



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Evaluierung von Tränen-Analysen für metabolische Studien“

verfasst von / submitted by

Azra Smajis, BSc

Angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree
of

Master of Science (MSc)

Wien, 2022/ Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof.Dr. Christopher Gerner

Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt meinem Betreuer Univ.-Prof. Mag. Dr. Christopher Gerner, der mir ermöglichte mein Masterpraktikum am Institut für Analytische Chemie zu absolvieren.

Insbesondere möchte ich mich bei Julia Brunmair, PhD bedanken, die mir bei meinem Masterpraktikum sehr geholfen hat.

Zu guter Letzt gilt mein Dank auch den Mitarbeitern des Instituts für Analytische Chemie, die mir beim praktischen Arbeiten im Labor eine große Hilfe waren.

Inhalt

Danksagung.....	3
Inhalt.....	4
Tabellenverzeichnis.....	6
Abbildungsverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1. Vorwort.....	9
2. Theoretischer Hintergrund.....	11
2.1. Omics.....	11
2.1.1. Metabolomik.....	12
2.1.2. Lipidomik.....	15
2.1.3. Eikosanoide.....	16
2.2. Der menschliche Tränenfilm.....	18
2.2.1. Tränenproduktion.....	19
2.3. Diabetes Melitus.....	20
2.3.1. Korrelation der DM mit DED.....	22
2.4. Analytische Techniken.....	23
2.4.1. Flüssigkeitschromatographie (LC).....	24
2.4.1.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	24
2.4.2. Massenspektrometrie.....	26
2.4.2.1. Elektrosprayionisation (ESI).....	27
2.4.2.2. Q Exactive HF.....	28
2.4.3. CompoundDiscoverer™.....	32
2.4.4. Skyline.....	32
2.4.5. Perseus.....	32
3. Materialien und Methoden.....	33
3.1. Materialien.....	33
3.1.1. Material.....	33
3.1.2. Reagenzien.....	33
3.1.3. Standards.....	34
3.1.4. Instrumenten.....	34
3.1.5. Software.....	34
3.2. Methoden.....	35
3.2.1. Klinische Studien.....	35
3.2.2. Schirmer Test.....	38
3.2.3. Probenvorbereitung.....	39
3.2.3.1. Interne Standards.....	39
3.2.3.1.1. Metabolit-Interne Standards.....	39
3.2.3.1.2. Eikosanoid-Interne Standards.....	40
3.3. UHPLC-MS.....	40

3.4.	Datenerfassung und -interpretation.....	43
4.	Ergebnisse und Diskussion	44
4.1.	Eikosanoide	44
4.2.	Metabolite.....	48
4.2.1.	Medikamente	56
4.2.2.	Aminosäuren und andere endogene Moleküle	61
4.2.3.	Taurin und Nicotinsäure.....	64
4.3.	Limitierungen dieser Masterarbeit.....	65
4.4.	Conclusion + Outlook.....	65
	Abstract.....	67
	Zusammenfassung.....	68
	Bibliographie.....	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Interne Standards für Metaboliten und Lipiden (82).....	34
Tabelle 2: Überblick über zwei verschiedene Studien während dieser Masterarbeit	36
Tabelle 3: Liste der T2DM-Patienten, Status und Medikation (82)	37
Tabelle 4: Endkonzentrationen der internen Standards von „EicosanoidPreMix“ (82).....	40
Tabelle 5: LC-Systemeinstellungen (82).....	41
Tabelle 6: MS-Systemeinstellungen (82)	42
Tabelle 7: Nachgewiesene Eikosanoide in Tränenflüssigkeit (82).....	45
Tabelle 8: Nachgewiesene Metaboliten in Tränenflüssigkeit (82)	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: "Omics" Kaskade im biologischen System (7) (11).....	11
Abbildung 2: Metabolomik-Workflow (21)	14
Abbildung 3: Die Struktur des menschlichen Tränenfilms (41)	19
Abbildung 4: UHPLC-System bestehend aus Lösungsmittelreservoir, Pumpensystem, Probeninjektor, UPLC-Säule, Detektor und Computer (58)	26
Abbildung 5: Schematische Darstellung von ESI (65).....	28
Abbildung 6: Aufbau von Q Exactive HF (76).....	29
Abbildung 7: Detaillierter Aufbau von Q Exactive HF. Diese Anlage basiert auf der Q Exactive Serie und besteht aus einem Advanced Active Beam Guide (AABG), das aus einem Injektions-Flatapol (A), gebogenen Flatapol (B) aufgebaut ist, und einem segmentierten Quadrupol (C) (74).	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines linearen Quadrupol-Massenanalysators (59).....	30
Abbildung 9: Schirmer-Test (84).....	38
Abbildung 10: Hauptkomponentenanalyse von Eikosanoide	47
Abbildung 11: Vulkan-Diagramm der Eikosanoide.....	47
Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse von Metaboliten	54
Abbildung 13: Loading-Plot.....	54
Abbildung 14: Kastengrafiken für Sorbitol (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Für Sorbitol wurde ein Mann-Whitney Test gemacht. **** = p-Wert < 0.0001.	55
Abbildung 15: Volcano Plot – Metabolite.....	56
Abbildung 16: Kastengrafiken für Metformin (n = 14 für Diabetes) und Oxybuprocain (n = 16 für Diabetes und n = 49 für Gesund). Für Metformin wurde ein Wilcoxon-Rangtest mit Vorzeichen bei einer Stichprobe durchgeführt, während für Oxybuprocain Mann-Whitney Test gemacht wurde. ** = p-Wert < 0.01 und * p-Wert < 0.05.....	57
Abbildung 17: Referenzspektren aus mzClod (unten) und gemessenen Spektren (oben) für die eingenommene Medikation (Metformin, Gabapentin und Bisoprolol).....	58
Abbildung 18: Referenzspektren aus mzCloud (unten) und gemessenen Spektren (oben) für die eingenommene Diabetes-Medikation (Vidagliptin, Sitagliptin und Pioglitazone).....	59
Abbildung 19: Kastengrafiken für Tropicamid (n = 16 für Diabetes). Für Tropicamid wurde ein Wilcoxon-Rangtest mit Vorzeichen bei einer Stichprobe durchgeführt. *** = p-Wert < 0.001.	60
Abbildung 20: Kastengrafiken für Carnitin, Ornithin, Citrulin und Harnsäure (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. **** = p-Wert < 0.0001 und * p-Wert < 0.05.	61
Abbildung 21: Kastengrafiken von essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Für alle aufgeführten Aminosäuren wurde Mann-Whitney Test durchgeführt. **** = p-Wert < 0.0001, *** = p-Wert < 0.001, ** = p-Wert < 0.01 und * p-Wert < 0.05.....	63
Abbildung 22: Kastengrafiken für Nicotinsäure und Taurin (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Sowohl für Nicotinsäure, als auch für Taurin wurde Mann-Whitney Test durchgeführt. **** = p-Wert < 0.0001 und ** = p-Wert < 0.01.....	64

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen	
AA	Arachidonsäure
AABG	Advanced Active Beam Guide
ACN	Acetonitril
AGE	Fortschrittliche Glykationsendprodukt
AKH	Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien
ANOVA	Varianzanalyse
API	Atmosphärendruck-Ionenquelle
AZM	Azithromycin
AQT	Advanced Quadrupole Technology
CE	Kapillarelektrophorese
CF-D9	Caffeine-trimethyl-D9
cPLA2	Zytosolische Calcium-abhängige PLA2
CRM	Geladenen-Rückstandsmodell
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450
DC	Gleichspannung
DDA	Datenunabhängige Aquisition
DED	Syndrom des trocknen Auges
DGLA	Dihomo- γ -Linolensäure
DM	Diabetes Mellitus
DME	Diabetisches Makulaödem
DPA	Docosapentaensäure
EET	Epoxy-Eicosatriensäure
EPA	Eicosapentaensäure
ESI	Elektrosprayionisation
FA	Ameisensäure
FAAH	Fettsäureamidhydrolase
GC	Gaschromatographie
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin
HCD-Zelle	Higher Energy Collisional Dissociation Zelle
HETE	Hydroxy-Eicosatriensäure
HIC	Hydrophobe-Interaktionschromatographie
HILIC	Hydrophyle-Interaktionschromatographie
HMDB	Human Metabolome Datenbank
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEM	Ionenverdampfungsmodell
iPLA2	Zytosolische Calcium-unabhängige PLA2
LC	Flüssigkeitschromatographie
LFU	Tränenfunktionseinheit
LOX	Lipoxygenase
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung Verhältnis
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPC	Normalphasen-Chromatographie
OAD	Orale Antidiabetika
PCA	Hauptkomponentenanalyse
PG	Prostaglandine
PI	Phosphatidylinositol
PLA2	Phospholipase A2

PLS-DA	Partielle Kleinste-Quadrate-Diskriminanzanalyse
PG	Prostaglandine
PPPM	Prädiktive, präventive und personalisierte Medizin
PUFA	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RF	Radiofrequenz
RNS	Reaktive-Stickstoffspezies
ROS	Freie-Radikale
RPC	Umkehrphasen-Chromatographie
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
sPLA2	Sezernierte PLA2
TFL	Lipidschicht des Tränenfilms
TXA2	Thromboxan A2
T1DM	Typ-I-Diabetes Mellitus
T2DM	Typ-II-Diabetes Mellitus
UHPLC	Ultra-HPLC
5-HETE	5-Hydroxyeicosatetraensäure
5-HPETE	5-Hydroperoxyeicosatetraensäure
5-Oxo-EETE	5-Oxo-Eicosatetraensäure

1. Vorwort

Die Metabolomik spielt in klinischen Studien eine wichtige Rolle. Das Ziel der Metabolomik-Forschung ist unter anderem das Verständnis verschiedener Krankheitszustände, die Entdeckung neuer Biomarker sowie Überwachung der Therapieeffekten (1). Das Blut, das Plasma und der Urin gehören zu den am häufigsten verwendeten Bioflüssigkeiten für die Stoffwechselanalyse. Das Blut zirkuliert ständig im Körper und kommt daher mit allen Geweben und Organen des Körpers in Kontakt. Obwohl das Blut eine der repräsentativsten Bioflüssigkeiten ist, gehört die Blutanalyse aufgrund der Venenpunktion zu den invasiven Techniken (2). Infolgedessen zögern viele Menschen an biomedizinischen Studien teilzunehmen und daher besteht ein wachsender Bedarf an nicht-invasiven Techniken, die ethisch angemessen und kosteneffizient sind (2). Die Urinalysen werden häufig zum Screening eingesetzt, haben aber den Nachteil, dass sie nicht die erforderlichen quantitativen Informationen für klinische Studien liefern (2). Die Hauptnachteile der Urinalysen sind Schwankungen in der Urinproduktion, Verdünnungseffekte sowie Schwankungen im Probenvolumen (3). Das Urinvolumen kann je nach Flüssigkeitszufuhr und körperlicher Aktivität zwischen 600 und 2500 mL/Tag variieren (4). Diese Schwankungen können zu einer ungleichmäßigen Verdünnung der Metabolitenkonzentrationen führen (4). Um diese Variationen ausgleichen zu können, wird üblicherweise eine Normalisierung der Rohdaten mit der Kreatinin durchgeführt (4). In Abwesenheit der Nierenerkrankungen ist die Menge an ausgeschiedenem Kreatin konstant (4). Die täglich ausgeschiedene Kreatinmenge beträgt bei gesunden Menschen 1g pro 20 kg Muskelmasse (4). Da die Kreatinmenge unabhängig von der ausgeschiedenen Urinmenge ist, ist Kreatin der beste interne Standard für die Korrektur dieser Schwankungen (4). Jedoch können bestimmte Faktoren wie körperliche Aktivität, Nahrungsaufnahme, Alter und Geschlecht den Kreatinspiegel beeinflussen (4). Unkonventionelle nichtinvasive Biomatrizen umfassen Muttermilch, Haare, Schweiß, Speichel, Mekonium und Tränen (2). Tränen, Muttermilch, Speichel und Schweiß werden heutzutage zunehmend als möglicher Ersatz für Blut- oder Plasmaanalysen untersucht (2). Obwohl diese Biomatrizen viele Vorteile haben, besitzen sie auch gewisse Einschränkungen, da nur geringe Probenmengen gesammelt werden können und gleichzeitig die meisten Analyten in geringen Konzentrationen vorliegen.

Mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) in Kombination mit Flüssigkeits-(LC) oder Gaschromatographie (GC) ist es möglich, selbst kleinste Mengen an Metaboliten in einer bestimmten Bioflüssigkeit nachzuweisen. In dieser Masterarbeit wurde eine Evaluierung der Tränen-Analysen für metabolische Studien mittels LC-MS durchgeführt. Die Probeentnahme erfolgte mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Schirmer-Streifen. Diese Art der Probenentnahme erwies sich bisher als gängigste Methode zur Gewinnung menschlicher Tränenflüssigkeit, da sie einfache, schnelle, genaue und präzise Technik darstellt (5). Das Ziel dieser Masterarbeit war den möglichen Einsatz von Tränenflüssigkeit für Screening-Methode zu ermitteln und den möglichen Einsatz in der prädiktiven, präventiven und personalisierten Medizin zu etablieren.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Omics

Omics-Technologien liefern eine Vielzahl von Erkenntnissen über Risikofaktoren im Erbgut und können eine wichtige Rolle bei der Modellierung verschiedener Krankheiten spielen (6). Die „Omics“ Kaskade beginnt mit dem Genom, setzt sich mit dem Transkriptom und Proteom fort und endet mit dem Metabolom (siehe Abbildung 1) (7). Das Metabolom zeigt sowohl qualitative, als auch quantitative Informationen über allen Metaboliten in einem biologischen System. Zusätzlich definiert das Metabolom den Phänotyp, der auf den tatsächlichen Zustand des Organismus basiert ist. Metabolomik kann daher zur Entdeckung von Biomarkern für Prognose, Diagnose und Therapie dienen und dabei helfen, pathologische Erkrankungen besser zu verstehen (7). Das Lipidom gehört zur Untergruppe des Metaboloms, aber seine analytischen Ansätze unterscheiden sich von den Methoden, die im Metabolom eingesetzt werden (7). Diese Omics-Disziplinen werden in vielen Forschungsbereichen eingesetzt, wie Toxikologie (8), Ernährung (9), als auch Medizin (10).

