

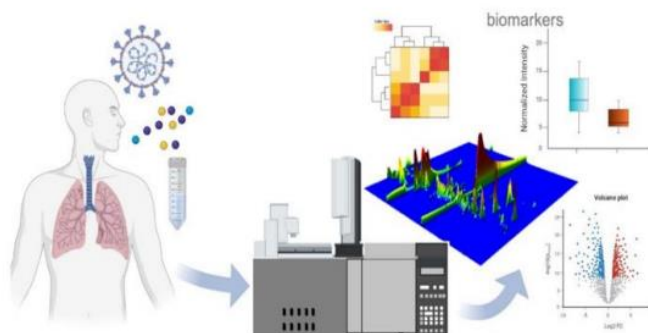


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα για τον προσδιορισμό βιοδεικτών με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας



ΒΕΡΤΖΑΓΙΑ ΑΝΤΩΝΙΑ

ΧΗΜΙΚΟΣ

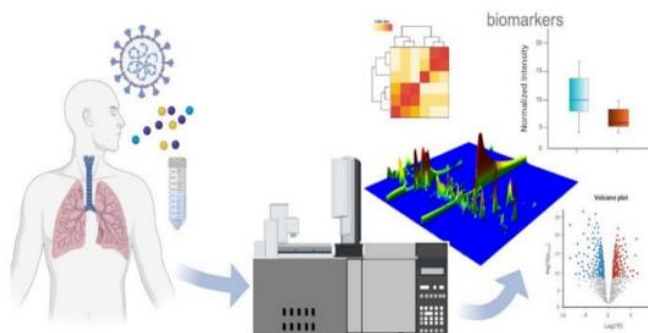
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα για τον προσδιορισμό βιοδεικτών με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας



ΒΕΡΤΖΑΓΙΑ ΑΝΤΩΝΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2023

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σακκά: 13.01.2023

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1076/27-01-2023

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Σακκάς Βασίλειος

Ημερομηνία ορισμού θέματος:

Θέμα: «Ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα για τον προσδιορισμό βιοδεικτών με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

1. Αναπληρωτής Καθηγητής Βασίλειος Σακκάς
2. Αναπληρωτής Καθηγητής Κωνσταντίνος Κωστίκας
3. Αναπληρωτής Καθηγητής Κωνσταντίνος Σταλίκας

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις

**Ο πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Καθηγητής κ. Πλακατούρας Ιωάννης**

**Η γραμματέας του
Τμήματος Χημείας
Τουτουνζόγλου Ξανθή**

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί τη διπλωματική εργασία του μεταπτυχιακού προγράμματος «Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών-Αναλυτικής Χημείας, Χημείας και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος και Τροφίμων» του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Πριν τη λήξη του προγράμματος των μεταπτυχιακών μου σπουδών που συνοδεύεται από την παρουσίαση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω κάποιους από τους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα, καθώς διατέλεσαν πολύ σημαντικό ρόλο στην διεκπεραίωση της έρευνας μου. Πρώτον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου και Αναπληρωτή καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά για την ευκαιρία που μου έδωσε να είμαι μέλος του εργαστηρίου του αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα για την εκπόνηση των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Πνευμονολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου των Ιωαννίνων κ. Κωνσταντίνο Κωστίκα για τη συνεργασία του μαζί μας και για την ευκαιρία της μελέτης στο συγκεκριμένο θέμα και τον ιατρό και υποψήφιο Διδάκτορα Χρήστο Χρόνη για την άποψη συνεργασία μας και για την πολύτιμη βοήθεια του στη συλλογή των δειγμάτων την οποία ανέλαβε πλήρως. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Χριστόφορο Χρηματοπούλο και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Λυπηρού Λουκία για την βοήθεια τους σε όλες τα θέματα που προέκυψαν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, αλλά και όλα τα μέλη του εργαστηρίου που ήταν δίπλα μου και συνέβαλαν ψυχολογικά δημιουργώντας ένα ευχάριστο κλίμα. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μπαμπά μου και την αδερφή μου, τον Τάσο και όλους μου τους φίλους που με την υπομονή και τη αμέριστη συμπαράστασή τους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Κάθε χρόνο ο αριθμός των ασθενών που προσβάλλονται από διάφορους τύπους καρκίνου αυξάνεται δραματικά, γι' αυτό το λόγο οι έρευνες έχουν στραφεί στην ανακάλυψη και εφαρμογή μεθόδων οι οποίες θα μπορούν να ανιχνεύσουν τέτοιες ασθένειες σε πολύ πρώιμο στάδιο και ίσως και στην πρόγνυσή τους πριν ακόμα αυτές εκδηλωθούν. Στην παρούσα διατριβή το είδος του καρκίνου που μελετάται είναι ο καρκίνος του πνεύμονα που αποτελεί τη συχνότερη μορφή καρκίνου παγκοσμίως και σημειώνει τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας. Η έρευνα για την επίτευξη του σκοπού αυτού εστιάστηκε στους μεταβολίτες, οι οποίοι αποτελούν τα τελικά προϊόντα των βιολογικών διεργασιών που πραγματοποιούνται εντός του οργανισμού και εφόσον περιέχονται σχεδόν σε όλα τα βιολογικά υγρά και στην ανθρώπινη αναπνοή, μπορούν να είναι ενδεικτικοί για την ύπαρξη κάποιας δυσλειτουργίας του. Ο τομέας που μελετά τους μεταβολίτες ονομάζεται μεταβολομική και αποτελεί μία «υψηλής απόδοσης» ανάλυση. Σε αυτή την έρευνα γίνεται ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα και των πτητικών οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε αυτόν, τόσο σε ασθενείς που πάσχουν από τον καρκίνο του πνεύμονα, όσο και σε υγιείς. Για την πραγματοποίηση της ανάλυσης είναι απαραίτητη η συλλογή των VOCs η οποία γίνεται με τη βοήθεια των σωλήνων RTubeVOC. Η ανάλυση απαιτεί προσρόφηση των πτητικών οργανικών ενώσεων σε ένα στερεό φορέα διαφορετικά δεν είναι δυνατή η ανάλυση του αέριου υποστρώματος. Η προσρόφηση γίνεται με τη διαδικασία της τεχνικής μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Στη συνέχεια γίνεται εκρόφηση των προσροφημένων ουσιών σε αέριο χρωματογράφο ο οποίος είναι συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας. Τα φάσματα μάζας και τα αέρια χρωματογραφήματα που προκύπτουν είναι αρκετά πολύπλοκα, για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται προγράμματα που συμβάλλουν στην επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων (raw data) όπως το XCMSOnline, MetaboAnalyst 5.0 και το SIMCA. Τέλος γίνεται στατιστική επεξεργασία προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των ομάδων με εφαρμογή των μοντέλων PCA, PLS-DA και OPLS-DA, αλλά και προσδιορισμός των χαρακτηριστικών στα οποία οφείλεται ο διαχωρισμός. Η ταυτοποίηση αυτών των χαρακτηριστικών γίνεται με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης NIST.

Abstract

Every year the number of patients that have been affected by various types of cancer increases dramatically, for this reason research has turned into the discovery and application of methods that will be able to detect these kinds of diseases at a very early stage and perhaps the prognosis of the disease before its onset. The subject of the research in the present thesis is the lung cancer, which is the most common form of cancer worldwide with the highest mortality rates. The field used to achieve this goal is the field of metabolomics which is a “high performance” analysis and directly related to the human body as it studies the products of human metabolism, the metabolites. Metabolites are organic compounds that can often be indicative of any dysfunction of the human body and are present in almost all biological fluids. In this research, an analysis of the exhaled air and the volatile organic compounds contained in it is performed in patients with lung cancer but also in healthy people. To carry out the analysis, it is necessary to collect the VOCs and for that the RTubeVOC tubes are used. The analysis requires adsorption of the volatile organic compounds in a solid carrier otherwise the analysis of the gaseous substrate is not possible. The adsorption is carried out by the procedure of solid phase micro-extraction (SPME). Subsequently, the adsorbed substances are desorbed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer. After the analysis, the chromatograms and mass spectra are obtained, which are complex data and difficult to analyze. For this reason, programs that contribute to the processing of raw data such as XCMSOnline, MetaboAnalyst 5.0 and the SIMCA program are used. Finally, statistical processing is carried out to separate the groups by applying the PCA, PLS-DA and OPLS-DA models, as well as to determine the characteristics underlying the separation. These features are identified with the help of the NIST library.

Πίνακας περιεχομένων

Ευχαριστίες.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
Abstract	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	13
ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ – Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ	13
1.1 Επιδημιολογία	13
1.2 Ταξινόμηση των καρκινικών όγκων του πνεύμονα.....	16
1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες του καρκίνου του πνεύμονα.....	18
1.3.1 Κάπνισμα	18
1.3.2 Ατμοσφαιρική Ρύπανση	19
1.3.3 Γενετικοί παράγοντες.....	19
1.3.4 Ραδόνιο	19
1.3.5 Αμύαντος.....	20
1.4 Συμπτώματα της ασθένειας.....	20
1.5 Διάγνωση της ασθένειας	20
1.5.1 Κυτταρολογική Εξέταση Πτυέλων	21
1.5.2 Ακτινογραφία θώρακος	21
1.5.3 Αξονική (CT) και Μαγνητική (MRI) τομογραφία	21
1.5.4 Τομογραφία με Εκπομπή Ποζιτρονίων (PET).....	22
1.5.5 Βρογχοσκόπηση	22
1.5.6 Βιοψία.....	23
1.6 Σταδιοποίηση	23
1.7 Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.....	28
1.8 Πρόληψη του καρκίνου	29
1.8.1 Διατροφικές συνήθειες.....	29
1.8.2 Σωματική άσκηση	30
1.8.3 Διακοπή του καπνίσματος	31
1.8.4 Πρόωρη διάγνωση.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	33
ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ	33
2.1 Εισαγωγή.....	33
2.2 Μεταβολομική Ανάλυση.....	34
2.3 Στοχευμένη και μη Στοχευμένη Ανάλυση.....	35
2.4 Η Μεταβολομική σε βιολογικά δείγματα και η σημασία της.....	36

2.5 Αναλυτικές Τεχνικές στη Μεταβολομική	38
2.5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού	38
2.5.2 Φαρματομετρία Μάζας	39
2.5.3 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας	39
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	41
ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΣ ΑΕΡΑΣ – ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ (VOCs)	41
3.1 Εισαγωγή.....	41
3.2 Φυσιολογία και σύσταση της ανθρώπινης αναπνοής	41
3.3 Μεταβολομική και πτητικές οργανικές ενώσεις.....	43
3.4 Πτητικές Οργανικές Ενώσεις για τον καρκίνο του πνεύμονα	46
3.5 Συλλογή των VOCs	48
3.5.1 Συνθήκες που επηρεάζουν τη σύσταση των VOCs.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	51
ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	51
4.1 Τεχνική εκχύλισης.....	51
4.1.1 Υγρή – Υγρή εκχύλιση (LLE)	51
4.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	52
4.2 Τεχνική μικροεκχύλισης.....	54
4.2.1 Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction – SPME)	55
4.3 Χρωματογραφική ανάλυση.....	59
4.3.1 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography LC)	59
4.3.2 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography GC)	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	61
ΣΚΟΠΟΣ.....	61
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	63
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	63
6.1 Συλλογή δειγμάτων	63
6.2 Προετοιμασία δειγμάτων	64
6.3 Συνθήκες ανάλυσης Αέριας Χρωματογραφίας (GC) και Φασματομετρίας Μάζας (MS)	65
6.4 Επεξεργασία φασμάτων GC-MS.....	66
6.5 Προεπεξεργασία δεδομένων GC-MS.....	66
6.6 Στατιστική επεξεργασία.....	66
6.6.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)	67
6.6.2 Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)	68

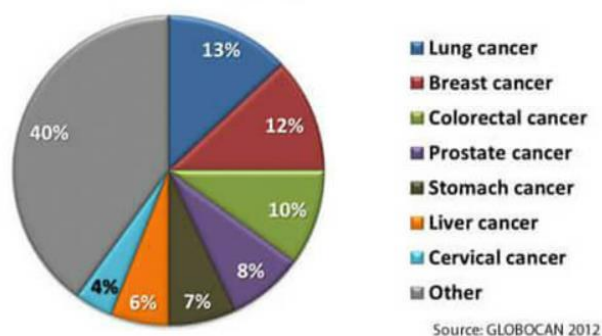
6.6.3 Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS-DA)	68
6.6.4 Επικύρωση των μοντέλων PLS-DA	69
6.6.5 Επιλογή χαρακτηριστικών που οφείλονται για το διαχωρισμό	69
6.6.6 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	73
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	73
7.1 Στατιστική επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων (GC/MS)	74
7.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών	85
7.3 Επικύρωση πιθανών βιοδεικτών	85
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	89
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	90

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ – Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ

1.1 Επιδημιολογία

Η υπογονιμότητα, η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης καθώς και οι αλλαγές του σύγχρονου τρόπου ζωής έχουν οδηγήσει παγκοσμίως σε αύξηση των μη μεταδιδόμενων νοσημάτων, τα οποία στην πλειονότητα τους αφορούν χρόνιες παθήσεις.[1] Ειδικότερα, σε περιόδους οικονομικής και κοινωνικής κρίσης παρατηρείται αύξηση του φορτίου από χρόνια νοσήματα, όπως ο καρκίνος, ο οποίος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) κατέλαβε την πρώτη θέση ανάμεσα στις αιτίες θνησιμότητας παγκοσμίως το 2011, αφήνοντας στη δεύτερη θέση τα καρδιαγγειακά νοσήματα.[2] Το 2012, περίπου 14.1 εκατ. νέες περιπτώσεις καρκίνου διαγνώσθηκαν στην Ευρώπη όπου το 55% αφορούσε στους άνδρες και το 45% στις γυναίκες.[3] Οι συχνότεροι τύποι καρκίνου, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.1, ήταν ο καρκίνος του πνεύμονα με 1.82 εκατ. νέες περιπτώσεις, ο καρκίνος του μαστού (1.67 εκατ.) και ο καρκίνος του παχέος εντέρου (1.36 εκατ.). Επιπρόσθετα, οι θάνατοι από καρκίνο ανήλθαν στα 8.2 εκατ. το 2012, με τον καρκίνο του πνεύμονα να παρουσιάζει τους περισσότερους θανάτους (1.6 εκατ.) και τον καρκίνο του ήπατος (745.000) και του στομάχου (723.000) να ακολουθούν.[3]

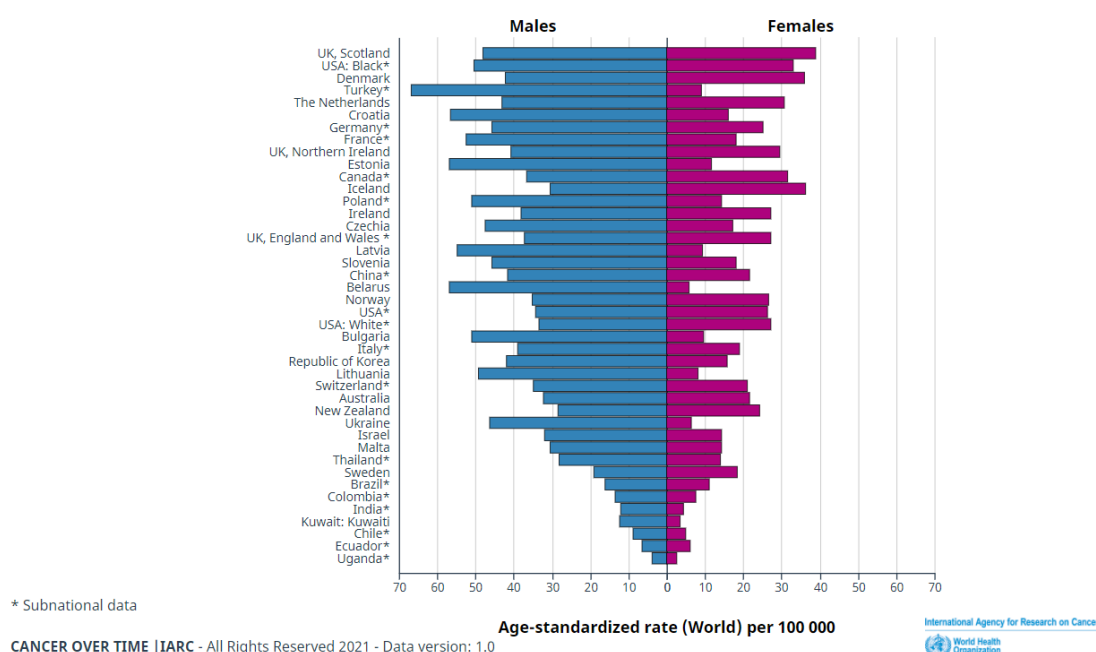


Εικόνα 1.1: Οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου για το 2012 [4]

Η συχνότητα εμφάνισης του σε σχέση με την ηλικία ποικίλλει ανάλογα με τις γεωγραφικές περιοχές, με τα υψηλότερα ποσοστά επίπτωσης και θνησιμότητας να καταγράφονται στον ανεπτυγμένο κόσμο, ιδιαίτερα στις Ηνωμένες Πολιτείες και την Ευρώπη, και τα χαμηλότερα στην Αφρική.[5] Σε παγκόσμιο επίπεδο, η επίπτωση και η θνησιμότητα του καρκίνου του πνεύμονα είναι σημαντικά υψηλότερη στους άνδρες από τις γυναίκες. Από το 1953, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πιο κοινή αιτία θανάτων από καρκίνο στους άνδρες και το 1985 έγινε η κύρια αιτία θανάτων από καρκίνο στις γυναίκες. Ο καρκίνος του πνεύμονα καταλαμβάνει την πρώτη αιτία στους θανάτους από κακοήγη νόσο στις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Κίνα, τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Στην Αυστραλία και στην Ευρώπη (Γαλλία, Γερμανία, Σκανδιναβικές χώρες, Ισπανία, Ηνωμένο Βασίλειο) ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου στους άνδρες και τη δεύτερη στις γυναίκες. Σχεδόν όλοι

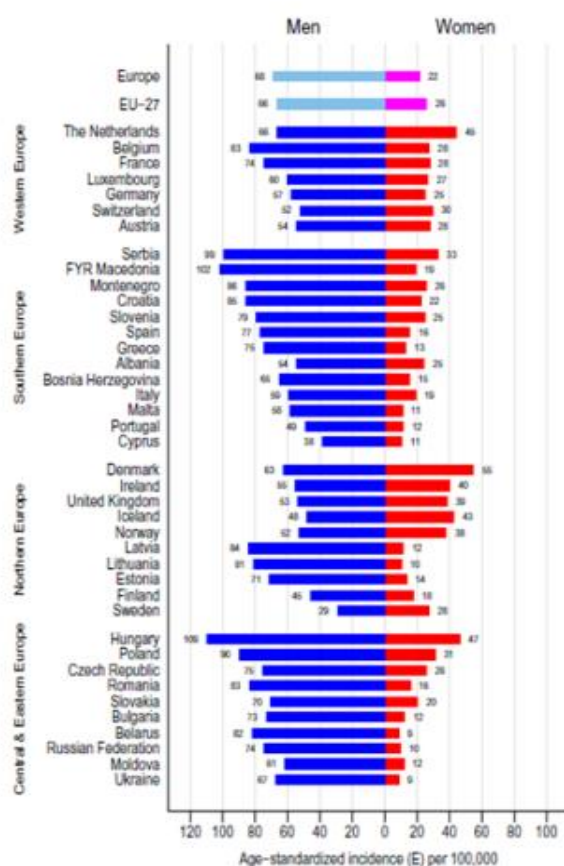
ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα πεθαίνουν ετησίως στις ΗΠΑ, τόσοι πεθαίνουν από καρκίνο του προστάτη, του μαστού και του εντέρου συνολικά. [6]

Από τα παγκόσμια δεδομένα της Διεθνούς έκθεσης για τον καρκίνο GLOBOCAN της IARC (International Agency for Research on Cancer)(Εικόνα 1.1.1) η νόσος παραμένει ως ο συνηθέστερος καρκίνος στους άνδρες παγκοσμίως με τα υψηλότερα εκτιμώμενα ποσοστά επίπτωσης ανά ηλικία (0-85+) να αναφέρονται στην Κεντρική και Ανατολική Ευρώπη και την Ανατολική Ασία. Αρκετά χαμηλά ποσοστά εμφάνισης παρατηρούνται στη Μέση και Δυτική Αφρική. Στις γυναίκες, τα ποσοστά είναι γενικά χαμηλότερα και το γεωγραφικό μοντέλο διαφοροποιείται, κυρίως λόγω της διαφορετικής ιστορικής έκθεσης στο κάπνισμα. Έτσι, οι υψηλότεροι ρυθμοί παρατηρούνται στη Βόρεια Αμερική και στη Βόρεια Ευρώπη με σχετικά υψηλό ρυθμό στην Ανατολική Ασία και τους χαμηλότερους ρυθμούς στη Δυτική και τη Μέση Αφρική.[7]



Εικόνα 1.1.1: Δεδομένα της GLOBOCAN για την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, βάση φύλου σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2012

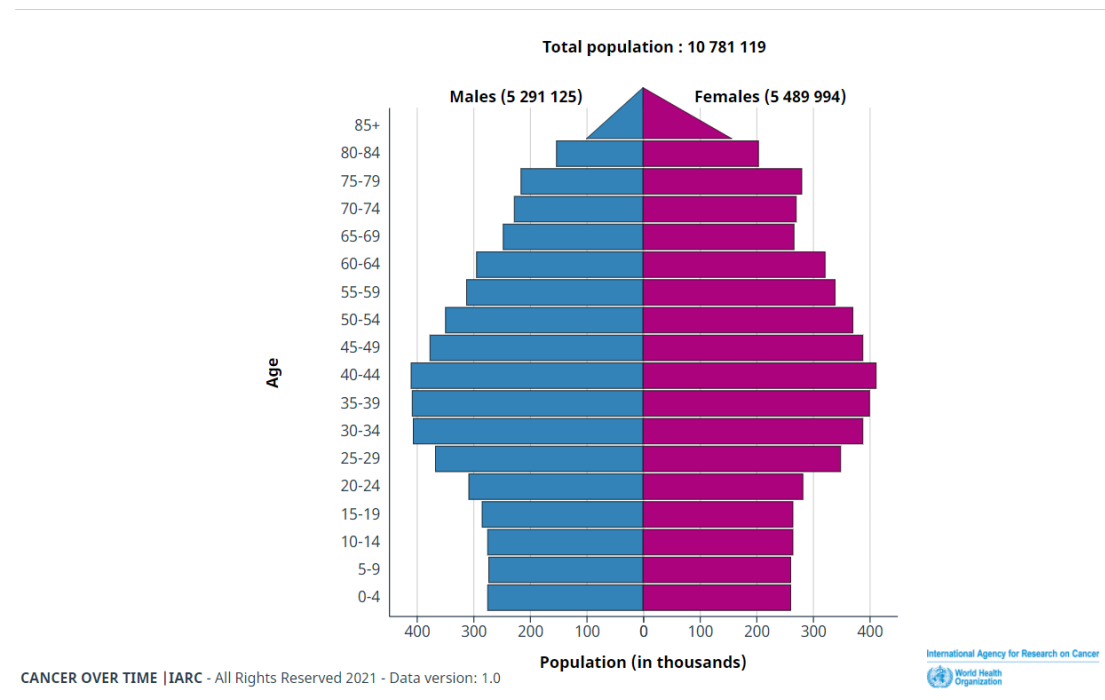
Από τα δεδομένα της GLOBOCAN για την Ευρώπη το 2012 (Εικόνα 1.1.2), ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τη δεύτερη πιο συχνή μορφή καρκίνου αλλά και τη δεύτερη πιο συχνή αιτία θανάτου από καρκίνο για τους άνδρες μετά τον καρκίνο του προστάτη. Στους άνδρες, η συχνότητα εμφάνισης είναι υψηλότερη στις χώρες της Κεντρικής και Ανατολικής Ευρώπης και χαμηλότερη στις χώρες της Βόρειας Ευρώπης. Για τις γυναίκες η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα είναι στην τρίτη θέση μετά τον καρκίνο του μαστού και τον καρκίνο του εντέρου. Τα υψηλότερα ποσοστά εκτιμήθηκαν στη Βόρεια Ευρώπη και τα χαμηλότερα στην Ανατολική Ευρώπη. Και για τα δύο φύλα τα υψηλότερα ποσοστά παρατηρήθηκαν στην Ουγγαρία και τα χαμηλότερα στην Κύπρο. Τα γεωγραφικά πρότυπα θνησιμότητας είναι παρόμοια με εκείνα της επίπτωσης και για τα δύο φύλα, λόγω της ταχείας πορείας της νόσου μετά τη διάγνωση. Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες σε όλες τις χώρες εκτός της Σουηδίας ενώ σε πολλές χώρες αποτελεί την πρώτη αιτία θανάτου ακόμη και πριν τον καρκίνο του μαστού για τις γυναίκες.



Εικόνα 1.1.2: Δεδομένα της GLOBOCAN για την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, βάση φύλου στην Ευρώπη για το έτος 2012

Η Ελλάδα ανάμεσα στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης, με βάση τα παραπάνω στοιχεία κατέχει την 15η θέση στην πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα αφού είναι η συχνότερη μορφή καρκίνου στους άνδρες και η τρίτη πιο συχνή μορφή καρκίνου στις γυναίκες μετά τον καρκίνο του μαστού. Πάνω από 3000 άτομα προσβάλλονται κάθε χρόνο κι αυτό οφείλεται στην αύξηση του αριθμού των καπνιστών τα προηγούμενα χρόνια.

Στην Εικόνα 1.1.3 παρουσιάζεται η θνησιμότητα στην Ελλάδα σχετικά με τον καρκίνο του πνεύμονα, τόσο στους άντρες αλλά και στις γυναίκες, σύμφωνα με την ηλικιακή του ομάδα.



Εικόνα 1.1.3: Δεδομένα της GLOBOCAN για τα ποσοστά θνησιμότητας στην Ελλάδα σύμφωνα με την ηλικιακή ομάδα για το έτος 2012 [8]

Η θεωρία ότι ο κίνδυνος είναι μεγαλύτερος στις γυναίκες παρά στους άνδρες που εκτίθενται σε ισοδύναμες ποσότητες καπνού τσιγάρων δεν υποστηρίζεται από πρόσφατες μελέτες, οι οποίες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ο κίνδυνος είναι παρόμοιος μεταξύ των δύο φύλων.[9][4]

1.2 Ταξινόμηση των καρκινικών όγκων του πνεύμονα

Η ταξινόμηση των διαφορετικών καρκίνων του πνεύμονα γίνεται με βάση τον ιστολογικό τους τύπο.[10] Η ιστολογική ταξινόμηση στηρίζεται στη μορφολογική διάκριση των κυτταρικών τύπων και του τρόπου αναπτύξεως του καρκίνου του πνεύμονα στο κοινό μικροσκόπιο, με την χρώση των ιστολογικών τομών με αιματοξυλίνη - ηωσίνη ή με την προσθήκη ειδικών χρώσεων για την αναζήτηση βλέννας, όπως καθορίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO).[11] Η χρησιμοποίηση της ταξινόμησης αυτής προσφέρει ιδιαίτερη βοήθεια κατά την καθημερινή διαγνωστική πράξη όμως για την επίλυση συνθέτων διαγνωστικών προβλημάτων τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται πλέον εξειδικευμένες διαγνωστικές μέθοδοι, όπως ο συνδυασμός της κοινής μικροσκοπήσεως και του ανοσοϊστοχημικού ελέγχου ή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίσεως . Οι μέθοδοι αυτοί επιπλέον συνετέλεσαν στην κατανόηση των ετερογενών χαρακτήρων του καρκίνου του πνεύμονα, την κυτταρική του διαφοροποίηση, καθώς και τις ιστογενετικές κατηγορίες τύπων και υποτύπων ή ποικιλιών.[12] Η πλειοψηφία των όγκων που εμφανίζονται στους πνεύμονες είναι καρκινώματα-κακοήθειες που προκύπτουν από τα επιθηλιακά κύτταρα. Οι δύο κύριες κατηγορίες είναι το μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα και το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του

πνεύμονα. Οι δύο αυτές κατηγορίες με τη σειρά τους διακρίνονται στις παρακάτω κατηγορίες:

- **Μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (NSCLC)**

Το 85-90% των καρκίνων του πνεύμονα είναι μη μικροκυτταρικός καρκίνος και διακρίνεται σε τρεις βασικές υποκατηγορίες:

- i. **Αδενοκαρκίνωμα**

Τα αδενοκαρκινώματα του πνεύμονα, που κάποτε σπάνιζαν, κατέχουν σήμερα την πρώτη θέση μεταξύ των καρκινωμάτων του πνεύμονα στον "πολιτισμένο κόσμο" και αγγίζουν το 40% των κακοήθων όγκων του πνεύμονα. Η αύξηση της συχνότητας τους, ιδιαίτερα στις γυναίκες, μπορεί να οφείλεται κατά ένα μέρος στην καλύτερη παθολογοανατομική διάγνωση αφού μικροσκοπικά μοιάζουν με τους αδιαφοροποίητους όγκους από μεγάλα κύτταρα.

Προέρχονται από τα αδενικά κύτταρα του βρογχικού βλεννογόνου και εντοπίζονται, κατά συνέπεια, συχνότερα περιφερικά αλλά και σε παλιές ουλές του πνεύμονα.[13] Η πλειοψηφία καρκίνων του πνεύμονα με αδενοκαρκίνωμα σχετίζονται με περιπτώσεις ασθενών οι οποίοι ήταν καπνιστές για μεγάλο χρονικό διάστημα τη ζωή τους. Ωστόσο υπάρχουν και περιπτώσεις ασθενών με αδενοκαρκίνωμα που κατατάσσονται στην κατηγορία των μη καπνιστών αφού ο αριθμός των τσιγάρων κατά τη διάρκεια της ζωής τους ήταν αρκετά μικρός.[14] Μια υποκατηγορία αυτής της κατηγορίας είναι το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα, του οποίου ο τύπος διακρίνεται σε θηλώδη και σε ηθμοειδή υπότυπο, οι οποίοι συχνά αλληλοεπικαλύπτονται. Αναπτύσσεται εξ' ίσου σε καπνιστές και μη, απαντάται δε με 3 διαφορετικούς τρόπους: 1) ως περιφεριακός όζος, κυρίως στους άνω λοβούς 2) ως πολλαπλοί όζοι, συχνά αμφοτερόπλευρα 3) με τη μορφή πνευμονίας.[12]

- ii. **Καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων(Squamous cell carcinoma-SCC)**

Τα νεοπλάσματα αυτά αποτελούν τον συχνότερο κακοήγη όγκο του καρκίνου του πνεύμονα και αντιστοιχούν περίπου στο 30-50% όλων των καρκινωμάτων, που εμφανίζονται στον πνεύμονα. Εμφανίζονται, κατά κύριο λόγο, σε μεγάλους βρόγχους, δηλαδή κεντρικά και σχετίζονται με πλακώδη μεταπλασία στα πρώιμα στάδια τους.[13] Ο χρόνος διπλασιασμού τους, είναι περίπου 100-120 ημέρες και θεωρείται ότι δίνουν δυσκολότερα μεταστάσεις από ότι οι άλλοι ιστολογικοί τύποι. Συχνότερες μεταστάσεις βρίσκουμε στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στα οστά. Επιδημιολογικές έρευνες φαίνεται να συσχετίζουν τους όγκους αυτούς με την μόλυνση του περιβάλλοντος και το κάπνισμα.[13]

- iii. **Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Large cell carcinoma-LCC)**

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα εμφανίζεται με τη μικρότερη συχνότητα και αντιστοιχεί στο 15% των νεοπλασμάτων του πνεύμονα. Εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες και στους καπνιστές και τα κύτταρα αυτά εντοπίζονται περιφερικά. Είναι υψηλής κακοήθειας και έχουν χρόνο διπλασιασμού 60-90 ημέρες. Δίνουν συχνά μεταστάσεις κατά κύριο λόγο στους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου και σε μεγάλα ποσοστά στο ήπαρ, στα οστά και στον εγκέφαλο.[13]

- **Μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα (SCLC)**

Περίπου 10% όλων των καρκίνων του πνεύμονα είναι ο καρκίνος του πνεύμονα μικρών κυττάρων (SCLC), που ονομάζεται έτσι για το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων, όταν παρατηρείται στο μικροσκόπιο.[15] Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα χωρίζεται σε δύο τύπους, την περιορισμένη νόσο (limited-stage disease-LD) και την εκτεταμένη νόσο (extensive-stage disease-ED). Η περιορισμένη νόσος περιλαμβάνει περίπου το 30% των ασθενών με ΜΚΠ οι οποίοι έχουν όγκους περιορισμένους στο ένα ημιθωράκιο, στο σύστημα

μεσοθωράκιο ή στους σύστοιχους υπερκλειδικούς λεμφαδένες ενώ η εκτεταμένη νόσος αναφέρεται στους ασθενείς στους οποίους ο όγκος έχει εξαπλωθεί πέρα από τα παραπάνω. Είναι δύσκολο να επιτευχθεί θεραπεία γιατί αυτός ο τύπος καρκίνου εξαπλώνεται ευρέως μέχρι τη στιγμή της διάγνωσης και για το λόγο αυτό θεωρείται ανεγχείρητη νόσος. Περίπου τα τρία τέταρτα των ασθενών με ΜΚΠ είναι συμπτωματικοί τη στιγμή της διάγνωσης. Τα συμπτώματα μπορεί να οφείλονται σε τοπική επέκταση, σε μεταστάσεις ή σε παρανεοπλασματικές εκδηλώσεις.[16]

1.3 Αιτιολογικοί παράγοντες του καρκίνου του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μία ασθένεια η οποία προσβάλλει όλο και περισσότερους ανθρώπους στη σημερινή κοινωνία. Η ακριβής αιτία που προκαλεί αυτού του είδους καρκίνο και οι παράγοντες που επηρεάζουν την υγεία του ανθρώπου εξακολουθούν να διερευνώνται, ωστόσο ορισμένοι παράγοντες κινδύνου έχουν αποδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην πρόκληση καρκινικών κυττάρων. Σε αυτούς περιλαμβάνονται το κάπνισμα, η έκθεση στην ατμοσφαιρική ρύπανση, ο αμίαντος, το ραδόνιο και η γενετική προδιάθεση.

1.3.1 Κάπνισμα

Το κάπνισμα είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα, με το 78% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα στους άνδρες και το 53% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα στις γυναίκες να αποδίδονται σε αυτό. Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα του καρκίνου του πνεύμονα που σχετίζεται με το κάπνισμα, ποικίλλουν μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών, γεγονός που περιπλέκει τις παγκόσμιες στρατηγικές πρόληψης.[17] Στις δυτικές χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες και η Ευρώπη η συχνότητα εμφάνισης και η θνησιμότητα από καρκίνο του πνεύμονα είναι ανάλογες με τα ποσοστά καπνίσματος στον πληθυσμό.[18]

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο βασικοί λόγοι που το κάπνισμα σχετίζεται με τον καρκίνο του πνεύμονα κι αυτοί είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι νιτροενώσεις (N-nitroso compounds). Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι καρκινογόνες ενώσεις οι οποίες είναι παρούσες στον καπνό και προκαλούν μεταλλάξεις των γονιδίων p53 με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των κυττάρων και την καρκινογένεση. Οι νιτροενώσεις είναι μία άλλη κατηγορία χημικών ενώσεων που υπάρχουν στον καπνό των τσιγάρων και προκαλεί καρκινογένεση στα ζώα.[19]

Η διακοπή του καπνίσματος ελαττώνει κατά 30-50% τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα μετά από 10 χρόνια συγκριτικά με αυτούς που συνεχίζουν να καπνίζουν και κατά 50% τον κίνδυνο για καρκίνο του οισοφάγου και της στοματικής κοιλότητας 5 χρόνια μετά την διακοπή. Δεκαπέντε έτη μετά την διακοπή του καπνίσματος ο κίνδυνος του καρκίνου του πνεύμονα ελαττώνεται σχεδόν στο επίπεδο εκείνων των ατόμων που δεν κάπνισαν ποτέ. Η έκθεση των μη-καπνιστών στον καπνό του τσιγάρου ονομάζεται «παθητικό κάπνισμα». Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ενήλικες που συζούν με καπνιστές έχουν 15% περισσότερες πιθανότητες να νοσήσουν από ασθένειες που σχετίζονται με το κάπνισμα, σε σύγκριση με ενήλικες όπου δεν έρχονται σε καθημερινή επαφή με κάποιον καπνιστή. Όσον

αφορά στον καρκίνο του πνεύμονα, ο κίνδυνος ανάπτυξης του στους μη καπνιστές αυξάνεται κατά 20-30%.[20]

1.3.2 Ατμοσφαιρική Ρύπανση

Το περιβάλλον και γενικότερα η ατμοσφαιρική ρύπανση του εδάφους και του ύδατος σχετίζονται με τους μηχανισμούς πρόκλησης καρκίνου. Μερικοί ερευνητές εκτιμούν ότι σε παγκόσμιο επίπεδο περίπου 1-2% όλων των θανάτων από αυτή τη νόσο μπορεί να οφείλεται στην ατμοσφαιρική ρύπανση.[21] Η εξωτερική ατμοσφαιρική ρύπανση οφείλεται κατά κύριο λόγο στους αέριους ρύπους των αυτοκινήτων, στα συστήματα θέρμανσης αλλά και στα βιομηχανικά απόβλητα. Οι καρκινογόνες ουσίες που προέρχονται από την καύση ορυκτών καυσίμων περιλαμβάνουν πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες και μέταλλα όπως το αρσενικό, το νικέλιο και το χρώμιο. Η εσωτερική ατμοσφαιρική ρύπανση περιλαμβάνει τους ατμούς από την καύση οργανικών υλών κατά το μαγείρεμα, τη φορμαλδεΰδη και το βενζόλιο από υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη διακόσμηση των εσωτερικών χώρων. Το 2013, ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο αποκάλυψε ότι η εξωτερική ατμοσφαιρική ρύπανση και ένα από τα κύρια συστατικά του, τα σωματίδια (PM), συγκεκριμένα τα PM_{2,5}, είναι σημαντικές αιτίες καρκίνου του πνεύμονα. Η πιο πρόσφατη έκθεση Παγκόσμιας Επιβάρυνσης Νόσων υπολόγισε ότι 265.000 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα αποδόθηκαν στην εξωτερική ατμοσφαιρική ρύπανση το 2017 (14% όλων των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα).[22]

1.3.3 Γενετικοί παράγοντες

Αν και η έρευνα σε αυτό τον τομέα είναι ακόμα σε εξέλιξη, υπάρχουν αρκετά στοιχεία τα οποία αποδεικνύουν ότι η γενετική προδιάθεση και η κληρονομικότητα παίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα. Ο αυξημένος κίνδυνος, καρκίνου του πνεύμονα, στους απογόνους των ασθενών (2,4 φορές) με καρκίνο του πνεύμονα, έχει περιγραφεί σε αρκετές μελέτες. Ο μοριακός έλεγχος, έχει ανακαλύψει, πολλαπλές ανωμαλίες (μεταθέσεις, προσθήκες, ελλείψεις χρωμοσωμικών τόπων, μεταλλάξεις, ενίσχυση και υπερέκφραση γονιδίων) οι οποίες οδηγούν, σε τροποποίηση του DNA. Οι πιο συχνές γενετικές αλλοιώσεις στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα αφορούν, σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια p53 και K-ras και ελλείψεις στα χρωμοσώματα 3p, 5p, 9p, 17q, 18q, 22q. Επίσης είναι τεκμηριωμένο βιβλιογραφικά, ότι ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα είναι αυξημένος στα μέλη οικογενειών με κληρονομικά σύνδρομα, όπως για παράδειγμα το οικογενές ρετινοβλάστωμα, και το σύνδρομο Li-Fraumeni. [21]

1.3.4 Ραδόνιο

Το ραδόνιο αποτελεί φυσική πηγή ακτινοβολίας, το οποίο προέρχεται από τη φυσική διάσπαση του ραδίου που υπάρχει στο έδαφος και στα πετρώματα της γης. Το οικιακό ραδόνιο από το έδαφος αποτελεί τον δεύτερο πιο κοινό παράγοντα κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα, που υπολογίζεται στο 10% των περιπτώσεων.[23] Είναι ένα άχρωμο, άοσμο και άγευστο αέριο που ως ιδανικό αέριο είναι χημικά αδρανές. Το ραδόνιο εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού και παράγει σωματίδια α, που διασπώνται σε πολώνιο και μετά σε βισμούθιο, τα οποία όπως εισπνέονται, προκαλούν βλάβες στους

πυρήνες των κυττάρων του επιθηλίου του βρογχικού βλεννογόνου, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση.[24][21][23]

1.3.5 Αμίαντος

Ο αμίαντος αποτελεί μέλος μιας ομάδας πυριτικών ορυκτών ινών. Λόγω της αντοχής του, έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε πάνω από 3.000 χρήσεις και εφαρμογές. Ο αμίαντος συνδέεται στενά με την ανάπτυξη κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα. Η σχέση μεταξύ της έκθεσης στον αμίαντο και του καρκίνου του πνεύμονα έχει επιβεβαιωθεί παλιότερα από διάφορες μελέτες. Εκτιμάται, ότι το 5-7% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, μπορεί να αποδοθεί στην επαγγελματική έκθεση στον αμίαντο. Επιπλέον, η ταυτόχρονη έκθεση στο κάπνισμα και στον αμίαντο για τον κίνδυνο εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα φαίνεται να είναι αθροιστικά πολλαπλασιαστική.[23] Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η κυκλοφορία του αμιάντου έχει απαγορευτεί από το 2005.[21]

1.4 Συμπτώματα της ασθένειας

Η φύση και η σχετική συχνότητα των συμπτωμάτων, επίσης γνωστή ως υπογραφή συμπτωμάτων, διαδραματίζουν ζωτικό ρόλο στην εκτίμηση των συμπτωμάτων και στην αναζήτηση βοήθειας μεταξύ ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα.[25] Τα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα δεν είναι ειδικά και τις περισσότερες φορές δεν αξιολογούνται από τους ασθενείς. Έτσι για τον παραπάνω λόγο όταν γίνεται η διάγνωση είναι πιο προχωρημένη η νόσος, με μικρότερες πιθανότητες οριστικής θεραπείας και χειρότερη πρόγνωση.[26] Ένας επίμονος βήχας και η δύσπνοια είναι πρώιμα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, οι ασθενείς τείνουν να είναι ασυμπτωματικοί για αρκετούς μήνες πριν αναζητήσουν ιατρική βοήθεια. Όταν εμφανίζονται συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα, τείνουν να συγχέονται με συμπτώματα που σχετίζονται με το κάπνισμα ή πνευμονικές συννοσηρότητες όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Η εσφαλμένη εκτίμηση των συμπτωμάτων και η καθυστέρηση αναζήτησης βοήθειας μπορεί επίσης να προκύψουν από την εμφάνιση συστηματικών και μη ειδικών συμπτωμάτων προχωρημένου καρκίνου, συμπεριλαμβανομένης της κόπωσης, της ανορεξίας, της ανεξήγητης απώλειας βάρους και του πυρετού. Οι λοιμώξεις, κυρίως οι επαναλαμβανόμενες, ο πόνος στο στήθος, ο οστικός πόνος και τα νευρολογικά συμπτώματα (πονοκέφαλοι, λιποθυμία, σπασμούς ή αδυναμία των άκρων) είναι ύποπτα συμπτώματα, επίσης.[25]

1.5 Διάγνωση της ασθένειας

Για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα είναι απαραίτητες κάποιες εξετάσεις οι οποίες θα διαγνώσουν το πρόβλημα. Είναι σύνηθες να υπάρχει μία συγκεκριμένη σειρά εξετάσεων οι οποίες θα καθορίσουν το μέγεθος του προβλήματος εφόσον υπάρχει. Η διάγνωση των νεοπλασμάτων του πνεύμονα γίνεται, όπως εξάλλου σε όλα τα είδη του

καρκίνου, με ιστολογική ή κυτταρολογική εξέταση. Η σταδιοποίηση στη συνέχεια είναι μείζονος σημασίας, αφού συνήθως από αυτή καθορίζεται το είδος της θεραπείας.

