

**ZASTOSOWANIE TECHNIK
CHROMATOGRAFICZNYCH W BADANIACH
METABOLITÓW W SCHORZENIACH
ZWIĄZANYCH Z OŚRODKOWYM UKŁADEM
NERWOWYM**

APPLICATION OF CHROMATOGRAPHIC
TECHNIQUES IN THE STUDY OF METABOLITES
IN DISEASES RELATED TO THE CENTRAL NERVOUS
SYSTEM

Paulina Gątarek*, Joanna Kałużna-Czaplińska**

*Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej, Wydział Chemiczny,
Politechnika Łódzka, ul. Żeromskiego 116, 90-924 Łódź*

*e-mail: paulina.gatarek@p.lodz.pl

**e-mail: joanna.kaluzna-czaplinska@p.lodz.pl

Abstract

Wprowadzenie

1. Badania metabolomiczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych

2. Metabolity w autyzmie

3. Metabolity w chorobie Parkinsona

Uwagi końcowe

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane



Dr inż. Paulina Gałarek studiowała na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, gdzie w 2012 roku uzyskała tytuł zawodowy licencjata. Od 2012 roku związana z Wydziałem Chemicznym Politechniki Łódzkiej, gdzie w 2015 roku uzyskała tytuł inżyniera, następnie w 2016 roku tytuł magistra, kontynuując naukę na studiach doktoranckich, uzyskując w 2023 roku tytuł doktora nauk chemicznych. Pracę doktorską pt. „*Oznaczanie wybranych metabolitów w płynach ustrojowych z wykorzystaniem technik chromatograficznych*” zrealizowała w Instytucie Chemii Ogólnej i Ekologicznej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Joanny Kałużnej-Czaplińskiej. Praca została nagrodzona w konkursie Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą rozprawę doktorską z chemii analitycznej w 2024 r. Obecnie

zatrudniona na stanowisku adiunkta na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. Jest współautorką m.in. dziewiętnastu publikacji o zasięgu międzynarodowym oraz trzech rozdziałów w monografiach naukowych. Zainteresowania naukowe skupia głównie na badaniach związanych z poszukiwaniem i identyfikacją potencjalnych markerów diagnostycznych i prognostycznych w chorobach związanych z ośrodkowym układem nerwowym z zastosowaniem technik chromatograficznych oraz wielowymiarowej analizy statystycznej.



<https://orcid.org/0009-0006-3825-522X>



Prof. dr hab. inż. Joanna Kałużna-Czaplińska - w 1989 roku ukończyła XII Liceum Ogólnokształcące im. S. Wyspiańskiego w Łodzi w klasie o profilu matematyczno-fizycznym. W tym samym roku podjęła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej, a po pięciu latach uzyskała tytuł magistra inżyniera chemii. Od 1994 roku związana jest z Instytutem Chemii Ogólnej i Ekologicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej. W 1999 roku uzyskała stopień doktora nauk chemicznych. Stypendystka Fundacji Pamięci Prof. dr hab. B. Jeżowskiej - Trzebiatowskiej dla wybitnych młodych uczonych. Stopień doktora habilitowanego otrzymała w 2012 roku na podstawie rozprawy habilitacyjnej nt. „*Oznaczenia metabolitów z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas*”. Zainteresowania naukowe prof. Joanny Kałużnej-Czaplińskiej dotyczą

wykorzystania technik łączonych z chromatografią w badaniach próbek środowiskowych, klinicznych i archeologicznych. Była kierownikiem i głównym wykonawcą projektów krajowych finansowanych przez NCN, MNiSW oraz w ramach Funduszy Europejskich. Od kilku lat uznawana jest jako najczęściej cytowany autor na świecie według Wydawnictwa Elsevier. Pełni funkcję kierownika zespołu badawczego Poland Chemistry and Nutrition Research Group, Grupa ta jest częścią Międzynarodowego Stowarzyszenia - Council for Nutritional and Environmental Medicine (CONEM). Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej PAN i Komisji Analizy Chromatograficznej i Technik pokrewnych Komitetu Chemii Analitycznej PAN, Polskiego Towarzystwa Metabolomicznego. Jest współautorką ponad 90 publikacji w czasopiśmie z listy JCR, monografiach naukowych i podręcznikach: „*Podstawy chromatografii i technik elektromigracyjnych*” oraz „*Biochromatografia*”. Pełni rolę recenzenta w czasopiśmie naukowym o zasięgu międzynarodowym. Nowe kierunki jej badań naukowych obejmują analizy metabolomiczne oraz wpływ diety i suplementacji na organizm człowieka.



<https://orcid.org/0000-0002-5106-4667>

ABSTRACT

The search for biomarkers which would be helpful in diagnosing or predicting the course of diseases of unknown etiology, such as autism or Parkinson's disease (PD), is challenging due to the complex nature of these conditions and their diverse biochemical backgrounds. With help comes metabolomics. Metabolomics studies allow qualitative and quantitative analysis of metabolites which can act as disease markers. Traditional biochemical methods are not always sensitive enough to detect metabolites present at very low concentrations in body fluids. Therefore, chromatographic techniques, especially gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), along with other detection options, are often used in metabolomic studies. The high sensitivity of both methods allows detection of metabolites even in trace amounts, which is crucial for diagnosing neurological diseases, where biochemical changes can be subtle and difficult to detect. Metabolomics research into autism and PD contributes to a better understanding of mechanisms of their development at cellular and molecular levels. Identifying biomarkers may help uncover metabolic changes affecting central nervous system (CNS) functions, such as neurotransmitters, which may be related to communication and social impairments in autism. Similarly, metabolites linked to dopaminergic neuronal degeneration or oxidative stress are being sought in Parkinson's disease. Examples of potential biomarkers include specific fatty acids, products of lipid peroxidation, or compounds related to energy metabolism, which may be indicative of ongoing neurodegenerative processes in the brain. However, more specific diagnostic indicators are still needed, making metabolomic studies together with bioinformatics analysis a valuable tool for the development of personalized diagnostics, but also for monitoring the course of disease and therapeutic strategies in diseases of the CNS. This article presents metabolites which can be considered potential prognostic and diagnostic markers in autism and Parkinson's disease.