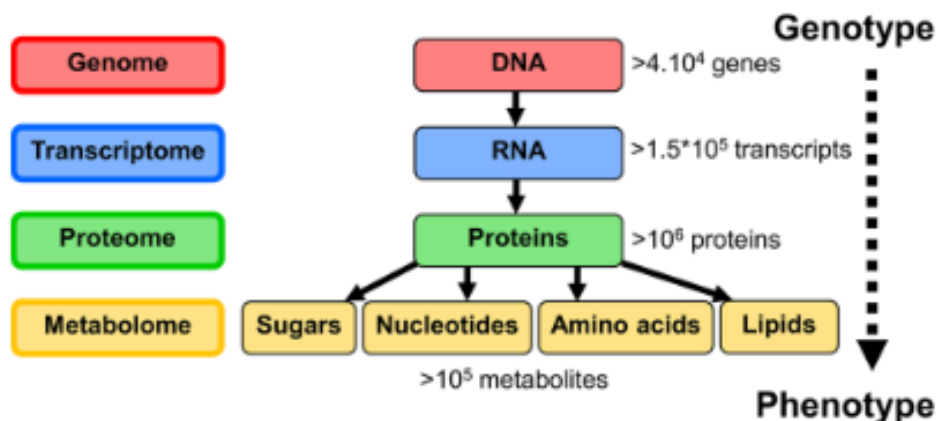


Abbildung 1: "Omics" Kaskade im biologischen System (7) (11)

2.1.1. Metabolomik

Metabolomik stellt eine Forschungsdisziplin dar, die sich mit der Erforschung von Metaboliten in einer bestimmten biologischen Probe (Gewebe, Biofluid) beschäftigt (12)(13). Das Metabolom ist eine Bezeichnung für die ganze Metaboliten-Summe innerhalb einer biologischen Probe (14). Metaboliten sind per Definition "niedermolekulare (<1500 Dalton) chemische Substrate, Zwischenprodukte oder Endprodukte enzymvermittelter Reaktionen" (12). Zahlreiche Analysen der Metaboliten können an vielen menschlichen und tierischen Organismen sowie an biologischen Proben wie Plasma und Blutserum, Bioflüssigkeiten, Zell- und Gewebeextrakten, Pflanzengeweben, Hefe und Bakterien sowie in-vitro-Studien durchgeführt werden (15). Metaboliten unterscheiden sich in physikalischen und chemischen Eigenschaften und diese Unterschiede spiegeln sich in unterschiedlichen funktionellen Gruppen, Stereochemie, Molekulargewichten, Polaritäten, chemischer Stabilitäten sowie ihrer Reaktivität wieder (15). Zu den Metaboliten zählen hydrophile polare Moleküle (z.B. Aminosäuren, organische Säuren, Kohlenhydrate und phosphorylierte Verbindungen), sowie hydrophobe nicht-polare Moleküle (z.B. Membranlipide und Fettsäuren) (16). Der menschliche Metabolom besteht aus 8500 endogenen und 40.000 exogenen Metaboliten (17). Die endogene Stoffwechselprodukte umfassen Produkte, die vom Körper selbst synthetisiert werden und dazu zählen Aminosäuren, Nukleinsäuren, organische Säuren, Fettsäuren, Zucker, Vitamine, Amine, Pigmente und Co-Faktoren (15). Zu den exogenen Produkten, die durch äußere Einwirkungen auf den Organismus entstehen, gehören Lebensmittelzusatzstoffe, Toxine, Arzneimittel und Umweltschadstoffe (15). Aufgrund ihrer chemischen Divergenz gibt es keine einzelne Analysemethode, mit der alle verschiedenen Metaboliten gleichzeitig gemessen werden können (15). Es existieren zwei unterschiedliche Ansätze "Targeted" und "Non-Targeted Metabolomics" (18). "Targeted Metabolomics" basiert auf der Erforschung bestimmter Metabolite, die man durch a priori Wissen selektiert hat (18). Im Gegensatz dazu ist das Ziel des "Non-Targeted-Metabolomics", möglichst viele Metabolite in einem bestimmten Biofluid zu detektieren ohne vorheriges Wissen, um so neue Biomarker zu entdecken. Der Biomarker ist definiert als eine Substanz oder ein Prozess, der im Körper gemessen werden kann und als Indikator für normale biologische oder pathologische Prozesse dienen kann (19)(20). Die Biomarkern besitzen prädiktive und diagnostische Aussagekraft und können zur Modellierung verschiedener Krankheitszustände eingesetzt werden (20).

Die Metabolitenidentifizierung erfolgt unter der Verwendung von verschiedenen Softwaretools, die aufgenommene Spektren mit Referenzspektren einer spektralen Datenbank verglichen (18).

Obwohl "Targeted-Metabolomics" eine viel höhere Sensitivität und Spezifität bieten kann, weist "Non-Targeted-Metabolomics" eine größere Metabolitenabdeckung auf (21). Bei der Entdeckung neuer Biomarker in klinischen Studien ist die Anwendung von "Non-Targeted-Metabolomics" von großer Bedeutung (18). Ein "Non-Targeted" Metabolomik/Lipidomik-Workflow besteht aus mehreren Schritten: Probensammlung, Lagerung, Vorbereitung, Analyse und Datenauswertung (siehe Abbildung 2) (21). Der Zeitpunkt der Probenentnahme sowie die verwendeten Materialien, Reagenzien und Lagertemperatur haben eine wichtige Rolle bei der Gewinnung genauer und reproduzierbarer Ergebnisse (21). Die Probenvorbereitung unterscheidet sich je nach Art des Extraktionsmoleküls sowie der verwendeten Analysemethoden. Die Wahl der Probenvorbereitungsmethode ist sehr wichtig, da sie sowohl das beobachtete Metabolitenprofil, als auch die Qualität der Daten beeinflusst (22). Die ideale Probenvorbereitungsmethode für die "Non-Targeted"-LC-MS-Analyse sollte unselektiv, reproduzierbar und schnell sein, die soll mit einer minimalen Anzahl von Schritten erfolgen und einen integrierten Quenching-Schritt beinhalten (22). Um einen potentiellen Verlust von Metaboliten zu verhindern, sollten biologische Proben in "Non-Targeted"-Metabolomstudien mit minimaler Vorbehandlung analysiert werden (23). Viele Metabolite sind instabil aufgrund von zum Beispiel Autooxidation und enzymatischer Degradation, daher müssen die Proben unmittelbar gequenched werden (i.e. das Stoppen von jeglicher enzymatischer Aktivität) und bei niedrigen Temperaturen gelagert werden (22)(23). Das am häufigsten zum Quenchen eingesetzte Protokoll ist das Schnellgefrieren in flüssigem Stickstoff (23). Die Gefriertemperatur hängt von der analysierten biologischen Probe und der Lagerzeit ab. Die Blutproben können bis zu einer Woche bei einer Temperatur von 20°C gelagert werden, während Urinproben bei dieser Temperatur bis zu 6 Monate gelagert werden können (23). Über einen längeren Zeitraum (bis zu 5 Jahren) werden Blut- und Urinproben bei einer Temperatur von -80°C gelagert (23). Um die Metabolomabdeckung erhöhen zu können, werden Metaboliten im Gegensatz zu Genomik und Proteomik mit einer Vielzahl von Analysetechnologien untersucht (15). Am häufigsten verwendeten Methoden zur Identifizierung und Quantifizierung von Metaboliten sind Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie und Massenspektrometrie (MS), wobei die MS häufig mit chromatographischen Techniken, wie Flüssigkeits-(LC-MS) und Gaschromatographie (GC-MS) gekoppelt wird (15).

Die daraus erhaltenen Daten werden verarbeitet, um die analysierten Verbindungen identifizieren zu können. Danach werden mehrere statistische Test durchgeführt, um die Unterschiede zwischen den Proben, sowie den analysierenden Gruppen zu ermitteln (21). Zu den statistischen Methoden zählen univariate und multivariate Analysen. ANOVA (Varianzanalyse) und t-Test gehören zu unvariaten Analysemethoden, die häufig verwendet werden. Die multivariate Analysemethoden umfassen Hauptkomponentenanalyse (PCA) und partielle Kleinste-Quadrate-Diskriminanzanalyse (PLS-DA) (24). Schließlich werden die Daten mit Hilfe von Visualisierungstools in einen biologischen Kontext gestellt. Mit den gewonnenen Daten wird versucht, die Antworten auf die Forschungsfragen zu erhalten und neue Leitlinien für die zukünftige Forschungen zu setzen. Dabei werden verschiedene Softwaretools und Datenbanken verwendet, wie LIPID MAPS (25)(26).

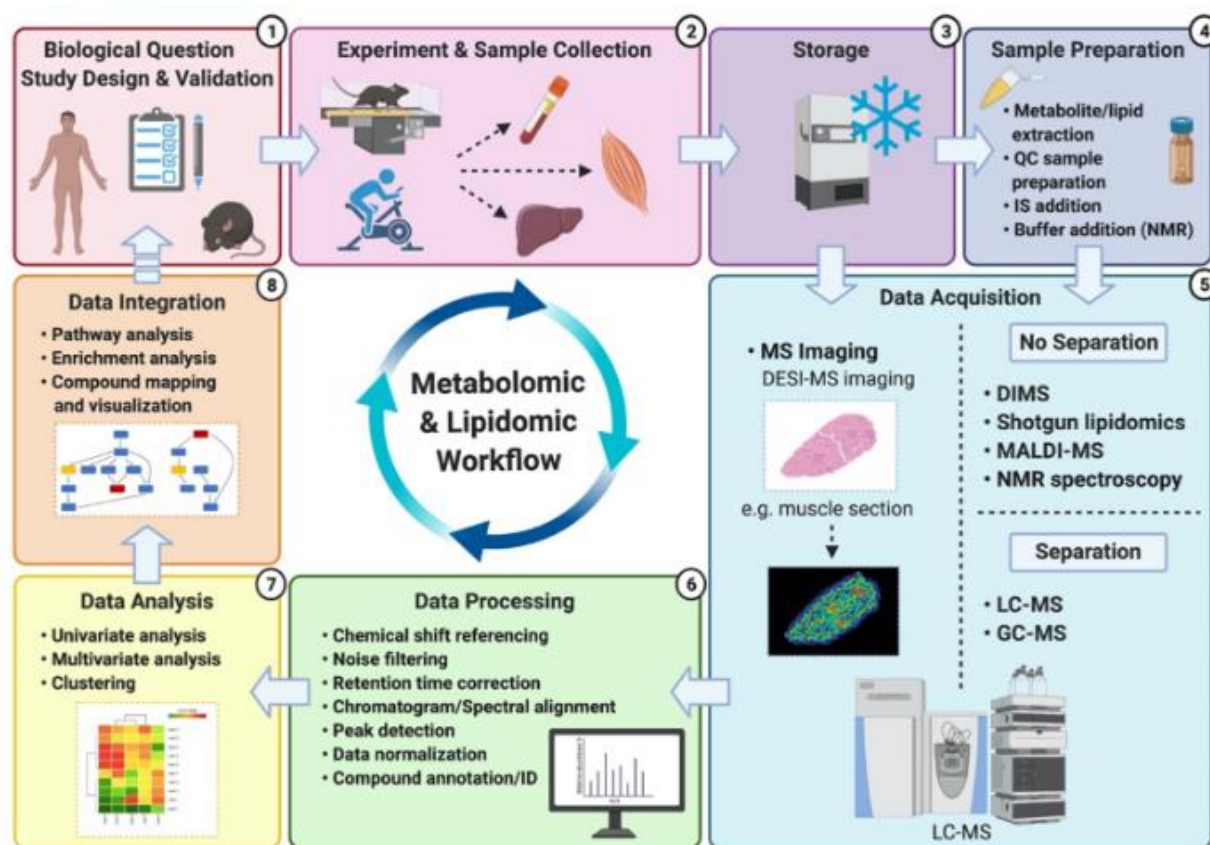


Abbildung 2: Metabolomik-Workflow (21)

Der Einsatz der Metabolomik ist weit verbreitet in der mikrobiellen, pflanzlichen sowie humanen Biochemie, Lebensmittelkontrolle, Toxikologie, Medizin, Arzneimittelforschung und der Entdeckung neuer präklinischer Biomarker für verschiedene Krankheiten wie Diabetes Mellitus, Prostatakrebsprogression und Alzheimer (15). Obwohl die Metabolomik ein breites Anwendungsspektrum hat, wird sie immer häufiger in der klinischen Praxis eingesetzt. Metaboliten dienen als Biomarker für physiologische, biochemische und pathologische Reaktionen und mit ihrer Hilfe lässt sich das Zusammenspiel verschiedener Signalwege in der Zelle erkennen. Anhand von Metaboliten kann man den allgemeinen Zustand eines Organismus erblicken. Daher ist das Hauptziel der Metabolomik, neben dem Verständnis der Signalwege im Körper, diagnostische Biomarker zu entdecken, die der Diagnose, Prognose und als Prädiktoren für die Entwicklung vieler Krankheiten dienen (27).

2.1.2. Lipidomik

Lipidomik ist ein Teilgebiet der Metabolomik (16)(28) und stellt per Definition "eine vollständige Charakterisierung von Lipidmolekülspezies und ihrer biologischen Rolle in Bezug auf die Expression von Proteinen, die am Lipidstoffwechsel und ihrer Funktion beteiligt sind, einschließlich Genregulation" (29). Das Lipidom umfasst die ganze Lipid-Summe innerhalb eines biologischen Systems. Lipide sind per Definition "hydrophobe oder amphipathische Moleküle, die ganz oder teilweise durch Kondensation von Thioestern auf Carbanionbasis und/oder durch Kondensation von Isopreneinheiten auf Carbokationenbasis entstehen" (30). Die LIPID MAPS®-Strukturdatenbank enthält ab Dezember 2020 mehr als 45.000 Lipidstrukturen (31). Lipide kommen in menschlichen Organismus ubiquitär vor und stellen eine wichtige Klasse von Biomolekülen dar (32). Diese kleine Biomoleküle bestehen aus einem hydrophoben Teil, der in polaren Lösungsmitteln nicht gut löslich ist und aus einen hydrophilen Teil, der in polaren Lösungsmitteln gute Löslichkeit zeigt (30). Lipide besitzen zahlreiche fundamentale Funktionen und sind in vielen zellulären Prozessen involviert (33). Sie dienen als Energiespeicher, Bausteine der Zellmembranen und als Hormonvorläufer (33). Eine weitere Aufgabe der Lipiden ist, dass die als Mediatoren den Zellsignalwegen fungieren und die Regulierungskaskaden verstärken (33). Die Möglichkeit der Identifizierung und Quantifizierung von Lipiden ist für die medizinische Forschung von großer Bedeutung. Infolge hoher Sensitivität und Spezifität eignet sich die Massenspektrometrie (MS) als etablierte Methode für die Lipidomik-Forschung.

Ein gestörter Fettstoffwechsel kann zur Entwicklung von chronischen sowie akuten Erkrankungen führen, wie z.B. Diabetes Mellitus, Arteriosklerose, Fettleibigkeit, Herz-Kreislauf-, neurologische, hepatologische Erkrankungen und letztendlich auch die Krebsentstehung verursachen (34). Daher wurde eine neue Disziplin namens Lipidomik etabliert, die sich mit der Erforschung von Lipiden beschäftigt.