Πριν αναφερθούμε στα παρακλινικά ή εργαστηριακά διαγνωστικά μέσα, πρέπει να επισημάνουμε το πόσο απαραίτητο είναι η λήψη του ατομικού αναμνηστικού, το ιστορικό της παρούσας νόσου, των καθημερινών συνηθειών και συνθηκών εργασίας του αρρώστου και του οικογενειακού ιστορικού. Με τη λήψη του ατομικού αναμνηστικού ψάχνουμε για παθήσεις τις οποίες πέρασε ο άρρωστος στο παρελθόν και που πιθανώς έχουν κάποια σχέση με τον καρκίνο του πνεύμονα. Ιδιαίτερη σημασία έχει αν ο άρρωστος είναι καπνιστής, σε τι περιβαλλοντολογικές συνθήκες ζεί, ποιες είναι οι συνθήκες εργασίας του κτλ.[27] Βασικές εξετάσεις αιματολογικές και βιοχημικές, όπως το επίπεδο αιμοσφαιρίνης, των ηλεκτρολυτών, της ηπατικής λειτουργίας, και το ασβέστιο είναι μια σειρά από τις αρχικές εξετάσεις στις οποίες θα υποβληθεί ο ασθενής και στη συνέχεια θα ακολουθήσουν μη επεμβατικές μέθοδοι όπως είναι η κυτταρολογική εξέταση πτυέλων, η ακτινογραφία και η αξονική τομογραφία.

1.5.1 Κυτταρολογική Εξέταση Πτυέλων

Η εξέταση των πτυέλων είναι μία μη επεμβατική μέθοδος η οποία απαιτεί υλικό που προκύπτει από τους ασθενείς μετά από βαθιά απόχρεμψη, με ποσοστό ευαισθησίας 66% και ένα ποσοστό ειδικότητας 99%. Ωστόσο, η ευαισθησία της κυτταρολογικής πτυέλων ποικίλλει ανάλογα με λειτουργική τοποθεσία του καρκίνου του πνεύμονα.[21] Για τους όγκους, που βρίσκονται κεντρικά, όπως το μικροκυτταρικό και το εκ πλακώδους επιθηλίου, η κυτταρολογική εξέταση είναι θετική σε υψηλό ποσοστό (80%). Για τους περιφερικούς όγκους διαμέτρου μικρότερης από 3 εκ., η διαγνωστική ικανότητα μειώνεται στο 20%. Παρόλα αυτά, η μέθοδος δεν είναι επεμβατική και αποτελεί τον απλούστερο και φθηνότερο τρόπο για διάγνωση. Η τριήμερη συλλογή πρωινών πτυέλων είναι η μέθοδος εκλογής.[13]

1.5.2 Ακτινογραφία Θώρακος

Η βασική εξέταση που γίνεται σε ένα άρρωστο που παραπονείται για συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα είναι η ακτινογραφία του πνεύμονα. . Οι περισσότεροι όγκοι φαίνονται στη ακτινογραφία ως σκιασμένες περιοχές. Ωστόσο οι ακτίνες Χ του θώρακα δεν μπορούν να δώσουν μία οριστική διάγνωση, επειδή συχνά δεν μπορούν να διακρίνουν μεταξύ καρκίνου κι άλλων παθήσεων, όπως το απόστημα των πνευμόνων (μία συγκέντρωση πύου που σχετίζεται με τους πνεύμονες).[28]

1.5.3 Αξονική (CT) και Μαγνητική (MRI) τομογραφία

Άλλος τρόπος διάγνωσης του καρκίνου του πνεύμονα είναι η αξονική τομογραφία. Η νέα τεχνολογία εκμεταλλεύεται μία εξέλιξη της αξονικής τομογραφίας της απεικονιστικής τεχνολογίας, η οποία λέγεται χαμηλής δόσολογίας και υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία (low dose city scan). Η ευαισθησία και η διακριτικότητα της μεθόδου είναι αρκετά υψηλή καθώς ανιχνεύει όγκους με διάμετρο 1cm ώστε να αποκαλύψει εγκαίρως τον καρκίνο του πνεύμονα. Αυτού του τύπου βλάβες είναι για παράδειγμα ο περιφερικός όζος, ένα σπυρί μέσα στον πνεύμονα με διάμετρο μικρότερη από τρία εκατοστά. [29]

Όσον αφορά τη μαγνητική τομογραφία, σε αντίθεση με τις ακτινογραφίες και τις αξονικές τομογραφίες (CT) που χρησιμοποιούν ακτινοβολία, αυτή χρησιμοποιεί ισχυρούς μαγνήτες και ραδιοκύματα. Τα σήματα από το μαγνητικό πεδίο εκπέμπονται από το σώμα σας και αποστέλλονται σε έναν υπολογιστή, όπου μετατρέπονται σε εικόνες. Διαφορετικοί τύποι ιστών αποστέλλουν διαφορετικά σήματα και αποτυπώνονται με διαφορετικό τρόπο. [30]

Η μαγνητική τομογραφία δεν διαφέρει ιδιαίτερα στην ευαισθησία σε σχέση με την αξονική τομογραφία. Και οι δύο μέθοδοι είναι πιο ακριβείς όταν νόσος έχει επεκταθεί αρκετά. Ωστόσο δεν χρησιμοποιείται γιατί οι πνεύμονες κινούνται συνεχώς και στην μαγνητική τομογραφία πρέπει το εξεταζόμενο όργανο να είναι εντελώς ακίνητο οπότε δεν ενδείκνυται ως εξέταση εκλογής για τους πνεύμονες γιατί υπάρχει πολύς θόρυβος. [29]

1.5.4 Τομογραφία με Εκπομπή Ποζιτρονίων (PET)

Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίου (P.E.T.) είναι μια απεικονιστική τεχνική της πυρηνικής ιατρικής η οποία παρέχει ανατομικές και λειτουργικές πληροφορίες για έναν οργανισμό, με στόχο τη διάγνωση της ασθένειας και τη συμβολή της τεχνικής αυτής στο σχεδιασμό μιας θεραπείας. Κατά την εξέταση χορηγείται στον ασθενή ένα ραδιοφάρμακο το οποίο καθλώνεται εκεί που υπάρχει παθολογική εστία. Το ραδιοφάρμακο διασπάται εκπέμποντας ποζιτρόνια (σωματίδια β⁺) τα οποία αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια του ιστού και δημιουργούν ακτίνες -γ (φωτόνια). Η Συμβολή της μεθόδου PET στην ογκολογία είναι σημαντική γιατί:

- I. αναγνωρίζει το είδος του όγκου (καλοήθους/κακοήθους)
- II. παρέχει πλήρη και ολόσωμο έλεγχο για πιθανή μετάσταση
- III. αξιολογεί την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και συμβάλλει στην επιλογή της [31]

Η τεχνολογική εξέλιξη των τελευταίων ετών οδήγησε στη κατασκευή του PET/CT, ενός ενιαίου μηχανήματος που συνδυάζει σε μια και μόνη εξέταση τα πλεονεκτήματα της λειτουργικής απεικόνισης της PET με τη λεπτομερή μορφολογική απεικόνιση της CT. [32] Ο συνδυασμός των δύο τεχνικών είναι πιο αποτελεσματικός όταν πρόκειται για μεγάλους και επιθετικούς όγκους μεγαλύτερους των 1cm. Ο συνδυασμός των PET/CT είναι πιο αποτελεσματικός σε σχέση με την PET και τη CT ξεχωριστά όσον αφορά τη σταδιοποίηση των όγκων αλλά και την ακριβή τους θέση. Επιπλέον μπορεί να ανιχνεύσει τα νεκρά καρκινικά κύτταρα δίνοντας έτσι τη δυνατότητα εκτίμησης της αποτελεσματικότητας της θεραπείας

1.5.5 Βρογχοσκόπηση

Η βρογχοσκόπηση είναι από τις ακριβέστερες μεθόδους για την διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα και είναι η διαδικασία κατά την οποία ο γιατρός εξετάζει τους μεγάλους αεραγωγούς του ασθενούς (τραχεία, βρόγχους), οι οποίοι αποτελούν τις κύριες οδούς μεταφοράς αέρα στους πνεύμονες. [33] Η βρογχοσκόπηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με την χρήση είτε εύκαμπτου, είτε άκαμπτου βρογχοσκοπίου. Και οι δύο τύποι βρογχοσκοπίου

έχουν ένα πλευρικό κανάλι, μέσω του οποίου μπορεί να περάσει και να οδηγηθεί προς το κάτω άκρο του ένας λεπτός καθετήρας, συνοδευόμενος από μία λαβίδα βιοψίας. Ο καθετήρας χρησιμοποιείται για την λήψη μικρού δείγματος για βιοψία από την εσωτερική επένδυση των βρόγχων, ή για την αφαίρεση μικρών αντικειμένων από τους αεραγωγούς. [34][35]

Η ευελιξία της βρογχοσκόπησης (χρησιμοποιώντας βρογχικές πλύσεις) προτιμάται συχνά για ασθενείς με κεντρικούς όγκους, και η ευαισθησία της μεθόδου ανέρχεται στο 88% για τους ασθενείς αυτούς. Παρά την προσθήκη κατευθυνόμενης διαβρογχικής βελόνας με οπτική ίνα και την αξονική τομογραφία (CT) η ευαισθησία της βρογχοσκόπησης πέφτει στο 70% σε ασθενείς με περιφερικούς όγκους και ακόμη χαμηλότερα σε ασθενείς με όγκο μικρότερο από 2 εκατοστά σε διάμετρο.[36] Οι περισσότεροι ασθενείς που κάνουν βρογχοσκόπηση δεν παρουσιάζουν έπειτα κάποιο πρόβλημα. Σοβαρές επιπλοκές συμβαίνουν σε λιγότερο από 1 στις 1000 βρογχοσκοπήσεις, με την αιμορραγία και την ανακοπή να είναι δύο από αυτές. [33][36][35]

1.5.6 Βιοψία

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα είναι η λήψη βιοψίας από τον πρωτοπαθή όγκο. Ο ιστός που λαμβάνεται για τη βιοψία συλλέγεται με σχετικά ελάχιστα επεμβατικές βελόνες όπως η βελόνα (FNA) υπό αξονικό τομογράφο, είτε με βρογχοσκόπηση, είτε με τη λήψη υγρού από τον υπεζώκωτα, είτε τέλος με κομμάτι από τον καρκινικό όγκο εφ' όσον αυτός έχει αφαιρεθεί με επέμβαση.[36][37]

Οι μέθοδοι λήψης βιοψίας είναι:

- 1) διαδερμική παρακέντηση ή λήψη βιοψίας με ακτινολογική καθοδήγηση
- 2) υπό ενδοβρογχικό υπερηχογράφημα (EBUS) καθοδηγούμενη από βελόνα αναρρόφησης
- 3) λήψη βιοψίας με τη χρήση συμβατικού εύκαμπτου βρογχοσκοπίου, κλειστή δια βρογχική με βελόνα αναρρόφησης (TBNA) ή συνδυασμό τους και
- 4) λήψη βιοψίας με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικά καθοδηγούμενου βρογχοσκοπίου (ENB). [21]

1.6 Σταδιοποίηση

Όταν επιβεβαιωθεί η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, το επόμενο βήμα είναι ο καθορισμός του σταδίου της νόσου. Βασικός σκοπός του καθορισμού του σταδίου είναι η απόφαση για τη δυνατότητα της εκτομής του όγκου, αλλά και για την απόφαση ενός συνδυασμένου θεραπευτικού σχήματος και την επιλογή της καλύτερης δυνατής θεραπείας. Η σταδιοποίηση είναι ο καθορισμός της έκτασης του καρκίνου σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διαδρομή του.

Η σημασία μιας ακριβούς σταδιοποίησης για τον θεραπευτικό χειρισμό του ασθενούς που πάσχει από καρκίνο του πνεύμονα είναι γνωστή αφού και το στάδιο της νόσου θα καθορίσει τη θεραπευτική προσέγγιση και έμμεσα την πρόγνωση και την επιβίωση του ασθενούς. Ενδιαφέρει κυρίως το μη μικροκυτταρικό καρκίνο δεδομένου ότι ο μικροκυτταρικός κατά τη στιγμή της διάγνωσης έχει είτε ακτινολογικά διεύρυνση μεσοθωρακίου ή εξωθωρακική νόσο ή και τα δύο στο 95% των περιπτώσεων. [38][39]

Ένα ιδανικό σύστημα σταδιοποίησης επιτρέπει την ακριβή περιγραφή της έκτασης της νόσου. Το σύστημα που χρησιμοποιείται σήμερα είναι το λεγόμενο TNM. Το σύστημα αυτό προτάθηκε αρχικά από τον Denoix τη δεκαετία του 1940 και περιγράφει **3 παράγοντες**: η έκταση του πρωτοπαθούς όγκου δεικνύεται με το γράμμα **T** (Tumor factor), ακολουθούμενο από προσδευτικά αυξανόμενους αριθμητικούς δείκτες, που δεικνύουν το ανάλογα αυξανόμενο μέγεθος της ογκοτικής μάζας και την επέκταση της στους παρακείμενους ανατομικούς σχηματισμούς. Το γράμμα **N** (Nodule factor), ακολουθούμενο από ανάλογους αριθμητικούς δείκτες, δεικνύει την απουσία ή παρουσία λεμφαδενικών μεταστάσεων. Τέλος το γράμμα **M** (Metastasis factor) , ακολουθούμενο πάντοτε από αριθμητικούς δείκτες, δεικνύει την απουσία ή ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλους ιστούς και όργανα. Για ασθενείς με NSCLC, το πρώτο TNM σύστημα σταδιοποίησης υιοθετήθηκε το 1974. Έκτοτε υπήρξαν διάφορες αναθεωρήσεις έως την πιο πρόσφατη του 1997 που υιοθετήθηκε από τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (International Union Against Cancer-UICC) και τη Διατομεακή Αμερικανική Επιτροπή κατά του Καρκίνου (American Journal Committee on Cancer-AJCC).[40]

Ο πίνακας 1.6, δείχνει αναλυτικά τις διάφορες κατηγορίες για τις τρεις παραπάνω συνιστώσες αλλά και πως αυτές συνδυαστικά σταδιοποιούν τον καρκίνο στα τέσσερα βασικά στάδια.

Πίνακας 1.6: Ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα σύμφωνα με το TNM σύστημα [41]

T (Πρωτοπαθής όγκος)	
TX	Δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιολόγηση του πρωτοπαθούς όγκου ή όγκου που αποδεικνύεται από την ύπαρξη νεοπλασματικών κυττάρων σε εξετάσεις πτυέλων ή βρογχικές εκπλύσεις, αλλά δεν οπτικοποιείται διά απεικόνισης ή βρογχοσκόπησης.
T0	Δεν υπάρχει ένδειξη πρωτοπαθούς όγκου • Tis Καρκίνωμα in situ.
T1	Ο όγκος είναι μικρότερος από 3 cm στη μεγαλύτερη διάσταση, που περιβάλλεται από πνεύμονα και δεν προσβάλλει κύριο βρόγχο Υποκατηγορίες του T1: • T1a: Ο όγκος είναι μικρότερος από 2 cm στη μεγαλύτερη διάσταση • T1b: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 2 cm αλλά μικρότερος από 3 cm στη μεγαλύτερη διάσταση
T2	Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 3 cm αλλά μικρότερος από 7 cm Υποκατηγορίες του T2 με βάση τη διάμετρο • T2a: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 3 cm αλλά μικρότερος ή ίσος με 5 cm • T2b: Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 5 cm αλλά μικρότερος από 7 cm στην μεγαλύτερη διάσταση του Επίσης ως T2 χαρακτηρίζεται ο όγκος που: • Παρουσιάζει διήθηση του σπλαχνικού υπεζωκότα

	• Παρουσιάζει ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα η οποία εκτείνεται ως την πύλη αλλά δεν περιλαμβάνει ολόκληρο τον πνεύμονα • Παρουσιάζει διήθηση κύριου βρόγχου σε απόσταση μεγαλύτερη ή ίση με 2 cm από την κύρια τρόπιδα
T3	Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 7 cm ή παρουσιάζει ένα εκ των ακόλουθων: • Ο όγκος βρίσκεται σε κύριο βρόγχο σε απόσταση μικρότερης από 2 εκατοστά από την κύρια τρόπιδα, και η τρόπιδα είναι ελεύθερη νεοπλασίας • Ο όγκος προκαλεί ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα ολόκληρου του πνεύμονα • Να συνυπάρχει ξεχωριστός όζος - όζοι στον ίδιο λοβό • Ο όγκος να διηθεί το θωρακικό τοίχωμα • Ο όγκος να διηθεί τον Μεσοθωρακικό Υπεζωκότα • Ο όγκος να διηθεί το Τοιχωματικό περικάρδιο • Ο όγκος να διηθεί το Διάφραγμα • Ο όγκος να διηθεί το Φρενικό νεύρο
T4	Ο όγκος είναι οποιουδήποτε μεγέθους και διηθεί οποιοδήποτε από τα ακόλουθα: • Μεσοθωράκιο • Καρδιά • Τα μεγάλα αγγεία • Τραχεία • Οισοφάγο • Τρόπιδα • Σπονδυλικό σώμα • Παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο • Επίσης να συνυπάρχει ξεχωριστό οζίδιο - οζίδια σε διαφορετικό ομόπλευρο λοβό

N (Λεμφαδένες)

NX	Χωρίς να μπορούν να εκτιμηθούν οι επιχώριοι λεμφαδένες
N0	Χωρίς μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες
N1	Μετάσταση σε ομόπλευρους περιβρογχικούς ή / και σύστοιχους πυλαίους λεμφαδένες και ενδοπνευμονικούς λεμφαδένες
N2	Μετάσταση σε ομόπλευρους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες ή / και υποτροπιδικούς λεμφαδένες

N3	Μετάσταση σε ετερόπλευρους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες, ετερόπλευρους πυλαίους, σύστοιχους ή ετερόπλευρους σκαληνούς ή υπερκλείδιους λεμφαδένες
-----------	---

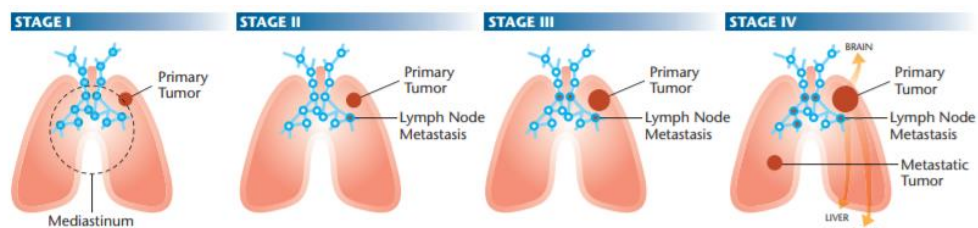
M (Μετάσταση)	
MX	Απομακρυσμένη μετάσταση που δεν μπορεί να εκτιμηθεί
M0	Χωρίς απομακρυσμένη μετάσταση
M1	Απομακρυσμένη μετάσταση • M1a: Ξεχωριστό οζίδιο - οζίδια σε ετερόπλευρο λοβό, όγκος με υπεζωκοτικά οζίδια ή κακοήγη πλευριτική (ή περικαρδιακή) συλλογή • M1b: απομακρυσμένη μετάσταση

Η νέα σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα με βάση το σύστημα TNM (πρωτοπαθής όγκος, λεμφαδένες, μεταστάσεις) φαίνεται στον πίνακα 1.6.1.

Πίνακας 1.6.1: Η νέα σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα. Αντιστοιχία σταδίου με ταξινόμηση TNM

ΣΤΑΔΙΟ	TNM
0	TisN0M0
IA	T1aN0M0 T1bN0M0
IB	T2aN0M0 T2bN0M0

IIA	T1aN1M0 T1bN1M0 T2aN1M0 T2bN0M0
IIB	T2bN1M0 T3N0M0
IIIA	T1a,bN2M0 T2a,bN2M0 T3N1M0 T3N2M0 T4N0M0 T4N1M0
IIIB	T0-4N3M0 T4N2M0
IV	T0-4N0-3M1a T0-4N0-3M1b



Εικόνα 1.6: Απεικόνιση των σταδίων του καρκίνου του πνεύμονα[39]

1.7 Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα

Οι θεραπευτικές μέθοδοι, οι οποίες εφαρμόζονται μέχρι στιγμής και έχουν καθιερωθεί ως μέθοδοι εκλογής, καθορίζονται από τον τύπο του καρκίνου του πνεύμονα και από το στάδιο της νόσου. Με γνώμονα αυτά τα δύο ο γιατρός είναι σε θέση να αποφασίσει την κατάλληλη θεραπεία για τον ασθενή. Η θεραπεία μπορεί να περιλαμβάνει χειρουργική επέμβαση εφ' όσον αυτό είναι εφικτό, ακτινοβολίες ή χημειοθεραπείες με στοχευμένες θεραπείες φαρμάκων.

Ο κλασικός σύγχρονος τρόπος θεραπείας για τον καρκίνο του πνεύμονα από τη στιγμή της διάγνωσης είναι ο εξής:

- I. Καθορισμός του ιστολογικού τύπου, διάκριση σε μικροκυτταρικό και μη μικροκυτταρικό.
- II. Σταδιοποίηση του όγκου

Με τον τρόπο αυτό προκύπτουν οι ακόλουθες περιπτώσεις:

- a) Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου I, II, IIIα.
- b) Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου IIIβ, IV.
- c) Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου I, II, IIIα (περιορισμένη νόσος).
- d) Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου IV και πιθανά IIIβ (εκτεταμένη νόσος).[13]

Σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα εφαρμόζονται σε κάθε περίπτωση οι ακόλουθοι συνδυασμοί:

Θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

Για τα αρχικά στάδια του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα έχει καθιερωθεί η χειρουργική επέμβαση ως η μόνη ριζική θεραπευτική αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα και πρέπει να πληροί δύο προϋποθέσεις: πρώτον να συνεπάγεται ριζική εκτομή του όγκου και δεύτερον να διατηρεί όσο το δυνατόν περισσότερο λειτουργικό πνευμονικό παρέγχυμα.[42] Εφ' όσον είναι βέβαιο ότι ο όγκος ή οι όγκοι είναι εγχειρήσιμοι τότε γίνεται η επέμβαση (στάδια IA έως IIIA) . Οι κυριότερες τεχνικές αφαίρεσης είναι η σφηνοειδής εκτομή κατά την οποία αφαιρείται ένα μικρό τμήμα του πνεύμονα που περιέχει τον όγκο, αλλά και μικρό τμήμα υγιούς ιστού περιφερειακά του όγκου, η λοβεκτομή κατά την οποία αφαιρείται όλος ο λοβός του ενός πνεύμονα, η τμηματική εκτομή όπου αφαιρείται ένα μεγαλύτερο τμήμα του πνεύμονα, αλλά όχι όλος ο λοβός και σπανίως η πνευμονεκτομή όπου αφαιρείται ολόκληρος ο πνεύμονας.[43] Στα στάδια IIIβ και IV, δηλαδή για τους όγκους εκείνους, που έχουν προχωρήσει τοπικά ή έχουν δώσει μεταστάσεις, μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική θεραπεία μόνο μετά από αυστηρά επιλογή και σε πολύ περιορισμένο αριθμό ασθενών, καθώς η εφαρμογή της δεν έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα.[44] Συγκεκριμένη ένδειξη για χειρουργική θεραπεία καρκίνου σταδίου IIIβ μπορεί να τεθεί σε αρρώστους με όγκο του άνω θωρακικού στομίου.[45] Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται η ακτινοθεραπεία όπου χρησιμοποιεί ενεργειακές ακτίνες με υψηλή ισχύ, όπως οι ακτίνες Χ, για να σκοτώσει τα καρκινικά κύτταρα. Συνήθως συνδυάζεται με τη χημειοθεραπεία. Αυτή η μορφή της ακτινοθεραπείας ονομάζεται ριζική ακτινοθεραπεία.

Ειδικότερα το στάδιο IV, που υποδηλώνει εξ' ορισμού την παρουσία εξωπνευμονικής μεταστατικής νόσου (εγκέφαλος, ήπαρ, επινεφρίδια, οστά), και έχει πολύ μικρό ποσοστό 5ετούς επιβίωσης (<1%), θεωρείται αθεράπευτο. Παρ' όλα αυτά, η χημειοθεραπεία εφαρμόζεται σε επιλεγμένους ασθενείς με στόχο κυρίως την ανακούφιση (palliative effect) και τη βελτίωση της ποιότητας της ζωής τους.[43]

Θεραπεία του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αποδείχθηκε μη αντιμετωπίσιμος με την χειρουργική επέμβαση. Ακόμη και σε σχετικά πρώιμο στάδιο, ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα θεραπεύεται κυρίως με χημειοθεραπεία και ακτινοβολίες. Για την περιορισμένη νόσο, η χειρουργική εξαίρεση του όγκου ή η ακτινοθεραπεία είχε διάμεση επιβίωση 3 με 4 μήνες, ενώ με την εφαρμογή της χημειοθεραπείας, αυξήθηκε στους 12 μήνες. Στην εκτεταμένη νόσο, η επιθετική χημειοθεραπεία που χρησιμοποιείται, φαίνεται να βελτίωσε την διάμεση επιβίωση από 6-8 εβδομάδες για τους ασθενείς, σε 8-10 μήνες.[13]

Δύο είναι οι συνδυασμοί χημειοθεραπείας πρώτης γραμμής, που χρησιμοποιούνται και είναι ευρέως αποδεκτοί:

- η ετοποσίδη σε συνδυασμό με την πλατίνα (EP) ή το ανάλογο της, την καρμποπλατίνα και
- η κυκλοφωσφαμίδη, σε συνδυασμό με τη δοξορουμπικίνη και την βινκριστίνη (CAV).[13]

1.8 Πρόληψη του καρκίνου

Πολλές φορές η πρόληψη μπορεί να συμβάλλει στην παράταση του προσδόκιμου ζωής αλλά και της ποιότητάς της μετά την προσβολή από την ασθένεια. Σε περιπτώσεις ωστόσο που η ασθένεια μπορεί να οφείλεται σε εξωγενείς παράγοντες, η αλλαγή του τρόπου ζωής όπως η διακοπή του καπνίσματος, η αποφυγή της παχυσαρκίας, η καθημερινή άσκηση και η υιοθέτηση ενός υγιεινού προτύπου διατροφής, πιθανολογείται ότι μπορεί να εξαλείψει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα.

1.8.1 Διατροφικές συνήθειες

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η διατροφή και οι διατροφικές συνήθειες έχουν υποστεί μια σειρά σημαντικών μεταβολών σε σχέση με τον τρόπο χρήσης των τροφίμων. Έχουν παρατηρηθεί σημαντικές μεταβολές στη σύνθεση της διατροφής, οι οποίες έχουν επιφέρει με τη σειρά τους αλλαγές στο ανάστημα και τη σύσταση του σώματος. Η φύση και ο ρυθμός αυτών των διατροφικών αλλαγών ποικίλλουν σημαντικά με την πάροδο του χρόνου. Σε παγκόσμιο επίπεδο, είναι εμφανής μια έντονη μετατόπιση σε μια διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και επεξεργασμένα τρόφιμα και χαμηλή σε φυτικές ίνες, φρέσκα φρούτα και λαχανικά, με αντίστοιχη αύξηση στην εμφάνιση χρόνιων ασθενειών.[46] Με το πέρασμα του χρόνου, έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες, όπου έχει αποδειχθεί ότι η κακή διατροφή και ο καθιστικός τρόπος ζωής είναι δύο από τους πιο βασικούς παράγοντες που μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου σε ένα άτομο.[47] Η προσκόλληση σε υγιεινές

επιλογές τροφίμων με έμφαση στα φυτικά τρόφιμα, αποδεικνύεται ως ο ιδανικός κανόνας διατροφής και μπορεί να έχει ισχυρό αντίκτυπο στην πρόληψη των χρόνιων ασθενειών, όπως ο καρκίνος του πνεύμονα. Αντίθετα υπάρχουν αρκετές μελέτες που έχουν εξετάσει τη συσχέτιση του κορεσμένου λίπους και του κρέατος με τον καρκίνο του πνεύμονα και συμπεραίνουν πως η αύξηση της πρόσληψης κορεσμένου λίπους και κόκκινου κρέατος οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα.[48][49] Συγκεκριμένα μια αντικατάσταση 5% των κορεσμένων λιπών με πολυακόρεστα λιπαρά οδηγεί σε μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα κατά 16 - 17%.[50]

Τα φρούτα και τα τρόφιμα που περιέχουν καροτενοειδή (το α-καροτένιο είναι ο προστατευτικός παράγοντας) πιθανώς προστατεύουν από τον καρκίνο του πνεύμονα, ενώ υπάρχουν περιορισμένα στοιχεία που υποδηλώνουν ότι τα λαχανικά (ιδιαίτερα στις σκούρες πράσινες και πορτοκαλί ποικιλίες) ενδείκνυνται για την προστασία του.[51] Ομοίως, η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σελήνιο ή συμπληρώματα σεληνίου αποδεικνύεται ότι προστατεύουν τον οργανισμό από την εκδήλωση της νόσου. [52] Η έρευνα των Anic et al. (2016) που διήρκεσε 10,5 χρόνια έδειξε πως η κατανάλωση φρούτων, λαχανικών και δημητριακών ολικής άλεσης ασκεί προστατευτική δράση έναντι του κινδύνου για καρκίνο του πνεύμονα διότι αυτές οι ομάδες τροφίμων έχουν ισχυρά αντιοξειδωτικά που βοηθούν στην άμυνα του οργανισμού.[53] Σημαντική επίσης είναι και οι ξηροί καρποί καθώς η κατανάλωση αυτών προστατεύει το DNA από οξειδωτική βλάβη, αφού έχουν χημειοπροστατευτικές ιδιότητες για τον καρκίνο του πνεύμονα.[54]

1.8.2 Σωματική άσκηση

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία που υποδηλώνουν ότι η σωματική άσκηση μπορεί να έχει αντίκτυπο σε όλα τα στάδια του ταξιδιού ενός καρκινοπαθούς. Η σωματική αδράνεια έχει αποδειχθεί ως πρωταρχικός παράγοντας κινδύνου για μια ποικιλία ασθενειών που απειλούν τη ζωή, όπως καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνος. Ενώ η υπερβολική άσκηση και η υπερπροπόνηση μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά τα αποτελέσματα της θεραπείας και την ποιότητα ζωής, η τακτική μέτρια άσκηση/φυσική δραστηριότητα μπορεί να προσφέρει συστηματικά ευεργετικά αποτελέσματα, όπως βελτιωμένη φυσιολογική λειτουργία, μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης και επανεμφάνισης του καρκίνου και καλύτερη ποιότητα ζωής.[55] Τόσο σε υγιείς όσο και σε άρρωστους ανθρώπους, η σωματική δραστηριότητα επηρεάζει σημαντικά το επίπεδο της σωματικής απόδοσης και αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό ενός υγιεινού τρόπου ζωής βελτιώνοντας όχι μόνο τη σωματική κατάσταση αλλά και την ψυχική κατάσταση των ασθενών.[56]

Η συστηματική εκγύμναση του σώματος όμως προσφέρει άλλο ένα πλεονέκτημα, άγνωστο μέχρι σήμερα, το οποίο δίνει ελπίδα στους ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν οι ερευνητές Line Pedersen και Pernille Hojman από το Πανεπιστήμιο της Κοπεγχάγης, οι οποίοι διεξήγαγαν μελέτη σε ποντίκια, διαπιστώνοντας ότι όσα έτρεχαν τακτικά σε ρόδα (το αντίστοιχο του διαδρόμου για τον άνθρωπο) μείωσαν την ανάπτυξη των υφιστάμενων όγκων στους πνεύμονες. Το όφελος που διαφάνηκε από τα ευρήματα της μελέτης δεν αφορούσε μόνο στον καρκίνο του πνεύμονα αλλά σε πολλαπλούς τύπους όγκων, μεταξύ αυτών του καρκίνου του δέρματος και του ήπατος. Επιπλέον, τα ποντίκια που ασκούσαν τακτικά είχαν γενικά μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν καρκίνο του πνεύμονα. Σύμφωνα με τους ειδικούς, το ανοσοποιητικό σύστημα έχει μια εξαιρετική ικανότητα να καταπολεμά τον καρκίνο και η κινητοποίηση των κυτταροτοξικών κατά τη διάρκεια της άσκησης θα μπορούσε να εμποδίσει την ανάπτυξη της νόσου ή να αποτρέψει

την εμφάνισή της. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι οι θετικές επιδράσεις του τρεξίματος εκτός του ότι απεδείχθησαν ανώτερες του σχηματισμού και της ανάπτυξης όγκων, επεκτάθηκαν και στην απώλεια βάρους που παρατηρείται σε ασθενείς με καρκίνο, μια κατάσταση γνωστή ως καχεξία. Τα ποντίκια με καρκίνο του πνεύμονα που ασκούσαν τακτικά δεν έδειξαν σημάδια καχεξίας.[57]

Άλλη μία έρευνα για τη σωματική άσκηση και για τον καρκίνο του πνεύμονα ήταν μια Νορβηγική έρευνα όπου συμμετείχαν 81,516 άνδρες και γυναίκες και διήρκεσε 19 χρόνια. Κατά τη διάρκεια της έρευνας, 413 άνδρες και 51 γυναίκες ανέπτυξαν καρκίνο του πνεύμονα. Τα αποτελέσματα της έρευνας απέδειξαν ότι η σχέση μεταξύ άσκησης και κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα είναι αντιστρόφως ανάλογη. Μετά τη ρύθμιση του καπνίσματος και του αριθμού των τσιγάρων καθημερινώς, οι άνδρες που περπατούσαν τουλάχιστον 4 ώρες/εβδομάδα είχαν μείωση του κινδύνου κατά 25 % σε σχέση με αυτούς που είχαν λιγότερη φυσική δραστηριότητα στον ίδιο χρόνο. Οι άνδρες που είχαν πιο έντονη φυσική δραστηριότητα με ≥ 4 ώρες/εβδομάδα είχαν μείωση κινδύνου που έφτανε το 29 %. Στις γυναίκες ο κίνδυνος εμφάνισης είναι πολύ μικρότερος σε σχέση με τους άνδρες οπότε δεν είναι ξεκάθαρα τα αποτελέσματα και κατά πόσο μπορεί να συσχετιστεί απόλυτα η άσκηση με τη μείωση κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα.[58]

1.8.3 Διακοπή του καπνίσματος

Ο κύριος παράγοντας για την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα είναι το κάπνισμα. Αναπόφευκτα λοιπόν, το συμπέρασμα που πηγάζει είναι ότι το σημαντικότερο μέτρο για την πρόληψή του είναι η διακοπή ή αποφυγή του καπνίσματος. Η προσπάθεια πρόληψης που απευθύνεται στους νέους μπορεί να αποτρέψει την εμφάνιση κάποιας νόσου σε 30-50 χρόνια, ενώ η διακοπή του καπνίσματος στους τωρινούς ενήλικες καπνιστές αποφέρει οφέλη για την υγεία, το συντομότερο σε 20-30 χρόνια. [59]

Αρκετοί κρατικοί φορείς και διάφορες επιστημονικές εταιρείες, οργάνωσαν και οργανώνουν κατά καιρούς, διάφορες εκστρατείες που έχουν σκοπό να συμβάλλουν στη πρόληψη, ενημερώνοντας και παροτρύνοντας τον κόσμο για την αποφυγή, τη διακοπή αλλά και τις βλαβερές συνέπειες που έχει το κάπνισμα στον οργανισμό.

