



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ανίχνευση VOCs σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα: Υιοθέτηση
χημειομετρικών εργαλείων για την διαφοροποίηση υγιών
ατόμων και ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.**

Νικολέτα Στρούτζου

Χημικός

Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

Υπεύθυνος καθηγητής : Βασίλειος Σακκάς

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Ανίχνευση VOCs σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα: Υιοθέτηση
χημειομετρικών εργαλείων για την διαφοροποίηση υγιών
ατόμων και ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.**

Νικολέτα Στρούτζου

Χημικός

Μεταπτυχιακή Διατριβή Ειδίκευσης

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

Υπεύθυνος καθηγητής : Βασίλειος Σακκάς

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2025

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σακκά: 18.11.2024

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1131/16-12-2024

Επιβλέπον μέλος ΔΕΠ: Σακκάς Βασίλειος

Ημερομηνία ορισμού θέματος:

Θέμα: <<Ανίχνευση VOCs σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα: Υιοθέτηση χημειομετρικών εργαλείων για την διαφοροποίηση υγιών ατόμων και ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα.>>

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

1. Καθηγητής Βασίλειος Σακκάς
2. Καθηγητής Κωνσταντίνος Σταλίκας
3. Επίκουρος Καθηγητής Παντελεήμων Τάκης

Έγκριση Μεταπτυχιακής Διατριβής στις 31.01.2025

Η πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Καθηγήτρια κα. Χελά Δήμητρα

Η γραμματέας του Τμήματος Χημείας
Τουτουνζόγλου Ξανθή

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο ερευνητικό εργαστήριο αναλυτικής χημείας του αναπληρωτή καθηγητή Βασίλειου Σακκά του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του αναφερόμενου καθηγητή.

Ολοκληρώνοντας την πτυχιακή μου εργασία θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα ακόλουθα άτομα:

Πρώτα από όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου Βασίλειο Σακκά για την εμπιστοσύνη του, το ενδιαφέρον του, την καθοδήγηση του, την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή αυτή εργασία, το χρόνο που αφιέρωσε και την εξαιρετική συνεργασία μαζί του.

Πολύτιμη υπήρξε επίσης η βοήθεια και η καθοδήγηση του διδακτορικού φοιτητή Χριστόφορου Χρηματόπουλου εντός του εργαστηρίου, της Αντωνίας Βερτζάγια ,πρώην μεταπτυχιακής φοιτήτριας στο ίδιο εργαστήριο, η οποία μου μεταλαμπάδευσε τις γνώσεις της πάνω στο συγκεκριμένο ερευνητικό πεδίο, αλλά και του μεταπτυχιακού φοιτητή Ελευθέριου Ηλιάδη που ήταν πρόθυμος να βοηθήσει οποιαδήποτε στιγμή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον ιατρό της πνευμονολογικής κλινικής του Π.Γ.Ν.Ι Χρήστο Χρόνη για την βοήθεια του και την συμμετοχή του στην συγκεκριμένη έρευνα, δίνοντας μου τα απαραίτητα δείγματα για την εκπόνηση της. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για την υπομονή και για τον χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να συλλεχθούν τα δείγματα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την οικονομική, ψυχική και ηθική στήριξη που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια μη επεμβατική μέθοδος για την πρώιμη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα αναζητείται τα τελευταία χρόνια λόγω του ότι ο καρκίνος του πνεύμονα είναι η πιο κοινή μορφή καρκίνου παγκοσμίως με τα υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας. Μια τέτοια πολλά υποσχόμενη μέθοδος είναι η ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) στην εκπνοή. Η εκπνοή μπορεί να περιέχει πιθανούς δείκτες πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) οι οποίοι δύναται να επιταχύνουν τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκε το πεδίο της μεταβολομικής που σχετίζεται άμεσα με το ανθρώπινο σώμα. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των VOCs σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα υγιών ατόμων και πασχόντων από καρκίνο του πνεύμονα. Οι σωλήνες RTubeVOC χρησιμοποιήθηκαν για τη συλλογή πτητικών οργανικών ενώσεων. Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται για να γίνει η προσρόφηση των πτητικών οργανικών μορίων σε έναν στερεό φορέα, που είναι απαραίτητος για την ανάλυση. Οι προσροφημένες ουσίες εκροφήθηκαν σε αέριο χρωματογράφο συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας. Μετά την ανάλυση, χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα που βοηθούν στην επεξεργασία ακατέργαστων δεδομένων όπως το XCMSOnline, MetaboAnalyst 5.0 και SIMCA λόγω του γεγονότος ότι τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα μάζας είναι πολύπλοκα δεδομένα και δύσκολα αναλύονται. Πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία για τη διάκριση των ομάδων με εφαρμογή των μοντέλων PCA, PLS-DA και OPLS-DA, καθώς και για τον προσδιορισμό των ενώσεων που συμβάλλουν στον διαχωρισμό. Η βιβλιοθήκη NIST βοήθησε στον εντοπισμό αυτών των χαρακτηριστικών. Διαπιστώθηκε ότι ένας συνδυασμός εξανάλης, γ-τερπινενίου και εννεανάλης θα μπορούσε να χρησιμεύσουν ως πιθανοί πτητικοί βιοδείκτες για τον καρκίνο του πνεύμονα. Η ανάλυση ANOVA καταδεικνύει ότι οι μεταβολίτες παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ υγιών ομάδων και ομάδων ασθενών. Η διόρθωση FDR επικυρώνει αυτά τα ευρήματα, διασφαλίζοντας την αξιοπιστία τους εν μέσω πολλαπλών συγκρίσεων. Αυτοί οι μεταβολίτες θα μπορούσαν να παίξουν κρίσιμους ρόλους στην κατανόηση των μηχανισμών της νόσου ή στην ανάπτυξη διαγνωστικών εργαλείων.

Abstract

A non-invasive screening method for early lung cancer diagnosis has been actively sought after in recent years because of the fact that lung cancer is the most common form of cancer worldwide with the highest mortality rates. One such promising method is the analysis of volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath. Exhaled breath may contain potential volatile organic compounds (VOCs) indicators linked to oxidative stress and lipid peroxidation, which could speed up the diagnosis of lung cancer. The field of metabolomics which is a “high performance” analysis and directly related to the human body was used in this research. Specifically, in this research an analysis of VOCs in exhaled breath was carried out in samples of healthy persons and lung cancer sufferers. RTubeVOC tubes were utilized for the collection of VOCs. Solid phase micro-extraction is the method used in order to carry out the adsorption of the volatile organic molecules in a solid carrier, which is necessary for the analysis. The adsorbed substances were desorbed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer. After the analysis, programs that contribute to the processing of raw data such as XCMSOnline, MetaboAnalyst 5.0 and the SIMCA program were used because of the fact that chromatograms and mass spectra are complex data and difficult to analyze. Statistical processing was carried out to distinguish the groups by applying the PCA, PLS-DA and OPLS-DA models, as well as to determine the compounds underlying the separation. The NIST library helped in the identification of these features. It was found that a combination of hexanal, c-terpinene and nonanal could serve as potential volatile biomarkers for lung cancer. The ANOVA analysis demonstrates that metabolites A (nonanal), B (hexanal), and C (c- terpinene) exhibit significant differences between healthy and patient groups. FDR correction validates these findings, ensuring their reliability amidst multiple comparisons. These metabolites could play critical roles in understanding disease mechanisms or developing diagnostic tools.

Πίνακας περιεχομένων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ

1.1.	Εισαγωγή: πνεύμονας και καρκίνος του πνεύμονα.....σελ.	11
1.2.	Επιδημιολογία	σελ.14
1.3.	Διάκριση των τύπων του καρκινικού όγκου του πνεύμονα.....σελ.	17
1.4.	Συμπτώματα της ασθένειας	σελ. 21
1.5.	Αίτια καρκίνου του πνεύμονα	σελ.21
1.6.	Σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα.....σελ.	25
1.7.	Διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα.....σελ.	30
1.8.	Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα.....σελ.	36
1.9.	Πρόληψη	σελ.39
1.10.	Πρόγνωση και προσυμπτωματικός έλεγχος	σελ.41
1.11.	Οικονομικό κόστος.....σελ.	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

2.1.	τεχνικές εκχύλισης- μικροεκχύλισης.....σελ.	45
2.1.1.	υγρή- υγρή εκχύλιση (liquid- liquid extraction – LLE) και υγρή- υγρή μικροεκχύλιση.....σελ.	46
2.1.2.	εκχύλιση και μικροεκχύλιση υγρής- στερεάς φάσης.....σελ.	47
2.1.3.	εκχύλιση και μικροεκχύλιση στερεάς φάσης.....σελ.	48
2.2.	χρωματογραφική ανάλυση.....σελ.	56
2.2.1.	αέρια χρωματογραφία.....σελ.	58
2.2.2.	αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας....σελ.	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΕΤΑΒΟΛΟΜΙΚΗ

3.1.	εισαγωγή- ομικές τεχνολογίες (-omics).....σελ.	66
3.2.	μεταβολομική ανάλυση	σελ.68
3.3.	στοχευμένη – μη στοχευμένη ανάλυση.....σελ.	71
3.4.	μεταβολομική σε βιολογικά δείγματα.....σελ.	72
3.5.	αναλυτικές τεχνικές και μεταβολομική	σελ.73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΤΗΤΙΚΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ VOCs ΣΤΟΝ ΕΚΠΝΕΟΜΕΝΟ ΑΕΡΑ

4.1.	εισαγωγή – οργανικές πτητικές ενώσεις (VOCs)	σελ.74
4.2.	σύσταση της ανθρώπινης αναπνοής.....σελ.	75
4.3.	πτητικές οργανικές ενώσεις και καρκίνος του πνεύμονα	σελ.77

4.4. τρόπο συλλογής των πτητικών οργανικών ενώσεων	σελ. 78
4.5. συνθήκες που επηρεάζουν την σύσταση των πτητικών οργανικών ενώσεων.....	σελ. 79

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΣΚΟΠΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1. συλλογή δειγμάτων.....	σελ.83
6.2. προετοιμασία δειγμάτων.....	σελ.85
6.3. συνθήκες ανάλυσης αέριας χρωματογραφίας (GC) και φασματομετρίας μάζας (MS)	σελ.87
6.4. επεξεργασία φασμάτων GC-MS	σελ.87
6.5. προ επεξεργασία δεδομένων GC-MS	σελ. 88
6.6. στατιστική επεξεργασία.....	σελ.88
6.6.1 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών(PCA).....	σελ.89
6.6.2 Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (PLS-DA)..	92
6.6.3 Ορθογώνια Διακρίνουσα Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (OPLS-DA)	σελ.92
6.6.4 Επικύρωση των μοντέλων PLS-DA.....	σελ.93
6.6.5 Επιλογή χαρακτηριστικών που οφείλονται για το διαχωρισμό.....	σελ.94
6.6.6 Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών	σελ.95

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Αποτελέσματα- Συζήτηση

7.1. Πρωτογενή χρωματογραφήματα δειγμάτων ασθενών και υγιών.....	σελ.97
7.2. Στατιστική επεξεργασία πρωτογενών δεδομένων GC-MS.....	σελ.98
7.3. Ταυτοποίηση μεταβολιτών.....	σελ. 110
7.4. Επικύρωση πιθανών βιοδεικτών.....	σελ.111

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 :ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

σελ.117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1:

Η ασθένεια του καρκίνου του πνεύμονα

1.1. Εισαγωγή : Πνεύμονας και καρκίνος του πνεύμονα

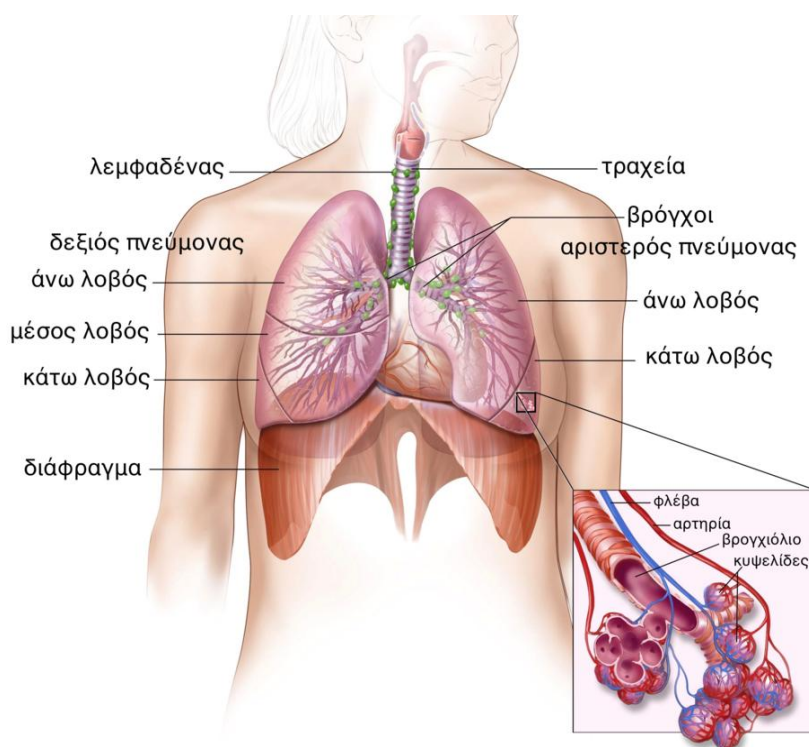
Παρόλο που η αναπνοή πραγματοποιείται αυτόματα από τα νευρικά κέντρα του εγκεφάλου και του προμήκη μυελού, ο άνθρωπος μπορεί να την ελέγχει και να την τροποποιεί δια μέσου των αναπνευστικών μυών οι οποίοι βρίσκονται υπό τον συνειδητό έλεγχο του.

Κύριο όργανο της αναπνοής αποτελεί ο πνεύμονας, ένα πολύπλοκο όργανο του αναπνευστικού μας συστήματος που σχετίζεται με την πρόσληψη του οξυγόνου από τον ατμοσφαιρικό αέρα και την απόδοση του διοξειδίου του άνθρακα σε αυτόν. Μετά τους πνεύμονες το αίμα κυκλοφορεί μέσω του κυκλοφορικού μας συστήματος σε όλο το σώμα μας οξυγονώνοντας όλους τους ιστούς.[1]

Αποτελείται από την έξω επιφάνεια που βρίσκεται σε επαφή με το πλευρικό τοίχωμα και την έσω που έρχεται σε επαφή με την καρδιά. Οι πνεύμονες περιβάλλονται εξωτερικά από υμένα, τον υπεζωκότα. Αυτός βρίσκεται μεταξύ του πνεύμονα και του θώρακα και σχηματίζει την κοιλότητα του υπεζωκότα στην οποία υπάρχει μικρή ποσότητα υγρού το οποίο ονομάζεται πλευρικό υγρό.[2]

Οι άνθρωποι έχουν δύο πνεύμονες στην περιοχή του θώρακα. Ο κάθε πνεύμονας υποδιαιρείται σε πιο μικρά τμήματα, τα οποία ονομάζονται λοβοί. Ο δεξιός πνεύμονας αποτελείται από τρεις λοβούς (τον άνω, μέσο και κάτω λοβό). Αντίθετα ο αριστερός πνεύμονας, που είναι λίγο μικρότερος, αποτελείται από δύο λοβούς (τον άνω και κάτω). Ο πνεύμονας γεμίζει με τον ατμοσφαιρικό αέρα που εισέρχεται από το στόμα και τη μύτη, διέρχεται από τον φάρυγγα, τον λάρυγγα και την τραχεία με αποτέλεσμα να καταλήξει στους πνεύμονες. Κατόπιν, η τραχεία διακλαδίζεται με την μορφή κλαδιών ενός δένδρου σε μικρούς αεραγωγούς (μικρούς σωλήνες) και καταλήγει σε κάποιους μικρούς σάκους, που ονομάζονται κυψελίδες και στις οποίες πραγματοποιείται η ανταλλαγή των αερίων. [1][2]

Το αναπνευστικό σύστημα εμποδίζει την είσοδο επιβλαβών ουσιών στους πνεύμονες χρησιμοποιώντας μικρές τρίχες στη μύτη ,οι οποίες λειτουργούν ως σύστημα καθαρισμού του αέρα, αλλά και βλέννα, η οποία παράγεται στην τραχεία και στους βρογχικούς σωλήνες προκειμένου να διατηρεί υγρές τις διόδους αέρα και να συμβάλλει στη συλλογή της σκόνης, των βακτηρίων και άλλων ουσιών. Τέλος, για τον ίδιο σκοπό το αναπνευστικό σύστημα χρησιμοποιεί και την σαρωτική κίνηση των βλεφαρίδων , που είναι μικρές τρίχες στην αναπνευστική οδό, προκειμένου να διατηρούνται καθαρές οι δίοδοι αέρα.

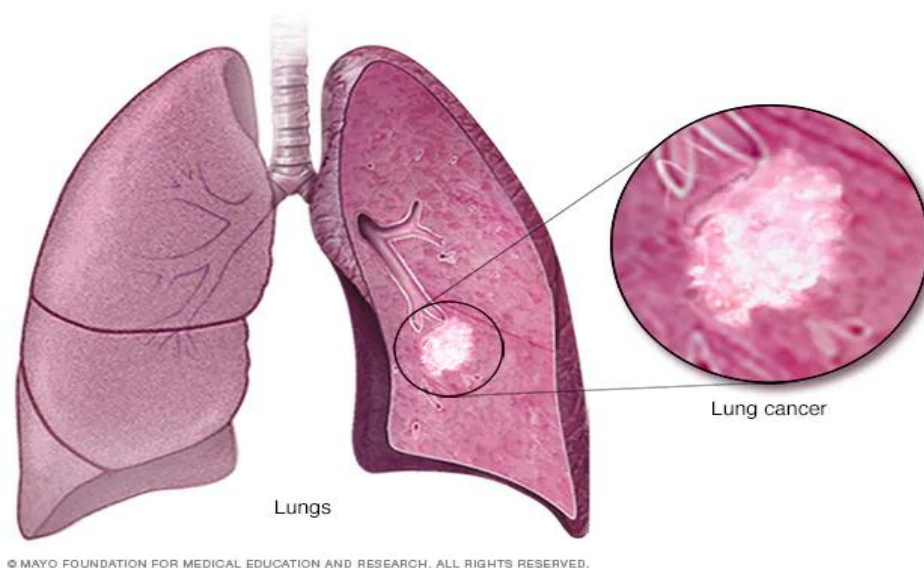


Εικόνα 1: η ανατομία των πνευμόνων

Οι άνθρωποι μπορούν να ζήσουν ακόμα και αν αφαιρεθούν οι λοβοί του πνεύμονα. Μπορούν να ζουν ακόμη και με τον έναν μόνο πνεύμονα.[2]

Υπάρχουν διάφορες παθήσεις που σχετίζονται με τους πνεύμονες. Μερικές είναι μικρής σημασίας και προσωρινές, ενώ άλλες είναι χρόνιες και περισσότερο σοβαρές. Τέτοιες είναι το άσθμα, η βρογχίτιδα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), ο COVID-19, η κυστική ίνωση, η γρίπη, ο καρκίνος του πνεύμονα, η πνευμονία, η πνευμονική ίνωση, οι πνευμονικοί όζοι, ο ιός RSV και η φυματίωση.

Μια από τις παθήσεις που σχετίζονται με τους πνεύμονες είναι όπως αναφέρθηκε ο καρκίνος του πνεύμονα, ο οποίος αποτελεί και το πεδίο μελέτης της παρούσας εργασίας. Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί ένα είδος καρκίνου που αρχίζει από τα κύτταρα και τους ιστούς των πνευμόνων και δύναται να κάνει μεταστάσεις σε κάποια άλλα σημεία του ανθρώπινου σώματος. Όπως όλοι οι τύποι καρκίνου έτσι και αυτός είναι μια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη κυττάρων. Στον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, όπως φανερώνει και το όνομα του η ανάπτυξη αυτή ξεκινάει στους ιστούς του πνεύμονα. Στην περίπτωση που δε θεραπευθεί, ο ανεξέλεγκτος αυτός πολλαπλασιασμός υπάρχει περίπτωση να εξαπλωθεί και πέρα από τον πνεύμονα με μια διαδικασία γνωστή ως μετάσταση σε κοντινό ιστό και, εν τέλει, σε άλλα μέρη του ανθρώπινου σώματος. Οι πλειοψηφία των καρκίνων που αρχίζουν στον πνεύμονα, οι οποίοι ονομάζονται πρωτογενείς καρκίνοι του πνεύμονα, αποτελούν καρκινώματα τα οποία προέρχονται από τα επιθηλιακά κύτταρα. Παρά το γεγονός ότι είναι πολύ ψηλά στην λίστα των αιτιών θανάτου σε όλο τον κόσμο, την ίδια στιγμή είναι και ένας καρκίνος ο οποίος προλαμβάνεται εύκολα δια μέσου της αποφυγής του καπνίσματος, συμπεριλαμβάνοντας και το παθητικό κάπνισμα. Στη δικιά μας χώρα, ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον συχνότερο καρκίνο που συναντάται στους άνδρες και τον δεύτερο συχνότερο στις γυναίκες.[3], [4]



Εικόνα 2 ο καρκίνος του πνεύμονα ξεκινά στα κύτταρα των πνευμόνων.

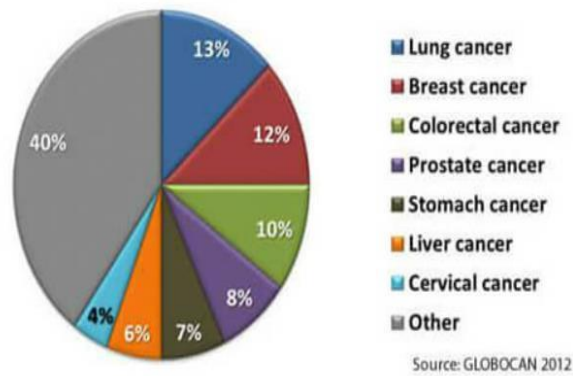
1.2. Επιδημιολογία

Η αύξηση των περιστατικών του καρκίνου η οποία παρατηρείται τα τελευταία χρόνια οφείλεται σε διάφορους παράγοντες όπως είναι η υπογονιμότητα, η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης καθώς και οι αλλαγές του σύγχρονου τρόπου ζωής. Όλοι αυτοί οι παράγοντες έχουν οδηγήσει παγκόσμια σε αύξηση γενικά των μη μεταδιδόμενων νοσημάτων, που στην πλειοψηφία τους αφορούν χρόνιες παθήσεις. Συγκεκριμένα, σε περιόδους οικονομικής και κοινωνικής κρίσης εμφανίζεται αύξηση του φορτίου των χρόνιων νοσημάτων, όπως ο καρκίνος, που σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ) πήρε την πρώτη θέση ανάμεσα στις αιτίες θνησιμότητας σε όλο τον κόσμο το 2011, μετατοπίζοντας στη δεύτερη θέση τα καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σε παγκόσμιο επίπεδο το 2018 διαγνωσθήκαν 18.1 εκατομμύρια νέα περιστατικά και καταγράφηκαν 9.6 εκατομμύρια θάνατοι. Εκτιμάται ότι 1 στους 5 άντρες και 1 στις 6 γυναίκες θα εμφανίσουν καρκίνο κατά τη διάρκεια της ζωής τους, καθώς και 1 στους 8 άντρες και 1 στις 11 γυναίκες θα πεθάνουν από τη νόσο αυτή.[5], [6]

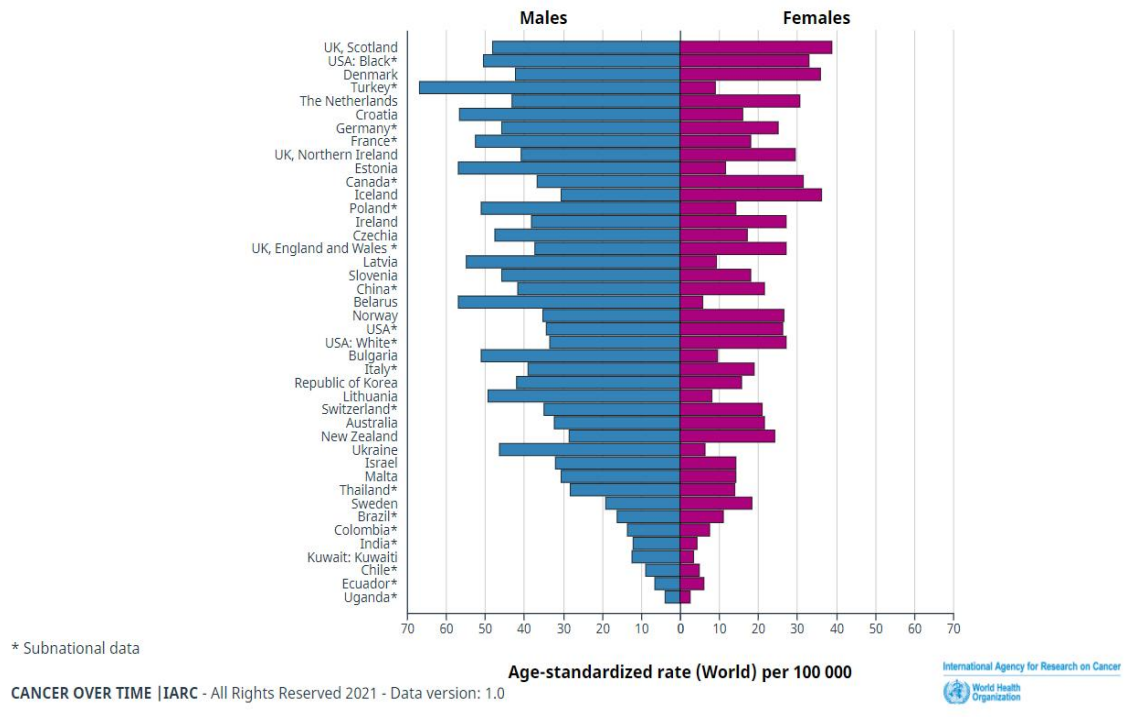
Η διαφορά στην συχνότητα συγκεκριμένων τύπων καρκίνων που εμφανίζεται, συνδέεται με κοινωνικούς αλλά και οικονομικούς παράγοντες. Ιδικά στις ταχέως αναπτυσσόμενες οικονομίες καταγράφεται μία στροφή από τους τύπους καρκίνου που σχετίζονται με τη φτώχεια και τις λοιμώξεις στους καρκίνους που έχουν σχέση με τον τρόπο ζωής των ανεπτυγμένων χωρών.

Οι τύποι καρκίνου οι οποίοι διαγιγνώσκονται πιο συχνά σε παγκόσμιο επίπεδο είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, του μαστού στις γυναίκες, και του παχέος εντέρου. Σχετικά με την θνησιμότητα οι αναφερόμενοι τύποι καρκίνου, βρίσκονται στους πέντε πρώτους. [5], [6], [7]



Εικόνα 3 οι πιο κοινοί τύποι καρκίνου το 2012

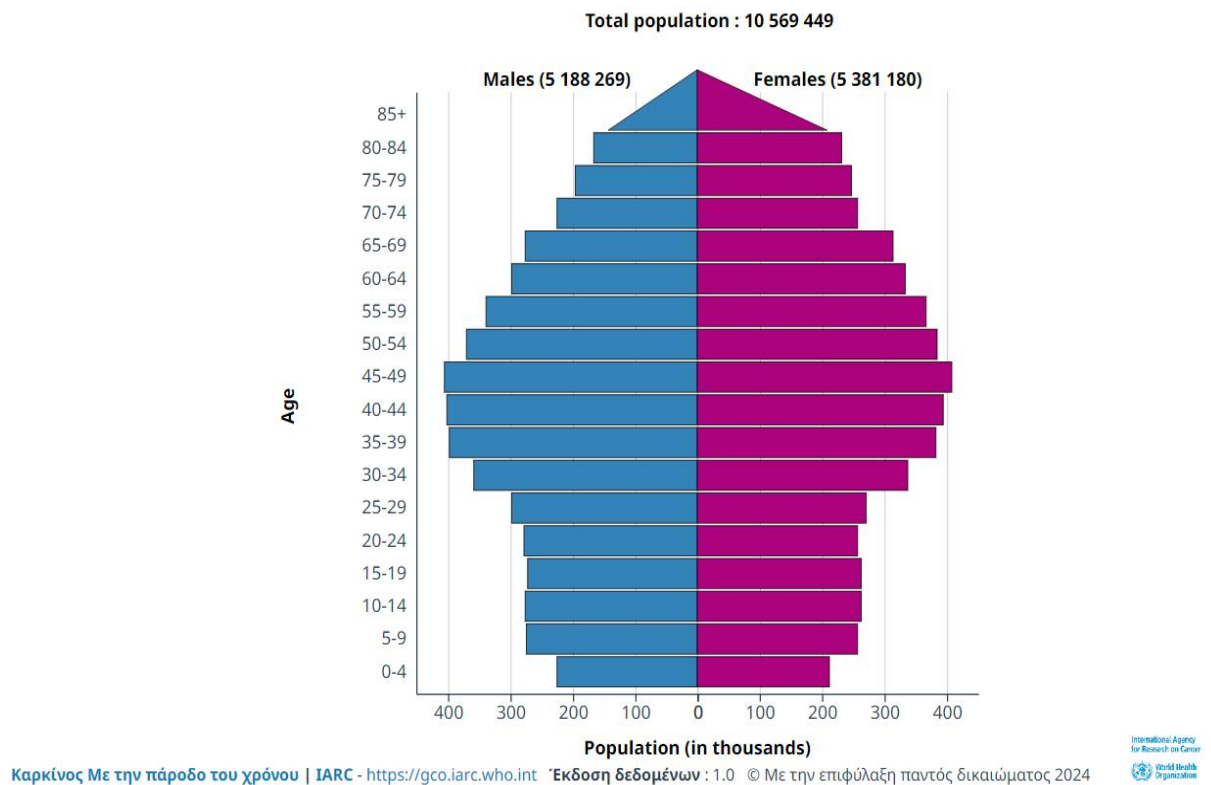
Από τα δεδομένα της Διεθνούς έκθεσης του καρκίνου GLOBOCAN της IARC (Internation Agency for Research on Cancer) (Εικόνα 4) η νόσος παραμένει ο συνηθέστερος τύπος καρκίνου στους άνδρες παγκοσμίως με τα υψηλότερα ποσοστά ανά ηλικία (0-85+) να αναφέρονται στην Ανατολική και Κεντρική Ευρώπη και στην Ανατολική Ασία. Χαμηλά ποσοστά εμφάνισης καταγράφονται στη Μέση και στη Δυτική Αφρική. Στις γυναίκες, τα ποσοστά, όπως παρατηρείται, είναι χαμηλότερα και το γεωγραφικό μοντέλο παρουσιάζει διαφοροποίηση, κυρίως εξαιτίας της διαφορετικής ιστορικής έκθεσης στο κάπνισμα. Συνεπώς, οι πιο υψηλοί ρυθμοί καταγράφονται στη Βόρεια Αμερική και στη Βόρεια Ευρώπη και οι χαμηλότεροι ρυθμοί στη Δυτική και στη Μέση Αφρική.[7], [8]



Εικόνα 4 Δεδομένα της GLOBOCAN σχετικά με την εμφάνιση του καρκίνου του πνεύμονα, βάση του φύλου σε παγκόσμιο επίπεδο για το έτος 2012.

Όσο αφορά την Ελλάδα, σύμφωνα με την αναφορά του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το 2014 οι καρκίνοι που σημειώνουν τα μεγαλύτερα ποσοστά θνησιμότητας σε σειρά είναι ο καρκίνος του πνεύμονα, ο καρκίνος του προστάτη και ο καρκίνος του παχέος εντέρου στους άντρες και ο καρκίνος του μαστού, ο καρκίνος του παχέος εντέρου και ο καρκίνος του πνεύμονα στις γυναίκες. Η χώρα μας μεταξύ των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης κατέχει την 15η θέση όσο αφορά την πιθανότητα εμφάνισης του καρκίνου του πνεύμονα. Περισσότερα από 3000 άτομα κάθε χρόνο προσβάλλονται από την νόσο.[9], [10]

Στην Εικόνα 5 παρατηρούμε δεδομένα για την θνησιμότητα στην Ελλάδα από καρκίνο του πνεύμονα, στους άντρες και στις γυναίκες, σύμφωνα με την ηλικιακή του ομάδα. Τα δεδομένα αντλήθηκαν από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας και αφορούν τα πιο πρόσφατα στατιστικά δεδομένα του έτους 2017.



Εικόνα 5 Δεδομένα της GLOBOCAN σχετικά με την θνησιμότητα του καρκίνου, βάση του φύλου στην Ελλάδα για το έτος 2017.

1.3. Διάκριση των τύπων του καρκινικού όγκου του πνεύμονα

Οι καρκίνοι του πνεύμονα ταξινομούνται ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο. Η συντριπτική πλειοψηφία των καρκίνων του πνεύμονα αποτελούν καρκινώματα-κακοήθειες οι οποίες προκύπτουν από τα επιθηλιακά κύτταρα. Τα καρκινώματα του πνεύμονα κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με το μέγεθος και την εμφάνιση των κακοηθών κυττάρων καθώς και με τρόπο ανάπτυξής τους, τα οποία δύναται να παρατηρηθούν στο μικροσκόπιο. Αυτή η μορφολογική διάκριση των κακοηθών κυτταρικών και του τρόπου ανάπτυξεως του καρκίνου στο μικροσκόπιο πραγματοποιείται με χρώση των ιστολογικών τομών με αιματοξυλίνη - ηωσίνη είτε με προσθήκη συγκεκριμένων χρώσεων για την αναζήτηση βλέννας, όπως καθορίζει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO). Η απλή αυτή μέθοδος βοηθάει τους γιατρούς στην διάγνωση ρουτίνας. Όταν όμως κρίνεται απαραίτητη η επίλυση συνθέτων διαγνωστικών προβλημάτων χρησιμοποιούνται στις μέρες μας εξειδικευμένες διαγνωστικές

μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τον συνδυασμό της κοινής μικροσκοπίας με τον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο ή της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Μέσω των μεθόδων αυτών βοηθάτε η κατανόηση των ετερογενών χαρακτήρων του καρκίνου του πνεύμονα, η κυτταρική του διαφοροποίηση, όπως και οι ιστογενετικές κατηγορίες τύπων και υποτύπων. Οι συχνότεροι τύποι του κακοήθους καρκινικού όγκου είναι ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα. Καθένας από αυτούς τους τύπους διακρίνεται σε επιμέρους κατηγορίες. [11]

▪ Μη-μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (NSCLC) αποτελεί τον πιο κοινό τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Πάνω από το 80% των περιπτώσεων καρκίνου του πνεύμονα ανήκουν σε αυτή την κατηγορία. Ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί μια κατηγορία η οποία περιλαμβάνει διάφορους τύπους καρκίνου του πνεύμονα, όπως το καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο, το αδеноκαρκίνωμα και το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα.

i) Αδеноκαρκίνωμα

Περίπου το 40% των καρκίνων του πνεύμονα ανήκουν στην κατηγορία που χαρακτηρίζεται ως αδеноκαρκίνωμα. Η αυξημένη αυτή συχνότητα εμφάνισης σήμερα έρχεται σε αντίφαση με παλαιότερα, που τα αδеноκαρκινώματα εμφανίζονταν σπάνια. Η αύξηση αυτή της εμφάνισης τους, κυρίως στις γυναίκες, είναι πιθανόν να είναι σε κάποιο βαθμό αποτέλεσμα της καλύτερης παθολογοανατομικής διάγνωσης, αφού μικροσκοπικά τα αδеноκαρκινώματα εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τους αδιαφοροποίητους όγκους από μεγάλα κύτταρα.

Συνήθως εντοπίζονται σε περιφερικούς ιστούς των πνευμόνων και σε παλιές ουλές των πνευμόνων, όπου βρίσκονται τα αδενικά κύτταρα του βρογχικού βλεννογόνου από τα οποία και προέρχονται.

Η πλειονότητα των περιπτώσεων του αδеноκαρκινώματος έχει στενή σχέση με το κάπνισμα. Παρόλα αυτά εμφανίζεται και σε άτομα που δεν είναι καπνιστές. Για παράδειγμα, ένας τύπος αδеноκαρκινώματος, που ονομάζεται

βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα, είναι συχνότερο σε γυναίκες μη καπνίστριες. Αυτός ο τύπος αδενοκαρκινώματος διαχωρίζεται σε θηλώδη και σε ηθμοειδή υπότυπο, οι οποίοι πολλές φορές αλληλοεπικαλύπτονται και απαντάται με 3 διαφορετικούς τρόπους, ως περιφερειακός όζος (κυρίως στους άνω λοβούς), ως πολλαπλοί όζοι και τέλος με τη μορφή πνευμονίας. Εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες. Η ηλικία εμφάνισης έχει παρατηρηθεί ότι είναι συνήθως νεότερη συγκριτικά με τα άλλα είδη καρκίνου του πνεύμονα.

ii) Καρκίνωμα από πλακώδες επιθήλιο (Squamous cell carcinoma- SCC)

Το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων ξεκινά συνήθως από τους κεντρικούς βρόγχους. Εμφανίζεται πιο συχνά στους άνδρες και στους καπνιστές. Πολλές φορές αναπτύσσεται κοντά σε μεγάλους βρόγχους, δηλαδή κεντρικά και σχετίζονται με την πλακώδη μεταπλασία στα αρχικά στάδια τους. Επίσης, υπάρχει περίπτωση να προκαλέσει αιμόπτυση. Το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων αποτελεί περίπου το 30% των καρκίνων του πνεύμονα. Μια κοίλη κοιλότητα η οποία σχετίζεται με νέκρωση υπάρχει τις περισσότερες φορές στο κέντρο του όγκου.