2.1.3. Eikosanoide

Eikosanoide sind biologisch aktive Lipidderivate, die von Arachidonsäure sowie mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFAs) abgeleitet sind (35). Diese Signalmoleküle steuern zahlreiche homöostatische und entzündliche Prozesse, die mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht werden (35). Arachidonsäure (AA) fungiert als Vorläufer der Eikosanoidsynthese. Der menschliche Körper ist nicht in der Lage AA zu produzieren, sondern sie wird exogen durch Lebensmittel wie Eier, Tunnfisch, Lachs und Fleisch aufgenommen oder endogen aus der Linolsäure synthetisiert (36). Die endogene Freisetzung findet mit Hilfe des Enzyms-Phospholipase-A2-Superfamilie (36). AA liegt im menschlichen Körper nicht in freier Form, sondern in der sn-2-Position auf dem Glycerol-Rückgrat von Phospholipiden in Zellmembranen vor. Wenn es zu einer Stimulation der Zellmembran kommt, werden sn-2-Fettsäuren durch die Phospholipase A2 (PLA2) aus Phospholipiden freigesetzt. Phospholipase A2-Enzyme können in 5 Typen eingeteilt werden: sezernierte PLA2 (sPLA2), zytosolische PLA2 (cPLA2), kalziumunabhängige PLA2, lysosomale PLA2 sowie Plättchen-aktivierender Faktor Acetylhydrolase (37). Zytosolische Calcium-abhängige PLA2 (cPLA2), zytosolische Calcium-unabhängige PLA2 (iPLA2) und sezernierte PLA2 (sPLA2) sind drei Mitglieder der PLA2-Familie, die an der Eikosanoid-Biosynthese am meisten beteiligt sind (35). iPLA2 ist ein Enzym, das für die meisten täglichen Zellfunktionen verantwortlich ist, insbesondere für die Membranhomöostase (35). Im Gegensatz zu iPLA2, ist cPLA2 während der Homöostase inaktiv und wird durch die Entzündungsreaktionen über verschiedene Rezeptoren initiiert. Initiierte cPLA2 führt zur Hydrolyse der Arachidonsäurehaltigen-Phospholipiden und unter anderem zur Eikosanoid-Bildung (35). sPLA2 stellt ein Enzym dar, das in der Lage ist, die Funktion von cPLA2 zu verbessern und die Dauer erhöhter Spiegel an freien Fettsäuren sowie Arachidonsäure zu kontrollieren (35).

Neben Arachidonsäure gibt es andere Vorläufer der Eikosanoid-Biosynthese wie Dihomo- γ -Linolensäure (DGLA), die von ω 6 abgeleiteten PUFAs hergestellt ist, sowie Eicosapentaensäure (EPA) und Docosapentaensäure (DPA), die von ω 3 abgeleiteten PUFAs stammen (35). Durch die Oxidation von AA und verwandten PUFAs mit Hilfe der Enzyme Cyclooxygenase (COX), Lipoxygenase (LOX), Cytochrom P450 (CYP) oder auch nicht-enzymatische Oxidation werden Eikosanoide hergestellt (35). Mit Hilfe der Enzyme COX-I und COX-II werden Prostacycline, Prostaglandine, sowie Thromboxane gebildet. COX-I befindet sich in allen Geweben, die für Lipopolysaccharid-induzierte Entzündungen anfällig sind (36). Thromboxan A₂ (TXA₂) und Prostaglandine (PGs) werden durch COX-I gebildet und sind für die Immunüberwachung zuständig (36). COX-II ist in Endothelzellen und Makrophagen vorhanden und seine Hauptmetaboliten sind Prostaglandin E₂ (PGE₂), PGD₂, PGI₂ und PGF₂ α , die für Schmerzempfindung, die Regulation des Gefäßtonus, sowie der Entstehung von Krebs und Neurodegeneration verantwortlich sind (36). Zuden vier Lipoxygenasen, die für die Eikosanoid-Bildung verantwortlich sind, gehören 5-LOX, 8-LOX, 12-LOX und 15-LOX, die an Produktion von 5-Hydroperoxyicosatetraensäure (5-HPETE), 5-Hydroxyicosatetraensäure (5-HETE), 5-Oxo-Eicosatetraensäure (5-Oxo-ETE), sowie zahlreichen Leukotrienen, Lipoxinen und Hydroxyeicosatetraensäuren (HETEs) beteiligt sind (36). Die zwei Enzyme, die am Metabolismus von CYP-450 teilnehmen, sind Epoxygenase und ω -Hydroxylase und diese sind für die Bildung von Epoxy-Eicosatriensäuren (EETs) sowie Hydroxy-Eicosatetraensäuren (HETEs) berechtigt (36).

Anandamide sowie Endocannabinoide werden in reversiblen Reaktionen durch die Einwirkung von Fettsäureamidhydrolase (FAAH) erzeugt (36). Die Eikosanoid-Biosynthese kann auch durch nicht-enzymatische-Wege erfolgen. Oxidativer Stress kann zur Bildung von freien Radikalen (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) führen, was zur Bildung von Isoprostan und Nitroeicosatetraensäure führt (36). Eikosanoide, die auf diesem Weg gebildet werden, können auch zu einer COX-I-Hemmung führen (36).

Eikosanoide stellen biologisch aktive Lipidmediatoren dar, die in der Lage sind, entzündliche Prozesse im Körper zu verstärken oder zu minimieren. Ungleichgewichte in der Eikosanoidsynthese können chronische Entzündungen verursachen, die als Folge abnormale Immunfunktionen vorantreiben (38).

Entzündliche Prozesse können das Fortschreiten verschiedener Krankheiten, einschließlich Diabetes, verursachen und zu Schäden an verschiedenen Organen wie den Augen, Nieren, Nerven- und Herz-Kreislauf-System führen (38). Bei Diabetes hängt das Ausmaß der Entzündung mit dem Hämoglobin-A1-Spiegel zusammen. Eine Dysfunktion der Glykogensynthese und Glukogeonese in der Leber ist mit erhöhtem PGE2-Spiegel verbunden (38).

2.2. Der menschliche Tränenfilm

Der Tränenfilm stellt eine wässrige Phase dar und besitzt eine komplexe Struktur (39). Er hat eine wichtige Funktion bei der Befeuchtung der Augenoberfläche, der Aufrechterhaltung der Gesundheit von Bindehaut und Hornhaut sowie der Stimulierung der Wundheilung nach einer Verletzung (40). Zusätzlich schützt der Tränenfilm das Oberflächenepithel des Auges von verschiedenen Umwelteinflüssen, wie Allergenen, Mikroben, Schadstoffen, als auch von Umweltbedingungen wie schnelle Luftbewegungen durch Innenraumluftbehandlung oder niedrige Luftfeuchtigkeit (39). Der Tränenfilm wird in drei unterschiedliche Schichten klassifiziert (siehe Abbildung 4). Die erste Schicht stellt eine Mucinschicht dar, die auf der Hornhautoberfläche liegt und 2,5-5 µm dick ist (41). Die Hauptbestandteile der Mucinschicht sind zuckerreiche glykosylierte Proteine, die im Epithel enthalten sind (41). Die Mucine besitzen eine gelartige Struktur und tragen zur Unterstützung der Wasserausbreitung nach dem Lidschlag bei (41). Die zweite Schicht ist die wässrige Schicht, die ca. 4 µm dick ist (41). Sie besteht aus zahlreichen wasserlöslichen und wasserunlöslichen Komponenten. Dazu zählen verschiedene Proteine, wie Tränenlipocalin und Lysozym, Peptiden, Elektrolyten, sowie niedermolekulare Metaboliten (Kreatin, Epinephrin, Harnstoff, Aminosäuren, Cholesterin) (41)(42). Die Hauptfunktion dieser Schicht ist die Gewährleistung einer optisch glatten Oberfläche, die für Lichtreflexion nötig ist. Die dritte Schicht stellt eine dünne Lipidschicht (TFLL) dar. Es fungiert als eine Grenzschicht zwischen dem Tränenfilm und der äußeren Umgebung. Ihre Hauptfunktion ist die Verringerung der Oberflächenspannung des Tränenfilms, wodurch der Tränenfilm an der Hornhautoberfläche stabilisiert wird (41). In der TFLL sind Lipide mehrschichtig organisiert.

TFL besteht aus einer dickeren Schicht, die unpolare hydrophobe Lipide enthält und aus einer dünnen Unterschicht, die wiederum aus polaren amphiphilen Lipiden aufgebaut ist. Die mittlere Gesamtdicke der TFL ist 42 nm, während die Dicke der unpolaren Phase 33-40 nm und der polaren Phase 2-9 nm beträgt (41). Daraus kann geschlossen werden, dass die Dicke der unpolaren Phase 80 % der Gesamtdicke ausmacht (41). TFL hat eine wichtige Funktion bei der Verzögerung der Wasserverdunstung und zur Vorbeugung des Überlaufens der Tränen an den Lidrändern (41).

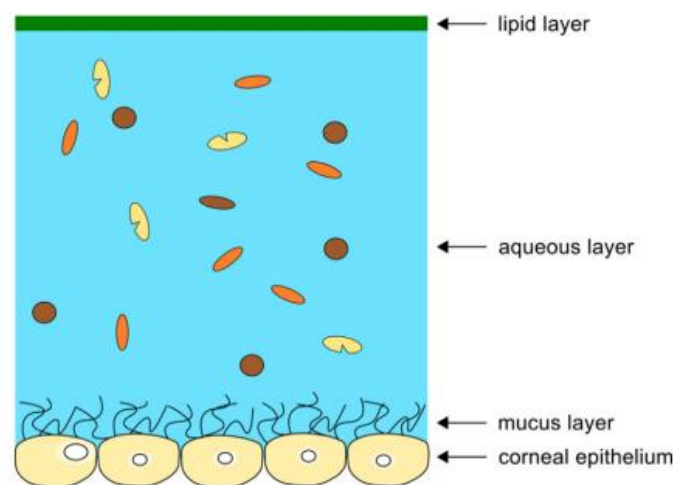


Abbildung 3: Die Struktur des menschlichen Tränenfilms (41)

2.2.1. Tränenproduktion

Tränen spielen eine ganz wichtige Rolle für die Augenschutz- und Schmierfunktion (39). Die Regulation von Tränenproduktion und Verteilung erfolgt anhand von Tränenfunktionseinheit (Lacrimal Functional Unit = LFU) (39). LFU ist komplex aufgebaut und besteht aus den Tränensekretionsdrüsen (Bindehautbecherzellen, Meibom-Drüsen), den Augenlider, dem Oberflächenepithel, der ableitenden Tränenflusssystem, dem Drüsen- und Schleimhaut-Immunsystem und den sensorischen und motorischen Nerven (39)(43). LFU besitzt eine wesentliche Funktion bei der Tränensekretion und der Tränenfilmbildung und bewahrt eine gesunde Physiologie der Augenoberfläche (43). Ein gestörter Betrieb einer Komponente der LFU führt zum Syndrom des trockenen Auges (DED).

Die Hauptursachen für die Entstehung von DED sind meistens Tränenhyperosmolarität und Tränenfilminstabilität, die durch LFU oder durch eine Dysfunktion der Augenoberfläche hervorgerufen werden (43). Eine Hyperglykämie, bei der es sich um einen erhöhten Blutzuckerspiegel handelt, kann auch zur Dysfunktion der LFU führen. Dementsprechend können eine mangelhafte Tränenproduktion oder übermäßiger Tränenverlust auftreten. Außerdem können die Anomalien beim Blinzeln oder Veränderungen in der Zusammensetzung des Tränenfilms entstehen (43). Sowohl die Typ I, als auch Typ II erkrankte Diabetes Mellitus (DM)-Patienten sind anfälliger für die Entwicklung von LFU Dysfunktionen. DM kann zur Entstehung von Hornhautepithelanomalien führen, welche wiederum LFU-Dysfunktionen verursachen. Die Hornhautkomplikationen, die durch Hyperglykämie hervorgerufen werden, schließen Hornhauterosionen, Epitheldefekte, punktförmige Keratopathie, sowie tropische Geschwüre ein (43).

2.3. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) gehört zur Gruppe der Stoffwechselerkrankungen, die durch Hyperglykämie beschrieben sind (44). DM wird durch die Störung der Insulinsekretion, der Insulinwirkung oder Kombination beider Faktoren verursacht (44). Chronische DM Erkrankung führt zu Langzeitschäden, Funktionsstörungen sowie Versagen verschiedenen Organen, vor allem Augen, Herz, Blutgefäße und Nieren (44). Die Haupteinteilung von DM erfolgt in Typ-1-DM (T1DM) und Typ-II-DM (T2DM).

T1DM ist eine endokrine Autoimmunerkrankung, die durch Disfunktion der β -Zellen verursacht wird (45). β -Zellen sind Insulin produzierenden Zellen des Pankreas, die das Insulin sezernieren und ins Blut ausschütten und ihre Fehlfunktion führt zu einem vollständigen Insulinmangel (45). Bei der T1DM spielt die Insulinresistenz kaum eine Rolle. Diese Art von Diabetes betrifft am häufigsten Kinder, Jugendliche sowie junge Erwachsene (45). Die häufigsten Symptome sind Gewichtsverlust, Leistungsminderung und Polyurie (vermehrte Harnausscheidung) (45). Die T1DM-Patienten sind meist normalgewichtig und besitzen aufgrund der mangelhafte Insulinproduktion eine ausgeprägte Ketoseneigung (45). Insulin wird ein Leben lang als Therapie für diese Art von Diabetes eingesetzt.

T2DM wird durch β -Zell-Dysfunktion und Insulinresistenz der peripheren Zielgewebes verursacht (45). Eine Reihe von Faktoren, wie genetische Disposition und der Lebensstil, beeinflussen die Entstehung von T2DM. Der spezifische Lebensstil von Diabetespatienten spiegelt sich in der Überernährung, dem Mangel an körperlicher Bewegung sowie der Adipositas (45). 80-90 % der T2DM-Patienten sind adipos (45). Die Interaktion des zentralen Fettgewebes mit anderen Insulinzielgeweben beeinflusst die Signaltransduktion von Insulinrezeptoren (45). Als Folge kommt es zu einer unzureichenden Insulinwirkung am peripheren Zielgewebe, sogenannten Insulinresistenz (45). Die Hyperglykämie, erhöhtes Körpergewicht sowie körperliche Inaktivität können die Insulinresistenz negativ bewirken. Obwohl Insulinresistenz die Hauptursache für T2DM ist, entwickeln 80 % der adipösen Menschen mit Insulinresistenz keinen Diabetes (45). Im Frühstadium des T2DM tritt zunächst eine Störung der Insulinsekretion auf, gefolgt von einer Hyperglykämie und schließlich tritt eine Hyperinsulinämie auf (45). Wie bei T1DM, kommt es auch bei T2DM zu einem Verlust der β -Zell-Masse (45). Bei der T2DM ist der β -Zell-Verlust deutlich geringer als bei der T1DM und bei der T2DM kommt es nicht zur autoimunen Destruktion (45). Die Therapie des T2DM variiert je nach Krankheitsstadium, Körpergewicht, Alter und anderen Erkrankungen des Patienten (46). 60 % der T2DM-Patienten werden mit oralen Antidiabetika (OAD) behandelt, 14 % mit einer Kombination aus OAD und Insulin (45). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium erfolgt die Behandlung ausschließlich mit dem Insulin. Zu den häufig verwendeten OAD gehört Metformin. Seine Hauptwirkung beruht auf der Verringerung der Glucoseproduktion in der Leber (45). Außerdem führt Metformin zu einer Abnahme der Insulinresistenz in der Muskulatur sowie zur Senkung des glykierten Hämoglobins (HbA1c) von 0,9-1,5 % (45). Aufgrund der aufgeführten positiven Wirkungen von Metformin, ist dieses Medikament die Wahl 1 für die T2DM-Basistherapie. Im Fall, wenn die Kombination aus 2-3 OAD kein Therapieerfolg mehr bringt, ist die Insulintherapie erforderlich (45). Im Durchschnitt tritt die Insulinpflichtigkeit nach 10 Jahren der Erkrankung auf (45).