Keywords: metabolity, techniki łączone z chromatografią, autyzm, choroba Parkinsona

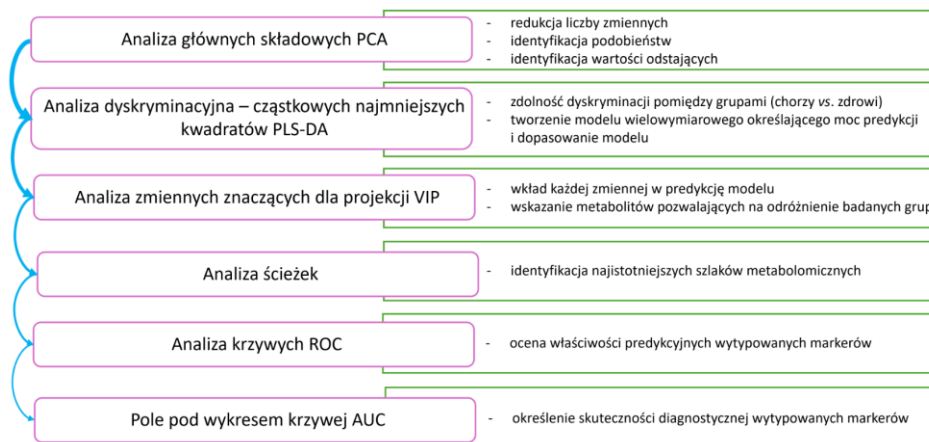
Słowa kluczowe: metabolites, coupled techniques with chromatography, autism, Parkinson's disease

WPROWADZENIE

Choroby cywilizacyjne często są definiowane jako te związane ze stylem życia i sposobem odżywiania. Do chorób cywilizacyjnych zaliczają się m.in.: choroby serca, cukrzyca typu 2, otyłość, choroby nowotworowe, choroby układu oddechowego oraz zaburzenia o podłożu psychicznym i neurologicznym. Wiele z tych chorób wiąże się z niewłaściwą dietą, brakiem aktywności fizycznej, stresem, paleniem tytoniu i nadmiernym spożywaniem alkoholu często prowadzącym do przewlekłego zmęczenia, ograniczenia zdolności do wykonywania codziennych czynności, wpływając tym na jakość życia całego społeczeństwa a także przyczyniając się do zwiększenia liczby zgonów oraz w dużej mierze do rozwoju niepełnosprawności. Obecnie szczególnie trudnym zagadnieniem są neurologiczne choroby cywilizacyjne. Najczęściej definiowane jako schorzenia i zaburzenia, które w coraz większym stopniu dotyczą społeczeństwo i są ściśle powiązane z ośrodkowym układem nerwowym (OUN). Ośrodkowy układ nerwowy odgrywa kluczową rolę w regulacji funkcji życiowych, procesów myślowych, ruchowych, związanych z emocjami, ma także kluczowe znaczenie w odczuwaniu bólu, reakcjach na bodźce, równowagę hormonalną oraz oddychanie i trawienie. Dlatego neurologiczne choroby cywilizacyjne mają poważne konsekwencje dla zdrowia publicznego, a wczesna diagnostyka oraz działania prewencyjne są istotnymi elementami w walce z tymi schorzeniami. Analiza metabolitów w przypadku OUN może pomóc w identyfikacji biomarkerów chorób neurologicznych, takich jak na przykład choroba Parkinsona (ang. *Parkinson's disease* – PD), czy zaburzenie jakim jest autyzm. Badania metabolitów związanych z OUN są istotne dla zrozumienia wielu aspektów funkcjonowania ludzkiego mózgu oraz patologii neurodegeneracyjnych. Metabolity, takie jak neurotransmitery, kwasy tłuszczowe, czy produkty metabolizmu glukozy, odgrywają kluczową rolę w komunikacji neuronów i regulacji procesów energetycznych. Badania metabolomiczne umożliwiają wczesną diagnozę oraz prognozowanie przebiegu choroby poprzez zidentyfikowanie markerów predykcyjnych, hamowanie rozwoju choroby czy wybór i dopasowanie najefektywniejszego leczenia. Stąd też w badaniach metabolomicznych istotne jest zastosowanie czułych, selektywnych i komplementarnych technik analitycznych, aby możliwe było oznaczenie metabolitów o różnych właściwościach fizykochemicznych, często występujących na bardzo niskich poziomach stężeń. W tym celu w tych badaniach szeroko wykorzystywane są techniki łączone m.in.: chromatografia gazowa (ang. *gas chromatography* – GC) czy cieczowa (ang. *liquide chromatography* – LC) sprzężone ze spektrometrią mas (ang. *mass spectrometry* – MS). Zastosowanie łączonych technik chromatograficznych pozwala na jakościową i ilościową analizę metabolitów mogących pełnić funkcję markerów chorobowych.

