivnost DNK topoizomeraze II, synergistički povećava citotoksičnost cisplatine u cilju smanjenja rezistentnosti tumorskih stanica na djelovanje cisplatine (Kigawa i sur., 1998). Smatra se da efikasnost takve kemoterapije uvelike ovisi o stvaranju reaktivnih kisikovih vrsta te posljedično povišenju oksidacijskog stresa koje dovodi do apoptoze ili nekroze stanica tumora (Teppo i sur., 2017).

U naših ispitanika s tumorom testisa koji su primili kemoterapiju nađena je snižena aktivnost SOD-a uz povišenu koncentraciju GSH u odnosu na vrijednosti prije primljene kemoterapije. GSH je uključen u metabolizam nekoliko citotoksičnih lijekova te povišenje njegove koncentracije nakon primjene lijeka može biti prediktorom rezistencije na taj lijek (Kigawa i sur., 1998). Međutim, inhibicija aktivnosti SOD-a nakon primljenog drugog ciklusa kemoterapije može uzrokovati nakupljanje $O_2^{\bullet-}$ u stanicama raka i dovesti do njihove smrti i uspješnosti same terapije.

Studija praćenja

U studiji praćenja sudjelovalo je 40 ispitanika s tumorom testisa. Uzorci krvi i urina uzorkovani su godinu dana nakon primijenjene kemoterapije koktelom koji je sadržavao bleomicin, etopozid i cisplatinu. Vrijednosti za tumorske biljege AFP, β -HCG i LDH bile su unutar referentnih raspona vrijednosti za 40 praćenih ispitanika.

Rezultati istraživanja prvo su uspoređeni s vrijednostima dobivenim nakon drugog ciklusa kemoterapije. Uočene su značajno niže koncentracije glicina, valina, leucina, aloizoleucina, treonina, prolina, asparagina i tirozina te značajno viša koncentracija β -aminoizomaslačne kiseline u urinu u odnosu na vrijednosti dobivene nakon primljene kemoterapije. Također je uočeno značajno sniženje koncentracija Na, Mg, Al, Fe, Ni, Cu, Cd, Pt i Hg godinu dana nakon kemoterapije u odnosu na koncentracije izmjerene nakon drugog ciklusa primljene kemoterapije. Značajno sniženje koncentracije elemenata u urinu godinu dana nakon kemoterapije upućuje na to da je tubularna reapsorpcija ponovno uspostavljena te više ne dolazi do pojačanog izlučivanja kako esencijalnih tako ni toksičnih elemenata.

Kada su vrijednosti dobivene godinu dana nakon kemoterapije uspoređene s vrijednostima u kontrolnih ispitanika, rezultati su pokazali da se vrijednosti za većinu aminokiselina i elemenata približavaju vrijednostima u kontrolnih ispitanika osim za treonin i serin čije su vrijednosti koncentracija bile i dalje značajno snižene te za Mn i Pt čije su vrijednosti koncentracija bile značajno povišene.

U skupini naših ispitanika koji su pristupili uzorkovanju godinu dana nakon kemoterapije, aktivnost SOD-a i vrijednosti TOS-a bile su statistički značajno više dok su vrijednosti TAC-a bile statistički značajno niže u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije. Ispitanici s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije imali su statistički značajno višu aktivnost SOD-a te značajno niže razine GSH i TOS-a u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Primjena citostatika na bazi Pt pridonosi porastu koncentracije Pt u organizmu te je cirkulirajuća Pt prisutna u plazmi i urinu liječenih osoba više od desetljeća nakon kemoterapije (Hohnloser i sur., 1996; Gerl i Schierl, 2000; Gietema i sur., 2000; Brouwers i sur., 2008). U ovom istraživanju koncentracija Pt u urinu se smanjila godinu dana nakon kemoterapije u odnosu na koncentraciju izmjerenu nakon drugog ciklusa kemoterapije. Međutim, koncentracija Pt u urinu je i godinu dana nakon kemoterapije ostala značajno povišena u odnosu na koncentraciju u kontrolnih ispitanika što je u skladu s rezultatima drugih istraživanja.

Sníženje koncentracija aminokiselina u urinu godinu dana nakon kemoterapije upućuje na uspostavljanje ravnoteže u metabolizmu aminokiselina. Naime, koncentracija većine aminokiselina izmjerena u urinu nakon godine dana bila je slična vrijednostima koncentracija izmjerenih u urinu kontrolnih ispitanika. β -aminoizomaslačna kiselina je jedina aminokiselina koja je kroz godinu dana mjerenja pokazivala obrnuti trend u odnosu na ostale aminokiseline. Nakon primijenjene kemoterapije njene koncentracije u urinu bile su niže u odnosu na koncentracije prije kemoterapije, dok su ostale aminokiseline bile povišene. Godinu dana nakon kemoterapije koncentracije β -aminoizomaslačne kiseline u urinu bile su značajno povišene u odnosu na vrijednosti nakon kemoterapije, ali slične vrijednostima koncentracija u urinu kontrolnih ispitanika. β -aminoizomaslačna kiselina je neproteinska aminokiselina koja potječe iz katabolizma timina i valina. 90 % β -aminoizomaslačne kiseline je produkt razgradnje timina te je 10 % produkt razgradnje valina (van Kuilenburg i sur., 2004). Timin je pirimidinska dušična baza te je početni korak sinteze pirimidinskih baza reakcija karbamoil-fosfata i aspartata (Moffatt i Ashihara, 2002). Primjenom citostatika zaustavlja se proliferacija stanica i replikacija DNK pa je i sinteza dušičnih baza smanjena. Pri smanjenoj sintezi timina, smanjen je i njegov katabolizam te su koncentracije β -aminoizomaslačne kiseline snižene. Godinu dana nakon kemoterapije organizam se vraća u normalno stanje te su sinteza i katabolizam timina u ravnoteži što su pokazale koncentracije β -aminoizomaslačne kiseline u urinu koje su slične koncentracijama u kontrolnih ispitanika.

Koncentracije serina i treonina u urinu te koncentracija GSH bile su značajno snižene u ispitanika godinu dana nakon kemoterapije. Metabolizmom serina se sintetizira glicin koji je sastavni dio GSH (Amelio i sur., 2014). GSH je tripeptid koji se sastoji od glicina, cisteina i glutaminske kiseline. U organizmu GSH djeluje kao reduzens i antioksidans u različitim biokemijskim reakcijama, služi kao izvor cisteina, štiti stanice od lipidne peroksidacije (LPO), smanjuje toksično djelovanje egzogene i endogene tvari (uključujući ROS-e i teške metale), sudjeluje u staničnoj proliferaciji i razvoju.

Rezultati studije praćenja upućuju na postupni oporavak metabolizma nakon prestanka kemoterapije.

6.2. Ne-ciljana analiza: kvalitativni profil hlapljivih organskih metabolita u urinu

Hlapljivi organski metaboliti u urinu određeni su primjenom plinske kromatografije uz spektrometriju masa nakon prethodne *headspace* mikroekstrakcije uzorka na čvrstoj fazi. U prvom dijelu ovog istraživanja, pomoću eksperimentalnog modela definirane su varijable koje najviše utječu na uspješnost mikroekstrakcije i njihove optimalne vrijednosti. Optimizirani postupak primijenjen je pri ispitivanju stabilnosti hlapljivih metabolita s obzirom na temperaturu i vrijeme pohranjivanja urina te višestruke cikluse zamrzavanja i odmrzavanja. Potom je provedena ne-ciljana analiza hlapljivih spojeva u urinu ispitanika s tumorom testisa koja je rezultirala kvalitativnim profilom hlapljivih organskih metabolita u urinu.

Procjena značajnih varijabli uključenih u HS-SPME

Primjenom reduciranog faktorskog dizajna i Doehlertovog dizajna trećeg reda određene su optimalne vrijednosti varijabli koje utječu na uspješnost ekstrakcije hlapljivih spojeva u urinu. Pri tome je bilo bitno odabrati uvjete koji omogućavaju visoku osjetljivost bez gubitka najhlapljivijih odnosno najnestabilnijih spojeva. U istraživanju Mills i Walker (2001) i Silva i sur. (2012) za temperaturu inkubacije i ekstrakcije odabrana je vrijednost od 50 °C budući da je pri višim temperaturama došlo do smanjenja površine pikova. Primjena viših temperatura može obogatiti hlapljivi ekstrakt s manje hlapljivim metabolitima, ali istovremeno može dovesti do gubitka više termolabilnih metabolita. Setkova i sur. (2007) također su pokazali da se optimalna temperatura značajno razlikuje za različite hlapljive spojeve jer se kod povišenja temperature ekstrakcije događaju dvije suprotne pojave. Brzina prijenosa analita prema vlaknu raste, dok se konstanta distribucije analita između površinskog prostora iznad urina i filma vlakna smanjuje što može uzrokovati značajno smanjenje osjetljivosti metode, ovisno o tome koji fenomen prevladava. Pri izboru temperature inkubacije i ekstrakcije u studiji koju su proveli Monteiro i sur. (2014) autori su odabrali 68 °C kao optimalnu temperaturu. U istraživanju u okviru ovog doktorskog rada odabrana je temperatura od 60 °C za inkubaciju i ekstrakciju jer se pokazala zadovoljavajućom za željenu analizu. Nadalje, vrijeme ekstrakcije od 50 min odabrano je kao optimalna vrijednost za uspješnu ekstrakciju odabranih hlapljivih spojeva što je u skladu s rezultatima Silve i sur. (2012) koji su zaključili da je pri 50 °C potrebno više od 45 minuta da bi se postigla ravnoteža između uzoraka i vlakna za ekstrakciju.

Stabilnost uzoraka urina

Za metabolomička istraživanja s ciljem usporedbe koncentracije hlapljivih spojeva, analiza svježih uzoraka je najbolji pristup, ali u praksi je to rijetko kad moguće. Stoga je pravilna pohrana uzoraka bitan korak kako bi se spriječio gubitak hlapljivih spojeva. Rezultati istraživanja pokazali su vremenski ovisno smanjenje zbroja površina pikova u uzorcima urina pohranjenih tijekom jednog tjedna, jednog mjeseca, tri mjeseca i šest mjeseci. Profil metabolita iz uzoraka pohranjenih na -80 °C bio je najbliži profilu metabolita iz svježih uzoraka. Smanjenje zbroja površina pikova, u rasponu od 13 % do 35 % kod uzoraka pohranjenih na -80 °C pokazalo je da je teško sačuvati uzorke bez obzira na temperaturu pohrane. Značajne razlike između ukupnih površina pikova dobivenih u uzorcima pohranjenim na 4 °C u usporedbi sa svježim uzorcima sugerirale su da ova temperatura nije pouzdana za čuvanje uzoraka dulje od jednog tjedna. Temperature od -20 °C i -80 °C pokazale su usporediv postotak promjene ukupne površine pikova ako se uzorci ne čuvaju dulje od jednog mjeseca, iako je kod pohrane na -80 °C došlo do manjeg gubitka u zbroju površina pikova u odnosu na uzorke pohranjene na -20 °C.

Gika i sur. (2008) ispitali su pomoću LC-MS-a i UPLC-MS-a stabilnost uzoraka urina pohranjenih do šest mjeseci na -20 °C i -80 °C. Zaključili su da je za metabolomičke analize prihvatljivo pohranjivanje urina do šest mjeseci na -20 °C ili na nižoj temperaturi. Razlike između profila urina pohranjenih na -20 °C i -80 °C nisu pronađene ni LC ni UPLC-MS analizom. Saude i sur. (2007) su analizirali uzorke urina pomoću NMR-a. Urin je bio pohranjen na 22 °C, 4 °C i -80 °C, a stabilnost je ispitivana tijekom četiri tjedna. U urinu pohranjenom na sobnoj temperaturi (22 °C) nađena je najveća promjena u broju metabolita, dok je urin pohranjen na -80 °C imao metabolomički profil sličan profilu dobivenom u svježim uzorcima. Rotter i sur. (2017) također su istraživali stabilnost profila metabolita u uzorcima urina pri različitim uvjetima skladištenja. Uzorci su pohranjeni na -80 °C, -20 °C, 4 °C, 9 °C i 20 °C tijekom 0, 2, 8 i 24 h. Koncentracije metabolita su kvantificirane pomoću FIA-ESI-MS/MS-a korištenjem Absolute IDQ™ p150 testa. Autori su zaključili da je 78 % izmjerenih metabolita bilo stabilno pri svim ispitivanim uvjetima pohrane, ali da čuvanje uzoraka urina pri 9 °C i 20 °C dulje od 8 sati treba izbjegavati.

Rezultati istraživanja u ovom doktoratu ukazuju na to da se uzorci urina za analizu hlapljivih spojeva mogu pohraniti do šest mjeseci samo ako se pohranjuju na -80 °C zbog nestabilne prirode analiziranih spojeva. Analizirani hlapljivi spojevi skloniji su promjeni u odnosu na manje hlapljive spojeve koje su proučavali drugi autori.

Nadalje, uočeno je da proces zamrzavanja i odmrzavanja utječe na stabilnost uzorka te stoga treba izbjegavati više od dva ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja uzorka urina koji je pohranjen šest mjeseci ili duže na -80 °C.

U studiji koju su proveli Gika i sur. (2008), podvrgavanje uzoraka urina ciklusima zamrzavanja i odmrzavanja jedan do devet puta, nakon čega je slijedila LC-MS ili UPLC-MS analiza, nije utjecalo na stabilnost uzoraka te su autori zaključili da višestruko zamrzavanje i odmrzavanje vjerojatno nema utjecaja na vjerodostojnost metabolomičke analize. Suprotno tome, Saúde i sur. (2007) su preporučili da proces višestrukog zamrzavanja i odmrzavanja treba izbjegavati kad god je to moguće jer s vremenom dolazi do promjene u sadržaju metabolita u urinu neovisno o temperaturi čuvanja. Pri tome su uočili da je ponavljanje ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja tijekom četiri tjedna najmanje utjecalo na stabilnost uzoraka urina pohranjenih na -80 °C prije analize NMR-om. Rotter i sur. (2017) također su istraživali utjecaj zamrzavanja/odmrzavanja na stabilnost metabolita u urinu. Urin je bio zamrznut 24 h na -80 °C i odmrznut tijekom 2 h na 20 °C te je ciklus ponovljen tri puta. Autori nisu uočili značajnu promjenu u koncentraciji metabolita nakon jednog ili dva ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, ali su dva metabolita pokazala značajno povišene koncentracije nakon tri ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja, u usporedbi s uzorcima koji nisu dodatno odmrzavani.

Hlapljivi organski metaboliti u uzorcima urina kao mogući biološki biljezi

Istraživanja hlapljivih organskih metabolita u urinu metabolomičkim pristupom zadnjih godina okuplja sve veći broj znanstvenika. Rezultati iz literature sugeriraju da su VOM-i iz urina mogući biološki biljezi za različite zdravstvene poremećaje i oboljenja (Amann i sur., 2014; Lubes i Goodarzi, 2018). U ovom doktorskom istraživanju provedena je kvalitativna analiza hlapljivih organskih metabolita kako bi se odredilo koje se sve vrste spojeva, ovisno o funkcionalnim skupinama, javljaju u urinu te procijenila njihova uloga kao potencijalnog biljega.

Identificirana su ukupno 123 metabolita. Najzastupljenija skupina u urinu bili su ketoni što je potvrđeno i rezultatima drugih autora (Silva i sur., 2012; Mills i Walker, 2001; de Lacy Costello i sur., 2014). Od 32 identificirana ketona, 30 je nađeno i identificirano u istraživanjima drugih autora (tablica 18 a). 5-etildihidro-(3H)furan-2-on do sada nije identificiran u urinu, međutim, identificiran je u fecesu (Garner i sur., 2007). 5-etil-5-metildihidro-2(3H)-furanon do sada nije detektiran u urinu niti je uvršten u HMDB. Pri tome

treba istaknuti kako je u ovom istraživanju 5-etil-5-metildihidro-2(3H)-furanon identificiran u 25 od 167 uzorka urina.

Heterocikličkih spojeva je nađeno 20 i svi su nađeni i identificirani u istraživanjima drugih autora (tablica 18 b).

Od 18 identificiranih monocikličkih ugljikovodika, 16 ih je također nađeno i identificirano u istraživanjima drugih autora (tablica 18 c). Izopropilbenzen do sada nije identificiran u urinu, međutim, identificiran je u fecesu (De Preter i sur., 2015) i slini (Dame i sur., 2015). *Tert*-butilbenzen do sada nije identificiran u urinu i nije uvršten u HMDB.