T2DM kann zu Veränderungen der Blutgefäße im Auge führen und auch die Netzhaut schädigen, dies manifestiert sich als diabetische Retinopathie, die die Hauptursache für Erblindung bei Diabetes ist. 85 % der Diabetespatienten entwickeln nach 25 Jahren Diabetes die Anzeichen der Retinopathie (45). Diabetische Retinopathie kann lange Zeit unbemerkt bleiben, denn oft über einen längeren Zeitraum keine Symptome erscheinen. Daher sind regelmäßige Kontrollen beim Augenarzt für die Früherkennung der Krankheit sehr wichtig.

Zu den häufigsten Symptomen zählen Leseschwierigkeiten, Verschwommensehen und Farbsinnstörungen, während in schweren Fällen die Erblindung auftreten kann (45). Jeder dritte T2DM-Patient leidet an diabetischer Retinopathie. Die Diabetische Retinopathie kann in eine nicht-proliferative Form mit mildem, mäßigem oder schwerem Stadium und eine proliferative Form unterteilt werden (45). Als Folge einer nicht proliferativen Retinopathie treten Mikroaneurysmen, Netzhautblutung, Wattlecken, sowie Lipidexsudate auf (47). Die diabetisches Makulaödem (DME), der die Ansammlung von Flüssigkeit in der zentralen neuralen Netzhaut darstellt, tritt als Folge der diabetischer Retinopathie auf (47). DME zeichnet sich durch abnormale Netzhautverdickung, sowie zystoide Bildung und ist somit eine der häufigsten Ursachen für Sehverlust (47). Zusätzlich haben Diabetes-Patienten ein erhöhtes Risiko, das trockene Augen-Syndrom zu entwickeln. Darüber hinaus besteht der Zusammenhang zwischen durch Diabetes ausgelöste Augenveränderungen und der Entwicklung einer oberflächlichen Keratitis Punctata sowie anhaltenden Epitheldefekten und rezidivierenden Hornhauterosionssyndromen (48). Wie wir bereits wissen, bildet das Hornhautepithel die erste Schicht des Auges und unterliegt einem ständigen Verschleiß, weshalb es ständig regeneriert werden muss. Die Augenschmerzen und -rötungen können durch Prozesse, die die Geschwindigkeit der Epithelregeneration und Wundheilung beeinflussen, eintreten (48).

2.3.1. Korrelation der DM mit DED

DM mit allen begleitender Komorbiditäten, wie z.B. chronische Hyperglykämie, verminderter Insulinspiegel und diabetische periphere Neuropathie stellt eine Gefahr für die Entstehung der DED dar (43). Diabetes führt zu histologischen Veränderungen in den Tränendrüsen und spielt somit eine Rolle bei der Entstehung des oxidativen Stresses bei DED. Die insulinbedürftigen Patienten besitzen deutlich verminderte Reflextränen. Die Tränen der Diabetikern haben im Vergleich zu nicht-Diabetikern einen höheren Glukosespiegel, die zu erhöhten Expression von AGE-Proteinen (fortschrittliche Glykationsendprodukte) führt (43). Diese AGE-modifizierte Proteine können daher als Biomarker für die DM-Diagnostik eingesetzt werden. Bei der Krankheitsentstehung von DED spielen auch die Entzündung und Immunität eine wesentliche Rolle. Eine entzündliche Kaskade wird durch die Hyperglykämie ausgelöst und diese initiiert angeborene und adaptive Immunantworten der LFU (43).

Dabei werden immun-inflammatorische Regulatoren aktiviert, wie z.B. Interferon-Chemokine, Chemokinrezeptoren, Interleukin-17 und Zelladhäsionsmoleküle (43). Außerdem löst die Hyperglykämie die Hyperosmolarität des Tränenfilms aus, wobei an der Augenoberfläche der Epithelzellen eine Hyperosmolarität entwickelt wird und somit eine entzündliche Kaskade stimuliert wird (43). An diesen entzündlichen Prozessen sind auch MAP-Kinasen beteiligt (43).

2.4. Analytische Techniken

Die Hauptaufgabe der Metabolomik besteht darin, die Zusammensetzung kleiner Moleküle in biologischen Proben zu untersuchen, als auch ihre Konzentration in einer bestimmten Probe, sowie ihre chemischen Eigenschaften zu bestimmen (15). Zu den am häufigsten verwendeten Nachweismethoden gehören Massenspektrometrie (MS) und Kernspinresonanzspektroskopie (NMR). Mit Rücksicht auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften, Größe, sowie Konzentration ist der dynamische Bereich der Metaboliten ziemlich hoch (15). Die Konzentrationsbereiche variieren zwischen pikomolaren und millimolaren Größenordnungen, physikalisch-chemische Eigenschaften wie Stereochemie, Polarität, Hydrophobie, Stabilität und pKa-Bereich können sich stark unterscheiden, die Metabolitgrößen können im Bereich von ~ 100–1500 Da liegen (15). Aufgrund des komplexen Aufbaus der biologischen Proben werden diese Detektionsmethoden sehr häufig mit verschiedenen Chromatographie-Arten gekoppelt. In der Metabolomik kommen meist Flüssigkeitschromatographie (LC), Gaschromatographie (GC) und Kapillarelektrophorese (CE) zum Einsatz. Aus den veröffentlichten Publikationen in PubMed kann geschlossen werden, dass seit 2005 häufiger MS als NMR als Nachweismethode eingesetzt wird (49). Obwohl es sich bei der NMR-Spektroskopie um eine zerstörungsfreie Analyse handelt, besitzt die MS gewisse Vorteile wie bessere Abdeckung der Gesamtmetaboloms, größere Empfindlichkeit sowie die Unterscheidung der Metabolite (49). In dieser Masterarbeit wurde mit LC-MS gearbeitet, deswegen werden beide Analyseverfahren in den nachstehenden Kapiteln erläutert.

2.4.1. Flüssigkeitschromatographie (LC)

Flüssigkeitschromatographie (LC) stellt ein physikalisches Trennverfahren dar, bei dem ein Stoffgemisch anhand unterschiedlichen Interaktionen der Probe mit einer beweglichen, mobilen Phase und einer ruhenden, stationären Phase aufgetrennt wird (50). HPLC wird heutzutage als moderne Variante von LC verwendet und wird häufig mit der MS gekoppelt. Früher war GC-MS die bevorzugte Methode für die Auftrennung und Identifizierung von Gemischen. Die Verwendung von GC-MS ist aufgrund bestimmter Faktoren begrenzt, wie Probenvolatilität, die Bedingung, dass wässrige Proben extrahiert werden müssen sowie thermischer Stabilität im GC-Ofen (51). Nicht volatile Proben müssen derivatisiert werden, was einen zusätzlichen, zeitaufwendigen Schritt in der Probenvorbereitung darstellt und dadurch auch den Durchsatz limitiert. Aufgrund der oben genannten Einschränkungen ist LC-MS heutzutage die erste Wahl für die Omics-Analyse. Das LC-MS System besteht aus einem HPLC-Pumpensystem, Injektor und eine Säule, die über einem ionisierenden Interface mit dem Massenspektrometer verbunden sind (51).

2.4.1.1. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC wird seit den 1970er Jahren zur Trennung, Analyse und Reinigung chemischer Verbindungen eingesetzt (51). Der Hauptteil des HPLC-Systems stellt die HPLC-Säule dar, in der die Trennung erfolgt. Dabei wird die mobile Phase durch einen Injektor auf die Säule injiziert, wobei die Signale nach der Auftrennung vom Detektor registriert und abschließend von einem Computer ausgewertet werden (51). Basierend auf der Dimension, dem chromatographischen Modus sowie der Anwendung kann die HPLC-Säule auf verschiedene Arten kategorisiert werden. Die vier Hauptmodi von HPLC-Säulen sind Normalphasenchromatographie (NPC), Umkehrphasenchromatographie (RPC), Ionenaustauschchromatographie (IEC) und Größenausschlusschromatographie (SEC), während Hydrophobe-Interaktionschromatographie (HIC) und Hydrophile-Interaktionschromatographie (HILIC) zu den anderen spezialisierten Modi zählen (50). Konventionelle HPLC-Säule besitzt einen Innendurchmesser von 4,6 mm und typische Flussraten für die mobile Phase betragen 0,4-2 ml/min (52). Für eine erfolgreiche Trennung ist die Auswahl des geeigneten Packungsmaterials für die Säule ausschlaggebend.

In der NPC ist die Verteilung auf der Adsorption des Analyten an der polaren stationären Phase basiert und wird am häufigsten für unpolare Verbindungen verwendet (50). Als stationäre Phase werden Kieselsäure oder Aluminiumoxid verwendet und als polare Phase wird meist ein Gemisch aus 2 organischen Lösungsmitteln wie n-Hexan und 2-Propanol verwendet (53). Der Nachteil dieser Art der Chromatographie ist die Kontamination der polaren Oberfläche, aber mit der Addition von polaren funktionellen Gruppen wird dieses Problem minimiert. NPLC wird heute am häufigsten für präparative Zwecke und chirale Trennungen angewendet (50). Die meisten HPLC-Trennungen laufen heutzutage nach der Umkehr-(=Reversed Phase, RP)-Methode ab (54). Im Gegensatz zu NPC, erfolgt bei der RPC die Aufteilung der Analyten zwischen einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase (50). Am häufigsten wird für RPC eine Mischung aus Acetonitril oder Methanol mit Wasser angewendet (50). Zu den am häufigsten für die RPC verwendeten stationären Phasengehören: Kinetex C-18 (mit an Silicaträger gebundenen Octadecylsiloxan), Kintex XB-C18 (mit an Silicaträger gebundenen Diisobutyloctadecyl) und Kinetex-C8 (Octylsiloxan gebundenes Silica) (55). In der RPC eluieren zuerst polare Analyten, während unpolare Analyten stärker mit stationärer Phase interagieren und später eluieren. Der Trennmechanismus beruht auf den hydrophoben Wechselwirkungen von Analyten mit stationären Phase (50). RPC hat eine begrenzte Fähigkeit bei der Auftrennung polaren Analyten (54). Daher werden andere Betriebsmodi, wie HILIC immer häufiger eingesetzt, um eine erfolgreiche Analyse solcher Verbindungen zu erreichen. Bei der HILIC ist die stationäre Phase polar und als mobile Phase werden hochorganische Verbindungen wie Acetonitril eingesetzt (54). Lipophile Verbindungen interagieren nicht stark mit der stationären Phase und eluieren schnell. Polare Verbindungen werden zurückgehalten und eluieren erst mit steigender Wasserkonzentration. HILIC findet ihre Anwendung bei der Analyse von polaren Metaboliten, wie beispielsweise Aminosäuren (54)(56).

Durch den Austausch der HPLC-Säule mit 150 x 4.6 mm I.D., 5 µm durch die UHPLC-Säule mit 50 x 2.1 mm I.D., 1.7 µm wurde eine signifikant schnellere Analyse von Proben unter identischen kinetischen Bedingungen ermöglicht (57). UHPLC-Geräte können Drücke von 1200 bis 1400 bar und Flussraten von 2-5 ml/min erreichen (57). Durch den Einsatz von UHPLC-Geräten werden sowohl ultraschnelle als auch hochauflösende Trennungen erzielt. Außerdem wird der Verbrauch der Lösungsmittel reduziert und es ist möglich die Säulen mit einer kleineren Partikelgröße von sub-2-µm zu verwenden (57). Der Aufbau des UHPLC-Systems ist in Abbildung 4 dargestellt.

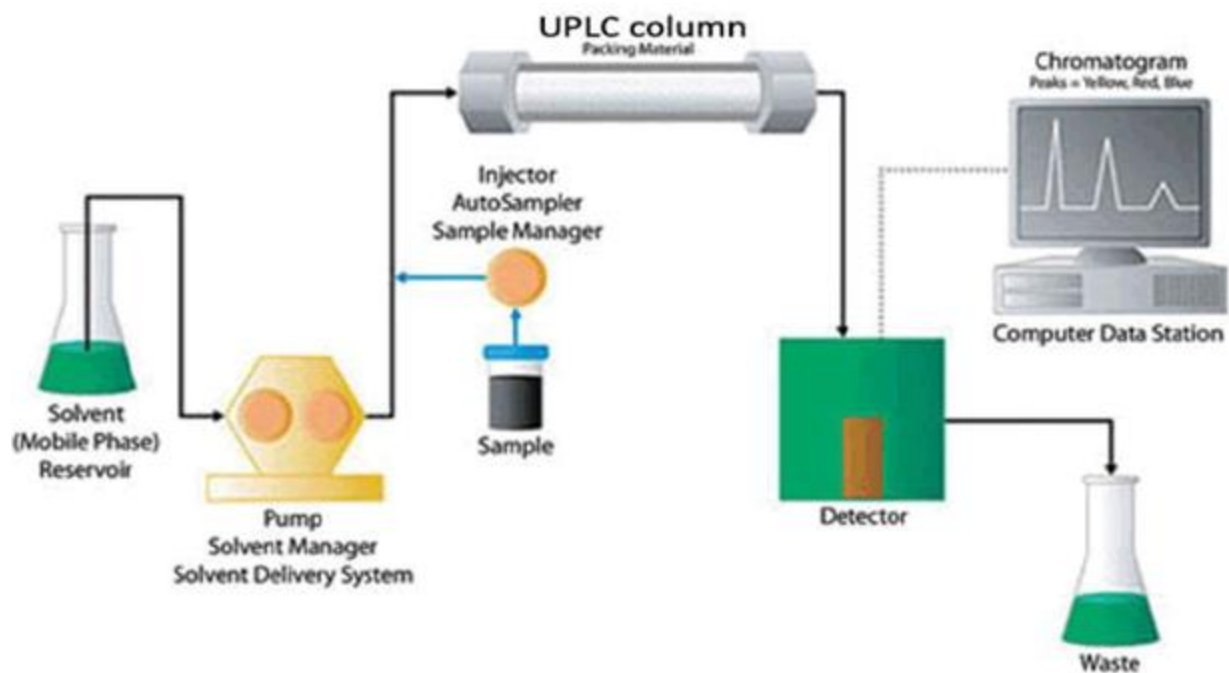


Abbildung 4: UHPLC-System bestehend aus Lösungsmittelreservoir, Pumpensystem, Probeninjektor, UPLC-Säule, Detektor und Computer (58)

2.4.2. Massenspektrometrie

In der Massenspektrometrie (MS) werden Ionen aus untersuchten Substanzen erzeugt, die anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) getrennt und mittels eines Detektors erfasst werden (59). Jedes Massenspektrometer ist nach einem Grundschemata aufgebaut und besteht aus einer Ionenquelle, in der die Ionisierung erfolgt, einem Massenanalysator, indem die Separation stattfindet und einem Detektor, die unter Hochvakuum operieren (59).

