

## Streszczenie

Cukrzycę typu 2 (z ang. type 2 diabetes mellitus, T2DM) uważa się za jedną z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. W początkowym etapie choroba ta zwykle przebiega bezobjawowo, przez co jej wczesne wykrywanie jest utrudnione. Przewlekła hiperglikemia prowadzi do wielu mikro- i makronaczyniowych powikłań, które mogą przyczyniać się do wielonarządowych uszkodzeń. Ze względu na ciągły wzrost liczby osób z T2DM, zasadne jest poszukiwanie nowych rozwiązań pozwalających na zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie tej choroby. W ostatnim czasie dużo uwagi poświęca się badaniom metabolomicznym, które wykorzystuje się między innymi do badania wpływu różnych czynników odpowiedzialnych za rozwój T2DM. Znaczącą rolę w etiologii tej choroby odgrywa mikrobiom jelitowy. Jest on odpowiedzialny m.in. za przemiany związków drobnocząsteczkowych, określanych mianem metabolitów zależnych od mikrobiomu (z ang. microbiota dependent metabolites, MDMs), które mogą również przenikać do krwiobiegu. Inne czynniki ryzyka rozwoju T2DM, takie jak niewłaściwa dieta, siedzący tryb życia oraz polimorfizmy genetyczne (np.: w genie PROX 1, z ang. Prospero Homeobox 1) także mogą powodować zmiany w poziomie MDMs. Dlatego też oznaczanie tego typu związków u pacjentów z grupy ryzyka może przyczynić się do wskazania panelu metabolitów biorących udział w procesach biochemicznych prowadzących do rozwoju T2DM. Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS) jest często wykorzystywana w badaniach metabolomicznych nad T2DM. Technika ta zyskała dużą popularność m.in. ze względu na możliwość jednoczesnej analizy wielu MDMs, należących do różnych klas. Jednak oznaczanie jak najszerzego spektrum MDMs w próbkach krwi wymaga optymalizacji protokołu przygotowania próbek. Jest to szczególnie ważne w przypadku analiz przy użyciu GC-MS, gdyż w przypadku wielu metabolitów konieczna jest ich derywatywacja przed oznaczeniem tą techniką.

Głównym celem badań było poszukiwanie metabolitów związanych z florą jelitową, wskazujących na ryzyko rozwoju T2DM. Aby zrealizować cel główny, wyznaczono następujące cele pośrednie: i) opracowanie metody przygotowania próbek osocza/surowicy do analiz przy użyciu GC-MS pozwalającej na jak najlepszy pomiar wybranych MDMs, ii) aplikacja opracowanej metody GC-MS do analizy próbek klinicznych celem wskazania

różnic w profilu metabolitów surowicy pomiędzy pacjentami ze stanem przedcukrzycowym, a pacjentami ze zdiagnozowaną T2DM, iii) wykorzystanie techniki GC–MS do określenia poposiłkowych (posiłek wysokowęglowodanowy (WW) i normowęglowodanowy (NW)) zmian w profilu metabolitów osocza zdrowych mężczyzn w zależności od obecności polimorfizmu w genie PROX1.

W celu osiągnięcia założeń pracy naukowej i zweryfikowania postawionych hipotez badawczych, przeprowadzono badania naukowe na archiwalnym materiale biologicznym (próbki surowicy oraz osocza) zgromadzonym od ochotników rasy kaukaskiej podczas realizacji projektu pt. „Rola czynników behawioralnych, antropometrycznych i molekularnych w rozwoju cukrzycy typu 2 – projekt 1000PLUS”. Do badań wykorzystano materiał pobrany od 42 pacjentów w stanie przedcukrzycowym ( $53.0 \pm 9.1$  lat). Po 5 latach obserwacji u 24 pacjentów rozwinęła się T2DM, natomiast 18 pacjentów pozostało w stanie przedcukrzycowym). Dodatkowo wykorzystano materiał zebrany od 18 zdrowych mężczyzn ( $35.5 \pm 8.0$  lat) wśród których 12 charakteryzowało się genotypem ryzyka rozwoju T2DM w genie PROX1, a 6 miało genotyp ochronny. W obu badaniach osoby w porównywanych grupach były dopasowane pod względem parametrów klinicznych i antropometrycznych. Do opracowania metody przygotowania próbek wykorzystano krew od zdrowych osób. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury stwierdzono, że rozwojowi T2DM towarzyszą zmiany w poziomie metabolitów związanych z florą jelitową. Metabolity te to głównie węglowodany, aminokwasy oraz kwasy tłuszczowe. Podczas optymalizacji metody przygotowania próbek osocza/surowicy do oznaczeń MDMs techniką GC-MS okazało się, że najlepsze rezultaty uzyskuje się przy przygotowaniu próbek za pomocą metanolu z dodatkiem wody. Ponadto wykazano, że objętość i stężenie odczynnika do metoksymacji mają największy wpływ na powtarzalność i intensywność oznaczanych metabolitów, podczas gdy warunki procesu derywatywacji w największym stopniu wpływają na kompletność tego procesu. Opracowana metoda pozwala na powtarzalny pomiar w próbkach osocza lub surowicy 75 metabolitów związanych z florą jelitową. Na podstawie analizy próbek klinicznych wykazano różnice w profilu metabolitów związanych z florą jelitową pomiędzy osobami ze stanem przedcukrzycowym oraz ze zdiagnozowaną T2DM. Dodatkowo, w oparciu o otrzymane wyniki, wykonano analizy krzywych ROC dla wybranych zmiennych. Na ich podstawie

wskazano panel siedmiu metabolitów, których pomiar w surowicy pozwala odróżnić osoby ze stanem przedcukrzycowym od osób z T2DM. Oba testy prowokacyjne (WW, NW) wywołały zmiany w poziomie MDMs u zdrowych osób mających predyspozycje genetyczne do rozwoju T2DM w genie PROX1, których nie odnotowano u osób z genotypem ochronnym. Różnice w odpowiedzi poposiłkowej mogą być źródłem wczesnych zaburzeń metabolicznych, także w poziomie metabolitów związanych z GM, które mogą być powiązane z przyszłym rozwojem T2DM.