Ο χρόνος διπλασιασμού τους, φαίνεται να είναι περίπου 100-120 ημέρες και θεωρείται ότι προκαλούν δυσκολότερα μεταστάσεις από άλλους ιστολογικούς τύπους. Οι συχνότερες μεταστάσεις παρατηρούνται στο ήπαρ, στον εγκέφαλο και στα οστά. Επιδημιολογικές έρευνες συσχετίζουν τους όγκους αυτούς με την μόλυνση του περιβάλλοντος και με το κάπνισμα.

iii) Μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα (Large cell carcinoma-LCC)

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα συναντάται με τη μικρότερη συχνότητα και αντιστοιχεί σε ποσοστό 15% των νεοπλασμάτων του πνεύμονα. Ονομάζεται έτσι λόγω του ότι τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζονται μεγάλα, με περίσσεια κυτταροπλάσματος , μεγάλους πυρήνες και εμφανείς πυρηνίσκους. Διακρίνεται σε γιγαντοκυτταρικό και διαιγοκυτταρικό. Λόγω του ότι πολλά από τα αδιαφοροποίητα μεγαλοκυτταρικά κατατάχθηκαν με τις νέες ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε χαμηλής διαφοροποίησης αδενοκαρκινώματα ή πλακώδη καρκινώματα, η συχνότητα τους μειώθηκε. Παρουσιάζεται συχνότερα στους άνδρες και στους καπνιστές.

Τα καρκινώματα αυτά είναι υψηλής κακοήθειας και έχουν χρόνο διπλασιασμού 60-90 ημέρες. Προκαλούν συχνά μεταστάσεις κυρίως στους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου αλλά και συχνά στο ήπαρ, στα οστά και στον εγκέφαλο.[11], [12]

▪ Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (SCLC)

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος προέρχεται από τα κύρια νευροενδοκρινικά κύτταρα ή κύτταρα Kulchitsky. Τα κύτταρα αυτά παράγουν πεπτιδικές ορμόνες, τις οποίες και εκκρίνουν στον χώρο που τα περιβάλλει προκαλώντας πολλές φορές παρανεοπλασματικά σύνδρομα. Οι περισσότερες περιπτώσεις προκύπτουν στους μεγάλους αεραγωγούς (πρωτογενείς και δευτερογενείς βρόγχοι). Το μικροκυτταρικό καρκίνωμα διακρίνεται παθολογοανατομικά σε τρεις υποομάδες, το λεμφοκυτταρικό, την ενδιάμεση μορφή και την συνδυασμένη ή μικτή.

Ονομάζεται έτσι λόγω του μεγέθους των καρκινικών κυττάρων, όταν παρατηρούνται στο μικροσκόπιο. Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα διακρίνεται σε δύο τύπους, την περιορισμένη νόσο (limited-stage disease-LD) και την εκτεταμένη νόσο (extensive-stage disease-ED).

Αυτός ο τύπος καρκίνου του πνεύμονα συνδέεται άμεσα με το κάπνισμα. Σχεδόν όλοι οι ασθενείς είναι καπνιστές. Πρόκειται για την πιο επιθετική μορφή καρκίνου του πνεύμονα. Πραγματοποιεί γρήγορα μεταστάσεις, ακόμη και πριν καν εμφανιστούν συμπτώματα. Πολλές φορές εντοπίζεται ως ένας σχετικά μικρός όγκος στον πνεύμονα ο οποίος έχει ήδη εξαπλωθεί σε άλλα μέρη του ανθρώπινου σώματός. Ο SCLC αναπτύσσεται πιο γρήγορα και είναι δυσκολότερο να αντιμετωπιστεί από τον NSCLC. Παρόλα αυτά, ο μικροκυτταρικός καρκίνος είναι πιο σπάνιος από τον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες υπάρχουν και άλλοι ιστολογικοί τύποι καρκίνου του πνεύμονα, όπως ο αδеноεπιδερμοειδής καρκίνος, οι καρκινοειδείς όγκοι, το καρκίνωμα βρογχικών αδένων και άλλα καρκινώματα. Οι καρκινικοί αυτοί τύποι είναι λιγότερο συχνοί.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι όλοι οι ιστολογικοί τύποι καρκίνου που έχουν προαναφερθεί είναι κακοήθεις. Εκτός από αυτούς υπάρχουν σαφώς και οι καλοήθεις όγκοι. [11], [13], [14]

1.4. Συμπτώματα της ασθένειας

Ο καρκίνος του πνεύμονα τις περισσότερες φορές δεν προκαλεί συμπτώματα νωρίς. Τα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα εμφανίζονται κυρίως όταν η ασθένεια είναι ήδη προχωρημένη και μπορεί να είναι ήπια ή πιο θορυβώδη.

Τα συμπτώματα του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να περιλαμβάνουν:

- Βήχα που δεν υποχωρεί
- Πόνο στο στήθος
- Βήχα με αίμα, έστω και σε μικρή ποσότητα
- Βραχνάδα
- Δυσκολία στην αναπνοή
- Συριγμός
- Συχνές λοιμώξεις

Τα συμπτώματα που εμφανίζονται όταν ο καρκίνος του πνεύμονα εξαπλώνεται σε άλλα μέρη του σώματος μπορεί να περιλαμβάνουν:

- Πόνο στα οστά
- Πονοκέφαλο
- Αδυναμία χωρίς προσπάθεια
- Απώλεια όρεξης
- Πρήξιμο στο πρόσωπο ή το λαιμό[11], [13]

1.5. Αίτια καρκίνου του πνεύμονα

Τα καρκινικά κύτταρα όπως έχει προαναφερθεί είναι φυσιολογικά κύτταρα του σώματος τα οποία έχουν αποκτήσει μεταλλάξεις που εμποδίζουν τον φυσιολογικό κύκλο ζωής τους. Τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, ανεξέλεγκτα και παρεμβαίνουν στα φυσιολογικά κύτταρα. Δεν είμαστε σίγουροι ακόμα και σήμερα για το τι προκαλεί αυτές τις αλλαγές που οδηγούν σε

καρκίνο του πνεύμονα. Ενώ η ακριβής αιτία διερευνάται, υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που θεωρείται ότι μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλότερο κίνδυνο για βλάβη στα κύτταρα και εν τέλει να προκαλέσουν καρκίνο του πνεύμονα. Τέτοιοι παράγοντες που ευνοούν την ανάπτυξη του καρκίνου του πνεύμονα είναι οι παρακάτω:

- **Το κάπνισμα**

Το κάπνισμα κάθε είδους προϊόντος καπνού, όπως τσιγάρα, πούρα ή πίπες είναι ο μεγαλύτερος αιτιολογικός παράγοντας του καρκίνου του πνεύμονα, ιδιαίτερα στην περίπτωση των παθολογοανατομικών τύπων του μικροκυτταρικού και του πλακώδους επιθηλίου. Οι ειδικοί εκτιμούν πως το 80% των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα συσχετίζονται με το κάπνισμα.

Οι ερευνητές θεωρούν ότι το κάπνισμα οδηγεί σε καρκίνο του πνεύμονα καταστρέφοντας τα κύτταρα που επενδύουν τους πνεύμονες. Ο καπνός του τσιγάρου είναι γεμάτος καρκινογόνες και μεταλλαξιογόνες ουσίες. Αυτές οι καρκινογόνες ουσίες προκαλούν αλλαγές στον πνευμονικό ιστό. Αρχικά, το ανθρώπινο σώμα μπορεί να είναι σε θέση να επιδιορθώσει τέτοιες βλάβες. Αλλά μετά από κάθε επαναλαμβανόμενη έκθεση, τα υγιή κύτταρα που επενδύουν τους πνεύμονες καταστρέφονται όλο και περισσότερο. Όσο ο καιρός περνάει, προκαλείται αλλαγή των κυττάρων και τελικά μπορεί να αναπτυχθούν καρκινικά κύτταρα.

Επιδημιολογικά στοιχεία δείχνουν ότι ο κίνδυνος γίνεται μικρότερος σε σχέση με τα χρόνια από την διακοπή του καπνίσματος. Η διακοπή του καπνίσματος μειώνει κατά 30-50% τον κίνδυνο για καρκίνο του πνεύμονα μετά από 10 έτη συγκριτικά με όσους συνεχίζουν να καπνίζουν. Δεκαπέντε χρόνια μετά την διακοπή του καπνίσματος ο κίνδυνος για καρκίνο του πνεύμονα μειώνεται σχεδόν στο επίπεδο των ατόμων εκείνων που δεν κάπνισαν ποτέ.

Στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα δεν συμβάλλει μόνο το κάπνισμα, αλλά και το παθητικό κάπνισμα. Το παθητικό κάπνισμα οδηγεί στην δημιουργία νεοπλασμάτων του πνεύμονα. Ενήλικες που διαμένουν με καπνιστές έχουν 20- 30% περισσότερες πιθανότητες να νοσήσουν από καρκίνο του πνεύμονα, συγκριτικά με ενήλικες που δεν έρχονται σε καθημερινή επαφή με καπνιστές.

- **Έκθεση σε επιβλαβείς ουσίες**

Η έκθεση σε επιβλαβείς ουσίες, όπως το ραδόνιο, ο αμίαντος, το ουράνιο, τα καυσαέρια ντίζελ, το πυρίτιο, το αρσενικό, το χρώμιο, το νικέλιο. και τα προϊόντα άνθρακα μπορεί να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα. Η έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες μπορεί να πραγματοποιείται πολλές φορές και στο χώρο εργασίας.

Συγκεκριμένα, το ραδόνιο παράγεται από τη φυσική διάσπαση του ουρανίου στο έδαφος, στους βράχους και στο νερό. Το ραδόνιο αποτελεί φυσική πηγή ακτινοβολίας. Το ραδόνιο από το έδαφος αποτελεί τον δεύτερο πιο συχνό παράγοντα κινδύνου για τον καρκίνο του πνεύμονα, που αναλογίζεται στο 10% των περιπτώσεων. Είναι ένα άχρωμο, άοσμο, άγευστο και χημικά αδρανές αέριο. Εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού και παράγει σωμάτια α, τα οποία διασπώνται σε πολώνιο και κατόπιν σε βισμούθιο. Αυτά όπως εισπνέονται, προκαλούν βλάβες στους πυρήνες των κυττάρων του επιθηλίου του βρογχικού βλεννογόνου, με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Βρίσκεται σε αφθονία σε σπίτια και κτήρια που δεν αερίζονται επαρκώς.

Άλλη μια ιδιαίτερα επιβλαβής ουσία, όπως αναφέρθηκε, είναι οι ίνες αμιάντου. Ο αμίαντος ανήκει σε μία ομάδα πυριτικών ορυκτών ινών. Λόγω της αντοχής του, έχει ευρεία χρήση (πάνω από 3.000 εφαρμογές). Ο αμίαντος συνδέεται άμεσα με την ανάπτυξη κακοήθους μεσοθηλιώματος του υπεζωκότα. Θεωρείται ότι το 5-7% όλων των καρκίνων του πνεύμονα, σχετίζεται με την επαγγελματική έκθεση στον αμίαντο. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση ο αμίαντος έχει απαγορευτεί από το 2005.

- **Ατμοσφαιρική ρύπανση**

Η δεύτερη κύρια αιτία καρκίνου του πνεύμονα είναι η ατμοσφαιρική ρύπανση, στις μέρες μας. Οι ατμοσφαιρικοί ρύποι μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως ρύποι PM (στερεοί και υγροί) ή αέριοι.

Η ατμοσφαιρική ρύπανση από τους αέριους ρύπους οφείλεται κυρίως στους ρύπους που προκύπτουν από τα αυτοκίνητα, τα συστήματα θέρμανσης

καθώς και την καύση απόβλητων. Οι καρκινογόνες ουσίες που προέρχονται από την καύση ορυκτών καυσίμων περιλαμβάνουν καρκινογόνες ουσίες.

Το PM είναι το μείγμα στερεών και υγρών σωματιδίων που ομαδοποιούνται κατά αεροδυναμική διάμετρο. Τα PM αποτελούνται από διάφορες χημικές ενώσεις οι οποίες περιλαμβάνουν πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAHs), ενώσεις n-Nitroso όπως νιτροζαμίνες και άλλες σχετικές ενώσεις. Ο μολυσμένος αέρας περιέχει τουλάχιστον δύο τύπους καρκινογόνων ουσιών, τα PAH και τις ενώσεις n-nitroso, όπως οι νιτροζαμίνες. Το 2013, ο Διεθνής Οργανισμός Έρευνας για τον Καρκίνο αποκάλυψε ότι τα PM 2,5 (έχουν αεροδυναμική διάμετρο μικρότερη από 2,5 microns) είναι καρκινογόνα και συντελούν στην εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. Τα PM 2,5 έχουν υψηλές συγκεντρώσεις PAH, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες και ενεργοποίηση του υποδοχέα υδρογονάνθρακα αρυλίου σε ανθρώπινα βρογχικά επιθηλιακά κύτταρα (BEAS-2B). Η ενεργοποίηση αυτή του υποδοχέα υδρογονάνθρακα αρυλίου προάγει την εισβολή και τη μετάσταση στα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα. Άλλοι τέτοιοι ρύποι που σχετίζονται με την νόσο είναι τα PM 10, τα ολικά αιωρούμενα σωματίδια και άλλα κοινά συστατικά της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, όπως οξείδια του αζώτου.

Με την πάροδο των χρόνων η ατμοσφαιρική ρύπανση φαίνεται να είναι ένας όλο και πιο σημαντικός παράγοντας για την εμφάνιση της νόσου. Έχει υπολογιστεί ότι 265.267 θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα παγκοσμίως αποδίδονται στη ρύπανση από PM 2,5, αριθμός που αντιπροσωπεύει το 14,1% όλων των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα το 2017. Πρόσφατα, ο Διεθνής Οργανισμός Υγείας μείωσε την ετήσια μέση κατευθυντήρια γραμμή για την ποιότητα του αέρα όσο αφορά τα PM 2,5 από 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ σε 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

▪ Προηγούμενη ακτινοθεραπεία

Κάνοντας προηγούμενες θεραπείες ακτινοβολίας στο στήθος για την αντιμετώπιση άλλων ασθενειών (για παράδειγμα, για καρκίνο του μαστού ή λέμφωμα), μπορεί να αυξηθεί ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα. Όταν το σώμα εκτίθεται στην ακτινοβολία, αυτή διαπερνά τα κύτταρα του ανθρώπινου σώματος και τους επιφέρει αλλαγές, δημιουργώντας σε κάποιες

περιπτώσεις καρκινικά κύτταρα. Κάποιοι ιστοί είναι περισσότερο και άλλοι λιγότερο ευαίσθητοι στην ακτινοβολία.

▪ Γενετικοί παράγοντες

Κάποιοι άνθρωποι έχουν γενετική προδιάθεση για καρκίνο των πνευμόνων. Άτομα με γονέα, αδέρφια ή παιδί με καρκίνο του πνεύμονα, δηλαδή με οικογενειακό ιστορικό έχουν αυξημένο κίνδυνο της νόσου. Σε συγγενείς ατόμων με καρκίνο των πνευμόνων, ο κίνδυνος αυξάνεται κατά 2,4 φορές. Επομένως, η γενετική προδιάθεση και η κληρονομικότητα παίζουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά τον καρκίνο του πνεύμονα. Μέσω του μοριακού ελέγχου έχουν ανακαλυφθεί πολλαπλές ανωμαλίες, όπως μεταθέσεις, προσθήκες, ελλείψεις χρωμοσωμικών τόπων, ενίσχυση και υπερέκφραση γονιδίων, οι οποίες οδηγούν σε τροποποίηση του DNA. Οι πιο συχνές γενετικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα σχετίζονται με σημειακές μεταλλάξεις στα γονίδια p53 και K-ras καθώς και ελλείψεις στα χρωμοσώματα 3p, 5p, 9p, 17q, 18q, 22q. Σήμερα πραγματοποιούνται με εντατικό ρυθμό έρευνες προς την κατεύθυνση της ανεύρεσης της παθογένεσης βάσει της χρωμοσωμιακής και γονιδιακής χαρτογράφησης.[13], [15], [16], [17][18]

1.6. Σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα

Η σταδιοποίηση του καρκίνου του πνεύμονα είναι η αξιολόγηση του βαθμού της εξάπλωσης του καρκίνου από την αρχική του προέλευση σε διάφορα χρονικά σημεία κατά τη διαδρομή του. Η σταδιοποίηση της συγκεκριμένης νόσου κρίνεται απαραίτητη σε κλινικό, παθολογοανατομικό αλλά και χειρουργικό επίπεδο, όχι μόνο διότι με τον τρόπο αυτό μπορούν να πραγματοποιηθούν προβλέψεις για την πρόγνωση της ασθένειας, αλλά και επειδή συνήθως ανάλογα με το στάδιο του επιλέγεται διαφορετική θεραπευτική μέθοδος. Αφορά κυρίως το μη μικροκυτταρικό καρκίνο δεδομένου του γεγονότος ότι ο μικροκυτταρικός καρκίνος κατά τη στιγμή της διάγνωσης έχει είτε ακτινολογικά διεύρυνση μεσοθωρακίου είτε εξωθωρακική νόσο είτε και τα δύο στο 95% των περιπτώσεων.

Από το 1985, έχει συμφωνηθεί διεθνώς η χρήση ενός συστήματος, το οποίο είναι ένα ιδανικό σύστημα σταδιοποίησης για την ακριβή περιγραφή της έκτασης της νόσου. Το σύστημα αυτό που χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα είναι το λεγόμενο TNM και προτάθηκε αρχικά από τον Denoix τη δεκαετία του 1940. Το TNM περιγράφει 3 παράγοντες:

- Την έκταση του πρωτοπαθούς όγκου που παριστάνεται με το γράμμα T (Tumor factor). Το γράμμα T ακολουθείται από έναν αριθμό από το 1 μέχρι το 4. Έτσι ο πρωτογενής όγκος υποδιαιρείται σε κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθος της ογκοτικής μάζας, με την θέση της και με την τοπική διήθηση των πέριξ αυτού ιστών.
- Την έκταση της νόσου στους λεμφαδένες, που συμβολίζεται με το γράμμα N (Nodule factor), ακολουθούμενο από ανάλογους αριθμητικούς δείκτες. Η έκταση της νόσου στους λεμφαδένες, καθορίζεται από τις ομάδες λεμφαδένων στις οποίες η νόσος έχει διηθήσει.
- Τέλος, την παρουσία ή όχι μεταστάσεων, που συμβολίζεται με το γράμμα M (Metastasis factor). Το γράμμα αυτό ακολουθείται πάντοτε από αριθμητικούς δείκτες, που φανερώνουν την απουσία ή ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλους ιστούς και όργανα.

Τον καρκίνο του πνεύμονα τον διακρίνουμε σε 4 στάδια, όπως φανερώνει ο Πίνακας 2. Αναφορικά με τον μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι περισσότεροι ογκολόγοι διακρίνουν δύο στάδια, αυτό της περιορισμένης νόσου, που περιλαμβάνει τις κατηγορίες I,II και IIIA και αυτό της εκτεταμένης νόσου, που περιλαμβάνει τις κατηγορίες IIIB και IV (πίνακας 3). Τα δύο αυτά στάδια έχουν διαφορετικό τρόπο αντιμετώπισης. Στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα η πρόγνωση αλλά και η θεραπεία είναι διαφορετική για κάθε στάδιο. [19], [20], [21]

Πίνακας 1 : Επεξηγήσεις συμβόλων συστήματος TNM

T : Πρωτοπαθής εστία	TX	Θετικά κακοήγη κύτταρα, μη εμφανής βλάβη
	T1	Όγκος < 3 εκ., περιβάλλεται από παρέγχυμα ή υπεζωκότα, δεν διηθεί λοβαίο 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
	T3	Ο όγκος είναι μεγαλύτερος από 7 cm ή παρουσιάζει ένα εκ των ακόλουθων: ▪ Έκταση του όγκου κατά συνέχεια ιστού στον υπεζωκότα, στο περικάρδιο, στο θωρακικό τοίχωμα, στο διάφραγμα. ▪ Απέχει < 2 εκ. από την τρόπιδα ▪ Ο όγκος προκαλεί ατελεκτασία ή αποφρακτική πνευμονίτιδα ολόκληρου του πνεύμονα

	T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί όργανα όπως το Μεσοθωράκιο, η Καρδιά, τα μεγάλα αγγεία, η Τραχεία, ο Οισοφάγος, το Παλίνδρομο λαρυγγικό νεύρο Παρατηρείται ίσως συνύπαρξη ξεχωριστών οζιδίων σε διαφορετικό ομόπλευρο βρόγχο.
--	----	---

N: λεμφαδενικές διηθήσεις	N0	Δεν υπάρχει διήθηση
	N1	Σύστοιχοι βρογχοπνευμονικοί ή πυλαίοι
	N2	Σύστοιχοι ή υποτροπιδικοί του μεσοθωρακίου Σύστοιχοι υπερκλείδιοι
	N3	Αμφο- ή ετερόπλευροι μεσοθωρακίου ή υπερκλείδιοι

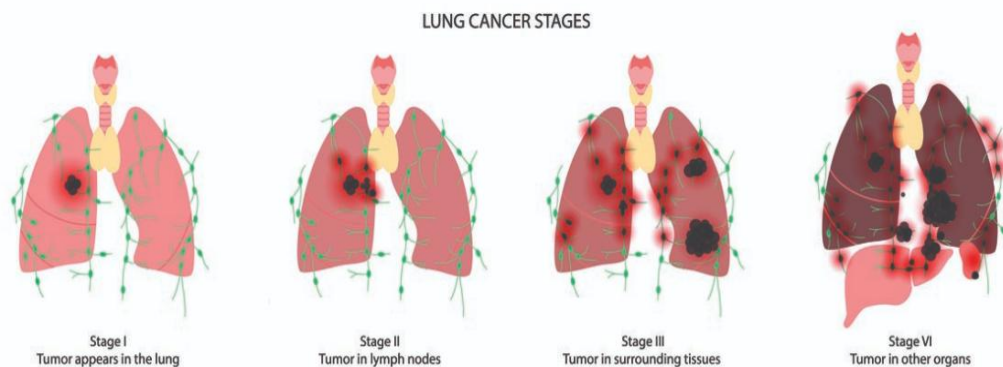
M: Μεταστάσεις	M0	Δεν υπάρχει μετάσταση
	M1	Παρουσία μεταστάσεων

Πίνακας 2 : στάδια καρκίνου του πνεύμονα

ΣΤΑΔΙΟ	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	5ετής επιβίωση για μη μικροκυτταρικό καρκίνο
I	T1-2, N0, M0	60-80%
II	T1-2, N1, M0	25-50%
IIIA	T3, N0-1, M0 T1-3, N2, M0	25-40% 10-30%
IIIB	T4, οποιοδήποτε N, M0 Οποιοδήποτε T, N3, M0	<5%
IV	Οποιοδήποτε T, οποιοδήποτε N, M1	<5%

Πίνακας 3: στάδια μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

ΣΤΑΔΙΟ	5ετής επιβίωση
Περιορισμένη νόσος (I, II, IIIA)	7%
Εκτεταμένη νόσος (IIIB, IV)	<1%



Εικόνα 6 στάδια καρκίνου του πνεύμονα[22]

1.7. Διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα

Η διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα μπορεί να αποτελέσει μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων, που περιλαμβάνει διάφορες εξετάσεις προκειμένου να διαγνωστεί η νόσος. Πάντοτε η διερεύνηση κλιμακώνεται από τις απλούστερες προς τις επεμβατικότερες διαγνωστικές μεθόδους. Τελικός προορισμός αποτελεί η προς όφελος του ασθενούς διάγνωση της φύσεως της νόσου, αποφεύγοντας υπερβολές στο πεδίο των διαγνωστικών χειρισμών. Κάποιες για παράδειγμα εξετάσεις είναι περισσότερο επιβλαβείς για τον ανθρώπινο οργανισμό και μπορεί να προκαλέσουν δυνητικά προβλήματα. Οπότε είναι σημαντικό οι εξετάσεις αυτές να μην πραγματοποιούνται αλόγιστα, αλλά μόνο μετά από κάποια ένδειξη για πιθανή ύπαρξη της ασθένειας, την οποία μας παρέχουν άλλες πιο ήπιες τεχνικές. [19], [20]

Το πρώτο και ιδιαίτερα σημαντικό πράγμα που κάνει ένας γιατρός είναι να ακούσει τα συμπτώματά του ασθενούς, να ρωτήσει για το ιστορικό της υγείας του και να πραγματοποιήσει μια φυσική εξέταση, όπως το να ακούσει την καρδιά και τους πνεύμονές του ασθενούς. Το ιστορικό του ασθενούς αλλά και το οικογενειακό ιστορικό πρέπει να καταγράφεται με ιδιαίτερη προσοχή, αφού παθήσεις που πέρασε ο άρρωστος στο παρελθόν ή οι συγγενείς του έχουν άμεση σχέση με την πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα. Ιδιαίτερη σημασία έχει αν ο άρρωστος είναι καπνιστής, σε τι περιβαλλοντολογικές συνθήκες ζει αλλά και ποιες είναι οι συνθήκες εργασίας του.

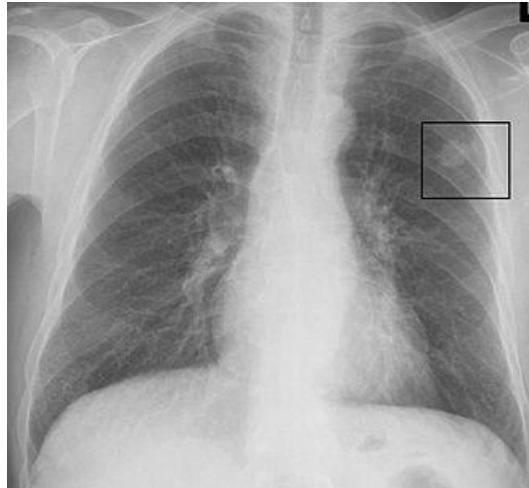
Ακολουθούν βασικές αιματολογικές και βιοχημικές εξετάσεις, όπως το επίπεδο αιμοσφαιρίνης και του ασβέστιο προτού υποβληθεί ο ασθενής σε επεμβατικές μεθόδους. Οι αιματολογικές εξετάσεις δεν μπορούν να ανιχνεύσουν τον καρκίνο, αλλά δίνουν μια σφαιρική εκτίμηση για την καλή λειτουργία των οργάνων του σώματος. Επομένως, αν οι εξετάσεις δεν βγουν ικανοποιητικές και υπάρχει υποψία με βάση το ιστορικό και τα συμπτώματα για καρκίνο του πνεύμονα, ο ιατρός προχωράει σε ακτινογραφία θώρακα.

Στη συνέχεια και κατά περίπτωση χρησιμοποιείται αξονική και μαγνητική τομογραφία, κατά τις οποίες εντοπίζονται πιθανές μεταστάσεις και τι έκταση έχει η νόσος. Επιπλέον, απαιτείται βρογχοσκόπηση και βιοψία για τον καθορισμό του ιστολογικού τύπου. Προκειμένου να βρεθεί το στάδιο στο οποίο έχει προχωρήσει ο καρκίνος και αν υπάρχουν μεταστάσεις σε πιο απομακρυσμένα όργανα εφαρμόζεται η εξέταση PET screening.[19], [20], [21]

Ακολουθεί αναλυτικότερη περιγραφή των τεχνικών διάγνωσης που αναφέρθηκαν.

1. Ακτινογραφία

Οι ακτινογραφίες θώρακα μπορούν να δείξουν αλλαγές στους πνεύμονες. Αποτελεί την βασική και ευκολότερη εξέταση που πραγματοποιείται σε ένα άρρωστο που παραπονείται για συμπτώματα από το αναπνευστικό σύστημα. Η μάζα του όγκου μπορεί να σκιαγραφηθεί, ενώ πολλές φορές, ατελεκτασίες, πλευρικές συλλογές και λεμφαδενικές διογκώσεις των πυλών και του μεσοθωρακίου δύναται να είναι εμφανείς. Οι περισσότεροι όγκοι φαίνονται στη ακτινογραφία ως σκιασμένες περιοχές. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή δεν μπορεί να δώσει μία οριστική διάγνωση, επειδή συχνά δεν έχει την ικανότητα να διακρίνει μεταξύ καρκίνου κι άλλων παθήσεων, όπως το απόστημα των πνευμόνων. Επιπλέον, η ακτινογραφία θώρακος μπορεί να αποκαλύψει αλλοιώσεις διαμέτρου μεγαλύτερης των 6 χιλιοστών. Αλλοιώσεις που βρίσκονται και κοντά σε αγγεία ή σχισμές είναι πιθανόν να διαφύγουν της προσοχής. [20], [21]



Εικόνα 7 Ακτινογραφία θώρακος που απεικονίζει καρκινικό όγκο στον αριστερό πνεύμονα

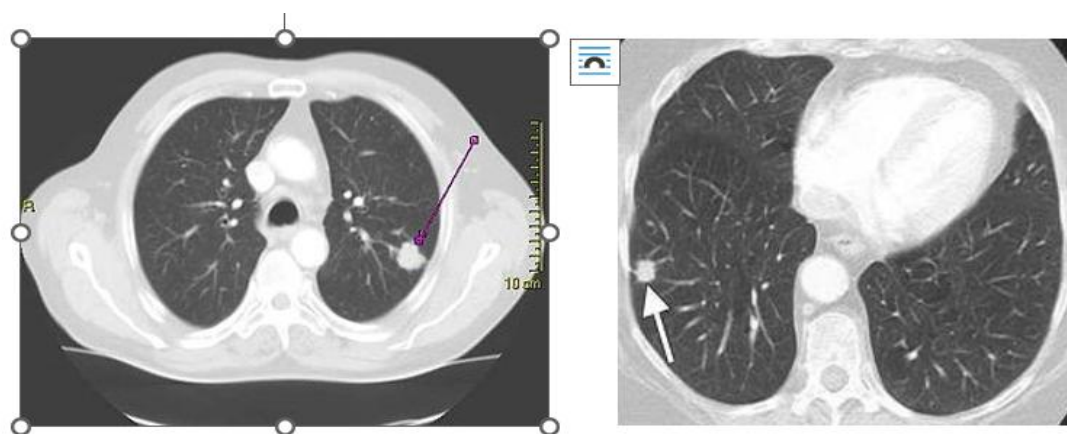
2. Αξονική (CT) και Μαγνητική (MRI) τομογραφία

Η αξονική τομογραφία είναι ακριβέστερη μέθοδος και χρησιμοποιείται προκειμένου να επιβεβαιώσει τις ανωμαλίες, οι οποίες εντοπίζονται στην ακτινογραφία. Με την αξονική τομογραφία μπορούμε επιπλέον να σταδιοποιήσουμε τον όγκο. Στον θώρακα, η τομογραφία αυτή δείχνει με ακρίβεια το μέγεθος του όγκου, την ύπαρξη ύποπτων λεμφαδένων του μεσοθωρακίου και την επέκταση του όγκου στους πυλαίους λεμφαδένες. Κρίνεται επίσης απαραίτητο, εκτός από τον θώρακα να πραγματοποιηθεί αξονική τομογραφία και στην κοιλία του ασθενούς, προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη εξωθωρακικών μεταστάσεων. Μία εξελεγμένη μορφή αξονικής τομογραφίας είναι η χαμηλής δόσολογίας και υψηλής ευκρίνειας αξονική τομογραφία (low dose city scan). Η ευαισθησία και η διακριτικότητα της μεθόδου αυτής είναι αρκετά υψηλή αφού ανιχνεύει όγκους με διάμετρο 1cm προκειμένου να αποκαλύψει εγκαίρως την νόσο.

Η διαγνωστική σημασία της μαγνητικής τομογραφίας στον καρκίνο του πνεύμονα είναι αρκετά περιορισμένη. Αυτό συμβαίνει διότι η αξονική τομογραφία είναι ακριβής και φθηνότερη μέθοδος, με καλή ευαισθησία, που δεν διαφέρει ιδιαίτερα από αυτή της μαγνητικής τομογραφίας. Επίσης, η χρήση της στην διάγνωση της νόσου είναι περιορισμένη και για το λόγο ότι οι πνεύμονες κινούνται διαρκώς και στην μαγνητική τομογραφία είναι απαραίτητο το εξεταζόμενο όργανο να είναι εντελώς ακίνητο. Συνεπώς, δεν ενδείκνυται ως εξέταση για τους πνεύμονες γιατί υπάρχει αρκετός θόρυβος.

Να σημειωθεί ότι η μαγνητική τομογραφία χρησιμοποιεί ισχυρούς μαγνήτες και ραδιοκύματα και όχι ακτινοβολία. Τα σήματα από το μαγνητικό πεδίο εκπέμπονται από το σώμα του ασθενούς και αποστέλλονται σε υπολογιστή, όπου μετατρέπονται σε εικόνες. Διαφορετικοί τύποι ιστών αποστέλλουν διαφορετικά σήματα και έπειτα αποτυπώνονται με διαφορετικό τρόπο.

Τόσο η αξονική όσο και η μαγνητική ακτινογραφία είναι πιο ακριβείς όταν η νόσος έχει επεκταθεί αρκετά.[16], [19], [20], [21]

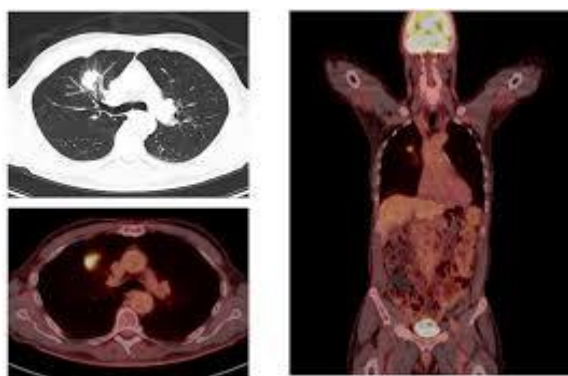


Εικόνα 8 αριστερά φαίνεται μια αξονική τομογραφία, ενώ δεξιά φαίνεται μια μαγνητική τομογραφία

3. Τομογραφία με Εκπομπή Ποζιτρονίων (PET)

Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (PET) είναι μια απεικονιστική εξέταση που παράγει εικόνες των οργάνων και των ιστών. Παρέχει ανατομικές και λειτουργικές πληροφορίες για έναν οργανισμό, με σκοπό τη διάγνωση της ασθένειας. Η τομογραφία χρησιμοποιεί μια ασφαλή, ενέσιμη ραδιενεργή χημική ουσία που ονομάζεται ραδιοϊχνηλάτης και μια συσκευή που ονομάζεται σαρωτής PET. Το ραδιοφάρμακο καθιλώνεται εκεί όπου υπάρχει παθολογική εστία και διασπάται εκπέμποντας ποζιτρόνια (σωματίδια β^+), που αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια του ιστού και δημιουργούν ακτίνες γ (φωτόνια). Ο σαρωτής ανιχνεύει άρρωστα κύτταρα που απορροφούν μεγάλες ποσότητες του ραδιοφαρμάκου, μέσω των φωτονίων που δημιουργούνται. Η τομογραφία αυτή που εξετάζει όλο το σώμα, μπορεί να αναγνωρίσει αν ένας όγκος είναι καλοήθης ή κακοήθης.

Η τεχνολογική εξέλιξη που έχει επέλθει τα τελευταία χρόνια οδήγησε στη κατασκευή του PET/CT. Το μηχάνημα αυτό συνδυάζει σε μια και μόνη εξέταση τα πλεονεκτήματα της PET με τη λεπτομερή μορφολογική απεικόνιση της CT. Ο συνδυασμός των PET/CT είναι αποτελεσματικότερος σε σχέση με την PET και τη CT ξεχωριστά αναφορικά με τη σταδιοποίηση των όγκων αλλά και την ακριβή τους θέση. Η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική για μεγάλους και επιθετικούς όγκους μεγαλύτερους των 1cm. Τέλος, παρέχει την δυνατότητα ανίχνευσης των νεκρών καρκινικών κυττάρων, παρέχοντας έτσι πληροφορίες για την αποτελεσματικότητα κάποιας θεραπείας. [23], [24]



Εικόνα 9 σύγκριση αξονικής τομογραφίας (πάνω αριστερά) με PET/CT(κάτω αριστερά και δεξιά) στην ανίχνευση μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα

4. Κυτταρολογική Εξέταση Πτυέλων

Η κυτταρολογική εξέταση των συλλεγμένων από τον ασθενή πτυέλων είναι η πιο απλή και πιο φθηνή μη επεμβατική μέθοδος, η οποία σε σημαντικό ποσοστό (60-75%) θα διαγνώσει την νόσο. Η περιορισμένη ικανότητα του ασθενούς να παράγει πτύελα, το μικρό μέγεθος όγκο και η μικρή εμπειρία πολλές φορές του κυτταρολόγου να ξεχωρίζει την δυσπλασία από την κακοήθεια είναι κάποια από τα μειονεκτήματα της μεθόδου. Επιπλέον, η ευαισθησία της κυτταρολογικής εξέτασης πτυέλων διαφέρει ανάλογα με λειτουργική τοποθεσία του καρκίνου του πνεύμονα. Για τους όγκους, οι οποίοι βρίσκονται κεντρικά, όπως είναι το μικροκυτταρικό και το εκ πλακώδους επιθηλίου, η κυτταρολογική εξέταση είναι θετική σε μεγάλο ποσοστό (80%). Αντίθετα, για περιφερικούς όγκους διαμέτρου μικρότερης από 3 εκ., η

διαγνωστική ικανότητα πέφτει στο 20%. Η τριήμερη συλλογή πρωινών πτυέλων είναι η μέθοδος εκλογής.[20], [21]

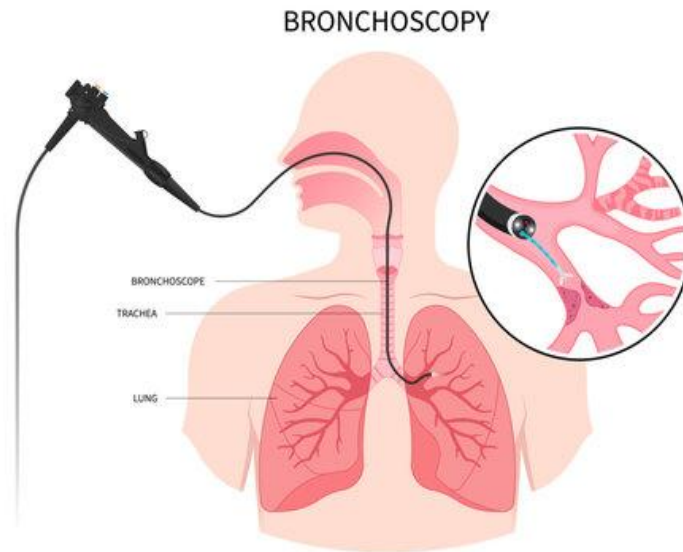
5. Βρογχοσκόπηση

Η βρογχοσκόπηση αποτελεί το βασικό διαγνωστικό εργαλείο για τον καρκίνο του πνεύμονα και σε συνδυασμό με τις κατάλληλες τεχνικές ανάλογα με την περίπτωση μπορεί να τυποποιήσει την νόσο σε ποσοστό 39-92% και να καθορίσει την θεραπεία. Η βρογχοσκόπηση είναι από τις ακριβέστερες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Η άμεση οπτική επαφή με τους ενδοβρογχικούς όγκους καθιστά την μέθοδο αναντικατάστατη. Αποτελεί διαδικασία κατά την οποία ο γιατρός εξετάζει τους μεγάλους αεραγωγούς του ασθενούς, όπως η τραχεία και οι βρόγχοι.