2.4.2.1. Elektrosprayionisation (ESI)

Die Elektrosprayionisation (ESI) stellt die Methode der Wahl für direkte Kopplung von HPLC und MS dar (59)(60)(61)(62)(63). Die Kombination von ESI mit der HPLC und MS bezeichnet eine empfindliche und robuste Technik, die in der Lage ist, ein breites Spektrum von Molekülen in komplexen biologischen Proben zu untersuchen (64). Üblicherweise werden polare Lösungsmittel wie Wasser, Acetonitril oder Methanol für den ESI-MS Analysen eingesetzt (65). Die Infusionsraten können zwischen einem und mehreren hundert $\mu\text{L}/\text{min}$ betragen, wobei diese mit der LC kompatibel sind (66). ESI gilt als eine sanfte Ionisationstechnik, die den Transfer der Ionen aus der Lösung in die Gasphase ermöglicht und für die Analyse von großen und nichtflüchtigen Molekülen geeignet ist (67)(68)(69)(70)(71)(72). Die Ionisation agiert bei atmosphärischem Druck (73). Um die Überführung von Analyten aus der Lösung in die Gasphase zu ermöglichen, benötigt ESI elektrische Energie. Dieser Übergang umfasst die Produktion geladener Tröpfchen, wiederholte Lösungsmittelverdampfung sowie Tröpfchenzerfall und zusätzlich ein Mechanismus, durch den die Ionen in die Gasphase übergehen (65). Bei der ESI wird die Analytlösung mit einem flüchtigen Lösungsmittel auf Konzentrationen von 10^{-6} - 10^{-4} verdünnt (59). Die verdünnte Analytlösung wird durch die Sprühkapillare gepumpt, die auf einem elektrischen Potenzial von 3-4 kV gehalten wird (59)(66). Dabei findet eine elektrochemische Reaktion des Lösungsmittels statt. Je nach Polarität der Elektrode von der Hochspannungskapillare liefern die Redoxreaktionen entweder positive oder negative Ionen in der Lösung. Auf der Oberfläche sammeln sich Ladungen gleicher Art an, die destabilisiert und unter dem Einfluss eines hohen elektrischen Feldes in einen Kegel umgewandelt werden (65). Die resultierende Taylor-Kegel repräsentiert eine Zone hoher Turbulenzen. Ein feiner Flüssigkeitsstrahl wird von der Spitze in Richtung der beheizten Kapillare bei hoher Feldstärke ausgestoßen (65). Dieser Strahl zerfällt in kleine Tröpfchen mit einem Radius von $1,5 \mu\text{l}$ (65). Durch die Coulomb-Abstoßung werden die Tröpfchen voneinander getrennt und bewegen sich in Richtung der beheizten Kapillare. Im positiven Modus entsteht ein positives Aerosol, im negativen Modus ein negatives Aerosol. Wenn die Tröpfchen den Raum zwischen der Sprühdrüse und der beheizten Kapillare passieren, kommt es zur Lösungsmittelverdampfung, die durch Stickstoffstrom unterstützt wird. Dabei nimmt die Tröpfchengröße ab bis die Rayleigh-Grenze erreicht ist (65).

Als Ergebnis tritt eine Coulomb-Spaltung auf und das Elterntropfchen zerfällt in mehrere kleineren Tropfchen (siehe Abbildung 5). Die neu gebildeten Tropfchen sind nicht nur kleiner, sondern haben auch ein höheres Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Coulomb-Explosion wiederholt sich und auf diese Weise entstehen immer kleinere Tropfchen, folglich auch Nanotropfchen, aus denen das Analytmolekül gebildet wird (65). Es gibt zwei Mechanismen zur Bildung des Analytmoleküls und zwar CRM (Geladen-Rückstandsmodell) und IEM (Ionenverdampfungsmodell) (65). Die geladene, gasförmige Analytmoleküle gelangen abschließend in das Massenspektrometer.

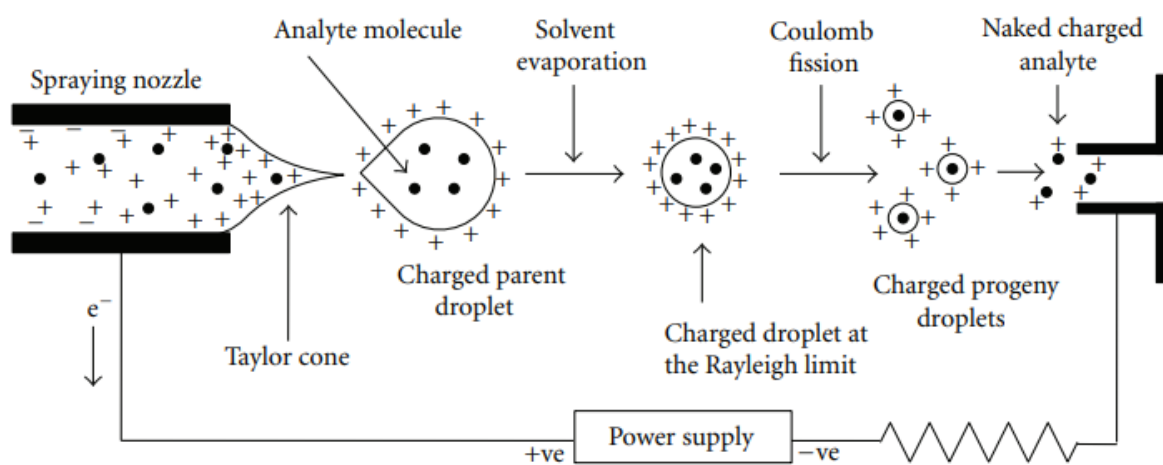


Abbildung 5: Schematische Darstellung von ESI (65)

2.4.2.2. Q Exactive HF

Die Q Exactive HF stellt die Kombination aus einem Vorfilter, Hochleistung-Quadrupol-Massenfilter und einem Ultrahochfeld-Orbitrap-Analysator dar (74). Der Vorfilter, der aus einem Stacked-Ring-Ionenleiter (S-Lens) und einem Injektions-Flatapole aufgebaut ist, verhindert, dass die unerwünschte Ionen in das System eindringen und erhöht somit die Robustheit des Systems (74).

Die Q Exactive HF Aufbau ist in Abbildung 6 dargestellt und besteht aus folgenden Teilen: einer Atmosphärendruck-Ionen quelle (API) zum Beispiel ESI, S-Lens, einem *Advanced Active Beam Guide* (AABG), der aus dem Injektion- und Bent-Flatapole besteht, einem Quadrupole-Massenfilter mit *Advanced Quadrupole Technology* (AQT), einer C-Trap, einer *Higher Energy Collisional Dissociation* (HCD) Zelle und einem Orbitrap Massenanalysator (75).

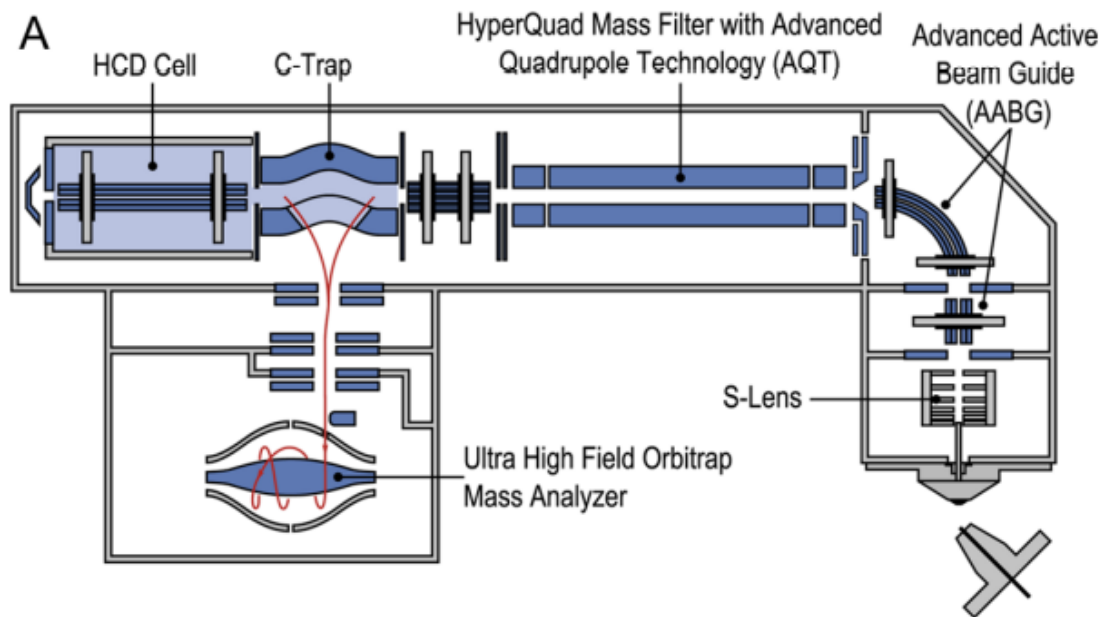


Abbildung 6: Aufbau von Q Exactive HF (76)

Die gebildeten Ionen gelangen durch eine Transferröhre zur S-Lens und danach werden sie über den Injektion-Flatapole in den Bent-Flatapole geführt (siehe Abbildung 7). Der Bent-Flatapole besteht aus zwei Stäben, zwischen denen sich 2 mm große Lücke befinden (75). Er dient dazu, dass ungeladene Teilchen nicht abgelenkt werden können und somit nicht weiter in das Gerät transportiert werden. Im Bent-Flatapole findet die Kollisionskühlung statt, wonach die Ionen mithilfe einer Linse in einen hyperbolischen Quadrupol übertragen werden.

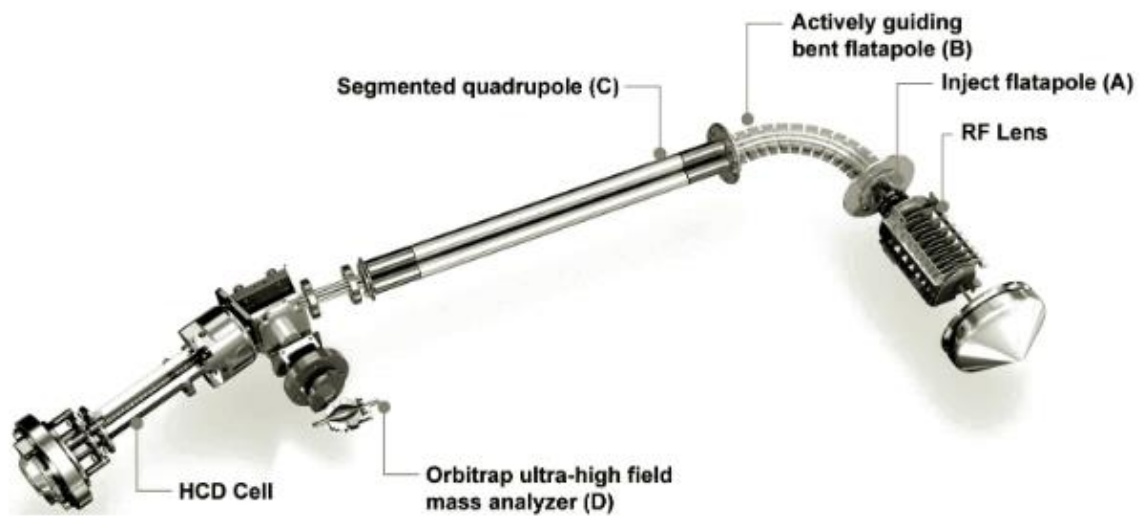


Abbildung 7: Detaillierter Aufbau von Q Exactive HF. Diese Anlage basiert auf der Q Exactive Serie und besteht aus einem Advanced Active Beam Guide (AABG), das aus einem Injektions-Flatapole (A), gebogenen Flatapole (B) aufgebaut ist, und einem segmentierten Quadrupol (C) (74).

In dem Quadrupol können die Ionen bis zu einer Isolationsbreite von 0,4 Th bei m/z 400 isoliert werden (75). Ein linearer Quadrupol-Massenanalysator ist aus vier zylindrisch geformten Stabelektroden aufgebaut, wie in der Abbildung 8 dargestellt ist (59)(77).