Ciągle istnieje potrzeba poszukiwania nowych, bardziej specyficznych wskaźników diagnostycznych. Analiza metabolitów zapewnia wgląd w odpowiedź organizmu wywołaną bodźcami zewnętrznymi. Na ich podstawie można obserwować zmiany w szlakach metabolicznych związanych z chorobą i jej rozwojem. Badania metabolomi-

czne przy wsparciu zaawansowanego modelowania bioinformatycznego stanowią potężne narzędzie diagnostyczne umożliwiające holistyczne podejście do zrozumienia regulowanych odpowiedzi na różnych poziomach biologicznych. Przykładowy schemat postępowania statystycznego w badaniach związanych z poszukiwaniem nowych biomarkerów zaprezentowano na Rysunku 1.



Rysunek 1. Przykładowy schemat postępowania statystycznych w badaniach metabolomicznych

Figure 1. An example of a scheme of statistical procedures in metabolomics research

1. BADANIA METABOLOMICZNE Z WYKORZYSTANIEM TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH

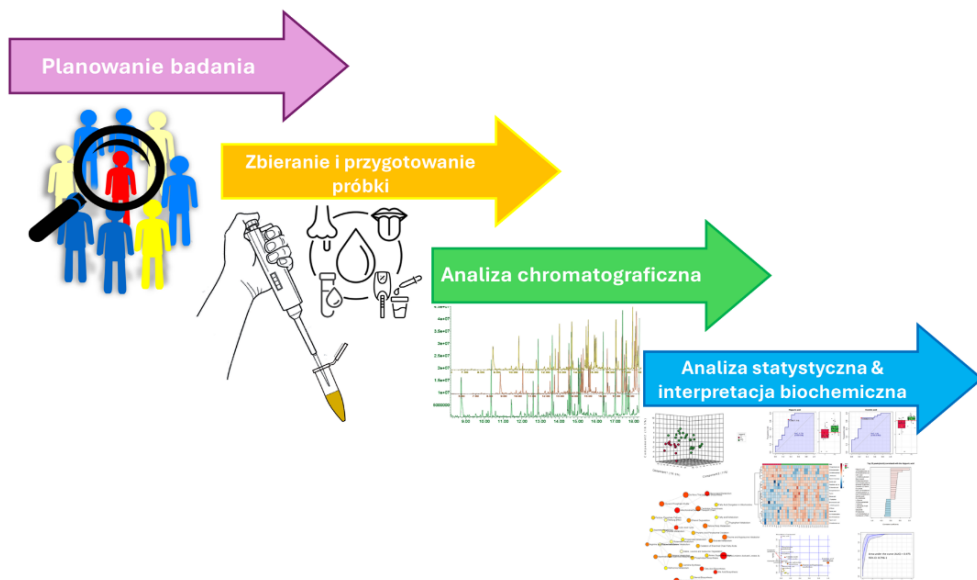
Etiologia wielu chorób i zaburzeń, w tym także choroby Parkinsona i autyzmu, nadal pozostaje przedmiotem dyskusji. Pomocne mogą okazać się nowe narzędzia diagnostyczne, które skupiają się na analizie metabolomu, czyli pełnego zestawu metabolitów, zmieniający się w zależności od fizjologii, rozwoju lub stanu patologicznego komórek czy tkanek. Badania nad metabolitami w chorobie Parkinsona i autyzmie mogą pomóc w identyfikacji nowych biomarkerów do wczesnej diagnostyki oraz w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych. Ponadto, badania metabolomiczne umożliwiają wczesną diagnozę poprzez zidentyfikowanie markerów predykcyjnych, prognozowanie przebiegu choroby, hamowanie rozwoju choroby czy wybór i dopasowanie najefektywniejszej suplementacji i leczenia.

W badaniach metabolomicznych stosowane są różne podejścia analityczne, takie jak:

1. metabolomiczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*) polegający na analizie jakościowej wszystkich związków obecnych w próbce [1,2],

2. badanie profili metabolicznych (ang. *metabolite profiling*), które polega na analizie określonej grupy metabolitów o podobnych właściwościach [3,4],
3. celowana analiza metabolomiczna (ang. *metabolite target analysis*), która skupia się na analizie określonego odcinka metabolomu poprzez analizę wybranych metabolitów [5,6].

Przykładowy schemat postępowania metabolomicznego został zaprezentowany na Rysunku 2.



Rysunek 2. Postępowanie metabolomiczne w poszukiwaniu biomarkerów

Figure 2. Metabolomic procedure in the search for biomarkers

Badania metabolomiczne skupiające się na identyfikacji markerów chorobowych często są utrudnione m.in.: ze względu na złożony skład matrycy, czyli płynów fizjologicznych lub tkanek, najczęściej stosowanych w tego typu badaniach. Dodatkowo nie bez znaczenia pozostają poziomy i zakresy stężeń metabolitów w próbkach biologicznych. Oznaczone metabolity występują na niskich poziomach stężeń, rzędu mikro-, nano- czy pikogramów. Często wykonywanie tych oznaczeń jest skomplikowane i czasochłonne, a proces przygotowania próbki wymagający i wieloetapowy. Te wszystkie trudności można wyeliminować stosując techniki chromatograficzne głównie w połączeniu ze spektrometrią mas. Sprzężenie tych technik gwarantuje rozdzielenie złożonej mieszaniny na poszczególne składniki i ich identyfikację. Wiele metabolitów z próbek biologicznych charakteryzujących się złożonym składem matrycy może być zidentyfikowanych w wyniku pojedynczej analizy z wykorzystaniem m.in.: chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią

mas (ang. *gas chromatography-mass spectrometry* – GC-MS) [7,8]. Sprzężenie to jest jedną z najczęściej stosowanych technik do oznaczania lotnych i niepolarnych metabolitów. Przed zadozowaniem próbki do kolumny chromatograficznej jest przekształcana w pochodne o odpowiednich właściwościach umożliwiających ich oznaczenie (zwiększenie lotności czy stabilności termicznej, zmianę polarności, zwiększenia czułości i/lub specyficzności oznaczenia). Do zalet tego połączenia należą wysoka czułość, możliwość jednoznacznej identyfikacji analizowanych związków oraz szeroki wachlarz możliwości zastosowania [8-11]. Inną szybką i dokładną metodą rozdzielania składników mieszaniny wraz z identyfikacją jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography-mass spectrometry* – LC-MS). W tym przypadku proces przygotowania próbki do analizy nie jest aż tak wymagający i długotrwały, jak dla GC-MS. Technika ta charakteryzuje się wysoką czułością i specyficznością. Stosowana jest głównie do oznaczania związków polarnych, nielotnych oraz wrażliwych na temperaturę [12].