Η βρογχοσκόπηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση εύκαμπτου, είτε άκαμπτου βρογχοσκοπίου. Με το εύκαμπτο βρογχοσκόπιο, το οποίο έχει την ικανότητα να φθάσει τη δεύτερη ή ακόμα και την τρίτη υποδιαίρεση του βρογχικού δέντρου, για όγκους που είναι ορατή η διακριτική ικανότητα της μεθόδου μπορεί να φθάσει μέχρι και 90%. Τα βρογχοσκόπια διαθέτουν ένα πλευρικό κανάλι, μέσω του οποίου μπορεί να περάσει και να φθάσει στο κάτω άκρο του ένας λεπτός καθετήρας, συνοδευόμενος από μία λαβίδα βιοψίας. Η λήψη βιοψιών βιοψία από την εσωτερική επένδυση των βρόγχων, με την βοήθεια κατάλληλων ψαλιδιών, βελονών και βουρτσών, καθιστά επιτρεπτή την σωστή διάγνωση. Ο καθετήρας χρησιμοποιείται και για την αφαίρεση μικρών αντικειμένων από τους αεραγωγούς.

Ακόμα και στην περίπτωση που ο όγκος δεν είναι ορατός με το βρογχοσκόπιο, το ξέπλυμα της ύποπτης περιοχής με άρδευση νερού, μπορεί να οδηγήσει σε διάγνωση μέσω κυτταρολογικής εξέτασης του εκπλύματος. Προτιμάται κυρίως για ασθενείς με κεντρικούς όγκους. Ευαισθησία της βρογχοσκόπησης πέφτει σε ασθενείς με περιφερικούς όγκους και ακόμη περισσότερο σε ασθενείς με όγκο διαμέτρου μικρότερης από 2 εκατοστά.

Οι πλειονότητα των ασθενών που κάνουν βρογχοσκόπηση δεν παρουσιάζουν έπειτα κάποιο πρόβλημα. Σοβαρές επιπλοκές, όπως αιμορραγία και ανακοπή συμβαίνουν σε λιγότερο από 1 στις 1000 βρογχοσκοπήσεις. [20], [21]



Εικόνα 10 βρογχοσκόπηση

6. Βιοψία

Βιοψία ονομάζεται η λήψη δείγματος ιστού ή υγρού, τα οποία μπορούν να μελετηθούν στο μικροσκόπιο προκειμένου να αναζητηθούν καρκινικά κύτταρα και να προσδιοριστεί το είδος του καρκίνου. Τα δείγματα μπορούν να ελεγχθούν και για γενετικές αλλαγές (μεταλλάξεις) πράγμα που μπορεί να επηρεάσει τη θεραπεία του ασθενούς. Για την διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα απαραίτητη είναι η λήψη βιοψίας από το πρωτοπαθή όγκο. Η βιοψία πραγματοποιείται με την βοήθεια βελόνων, όπως η βελόνα (FNA) υπό αξονικό τομογράφο, ή με βρογχοσκόπηση, ή με τη λήψη υγρού από τον υπεζόκωτα, ή τέλος με κομμάτι από τον ίδιο τον καρκινικό όγκο εφ' όσον αυτός έχει αφαιρεθεί με επέμβαση.

Οι μέθοδοι λήψης βιοψίας είναι η λήψη βιοψίας με ακτινολογική καθοδήγηση, το υπό ενδοβρογχικό υπερηχογράφημα (EBUS) με χρήση βελόνας αναρρόφησης, η λήψη βιοψίας με τη χρήση συμβατικού εύκαμπτου βρογχοσκοπίου και η λήψη βιοψίας με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικά καθοδηγούμενου βρογχοσκοπίου (ENB).[20], [21]

1.8. Θεραπεία του καρκίνου του πνεύμονα

Οι θεραπείες για τον καρκίνο του πνεύμονα στοχεύουν στην απαλλαγή του ασθενή από τον καρκίνο στο σώμα του ή στην επιβράδυνση της ανάπτυξής

του. Οι θεραπείες δύνανται να αφαιρέσουν τα καρκινικά κύτταρα, να βοηθήσουν στην καταστροφή τους είτε να τα εμποδίσουν να πολλαπλασιαστούν. Κάποιες θεραπείες χρησιμοποιούνται επίσης με σκοπό τη μείωση των συμπτωμάτων και την ανακούφιση του πόνου. Η θεραπεία που εφαρμόζεται εξαρτάται από τον τύπο του καρκίνου του πνεύμονα που εμφανίζει ο ασθενής και από το στάδιο της νόσου. Αφού λοιπόν καθοριστεί ο ιστολογικός τύπος (μικροκυτταρικό ή μη μικροκυτταρικό) και το στάδιο του όγκου, ο ασθενής κατατάσσεται σε μια από τις παρακάτω κατηγορίες. Σε κάθε κατηγορία ακολουθείται διαφορετική θεραπεία. [20], [21]

- Μη μικροκυτταρικός καρκίνος σταδίου I, II, IIIa.
- Μη μικροκυτταρικός καρκίνος σταδίου IIIβ, IV.
- Μικροκυτταρικός καρκίνος σταδίου I, II, IIIa (περιορισμένη νόσος).
- Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου IV και πιθανά IIIβ (εκτεταμένη νόσος).

Οι θεραπείες για τον καρκίνο του πνεύμονα περιλαμβάνουν χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία, στοχευμένη φαρμακευτική θεραπεία και ανοσοθεραπεία.

Παρακάτω αναφέρονται οι θεραπείες που ακολουθούνται για κάθε μια από αυτές τις κατηγορίες.

1. Μη μικροκυτταρικός καρκίνος σταδίου I, II, IIIa

Αν ο ασθενής έχει κάποιο από αυτούς τους ιστολογικούς τύπους και βρίσκεται σε καλή γενική υγεία, υποβάλλεται σε χειρουργική επέμβαση για την αφαίρεση των καρκινικών κυττάρων.

Το είδος της χειρουργικής επέμβασης εξαρτάται από το μέγεθος και τη θέση του όγκου στον πνεύμονα, την έκταση του καρκίνου και άλλους παράγοντες. Πολλές επεμβάσεις πραγματοποιούνται με μια μακριά τομή στο πλάι του θώρακα, αναφερόμενη ως θωρακοτομή.

Οι τύποι χειρουργικής επέμβασης περιλαμβάνουν:

- σφηνοειδής εκτομή, δηλαδή αφαίρεση μόνο ενός μικρού τμήματος του πνεύμονα

- Λοβεκτομή, δηλαδή αφαίρεση ολόκληρου του λοβού του πνεύμονα
- Πνευμονεκτομή, δηλαδή αφαίρεση ολόκληρου του πνεύμονα
- Τμηματική εκτομή, δηλαδή αφαίρεση κομματιού βρόγχου

Στην περίπτωση που ο καρκίνος δεν έχει εξαπλωθεί μακριά αλλά η χειρουργική επέμβαση δεν κρίνεται δυνατή (για παράδειγμα, επειδή υπάρχει αυξημένος κίνδυνος επιπλοκών), ακολουθείται ακτινοθεραπεία για την καταστροφή των καρκινικών κυττάρων. Σε κάποιες περιπτώσεις, αυτό μπορεί να συνδυαστεί με χημειοθεραπεία.[20], [21], [25], [26]

2. Μη μικροκυτταρικός καρκίνος σταδίου IIIβ, IV.

Σε αυτή την κατηγορία συνήθως συνιστάται ακτινοθεραπεία, χημειοθεραπεία ή/και ανοσοθεραπεία. Μπορεί να πραγματοποιηθεί χειρουργική θεραπεία μόνο σε πολύ περιορισμένο αριθμό ασθενών.

Η ακτινοθεραπεία είναι η χρήση ακτινοβολίας υψηλής ενέργειας με σκοπό τη θανάτωση καρκινικών κυττάρων και τη συρρίκνωση των όγκων. Η χειρουργική επέμβαση και η θεραπεία με ακτινοβολία επικεντρώνονται σε μία μόνο περιοχή του σώματος.

Η χημειοθεραπεία αντίθετα πηγαίνει σε όλο το σώμα για την αναζήτηση καρκινικών κυττάρων. Η χημειοθεραπεία χορηγείται συνήθως μέσω ενδοφλέβιας έγχυσης. Η χημειοθεραπεία λειτουργεί παρεμποδίζοντας την ικανότητα που έχουν τα καρκινικά κύτταρα να αναπτύσσονται ή να αναπαράγονται. Διαφορετικές ομάδες φαρμάκων λειτουργούν με διαφορετικούς τρόπους με σκοπό την καταπολέμηση των καρκινικών κυττάρων. Ο ογκολόγος θα διαμορφώσει ένα σχέδιο θεραπείας για κάθε άτομο.

Η ανοσοθεραπεία αποτελεί μια νέα προσέγγιση θεραπείας του καρκίνου του πνεύμονα που χρησιμοποιεί φάρμακα, εμβόλια και άλλες θεραπείες προκειμένου να ενεργοποιήσει τις φυσικές άμυνες του ανοσοποιητικού συστήματος ώστε να καταπολεμήσει τον καρκίνο του πνεύμονα στην περίπτωση μας. Ένας τύπος φαρμάκου ανοσοθεραπείας, ο οποίος ονομάζεται «anti-PD-1», έχει αποδειχθεί πως προκαλεί σημαντική υποχώρηση του καρκινικού όγκου στο ένα τέταρτο των ασθενών που το

λαμβάνουν μετά από έναν κύκλο χημειοθεραπείας. Τρία φάρμακα ανοσοθεραπείας (pembrolizumab, atezolizumab και nivolumab) έχουν εγκριθεί για την θεραπεία ορισμένων μη μικροκυτταρικών καρκίνων του πνεύμονα.

Σε κάποιες περιπτώσεις, εάν ο καρκίνος έχει μια ορισμένη μετάλλαξη, μπορεί να συνιστάται βιολογική ή στοχευμένη θεραπεία αντί της χημειοθεραπείας ή μετά από αυτή. Οι βιολογικές θεραπείες είναι φάρμακα που είτε ελέγχουν είτε σταματούν την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων.

3. Μικροκυτταρικός καρκίνος σταδίου I, II, IIIa (περιορισμένη νόσος)

Ο μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα αντιμετωπίζεται κυρίως με χημειοθεραπεία, ακτινοθεραπεία ή ανοσοθεραπεία. Η χειρουργική επέμβαση δεν χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές για τη θεραπεία αυτού του τύπου καρκίνου του πνεύμονα.

4. Μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα σταδίου IV και πιθανά IIIβ (εκτεταμένη νόσος).

Σε αυτή την κατηγορία ο καρκίνος θεωρείται μη θεραπεύσιμος. Χρησιμοποιείται επιθετική χημειοθεραπεία, αλλά μόνο με σκοπό την παράταση του χρόνου ζωής ή την ανακούφιση των συμπτωμάτων. Η επιθετική χημειοθεραπεία που χρησιμοποιείται, φαίνεται να βελτιώνει την μέση επιβίωση από 6-8 εβδομάδες σε 8-10 μήνες.[20], [25], [26][19]

1.9. Πρόληψη

Λόγω του ότι δεν γνωρίζουμε με βεβαιότητα τι προκαλεί τους περισσότερους καρκίνους, δεν υπάρχει σίγουρος τρόπος για την πρόληψη του καρκίνου του πνεύμονα. Τα μέτρα που λαμβάνονται στοχεύουν στην μείωση του κινδύνου. Μερικά μέτρα που μπορεί να λάβει ο ασθενής και που μειώνουν τον κίνδυνο περιλαμβάνουν:[13], [16], [19]

- Αποφυγή του καπνίσματος ή κόψιμο του κάπνισμα. Είναι σημαντικό μην ξεκινήσει ένα άτομο το κάπνισμα καθόλου. Για το λόγο αυτό είναι σημαντική η ενημέρωση των παιδιών από μικρές ηλικίες για τις αρνητικές επιπτώσεις του καπνίσματος, ώστε να μην υποπέσουν στην πίεση των συνομηλίκων. Ακόμα όμως και στην περίπτωση που κάποιος είναι καπνιστής είναι σημαντικό να κόψει το κάπνισμα. Ο

κίνδυνος καρκίνου του πνεύμονα μειώνεται εντός πέντε ετών από τη διακοπή του καπνίσματος.

- Αποφυγή του παθητικού καπνίσματος. Το άτομο πρέπει να αποφεύγει να βρίσκεται σε χώρους με άτομα που καπνίζουν. Είναι σημαντικό να παροτρύνουμε τους οικείους μας να κόψουν το κάπνισμα ή να καπνίζουν σε χώρους εξωτερικούς.
- Υιοθέτηση μιας υγιεινής διατροφής. Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η κατανάλωση φρούτων και λαχανικών μπορεί να συμβάλλει στη μείωση του κινδύνου για καρκίνο. Οι διατροφικές πηγές βιταμινών και θρεπτικών συστατικών είναι σύμμαχοι στον αγώνα κατά του καρκίνου. Τα φρούτα και τα τρόφιμα που περιέχουν καροτενοειδή πιθανώς προστατεύουν από τον καρκίνο του πνεύμονα, αφού το α-καροτένιο αποτελεί προστατευτικό παράγοντα. Με τον ίδιο τρόπο, η κατανάλωση τροφίμων που περιέχουν σελήνιο αποδεικνύεται ότι προστατεύει τον οργανισμό από την εκδήλωση της ασθένειας. Η λήψη μεγάλων δόσεων βιταμινών σε μορφή χαπιού, μπορεί να είναι επιβλαβείς. Επίσης, είναι σημαντική η κατανάλωση φυτικών τροφίμων και η αποφυγή των επεξεργασμένων τροφίμων. Η αύξηση της πρόσληψης κορεσμένου λίπους και κόκκινου κρέατος οδηγεί σε αύξηση του κινδύνου για εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα. [27]
- Αποφυγή των καρκινογόνων στην εργασία. Λάβετε προφυλάξεις προκειμένου να προστατευθείτε από την έκθεση σε τοξικές χημικές ουσίες στην εργασία. Είναι απαραίτητο να ακολουθούνται οι προφυλάξεις του εργοδότη. Εάν είναι απαραίτητη η χρήση μάσκας για προστασία πρέπει να μην αμελείται.
- Έλεγχος για καρκίνο του πνεύμονα εάν το άτομο διατρέχει υψηλό κίνδυνο. Η έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα είναι απαραίτητη λόγω του μεγάλου αριθμού των περιπτώσεων υψηλού αλλά και μειωμένου κινδύνου για τους πρώην καπνιστές. Κύριος σκοπός είναι να διαγνωστεί η νόσος πριν εμφανιστούν τα συμπτώματα.
- Σωματική άσκηση. Τόσο σε υγιείς όσο και σε άρρωστους ανθρώπους, η σωματική άσκηση επηρεάζει σημαντικά το επίπεδο της σωματικής απόδοσης και αποτελεί αναπόσπαστο συστατικό ενός υγιεινού τρόπου

ζωής, βελτιώνοντας τη σωματική κατάσταση αλλά και την ψυχική κατάσταση των ασθενών. Επιπλέον, έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί έδειξε ότι η άσκηση βοηθάει στην μείωση της ανάπτυξη των υφιστάμενων όγκων στους πνεύμονες, γεγονός ιδιαίτερα ενθαρρυντικό.

1.10. Πρόγνωση και προσυμπτωματικός έλεγχος

Η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου του πνεύμονα είναι ιδιαίτερα κρίσιμη για τη μείωση των ποσοστών θνησιμότητας. Η ανίχνευση κακοήθων πνευμονικών οζιδίων είναι ύψιστης σημασίας για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, αφού αυξάνει τις ευκαιρίες θεραπείας για τους ασθενείς και βελτιώνει τα ποσοστά επιβίωσής τους. Σύμφωνα με τις συστάσεις της Ειδικής Ομάδας Προληπτικών Υπηρεσιών των ΗΠΑ (USPSTF), τα άτομα θα πρέπει να ξεκινήσουν να υποβάλλονται σε προληπτικό έλεγχο για καρκίνο του πνεύμονα στην ηλικία των 50 ετών. Οι οδηγίες προτείνουν ακόμα ότι άτομα με ιστορικό καπνίσματος θα πρέπει και αυτοί να συμπεριληφθούν στη διαδικασία προσυμπτωματικού ελέγχου.

Παρόλα αυτά, υπάρχει μια πρόκληση στην ανίχνευση και τον εντοπισμό κακοήθων όγκων στους πνεύμονες σε προσυμπτωματικό επίπεδο. Ο προσυμπτωματικός έλεγχος χαμηλής δόσης αξονικής τομογραφίας (LDCT) είναι μια μέθοδος που έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στον εντοπισμό κυρίως ομάδων υψηλού κινδύνου. Μικροί όγκοι πιθανόν να μην ανιχνευθούν. Επίσης, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι κοστοβόρες, χρονοβόρες, μη αποτελεσματικές σε αρχικά στάδια και ορισμένες φορές επιβλαβείς για την υγεία του ασθενούς. Επομένως, υπάρχει επείγουσα ανάγκη εύρεσης πιο αποτελεσματικών και υψηλής ποιότητας μεθόδων προσυμπτωματικού ελέγχου. Είναι επιτακτική η ανάγκη εύρεσης δεικτών και μεθόδων που να εντοπίζουν οικονομικά, ανώδυνα και εύκολα σε πολύ πρώιμα στάδια την ασθένεια ή ιδανικά και πριν καν εμφανιστεί, ώστε να αντιμετωπιστεί με τον αποτελεσματικότερο τρόπο. [20], [21], [28]

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μεγάλη προσπάθεια για εύρεση καρκινικών δεικτών που να συνδέονται με τον καρκίνο του πνεύμονα, ώστε να

χρησιμοποιούνται για την ταχεία, πρόωρη και αποτελεσματική ανίχνευση της ασθένειας, αλλά και του συγκεκριμένου ιστολογικού τύπου. Ο ιδανικός καρκινικός δείκτης θα ήταν μια ουσία που θα ανιχνευόταν στον ασθενή και θα μπορούσε να συμβάλλει στην έγκαιρη διάγνωση της κακοήθειας, με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα, να δίνει προγνωστικές πληροφορίες της ασθένειας, να μπορεί να αποτιμά την απάντηση στην κάθε θεραπεία και να διαπιστώνει υποτροπές της νόσου.

Αρκετοί καρκινικοί δείκτες έχουν ερευνηθεί για τον καρκίνο του πνεύμονα. Δυστυχώς, καρκινικούς δείκτες παράγουν εκτός από τις καρκινικά και πολλά φυσιολογικά κύτταρα και οι τιμές στο αίμα μπορεί να είναι αυξημένες σε μη νεοπλασματικές ασθένειες. Έτσι περιορίζεται η δυνατότητα χρήσης των δεικτών αυτών για την διάγνωση του καρκίνου και ο δεν έχει βρεθεί ακόμα δείκτης με πολύ υψηλή αξιοπιστία. Είναι αρκετές οι φορές που κάποιος ασθενής έχει αυξημένη τιμή κάποιου καρκινικού δείκτη, χωρίς όμως να έχει τελικά την ασθένεια. Ωστόσο, υπάρχουν πολλά στοιχεία που καταδεικνύουν ότι τουλάχιστον κάποιοι από αυτούς είναι χρήσιμοι στην εκτίμηση της πορείας της ασθένειας. Χρησιμοποιούνται σήμερα για να δώσουν μια πρώτη εκτίμηση, αλλά δεν επιβεβαιώνουν σίγουρα τον καρκίνο.[29]

Οι πιο συχνοί καρκινικοί δείκτες είναι χημικές ουσίες κυρίως πεπτιδικής φύσεως, οι οποίοι εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα. Συνήθως, απουσιάζουν από τον ορό ή βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, αφού δεν εκκρίνονται από τα φυσιολογικά κύτταρα.

Μια πιο νέα έννοια του καρκινικού δείκτη περιλαμβάνει όχι μόνο τα κλασσικά εκκριτικά προϊόντα αλλά και άλλες ουσίες που επιτρέπουν την διάγνωση της νόσου. Για να μπορεί μια ουσία να είναι καρκινικός δείκτης θα πρέπει να διευκολύνει την πρώιμη διάγνωση του όγκου, να συμβάλλει στην εκτίμηση της πρόγνωσης και να συνεισφέρει στην παρακολούθηση της απάντησης στην θεραπεία και στην πρώιμη διάγνωση υποτροπής. Οι καρκινικοί δείκτες θα πρέπει να είναι μετρήσιμοι εύκολα και οικονομικά.

Οι καρκινικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Καρκινικοί δείκτες που παράγονται από καρκινικά κύτταρα είτε από φυσιολογικά. Δεν αποτελούν αντιγόνα ειδικά των κακοήθων όγκων αλλά σχετίζονται με αυτούς.
- Καρκινικοί δείκτες οι οποίοι παράγονται από καρκινικά κύτταρα και βρίσκονται σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου.
- Καρκινικοί δείκτες οι οποίοι παράγονται αποκλειστικά από καρκινικά κύτταρα, είναι ειδικοί για τον κάθε τύπο καρκίνου και δεν ανιχνεύονται σε άλλους τύπους.

Συχνά χρησιμοποιούμενοι καρκινικοί δείκτες σήμερα είναι το CA125, το ειδικό προστατικό αντιγόνο (Prostate-specific antigen, PSA), η όξινη φωσφατάση (PAP ,Prostatic-acid phosphatase), το CEA (καρκινοεμβρυικό αντιγόνο), η AFP (άλφα φετοπρωτεΐνη), η HCG (χοριακή γοναδοτροπίνη), το CA 27-29, το CA 15-3, το CA 19-, το CYFRA 21-1 (τμήμα της κυτοκερατίνης), η Θυρεοσφαιρίνη (TG) και η Καλσιτονίνη. [20], [28], [29]

Το γεγονός λοιπόν ότι οι καρκινικοί δείκτες δεν μπορούν να διαγνώσουν σίγουρα τον καρκίνο και τον ιστολογικό τύπο και δεδομένου του ότι οι άλλοι μέθοδοι διάγνωσης δεν είναι γρήγοροι, οικονομικοί και αξιόπιστοι για όλους τους τύπους καρκίνου, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση νέου τρόπου διάγνωσης. Η εξέλιξη της τεχνολογίας και των υπολογιστικών συστημάτων έχει δώσει νέα εργαλεία που προσπαθούν να ενσωματωθούν στην διαδικασία επιτυχούς διάγνωσης. Αυτές οι καινοτόμες ιδέες έχουν αποδειχθεί μια επιτυχημένη λύση για αποτελεσματικό και υψηλής ποιότητας προσυμπτωματικό έλεγχο του καρκίνου του πνεύμονα.[29]

1.11. Οικονομικό κόστος

Ο καρκίνος του πνεύμονα έχει μακροπρόθεσμες οικονομικές επιπτώσεις στους ασθενείς, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε χρεοκοπία ακόμη και τα πιο οργανωμένα συστήματα υγείας παγκοσμίως. Το κόστος για την αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα σε φάρμακα και νοσηλείες είναι πολύ μεγάλο. Το 61,4% των ασθενών στην Ελλάδα χρειάζεται πάνω από το 20% του εισοδήματος του νοικοκυριού του προκειμένου να πληρώσει τις δαπάνες που

σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε, το 87,5% των ατόμων που αντιμετωπίζουν οικονομικές δυσκολίες συμφώνησαν ότι η οικονομική τους κατάσταση είχε αντίκτυπο στην πρόσβασή τους στην θεραπεία και την περίθαλψη. Μέχρι και οι προληπτικές εξετάσεις που χρειάζεται να κάνει κάποιο άτομο έχουν τέτοιο κόστος που πιθανόν αποτρέπουν άτομα με οικονομικά προβλήματα να τις πραγματοποιήσουν.

Επομένως, η εύρεση ενός νέου αποτελεσματικού διαγνωστικού εργαλείου που θα επιτρέπει την γρήγορη, εύκολη, ανώδυνη αλλά και οικονομική διάγνωση είναι ύψιστης σημασίας. Έτσι, περισσότερα άτομα θα είχαν εύκολη πρόσβαση σε αυτό ανεξάρτητα της οικονομικής τους κατάστασης. Επιπλέον, ένας ευρείας χρήσης αποτελεσματικός προσυμπτωματικός έλεγχος θα επέτρεπε την διάγνωση σε πολύ αρχικά στάδια, όπου η ασθένεια θα ήταν αντιμετωπίσιμη πιο εύκολα και με τρόπους με μικρότερη οικονομική επιβάρυνση για τον ασθενή. [30]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2:

Αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού

2.1. τεχνικές εκχύλισης – μικροεκχύλισης

Η εκχύλιση είναι μια διαδικασία διαχωρισμού μιας ουσίας από ένα μέσο στο οποίο βρίσκεται σε ένα άλλο, ίδιας ή διαφορετικής φάσης. Βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων που αναμειγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Η μεταφορά αυτή είναι δυνατή επειδή η ουσία που πρέπει να διαχωριστεί είναι περισσότερο διαλυμένη στη νέα φάση από ό,τι στην αρχική φάση, ή εμφανίζει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με το νέο μέσο.

Οι μέθοδοι εκχύλισης διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

- ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΓΡΗΣ (ΜΙΚΡΟ)ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ
- ΜΕΘΟΔΟΙ (ΜΙΚΡΟ)ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΥΓΡΗΣ - ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ
- ΜΕΘΟΔΟΙ (ΜΙΚΡΟ)ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ

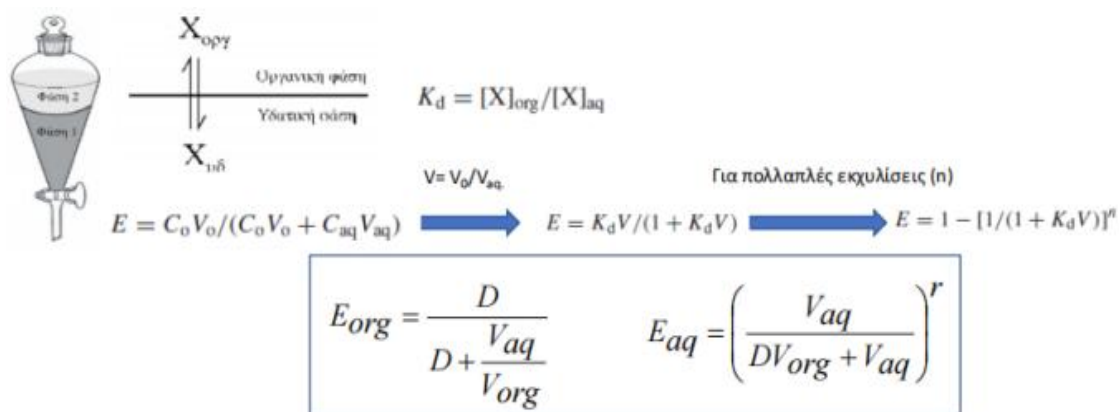
Τις τελευταίες δεκαετίες, αναπτύχθηκε μία νέα μέθοδος η οποία ονομάζεται μικροεκχύλιση. Η μικροεκχύλιση αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού που χρησιμοποιείται για την επιλεκτική εξαγωγή ουσιών από μια σύνθετη μήτρα χρησιμοποιώντας μικρές ποσότητες παραγόντων εκχύλισης ή/και διαλυτών. Η τεχνικές μικροεκχύλισης επιτυγχάνουν ευκολότερη προετοιμασία δείγματος, μειωμένη κατανάλωση εκχυλιστικού μέσου και απλούστευση της αρχικής τεχνικής. Η αναγωγή των κλασικών τεχνικών εκχύλισης σε μικρή κλίμακα υπερνίκησε πολλά προβλήματα που εμφανίζονταν κατά την κλασσική ανάλυση. Επίσης, βοήθησε στην ελαχιστοποίηση της απαιτούμενης ποσότητας του δείγματος και της ποσότητας της εκχυλιστικής φάσης, μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το συνολικό κόστος. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα των τεχνικών μικροεκχύλισης είναι η επιτάχυνση της μεταφοράς της μάζας κατά τη διαδικασία της ρόφησης και της εκρόφησης στο αναλυτικό όργανο, ενώ την ίδια στιγμή εμποδίζει την έμφραξη του αναλυτικού οργάνου από προσμίξεις.

Παρακάτω θα δοθούν πληροφορίες για τις τρεις κατηγορίες εκχύλισης, αλλά με μεγαλύτερη έμφαση στην (μικρο) εκχύλιση στερεής φάσης που είναι και αυτή που μας αφορά. [31][32]

2.1.1. Υγρή – υγρή εκχύλιση (Liquid-liquid extraction-LLE) και υγρή – υγρή μικροεκχύλιση

Η υγρή - υγρή εκχύλιση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού ενώσεων με βάση τις σχετικές διαλυτότητές τους σε δύο διαφορετικά μη αναμίξιμα υγρά, συνήθως νερό (πολικό) και έναν οργανικό διαλύτη (μη πολικό). Συνήθως, πρόκειται για εκχύλιση από την υδατική φάση σε ένα οργανικό διαλύτη μη αναμίξιμο με το νερό (διφασικό σύστημα). Όλες οι λιπόφιλες ενώσεις μεταφέρονται από την υδατική στην οργανική φάση, αφού ισχύει ο κανόνας «Τα όμοια διαλύουν όμοια». Περιλαμβάνει χρήση επικίνδυνων – τοξικών διαλυτών, είναι χρονοβόρα (πολλαπλές εκχυλίσεις), εμφανίζει δυσκολία στην χρήση (ειδικά όταν απαιτείται εκχύλιση μεγάλων όγκων) και παράγει πολλές φορές γαλακτώματα. Η μεταφορά καθοδηγείται από το χημικό δυναμικό, δηλαδή μόλις η μεταφορά ολοκληρωθεί, το συνολικό σύστημα των χημικών συστατικών (διαλυμένες ουσίες και διαλύτες) είναι σε πιο σταθερή κατάσταση από την αρχική (χαμηλότερη ελεύθερη ενέργεια).

Όσο αφορά την διαδικασία που ακολουθείται σε μια τέτοια εκχύλιση, ο όγκος του προς εκχύλιση διαλύματος έρχεται σε επαφή με ορισμένο όγκο εκχυλιστικού μέσου μέσα σε διαχωριστική χοάνη. Έπειτα, το σύστημα αναταράσσεται και αφήνεται σε ηρεμία. Μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας, οι δύο φάσεις διαχωρίζονται και λαμβάνεται εκείνη η οποία περιέχει την ένωση στόχο.



Εικόνα 11 υγρή – υγρή εκχύλιση

Δύο τώρα από τις μεθόδους μικροεκχύλισης υγρής- υγρής φάσης είναι η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση διασποράς (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction-DLME) και η Μικροεκχύλιση διασποράς και αιώρησης (Dispersive suspended microextraction-DSME). Σχετικά με την πρώτη, ως διαλύτης χρησιμοποιείται μίγμα πολικών και μη-πολικών διαλυτών και η μέθοδος χαρακτηρίζεται από ελάχιστη κατανάλωση οργανικών διαλυτών, χαμηλή τοξικότητα, ευκολία και υψηλές ανακτήσεις αλλά και από περιορισμούς στον όγκο του δείγματος και δυσκολία χειρισμού μικρών όγκων. Στην δεύτερη χρησιμοποιούνται μη-πολικοί διαλύτες (π.χ. οκτανόλη, ξυλένιο, δεκανόλη, ενδεκανόλη, κα) με πυκνότητα χαμηλότερη του νερού ώστε να επιπλέουν, πολύ μικρή διαλυτότητα στο νερό και μικρή πτητικότητα. Η τεχνική μπορεί να είναι άμεση ή έμμεση.[31][33], [34], [35]

2.1.2. Εκχύλιση και μικροεκχύλιση υγρής- στερεάς φάσης

Όταν το δείγμα είναι στερεό και η απαιτούμενη φάση για ανάλυση είναι υγρή, η διαδικασία ονομάζεται εκχύλιση στερεού-υγρού. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμη ιδιαίτερα για τον καθαρισμό προσμίξεων και λιγότερο για προσυγκέντρωση. Το υδατικό δείγμα απορροφάται πλήρως στο υλικό. Επομένως, ο όγκος δείγματος είναι συγκεκριμένος. Όλα τα συστατικά εγκλωβίζονται μέσω σταγονιδίων στην επιφάνεια του υλικού αλλά εκχυλίζονται εκλεκτικά με τον οργανικό διαλύτη χωρίς να παρασέρνονται τα σταγονίδια του υδατικού δείγματος. Εμφανίζει ψηλότερες ανακτήσεις και καλύτερη επαναληψιμότητα σε σχέση με την LLE, σε αυτή αποφεύγεται ο σχηματισμός γαλακτωμάτων (καθώς υδατικό δείγμα και διαλύτης δεν αναμιγνύονται άμεσα) εμφανίζει

μικρότερη κατανάλωση διαλυτών, δυνατότητα πλήρους αυτοματοποίησης και είναι ιδανική για καθαρισμό δειγμάτων από πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια. Παρόλα αυτά εμφανίζει και περιορισμούς στον όγκο του δείγματος.[31]

2.1.3. Εκχύλιση και μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

i. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Extraction-SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction-SPE) είναι μια κοινή μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον διαχωρισμό αναλυτών από υγρά, καθώς και για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων οργανικού διαλύτη πριν από το ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών. Οι αναλυόμενες ουσίες προσροφούνται στο υλικό στερεάς φάσης, που έχει προετοιμαστεί και ενεργοποιηθεί με κάποιον οργανικό διαλύτη. Οι παρεμβολές απομακρύνονται ενώ αντίθετα οι αναλυόμενες ουσίες παραμένουν στο προσροφητικό. Με έκλουση με άλλες οργανικές ενώσεις, μπορούν να ληφθούν καθαρές προς ανάλυση ουσίες.[31], [36], [37]

Στην μέθοδο αυτή πραγματοποιείται προσυγκέντρωση-εκχύλιση αναλυτών, καθαρισμός προσμίξεων και αλλαγή φάσης (από υδατική σε οργανική, από πολικούς σε μη πολικούς διαλύτες, κ.λ.π. Η προσυγκέντρωση μπορεί να γίνει σε βαθμό από 100 έως 5000 φορές.

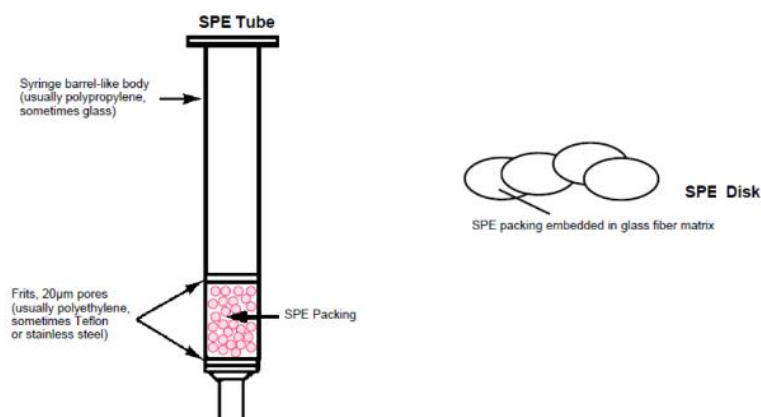
Η εκχύλιση στερεάς φάσης βασίζεται στη διαφορά συγγένειας που εμφανίζεται μεταξύ μιας αναλυόμενης ουσίας και των παρεμβολών, που υπάρχουν, για μια στερεή φάση (ροφητικό). Αυτή η συγγένεια καθιστά επιτρεπτό τον διαχωρισμό της αναλυόμενης ουσίας στόχου από τους παρεμβολείς. Με άλλα λόγια, η στατική φάση δεσμεύει είτε την αναλυόμενη ουσία είτε την ακαθαρσία μέσω ισχυρών αλλά αναστρέψιμων αλληλεπιδράσεων. Η χρήση διαφορετικών διαλυτών καθορίζει πότε μια ουσία θα παραμένει προσροφημένη και πότε θα εκπλένεται. Επομένως, κάθε φορά επιλέγουμε κατάλληλο διαλύτη με βάση την πολικότητα του και την συγγένεια του με τον αναλύτη. [36], [37], [38]

Το SPE είναι επιλεκτικό και ευέλικτο αφού υπάρχουν πολλοί διαφορετικοί ροφητές και συνθήκες έκλουσης για διαφορετικούς αναλύτες και μήτρες. Πριν από την επιλογή του προσροφητικού, είναι απαραίτητο να προηγείται μελέτη της φυσικοχημείας του συστήματος καθώς και να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι όπως είναι οι χαρακτηριστικές ομάδες των αναλυτών, η φύση του προσροφητικού υλικού, οι ενέργειες των σχηματιζόμενων δεσμών, οι δευτερεύουσες επιδράσεις και η αλληλεπίδραση του προσροφητικού και των προς ανάλυση ενώσεων με τα υπόλοιπα συστατικά του υποστρώματος.