Od 13 aldehida koliko ih je nađeno i identificirano u ovom istraživanju, 11 ih je nađeno u istraživanjima drugih autora (tablica 18 d). Feniletanal i 4-metilfenilmetanal do sada nisu identificirani u urinu, međutim, identificirani su u fecesu. Detektirane su njihove povišene koncentracije kod oboljelih od ulcerativnog kolitisa (Garner i sur., 2007).

Devet od deset identificiranih alkohola u ovom istraživanju nađeno je i identificirano u istraživanjima drugih autora (tablica 18 e). 2-metilpropan-2-ol do sada nije identificiran u urinu, međutim, identificiran je u krvi i izdahnutom zraku (Bouatra i sur., 2013). Taj je alkohol pronađen u svega desetak uzoraka urina ispitanika s tumorom testisa.

Sedam od osam identificiranih fenola nađeno je i identificirano u istraživanjima drugih autora (tablica 18 f). 2,6-*ditert*-butil-4-metilfenol do sada nije identificiran u urinu, ali je identificiran u slini (Ward i sur., 1976). U HMDB-u je opisan kao antioksidacijski prehrambeni aditiv (E broj E321) te je navedeno da se nalazi u sastavu češnjaka. Nađen je u većini uzoraka urina.

Pet identificiranih karboksilnih kiselina i tri identificirana kondenzirana policiklička ugljikovodika su također nađena i identificirana u istraživanjima drugih autora (tablice 18 g i 18 h).

Od tri nađena sulfida, dva su nađena i identificirana u istraživanjima drugih autora (tablica 18 i), a 3-(metildisulfanil)prop-1-en do sada nije identificiran u urinu već u fecesu zdravih ispitanika i ispitanika oboljelih od ulceroznog kolitisa i Crohnove bolesti gdje su nađene njegove snižene koncentracije (Raman i sur., 2013; De Preter i sur., 2015). Sulfid je uvršten u HMDB te je navedeno njegovo podrijetlo u organizmu iz prehrane (luk).

Od preostalih 11 spojeva koji se ubrajaju u estere dikarboksilne kiseline, ugljikovodike, bicikličke etere, izotiocijanati, tiol, amin, halogenalkan i ester karboksilne kiseline, deset ih je također nađeno i identificirano u istraživanjima drugih autora (tablica 18 j). Biciklički spoj 2,6,6-trimetilbiciklo[3.1.1]heptan do sada nije identificiran u urinu i nije uvršten u HMDB. U ovom istraživanju nađen je u 70 od 167 analizirana urina.

Neki od gore navedenih identificiranih metabolita su u dosadašnjim istraživanjima drugih autora navedeni kao potencijalni razlikovni metaboliti između zdravih ispitanika i ispitanika oboljelih od raka. Pri tome se najviše ističu ketoni i aldehidi. Uočeno je značajno povišenje propanona i butan-2-ona te značajno sniženje pentan-2-ona, heptan-4-ona i oktan-2-ona u urinu oboljelih od raka jednaka, mjehura odnosno prostate (Huang i sur., 2013; Khalid i sur., 2015; Cauchi i sur., 2016). Ketoni propanon i heptan-4-on su produkti metabolizma, dok se butan-2-on, pentan-2-on i oktan-2-on smatraju egzogenim metabolitima iz hrane (HMDB). Kod aldehida u urinu oboljelih od raka uočene su značajno više koncentracije 2-oksopropanala, 3-fenil-2-metilprop-2-enala, heksanala, fenilmetanala i 3,5-dimetilbenzaldehyda (Silva i sur., 2011; Cauchi i sur., 2016; Monteiro i sur., 2017; Jiménez-Pacheco i sur., 2018).

Heterociklički spoj furan i monociklički ugljikovodik dimetilbenzen nađeni su značajno povišenima u urinu ispitanika s rakom prostate nakon masaže prostate što je autore navelo da ih smatraju izravnim produktima reakcija u samom tumoru. Smatra se da furan u organizmu nastaje kao produkt dehidratacije monosaharida i oksidacije masnih kiselina (Pacheco i sur., 2018).

Prisutnost VOM-a u biološkim tekućinama često se povezuje s poremećajem oksidacijsko-redukcijske ravnoteže (Amann i sur., 2014). Produkcija aldehida značajno je povećana u uzorcima oboljelih osoba pa se njihovo pojavljivanje povezuje s brojnim tumorskim oboljenjima i upalnim procesima, uzrokovanim povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva (Khalid i sur., 2015). Reaktivni kisikovi spojevi poznati su po svom štetnom djelovanju na stanične komponente poput nukleotida, proteina i lipida uzrokujući poremećaj oksidacijsko-redukcijske ravnoteže što pridonosi nastanku patoloških stanja u organizmu.

ZAKLJUČCI

- U ispitanika s tumorom testisa koncentracija asparaginske kiseline, mangana, cinka i aktivnost superoksid dismutaze bila je značajno povišena, a koncentracija treonina, serina, histidina, kobalta, glutationa i ukupnog oksidacijskog statusa značajno snižena u odnosu na kontrolne ispitanike. Navedeni rezultati nas upućuju na mogući poremećaj u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree pri razvoju tumora testisa.
- Uspješnost diskriminacije ispitanika s tumorom testisa u odnosu na kontrolne ispitanike temeljem profila svih mjerenih aminokiselina u urinu iznosila je 86 %. Kada su u model uključene samo aminokiseline čije su razlike u koncentraciji između uspoređenih skupina ispitanika bile statistički značajno različite te aminokiseline koje sudjeluju u njihovom metabolizmu, uspješnost diskriminacije iznosila je 65 %. Rezultati su pokazali da cjelokupni profil aminokiselina uspješnije razdvaja ispitivane skupine nego kada se razmatraju samo pojedine aminokiseline.
- Kemoterapija po BEP protokolu (bleomicin, etopozid i cisplatina) rezultirala je povišenjem koncentracije većine aminokiselina i elemenata u urinu te glutationa u krvnoj plazmi. Također su uočene značajno niže koncentracije kalija i molibdena u urinu te niža aktivnost superoksid dismutaze u eritrocitima. Rezultati nas upućuju da nakupljanje platine u bubregu, što uzrokuje promjene u glomerularnoj filtraciji, potencijalno uzrokuje povišeno izlučivanje aminokiselina i elemenata urinom.
- Godinu dana nakon primljene kemoterapije uočeno je značajno sniženje koncentracije glicina, valina, leucina, aloizoleucina, treonina, prolina, asparagina i tirozina te značajno povišenje koncentracije β -aminoizomaslačne kiseline, značajno sniženje koncentracije natrija, magnezija, aluminijska, željeza, nikla, bakra, kadmija, platine i žive, značajno povišenje superoksid dismutaze i razine ukupnog oksidacijskog statusa te značajno sniženje aktivnosti glutation peroksidaze i razine ukupnog antioksidacijskog kapaciteta u odnosu na vrijednosti dobivene odmah nakon kemoterapije.

- Koncentracije aminokiselina i elemenata u ispitanika s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije približile su se vrijednostima u kontrolnih ispitanika osim za treonin i serin čije vrijednosti koncentracija su i dalje bile značajno snižene te za mangan i platinu čije vrijednosti su ostale značajno povišene. Ispitanici s tumorom testisa godinu dana nakon kemoterapije imali su statistički značajno višu aktivnost superoksid dizmutaze te značajno niže razine glutationa i ukupnog oksidacijskog statusa u usporedbi s kontrolnom skupinom.
- Odrediti stanje oksidacijskog stresa u ispitanika s rakom vrlo je izazovno. Naime, kako je oksidacijski stres prisutan također u fiziološkim uvjetima, teško je procijeniti koje vrijednosti odgovaraju patološkom stanju. Nadalje, i odnosi između različitih komponenti oksidacijsko-redukcijskog sustava u uvjetima povišenog oksidacijskog stresa uzrokovanog rakom vrlo su složeni.
- Određeni su optimalni uvjeti ekstrakcije hlapljivih organskih metabolita: 2 mL uzorka urina (pH = 2-3) pomiješa se s 1 g natrijeva klorida 60 s. Uzorak se potom inkubira 35 minuta na temperaturi od 60 °C. Nakon inkubacije, Carboxen/PDMS vlakno se izloži prostoru iznad urina tijekom 50 minuta. Nakon ekstrakcije slijedi analiza vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa.
- Analiza hlapljivih metabolita u urinu ispitanika s tumorom testisa i kontrolnih ispitanika, primjenom vezanog sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa nakon mikroekstrakcije na čvrstoj fazi, rezultirala je detekcijom oko 200 metabolita.
- Metaboliti su identificirani pomoću identifikacijskog sustava AMDIS, knjižnice spektara NIST, indeksa zadržavanja i temperature vrenja. Na taj su način identificirana 123 metabolita. Identifikacija dijela metabolita potvrđena je primjenom raspoloživih standarda. Uz korištenje vremena zadržavanja i temperature vrenja, sustav AMDIS se pokazao kao pouzdan automatski sustav koji ubrzava proces identifikacije.

- U urinu svih ispitanika identificirane su sljedeće klase spojeva: 32 ketona, 20 heterocikličkih spojeva, 18 monocikličkih ugljikovodika, 13 aldehida, 10 alkohola, 8 fenola te 22 ostala spoja.
- Ovim istraživanjem dobiveni su rezultati koji upućuju na to da razvojem tumora u testisima dolazi do poremećaja u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja o ulozi međuprodukata navedenih ciklusa u tumorigenezi.

LITERATURA

- Aggarwal SK (1993) A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. *J Histochem Cytochem* **41**:1053–1073.
- Akinloye O, Adaramoye O, Kareem O (2009) Changes in antioxidant status and lipid peroxidation in Nigerian patients with prostate carcinoma. *Pol Arch Med Wewn* **119**:526–532.
- Akutsu Y, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Murakami K, Fujishiro T, Imanishi S, Endo S, Toyozumi T, Matsubara H (2012) Are additional trace elements necessary in total parenteral nutrition for patients with esophageal cancer receiving cisplatin-based chemotherapy? *Biol Trace Elem Res* **150**:109–115.
- Altman BJ, Stine ZE, Dang CV (2016) From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **16**:619–634.
- Amann A, de Lacy Costello B, Miekisch W, Schubert J, Buszewski B, Pleil J, Ratcliffe N, Risby T (2014) The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J Breath Res* **8**:34001.
- Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G (2014) Serine and glycine metabolism in cancer. *Trends Biochem Sci* **39**:191–198.
- American Joint Committee on Cancer (2010) *Cancer Staging Manual*. 7th ed. Chicago, Illinois: Springer Science+Buisness Media.
- Ananieva E (2015) Targeting amino acid metabolism in cancer growth and anti-tumor immune response. *World J Biol Chem* **6**:281–289.
- Arasardnam RP, McFarlane MJ, Ryan-Fisher C, Westenbrink E, Hodges P, Thomas MG, Chambers S, O'Connell N, Bailey C, Harmston C, Nwokolo CU, Bardhan KD, Covington JA (2014) Detection of colorectal cancer (CRC) by urinary volatile organic compound analysis. *PLoS One* **9**:e108750.
- Arendt JFB, Pedersen L, Nexø E, Sørensen HT (2013) Elevated plasma vitamin B12 levels as a marker for cancer: A population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst* **105**:1799–1805.
- Arsova-Saradinovska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, Sayal A, Savaser A, Banev S, Petrovski D, Dzikova S, Georgiev V, Sikole A, Özgök Y, Suturkova Lj, Dimovski A, Aydin A (2009) Increased oxidative / nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clin Biochem* **42**:1228–1235.
- Arthur CL, Pawliszyn J (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal Chem* **62**:2145–2148.
- Ash DE (2004) Structure and function of arginases. *J Nutr* **134**:2760S–2767S.
- Aydin A, Arsova-Saradinovska Z, Sayal A, Eken A, Erdem O, Erten K, Özgök Y, Dimovski A (2006) Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Clin Biochem* **39**:176–179.
- Baird DC, Meyers GJ, Hu JS (2018) Testicular cancer: diagnosis and treatment. *Am Fam Phys* **97**:261–268.
- Baselga J, Bhardwaj N, Cantley LC, DeMatteo R, DuBois RN, Foti M, Gapstur SM, Hahn WC, Helman LJ, Jensen RA, Paskett ED, Lawrence TS, Lutzker SG, Szabo E (2015) AACR Cancer Progress Report 2015. *Clin Cancer Res* **21**:1–128.

- Batool A, Chen S-R, Liu Y-X (2019) Distinct metabolic features of seminoma and embryonal carcinoma revealed by combined transcriptome and metabolome analyses. *J Proteome Res* **18**:4:1819-1826.
- Battisti V, Maders LDK, Bagatini MD, Reetz LGB, Chiesa J, Battisti IE, Gonçalves JF, Duarte MMF, Schetinger MRC, Morsch VM (2011) Oxidative stress and antioxidant status in prostate cancer patients: Relation to Gleason score, treatment and bone metastasis. *Biomed Pharmacother* **65**:516–524.
- Belsten JL, Wright AJA (1995a) European community: FLAIR common assay for erythrocyte superoxide dismutase (SOD); results of an inter-laboratory trial. *Eur J Clin Nutr* **49**:928–931.
- Belsten JL, Wright AJ (1995b) European Community: FLAIR common assay for whole-blood glutathione peroxidase (GSH-Px); results of an inter-laboratory trial. *Eur J Clin Nutr* **49**:921–927.
- Bi X, Henry CJ (2017) Plasma-free amino acid profiles are predictors of cancer and diabetes development. *Nutr Diabetes* **7**:e249.
- Bichell TJV, Wegrzynowicz M, Tipps KG, Bradley EM, Uhouse MA, Bryan M, Horning K, Fisher N, Dudek K, Halbesma T, Umashanker P, Stubbs AD, Holt HK, Kwakye GF, Tidball AM, Colbran RJ, Aschner M, Neely MD, Di Pardo A, Maglione V, Osmand A, Bowman AB (2017) Reduced bioavailable manganese causes striatal urea cycle pathology in Huntington's disease mouse model. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* **1863**:1596–1604.
- Birsoy K, Wang T, Chen WC, Freinkman E, Abu-Remaileh M, Sabatini DM (2015) An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell* **162**:540–551.
- Blom HJ, van Rooij A, Hogeveen M (2007) A simple high-throughput method for the determination of plasma methylmalonic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* **45**:645–650.
- Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo AC, Wilson MR, Knox C, Bjorndahl TC, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame ZT, Poelzer J, Huynh J, Yallou FS, Psychogios N, Dong E, Bogumil R, Roehring C, Wishart DS (2013) The human urine metabolome. *PLoS One* **8**:e73076.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248–254.
- Brouwers EEM, Huitema ADR, Beijnen JH, Schellens JHM (2008) Long-term platinum retention after treatment with cisplatin and oxaliplatin. *BMC Clin Pharmacol* **8**:1–10.
- Buico A, Cassino C, Ravera M, Betta P-G, Osella D (2009) Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma. *Redox Rep* **14**:125–131.
- Burton C, Dan Y, Donovan A, Liu K, Shi H, Ma Y, Bosnak CP (2016) Urinary metallomics as a novel biomarker discovery platform: Breast cancer as a case study. *Clin Chim Acta* **452**:142–148.
- Cala M, Aldana J, Sánchez J, Guio J, Meesters RJW (2018) Urinary metabolite and lipid alterations in Colombian Hispanic women with breast cancer: A pilot study. *J Pharm Biomed Anal* **152**:234–241.