2. METABOLITY W AUTYZMIE

Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization* – WHO) definiuje autyzm jako zaburzenie rozwoju psychicznego charakteryzujące się opóźnieniem lub upośledzeniem rozwoju funkcji mózgu bezpośrednio związanych z biologicznym dojrzewaniem ośrodkowego układu nerwowego. Charakterystycznymi cechami diagnostycznymi autyzmu są obecność zaburzonego lub nieprawidłowego rozwoju dziecka ujawniającego się przed ukończeniem trzeciego roku życia, a także nieprawidłowe funkcjonowanie we wszystkich obszarach psychopatologii: wzajemnych interakcji społecznych, komunikacji i ograniczonych, powtarzalnych, stereotypowych zachowań. Oprócz tych specyficznych cech powszechny jest szereg innych, niespecyficznych problemów, takich jak upośledzenie zdolności językowych oraz koordynacji ruchowej, napady złości i autoagresja, fobie czy zaburzenia snu oraz odżywiania [13].

Badania metabolomiczne z wykorzystaniem technik chromatograficznych są użytecznym i czułym narzędziem w identyfikacji specyficznych ścieżek biologicznych, badaniach wielu chorób w celu poprawy jej diagnostyki czy wprowadzenia nowych lub optymalizowanie standardowych strategii terapeutycznych. Ponadto podejścia te w połączeniu z jedno- i wieloczynnikową analizą statystyczną umożliwiają identyfikowanie różnic w zawartościach małowcząsteczkowych metabolitów zapewniając specyficzny i spersonalizowany profil biochemiczny badanych osób. Sprzężenie technik chromatograficznych ze spektrometrią mas oferuje identyfikację i oznaczenie niskich poziomów stężeń metabolitów w płynach ustrojowych oraz tkankach. Zapewnia także odpowiednią

selektywność i wysoką czułość analiz [14]. Badania metabolomiczne u dzieci autystycznych mają potencjał do odkrywania nie tylko nowych biomarkerów, ale są istotne w zrozumieniu mechanizmów choroby i wspierania bardziej zindywidualizowanego podejścia do terapii.

W Tabeli 1 zaprezentowane zostały potencjalne biomarkery autyzmu, które obecnie są oznaczane w płynach ustrojowych osób dotkniętych tym zaburzeniem z wykorzystaniem technik chromatograficznych.

Tabela 1. Potencjalne biomarkery autyzmu oznaczane w płynach ustrojowych osób badanych z wykorzystaniem technik chromatograficznych

Table 1. Potential biomarkers of autism spectrum disorder determined in body fluids of subjects using chromatographic techniques

L.p.	Metabolity	Matryca	Przygotowanie próbek do analizy	Stosowana technika chromatograficzna	Parametry walidacyjne/statystyczne	Lit.
1	<i>kwasy:</i> 2-oksoglutarynowy, cytrynowy, izocytrynowy, 4-hydroksybenzoesowy, 4-hydroksyfenylooctowy, hipurowy, adypinowy, suberynowy	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa octan etylu:eter dietylowy (1:1, w/v), derywatywacja: silylacja	GC-MS	$p < 0,05$	[15]
2	<i>kwasy:</i> α - i β -hydroksymasłowy, szczawiowy, bursztynowy, α -hydroksyglutarynowy, 4-hydroksyfenylooctowy, winowy, cytrynowy, treonowy, 3-hydroksybenzoesowy, propionowy, fosforowy, butanowy, sebacynowy; <i>aminokwasy:</i> homocysteina, tyrozyna, seryna, tryptofan; cukry: mannitol, arabinitol	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa MeOH, derywatywacja: metoksylacja, silylacja	GC-MS	$p < 0,05$ AUC ROC 0,775	[16]
3	retinol, 5-HT	surowica krwi	odbiałczanie i ekstrakcja rozpuszczalnikowa heksanem	HPLC	$p < 0,001$	[17]
4	metionina, fenyloalanina, walina, tryptofan, leucyna, izoleucyna	mocz	derywatywacja: EtOH, Na ₂ SO ₃ , aldehyd ftalowy, tetraboran sodu (Na ₂ B ₄ O ₇)	HPLC	R ² 0,9939– 0,9995 LOD 0,01– 0,04 µg/mL LOQ 0,05– 0,2 µg/mL Odzysk 86,6– 107,5% $p < 0,05$	[18]
5	tyrozyna, kreatyna, kwas 2-hydroksybutyrowy, kwas glutaminowy	mocz	odwirowanie, rozcieńczenie	NMR LC-MS	R ² 0,90 Q ² 0,77 AUC ROC 0,877	[19]