Τα προσροφητικά υλικά αποτελούνται συνήθως από σωματίδια πυριτίας (Si) ακανόνιστου σχήματος και διαμέτρου μεταξύ 30-60 μm . Μπορεί να είναι

- κανονικής φάσης (normal phase) που διαθέτουν πολικές δραστικές ομάδες
- Αντίστροφης φάσης (reversed phase) που διαθέτουν μη πολικές δραστικές ομάδες
- Ιονανταλλαγής που διαθέτουν κατιονικές ή ανιονικές δραστικές ομάδες που όταν ιονιστούν προσελκύουν ενώσεις ή ιόντα αντιθέτου φορτίου.

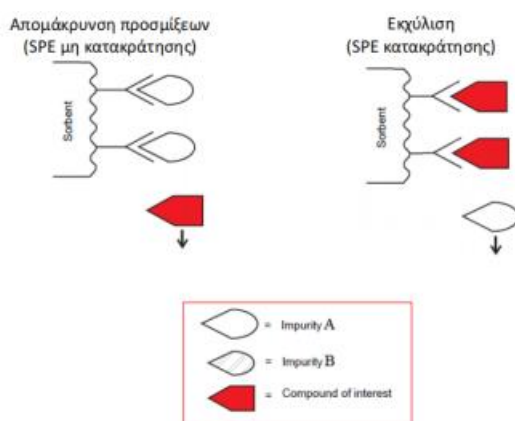
Η εκχύλιση στερεάς φάσης πραγματοποιείται σε μικροστήλες, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο προσροφητικό υλικό, είτε σε δίσκους εκχύλισης στους οποίους η προσροφητική μεμβράνη βρίσκεται ενσωματωμένη πάνω σε ένα δίκτυο για παράδειγμα μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλενίου (PTFE). Οι μικροστήλες περιλαμβάνουν προσροφητικά με διαφορετικές διαστάσεις σωματιδίων που επιτρέπουν τη χρήση χαμηλών πιέσεων, αναγκάζοντας το δείγμα και τον διαλύτη έκλουσης να περάσει δια μέσω αυτού.[31], [39]



Εικόνα 12 μικροστήλες και δισκία που χρησιμοποιούνται στην SPE

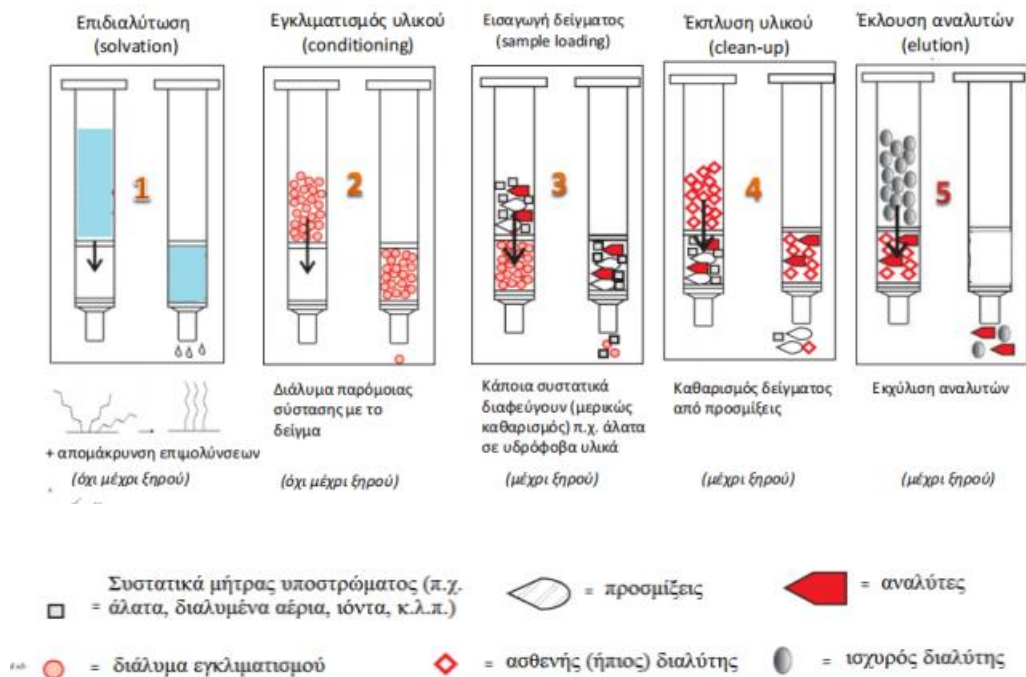
Η LLE πάσχει από πολλά μειονεκτήματα που μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση SPE, όπως η ανάγκη για ακριβά γυάλινα σκεύη (διαχωριστικές χοάνες), η μεγάλη και δαπανηρή ποσότητα οργανικών διαλυτών που απαιτούνται για τον διαχωρισμό, καθώς και η σε μικρότερο ποσοστό ποσοτική ανάκτηση ή ατελείς διαχωρισμούς φάσεων.[31], [40]

Υπάρχει η μέθοδος κατακράτησης και μη κατακράτησης, ανάλογα με το αν το προσροφητικό κατακρατά την ουσία που μας ενδιαφέρει.



Εικόνα 13 μέθοδος κατακράτησης ή μη κατακράτησης

Παρακάτω παριστάνονται σχηματικά τα στάδια της μεθόδου.



Εικόνα 14 τα στάδια της SPE

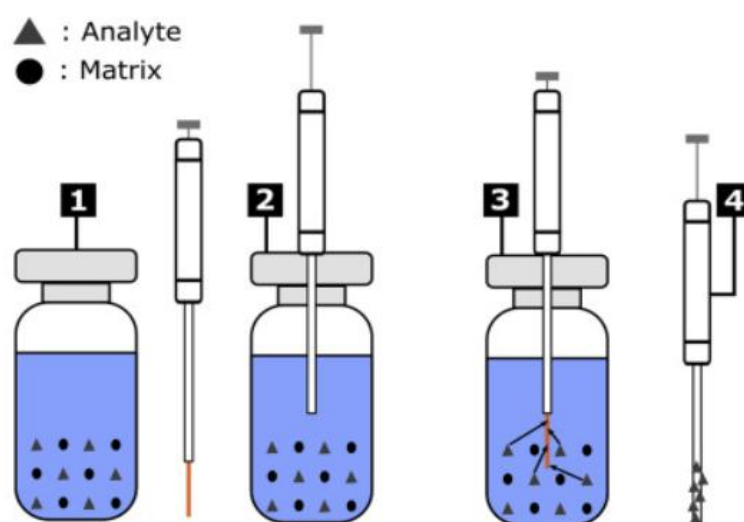
ii. Μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction-SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) είναι μια καινοτόμος και ευαίσθητη τεχνολογία προετοιμασίας δειγμάτων. Με βάση την αρχή της προσρόφησης/απορρόφησης και της εκρόφησης, η τεχνική αυτή μικροεκχύλισης χρησιμοποιεί μια επικαλυμμένη ίνα για τη συγκέντρωση πτητικών και ημιπτητικών ενώσεων από ένα δείγμα. Το SPME εισήχθη στις αρχές της δεκαετίας του 1990 από τον Pawliszyn και τους συναδέλφους του. Είναι μία τεχνική εκχύλισης που στηρίζεται στην ρόφηση των αναλυτών από την στερεή φάση εκχύλισης, η οποία ξεπερνά πολλούς από τους περιορισμούς των συμβατών τεχνικών προετοιμασίας δείγματος και η στερεή αυτή φάση μπορεί εύκολα να οδηγηθεί ακολούθως σε μία συστοιχία χρωματογραφίας. Με άλλα λόγια, το SPME βασίζεται στην εξαγωγή διαλυμένων ουσιών από ένα δείγμα σε ένα απορροφητικό στρώμα στην ίνα SPME.[39], [40], [41]

Το SPME χρησιμοποιεί μια ίνα που είναι επικαλυμμένη με μια φάση εκχύλισης: ένα υγρό (πολυμερές), ένα στερεό (ροφητικό) ή συνδυασμό και των δύο. Η

επικαλυμμένη ίνα στεγάζεται σε μια προστατευτική βελόνα και προσαρτάται σε μια θήκη που θυμίζει σύριγγα.

Όταν η ίνα εκτίθεται σε ένα δείγμα, οι αναλυόμενες ουσίες του δείγματος διαχωρίζονται από τη μήτρα του δείγματος και προσκολλούνται στη στατική φάση μέχρι να επιτευχθεί ισορροπία. Η επίστρωση της ίνας εξάγει τις ενώσεις από το δείγμα είτε με απορρόφηση (υγρές επικαλύψεις) είτε με προσρόφηση (στερεές επικαλύψεις). Μετά από κάποιον προκαθορισμένο χρόνο εκχύλισης, η ίνα αφαιρείται και εισάγεται κατευθείαν σε ένα χρωματογραφικό όργανο, συνήθως αέρια χρωματογραφία (GC) ή HPLC, προκειμένου να εκροφηθούν οι προσροφημένες ουσίες και να αναλυθούν. Η εκρόφηση σε GC των αναλυτών πραγματοποιείται θερμικά, ενώ η HPLC χρησιμοποιεί έναν διαλύτη για εκρόφηση σε υγρή φάση.[40]



Εικόνα 15 προσρόφηση ουσιών στην στατική φάση

Με την πάροδο του χρόνου κατά την προσρόφηση, οι ποσότητες των ουσιών στο στρώμα SPME φτάνουν σε ένα επίπεδο ισορροπίας με το περιβάλλον τους, το οποίο αντιπροσωπεύει τις μέγιστες ποσότητες διαλυμένων ουσιών που μπορούν να απορροφηθούν και να αποσυρθούν υπό ένα δεδομένο σύνολο συνθηκών δειγματοληψίας. Η ισορροπία αυτή διέπτετε από την ακόλουθη σχέση. [42], [43]

$$n = KV_2C_0V_1/KV_2 \times V_1$$

Όπου

n = ο αριθμός mole του αναλύτη που προσρροφάται από την στατική φάση

K = Συντελεστής (σταθερά) κατανομής του αναλύτη μεταξύ υδατικής και στατικής φάσης

C_0 = η συγκέντρωση του αναλύτη στην υδατική φάση

V_1 = ο όγκος δείγματος

V_2 = ο όγκος που καταλαμβάνει η στατική φάση

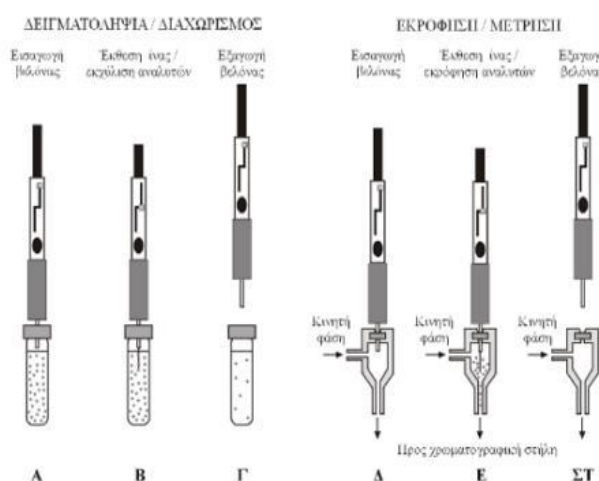
Οι τιμές του K είναι γενικά πολύ μεγάλες αλλά όχι τόσο ώστε να επιτευχθεί πλήρης (ποσοτική) εκχύλιση των αναλυτών. Επομένως, πρόκειται για μια μέθοδο που στηρίζεται στην ισορροπία της συγκέντρωσης των αναλυτών μεταξύ υδατικής και στατικής φάσης. Επειδή ο όγκος του δείγματος είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν της ίνας (που κυμαίνεται στα 2-3 μL) η παραπάνω σχέση απλοποιείται στην

$$n = KV_2C_0$$

Η ίνα που χρησιμοποιείται στην SPME είναι μια λεπτή οπτική ίνα από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica) και καλύπτεται από υμένιο υγρού πολυμερικού υλικού το οποίο μπορεί να είναι πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) ή πολυακρυλικό (PA) πάνω στην επιφάνεια της οποίας βρίσκεται το ροφητικό υλικό, δηλαδή η στατική φάση ή φάση εκχύλισης. Ο όγκος και η επιφάνεια της επικάλυψης από πολυμερικό υλικό έχουν επίδραση 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 παίζει ρόλο στην αποτελεσματικότητα και την ακρίβεια της μεθόδου. Το κατάλληλο πολυμερικό υλικό που επικαλύπτει την ίνα τηγμένου υμενίου του πυριτίου επιλέγεται από τα εμπορικά διαθέσιμα (commercial fibre) είτε σχεδιάζεται εκ νέου (custom-made fibre) σύμφωνα με τις ανάγκες τις οποίες πρέπει να

εξυπηρετήσει (ανάλογα με τη φύση των αναλυτών και τη φύση της στήλης στην υγρή ή αέρια χρωματογραφία).[31], [35], [38]

Η επιτυχία στηρίζεται στην επιλογή συνθηκών έτσι ώστε η προσρόφηση των επιθυμητών ουσιών στη στερεά φάση να ευνοείται όσο το δυνατόν περισσότερο παρουσία δείγματος όγκου, και κατόπιν οι απορροφούμενες διαλυμένες ουσίες να απελευθερώνονται όσο το δυνατόν γρηγορότερα και πλήρως για υγρή ή αέρια χρωματογραφική ανάλυση.[42], [43], [44]



Εικόνα 16 Διαδικασία δειγματοληψίας με την SPME

Η μέθοδος εμφανίζει πλήθος πλεονεκτημάτων. Συγκεκριμένα, η SPME συνδυάζει τη δειγματοληψία αναλυτών, την απομόνωση και τον εμπλουτισμό σε ένα και μόνο απλό βήμα. Με έλεγχο της πολικότητας και του πάχους της επίστρωσης ινών, διατηρώντας σταθερό χρόνο δειγματοληψίας και ελέγχοντας πολλές άλλες παραμέτρους εκχύλισης, η SPME επιτρέπει στον αναλυτή να διασφαλίζει συνεπή και μετρήσιμα αποτελέσματα από τα δείγματα, ακόμη και στην περίπτωση που οι αναλυόμενες ουσίες βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επίσης, η μέθοδος δεν περιλαμβάνει διαλύτες, είναι εύκολη στην αυτοματοποίηση, μη καταστροφική για τα δείγματα, ισχύει για σχεδόν οποιοδήποτε δείγμα ή μήτρα, οι ίνες που χρησιμοποιούνται είναι επαναχρησιμοποιήσιμες και φθηνές, το μικρό μέγεθος ινών τις καθιστά ευχάριστες για την εργασία και τέλος είναι συμβατή με όργανα GC ή HPLC. Το SPME εφαρμόζεται τόσο στην εκχύλιση σε αέρια φάση όσο και σε υγρή φάση, ενώ αντίθετα το SPE περιορίζεται στην εκχύλιση από δείγματα υγρής φάσης.

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 είναι ο περιορισμένος χρόνος ζωής της ίνας, αφού παρατηρούνται φθορές στην επιφάνειά της εξαιτίας της ανάδευσης, της υψηλής θερμοκρασίας κατά την εκρόφηση ή της έκθεσης της ίνας σε πολύπλοκες μήτρες με πολλές προσμίξεις. Η μερική απώλεια της στατικής φάσης οδηγεί στην εμφάνιση κορυφών που συνενώνονται μαζί με τις προσδιοριζόμενες ουσίες, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο την ακρίβεια και την ευαισθησία της τεχνικής. Επιπλέον, κάποιες φορές ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους προσδένονται ανέκκλητα με την ίνα μεταβάλλοντας 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, αφού εξάγεται μικρή σχετικά ποσότητα από την αρχική συγκέντρωση των αναλυτών στο δείγμα. Τέλος, τα πιο πολλά προβλήματα σε αυτή τη μέθοδο δημιουργούνται όταν η μήτρα είναι βρώμικη γεγονός που οδηγεί σε χαμηλή επαναληψιμότητα και μειωμένη γραμμικότητα στις χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών. Παρόλα αυτά δεν παύει να είναι μία εξαιρετική τεχνική, η οποία εξελίσσεται και βελτιώνεται διαρκώς.[42], [43], [44]

Το SPME χρησιμοποιείται ευρέως σε ποικιλία εφαρμογών που περιλαμβάνουν περιβαλλοντικά, βιολογικά και φαρμακευτικά δείγματα, τρόφιμα, ποτά, γεύσεις, αρώματα, εγκληματολογία, τοξικολογία και δοκιμές προϊόντων. Οι πιο τυπικές χρήσεις περιλαμβάνουν:

- Περιβαλλοντικές αναλύσεις δειγμάτων νερού και αέρα
- Ανάλυση ακαθαρσιών σε πολυμερή και στερεά δείγματα
- αναλύσεις οσμών
- Αναλύσεις γεύσης προϊόντων διατροφής
- Τοξικολογικές αναλύσεις αλκοόλ στο αίμα ή ναρκωτικών σε ούρα
- Ζιζανιοκτόνων φαινυλουρίας σε υδατικά δείγματα[42], [44]

2.2. Χρωματογραφική ανάλυση

Η χρωματογραφία είναι χημική αναλυτική τεχνική διαχωρισμού ουσιών από μείγμα τους. Ονομάστηκε κατά αυτόν τον τρόπο επειδή αρχικά χρησιμοποιήθηκε για διαχωρισμό εγχρώμων ουσιών. Οι ουσίες κατανέμονται μεταξύ ενός κινούμενου ρεύματος ρευστού, που ονομάζεται κινητή φάση, και μιας στατικής φάσης. Η στατική φάση είναι μια ακίνητη φάση που μπορεί να είναι στερεή (στρώμα στερεού) είτε υγρή (στρώμα υγρού ακινητοποιημένο σε ένα στερεό υπόστρωμα). Από την άλλη η κινητή φάση είναι υγρή ή αέρια και κινείται μέσω και κατά μήκος της στατικής φάσης. [45], [46]

Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω των διαφορών ως προς την φυσικοχημική συγγένεια των ουσιών σε σχέση με τις δυο αυτές φάσεις. Ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων ισορροπιών των συστατικών μεταξύ των δυο φάσεων και της διαφορετικής μετακίνησης τους στην στατική φάση. Συνεχώς μόρια διαλυμένης ουσίας ανταλλάσσονται μεταξύ των δύο φάσεων. Εάν μια συγκεκριμένη διαλυμένη ουσία έχει μεγαλύτερη συγγένεια με το κινούμενο ρευστό, τα μόρια της θα περάσουν τον πιο πολύ χρόνο τους μεταναστεύοντας με το ρεύμα και θα μεταφερθούν μακριά από τα άλλα είδη των οποίων τα μόρια συγκρατούνται περισσότερο από τη στατική φάση. Πρώτα εξέρχονται τα μόρια που συγκρατούνται λιγότερο από την στατική φάση.

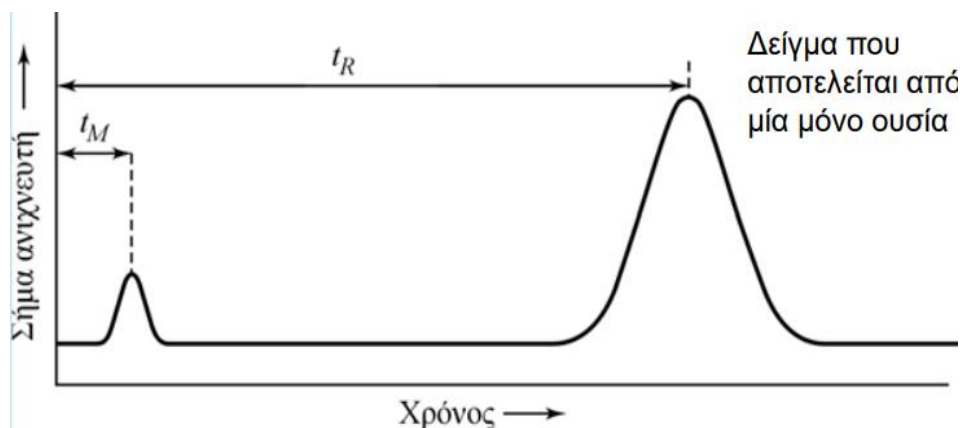
Οι δύο φάσεις επιλέγονται με τέτοιο τρόπο, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ταινίες ή ζώνες και κατόπιν μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά.

Υπάρχουν πολλά είδη χρωματογραφίας όπως η χρωματογραφία στήλης, η χρωματογραφία χάρτου, η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και η αέρια χρωματογραφία.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν με δύο τρόπους:

- Με βάση την φυσική κατάσταση της στατικής και κινητής φάσης, όπου διακρίνουμε την αέριο χρωματογραφία (GC), την υγροχρωματογραφία (LC) και την χρωματογραφία υπερκρίσιμων ρευστών (SFC).
- Με βάση την διάταξη της στατικής φάσης, όπου διακρίνεται σε χρωματογραφία στήλης (column chromatography) και επίπεδη χρωματογραφία (planar chromatography). Η δεύτερη διακρίνεται σε χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography) και σε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin layer chromatography, TLC). Η επίπεδη χρωματογραφία αφορά μόνο την υγρή χρωματογραφία και όχι την αέριο χρωματογραφία.
- Με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού. Έτσι έχουν χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, αποκλεισμού μεγέθους, ιονεναλλαγής, και συγγένειας.[45], [46], [47]

Το χρωματογράφημα είναι ένα γράφημα που δείχνει την απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου έκλουσης. Καμπύλη έκλουσης (Elution curve) ονομάζεται η καμπύλη συγκέντρωσης της ουσίας.



Εικόνα 17 χρωματογράφημα

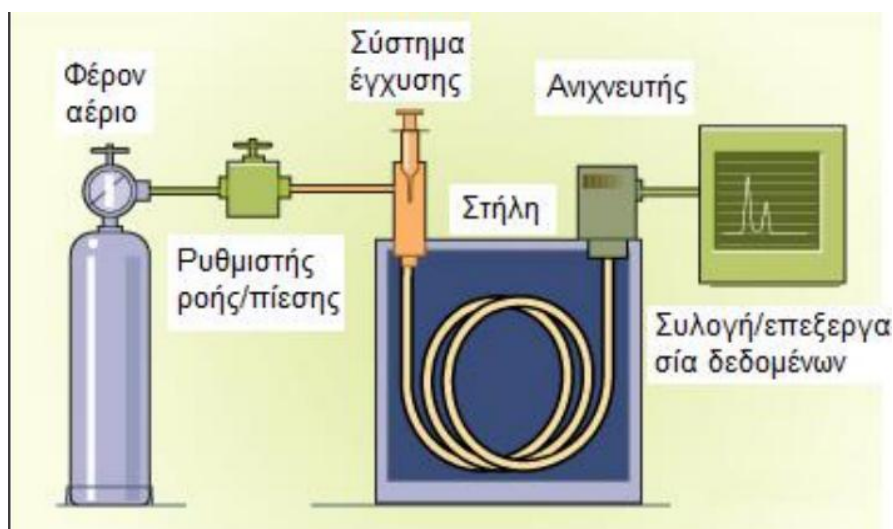
Χρόνος έκλουσης ή χρόνος ανάσχεσης (retention time) t_R είναι ο χρόνος από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φθάνει στον ανιχνευτή. Ο νεκρός χρόνος (dead time t_M ή t_0) είναι ο χρόνος που χρειάζεται για να φθάσει μια μη κατακρατούμενη ουσία στον ανιχνευτή. Ο ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης (adjusted retention time t_R') ισούται με $t_R - t_0$.

Η ταχύτητα μετανάστευσης της μη κατακρατούμενης ουσίας είναι ίση με τη μέση ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης.[45], [46], [47]

2.2.1.Αέρια χρωματογραφία (GC)

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια αναλυτική τεχνική διαχωρισμού που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση πτητικών ουσιών στην αέρια φάση. Στην αέρια χρωματογραφία, τα συστατικά ενός δείγματος διαλύονται σε έναν διαλύτη και εξατμίζονται με σκοπό να διαχωριστούν οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμοντας το δείγμα μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής φάσης και μιας κινητής φάσης. Η κινητή φάση είναι ένα χημικά αδρανές αέριο το οποίο χρησιμεύει στη μεταφορά των μορίων της αναλυόμενης ουσίας μέσω της θερμαινόμενης στήλης. Η αέρια χρωματογραφία αποτελεί μία από τις μοναδικές μορφές χρωματογραφίας που δεν χρησιμοποιεί την κινητή φάση για την αλληλεπίδραση με την αναλυόμενη ουσία. Ο μόνος ρόλος της κινητής φάσης είναι η μετακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης.

[47], [48]



Εικόνα 18 τμήματα αέριου χρωματογράφου

Υπάρχουν δύο τύποι αέριας χρωματογραφίας, η χρωματογραφία αερίου-στερεού (gas-solid chromatography, GSC) και η χρωματογραφία αερίου-υγρού (gas-liquid chromatography, GLC). Η χρωματογραφία αερίου-υγρού εμφανίζει ευρεία χρήση σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών και

συχνά αναφέρεται ως αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC), αν και με την ονομασία αυτή παραβλέπεται, ότι και η χρωματογραφία αερίου-στερεού αποτελεί ένα χρήσιμο τύπο χρωματογραφίας.

Η χρωματογραφία αερίου-στερεού βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, στην οποία η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης. Έχει περιορισμένες εφαρμογές λόγω της σχεδόν μόνιμης κατακράτησης δραστικών ή πολικών μορίων και της έντονης παρουσίας ουράς στις κορυφές έκλουσης (ως αποτέλεσμα του μη γραμμικού χαρακτήρα του μηχανισμού προσρόφησης). Χρησιμοποιείται για διαχωρισμό ορισμένων αερίων χαμηλού μοριακού βάρους.[47], [48]

Η χρωματογραφία αερίου-υγρού στηρίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης. Η στατική φάση είναι ένα υγρό σε ένα αδρανές υπόστρωμα. Η ανάπτυξη αναλυτικών εφαρμογών με την τεχνική αυτή έγινε με ταχείς ρυθμούς.

Στη αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο τύποι στηλών, οι πληρωμένες ή πακεταρισμένες (packed) και οι στήλες ανοικτού σωλήνα (open tubular) ή τριχοειδείς (capillary). Το μήκος των στηλών που χρησιμοποιούνται κυμαίνεται από 2m (ή και πιο μικρό) μέχρι και περισσότερο από 50m. Είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα, ύαλο, τηγμένη πυριτία ή Teflon. Προκειμένου να είναι επιτερπτή η τοποθέτησή τους στον φούρνο για θερμοστάτηση, συνήθως έχουν τη μορφή σπειράματος.



Εικόνα 19 αριστερά: πληρωμένη στήλη δεξιά: τριχοειδής στήλη

Η πληρωμένη στήλη στην εικόνα 18 είναι κατασκευασμένη από ανοξείδωτο ατσάλι μήκους 2m με εσωτερική διάμετρο 3,2 mm. Το υλικό πλήρωσης έχει διάμετρο σωματιδίων 149-177 μm . Η τριχοειδής στήλη στην ίδια εικόνα. Έχει

μήκος 30 m και εσωτερική διάμετρο 0,25 mm. Η εσωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς αποτελείται από επίστρωση υγρής φάσης πάχους 0,25 μm .

Η σειρά έκλουσης στην χρωματογραφία αερίου-υγρού εξαρτάται από το σημείο βρασμού των διαλυμένων ουσιών και την αλληλεπίδραση ανάμεσα στις διαλυμένες ουσίες και την στατική φάση. Στην περίπτωση που τα συστατικά του μείγματος έχουν σημαντικά διαφορετικά σημεία ζέσης, η επιλογή της στατικής φάσης είναι λιγότερο σημαντική. Από την άλλη αν δύο διαλυμένες ουσίες έχουν παρόμοια σημεία ζέσεως, τότε καθίσταται δυνατός ο διαχωρισμός μόνο στην περίπτωση που η στατική φάση αλληλεπιδρά επιλεκτικά με μία από τις διαλυμένες ουσίες. Γενικά ισχύει ο κανόνας ότι οι μη πολικές διαλυμένες ουσίες διαχωρίζονται πιο εύκολα με τη χρήση μιας μη πολικής στατικής φάσης και οι πολικές διαλυμένες ουσίες διαχωρίζονται πιο εύκολα με τη χρήση πολικής στατικής φάσης. [47], [48]

Οι αναλύτες διαχωρίζονται και εξέρχονται από την στήλη μέσω μεταβολής της θερμοκρασίας της στήλης. Αλλάζοντας την θερμοκρασία (θερμοκρασιακό πρόγραμμα), μεταβάλλεται η δυναμική της αλληλεπίδρασης του αναλύτη με την στατική φάση, και επομένως εξέρχονται από την στήλη όλοι οι αναλύτες σε διαφορετικούς χρόνους.

Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών όπως ο ανιχνευτής φλόγας (FID), ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD), ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), ο ανιχνευτής ατομικής Εκπομπής (AED), ανιχνευτής χημειοφωταύγειας (CS), Φωτοϊονισμού (PID) και το φασματομέτρο μάζας (MS). [47], [48]

2.2.2. Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

Φασματομετρία μάζας (MS) χαρακτηρίζεται μια ισχυρή ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος αναλυτών. Κατά την τεχνική αυτή τα μόρια, δηλαδή τα συστατικά ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και κατόπιν διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της

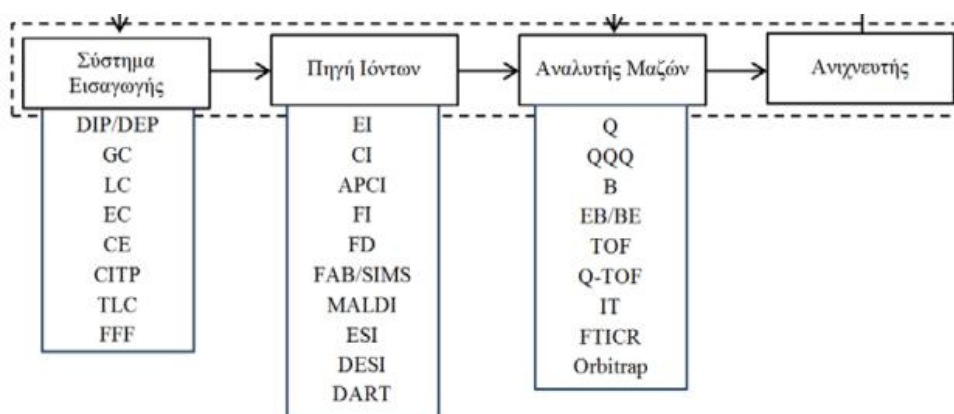
μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται, ευρέως, σε πολλούς τομείς τεχνολογίας και έρευνας, όπως οι επιστήμες ζωής, οι επιστήμες των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι τεχνολογίες omics. Αυτό συμβαίνει διότι η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για:

- την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων
- τη χημική δομή μεγάλου αριθμού ενώσεων
- την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων
- τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging)

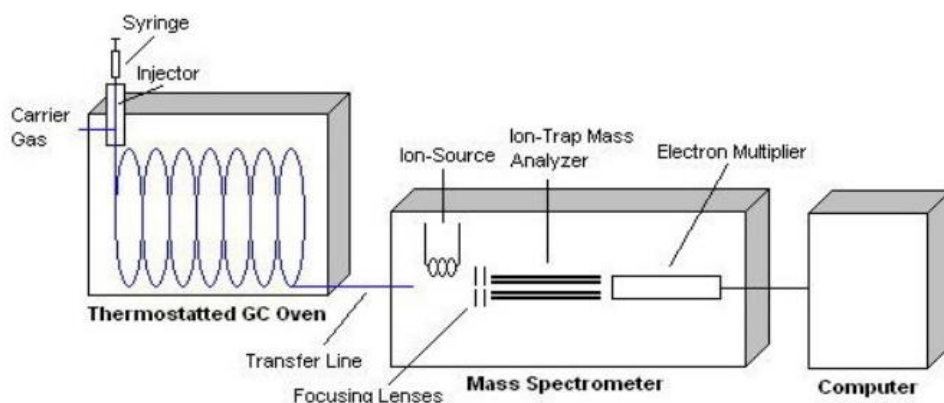
Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος, σημείο διασύνδεσης π.χ. με το GS
- Την πηγή ιόντων, όπου τα εισερχόμενα μόρια μετατρέπονται σε ιόντα. Συχνά το σύστημα έγχυσης συνενώνεται με την πηγή ιόντων.
- Τον αναλυτή μαζών. Εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με τον λόγο m/z τους.
- Τον ανιχνευτή ο οποίος συλλέγει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.[48], [49], [50]

Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό που δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.



Εικόνα 20 τμήματα φασματογράφου

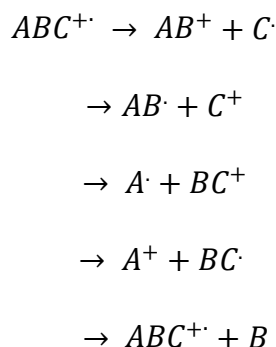


Εικόνα 21 σύζευξη GC-MS

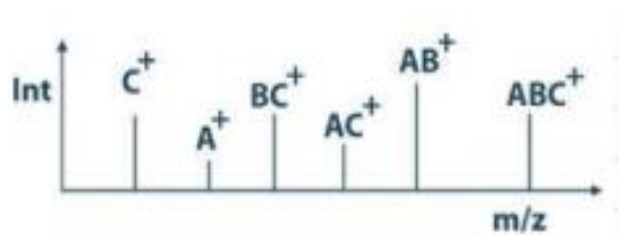
Η βασική αρχή της τεχνικής αυτής είναι ο βομβαρδισμός των χημικών ειδών με δέσμη ηλεκτρονίων (70 eV) που οδηγεί σε απόσπαση ηλεκτρονίου και παραγωγή ιόντος, δηλαδή κατιονικής ρίζας. Η κατιονική ρίζα λόγω του υψηλού ενεργειακού της φορτίου διασπάται σε επιμέρους θετικά φορτισμένα ιόντα και ουδέτερα θραύσματα. Τα ουδέτερα θραύσματα δεν ανιχνεύονται στην συνέχεια.

Ιοντισμός : $ABC + e^- \rightarrow ABC^{+\cdot} + 2e^-$

Θραυσματοποίηση :



Παρακάτω φαίνεται ένα φάσμα μάζας που είναι ένα γράφημα του λόγου m/z με την ένταση των ιόντων. Στο φάσμα μάζας η κορυφή με ένταση 100% ονομάζεται βασική κορυφή και η κορυφή που αντιστοιχεί στο μη θραυσματοποιημένο ιόν ονομάζεται κορυφή μοριακού ιόντος. [51], [52]



Εικόνα 22 φάσμα μάζας

Κάθε οργανικό μόριο θραυσματοποιείται με έναν και μοναδικό τρόπο (δακτυλικό αποτύπωμα) και έτσι λαμβάνουμε πληροφορίες σχετικά με την δομή του. Παρόμοια φάσματα μάζας δεν αντιστοιχούν απαραίτητα σε παρόμοιες δομές.

Η ικανότητα ενός αναλύτη να διακρίνει δύο γειτονικές κορυφές ονομάζεται διακριτική ικανότητα και περιγράφεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Ιονισμός

Η επιλογή της τεχνικής ιονισμού που θα εφαρμοστεί έχει ιδιαίτερη σημασία για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για την ίδια ένωση, το φάσμα που θα ληφθεί μπορεί να είναι τελείως διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού. Οι τεχνικές ιονισμού διαχωρίζονται σε "μαλακές" και "σκληρές" τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπασή της ένωσης σε θυγατρικά ιόντα (θραύση). Μαλακές ονομάζονται οι τεχνικές που πραγματοποιούν ιονισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση. Ο ιονισμός των μορίων γίνεται με διάφορες τεχνικές όπως ο ιονισμός με ηλεκτρονιακή πρόσκρουση (Electron impact ionization, EI) με την χρήση ταχέως κινούμενων ηλεκτρονίων σε ηλεκτρικό πεδίο, φωτοϊονισμός και χημικός ιονισμός (Chemical ionization, CI), μέσω κρούσης με άλλα ιόντα.

Ο ηλεκτρονιοντισμός (EI) είναι η πιο παλιά και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ιονισμού στην οποία τα ηλεκτρόνια βομβαρδίζουν απευθείας την ένωση. Αποτελεί μια σκληρή τεχνική ιονισμού από την οποία παράγονται ιόντα με φορτίο +1. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι εφαρμόζεται σε όλα τα πτητικά μόρια, ότι λαμβάνουμε επαναλήψιμο φάσμα μαζών, ότι τα

θραύσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση της δομής και ότι αποτελεί την βάση για την δημιουργία ψηφιακών βιβλιοθηκών που περιέχουν το αποτύπωμα κάθε ένωσης. Η τεχνική εμφανίζει και μειονεκτήματα όπως το ότι το δείγμα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό και ότι το μοριακό ιόν μπορεί να απουσιάζει ή να έχει χαμηλή αφθονία.