Κάποια από τα μέτρα που έλαβαν ήταν:

- ✓ Την απαγόρευση οποιασδήποτε διαφήμισης στη τηλεόραση που αφορά την πώληση τσιγάρων και είδη καπνού
- ✓ Το σφράγισμα των πακέτων όπου πάνω τους αναγράφεται πόσο βλαβερό είναι το κάπνισμα, με τη χρήση πραγματικών εικόνων
- ✓ Τη χρήση εντύπων και την οργάνωση ημερίδων με σκοπό την ενημέρωση του κόσμου
- ✓ Την καθιέρωση του Νοεμβρίου ως ο μήνας ευαισθητοποίησης για τον καρκίνο του πνεύμονα.[60]

Άλλος ένας τρόπος για την άμεση και οριστική διακοπή του καπνίσματος σχετίζεται με τη γενετική και τη προδιάθεση που έχει ένας άνθρωπος να ξεκινήσει το κάπνισμα. Ωστόσο πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα γονίδια που σχετίζονται με την προδιάθεση για το κάπνισμα είναι διαφορετικά από εκείνα που αυξάνουν τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα. Η μοριακή χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος θα μπορούσε να διαχωρίσει τους ανθρώπους σε κατηγορίες ανάλογα με την εξάρτηση που έχουν στη νικοτίνη.[61]

Η ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να υπάρξει ακόμη και αν το άτομο σταματήσει το κάπνισμα, διότι είναι συνδυαστικός παράγοντας και όχι ο μοναδικός. Ωστόσο έρευνες έχουν δείξει ότι το 90% που νόσησαν από καρκίνο του πνεύμονα, δεν θα τον εμφανίζουν αν δεν κάπνιζαν. Μετά από 10 χρόνια διακοπής ο κίνδυνος αρχίζει να υποδιπλασιάζεται αλλά χρειάζεται αρκετά χρόνια ακόμη για να φτάσει κάποιος καπνιστής στο ίδιο επίπεδο με έναν μη καπνιστή.[60]

1.8.4 Πρόωρη διάγνωση

Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα με την ανίχνευση και την παρακολούθηση της ασθένειας είναι απαραίτητη λόγω του μεγάλου αριθμού των περιπτώσεων, του υψηλού αλλά μειωμένου κινδύνου για τους πρώην καπνιστές και γενικά για την συνήθη κακή έκβαση της θεραπείας. Κύριος σκοπός του είναι να διαγνωστεί η νόσος πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα. Μολονότι τα συμπτώματα είναι δυσδιάκριτα πολλές φορές, γίνεται προσπάθεια διάγνωσης του όγκου σε όσο το δυνατό αρχικό στάδιο, έτσι ώστε να υπάρξει άμεση θεραπευτική αντιμετώπιση και μείωση της πιθανότητας θανάτου. Σήμερα, ο ετήσιος προληπτικός έλεγχος είναι ιδιαίτερα σημαντικός, διότι μας δίνει πληροφορίες για τυχόν έκθεση σε καρκινογόνα, για πρώιμα κλινικά σημεία καρκινωμάτων και για οικογενειακή προδιάθεση. Αυτό επιτυγχάνεται με λεπτομερείς εξετάσεις, όπως εργαστηριακές (εξετάσεις αίματος) και απεικονιστικές.

Για τον καρκίνο του πνεύμονα δεν υπάρχει κάποια ειδική εξέταση για προληπτικό έλεγχο. Διενεργούνται διάφορες εξετάσεις που δεν έχουν σημαντικά αποτελέσματα. Οι εξετάσεις αυτές μπορεί να είναι δαπανηρές αλλά και επώδυνες για τον ασθενή θέτοντας τον σε μεγαλύτερο κίνδυνο. Για παράδειγμα, η ακτινογραφία θώρακος και η αξονική τομογραφία μπορεί να δείξουν ύπαρξη κακοήθειας χωρίς να υπάρχει ή το αντίθετο, να υπάρχει δηλαδή και να μην εντοπιστεί.[60] Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι η έντονη και τακτική παρακολούθηση μπορεί να οδηγήσει στην ανίχνευση ασυμπτωματικών καρκίνων, για τις οποίες η επιβίωση είναι μεγαλύτερη από την πιο προχωρημένη ασθένεια, δεν υπάρχει αποδεδειγμένη μείωση στον αριθμό των θανάτων. Ένας τομέας που θα μπορούσε να φανεί χρήσιμος στο εγχείρημα της πρόγνωσης είναι η μεταβολομική η οποία θα αναλυθεί λεπτομερώς στο επόμενο κεφάλαιο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

2.1 Εισαγωγή

Κάθε χρόνο ο αριθμός των ασθενειών που προσβάλλουν τον άνθρωπο αυξάνεται δραματικά. Έτσι οι έρευνες έχουν στραφεί σε μεθόδους οι οποίες θα μπορούν να ανιχνεύσουν τέτοιες ασθένειες σε πολύ πρώιμο στάδιο. Για να επιτευχθεί αυτός ο σκοπός πρέπει να γίνει γνωστή η βιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Όπως είναι γνωστό, όλες οι γενετικές πληροφορίες για την κατασκευή και τη λειτουργία ενός οργανισμού εμπεριέχονται στα γονίδια (DNA). Σύμφωνα με το κεντρικό δόγμα της μοριακής βιολογίας, η ροή των γενετικών πληροφοριών σε έναν οργανισμό πραγματοποιείται από το DNA προς τις πρωτεΐνες με τη βοήθεια των μορίων RNA. Το πρώτο βήμα στην έκφραση της γενετικής πληροφορίας είναι η μεταφορά της με κωδικοποιημένη μορφή από το DNA στο RNA, διαδικασία που ονομάζεται «μεταγραφή» (transcription). Στη συνέχεια, με τη διαδικασία της «μετάφρασης» (translation), το αγγελιοφόρο RNA (messenger-mRNA) μεταφέρει την πληροφορία στα ριβοσώματα (λειτουργώντας ως ενδιάμεσος φορέας πληροφοριών από το DNA στον τόπο της πρωτεϊνοσύνθεσης). Παράλληλα, το μεταφορικό RNA (transferRNA) μεταφέρει τα αμινοξέα για την διεργασία της πρωτεϊνοσύνθεσης ενώ τα ριβοσωματικά RNA (ribosomal-rRNA) συμμετέχουν στην πρωτεϊνοσύνθεση. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η μετάδοση των γενετικών πληροφοριών ή αλλιώς η «γονιδιακή έκφραση».[62][63]

Για την ανάλυση των δεδομένων, σε όλα τα επίπεδα της κυτταρικής ρύθμισης, δηλαδή αυτών που επιτελούνται σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης αλλά και μεταμεταφραστικών τροποποιήσεων εφαρμόζονται οι «-ομικές» (-omics) τεχνικές. Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών που βασίζονται στις υψηλής απόδοσης βιομοριακές αναλύσεις ή αλλιώς ομικές αναλύσεις, κατέστησαν δυνατή την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση δεκάδων έως χιλιάδων μορίων στα διάφορα επίπεδα κυτταρικής λειτουργίας. Μέσω των ομικών τεχνικών, δόθηκε ώθηση ως προς την ολιστική προσέγγιση της μοριακής φυσιολογίας ενός συστήματος απορρίπτοντας πλέον την ανάλυση μεμονωμένων χαρακτηριστικών. Οι ομικές αναλύσεις, ανάλογα με το κυτταρικό επίπεδο που μελετάται, χωρίζονται σε υποκατηγορίες, οι οποίες μπορούν να συνδυαστούν, καθώς τα κυτταρικά επίπεδα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους.[64]

Οι υποκατηγορίες αυτές είναι οι:

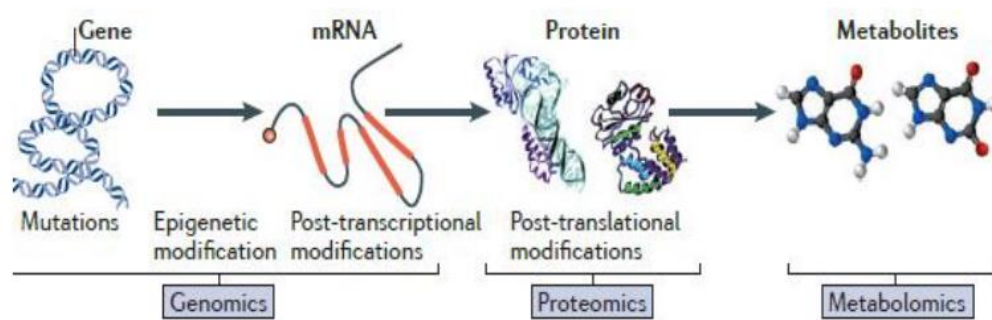
Γονιδιωματική που μελετά όλες τις αλληλουχίες των νουκλεοτιδίων, συμπεριλαμβανομένων των δομικών γονιδίων, των ρυθμιστικών αλληλουχιών και του μη κωδικοποιημένων τμημάτων του DNA στα χρωμοσώματα που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου κυττάρου ή οργανισμού σε συγκεκριμένο χρόνο ή υπό συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών,

Μεταγραφωματική η οποία μελετά του συνόλου των μεταγραφημάτων (mRNA) που παράγονται σε ένα κύτταρο ή είδος κυττάρων ή κάποιο οργανισμό,

Πρωτεωμική που περιλαμβάνει την ταυτοποίηση πρωτεϊνών στο σώμα και τον προσδιορισμό του ρόλου τους στις φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές λειτουργίες.[65][66]

Στις «-ομικές» τεχνικές χρησιμοποιούνται ολιστικές μέθοδοι για την ανάλυση των δεδομένων, αφού τα βιολογικά συστήματα θεωρούνται και εξετάζονται ως ένα σύνολο σε μια δεδομένη κατάσταση. Εν τούτοις, η ανάλυση της γονιδιακής και της πρωτεϊνικής

έκφρασης δεν αποδίδει την κυτταρική λειτουργία στο σύνολό της. Το πολύπλοκο και οργανωμένο βιοχημικό δίκτυο στο οποίο μικρά μόρια, όπως μεταβολικά υποστρώματα και προϊόντα, αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με άλλα βιολογικά μακρομόρια, αποτελεί το μεταβόλωμα. Έτσι, η μεταβολομική αναλαμβάνει τη θέση της ως η νέα επιστημονική ολιστική "omics" επιστήμη, μια «υψηλής απόδοσης» ανάλυση ("high-throughput") του μεταβολισμού, δηλαδή των τελικών προϊόντων των βιολογικών διεργασιών που πραγματοποιούνται εντός του κυττάρου. Πλεονεκτεί σε σύγκριση με τις άλλες -ομικές τεχνικές καθώς δεν επηρεάζεται μόνο από τον γονότυπο αλλά προσδιορίζει και τον τρόπο που οι μεταβολίτες αντιδρούν στην έκθεση του οργανισμού σε γενετικές αλλαγές, ασθένειες ή περιβαλλοντικές επιρροές.[67] Επιπλέον η μεταβολομική υπερτερεί και στο κόστος ανάλυσης καθώς κοστίζει λιγότερο από οποιαδήποτε άλλη ολιστική τεχνική. [66] Ωστόσο, το γεγονός ότι ένας μεταβολίτης ενδέχεται να ανήκει σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια, αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της μεταβολομικής, αφού δυσκολεύει την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.[68]



Εικόνα 2.1: Το κεντρικό σύστημα της βιολογίας και του καταρράκτη των ομικών τεχνικών.

2.2 Μεταβολομική Ανάλυση

Η μεταβολομική και η μεταβονομική είναι δύο έννοιες οι οποίες συγχέονται αρκετές φορές. Ωστόσο παρ' όλο που έχουν αρκετά κοινά έχουν διαφορετική σημασία. Η μεταβονομική προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις μεταβολίτης και νόμος και έχει οριστεί ως η ποσοτική μέτρηση της δυναμικής πολυπαραμετρικής αντίδρασης των ζωντανών συστημάτων σε παθοφυσιολογική διέγερση ή γενετική τροποποίηση ενώ μεταβολομική είναι η συνολική ποσοτική ανάλυση όλων των μεταβολιτών ενός οργανισμού ή ενός συγκεκριμένου βιολογικού δείγματος. Ο διαχωρισμός των δύο όρων είναι κυρίως φιλοσοφικός καθώς οι δύο αυτές προσεγγίσεις είναι στενά συνδεδεμένες και οι όροι μεταβονομική και μεταβολομική μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξίσου το ίδιο. [69]

Σκοπός της μεταβολομικής ανάλυσης είναι ο προσδιορισμός όσο το δυνατόν περισσότερων μορίων στα υπό εξέταση δείγματα. Οι μεταβολίτες, αποτελούν μόρια μικρού μοριακού βάρους, τα οποία λαμβάνουν μέρος στις μεταβολικές αντιδράσεις, ως προϊόντα και αντιδρώντα. Επειδή η συγκέντρωση των μεταβολιτών επηρεάζει και επηρεάζεται από την ταχύτητα των μεταβολικών αντιδράσεων, το μεταβολικό πρότυπο αποτελεί ένα αποτύπωμα μεταβολικής κατάστασης ενός συστήματος σε συγκεκριμένες συνθήκες φυσιολογίας. Κατά την προσέγγιση αυτή, σκοπός δεν είναι ο ποσοτικός προσδιορισμός κάθε παρατηρούμενου

μεταβολίτη αλλά η σύγκριση προτύπων ή αλλιώς των δαχτυλικών αποτυπωμάτων των μεταβολιτών με αντίστοιχα πρότυπα που προέρχονται από αλλαγές λόγω κάποιας ασθένειας, ή έκθεσης σε κάποια τοξική ουσία ή λόγω περιβαλλοντικών ή γενετικών αλλαγών. Η μελέτη του μεταβολικού δαχτυλικού αποτυπώματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν διαγνωστικό εργαλείο για την σύγκριση π.χ. του μεταβολικού δαχτυλικού αποτυπώματος ενός υγιή από έναν άνθρωπο που νοσεί. Έτσι, αναλύονται βιολογικά δείγματα με στόχο μια «ολική διερεύνηση» και χαρτογράφηση όλων των συστατικών του δείγματος. Το σύνολο όλων αυτών των βιομορίων αποτελεί το μεταβολικό προφίλ (metabolic profile) του δείγματος. Ως εκ τούτου, μπορούν ταυτόχρονα να προσδιοριστούν τα επίπεδα εκατοντάδων μεταβολιτών και να παρατηρούνται με την πάροδο του χρόνου τυχόν αλλαγές στο μεταβολικό τους προφίλ, που οφείλονται σε παράγοντες όπως μεταβολές στη δίαιτα, στο περιβάλλον, στην πρόοδο μιας ασθένειας, στη φαρμακευτική αγωγή κ.ά. Οι μεταβολίτες ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες ενώσεων όπως είναι οι υδατάνθρακες, τα αμινοξέα ή κάποια που σχετίζονται με μια συγκεκριμένη βιοχημική οδό.[69][70][71]

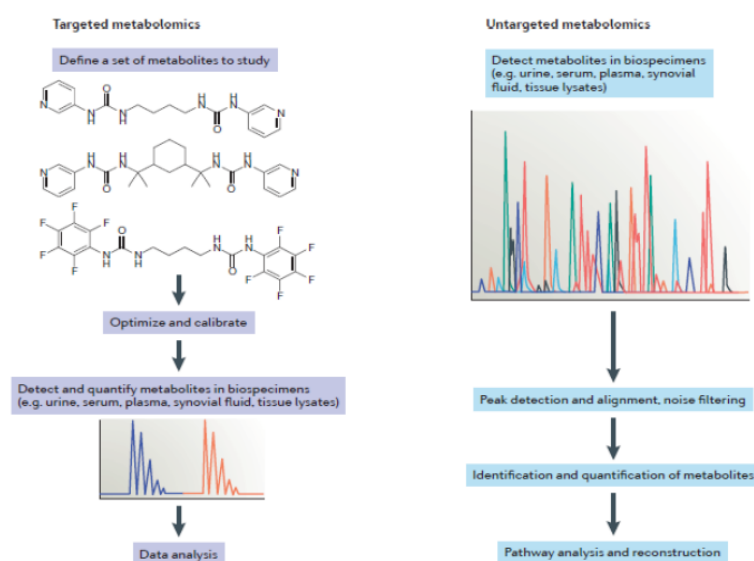
Ο αριθμός των διαφόρων μεταβολιτών στους ανθρώπους είναι άγνωστος, ωστόσο κυμαίνονται από 2.000 έως περίπου 20.000, σε σύγκριση με εκτιμώμενα 30.000 γονίδια και 100.000 πρωτεΐνες.[72]

2.3 Στοχευμένη και μη Στοχευμένη Ανάλυση

Υπάρχουν δύο κύριες στρατηγικές που μπορούν να πραγματοποιηθούν στη μεταβολομική: η **στοχευμένη** ανάλυση (targeted) και η μελέτη του μεταβολικού προφίλ που πραγματοποιείται με **μη στοχευμένη** ανάλυση (untargeted). Στη πρώτη περίπτωση, γίνεται αναφορά σε μελέτες που αφορούν στην ανίχνευση και στη ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων μορίων, τα οποία ακολουθούνται από μια υπόθεση ή ερώτηση που σχετίζεται με τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία εμπλέκονται. Ο βασικός περιορισμός που εισάγεται στην στοχευμένη ανάλυση είναι ότι θα πρέπει να υπάρχει υπάρχουσα γνώση που να συνοδεύει τα συγκεκριμένα μόρια.[64] Η ανάπτυξη μιας ολοκληρωμένης μεθόδου για την στοχευμένη μεταβολομική ανάλυση είναι μια αρκετά δύσκολη διαδικασία και αποτελεί μια πρόκληση. Τα προς ανάλυση δείγματα συνήθως περιέχουν πολικούς μεταβολίτες με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που συνυπάρχουν στα δείγματα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επιπλέον για να αναλυθούν σωστά τα δείγματα θα πρέπει για γίνει σωστή ρύθμιση των παραμέτρων για όλους τους αναλύτες με σκοπό να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες ανίχνευσης των μορίων.

Από την άλλη μεριά, στη μη στοχευμένη προσέγγιση δεν χρειάζεται η κατάθεση μιας αρχικής υπόθεσης καθώς στοχεύει στον προσδιορισμό, όσο το δυνατό περισσότερων μεταβολιτών με τη βοήθεια διάφορων αναλυτικών τεχνικών με στόχο την καλύτερη περιγραφή της βιοχημικής κατάστασης ενός βιολογικού δείγματος, που θα συνθέσουν το μεταβολικό πρότυπο. Η συγκεκριμένη προσέγγιση φέρει αποτελέσματα αρκετά ογκώδη που δύσκολα ερμηνεύονται, αποτελώντας έτσι εμπόδιο για τη διευκρίνηση της χημικής δομής των μεταβολιτών. Η κύρια δυσκολία κατά την πειραματική διαδικασία είναι η εύρεση της δομής των δεικτών, καθώς υπάρχει μεγάλη ποικιλία των δομών που απαρτίζουν τα μόρια και πολλές φορές δε μπορούν να ανασκευαστούν με την ίδια ευκολία όπως για τα αμινοξέα ή τα νουκλεοτίδια στην περίπτωση ταυτοποίησης πρωτεϊνών και γονιδίων αντίστοιχα.[73]

Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτές οι δύο μέθοδοι δρουν συμπληρωματικά και ενισχύουν την κάλυψη όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών αυξάνοντας την πιθανότητα εύρεσης βιοδεικτών. Για τη σχεδίαση λοιπόν ενός πειράματος μεταβολομικής είναι απαραίτητος ο προσδιορισμός του αριθμού των μεταβολιτών που πρέπει να μετρηθούν προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια στοχευμένη ανάλυση ενώ σε περίπτωση που το πείραμα στοχεύει στην ανίχνευση όσο το δυνατόν περισσότερων μεταβολιτών αλλά και στη σύγκριση μεταξύ δειγμάτων τότε προτιμάται μία μη στοχευμένη προσέγγιση. Τελικά, ο αριθμός και η χημική σύνθεση των μεταβολιτών που πρόκειται να μελετηθούν αποτελεί καθοριστικό χαρακτηριστικό οποιουδήποτε μεταβολομικού πειράματος και διαμορφώνει τον πειραματικό σχεδιασμό σε σχέση με την προετοιμασία του δείγματος και την επιλογή των οργάνων.[71]



Εικόνα 2.3 : Στοχευμένες και μη στοχευμένες προσεγγίσεις μεταβολισμού. Το πεδίο εφαρμογής αυτών των δύο τύπων ανάλυσης είναι διαφορετικό και οι δύο έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Οι στοχευμένες προσεγγίσεις μεταβολισμού έχουν χαμηλό όριο ανίχνευσης και επιτρέπουν την απόλυτη ποσοτικοποίηση του δείγματος. Ωστόσο, οι στοχευμένες μέθοδοι δεν επιτρέπουν την ανακάλυψη άγνωστων ενώσεων. Οι μη προσανατολισμένες προσεγγίσεις μεταβολισμού παρέχουν μια συνολική εικόνα ενός δείγματος. Τα μειονεκτήματα των μη στοχευμένων μεθόδων περιλαμβάνουν τη σύνθετη πληροφορία που απαιτείται για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων, τον ημι-ποσοτικό χαρακτήρα των μεθόδων και την ανάγκη επικύρωσης τυχόν προσδιορισμένων ενώσεων.[68]

2.4 Η Μεταβολομική σε βιολογικά δείγματα και η σημασία της

Η μεταβολομική εφαρμόζεται συχνά στις εκτιμήσεις των διαταραχών στα βιολογικά συστήματα, που προκαλούνται από ασθένειες ή θεραπείες σε σύγκριση με τα συστήματα αναφοράς.[74] Είναι μια ανερχόμενη επιστήμη που συγκεντρώνει την αναλυτική τεχνολογία, την αξιολόγηση του μεταβολίτη και τον υπολογισμό του. Η ενσωμάτωση αυτού του εργαλείου δίνει την ευκαιρία να εξετάσουμε και να διαγνώσουμε πολλές ασθένειες. Μία από

τις κύριες κατηγορίες ασθενειών που στοχεύει η μεταβολομική είναι ο καρκίνος καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση καταστάσεων της ασθένειας απευθείας στα σωματικά υγρά.[74][75]

Η επιστήμη της μεταβολομικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κλινική διάγνωση με την εύρεση βιοδεικτών. Με τον όρο βιοδείκτες, ονομάζονται τα βιομόρια που αποτελούν αντικειμενικές ενδείξεις της παθοφυσιολογικής κατάστασης ενός ασθενούς, καθώς παρουσιάζουν διαφοροποίηση στη συγκέντρωσή τους κατά την εκδήλωση και την πορεία μιας ασθένειας και μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια και με δυνατότητα αναπαραγωγής.[76]

Η εύρεση βιοδεικτών μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών μιας ασθένειας, με αποτέλεσμα την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, που θα καταπολεμούν τα αίτια της ασθένειας πριν καν εκδηλωθεί, και θα μπορεί να βοηθήσει στην άμεση και αποτελεσματική παρακολούθηση της πορείας της θεραπείας αλλά και της ανταπόκρισης στη φαρμακευτική αγωγή. Είναι γνωστό ότι, η αρχή της ασθένειας προηγείται πολλούς μήνες ή και χρόνια της εκδήλωσης συμπτωμάτων και της τελικής διάγνωσης.

Η έγκαιρη και ασφαλής διάγνωση που βασίζεται σε επικυρωμένους βιοδείκτες και όχι σε μόνο σε κλινικές εξετάσεις μπορεί να βοηθήσει στην έγκαιρη αντιμετώπιση της νόσου, την προετοιμασία και τον καλύτερο προγραμματισμό της ζωής του ασθενή. Επιπλέον η συνεχής παρακολούθηση των συγκεντρώσεων μοριακών δεικτών κατά τη πορεία της ασθένειας μπορεί να βοηθήσει στη λήψη αποφάσεων σε κλινικό επίπεδο. Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί στην εξατομικευμένη θεραπευτική, στην αναγνώριση της απόκρισης του ασθενούς στην αγωγή, πολύ νωρίτερα από τις όποιες αλλαγές στη φυσιολογία του. Η μέτρηση βιοδεικτών απόκρισης σε μία θεραπεία μπορεί να γίνει μέσα σε λίγες ώρες. Αντιθέτως, η αλλαγή στην κλινική εικόνα μπορεί να απαιτεί μέρες, γεγονός που μπορεί να επιφέρει μεγάλο κόστος στην υγεία ,ακόμη και στη ζωή του ασθενούς.

Οι καρκινικοί βιοδείκτες ή δείκτες όγκων είναι ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα όγκων ή τον οργανισμό ως απάντηση στην παρουσία όγκων. Μπορούν να βρεθούν σε μεγάλα ποσά στο αίμα ασθενών με καρκίνο, μπορούν όμως να βρεθούν και στο αίμα ή στα ούρα των ανθρώπων που δεν έχουν καρκίνο. Μερικοί βιοδείκτες παράγονται μόνο από ένα ενιαίο είδος καρκίνου. Οι βιοδείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην διαλογή στο σύνολο ενός πληθυσμού ατόμων υψηλού κινδύνου για την παρουσία καρκίνου, στη διάγνωση του καρκίνου, στον καθορισμό της πρόγνωσης σε έναν ασθενή καθώς και στην παρακολούθηση ασθενούς σε φάση θεραπείας ή ύφεση της νόσου. Επιπλέον τα επίπεδα των καρκινικών βιοδεικτών χρησιμοποιούνται σε κάποιες περιπτώσεις ως κριτήριο για τον καθορισμό της θεραπείας. Μέχρι σήμερα κανένας δείκτης δεν έχει καθιερωθεί ως απόλυτο εργαλείο διαλογής καρκίνου είτε σε έναν υγιή γενικό πληθυσμό είτε σε πληθυσμούς υψηλού κινδύνου λόγω σχετικής έλλειψης ευαισθησίας και ειδικότητας των διαθέσιμων εξετάσεων. Καμία ουσία που χρησιμοποιείται ως δείκτης δεν είναι μοναδική ως προς τα καρκινικά κύτταρα, διότι είτε αντιπροσωπεύει παρεκκλίνουσα παραγωγή ενός φυσιολογικού στοιχείου από τους όγκους είτε παράγεται από τον οργανισμό σε απάντηση στην παρουσία καρκίνου.[74]

Η Εξατομικευμένη ιατρική αποτελεί ένας από τους πιο μεγαλεπίβολους στόχους των τεχνολογιών omics. Θεωρείται ότι με αυτόν τον τρόπο θα γίνει δυνατή η βελτιστοποίηση της θεραπείας και η απόκριση του ασθενούς στην εκάστοτε θεραπεία.[66] Εκτός αυτού, η τεχνολογία αυτή έχει αποδείξει ένα σημαντικό πλεονέκτημα: μη ή ελάχιστα επεμβατική μέτρηση δυναμικά χρήσιμων βιοδεικτών από βιορευστά, όπως ούρα, πλάσμα ή ορός του αίματος, , σπερματικό υγρό, αμνιακό υγρό, αρθρικό υγρό, σάλιο, αλλά και άλλα πιο δύσκολα υποστρώματα όπως είναι ο αέρας. Ο αέρας περιλαμβάνει πολλές πτητικές ενώσεις. Σε βιολογικά δείγματα το δείγμα αέρα είναι δείγμα εκπνοής και περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο

πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs), οι οποίες μπορεί να είναι σημαντικοί μεταβολίτες για διάφορες μεταβολικές ενέργειες στο ανθρώπινο σώμα.[70]

2.5 Αναλυτικές Τεχνικές στη Μεταβολομική

Η μεταβολομική προσέγγιση των ερευνών στηρίζεται σε σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές στις οποίες εξετάζεται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Οι κυριότερες τεχνικές που έχουν βρει εφαρμογή στην ανάλυση ολικού μεταβολικού προφίλ είναι η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η Φασματομετρία Μαζών (MS). Αυτές οι δύο αναλυτικές πλατφόρμες παρέχουν τη δυνατότητα ολιστικής ανάλυσης δειγμάτων, δίνοντας πληροφορίες για εκατοντάδες μεταβολίτες που περιέχονται σε ένα βιολογικό υγρό ή ιστό διεξάγοντας μόνο μία ανάλυση. Εφαρμόζονται όμως και άλλες συνδυαστικές τεχνικές που εξασφαλίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στον προσδιορισμό των μεταβολιτών, γιατί οι μεταβολίτες είναι μια ευρεία ομάδα που δε μοιράζονται πολλά κοινά χαρακτηριστικά, πράγμα που δεν επιτρέπει σε κάποια από τις τεχνικές ανάλυσης να καλύψει όλο το εύρος της. Τέτοιες συνδυαστικές τεχνικές είναι η Φασματοσκοπία μαζών με υγρό χρωματογράφο (LC-MS) και η Φασματοσκοπία μαζών με αέριο χρωματογράφο (GC-MS).

2.5.1 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού

Η φασματοσκοπία NMR συνδυάζει τεχνικές πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού υψηλής ανάλυσης με μεθόδους στατιστικής ανάλυσης δεδομένων για την αξιολόγηση της μεταβολικής κατάστασης ενός οργανισμού.[77] Αποτελεί βασική αναλυτική τεχνική στην ανάλυση μεταβολικού προφίλ βιολογικών δειγμάτων καθώς παρέχει βασικές πληροφορίες για χημικές ενώσεις που περιέχουν άτομα υδρογόνου (^1H NMR) και άνθρακα (^{13}C NMR). [69] Κυρίως η ^1H NMR, προτιμάται από μεγάλη μερίδα ερευνητών, καθώς είναι γρήγορη και απλή και έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε πληθώρα βιολογικών δειγμάτων.[78] Ως αναλυτική τεχνική απαιτεί ελάχιστη έως μηδενική προκατεργασία δείγματος, αφήνοντας ανέπαφο το δείγμα στο τέλος της ανάλυσης εξασφαλίζοντας γρήγορη, επαναλήψιμη, μη εκλεκτική, μη επεμβατική και ποσοτική ανάλυση μεγάλου εύρους ενδογενών μεταβολιτών. Γι' αυτούς τους λόγους έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στο ερευνητικό πεδίο της μεταβολομικής. Συγκεκριμένα έχει εφαρμοστεί σε μελέτες διαφορών στη φυσιολογία που οφείλονται στη δίαιτα, στο γένος, στην ηλικία, στον κirkάδιο ρυθμό, σε ορμονικές διαφορές,[79] στη μελέτη διαφόρων ασθενειών,[80] καθώς και σε ένα ευρύ φάσμα τοξικολογικών μελετών.[81] Τα τελευταία χρόνια με την εφαρμογή συγκεκριμένης τεχνολογίας συχνοτήτων γνωστή ως 1H MAS (magic angle spinning) NMR είναι εφικτή η ανάλυση ιστών χωρίς καμία προκατεργασία, αφήνοντας τον ιστό ανέπαφο μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης. Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ανάλυσης ολικού μεταβολικού προφίλ 27 διαφόρων ιστών όπως ήπαρ, νεφρών, προστάτη και μυελού.[69][82]

Το βασικότερο πλεονέκτημα της NMR είναι η απλή και μη χρονοβόρα παρασκευή του δείγματος, που πραγματοποιείται χωρίς να προκαλεί την καταστροφή του. Επιπλέον, είναι εύκολη η ποσοτικοποίηση, καθώς η ένταση του σήματος είναι ανάλογη της γραμμομοριακής συγκέντρωσης. Με τον τρόπο αυτό εξάγεται συμπέρασμα για την ακριβή ποσότητα ενός μεταβολίτη. Επίσης μας δίνει χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή ενός μορίου αλλά και για τις στερεοχημικές του ιδιότητες.[83][84]

Από την άλλη μεριά, αν και η ευαισθησία της φασματοσκοπίας NMR έχει αυξηθεί πάρα πολύ και οι βελτιώσεις συνεχίζουν να εμφανίζονται σταθερά, αυτό παραμένει ένα ασθενές σημείο για το NMR σε σύγκριση με το MS. Το MS είναι πολύ πιο ευαίσθητο από το NMR και τα όρια ανίχνευσης του είναι αρκετά χαμηλότερα αφού μπορεί να ανιχνεύσει ενώσεις με συγκεντρώσεις της τάξεως των picomole ενώ το NMR απαιτεί συγκεντρώσεις του nanomole ή μεγαλύτερες.[85]

2.5.2 Φαρματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μαζών (MS) αποτελεί μία από τις πλέον σύγχρονες αναλυτικές τεχνικές και είναι ευρύτερα εφαρμοσμένη στη μεταβολομική. Χαρακτηρίζεται από αυξημένη ευαισθησία, μεγάλη ακρίβεια και δυνατότητα εφαρμογής σε μεγάλο εύρος μαζών. Αποτελεί ένα αναλυτικό εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της μοριακής μάζας ενός δείγματος. Έχει μεγάλη ακρίβεια, 0.01% για μεγάλα δείγματα όπως βιομόρια. Ως φασματομετρία μάζας (MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια ενός δείγματος μετατρέπονται σε ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους.

Η ανάλυση μεταβολικού προφίλ με τη μέθοδο αυτή, απαιτεί πριν την ανάλυση του βιολογικού δείγματος ένα στάδιο προκατεργασίας, το οποίο αν δεν έχει επιλεγεί σωστά μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα των δεδομένων που συλλέγονται. Στο στάδιο της προκατεργασίας πραγματοποιείται απομόνωση των μεταβολιτών από πολύπλοκα βιολογικά υποστρώματα και απομάκρυνση συστατικών του υποστρώματος (π.χ. πρωτεΐνες, πεπτίδια) που παρεμποδίζουν την ανάλυση. Το πρωτόκολλο του σταδίου προκατεργασίας πρέπει να είναι απλό και επαναλήψιμο ώστε να παραλαμβάνονται δεδομένα υψηλής ποιότητας στο τέλος της ανάλυσης. Επιπλέον ανάλογα με το είδος του προς ανάλυση δείγματος εκτός από το είδος του σταδίου προκατεργασίας επιλέγεται και η διαχωριστική τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί πριν τη φασματομετρία μαζών και εξαρτάται από τη φύση του δείγματος, τον πειραματικό σχεδιασμό, τον διαθέσιμο εξοπλισμό, την εκλεκτικότητα του επιθυμητού διαχωρισμού, τη δυναμική περιοχή, το όριο ανίχνευσης, την ακρίβεια, την πιστότητα και το κόστος ανάλυσης.[69]

Η πλειοψηφία των μελετών για διερεύνηση του μεταβολικού προφίλ έχουν πραγματοποιηθεί με τη σύζευξη της φασματομετρίας μάζας με άλλες τεχνικές. Τα συστήματα αυτά συνδυάζουν την υψηλότερη χρωματογραφική ανάλυση με εξαιρετική ευαισθησία, γρήγορη απόκτηση δεδομένων και την υψηλή ακρίβεια. Οι τεχνικές αυτές είναι η αέρια χρωματογραφία μάζας, η υγρή χρωματογραφία μάζας, η φασματομετρία χρόνου-πτήσης μάζας και η τροχοειδής ηλεκτροφόρηση.[86]

2.5.3 Αέρια Χρωματογραφία – Φασματομετρία Μάζας

Η φασματοσκοπία μαζών με αέριο χρωματογράφο ή αέρια χρωματογραφία μάζας (GC-MS) είναι μία αναλυτική μέθοδος που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της χρωματογραφίας αερίου και της φασματομετρίας μαζών, και ο συνδυασμός τους αναδείχθηκε ως το ιδανικό εργαλείο για την ανάλυση πτητικών μεταβολιτών.[87] Η αναλυτική αυτή τεχνική φασματομετρίας μάζας ήταν από τις πρώτες τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στο ερευνητικό πεδίο ανάλυσης

μεταβολικού προφίλ με εφαρμογές όπως η ανάλυση μεταβολιτών σε φυτά, μικροοργανισμούς, σε θηλαστικά και στον άνθρωπο. [88] Η επαναληψιμότητα, η ευαισθησία και η υψηλή διακριτική ικανότητα σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (χρησιμοποιώντας πηγή χημικού ιοντισμού ή επίδρασης ηλεκτρονίων) παρέχουν ένα πολύ καλό εργαλείο, το οποίο σε συνδυασμό με τις εμπορικά διαθέσιμες βάσεις δεδομένων και βιβλιοθηκών φασμάτων προτύπων ενώσεων για το GC είναι αρκετά χρήσιμο στην ταυτοποίηση άγνωστων μεταβολιτών. Ωστόσο σημαντικά μεγάλος αριθμός ενώσεων (σάκχαρα, νουκλεοζίτες, αμινοξέα) δεν μπορεί να αναλυθεί με την τεχνολογία GC-MS λόγω έλλειψης πτητικότητας αλλά και υψηλής πολικότητας.

Η διαδικασία προβλέπει αρχικά το διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο με τη συνδρομή αδρανούς αερίου. Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες και εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τις ιδιότητες των σωλήνων που διέρχεται το μείγμα. Στη συνέχεια, στο φασματογράφο μάζας πραγματοποιείται η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών, με τη γνωστή διαδικασία της φασματοσκοπίας μάζας. Η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των μεταβολιτών επιτρέπουν τον προσδιορισμό διαφορετικών ουσιών σε ένα βιολογικό δείγμα συμπεριλαμβανομένου του εκπνεόμενου αέρα. Η φασματοσκοπία GC-MS βρίσκει εφαρμογές σε πολλά ερευνητικά πεδία. Με την ανάλυση των δειγμάτων, παρέχει η δυνατότητα για ανίχνευση περιβαλλοντικών επιδράσεων, γενετικών τροποποιήσεων, στρεσογόνων παραγόντων και φαρμακευτικών ουσιών αλλά και για την ταυτοποίηση αγνώστων δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟΣ ΑΕΡΑΣ – ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ (VOCs)

3.1 Εισαγωγή

Από τα αρχαία χρόνια η ανθρώπινη αναπνοή βρήκε εφαρμογή στη διάγνωση ασθενειών, όπως ο διαβήτης και η ηπατική ανεπάρκεια, όταν έγιναν αντιληπτές χαρακτηριστικές οσμές στην αναπνοή ανθρώπων που νοσούσαν. Πλέον είναι γνωστό ότι οι οσμές αυτές, οφείλονται στο πλήθος των ουσιών που είναι παρούσες στην ανθρώπινη εκπνοή. Έτσι με κάθε εκπνοή χιλιάδες μόρια αποβάλλονται και ο κάθε άνθρωπος έχει ένα «αναπνευστικό αποτύπωμα» το οποίο μπορεί να είναι χαρακτηριστικό της υγείας του.