						$p < 0,05$	
6	7-metyloguanozyna, 1-metyloadenozyna, 1-metyloguanina, 7-metyloguanina, 3-metyloadenina	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa ACN	LC-MS/MS	$R^2 > 0,995$ CV 0,8-4,9% $p < 0,05$	[20]	
7	<i>kwasy:</i> 3-hydroksyzowalerianowy, HVA, adypinowy, suberynowy, indoloctowy	mocz	ekstrakcja rozpuszczalnikowa HCl i octan etylu, derywatywacja: silylacja	GC-MS	$p < 0,0001$	[21]	
8	<i>kwasy:</i> 3-metyloglutakonowy, 3-hydroksyzomasłowy, 3-hydroksyzowalerianowy, 4- hydroksyfenylopirogronowy, bursztynowy, 3-hydroksy-3- metylowalerianowy, akonitowy, octowy	mocz	hydroliza, ekstrakcja rozpuszczalnikowa octan etylu, derywatywacja: silylacja	GC-MS LC-MS/MS	$p < 0,05$	[22]	
9	<i>kwasy:</i> 9-(9Z-oktadecenoyloksy)- oktadekanowy, DL-2- hydroksystearynowy, 7(S),17(S)-dihydroksy- 8(E),10(Z),13(Z),15(E),19(Z)- dokożapentanowy	osocze	ekstrakcja rozpuszczalnikowa ACN:MeOH	LC-MS/MS	$R^2 0,945$ $Q^2 0,78$ $p < 0,005$	[23]	
10	1-metyloguanidyna, N α -acetylo-L-arginina, siarczan indoksyli, kwas 3-indoloctowy	mocz	odwirowanie, rozcieńczenie	LC-MS/MS	$R^2 > 0,999$ zakres liniowości: 20-48000 ng/ml LOQ 20-480 ng/ml LOD 1,9- 15,8 ng/ml	[24]	

GC-MS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas; p – wartość prawdopodobieństwa testowego; MeOH – alkohol metylowy; AUC ROC – pole pod wykresem krzywej ROC; 5-HT – 5-hydroksytryptamina; HPLC – wysokosprawną chromatografię cieczową; EtOH – alkohol etylowy; R^2 – współczynnik determinacji; Q^2 – współczynnik korelacji; LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego; LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas; LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas; CV – współczynnik zmienności; HVA – kwas homowanilinowy.

3. METABOLITY W CHOROBIE PARKINSONA

W 1817 roku James Parkinson opisał charakterystyczne objawy tej choroby, takie jak drżenie spoczynkowe, pochylona postawa ciała, a także sztywność i zwiększone napięcie mięśni oraz bradykinezja [25,26]. Choroba Parkinsona jest chorobą neurodegeneracyjną ośrodkowego układu nerwowego charakteryzującą się postępującą utratą neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej i wytwarzaniem ciałek Lewy'ego [27-29], a także agregacją α -synukleiny, która wywołuje neuroto-

toksyczność neuronów dopaminergicznych. Neurony dopaminergiczne są podatne na degenerację ze względu na rozległe rozgałęzienia i znaczną ilość energii potrzebną do przekazywania sygnałów nerwowych [30]. Ich utrata powoduje postępujące upośledzenie kontroli motorycznej, co jest podstawową cechą kliniczną tej choroby. Typowe objawy ruchowe pojawiają się w momencie, gdy degradacji ulegnie ponad 60% komórek dopaminergicznych [29]. Nie ma testu pozwalającego na wczesne rozpoznanie choroby, jeszcze przed pojawieniem się objawów [31]. Rozpoznanie stawia się najczęściej na podstawie obecności lub braku charakterystycznych objawów ruchowych. Ze względu na postępującą neurodegenerację u pacjentów z chorobą Parkinsona obserwuje się objawy niemotoryczne, takie jak zaburzenia czucia i snu, zmiany zachowania, otępienie, depresja, psychoza, lęk i zmęczenie [29]. Na Rysunku 3 schematycznie przedstawiono charakterystykę choroby Parkinsona.

Rozróżnia się idiopatyczną postać choroby Parkinsona oraz zespoły parkinsonowskie. Idiopatyczną formę choroby o nieznannej przyczynie obserwuje się u około 90% pacjentów. Charakteryzuje się ona spowolnieniem ruchowym, drżeniem spoczynkowym, sztywnością mięśni i zaburzeniami postawy. Rozpoznanie tej formy potwierdza dobra i długotrwała odpowiedź pacjenta na leczenie dopaminergiczne, jak również występowanie dyskinez płasawicznych w przebiegu leczenia preparatami L-dopy. Zespoły parkinsonowskie mogą wykazywać niektóre cechy kliniczne idiopatycznej formy choroby Parkinsona, w tym bradykinezę i sztywność. Charakteryzują się szybszą dynamiką narastania objawów, nieobecnością dyskinez i brakiem lub słabą odpowiedzią pacjenta na stosowane leczenie dopaminergiczne. Z tego względu dla tej formy choroby nie ma skutecznego leczenia. Obserwuje się nieprawidłowości w zakresie presynaptycznego białka α -synukleiny lub białka tau. Zespoły parkinsonowskie są spowodowane przez nieznanne procesy neurodegeneracyjne, uszkodzenia naczyniowe, czynniki genetyczne, toksyny, zaburzenia metaboliczne lub leki [32-34].



Rysunek 3. Charakterystyka choroby Parkinsona

Figure 3. Characteristics of Parkinson's disease

Do dziś etiologia choroby Parkinsona nie jest dobrze poznana. Do głównych mechanizmów patologicznych choroby zalicza się utratę neuronów dopaminergicznych, występowanie dysfunkcji mitochondriów, stres oksydacyjny związany z uszkodzeniem mechanizmów antyoksydacyjnych, jak również aktywacji mikrogleju i synukleinopatii, które przyczyniają się do śmierci komórek nerwowych [35]. Coraz częściej wskazuje się na różnego rodzaju interakcje pomiędzy wiekiem, czynnikami środowiskowymi i genetycznymi w rozwoju choroby [36]. Wymienia się również dysbiozę mikrobiomu jelitowego, która jest zaangażowana w rozwój choroby poprzez oś mikrobiom-jelita-mózg [36-39].