Ο χημικός ιοντισμός (CI) είναι μια μαλακή τεχνική ιονισμού, όπου έχουμε μικρή θραυσματοποίηση και παρουσία του μοριακού ιόντος. Εδώ η δέσμη ηλεκτρονίων δεν αλληλεπιδρά κατευθείαν με την ένωση, αλλά με ένα αέριο αντιδραστήριο που έχει εισαχθεί (0,1-1 Torr). Υπάρχει θετικός και αρνητικός χημικός ιοντισμός. Στον θετικό έχουμε αντίδραση μεταφοράς H^+ και δημιουργία ψεύδο μοριακού κατιόντος υψηλής αφθονίας, ενώ στον αρνητικό πραγματοποιείται αντίδραση σύλληψης e^- και δημιουργία ανιονικής ρίζας. Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι λαμβάνουμε πληροφορίες για το MB και απλό φάσμα χωρίς ιδιαίτερη θραυσματοποίηση. Από την άλλη, υπάρχουν μειονεκτήματα, όπως ότι το δείγμα μας πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό και ότι η ελλιπής θραυσματοποίηση οδηγεί σε αδυναμία ταυτοποίησης μέσω έρευνας σε ψηφιακές βιβλιοθήκες. [49], [51], [52]

Αναλυτές μάζας

Οι αναλυτές μάζας πραγματοποιούν τον διαχωρισμό των ιόντων με βάση τον λόγο m/z . Μπορούν να πραγματοποιούν πλήρη σάρωση (full scan) ή σάρωση επιλεγμένων ιόντων (SIM), καταγράφοντας μόνο τα επιθυμητά μόρια. Οι αναλυτές μάζας διακρίνονται στους αναλυτές χαμηλής διακριτικής ικανότητας, όπως το τετράπολο και η παγίδα ιόντων και υψηλής διακριτικής ικανότητας, όπως οι αναλυτές χρόνου πτήσης και μαγνητικού τομέα.

Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές είναι ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές διακριτών ή συνεχών δυνόδων. Αυτοί αποτελούνται από δυνόδους, δηλαδή μεταλλικές επιφάνειες κράματος Cu-Al, οι οποίες εκπέμπουν δευτερογενή ηλεκτρόνια. Αρχικά πραγματοποιείται πρόσκρουση των εξερχόμενων ιόντων στην πρώτη δύνοδο. Έτσι προκαλείται εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων, τα οποία προσκρούονται στην δεύτερη δύνοδο. Καθώς το φαινόμενο συνεχίζεται

προκύπτει εκπομπή πολλαπλάσιων ηλεκτρονίων, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του σήματος 10^6 - 10^8 φορές. [50], [51], [52]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:

Μεταβολομική

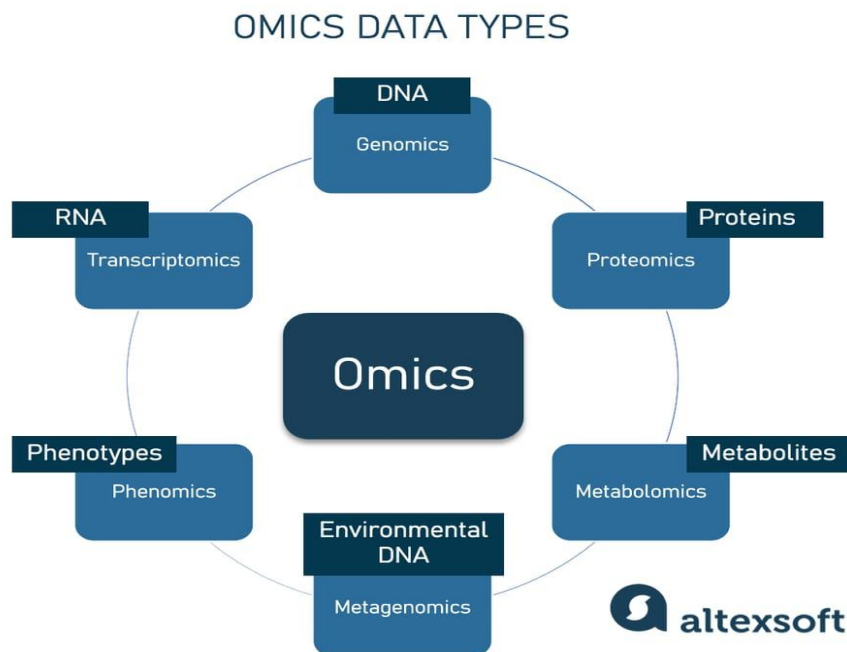
3.1. εισαγωγή – ομικές τεχνολογίες (-omics)

Οι ομικές τεχνολογίες είναι υψηλού επιπέδου τεχνολογίες οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ολιστική ανάλυση των μορίων που συνθέτουν τα κύτταρα των ζωντανών οργανισμών.

Από τότε που άρχισε η διαδικασία χαρτογράφησης και αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, οι νέες τεχνολογίες έκαναν δυνατή τη λήψη ενός τεράστιου αριθμού μοριακών μετρήσεων σε έναν ιστό ή ένα κύτταρο. Αυτές οι τεχνολογίες δύναται να εφαρμοστούν σε ένα βιολογικό σύστημα ενδιαφέροντος προκειμένου να ληφθεί ένα στιγμιότυπο της υποκείμενης βιολογίας σε μια ανάλυση που ποτέ πρωτίτερα δεν ήταν δυνατή. Τα επιστημονικά πεδία τα οποία σχετίζονται με τη μέτρηση τέτοιων βιολογικών μορίων με τρόπο υψηλής απόδοσης καλούνται «ωμικά».

Πολλοί τομείς έρευνας μπορούν να ταξινομηθούν ως omics. Τα πεδία μελέτης omics περιλαμβάνουν τους ακόλουθους κλάδους:

- γονιδιωματική, μελέτη του γονιδιώματος ενός ατόμου
- πρωτεομική, μελέτη των πρωτεωμάτων, ένα σύνολο πρωτεϊνών σε έναν οργανισμό
- μεταβολομική, μελέτη των μεταβολιτών, δηλαδή μικρών μορίων εντός των κυττάρων που παράγονται κατά τον μεταβολισμό
- μεταγονιδιωματική, μελέτη γενετικών υλικών που ανακτώνται από φυσικά περιβάλλοντα
- phenomics, μελέτη των συνολικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών ενός οργανισμού
- μεταγραφωματική, μελέτη των μεταγραφών RNA που παράγονται από ένα γονιδίωμα[53], [54], [55], [56], [57]



Εικόνα 23 κλάδοι ωμικής

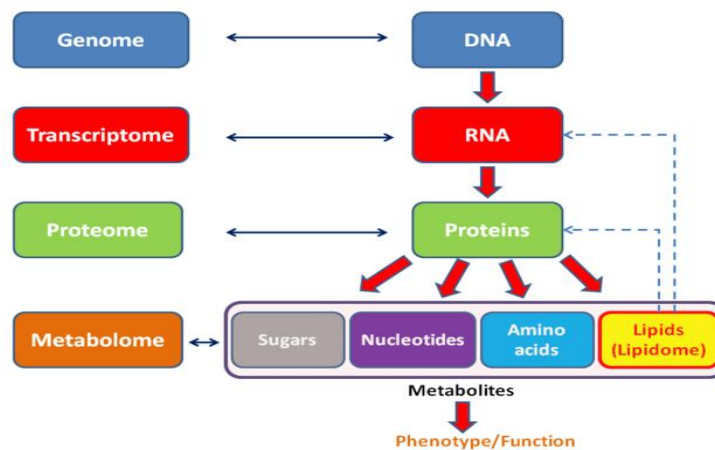
Υπάρχει πλήθος κινήτρων για τη διεξαγωγή ωμικής έρευνας. Ένας κοινός λόγος είναι προκειμένου να αποκτήσουμε μια ολοκληρωμένη κατανόηση του υπό μελέτη βιολογικού συστήματος. Παραδείγματος χάριν, θα μπορούσε κάποιος να πραγματοποιήσει μια μελέτη πρωτεομικής σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς νεφρών προκειμένου να κατανοήσει καλύτερα τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών, τις λειτουργικές οδούς και τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο όργανο. Ένας άλλος σύνηθες στόχος των μελετών omics είναι η συσχέτιση μοριακών μετρήσεων που βασίζονται σε omics με ένα κλινικό αποτέλεσμα ενδιαφέροντος, όπως ο χρόνος επιβίωσης του καρκίνου του προστάτη, ο κίνδυνος υποτροπής του καρκίνου του πνεύμονα ή η ανταπόκριση στη θεραπεία. Η ιδέα είναι ότι εκμεταλλευόμενοι τις μετρήσεις που στηρίζονται σε ωμικά στοιχεία, υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης ενός πιο ακριβούς προγνωστικού μοντέλου μιας συγκεκριμένης πάθησης ή ασθένειας από ό,τι μπορεί να επιτευχθεί με χρήση τυπικών κλινικών προσεγγίσεων.[53], [54], [58]

3.2. Μεταβολομική ανάλυση

Το ανθρώπινο σώμα αποτελεί ένα πολύπλοκο εργαστήριο όπου πραγματοποιούνται εκατομμύρια χημικές αντιδράσεις. Χιλιάδες χημικά συστατικά αντιδρούν μεταξύ τους για την διατήρηση της ζωής, μια διαδικασία που καλείται μεταβολισμός. Ο **Μεταβολισμός** σαν έννοια προέρχεται από την λέξη “μεταβολή” και αναφέρεται στις μεταβολές που πραγματοποιούνται στα συστατικά που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα. Κύριος σκοπός του μεταβολισμού αποτελεί η μετατροπή των διαφόρων ουσιών, ώστε να χρησιμοποιηθούν σε δύο κύριες κατευθύνσεις. Η πρώτη κατεύθυνση είναι η κατασκευή και η αναδόμηση ιστών, ενώ η δεύτερη αφορά την παραγωγή ενέργειας. Οι δύο αυτές λειτουργίες είναι η βάση για τη διατήρηση της ζωής σε όλους τους οργανισμούς. Ένας οργανισμός που μπορεί να χτίσει και να αναδιαμορφώσει τα κύτταρα του, τους ιστούς του και τα όργανα του, χωρίς δυσκολία με άφθονη ενέργεια στη διάθεση του είναι ένας υγιής οργανισμός.

Μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό λαμβάνουν χώρα 5000 χημικές αντιδράσεις. Τα προϊόντα των χημικών αντιδράσεων αυτών ονομάζονται **μεταβολίτες**. [59]

Αυτές οι χημικές αντιδράσεις διεκπεραιώνονται σε μια αλληλουχία. Ένα συστατικό μετατρέπεται σε κάποιο άλλο και αυτό στο επόμενο συστατικό. Μετρώντας τους μεταβολίτες μπορούμε να καταλάβουμε αν σε κάποιο σημείο του μεταβολισμού μια χημική αντίδραση δεν ολοκληρώνεται σωστά, οπότε κάποιο συστατικό δεν περνάει στο επόμενο βήμα με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται. Έτσι καταγράφετε σε μεγαλύτερη ποσότητα απ’ ότι θα έπρεπε σε σχέση με το επόμενο. [59], [60]



Εικόνα 24 ωμικές τεχνικές

Το 1971 ο Horning και οι συνεργάτες του άρχισαν να εφαρμόζουν τις μεθόδους διάγνωσης των μεταβολικών διαταραχών στον πληθυσμό ευρύτερα με σκοπό την διάγνωση των μεταβολικών αιτιών των νοσημάτων. Έτσι διαμορφώθηκαν τα πρώτα εξατομικευμένα μεταβολικά προφίλ. Στις αρχές της δεκαετίας του 70 ο Pauling παρατήρησε πως ο κάθε άνθρωπος έχει ένα μοναδικό μεταβολικό προφίλ. Κατά την διάρκεια της δεκαετίας αυτής ο Pauling και ο Arthur Robinson εξέλιξαν και άλλο την έρευνα που αφορούσε την μέτρηση των μεταβολιτών στον άνθρωπο. Την δεκαετία του '90 ξεκίνησε η κλινική εφαρμογή της Μεταβολομικής. Στις μέρες μας αποτελεί τον πιο ακριβή τρόπο αξιολόγησης της υγείας καθώς και αναπόσπαστο κομμάτι της Εξατομικευμένης Ιατρικής. [61], [62]

Η μεταβολομική μπορεί να εφαρμοστεί από οποιαδήποτε ειδικότητα. Μπορεί να εφαρμοστεί :

- Στην ενδοκρινολογία
- Στην ρευματολογία
- Στην γυναικολογία και στην επιλογή ωαρίων
- Στα Αυτοάνοσα Νοσήματα
- Στις Διαταραχές του Γαστρεντερικού Συστήματος
- Στην Ογκολογία
- Στο Διαβήτη
- Στον Αυτισμό
- Στα Νευρολογικά Νοσήματα
- Στην Παχυσαρκία

- Στην Καρδιολογία
- Στον καρκίνο

Βιοδείκτες- Μεταβολίτες

Οι επιστήμονες επιδιώκουν με τη Μεταβολομική επιστήμη μακροπρόθεσμα να καλύψουν σημαντικά κενά που υπάρχουν στη βιολογία των συστημάτων. Οι βραχυπρόθεσμοι κλινικοί στόχοι για τον τομέα αφορούν πιο πολύ την αναζήτηση βιο-δεικτών. Οι μεμονωμένοι μεταβολίτες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ως βιο-δείκτες της νόσου εδώ και χρόνια. Για παράδειγμα, η αυξημένη γλυκόζη είναι ένδειξη για σακχαρώδη διαβήτη, ενώ η χοληστερόλη αποτελεί ένας μεταβολίτη, που σχετίζεται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τα εγκεφαλικά επεισόδια. Η Μεταβολομική καθιστά επιτρεπτό τον εντοπισμό βιο-δεικτών που βασίζονται σε ολόκληρες ομάδες μεταβολιτών που αυξάνονται είτε μειώνονται ταυτόχρονα υπό συγκεκριμένες συνθήκες.

Η μεταβολομική παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα και θεωρείται αποτελεσματικότερη από άλλες ωμικές τεχνικές. Τα μεταβολομικά προφίλ είναι πολύ πιο φθηνά στην παραγωγή, σε σχέση με τις μικρο-συστοιχίες DNA, οι οποίες χρησιμοποιούνται στην γονιδιωματική έρευνα και κοστίζουν εκατοντάδες έως και χιλιάδες ευρώ. Ακόμα και η ανάλυση πρωτεϊνών είναι χρονοβόρα διαδικασία και παρεμποδίζεται από το κατά πολύ μεγαλύτερο μέγεθος και την πολυπλοκότητα των μορίων. Επίσης, οι λειτουργίες των πιο πολλών γονιδίων και πρωτεϊνών παραμένουν άγνωστες, ενώ αντίθετα οι μεταβολίτες μπορούν πολλές φορές να συσχετιστούν με συγκεκριμένους ιστούς ασθενειών, πράγμα που επιτρέπει την σχετικά εύκολη ανάγνωση των λειτουργιών τους. Τέλος, η μεταβολομική αποτελεί μη επεμβατική μέθοδο και επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη δειγματοληψία. Οι μεταβολίτες υπάρχουν στους ιστούς, στο αίμα, στο σάλιο, στην αναπνοή και στα ούρα. Παρόλα αυτά και οι μεταβολικοί βιο-δείκτες έχουν τους περιορισμούς τους.[60], [61], [62]

3.3. Στοχευμένη – μη στοχευμένη ανάλυση

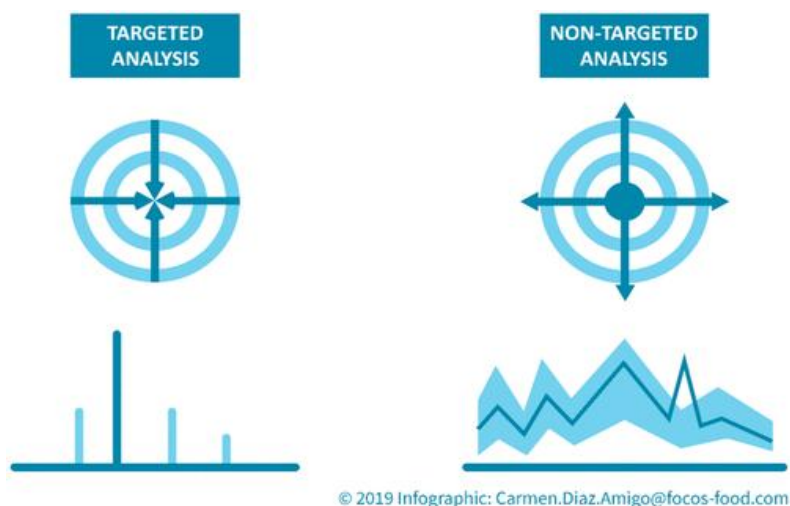
Η **στοχευμένη** ανάλυση αφορά τη διαδικασία αναζήτησης ορισμένων, γνωστών χημικών ουσιών. Μια στοχευμένη ανάλυση, με άλλα λόγια, καλύπτει τον εντοπισμό ή την ποσοτικοποίηση ενός ή περισσότερων προκαθορισμένων αναλυτικών στόχων. Οι στόχοι μπορούν να είναι είτε πρωτογενείς είτε δευτερεύοντες δείκτες. Μια ανάλυση προφίλ στοχεύει πολλαπλούς δευτερεύοντες δείκτες (απαιτούνται >2 στόχοι). Οι ερευνητές γνωρίζουν τα χαρακτηριστικά των αναλυτικών στόχων, όπως τους χρόνους κατακράτησης και τα φάσματα μάζας. Επομένως, η στοχευμένη ανάλυση δεν αξιολογεί άλλες ουσίες που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Με τον περιορισμό αυτό της ποσότητας των δεδομένων που μετρούνται, αυξάνεται η επιλεκτικότητα και η ευαισθησία.[63], [64]

Η **μη στοχευμένη** ανάλυση, αναφερόμενη και ως «δακτυλικά αποτυπώματα», εντοπίζει την ίδια στιγμή πολλούς απροσδιόριστους στόχους (συνικά πάνω από 100) που υπάρχουν σε ένα δεδομένο δείγμα. Οι ερευνητές χρησιμοποιούν την NTA για να αναγνωρίσουν γνωστά αλλά και άγνωστα συστατικά για μια καλύτερη εικόνα της σύνθεσης ενός δείγματος. Οι αναλύσεις αυτές είναι συχνά ποιοτικές και είναι σημαντικές όταν δεν έχουν καθοριστεί οι κύριοι ή δευτερεύοντες δείκτες. Τα δακτυλικά αποτυπώματα συχνά αναφέρονται με βάση την αναλυτική μέθοδο η οποία χρησιμοποιείται και έτσι υπάρχουν δακτυλικά αποτυπώματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματομετρίας μάζας (MS).[63], [65]

Το κύριο πλεονέκτημα της μη στοχευόμενης ανάλυσης είναι ότι δίνει μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα των ουσιών που υπάρχουν σε ένα δείγμα. Έχει ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως στις δοκιμές τροφίμων, στην περιβαλλοντική ανάλυση, τη μεταβολομική και τη βιομηχανία πετρελαίου. Για παράδειγμα, εάν οι ερευνητές επιθυμούν να βρουν έναν βιοδείκτη για μια συγκεκριμένη ασθένεια, θα πραγματοποιήσουν μη στοχευμένη ανάλυση για να αποκτήσουν μια ιδέα των συστατικών στα δείγματα των ασθενών. [63], [64], [65]

Ένα από τα μειονεκτήματα της μη στοχευμένης ανάλυσης είναι ότι υπάρχει μεγαλύτερος βαθμός αβεβαιότητας σε σύγκριση με τις στοχευμένες χημικές μετρήσεις. Η αβεβαιότητα αφορά τις ακριβείς δομές και τις συγκεντρώσεις των

ανιχνευόμενων ουσιών. Η NTA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρώτο βήμα για την εξερεύνηση δειγμάτων και την ανακάλυψη νέων χημικών ουσιών, ακολουθούμενη από στοχευμένες προσεγγίσεις που εξασφαλίζουν δεδομένα μέτρησης υψηλής βεβαιότητας.[66]



Εικόνα 25 στοχευμένη και μη στοχευμένη ανάλυση

3.4. Μεταβολομική σε βιολογικά δείγματα

Οι στόχοι της μεταβολομικής, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αφορούν σε μεγάλο βαθμό την αναζήτηση βιο-δεικτών. Βιοδείκτες ονομάζονται τα βιομόρια που αποτελούν ενδείξεις της παθοφυσιολογικής κατάστασης ενός ασθενούς, αφού παρουσιάζουν διαφοροποίηση στη συγκέντρωσή τους κατά την εκδήλωση και την πορεία μιας ασθένειας και μπορούν να μετρηθούν με ακρίβεια. Οι μεμονωμένοι μεταβολίτες έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί ως βιο-δείκτες της νόσου. Για παράδειγμα, η αυξημένη γλυκόζη είναι ένδειξη για σακχαρώδη διαβήτη, ενώ η χοληστερόλη αποτελεί μεταβολίτη, που σχετίζεται με τις καρδιαγγειακές παθήσεις και τα εγκεφαλικά επεισόδια. Η Μεταβολομική καθιστά επιτρεπτό τον εντοπισμό βιο-δεικτών που βασίζονται σε ολόκληρες ομάδες μεταβολιτών που αυξάνονται είτε μειώνονται ταυτόχρονα υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Η ενσωμάτωση αυτού του εργαλείου προσφέρει την ευκαιρία να εξετάσουμε και να διαγνώσουμε πολλές ασθένειες. Μία από τις κύριες κατηγορίες ασθενειών που στοχεύει η μεταβολομική είναι ο καρκίνος αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διάγνωση καταστάσεων της ασθένειας απευθείας στα σωματικά υγρά. Οι καρκινικοί βιοδείκτες είναι ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα όγκων ως απάντηση στην παρουσία όγκων.

Μερικοί βιοδείκτες παράγονται μόνο από ένα ενιαίο είδος καρκίνου. Καρκινικοί βιοδείκτες μπορούν να βρεθούν στο αίμα, στα ούρα, στην σίελο και στον της αναπνοής. Ο αέρας αποτελείται από πολλές πτητικές ενώσεις (VOCs), οι οποίες δύνανται να είναι σημαντικοί μεταβολίτες για διάφορες μεταβολικές ενέργειες.[67], [68]

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
- στην διάγνωση της ασθένειας
- στην άμεση και αποτελεσματική παρακολούθηση της πορείας της θεραπείας
- Στην παρακολούθηση της ανταπόκρισης του ασθενή στη φαρμακευτική αγωγή
- Στην πρόγνωση της ασθένειας πριν καν εμφανιστεί [67], [68]

3.5. Αναλυτικές τεχνικές και μεταβολομική

Η μεταβολομική έχει αναπτυχθεί μαζί με καινοτόμα αναλυτικά όργανα. Στηρίζεται σε σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές στις οποίες εξετάζεται η αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Πολλές αναλυτικές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένης της φασματομετρίας μάζας (MS), του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), της φασματοσκοπίας υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) και της φασματοσκοπίας Raman. Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) και η Φασματομετρία Μαζών (MS), είναι οι αναλυτικές πλατφόρμες με την πιο ευρεία χρήση στον τομέα αυτόν και παρέχουν τη δυνατότητα ολιστικής ανάλυσης δειγμάτων, προσφέροντας πληροφορίες για εκατοντάδες μεταβολίτες οι οποίοι περιέχονται σε ένα βιολογικό δείγμα διεξάγοντας μόνο μία ανάλυση.[69]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πτητικές οργανικές ενώσεις VOCs στον εκπνεόμενο αέρα

4.1. Εισαγωγή – οργανικές πτητικές ενώσεις (VOCs)

Οι οργανικές πτητικές ενώσεις είναι οργανικές χημικές ενώσεις που υπό κανονικές συνθήκες είναι αέριες ή μπορούν να εξατμιστούν. Οι πτητικές οργανικές ενώσεις περιλαμβάνουν ενώσεις όπως είναι το μεθάνιο, βενζόλιο, ξυλόλιο, προπάνιο και βουτάνιο. Οι ενώσεις αυτές έχουν υψηλή τάση ατμών. Η υψηλή τάση ατμών σχετίζεται με χαμηλό σημείο βρασμού και με το χαρακτηριστικό που καλείται πτητικότητα. Η πτητικότητα μιας ένωσης είναι υψηλότερη όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία του σημείου βρασμού της.

Δεν υπάρχει ένας κοινός και συγκεκριμένος ορισμός για τις πτητικές οργανικές ενώσεις. Χρησιμοποιούνται διάφοροι ορισμοί του όρου VOC.

- Ο γενικός ορισμός των VOC που χρησιμοποιείται στην επιστημονική βιβλιογραφία είναι ο εξής : “Οι πτητικές οργανικές ενώσεις είναι οργανικές χημικές ενώσεις των οποίων η σύνθεση καθιστά δυνατή την εξατμισή τους υπό κανονικές εσωτερικές ατμοσφαιρικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης.”
- Η Health Canada από τη άλλη ταξινομεί τις VOC ως “οργανικές ενώσεις που έχουν σημεία βρασμού περίπου στην περιοχή από 50 έως 250 °C”
- Η Ευρωπαϊκή Ένωση χρησιμοποιεί τον ορισμό : “VOC είναι οποιαδήποτε οργανική ένωση με αρχικό σημείο βρασμού μικρότερο ή ίσο με 250°C μετρούμενο σε τυπική ατμοσφαιρική πίεση 101,3 kPa”

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) κατηγοριοποιεί τους οργανικούς ρύπους εσωτερικού χώρου ως εξής:

- Πολύ πτητικές οργανικές ενώσεις (VVOCs)
<0 έως 50-100
Προπάνιο, βουτάνιο, μεθυλοχλωρίδιο
- Πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs)
50-100 έως 240-260,

Φορμαλδεΐδη, d-Λιμονένιο, τολουόλιο, ακετόνη, αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη) 2-προπανόλη (ισοπροπυλική αλκοόλη), εξανάλη

- Ημιπτητικές οργανικές ενώσεις (SVOCs)

240-260 έως 380-400

Παρασιτοκτόνα (DDT, χλωρδάνιο, πλαστικοποιητές (φθαλικές ενώσεις), επιβραδυντικά πυρκαγιάς (PCB, PBB))[70], [71], [72]

Όσο μεγαλύτερη είναι η πτητικότητα (χαμηλότερο το σημείο βρασμού), τόσο πιο πιθανό είναι η ένωση να εκπέμπεται στον αέρα. Οι πολύ πτητικές οργανικές ενώσεις είναι τόσο πτητικές που είναι δύσκολο να μετρηθούν και βρίσκονται σχεδόν εξ ολοκλήρου ως αέρια στον αέρα και όχι σε υλικά ή σε επιφάνειες.

Μερικές VOCs παράγονται από ανθρωπογενείς δραστηριότητες και απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα. Αυτά μπορεί να είναι επιβλαβή και κάποιες προκαλούν καρκίνο. Επιπλέον, κάποιες μπορούν να αντιδράσουν με αέρια και να σχηματίσουν άλλους ατμοσφαιρικούς ρύπους αφού βρεθούν στον αέρα. Υπάρχουν όμως και βιολογικά παραγόμενες πτητικές οργανικές ουσίες. Ακόμα και ο άνθρωπος παράγει πτητικές οργανικές ουσίες κατά την διάρκεια των αντιδράσεων που συμβαίνουν στον οργανισμό και αυτές απελευθερώνονται με την αναπνοή. [71], [73]

Οι βιογενείς πτητικές οργανικές ενώσεις (BVOCs) περιλαμβάνουν πτητικές οργανικές ενώσεις που εκπέμπονται από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς και είναι συνήθως τερπενοειδή, αλκοόλες και καρβονύλια. [70], [72], [73]

Οι κύριες πηγές ανθρωπογενών πτητικών οργανικών ενώσεων είναι τα οικοδομικά υλικά (βαφές, βερνίκια και κόλλες) προϊόντα οικιακής και προσωπικής φροντίδας (όπως καθαριστικά και απολυμαντικά, φυτοφάρμακα, αποσμητικά χώρου), η χρήση και παραγωγή ορυκτών καυσίμων, η εξόρυξη και επεξεργασία πετρελαίου και φυσικού αερίου και οι βιομηχανικές εκπομπές.

4.2. Σύσταση της ανθρώπινης αναπνοής

Ο εκπνεόμενος αέρας αποτελείται από περισσότερα από 3.500 συστατικά. Συγκεκριμένα, αποτελείται κυρίως από άζωτο, οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα,

νερό και αδρανή αέρια. Ιχνοστοιχεία- πτητικές ουσίες που παράγονται στο σώμα ή απορροφούνται από το περιβάλλον και υπάρχουν στην περιοχή nmol/l – pmol/l αποτελούν το υπόλοιπο μέρος της αναπνοής. Τα εξωγενή πτητικά συστατικά εισπνέονται μέσω των πνευμόνων είτε απορροφώνται μέσω του δέρματος. Τα ενδογενή πτητικά συστατικά του εκπνεόμενου αέρα παράγονται μέσα από τις κυτταρικές βιοχημικές διεργασίες του ανθρώπινου σώματος. [74], [75]

Η αναπνοή, λοιπόν, είναι εμπλουτισμένη με πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) που μπορούν να χρησιμεύσουν ως βιοδείκτες για μια ποικιλία πιθανών κλινικών χρήσεων. Ένας ιλιγγιώδης αριθμός ενώσεων παράγεται συνεχώς σε όλο το σώμα, μέσω του πλήθους των μεταβολικών διεργασιών που βρίσκονται σε εξέλιξη. Οι ενώσεις αυτές κατευθύνονται στο αίμα και στα κοντινά αιμοφόρα αγγεία. Μόλις εισέλθουν στο αίμα, ταξιδεύουν σε όλο το σώμα δια μέσω του κυκλοφορικού συστήματος. Η κυψελιδική μεμβράνη χρησιμεύει ως σημείο εκτόξευσης από την οποία οι πτητικές χημικές ουσίες του αίματος δύνανται να πετάξουν και να εισέλθουν στον αέρα, με αποτέλεσμα η εκπνοή να περιέχει πτητικές ενώσεις που παράγονται από όλο το σώμα.

Διάφορες κατηγορίες πτητικών οργανικών ενώσεων δύνανται να εντοπιστούν στην εκπνοή. Αυτές περιλαμβάνουν κορεσμένους και ακόρεστους υδρογονάνθρακες και ενώσεις οι οποίες περιέχουν οξυγόνο, θείο και άζωτο. Οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες (π.χ. πεντάνιο, αιθάνιο και αλδεΐδες) δημιουργούνται κατά την υπεροξείδωση των λιπιδίων των συστατικών λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, η οποία ενεργοποιείται από αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Πιο μικρές ποσότητες μπορεί να σχηματιστούν από την οξείδωση πρωτεϊνών και τον βακτηριακό μεταβολισμό του παχέος εντέρου. Οι ακόρεστοι υδρογονάνθρακες εντοπίζονται και αυτοί στην εκπνοή. Για παράδειγμα, το ισοπρένιο, σχηματίζεται στην μεβαλονική οδό της σύνθεσης χοληστερόλης. Στην αναπνοή βρίσκονται και ενώσεις που περιέχουν οξυγόνο όπως είναι η ακετόνη. Η ακετόνη σχηματίζεται μέσω της αποκαρβοξυλίωσης του ακετοξικού που προέρχεται από την λιπόλυση είτε την υπεροξείδωση λιπιδίων. Οι ενώσεις της εκπνοής που περιέχουν θείο μπορούν να παραχθούν από τον ατελές μεταβολισμό της μεθειονίνης στο μεταβολικό

μονοπάτι της τρανσαμίνωσης. Οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο παρατηρούνται αυξημένες σε άτομα με ηπατική δυσλειτουργία ή ουραιμία.[76]

Η προέλευση, όμως, πολλών ενδογενών πτητικών οργανικών ενώσεων δεν είναι ακόμα γνωστή. Κάποιες μπορεί να εμφανίζονται σε κάποιες παθολογικές καταστάσεις και έτσι να εποτελούν βιοδείκτες για τις ασθένειες αυτές, όπως ο καρκίνος. Επίσης, κάποια ασθένεια μπορεί να οδηγεί και σε αύξηση της συγκέντρωσης των πτητικών ενώσεων που έχουν ήδη γνωστή προέλευση. Οι μεταβολές της συγκέντρωσης τέτοιων ενώσεων στην εκπνοή ασθενών με καρκίνο δύναται να συσχετιστούν με βιοδείκτες ποσοτικοποίησης του καρκίνου, λόγω του ότι οι μεταβολικές διεργασίες των καρκινικών κυττάρων παράγουν περισσότερες ή μειώνουν τις πτητικές οργανικές ενώσεις συγκριτικά με τα φυσιολογικά κύτταρα.[74], [75]

4.3. Πτητικές οργανικές ενώσεις και καρκίνος του πνεύμονα

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε καταστάσεις ασθενειών ο οργανισμός μέσω των μεταβολικών μονοπατιών του μπορεί να παράγει μεγαλύτερες ή μικρότερες ποσότητες κάποιων πτητικών οργανικών ενώσεων από αυτές που παράγονται κατά την φυσιολογική λειτουργία του. Έτσι οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Το φαινόμενο αυτό έχει ήδη παρατηρηθεί σε διάφορους τύπους καρκίνου, με αποτέλεσμα η επιστημονική κοινότητα σήμερα να προσπαθεί να εντοπίσει VOCs που μπορούν να αποτελέσουν βιοδείκτες για κάθε τύπο καρκίνου.[77]

Για τον καρκίνο του πνεύμονα, συγκεκριμένα, ήδη υπάρχουσες έρευνες έχουν προτείνει VOCs για βιοδείκτες, όπως οι αλκοόλες, οι αλδεΐδες και οι αιθέρες. Συγκεκριμένα, διάφορες μελέτες εντόπισαν αρκετούς βιοδείκτες VOCs για τη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα, όπως είναι η 2-βουτανόνη, η 2-πεντανόνη, η 3-υδροξυ-2-βουτανόνη, η εξανάλη, η εξανόλη, το πεντάνιο, η δεκανοδιόλη, το στυρόλιο, το ξυλόλιο και διάφορες αλδεΐδες, φαινόλες, βενζόλια και αλκάνια. Η προέλευση των ενώσεων αυτών όμως δεν έχει εντοπιστεί πλήρως. Οι πτητικές χημικές ουσίες που ίσως αποτελούν βιοδείκτες για τον καρκίνο του πνεύμονα μπορεί να καταλήγουν στην εκπνοή

μέσω του αίματος, όπως αναλύθηκε, ή να διοχετεύονται απευθείας στους αεραγωγούς από τους καρκινικούς ιστούς στους πνεύμονες.

Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα για την ταυτοποίηση των σχετικών πτητικών ενώσεων είναι ελάχιστα, πιθανότατα λόγω έλλειψης τυποποίησης στην δειγματοληψία και στην ανάλυση εκπνοής. Ενώ πολλές είναι οι μελέτες και οι προτεινόμενες ενώσεις τα ευρήματα δεν συγκλίνουν, ώστε οι επιστήμονες να καταλήξουν στους κατάλληλους βιοδείκτες. Ο δρόμος για την έρευνα είναι ακόμα μακρύς. Όλες οι μελέτες έδειξαν ότι, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε ακριβής εντοπισμός συγκεκριμένων δεικτών για τον καρκίνο του πνεύμονα, η ασθένεια αλλάζει τη συγκέντρωση πολλών ενώσεων, τροποποιώντας έτσι τη συνολική χημική σύνθεση της εκπνοής. [77], [78], [79]

4.4. Τρόποι συλλογής των πτητικών οργανικών ενώσεων

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι συλλογής των VOCs οι σακούλες Tedlar (Tedlar bags), οι συσκευές Bio-VOC καθώς και οι σωλήνες συλλογής (RTubeVOC).[80], [81], [82]

Οι ηλεκτρονικές μύτες αποτελούν συστήματα ανίχνευσης αερίων που περιλαμβάνουν συστοιχίες πολλαπλών νανοαισθητήρων με διασταυρούμενη αντίδραση, ικανές να εκτελούν διάκριση μεταξύ των προτύπων απόκρισης αισθητήρων των VOC, χρησιμοποιώντας αλγόριθμους αναγνώρισης προτύπων για την ταξινόμηση αρώματος. Όταν έρθουν σε επαφή με πτητικές ενώσεις, οι αισθητήρες αυτοί αντιδρούν, γεγονός που σημαίνει ότι παρουσιάζουν μεταβολή στις ηλεκτρικές ιδιότητες.

Οι σακούλες Tedlar και οι σωλήνες RTubeVOC λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο συλλογής των VOCs. Και στις δύο μεθόδους το δείγμα συλλέγεται με βαθιά εκπνοή του δότη. Η διαφορά τους είναι ότι στις σακούλες Tedlar αποθηκεύεται όλη η ποσότητα του αέρα που εκπνέετε από τον δότη, ενώ στους σωλήνες RTubeVOC αποθηκεύεται μόνο το τελευταίο κλάσμα της εκπνοής του. Με αυτές τις μεθόδους συλλογής δεν πραγματοποιείται άμεση ανάλυση των VOCs της εκπνοής και έτσι κρίνεται απαραίτητο το στάδιο της προσυγκέντρωσης, αφού οι VOCs στον εκπνεόμενο αέρα βρίσκονται σε

συγκεντρώσεις της τάξης των ppm ή και χαμηλότερες. Οι πιο κοινοί μέθοδοι προσυγκέντρωσης είναι οι σωλήνες θερμικής εκρόφησης (TD) που περιλαμβάνουν προσροφητικά υλικά και η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME).[80], [81]

Το Bio-VOC αποτελεί μια απλή συσκευή μιας χρήσης για την συλλογή VOCs σε δείγματα εκπνοής, μεταφέροντας τις ενώσεις σε ροφητικούς σωλήνες, για ανάλυση με θερμική εκρόφηση (TD).[82]



Εικόνα 26 από τα αριστερά προς τα δεξιά: Bio- VOC, σακούλες Tedlar, RTubeVOC

4.5. Συνθήκες που επηρεάζουν την σύσταση των πτητικών οργανικών ενώσεων

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

Κατά τη συλλογή δείγματος είναι πιθανή η επιμόλυνσή του από πτητικές ενώσεις που βρίσκονται στο περιβάλλοντα χώρο. Έτσι γίνεται και δειγματοληψία του αέρα του χώρου για να συγκριθούν τα δύο δείγματα και να αφαιρεθούν VOCs που ίσως είναι προσμίξεις και δεν είναι ενδεικτικές του εκπνεόμενου αέρα. Ο καπνός του τσιγάρου έχει πολλές πτητικές οργανικές ενώσεις που μπορούν να μεταβάλλουν τη σύσταση των VOCs του εκπνεόμενου αέρα, όπως οι νιτροενώσεις και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Η λήψη τροφής πριν από τη δειγματοληψία πρέπει να αποφεύγεται χωρίς να είναι αποδεδειγμένο ότι επηρεάζει τη σύσταση των

VOCs. Η σωματική άσκηση ίσως δεν επηρεάζει τη σύσταση του εκπνεόμενου αέρα αλλά επιφέρει ίσως μεταβολές στα επίπεδα των VOCs. Επομένως, η άσκηση πριν τη δειγματοληψία καλό είναι να αποφεύγεται.[83], [84], [85], [86]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:

Σκοπός

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί τον πιο συχνό τύπο καρκίνου και τη κύρια αιτία θανάτου από καρκίνο στις μέρες μας, επιφέροντας μεγάλη επιβάρυνση στην κοινωνία. Η έγκαιρη διάγνωση και θεραπεία είναι θέμα ζωτικής σημασίας για τη αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Οι διαθέσιμες κλινικές τεχνικές για τη διάγνωση και την ταξινόμηση του καρκίνου του πνεύμονα είναι αναπόφευκτα επεμβατικές, δαπανηρές ή ανίκανες για έγκαιρη διάγνωση. Έτσι κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη μιας νέας καινοτόμας μεθόδου για την έγκαιρη διάγνωση και ταξινόμηση του συγκεκριμένου είδους καρκίνου.

