

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 przemianę związków drobnocząsteczkowych, określaną 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 najszerszego 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 osób zdrowych, w stanie przedcukrzycowym oraz 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 ± 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 ± 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.