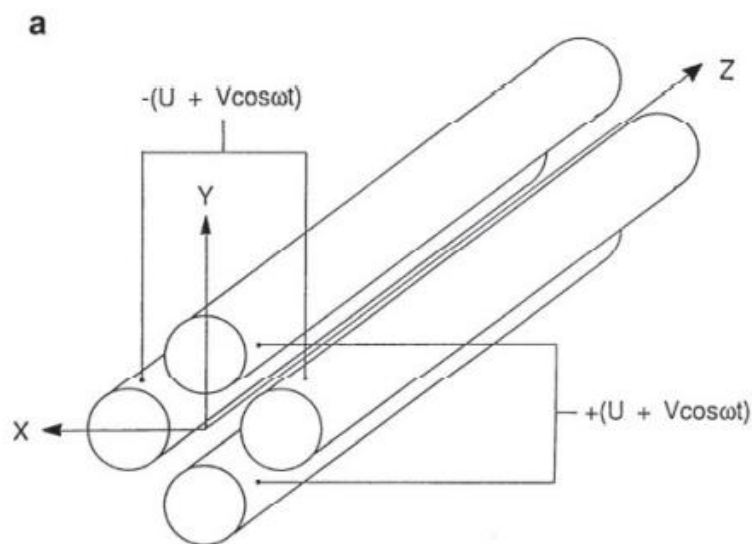


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines linearen Quadrupol-Massenanalysators (59)

Die Stabelektroden sind quadratisch angeordnet und erstrecken sich in z-Richtung (59). Das positive und negative Potenzial werden an den Elektroden angelegt, wobei zwei gegenüberliegenden Elektroden das gleiche Potenzial besitzen, das sich aus einer Gleichspannung (DC) und einer Radiofrequenz-(RF)-Spannung zusammensetzt (59). Die Gesamtbewegung der Ionen kann auf einer stabilen Trajektorie ablaufen, wobei nur die Ionen mit einem gewissen m/z -Wert den Quadrupol passieren können (59). Diese werden durch den Quadrupol geleitet und zum Schluss vom Detektor erfasst. Die Ionen mit nicht bevorzugten m/z -Werten werden neutralisiert und erreichen den Detektor oder in diesem Fall die *C-Trap* nicht. Die Ionen werden dann mithilfe eines kurzen Oktapols in die *C-Trap* gebracht. In der *C-Trap* können Ionen gespeichert und akkumuliert werden und von dort orthogonal in die Orbitrap befördert. Je nach RF-Spannung werden die Ionen mit spezifischen m/z geschleudert (MS1) Scan. Aber die Ionen können auch in die HCD-Zelle gelangen, die sich neben der *C-Trap* befindet. In der HCD-Zelle werden Precursor selektiert und fragmentiert. Aus der HCD-Zelle können Fragmente wieder in die *C-Trap* übertragen und dort akkumuliert und wieder orthogonal in die Orbitrap befördert (MS2) (75). Die Spezifität des Orbitrap-Massenanalysators spiegelt sich in der akkuraten Masse und im hohen Auflösungsvermögen wieder, wobei die Höhe beider Parameter vom Orbitrap-Modell abhängt (77). Das Orbitrap-Massenanalysator besteht aus einer äußeren tonnenartigen und einer zentralen spindelartigen Elektrode (77). Während des Einleitens der Ionen aus der C-Trap wird das elektrische Feld in dem Orbitrap erhöht und die Ionenwolken werden in Richtung des Zentrums des Orbitrap-Massenanalysators komprimiert (77). Dabei bewegen sich die Ionen um die Zentralelektrode und führen die Schwingungen aus (77). Diese Schwingungen werden durch die Elektroden erfasst, wobei die Frequenz durch die Fourier-Transformation aufgezeichnet wird (77). Mit Hilfe der Frequenz werden m/z und die Häufigkeit der Ionen berechnet.

2.4.3. CompoundDiscoverer™

Thermo Scientific™ Compound Discoverer™ ist eine Software für die Metabolomik-Datenanalyse. Diese Software dient dazu, anhand von Bibliotheken, Datenbanken, sowie statistischen Analysen, die Unterschiede zwischen Proben zu erkennen und die biologischen Muster aufzuklären (78)(79). Die Datenbanken und online Bibliotheken, die Compound Discoverer™ verwendet, um biologische Stoffwechselwege zu verstehen, sind Thermo Scientific™ Metabolika™, mzCloud, Chemspider, KEGG- und BioCyc-Datenbanken (79). Die Datenverarbeitung wird in dieser Software durch einstellbare Arbeitsabläufe ermöglicht.

2.4.4. Skyline

Skyline ist ein Softwaretool, die seit 2009 für den MS-Proteomik-Workflow verwendet wurde und erwies sich als zuverlässig für SRM-MS-Analysen (80). Mithilfe von Skyline ist es möglich, Daten zu analysieren, die mit zielgerichteten Methoden wie SRM und PRM sowie mit Nicht-Target-Methoden erhoben wurden (80).

2.4.5. Perseus

Perseus ist eine Software für die Analyse von quantitativen Omics-Daten. Mit dieser Software werden statistische Analysen zwischen gesunden und erkrankten Patienten erhoben, auf deren Grundlage relevante Schlussfolgerungen gezogen werden können. Diese Analysen umfassen unter anderem PCA, hierarchische Gruppierung aller Proben und Multi-Scatter-Plots (81).

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Material

- ❖ 10 µl G graduierte Spitzen (TipOne)
- ❖ 200 µl und 1000 µl Spitzen (Greiner Bio-One)
- ❖ Eppendorf Sicherheits-Reaktionsgefäße 0.5 ml (Polypropylen)
- ❖ Eppendorf Reaktionsgefäß 1.5 ml (Polypropylen)
- ❖ Falkenrohr 15 ml (konisches Polypropylenröhrchen mit hoher Klarheit)
- ❖ Falkenrohr 50 ml (konisches Polypropylenröhrchen mit hoher Klarheit)
- ❖ Glass Vials, 8 ml (Scherf Präzision Europa GmbH)
- ❖ Glass Vials, N9, 1.5 ml, Gewindehals (Macherey-Nagel)
- ❖ Kinetex LC-Säule (2.6 µm XB-C18; 100 x 2.1 mm; 100 Å)
- ❖ Plastikbeutel (VWR Chemicals)
- ❖ Schraubenkappen, Butyl/PTFE, (Kimble)
- ❖ Schraubenkappen, Mittelloch, PTFE (Macherey-Nagel)
- ❖ Schirmer Plus-Teststreifen für Schirmer-Test (Grecis, Frankreich)
- ❖ Set von Gilson Pipetman Pipetten (10 µL, 20µL, 100 µL, 200µL, 1000µL)

3.1.2. Reagenzien

- ❖ Acetonitril HiPerSolv Chromanorm, LC-MS Grade (VWR Chemicals, Deutschland)
- ❖ Ameisensäure, LC-MS Grade (VWR Chemicals, Deutschland)
- ❖ Methanol, LC-MS Grade (Honeywell International Inc., USA)
- ❖ Wasser, LC-MS Grade (VWR Chemicals, Deutschland)
- ❖ N₂-Gas

3.1.3. Standards

Tabelle 1: Interne Standards für Metaboliten und Lipiden (82)

	Interne Standards	Abkürzung	c[pg/μl]	Herstellungs-Unternehmen
Metaboliten	Caffeine-trimethyl-D9	CF-D9	1	Sanova Pharma
	N-acetyl-tryptophan		1	
Lipide	15S-Hydroxyeicosatetraensäure-D8	HETE-D8	6.67	Cayman Europe (Tallinn, Estland)
	12S- Hydroxyeicosatetraensäure-D8	HETE-D8	6.67	
	5-Oxo-Eicosatetraensäure-D7	5-oxo-ETE-D7	20	
	Prostaglandin E2-D4	PGE2-D4	13.33	
	20- Hydroxyeicosatetraensäure-D6	20-HETE-D6	6.67	
	11,12-Dihydroxy-5,8,14-eicosatriensäure-D11	11,12-DiHETre-D11	6.67	

3.1.4. Instrumenten

- ❖ Duo Plus Paket mit miVac Duo, miVac Duo Pumpe and miVac Speed Trap (Genevac SP Scientific)
- ❖ Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Scientific)
- ❖ Thermomixer Comfort 1.5 mL (Eppendorf)
- ❖ Vanquish UHPLC System (Thermo Scientific)
- ❖ Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Inc.)
- ❖ Zentrifuge 5424 (Eppendorf)

3.1.5. Software

- ❖ Compound Discoverer 3.1 (Thermo Scientific)
- ❖ Skyline 21.1 (Mac Coss Lab)
- ❖ Perseus 1.6.6.0 (Max Plank)

3.2. Methoden

Die Tränenproben wurden im Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien (AKH) von gesunden Probanden und T2DM-Patienten genommen. Die Tränen wurden auf das Vorhandensein von Eikosanoiden und Metaboliten untersucht. Um so viele dieser Moleküle wie möglich zu identifizieren, wurde ein ungezieltes Screening durchgeführt. Die Proben wurden von beiden Augen entnommen und analysiert.

Die Auftrennung und Messung der Analyten erfolgten mittels UHPLC, die an die Q Exactive HF gekoppelt war. Dabei wurde für die UHPLC-Analyse eine Reversed-Phase-Säule verwendet. Als Ionisierungsquelle für positive und negative Ionisation wurde eine ESI-Quelle eingesetzt, wobei der Nachweis des Analyten anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses mit dem Orbitrap-Massenanalysator erfolgte.

Mithilfe von Fragmentierungsspektren wurden die nachgewiesenen Verbindungen identifiziert und zusätzlich manuell überprüft. Zur Kontrolle wurden die Datenbanken verwendet. Abschließend erfolgte Quantifizierung und statistische Datenverarbeitung.

3.2.1. Klinische Studien

Im AKH wurden zwei Studien in der Abteilung für Klinische-Pharmakologie durchgeführt: "Diagnostische-Augentropfen" sowie "Diabetes Type II Sauerstoff Extraktion" (siehe Tabelle 2). Alle Probanden erteilten ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an diesen Studien und alle durchgeführten Experimente wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Wien genehmigt. In der Tabelle 3 sind T2DM-Patienten, deren Status und Medikation aufgelistet.

Tabelle 2: Überblick über zwei verschiedene Studien während dieser Masterarbeit

Name der Studie		Beschreibung
1.	Diagnostische-Augentropfen	➤ Wirkung diagnostischer Augentropfen auf die Tränenfilmdicke ➤ Einmalige Gabe ➤ Gesunde Teilnehmer
2.	Diabetes Type II Sauerstoff Extraktion	➤ Wirkung von DM auf den retinalen Blutfluss und den Sauerstoffverbrauch ➤ T2DM-Patienten

❖ Diagnostische Augentropfen

Da die Augentropfen (Novain®, Minims Oxybuprocaine Hydrochloride®, Thilorbin® und Minims®) für verschiedene Untersuchungen und chirurgische Eingriffe essenziell sind, wurde ihre Wirkung nach einmaliger Gabe bei gesunden Patienten auf die Tränenfilmdicke untersucht. Insgesamt wurden 20 gesunde Personen für diese Studie rekrutiert. Für diese Studie waren bis zu fünf Besuche erforderlich. Dies beinhaltete eine einstündige Voruntersuchung und vier Studientage von jeweils ungefähr fünf Stunden. Die Voruntersuchung beinhaltet die Erhebung personenbezogener Daten (darunter Alter: 24 ± 6 , BMI: 22 ± 6 und Geschlecht), Ermittlung ihrer Krankengeschichte (inklusive Allergien), Schwangerschaftstest bei Frauen, sowie detaillierte Augenuntersuchung beider Augen. Visite zwei beinhaltete den Schwangerschaftstest bei Frauen, Messung der Tränenfilmdicke mittels Optische-Kohärenztomographie, Messungen der Lipidschichtdicke, Sensibilitätsmessung der Hornhaut, Augenuntersuchung und Schirmer-Test-I.

❖ Diabetes Type II Sauerstoff Extraktion

Diese Studie umfasste die Messung des totalen retinalen Blutflusses, sowie der Sauerstoffextraktion bei T2DM-Patienten. DM kann diabetische Retinopathie verursachen und dies kann Auswirkungen auf den Blutfluss der Netzhaut (retinalen Blutfluss) und den Sauerstoffverbrauch (Sauerstoffextraktion) im Auge haben. Insgesamt wurden im Zuge meiner Masterarbeit 8 T2DM-Patienten untersucht. Die Voruntersuchung inkludierte die Erhebung personenbezogener Daten (darunter Alter: 64 ± 9 , BMI: 32 ± 4 und Geschlecht), Ermittlung ihrer Krankengeschichte, Schwangerschaftstest bei Frauen, Messung des Blutdrucks und Puls, Blutabnahme zur Bestimmung des Langzeitzuckers (HbA1c), des Blutzuckerwertes und des Blutfarbstoffes (Häm), detaillierte Augenuntersuchung beider Augen inklusive Sehtest. Der Studientag inkludierte Schwangerschaftstest bei Frauen, Elektroretinogramm, Verabreichung von Mydriatikum (pupillenerweiternde Augentropfen), Bestimmung des Blutzuckerwertes, Sauerstoffsättigung des Blutes mittels Stiches im Ohrläppchen, Messung der Durchblutung der Netzhaut, Sauerstoffsättigung und Nervenfaserschichtdicke.

Tabelle 3: Liste der T2DM-Patienten, Status und Medikation (82)

Donor	Nüchternglucose [mg dL ⁻¹]	HbA1c [%]	Status (Anzeichen der Retinopathie)	Medikation
35	138	5.8	Keine Zeichen	Metformin
50	222	7.8	Leichte Symptome	Metformin
53	198	7.6	Leichte Symptome	Concor (Bisoprolol)
60	148	6.6	Mittelschwere bis schwere Symptome	Metformin
61	162	6.8	Mittelschwere bis schwere Symptome	Xigduo (Metformin), Gabapentin
64	212	7.3	Keine Zeichen	Metformin, Sitagliptin
97	-	6.8	Keine Zeichen	Metformin, Pioglitazon
103	162	7.3	Keine Zeichen	Eucreas (Metformin, Vidagliptin)

3.2.2. Schirmer Test

Die Tränenproben wurden im AKH Krankenhaus mittels Schirmer-Teststreifen gesammelt. Der Schirmer-Test-I, der üblicherweise ohne Anästhesie durchgeführt wird, stellt am weitesten verbreitete Technik zur Beurteilung der Tränenmenge dar (83). Bei diesem Test werden 5 mm breite und 35 mm lange Filterpapierstreifen, die aus Lackmuspapier bestehen, angewendet (83).



Abbildung 9: Schirmer-Test (84)

Diese Teststreifen werden unter das Unteraugenlid in den Bindehautsack positioniert und bis der Filter voll ist, aber maximal 5 Minuten lang an dieser Stelle gehalten (siehe Abbildung 12) (83). Dabei schauen die Spender nach oben, um den Teststreifen an der entsprechenden Stelle ablegen zu können. An beiden Augen wurde parallel der Schirmer-Test durchgeführt. Nachdem die Teststreifen richtig positioniert sind, wurden die Spender gebeten, ihre Augen ohne zusätzlichen Druck sanft zu schließen. Nach 5 Minuten wurden die Spender angewiesen, ihre Augen wieder zu öffnen und die Teststreifen wurden entfernt. Abschließend wurden die Schirmer-Teststreifen in 2-mL-Glasfläschen (Aglient Technologies, USA) überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.3. Probenvorbereitung

Die Proben wurden zunächst aufgetaut. Auf das Filterpapier wurden 5 µL deuterierter Standardmischung, der aus einer Mischung von internen Standards, nämlich 15S-HETE-D8, 12S-HETE-D8, PGE2-D4, 5-oxo-ETE-D7, 20-HETE-D6, 11,12-DiHETre-D11 besteht, pipettiert (82). Die Konzentrationen der verwendeten internen Eikosanoid-Standards sind in Tabelle 1 aufgeführt. Danach wurden 300 µL 80 % MeOH vorsichtig auf dem ganzen Filterpapier pipettiert, die Proben wurden gevortext und für eine halbe Stunde auf den Shaker gestellt. Nachdem die Extraktion abgeschlossen war, wurde der Überstand in ein neues HPLC-Glas-Vial (Marcherey-Nagel GmbH & Co. KG) transferiert. Die Proben wurden dann unter sanftem Stickstoffstrom getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Proben in 200 µL einer Rekonstitutionslösung, bestehend aus 5% MeOH, 0,2% Ameisensäure, Caffeine-(trimethyl-D9) (CF-D9) und N-acetyl-tryptophan, resuspendiert. Danach wurden die Proben in V-förmige-Glaseinsatz überführt und zurück in die beschrifteten HPLC-Glas-Vials gegeben. Abschließend folgte die LC-MS/MS Analyse. Als Blindkontrollen dienten Schirmer-Streifen ohne Tränen, die auf die gleiche Weise wie die Proben behandelt wurden.