Σε αυτό το πλαίσιο, η ανάλυση των πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) στην εκπνοή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να ανιχνευθούν οι μεταβολίτες οι οποίοι μπορεί να χαρακτηριστούν ως βιοδείκτες και να συμβάλλουν στην πρόωρη διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Στην παρούσα μελέτη η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε δείγματα εκπνεόμενου αέρα από ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα και υγιείς άτομα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν με RTubeVOC και οι ενώσεις που συλλέχθηκαν προ συγκεντρώθηκαν με την μέθοδο μικροεκχύλισης SPME και αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Τα αποτελέσματα συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν στατιστικά ώστε να προσδιοριστεί το μεταβολικό προφίλ των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα. Οι ενώσεις εκείνες στις οποίες βασίζεται ο διαχωρισμός των δύο ομάδων (ασθενών και υγιών) θεωρούνται πιθανοί μεταβολίτες και πραγματοποιείται ταυτοποίηση τους ως πιθανοί βιοδείκτες που σχετίζονται με τον καρκίνο του πνεύμονα. Η μέθοδος αυτή παρέχει μια φθηνότερη, άμεση και μη επεμβατική διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6:

Υλικά και μέθοδοι

6.1. Συλλογή δειγμάτων

Για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης συλλέχθηκαν δείγματα εκπνεόμενου αέρα από 20 ασθενής με καρκίνο του πνεύμονα και 20 υγιή άτομα διάφορων ηλικιών και των δύο φύλλων. Τα δείγματα των ασθενών συλλέχθηκαν από την Πνευμονολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, μετά από συναίνεση των μαρτύρων. Ο συνολικός αριθμός δειγμάτων λοιπόν είναι 40 και τα χαρακτηριστικά των ασθενών μαρτύρων από τους οποίους πάρθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

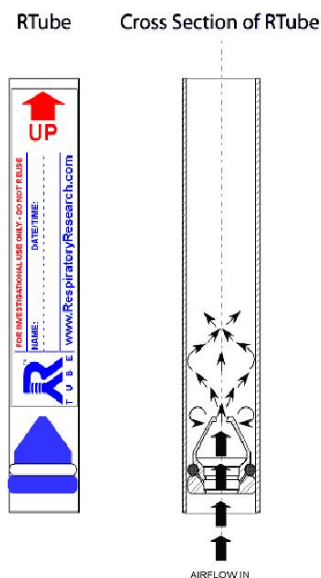
Πίνακας 4 : κατάλογος δειγμάτων ασθενών

Κωδικός δείγματος	Φύλλο
P1	ΘΗΛΥ
P2	ΑΡΡΕΝ
P3	ΘΗΛΥ
P4	ΑΡΡΕΝ
P5	ΑΡΡΕΝ
P6	ΑΡΡΕΝ
P7	ΘΗΛΥ
P8	ΑΡΡΕΝ
P9	ΑΡΡΕΝ
P10	ΘΗΛΥ
P11	ΑΡΡΕΝ
P12	ΑΡΡΕΝ

P13	APPEN
P14	APPEN
P15	ΘΗΛΥ
P16	APPEN
P17	APPEN
P18	APPEN
P19	APPEN
P20	ΘΗΛΥ

Η συλλογή όλων των δειγμάτων έγινε με τους ειδικούς σωλήνες RTubeVOC, χωρητικότητας 65 ml που έχουν απώτερο στόχο να αποβάλλονται τα πρώτα κλάσματα του εκπνεόμενου αέρα και να παγιδεύεται το τελευταίο κλάσμα το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του εσωτερικού των πνευμόνων. Οι συσκευές αυτές είναι αυστηρά μίας εκπνοής με δύο βαλβίδες μονής κατεύθυνσης με σκοπό τη διατήρηση της μονοκατευθυντικής ροής καθώς το άτομο εκπνέει μέσω του επιστομίου. Ο σωλήνας διαθέτει πώματα που χρησιμεύουν στην παγίδευση του αέρα και στην απόκλιση των απωλειών. Είναι κατασκευασμένοι από συμπολυμερές πολυπροπυλένιο. Το στόμιο είναι κατασκευασμένο από πολυαιθυλένιο, τα πώματα από βινύλιο ιατρικής χρήσης και η βαλβίδα προσαρμογής από καουτσούκ σιλικόνης (εγκεκριμένα συστατικά από το FDA).

Οι μάρτυρες εξέπνευσαν δια μέσου του σωλήνα για 6 δευτερόλεπτα για να συλλεχθεί το τελευταίο τμήμα της εκπνοής τους και κατόπιν οι σωλήνες σφραγίστηκαν με τα ειδικά πώματα, προκειμένου να γίνει η μεταφορά των δειγμάτων στον εργαστηριακό χώρο χωρίς να αλλοιωθεί το δείγμα των ασθενών.



Εικόνα 27 RTubeVOC

6.2. Προετοιμασία δειγμάτων

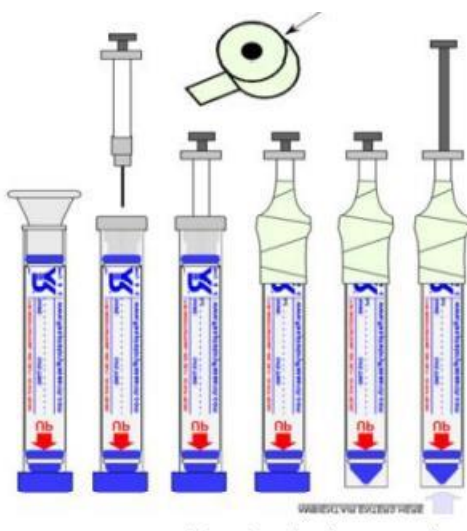
Τα δείγματα αφού συλλεχθούν μεταφέρονται στον εργαστηριακό χώρο, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση τους. Η ανάλυση είναι απαραίτητο να γίνει εντός δύο ωρών από την δειγματοληψία, καθώς μετά το πέρας αυτού του χρόνου οι πτητικές ενώσεις εναποτίθενται στα τοιχώματα του σωλήνα RTubeVOC με αποτέλεσμα να παρατηρούνται σοβαρές απώλειες.

Μόλις λοιπόν τα δείγματα φτάσουν στον εργαστηριακό χώρο πρέπει να προετοιμαστούν προκειμένου να γίνει η ανάλυση στο GC-MS. Η προετοιμασία περιλαμβάνει προσυγκέντρωση των πτητικών ουσιών με προσρόφηση τους σε ίνα με την τεχνική μικροεκχύλισης SPME, ώστε στην συνέχεια να πραγματοποιηθεί εισαγωγή της ίνας στον αέριο χρωματογράφο για έγχυση των προσροφημένων ουσιών. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε είναι κατασκευασμένη από συνδυασμό υλικών Διβινυλοβενζόλιο / καρβοξένιο / πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (CAR/DVB/PDMS) και έχει διάμετρο 30/50 μm . Είναι ιδανική σύμφωνα με τον κατασκευαστή για αρωματικές, πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις με μοριακό βάρος από 40-300.

Πριν η ίνα τοποθετηθεί στο σωλήνα με το δείγμα για να γίνει η προσρόφηση των ουσιών σε αυτή πρέπει να περάσει από στάδιο προκατεργασίας, προκειμένου να καθαριστεί από άλλες ουσίες- προσμίξεις που πιθανόν

προυπάρχουν σε αυτή και μπορεί να προκαλέσουν θόρυβο στο χρωματογράφημα. Η προκατεργασία της ίνας λαμβάνει χώρα στο αέριο χρωματογράφο (Trace GC Ultra, Thermo Scientific- ISQ-Single Quadrupole- Thermo Scientific) για 20 λεπτά στους 200 °C. Έτσι η ίνα είναι έτοιμη για εκχύλιση.

Η εκχύλιση SPME πραγματοποιείται με εισαγωγή της προκατεργασμένης ίνας στο σωλήνα με το δείγμα. Η ίνα εκτίθεται στον αέριο όγκο δείγματος και πραγματοποιείται προσρόφηση των πτητικών ουσιών πάνω στην ίνα. Το σύστημα σφραγίζεται στο σημείο διασύνδεσης με αεροδιαπερατό φιλμ (Parafilm) για τη στεγανοποίηση με σκοπό να ελαχιστοποιηθούν απώλειες του δείγματος. Η ίνα διατηρείται σε σταθερό ύψος κάθε φορά αφού λαμβάνει χώρα προσρόφηση. Η προσρόφηση των πτητικών οργανικών ενώσεων στη στατική φάση γίνεται για 30 λεπτά.



Εικόνα 28 προσρόφηση αναλυτών στην ίνα SPME

Κατόπιν η ίνα εισάγεται στο σύστημα έγχυσης του αέριου χρωματογράφου όπου οι προσροφημένες στην ίνα πτητικές ενώσεις εκροφούνται. Η εκρόφηση γίνεται για 30 λεπτά με πρόγραμμα που ξεκινάει από θερμοκρασία 40°C και διαδοχικά ανέρχεται στους 270 °C.

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

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου Trace GC Ultra, Thermo Scientific με τριχοειδή στήλη RTX-5MS γενικής χρήσης η οποία σύμφωνα με τον κατασκευαστή είναι κατάλληλη για ανάλυση πτητικών και ημιπτητικών οργανικών ενώσεων (EPA, VOCs), ρύπων κ.α.. Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε χειροκίνητα, τοποθετώντας την ίνα κατευθείαν στο σημείο έγχυσης. Το ήλιο χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο (He) (99,999%) ενώ η ταχύτητα ροής του ήταν 2ml/λεπτό. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στατικής φάσης που εφαρμόστηκε ήταν βαθμιδωτό ξεκινώντας αρχικά από τους 40 °C για 2 λεπτά και κατόπιν πραγματοποιήθηκε αύξηση της θερμοκρασίας, 7 °C/ λεπτό μέχρις ότου η θερμοκρασία της στήλης να καταλήξει στους 200 °C. Μετά τους 200 °C συνεχίστηκε η αύξηση της θερμοκρασίας ανά 20 °C/ λεπτό έως τους 230 °C όπου διατηρήθηκε για 3 λεπτά και με την ίδια διαβάθμιση κατέληξε στους 270 °C όπου διατηρήθηκε εκεί για 5 λεπτά. Συνολικά η χρωματογραφική ανάλυση διήρκεσε 37.37 λεπτά. Η θερμοκρασία του σημείου έγχυσης (injector) ήταν 200 °C και του συστήματος διασύνδεσης (interface) 285 °C.

Στο φασματόμετρο μάζας προκειμένου να σχηματιστούν τα ιόντα των αναλυτών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροιοντισμού ή πρόσκρουσης ηλεκτρονίων EI (electron impact) με θετικό ιονισμό. Η τάση που εφαρμόστηκε για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων ήταν 70 eV ενώ η θερμοκρασία της πηγής ήταν στους 250 °C. Ο φασματογράφος μάζας του εργαστηρίου έχει απλό τετραπολικό αναλυτή μαζών (ISQ -Single Quadrupole-Thermo Scientific) και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε 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 μη στοχευμένων ερευνών είναι αρκετά πολύπλοκη εξαιτίας της πληθώρας των δεδομένων. Έτσι είναι απαραίτητα κάποια στάδια στατιστικής επεξεργασίας προκειμένου τα αποτελέσματα να

είναι τα πλέον σημαντικά. Τα στάδια στατιστικής επεξεργασίας που χρησιμοποιήθηκαν περιλάμβαναν διαδικτυακές πλατφόρμες όπως το XCMS Online, το MetaboAnalyst και το πρόγραμμα SIMCA. Για την ταυτοποίηση χρησιμοποιήθηκε η βιβλιοθήκη NIST. Τέλος χρησιμοποιήθηκε και το πρόγραμμα Analyse-it στο Excel, όπως θα αναλυθούν παρακάτω.

6.5. Προ επεξεργασία δεδομένων GC-MS

Προκειμένου να διευκολυνθεί η αξιολόγηση και η επεξεργασία των τεράστιων ποσοτήτων δεδομένων που παράγονται από τις μη στοχευμένες μεθόδους μεταβολομικής ανάλυσης, διατίθενται εργαλεία επεξεργασίας δεδομένων που χρησιμοποιούνται, ώστε να προσδιοριστεί ποια χαρακτηριστικά διαφοροποιούνται μεταξύ δύο ή περισσότερων ομάδων δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε αρχικά το πρόγραμμα ProteoWizard 3.0.21260 64-bit για την μετατροπή των raw δεδομένων σε μορφή mzML, που επιτρέπει την περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων από τα ακόλουθα προγράμματα. Τα δεδομένα υπό μορφή mzML εισήχθησαν στη πλατφόρμα XCMS Online (διαδικτυακή έκδοση του λογισμικού), όπου πραγματοποιήθηκε ανίχνευση όλων των χαρακτηριστικών, διόρθωση του χρόνου κατακράτησης, ευθυγράμμιση και εξομάλυνση της στατιστικής ανάλυσης και της απεικόνισης των δεδομένων. Μέσω αυτής της διαδικασίας δημιουργήθηκε πίνακας στο Excel, που περιέχει όλα τα χαρακτηριστικά που ανιχνεύθηκαν αλλά και τα δεδομένα που αντιστοιχούν στο κάθε χαρακτηριστικό (όπως μάζα, χρόνος κατακράτησης, p-value κ.λ.π). Η διόρθωση του πίνακα για πιθανές κενές καταχωρίσεις (missing value estimation) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του MetaboAnalyst 5.0. Ο καινούργιος πίνακας εισήχθη στο πρόγραμμα SIMCA που παρέχει ποικιλία μεθόδων ανάλυσης για μεταβολικά δεδομένα. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν την επεξεργασία μεταβολικών δεδομένων, την ομαλοποίηση, την πολυμεταβλητή στατιστική ανάλυση καθώς και τον σχολιασμό των δεδομένων.

6.6. Στατιστική επεξεργασία

Μετά την προ επεξεργασία, τα δεδομένα που λαμβάνουμε είναι πολύπλοκα. Πρέπει όμως να κατανεμηθούν ώστε να διαχωριστούν οι δύο ομάδες και για τον σκοπό αυτό τα δεδομένα υπόκεινται σε πολυδιάστατη ανάλυση. Ο στόχος των χημειομετρικών εργαλείων είναι η αναζήτηση της κατάλληλης συσχέτισης μεταξύ των δειγμάτων και των μεταβλητών ενός συνόλου δεδομένων και η μετατροπή τους σε νέες λανθάνουσες μεταβλητές. Στην συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκαν η ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), η μερική ανάλυση ελάχιστων τετραγώνων (PLS-DA) και η ορθογώνια μερική ανάλυση ελάχιστων τετραγώνων (OPLS-DA). Η PCA δεν ορίζονται οι ομάδες δεδομένων προκειμένου να βρεθούν τα κύρια συστατικά, είναι δηλαδή μια μη επιβλεπόμενη μέθοδος, ενώ η PLS-DA και η OPLS-DA είναι επιβλεπόμενες μέθοδοι, στις οποίες ορίζονται οι ομάδες δεδομένων.[87]

6.6.1.Ανάλυση κύριων συστατικών (PCA)

Η μέθοδος PCA (Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών) είναι μια γραμμική υπολογιστική μέθοδος συμπίεσης δεδομένων που χρησιμοποιείται για να εξετάσουμε τη διακύμανση του συνόλου δεδομένων και συνίσταται στον επαναπροσδιορισμό των συντεταγμένων ενός συνόλου δεδομένων σε άλλο σύστημα συντεταγμένων που είναι πιο κατάλληλο στην επικείμενη ανάλυση δεδομένων. Οι νέες αυτές συντεταγμένες είναι αποτέλεσμα ενός γραμμικού συνδυασμού που προέρχεται από τις αρχικές μεταβλητές κατά τον οποίο χρησιμοποιείται ορθογωνικός μετασχηματισμός, ενώ τα επικείμενα σημεία διατηρούν φθίνουσα σειρά σχετικά με τη τιμή της διακύμανσής τους. Οι μεταβλητές που είναι γνωστές ως κύριες συνιστώσες αποτελούνται από ένα σύνολο παρατηρήσεων που είναι γραμμικά μη συσχετισμένες. Το πρώτο κυρίαρχο στοιχείο (PC1) αναφέρεται στη μεγαλύτερη δυνατή διακύμανση εντός ενός συνόλου δεδομένων και διατηρεί πιο πολλές πληροφορίες δεδομένων σε σχέση με το δεύτερο που δεν διατηρεί πληροφορίες που έχουν εισέλθει στο πρώτο συστατικό. Το δεύτερο κυρίαρχο στοιχείο (PC2) αποτελεί την δεύτερη μεγαλύτερη διακύμανση ορθογώνια στον πρώτο υπολογιστή. Δηλαδή, τα κυρίαρχα συστατικά καθορίζονται με βάση μια επαναληπτική διαδικασία κατά την οποία το σημαντικότερο κυρίαρχο συστατικό καθορίζεται

πρώτο και τα επόμενα βασικά συστατικά έχουν διαδοχικά πιο μικρή συνεισφορά. Υπάρχουν διάφοροι αλγόριθμοι για να υπολογιστούν τα κυρίαρχα στοιχεία, (NIPALS, SAO, SVD, κτλ) και κάθε αλγόριθμος διαθέτει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα του. [88], [89]

Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο κυρίαρχο στοιχείο (PC1) είναι ο μέσος όρος όλων των φασμάτων στο σύνολο βαθμονόμησης. Το δεύτερο πιο μεγάλο κύριο συστατικό υπολογίζεται κατόπιν και θεωρείται ο μέσος όρος όλων των υπόλοιπων. Το δεύτερο κυρίαρχο συστατικό αφαιρείται από όλα τα άλλα και σύνολο στη συνέχεια γίνεται το δεύτερο υπόλοιπο.

Δεν είναι όλα τα βασικά συστατικά σημαντικά. Έτσι, μόνο ένα υποσύνολο του συνόλου των κυρίαρχων συστατικών είναι απαραίτητο. Ενώ η PCA εκτελείται, γίνεται καταγραφή της συμβολής κάθε κυρίαρχου συστατικού σε ολόκληρο το σύνολο δεδομένων βαθμονόμησης. Οι συνεισφορές αυτές αναφέρονται ως ιδιοτιμές. Τα λοιπά κυρίαρχα συστατικά θεωρούνται θόρυβος και δεν λαμβάνονται υπόψιν. Αφού γίνει προσδιορισμός των σημαντικά κυρίαρχων συστατικών και των βαρών τους, πραγματοποιείται αποθήκευση τους ώστε πλέον να αντιπροσωπεύουν τα φάσματα απορρόφησης. [88], [89], [90]

Η συνολική ποσότητα των κυρίαρχων συστατικών ισούται με τη ποσότητα των αρχικών μεταβλητών και εμφανίζει τις ίδιες στατιστικές πληροφορίες. Όμως η μέθοδος καθιστά δυνατή την μείωση του συνόλου των μεταβλητών, αφού τα πρώτα συστατικά διατηρούν πιο πολύ από το 90% των στατιστικών δεδομένων των αρχικών δεδομένων. Τα πλεονεκτήματα αυτά οδηγούν την μέθοδο αυτή να είναι διαδεδομένη ευρέως στην συμπίεση εικόνας.

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.

Η γραφική παράσταση των αποτελεσμάτων (scores plot) δίνει τη δυνατότητα οπτικοποίησης των δεδομένων όπου κάθε σημείο του διαγράμματος αντιπροσωπεύει ένα δείγμα. Μέσω του scores plot μπορεί να παρατηρηθεί τυχόν διαχωρισμός των ομάδων αλλά και η παρουσία έκτροπων τιμών (outliers). Ο τρόπος με τον οποίο οι αρχικές μεταβλητές συνδυάζονται

γραμμικά προς τον σχηματισμό νέων μεταβλητών ορίζεται από τα φορτία (loadings). Από το διάγραμμα των φορτίων (loadings plot) μπορεί να βρεθεί ποιες μεταβλητές επηρεάζουν ορισμένα αντικείμενα.[88], [91]

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 $1/sd_j$, 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 $1/(sd_j)^{1/2}$.

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.[91]

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 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.[91]

6.6.2. Διακρίνουσα ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-DA)

Το PLS-DA αποτελεί μια εποπτευόμενη μέθοδο μείωσης διαστάσεων και είναι μια γραμμική μέθοδος ταξινόμησης που συνδυάζει τις ιδιότητες της ανάλυσης παλινδρόμησης με τη δύναμη διάκρισης μιας τεχνικής ταξινόμησης. Ανακαλύπτει λανθάνουσες μεταβλητές (συστατικά) οι οποίες μεγιστοποιούν το διαχωρισμό ανάμεσα σε διαφορετικές προκαθορισμένες ομάδες (π.χ. υγιείς - ασθενών) στα δεδομένα. Προβάλλοντας τα δεδομένα σε αυτές τις λανθάνουσες μεταβλητές, το PLS-DA καταγράφει τη δομή διακύμανσης και συσχέτισης στα δεδομένα που σχετίζονται πιο πολύ με τη διαφοροποίηση της ομάδας.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα της PLS-DA έναντι της PCA είναι η ικανότητά της να εστιάζει και να βελτιώνει τους διαχωρισμούς ομάδων. Το PCA μεγιστοποιεί αποκλειστικά τη διακύμανση χωρίς να λαμβάνει υπόψη τον ορισμό των ομάδων δεδομένων, ενώ το PLS-DA χρησιμοποιεί αυτές τις ομάδες για να βρει την κατεύθυνση του μέγιστου διαχωρισμού κλάσεων, η οποία είναι πιο κατάλληλη για τις εργασίες ταξινόμησης. Η PCA προβάλλει τη μέγιστη διαφοροποίηση που υπάρχει στη μήτρα X , ενώ η τεχνική PLS προβάλλει τη μέγιστη συνδιακύμανση (covariance) μεταξύ X και Y . Στη μεταβολομική, αυτό σημαίνει ότι η PLS-DA μπορεί να εντοπίσει πιο αποτελεσματικά τους μεταβολίτες παθήσεων. Η αξιοπιστία του μοντέλου αξιολογείται από την περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου που αποτυπώνονται από τις τιμές R^2 και Q^2 . [91], [92]

6.6.3. Ορθογώνια μερική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων (OPLS-DA)

Η ορθογώνια μερική ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων (orthogonal Partial Least Squares Discriminant-Analysis, OPLS-DA) ενσωματώνει τις μεθόδους διόρθωσης ορθογώνιου σήματος (OSC) και PLS-DA. Θεσπίστηκε ως

βελτίωση της προσέγγισης PLS-DA για τη διάκριση δύο ή περισσότερων ομάδων με τη χρήση πολυδιάστατων δεδομένων. Στην OPLS-DA, πραγματοποιείται κατασκευή ενός μοντέλου παλινδρόμησης ανάμεσα στα πολύπλοκα δεδομένα και σε μια μεταβλητή απόκρισης που περιέχει μόνο πληροφορίες για τις ομάδες. Το πλεονέκτημα της OPLS-DA σε σχέση με την PLS-DA είναι το γεγονός ότι μόνο ένα συστατικό χρησιμεύει ως προγνωστικός παράγοντας για την κατηγοριοποίηση, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά περιγράφουν την ορθογώνια διακύμανση στο πρώτο κύριο συστατικό. Με αυτόν τον τρόπο η OPLS-DA παρέχει πιο καλή ερμηνεία των σχετικών μεταβλητών από την PLS-DA.

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

Τα Q^2 και R^2 φανερώνουν την ευρωστία του μοντέλου. Το R^2 ορίζεται ως το κλάσμα της διακύμανσης το οποίο εξηγείται από ένα στοιχείο. Από την διασταυρούμενη επικύρωση του R^2 προκύπτει το Q^2 , το οποίο αντιπροσωπεύει το ποσοστό της συνολικής διακύμανσης που προβλέπεται από κάποιο στοιχείο. Το R^2 , λοιπόν, υποδεικνύει πόσο καλά εξηγείται η διακύμανση μιας μεταβλητής, ενώ το Q^2 πόσο καλά μια μεταβλητή θα μπορούσε να προβλεφθεί και να εκτιμηθεί με διασταυρούμενη επικύρωση (με την ακρίβεια της πρόβλεψης). Οι καλά μοντελοποιημένοι μεταβολίτες έχουν τιμές R^2 και $Q^2 > 0,5$. [92]

6.6.4. Επικύρωση μοντέλων PLS-DA

Απαραίτητη είναι η επικύρωσή των μοντέλων PLS-DA γι'αυτό πραγματοποιείται η διαδικασία τυχαίων αλλαγών (permutation test). Το permutation test κάνει την υπόθεση ότι δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στις

ομάδες και τυχαία εκτελεί μετατροπή των μεταβλητών y . Έτσι παρέχει τη στατιστική σημασία της εκτιμώμενης προβλεπόμενης ισχύος των μοντέλων, μέσω σύγκρισης των τιμών R^2Y και Q^2Y του αρχικού μοντέλου με εκείνες του επαναδιατεταγμένου μοντέλου, που δημιουργήθηκε μετά την μετατροπή των y μεταβλητών σε τυχαίες. Η ποιότητα των πραγματικών μοντέλων αξιολογήθηκε με τις παραμέτρους R^2 και Q^2 . Το διάγραμμα που προκύπτει παρέχει τη σχετική διακύμανση R^2 , τη προβλεπτική ικανότητα της επικύρωσης του μοντέλου Q^2 καθώς και το βαθμό αλληλεπικάλυψης μεταξύ των τυχαίων και των πραγματικών μοντέλων (correlation). Προκειμένου να θεωρηθεί ένα μοντέλο αξιόπιστο πρέπει οι τυχαίες τιμές της προβλεπτικής ικανότητας Q^2 να είναι πιο μικρές από αυτές του πραγματικού μοντέλου είτε έστω η ευθεία του 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.[93]

6.6.5. Επιλογή χαρακτηριστικών στα οποία οφείλεται ο διαχωρισμός

Αφού ολοκληρωθεί η παραπάνω επεξεργασία και ο διαχωρισμός είναι απαραίτητη η διάκριση των χαρακτηριστικών στα οποία οφείλεται αυτός ο διαχωρισμός. Σε αυτό μας βοηθάει το διάγραμμα Σημαντικών Μεταβλητών για την Προβολή (Variable Importance in the Projection, VIP), το οποίο συνοψίζει την επίδραση μεμονωμένων μεταβλητών X στο μοντέλο PLS και αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την εύρεση των μεταβλητών που συμβάλλουν πιο πολύ στην εξήγηση της διακύμανσης y . Στο διάγραμμα VIP τα αποτελέσματα ταξινομούνται σε φθίνουσα σειρά ανάλογα με τη συμβολή που έχουν στον διαχωρισμό. Ο μέσος όρος των τετραγωνικών τιμών των VIP ισούται με 1, οπότε μεταβλητή που έχει τιμή VIP μεγαλύτερη από 1 χρησιμοποιείται πολλές φορές ως σημείο διάκρισης για την έρευνα των σημαντικών μεταβλητών. Έτσι επιλέγονται μεταβλητές με τιμή VIP μεγαλύτερη από 1.

Οι τιμές αυτές επαληθεύονται μέσω του διαγράμματος S-plot, στο οποίο τα χαρακτηριστικά ταξινομούνται σε ένα ορθοκανονικό σύστημα αξόνων. Τα χαρακτηριστικά τα οποία απομακρύνονται από τους δύο κάθετους άξονες θεωρούνται σημαντικά για τη διαφοροποίηση.

Τέλος το t-test χρησιμοποιείται για τη διάκριση των χαρακτηριστικών που προκαλούν τον διαχωρισμό. Ένα χαρακτηριστικό θεωρείται σημαντικό αν η τιμή p-value είναι μικρότερη από τη τιμή 0.05. [94], [95], [96]

6.6.6. Επικύρωση υποψήφιων βιοδεικτών

Για την επικύρωση των πιθανών βιοδεικτών πραγματοποιήθηκε ανάλυση ANOVA ώστε να δειχθεί η στατιστική σημαντικότητα της διάκρισης των δύο ομάδων λόγω των μεταβολιών αυτών καθώς και FDR (False Discovery Rate).

Στην ανάλυση δεδομένων, το False Discovery Rate (FDR) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της αναλογίας των ψευδώς θετικών (απορρίπτοντας λανθασμένα μια αληθινή μηδενική υπόθεση) μεταξύ των σημαντικών αποτελεσμάτων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν εκτελούνται δοκιμές πολλαπλών υποθέσεων, όπως στην περίπτωση της ανάλυσης μεταβολικών ή άλλων μεγάλων συνόλων δεδομένων, όπου η πιθανότητα ψευδώς θετικών αυξάνει με τον αριθμό των δοκιμών.

Για τα δεδομένα «ασθενείς»- «υγιείς», δοκιμάζουμε τη διαφορά στις εντάσεις για πολλαπλά χαρακτηριστικά (π.χ. μεταβολίτες), το FDR διασφαλίζει ότι ελαχιστοποιείται το κλάσμα των ψευδώς σημαντικών αποτελεσμάτων.

Τα βήματα για τον υπολογισμό του FDR περιλαμβάνουν:

1. Εκτελούμε δοκιμή υποθέσεων:

- Για κάθε ζεύγος τιμών (ή ομάδα τιμών), εκτελούμε μια στατιστική δοκιμή (π.χ., t-test ή ANOVA) για να υπολογίσουμε τις τιμές p για τη διαφορά μεταξύ των ομάδων 'ασθενείς' και 'υγιείς'.

2. Συλλέγουμε τις τιμές P:

- Αφού υπολογίσουμε τις τιμές p για όλα τα χαρακτηριστικά (στην περίπτωσή μας, εντάσεις), τα συγκεντρώνουμε σε μια λίστα.

3. Προσαρμόζουμε τις τιμές P χρησιμοποιώντας τη διαδικασία Benjamini-Hochberg:

- Ταξινομούμε τις τιμές p σε αύξουσα σειρά.
- Υπολογίζουμε μια προσαρμοσμένη τιμή p για κάθε δοκιμή:

$$p_{adjusted}(i) = \frac{p(i) \cdot N}{i}$$

- $p(i)$: Αρχική τιμή p για την i δοκιμή.
- N : Συνολικός αριθμός δοκιμών.
- Κατάταξη της τιμής p μετά την ταξινόμηση.

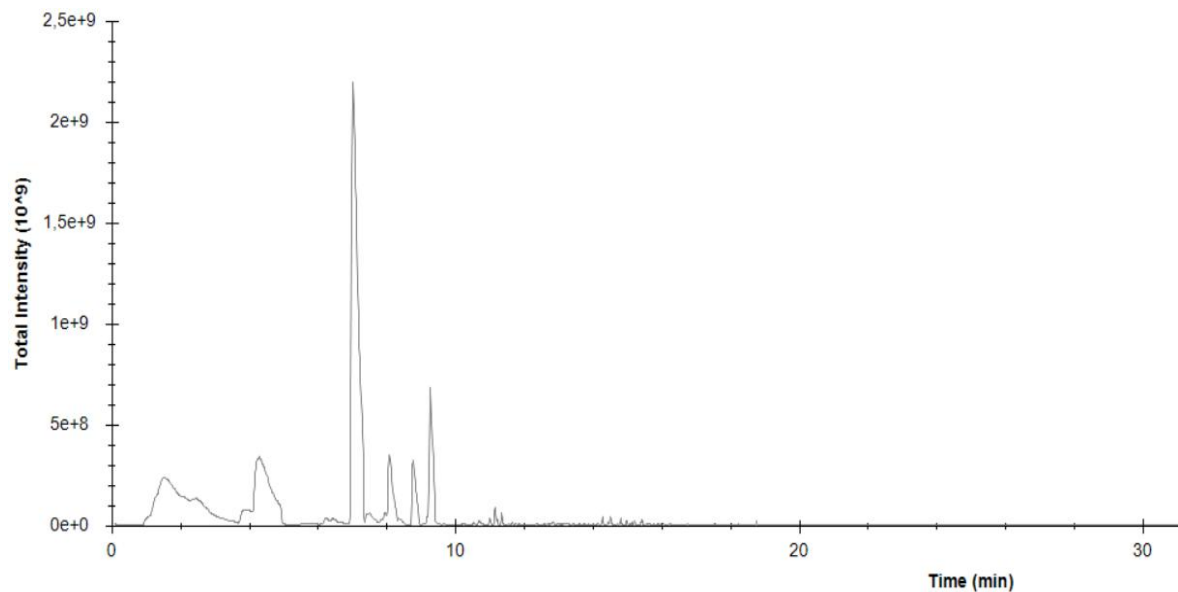
4. Συγκρίνουμε τις προσαρμοσμένες τιμές p με ένα προκαθορισμένο όριο σημαντικότητας ($\alpha=0,05$ \(\alpha = 0,05\(\alpha=0,05 είναι κοινό).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:

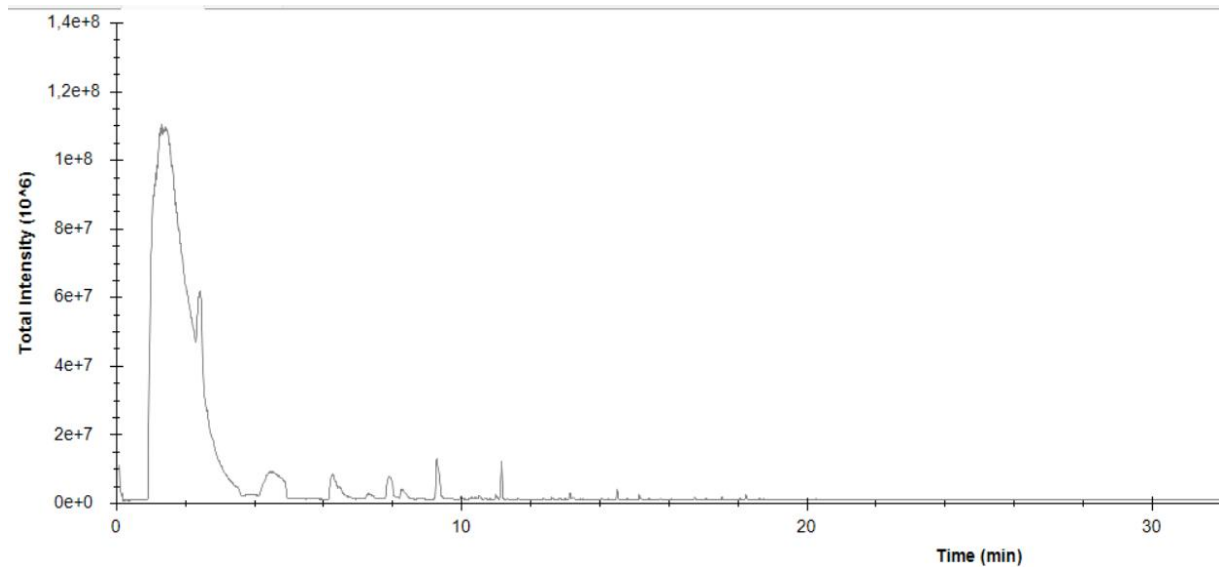
Αποτελέσματα- Συζήτηση

7.1. Πρωτογενή χρωματογραφήματα δειγμάτων ασθενών και υγιών ατόμων

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά χρωματογραφήματα ενός ασθενούς με καρκίνο του πνεύμονα και ενός υγιούς ατόμου.



Εικόνα 33 χρωματογράφημα ασθενούς



Εικόνα 34 χρωματογράφημα υγιούς

7.2. Στατιστική επεξεργασία πρωτογενών δεδομένων GC-MS

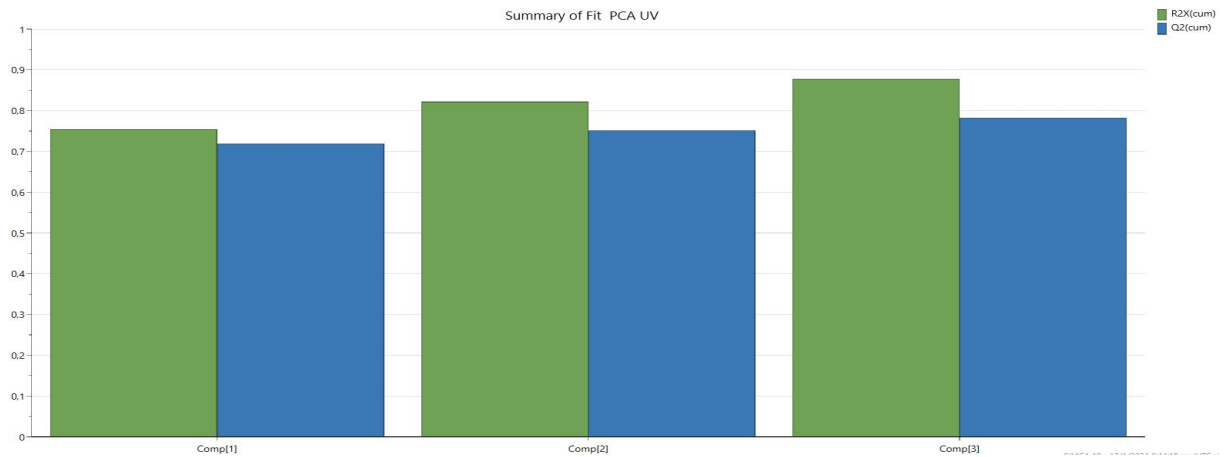
Εξαιτίας της πολυπλοκότητας των πρωτογενών δεδομένων (μεγάλος αριθμός ενώσεων σε κάθε δείγμα με πολλαπλάσιο αριθμό θραυσμάτων m/z) η διερεύνηση των πιθανών μεταβολιτών αποτελεί δύσκολο εγχείρημα. Έτσι εφαρμόστηκε στατιστική επεξεργασία των δεδομένων με τη χρήση χημειομετρικών εργαλείων.