3.2 Φυσιολογία και σύσταση της ανθρώπινης αναπνοής

Ένας άνθρωπος εισπνέει και εκπνέει χιλιάδες φορές μέσα στη μέρα. Με κάθε εκπνοή χιλιάδες μόρια αποβάλλονται και ο καθένας μας έχει ένα «αναπνευστικό αποτύπωμα» το οποίο μπορεί να είναι χαρακτηριστικό της υγείας μας. Πιο συγκεκριμένα κάθε άνθρωπος επιτελεί 15 αναπνοές το λεπτό με εκπνεόμενο όγκο σε κάθε αναπνοή 500 ml. Ο συνολικός εκπνεόμενος όγκος αέρα σε κάθε λεπτό είναι 7500 ml/min. Ο όγκος αυτός ονομάζεται ολικός πνευμονικός αερισμός. Ο όγκος του αέρα που εισέρχεται στους πνεύμονες είναι ελαφρώς μεγαλύτερος από τον όγκο του αέρα που εξέρχεται, επειδή ο όγκος του οξυγόνου που προσλαμβάνεται από τον οργανισμό είναι μεγαλύτερος από τον όγκο του διοξειδίου του άνθρακα που αποβάλλεται. Δεν φθάνει όμως όλος ο εισπνεόμενος όγκος στον κυψελιδικό χώρο όπου πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων. Σε κάθε 500 ml εισπνεόμενου αέρα τα 150 ml παραμένουν μέσα στον ανατομικό νεκρό χώρο. Ο όγκος λοιπόν του καθαρού αέρα που εισέρχεται στην αναπνευστική ζώνη κάθε λεπτό είναι $(500-150)*15= 5250$ ml/min. Ο όγκος αυτός ονομάζεται κυψελιδικός αερισμός και αντιπροσωπεύει το ποσό από τον εισπνεόμενο αέρα που διατίθεται για την ανταλλαγή των αερίων.[89]



Εικόνα 3.1: Σχηματική παράσταση του αναπνευστικού συστήματος [89]

Οι ανάγκες των πνευμόνων για την ανταλλαγή των αερίων αυξάνουν σημαντικά κατά τη διάρκεια της άσκησης. Τυπικά η κατανάλωση οξυγόνου αυξάνει από 300 στα 3000 ml/min σε ένα μέτρια εξασκημένο άνθρωπο, ενώ μπορεί να φθάσει τα 6000 ml/min σε ένα υψηλών αποδόσεων αθλητή. Αντίστοιχα η παραγωγή CO₂ που σε κατάσταση ηρεμίας είναι 240 ml/min αυξάνει σε 3000 ml/min περίπου. [89]

Ο εκπνεόμενος αέρας αποτελείται από περισσότερα από 3.500 συστατικά. Η ανάλυση του εκπνεόμενου αέρα επιτρέπει την παρατήρηση των βιοχημικών διεργασιών στο σώμα με μία μη επεμβατική προσέγγιση. Το μεγαλύτερο ποσοστό στο μείγμα της ανθρώπινης αναπνοής καταλαμβάνουν ενώσεις όπως άζωτο, οξυγόνο, νερό, διοξείδιο του άνθρακα και αδρανή αέρια. Το εναπομείναν μικρό κλάσμα της ανθρώπινης αναπνοής αποτελείται από ίχνη συστατικών συμπεριλαμβανομένων και των πτητικών οργανικών ενώσεων που εμφανίζονται σε συγκεντρώσεις στην περιοχή nmol / l-pmol / l (ppbv-ppbv). [90] Ο αριθμός των VOCs στην ανθρώπινη εκπνοή είναι σημαντικά μεγάλος. Τα περισσότερα δείγματα εκπνοής περιέχουν περισσότερα από 200 VOCs, ενώ υπάρχουν σχεδόν 3000 VOCs που έχουν ανιχνευθεί τουλάχιστον μια φορά στην ανθρώπινη εκπνοή. [91] Η ακριβής ποσότητα του εκπνεόμενου οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα ποικίλλει ανάλογα με την φυσική κατάσταση, την κατανάλωση ενέργειας και τη διατροφή του συγκεκριμένου ατόμου. Περισσότερες από 500 από αυτές τις ενώσεις έχουν ανιχνευθεί και ταυτοποιηθεί. Εκτός από το να εκκρίνονται μέσω των πνευμόνων, οι πτητικές οργανικές ενώσεις μπορεί επίσης να εμφανίζονται στον ιδρώτα ή στα ούρα. [90] Η πηγή και η φυσιολογική λειτουργία των περισσότερων VOCs είναι ωστόσο άγνωστη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, τα συγκεκριμένα μεταβολικά μονοπάτια που προκαλούν αύξηση στα ποσοστά εμφάνισή τους στην εκπνοή είναι ακόμα άγνωστα. Μερικά VOCs στον εκπνεόμενο αέρα προέρχονται από το περιβάλλον, λόγω του ότι απορροφούνται από το δέρμα ή προσλαμβάνονται μέσω της αναπνοής ή της κατανάλωσης τους από τα τρόφιμα. Οι ενώσεις αυτές μεταβολίζονται πιθανώς στον οργανισμό και μετά απεκκρίνονται από την εκπνοή. Άλλες πτητικές ενώσεις παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό σαν προϊόντα των μεταβολικών διαδικασιών ή τις δραστηριότητες των βακτηρίων του εντέρου. Οι ενδογενείς ενώσεις περιλαμβάνουν ανόργανα αέρια, όπως NO, CO, πτητικές οργανικές ενώσεις (VOC) όπως αιθάνιο, πεντάνιο,

ισοπρένιο και άλλες μη πτητικές ουσίες. Οι πτητικές οργανικές ουσίες μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για διαφορετικές βιοχημικές διεργασίες στο υγιές και στο νοσούν ανθρώπινο σώμα. Οι ενδογενείς δείκτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται συνήθως για διαγνωστικούς σκοπούς, είναι υδρογονάνθρακες. Για να εκτιμηθεί η φυσιολογική σημασία και το διαγνωστικό δυναμικό αυτών των ουσιών, πρέπει να γίνουν γνωστές οι βιοχημικές οδοί παραγωγής.

Σε μια αντίστοιχη επιστημονική έρευνα για τον προσδιορισμό των VOC's της ανθρώπινης εκπνοής αναφέρεται ότι σε ένα δείγμα 50 υγιών εθελοντών ανιχνεύτηκαν 3481 διαφορετικά VOC's, εκ των οποίων τα 1741 χαρακτηρίστηκαν ενδογενή (με θετική κυψελιδική κλίση = ποσότητα στα αέρια της εκπνοής-ποσότητα στον εισπνεόμενο αέρα) και τα υπόλοιπα 1728 εξωγενή. Ένα μέσο δείγμα αερίων εκπνοής περιείχε 204,2 VOC's. Συνολικά αναφέρεται ότι βρέθηκαν 27 κοινά VOC's σε όλους τους εθελοντές (9 ενδογενή = isoprene, benzene 1-methylethenyl, naphthalene, 2,5- cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis, naphthalene1-methyl, butane2-methyl, tetradecane, pentadecane, dodecane και 28 εξωγενή = benzene, benzene1-ethyl-2-ethyl, benzene ethyl, benzene methyl, benzene propyl, cyclohexane methyl, decane, heptane, heptane 2-methyl, heptane 3-methyl, hexane, hexane 3-methyl, nonane, pentane 2,3,4- trimethyl, pentane 2-methyl, pentane 3-methyl, propane 2-methoxy-2-methyl, undecane).[91]

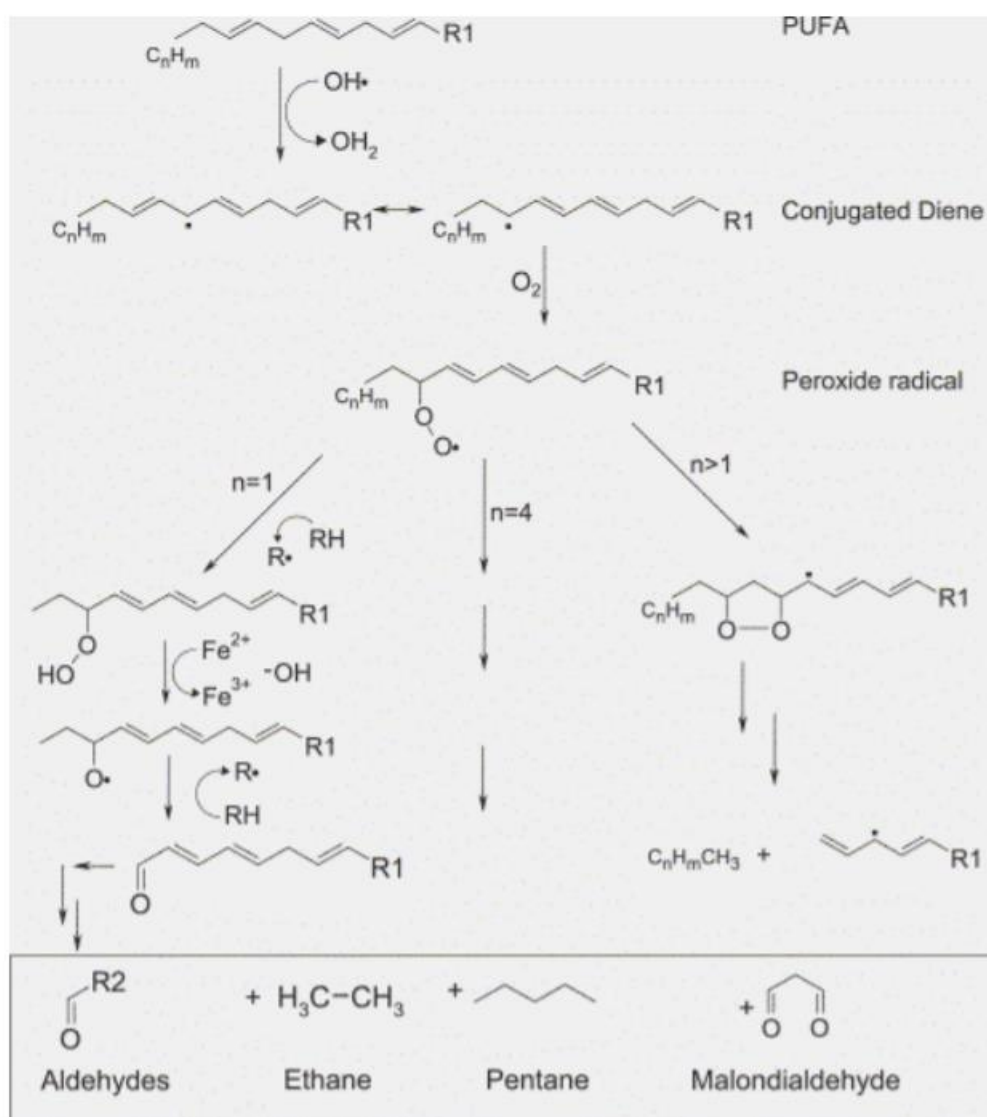
3.3 Μεταβολομική και πτητικές οργανικές ενώσεις

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις είναι ένα ιδιαίτερο κομμάτι του μεταβολώματος και απαντώνται στα ούρα, το αίμα και τον εκπνεόμενο αέρα.[92] Μπορεί να παράγονται απευθείας από τον ανθρώπινο οργανισμό ως αποτέλεσμα των διαφόρων μεταβολικών διεργασιών (ενδογενείς ενώσεις) ή να προσλαμβάνονται από το περιβάλλον (εξωγενείς ενώσεις). Για τη μελέτη των φυσιολογικών ή παθολογικών μεταβολικών διεργασιών στο ανθρώπινο σώμα χρησιμοποιούνται οι ενδογενείς ενώσεις, ενώ για τη μελέτη έκθεσης σε επικίνδυνες ουσίες μελετώνται οι εξωγενείς ενώσεις. Στους πτητικούς οργανικούς μεταβολίτες περιλαμβάνονται ενώσεις που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες ουσιών όπως αυτές των αλδευδών, των αλκοολών, των κετονών, των υδρογονανθράκων, των τερπενίων κ.α

Οι ενδογενείς ενώσεις περιλαμβάνουν ανόργανα αέρια (π.χ. NO, CO₂), πτητικές οργανικές ενώσεις (π.χ. αιθάνιο, πεντάνιο, ακετόνη, ισοπρένιο) και μη πτητικές οργανικές ενώσεις. Οι ενδογενείς πτητικές οργανικές ενώσεις συνοψίζονται στις πιο κάτω βασικές κατηγορίες ενώσεων:

Υδρογονάνθρακες (π.χ. αιθάνιο, πεντάνιο, ισοπρένιο): Η παρουσία κορεσμένων υδρογονανθράκων (αιθάνιο και πεντάνιο) στον εκπνεόμενο αέρα είναι το αποτέλεσμα της υπεροξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που βρίσκονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η λιπιδική υπεροξείδωση είναι μια διαδικασία απαλλαγμένη από την μεσολάβηση ριζών, στην οποία τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα επηρεάζονται οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό μιας μεγάλης ποικιλίας δευτερογενών καρβονυλικών προϊόντων οξείδωσης που διαδοχικά εκκρίνονται στην εκπνοή. Το αιθάνιο και το πεντάνιο είναι οι κύριοι υδρογονάνθρακες που σχηματίζονται κατά την αποικοδόμηση των ω-3 και ω-6 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (λινολενικό, λινολεϊκό και αραχιδονικό οξύ). Το πεντάνιο μεταβολίζεται από το ηπατικό κυτόχρωμα P-450, γι' αυτό και η συγκέντρωσή του πιθανότατα

συσχετίζεται με τη λειτουργία του ήπατος. Οι συγκεντρώσεις του αιθανίου και πεντανίου έχουν συσχετισθεί με το βαθμό του οξειδωτικού στρες, καθώς και με φλεγμονώδεις νόσους. Το προπάνιο και το βουτάνιο παράγονται από την οξείδωση των πρωτεϊνών και τη χλωρίδα του εντέρου και δε σχετίζονται με την υπεροξείδωση των λιπών. Τα βιοχημικά μονοπάτια γένεσης και λειτουργίας των μεθυλιωμένων κορεσμένων υδρογονανθράκων δεν έχουν ακόμη διασαφηνιστεί, παρόλο που οι ενώσεις αυτές συνδέονται με την υπεροξείδωση των λιπών. Το ισοπρένιο που αποτελεί έναν ακόρεστο υδρογονάνθρακα, είναι μια από τις βασικές ενώσεις της ανθρώπινης εκπνοής. Σχηματίζεται κυρίως από το μεταβολικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Το ισοπρένιο παρουσιάζει 24ώρη διακύμανση, με τη μέγιστη τιμή του στις 6 π.μ. και την ελάχιστη στις 6 μ.μ. Παράλληλα, οι συγκεντρώσεις του συσχετίζονται με την ηλικία. Στον εκπνεόμενο αέρα μικρών παιδιών έχουν παρατηρηθεί χαμηλότερες συγκεντρώσεις ισοπρενίου. Ισοπρένιο εκπέμπουν και τα ζώα, η συγκέντρωσή του όμως σε αυτά δεν υπερβαίνει την τιμή του 1 nmol/l.[93]



Εικόνα 3.2: Μεταβολικό μονοπάτι παραγωγής ισοπρενίου[70]

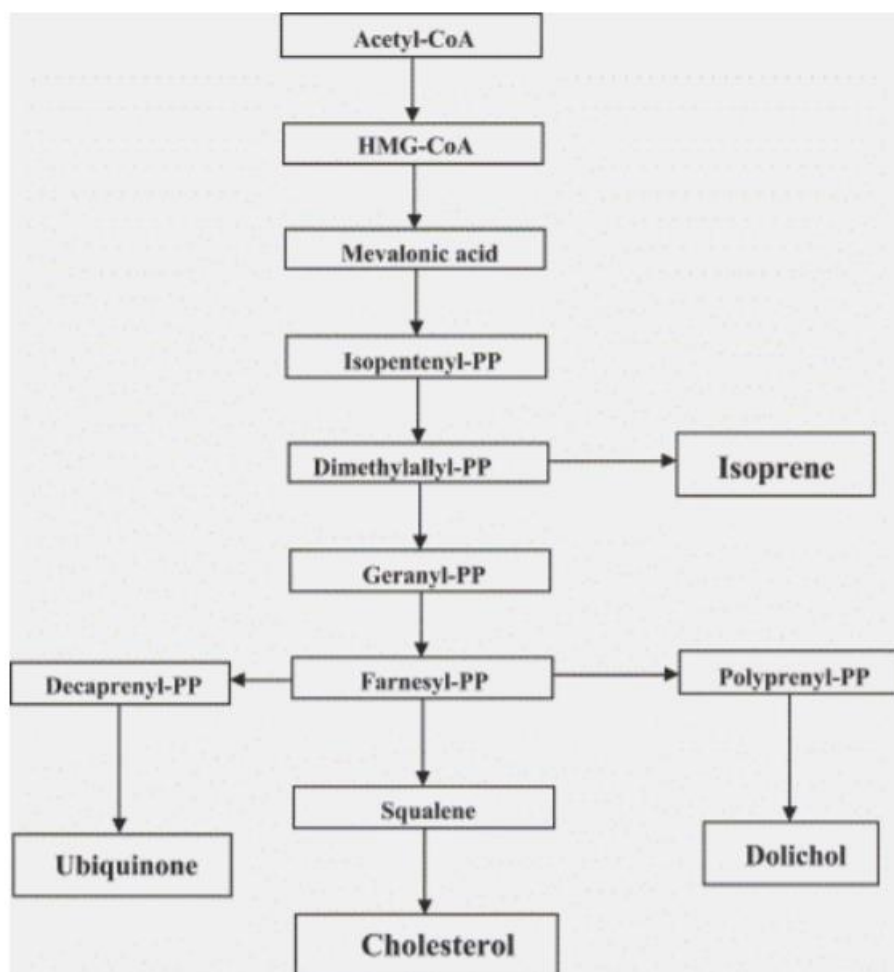
Οξυγονωμένες πτητικές οργανικές ενώσεις

Ακετόνη: Αποτελεί την μεγαλύτερη σε συγκέντρωση πτητική οργανική ένωση της ανθρώπινης εκπνοής. Η ακετόνη, συνδέεται με την μεταβολισμό της δεξτρόζης και την λιπόλυση. Παράγεται από τα ηπατοκύτταρα μέσω της αποκαρβοξυλίωσης της περίσσειας του ακέτυλο-CoA, που προέρχεται από την β-οξειδωση των λιπαρών οξέων. Το τελικό στάδιο παραγωγής της ακετόνης είναι η αποκαρβοξυλίωση του ακετοξικού οξέος που προέρχεται από την λιπόλυση ή την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Η ακετόνη μαζί με το ακετοξικό οξύ και το D-3 υδρόξυβουτυρικό οξύ χαρακτηρίζονται σαν κετονοσώματα, τα επίπεδα των οποίων αυξάνονται σε περιπτώσεις νηστείας και σε διαβητικούς. Γενικότερα η παραγωγή κετονοσωμάτων πραγματοποιείται όταν ο οργανισμός χρησιμοποιεί τα λίπη σαν πηγή ενέργειας εναλλακτικά της γλυκόζης. Η έλλειψη οξαλοξικού, το οποίο χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλυκόζης κατά το μονοπάτι της γλυκονεογέννεσης, είναι ο λόγος που το ακέτυλο-CoA δεν εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος αλλά ακολουθεί διαφορετική πορεία.[70]

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΟΝ ΟΡΟ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΑΚΕΤΟΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΠΝΟΗ (nmol/l)	ΔΙΑΓΝΩΣΗ	ΘΕΡΑΠΕΙΑ
Μεγάλη αύξηση	Κανονική: 10-50	Υπερφαγία	Δίαιτα φτωχή σε υδατάνθρακες
Μεγάλη αύξηση	Υψηλή: > 50	Ανεπάρκεια ινσουλίνης	Εξωγενής χορήγηση ινσουλίνης
Μέτρια αύξηση	Υψηλή: > 50	Ανεπάρκεια υδατανθράκων	Συνέχιση της διαίτας με προσθήκη υδατανθράκων
Μέτρια αύξηση	Κανονική: 10-50	Καλός μεταβολικός έλεγχος	Συνέχιση της θεραπείας ως έχει

Εικόνα 3.2.1: Κλινική χρήση της ακετόνης στον εκπνεόμενο αέρα [93]

Ισοπρένιο: Ένα από τα πιο κοινά VOCs της ανθρώπινης εκπνοής είναι και το ισοπρένιο, το οποίο εμφανίζει τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μεταξύ των υδρογονανθράκων. Σχηματίζεται σαν πρόδρομη ένωση πολλών σημαντικών ενώσεων και είναι σχεδόν πάντοτε παρών στην ανθρώπινη εκπνοή. Το ισοπρένιο σχηματίζεται παράλληλα κατά το μονοπάτι σύνθεσης της χοληστερόλης από το μεβαλονικό οξύ στο. Στα θηλαστικά το ισοπρένιο μπορεί να παραχθεί από μια αντίδραση που καταλύεται από την ισοπέντυλπυροφωσφορική ισομεράση που είναι εξαρτώμενη από τα ιόντα Mg^{2+} . Το ένζυμο αυτό καταλύει την συμπύκνωση του πυροφωσφορικού πεντυλίου με το πυροφωσφορικό διμέθυλαλλύλιο για τον σχηματισμό του πυροφωσφορικού γερανυλίου. Μια άλλη πιθανή πηγή ισοπρενίου είναι η υπεροξειδωση του σκουαλενίου. Η τιμή του ισοπρενίου στον εκπνεόμενο αέρα αυξάνει μέχρι την ηλικία των 25 ετών ενώ έχει σημαντικά μικρότερη τιμή σε παιδιά.[70]



Εικόνα 3.2.2: Μεταβολισμός ακετόνης σε ηπατοκύτταρο [70]

3.4 Πτητικές Οργανικές Ενώσεις για τον καρκίνο του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι ο πιο κοινός καρκίνος παγκοσμίως και μια θανατηφόρα ασθένεια που παρουσιάζει υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Είναι σημαντικό να εντοπιστεί στο αρχικό στάδιο, διότι έτσι αυξάνεται το προσδόκιμο ζωής. Συμβατικά, ο καρκίνος του πνεύμονα ανιχνεύεται με αξονική τομογραφία (CT) ή με βρογχοσκόπηση. Ωστόσο, η CT έχει χαμηλή ευαισθησία, και η βρογχοσκόπηση είναι μια δαπανηρή και επεμβατική διαγνωστική μέθοδος, γεγονός που τις καθιστά ακατάλληλες μεθόδους εξέτασης για μεγάλο αριθμό ασθενών. Αυτά τα μειονεκτήματα μπορεί να οδηγήσουν σε καθυστερημένη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα και υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Ως εναλλακτική μέθοδος ανίχνευσης καρκίνου του πνεύμονα, η ανάλυση της αναπνοής έχει διερευνηθεί για πολλά χρόνια λόγω των πλεονεκτημάτων της, ότι είναι μία μη επεμβατική και απλή διαγνωστική μέθοδος.

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν υποδηλώνουν ότι υπάρχει σχέση μεταξύ των πτητικών οργανικών ενώσεων που εκπνέονται από την αναπνοή και του καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο, η προέλευση αυτών των ενώσεων δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Παρά την αντίληψη ότι οι καρκινικοί ιστοί στους πνεύμονες διοχετεύουν απευθείας τους πτητικούς μεταβολίτες στους αεραγωγούς, ορισμένα έγγραφα

επισημαίνουν ότι οι μεταβολίτες συλλέγονται από το αίμα και έπειτα ανταλλάσσονται στη διεπιφάνεια αέρα-αίματος στον πνεύμονα.

Οι πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) που εκπνέουν οι άνθρωποι αποτελούν πολύτιμη πηγή πληροφοριών για την κατάσταση του σώματος. Μια μεγάλη ποικιλία πτητικών οργανικών ενώσεων εκπέμπεται από τα διάφορα μέρη του σώματος. Η αναπνοή παρέχει αέρα στους πνεύμονες με κύριο σκοπό την εισαγωγή οξυγόνου στο σώμα. Η εκπνοή είναι η επανέκδοση του εισπνεόμενου αέρα μετά την αφαίρεση του οξυγόνου που είναι απαραίτητο για τη ζωή. Όσον αφορά τον εισπνεόμενο αέρα, η εκπνοή εξαντλείται από οξυγόνο και εμπλουτίζεται, εκτός από το CO₂, από έναν αριθμό ενώσεων που συλλαμβάνονται στη διεπιφάνεια ιστού-αέρα σε όλο το μήκος της αναπνευστικής οδού. Οι περισσότερες από αυτές τις ενώσεις είναι μεταβολικά προϊόντα, οπότε η αναπνοή μπορεί να περιέχει τα ίχνη των κυτταρικών δραστηριοτήτων. Η επακόλουθη ανάλυση της αναπνοής μπορεί να αποκαλύψει εκείνες τις παθολογίες που τροποποιούν το μεταβολισμό. Η καταγραφή των πληροφοριών που περιέχονται στην αναπνοή, κεντρίζει το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών και έτσι η ανάλυση της αναπνοής αναδεικνύεται ως ένας από τους πιο υποσχόμενους τομείς ενδιαφέροντος για την τεχνολογία αισθητήρων αερίου.[94]

Ο καρκίνος του πνεύμονα, συγκεκριμένα, προσέλκυσε μεγάλο ενδιαφέρον για την προφανή εμπλοκή του στην αναπνοή και όλες αυτές οι μελέτες υποστηρίζουν ότι ο καρκίνος του πνεύμονα μεταβάλλει τη σύνθεση της αναπνοής.

Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα για την ταυτοποίηση των σχετικών πτητικών ενώσεων είναι ελάχιστα, πιθανώς λόγω έλλειψης τυποποίησης της δειγματοληψίας και της ανάλυσης αναπνοής. Για παράδειγμα, σε μια έρευνα 10 εργασιών σχετικά με το θέμα, μετρήθηκαν συνολικά 170 διαφορετικά ανιχνευμένα VOC, αλλά μόνο 17 από αυτά εμφανίστηκαν σε τουλάχιστον δύο διαφορετικά πειράματα.[94][95] Όλες αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι, ενώ δεν είναι δυνατός ο εντοπισμός συγκεκριμένων δεικτών για τον καρκίνο του πνεύμονα, η ασθένεια μεταβάλλει τη συγκέντρωση πολλών ενώσεων, τροποποιώντας τη συνολική χημική σύνθεση της αναπνοής.

Μελέτη η οποία δημοσιεύθηκε στο επιστημονικό περιοδικό Nature με τίτλο "The lung cancer breath signature: a comparative analysis of exhaled breath and air sampled from inside the lung", υποστηρίζει την υπόθεση ότι τα πτητικά προϊόντα του μεταβολισμού απελευθερώνονται κυρίως μέσω των σωματικών υγρών και ειδικότερα του αίματος, απ' όπου φθάνουν στους διαφορετικούς ιστούς του σώματος. Η επιτυχής απελευθέρωση των προϊόντων μεταβολισμού εξαρτάται από τους συντελεστές κατανομής στην διεπιφάνεια μεταξύ του αίματος και των ιστών. Για το λόγο αυτό προτείνεται η ταυτόχρονη μέτρηση των πτητικών οργανικών ενώσεων από διαφορετικά τμήματα του σώματος για τη μέτρηση των παγκόσμιων πτητικών μεταβολικών προϊόντων β. Επιπλέον σύμφωνα με την ίδια μελέτη, στους πνεύμονες, στη διεπιφάνεια αίματος-αέρα οι πτητικές μεταβολικές ενώσεις μπορεί να εκτοπιστούν από το αίμα προς τον αέρα και τελικά να απελευθερωθούν στην αναπνοή. Σύμφωνα με αυτό το σενάριο τα VOCs εκπέμπονται στην διεπιφάνεια αίματος-αέρα ανεξάρτητα από τη θέση του καρκίνου.[94]

3.5 Συλλογή των VOCs

Λόγω της πολυπλοκότητας, της ετερογένειας και της παρουσίας πολλών διαφορετικών ουσιών σε επίπεδα που κυμαίνονται από pptv-ppbv, ο εκπνεόμενος αέρας ανήκει στα πιο περίπλοκα μέσα προς ανάλυση. Τα συνήθη στάδια της αναλυτικής διαδικασίας προσδιορισμού των οργανικών ενώσεων στον αέρα της ανθρώπινης εκπνοής είναι τα παρακάτω:

1. Συλλογή δείγματος εκπνοής
2. Προ-Συγκέντρωση των VOCs της εκπνοής
3. Ανάλυση των VOCs που έχουν συλλεχθεί

Οι μέθοδοι συλλογής των VOCs ποικίλουν. Οι πιο συνηθισμένες είναι η ηλεκτρονική μύτη (electronic nose), οι σακούλες Tedlar (Tedlar bags), οι συσκευές Bio-VOC και οι σωλήνες συλλογής (RTubeVOC). Η ηλεκτρονική μύτη είναι μία συσκευή που χρησιμοποιεί σύνθετους ανιχνευτές νανοαισθητήρων, συνδυασμένους με ενσωματωμένους αλγόριθμους ηλεκτρονικής μάθησης, οι οποίοι μπορούν να συγκεντρώσουν εκπνεόμενα μοριακά δακτυλικά αποτυπώματα.[96] Όταν έρχονται σε επαφή με πτητικές ενώσεις, οι αισθητήρες αντιδρούν, πράγμα που σημαίνει ότι παρουσιάζουν αλλαγή στις ηλεκτρικές ιδιότητες. Τα καταγεγραμμένα δεδομένα υπολογίζονται στη συνέχεια με βάση τα στατιστικά μοντέλα. Οι σακούλες Tedlar και οι σωλήνες RTubeVOC έχουν παρόμοιο τρόπο συλλογής των VOCs καθώς και με τις δύο μεθόδους το δείγμα συλλέγεται με μία βαθιά εκπνοή από τον δότη, με τη διαφορά ότι στις σακούλες Tedlar αποθηκεύεται όλη η ποσότητα του εκπνεόμενου αέρα ενώ στους σωλήνες RTubeVOC μόνο το τελευταίο κλάσμα της εκπνοής. Ωστόσο με αυτόν τον τρόπο συλλογής δείγματος δεν γίνεται άμεση ανάλυση των VOCs της αναπνοής και γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητο το στάδιο της προσυγκέντρωσης καθώς οι VOCs στον εκπνεόμενο αέρα είναι σε συγκεντρώσεις της τάξης των pptv και χαμηλότερα.



Εικόνα 3.4 : Αριστερά: Tendlar bag (envirotech), Δεξιά RTubeVOC (Respiratory Research)

Οι συνήθειες μέθοδοι προ-συγκέντρωσης περιλαμβάνουν τους σωλήνες θερμικής εκρόφησης (TD) που περιέχουν προσροφητικά υλικά, και την χρήση της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME).[70] Μετά την προσυγκέντρωση ακολουθεί η ανάλυση όπου γίνεται διαχωρισμός με κάποια χρωματογραφική τεχνική και ταυτοποίηση με φασματομετρία μάζας.

3.5.1 Συνθήκες που επηρεάζουν τη σύσταση των VOCs

Οι συνθήκες οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την σύσταση των VOCs είναι συνήθως εξωγενείς παράγοντες όπως το κάπνισμα, η λήψη τροφής και το περιβάλλον δειγματοληψίας αλλά και ενδογενείς όπως η διαφοροποιημένη σύσταση τους ανάλογα με τη φυσική κατάσταση του ατόμου.

Περιβάλλον: Κατά τη συλλογή του δείγματος είναι δυνατή η επιμόλυνσή του από τις πτητικές ενώσεις που υπάρχουν στο περιβάλλοντα χώρο. Επειδή δεν είναι δυνατή η απομάκρυνση των πτητικών οργανικών ενώσεων ταυτόχρονα γίνεται και δειγματοληψία του αέρα του χώρου προκειμένου να συγκριθούν τα δύο δείγματα και να αφαιρεθούν τυχόν VOCs που είναι απλές προσμίξεις και δεν είναι ενδεικτικές του εκπνεόμενου αέρα και των ενδογενών VOCs.[97]

Κάπνισμα: Ο καπνός του τσιγάρου περιέχει πολλές πτητικές οργανικές ενώσεις οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν στη σύσταση των VOCs του εκπνεόμενου αέρα. Τέτοιες ενώσεις είναι οι νιτροενώσεις και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Για αυτό τον λόγο συνίσταται να αποφεύγεται το κάπνισμα πριν τη δειγματοληψία για τουλάχιστον 3 ώρες.[97]

Λήψη τροφής και ποτών: Η λήψη τροφής πριν από τη δειγματοληψία αποφεύγεται χωρίς να είναι ωστόσο αποδεδειγμένο ότι επηρεάζει άμεσα τη σύσταση των VOCs. Ο λόγος γίνεται κυρίως για τροφές που είναι πλούσιες σε νιτρώδη και νιτρικά άλατα και μπορεί να επηρεάσουν τα επίπεδα του NO στη συνολική σύσταση των VOCs.[97]

Άσκηση: Η σωματική άσκηση μπορεί να μην επηρεάζει τη σύσταση του εκπνεόμενου αέρα αλλά ίσως επιφέρει μεταβολές στα επίπεδα των VOCs. Έτσι η άσκηση πριν από τη δειγματοληψία πρέπει να αποφεύγεται.[98]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

4.1 Τεχνική εκχύλισης

Η κάθε αναλυτική διαδικασία, πρέπει να ακολουθεί τρία σημαντικά βήματα:

- δειγματοληψία και προετοιμασία δειγμάτων για μετρήσεις
- μέτρηση
- επεξεργασία δεδομένων

Τα δείγματα είναι τμήματα περιβάλλοντος, τόσο από τον βióτοπο (αέρα, νερό, έδαφος) όσο και από τη βιογένεση (φυτά, ζώα) που είναι αντιπροσωπευτικά του τόπου και της στιγμής δειγματοληψίας.[99] Η δειγματοληψία, η συντήρηση και η προεργασία του δείγματος εξαρτώνται από τη φύση των συστατικών που περιέχονται και ενδιαφέρουν τον αναλυτή (οργανικά ή ανόργανα), από τη συγκέντρωσή τους (κύρια συστατικά, μικρή περιεκτικότητα ή ίχνη) και από την αναλυτική τεχνική.[100]

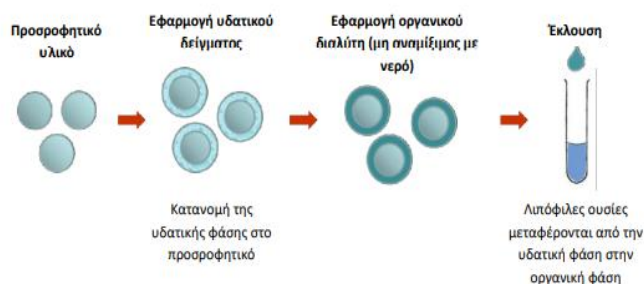
Η εκχύλιση είναι μία από τις πιο κλασικές τεχνικές διαχωρισμού και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Αυτή η μέθοδος συναντάται με πολλές και διαφορετικές εκδοχές ανάλογα με τη φυσική κατάσταση του εκχυλιστικού μέσου και της φάσης-δότη. Στις τεχνικές εκχύλισης συμπεριλαμβάνεται η εκχύλιση στερεών με υγρό, η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) και η πιο συνήθης που είναι η υγρή-υγρή εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE).[101]

4.1.1 Υγρή – Υγρή εκχύλιση (LLE)

Η τεχνική LLE, δηλαδή η εκχύλιση ενός διαλύματος με ένα υγρό διαλύτη, όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.1.1, βασίζεται στην κατανομή της ένωσης στόχου, η οποία αποτελεί τη διαλυμένη ουσία του διαλύματος, μεταξύ των δύο υγρών που είναι μη αναμίξιμα, δημιουργώντας δύο φάσεις. Στην υγρή-υγρή εκχύλιση, ορισμένος όγκος του προς εκχύλιση διαλύματος φέρεται σε επαφή με ορισμένο όγκο εκχυλιστικού μέσου μέσα σε διαχωριστική χοάνη. Είναι χρονοβόρα τεχνική και χρησιμοποιεί πολλές φορές τοξικούς διαλύτες. Μερικές φορές σχηματίζονται γαλακτώματα καθιστώντας πολύ δύσκολο τον διαχωρισμό νερού / οργανικής φάσης. Συνεπώς, τα προηγούμενα χρόνια οι χοάνες διαχωρισμού είχαν αντικατασταθεί από στήλες εκχύλισης (π.χ. στήλη Extrelute, Merck). Έπειτα, το σύστημα αναταράσσεται και αφήνεται σε ηρεμία. Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας, οι δύο φάσεις (συνήθως υδατική κι οργανική) διαχωρίζονται και λαμβάνεται εκείνη (συνήθως η οργανική) που περιέχει την ένωση στόχο, της οποίας εν συνεχεία υπολογίζεται η συγκέντρωση.[102]

Η εκχύλιση με στήλη βασίζεται στην ακόλουθη αρχή: Το δείγμα νερού κατανέμεται στην επιφάνεια του προσροφητικού. Στη συνέχεια πραγματοποιείται η έκλουση με μη-αναμίξιμους διαλύτες με το νερό (π.χ. διαιθυλαιθέρας, οξικός αιθυλεστέρας ή χλωριωμένοι διαλύτες). Όλες οι λιπόφιλες ενώσεις μεταφέρονται από την υδατική στην οργανική φάση. Κατά τη διάρκεια της διεργασίας η υδατική φάση παραμένει στην στατική φάση και ο

σχηματισμός γαλακτώματος δεν είναι πλέον δυνατός. Το εκχύλισμα μπορεί να συμπυκνωθεί και ενώσεις θα αναλυθούν.[102]



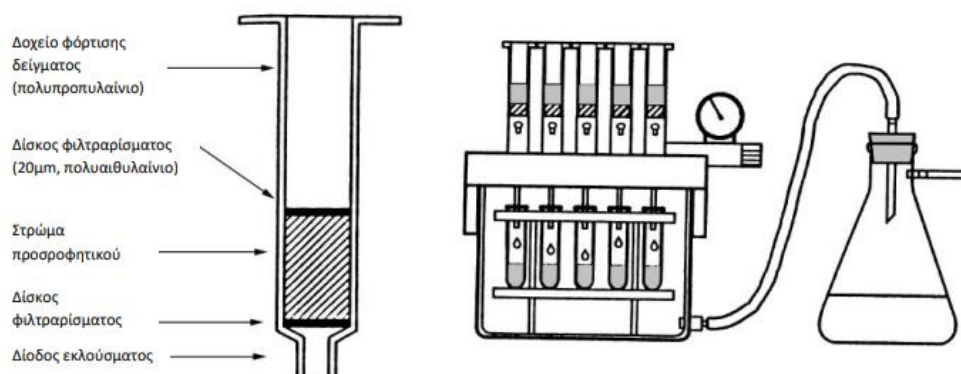
Εικόνα 4.1.1: Σχηματική αναπαράσταση υγρής-υγρής εκχύλισης LLE σε στήλη[103]

4.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Στην ανάλυση υπολειμμάτων, η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης χρησιμοποιείται για την άμεση εκχύλιση των οργανικών ενώσεων από υγρά δείγματα αλλά αποτελεί και βασική τεχνική καθαρισμού των εκχυλισμάτων οργανικού διαλύτη πριν από το ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών. Η SPE βασίζεται στην θεωρία της χρωματογραφίας προσρόφησης.[104] Αντικαθιστά την κλασική εκχύλιση υγρού-υγρού και βασίζεται στην παρατήρηση ότι οι οργανικοί αναλύτες μπορούν να προσροφηθούν σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, σε μια μικροστήλη. Σε αυτή τη τεχνική απομακρύνονται οι παρεμβαλλόμενες ενώσεις από τη μήτρα και επιτυγχάνεται μία επιλεκτική προσυγκέντρωση από 100 έως 5000 φορές, με τη μέθοδο να μπορεί να απομονώνει ακόμη και ίχνη.

Πριν από την επιλογή του προσροφητικού, θα πρέπει να προηγείται μελέτη της φυσικοχημείας του συστήματος και να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι όπως οι χαρακτηριστικές ομάδες των αναλυτών, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των σχηματιζόμενων δεσμών, οι δευτερεύουσες επιδράσεις, καθώς και η αλληλεπίδραση του προσροφητικού και των προς ανάλυση ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος.[105]

Η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης πραγματοποιείται είτε σε μικροστήλες οι οποίες περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό, είτε σε δίσκους εκχύλισης στους οποίους η προσροφητική μεμβράνη είναι ενσωματωμένη πάνω σε ένα δίκτυο μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE). Οι μικροστήλες περιέχουν προσροφητικά με διαφορετικές διαστάσεις σωματιδίων που επιτρέπουν τη χρήση χαμηλών πιέσεων, αναγκάζοντας το δείγμα και τον διαλύτη έκλυσης να περάσει μέσα από αυτό. Η εκχύλιση σε στερεά φάση για υγρά δείγματα έγινε μια ευρέως χρησιμοποιούμενη εργαστηριακή τεχνική με την χρήση μίας σύριγγας απορροφήσεως που περιέχει πορώδη σωματίδια πυριτίας συνδεδεμένα με σιλοξάνιο, μεγέθους που επιτρέπει την επεξεργασία δείγματος με ήπια αναρρόφηση υπό κενό.