Odkrywanie nowych markerów diagnostycznych czy prognostycznych odbywa się dzięki zastosowaniu technik „omics”, głównie genomiki, metabolomiki, proteomiki i lipidomiki. Techniki te wykorzystywane są także do diagnozowania, wyjaśniania i dążenia do lepszego zrozumienia mechanizmów patofizjologicznych danej choroby czy zaburzenia [36]. Obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania wykorzystaniem technik metabolomicznych w badaniach nad chorobą Parkinsona. Badania te umożliwiają głębsze zrozumienie choroby poprzez szersze spojrzenie na indukowane przez nią zmiany biochemiczne zachodzące w organizmie. Ponadto umożliwiają diagnozę choroby we wczesnym jej stadium, przed wystąpieniem pierwszych, charakterystycznych objawów, a także mogą być pomocne w odkrywaniu potencjalnych markerów. Poszukiwanie nowych markerów biologicznych do wczesnego rozpoznania, ale także do przewidywania przebiegu choroby, oceny skuteczności leczenia możliwe jest dzięki wykorzystaniu technik separacyjnych stosowanych w badania metabolomicznych [29]. W Tabeli 2 zostały

zestawione najczęściej oznaczane wskaźniki diagnostyczne w chorobie Parkinsona z zastosowaniem technik chromatograficznych.

Tabela 2. Potencjalne biomarkery choroby Parkinsona oznaczane w płynach ustrojowych osób badanych z wykorzystaniem technik chromatograficznych

Table 2. Potential biomarkers of Parkinson's disease determined in body fluids of study subjects using chromatographic techniques

L.p.	Metabolity	Matryca	Przygotowanie próbek do analizy	Stosowana technika chromatograficzna	Parametry walidacyjne /statystyczne	Lit.
1	L-3-metoksytyrozyna, kwas akonitowy, L-metionina, 13-docosenamid, kwas hipurowy, kwas linolowy	osocze	ekstrakcja rozpuszczalników a ACN:ISO:H ₂ O (3:3:2, v/v/v), derywatywacja: metoksylacja, silylacja	GC-TOFMS	p < 0,05 AUC 0,975	[40]
2	O-metyloguanozyna, N6-metylo-2'-deoksyadenozyna, 1-metyloguanozyna, 1-metyloguanina, 7-metyloguanina, 3-metyloguanina, 7-metyloguanozyna	mocz	ekstrakcja rozpuszczalników a ACN	LC-MS/MS	p < 0,05 R ² > 0,995 LLOQ 0,5 – 100 ng/ml CV 0,2 – 4,3%	[41]
3	kwas 3, 4 – dihydroksyfenylooctowy, HVA	tkanki mózgu	jednoczesna ekstrakcja i derywatywacja: ACN, chlorek sulfonowy rodaminy B, bromobenzen	LC-MS/MS	kwas 3, 4 – dihydroksyfenylooctowy LOD 0,003 nmol/l LOQ 0,010 nmol/l CV 4,7 – 7,7% HVA LOD 0,004 nmol/l LOQ 0,015 nmol/l CV 4,0 – 7,5%	[42]
4	kwas kynureninowy, 5-HIAA, kwas glutaminowy, kwas γ-aminobutanowy	surowica krwi	odbiałczanie i ekstrakcja rozpuszczalnikowa TFA	LC-MS/MS	LOD 2,64 nmol/l LOQ 5,29 nmol/l	[43]
5	LPA, hipoksantyna, kwas ferulowy	surowica krwi	ekstrakcja rozpuszczalnikowa ACN, H ₂ O/ACN (1:1, v/v)	LC-ESI-QTOF	R ² 0,73 Q ² 0,54 p < 0,05	[44]
6	L-ornityna, N-acetylo-putrescyna, N-acetylo-kadaweryna	płyn mózgowo-rdzeniowy	odbiałczanie MeOH	LC-MS/MS	AUC ROC 0,897	[45]
7	kwas octowy, kwas propionowy, kwas 2,3,4-trihydroksybutanowy	osocze	ekstrakcja rozpuszczalnikowa MeOH, derywatywacja: metoksylacja, silylacja	GC-MS	AUC ROC 0,981 p < 0,001	[46]

8	kwasy dekanowy (FFA 10:0), kwasy laurynowy (FFA 12:0), kwasy 3-indolooctowy, fenyloacetylo-L-glutamina	osocze	odbiałczanie MeOH/H ₂ O (1:3, v/v)	LC-MS	R ² 0,758 Q ² 0,594 AUC ROC 0,981 p < 0,001	[47]
9	kwasy palmitynowy, kwasy oleinowy, kwasy stearynowy, mioinozytol, sorbitol, kwasy chinolinowy	osocze	odbiałczanie MeOH/EtOH (1:1, v/v)	LC-MS/MS	AUC ROC > 0,7 p < 0,05	[48]
10	kwasy 3-indolooctowy	mocz	odbiałczanie MeOH, zateżnienie	LC-MS/MS	zakres pomiarowy 150-200 ng/ml R ² 0,991 p < 0,05 LOD 1,0 ng/ml LOQ 5,0 ng/ml	[49]

ACN – acetonitryl; ISO – alkohol izopropylowy; GC-TOFMS – chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas i analizatorem czasu przelotu; LC-MS/MS – chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas; p – wartość prawdopodobieństwa testowego; R² – współczynnik determinacji; LLOQ – dolna granica oznaczalności; CV – współczynnik zmienności; HVA – kwas homowanilinowy; LOD – granica wykrywalności; LOQ – granica oznaczalności; 5-HIAA – kwas 5-hydroksyindolooctowy; TFA – kwas trifluorooctowy; LPA – kwas lizofosfatydowy; LC-ESI-QTOF – chromatograf cieczowy sprzężony z analizatorem typu kwadrupol – analizator czasu przelotu z jonizacją przez elektrorozpraszanie; Q² – współczynnik korelacji; MeOH – alkohol metylowy; AUC ROC – pole pod wykresem krzywej ROC.