- Callejón-Leblic B, Gómez-Ariza JL, Pereira-Vega A, García-Barrera T (2018) Metal dyshomeostasis based biomarkers of lung cancer using human biofluids. *Metallomics* **10**:1444–1451.
- Cauchi M, Weber CM, Bolt BJ, Spratt PB, Turner DC, Wills CM, Britton LE, Turner C, Morgan G (2016) Evaluation of gas chromatography mass spectrometry and pattern recognition for the identification of bladder cancer from urine headspace. *Anal Methods* **8**:4037–4046.
- Cepeda V, Fuertes MA, Castilla J, Alonso C, Quevendo C, Perez JM (2007) Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem* **7**:3–18.
- Chen P (2018) Manganese metabolism in humans. *Front Biosci* **23**:1655–1679.
- Chen Y, Jiang J, Guo L, Liu L, Wen J, Xu L, Yan M, Li Z, Zhang X, Nan P, Jiang J, Ji J, Zhang J, Cai W, Zhuang H, Wang Y, Zhu Z, Yu Y (2016) A characteristic biosignature for discrimination of gastric cancer from healthy population by high throughput GC-MS analysis. *Oncotarget* **7**:87496–87510.
- Chen Y, Jungsuwadee P, Vore M, Butterfield DA, Clair DK (2007) Collateral damage in cancer chemotherapy: oxidative stress in nontargeted tissues. *Mol Interv* **7**:147–156.
- Cheng L, Albers P, Berney DM, Feldman DR, Daugaard G, Giligan T, Looijenga LHJ (2018) Testicular cancer. *Nat Rev Cancer* **4**:29.
- Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, Purdue MP, Cook MB, McGlynn KA (2010) International trends in the incidence of testicular cancer, 1973-2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**:1151–1159.
- Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, Duca Piergiorgio D (2006) Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* **101**:513–523.
- Cooley W, Lohnes P (1973) Multivariate data analysis. *J. Wiley and Sons Inc., New York 1971, 364 S.* John Wiley & Sons, Ltd.
- Cozzolino R, De Giulio B, Marena P, Martignetti A, Günther K, Lauria F, Russo P, Stocchero M, Siani A (2017) Urinary volatile organic compounds in overweight compared to normal-weight children: results from the Italian I.Family cohort. *Sci Rep* **7**:1–13.
- Czarnek K, Terpilowska S, Siwicki AK (2015) Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Cent Eur J Immunol* **40**:236–242.
- D’Aniello G, Ronsini S, Guida F, Spinelli P, D’Aniello A (2005) Occurrence of D-aspartic acid in human seminal plasma and spermatozoa: Possible role in reproduction. *Fertil Steril* **84**:1444–1449.
- Dame ZT, Aziat F, Mandal R, Krishnamurthy R, Bouatra S, Borzouie S, Guo AC, Sajed T, Deng L, Lin H, Liu P, Dong E, Wishart DS (2015) The human saliva metabolome. *Metabolomics* **11**:1864–1883.
- Dasari S, Tchounwou PB (2014) Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **740**:364–378.
- De Lacy Costello B, Amann A, Al-Kateb H, Flynn C, Filipiak W, Khalid T, Osborne D, Ratcliff NM (2014) A review of the volatiles from the healthy human body. *J Breath Res* **8**:14001.

- De Preter V, Machiels K, Joossens M, Arijs I, Matthys C, Vermeire S, Rutgeerts P, Verbeke K (2015) Faecal metabolite profiling identifies medium-chain fatty acids as discriminating compounds in IBD. *Gut* **64**:447–458.
- Dereziński P, Klupczynska A, Sawicki W, Pałka JA, Kokot ZJ (2017) Amino acid profiles of serum and urine in search for prostate cancer biomarkers: A pilot study. *Int J Med Sci* **14**:1–12.
- Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agro A, D'Amico A (2003) Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* **18**:1209–1218.
- Duskova K, Vesely S, Do Carmo Silva J, Cernei N, Zitka O, Heger Z, Adam V, Havlova K, Babjuk M (2018) Differences in urinary amino acid patterns in individuals with different types of urological tumor urinary amino acid patterns as markers of urological tumors. *In Vivo* **32**:425–429.
- Ellman GL (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* **74**:443–450.
- Erel O (2004) A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* **37**:277–285.
- Erel O (2005) A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* **38**:1103–1111.
- Erickson JW, Cerione RA (2010) Glutaminase: A hot spot for regulation of cancer cell metabolism? *Oncotarget* **1**:734–740.
- García-Sevillano MÁ, García-Barrera T, Abril N, Pueyo C, López-Barea J, Gómez-Ariza JL (2014) Omics technologies and their applications to evaluate metal toxicity in mice *M. spretus* as a bioindicator. *J Proteomics* **104**:4–23.
- Garner CE, Smith S, de Lacy Costello B, White P, Spencer R, Probert CSJ, Ratcliffe NM (2007) Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB J* **21**:1675–1688.
- Geck RC, Toker A (2016) Nonessential amino acid metabolism in breast cancer. *Adv Biol Regul* **62**:11–17.
- Gerl A, Schierl R (2000) Urinary excretion of platinum in chemotherapy-treated long-term survivors of testicular cancer. *Acta Oncol* **39**:519–522.
- Giansante L, Di Vincenzo D, Bianchi G (2003) Classification of monovarietal Italian olive oils by unsupervised (PCA) and supervised (LDA) chemometrics. *J Sci Food Agric* **83**:905–911.
- Gietema JA, Meinardi MT, Messerschmidt J, Gelever T, Alt F, Uges DRA, Sleijfer DT (2000) Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer. *Lancet* **355**:1075–1076.
- Gika HG, Theodoridis G, Wilson ID (2008) Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabonomics studies. *J Chromatogr A* **1189**:314–322.
- Grgić M, Bolanca A, Ledina D, Guguć D, Solarić M, Omrčen T, Zorica R, Galić J, Trnski D, Pasini J, Štern Padovan R, Petković M, Balenović A, Juretić A, Kaštelan Ž, Gamulin M (2013) Clinical guidelines for diagnosing, treatment and monitoring patients with

- testicular cancer-Croatian Oncology Society and Croatian Urology Society, Croatian Medical Association. *Liječnički Vjesn* **135**:287–291.
- Gu H, Du J, Carnevale Neto F, Carroll PA, Turner SJ, Chiorean EG, Eisenman RN, Raftery D (2015) Metabolomics method to comprehensively analyze amino acids in different domains. *Analyst* **140**:2726–2734.
- Guyton AC (2003) Medicinska fiziologija, Medicinska naklada, Zagreb.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**:646–674.
- Hanai YH, Shimono KS, Matsumura KM, Vachani A, Albelda S, Yamazaki K, Beauchamp GK, Oka H (2012) Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer. **76**:679–684.
- Hecht F, Pessoa CF, Gentile LB, Rosenthal D, Carvalho DP, Fortunato RS (2016) The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumor Biol* **37**:4281–4291.
- Heger Z, Cernei N, Gumulec J, Masarik M, Eckschlager T, Hrabec R, Zitka O, Adam V, Kizek R (2014) Determination of common urine substances as an assay for improving prostate carcinoma diagnostics. *Oncol Rep* **31**:1846–1854.
- Hiller K, Metallo CM (2013) Profiling metabolic networks to study cancer metabolism. *Curr Opin Biotechnol* **24**:60–68.
- Hohnloser JH, Schierl R, Hasford B, Emmerich B (1996) Cisplatin based chemotherapy in testicular cancer patients: long term platinum excretion and clinical effects. *Eur J Med Res* **1**:509–14.
- Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK (2008) Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* **134**:714–717.
- Hong-Geller E, Adikari S (2017) Chapter 3: Volatile Organic Compound and Metabolite Signatures as Pathogen Identifiers and Biomarkers of Infectious Diseases, *Biosensing Technologies for the Detection of Pathogens - A Prospective Way for Rapid Analysis*.
- Huang Q, Feng J, Wu R, Yang Y, Dai C, Li J, Liao Y, Xiang M, Wang D, Du XB (2017) Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with esophageal cancer. *Med Sci Monit* **23**:3789–3794.
- Huang J, Kumar S, Abbassi-Ghadi N, Španěl P, Smith D, Hanna GB (2013) Selected ion flow tube mass spectrometry analysis of volatile metabolites in urine headspace for the profiling of gastro-esophageal cancer. *Anal Chem* **85**:3409–3416.
- Incidencija raka u Hrvatskoj (2015) Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Registar za rak Republike Hrvatske.
- Iynem AH, Alademir AZ, Obek C, Kural AR, Konukoğlu D, Akçay T (2004) The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems. *Int Urol Nephrol* **36**:57–62.
- Jiménez-Pacheco A, Salinero-Bachiller M, Iribar MC, López-Luque A, Miján-Ortiz JL, Peinado JM (2018) Furan and p-xylene as candidate biomarkers for prostate cancer. *Urol Oncol Semin Orig Investig* **36**:243.e21–243.e27.
- Jurasović J, Cvitković P, Pizent A, Colak B, Telisman S (2004) Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* **17**:735–743.

- Kaba M, Pirinicci N, Yuksel MB, Geçit İ, Gunes M, Demir M, Akkoyun H, Demir H (2015) Serum levels of trace elements in patients with testicular cancers. *Int braz j urol* **41**:1101–1107.
- Kaspar H, Dettmer K, Gronwald W, Oefner PJ (2008) Automated GC-MS analysis of free amino acids in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **870**:222–232.
- Kelland L (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* **7**:573–584.
- Khalid T, Aggio R, White P, De Lacy Costello B, Persad R, Al-Kateb H, Jones P, Probert CS, Ratcliffe N (2015) Urinary volatile organic compounds for the detection of prostate cancer. *PLoS One* **10**:1–15.
- Kigawa J, Minagawa Y, Kanamori Y, Itamochi H, Cheng X, Okada M, Oishi T, Terakawa N (1998) Glutathione concentration may be a useful predictor of response to second-line chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Cancer* **82**:697–702.
- Kim HS, Lee HE, Yang H-K, Kim WH (2014) High lactate dehydrogenase 5 expression correlates with high tumoral and stromal vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *Pathobiology* **81**:78–85.
- Laity JH, Lee BM, Wright PE (2001) Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol* **11**:39–46.
- Lajer H, Kristensen M, Hansen HH, Christensen S, Jonassen T, Daugaard G (2005) Magnesium and potassium homeostasis during cisplatin treatment. *Cancer Chemother Pharmacol* **55**:231–236.
- Le Cornet C, Lortet-Tieulent J, Forman D, Béranger R, Flechon A, Fervers B, Schüz J, Bray F (2014) Testicular cancer incidence to rise by 25% by 2025 in Europe? Model-based predictions in 40 countries using population-based registry data. *Eur J Cancer* **50**:831–839.
- Lima AR, Bastos ML, Carvalho M, Guedes de Pinho P (2016) Biomarker discovery in human prostate cancer: An update in metabolomics studies. *Transl Oncol* **9**:357–370.
- Lubes G, Goodarzi M (2018) GC–MS based metabolomics used for the identification of cancer volatile organic compounds as biomarkers. *J Pharm Biomed Anal* **147**:313–322.
- Mamas M, Dunn WB, Neyses L, Goodacre R (2011) The role of metabolites and metabolomics in clinically applicable biomarkers of disease. *Arch Toxicol* **85**:5–17.
- Mao S, Huang S (2013) Zinc and copper levels in bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *Biol Trace Elem Res* **153**:5–10.
- Matsuda S, Katane M, Maeda K, Kaneko K, Saitoh Y, Miyamoto T, Sekine M, Homma H (2015) Biosynthesis of d-aspartate in mammals: The rat and human homologs of mouse aspartate racemase are not responsible for the biosynthesis of d-aspartate. *Amino Acids* **47**:975–985.
- Matsumura K, Opiekun M, Oka H, Vachani A, Albelda SM, Yamazaki K, Beauchamp GK (2010) Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: a proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer. *PLoS One* **5**:e8819.
- Mills GA, Walker V (2001) Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine : application to metabolic investigations. *J Chromatogr B* **753**:259–268.

- Mishra P, Ambs S (2015) Metabolic signatures of human breast cancer. *Mol Cell Oncol* **2**:e992217.
- Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, Saruki N, Bando E, Kimura H, Imamura F, Moriyama M, Ikeda I, Chiba A, Oshita F, Imaizumi A, Yamamoto H, Miyano H, Horimoto K, Tochikubo O, Mitsushima T, Yamakado M, Okamoto N (2011) Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One* **6**:e24143.
- Mochalski P, Unterkofer K (2016) 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**:4796–4803.
- Moffatt BA, Ashihara H (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. *Arab B* **1**:e0018.
- Monteiro MS, Carvalho M, Bastos ML, Guedes de Pinho P (2013) Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges. *Curr Med Chem* **20**:257–271.
- Monteiro M, Carvalho M, Henrique R, Jeronimo C, Moreira N, de Lourdes Bastos M, Guedes de Pinho M (2014) Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma. *Eur J Cancer* **50**:1993–2002.
- Monteiro MS, Carvalho M, de Lourdes Bastos M, Guedes de Pinho PG (2014) Biomarkers in renal cell carcinoma: a metabolomics approach. *Metabolomics* **10**:1210–1222.
- Monteiro M, Moreira N, Pinto J, Pires-Luis AS, Henrique R, Jeronimo C, de Lourdes Bastos M, Gil AM, Carvalho M, Guedes de Pinho M (2017) GC-MS metabolomics-based approach for the identification of a potential VOC-biomarker panel in the urine of renal cell carcinoma patients. *J Cell Mol Med* **21**:2092–2105.
- Moret C, Dave MH, Schulz N, Jiang JX, Verrey F, Wagner CA (2007) Regulation of renal amino acid transporters during metabolic acidosis. *Am J Physiol Physiol* **292**:F555–F566.
- Morizono H, Woolston JE, Colombini M, Tuchman M (2005) The use of yeast mitochondria to study the properties of wild-type and mutant human mitochondrial ornithine transporter. *Mol Genet Metab* **86**:431–440.
- Mounicou S, Szpunar J, Lobinski R (2009) Metallomics: The concept and methodology. *Chem Soc Rev* **38**:1119–1138.
- Nakamura H, Nishikata N, Kawai N, Imaizumi A, Miyano H, Maiko M, Yamamoto H, Noguchi Y (2016) Plasma amino acid profiles in healthy East Asian subpopulations living in Japan. *Am J Hum Biol* **28**:236–239.
- Nam H, Chung BC, Kim Y, Lee K, Lee D (2009) Combining tissue transcriptomics and urine metabolomics for breast cancer biomarker identification. *Bioinformatics* **25**:3151–3157.
- Naz S, Vallejo M, Garcia A, Barbas C (2014) Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics. *J Chromatogr A* **1353**:99–105.
- O’Neal SL, Zheng W (2015) Manganese toxicity upon overexposure: a decade in review. *Curr Environ Heal reports* **2**:315–328.
- Olas B, Wachowicz B, Majsterek I, Blasiak J (2005) Resveratrol may reduce oxidative stress

- induced by platinum compounds in human plasma, blood platelets and lymphocytes. *Anticancer Drugs* **16**:659–665.
- Oun R, Moussa YE, Wheate NJ (2018) The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalt Trans* **47**:6645–6653.
- Pereira J, Silva CL, Perestrelo R, Gonçalves J, Alves V, Câmara JS (2014) Re-exploring the high-throughput potential of microextraction techniques, SPME and MEPS, as powerful strategies for medical diagnostic purposes. Innovative approaches, recent applications and future trends. *Anal Bioanal Chem* **406**:2101–2122.
- Pezonaga I, Taylor A, Dobrota M (1996) The effects of platinum chemotherapy on essential trace elements. *Eur J Cancer Care (Engl)* **5**:122–126.
- Pizent A, Čolak B, Kljaković Gašpić Z, Telišman S (2009) Prostate-Specific Antigen (PSA) in serum in relation to blood lead concentration and alcohol consumption in men. *Arh Hig Rada Toksikol* **60**:69–78.
- Pizent A, Tariba B, Živković T (2012) Reproductive toxicity of metals in men. *Arh Hig Rada Toksikol* **63**:35–46.
- Pizzimenti S, Toaldo C, Pettazzoni P, Dianzani MU, Barrera G (2010) The „Two-Faced“ effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-Hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. *Cancers (Basel)* **2**:338–363.
- Pollán M, Gustavsson P, Cano MI (2001) Incidence of testicular cancer and occupation among Swedish men gainfully employed in 1970. *Ann Epidemiol* **11**:554–562.
- Raman M, Ahmed I, Gillevet PM, Probert CS, Ratcliffe NM, Smith S, Greenwood R, Sikaroodi M, LamV, Crotty P, Bailey J, Myers RP, Rioux KP (2013) Fecal microbiome and volatile organic compound metabolome in obese humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* **11**:868–875.
- Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB (2010) Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic Biol Med* **49**:1603–1616.
- Rocha SM, Caldeira M, Carrola J, Santos M, Cruz N, Duarte IF (2012) Exploring the human urine metabolomic potentialities by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1252**:155–163.
- Rodgers KJ (2014) Non-protein amino acids and neurodegeneration: The enemy within. *Exp Neurol* **253**:192–196.
- Román DA, Pizarro I, Rivera L, Torres C, Avila J, Cortes P, Gill M (2012) Urinary excretion of platinum, arsenic and selenium of cancer patients from the Antofagasta region in Chile treated with platinum-based drugs. *BMC Res Notes* **5**:207.
- Rotter M, Brandmaier S, Prehn C, Adam J (2017) Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions. *Metabolomics* **13**:4.
- Ryg J, Nybo M, Hallas J (2013) Cancer incidence in persons with elevated cobalamin levels. *Eur J Clin Invest* **43**:557–561.
- Saude EJ, Adamko D, Rowe BH, Marrie T, Sykes BD (2007) Variation of metabolites in normal human urine. *Metabolomics* **3**:439–451.
- Schadewaldt P, Bodner-Leidecker A, Hammen HW, Wendel U (1999) Significance of L-alloisoleucine in plasma for diagnosis of maple syrup urine disease. *Clin Chem* **45**:1734–

1740.