3.2.3.1. Interne Standards

3.2.3.1.1. Metabolit-Interne Standards

Um die eventuelle Messungenauigkeiten ausgleichen zu können, wurde als interner Standard für den positiven Ionisationsmodus von Metaboliten CF-D9 eingesetzt. CF-D9 wurde in einer Konzentration von 1 pg/µL der Extraktionslösung zugesetzt. N-Acetyl-Tryptophan wurde in einer Konzentration von 1 pg/µL für den negativen Ionisationsmodus von Metaboliten als interner Standard verwendet.

3.2.3.1.2. Eikosanoid-Interne Standards

Die für die Eikosanoidanalyse verwendeten internen Standards sind in Tabelle 4 aufgeführt. Sie wurden den Proben vor der Extraktion zugesetzt und wurden daher als „EikosanoidPreMix“ bezeichnet. „EikosanoidPreMix“-Aliquots wurden bei -80°C gelagert und daher jedes Mal aufgetaut, bevor sie den Proben zugesetzt wurden. Die „EikosanoidPreMix“ wurde aus den in der Tabelle 4 aufgeführten Mengen an Stammlösungen hergestellt und mit ACN auf 500 µL aufgefüllt. Danach wurden die in 70 µL Aliquots aufgeteilt und bei der Temperatur von -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 4: Endkonzentrationen der internen Standards von „EikosanoidPreMix“ (82)

Verbindung	Volumen der Stammlösung (µL)	Endkonzentration in 500 µL ACN (ng/mL)
15S-HETE-d8	4	200
12S-HETE-d8	4	200
5-oxo-EETE-d7	12	600
PGE2-d4	8	400
20-HETE-d6	4	200
11,12-DiHETre-d11	4	200

3.3. UHPLC-MS

Die Proben wurden mittels Q Exactive HF mit dem Vanquish UHPLC-System (beides von Thermo Fischer Scientific) auf Eikosanoiden und Metaboliten untersucht. Als Ionisationsquelle wurde ESI verwendet. Die Einstellungen des LC-Systems waren für die Metaboliten und Eikosanoide unterschiedlich und sind in Tabelle 5 aufgelistet.

❖ LC-Systemeinstellungen für die Metabolitenanalyse

Für die Metabolitenanalyse wurde eine Reversed Phase-UHPLC-C18-Säule von KINETEX (2,6 µm, 100 x 2.1 mm, 100 Å) angewendet. Mobile Phase A bestand aus Wasser mit 0,2 % Ameisensäure (FA), während die mobile Phase B aus Methanol (MeOH) und 0,2 % FA bestand. Die Gesamtlauzeit betrug 7,5 min. Dabei war das exakte Elutionsgradientenprotokoll wie folgt: 0.0-0.3min 1-5% B, 0.3 – 4.5 min 5-40% B, 4.5 – 6.9 min 80% B und Re-Equilibrationsphase von 1.6 min bei 1% B, was in einer gesamten Messmethode von 7,5 min entspricht. Das Injektionsvolumen war 10 µL und es wurde eine Flussrate von 0,5 mL/ min eingestellt. Für das Waschen von Nadel und die Rückspülen der Kolben wurde 10 % MeOH verwendet.

❖ LC-Systemeinstellungen für die Eikosanoidanalyse

Für die Eikosanoidanalyse wurde eine Reversed Phase-UHPLC-C18-Säule von KINETEX (2,6 µm, 150 x 2.1 mm, 100 Å) angewendet. Mobile Phase A bestand aus Wasser mit 0,2 % FA, während die mobile Phase B aus 90% Acetonitril (ACN), 10 % MeOH und 0,2 % FA bestand. Das exakte Elutionsgradientenprotokoll war wie folgt: 1 min 35% B, 1-10 min 35-90% B, 10-13,25 min 99% B und dann Rückkehr zum Ausgangszustand (35% B). Die gesamte Methode betrug insgesamt 20 min. Das Injektionsvolumen betrug 20 µL und es wurde eine Flussrate von 0,2 mL min⁻¹ eingestellt. Für das Waschen von Nadel und die Rückspülen der Kolben wurden 75 % Isopropanol und 0,2 % FA verwendet.

Tabelle 5: LC-Systemeinstellungen (82)

	Metaboliten	Eikosanoide
Injektionsvolumen	10 µL	20 µL
A	H2O + 0,2 % FA	H2O + 0,2 % FA
B	MeOH + 0,2 % FA	90 % ACN, 10% MeOH + 0,2 % FA
Flussrate	0,5 mL/min	0,2 mL/min
Sampler Wash	10 % MeOH	75 % Isopropanol, 0,2 % FA

❖ MS-Systemeinstellungen für die Metabolitenanalyse

Zur Identifizierung wurde ein ungezielter Ansatz verwendet und die Metaboliten wurden im positiven und negativen Modus gemessen. Der MS-Scanbereich betrug zwischen 100 und 1000 m/z , während die Auflösung auf 60.000 (bei m/z von 200) eingestellt wurde. Nach der „Top-4-Methode“ wurden vier der abundantesten Ionen des vollständigen Scans zur weiteren Fragmentierung ausgewählt. Die Fragmentierung fand in der HCD-Kollisionszelle mit 30 eV Kollisionsenergie statt. Ein dynamischer Ausschluss von 6 Sekunden wurde für die Messung von weniger vertretener Metaboliten angewendet. Die Auflösung-Einstellungen für den MS2 waren 15.000.

❖ MS-Systemeinstellungen für die Eikosanoidanalyse

Die Eikosanoide wurden im negativen Modus gemessen. Durch den Quadrupol-Massenfilter der Q Exactive HF wurden Eikosanoid-Ionen mit m/z Werten zwischen 250 und 700 durchgeleitet. Nach der „Top-2-Methode“ wurden zwei der abundantesten Ionen des vollständigen Scans zur weiteren Fragmentierung ausgewählt. Die Fragmentierung fand in der HCD-Kollisionszelle mit 24 eV Kollisionsenergie statt. Ein dynamischer Ausschluss von 2 Sekunden wurde für die Messung von weniger abundanten Eikosanoide angewendet. Die Auflösung-Einstellungen waren identisch zur Auflösung-Einstellung der Metaboliten und sind in der Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: MS-Systemeinstellungen (82)

	Metaboliten	Lipiden
Ionisation Mode	Pos + neg	Neg
Scan Bereich	100-1000 m/z	250-700 m/z
Resolution	60.000 MS1,15.000 MS2	60.000 MS1,15.000 MS2
CE	30 eV	24 eV
Top	4	2
Dynamic exclusion	6 sec	2 sec

3.4. Datenerfassung und -interpretation

Die Rohdaten wurden zunächst in der Compound Discoverer Software 3.1. (Thermo Fisher Scientific) geladen. Für die Identifizierung wurde ein user-definierter Workflow-Tree erstellt, mit Hilfe dessen die Metabolite identifiziert wurden. Die identifizierten Verbindungen wurden manuell mit einem Xcalibur 4.0 Qual Browser (Thermo Fisher Scientific) überprüft und mit der Spektrenbibliothek (mzcloud - Copyright © 2013–2021 HighChem LLC, Slowakei) verglichen. Die Eikosanoid-MS2-Spektren wurden mit Referenzspektren aus LipidMaps verglichen. Die maximale Massentoleranz betrug 5-10 ppm. Die Peakintegration und Berechnung der Peakflächen erfolgte mit dem Tracefinder Software 4.1 (Thermo Fischer Scientific). Für das Skyline 21.1 (MacCossLab)-Software wurde zunächst eine Übergangsliste in Excel erstellt. Die Übergangsliste bestand aus Vorläufer (m/z), Vorläuferaddukt, Vorläuferladung und expliziter Retentionszeit. Abschließend wurde die Liste in der Skyline-Software geladen und die Übergangseinstellungen wurden angepasst: Ionenübereinstimmungstoleranz von 0.5 m/z , Auflösungsvermögen für MS1-Filterung von 60.000 bei 200 m/z und Auflösungsvermögen für MS/MS-Filterung von 15.000 bei 200 m/z . Als massenspektrometrische Methode wurde die Datenunabhängige Aquisition (DDA) ausgewählt und es wurde hochselektive Extraktion verwendet. Bei der Retentionszeitfilterung wurden nur Scans, die innerhalb der 5 Minuten von MS/MS vorliegen, angewendet. Für die Quantifizierung wurden folgende Einstellungen gewählt: Regression-Fit -> linear in Logbereich, als Normalisierungsmethode -> abgeglichene Mediane, Regressionsmodell -> $1/(x*x)$. Perseus 1.6.6.0 (Max Plank) wurde für multivariate Analysen (PCA und Vulkandigram) verwendet, während Origin Software für univariate Analysen (t-Test, Wilcoxon-Rangtest und Mann-Whitney-Test) verwendet wurde.

4. Ergebnisse und Diskussion

Das Ziel dieser Masterarbeit war die Untersuchung der metabolischen Erkrankung-T2DM mit Hilfe von LC-MS Tränenfilm-Analysen. Insgesamt 20 gesunde Probanden und 8 T2DM-Patienten nahmen an dieser Studie teil, wobei das Vorhandensein von Metaboliten und Eikosanoiden in den Tränenproben untersucht wurde. Schließlich wurden die Proben von gesunden Probanden mit den Proben der Typ-II-Diabetikern miteinander verglichen, um herauszufinden, welche Eikosanoide und Metaboliten mit Diabetes-Typ-II in Verbindung gebracht werden können. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Tränenproben für die zukünftige metabolische Studien von Vorteil sein können. Die Sammlung der Proben wurde mit Schirmer-Streifen durchgeführt und diese Stichprobenmethode erwies sich als nicht-invasiv und schnell. Die Tränen wurden von beiden Augen gesammelt und mehrfach von einzelnen gesunden Teilnehmern gespendet, so dass wir insgesamt 127 Proben von gesunden Probanden und 16 von Diabetikern hatten. Schließlich wurden die Tränenproben mit LC-MS analysiert. Insgesamt wurden in dieser Studie 70 Eikosanoide (siehe Tabelle 7) und 226 Metaboliten (siehe Tabelle 8) identifiziert.

4.1. Eikosanoide

In der Erwägung, dass Eikosanoide, sogenannte Mediatoren von zahlreichen Entzündungsreaktionen, in Tränenproben gefunden und nachgewiesen wurden, kann dies bei weiteren diagnostischen Studien sehr hilfreich sein. Dies kann ein besseres Verständnis der verschiedenen Stadien unterschiedlicher Krankheiten ermöglichen und somit zu neuen Zusammenhängen und zur Erfindung der Krankheitsursachen führen. Eikosanoide, die erfolgreich in der Tränenflüssigkeit identifiziert wurden, sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Nachgewiesene Eikosanoide in Tränenflüssigkeit (82)

Eikosanoide		
Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H]-
11-HDoHE	10,5	343,2279
11S-HETE	10,48	319,2279
12.13-DiHOME	8,5	313,2384
12S-HETE/8S HETE	10,62	319,2279
12S-HHTrE	8,8	279,1966
14,15-DiHETrE	8,8	337,2384
14-HDoHE and 10-HDoHE	10,5	343,2279
15S-HETE	10,21	319,2279
15S-HETrE	10,98	321,2435
16-HETE	9,93	319,2279
17-HDoHE	10,35	343,2279
18-HETE	9,8	319,2279
20-HETE	9,7	319,2279
313_10.40	10,4	313,2384
313_10.45	10,55	313,2384
313_10.75	10,75	313,2384
313_12.47	12,47	313,2384
313_8.24	8,24	313,2384
317_10.65	10,65	317,2122
319_10.31	10,31	319,2279
319_11.07	11,07	319,2279
319_11.45	11,55	319,2279
319_8.85	8,85	319,2279
333_9.2	9,2	333,2071
335_6.88	6,88	335,2228
335_7.02	7,02	335,2222
335_8.71	8,71	335,2228
335_9.77	9,77	335,2228
335_9.86	9,86	335,2228
337_9.84	9,84	337,2384
343_10.07	10,07	343,2278
359_9.88	9,88	359,2228
3-HOTrE_9.39	9,48	293,2122
4-HDoHE	10,9	343,2279
5-HEPE	9,91	317,2122
5S-HETE	10,82	319,2279
6trans-LTB4	7,89	335,2222

Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H]-
7-HDoHE	10,65	343,2279
8-HDoHE	10,72	343,2279
9(R) _13(R)-HODE_EPOME mix	10,1	295,2279
9.10-DiHOME	8,66	313,2384
9-HEPE	9,84	317,2122
9-HETE	10,73	319,2279
9-HOTrE_9.26	9,26	293,2122
9-HpODE_9.91	9,91	311,2228
Arachidonsäure	12,68	303,233
Adreninsäure_13.26	13,36	331,2643
Adreninsäure_13.36	13,36	331,2643
Adreninsäure_13.46	13,4	331,2643
Adreninsäure_8.82	8,82	331,2643
a-Linolensäure	12,45	277,2173
DGLA_13.03	13,03	305,2486
DGLA_13.12	13,22	305,2486
DGLA_13.2	13,2	305,2486
DHA	12,52	327,233
DHA_12.60	12,7	327,233
DPA	12,8	329,2486
DPA_12.97	13,07	329,2486
EPA	12,26	301,2173
g-Linolensäure	12,4	277,2173
HETrE_10.77	10,77	321,2435
HHTrE_5.89	5,89	279,1966
HHTrE_8.81	8,81	279,1966
HHTrE_9.22	9,22	279,1966
HpODE_7.71	7,71	311,2228
HpODE_7.86	7,86	311,2228
Linolensäure_12.82	12,82	279,233
Palmitinsäure	13,47	255,233
Stearidonsäure_11.63	11	275,2017
Stearidonsäure_12.00	12	275,2017

Beim Vergleich von Proben der gesunden Probanden und T2DM-Patienten wurden in der Hauptkomponentenanalyse keine Cluster-Bildung zwischen den beiden Gruppen bei den in Tränen vorhandenen Eikosanoiden festgestellt (siehe Abbildung 10).