UWAGI KOŃCOWE

Analiza metabolitów staje się kluczowym narzędziem w naukach przyrodniczych i medycznych, umożliwiającym zrozumienie nie tylko metabolizmu, ale także poznanie wpływu metabolitów na zdrowie oraz powiązanie ich z różnymi chorobami. Wśród nich niewątpliwie znajdują się choroby i zaburzenia neurologiczne, takie jak choroba Parkinsona czy autyzm. Na całym świecie trwają nieustanne badania koncentrujące się na wyjaśnieniu nieprawidłowości zachodzących w ludzkim organizmie, które mogą być pośrednią, bądź bezpośrednią przyczyną rozwoju zaburzeń i chorób. Działania te prowadzą w kierunku typowania nowych markerów oraz rozwijania nowoczesnych procedur analitycznych, które pozwalają na ich skuteczną identyfikację oraz ilościowe oznaczenie. Poszukiwanie nowych wskaźników diagnostycznych staje się możliwe dzięki zastosowaniu technik chromatograficznych, które stanowią potężne narzędzie w badaniach nad chorobami neurocywilizacyjnymi, umożliwiając identyfikację biomarkerów, analizę neuroprzekazników oraz badania nad skutecznością stosowanych terapii. Ich zastosowanie przyczynia się do lepszego zrozumienia patogenezy tych chorób oraz do opracowywania nowych strategii diagnostycznych i terapeutycznych.

PODZIĘKOWANIE

Współautorka dr inż. Paulina Gałarek składa podziękowania Komitetowi Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk oraz Firmie Altium International Sp. z o.o. za przyznanie nagrody w konkursie za najlepszą pracę doktorską z zakresu chemii analitycznej w kategorii najlepsza praca doktorska związana z rozwojem technik rozdzielania (edycja 2023).

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A.K. Kosmides, K. Kamisoglu, S.E. Calvano, S.A. Corbett, I.P. Androulakis, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 2013, **41(3)**, 205.
- [2] Q. Liang, C. Wang, B. Li, A-H. Zhang, *Pharmacogn. Mag.*, 2015, **11(43)**, 586.
- [3] E.J. Want, I.D. Wilson, H. Gika, G. Theodoridis, R.S. Plumb, J. Shockcor, E. Holmes, J.K. Nicholson, *Nat. Protoc.*, 2010, **5(6)**, 1005.
- [4] P. Emond, S. Mavel, N. Aïdoud, L. Nadal-Desbarats, F. Montigny, F. Bonnet-Brilhault, C. Barthélémy, M. Merten, P. Sarda, F. Laumonnier, P. Vourc'h, H. Blasco, C.R. Andres, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 5291.
- [5] B. Dieme, S. Mavel, H. Blasco, G. Tripi, F. Bonnet-Brilhault, J. Malvy, C. Bocca, C.R. Andres, L. Nadal-Desbarats, P. Emond, *J. Proteome Res.*, 2015, **14(12)**, 5273.
- [6] T. Bitar, S. Mavel, P. Emond, L. Nadal-Desbarats, A. Lefèvre, H. Mattar, M. Soufia, H. Blasco, P. Vourc'h, W. Hleihel, C.R. Andres, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2018, **152**, 57.
- [7] J. Kałużna-Czaplińska, J. Józwik, *Med. Rodz.*, 2013, **2**, 63.
- [8] J.M. Holler, S.P. Vorce, J.L. Knittel, B. Malik-Wolf, B. Levine, T.Z. Bosy, *J. Anal. Toxicol.*, 2014, **38**, 295.
- [9] Y. Tikunov, A. Lommen, C.H.R. de Vos, H.A. Verhoeven, R.J. Bino, R.D. Hall, A.G. Bovy, *Plant Physiol.*, 2005, **139**, 1125e1137.
- [10] H. Kaspar, K. Dettmer, W. Gronwald, P.J. Oefner, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **870**, 222.
- [11] M.M. Acanski, D.N. Vujčić, *Food Chem.*, 2014, **145**, 743.
- [12] H.G. Gika, I.D. Wilson, G.A. Theodoridis, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, **966**, 1-6.
- [13] International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10. World Health Organization, 2009.
- [14] F. Gevi, A. Belardo, L. Zolla, *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.*, 2020, **1866(10)**, 165859.
- [15] J. Kałużna-Czaplińska, *Clin Biochem.*, 2011, **44(8-9)**, 686.
- [16] J. Kałużna-Czaplińska, E. Żurawicz, W. Struck, M. Markuszewski, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2014, **966**, 70.
- [17] M. Guo, J. Zhu, T. Yang, X. Lai, X. Liu, J. Liu, J. Chen, T. Li, *Brain Res Bull.*, 2018, **137**, 35.
- [18] C. Li, K. Shen, L. Chu, P. Liu, Y. Song, X. Kang, *J Clin Neurosci.*, 2018, **54**, 45.
- [19] T. Bitar, S. Mavel, P. Emond, L. Nadal-Desbarats, A. Lefèvre, H. Mattar, M. Soufia, H. Blasco, P. Vourc'h, W. Hleihel, C.R. Andres, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, **152**, 57.
- [20] B. Bobrowska-Korczak, P. Gałarek, A. Rosiak, J. Giebułtowicz, J. Kałużna-Czaplińska, *Anal. Biochem.*, 2019, **571**, 62.
- [21] Z.U.N. Khan, P. Chand, H. Majid, S. Ahmed, A.H. Khan, A. Jamil, S. Ejaz, A. Wasim, K.A. Khan, L. Jafri, *BMC Neurol.*, 2022, **22(1)**, 101.