Τα πρωτογενή δεδομένα που προέκυψαν είναι σε μορφή raw data και πρέπει να μετατραπούν με την βοήθεια του προγράμματος ProteoWizard σε κατάλληλο τύπο αρχείου (MzML), ώστε να είναι δυνατή η επεξεργασία τους. Τα δεδομένα με μορφή MzML φορτώθηκαν στην διαδικτυακή πλατφόρμα XCMS Online, προκειμένου να διαχωριστούν, να διορθωθεί ο χρόνος κατακράτησης, να ευθυγραμμιστούν και να κανονικοποιηθούν,. Μετά την επεξεργασία δημιουργήθηκε πίνακας δεδομένων στον οποίο έγινε στατιστική ανάλυση με το λογισμικό SIMCA.

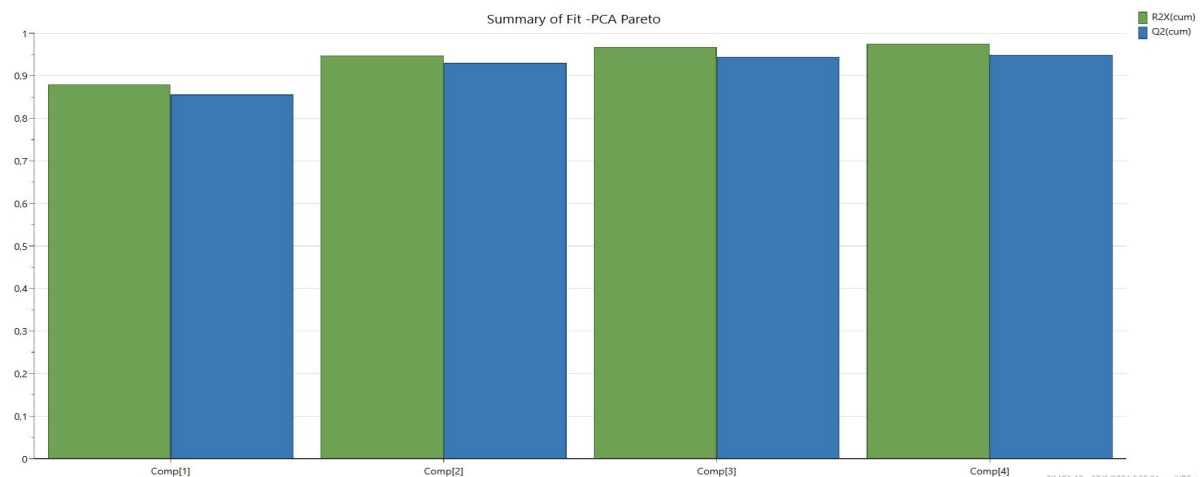
Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων (PCA & PLS-DA) πραγματοποιείται σε δύο κλίμακες, UV και Pareto. Στο στάδιο της PLS-DA και αφού πραγματοποιηθεί το permutation test και για τις δύο κλίμακες, θα πρέπει να επιλεγθεί ποια από τις δύο δίνει καλύτερη περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα στο μοντέλο. Αφού επιλεγθεί η κατάλληλη κλίμακα θα συνεχιστεί η στατιστική ανάλυση (OPLS-DA, S-Plot, VIP-Plot).

Summary of fit plot PCA

Το μέγεθος της μπάρας R^2 υποδηλώνει το πόσο καλά το μοντέλο ταιριάζει με τα δεδομένα μας, ενώ το μέγεθος της μπάρας Q^2 υποδηλώνει το πόσο καλά μπορεί το μοντέλο μας να προβλέψει νέα δεδομένα. Το πρόγραμμα SIMCA για κάθε στοιχείο του μοντέλου εμφανίζει 2 μπάρες (R^2, Q^2).



Εικόνα 35 Summary of Fit Plot PCA UV Scaling που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca



Εικόνα 36 Summary of Fit Plot PCA Pareto Scaling, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Στο γράφημα της PCA σε κλίμακα UV, οι μπάρες R^2 είναι αρκετά μεγάλες πάνω από 0,5 κοντά στο 0,8 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο ταιριάζει πάρα πολύ καλά με τα δεδομένα μας. Αντίστοιχα, στο γράφημά της PCA σε κλίμακα Pareto, οι μπάρες R^2 είναι κοντά στο 0,9 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο αυτό ταιριάζει σε ιδιαίτερα μεγάλο βαθμό με τα δεδομένα μας.

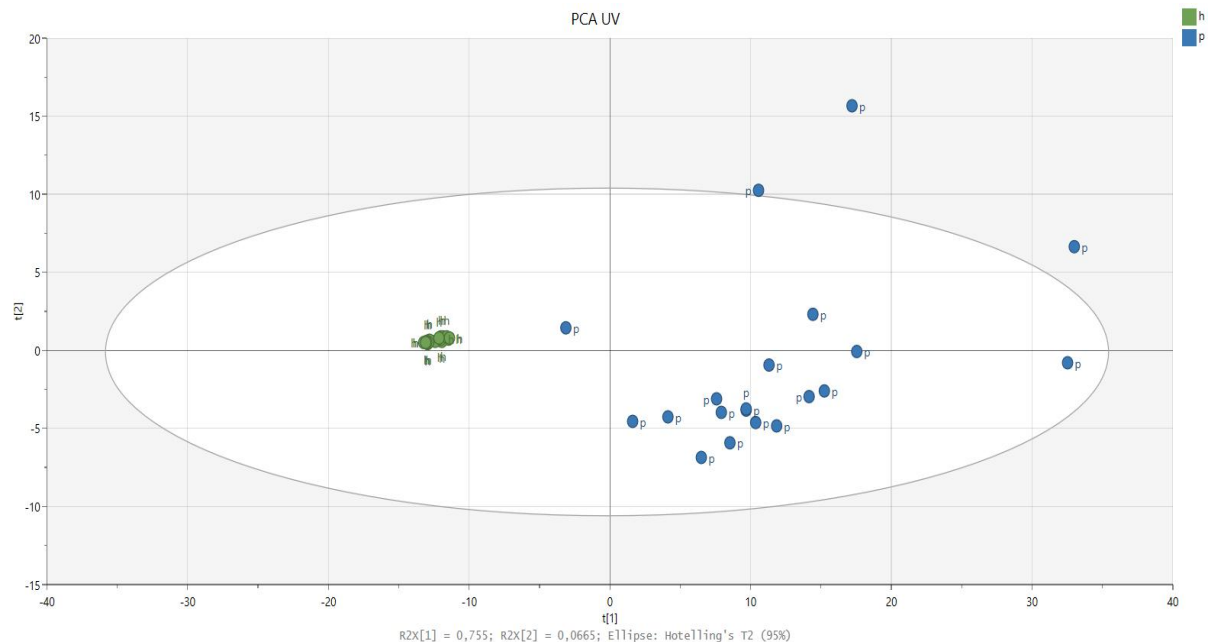
Το γράφημα της PCA σε κλίμακα UV φαίνεται ότι έχει ικανοποιητική προβλεψιμότητα για τα στοιχεία μας καθώς και οι 3 μπάρες Q^2 είναι μεγαλύτερες του 0,5 κοντά στο 0,7. Αντίστοιχα, το γράφημά της PCA σε

κλίμακα Pareto, φαίνεται ότι έχει εξίσου ή και ακόμα πιο ικανοποιητική προβλεψιμότητα για τα 4 στοιχεία που εμφανίζονται.

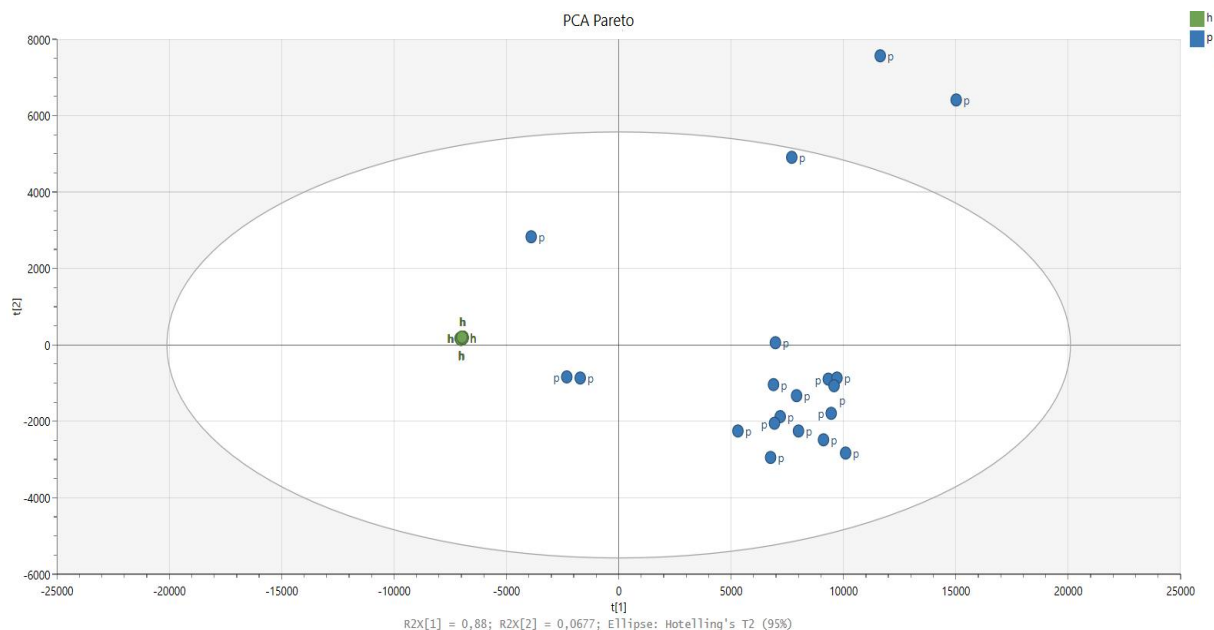
Διάγραμμα PCA

Το διάγραμμα PCA είναι ένα παράθυρο στο χώρο X , που παρουσιάζει τον τρόπο με τον οποίο βρίσκονται οι παρατηρήσεις X σε σχέση μεταξύ τους. Είναι ένας χάρτης των παρατηρήσεων X . Η πλοκή αυτή δείχνει την πιθανή παρουσία ακραίων τιμών, ομάδων, ομοιοτήτων και άλλων μοτίβων στα δεδομένα μας.

Το πρόγραμμα SIMCA σχεδιάζει έλλειψη ανοχής που υποδηλώνει ότι οι παρατηρήσεις οι οποίες βρίσκονται πολύ έξω από αυτήν πιθανότατα είναι ακραίες τιμές. Ωστόσο αυτό θα επιβεβαιωθεί στο διάγραμμα PLS-DA, όπου αν οι παρατηρήσεις αυτές συνεχίσουν να είναι εκτός της έλλειψης ανοχής θα πρέπει να αφαιρεθούν αφού δηλώνουν θόρυβο και αλλοιώνουν τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης.



Εικόνα 37 Διάγραμμα PCA σε κλίμακα UV, για τα δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και υγιών που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.



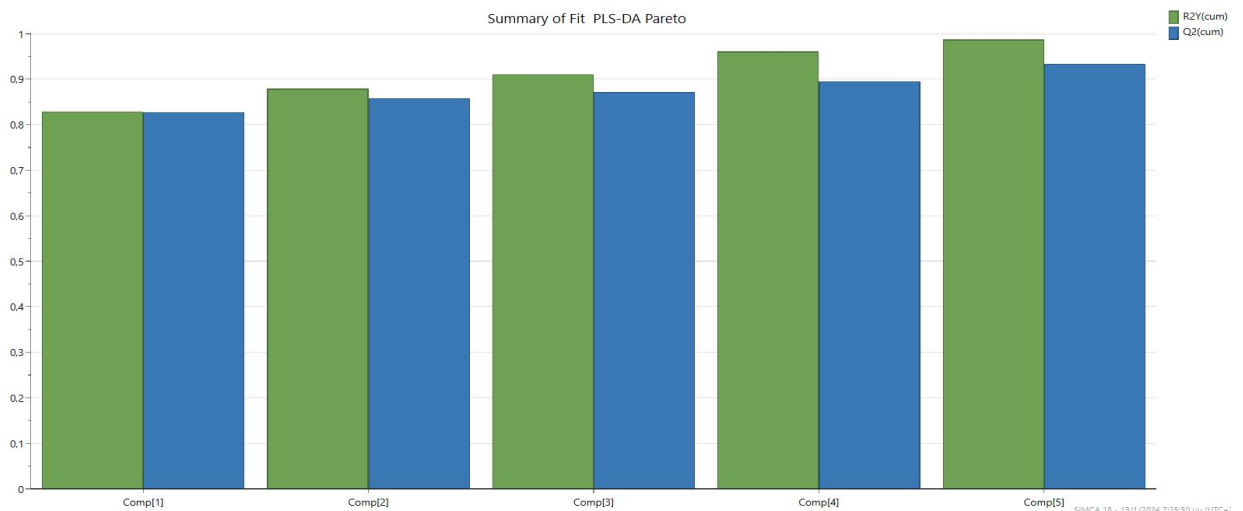
Εικόνα 38 Διάγραμμα PCA σε κλίμακα Pareto, για τα δείγματα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και υγιών που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Παρατηρείται ότι τόσο στην PCA σε κλίμακα UV όσο και στην PCA σε κλίμακα Pareto υπάρχει εμφανής διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων. Συνεπώς, παρόλο που η PCA αποτελεί μια μη επιβλεπόμενη μέθοδο είναι ικανή να διαχωρίσει τις ομάδες μέσω της προβολής των παρατηρήσεων σε 2 διαστάσεις (2D). Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικό, αφού στην πλειοψηφία των μελετών η PCA ως μη επιβλεπόμενη μέθοδος αδυνατεί να παρουσιάσει εμφανή διαχωρισμό.

Summary of Fit Plot PLS-DA



Εικόνα 39 Summary of Fit Plot PLS-DA UV Scaling, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca..



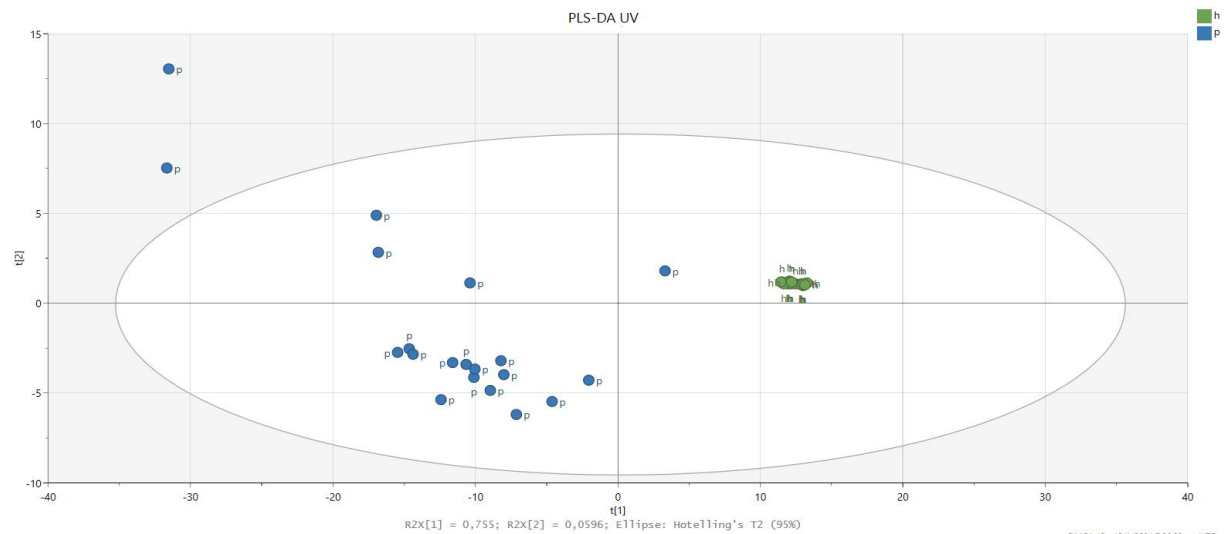
Εικόνα 40 Summary of Fit Plot PLS-DA Pareto Scaling, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Στο γράφημά της PLS-DA σε κλίμακα UV, οι μπάρες R^2 είναι περίπου στο 0,9, δηλαδή πλησιάζουν το 1, και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο προσαρμόζεται πάρα πολύ καλά με τα δεδομένα. Στο γράφημά της PLS-DA σε κλίμακα Pareto, επίσης οι μπάρες είναι γύρω στο 0,9, με αποτέλεσμα και αυτό το μοντέλο να είναι ιδιαίτερα καλά προσαρμοσμένο με τα δεδομένα μας.

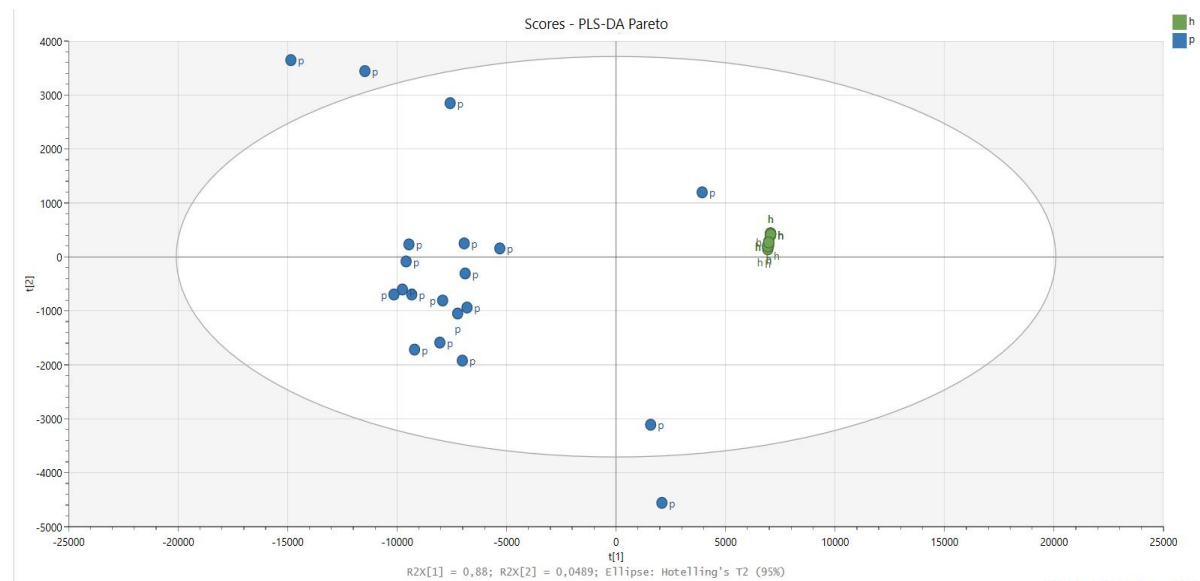
Ακόμα, τα γραφήματα της PLS-DA σε κλίμακα UV και Pareto έχουν ιδιαίτερα καλή προβλεψιμότητα, καθώς όλες οι μπάρες Q^2 λαμβάνουν τιμές μεγαλύτερες του 0,8.

Διαγράμματα PLS-DA

Τα διαγράμματα PLS-DA είναι τα ακόλουθα.



Εικόνα 41 Διάγραμμα PLS-DA σε κλίμακα UV



Εικόνα 42 Διάγραμμα PLS-DA σε κλίμακα Pareto

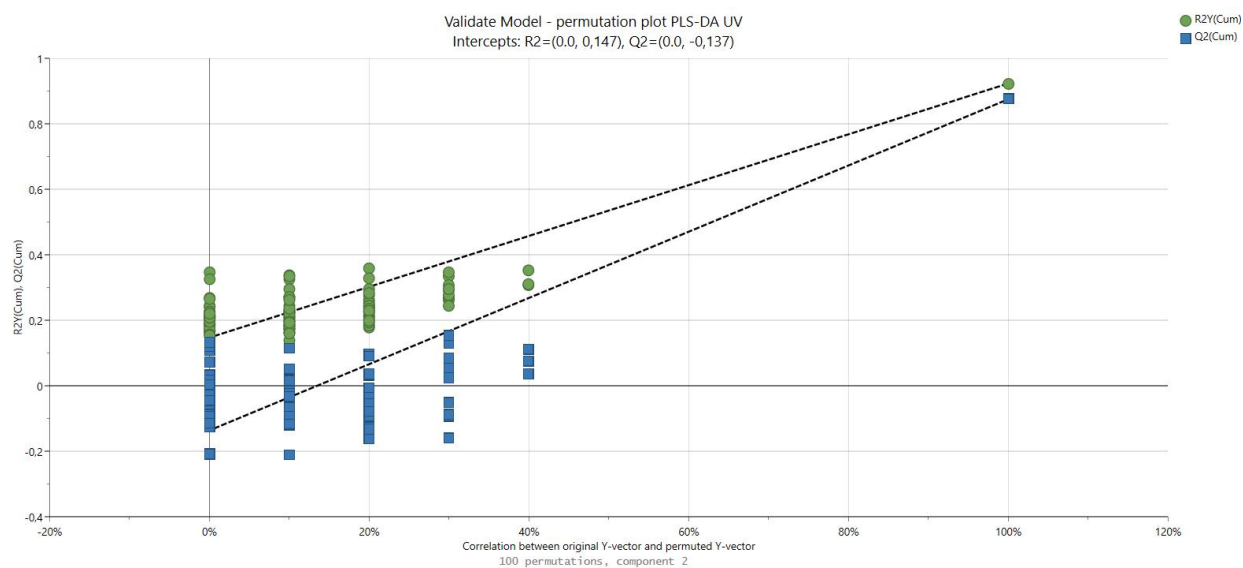
Παρατηρείται ότι τόσο στην PLS-DA σε κλίμακα UV όσο και σε κλίμακα Pareto υπάρχει εμφανής διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων. Στην συνέχεια είναι απαραίτητο να γίνει η επιλογή του πιο αξιόπιστου μοντέλου. Η δοκιμασία για την επικύρωση των μοντέλων PLS-DA που εφαρμόστηκε είναι η δοκιμασία των τυχαίων αλλαγών (Permutation test) με την χρήση του προγράμματος

SIMCA. Στη δοκιμασία αυτή δημιουργούνται νέα τυχαία μοντέλα με τυχαίες αλλαγές με σκοπό τη σύγκριση της περιγραφικής και της προβλεπτικής ικανότητας του πραγματικού μοντέλου με αυτές των τυχαίων μοντέλων που προκύπτουν. Το Permutation test πραγματοποιήθηκε και για τα δύο μοντέλα PLS-DA που προέκυψαν (UV και Pareto) με την εκτέλεση 100 τυχαίων αλλαγών.

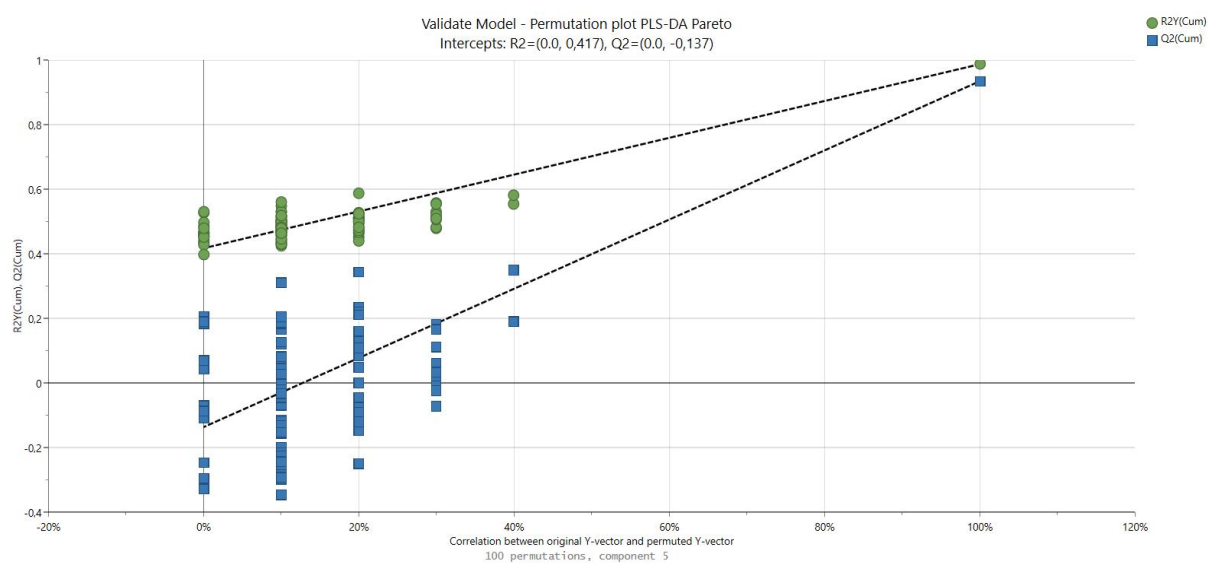
Permutation Test

Το Permutation test βοηθά στην αξιολόγηση του αν το μοντέλο PLS-DA είναι ψευδές, δηλαδή αν το μοντέλο ταιριάζει καλά στο σύνολο των δεδομένων, αλλά δεν προβλέπει καλά το Y για τις καινούργιες παρατηρήσεις. Η επικύρωση γίνεται με σύγκριση της αξιοπιστίας των παραμέτρων R^2 και Q^2 του αρχικού μοντέλου με την αξιοπιστία των παραμέτρων R^2 και Q^2 με πολλά μοντέλα που στηρίζονται στα δεδομένα όπου η σειρά των παρατηρήσεων Y έχει μεταβληθεί τυχαία, την στιγμή που οι παρατηρήσεις X έχουν διατηρηθεί. Το διάγραμμα μεταθέσεων υποδηλώνει έντονα πως το αρχικό μοντέλο είναι έγκυρο στην περίπτωση που πληρούνται τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω κριτήρια :

- Όλες οι μπλε τιμές Q^2 προς τα αριστερά να είναι πιο χαμηλές από τα αρχικά σημεία προς τα δεξιά
- 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 πιο χαμηλές από το αρχικό σημείο στα δεξιά, αυτό αποτελεί ένδειξη για την εγκυρότητα του αρχικού μοντέλου



Εικόνα 43 Permutation test PLS-DA UV Scaling που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

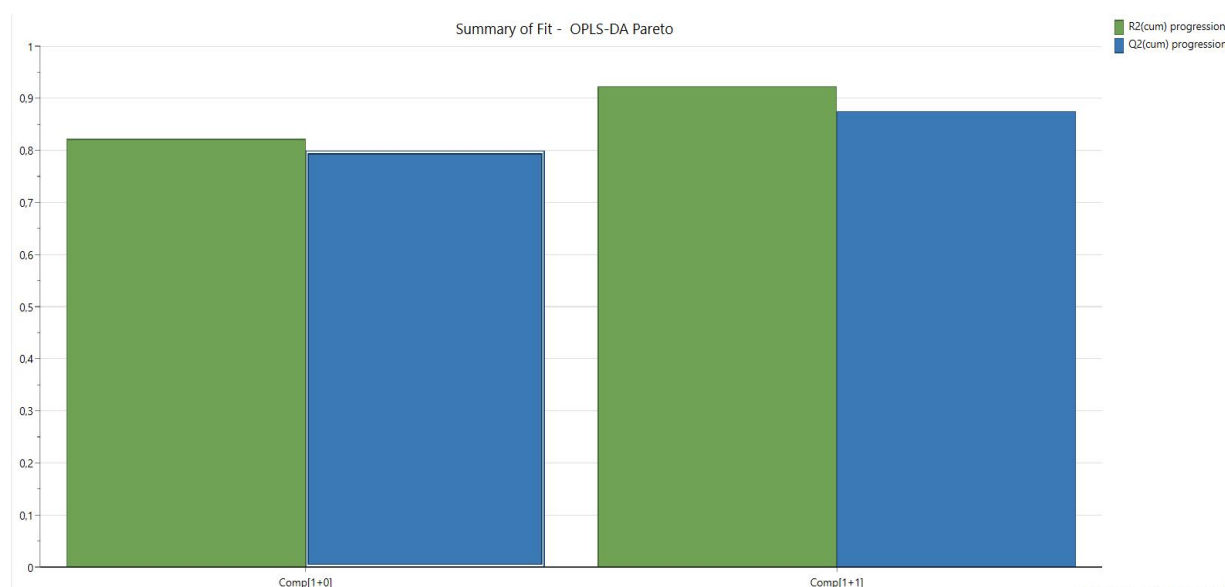


Εικόνα 44 Permutation test PLS-DA Pareto Scaling που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Τόσο στο διάγραμμα UV Scaling όσο και στο διάγραμμα Pareto Scaling πληρούνται και τα 3 κριτήρια εγκυρότητας. Επομένως και τα δύο μοντέλα είναι αξιόπιστα και μη υπερπροσαρμοσμένα στα δεδομένα μας. Θεωρείται ότι το μοντέλο Pareto έχει καλύτερη περιγραφική και προβλεπτική ικανότητα σε σχέση με το UV καθώς στο UV υπάρχει αλληλοεπικάλυψη των δεδομένων.

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

Summary of Fit Plot OPLS-DA Pareto Scaling

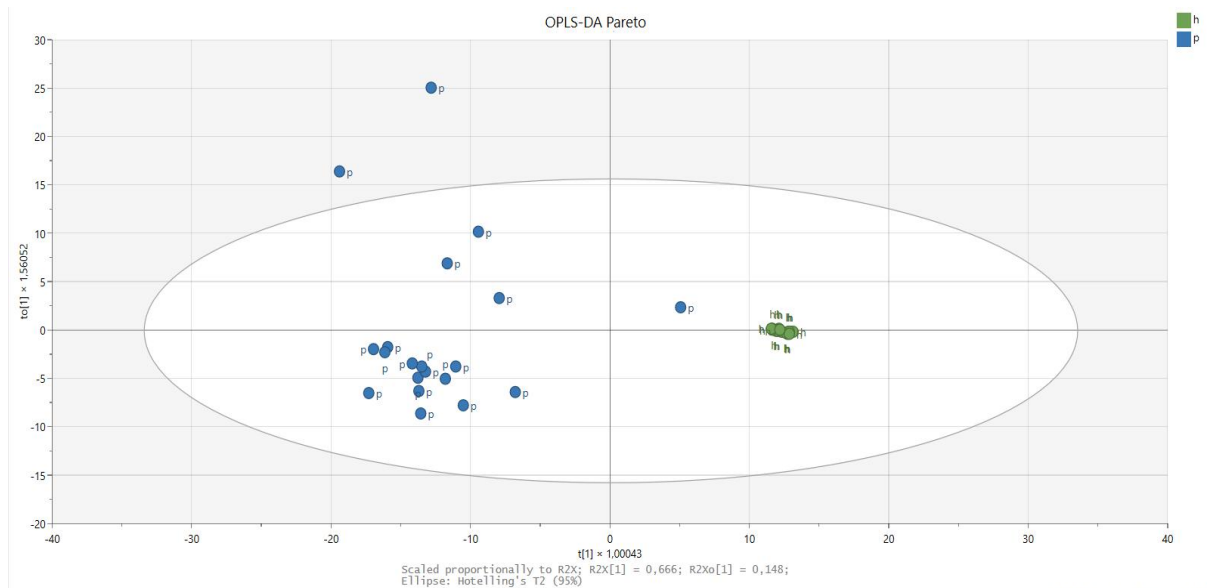


Εικόνα 45 Summary of Fit Plot OPLS-DA Pareto Scaling, που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca

Στο γράφημά της OPLS-DA σε κλίμακα Pareto, οι μπάρες R^2 πλησιάζουν το 1 είναι κοντά στο 0,9 και αυτό δηλώνει ότι το μοντέλο προσαρμόζεται πάρα πολύ καλά με τα δεδομένα. Ακόμα, το γράφημα της OPLS-DA σε κλίμακα Pareto φαίνεται ότι έχει πάρα πολύ καλή προβλεψιμότητα για τα στοιχεία μας καθώς οι τιμές Q^2 είναι μεγαλύτερες από 0.8.

Διάγραμμα OPLS-DA UV Scaling

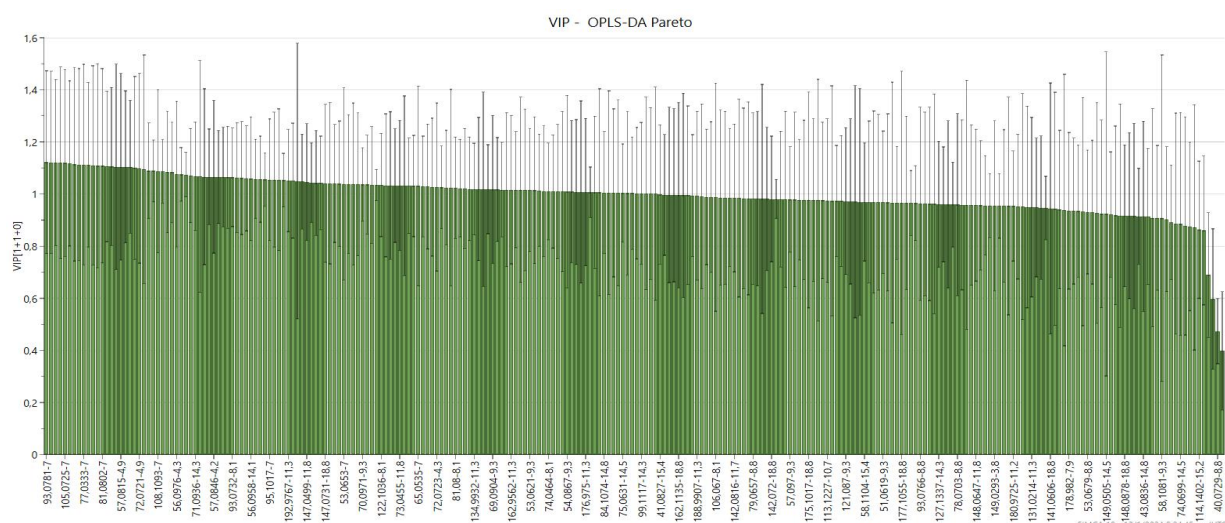
Το διάγραμμα OPLS-DA είναι παραλλαγή της PLS-DA που χρησιμοποιεί τη διόρθωση ορθογωνίου σήματος προκειμένου να μεγιστοποιήσει την συνδιακύμανση μεταξύ X και Y κατά τον άξονα X . Επομένως το διάγραμμα OPLS-DA είναι ένα παράθυρο στο χώρο X στο οποίο πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των δύο κατηγοριών στον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



Εικόνα 46 Διάγραμμα OPLS-DA σε κλίμακα Pareto που πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης Simca.

Παρατηρούμε ότι στην OPLS-DA σε κλίμακα Pareto, οι ομάδες των ασθενών και υγιών διαχωρίστηκαν στον άξονα X εκτός ενός δείγματος. Κατόπιν, από το OPLS-DA προκύπτει το διάγραμμα VIP στο οποίο συνοψίζονται τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά. Στη λίστα VIP τιμές που είναι μεγαλύτερες του 1 αντιστοιχούν σε σημαντικά στατιστικά χαρακτηριστικά, ενώ τιμές που είναι μικρότερες του 0.5 αντιστοιχούν σε μη σημαντικά στατιστικά χαρακτηριστικά. Από την OPLS-DA προκύπτει και το διάγραμμα S (S-plot) το οποίο χρειάζεται για την απεικόνιση της συμμεταβλητότητας (covariance) και της συσχέτισης (correlation) των χαρακτηριστικών. Τα χαρακτηριστικά εκείνα που βρίσκονται στις άκρες, δηλαδή που είναι πιο απομακρυσμένα από το σύνολο εμφανίζουν υψηλή διαφοροποίηση.

VIP PLOT



Εικόνα 47 Διάγραμμα VIP Plot

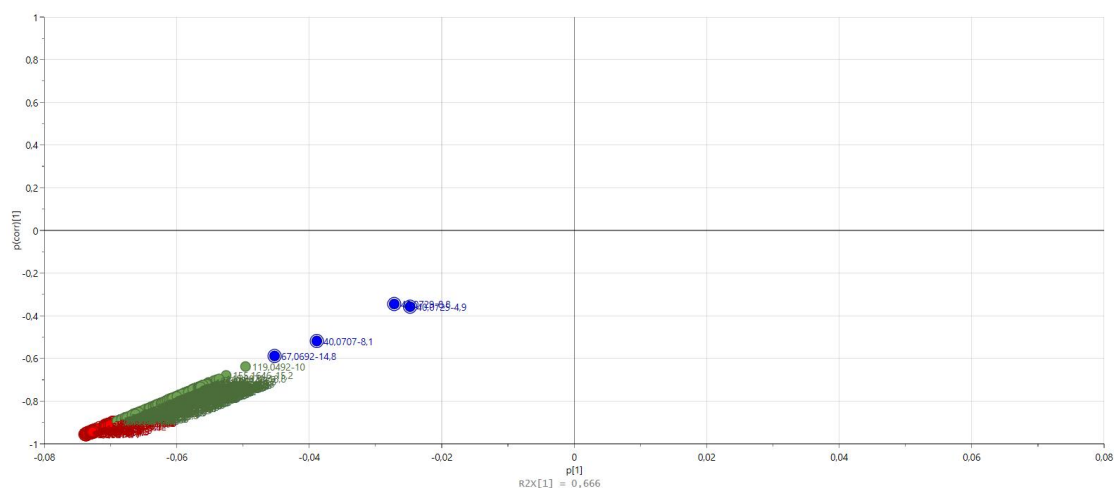
Από το VIP Plot προκύπτει ο Πίνακας 5 με τα σημαντικά στατιστικά χαρακτηριστικά δηλαδή τα χαρακτηριστικά με VIP τιμές > 1.