Εικόνα 4.1.2: Σχηματική αναπαράσταση μιας τυπικής SPE μικροστήλης και η διάταξη κενού σε μία παράλληλη κατεργασία δειγμάτων[106]

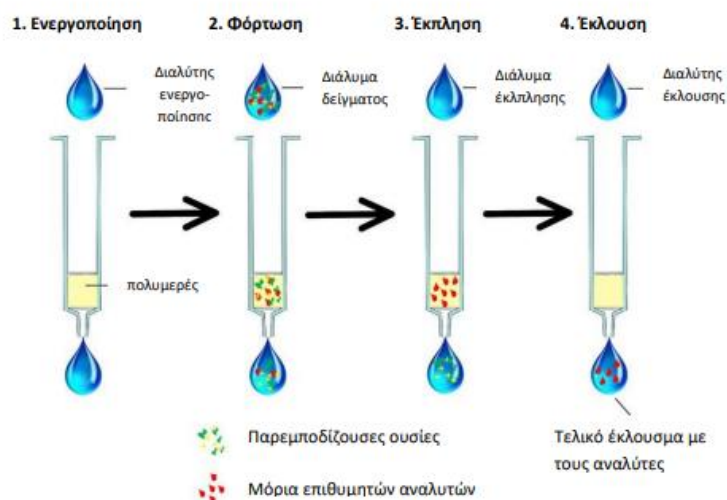
Η τεχνική της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης, όπως φαίνεται και στην εικόνα 4.1.2.1, περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα στάδια:

α) Προετοιμασία του προσροφητικού υλικού (conditioning). Μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη διέρχεται μέσω του δίσκου εκχύλισης ή της μικροστήλης. Ένα μέρος αυτού προσροφάται στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και την καθιστά ανάλογα του συστήματος εκχύλισης πιο συμβατή με το διάλυμα του δείγματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη επιφανειακή επαφή. Επιπλέον, με τη διαδικασία αυτή επιτυγχάνεται απομάκρυνση ξένων προς την ανάλυση, προσροφημένων οργανικών ουσιών, από το στρώμα του προσροφητικού

β) Εκχύλιση-Προσρόφηση: Τα δείγματα διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης, με εφαρμογή πίεσης ή κενού, ενώ ο ρυθμός ροής θα πρέπει να διατηρείται κατά το δυνατόν σταθερός.

γ) Έκπλυση: Η έκπλυση του προσροφητικού υλικού έχει ως σκοπό την απομάκρυνση παρεμποδιστικών ουσιών, που πιθανόν να υπάρχουν, χωρίς να γίνει έκλυση των αναλυόμενων ουσιών.

δ) Έκλυση: Χρησιμοποιείται κατάλληλος όγκος οργανικού διαλύτη (ή μίγματος διαλυτών), για τη ποσοτική εκρόφηση των αναλυόμενων ουσιών και τη μεταφορά τους σε υγρή φάση.[104]



Εικόνα 4.1.2.1 : Τα στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης SPE

Πιθανώς η πρώτη εφαρμογή της SPE, το 1950, γινόταν με χρήση άνθρακα ως υλικό πλήρωσης των στηλών για την απομόνωση οργανικών ρύπων από επιφανειακά ύδατα για την αξιολόγηση της τοξικότητας. Ο μεγάλος όγκος νερού που απαιτούνταν εμπόδιζε την χρήση εκχύλισης LLE. Η άνθηση των πολυμερών στις αρχές της δεκαετίας του 1970 ήταν υπεύθυνη για την αναζωπύρωση του ενδιαφέροντος για την SPE και την επέκταση του πεδίου εφαρμογής της σε αέρια δείγματα εκτός από τα υγρά. Αυτά τα προσροφητικά είχαν καλή μηχανική αντοχή, σε σύγκριση με τις πηκτές, μεγάλη επιφάνεια, ισχυρότερη προσροφητική ικανότητα και χαμηλή κατακράτηση νερού. Σήμερα χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός προσροφητικών ανάλογα με τους ενδιαφερόμενους αναλύτες.[106]

4.2 Τεχνική μικροεκχύλισης

Κατά τις δύο τελευταίες δεκαετίες, αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος η οποία ονομάζεται μικροεκχύλιση, επιτυγχάνοντας ευκολότερη προετοιμασία δείγματος, μειωμένη κατανάλωση εκχυλιστικού μέσου και απλούστευση της αρχικής τεχνικής. Η σμίκρυνση των κλασικών τεχνικών εκχύλισης υπερνίκησε πολλά προβλήματα που εμφανίζονταν κατά την ανάλυση. Επιπλέον, συντέλεσε στην ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος και της ποσότητας της εκχυλιστικής φάσης, μειώνοντας έτσι το συνολικό κόστος. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθόδου μικροεκχύλισης είναι η επιτάχυνση μεταφοράς της μάζας κατά τη διαδικασία της ρόφησης και της εκρόφησης στο αναλυτικό όργανο, ενώ ταυτόχρονα εμποδίζει την έμφραξη του αναλυτικού οργάνου από προσμίξεις.

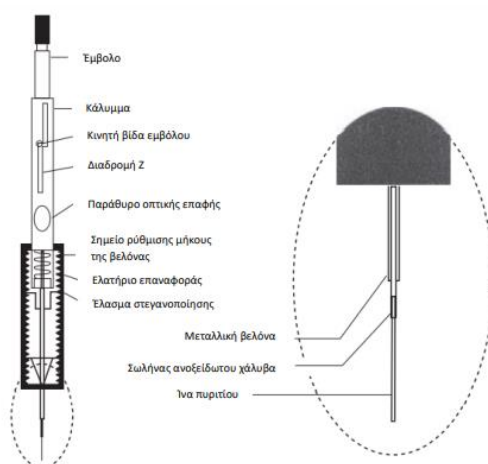
Ο όρος μικροεκχύλιση περιλαμβάνει μία ομάδα διαφορετικών τεχνικών όπως τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Micro Extraction, SPME) και τη μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Micro Extraction, LPME). Η εμφάνιση της Μικροεκχύλισης στερεάς φάσης το 1990, αποτέλεσε σημείο αναφοράς στην εξέλιξη των τεχνικών εκχύλισης.

Η επακόλουθη βιομηχανική διάδοση της SPME τεχνικής, σηματοδότησε την απαρχή μιας έντονης ερευνητικής δραστηριότητας. [101][107]

4.2.1 Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction – SPME)

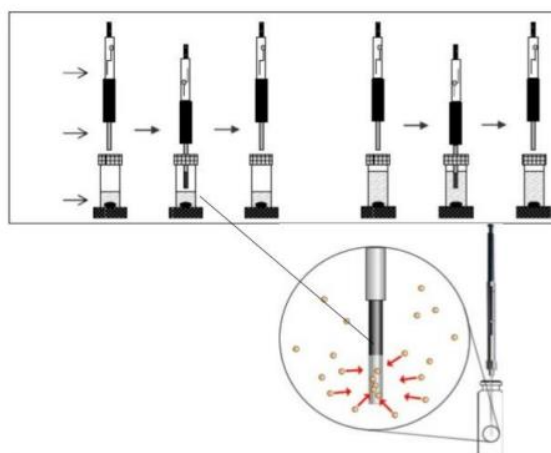
Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αντιπροσωπεύει μια σύγχρονη αποτελεσματική εναλλακτική λύση για την προεργασία του δείγματος που πολύ γρήγορα διαδόθηκε στον επιστημονικό χώρο. Είναι μία τεχνική εκχύλισης που βασίζεται στην ρόφηση των αναλυτών από την στερεή φάση εκχύλισης η οποία ξεπερνά πολλούς από τους περιορισμούς των συμβατών τεχνικών προετοιμασίας δείγματος και μπορεί εύκολα να οδηγηθεί ακολούθως σε μία συστοιχία χρωματογραφίας. Η τεχνική αυτή γνωστοποιήθηκε από τους J.Pawliszyn και την επιστημονική του ομάδα στο Πανεπιστήμιο του Waterloo (Ontario, Canada) το 1989 με τις εφαρμογές της να αυξάνονται δραματικά και να χρησιμοποιείται κυρίως για περιβαλλοντική ανάλυση νερού. Στην πραγματικότητα το 1989 εκδόθηκαν οι αρχές της θεωρίας που βασίζεται η SPME και το 1990 δημιουργήθηκε η πρώτη συσκευή SPME. Η εφεύρεση της SPME βασίζεται στη τεχνολογία των ανοικτού - σωληνοειδή τύπου τριχοειδών στηλών (open – tubular capillary columns) που χρησιμοποιούνται στην αέρια χρωματογραφία (GC) η οποία εμφανίστηκε στην δεκαετία του '80.[101]

Ο βασικός εξοπλισμός της SPME είναι απλός. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2.1, μοιάζει με μια τροποποιημένη σύριγγα που αποτελείται από το σύστημα συγκράτησης της ίνας και μία μεταλλική «θήκη» με μορφή σύριγγας, που περιέχει μια ανακλινόμενη ίνα SPME μήκους 1-2 cm. Η ίνα SPME είναι μια λεπτή οπτική ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) και καλύπτεται από υμένιο υγρού πολυμερικού υλικού το οποίο είναι είτε πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) είτε πολυακρυλικό (PA) πάνω στην επιφάνεια της οποίας βρίσκεται το ροφητικό υλικό (στατική φάση ή φάση εκχύλισης). Ο όγκος και η επιφάνεια της επικάλυψης από πολυμερικό υλικό επιδρούν στην συγκέντρωση των αναλυτών που εκχυλίζονται, το είδος του πολυμερικού υλικού καθορίζει την επιλεκτικότητα της μεθόδου, το πάχος του στρώματος του πολυμερούς και ο συντελεστής διάχυσης επηρεάζουν δραστικά το χρόνο εκχύλισης και η σταθερά κατανομής επηρεάζει την ευαισθησία της αναλυτικής μεθόδου. Γι' αυτό το λόγο η σωστή επιλογή της επικαλυμμένης από πολυμερές ίνας καθορίζει την αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια της μεθόδου. Το κατάλληλο πολυμερικό υλικό που επικαλύπτει την ίνα τηγμένου υμενίου του πυριτίου είτε επιλέγεται από τα εμπορικά διαθέσιμα (commercial fibre) είτε σχεδιάζεται εκ νέου (custom-made fibre) σύμφωνα με τις ανάγκες που πρέπει να εξυπηρετήσει (ανάλογα με τη φύση των αναλυτών και τη φύση της στήλης στην υγρή ή αέρια χρωματογραφία).



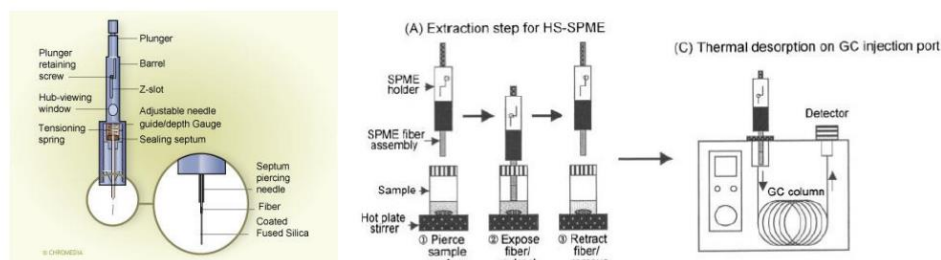
Εικόνα 4.2.1: Συσσκευή SPME[108]

Η ίνα SPME εισάγεται στην κατάλληλη θέση, η βελόνα προστασίας της ίνας αποσύρεται και η ίνα εκτίθεται στον περιβάλλοντα χώρο. Οι οργανικοί αναλύτες προσροφώνται σε αυτή, ενώ η μαγνητική ανάδευση αυξάνει την ταχύτητα της προσρόφησης. Περίπου 15 λεπτά είναι απαραίτητα για να επέλθει η ισορροπία. Η επικάλυψη πολυμερούς δρα σαν σπόγγος, συγκεντρώνοντας τους αναλύτες με διαδικασίες απορρόφησης/προσρόφησης. Η εκχύλιση οφείλεται στην κατανομή αερίου-υγρού ή υγρού-υγρού. [109] Μετά τη δειγματοληψία, η ίνα ανασύρεται στη βελόνα (για προστασία από επιμολύνσεις) και το επόμενο βήμα είναι η μεταφορά του αναλύτη από την ίνα στον χρωματογράφο. Πιο συγκεκριμένα η τεχνική εκχύλισης SPME αποτελείται από δύο διαδικασίες: (1) διαχωρισμό των αναλυτών μεταξύ του δείγματος και της επικαλυμμένης ίνας πυριτίας, και (2) έγχυση των ουσιών προς ανάλυση από την ίνα σε ένα αναλυτικό όργανο. Για να εκτελεστεί η εκχύλιση, ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει οργανικές ουσίες (άμεση) ή ένα στερεό/υγρό/αέριο δείγμα που περιέχει πτητικούς οργανικούς αναλύτες (έμμεση) τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο και στη συνέχεια κλείνεται ερμητικά με πώμα που έχει ενσωματωμένο έλασμα. Για να γίνει εκχύλιση, η προστατευτική βελόνα χάλυβα του SPME διατρύπα το έλασμα και στη συνέχεια το έμβολο χαμηλώνει είτε για να βυθίσει απευθείας την ίνα στο υδατικό δείγμα είτε για να την εκθέσει στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος (Εικόνα 4.2.1.1). Οι αναλύτες στη συνέχεια εκχυλίζονται από τη μήτρα δείγματος στην επικαλυμμένη ίνα. Μετά από έναν προκαθορισμένο χρόνο προσρόφησης, η ίνα ανασύρεται πίσω στην προστατευτική βελόνα, και στη συνέχεια το σύνολο τραβιέται έξω από το φιαλίδιο δειγματοληψίας. Το σύνολο εισάγεται αμέσως στον δειγματολήπτη GC ή HPLC και το έμβολο χαμηλώνει και πάλι για να εκθέσει την ίνα. [110]



Εικόνα 4.2.1.1: Εφαρμογή SPME δειγματοληψίας με δύο διαφορετικούς τρόπους: Παραλαβή συστατικών από το εσωτερικό διάκενο του φιαλιδίου (αριστερά) & Παραλαβή πτητικών συστατικών από το υγρό δείγμα (δεξιά)[111]

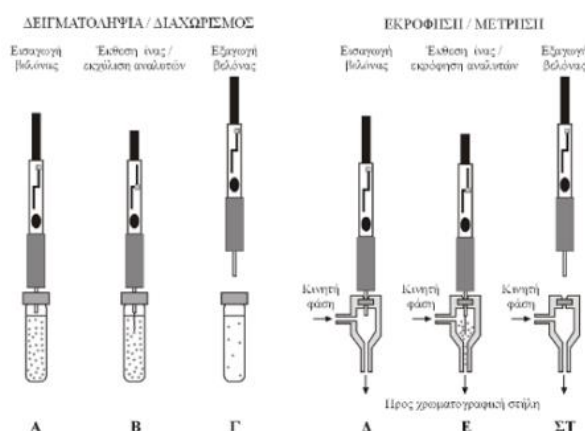
Η αέρια χρωματογραφία (GC ή GC / MS) είναι μία από τις προτιμώμενες τεχνικές. Στην περίπτωση αυτή, η θερμική εκρόφηση του αναλύτη λαμβάνει χώρα στο θερμό σημείο έγχυσης του αέριου χρωματογράφου. Μετά την εισαγωγή της βελόνας μέσα στον εγχυτήρα, η ίνα ωθείται έξω από τη μεταλλική βελόνα. Η ίνα είναι επικαλυμμένη με ένα λεπτό πολυμερικό φιλμ, το οποίο συγκεντρώνει τους οργανικούς αναλύτες κατά τη διάρκεια της απορρόφησης ή της προσρόφησης από το δείγμα. Η αρχή της εξαγωγής βασίζεται στους κανόνες διαφορετικής κατανομής. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό που καθορίζει την αναλυτική απόδοση του SPME είναι ο τύπος και το πάχος του υλικού επικάλυψης. Το πιο κοινό υλικό επίστρωσης είναι το PDMS. Οι δύο τύποι PDMS και PA εκχυλίζουν δείγματα μέσω της απορρόφησης αναλυτών, τα οποία διαλύονται και διαχέονται στο υλικό επικάλυψης. Οι υπόλοιποι τύποι (Carbowax-DVB, Carbowax-TPR, PDMS-Carboxen και PDMS-DVB) είναι μικτές επικαλύψεις και εκχυλίζονται μέσω προσρόφησης των αναλυτών που παραμένουν στην επιφάνεια της ίνας.[112] Η επικαλυμμένη ίνα βυθίζεται απευθείας στο δείγμα ή στο HS του δείγματος, όπου οι αναλύτες συγκεντρώνονται. Αφού επιτευχθεί ισορροπία η ίνα αποσύρεται και μεταφέρεται είτε στο σημείο έγχυσης του GC είτε σε τροποποιημένη βαλβίδα HPLC. Η ίνα εκτίθεται και ο αναλύτης απορροφάται είτε θερμικώς στη θύρα έγχυσης θερμού GC είτε (στην περίπτωση της HPLC) εκλούεται από την κινητή φάση και ακολούθως χρωματογραφείται με συμβατικό τρόπο.[113]



Εικόνα 4.2.1.2: Αριστερά: Χαρακτηριστικά της ίνας SPME, Δεξιά: Προσρόφηση στην ίνα και ανάλυση της με αέριο χρωματογράφο.[113]

Η SPME αναπτύχθηκε με σκοπό την επίτευξη της γρήγορης προετοιμασίας δειγμάτων, που αποτελούν πρώτητη ανάγκη, τόσο σε εργαστηριακή κλίμακα, όσο και σε *in situ* εφαρμογές. Αποτελεί μία σμίκρυνση της μεθόδου SPE γεγονός που οδηγεί στην ελαχιστοποίηση της ανάλυσης δηλαδή στην απαίτηση μικρότερων ποσοτήτων δείγματος. Είναι μια τεχνική που παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα καθώς είναι απλή και εύχρηστη, κοστίζει λίγο, δύναται να αυτοματοποιηθεί, δεν προϋποθέτει την χρήση διαλύτη και επιταχύνει την μεταφορά μάζας κατά την διάρκεια της εκχύλισης και της εκρόφησης. Επίσης, ολοκληρώνεται σε ένα στάδιο ενώ δεν απαιτεί στάδιο καθαρισμού εφόσον διακρίνεται από υψηλή επιλεκτικότητα και οι πιθανές προσμίξεις εξαφανίζονται κατά την εκρόφηση στο αναλυτικό όργανο, αποφεύγοντας έτσι την απώλεια μέρους της ποσότητας των ενώσεων-στόχων οδηγώντας σε μία τεχνική υψηλής ευαισθησίας. Τέλος, είναι μία αναλυτική μέθοδος που εφαρμόζεται για την ανίχνευση μεγάλης ποικιλίας αναλυτών από πολλές και διαφορετικές μήτρες, εμφανίζοντας ταυτόχρονα χαμηλά όρια ανίχνευσης και υψηλή ακρίβεια. Η SPME είναι ακόμη φιλική προς το περιβάλλον.

Φυσικά η τεχνική της SPME διαθέτει ταυτόχρονα αρκετά μειονεκτήματα όπως το γεγονός ότι παρ' όλες τις προσπάθειες η αντίσταση μεταφοράς της μάζας από το δείγμα στην ίνα παραμένει. Ένα σημαντικό μειονέκτημα αποτελεί ο περιορισμένος χρόνος ζωής της ίνας καθώς παρατηρούνται φθορές στην επιφάνειά της λόγω της ανάδευσης ή της υψηλής θερμοκρασίας κατά την εκρόφηση ή της έκθεσης της ίνας σε πολύπλοκες μήτρες με πολλές προσμίξεις. Η μερική απώλεια της στατικής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κορυφών που συνενώνονται μαζί με τις προσδιοριζόμενες ουσίες, μειώνοντας έτσι την ακρίβεια και την ευαισθησία της τεχνικής. Επίσης, ορισμένες φορές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους προσδένονται ανέκκλητα με την ίνα αλλάζοντας τα χαρακτηριστικά του υλικού επικάλυψης της ίνας με τέτοιο τρόπο ώστε να μη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά. Ακόμη, η εφαρμογή της SPME περιορίζεται από το μικρό όγκο της φάσης εκχύλισης καθώς εξάγεται μικρή σχετικά ποσότητα από την αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα. Τέλος, τα περισσότερα προβλήματα σε αυτή τη μέθοδο δημιουργούνται όταν η μήτρα είναι βρώμικη κάτι που οδηγεί σε χαμηλή επαναληψιμότητα και μειωμένη γραμμικότητα για χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών. Παρόλα αυτά δεν παύει να είναι μία τεχνική εξαιρετική η οποία εξελίσσεται και βελτιώνεται συνεχώς.[101]



Εικόνα 4.2.1.3: Διαδικασία δειγματοληψίας με την SPME[101]

4.3 Χρωματογραφική ανάλυση

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, η οποία στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινητής και μια στατικής φάσης. Ανάλογα με τη φύση της κινητής φάσης, η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται ως αέρια ή υγρή. Ο διαχωρισμός των χημικών ουσιών διαφέρει αναλόγως την αρχή στην οποία στηρίζεται. Έτσι η χρωματογραφία χαρακτηρίζεται σαν κατανομής, προσρόφησης, ιονανταλλαγής ή πηκτής. Ακόμα και η τεχνική συγκράτησης της στατικής φάσης ποικίλλει έχοντας χρωματογραφία στήλης, λεπτής στιβάδας και χρωματογραφία χάρτου.

4.3.1 Υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography LC)

Η υγρή χρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη αναλυτική τεχνική λόγω της ευαισθησίας της, της εύκολης προσαρμογής της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, της καταλληλότητάς της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως λόγω της δυνατότητας εφαρμογής της σε προσδιορισμούς ουσιών ποικίλης προέλευσης.

Η χρωματογραφία HPLC, High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (με την ανάπτυξη της τεχνολογίας έχει καθιερωθεί η δεύτερη έκφραση), αποτελεί την σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλοεπιδράσει με τους αναλύτες που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό.[114]

4.3.2 Αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι σχετικά απλή εάν ληφθούν υπ' όψιν οι μεγάλες δυνατότητες εφαρμογής που παρέχει. Χρησιμοποιείται ως κινητή φάση ένα αέριο (φέρων αέριο), το οποίο συνήθως είναι ήλιο, αν και σε πολλές περιπτώσεις αντικαθίσταται με άζωτο, αργό ή υδρογόνο, και ως στατική φάση είναι είτε στερεή φάση (αέρια-στερεή χρωματογραφία, Gas Solid Chromatography, GSC), είτε υγρή φάση (αέρια-υγρή χρωματογραφία, Gas Liquid Chromatography, GLC). Πιο συχνή εφαρμογή έχει η δεύτερη, δηλαδή η αέρια-υγρή χρωματογραφία.

Στην τεχνική της αέριας-υγρής χρωματογραφίας ο διαχωρισμός των συστατικών βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού υγρού (στατική φάση), καθηλωμένου σε στερεό φορέα ή στα τοιχώματα ανοικτών τριχοειδών στηλών, και του φέροντος αερίου (κινητή φάση). Ο διαχωρισμός οφείλεται στις διαφορετικές δυνάμεις συγκράτησης και έκλυσης μεταξύ των συστατικών του μίγματος και του υλικού πλήρωσης της στήλης υπό τη ροή του φέροντος αερίου. Στην αέρια χρωματογραφία, οι αναλύτες διαχωρίζονται και

εξέρχονται από την στήλη μέσω μεταβολής της θερμοκρασίας της στήλης. Μεταβάλλοντας την θερμοκρασία (θερμοκρασιακό πρόγραμμα), αλλάζει η δυναμική της αλληλεπίδρασης του αναλύτη με την στατική φάση, και συνεπώς εξέρχονται από την στήλη όλοι οι αναλύτες σε διαφορετικούς χρόνους.

Η χρήση αερίου ως κινητή φάση σε ένα χρωματογραφικό σύστημα παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Το χαμηλό ιξώδες των αερίων επιτρέπει τη χρήση στηλών μεγάλου μήκους, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της στήλης.
- Η αδράνεια των αερίων όσον αφορά την αλληλεπίδραση τους με τα προς προσδιορισμό συστατικά καθιστά την ισορροπία κατανομής μεταξύ των δύο φάσεων πρακτικώς ανεξάρτητη από το αέριο.
- Υπάρχουν πολλοί απλοί, ευαίσθητοι και ταχείας αποκρίσεως ανιχνευτές, ικανοί να παρακολουθούν τις συγκεντρώσεις των ουσιών στην αέρια φάση.

Κατά την ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων με την GC, μετά τον διαχωρισμό των ουσιών ακολουθεί η ανίχνευση αυτών. Εξετάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν δεκάδες είδη ανιχνευτών όπως ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID), ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ανιχνευτές φασματογραφίας μαζών (MS) κ.α. Οι πιο συνήθεις ανιχνευτές που συνοδεύουν μία αέρια χρωματογραφία είναι οι τελευταίοι (GC-MS), όπου και παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία. Η σύζευξη συνήθως γίνεται με απ' ευθείας σύνδεση του αερίου χρωματογράφου με το όργανο της βοηθητικής αναλυτικής τεχνικής.[114]

Το αναλυτικό όργανο που χρησιμοποιείται περισσότερο κατά την εφαρμογή της τεχνικής SPME είναι ο αέριος χρωματογράφος. Η χρήση των κοινών GC εισαγωγών (Split/splitless) κατά την εφαρμογή της τεχνικής SPME είναι εφικτή εφόσον χρησιμοποιείται ένας ειδικός προσαρμογέας υποδοχής της ίνας (liner) με πολύ στενή εσωτερική διάμετρο (λίγο μεγαλύτερη από τη διάμετρο της ίνας). Άλλοι εισαγωγείς που χρησιμοποιούνται είναι οι εισαγωγείς ταχείας εκρόφησης με διέλευση του φέροντος αερίου απευθείας μέσα από την ίνα. Η χρήση αυτών των εισαγωγέων είναι εφικτή σε ηλεκτροχημικά SPME αναλυτικά όργανα, όπου η ίνα αποτελείται από αγώγιμο υλικό. Μετά την ηλεκτρική σύνδεση στο τελικό άκρο του ειδικού προσαρμογέα, πραγματοποιείται γρήγορη θέρμανση της ίνας με σύγχρονη διέλευση του φέροντος αερίου. Η χρήση ακτίνων λέιζερ είναι επίσης πολλές φορές δυνατή σ' αυτή την περίπτωση για την εκρόφηση των ενώσεων από την επιφάνεια της οπτικής ίνας. Οι εισαγωγείς ταχείας εκρόφησης συνδυάζονται άμεσα με ειδικούς προσαρμογείς SPME σε διάφορα όργανα ανίχνευσης όπως ανιχνευτές μάζας και ατομικής απορρόφησης. Ο πολύ καλός διαχωρισμός των ενώσεων και οι οξείες κορυφές που επιτυγχάνονται με την εφαρμογή αυτής της μεθόδου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ευαισθησίας της αναλυτικής τεχνικής και την επίτευξη πολύ χαμηλών ορίων ανίχνευσης, περίπου δυο τάξεις μεγέθους χαμηλότερων από τις παραδοσιακές GC-MS τεχνικές.[115]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ

Κάθε χρόνο, ο καρκίνος του πνεύμονα προκαλεί εκατομμύρια θανάτους και αποτελεί έναν από τους συνηθέστερους καρκίνους παγκοσμίως. Παρά την αξιόλογη πρόοδο των τελευταίων χρόνων στη διαγνωστική και θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα η συνολική πρόγνωση παραμένει πτωχή, εστιάζοντας την αγωνία ακόμα και σήμερα στην κατά το δυνατό πρωιμότερη διάγνωση της ασθένειας. [116]

Για το λόγο αυτό δημιουργήθηκε η ανάγκη για την ανάπτυξη νέων μεθόδων που θα επιτρέπουν την διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα σε πολύ πρώιμο στάδιο ακόμη και πριν την εκδήλωση συμπτωμάτων και θα στοχεύουν στην εξατομικεύμενη θεραπεία προκειμένου να αυξηθεί το προσδόκιμο ζωής αλλά και η ποιότητα ζωής του ασθενούς. Για την επίτευξη αυτού του στόχου εισάγεται η επιστήμη της μεταβολομικής.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η μελέτη του μεταβολικού προφίλ των ασθενών με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα ώστε να ανιχνευθούν οι μεταβολίτες οι οποίοι μπορεί να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες και να συμβάλλουν στην πρόωρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Για να πραγματοποιηθεί η συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εκπνεόμενου αέρα από ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και υγιείς τα οποία συλλέχθηκαν με RTubeVOC και αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Τα αποτελέσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά προκειμένου να προσδιοριστεί το μεταβολικό προφίλ των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Οι ενώσεις στις οποίες βασίζεται ο διαχωρισμός των δύο ομάδων θεωρούνται μεταβολίτες και πραγματοποιείται ταυτοποίηση αυτών ως πιθανών βιοδεικτών που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Συλλογή δειγμάτων

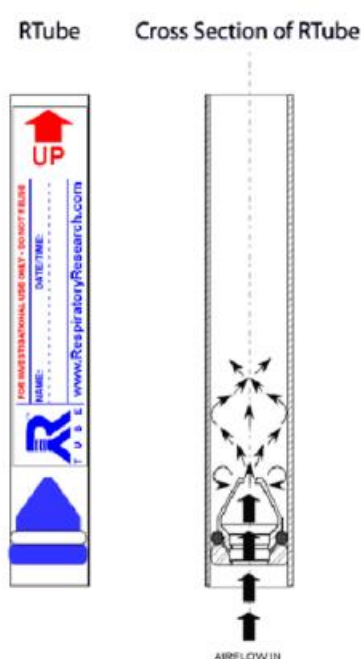
Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα εκπνεόμενου αέρα από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) αλλά και δείγματα υγιών μαρτύρων ίδιου φύλου και εύρους ηλικίας. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Πνευμονολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο αριθμός των δειγμάτων ασθενών και μαρτύρων είναι συνολικά 44 ενώ ο αριθμός των ασθενών μαζί με την κλινική τους κατάσταση και την ηλικία φαίνεται παρακάτω:

ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	ΦΥΛΟ
P1	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P2	IIA	ΆΡΡΕΝ
P3	IIIB	ΆΡΡΕΝ
P4	IV	ΆΡΡΕΝ
P5	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P6	IV	ΆΡΡΕΝ
P7	IV	ΆΡΡΕΝ
P8	IV	ΆΡΡΕΝ
P9	I	ΆΡΡΕΝ
P10	IV	ΆΡΡΕΝ
P11	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P12	IIIA	ΘΗΛΥ
P13	IIIB	ΆΡΡΕΝ
P14	IV	ΆΡΡΕΝ
P15	I	ΘΗΛΥ
P16	IV	ΘΗΛΥ
P17	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P18	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P19	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P20	IV	ΆΡΡΕΝ
P21	IIIA	ΆΡΡΕΝ
P22	IIIA	ΘΗΛΥ

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με ειδικούς σωλήνες RTubeVOC. Οι σωλήνες αυτοί είναι συσκευές αυστηρά μίας εκπνοής και διαθέτουν δύο βαλβίδες μονής κατεύθυνσης για τη διατήρηση της μονοκατευθυντικής ροής σε ολόκληρο τον κύκλο αναπνοής καθώς το άτομο εκπνέει μέσω του επιστομίου. Είναι χωρητικότητας 65 ml με απώτερο σκοπό να αποβάλλονται τα πρώτα κλάσματα του εκπνεόμενου αέρα και να παγιδεύεται το τελευταίο κλάσμα που είναι αντιπροσωπευτικό του εσωτερικού των πνευμόνων. Ο σωλήνας RTubeVOC είναι κατασκευασμένος από συμπολυμερές πολυπροπυλένιο, το στόμιο που είναι κατασκευασμένο από πολυαιθυλένιο, τα πώματα που διαθέτει που χρησιμεύουν στην παγίδευση του αέρα και στην απόκλιση των απωλειών, είναι κατασκευασμένα από βινύλιο

ιατρικής χρήσης, τη βαλβίδα προσαρμογής που είναι κατασκευασμένη από καουτσούκ σιλικόνης (εγκεκριμένα συστατικά από το FDA) και από δύο παρέμβυσματα υπό μορφή δακτυλίου με κυκλική διατομή που χρησιμοποιείται για την στεγανοποίηση της σύνδεσης στον σωλήνα.

Οι ασθενείς αλλά και οι υγιείς εξέπνευσαν δια μέσου του σωλήνα για 6 δευτερόλεπτα προκειμένου να συλλεχθεί το τελευταίο τμήμα της εκπνοής τους και οι σωλήνες παρέμειναν ανοικτοί χωρίς να σφραγιστούν με τα ειδικά πώματα, καθώς έχει αποδειχθεί πως με την σφράγιση των σωλήνων εισάγεται μικρή ποσότητα αέρα που αλλοιώνει το δείγμα των ασθενών. Στην συνέχεια τα δείγματα αναλύθηκαν με την κατάλληλη διαδικασία και μεθοδολογία.

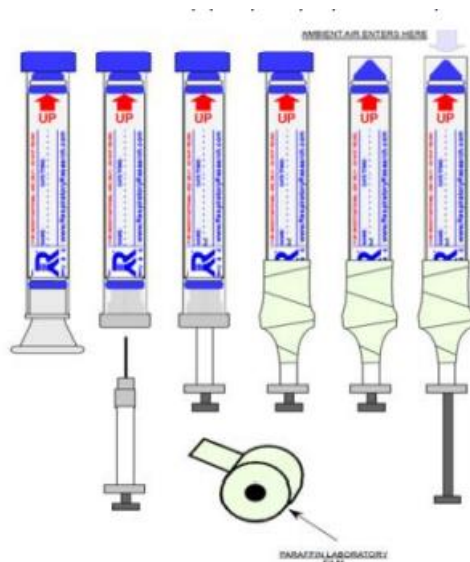


Εικόνα 6.1: Σωλήνας Δειγματοληψίας RTubeVOC.

6.2 Προετοιμασία δειγμάτων

Τα αέρια δείγματα είναι απαραίτητο να επεξεργαστούν εντός δύο ωρών από τη δειγματοληψία τους διαφορετικά μπορεί να παρατηρηθούν απώλειες λόγω πτητικότητας. Η προσρόφηση των πτητικών ενώσεων (VOCs) που επρόκειτο να αναλυθούν γίνεται με την μέθοδο της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME). Για την προσρόφηση χρησιμοποιήθηκε ένα κατασκευασμένη από συνδυασμό υλικών Διβινυλοβενζόλιο / καρβοξένιο / πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (CAR/DVB/PDMS) και διάμετρο 30/50 g/mol. Αυτή η ίνα είναι ιδανική σύμφωνα με τον κατασκευαστή για αρωματικές ενώσεις, πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις με μοριακό βάρος από 40-300.

Πριν από την εκχύλιση των πτητικών οργανικών ενώσεων είναι απαραίτητο το στάδιο της προκατεργασίας και εγκλιματισμού της ίνας προκειμένου να αποφευχθούν τυχών επιμολύνσεις. Η προκατεργασία της ίνας γίνεται στο αέριο χρωματογράφο (Trace GC Ultra, Thermo Scientific- ISQ-Single QuadrupoleThermo Scientific) για μισή ώρα στους 200 °C.



Εικόνα 6.2.2 : Διαδικασία προσρόφησης αναλυτών στην ίνα.

Μετά την προκατεργασία γίνεται εισαγωγή της ίνας στο σωλήνα που περιέχει το δείγμα μέσω του αντίστοιχου διαφράγματος και εκτίθεται στον αέριο όγκο του δείγματος. Το σύστημα σφραγίζεται στο σημείο διασύνδεσης με αεροδιαπερατό φιλμ (Parafilm) για τη σφράγιση και στεγανοποίηση ώστε να ελαχιστοποιηθούν απώλειες του δείγματος. Η ίνα διατηρείται σε σταθερό ύψος κάθε φορά καθώς λαμβάνει χώρα προσρόφηση των πτητικών οργανικών ενώσεων στη στατική φάση για 30 λεπτά.

Εν συνεχεία η ίνα εισάγεται στο σύστημα έγχυσης του αέριου χρωματογράφου όπου οι προσροφημένες στην ίνα αναλύτες εκροφούνται σε θερμοκρασία 200 °C (χρόνος 30 λεπτά).

6.3 Συνθήκες ανάλυσης Αέριας Χρωματογραφίας (GC) και Φασματομετρίας Μάζας (MS)

Όσο αφορά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, αυτός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου Trace GC Ultra, Thermo Scientific με τριχοειδή στήλη RTX-5MS γενικής χρήσης που σύμφωνα με τον κατασκευαστή ενδείκνυται για ανάλυση πτητικών και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων (EPA, VOCs), ρύπων κ.α.. Η εισαγωγή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε χειροκίνητα, τοποθετώντας απευθείας την ίνα στο σημείο έγχυσης. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) (99,999%) και η ταχύτητα ροής του ήταν 2ml/λεπτό. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στατικής φάσης ήταν βαθμιδωτό ως εξής: αρχικά στους 40 °C για 2 λεπτά, εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας, 7 °C/ λεπτό έως ότου η θερμοκρασία της στήλης να φτάσει τους 200 °C. Μετά τους 200 °C συνεχίστηκε η άνοδος της θερμοκρασίας ανά 20 °C/ λεπτό έως τους 230 °C όπου και διατηρήθηκε για 3 λεπτά και με την ίδια διαβάθμιση έφτασε στους 270 °C και διατηρήθηκε

εκεί για 5 λεπτά. Η συνολική χρονική διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 37.37 λεπτά. Η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης (injector) ήταν 200 °C και του συστήματος διασύνδεσης (interface) 285 °C.

Αντίστοιχα, όσο αφορά στο φασματομέτρο μάζας, για τον σχηματισμό των ιόντων των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροιοντισμού ή πρόσκρουσης ηλεκτρονίων EI (electron impact) όπου και πραγματοποιήθηκε θετικός ιονισμός. Η τάση που εφαρμόστηκε για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων είναι 70 eV και η θερμοκρασία της πηγής ήταν στους 250 °C. Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από απλό τετραπολικό αναλυτή μαζών (ISQ - Single Quadrupole-Thermo Scientific) και η ανάλυση έγινε με τη λειτουργία της πλήρους σάρωσης, με χρόνο σάρωσης 0.5 sec. Τέλος, το εύρος περιοχής μαζών που επιλέχθηκε ήταν 35-200 amu.

6.4 Επεξεργασία φασμάτων GC-MS

Η αξιολόγηση των φασμάτων μίας μη στοχευμένης έρευνας είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω της πληθώρας των δεδομένων. Για τον λόγο αυτό είναι απαραίτητα κάποια στάδια στατιστικής επεξεργασίας προκειμένου τα αποτελέσματα να διαθέτουν επαρκή στατιστική σημαντικότητα. Χρησιμοποιήθηκαν πλατφόρμες και λογισμικά που θα αναφερθούν στη συνέχεια (π.χ. XCMS Online, SIMCA, Analyse-it Excel).