- [22] E. Sertoglu, A.R. Balik, U.G. Duman, M.E. Mavis, M. Arslan, Y. Yildiz, J. Batu, A. Olgac, Ö. Hekim, *Res. Autism Spectr. Disord.*, 2023, **106**, 102198.
- [23] J. Liu, Y. Tan, F. Zhang, Y. Wang, S. Chen, N. Zhang, W. Dai, L. Zhou, J-C. Li, *MedComm.*, 2020, **5(3)**, e488.
- [24] D. Olesova, J. Galba, J. Piestansky, H. Celusakova, G. Repiska, K. Babinska, D. Ostatnikova, S. Katina, A. Kovac, *Metabolites.*, 2020, **10(11)**, 443.
- [25] J. Parkinson, *Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, 2002, **14**, 223.
- [26] B. Hurwitz, *Int. Rev. Neurobiol.*, 2017, **133**, 3.
- [27] X. Chen, C. Xie, L. Sun, J. Ding, H. Cai, *PLoS ONE.*, 2015, **10(8)**, e0136612.
- [28] P. Gątarek, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, A. Głąbiński, J. Kałużna-Czaplińska, *Trends Anal. Chem.*, 2019, **118**, 292.
- [29] C. Gonzalez-Riano, J. Saiz, C. Barbas, A. Bergareche, J.M. Huerta, E. Ardanaz, M. Konjevod, E. Mondragon, M.E. Erro, M.D. Chirlaque, E. Abilleira, F. Goñi-Irigoyen, P. Amiano, *NPJ Park. Dis.*, 2021, **7**, 73.
- [30] M. Mamelak, *Neurol.*, 2018, **7**, 5.
- [31] P. Maher, *Food Funct.*, 2017, **8**, 3033.
- [32] D.W. Dickson, *Cold. Spring. Harb. Perspect. Med.*, 2012, **2**, a009258.
- [33] P. Srivanitchapoom, Y. Pitakpatapee, A. Suengtaworn, *Neurol. India.*, 2018, **66(7)**, 15.
- [34] L. Marsili, G. Rizzo, C. Colosimo, *Front Neurol.* 2018, **9**, 156.
- [35] M. Lemieszewska, A. Zabłocka, J. Rymaszewska, *Postepy Hig. Med. Dosw.*, 2019, **73**, 256.
- [36] X. Li, X. Fan, H. Yang, Y. Liu, *Mol. Neurobiol.*, 2022, **59(2)**, 1041.
- [37] F. Zhu, C. Li, J. Gong, W. Zhu, L. Gu, N. Li, *Dig. Liver Dis.*, 2019, **51(1)**, 38.
- [38] M. Elfil, S. Kamel, M. Kandil, B.B. Koo, S.M. Schaefer, *Mov. Disord.*, 2020, **35(6)**, 921.
- [39] V. Metta, V. Leta, K.R. Mrudula, L.K. Prashanth, V. Goyal, R. Borgohain, G. Chung-Faye, K.R. Chaudhuri, *Neurol.*, 2022, **269(3)**, 1154.
- [40] P. Gątarek, J. Sekulska-Nalewajko, B. Bobrowska-Korcza, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, A. Głąbiński, J. Kałużna-Czaplińska, *Biomedicines.*, 2022, **10(12)**, 3005.
- [41] P. Gątarek, J. Kałużna-Czaplińska, M. Pawełczyk, K. Jastrzębski, J. Giebułtowicz, A. Głąbiński, B. Bobrowska-Korcza, *Molecules.*, 2020, **25(21)**, 4959.
- [42] Y. He, X-E Zhao, S. Zhu, N. Wei, J. Sun, Y. Zhou, S. Liu, Z. Liu, G. Chen, Y. Suo, J. You, *J Chromatogr A.*, 2016, **1458**, 70.
- [43] L.S. Wang, M-D Zhang, X. Tao, Y-F Zhou, X-M Liu, R-L Pan, Y-H Liao, Q. Chang, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2019, **1112**, 24.
- [44] W.T. Santos, A. Katchborian-Neto, G.S. Viana, M.S. Ferreira, L.C. Martins, T.C. Vale, M. Murgu, D.F. Dias, M.G. Soares, D.A. Chagas-Paula, A.C.C. Paula, *ACS Chem. Neurosci.*, 2024, **15(17)**, 3168.
- [45] P.A. LeWitt, J. Li, K-H Wu, M. Lu, *Neurobiol. Dis.*, 2023, **177**, 105962.
- [46] A. Qi, L. Liu, J. Zhang, S. Chen, S. Xu, Y. Chen, L. Zhang, C. Cai, *Mol Neurobiol.*, 2023, **60(5)**, 2619.
- [47] Y. Shao, T. Li, Z. Liu, X. Wang, X. Xu, S. Li, G. Xu, W. Le, *Mol Neurodegener.*, 2021, **16(1)**, 4.
- [48] M. Konjevod, J. Sáiz, C. Barbas, A. Bergareche, E. Ardanaz, J.M. Huerta, A. Vinagre-Aragón, M.E. Erro, M.D. Chirlaque, E. Abilleira, J.M. Ibarluzea, P. Amiano, *Front Neurol.*, 2022, **13**, 844841.
- [49] S.H. Chung, D. Yoo, T-B Ahn, W. Lee, J. Hong, *Pharmaceuticals (Basel).*, 2023, **16(10)**, 1495.