Πίνακας 5: τιμές VIP

M/Z_tR	VIP τιμές
93,0781-7	1,12223
92,0827-7	1,12159
91,0576-7	1,12057
117,0671-7	1,12113
122,1039-7	1,11759
79,0617-7	1,11387
77,0333-7	1,11297
105,0725-7	1,11959
68,0815-7	1,11332
67,0673-7	1,11042
107,0948-7	1,11223
94,0964-7	1,10542
136,0926-7	1,10615
41,0761-9,3	1,10429

57,0832-9,3	1,10432
70,0833-9,3	1,10461
82,0754-9,3	1,10465
66,0789-7	1,1049
103,0547-7	1,10869
81,0802-7	1,10833
57,0815-4,9	1,10457
56,1008-4,9	1,10434
41,0822-4,9	1,10431
44,0921-4,9	1,10429

Ακολουθεί το διάγραμμα S-plot



Εικόνα 48 s-plot από SIMCA

Από το διάγραμμα αυτό προκύπτουν ορισμένα χαρακτηριστικά που είναι απομακρυσμένα από την κύρια μάζα δεδομένων και συνεισφέρουν στην διαφοροποίηση των ομάδων. Τα χαρακτηριστικά αυτά δύναται να αντιπροσωπεύουν θραύσματα της ένωσης ή και το μοριακό ιόν. Από το διάγραμμα προκύπτει ο Πίνακας 6 με τα χαρακτηριστικά που αντιπροσωπεύουν m/z τα οποία διαφοροποιούνται μεταξύ των δύο πληθυσμών τουλάχιστον κατά 1.5 μονάδα (fold change).

Πίνακας 6 : S-Plot

M/Z_tR			
93,0781-7	79,0617-7	107,0948-7	103,0547-7
92,0827-7	77,0333-7	40,0729-8,8	81,0802-7
91,0576-7	105,0725-7	67,0692-14,8	57,0815-4,9
40,0707-8,1	68,0815-7	41,0822-4,9	56,1008-4,9
122,1039-7	67,0673-7	66,0789-7	80,0773-7
44,0921-4,9	82,0754-9,3	41,0761-9,3	57,0832-9,3

Κατόπιν κατασκευάζεται ο Πίνακας 7 που συνοψίζει τα κοινά στατιστικά χαρακτηριστικά από τους πίνακες 5 και 6 των διαγραμμάτων VIP και S-Plot.

Πίνακας 7: Συγκεντρωτικός πίνακας των χαρακτηριστικών που προέκυψαν

Χρόνος (tR)	Χαρακτηριστικά (M/Z)
4,9	41,44,56,57
7	66,67,68,77,79, 80,81,91,92,93,94,103, 105,107,117,122, 136
8,1	40
8,8	40
9,3	41,57,70,82
14,8	67

7.3. Ταυτοποίηση μεταβολιτών

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα 7 έγινε αναζήτηση σε όλα τα χρωματογραφήματα στον αντίστοιχο χρόνο κατακράτησης και με βάση το αντίστοιχο φάσμα μάζας και τη συνδρομή της βιβλιοθήκης NIST έγινε η ταυτοποίηση των ενώσεων. Για κάθε ένωση που ταυτοποιήθηκε έγινε δοκιμασία t-test προκειμένου να εξακριβωθεί η στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο ομάδες με βάση το εμβαδόν της αντίστοιχης χρωματογραφικής κορυφής και για τις δύο ομάδες. Το t-test έγινε

σε στάθμη εμπιστοσύνης 95% όπου ένα χαρακτηριστικό θεωρείται σημαντικό όταν η τιμή p-value είναι πιο μικρή από 0.05.

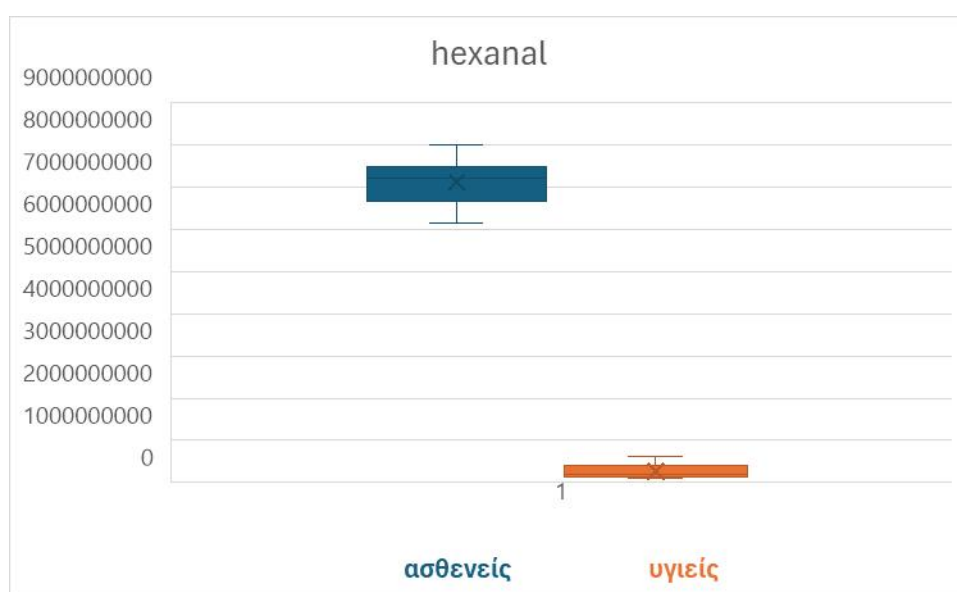
Πίνακας 8 : ταυτοποιημένοι μεταβολίτες μέσω της βιβλιοθήκης NIST

Χρόνος	Μάζα	Ένωση
4,9	41,44,56,57	εξανάλη
7	66,67,68,77,79, 80,81,91,92,93,94, 103,105,107,117, 122, 136	γ-τερπινένιο
9,3	41,57,70,82	εννεανάλη

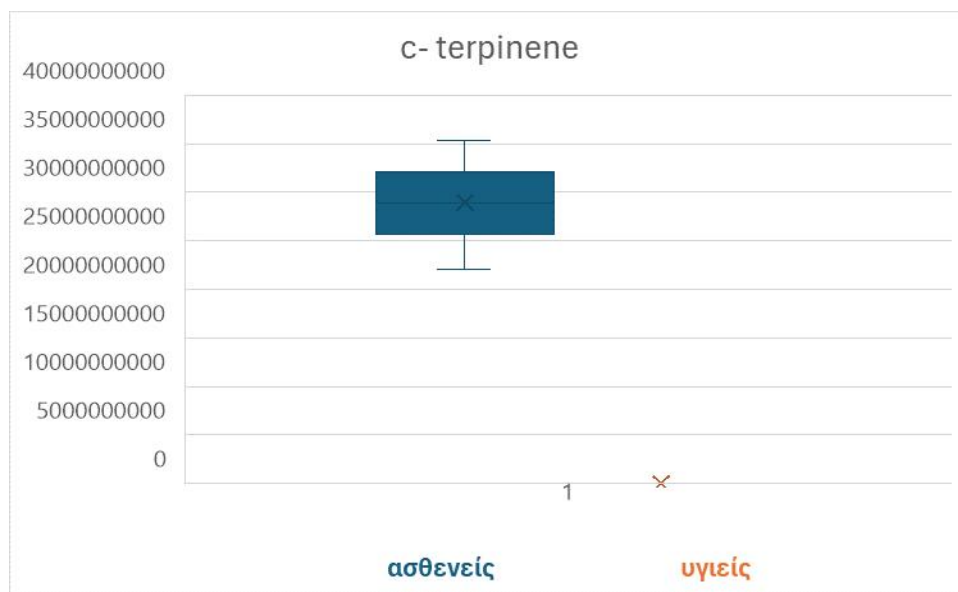
Οι ενώσεις οι οποίες θεωρούνται αξιόπιστες σε ποσοστό 95% και άνω σύμφωνα με τα δεδομένα του t-test, είναι οι ενώσεις nonanal , c-terpinene και hexanal με τιμή p-value μικρότερο του 0,0001.

7.4. Επικύρωση πιθανών βιοδεικτών

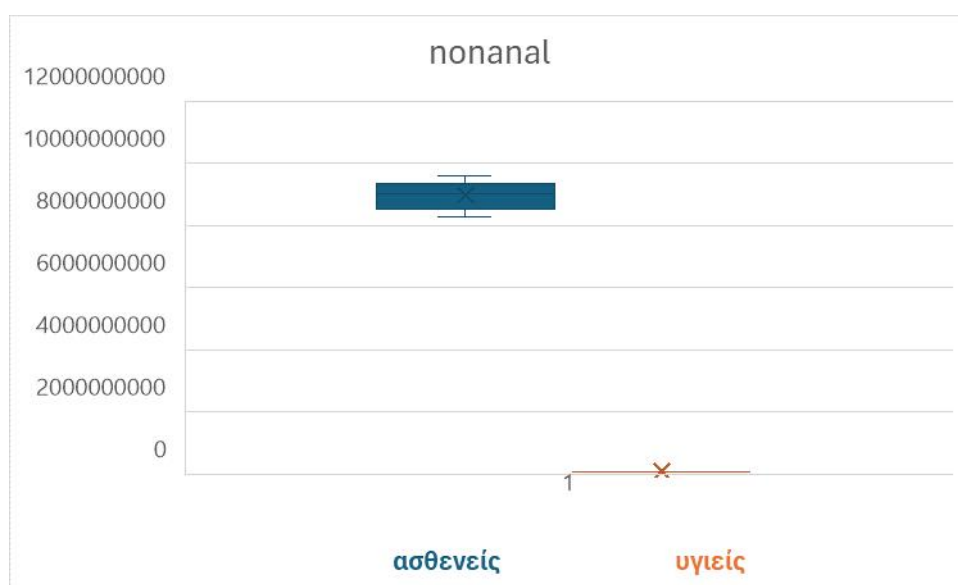
Για τις ενώσεις αυτές έγιναν τα θηκογράμματα (boxplot) όπου παρατίθενται η ενδιάμεση τιμή, το χαμηλότερο και το υψηλότερο όριο που υπάρχει στα δείγματα που αντιπροσωπεύουν κάθε ομάδα. Τα θηκογράμματα έγιναν στο Excel.



Εικόνα 49 θηκόγραμμα για hexanal



Εικόνα 50 Θηκόγραμμα για c-terpinene



Εικόνα 51 Θηκόγραμμα για nonanal

Από τα θηκογράμματα παρατηρούμε ότι και για τις τρεις ενώσεις οι μέσες τιμές που αφορούν τους ασθενείς είναι υψηλότερες από τις αντίστοιχες που αφορούν τους υγιείς, ενώ το εύρος αλληλοεπικάλυψης των δύο ομάδων είναι μηδενικό.

Τα θηκογράμματα, όπως γνωρίζουμε, δεν εκφράζουν στατιστική σημαντικότητα αλλά οπτικοποιούν την κατανομή των στατιστικών μετρήσεων.

Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ANOVA (Analysis of Variance) για τη σύγκριση των μέσων εντάσεων των μεταβολιτών μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την στατιστική σημαντικότητα της διάκρισης των ομάδων λόγω των μεταβολιτών αυτών

1. εννεανάλη (nonanal):

- F-statistic: 8035.71 — Υποδεικνύει πόση διακύμανση εξηγείται από τις διαφορές των ομάδων (υγείς έναντι ασθενών) σε σύγκριση με τη διακύμανση εντός της ομάδας. Μια υψηλότερη στατιστική F υποδηλώνει μια ισχυρότερη επίδραση των διαφορών ανάμεσα στις ομάδες.
- p-value: $7,79 \times 10^{-467,79} \times 10^{-46}$ — Η πιθανότητα να προκύψουν τυχαία οι παρατηρούμενες διαφορές είναι αστρονομικά χαμηλή, που σημαίνει ότι οι διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο ομάδων είναι πολύ σημαντικές.

Πίνακας 9 ανάλυση διακύμανσης εννεανάλης (nonanal)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ					
Ομάδες	Πλήθος	Αθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση	
Στήλη 1	20	1,79505E+11	8 975230462	1,9666E+17	
Στήλη 2	20	1703158904	85157945,2	4,7502E+13	

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	7,9033E+20	1	7,9033E+20	8035,71498	7,79E-46	4,098172
Μέσα στις ομάδες	3,7374E+18	38	9,8353E+16			
Σύνολο	7,9407E+20	39				

2. εξανάλη (hexanal):

- F-statistic: 3178,41 — Ωστόσο, υποδεικνύει μια ισχυρή διαφοροποίηση ανάμεσα στις δύο ομάδες λιγότερο έντονη από ό,τι για το A.
- p-value: $3,07 \times 10^{-383,07} \times 10^{-38}$ — Ακόμα πολύ μικρή τιμή, επιβεβαιώνοντας σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενείας.

Πίνακας 10 ανάλυση διακύμανσης εξανάλης (hexanal)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ				
Ομάδες	Πλήθος	Άθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση
Στήλη 1	20	1,42133E+11	7,107E+09	2,721E+17
Στήλη 2	20	5378619780	268930989	2,211E+16

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	Κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	4,68E+20	1	4,675E+20	3178,4078	3,07E-38	4,098172
Μέσα στις ομάδες	5,59E+18	38	1,471E+17			
Σύνολο	4,73E+20	39				

3. γ-τερπινένιο (c-terpinene):

- F-statistic: 1042.53 — υποδηλώνει σημαντική επίδραση στην διαφοροποίηση αν και μικρότερη από το A και το B.
- p-value: $3,11 \times 10^{-293,11} \times 10^{-29}$ — Πολύ μικρή τιμή, υποδεικνύοντας ισχυρές ενδείξεις διαφοροποιήσεων μεταξύ των δύο ομάδων.

Πίνακας 11 ανάλυση διακύμανσης γ – τερπινένιου (c-terpinene)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ						
Ομάδες	Πλήθος	Αθροισμα	Μέσος όρος	Διακύμανση		
Στήλη 1	20	5,79279E+11	28963939596	1,609E+19		
Στήλη 2	20	73682103	3684105,15	1,5519E+12		

ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗΣ						
Προέλευση διακύμανσης	SS	βαθμοί ελευθερίας	MS	F	τιμή-P	κριτήριο F
Μεταξύ ομάδων	8,39E+21	1	8,38696E+21	1042,52598	3,11E-29	4,098172
Μέσα στις ομάδες	3,06E+20	38	8,04485E+18			
Σύνολο	8,69E+21	39				

Ανάλυση FDR

Η ανάλυση FDR (False Discovery Rate) προσαρμόζει τις τιμές p για να ληφθούν υπόψη οι πολλαπλές δοκιμές, διασφαλίζοντας ότι τα αναφερόμενα σημαντικά αποτελέσματα δεν είναι ψευδώς θετικά λόγω τύχης.

Κατά τη διεξαγωγή πολλαπλών στατιστικών δοκιμών (π.χ. ANOVA για πολλαπλούς μεταβολίτες), ορισμένες δοκιμές μπορεί να παράγουν σημαντικές τιμές p καθαρά τυχαία. Αυτό ονομάζεται πρόβλημα πολλαπλών δοκιμών. Το FDR ελέγχει την αναμενόμενη αναλογία των ψευδώς θετικών μεταξύ των αποτελεσμάτων που δηλώνονται σημαντικά, παρέχοντας πιο αξιόπιστα συμπεράσματα.

Ερμηνεία διορθωμένων τιμών p:

- εννεανάλη : Αρχική τιμή p $7,79 \times 10^{-467,79} \times 10^{-46}$, διορθώθηκε $2,34 \times 10^{-452,34} \times 10^{-45}$. Η μικρή προσαρμογή επιβεβαιώνει ότι το αποτέλεσμα παραμένει ιδιαίτερα σημαντικό.

- Εξανάλη : Αρχική τιμή $p = 3,07 \times 10^{-383,07} \times 10^{\{-38\}}$, διορθώθηκε $4,61 \times 10^{-384,61} \times 10^{\{-38\}}$. Το αποτέλεσμα παραμένει σημαντικό μετά τη διόρθωση.
- γ – τερπινένιο : Αρχική και διορθωμένη τιμή $p = 3,11 \times 10^{-293,11} \times 10^{\{-29\}}$. Δεν χρειάστηκε καμία προσαρμογή, καθώς η αρχική τιμή p ήταν ήδη σημαντική.

Και οι τρεις μεταβολίτες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις εντάσεις μεταξύ υγιών ατόμων και ασθενών, ακόμη και μετά από διόρθωση FDR. Αυτό υποδηλώνει ότι αυτοί οι μεταβολίτες θα μπορούσαν να είναι πιθανοί βιοδείκτες για τη διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων.

FDR Analysis Results:							
A: Original p-value = 7.792162202966545e-46, FDR-corrected p-value = 2.3376486608899635e-45							
B: Original p-value = 3.0724134692251574e-38, FDR-corrected p-value = 4.608620203837736e-38							
C: Original p-value = 3.114511388495609e-29, FDR-corrected p-value = 3.114511388495609e-29							

Interpretation:				
A shows significant differences after FDR correction.				
B shows significant differences after FDR correction.				
C shows significant differences after FDR correction.				

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποσκοπούσε στη εφαρμογή ενός νέου αναλυτικού πρωτοκόλλου για τη διερεύνηση πιθανών μεταβολιτών που παρουσιάζουν διαφοροποίηση μεταξύ ασθενών που πάσχουν από καρκίνο του πνεύμονα και υγιών. Με επιτυχία εφαρμόστηκε αναλυτική μεθοδολογία βασισμένη στη δειγματοληψία του εκπνεόμενου αέρα με RTubeVOC από ασθενή και υγιή άτομα 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. Αρχικά έγινε ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA) και στη συνέχεια ακολούθησαν οι μέθοδοι PLS-DA και OPLS-DA όπου ο διαχωρισμός ήταν παντού 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 τρεις ενώσεις οι οποίες έχουν στάθμη εμπιστοσύνης μεγαλύτερη του 95%.

Οι ενώσεις αυτές αναφέρονται ως προτεινόμενοι βιοδείκτες σε ορισμένες έρευνες κάτι που επιβεβαιώνει την επιτυχία της έρευνας. Παρόλα αυτά περαιτέρω έρευνα απαιτείται ώστε να χαρακτηριστούν οι ενώσεις με σιγουριά ως βιοδείκτες και ενδεχομένως να ποσοτικοποιηθούν.

Ένας μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων στο μέλλον θα μπορεί να δώσει πολλές ακόμα ενώσεις οι οποίες ίσως αποτελούν βιοδείκτες για τον καρκίνο του πνεύμονα και συμβάλλουν στην πρόωμη διάγνωσή του.

Η ανάλυση της αναπνοής είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για τη μη επεμβατική διάγνωση του καρκίνου του πνεύμονα. Ωστόσο χρειάζεται ακόμα πολλή μελέτη ώστε να οριστούν οι κατάλληλες συνθήκες για να λαμβάνονται ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] “Ο Πνεύμονας: Δομή & Λειτουργία | Κωνσταντίνος Συρίγος.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://lungcancer.gr/o-pneymonas/#welcome>
- [2] “Lungs: Location, Anatomy, Function & Complications.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/8960-lungs>
- [3] “Καρκίνος του Πνεύμονα: Συμπτώματα, Μεταστάσεις και Προσδόκιμο Επιβίωσης.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.doctoranytime.gr/p/karkinos-tou-pneumona>
- [4] “Lung Cancer: Types, Stages, Symptoms, Diagnosis & Treatment.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4375-lung-cancer>
- [5] “Καρκίνος, επιδημιολογία, πρόληψη και νεότερες εξελίξεις - Μαρία Μπελεχρή - Maria Belechri.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://drbelechri.gr/?p=294>
- [6] freddie bray jacques ferlay, “cancer incidence and mortality worldwide : sources, methods and major patterns” .
- [7] D. M. Parkin, “The evolution of the population-based cancer registry,” *Nat Rev Cancer*, vol. 6, no. 8, pp. 603–612, Aug. 2006, doi: 10.1038/NRC1948.
- [8] J. Ferlay *et al.*, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012,” *Eur J Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, Apr. 2013, doi: 10.1016/J.EJCA.2012.12.027.
- [9] “Cancer Over Time.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/population_pyramid?types=1&populations=30000&years=2017

- [10] "Cancer Over Time." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/bars?sexes=1_2&sort_by=valueO&types=0&years=2012&hide_tab_age_specific_numbers=0
- [11] "Διατριβή: Η σημασία της κατηγοριοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας - Κωδικός: 13222." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/13222?lang=el#page/4/mode/2up>
- [12] M. J. Thun *et al.*, "Lung Cancer Occurrence in Never-Smokers: An Analysis of 13 Cohorts and 22 Cancer Registry Studies," *PLoS Med*, vol. 5, no. 9, p. e185, Sep. 2008, doi: 10.1371/journal.pmed.0050185.
- [13] "Lung Cancer: Types, Stages, Symptoms, Diagnosis & Treatment." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4375-lung-cancer>
- [14] F. C. Detterbeck, S. Z. Lewis, R. Diekemper, D. Addrizzo-Harris, and W. M. Alberts, "Executive Summary: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines," *Chest*, vol. 143, no. 5, pp. 7S-37S, May 2013, doi: 10.1378/CHEST.12-2377.
- [15] J. S. Temel *et al.*, "Early Palliative Care for Patients with Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 8, pp. 733-742, Aug. 2010, doi: 10.1056/NEJMOA1000678.
- [16] F. C. Detterbeck, S. Z. Lewis, R. Diekemper, D. Addrizzo-Harris, and W. M. Alberts, "Executive Summary: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines," *Chest*, vol. 143, no. 5, pp. 7S-37S, May 2013, doi: 10.1378/CHEST.12-2377.
- [17] "Διατριβή: Η σημασία της κατηγοριοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας - Κωδικός: 13222." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available:

<https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/13222?lang=el#page/18/mode/2up>

- [18] C. D. Berg *et al.*, “Air Pollution and Lung Cancer: A Review by International Association for the Study of Lung Cancer Early Detection and Screening Committee,” *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 18, no. 10, pp. 1277–1289, Oct. 2023, doi: 10.1016/J.JTHO.2023.05.024.
- [19] “Lung Cancer: Types, Stages, Symptoms, Diagnosis & Treatment.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4375-lung-cancer>
- [20] “Διατριβή: Ο ρόλος των νεώτερων καρκινικών δεικτών στην σταδιοποίηση και πρόγνωση του καρκίνου του πνεύμονος – Κωδικός: 15005.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/15005?lang=el#page/32/mode/2up>
- [21] “Διατριβή: Η σημασία της κατηγοριοποίησης του καρκίνου του πνεύμονα για την επιλογή της κατάλληλης θεραπείας – Κωδικός: 13222.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://thesis.ekt.gr/thesisBookReader/id/13222?lang=el#page/30/mode/2up>
- [22] “Stages Of Lung Cancer – Health365.sg.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.health365.sg/stages-of-lung-cancer/>
- [23] “PET/CT For Non-Small Cell Lung Cancer Detection and Staging – Charter Radiology.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.charterradiology.com/pet-ct/pet-ct-for-non-small-cell-lung-cancer-detection-and-staging/>
- [24] “PET Scan: What It Is, Types, Purpose, Procedure & Results.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/10123-pet-scan>
- [25] “Lung cancer – Treatment – NHS.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.nhs.uk/conditions/lung-cancer/treatment/>

- [26] "Lung Cancer Treatment | Johns Hopkins Medicine." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/lung-cancer/lung-cancer-treatment>
- [27] "Διατροφή και Καρκίνος: Ανασκόπηση επιδημιολογικών και κλινικών ερευνών - Vima Asklipiou." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.vima-asklipiou.gr/articles/311/>
- [28] B. Long, Z. Xiong, and M. Habou, "Lung cancer screening, diagnosis, and treatment: The radiologist's perspective," *Meta-Radiology*, vol. 2, no. 1, p. 100066, Mar. 2024, doi: 10.1016/J.METRAD.2024.100066.
- [29] "Καρκινικοί δείκτες - Βανέσσα Μηλιώνη." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://vanessamilioni.gr/%CE%AC%CF%81%CE%B8%CF%81%CE%B1/%CE%BA%CE%B1%CF%81%CE%BA%CE%B9%CE%BD%CE%B9%CE%BA%CE%BF%CE%AF-%CE%B4%CE%B5%CE%AF%CE%BA%CF%84%CE%B5%CF%82-%CF%84%CF%81%CE%AF%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%B1/>
- [30] "Καρκίνος του πνεύμονα: Σε οικονομικό αδιέξοδο οι Έλληνες ασθενείς - Όλο Υγεία." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.olygeia.gr/health/politiki-ygeias/karkinos-toy-pneymona-se-oikonomiko-adiexodo-oi-ellines-astheneis/>
- [31] γκιώκας, "μέθοδοι εκχύλισης και μικροεκχύλισης, σημειώσεις αναλυτικής χημείας".
- [32] "Boland , analytical chemistry".
- [33] "Liquid-Liquid Extraction - an overview | ScienceDirect Topics." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/liquid-liquid-extraction>
- [34] H. Hashemi-Moghaddam, "Liquid-liquid extraction in the food industry," *Extraction Processes in the Food Industry*, pp. 45–76, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-12-819516-1.00006-5.

- [35] Z. Berk, "Extraction," *Food Process Engineering and Technology*, pp. 289–310, 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-812018-7.00011-7.
- [36] "Solid-Phase Extraction - Chemistry LibreTexts." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Contextual_Modules/Sample_Preparation/O3_Solid-Phase_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Contextual_Modules/Sample_Preparation/O3_Solid-Phase_Extraction)
- [37] "Solid Phase Extraction - Affinisep," <https://www.affinisep.com/>, Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.affinisep.com/technologies/solid-phase-extraction/>
- [38] C. F. Poole and S. K. Poole, "Principles and practice of solid-phase extraction," *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*, pp. 273–297, Dec. 2012, doi: 10.1016/B978-0-12-381373-2.00041-7.
- [39] S. Ncube, L. M. Madikizela, M. M. Nindi, and L. Chimuka, "Solid phase extraction technique as a general field of application of molecularly imprinted polymer materials," *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 86, pp. 41–76, Jan. 2019, doi: 10.1016/bs.coac.2019.05.001.
- [40] J. Stone, "Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory," *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, pp. 37–62, 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-800871-3.00003-1.
- [41] V. D. Patel, S. A. Shamsi, and K. Sutherland, "Capillary electromigration techniques coupled to mass spectrometry: Applications to food analysis," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 139, Jun. 2021, doi: 10.1016/j.trac.2021.116240.
- [42] E. Boyaci *et al.*, "Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases," *Anal Chim Acta*, vol. 873, pp. 14–30, May 2015, doi: 10.1016/j.aca.2014.12.051.

- [43] "Solid Phase Microextraction (SPME)." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/applications/analytical-chemistry/sample-preparation/solid-phase-microextraction>
- [44] "Solid-Phase Microextraction (SPME): A Discussion." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.chromatographyonline.com/view/solid-phase-microextraction-spme>
- [45] "Chromatography - Separation, Adsorption, Retention | Britannica." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/science/chromatography/Methods>
- [46] "εισαγωγή στις χρωματογραφικές τεχνικές , eclass patras".
- [47] "χρωματογραφία, αναλυτική χημεία, σημειώσεις πανεπιστημίου ιωαννίνων".
- [48] "Gas Chromatography - Chemistry LibreTexts." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumentation_and_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)
- [49] G. Theodoridis *et al.*, "Φασματομετρία μάζας," Feb. 2016, Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <http://repository.kallipos.gr/handle/11419/3677>
- [50] E. Garg and M. Zubair, "Mass Spectrometer," Jan. 2023, Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589702/>
- [51] Βασίλης Σακκάς, "χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας σημειώσεις αναλυτικής χημείας".
- [52] "ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΩΤΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: https://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm

- [53] “Ομικές τεχνολογίες | EFSA.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.efsa.europa.eu/el/glossary/omics>
- [54] C. M. Micheel *et al.*, “Omics-Based Clinical Discovery: Science, Technology, and Applications,” Mar. 2012, Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK202165/>
- [55] E. F. Petricoin, K. C. Zoon, E. C. Kohn, J. C. Barrett, and L. A. Liotta, “Clinical proteomics: Translating benchside promise into bedside reality,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 1, no. 9, pp. 683–695, Sep. 2002, doi: 10.1038/NRD891.
- [56] R. P. Horgan and L. C. Kenny, “‘Omic’ technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics,” *The Obstetrician & Gynaecologist*, vol. 13, no. 3, pp. 189–195, Jul. 2011, doi: 10.1576/TOAG.13.3.189.27672.
- [57] D. B. Kell, “The virtual human: Towards a global systems biology of multiscale, distributed biochemical network models,” *IUBMB Life*, vol. 59, no. 11, pp. 689–695, 2007, doi: 10.1080/15216540701694252.
- [58] “Exploring Omics Data Analysis and Integration.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.altexsoft.com/blog/omics-data-analysis/>
- [59] J. Y. Kim *et al.*, “Metabolic profiling of plasma in overweight/obese and lean men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF Mass spectrometry (UPLC-Q-TOF MS),” *J Proteome Res*, vol. 9, no. 9, pp. 4368–4375, Sep. 2010, doi: 10.1021/PR100101P.
- [60] “METABOLOMIKH – Complete-Health Control.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://gtsilimidos.gr/%CE%BC%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B2%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CE%B7/>
- [61] “Introduction to Metabolomics.” Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.aurorabiomed.com/introduction-to-metabolomics/>

- [62] C. M. Micheel *et al.*, "Omics-Based Clinical Discovery: Science, Technology, and Applications," Mar. 2012, Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK202165/>
- [63] N. Z. Ballin and K. H. Laursen, "To target or not to target? Definitions and nomenclature for targeted versus non-targeted analytical food authentication," *Trends Food Sci Technol*, vol. 86, pp. 537–543, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.TIFS.2018.09.025.
- [64] "What is Non-Target Analysis? Chromatography Today." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.chromatographytoday.com/news/gc-ms/46/breaking-news/what-is-non-target-analysis/58324>
- [65] "Non-Targeted Analysis Research | US EPA." Accessed: Oct. 06, 2024. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/chemical-research/non-targeted-analysis-research>
- [66] B. Gao, S. E. Holroyd, J. C. Moore, K. Laurvick, S. M. Gendel, and Z. Xie, "Opportunities and Challenges Using Non-targeted Methods for Food Fraud Detection," *J Agric Food Chem*, vol. 67, no. 31, pp. 8425–8430, Aug. 2019, doi: 10.1021/ACS.JAFC.9B03085/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2019-03085X_0002.GIF.
- [67] J.A. Strimbu, "what are biomarkers?".
- [68] rasmus madsen, "chemometrics in metabolomics- a review in human disease diagnosis".
- [69] S. J. Kim, S. H. Kim, J. H. Kim, S. Hwang, and H. J. Yoo, "Understanding Metabolomics in Biomedical Research," *Endocrinology and Metabolism*, vol. 31, no. 1, p. 7, Mar. 2016, doi: 10.3803/ENM.2016.31.1.7.
- [70] "Technical Overview of Volatile Organic Compounds | US EPA." Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq/technical-overview-volatile-organic-compounds>

- [71] S. Reimann and A. C. Lewis, *Volatile Organic Compounds in the Atmosphere*. Blackwell Publishing Ltd, 2007. doi: 10.1002/9780470988657.
- [72] "Volatile Organic Compounds | American Lung Association." Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.lung.org/clean-air/indoor-air/indoor-air-pollutants/volatile-organic-compounds>
- [73] "volatile organic compound (VOC) — European Environment Agency." Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.eea.europa.eu/help/glossary/eea-glossary/volatile-organic-compound-voc>
- [74] "What compounds are contained in exhaled breath?" Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.owlstonemedical.com/about/blog/2023/jul/07/what-is-in-breath/>
- [75] S. Janfaza, B. Khorsand, M. Nikkhah, and J. Zahiri, "Digging deeper into volatile organic compounds associated with cancer," *Biol Methods Protoc*, vol. 4, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1093/BIOMETHODS/BPZO14.
- [76] P. J. Mazzone, "Analysis of Volatile Organic Compounds in the Exhaled Breath for the Diagnosis of Lung Cancer," *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 3, no. 7, pp. 774–780, Jul. 2008, doi: 10.1097/JTO.0B013E31817C7439.
- [77] J. Song *et al.*, "Detection of VOCs in exhaled breath for lung cancer diagnosis," *Microchemical Journal*, vol. 199, p. 110051, Apr. 2024, doi: 10.1016/J.MICROC.2024.110051.
- [78] J. Chung *et al.*, "Diagnosis by Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath from Patients with Gastric and Colorectal Cancers," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 1, Jan. 2023, doi: 10.3390/IJMS24010129.
- [79] Z. Jia *et al.*, "Detection of Lung Cancer: Concomitant Volatile Organic Compounds and Metabolomic Profiling of Six Cancer Cell Lines of Different Histological Origins," *ACS Omega*, vol. 3, no. 5, pp. 5131–

5140, May 2018, doi:

10.1021/ACSOMEGA.7B02035/SUPPL_FILE/A07B02035_SI_001.PDF.

- [80] "Sample Bags - Tedlar - FlexFilm." Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://www.skcltd.com/gas-sample-bags.html>
- [81] "RTubeVOC End Tidal Air Collector," <https://respiratoryresearch.com/>, Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://respiratoryresearch.com/rtube-voc/>
- [82] "Bio-VOC™", Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: www.markes.com
- [83] K. J. M. Kramer, "Quality assurance of sampling and sample handling for trace metal analysis in aquatic biota," *Quality Assurance in Environmental Monitoring: Sampling and Sample Pretreatment*, pp. 179–214, Dec. 2007, doi: 10.1002/9783527615216.CH08.
- [84] P. Rosias, "Methodological aspects of exhaled breath condensate collection and analysis," *J Breath Res*, vol. 6, no. 2, Jun. 2012, doi: 10.1088/1752-7155/6/2/027102.
- [85] H. Ahmadzai, S. Huang, R. Hettiarachchi, J. L. Lin, P. S. Thomas, and Q. Zhang, "Exhaled breath condensate: a comprehensive update," *Clin Chem Lab Med*, vol. 51, no. 7, pp. 1343–1361, Jul. 2013, doi: 10.1515/CCLM-2012-0593.
- [86] P. P. Rosias *et al.*, "Biomarker reproducibility in exhaled breath condensate collected with different condensers," *European Respiratory Journal*, vol. 31, no. 5, pp. 934–942, May 2008, doi: 10.1183/09031936.00073207.
- [87] S. Barnes *et al.*, "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, pp. 535–548, Aug. 2016, doi: 10.1002/JMS.3780.

- [88] R. C. Pinto, "Chemometrics Methods and Strategies in Metabolomics," *Adv Exp Med Biol*, vol. 965, pp. 163–190, Jan. 2017, doi: 10.1007/978-3-319-47656-8_7.
- [89] R. Madsen, T. Lundstedt, and J. Trygg, "Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis," *Anal Chim Acta*, vol. 659, no. 1–2, pp. 23–33, Feb. 2010, doi: 10.1016/j.aca.2009.11.042.
- [90] M. Bylesjö, "Extracting meaningful information from metabonomic data using multivariate statistics," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1277, pp. 137–146, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2377-9_11.
- [91] J. A. Westerhuis *et al.*, "Assessment of PLS-DA cross validation," *Metabolomics*, vol. 4, no. 1, pp. 81–89, Mar. 2008, doi: 10.1007/s11306-007-0099-6.
- [92] H. Blasco *et al.*, "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, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.jbi.2014.12.001.
- [93] J. A. Westerhuis *et al.*, "Assessment of PLS-DA cross validation", doi: 10.1007/s11306-007-0099-6.
- [94] B. Lu, I. Castillo, L. Chiang, and T. F. Edgar, "Industrial PLS model variable selection using moving window variable importance in projection," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 135, pp. 90–109, Jul. 2014, doi: 10.1016/J.CHEMOLAB.2014.03.020.
- [95] L. Chiang, B. Lu, and I. Castillo, "Big data analytics in chemical engineering," *Annu Rev Chem Biomol Eng*, vol. 8, pp. 63–85, Jun. 2017, doi: 10.1146/ANNUREV-CHEMBIOENG-060816-101555.
- [96] S. Xu *et al.*, "Data cleaning in the process industries," *Reviews in Chemical Engineering*, vol. 31, no. 5, pp. 453–490, Oct. 2015, doi: 10.1515/REVCE-2015-0022.

- [97] J. Xia, D. I. Broadhurst, M. Wilson, and D. S. Wishart, "Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial," *Metabolomics*, vol. 9, no. 2, pp. 280–299, Apr. 2013, doi: 10.1007/S11306-012-0482-9.
- [98] Y. Jang *et al.*, "Biomarker discovery in progressive supranuclear palsy from human cerebrospinal fluid.," *Clin Proteomics*, vol. 21, no. 1, p. 56, Sep. 2024, doi: 10.1186/s12014-024-09507-3.
- [99] P. Schlattmann, "Statistics in diagnostic medicine," *Clin Chem Lab Med*, vol. 60, no. 6, pp. 801–807, May 2022, doi: 10.1515/cclm-2022-0225.
- [100] "Understanding AUC - ROC Curve | by Sarang Narkhede | Towards Data Science." Accessed: Oct. 07, 2024. [Online]. Available: <https://towardsdatascience.com/understanding-auc-roc-curve-68b2303cc9c5>