- Schmidt K, Podmore I (2015) Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. *J Biomarkers* **2015**:16.
- Schottenfeld D, Warshauer E, Sherlock S, Zauber AG, Leder M, Payne R (1980) The epidemiology of testicular cancer in young adults. *Am J Epidemiol* **112**:232–246.
- Setkova L, Risticovic S, Linton CM, Ouyang G, Bragg LM, Pawliszyn J (2007) Solid-phase microextraction-gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry utilized for the evaluation of the new-generation super elastic fiber assemblies. *Anal Chim Acta* **581**:221–231.
- Shenkin A (2008) Basics in clinical nutrition: Physiological function and deficiency states of trace elements. *E Spen Eur E J Clin Nutr Metab* **3**:e255–e258.
- Siddik ZH (2003) Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **22**:7265–7279.
- Silva CL, Passos M, Câmara JS (2011) Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br J Cancer* **105**:1894–904.
- Silva CL, Passos M, Câmara JS (2012) Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers--a powerful strategy for breast cancer diagnosis. *Talanta* **89**:360–368.
- Song H, Hyeak C, Lee W, Cho S (2017) Simultaneous determination of volatile organic compounds (VOCs) with a wide range of polarities in urine by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **31**:613–622.
- Srivastava DSL, Mittal RD (2005) Free radical injury and antioxidant status in patients with benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *Indian J Clin Biochem* **20**:162–165.
- Struck-Lewicka W, Kordalewska M, Bujak R, Mpanga Y, Markuszewski M, Jacyna J, Matuszewski M, Kaliszan R, Markuszewski MJ (2015) Urine metabolic fingerprinting using LC-MS and GC-MS reveals metabolite changes in prostate cancer: A pilot study. *J Pharm Biomed Anal* **111**:351–361.
- Sullivan LB, Luengo A, Danai LV, Bush LN, Diehl FF, Hosios AM, Lau AN, Elmiligy S, Malstrom S, Lewis CA, Vander Heiden MG (2018) Aspartate is an endogenous metabolic limitation for tumour growth. *Nat Cell Biol* **20**:782–788.
- Surapaneni KM, Venkata GR (2006) Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with carcinoma of prostate. *Indian J Physiol Pharmacol* **50**:350–354.
- Swerdlow AJ, Higgins CD, Pike MC (1997) Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. *BMJ* **314**:1507–1511.
- Štraus B (2009) Štrausova medicinska biokemija, Medicinska naklada, Zagreb, 744.
- Štraus B (1992) Medicinska biokemija, Medicinska naklada, Zagreb, 320.
- Tanaka-Kagawa T, Kitahara J, Seko Y, Toyoda H, Imura N, Naganuma A (1999) Reduced sensitivity of HeLa cells to cis-platinum by simultaneous overexpression of copper, zinc-superoxide dismutase and catalase. *Biochem Pharmacol* **57**:545–548.
- Tariba B, Živković T, Filipović Marijić V, Erk M, Gamulin M, Pizent A (2016) Does the serum metallothionein level reflect the stage of testicular germ cell tumor? *Arch Med Res*

47:232-235.

- Tariba B, Živković T, Krasnići N, Marijić VF, Erk M, Gamulin M, Grgić M, Pizent A (2015) Serum metallothionein in patients with testicular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **75**:813-820.
- Telišman S, Čolak B, Pizent A, Jurasović J, Cvitković P (2007) Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res* **105**:256–266.
- Telišman S, Cvitković P, Jurasović J, Pizent A, Gavella M, Ročić B (2000) Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. *Environ Health Perspect* **108**:45–53.
- Telišman S, Jurasović J, Pizent A, Cvitković P (1997) Cadmium in the blood and seminal fluid of nonoccupationally exposed adult male subjects with regard to smoking habits. *Int Arch Occup Environ Health* **70**:243–248.
- Teppo H-R, Soini Y, Karihtala P (2017) Reactive oxygen species-mediated mechanisms of action of targeted cancer therapy. *Oxid Med Cell Longev* **2017**:2017.
- Topo E, Soricelli A, D’Aniello A, Ronsini S, D’Aniello G (2009) The role and molecular mechanism of D-aspartic acid in the release and synthesis of LH and testosterone in humans and rats. *Reprod Biol Endocrinol* **7**:120.
- Trigo JM, Tabernero JM, Paz-Ares L, Garcia-Liano JL, Mora J, Lianes P, Esteban E, Salazar R, Lopez-Lopez JJ, Cortes-Funes H (2000) Tumor markers at the time of recurrence in patients with germ cell tumors. *Cancer* **88**:162–168.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**:1029–1033.
- Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ (2017) Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. *Cell* **168**:657–669.
- Van Kuilenburg ABP, Van gennip AH, Van Lenthe H, Abeling NGGM, Stroomer AEM (2004) New insights in dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a pivotal role for beta-aminoisobutyric acid? *Biochem J* **379**:119–124.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**:1–40.
- Vernie LN, De Goeijj JM, Zegers C, De Vries M, Baldewg S, Mcvie JG (1988) Cisplatin-induced changes of selenium levels and glutathione peroxidase activities in blood of testis tumor patients. *Cancer Lett* **40**:83–91.
- Wang X, Wang J, Wang Z, Wang Q, Li H (2015) Dynamic monitoring of plasma amino acids in chemotherapy of patients with hematological malignancies and its clinical value. *Acta Nutr Sin* **35**:549–553.
- Wang L, Liu X, Yang Q (2018) Application of metabolomics in cancer research: as a powerful tool to screen biomarker for diagnosis, monitoring and prognosis of cancer. *Biomarkers J* **1**:1–8.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**:309–314.
- Ward ME, Politzer IR, Laseter JL, Alam SQ (1976) Gas chromatographic mass spectrometric evaluation of free organic acids in human saliva. *Biomed Mass Spectrom* **3**:77–80.
- Wargo MJ (2013) Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from pseudomonas aeruginosa. *Appl Environ Microbiol* **79**:2112–2120.

- Weiner MW, Jacobs C (1983) Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc* **42**:2974–2978.
- Wong WY, Thomas CM, Merkus JMW, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP (2000) Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertil Steril* **73**:435–442.
- Wu G (2010) Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv Nutr* **1**:31–37.
- Wu HQ, Ungerstedt U, Schwarcz R (1995) l- α -Aminoadipic acid as a regulator of kynurenic acid production in the hippocampus: a microdialysis study in freely moving rats. *Eur J Pharmacol* **281**:55–61.
- Wu H, Xue R, Dong L, Liu T, Deng C, Zeng H, Shen X (2009) Metabolomic profiling of human urine in hepatocellular carcinoma patients using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **648**:98–104.
- Xie G, Zhou B, Zhao A, Qiu Y, Zhao X, Garmire L, Shvetsov YB, Yu H, Yen Y, Jia W (2015) Lowered circulating aspartate is a metabolic feature of human breast cancer. *Oncotarget* **6**:33369–81.
- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K (2007) Cisplatin nephrotoxicity: A review. *Am J Med Sci* **334**:115–124.
- Yilmaz MI, Saglam K, Sonmez A, Gok DE, Basal S, Kilic S, Akay C, Kocar IH (2004) Antioxidant system activation in prostate cancer. *Biol Trace Elem Res* **98**:13–20.
- Yossepowitch O, Eggener SE, Bianco FJ, Carver BS, Serio A, Scardino PT, Eastham JA (2007) Radical prostatectomy for clinically localized, high risk prostatecancer: critical analysis of risk assessment methods. *J Urol* **178**:493–499.
- Yu L, Jiang C, Huang S, Gong X, Wang S, Shen P (2013) Analysis of urinary metabolites for breast cancer patients receiving chemotherapy by CE-MS coupled with on-line concentration. *Clin Biochem* **46**:1065–1073.
- Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X (2012) Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics* **75**:1079–1088.
- Zitka O, Ryvolova M, Hubalek J, Eckschlager T, Adam V, Kizek R (2012) From amino acids to proteins as targets for metal-based drugs. *Curr Drug Metab* **13**:306–320.
- Živković Semren T, Brčić Karačonji I, Safner T, Brajenović N, Tariba Lovaković B, Pizent A (2018) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions. *Talanta* **176**:537–543.
- Živković T, Tariba B, Pizent A (2014) Multielement analysis of human seminal plasma by octopole reaction cell ICP-MS. *J Anal At Spectrom* **29**:2114–2126.
- Zwart A, van Assendelft OW, Bull BS, England JM, Lewis SM, Zijlstra WG (1996) Recommendations for reference method for haemoglobinometry in human blood (ICSH standard 1995) and specifications for international haemoglobinocyanide standard (4th edition). *J Clin Pathol* **49**:271–274.

POPIS KORIŠTENIH KRATICA

Aminokiseline

Aaa	α -Aminoadipinska kiselina	His	Histidin
Aba	α -Aminomaslačna kiselina	Hly	Hidroksilizin
alle	Aloizoleucin	Ile	Izoleucin
Ala	Alanin	Leu	Leucin
Apa	α -aminopimelna kiselina	Lys	Lizin
Arg	Arginin	Met	Metionin
Asn	Asparagin	Orn	Ornitin
Asp	Asparaginska kiselina	Phe	Fenilalanin
β-AiB	β -Aminoizomaslačna kiselina	Pro	Prolin
C-C	Cistin	Sar	Sarkozin
Cis	Cistein	Ser	Serin
Cth	Cistationin	Thr	Treonin
Gln	Glutamin	Tpr	Tioprolin
Glu	Glutaminska kiselina	Trp	Triptofan
Gly	Glicin	Tyr	Tirozin
Gpr	Glicil-prolin	Val	Valin

Elementi

Al	Aluminij	Mn	Mangan
As	Arsen	Mo	Molibden
Ca	Kalcij	Na	Natrij
Cd	Kadmij	Ni	Nikal
Co	Kobalt	Pb	Olovo
Cr	Krom	Pt	Platina
Cu	Bakar	Rh	Rodij
Fe	Željezo	Sc	Skandij
Ge	Germanij	Se	Selenij
Hg	Živa	Sn	Kositar
Ir	Iridij	Tb	Terbij
K	Kalij	Tl	Talij
Lu	Lutecij	Zn	Cink
Mg	Magnezij		

AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
ANOVA	analiza varijance
AFP	alfa-fetoprotein
β-HCG	humani korionski gonadotropin
BEP	bleomicin, etopozid, cisplatina
BMI	indeks tjelesne mase
CAT	katalaza
DA	diskriminantna analiza
D_M	uopćena Mahalanobisova udaljenost
DNK	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
EP	etopozid i cisplatina
FA	faktorska analiza
GC-MS	vezani sustav plinske kromatografije i spektrometrije masa
GR	glutation reduktaza
GSH	glutation
GPx	glutation peroksidaza
GST	glutation transferaza
Hb	hemoglobin
HMDB	<i>Human Metabolome Data Base</i>
HS-SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi iz para iznad uzorka
IARC	međunarodna agencija za istraživanje raka
ICP-MS	masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC	tekućinska kromatografija
LDA	linearna diskriminantna analiza
LDH	laktat dehidrogenaza
MDS	multidimenzionalno skaliranje
MT	metalotionein
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMR	nuklearna magnetna rezonanca
PCA	analiza glavnih komponenti
RI	indeks zadržavanja
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
RT	vrijeme zadržavanja

SMPDB	<i>Small Molecule Pathway Database</i>
SOD	superoksid dismutaza
SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi
TAC	ukupni antioksidacijski kapacitet
TCA	ciklus limunske kiseline
TGCT	germinativni tumor testisa
TIC	kromatogram ukupne struje iona
TOS	ukupni oksidacijski status
VOM	hlapljivi organski metaboliti

PRILOG

Ovaj prilog sadrži dva znanstvena rada objavljena u časopisima zastupljenim u bazama Current Contents koji obrađuju problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

1. Tariba B, **Živković T**, Filipović Marijić V, Erk M, Gamulin M, Pizent A (2016) Does the serum metallothionein level reflect the stage of testicular germ cell tumor? *Archives of Medical Research* **47**:232-235.
2. **Živković Semren T**, Brčić Karačonji I, Safner T, Brajenović N, Tariba Lovaković B, Pizent A (2018) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions. *Talanta* **176**:537-543.

PRELIMINARY REPORT**Does the Serum Metallothionein Level Reflect the Stage of Testicular Germ Cell Tumor?**

Blanka Tariba,^a Tanja Živković,^a Vlatka Filipović Marijić,^b Marijana Erk,^b
Marija Gamulin,^c and Alica Pizent^a

^aAnalytical Toxicology and Mineral Metabolism Unit, Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

^bLaboratory for Biological Effects of Metals, Division for Marine and Environmental Research, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

^cDepartment of Oncology, University Hospital Centre Zagreb, Zagreb, Croatia

Received for publication January 15, 2016; accepted May 20, 2016 (ARCMED-D-16-00029).

Increased levels of metallothionein (MT) have recently been found in the blood serum of men with newly diagnosed testicular germ cell tumors (TGCT). In light of previously published results, the aim of this study was to investigate the difference in serum MT levels among patients with different stages of TGCT and compare MT with commonly used markers (α -fetoprotein, β -human chorionic gonadotropin and lactate dehydrogenase). The concentration of total MT was determined in the serum of 25 men with TGCT (seminoma or non-seminoma) by differential pulse voltammetry. Serum samples were obtained prior to chemotherapy, after two cycles of chemotherapy and 1 year after chemotherapy. A statistically significant difference in MT levels in patients with different stages of TGCT was observed in the serum of patients with non-seminoma obtained before chemotherapy. Although not significant, an increase in serum MT levels commensurate with the disease stage increase was also observed in patients with seminomatous TGCT. The results indicate that, in combination with the existing markers, MT could be useful for the identification of the histological type of tumor and stage of the disease before biopsy diagnosis. © 2016 IMSS. Published by Elsevier Inc.

Key Words: Metallothionein, Non-seminoma, Seminoma, Serum marker, Testicular germ cell tumor.

Introduction

Testicular germ cell tumors (TGCT) are uncommon but particularly important malignancies as they tend to affect children and young men, representing the most common tumor in men aged 15–35 years. Incidence rates have been increasing over the past 50 years in many industrialized populations (1,2).

Using the histopathological criteria, TGCT are classified as seminoma and non-seminoma. In addition, the stage of tumor at diagnosis is used to determine the extent or spread of the disease and to help in the diagnosis, treatment and prognosis of testicular cancer (3). In clinical practice, there are three tumor markers commonly used in the diagnosis

and prognosis of testicular cancer: α -fetoprotein (AFP), β -human chorionic gonadotropin (β -HCG) and lactate dehydrogenase (LDH) (3). Although crucial in the management of testicular cancer, these markers are not specific for testicular cancer and their values are elevated in only 51% of testicular cancer cases (4). It has also been observed that β -HCG and/or AFP are elevated at relapse in about 2/3 of patients with non-seminoma and in only 1/3 of those with seminoma, whereas LDH has limited sensitivity, specificity and positive predictive value and does not add to the early detection of relapse (5–7). Therefore, there is a need for additional, minimally invasive biomarkers to optimize individual treatments of cancer patients.