6.5 Προεπεξεργασία δεδομένων GC-MS

Η πρόκληση μίας μη στοχευμένης μεταβολομικής ανάλυσης είναι η εξαγωγή και η αξιολόγηση των τεράστιων όγκων δεδομένων που παράγονται. Προκειμένου να διευκολυνθεί η διαδικασία αυτή, διατίθενται διάφορα εργαλεία επεξεργασίας δεδομένων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ώστε να προσδιοριστεί ποια χαρακτηριστικά (components) διαφοροποιούνται μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων δειγμάτων. Έτσι για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρόγραμμα ProteoWizard 3.0.21260 64-bit για την μετατροπή των πρωτογενών (raw) δεδομένων σε μορφή mzML, που επιτρέπει την περαιτέρω επεξεργασία. Τα δεδομένα υπό μορφή mzML εισήχθησαν στη διαδικτυακή πλατφόρμα XCMS Online (διαδικτυακή έκδοση του λογισμικού XCMS), όπου έγινε ανίχνευση όλων των χαρακτηριστικών, διόρθωση του χρόνου κατακράτησης, ευθυγράμμιση, εξομάλυνση, στατιστική ανάλυση και απεικόνιση των δεδομένων. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η δημιουργία ενός πίνακα στο Excel, ο οποίος περιέχει όλα τα ανιχνεύσιμα χαρακτηριστικά αλλά και τα δεδομένα που αντιστοιχούν στο κάθε χαρακτηριστικό (όπως μάζα m/z, χρόνος κατακράτησης, το στατιστικό στοιχείο p-value κ.λ.π.). Η διόρθωση του πίνακα για τυχόν κενές καταχωρίσεις (missing value estimation) γίνεται με τη βοήθεια του MetaboAnalyst 5.0. Ύστερα, ο νέος πίνακας εισάγεται στο πρόγραμμα SIMCA που παρέχει μια ποικιλία μεθόδων ανάλυσης όπως την επεξεργασία μεταβολικών δεδομένων, την ομαλοποίηση και την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση.

6.6 Στατιστική επεξεργασία

Τα δεδομένα που λαμβάνονται μετά από την προεπεξεργασία, είναι πολύπλοκα και πρέπει να κατανεμηθούν προκειμένου να διαχωριστούν οι δύο ομάδες. Έτσι τα δεδομένα αυτά

υπόκεινται σε πολυδιάστατη ανάλυση. Ο στόχος της πολυδιάστατης ανάλυσης δεδομένων είναι να προσδιοριστούν όλες οι παραλλαγές της μελέτης των δεδομένων του πίνακα. Στόχος των χημειομετρικών εργαλείων είναι η αναζήτηση της κατάλληλης συσχέτισης μεταξύ των δειγμάτων και των μεταβλητών επί ενός συνόλου δεδομένων και η μετατροπή τους σε νέες λανθάνουσες μεταβλητές. Κατ' επέκταση χρησιμοποιήθηκαν, η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), η μερική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA) και η ορθογώνια μερική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA). Πρέπει να σημειωθεί ότι, δεδομένου ότι η PCA δεν χρησιμοποιεί καμία ταξινόμηση των δεδομένων για να βρει τα κύρια συστατικά, είναι μια μη επιβλεπόμενη μέθοδος ενώ η PLS-DA και η OPLS-DA, είναι επιβλεπόμενες μέθοδοι, όπου ορίζονται οι ομάδες των δεδομένων.[117]

6.6.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA)

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο εργαλείο στη χημειομετρική ανάλυση, είναι η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA). Μπορεί να θεωρηθεί ως η βάση για άλλες πολυμεταβλητές μεθόδους, και αποτελεί σημαντικό εργαλείο εξερεύνησης στη μεταβολομική ανάλυση.

Η κεντρική ιδέα της PCA είναι να μειωθεί η διάσταση ενός συνόλου δεδομένων που αποτελείται από μεγάλο αριθμό αλληλένδετων μεταβλητών, διατηρώντας παράλληλα όσο το δυνατόν περισσότερο τη διακύμανση που υπάρχει στο σύνολο των δεδομένων. Πρόκειται για γραμμικούς συνδυασμούς των αρχικών μεταβλητών, με την πρώτη κύρια συνιστώσα να εκφράζει τη μεγαλύτερη διακύμανση, η δεύτερη συνιστώσα τη δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση και ούτω καθεξής. Έτσι, είναι δυνατή η επιλογή ορισμένων σημαντικών συνιστωσών, έτσι ώστε να μειωθεί η διάσταση των δεδομένων. Η PCA είναι μια μη εποπτευόμενη μέθοδος, δεδομένου ότι δεν περιέχει υποθέσεις σχετικά με τα δεδομένα. Χρησιμοποιείται ως εργαλείο απεικόνισης και εξερεύνησης στην αρχή οποιασδήποτε ανάλυσης, προκειμένου να εντοπιστούν τάσεις, ομάδες και ακραίες τιμές. Επιτρέπει την απλούστερη απεικόνιση, αντιπροσωπεύοντας τη διακύμανση σε μικρό αριθμό μη συσχετισμένων λανθάνουσων μεταβλητών, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να γίνουν κατανοητές ως πληροφορίες ή τυχαίες αλλαγές.

Η γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων (scores plot) παρέχει τη δυνατότητα οπτικοποίησης των δεδομένων όπου κάθε σημείο του διαγράμματος αντιπροσωπεύει και ένα δείγμα. Μέσω του scores plot μπορεί να παρατηρηθεί τυχόν διαχωρισμός των ομάδων αλλά και η παρουσία αποκλινοσών ή έκτροπων τιμών (outliers). Ο τρόπος με τον οποίο οι αρχικές μεταβλητές συνδυάζονται γραμμικά προς σχηματισμό νέων μεταβλητών οπτικοποιείται από τα γραφήματα (loadings)[118].

Πριν από τη στατιστική επεξεργασία είναι απαραίτητη η προσαρμογή της κλίμακας των δεδομένων (scaling) προκειμένου κάθε μεταβλητή να έχει την ίδια συνεισφορά στο μοντέλο που προκύπτει. Οι πιο συχνοί τρόποι scaling είναι το Unit Variance (UV) και το Pareto (Par). Με βάση το UV scaling κάθε μεταβλητή πολλαπλασιάζεται με το $1/sdj$ όπου το sd αντιστοιχεί στην τυπική απόκλιση (standard deviation) της μεταβλητής υπολογιζόμενη γύρω από τη μέση τιμή με αποτέλεσμα οι κορυφές υψηλής έντασης να συρρικνώνονται και οι κορυφές χαμηλής έντασης να ενισχύονται με σκοπό να συνεισφέρουν στο μοντέλο με τον ίδιο τρόπο. Κατά τη χρήση του Pareto scaling αντί της τυπικής απόκλισης, η τετραγωνική ρίζα της τυπικής απόκλισης χρησιμοποιείται ως συντελεστής κλιμάκωσης $1/(sdj)^{1/2}$. Μετά από την επιλογή της κλίμακας και την εξαγωγή του στατιστικού μοντέλου είναι απαραίτητος ο έλεγχος του με βάση κάποιες διαγνωστικές παραμέτρους. Αυτές οι παράμετροι είναι το Hotelling's T^2 που δείχνει τις έκτροπες τιμές που εμφανίζονται στο scores plot και έχουν αντίκτυπο στο μοντέλο, το R^2X που εκφράζει το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X

που ερμηνεύεται από τη συγκεκριμένη κύρια συνιστώσα και το Q^2 που είναι ο συντελεστής συσχέτισης που εκφράζει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης των μεταβλητών X που προβλέπεται για όλες τις συνιστώσες. Το συνολικό Q^2 για όλες τις εξαχθείσες συνιστώσες δείχνει την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου (goodness of prediction).[119]

Τα R^2X και Q^2 εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά όσο αυξάνεται ο αριθμός των συνιστωσών. Το R^2 κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0 και 1, με το 0 να δείχνει αδυναμία προσαρμογής και το 1 αντίστοιχα, μια τέλεια προσαρμογή. Η βέλτιστη τιμή της προβλεπτικής ικανότητας Q^2 είναι 1. Το R^2 τείνει στη τιμή 1 όσο αυξάνεται ο αριθμός των κύριων συνιστωσών ακολουθώντας μία καμπύλη υπερβολής, ενώ το Q^2 ακολουθεί μία παραβολική σχέση και συνήθως εμφανίζει μέγιστη τιμή στις δύο ή τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες και έπειτα με κάθε προσθήκη συνιστωσών μειώνεται.[119]

6.6.2 Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)

Η τεχνική PLS θεωρείται επέκταση της PCA. Μέσω της PLS προβάλλεται η σχέση μεταξύ της μήτρας δεδομένων X που περιέχει τις παρατηρήσεις mz_Rt σε κάθε δείγμα, και της μήτρας Y που περιέχει πληροφορίες σχετικές με τα χαρακτηριστικά των δειγμάτων όπως ηλικία, ύψος, ομαδοποίηση, κλινικά δεδομένα. Η PCA προβάλλει τη μέγιστη διαφοροποίηση που υπάρχει στη μήτρα X , ενώ η τεχνική PLS προβάλλει τη μέγιστη συνδιακύμανση (covariance) μεταξύ X και Y . [120] Η PLS-DA χρησιμοποιείται ευρέως στην μεταβολομική ανάλυση αλλά και σε άλλες οπτικές τεχνολογίες, καθώς τα σύνολα των δεδομένων χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό χαρακτηριστικών, θόρυβο και εκλιπόντες τιμές. Τέτοιου είδους δεδομένα συνήθως έχουν λιγότερα δείγματα από ότι χαρακτηριστικά. Η αξιοπιστία του μοντέλου αξιολογείται από την περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου που αποτυπώνονται από τις τιμές R^2 και Q^2 .

6.6.3 Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS-DA)

Η Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (orthogonal Partial Least Squares Discriminant-Analysis, OPLS-DA), θεσπίστηκε ως βελτίωση της προσέγγισης PLS-DA για τη διάκριση δύο ή περισσότερων ομάδων (κλάσεων) με τη χρήση πολυδιάστατων δεδομένων. Στην OPLS-DA, κατασκευάζεται ένα μοντέλο παλινδρόμησης μεταξύ των πολύπλοκων δεδομένων και μιας μεταβλητής απόκρισης που περιέχει μόνο πληροφορίες για τις ομάδες. Το προφανές πλεονέκτημα της OPLS-DA σε σύγκριση με την PLS-DA είναι ότι ένα μόνο συστατικό χρησιμεύει ως προγνωστικός παράγοντας για την κατηγοριοποίηση, ενώ τα άλλα συστατικά περιγράφουν την ορθογώνια διακύμανση στο πρώτο κύριο συστατικό. Έτσι η OPLS-DA παρέχει καλύτερη ερμηνεία των σχετικών μεταβλητών από την PLS-DA.

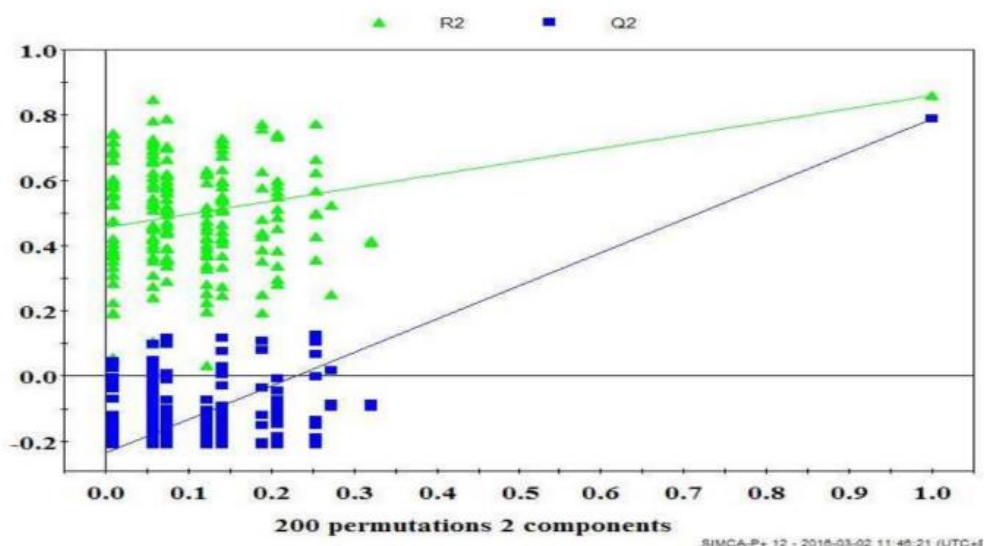
Η OPLS-DA μπορεί να διαχωρίσει την συστηματική διακύμανση της μεταβλητής X σε δύο τμήματα: 1) αυτό που σχετίζεται γραμμικά με το Y και 2) αυτό που σχετίζεται ορθογώνια με το Y και στην συνέχεια δημιουργείται μια γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων, ένα score plot, που παρουσιάζει την συνεισφορά κάθε μεταβλητής στον διαχωρισμό των ομάδων. Έτσι γίνεται διαχωρισμός της προγνωστικής διακύμανσης από την μη προγνωστική (ορθογώνια) διακύμανση, όπου τα πρώτα συστατικά που σχετίζονται ορθογώνια προς την εξαρτημένη μεταβλητή αφαιρούνται από τα δεδομένα και ελαχιστοποιείται ο θόρυβος που οφείλεται σε μη συσχετιζόμενες μεταβλητές.

Τα Q^2 και R^2 υποδεικνύουν την ευρωστία του μοντέλου. Το R^2 ορίζεται ως κλάσμα της διακύμανσης που εξηγείται από ένα στοιχείο. Η διασταυρούμενη επικύρωση του R^2 δίνει το Q^2 , το οποίο αντιπροσωπεύει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που προβλέπεται από ένα στοιχείο. Έτσι, το R^2 υποδεικνύει πόσο καλά εξηγείται η διακύμανση μιας μεταβλητής και το Q^2 πόσο καλά μια μεταβλητή θα μπορούσε να προβλεφθεί και να εκτιμηθεί με διασταυρούμενη επικύρωση (δηλαδή με την ακρίβεια της πρόβλεψης). Οι μεταβολίτες που είναι καλά μοντελοποιημένοι εμφανίζουν τιμές R^2 και $Q^2 > 0,5$. Η μέθοδος της OPLS-DA είναι ιδανική για την κατηγοριοποίηση των δεδομένων που έχουν πολύπλοκες μεταβλητές όπως τα δεδομένα των βιολογικών δειγμάτων.[121]

6.6.4 Επικύρωση των μοντέλων PLS-DA

Μετά την εφαρμογή των μοντέλων PLS-DA είναι απαραίτητη η επικύρωσή τους γι' αυτό πραγματοποιείται η διαδικασία τυχαίων μεταθέσεων ή συνδυασμών (permutation test). Το permutation test υποθέτει ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των ομάδων και τυχαία πραγματοποιεί μετατροπή των μεταβλητών y , συγκρίνοντας τις τιμές R^2Y και Q^2Y του αρχικού μοντέλου με εκείνες του επαναδιατεταγμένου μοντέλου, το οποίο δημιουργήθηκε μετά την μετατροπή των y μεταβλητών ως τυχαίες. Η ποιότητα των πραγματικών μοντέλων αξιολογήθηκε με τις παραμέτρους R^2 και Q^2 . Το διάγραμμα που προκύπτει δίνει τη σχετική διακύμανση R^2 , τη προβλεπτική ικανότητα της επικύρωσης του μοντέλου Q^2 και το βαθμό συσχέτισης μεταξύ των τυχαίων και των πραγματικών μοντέλων (correlation).

Για να θεωρηθεί ένα μοντέλο αξιόπιστο αρκεί οι τυχαίες τιμές της προβλεπτικής ικανότητας Q^2 να είναι μικρότερες από αυτές του πραγματικού μοντέλου ή έστω η ευθεία που αντιστοιχεί στο Q^2 να τέμνει τον κάθετο άξονα σε μία αρνητική τιμή και όλες οι τιμές R^2 προς τα αριστερά να είναι χαμηλότερες από το αρχικό σημείο στα δεξιά.[122]



Εικόνα 6.6.4: Διάγραμμα επικύρωσης μοντέλου PLS-DA

6.6.5 Επιλογή χαρακτηριστικών που οφείλονται για το διαχωρισμό

Μετά τη στατιστική επεξεργασία είναι απαραίτητη η διάκριση των χαρακτηριστικών στα οποία οφείλεται ο διαχωρισμός. Για το λόγο αυτό είναι σημαντικό το διάγραμμα Σπουδαιότητας Μεταβλητών στην Προβολή (Variable Importance in the Projection, VIP).

Τα αποτελέσματα στο διάγραμμα VIP ταξινομούνται σε φθίνουσα σειρά ανάλογα με τη συμβολή τους στον διαχωρισμό. Ο μέσος όρος των τετραγωνικών τιμών των VIP είναι ίσος με 1, οπότε μεταβλητή με τιμή VIP μεγαλύτερη από 1 χρησιμοποιείται συχνά ως σημείο διάκρισης για την επιλογή των σημαντικών μεταβλητών. Επιλέγονται μεταβλητές με τιμή βαθμολογίας VIP μεγαλύτερη από 1.

Η επιλογή των σημαντικών για τη διαφοροποίηση χαρακτηριστικών μπορεί να γίνει και από το διάγραμμα s-plot στο οποίο τα χαρακτηριστικά ταξινομούνται σε ένα ορθοκανονικό σύστημα αξόνων. Τα χαρακτηριστικά που απομακρύνονται από τους δύο κάθετους άξονες θεωρούνται σημαντικά για τη διαφοροποίηση.

Το t-test είναι το τελευταίο βήμα για τη διάκριση των χαρακτηριστικών που διαφοροποιούνται μεταξύ δύο πληθυσμών, όπου ένα χαρακτηριστικό θεωρείται σημαντικό όταν η τιμή p-value είναι μικρότερη από τη τιμή 0.05 (διάστημα εμπιστοσύνης 95%)[10].

6.6.6 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών

Η μεταβολομική εφαρμόζεται όλο και περισσότερο για τον εντοπισμό βιολογικών δεικτών που θα χρησιμεύσουν στην διάγνωση, την πρόγνωση και την πρόβλεψη των κινδύνων για πολλές ασθένειες. Ο βιοδείκτης είναι μία ένωση η οποία έχει άμεση σχέση με την παθοφυσιολογία ενός οργανισμού και οι μετρήσεις του πρέπει να είναι επαναλήψιμες. Ο λόγος που είναι απαραίτητη η εύρεση βιοδεικτών, είναι η δημιουργία ενός μοντέλου το οποίο θα διακρίνει συγκεκριμένες ομάδες με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ευαισθησία. Η αξιολόγηση και η επικύρωση των πιθανών βιοδεικτών γίνεται με την καμπύλη AUC-ROC (Area Under Curve-Receiver Operating Characteristic curve), η οποία εκφράζει την αξιοπιστία τους. Μια καμπύλη ROC δείχνει πώς μεταβάλλεται η ευαισθησία και η εξειδίκευση του βιοδείκτη και ο δείκτης AUC (Area Under Curve) χρησιμοποιείται ως μέτρο του διαχωρισμού. Δηλώνει πόσο ικανό είναι το μοντέλο να διακρίνει τις κατηγορίες. Όσο υψηλότερη είναι η τιμή του δείκτη AUC τόσο καλύτερα ανταποκρίνεται το μοντέλο στην πρόβλεψη των κατηγοριών δηλαδή να προβλέπει την κατηγορία 0 ως 0 και την κατηγορία 1 ως 1. Κατ' αναλογία όσο υψηλότερη είναι η τιμή του AUC, τόσο καλύτερο είναι το μοντέλο στην διάκριση μεταξύ των κατηγοριών.[123]

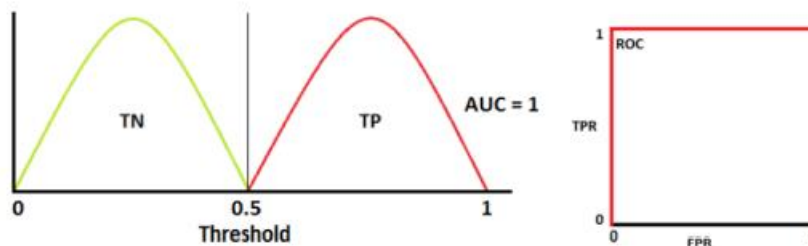
Η καμπύλη ROC σχεδιάζεται έχοντας ως άξονα y, TPR (True Positive Rate) και ως άξονα x, FPR (False Positive Rate). Η προσέγγιση για την εκτίμηση των μετρήσεων που γίνονται για έναν βιοδείκτη είναι η εξέταση της συχνότητας με την οποία η δεδομένη μέτρηση δίνει αποτελέσματα: TP (True Positive) αληθώς θετικά, TN (True Negative) αληθώς αρνητικά, FP (False Positive) ψευδώς θετικά και FN (False Negative) ψευδώς αρνητικά. Στη συνέχεια συνοψίζονται αυτές οι τιμές στην αναλογία των πραγματικών θετικών που ταξινομούνται σωστά ως θετικά (ευαισθησία) και στην αναλογία των πραγματικών αρνητικών που ταξινομούνται σωστά ως αρνητικά (εξειδίκευση).[123]

Οι ορισμοί των TP, TN, FP και FN και η ευαισθησία (Sn) και η ειδικότητα (Sp) ορίζονται μαθηματικά ως:

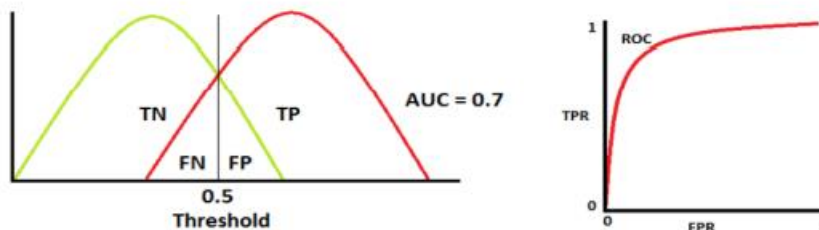
$$Sn = TP/(TP+FN)$$

$$SP = TN/(TN+FP)$$

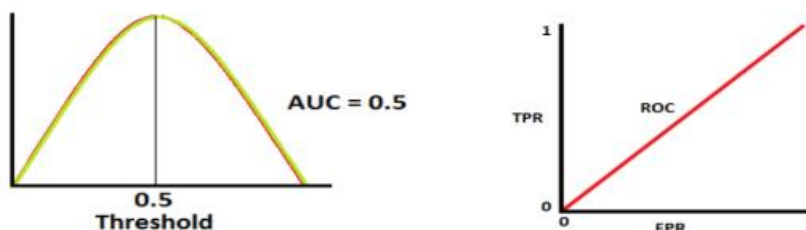
Ένα εξαιρετικό μοντέλο εμφανίζει τιμή AUC κοντά στο 1 που σημαίνει ότι έχει ένα καλό μέτρο διαχωρισμού. Ένα φτωχό μοντέλο έχει AUC κοντά στο 0 που σημαίνει ότι έχει το χειρότερο μέτρο διαχωρισμού. Όταν το AUC λαμβάνει τιμή ίση με 0,5, σημαίνει ότι το μοντέλο δεν έχει καμία ικανότητα διαχωρισμού μεταξύ των κατηγοριών.



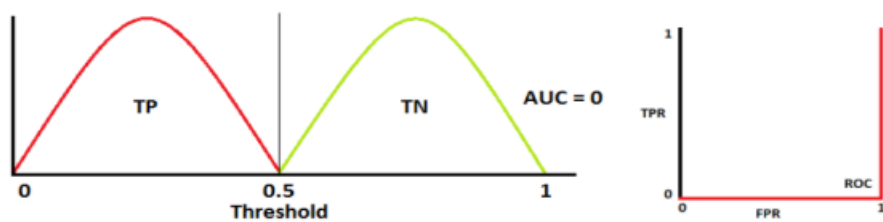
Αυτή είναι μια ιδανική κατάσταση. Όταν δύο καμπύλες δεν αλληλεπικαλύπτονται καθόλου σημαίνει ότι το μοντέλο έχει ένα ιδανικό μέτρο διαχωρισμού. Είναι απόλυτα σε θέση να διακρίνει μεταξύ θετικής τάξης και αρνητικής τάξης.[124]



Όταν δύο κατηγορίες αλληλεπικαλύπτονται, εισάγονται σφάλματα τύπου 1 και τύπου 2. Όταν το AUC είναι 0,7, αυτό σημαίνει ότι υπάρχει 70% πιθανότητα ότι το μοντέλο θα είναι σε θέση να διακρίνει μεταξύ θετικής κατηγορίας και αρνητικής κατηγορίας.[124]



Όταν το AUC είναι περίπου 0,5, το μοντέλο δεν έχει καμία ικανότητα διάκρισης για να διακρίνει μεταξύ θετικής κατηγορίας και αρνητικής κατηγορίας.[124]



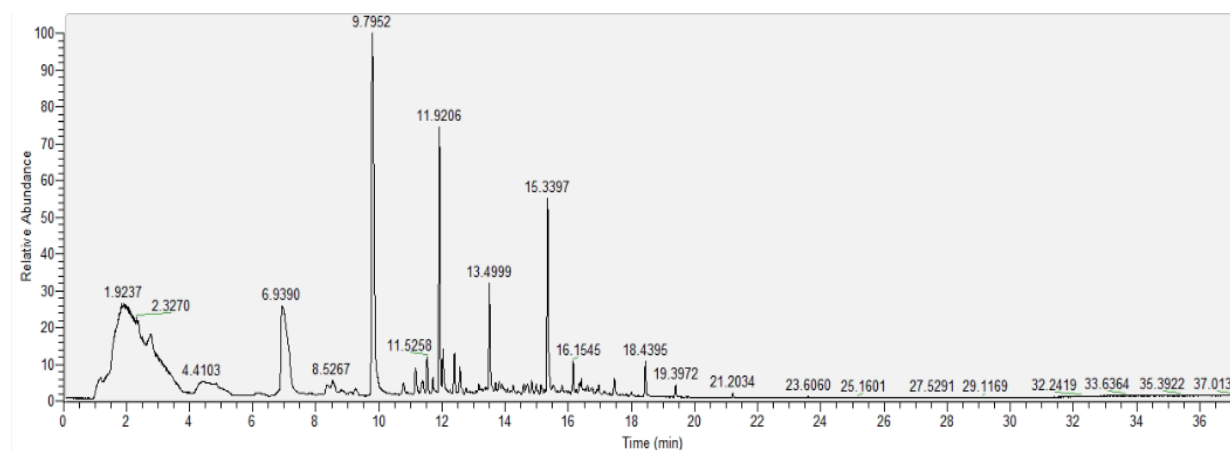
Όταν το AUC είναι περίπου 0, το μοντέλο στην πραγματικότητα μπερδεύει τις κατηγορίες. Σημαίνει ότι το μοντέλο προβλέπει μια αρνητική κατηγορία ως θετική κατηγορία και αντίστροφα.[124]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

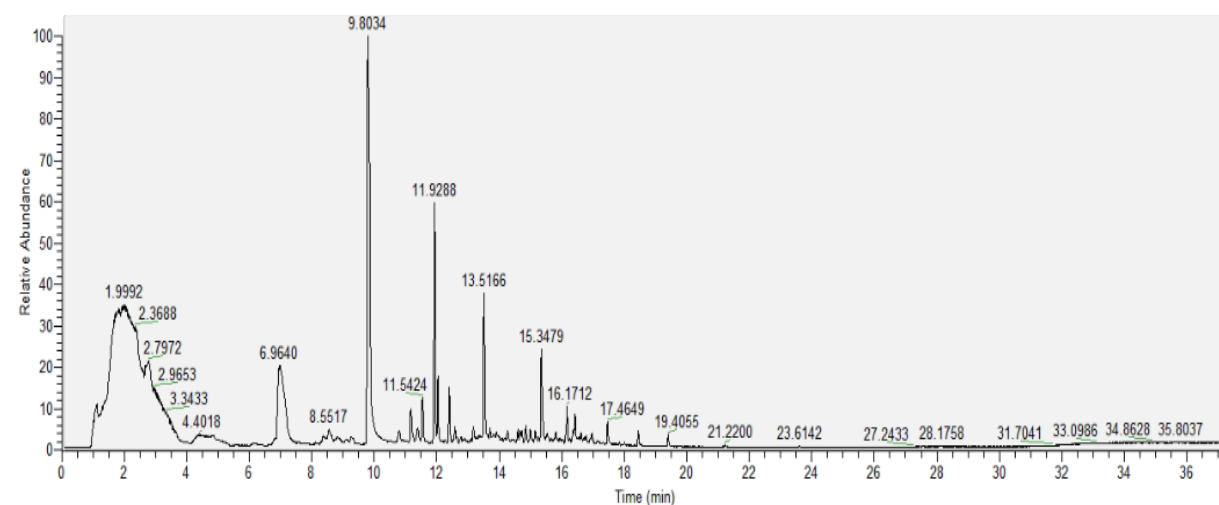
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Λόγω της πολυπλοκότητας των πρωτογενών δεδομένων (μεγάλος αριθμός ενώσεων σε κάθε δείγμα με πολλαπλάσιο αριθμό θραυσμάτων m/z) η διερεύνηση πιθανών μεταβολιτών όπως συζητήθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο αποτελεί ένα δύσκολο εγχείρημα. Για τον λόγο αυτό εφαρμόστηκε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με τη χρήση χημειομετρικών εργαλείων. Υπενθυμίζεται ότι στόχος της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η σύγκριση των φασματικών δεδομένων δύο ομάδων, ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα και υγιών ανθρώπων, προκειμένου να ταυτοποιηθούν πιθανοί μεταβολίτες που διαφοροποιούν τις δύο αυτές κατηγορίες.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά τα χρωματογραφήματα ενός ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα και ενός υγιή (Σχήμα 7).



Σχήμα 7α : Χρωματογράφημα GC-MS ενός ασθενούς με καρκίνο του πνεύμονα



Σχήμα 7β: Χρωματογράφημα GC-MS ενός υγιούς ατόμου

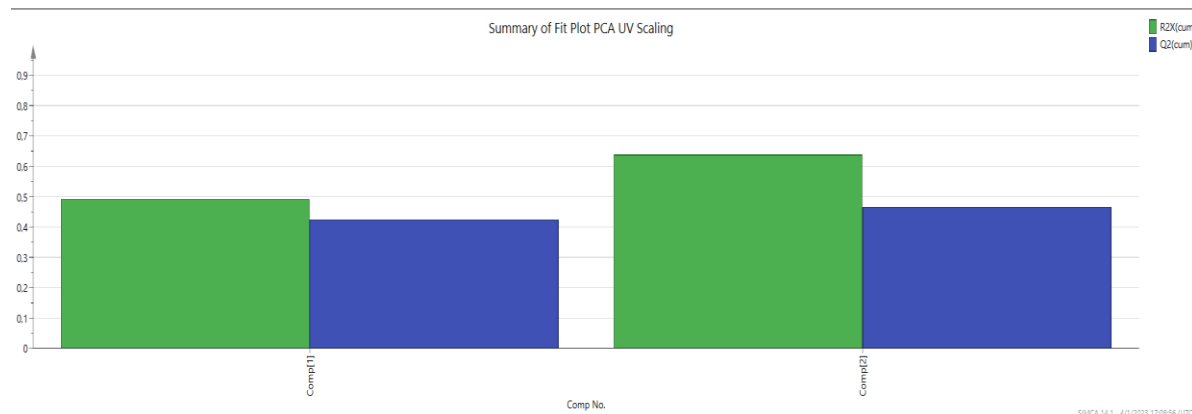
7.1 Στατιστική επεξεργασία των πρωτογενών δεδομένων (GC/MS)

Τα πρωτογενή δεδομένα που προέκυψαν μετά τη διαδικασία της αεριοχρωματογραφικής ανάλυσης (raw data) μετατράπηκαν με την βοήθεια του προγράμματος ProteoWizard σε κατάλληλο τύπο αρχείου (MzML). Τα δεδομένα πλέον με μορφή MzML προκειμένου να διαχωριστούν και να κανονικοποιηθούν, φορτώθηκαν στην διαδικτυακή πλατφόρμα XCMS Online. Μετά την επεξεργασία δημιουργήθηκε ένας πίνακας δεδομένων στον οποίο εφαρμόστηκε στατιστική ανάλυση με το λογισμικό SIMCA.

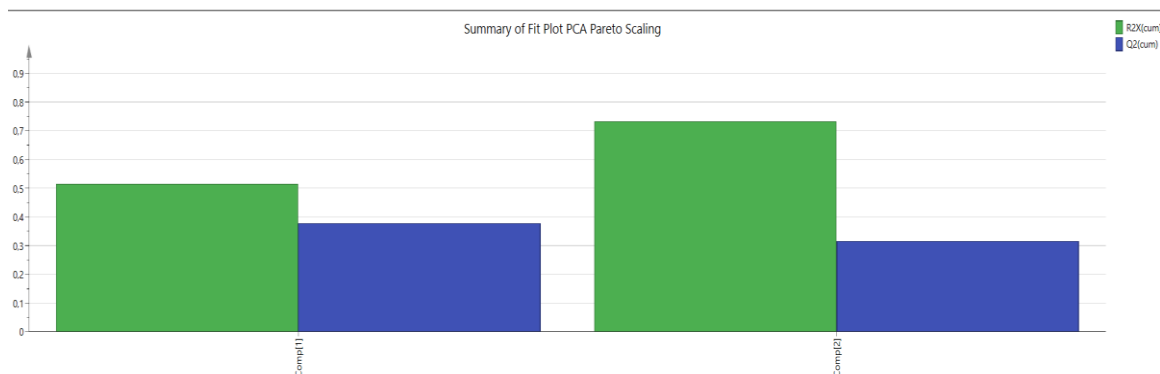
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (PCA & PLS-DA) πραγματοποιήθηκε σε δύο κλίμακες, την κλίμακα UV και την κλίμακα Pareto. Στη συνέχεια κατά την PLS-DA και αφού ληφθεί το permutation test και για τις δύο κλίμακες, θα διακρίνουμε ποια από τις δύο παρέχει καλύτερη περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα στο μοντέλο. Αφού επιλεγεί η κατάλληλη κλίμακα ακολουθεί στατιστική ανάλυση όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο αναλυτικά (OPLS-DA, S-Plot, VIP-Plot). Ακολουθεί η πορεία επεξεργασίας των δεδομένων για την διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων, ασθενών και υγιών που μπορεί να οδηγήσει σε ταυτοποίηση πιθανών μεταβολιτών ή βιοδεικτών μεταξύ των δύο ομάδων.

Summary of Fit Plot PCA

Το μέγεθος της μπάρας R^2 δηλώνει το πόσο καλά το μοντέλο μας ταιριάζει με τα δεδομένα μας, ενώ το μέγεθος της μπάρας Q^2 δηλώνει το πόσο καλά μπορεί το μοντέλο να προβλέψει νέα δεδομένα.



Εικόνα 7.1: Summary of Fit Plot PCA **UV Scaling** που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca. Το πρόγραμμα SIMCA για κάθε στοιχείο του μοντέλου εμφανίζει 2 μπάρες (R^2 , Q^2).



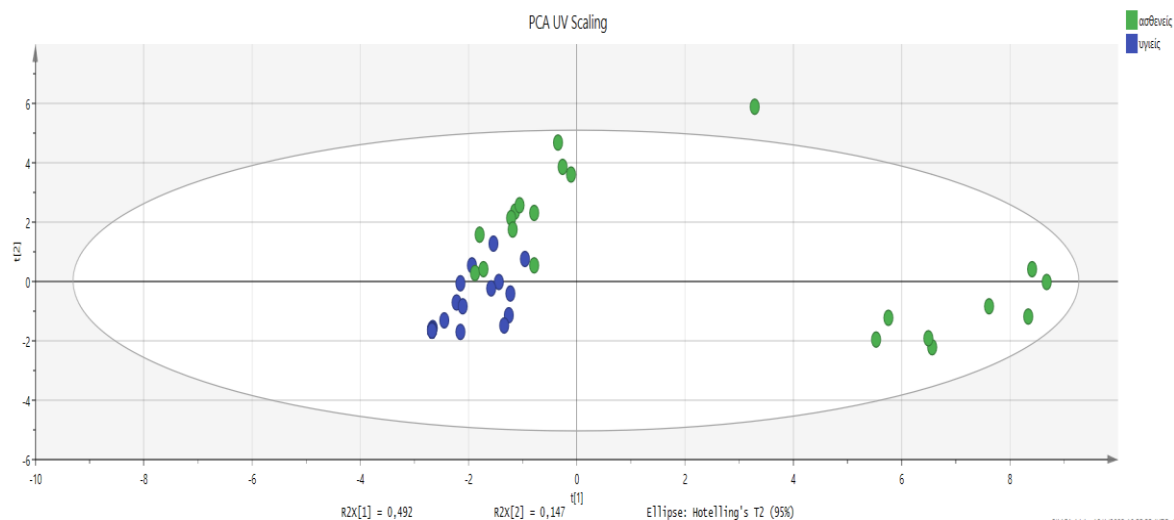
Εικόνα 7.1.1: Summary of Fit Plot PCA **Pareto Scaling**, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca. Το πρόγραμμα SIMCA για κάθε στοιχείο του μοντέλου εμφανίζει 2 μπάρες (R^2 , Q^2).

Στο γράφημά της PCA σε κλίμακα UV, οι μπάρες R^2 είναι αρκετά κοντά στο 0,5 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο προσαρμόζεται ικανοποιητικά με τα δεδομένα. Αντίστοιχα, στο γράφημά της PCA σε κλίμακα Pareto, οι μπάρες R^2 είναι μεγαλύτερες από 0,5 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο προσαρμόζεται καλύτερα. Σε ότι αφορά την προβλεψιμότητα τόσο η κλίμακα UV όσο και η Pareto εμφανίζουν τιμές Q^2 μικρότερες του 0,5 υποδηλώνοντας ικανοποιητική προβλεψιμότητα και για τα 2 στοιχεία.

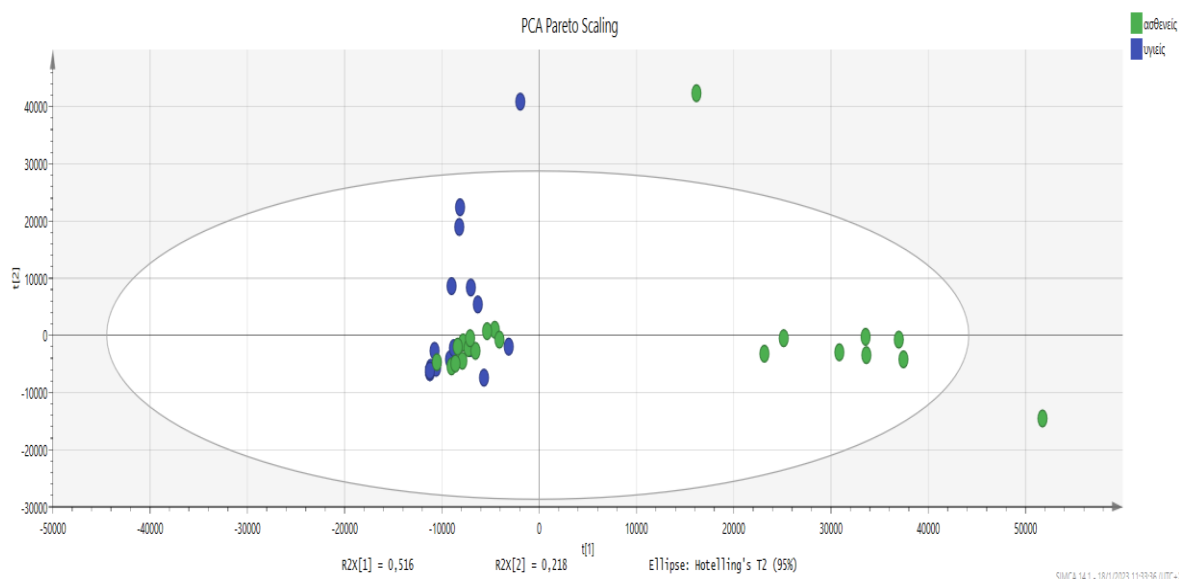
Διάγραμμα PCA

Το διάγραμμα PCA (Principal Component Analysis) είναι ένα παράθυρο στο χώρο X, που εμφανίζει τον τρόπο με τον οποίο βρίσκονται οι παρατηρήσεις X σε σχέση μεταξύ τους. Αυτή η πλοκή δείχνει την πιθανή παρουσία ακραίων τιμών, ομάδων, ομοιοτήτων και άλλων μοτίβων στα δεδομένα. Το διάγραμμα PCA αποτελεί απλά έναν χάρτη των παρατηρήσεων X.