Metallothioneins (MT) are a group of low molecular mass, cysteine-rich proteins. Their enhanced synthesis in rapidly proliferating tissues suggests their crucial role in normal and neoplastic cell growth (8). Increased levels of MT in serum have been found in patients with lymphoid

Address reprint request to: Blanka Tariba, Ksaverska cesta 2, POB 291, 10000 Zagreb, Croatia; Phone: (+385) 1 4682 500; FAX: (+385) 1 4673 303; E-mail: btariba@imi.hr

leukemia, lung carcinoma, thyroid carcinoma, head and neck cancer (9,10) and prostate cancer (11). In a recently published study, we found significantly higher levels of serum MT in patients with newly diagnosed TGCT compared to healthy volunteers (12). Elevated levels of serum MT in men with newly diagnosed TGCT make MT a candidate biomarker for testicular cancer development. In an ideal case, a tumor marker reflects the body's tumor burden and subsequently increases with progressive or recurrent disease, decreases with response to treatment, and normalizes with remission (13). Therefore, in the current study, we evaluated serum MT levels among patients with different stages of TGCT in the samples obtained before chemotherapy (I), after two cycles of chemotherapy (II) and 1 year after chemotherapy (III) and compared serum MT levels with those of commonly used tumor markers (AFP, β -HCG and LDH).

Subjects and Methods

Subjects

The study population consisted of 25 men (age: 18–49 years), non-smokers, with newly diagnosed TGCT ascertained by the Department of Oncology at the University Hospital Centre, Zagreb, Croatia. Based on histological reports, the patients were classified as having seminoma or non-seminoma. After orchiectomy, patients were treated with two, three or four cycles of standard chemotherapy, every 3 weeks with bleomycin and etoposide, cisplatin (bleomycin 30 units iv weekly on days 2, 9 and 16; etoposide 100 mg/m² iv on days 1–5; cisplatin 20 mg/m² iv on days 1–5) depending on the stage of the disease (1, 2 or 3). Venous blood was sampled from each patient before any type of treatment (I), after two cycles of chemotherapy (II) and 1 year after chemotherapy (III). Levels of serum tumor markers AFP, β -HCG and LDH were determined as part of routine biochemical tests used for differential diagnosis and surveillance of patients.

Before entering the study, all subjects were informed about the aim and experimental details and provided signed consent for voluntary participation. The study was performed in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and approved by the institutional Ethics Committee.

Metallothionein Assay

MT was determined in heat-treated blood serum to enable the analysis of MTs as heat stable proteins. The concentration of total MT was determined by differential pulse voltammetry according to a modified Brdička procedure (14,15) as described in Tariba et al. (12).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 12 for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK). In order to normalize the distribution of the MT concentration data, a logarithmic transformation was applied. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was used to evaluate the difference in serum MT levels between patients with different stages of TGCT (stage 1, 2 or 3). Spearman's rank correlation (r , p) was calculated for the associations between MT and AFP, β -HCG and LDH levels. Data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion

The discovery and validation of additional markers in combination with current markers is important for improving the diagnosis and management of testicular cancer. Although AFP, β -HCG and LDH are the most commonly used serum markers for the management of TGCT, they are not very sensitive and specific because their values can also be increased in the presence of other tumors (16,17). AFP is expressed in 50–70% of non-seminomatous TGCTs, whereas in patients with pure

Table 1. Concentration of metallothionein (MT) and levels of serum tumor markers (AFP, β -HCG and LDH) (median and range) in patients with seminoma and non-seminoma before chemotherapy (I), after two cycles of chemotherapy (II) and 1 year after chemotherapy (III)

Blood sampling time	MT (mg/mL)	AFP (μ g/L)	β -HCG (IU/L)	LDH (U/L)
All patients ($n = 25$)				
I	0.55 (0.27–1.21)	5.0 (1.40–19,032.0)	1.20 (0.0–14,101.0)	201.0 (96.0–1,726.0)
II	0.64 (0.25–1.08)	3.41 (1.0–81.0)	0.0 (0.0–16.0)	179.0 (127.0–250.0)
III	0.26 (0.18–0.74)	3.0 (0.74–12.0)	0.0 (0.0–1.20)	167.0 (119.0–219.0)
Seminoma ($n = 11$)				
I	0.67 (0.27–1.21)	2.70 (1.40–11.0)	0.0 (0.0–11.0)	203.0 (96.0–665.0)
II	0.65 (0.25–0.94)	3.75 (1.0–9.0)	0.0	179.0 (127.0–236.0)
III	0.26 (0.20–0.70)	3.10 (1.20–12.0)	0.0	168.0 (138.0–190.0)
Non-seminoma ($n = 14$)				
I	0.48 (0.30–1.16)	7.0 (2.0–19,032.0)	2.60 (0.0–14,101.0)	201.0 (120.0–1,726.0)
II	0.59 (0.25–1.08)	3.31 (2.0–81.0)	0.0 (0.0–16.0)	178.5 (138.0–250.0)
III	0.26 (0.18–0.74)	2.86 (0.74–5.0)	0.0 (0.0–1.20)	166.0 (119.0–219.0)

seminoma an elevated AFP raises suspicion of the presence of non-seminomatous elements. Elevated serum β -HCG levels are typically present in both seminomas and non-seminomas, whereas LDH is a less specific marker but has an independent prognostic value in men with advanced testicular cancer (4,18). The concentration of MT found in our study and the levels of commonly used serum tumor markers (AFP, β -HCG and LDH) in patients with seminoma and non-seminoma obtained before chemotherapy (I), after two cycles of chemotherapy (II) and 1 year after chemotherapy (III) are presented in Table 1. The levels of AFP, β -HCG and LDH in the serum of our subjects obtained 1 year after chemotherapy were found to be normal in both types of TGCT (according to the American Joint Committee on Cancer, 2010).

The values obtained for MT in TGCT patients (before and after therapy) were significantly higher than those measured in the serum of healthy volunteers (median and range 0.412 (0.230–0.687) mg/mL) (published in Tariba et al. 2015). In patients with germ cell tumors,

the level of commonly used tumor markers usually reflects the stage of the disease (3,19). Figure 1 indicates an increase in the serum MT concentration commensurate with cancer stage increase (stage 1, 2 or 3), when all patients (Figure 1A), patients with seminoma (Figure 1B) and patients with non-seminoma (Figure 1C) were considered. According to the results of one-way ANOVA, there is a statistically significant difference in serum MT levels across different stages of TGCT in the samples of patients with non-seminoma obtained before chemotherapy. In the available literature there are no similar results for comparison. The existing data on MT levels in testicular cancer patients come from the studies that investigated the levels of MT using immunohistochemical staining in TGCT specimens obtained after radical orchiectomy. The most recent results of a meta-analytical approach, which comprises the data from these studies for the evaluation of immunohistochemically determined MT as a cancer biomarker, found no association between MT staining and tumor stage in TGCT (20).

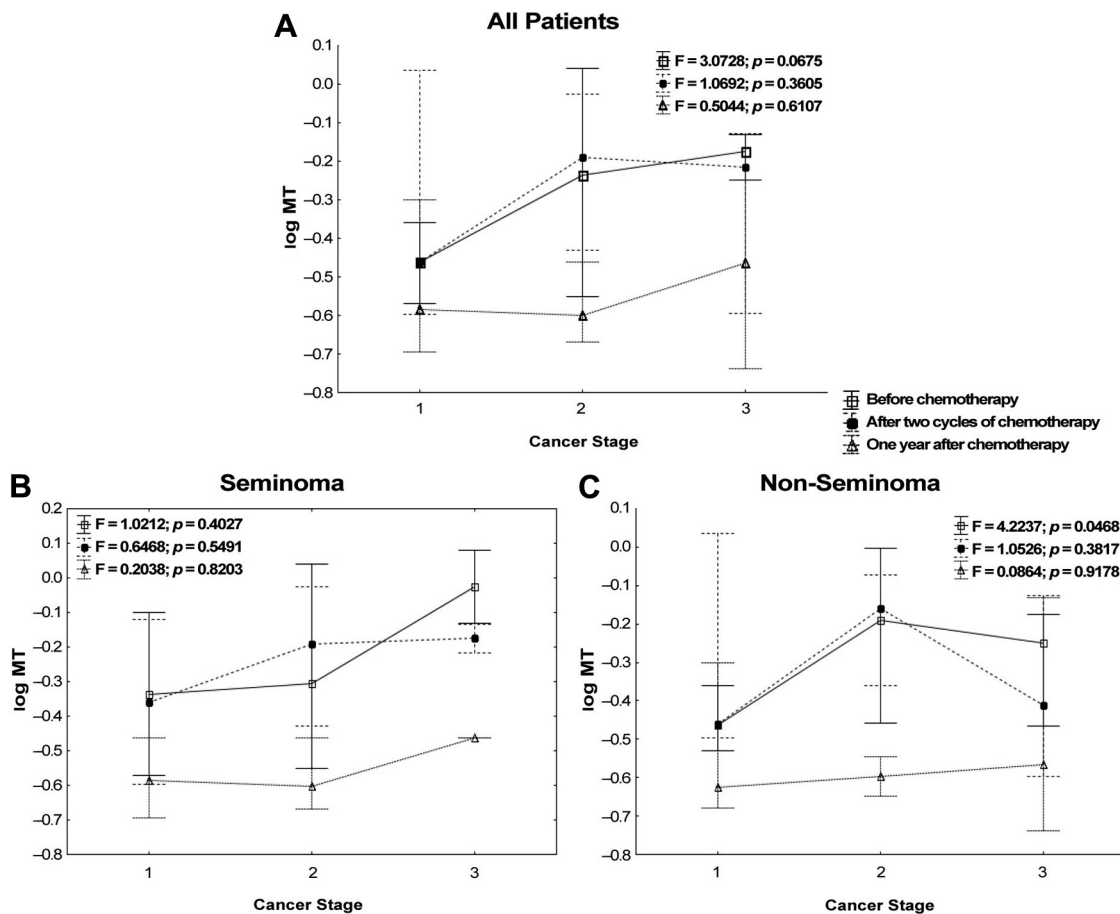


Figure 1. Concentrations of metallothionein (MT) (log transformed) in serum of patients with different stage of testicular germ cell tumor (stage 1, 2 or 3) obtained before chemotherapy, after two cycles of chemotherapy and 1 year after chemotherapy. (A) All patients. (B) Patients with seminoma. (C) Patients with non-seminoma. Full dot, square and triangle represent mean values, whereas vertical bars denote 0.95 confidence intervals. Data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

We found a significant positive correlation between MT and AFP levels in all patients ($r = 0.594$, $p < 0.04$) and in seminoma patients ($r = 0.886$, $p < 0.02$) only in the samples obtained after two cycles of chemotherapy, whereas no significant correlation was found between these parameters before chemotherapy or 1 year after chemotherapy. No significant correlation was found between MT levels and β -HCG and LDH. The lack of significant correlation between the levels of MT and serum tumor markers in newly diagnosed TGCT patients suggests that the diagnostic value of MT is independent from that of commonly used testicular cancer markers.

Conclusion

Our results indicate the potential of serum MT as an additional marker that could provide helpful information for adequate management and treatment of TGCT, including early diagnosis, determination of histological type and stage of the disease. Nevertheless, based on the limited results, we cannot unambiguously assert that serum MT is a suitable marker for TGCT. The low number of patients may be considered a limiting factor for the power of the study. In particular, the lack of statistical significance between groups might be attributed to the inclusion of a limited number of patients. Additional studies including a larger number of subjects as well as patients with disease relapse are needed to further elucidate the significance of MT as a testicular cancer marker.

Acknowledgments

This research was supported by the Croatian Ministry of Science, Education and Sports (Grant Number 022-0222411-2408).

Conflict of interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Chia VM, Quraishi SM, Devesa SS, et al. International trends in the incidence of testicular cancer, 1973–2002. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1151–1159.
2. Bray F, Richiardi L, Ekblom A, et al. Trends in testicular cancer incidence and mortality in 22 European countries: continuing increases in

- incidence and declines in mortality. *Int J Cancer* 2006;118:3099–3111.
3. American Joint Committee on Cancer. *Cancer Staging Manual*. 7th ed Berlin: Springer Science and Business Media LLC; 2010.
4. Vasdev N, Thorpe A. Testicular germ cell tumours—A European and UK perspective. In: Matin A, ed. *Germ Cell Tumor*. Rijeka: InTech; 2012. pp. 59–72.
5. Ackers C, Rustin GJS. Lactate dehydrogenase is not a useful marker for relapse in patients on surveillance for stage I germ cell tumours. *Br J Cancer* 2006;94:1231–1232.
6. Venkitaraman R, Johnson B, Huddart RA, et al. The utility of lactate dehydrogenase in the follow-up of testicular germ cell tumours. *BJU Int* 2007;100:30–32.
7. van As NJ, Gilbert DC, Money-Kyrle J, et al. Evidence-based pragmatic guidelines for the follow-up of testicular cancer: optimising the detection of relapse. *Br J Cancer* 2008;98:1894–1902.
8. Jin R. Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis* 2002;23:81–86.
9. Fabrik I, Krizkova S, Huska D, et al. Employment of electrochemical techniques for metallothionein determination in tumor cell lines and patients with a tumor disease. *Electroanalysis* 2008;20:1521–1532.
10. Krejcova L, Fabrik I, Hynek D, et al. Metallothionein electrochemically determined using Brdicka reaction as a promising blood marker of head and neck malignant tumours. *Int J Electrochem Sci* 2012;7:1767–1784.
11. Krizkova S, Ryvolova M, Gumulec J, et al. Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis* 2011;32:1952–1961.
12. Tariba B, Živković T, Krasnići N, et al. Serum metallothionein in patients with testicular cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:813–820.
13. Handy B. The clinical utility of tumor markers. *Lab Med* 2009;40:99–103.
14. Raspor B. Elucidation of the mechanism of the Brdicka reaction. *J Electroanal Chem* 2001;503:159–162.
15. Raspor B, Paic M, Erk M. Analysis of metallothioneins by the modified Brdicka procedure. *Talanta* 2001;55:109–115.
16. Colli A, Fraquelli M, Casazza G, et al. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2006;101:513–523.
17. Kim HS, Lee HE, Yang H-K, et al. High lactate dehydrogenase 5 expression correlates with high tumoral and stromal vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer. *Pathobiology* 2014;81:78–85.
18. Leman ES, Gonzalgo ML. Prognostic features and markers for testicular cancer management. *Indian J Urol* 2010;26:76–81.
19. Perkins G, Slater E, Sanders G, et al. Serum tumor markers. *Am Fam Physician* 2003;68:1075–1082.
20. Gumulec J, Raudenska M, Adam V, et al. Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9:e85346.



Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions

Tanja Živković Semren^a, Irena Brčić Karačonji^a, Toni Safner^b, Nataša Brajenović^a,
Blanka Tariba Lovaković^{a,*}, Alica Pizent^a

^a Analytical Toxicology and Mineral Metabolism Unit, Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska c. 2, HR-10001 Zagreb, Croatia

^b Department of Plant Breeding Genetics, Biometrics and Experimentation, University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Svetošimunska cesta 25, HR-10000 Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Keywords:

Volatile organic metabolites
Urine samples
HS-SPME procedure
Sample stability
Metabolomic

ABSTRACT

Non-targeted metabolomics research of human volatile urinary metabolome can be used to identify potential biomarkers associated with the changes in metabolism related to various health disorders. To ensure reliable analysis of urinary volatile organic metabolites (VOMs) by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), parameters affecting the headspace-solid phase microextraction (HS-SPME) procedure have been evaluated and optimized. The influence of incubation and extraction temperatures and times, coating fibre material and salt addition on SPME efficiency was investigated by multivariate optimization methods using reduced factorial and Doehlert matrix designs. The results showed optimum values for temperature to be 60 °C, extraction time 50 min, and incubation time 35 min. The proposed conditions were applied to investigate urine samples' stability regarding different storage conditions and freeze-thaw processes. The sum of peak areas of urine samples stored at 4 °C, –20 °C, and –80 °C up to six months showed a time dependent decrease over time although storage at –80 °C resulted in a slight non-significant reduction comparing to the fresh sample. However, due to the volatile nature of the analysed compounds, more than two cycles of freezing/thawing of the sample stored for six months at –80 °C should be avoided whenever possible.

1. Introduction

Metabolome is a complete set of metabolites (low molecular weight compounds) produced by cells and organisms, which varies according to the physiology, development or pathological state of the cell, tissue, organ or organism. Accordingly, metabolomics is the comprehensive analysis of metabolome of an isolated organism, cell system, tissue, or biological fluid [1]. Because metabolome is highly complex, it is hardly possible to analyse all metabolites in one single analysis.

Metabolomic techniques can be used as a powerful and reliable tool for the identification of biomarkers that are different between two samples under different biological conditions. Over the last few years non-targeted metabolomics research of human volatile urinary metabolome has attracted a great amount of scientific interest, particularly in oncological studies. Namely, cancer cells can produce some specific volatile metabolites that are not produced by healthy cells during normal physiological process and/or alter their concentration [2–4]. Several studies indicate that the profile of volatile organic metabolites

(VOM) in urine may be useful to discriminate cancer patients from healthy subjects and the difference in VOM level can be potentially used for diagnostic and/or prognostic purposes. For example, VOMs in urine are considered potential cancer biomarkers in lung cancer [2], breast cancer [5], and renal cell carcinoma studies [6].

VOMs in urine are chemically very diverse. They include alcohols, aldehydes, furans, ketones, pyrroles, terpenes, and other heterocyclic compounds. These compounds generally contain up to twelve carbon atoms and are characterized by low molecular weight and boiling point less than 300 °C [7]. VOMs are concentrated in the kidneys before excretion so urine is a rich source of these compounds [8]. Another advantage of urine is its non-invasive sampling.

Analysis of VOMs in urine requires a procedure with good sensitivity and without sample losses and contamination. The development of solid-phase microextraction (SPME), which was introduced by Arthur and Pawliszyn [9], contributed to the simplification of sample preparation since it integrates sampling, extraction, concentration, and sample introduction in a single step. The headspace-SPME

* Corresponding author.

E-mail address: btariba@imi.hr (B. Tariba Lovaković).

(HS-SPME) technique of solvent-free sample preparation coupled with gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) proved to be most successful in VOM analysis [5,6]. SPME efficiency depends on several factors that can be optimized such as chemical nature of the compounds to be extracted (not changeable), the temperature of incubation and extraction, the coating material of the fibre, the incubation and extraction times, and the salting-out effect [10]. Optimization of the HS-SPME method for VOM analysis in urine generally involves examining the effect of one parameter at a time while all other variables are constant [5]. However, it is difficult and time consuming to study all these variables individually to obtain the best possible conditions. Multivariate optimization design methods offer a simultaneous study of several control variables and their interactions thus reducing the number of experiments in the SPME method optimization.

To the best of our knowledge, this is the first time that the combination of reduced factorial and Doehlert matrix designs was applied to optimize the SPME method for the extraction of the urinary volatile metabolome. Apart from a recently published study that used freeze-drying as its storage method [11], ours are the first data on VOM stability in urine with regard to sample handling and different storage conditions.

The aims of the current study were therefore to optimize the HS-SPME method using a multivariate design approach for urinary VOM analysis by GC-MS and to test whether different storage conditions [refrigerator (4 °C), freeze (−20 °C), or deep-freeze (−80 °C)] had a significant effect on the changes of urinary metabolites' concentration over time.

2. Material and methods

2.1. Reagents and materials

The following commercial chemicals were used: Suprapur nitric acid (65% HNO₃) from Merck (Darmstadt, Germany); hydrochloric acid (HCl) from VWR International (West Chester, PA, USA); sodium chloride (NaCl) from Kemika (Zagreb, Croatia) and alkane standard solution containing C₈–C₂₀ alkanes of 40 mg/L concentration in hexane from Fluka (Buchs, Switzerland). Clear glass 5 mL SPME vials (20.5 mm × 38 mm) with crimp caps were products of Macherey-Nagel GmbH & Co. (Düren, Germany) and grey butyl rubber septa with 20 mm diameter were product of Supelco (Bellefonte, USA). The thermoblock used for temperature control of HS-SPME extraction was supplied from Barnstead/Lab Line (Melrose Park, IL, USA). The commercial SPME holder for manual use and fibres coated with 100 µm polydimethylsiloxane (PDMS), 65 µm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), and 75 µm Carboxen/PDMS were purchased from Supelco (Bellefonte, USA). The fibres were conditioned by heating in the injection port of GC as recommended by the manufacturer and the blank level was checked before the first daily analysis.

2.2. Urine samples

Urine samples were obtained from three healthy male volunteers aged 26, 36, and 39 years who were on a mixed diet. All subjects were informed of the aim of the study and their written consent was obtained before inclusion in the study. The study was approved by the Institutional Ethics Committee and was performed in accordance with the Declaration of Helsinki.

Mid-stream urine samples were collected in the morning in plastic (phthalate free) vials filled completely to avoid any loss of volatile compounds. Nitric acid was used for adjusting the urine pH to 2–3.

A control sample was prepared according to Gika et al. [12] by pooling equal volumes from each of the three samples. This pool sample was analysed the same way as other samples. Pooled urine was used to provide a representative sample containing all the analytes that

will be encountered during the analysis.

2.3. GC-MS analysis

The analyses of volatile compounds were carried out using a Trace 1300 gas chromatograph (Thermo Scientific, Milan, Italy) coupled to a ITQ 700 ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific, Austin, TX, USA). Chromatographic separation was performed on a TG-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm ID, 0.25 µm film thickness; Thermo Scientific, Runcorn, UK). The following chromatographic program was used: the oven temperature was held for 2 min at 40 °C, then increased to 150 °C at a rate of 5 °C/min (held for 2 min), then to 250 °C at a rate of 7 °C/min followed by an increase of 50 °C/min to 310 °C. The final oven temperature of 310 °C eluted all of the extracted compounds from the column, which was confirmed with the analysis of the blank sample after the urine sample. The carrier gas (He) flow was constant at 1 mL/min. The injection port was operated in the splitless mode at 280 °C. The operating conditions for the MS system were as follows: electron ionization mode at the energy of 70 eV; transfer line and ion source temperatures were 260 °C and 200 °C, respectively; full scan mode with a scan range of *m/z* 30–400 was used for data acquisition.

To detect detector drift and to control the inertness of the analytical system [13], C₈–C₂₀ alkanes were used as reference standards. These were analysed after the last daily analysis in order to verify instrument conditions throughout the entire experiment.

2.4. Experimental procedure

The sum of peak areas of analytes with different volatile and polar characteristics selected across the entire GC chromatogram was considered for sample preparation optimization to accomplish the best SPME performance conditions during method development. The experimental conditions that achieved the highest sum of peak areas were selected. The peak area of the selected compounds was calculated by internally processing the setup method of the Xcalibur software (ver. 2.1, Thermo Scientific, San Jose, CA, USA).

The optimized HS-SPME GC-MS procedure was validated in terms of precision, and was applied for the evaluation of the storage conditions impact on VOM concentration in urine samples. Measurements were performed in duplicate.

2.4.1. Optimization of HS-SPME conditions

The optimization procedure involved the selection of those experimental parameters that were important for the SPME extraction efficiency.

In the preliminary experiment, SPME fibres with three different coatings (100 µm-PDMS, 65 µm-PDMS/DVB, and 75 µm-Carboxen/PDMS) were compared in terms of their extraction efficiency. Extraction was performed by exposing the fibres to the headspace of 2 mL of acidified urine sample with 1 g of NaCl for 60 min at 60 °C after one hour incubation. In further experiments, Carboxen/PDMS fibre was used since it revealed the best VOM extraction efficiency.

To obtain the HS-SPME procedure with a maximum response area of the detected peak for VOM extraction from urine samples, the influence of NaCl amount (0.1, 0.5, and 1 g), agitation time prior to incubation (10, 65, and 120 s), incubation and extraction temperature (40, 60, and 80 °C), and incubation (10, 35, and 60 min) and extraction (10, 35, and 60 min) times were studied (Table 1). The minimum and maximum levels of each of the studied variables were arbitrarily selected to cover a wide range of experimental conditions, and the corresponding central points of factorial design were examined.

As an initial step, a 2^{5−1} reduced factorial design was performed to evaluate significant variables involved in HS-SPME. Optimization of sample preparation was evaluated on the total sum of 25 selected peak areas of VOMs covering the entire GC chromatogram (25 VOMs)

Table 1

The minimum, central point, and maximum ranges for each variable of interest for optimization of the HS-SPME procedure.

Factor	Min	Central point	Max
Agitation time / s	10	65	120
Incubation time / min	10	35	60
Extraction time / min	10	35	60
Temperature / °C	40	60	80
NaCl / g	0.10	0.55	1.00

obtained in the GC-MS analysis. Peak selection criteria were different retention time and volatility characteristics for each peak area, as well as relative standard deviation (RSD) under 30%, as suggested by Naz et al. [14]. It is also important that the compounds considered for method optimization originate from the urine sample rather than the fibre or the column. This is a common approach employed when developing methods to allow non-target analysis of complex matrices [15]. The selected 25 VOMs were identified by comparing their mass spectra to the mass spectra of reference compounds in the US National Institute of Standards and Technology (NIST) using the Automated Mass Spectral Deconvolution System (AMDIS) and Kovats retention index. Setkova et al. [16] showed that the optimal temperature significantly differs for various volatile compounds because two opposite phenomena take place when the extraction temperature is higher. The rate of analyte transfer towards the fibre increases and the distribution constant of the analyte between the headspace and the fibre coating decreases, which might cause a significant decrease in the method's sensitivity, depending on which phenomenon predominates. To evaluate the effect of temperature on the extraction of VOMs in more detail, one more set of analyses was carried out on the sum of peak areas of the first 15 more volatile metabolites (15 VOMs) obtained in the GC-MS analysis.

Once significant variables influencing HS-SPME were retained, an additional experiment based on Doehlert design was performed to estimate their optimal values affecting the total sum of selected peak areas of 25 VOMs and 15 VOMs. Doehlert designs comprise experimental designs with which different factors can be studied at different numbers of levels. They are attractive for treating those problems for which specific information about the system indicate that some factors deserve more attention than others [17]. The chosen design allows the region around the optimal response to be described by means of uniform distribution of the experiments in a three-dimensional space.

2.4.2. Method validation

Precision is a parameter that is possible to test. Precision was calculated and expressed as the relative standard deviation (RSD %) of six replicates of a fresh control sample.

2.4.3. Sample stability study

To perform a sample stability study, the collected urine samples were aliquoted into separate tubes and stored until analysis in sets. One set contained three individual samples and a control sample comprised of pooled individual samples.

The study design is summarized in Fig. 1. Sets were stored up to six months in a refrigerator (4 °C), in a freezer (−20 °C) and in a deep-freezer (−80 °C). Sample stability was determined by analysing a stored set of samples. The first set of samples (fresh samples) was analysed on the day of collection, and the other sets were analysed one week, one month, three months, and six months after collection (Fig. 1a).

Freeze-thaw stability was determined using urine samples collected in the same way as for the six months stability test. Eight sets of urine samples were stored (four sets at −20 °C and four at −80 °C) and then underwent one to four freeze-thaw cycles during six months (Fig. 1b). The first freeze-thaw cycle was after one week, the second after one month, the third after three months and the fourth after six months.

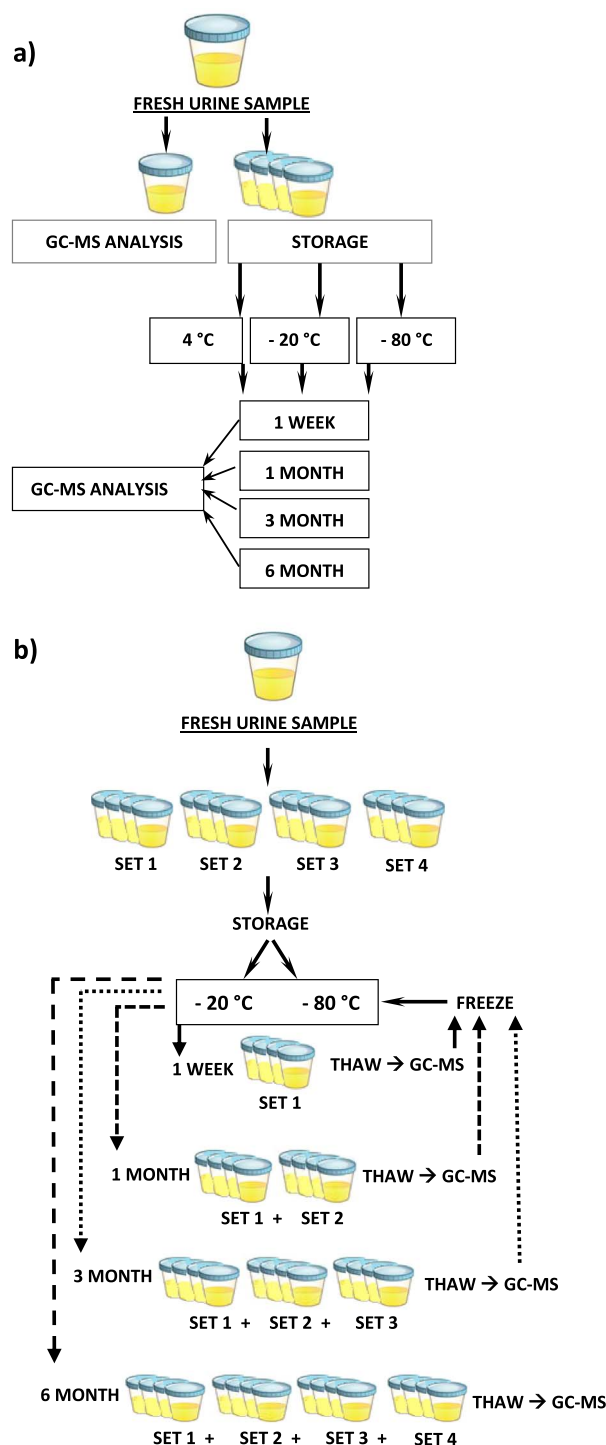


Fig. 1. Design of the sample stability study. Urine samples and pooled urine sample were stored at 4 °C, −20 °C, and −80 °C for one week, one, three, and six months. For freeze and thaw stability study samples underwent one to four freeze-thaw cycles during six months.

Samples were analysed after each freeze-thaw cycle.

The sum of peak areas of the chosen analytes obtained in fresh samples was used as reference to determine the relative stability of the stored sets of samples. For an overall comparison between sets, the sum of peak areas of analytes identified for different storage conditions was divided by the sum of peak areas in a fresh urine sample(s).

2.5. Statistical analysis

The design of the implemented experiments utilized for SPME method optimization (reduced factorial and Doehlert matrix designs) was completed by employing Minitab 17 and SAS 9.4. software (SAS Institute, Cary NC). For both sets of experiments, the significance of the analysed factors and their one-way interactions on the total sum of 25 selected peak areas and the sum of 15 peak areas for selected VOMs was assessed using factorial regression in Minitab 17 and SAS 9.4. software. Statistical analyses used in the sample stability study were performed using Statistica for Windows (release 13; StatSoft, Tulsa, OK, USA). A Shapiro test indicated that the data were not normally distributed. Thus, the Mann–Whitney *U* test was applied for comparing the sum of peak areas of metabolites reported by each treatment in relation to the sum of peak areas in fresh samples. All tests were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Experimental conditions optimization for HS-SPME procedure

The efficiency of the SPME extraction method depends mainly on the distribution constant of analytes partitioned between the fibre coating and the sample matrix. Therefore, the selection of fibre coating and the sample matrix is very important for the SPME method development. Several commercially available types of fibre (100 μm -PDMS, 65 μm -PDMS/DVB and 75 μm -Carboxen/PDMS) were tested for efficiency by comparing their peak area. The Carboxen/PDMS fibre proved to be the most suitable for our study due to its broad specificity and sensitivity. Other authors also found that this type of fibre is able to reach the widest coverage of volatile compounds [5,8]. Total ion mass chromatogram of the control sample (prepared by pooling equal volumes from three individual samples) is shown in Fig. 2.

3.1.1. Evaluation of significant variables (factors) involved in HS-SPME

The Pareto charts in Fig. 3 show the contribution of each analysed factor and interactions between certain factors to the total peak area of 25 VOMs and 15 VOMs. Parameters with a standardized effect extending beyond the vertical line were considered statistically significant.