Το πρόγραμμα SIMCA σχεδιάζει την έλλειψη ανοχής, η οποία δηλώνει ότι οι παρατηρήσεις που βρίσκονται πολύ έξω από αυτήν είναι πιθανό να είναι ακραίες τιμές. Ωστόσο αυτό θα επιβεβαιωθεί στο διάγραμμα PLS-DA. Αν οι παρατηρήσεις αυτές συνεχίσουν να βρίσκονται εκτός της έλλειψης ανοχής θα πρέπει να αφαιρεθούν καθώς υποδηλώνουν θόρυβο και αλλοιώνουν το αποτέλεσμα της στατιστικής ανάλυσης.



Εικόνα 7.1.2: Διάγραμμα PCA σε **κλίμακα UV**, για τα δείγματα, ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (a group-πράσινο χρώμα) και υγιών (b group-μπλε χρώμα) που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

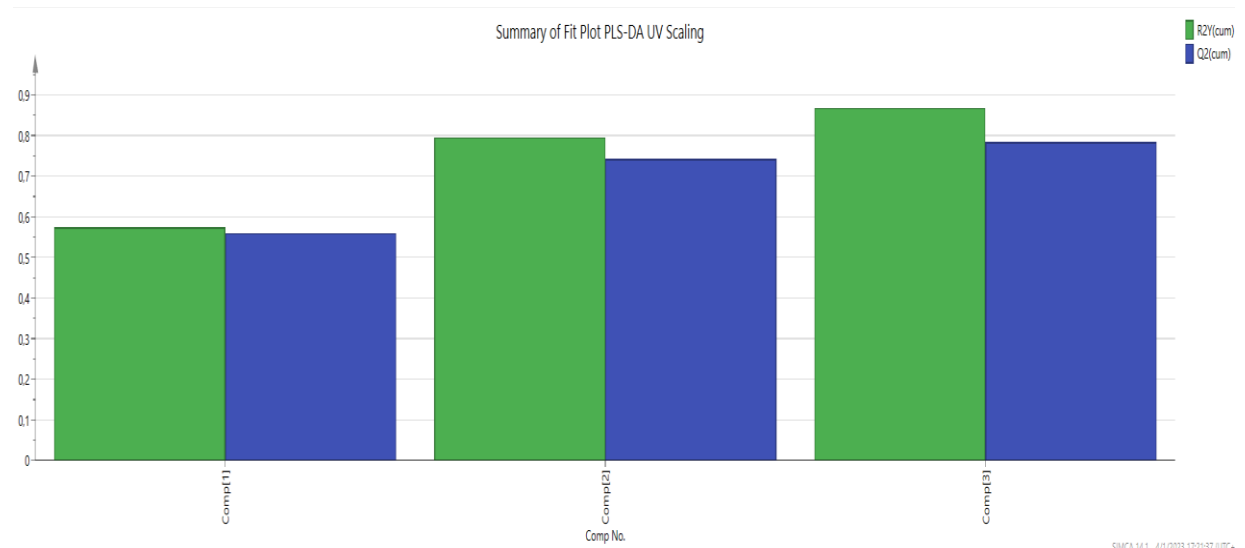


Εικόνα 7.1.4 : Διάγραμμα PCA σε **κλίμακα Pareto** , για τα δείγματα, ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (πράσινο χρώμα) και υγιών (μπλε χρώμα) που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

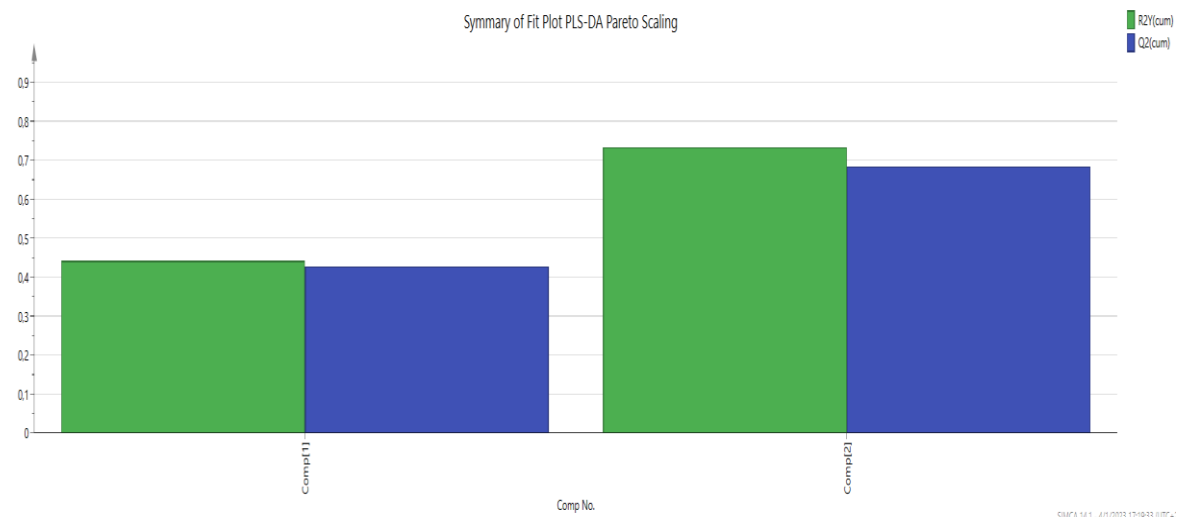
Παρατηρείται ότι τόσο στην PCA σε κλίμακα UV όσο και στην PCA σε κλίμακα Pareto δεν υπάρχει διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων (ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα – υγιείς). Συνεπώς η PCA αποτελώντας μια μη επιβλεπόμενη μέθοδος δεν είναι ικανή να διαχωρίσει τις ομάδες μέσω της προβολής των παρατηρήσεων σε 2 διαστάσεις (2D).

Κρίθηκε στη συνέχεια σκόπιμο να διερευνηθεί η επιβλεπόμενη μέθοδος της PLS-DA, τόσο για την κλίμακα UV όσο και για την Pareto, στην οποία υπήρξε διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων δειγμάτων, ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και σε υγιείς.

Summary of Fit Plot PLS-DA



Εικόνα 7.1.5: Summary of Fit Plot PLS-DA **UV Scaling**, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.. Το πρόγραμμα SIMCA για κάθε στοιχείο του μοντέλου εμφανίζει 3 μπάρες (R^2 , Q^2).



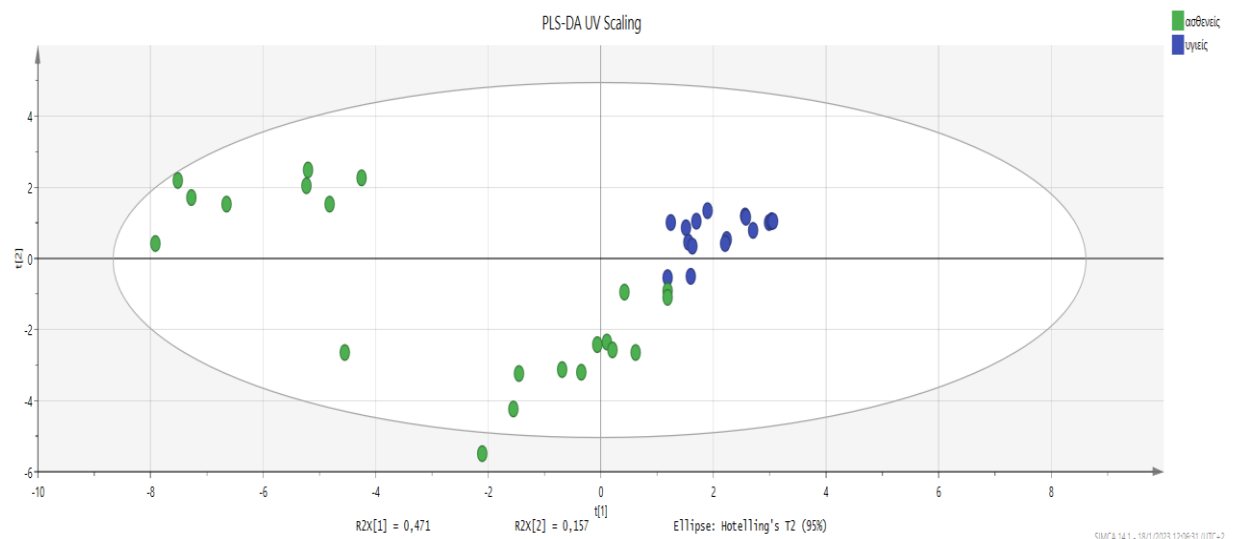
Εικόνα 7.1.6: Summary of Fit Plot PLS-DA **Pareto Scaling**, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca. Το πρόγραμμα SIMCA για κάθε στοιχείο του μοντέλου εμφανίζει 2 μπάρες (R^2 , Q^2).

Στο γράφημά της PLS-DA σε κλίμακα UV, οι μπάρες R^2 πλησιάζουν το 1 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο προσαρμόζεται πάρα πολύ καλά με τα δεδομένα. Αντίθετα, στο γράφημά της PLS-DA σε κλίμακα Pareto, μόνο 1 ράβδος R^2 είναι πάνω από το 0,5 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο αυτό δεν προσαρμόζεται ικανοποιητικά. Ακόμα, το γράφημα της PLS-DA σε κλίμακα UV φαίνεται ότι έχει ικανοποιητική προβλεψιμότητα καθώς, και οι 3 μπάρες Q^2 λαμβάνουν

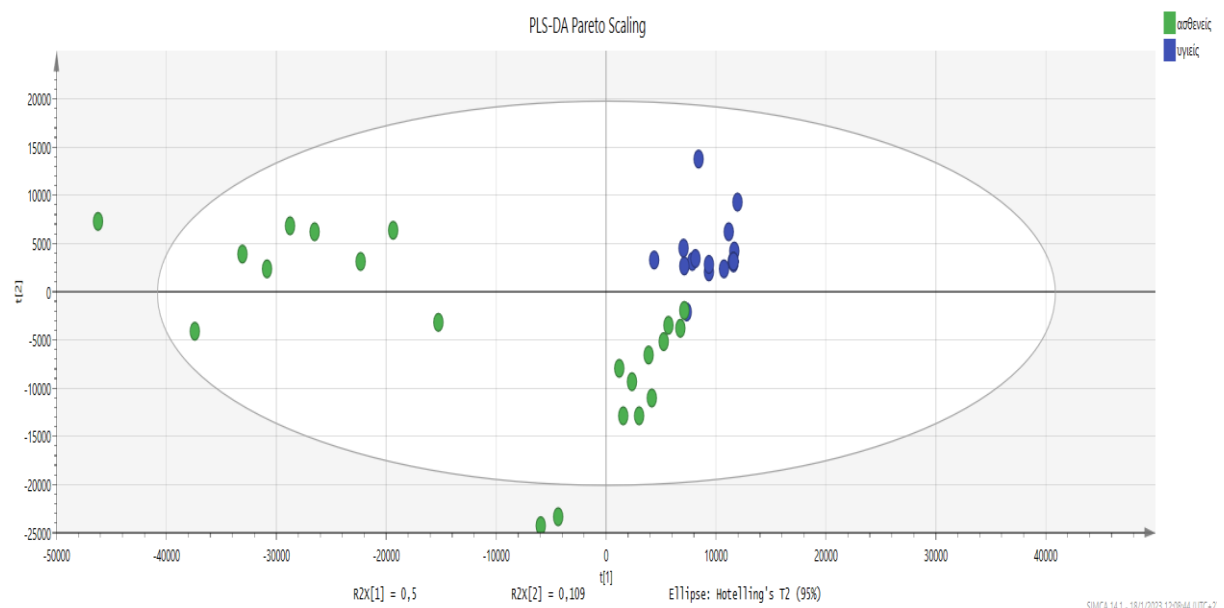
τιμές μεγαλύτερες του 0,5. Αντίθετα το γράφημά της PLS-DA σε κλίμακα Pareto, φαίνεται να μην εμφανίζει ικανοποιητική προβλεψιμότητα, καθώς οι τιμές Q^2 είναι χαμηλότερες.

Διαγράμματα PLS-DA

Ακολουθούν τα αντίστοιχα γραφήματα κατόπιν επεξεργασίας με τη μέθοδο της PLS-DA στις δύο κλίμακες.



Εικόνα 7.1.7: Διάγραμμα PLS-DA σε **κλίμακα UV**, για τα δείγματα, ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (a group-πράσινο χρώμα) και υγιών (b group-μπλε χρώμα) που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.



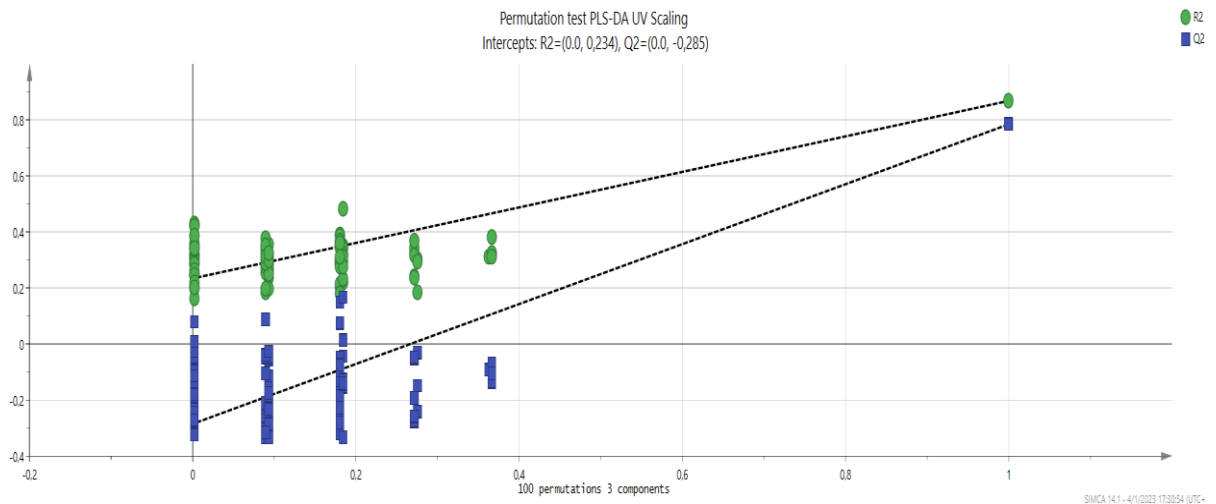
Εικόνα 7.1.8: Διάγραμμα PLS-DA σε **κλίμακα Pareto**, για τα δείγματα, ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (a group-πράσινο χρώμα) και υγιών (b group-μπλε χρώμα) που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Παρατηρούμε ότι στην PLS-DA σε κλίμακα UV, τα δείγματα των ασθενών διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά, καθώς πριν την εφαρμογή της PLS-DA ορίστηκαν οι 2 ομάδες. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την PLS-DA σε κλίμακα Pareto, όμως οι πλυθισμοί δεν διαχωρίστηκαν ικανοποιητικά με την εφαρμογή αυτού του μοντέλου. Ήδη από τις PLS-DA γίνεται αντιληπτό ποιο μοντέλο ανταποκρίνεται καλύτερα στα δεδομένα μας. Κατ' επέκταση για να συνεχιστεί η στατιστική επεξεργασία είναι απαραίτητο να γίνει η επιλογή του πιο αξιόπιστου μοντέλου. Η δοκιμασία για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA που χρησιμοποιείται είναι η αυτή των τυχαίων μεταθέσεων (Permutation test) με την χρήση του προγράμματος SIMCA. Στη δοκιμασία αυτή σχηματίζονται νέα τυχαία μοντέλα με τυχαίες αλλαγές με στόχο τη σύγκριση της περιγραφικής και της προβλεπτικής ικανότητας του πραγματικού μοντέλου με αυτές των τυχαίων μοντέλων που προκύπτουν. Το Permutation test έγινε και για τα δύο μοντέλα PLS-DA που προέκυψαν (UV και Pareto) με την πραγματοποίηση 100 τυχαίων αλλαγών.

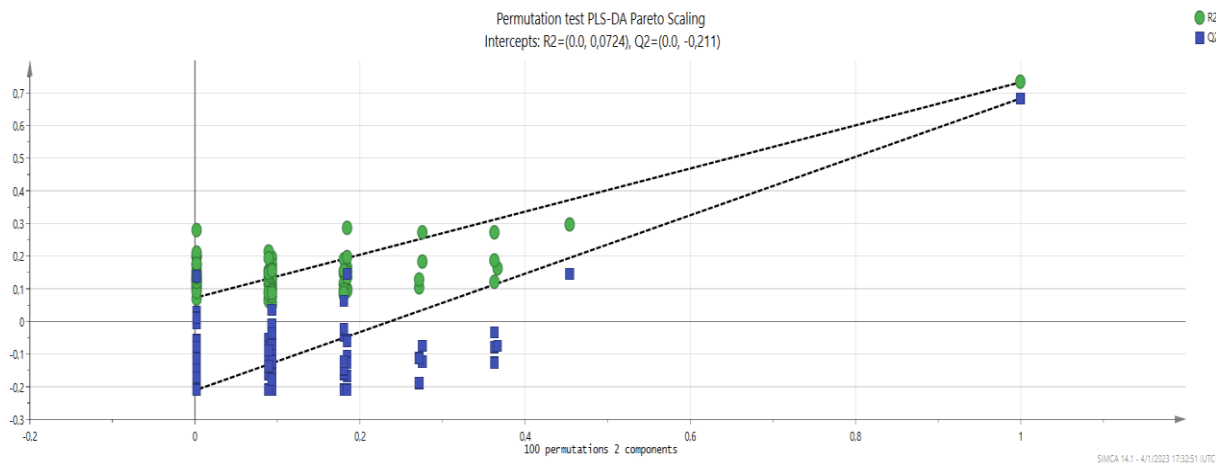
Permutation Test

Το Permutation test βοηθά στην αξιολόγηση του κινδύνου αν το τρέχον μοντέλο PLS-DA είναι ψευδές, δηλαδή αν το μοντέλο ταιριάζει καλά στο σύνολο των δεδομένων, αλλά δεν προβλέπει καλά το Y για τις νέες παρατηρήσεις. Η ιδέα αυτή της επικύρωσης είναι να συγκριθεί η αξιοπιστία των παραμέτρων R^2 και Q^2 του αρχικού μοντέλου με την αξιοπιστία των παραμέτρων R^2 και Q^2 με πολλά μοντέλα που βασίζονται στα δεδομένα όπου η σειρά των παρατηρήσεων Y έχει μεταβληθεί τυχαία, ενώ οι παρατηρήσεις X έχουν διατηρηθεί. Το διάγραμμα μεταθέσεων δηλώνει έντονα ότι το αρχικό μοντέλο είναι έγκυρο όταν πληρούνται τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω κριτήρια :

- Όλες οι μπλε τιμές Q^2 προς τα αριστερά να είναι χαμηλότερες από τα αρχικά σημεία προς τα δεξιά. ή
- Η μπλε διακεκομμένη γραμμή των σημείων Q^2 να τέμνει τον κατακόρυφο άξονα (στα αριστερά) κάτω από το μηδέν.
- Όλες οι πράσινες τιμές R^2 προς τα αριστερά να είναι χαμηλότερες από το αρχικό σημείο στα δεξιά, αυτό αποτελεί ένδειξη για την εγκυρότητα του αρχικού μοντέλου.



Εικόνα 7.1.9: Permutation test PLS-DA **UV Scaling** που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.



Εικόνα 7.1.10: Permutation test PLS-DA **Pareto Scaling** που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

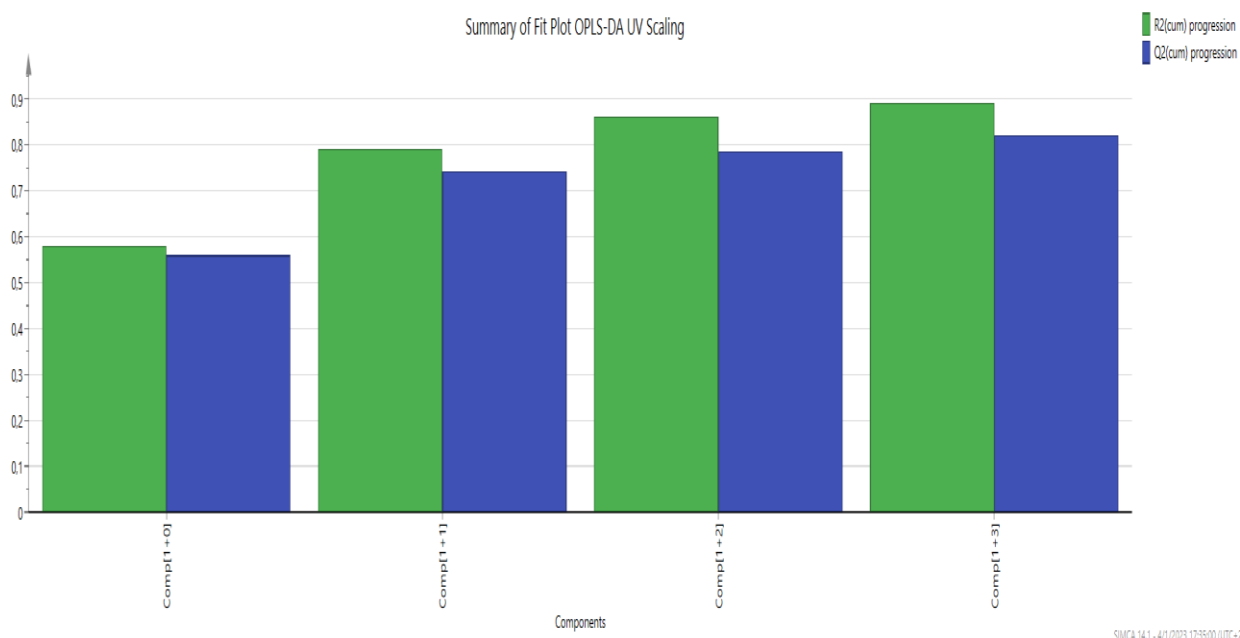
Παρατηρείται ότι στο διάγραμμα UV Scaling πληρούνται και τα 3 κριτήρια εγκυρότητας, δηλαδή, όλες οι μπλε τιμές Q^2 προς τα αριστερά να είναι χαμηλότερες από τα αρχικά σημεία προς τα δεξιά, η μπλε διακεκομμένη γραμμή των σημείων Q^2 τέμνει τον κατακόρυφο άξονα (στα αριστερά) κάτω από το μηδέν και όλες οι πράσινες τιμές R^2 προς τα αριστερά είναι χαμηλότερες από το αρχικό σημείο στα δεξιά. Αντίθετα, στο διάγραμμα Pareto Scaling παρατηρείται ότι, παρόλο που φαίνεται να πληρούνται και τα τρία κριτήρια εγκυρότητας, συγκριτικά με το UV μοντέλο και τις τιμές R^2 και Q^2 που δίνονται από το διάγραμμα θεωρείται μη αξιόπιστο μοντέλο καθώς υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των δεδομένων.

Με βάση τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι,

- το μοντέλο UV δεν είναι υπερπροσαρμοσμένο στα δεδομένα μας και έχει καλύτερη περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα σε σχέση με το Pareto,
- το μοντέλο Pareto είναι υπερπροσαρμοσμένο στα δεδομένα μας και κατ' επέκταση δεν είναι τόσο αξιόπιστο όσο το μοντέλο UV.

Επομένως στα επόμενα στάδια της επεξεργασίας χρησιμοποιούνται τα δεδομένα που προκύπτουν από το μοντέλο UV και ακολουθεί η εφαρμογή της OPLS-DA μόνο σε κλίμακα UV.

Summary of Fit Plot OPLS-DA UV Scaling

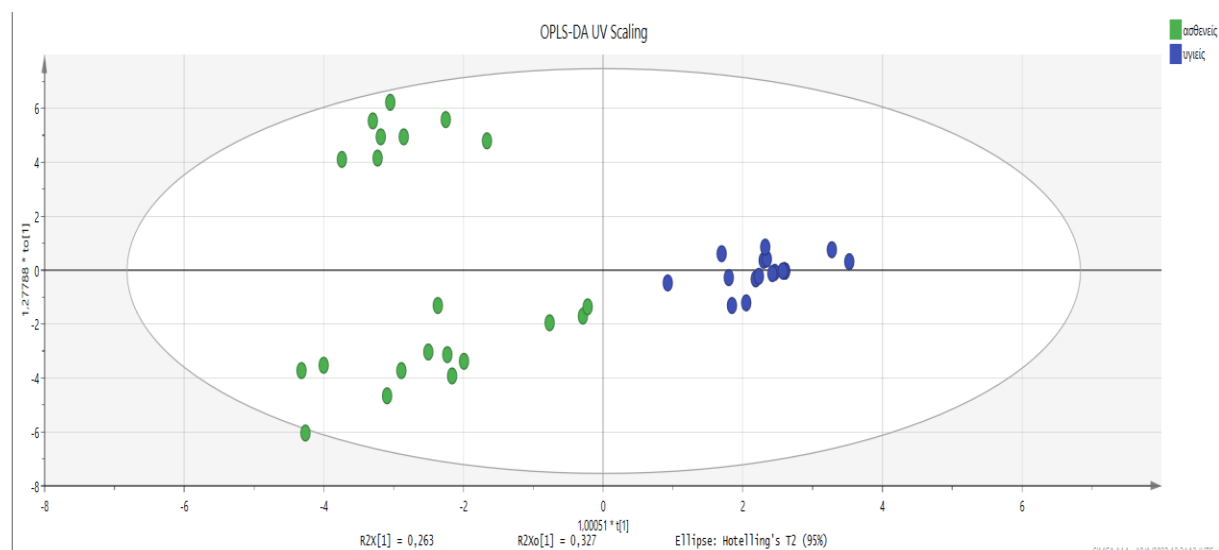


Εικόνα 7.1.11: Summary of Fit Plot OPLS-DA UV Scaling, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.. Το πρόγραμμα SIMCA για κάθε στοιχείο του μοντέλου εμφανίζει 4 μπάρες (R^2 , Q^2)

Στο γράφημά της OPLS-DA σε κλίμακα UV, οι μπάρες R^2 πλησιάζουν το 1 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο προσαρμόζεται πάρα πολύ καλά με τα δεδομένα. Ακόμα, το γράφημα της OPLS-DA σε κλίμακα UV φαίνεται ότι έχει ικανοποιητική προβλεψιμότητα για τα στοιχεία μας καθώς και οι 4 τιμές Q^2 είναι μεγαλύτερες του 0,5.

Διάγραμμα OPLS-DA UV Scaling

Το διάγραμμα της OPLS-DA είναι μια παραλλαγή της PLS-DA που χρησιμοποιεί τη διόρθωση ορθογωνίου σήματος για να μεγιστοποιήσει την συνδιακύμανση μεταξύ X και Y κατά τον άξονα X. Άρα το διάγραμμα της OPLS-DA είναι ένα παράθυρο στο χώρο X στο οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δύο κατηγοριών στον οριζόντιο άξονα.



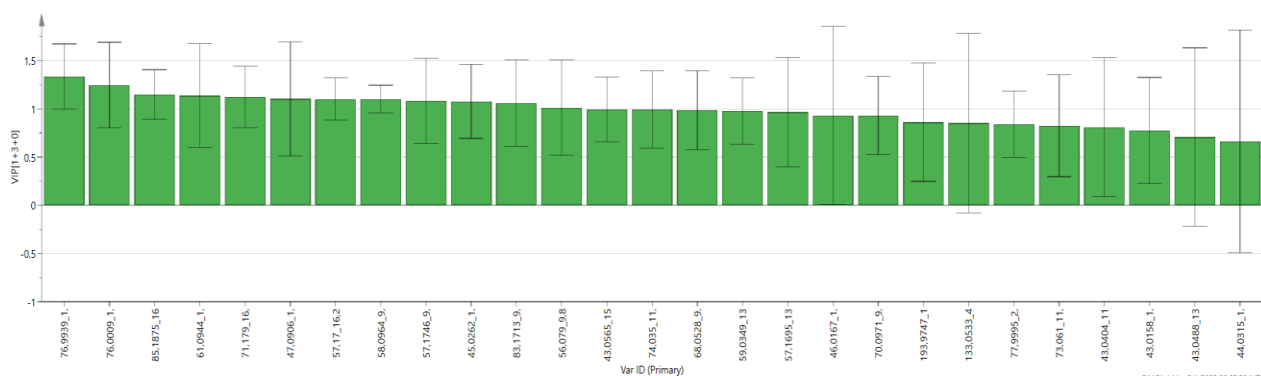
Εικόνα 7.1.12: Διάγραμμα OPLS-DA σε κλίμακα UV για τα δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (a group-πράσινο χρώμα) και υγιών (b group-μπλε χρώμα) που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Παρατηρούμε ότι στην OPLS-DA σε κλίμακα UV, οι ομάδες των ασθενών και υγιών διαχωρίστηκαν εντελώς στον άξονα X, καθώς πριν την εφαρμογή της OPLS-DA έχουν οριστεί οι 2 κατηγορίες.

Στην συνέχεια, από το OPLS-DA προκύπτει το διάγραμμα VIP όπου συνοψίζονται τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά. Στη λίστα VIP τιμές μεγαλύτερες του 1.0 αντιστοιχούν σε σημαντικά στατιστικά χαρακτηριστικά, ενώ τιμές μικρότερες του 0.5 αντιστοιχούν σε μη σημαντικά στατιστικά χαρακτηριστικά.

Από την OPLS-DA, προκύπτει επίσης και το διάγραμμα S (S-plot) που χρησιμοποιείται για την απεικόνιση της συμμεταβλητότητας (covariance) και της συσχέτισης (correlation) των χαρακτηριστικών. Τα χαρακτηριστικά τα οποία βρίσκονται στις άκρες, δηλαδή αυτά που είναι περισσότερο απομακρυσμένα από το σύνολο εμφανίζουν υψηλή διαφοροποίηση.

VIP PLOT



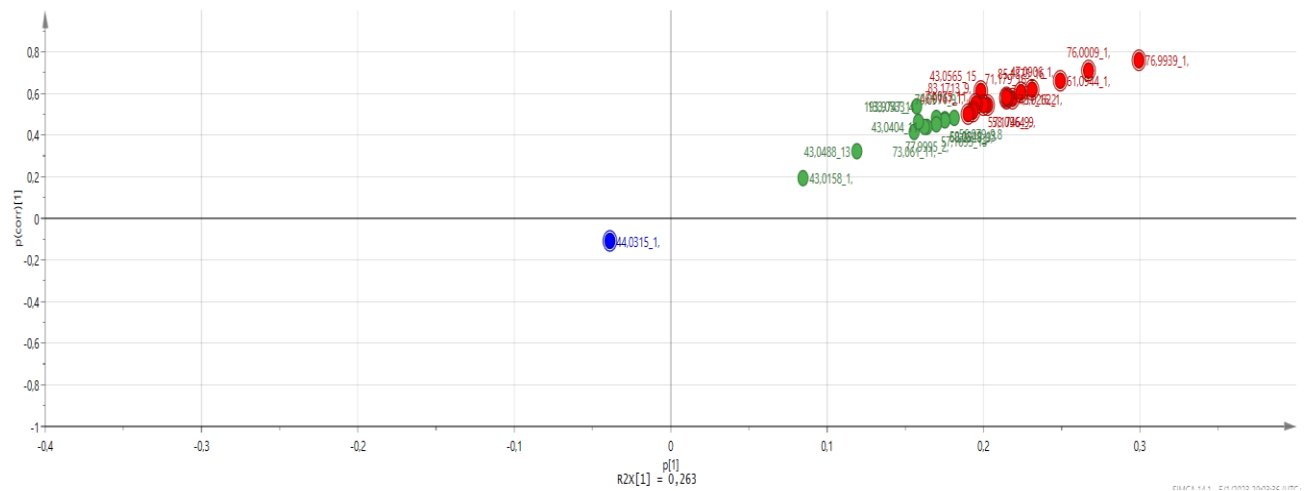
Εικόνα 7.1.13: Διάγραμμα VIP Plot που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Από το VIP Plot προκύπτει ο Πίνακας 7.1 με τα σημαντικά στατιστικά χαρακτηριστικά δηλαδή τα χαρακτηριστικά με VIP τιμές > 1

Πίνακας 7.1: VIP - Στατιστικών Σημαντικών Χαρακτηριστικών

MZ_tR	VIP τιμές
76,9_1,6	1,33698
76_1,7	1,24758
85,2_16,2	1,15032
61,1_1,7	1,13758
71,2_16,2	1,12368
47,1_1,6	1,10399
57,1_16,2	1,10229
58,1_9,8	1,10216
57,2_9,8	1,08223
45_1,4	1,07854
83,2_9,8	1,05878
56,1_9,8	1,01331

S-Plot



Εικόνα 7.1.14: Διάγραμμα S-Plot, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Από το διάγραμμα S-Plot προκύπτουν ορισμένα χαρακτηριστικά που είναι απομακρυσμένα από την κύρια μάζα των δεδομένων και φαίνεται ότι συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση των ομάδων. Τα χαρακτηριστικά αυτά μπορεί να αντιπροσωπεύουν θραύσματα της ένωσης ή ακόμη και το μοριακό ιόν. Από το διάγραμμα S-Plot προκύπτει ο Πίνακας 7.1.2 με όλα τα χαρακτηριστικά που αντιπροσωπεύουν m/z τα οποία διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο πληθυσμών κατά 1.5 τουλάχιστον μονάδα (fold change).

Πίνακας 7.1.2 : S-Plot - Στατιστικών Σημαντικών Χαρακτηριστικών

MZ/tR	MZ/tR
76,9_1,6	58,1_9,8
76_1,7	57,2_9,8
45,1_1,4	83,2_9,8
57,1_16,2	74_11,9
85,2_16,2	47,1_1,6
71,2_16,2	46_1,5
43_15,3	61,1_1,7

Στην συνέχεια κατασκευάζεται ο Πίνακας 7.1.3 που συνοψίζει τα κοινά στατιστικά χαρακτηριστικά από τους πίνακες των διαγραμμάτων VIP και S-Plot.

Πίνακας 7.1.3: Συγκεντρωτικός πίνακας των χαρακτηριστικών που προέκυψαν από την ανάλυση των δειγμάτων.

Χρόνος (tR)	Χαρακτηριστικά(MZ)
1,4	45
1,6	47,76
1,7	61,76
9,8	57,58,83
16,2	57,71,85

7.2 Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 7.2, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση σε όλα τα χρωματογραφήματα στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης και με βάση το αντίστοιχο φάσμα μάζας και με τη συνδρομή της βιβλιοθήκης NIST πραγματοποιήθηκε η ταυτοποίηση των ενώσεων. Για κάθε ένωση που ταυτοποιήθηκε πραγματοποιήθηκε δοκιμασία t-test για να εξακριβωθεί η στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ομάδων με βάση το εμβαδόν της αντίστοιχης χρωματογραφικής κορυφής και για τις δύο ομάδες. Το t-test πραγματοποιήθηκε σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% όπου ένα χαρακτηριστικό θεωρείται σημαντικό όταν η τιμή p-value είναι μικρότερη από τη τιμή 0.05.

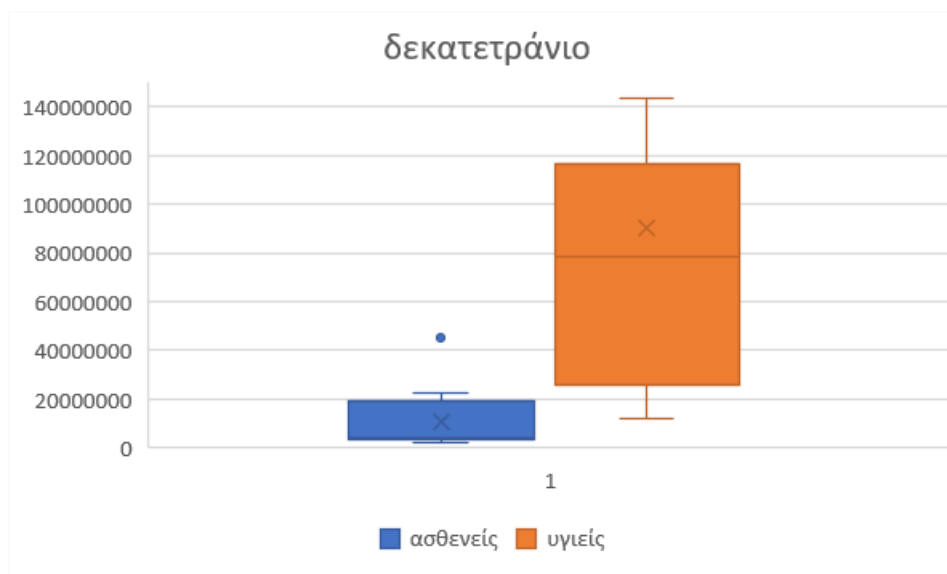
Πίνακας 7.2: Μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν με τη βιβλιοθήκη NIST

Χρόνος	Μάζα	p-value	Ένωση
9,8	57,58,83	0,047781	2-αίθυλο-1-εξανόλη
16,2	57,71,85	0,0038	δεκατετράνιο

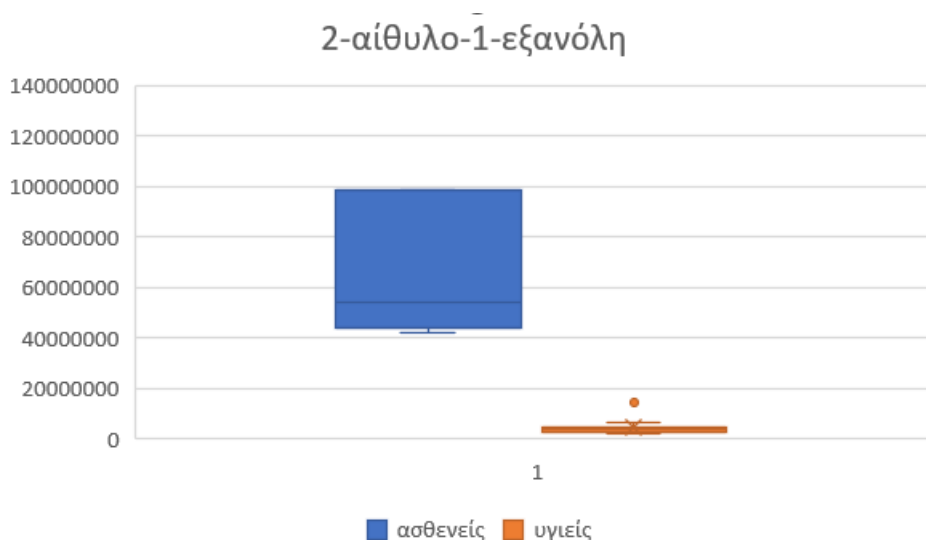
Οι ενώσεις οι οποίες θεωρούνται αξιόπιστες σε ποσοστό 95% και άνω σύμφωνα με τα δεδομένα του t-test, είναι οι ενώσεις, 2-αίθυλο-1-εξανόλη (2-Ethyl-1-hexanol) (tR: 9,8) με τιμή p-value 0,047781 και η ένωση δεκατετράνιο (Tetradecane) (tR: 16,2) με τιμή p-value 0,0038.

7.3 Επικύρωση πιθανών βιοδεικτών

Για τις ενώσεις αυτές λήφθηκαν αρχικά τα θηκογράμματα (bloxplot) βοήθεια του προγράμματος Excel.