Results showed a statistically significant influence of incubation time (B), extraction time (C), temperature (D), and NaCl amount (E) on the sum of peak areas corresponding to both 25 and 15 VOMs, whereas the influence of agitation time (A) was not statistically significant. In addition, all one-way interactions except the interactions between extraction time and NaCl amount (CE), agitation time and NaCl amount (AE), and agitation time and incubation time (AB) significantly

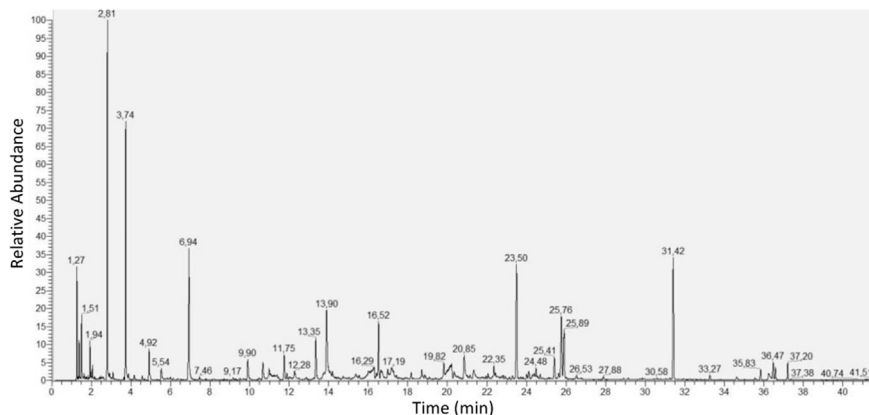


Fig. 2. Total ion mass chromatogram of the control urine sample (prepared by pooling equal volumes from three individual samples) analysed on the day of collection.

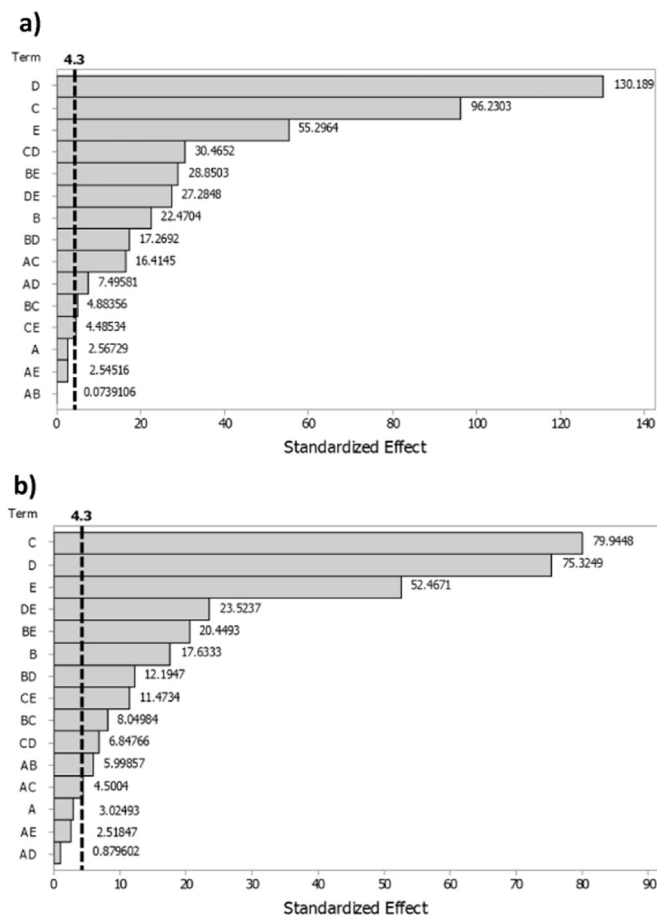


Fig. 3. Pareto charts of the standardized effects of a 2^{5-1} factorial design for: a) the total chromatographic peak area corresponding to 25 VOMs selected for the HS-SPME method optimization and b) the sum of peak areas for 15 VOMs. Effects are labelled with letters: A - agitation time, B - incubation time, C - extraction time, D - temperature, E - NaCl amount. One way interactions between the effects are labelled with letter combinations.

influenced the sum of peak areas of 25 VOMs. Similarly, all one way interactions except the ones between agitation time and temperature (AD), and NaCl concentration (AE) and extraction time (AC) were statistically significant for the peak area of 15 VOMs.

3.1.2. Optimal levels of variables important for HS-SPME efficiency

According to the results of a reduced factorial design (Fig. 3), four single variables that affected HS-SPME efficiency the most were incubation (B) and extraction time (C), temperature (D), and amount

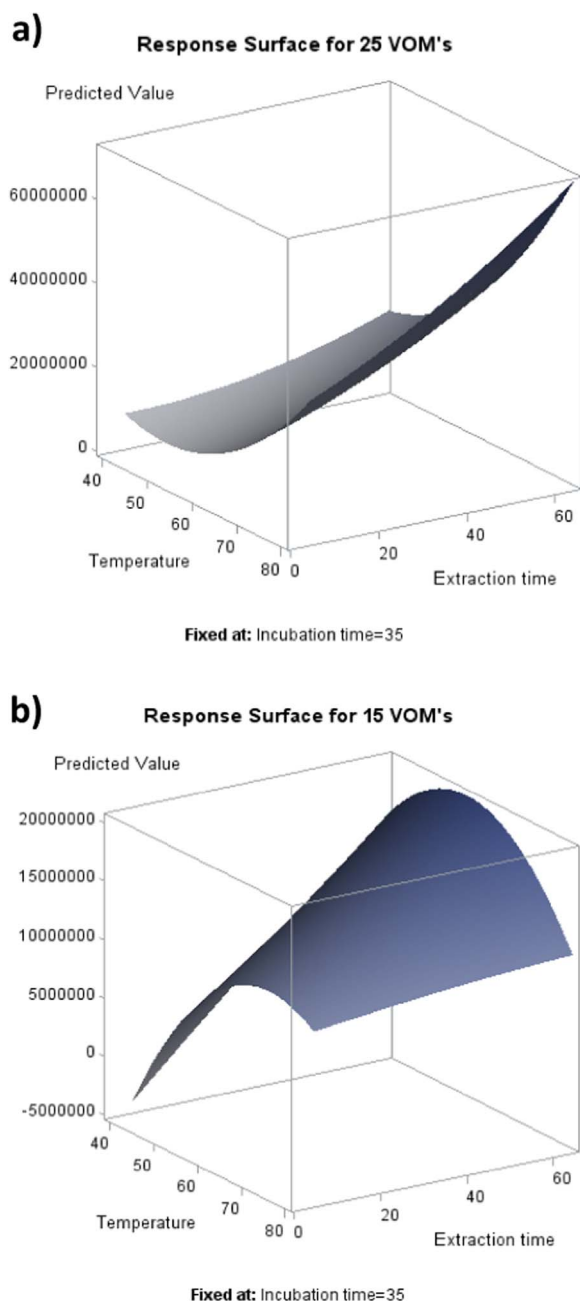


Fig. 4. Response surface plots of the sum of peak areas corresponding to a) 25 VOMs and b) 15 VOMs.

of NaCl (E). It was observed that the sum of peak areas increased as the amount of NaCl increased. Since the amount of 1 g of NaCl in 2 mL urine sample was enough to achieve a saturated solution, this amount of NaCl was selected and there was no need for further optimization of this variable. Therefore, other highly influencing variables, such as incubation and extraction time and temperature, were further optimized through the utilization of a third order Doehlert design.

Response surface analysis was performed to find the optimal values of the selected variables. Fig. 4 illustrates response surface plots of the sum of peak areas corresponding to the selected 25 VOMs (Fig. 4a) and 15 VOMs (Fig. 4b). The estimated ridge of maximum response for the sum of peak areas corresponding to 25 VOMs predicted by the model showed optimum values to be an extraction time between 44 and 46 min, temperature between 72 and 75 °C, and incubation time between 35 and 36 min. Regarding the sum of peak areas for 15 VOMs, the model predicts that the optimal response is defined with an

extraction time between 50 and 60 min, temperature between 58 and 60 °C, and incubation time between 34 and 35 min. To plot the response surface, incubation time was fixed at 35 min because it was the variable with the least impact on the sum of peak areas and it had similar estimated optimal levels in both models.

The incubation time of 35 min was chosen for further analysis in accordance with the predicted model. In a recent study by Monteiro et al. [6], it has been shown that incubation time does not have a significant influence on sample preparation.

A temperature of 60 °C was selected as a compromise condition to ensure efficient extraction of both 25 VOMs and 15 VOMs. In a study by Monteiro et al. [6], the authors used 68 °C as the optimal incubation and extraction temperature while Silva et al. [5] and Mills and Walker [8] chose 50 °C as the incubation and extraction temperature since at higher temperatures a decrease in the peak area was observed. The use of higher temperatures may enrich the volatile extract with less volatile metabolites but at the same time it may lead to a loss of more thermolabile metabolites [6]. Setkova et al. [16] have also showed that the optimal temperature significantly differs for various volatile compounds because two opposite phenomena take place when the extraction temperature increases. The rate of analyte transfer towards the fibre increases and the distribution constant of the analyte between the headspace and the fibre coating decreases, which might cause a significant decrease in the method's sensitivity, depending on which phenomenon predominates. The temperature chosen in our study (60 °C) proved to be satisfactory for the preferred analysis.

Further, the extraction time of 50 min was chosen as the optimum value for the extraction of both 25 VOMs and 15 VOMs. This is in accordance with Silva et al. [5] who concluded that at 50 °C more than 45 min of extraction are needed to reach equilibrium between the samples and the fibre.

3.1.3. Final HS-SPME procedure

After the evaluation of experimental conditions, the following procedure was found to be optimal for VOM extraction from urine samples: 2 mL of urine sample adjusted to pH = 2–3 are added to a 5 mL SPME vial containing 1 g of NaCl. The vial was sealed with PTFE septum and holed aluminium cap and mixed for 120 s. The vial was then placed in a thermoblock at a temperature of 60 °C. After 35 min of incubation, an SPME needle was passed through the septum and the 75 µm-Carboxen/PDMS fibre was exposed to the headspace above the urine for 50 min. After extraction, the SPME fibre was withdrawn into the needle, removed from the vial and inserted into the injector port of the GC-MS system for 10 min where the analytes were thermally desorbed at 280 °C and transferred to the analytical column.

The final GC and MS conditions allowed good separation of the chosen analytes, as well as a narrow peak's shape with low background noise.

3.2. Precision

In non-targeted metabolomics, analysis precision is the only parameter that is possible to calculate regarding the analytical validation of the procedure. The metabolite peak areas present in the pool sample that covered all retention times through the entire GC chromatogram were considered for further analysis. Naz et al. [14] suggest that RSD values for non-targeted metabolomics analysis by liquid chromatography-MS (LC-MS) should be under 30% and that ions with higher RSD are not suitable biomarkers due to high variability. Therefore, VOMs present in more than 70% of individual samples and with a RSD lower than 30% were included in further analyses.

The RSD of peak areas in six replicate analyses was less than 10% for the 30/57 peaks (53%), less than 20% for 21/57 (37%) peaks, and less than 30% for all the remaining 6/57 (10%) peaks.

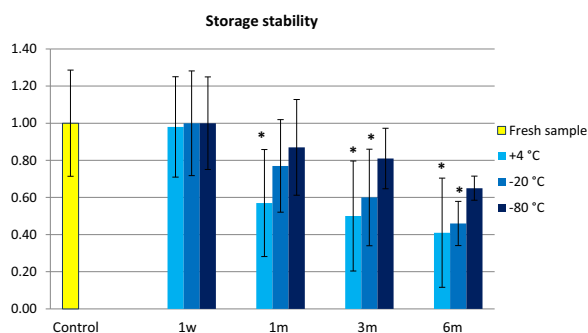


Fig. 5. Storage stability of urine samples stored at 4 °C, -20 °C, and -80 °C for one week (1w), one month (1 m), three months (3 m), and six months (6 m). Mean and standard deviation of the relative peak areas of four urine samples. Mann-Whitney *U*-test, **p* < 0.05 compared to fresh sample (control).

3.3. Urine sample stability

The proper storage of samples and the information on sample stability during storage and analysis is indispensable for yielding valid results. The same sample may also need to be analysed several times during certain time period in order to collect additional information using different analytical methods or to identify new biomarker molecules. The optimized method was further applied to evaluate the impact of storage duration, storage temperature, and freeze-thaw process on the areas of 57 peaks from the urine samples.

3.3.1. Storage stability at 4 °C, -20 °C, and -80 °C

The samples obtained from the three subjects and the pooled sample (sample four) were analysed after storage for one week, one, three, and six months at 4 °C, -20 °C, and -80 °C as described in the Experimental part of the study (Fig. 1). The obtained chromatograms were compared with the chromatograms of fresh samples. A total of 57 peaks were chosen to evaluate storage stability. A decrease in the sum of peak areas is expressed as the relative peak area using fresh urine sample as baseline reference with a ratio of 1 and the results are shown in Fig. 5. The storage of urine in a refrigerator (4 °C) resulted in the biggest reduction of the sum of peak areas regardless of the storage duration with a significant decrease when stored for one month and longer. Storage at -20 °C resulted in a significant reduction of the sum of peak areas after three months (40% decrease) and six months (54% decrease), while -80 °C showed to be the best temperature for sample storage resulting in the lowest reduction of the sum of peak areas (Fig. 5). Results showed an obvious time dependent decrease in the sum of peak areas over time, but storage at -80 °C resulted in a urine sample that best reflected the metabolite profile of the fresh sample. A decrease in the sum of peak areas, ranging from 13% to 35% in the samples stored at -80 °C shows that it is hard to preserve samples irrespective of the temperature of sample storage. Significant differences between total peak areas obtained in the samples stored at 4 °C compared to the fresh samples suggest that this temperature is not reliable for sample storage longer than one week. The temperatures of -20 °C and -80 °C show a comparable percentage of the change in the total peak area up to one month of storage, although the temperature of -80 °C showed a lower reduction in the sum of peak areas. These results suggest that for a non-targeted analysis of VOMs the storage temperature of -80 °C provides the best sample stability over six months. For metabolomics studies, with the aim to compare the concentrations of VOMs, analysis of fresh samples is the best approach, but this is rarely possible.

Gika et al. [12] examined sample stability by LC-MS and UPLC-MS for up to six months at -20 °C and -80 °C and concluded that storing human urine for up to six months at -20 °C or below is suitable for metabolomics studies. Differences between the profiles of urine stored at -20 °C and -80 °C were not found by either LC or UPLC-MS. Saude

and Sykes [18] analysed human urine samples by NMR. Urine was stored at 22 °C, 4 °C, and -80 °C and stability was examined over a four week period. Urine stored at room temperature (22 °C) had a significant change in the number of metabolites, while storage in the refrigerator (4 °C) showed a slight reduction in the degree of metabolite change. Storage of urine at -80 °C resulted in a metabolic profile similar to the profile obtained in fresh samples. Rotter et al. [19] also investigated the stability of metabolite profiles in urine samples under different storage conditions. Samples were stored at -80, -20, 4, 9, and 20 °C for 0, 2, 8, and 24 h. Metabolite concentrations were quantified with flow injection electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry (FIA-ESI-MS/MS) using the Absolute IDQ™ p150 assay. They concluded that 78% of quantified metabolites were stable under all examined storage conditions and storing urine samples at 9 °C and 20 °C for more than 8 h should be avoided. Our results indicated that the urine samples for VOM analysis could be stored for up to six months only if stored at -80 °C due to the volatile nature of the analysed compounds, which are more prone to change compared to the less volatile compounds studied by others.

3.3.2. Freeze-thaw stability

There is a significant risk of losing volatiles during the freeze-thaw process, which may change the sample VOM profile. The samples were subject to freeze-thaw processes as described in the Experimental part of the study. The sum of 57 peak areas in the samples stored at -20 °C and -80 °C and thawed one, two, three, and four times after one week, one month, three months, and six months, respectively, were compared with the sum of peak areas found in the fresh sample. The difference between the sums of peak areas in the fresh sample (baseline reference with a ratio of 1) compared to those analysed after a number of freeze-thaw cycles are shown in Fig. 6. The results show that the freeze-thaw process affects sample stability. When samples were stored at -20 °C for more than one month, a significant decrease in the sum of peak areas was observed regardless of the number of freeze/thaw cycles. The

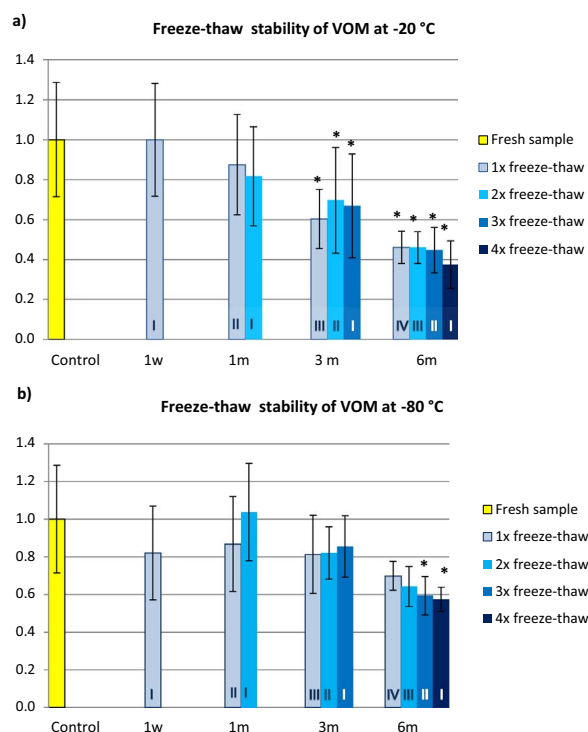


Fig. 6. Freeze-thaw stability of VOMs in urine samples stored at a) -20 °C and b) -80 °C for one week (1w), one month (1 m), three months (3 m), and six months (6 m), subjected to one to four freeze-thaw cycles. Roman numerals indicate the number of the set of samples. Mean and standard deviation of the relative peak area of four urine samples. Mann-Whitney *U*-test, **p* < 0.05 compared to fresh sample (control).

urine samples stored at -80°C that underwent repeated cycles of freeze/thaw over six months had a lower degree of metabolite change when compared with urine stored at -20°C . The results show that three freeze/thaw cycles are acceptable if urine samples are stored at -80°C up to three months. A significant decrease after six-month storage was observed for three and four freeze/thaw cycles. Hence, more than two cycles of freezing/thawing of the sample that was stored for six months at -80°C should be avoided if possible.