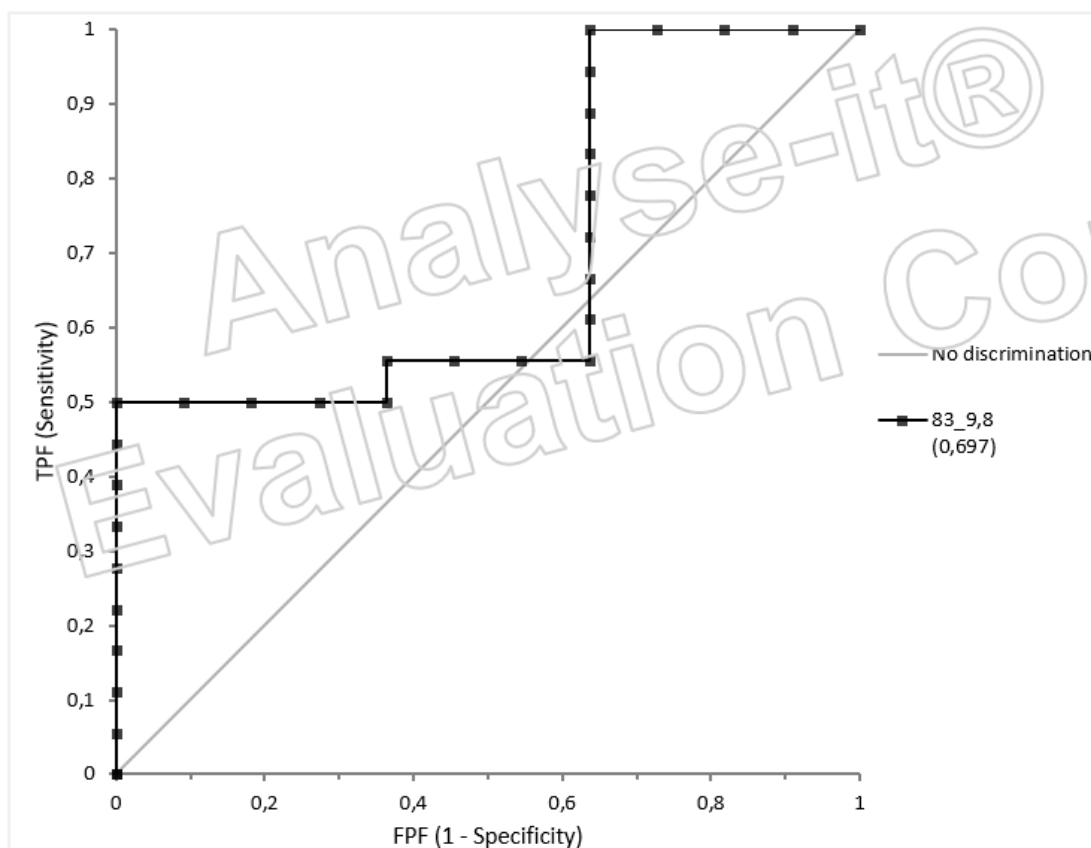
Εικόνα 7.3: Θηκόγραμμα για την ένωση δεκατετράνιο (tR:16,2)



Εικόνα 7.3.1: Θηκόγραμμα για την ένωση 2-αίθυλο-1-εξανόλη (tR:9,8)

Από τα θηκογράμματα προκύπτει ότι για την ένωση δεκατετράνιο οι μέσες τιμές που αφορούν τους ασθενείς είναι χαμηλότερες από τις αντίστοιχες για τους υγιείς ενώ το εύρος αλληλοεπικάλυψης των δύο ομάδων είναι μηδενικό. Αντίθετα για την ένωση 2-αίθυλο-1-εξανόλη οι μέσες τιμές που αφορούν τους ασθενείς είναι μεγαλύτερες και το εύρος αλληλοεπικάλυψης παραμένει μηδενικό.

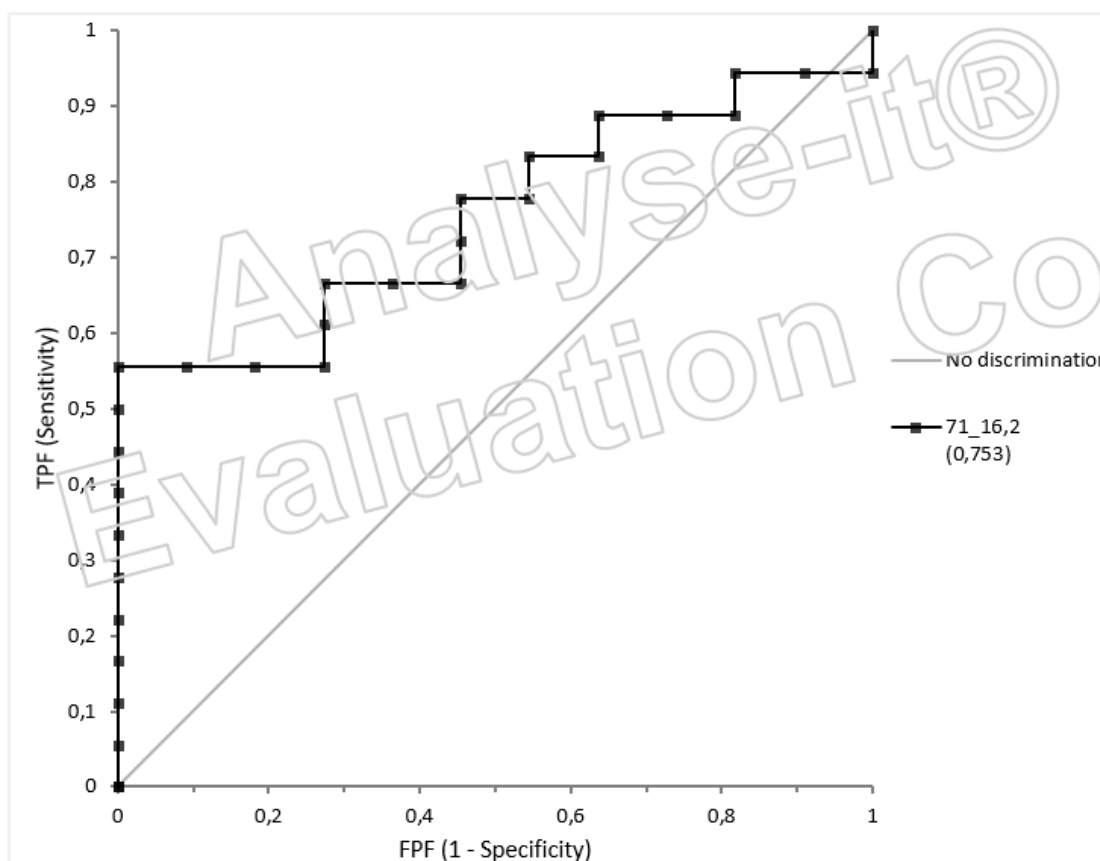
Τέλος όπως είναι γνωστό, τα θηκογράμματα δεν εκφράζουν στατιστική σημαντικότητα αλλά οπτικοποιούν την κατανομή των στατιστικών μετρήσεων, οπότε έγιναν οι καμπύλες ROC. Οι καμπύλες ROC αποτελούν τον πραγματικό παράγοντα που εκφράζει την στατιστική σημαντικότητα και υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος Analyse-it στο Excel.



	ασθενείς	υγιείς	Total
groups	18	11	29

	AUC	95% CI	SE
83_9,8	0,697	0,492 to 0,902	0,1045

Εικόνα 7.3.2: Καμπύλη ROC για την ένωση 2-αίθυλο-1-εξανόλη (tR: 9,8)



	ασθενείς	υγιείς	Total
groups	18	11	29
	AUC	95% CI	SE
71_16,2	0,753	0,574 to 0,931	0,0908

Εικόνα 7.3.3: Καμπύλη ROC για την ένωση δεκατετράνιο (tR: 16,2)

Από τις καμπύλες ROC και την τιμή της περιοχής κάτω από την καμπύλη (AUC) επικυρώνεται η αξιοπιστία των βιοδεικτών. Σε γενικές γραμμές, AUC ίσο ή μικρότερο του 0,5 δεν δηλώνει καμία διάκριση (δηλαδή, την ικανότητα διάγνωσης ασθενών και υγιών), από 0,6 έως 0,7 θεωρείται αποδεκτό, από 0,7 έως 0,8 θεωρείται αρκετά ικανοποιητικό, από 0,8 έως 0,9 θεωρείται πολύ καλό και περισσότερο από 0,9 θεωρείται εξαιρετικό. Οι τιμές AUC για την καμπύλη ROC της ένωσης δεκατετράνιο είναι μεγαλύτερη από 0,7 δηλώνοντας έτσι ικανοποιητικό έως και εξαιρετικό διαχωρισμό μεταξύ των δύο κατηγοριών. Αντίθετα για την ένωση 2-αίθυλο-1-εξανόλη η τιμή AUC είναι 0,697 δηλώνοντας έναν αποδεκτό αλλά όχι ικανοποιητικό διαχωρισμό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της μεταπτυχιακής εργασίας ήταν η εφαρμογή ενός νέου αναλυτικού πρωτοκόλλου για τη διερεύνηση πιθανών μεταβολιτών που διαφοροποιούνται μεταξύ ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα και υγιών. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν αέρια δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) αλλά και δείγματα υγιών μαρτύρων. Τα δείγματα των ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν προερχόταν όλα από άνδρες καθώς η εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα στις γυναίκες είναι πιο σπάνια και με επιτυχία εφαρμόστηκε αναλυτική μεθοδολογία βασισμένη στη δειγματοληψία του εκπνεόμενου αέρα με RTubeVOC και την εκχύλισή του με υγρή στερεή μικροεκχύλιση (PDMS/CAR/DVB-30/50um). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.

Τα δεδομένα που προέκυψαν ήταν αρκετά πολύπλοκα και για το λόγο αυτό ακολούθησε πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση. Σε πρώτο στάδιο έγινε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) στην οποία δεν παρατηρήθηκε κάποιος διαχωρισμός και στη συνέχεια ακολούθησαν οι μέθοδοι PLS-DA και OPLS-DA όπου ο διαχωρισμός ήταν πιο σαφής. Οι ενώσεις στις οποίες οφείλεται ο διαχωρισμός ταυτοποιήθηκαν και επικυρώθηκαν με τις καμπύλες ROC. Επιπλέον για τους βιοδείκτες έγιναν και τα σχετικά θηκογράμματα όπου παρουσιάζονται τα σχετικά ενδιάμεσα, μέγιστα και ελάχιστα κάθε πληθυσμού. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν μόνο δύο ενώσεις οι οποίες έχουν στάθμη εμπιστοσύνης μεγαλύτερη του 95%.

Οι δύο αυτές ενώσεις δεν αναφέρονται ως ταυτοποιημένοι βιοδείκτες σε διαδικτυακές βάσεις δεδομένων ωστόσο η ένωση 2-αίθυλο-1-εξανόλη έχει εμφανιστεί ως πιθανός βιοδείκτης του καρκίνου του πνεύμονα σε σχετική βιβλιογραφία με χρήση της μεθόδου ηλεκτρονικής μύτης και αεροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Caruano et al., 2015). Είναι πιθανό να ανήκουν στον μεγάλο αριθμό μη πιστοποιημένων βιοδεικτών αφού οι μεταβολίτες στον εκπνεόμενο αέρα είναι πάνω από 3000 και έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 500. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι η ένωση δεκατετράνιο εμφανίζεται και σε άλλες ασθένειες όπως άσθμα, νόσος Crohn, ελκώδης κολίτιδα, μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος και κοιλιοκάκη.[125]

Συμπερασματικά λοιπόν αυτή η μελέτη παρ' όλο του πέτυχε το στόχο της, με έναν μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων στο μέλλον θα μπορεί να δώσει πολλές ακόμα ενώσεις οι οποίες μπορεί να αποτελούν βιοδείκτες για τον καρκίνο του πνεύμονα και να συμβάλλουν στην πρόωπη διάγνωσή του.

Είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι λόγω της πανδημίας COVID-19, υπήρξε μεγάλη δυσκολία κατά τη δειγματοληψία αφού οι ασθενείς δεν επισκέπτονταν το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο των Ιωαννίνων ακόμα και για επιβεβαιωμένες επισκέψεις ρουτίνας. Κατ' επέκταση, ο μικρός αυτός αριθμός των βιοδεικτών είναι πιθανό να οφείλεται στο ότι ο αριθμός των δειγμάτων ήταν σχετικά μικρός και στο ότι το υπόστρωμα ανάλυσης είναι ένα από τα πιο δύσκολα υποστρώματα λόγω των μεγάλων απωλειών του.

Παρά τα πολλά ερωτήματα που παραμένουν ανοιχτά, η ανάλυση της αναπνοής είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη μη επεμβατική διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, η οποία μπορεί να βρει εφαρμογή στην πράξη για τον αριθμό των ασθενών που χρειάζονται περαιτέρω λεπτομερή εξέταση. Ωστόσο χρειάζεται ακόμα πολλή μελέτη ώστε να οριστούν οι κατάλληλες συνθήκες για να λαμβάνονται ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Bray, F., Znaor, A., Cueva, P., Korir, A., Swaminathan, R., Ullrich, A., Wang and D. Parkin, "Planning and Developing Population-Based Cancer Registration in Low- and Middle-Income Settings," *Fr. Int. Agency Res. Cancer*, 2015.
- [2] W. H. O. WHO, "Global Health Observatory Data Repository.," 2017.
- [3] et al Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. cancer*, vol. 359–386, 2015.
- [4] ["https://www.athensradiotherapy.gr/%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%82-%CE%B8%CE%B5%CF%81%CE%B1%CF%80%CE%B5%CE%AF%CE%B5%CF%82/%CF%84%CF%8D%CF%80%CE%BF%CE%B9-%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%85/%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%."](https://www.athensradiotherapy.gr/%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%82-%CE%B8%CE%B5%CF%81%CE%B1%CF%80%CE%B5%CE%AF%CE%B5%CF%82/%CF%84%CF%8D%CF%80%CE%BF%CE%B9-%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%CE%BF%CF%85/%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%AF%CE%BD%.)
- [5] J. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, "Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990," no. *Int. J. Cancer* 80, pp. 827–841, 1999.
- [6] J. A. Siegel R, Ward E, Brawley O, "Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths.," *CA Cancer J Clin.*, vol. 61(4), no. 212–36, 2011.
- [7] World Health Organiz and Ation, "Cancer over time." https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/bars?sexes=1_2&sort_by=value0&types=0&years=2012&hide_tab_age_specific_numbers=0.
- [8] W. H. O. WHO, "Cancer over time." https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/population_pyramid?sexes=1_2&sort_by=value0&types=1&years=2012&hide_tab_age_specific_numbers=0&mode=population&key=asr&age_end=16&populations=30000.
- [9] D. J. E. Tyczynski, F. Bray, and D. M. Parkin, "Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection," vol. 4, no. 1, pp. 45–55, 2003.
- [10] T. F. Lu, B., Castillo, I., Chiang, L., Edgar, "Industrial PLS model variable selection using moving window variable importance in projection.," *Chemom. Intell. Lab.*, vol. Syst. 135, pp. 90–109, 2014.
- [11] Τσιμάρα-Παπασταματίου, "Η Παθολογοανατομική προσέγγιση στον πρωτοπαθή πνευμονικό καρκίνο," pp. 543–558, 1990.
- [12] Ε. Γ. ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ, "Η αναζήτηση και η προγνωστική αξία της εκφράσεως των γονιδίων RAS και p53 στον χειρουργήσιμο, μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονος," *ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ*, pp. 27–45, 1993.
- [13] Γ. Θ. Τσάκαλου, "Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΗΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ," *Δημοκρίτειο*

Πανεπιστήμιο Θράκης, 2001.

- [14] P. J. Couraud, S., Zalcman, G., Milleron, B., Morin, F., Souquet, "Lung cancer in never smokers," *A Rev. Eur. J. Cancer* 48, pp. 1299–1311, 2012.
- [15] B. E. Jackman, D.M., Johnson, "Small-cell lung cancer," *Lancet* 366, pp. 1385–1396, 2005.
- [16] Ε. ΕΛΛΑΔΑ, "Η σημασία των υποδοχέων της σωματοστατίνης στην αντιμετώπιση του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα," *ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ – ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ ΠΝΕΥΜΟΝΟΛΟΓΙΚΗ – ΦΥΜΑΤΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ*, pp. 18–25, 2016.
- [17] M. Xiaorong Yang, JinyuMan, HuiChen, Tongchao Zhang, XiaolinYin, QiufengHe, "Temporal trends of the lung cancer mortality attributable to smoking from 1990 to 2017: A global, regional and national analysis," vol. 152, 2021.
- [18] J. FeiWang, FengweiTan, ZhengWu, WeiCao, ZhuoyuYang, YiwenYu, YongjieXu, ChaoQin, LiangZhao, JiansongRen, "Lung cancer risk in non-smoking females with a familial history of cancer: a multi-center prospective cohort study in China," *J. Natl. Cancer Cent.*, vol. 1, no. 3, pp. 108–114, 2021.
- [19] J. M. Alberg, A.J., Samet, "Epidemiology of Lung Cancer," pp. 215–49S, 2003.
- [20] Χ. Κωτούλας, "Κάπνισμα και Καρκίνος του Πνεύμονα." <https://www.kotoulas.com/μέσα-τύπος/blog/65-κάπνισμα-και-καρκίνος-του-πνεύμ>.
- [21] Ζ. ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ, "Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΚΑΠΝΙΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΝΗΘΕΙΑΣ ΣΤΟΝ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟ ΤΥΠΟ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ. ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ 20 ΕΤΩΝ," *ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ*, 2020.
- [22] A. L.McGuireMD, SophieSunMD, KyleGrantMD, AlexanderLeeMD, MarthaLeeMSc, WeiranYuchiMSc, MartinTammemagiPhD, StephenLamMD, RenelleMyersMD, MichaelBrauerScD, TrevorDummerPhD, SukhinderAtkar-KhattraBSc, JohnYeeMD, BarbaraMeloskyMD, CherylHoMD, "High-Ambient Air Pollution Exposure Among Never Smokers Versus Ever Smokers With Lung Cancer," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1850–1858, 2021.
- [23] and R. F. M. Patricia M. de Groot, Carol C. Wu, Brett W. Carter, "The epidemiology of lung cancer," *US Natl. Libr. Med. Natl. Institutes Heal.*, vol. 7, no. 3, pp. 220–233, 2018.
- [24] ΕΟΔΥ, "Ραδόνιο." <https://eody.gov.gr/wp-content/uploads/2019/01/radonio.pdf>.
- [25] J. M.Saab, BrendanNoonan, CarolineKilty, SerenaFitzGerald, AbigailCollins, ÁineLyng, UnaKennedy, MaiddyO'Brien, "Awareness and help-seeking for early signs and symptoms of lung cancer: A qualitative study with high-risk individuals," *Eur. J. Oncol. Nurs.*, vol. 50, 2021.
- [26] Π. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, "https://pneumonologikokentro.gr/epemvatiki-pneumonologia/?gclid=EAIaIQobChMI3_nC5q7K9AIVQY9oCR3dbgkpEAAAYiAAEgI08_D_BwE." .
- [27] Ι. Ν. ΤΑΒΑΝΤΖΗ-ΣΤΕΡΓΙΟΥ, "ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΟΥ ΜΗ ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΜΕ ΒΙΝΤΕΣΙΝΗ ΚΑΙ ΣΙΣΠΑΤΙΝΗ," *ΘΕΑΓΕΝΕΙΟ ΙΑΤΡΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ*, 1985.

- [28] P. Stewart, B.W., Kleihues, "World Cancer Report. Cancer Control.," 2003.
- [29] Α. Ρασιδάκης, "Καρκίνος του πνεύμονα: προοπτικές έγκαιρης διάγνωσης," *Περ. Γεν. Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αθηνών «Σωτηρία»*, 2004.
- [30] "Μαγνητική τομογραφία," 2019. <https://www.iatronet.gr/symptom-checker/magnitiki-tomografia.html>.
- [31] Ν. ΠΑΖΑΙΤΗ, "Ρ.Ε.Τ (Τομογραφία Εκπομπής Ποζιτρονίων)," *Κέντρο Υγείας Μαστού*, 2019. <https://www.natasapazaiti.gr/portal/p-e-t-tomografia-ekpompis-pozitronion/>.
- [32] Β. Πρασόπουλος, "Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων στην κλινική έρευνα λεμφωμάτων," *υγεία, όμιλος ΗΗG*, 2007.
- [33] Μ. Παύλος, "Βρογχοσκόπηση - Καρκίνος Πνεύμονα," *Ιατρική Σχολή Α.Π.Θ.* <https://www.pneumonologos-thessaloniki.gr/vrogchoskopisi-karkinos-pnevmona>.
- [34] Γ. Ν. Ευαγγελία, "Βρογχοσκόπηση: Η ελάχιστη επεμβατική και άμεση εξέταση των αεραγωγών," 2016. <https://www.pneumonologos.com/index.php/βρογχοσκόπηση>.
- [35] H. Colt, *The Essential Flexible Bronchoscope: Learning bronchoscopy in the world today*. 2017.
- [36] R. E. Collins, L.G., Haines, C., Perkel, R., Enck, "Lung cancer: Diagnosis and management," *Am. Fam. Physician* 75, pp. 56–63, 2007.
- [37] Ι. Κουτσαμπασοπούλου, "Διαδερμικές βιοψίες καθοδηγούμενες από αξονικό τομογράφο," 2021. <https://www.bioclinic.gr/diadermikes-biopsies/>.
- [38] Κ. Δ. ΧΑΤΖΑΚΗΣ, "Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΝΕΩΤΕΡΩΝ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗΝ ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΟΣ.," 2002.
- [39] A. society Thoracic, "Staging of Lung Cancer," *Patient Inf. Ser.*, 2010.
- [40] P. Dorothy J. Giroux MS , Paul Van Schil MD , Hisao Asamura MD , Ramón Rami-Porta MD , Kari Chansky MS , John J. Crowley PhD , Valerie W. Rusch MD , Kemp Kernstine MD, "The IASLC Lung Cancer Staging Project: A Renewed Call to Participation," *J. Thorac. Oncol.*, vol. 13, no. 6, pp. 801–809, 2018.
- [41] yesha S. B. · R. J. Cerfolio, "Diagnosis, staging and treatment of patients with non-small cell lung cancer for the surgeon," *Indian J Surg*, no. 71, pp. 310–316, 2009.
- [42] Δ. Ι. ΦΙΛΙΠΠΟΥ, "ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ - ΔΙΑΣΩΣΗ ΠΝΕΥΜΟΝΙΚΟΥ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑΤΟΣ ΜΕ ΕΠΑΝΕΜΦΥΤΕΥΣΗ," 2003.
- [43] Ε. Δ. Καραθάνος, "Η συμβολή του 99mTc-depreotide (Neospect®) στη σταδιοποίηση του βρογχογενούς καρκίνου του πνεύμονα," 2010.
- [44] J. F. L.Kaiser, "The Role of Surgery in the Multimodality Management of NonSmall Cell Lung Cancer," *Semin Thor Cardiovasc Surg*, vol. 9, pp. 60–79, 1997.
- [45] A. F. F.Sartori, L.Bortolotti, M.Michelon, F.Colaut, M.Loy, F.Rea, "The role of surgery in integrated therapies for non-small-cell lung cancer," *Ann. Oncol.*, vol. 10, no. 5, pp. S73–S76, 1999.
- [46] Φ. Μανωλής, "«Διατροφή και καρκίνος του πνεύμονα»," 2019.
- [47] F. S. A. Public Health England, "National Diet and Nutrition Survey Results from Years 5 and 6 (Combined) of the Rolling Programme 2012 / 2013," – *About Public Heal.*

Engl., vol. 6, 2016.

- [48] A. Mulder, I., Jansen, M.C.J.F., Smit, H.A., Jacobs, D.R., Menotti, A., Nissinen and D. Fidanza, F., Kromhout, "Role of smoking and diet in the cross-cultural variation in lung-cancer mortality: The seven countries study.," *Int. J. Cancer*, pp. 665–671, 2000.
- [49] E. Stefani, PaulBrennan, AlvaroRonco, LuisFierro, PelayoCorrea, PaoloBoffetta, HugoDeneo-Pellegrini, EnriqueBarrios, "Food groups and risk of lung cancer in Uruguay," *Lung Cancer*, vol. 38, no. 1, pp. 1–7, 2002.
- [50] Y. Yang, J., Yu, D., Takata, Y., Smith-Warner, S., Blot, W., White, E., Robien, K., Park, K. Xiang, Y., Sinha, R., Lazovich, D., Stampfer, M., Tumino, R., Aune, D., Overvad, and X. Liao, L., Zhang, X., Gao, Y., Johansson, M., Willett, W., Zheng, W. and Shu, "Dietary Fat Intake and Lung Cancer Risk: A Pooled Analysis," *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, no. 26, pp. 3055–3064, 2017.
- [51] Μ. Θ. ΜΙΧΑΛΟΠΟΥΛΟΥ ΜΑΡΙΑ, "Η ΕΓΚΑΙΡΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΝΕΟΤΕΡΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗΣ ΤΟΥ," 2018.
- [52] C. L. Pryor, W. a, Stahl, W., Rock, "Beta carotene: from biochemistry to clinical trials.," *Nutr. Rev.*, pp. 39–53, 2000.
- [53] J. Anic, G.M., Park, Y., Subar, A., Schap, T. & Reedy, "Index-based dietary patterns and risk of lung cancer in the NIH–AARP diet and health study," *Eur. Clin. Nutr.*, pp. 9–123, 2016.
- [54] Δ. Π. Νίκη Κόντου, Γεωργία Γεωργίου, "Διατροφή και Καρκίνος: Ανασκόπηση επιδημιολογικών και κλινικών ερευνών," *Το Βήμα του Ασκληπιού*, vol. 9, no. 3, 2010.
- [55] "Επιπτώσεις της άσκησης και της σωματικής δραστηριότητας στον καρκίνο," 2021. <https://addon.life/el/2021/07/30/physical-activity-exercise-cancer/>.
- [56] J. K.-M. and A. M. Ewelina Zyzniewska-Banaszak, "Physiotherapy and Physical Activity as Factors Improving the Psychological State of Patients With Cancer," *Front. Psychiatry*, vol. 12, 2021.
- [57] P. H. Line Pedersen, "Voluntary Running Suppresses Tumor Growth through Epinephrine- and IL-6-Dependent NK Cell Mobilization and Redistribution," *Cell Metab.*, vol. 23, no. 3, pp. 554–562, 2016.
- [58] I. T. E. Lund, "The influence of physical activity on lung-cancer risk: A prospective study of 81, 516 men and women.," *Int. J. Cancer*, vol. 70, pp. 57–62, 1997.
- [59] Ι.-Α. Η. Μπουλουκάκη, "«ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΣΤΗ ΦΛΕΓΜΟΝΗ ΤΩΝ ΑΕΡΑΓΩΓΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΡΙΝΙΚΟΥ ΒΛΟΝΝΟΓΟΝΟΥ ΜΕΤΑ ΤΗ ΔΙΑΚΟΠΗ ΤΟΥ ΤΣΙΓΑΡΟΥ»,» 2010.
- [60] Μ. Ηλιάννα, Κ. Ελευθερία, and Π. Ελένη, "«Καρκίνος πνεύμονα: Αιτιολογία, κλινικές εκδηλώσεις, θεραπεία και νοσηλευτικές παρεμβάσεις.»," 2020.
- [61] S. Walton, R., Johnstone, E., Munafò, M., Neville, M., Griffiths, . "Genetic clues to the molecular basis of tobacco addiction and progress towards personalized therapy.," *Trends Mol. Med.*, vol. 7, pp. 70–76, 2000.
- [62] Μ. V., "Βιοχημεία της Άσκησης," *Ελληνική Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδη*, 2008.
- [63] Η. ΣΚΕΠΑΡΝΙΑΣ, "Διερεύνηση αλληλεπιδράσεων RNA-πρωτεϊνών και του ρόλου τους στη ρύθμιση της πρωτεϊνοσύνθεσης και της διαφοροποίησης των κυττάρων,"

- ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, 2020.
- [64] Χ. Μάγγα-Ντεβέ, “ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΩΝ ΕΡΓΑΛΕΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΤΥΠΩΝ,” ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ, 2017.
 - [65] A. Claudino, W.M., Quattrone, A., Biganzoli, L., Pestrin, M., Bertini, I., Di Leo, “Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications.,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 25, pp. 2840–2846, 2007.
 - [66] Γ. Θεοδωρίδης, “Κεφάλαιο 2: Βιολογία Συστημάτων, Τεχνολογίες Omics,” pp. 1–21.
 - [67] D. B. Goodacre, R., Vaidyanathan, S., Dunn, W. B., Harrigan, G. G., & Kell, “Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data.,” *Trends Biotechnol.*, vol. 22, no. 5, pp. 245–252, 2004.
 - [68] T. D. Menni, C., Zierer, J., Valdes, A.M., Spector, “Mixing omics: combining genetics and metabolomics to study rheumatic diseases.,” *Nat. Rev. Rheumatol.*, vol. 13, pp. 174–181, 2017.
 - [69] Κ. ΣΠΑΓΟΥ, “ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΟΛΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ,” ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, 2013.
 - [70] Α. Β. Γεωργιάδου, “Μεταβολομική (Metabolomics) του Ανθρώπινου Οργανισμού σε Προσομοιούμενες Συνθήκες Εγκλωβισμού σε Ερείπια Κτηρίων μετά από Σεισμό,” ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ, 2008.
 - [71] Ο. Α. ΔΕΔΑ, “ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΑΣΚΗΣΗΣ ΚΑΙ ΓΗΡΑΝΣΗΣ ΣΕ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ,” ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, 2017.
 - [72] “Η ανάπτυξη της Μεταβολομικής.” <https://gtsilimidos.gr/μεταβολομικη/>.
 - [73] Χ. Ε. ΒΙΡΓΙΛΙΟΥ, “ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΥΡΕΣΗ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ,” ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, 2017.
 - [74] J. T. Rasmus Madsen, Torbjörn Lundstedt, “Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 659, no. 1–2, pp. 23–33, 2010.
 - [75] J. K. Lindon, J.C., Holmes, E., Nicholson, “Metabonomics and its role in drug development and disease diagnosis,” vol. 4, no. 2, pp. 189–199, 2004.
 - [76] J. A. Strimbu, K., Tavel, “What are biomarkers?,” *Curr. Opin. HIV AIDS*, vol. 5, pp. 463–466, 2010.
 - [77] A. Claudino, W.M., Quattrone, A., Biganzoli, L., Pestrin, M., Bertini, I., Di Leo, “Metabolomics: Available results, current research projects in breast cancer, and future applications.,” *J Clin Oncol.*, vol. 25, no. 19, pp. 2840–2846, 2007.
 - [78] V. R. Kim HK, Choi YH, “NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go?,” *Trends Biotechnol.*, vol. 29, pp. 267–275, 2011.
 - [79] L. E. Plumb R, Granger J, Stumpf C, Wilson ID, Evans JA, “Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences.,” *Analyst.*, vol. 128, no. 7, pp.

- 819–823, 2003.
- [80] et al Brindle JT, Antti H, Holmes E, Tranter G, Nicholson JK, Bethell HW, “Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using ¹H-NMR-based metabonomics,” *Nat Med.*, vol. 8, no. 12, pp. 1439-1444., 2002.
 - [81] N. J. Lindon JC, Holmes E, Bollard ME, Stanley EG, . “Metabonomics technologies and their applications in physiological monitoring, drug safety assessment and disease diagnosis,” *Biomarkers.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–31, 2004.
 - [82] et al Cheng LL, Lean CL, Bogdanova A, Wright SC, Jr., Ackerman JL, Brady TJ, “Enhanced resolution of proton NMR spectra of malignant lymph nodes using magic-angle spinning,” *Magn Reson Med.*, vol. 36, no. 5, pp. 653–658, 1996.
 - [83] Σ.-Ε. Ι. Βερναρδής, “Η ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ ΩΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ ΠΛΑΤΦΟΡΜΑ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΤΗ ΦΑΡΜΑΚΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ,” 2013.
 - [84] S. S. Seger C, “Analytical aspects of plant metabolite profiling platforms: current standings and future aims,” *J. Proteome Res.*, vol. 6, pp. 480–497, 2007.
 - [85] R. E. Lewis, G.D., Asnani, A., Gerszten, “Application of Metabolomics to Cardiovascular Biomarker and Pathway Discovery,” *γ. J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 52, pp. 117–123, 2008.
 - [86] I. D. Theodoridis, G. A., Gika, H. G., Want, E. J., & Wilson, “Liquid chromatographymass spectrometry based global metabolite profiling: a review,” *Anal Chim Acta*, vol. 711, pp. 7–16, 2012.
 - [87] Β. ΑΘ., “Φασματοσκοπία Οργανικών Ενώσεων,” Έκδοση Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών., 2004.
 - [88] W. L. Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, . “Metabolite profiling for plant functional genomics,” *Nat Biotechnol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1157–1161, 2000.
 - [89] J. B. West, “«Φυσιολογία της αναπνοής»,” *Επιστημονικές εκδόσεις Γρ. Παρισιάνος, 5η έκδοση*, vol. 144, p. 17, 1996.
 - [90] B. Ligor, T., Ligor, M., Amann, A., Ager, C., Bachler, M., Dzien, A., Buszewski, “The analysis of healthy volunteers’ exhaled breath by the use of solid-phase microextraction and GC-MS,” *J. Breath Res.*, vol. 2, pp. 460–466, 2008.
 - [91] B. L. Phillips M., Glesson K., Hughes J.M.B., Greenberg J., Cataneo R.N. and M. W.P, “Volatile organic compounds in breath as marker of lung cancer: a cross sectional study,” *Lancet*, vol. 353, pp. 1930–1933, 1999.
 - [92] W. V. Mills G.A., “Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile organic compounds in urine: Application to metabolic investigations,” *J. Chromatogr. B Biomed Sci Appl*, vol. 753, pp. 259–268, 2001.
 - [93] Α. ΑΓΑΠΙΟΣ, “ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ Η ΑΠΟ ΜΕΤΑΘΑΝΑΤΙΑ ΑΠΟΣΥΝΘΕΣΗ,” ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ, 2006.
 - [94] A. D. Rosamaria Capuano, Marco Santonico, Giorgio Pennazza, Silvia Ghezzi, Eugenio Martinelli, Claudio Roscioni, Gabriele Lucantoni, Giovanni Galluccio, Roberto Paolesse, Corrado Di Natale, “The lung cancer breath signature: a comparative analysis of exhaled breath and air sampled from inside the lungs,” *Sci. Rep.*, vol. 5,

- 2015.
- [95] D. A. & D. N. C. Pennazza G., Santonico M., Martinelli E., “Ερμηνεία εκπνεόμενων πτητικών οργανικών ενώσεων .,” *Nature*, vol. 49, pp. 115–129, 2010.
 - [96] T. A. Popov, “Human exhaled breath analysis.,” *Ann. Allergy, Asthma Immunol*, vol. 106, pp. 451–456, 2011.
 - [97] Q. Z. Hasib Ahmadzai , Shuying Huang, Ravin Hettiarachchi, Jiun-Lih Lin, Paul S Thomas, “Exhaled breath condensate: a comprehensive update,” *Clin Chem Lab Med*, vol. 51, no. 7, pp. 1343–1361, 2013.
 - [98] P. Rosias, “Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis.,” *J. Breath Res.*, vol. 6, no. 2, 2012.
 - [99] K. J. M. Kramer, “Quality assurance of sampling and sample handling for trace metal analysis in aquatic biota,” *Qual. Assur. Environ. Monit. Sampl. Sample Pretreat.*, pp. 179–214, 1995.
 - [100] E. C. and C. Draghici, “Pollutants analysis I, Water Quality Control,” *Transilv. Univ. Press*, 2003.
 - [101] A. ΜΟΥΣΟΥΡΑΚΗ, “Διερεύνηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπό συνθήκες κενού ‘Vas - HSSPME,’” *ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ*, 2012.
 - [102] and S. D. E. S. Chirila, C. Draghici, “Sampling and sample pretreatment for environmental analysis.,” pp. 7–28, 2006.
 - [103] and T. G. H. S. Mezouari, W. Y. Liu, G. Pace, “Development and validation of an improved method for the determination of chloropropanols in paperboard food packaging by GC-MS,” *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess*, vol. 32, no. 5, pp. 768–778, 2015.
 - [104] Ε. Γ. ΑΜΒΡΑΖΗ, “ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΣΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ,” *ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ*, 2007.
 - [105] B. F. Masque N., Marce M., “New polymeric and other type of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, no. 17:384, 1998.
 - [106] C. F. Poole, “Solid-Phase Extraction,” Wayne State University. Detroit, MI, USA, 2000.
 - [107] E. P. N. Kalogerakis, “Developments in liquid-phase microextraction,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 22, no. 9, pp. 565–574, 2003.
 - [108] M. J. Y. and J. Pawliszyn, “Solid-Phase Microextraction,” vol. 66, no. 17, pp. 844–853, 1994.
 - [109] T. Sokoließ, T., Menyes, U., Roth, U., Jira, “New calixarene-bonded stationary phases in high-performance liquid chromatography: Comparative studies on the retention behavior and on influences of the eluent,” *J. Chromatogr*, pp. 35–52, 2000.
 - [110] J. Pawliszyn, “Solid Phase Microextraction: Theory and Practice,” *New York, Wiley-VCH*, 1997.
 - [111] J. P. B. Boland A.A., “Analytical Chemistry,” 1996.

- [112] J. B. Chen, J., Pawliszyn, "Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 67, pp. 2530–2533, 1995.
- [113] K. Vas, G., Vékey, "Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, pp. 233–254, 2004.
- [114] and S. R. C. D. A. Skoog, J. F. Holler, "“Υδροχρωματογραφία,”” in *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, 6th ed., no. Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007, pp. 935–979.
- [115] J. Ouyang, G., & Pawliszyn, "A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 627, no. 2, pp. 184–197, 2008.
- [116] Μ. ΛΑΔΑ, "“Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ,”” ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ, 2014.
- [117] J. Barnes, S., Benton, H. P., Casazza, K., Cooper, S. J., Cui, X., Du, X., Engler and H. K. Kabarowski, J. H., Li, S., Pathmasiri, W., Prasain, J. K., Renfrow, M. B., & Tiwari, "Training in metabolomics research. II. Processing and statistical analysis of metabolomics data, metabolite identification, pathway analysis, applications of metabolomics and its future.," *J. Mass Spectrom.*, vol. 51, no. 8, 2016.
- [118] R. C. Pinto, "Chemometrics methods and strategies in metabolomics.," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 965, pp. 163–190, 2017.
- [119] E. J. J. Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., Velzen and F. A. Duijnhoven, J. P. M., & Dorsten, "Assessment of PLSDA cross validation.," *Metabolomics*, vol. 4, no. 1, pp. 81–89, 2008.
- [120] Κ. ΣΠΑΓΟΥ, "ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΟΛΙΣΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ," 2013.
- [121] D. Blasco, H., Błaszczyszki, J., Billaut, J. C., Nadal-Desbarats, L., Pradat, P. F., Devos and R. Moreau, C., Andres, C. R., Emond, P., Corcia, P., & Słowiński, "Comparative analysis of targeted metabolomics: Dominance-based rough set approach versus orthogonal partial least square-discriminant analysis.," *J. Biomed. Inform.*, vol. 53, pp. 291–299, 2015.
- [122] E. J. J. Westerhuis, J. A., Hoefsloot, H. C. J., Smit, S., Vis, D. J., Smilde, A. K., Velzen and F. A. Duijnhoven, J. P. M., & Dorsten, "Assessment of PLSDA cross validation.," *Metabolomics*, vol. 4, no. 1, pp. 81–89, 2008.
- [123] D. S. Xia, J., Broadhurst, D. I., Wilson, M., & Wishart, "Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: An introductory tutorial.," *Metabolomics*, vol. 9, no. 2, pp. 280–299, 2013.
- [124] S. Narkhede, "Understanding AUC - ROC Curve," *Towards Data Science*, 2018. <https://towardsdatascience.com/understanding-auc-roc-curve-68b2303cc9c5>.
- [125] "No Title." <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0059907>.