In a study by Gika et al. [12], subjecting human urine samples to one to nine freeze/thaw cycles, followed by an LC or UPLC-MS analysis, did not affect sample integrity. The authors conclude that metabolomics analysis is unlikely to be affected by the freezing and thawing process. Contrary to this, Saude and Sykes [18] reported that urine that underwent eight freeze/thaw cycles at -80°C , as analysed by NMR, had an intermediate degree of metabolite change when compared to the urine stored at room temperature or frozen at -80°C and that the freeze/thaw process should be avoided whenever possible. Rotter et al. [19] also investigated the influence of freezing and thawing urine samples; urine was frozen for 24 h at -80°C and thawed for 2 h at -20°C , and the cycle was repeated three times. They did not observe any significantly changed metabolite concentration for one or two freeze and thaw cycles, but two metabolites showed significantly increased concentrations after three freeze and thaw cycles, when compared to the samples immediately frozen at -80°C .

4. Conclusion

This is the first reported multivariate optimization method that includes reduced factorial and Doehlert matrix designs used to identify suitable conditions for an efficient HS-SPME-GC/MS procedure for the analysis of the volatile urinary metabolome. The most influential parameters were incubation and extraction temperature, and extraction and incubation time. The optimized procedure was further applied to evaluate sample stability under various storage conditions and repeated freezing-thawing processes. The results here presented indicated that storing human urine up to six months at -80°C with no more than two freeze-thaw cycles can be considered suitable for metabolomics studies. Our findings are crucial for planning further experiments regarding non-targeted analysis of specific metabolites.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgment

This research was supported by the Ministry of Science, Education and Sports of the Republic of Croatia (Project No. 022-0222411-2408).

References

- [1] M.S. Monteiro, M. Carvalho, M.L. Bastos, P. Guedes De Pinho, Metabolomics analysis for biomarker discovery: advances and challenges, *Curr. Med. Chem.* 20 (2013) 257–271.
- [2] K. Matsumura, M. Opiekun, H. Oka, A. Vachani, S.M. Albelda, K. Yamazaki, G.K. Beauchamp, Urinary volatile compounds as biomarkers for lung cancer: a proof of principle study using odor signatures in mouse models of lung cancer, *PLoS One* 5 (2010) e8819.
- [3] A.W. Boots, L.D. Bos, M.P. van der Schee, F.J. van Schooten, P.J. Sterk, Exhaled molecular fingerprinting in diagnosis and monitoring: validating volatile promises, *Trends Mol. Med.* 21 (2015) 633–644.
- [4] K. Schmidt, I. Podmore, Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer, *J. Biomark.* (2015) ID981458. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/981458>.
- [5] C.L. Silva, M. Passos, J.S. Câmara, Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers - a powerful strategy for breast cancer diagnosis, *Talanta* 89 (2012) 360–368.
- [6] M. Monteiro, M. Carvalho, R. Henrique, C. Jerónimo, N. Moreira, M. de Lourdes Bastos, P.G. de Pinho, Analysis of volatile human urinary metabolome by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for biomarker discovery: application in a pilot study to discriminate patients with renal cell carcinoma, *Eur. J. Cancer* 50 (2014) 1993–2002.
- [7] A. Zlatkis, R.S. Brazell, C.F. Poole, The role of organic volatile profiles in clinical diagnosis, *Clin. Chem.* 27 (1981) 789–797.
- [8] G.A. Mills, V. Walker, Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations, *J. Chromatogr. B* 753 (2001) 259–268.
- [9] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [10] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Headspace solid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 1 (1993) 1843–1852.
- [11] R.B. Aggio, A. Mayor, S. Coyle, S. Reade, T. Khalid, N.M. Ratcliffe, C.S. Probert, Freeze-drying: an alternative method for the analysis of volatile organic compounds in the headspace of urine samples using solid phase micro-extraction coupled to gas chromatography - mass spectrometry, *Chem. Cent. J.* (2016). <http://dx.doi.org/10.1186/s13065-016-0155-2>.
- [12] H.G. Gika, G.A. Theodoridis, I.D. Wilson, Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabolomics studies, *J. Chromatogr. A* 1189 (2008) 314–322.
- [13] M.M. Koek, R.H. Jellema, J. van der Greef, A.C. Tas, T. Hankemeier, Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives, *Metabolomics* 7 (2011) 307–328.
- [14] S. Naz, M. Vallejo, A. García, C. Barbas, Method validation strategies involved in non-targeted metabolomics, *J. Chromatogr. A* 1353 (2014) 99–105.
- [15] S. Ristićević, E. Carasek, J. Pawliszyn, Headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric methodology for geographical origin verification of coffee, *Anal. Chim. Acta* 617 (2008) 72–84.
- [16] L. Setkova, S. Ristićević, J. Pawliszyn, Rapid headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-time-of-flight mass spectrometric method for qualitative profiling of ice wine volatile fraction: I. Method development and optimization, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 213–223.
- [17] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, E.G.P. da Silva, W.N. Lopes dos Santos, C.M. Quintella, J.M. David, J.B. de Andrade, M.C. Breitkreitz, I.C. Jardim, B.B. Neto, Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems, *J. Chromatogr. A* 1158 (2007) 2–14.
- [18] E.J. Saude, B.D. Sykes, Urine stability for metabolomic studies: effects of preparation and storage, *Metabolomics* 3 (2007) 19–27.
- [19] M. Rotter, S. Brandmaier, C. Prehn, J. Adam, S. Rabstein, K. Gawrych, T. Brüning, T. Illig, H. Lickert, J. Adamski, R. Wang-Sattler, Stability of targeted metabolite profiles of urine samples under different storage conditions, *Metabolomics* 13 (2017) 4.

ŽIVOTOPIS

Tanja Živković Semren rođena je 17. travnja 1986. godine u Slavonskom Brodu. Završila je osnovnu školu u Lastovu, a srednjoškolsko obrazovanje nastavlja u Zadru gdje je 2004. završila jezičnu gimnaziju. Iste godine upisuje studij kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je u prosincu 2010. godine. U ožujku 2011. godine zapošljava se kao stručna suradnica u sustavu znanosti te od veljače 2012. godine kao znanstvena novakinja-asistentica u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Poslijediplomski doktorski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu upisala je 2013. godine.

Sudjelovala je na brojnim domaćim i međunarodnim radionicama, tečajevima i znanstvenim skupovima. Član je Hrvatskog kemijskog društva, Hrvatskog toksikološkog društva te Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju. Prvi je autor ili ravnopravni suautor na osam znanstvenih radova i dva pregledna rada objavljenih u časopisima zastupljenim u bazama *Current Contents* ili *Science Citation Index – Expanded*, te 17 kongresnih priopćenja.

Popis objavljenih znanstvenih radova

1. Živković Semren T, Žunec S, Pizent A (2018) **Oxidative stress in triazine pesticide toxicity: a review of the main biomarker findings.** *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69(2):109-125.
2. Milić M, Žunec S, Micek V, Kašuba V, Mikolić A, Tariba Lovaković B, Živković Semren T, Pavičić I, Marjanović Čermak AM, Pizent A i sur. (2018) **Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate.** *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 69(2):154-168.
3. Tariba Lovaković B, Lazarus M, Brčić Karačonji I, Jurica K, Živković Semren T, Lušić D, Brajenović N, Pelaić Z, Pizent A (2018) **Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 45:85-92.
4. Živković Semren T, Brčić Karačonji I, Safner T, Brajenović N, Tariba Lovaković B, Pizent A (2018) **Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of urinary volatile organic metabolites: Optimization of the HS-SPME procedure and sample storage conditions.** *Talanta* 176:537-543.

5. Tariba B, **Živković T**, Gajski G, Gerić M, Gluščić V, Garaj-Vrhovac V, Peraica M, Pizent A (2017) **In vitro effects of simultaneous exposure to platinum and cadmium on the activity of antioxidant enzymes and DNA damage and potential protective effects of selenium and zinc.** *Drug and Chemical Toxicology*, 40(2):228-234.
6. Želježić D, Mladinić M, Žunec S, Lucić Vrdoljak A, Kašuba V, Tariba B, **Živković T**, Marjanović AM, Pavičić I, Milić M, Rozgaj R, Kopjar N (2016) **Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line.** *Food and Chemical Toxicology* 96:90-106.
7. Tariba B, **Živković T**, Filipović Marijić V, Erk M, Gamulin M, Pizent A (2016) **Does the serum metallothionein level reflect the stage of testicular germ cell tumor?.** *Archives of Medical Research* 47:232-235.
8. Tariba B, **Živković T**, Krasnići N, Filipović Marijić V, Erk M, Gamulin M, Grgić M, Pizent A (2015) **Serum metallothionein in patients with testicular cancer.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 75(4):813-820.
9. **Živković T**, Tariba B, Pizent A (2014) **Multielement analysis of human seminal plasma by octopole reaction cell ICP-MS.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29:2114-2126.
10. Pizent A, Tariba B, **Živković T** (2012) **Reproductive toxicity of metals in men.** *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 63(1):35-46.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

HLAPLJIVI SPOJEVI I AMINOKISELINE U URINU OBOLJELIH OD TUMORA TESTISA

Tanja Živković Semren

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada

Tumor testisa najčešće je maligno oboljenje u muškaraca mlade životne dobi. Razvojem tumora nastaju promjene u metabolizmu stanica koje se mogu pratiti analizom metabolita u biološkim uzorcima ispitanika što može biti koristan alat za procjenu stanja organizma i daljnje liječenje bolesti. Cilj ovog istraživanja bio je kreirati kvantitativni profil slobodnih aminokiselina i elemenata u urinu ispitanika s tumorom testisa i odrediti vrijednosti parametara oksidacijsko-redukcijske ravnoteže u krvi. U ispitanika s tumorom testisa izmjerene su značajno povišene koncentracije asparaginske kiseline, mangana i cinka te aktivnost superoksid dismutaze dok su koncentracija treonina, serina, histidina, kobalta i glutationa te ukupni oksidacijski status, bili značajno niži u odnosu na kontrolne ispitanike. Nadalje, provedena je linearna diskriminantna analiza kako bi se ispitalo razdvaja li kreirani profil aminokiselina ispitanike s tumorom testisa od kontrolnih ispitanika, a uspješnost diskriminacije iznosila je 86 %. U urinu ispitanika s tumorom testisa kreiran je i kvalitativni profil hlapljivih organskih metabolita kako bi detektirali koje se vrste, ovisno o funkcionalnim skupinama, javljaju u urinu. Analizom urina u kromatogramu je detektirano oko 200 pikova hlapljivih organskih metabolita te su identificirana 123 metabolita.

Procijenjen je učinak kemoterapije cisplatinom na koncentraciju aminokiselina i elemenata te na parametre oksidacijsko-redukcijske ravnoteže. Nakon primljene kemoterapije, u ispitanika s tumorom testisa izmjerene su povišene koncentracije većine aminokiselina i elemenata u urinu te glutationa u krvnoj plazmi u odnosu na vrijednosti prije kemoterapije.

Godinu dana nakon kemoterapije rezultati su pokazali slične vrijednosti za većinu aminokiselina osim za treonin, serin i živu koji su bili značajno sniženi, te mangan i platinu koji su i dalje bili značajno povišeni kod ispitanika koji su bolovali od tumora testisa u odnosu na kontrolne ispitanike. Rezultati upućuju na postupni oporavak metabolizma nakon prestanka kemoterapije.

Ovim istraživanjem dobiveni su rezultati koji upućuju na to da razvojem tumora u testisima dolazi do poremećaja u ciklusu limunske kiseline i ciklusu uree. Dobiveni rezultati mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja o ulozi međuprodukata navedenih ciklusa u tumorigenezi što može pridonijeti eventualnom otkrivanju novih bioloških biljega tumora testisa.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 136 stranicu, 29 slika, 18 tablica i 176 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: tumor testisa, aminokiseline, elementi, oksidacijski stres, hlapljivi organski metaboliti, ciklus limunske kiseline, ciklus uree

Mentori: **dr. sc. Alica Pizent**, *znan. savj. u trajnom zvanju*,
dr. sc. Ana Mornar Turk, *red. prof.*

Ocjenjivači: **dr. sc. Biljana Nigović**, *red. prof.*
dr. sc. Ksenija Fumić, *izv. prof.*
dr. sc. Davor Ježek, *red. prof.*

Rad prihvaćen: 12. lipnja 2019.

BASIC DOCUMENTARY CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dissertation

VOLATILE COMPOUNDS AND AMINO ACIDS IN THE URINE OF TESTICULAR TUMOUR PATIENTS

Tanja Živković Semren

Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

Testicular cancer is the most common malignancy in young men and in recent decades its occurrence has been growing rapidly. Tumour development induces changes in cell metabolism that can be monitored by analysing the metabolites in biological samples of the subject.

The aim of this study was to create a quantitative profile of free amino acids and elements in urine and levels of oxidative stress parameters in blood of men with testicular cancer and compare them with control subjects. In subjects with testicular cancer, significantly higher concentrations of aspartic acid, manganese and zinc were measured, as well as a higher activity of superoxide dismutase. On the other hand, concentrations of threonine, serine, histidine, cobalt and glutathione and total oxidant status were significantly lower in comparison to control subjects. Additionally, linear discriminant analysis (LDA) was performed to examine whether the created amino acid profile discriminated subjects with testicular cancer from control subjects and the results showed that the discrimination rate was 86%. In the urine of subjects with testicular cancer a qualitative profile of volatile organic metabolites was also created to detect which species, depending on their functional groups, can be detected in urine. GC-MS analysis of urine detected about 200 peaks of volatile organic metabolites, and 123 of them were identified.

The effect of cisplatin chemotherapy on the concentration of amino acids and elements in urine and on the parameters of oxidative stress was also estimated. After receiving chemotherapy, concentrations of the majority of amino acids and elements in urine and glutathione in blood plasma increased in comparison to values obtained before chemotherapy.

One year after receiving chemotherapy the results showed that the concentrations of most amino acids and elements were similar to those measured in the control subjects, except for threonine, serine and mercury, which had significantly higher values, and manganese and platinum, which had significantly lower values than the control subjects.

Results indicated a gradual metabolism recover following chemotherapy.

The results of this research suggest that the development of a tumour in the testicles leads to a disorder in the citric acid cycle and the urea cycle. The obtained results can be used as a basis for further research on the role of the intermediates of the above-mentioned cycles in tumorigenesis, which could contribute to the possible discovery of new biomarkers for testicular tumours.

The thesis is deposited in the Central Library of Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis includes: 136 pages, 29 figures, 18 tables and 176 references; original in Croatian

Keywords: testicular tumour, amino acids, elements, oxidative stress, volatile organic metabolites, citric acid cycle, urea cycle

Mentors: **Alica Pizent, Ph.D.**, *Permanent Scientific Advisor*
Ana Mornar Turk, Ph.D., *Full Professor*

Reviewers: **Biljana Nigović, Ph.D.**, *Full Professor*
Ksenija Fumić Ph.D., *Associate Professor*
Davor Ježek, Ph.D., *Full Professor*

The thesis accepted: June 12, 2019