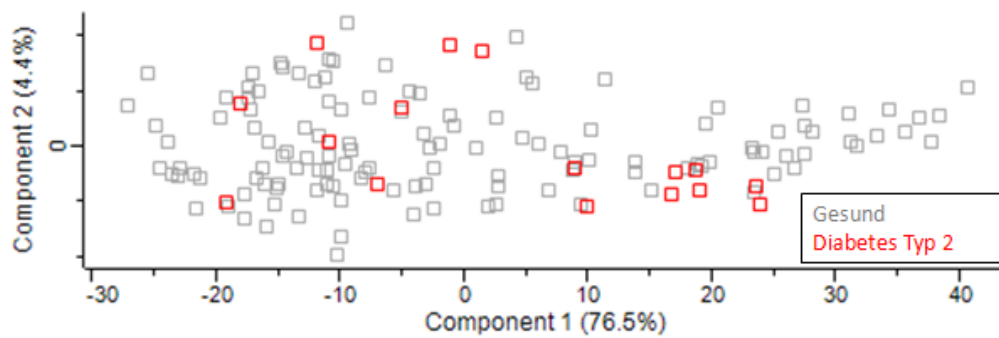


Abbildung 10: Hauptkomponentenanalyse von Eikosanoide

Mit Hilfe eines Vulkan-Diagramms von Eikosanoiden, das die statistische Signifikanz (P-Wert) in Bezug zum Ausmaß der Änderung (Unterschied Diabetes-Gesund) zeigt, wurde auch bestätigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den gesunden Teilnehmer und Diabetikern vertreten sind (siehe Abbildung 11).

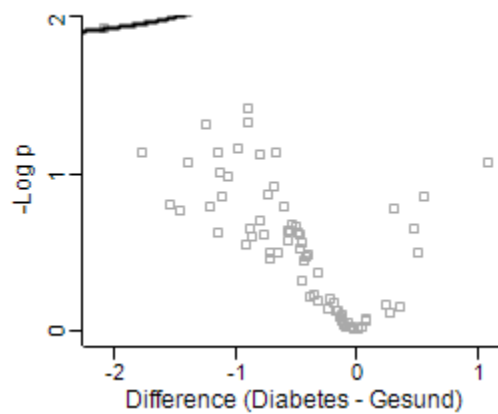


Abbildung 11: Vulkan-Diagramm der Eikosanoide

4.2. Metabolite

Metabolite, die erfolgreich in der Tränenflüssigkeit identifiziert wurden, sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Nachgewiesene Metaboliten in Tränenflüssigkeit (82)

Metaboliten		
Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H] ⁺
11 β -Hydroxyandrosteron	5,7	307,22677
12-Aminododecansäure	5,47	216,19581
13-OxoODE	5,88	317,20872
15-Deoxy- Δ 12,14-PG D2	6,11	317,21112
16 α -Hydroxyestron	5,8	287,16417
19-Norandrostenedion	6,26	273,18491
19-Nortestosteron	5,7	275,20056
1-Methylxanthin	1,7	167,05635
2,3-Dihydroxybenzoesäure	2,46	155,03389
2-Acetamidophenol	1,98	152,07061
2-Hydroxybuttersäure	5,29	105,05462
337,2	3,71	337,09179
337,3	3,92	337,09179
337,4	4,07	337,09179
3-Hydroxyanthranilsäure	1,22	154,04987
3-Hydroxycotin	0,55	193,09715
3-Methylxanthin	1,6	167,05635
3-Phenyllaktischesäure	4,02	167,07027
3-Pyridyllessigsäure	2,54	138,05496
4-Methoxyzimtsäure	5,38	179,07027
4-Methylumbelliferon	3,58	177,05462
5-Acetylamino-6-formylamino-3-methyluracil (AFMU)	1,07	227,07748
5-Amino-nicotinsäure	0,5	139,0502
5-OxoETE	6,44	319,22677
5-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure	2,91	275,04849
7,8-Dihydrobiopterin	0,95	240,10912
7-Methylxanthin	1,48	167,05635
7-Hydroxytestosteron	6,1	305,21112
Acetamidrid	5,66	223,0745
Adenosin	1,12	268,10403
Allantoin	0,44	159,05127
Anatabin	0,63	161,10732
Arginin	0,38	175,11895
Ascorbat	0,48	199,02131

Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H] ⁺
Ascorbinsäure	0,48	177,03936
Asparagin	0,38	133,06077
Asparaginsäure	0,4	134,04478
Benzoguanamin	2,44	188,09307
Benzoylecgonin	3,56	290,13868
Betain	0,5	118,08626
Betaxolol	5,31	308,22202
Biopterin	1,08	238,09347
Bisoprolol	4,72	326,23258
Bisphenol S	4,5	251,03726
Caffein	3,21	195,08765
Caffein d9	3,17	204,14414
Caffein-Na	3,28	217,0696
Camphor	5,8	153,12739
Carnitin	0,39	162,11247
Catechin	2,59	291,08631
Cetrimonium	5,54	284,33118
Chelidonin	5,3	354,1336
Chlorogensäure	3	355,10236
Chlorogensäure - Isomer 2	2,82	355,10236
Chlorogensäure - Isomer 1	2,28	355,10236
Chlorogensäure - Isomer 3	3,24	355,10236
Chlorpheniramin	3,86	275,13095
Citral	5,76	153,12739
Citrinin	3,92	251,0914
Citrullin	0,44	176,10297
Cortisol	5,76	363,2166
Cortisone	5,42	361,20095
Cotinin	0,8	177,10224
Coumarin	4,6	147,04406
Creatin	0,41	132,07675
Creatinin	0,42	114,06619
Cycloleucylprolyl	4,21	211,1441
Cystathionin	5,66	223,0747
Cystein	0,41	122,02703
Debrisoquin	2,14	176,11822
Desmethyldramadol	5,54	250,18016
Desthiobiotin	4,38	215,13902
Dihydromorphin	5,53	288,15942
Diphenhydramin	4,98	256,16959
Doxylamin	2,32	271,18049

Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H] ⁺
Dulcitol	0,46	183,08631
Enilconazol	5,31	297,0556
Epicatechin	3,49	291,08631
Epinephrin	0,44	184,09682
Ergothionein	0,53	230,09577
Escitalopram	5,13	325,17107
Estradiol	6,29	273,18491
Estron	5,61	271,16926
Fenpropimorph	5,34	304,26349
Fluconazol	4,39	307,11134
Gentisinsäure	2,46	155,03389
Glukose	0,44	181,07066
Glutamin	0,39	147,07642
Glutamyl-glutaminsäure	0,57	277,10303
Glutathion (red.)	0,68	308,09108
Glycl-L-Leucin	1,48	189,12337
Hesperidin	5,27	611,19705
Hexadecanamid	6,35	256,26349
Hexanoylcarnitin	3,02	260,18563
Histamin	0,34	112,08692
Histidin	0,4	156,07675
Hydrocortison	5,45	362,20878
Imazamox	4,88	306,14483
Imidazol-essigsäure	0,42	127,0502
Indol-2-carbonsäure	5,34	162,05496
Indol-3-carbaldehyd	4,32	146,06004
Indol-3-carbonsäure	4,34	162,05496
Indole-3-milchsäure	4,2	206,08117
Indole-3-propionsäure	5,31	190,08626
Isoferulinsäure	3,63	195,06519
Isoimperatorin	5,84	271,09649
Isoleucin	0,9	132,10191
Kahweol	6,23	315,19547
Kojisäure	1,11	143,03389
Kynurensäure	3,62	190,04987
Kynurenin	1,34	209,09207
Laktose	0,57	343,12349
L-DOPA	0,71	198,07608
Leucin	0,94	132,10191
Levetiracetam	2,42	171,1128
L-Glutaminsäure	0,41	148,06043
Lidocain	2,62	235,18049

Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H]⁺
Loperamid	4,13	477,23033
Loratadin	3,89	383,15208
L-Phenylalanin	1,49	166,08626
Lysin	0,37	147,1128
Maltol	1,63	127,03897
Maltose	0,46	343,12349
Melamin	0,41	127,07267
Melatonin	4,64	233,12845
Metformin	0,45	130,10872
Methionin	0,62	150,05833
Methionin Sulfoxide	0,41	166,05324
Methylguanosin	1,73	299,12242
N-acetyl-4-aminoantipyrin	3,15	246,1237
N-acetyl-ciprofloxacin	3,05	374,15106
N-Acetyl-DL-serin	0,55	148,06043
N-Acetylhistamin	0,53	154,09749
N-Acetylserotonin	2,91	219,1128
N-Acetyltryptophan	4,4	247,10772
Naproxen	5,55	231,10157
Naringin	5,15	581,18648
Neohesperidin	5,31	611,19705
Neopterin	0,63	254,08838
Neosolaniol	3,36	405,15199
N-formyl-4-aminoantipyrin	3,15	232,10805
Nicotin	0,6	163,12298
Nicotinsäure	0,65	124,0393
Nitrazepam	4,2	282,08732
N-methyl-4-aminoantipyrin	1,93	218,12879
Nobiletin	5,58	403,13874
Nootkaton	6,05	219,17434
Norcodein	4,14	286,14377
Norfenantyl	2,79	233,16484
Norgestrel	6,24	313,21621
Norleucin	1	132,10191
Octadecanamid	5,56	284,29479
Octocrylen	6,39	362,21146
Oleamid	6,03	282,27914
Ornithin	0,36	133,09715
Oxybenzon	5,76	229,08592
Oxybuprocain	4,67	309,21727
Palbociclib	4,73	448,24555
Panthenol	2,03	206,13868

Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H]⁺
Panthothenat	2,03	260,08054
Panthothensäure	1,98	220,11795
Pantoloc	5,31	384,08241
Paracetamol	1,96	152,07061
Paraxanthin	2,45	181,072
Phenetylamin	1,41	122,09643
Pheniramin	2,34	241,16993
Phenyllessigsäure	4,51	137,05971
Picolinsäure	0,7	124,0393
Pioglitazon	4,92	357,12674
Pipecolinsäure	0,58	130,08626
Pipecolininsäure	0,58	130,08626
Piperacillin	5,38	518,1704
Pregabalin	1,99	160,13321
Prochloraz	5,77	376,03809
Progesteron	5,98	315,23186
Prolin	0,44	116,07061
Prolinbetain	0,55	144,10191
Prolinamid	0,42	115,08659
Prolylglycin	0,48	173,09207
Propamocarb	1,55	189,15975
Propoxycain	3,87	295,20162
Prostaglandin A3	5,7	333,20604
Protopin	3,94	354,1336
Pseudoephedrin	1,7	166,12264
Pyridoxal	0,55	168,06552
Pyridoxamin	1,7	169,09715
Pyridoxin	0,65	170,08117
Pyroglutaminsäure	0,8	130,04987
Chinasäure	0,51	193,07066
Raffinose	0,52	505,17631
Ropivacain	3,8	275,21179
Salsolinol	0,74	180,10191
Sebacinsäure	5,4	203,12779
Serin	0,37	106,04987
Serotonin	1,07	177,10224
Sitagliptin	3,8	408,12536
Sorbitol	0,42	183,08631
Spermidin	0,35	146,16517
Spermin	0,32	203,22302
Sulfametrol	4,07	287,02671
Tangeritin	5,55	373,12818

Verbindungen	Retentionszeit [min]	Vorläufermasse [M-H] ⁺
Taurin	0,4	126,02194
Tazobactam	2,18	301,06012
Testosteron	5,75	289,21621
Testosterone-glucuronid	5,43	465,24829
tetranor-12S-HETE	5,96	267,19547
tetranor-PGJM	4,82	267,196
Theobromin	2,07	181,072
Theophyllin	2,58	181,072
Threonin	0,4	120,06552
Thymin	1,18	127,0502
Timolol	3,6	317,16419
Trazodon	4,32	372,15856
Tributyl-citrat	6,24	361,22208
Tributyl-phosphat	6,07	267,17197
Triethanolamin	0,42	150,11247
Trigonellin	0,42	138,05496
Trimethoprim	2,76	291,14517
Triphenyl-phosphat	5,89	327,07807
Tropicamid	2,97	285,15975
Tryptophan	2,13	205,09715
Tyrosin	0,89	182,08117
Harnsäure	0,7	169,03562
Valin	0,53	118,08626
Vildagliptin	1,8	304,20195

Gewisse Unterschiede wurden zwischen dem Vorhandensein der Metaboliten beobachtet. Mit Hilfe der 2D-Hauptkomponentenanalyse (PCA) konnten signifikante Unterschiede in den Metaboliten zwischen den Tränen von gesunden Probanden und Diabetikern erfolgreich festgestellt werden, wodurch in der PCA beide Gruppen getrennt wurden. Jedoch wurden die Proben von Donor 35 und 64, die zu den Studienteilnehmern mit Diabetes gehörten, eher zu den Proben von gesunden Probanden gruppiert (siehe Abbildung 12). Diese Proben stammten von Patienten, die basierend auf der klinischen Bewertung keine Anzeichen einer diabetischen Retinopathie zeigten, was eine mögliche Ursache für die PCA-Trennung sein könnte. Insgesamt 127 Proben von 20 gesunden Probanden wurden mit PCA analysiert. Die meisten gesunden Probanden spendeten ihre Tränenproben bei verschiedenen Visiten und einige davon wurden in der PCA als Beispiel mit unterschiedlichen Markierungen (blaues, gelbes, violettes Symbol) dargestellt.

Dies zeigte, dass sich die Tränenproben nach einzelner Person und nicht nach dem Zeitpunkt der Probennahme gruppieren (siehe Abbildung 12).

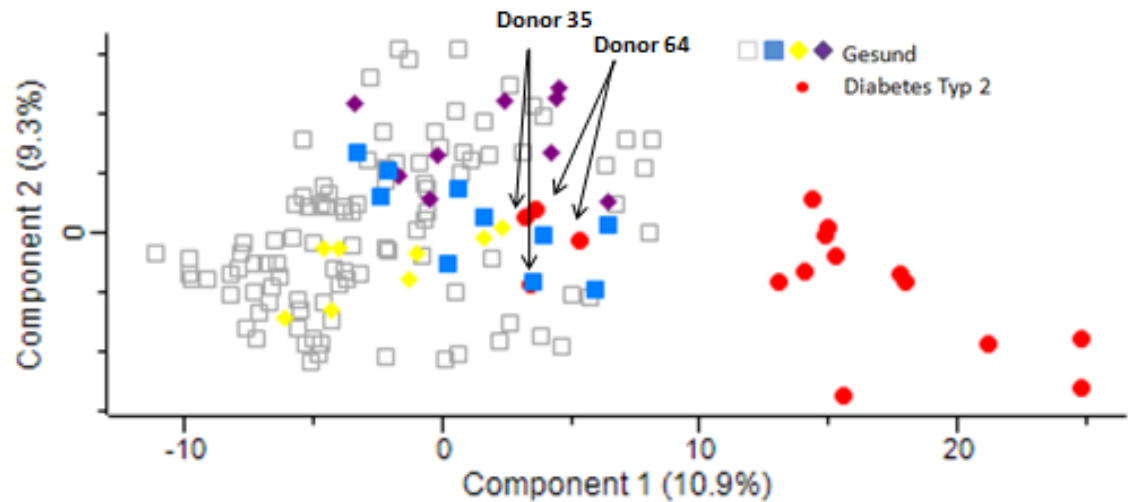


Abbildung 12: Hauptkomponentenanalyse von Metaboliten

Der Loadingsplot zur Hauptkomponentenanalyse zeigte, dass folgenden Medikamente einen großen Einfluss auf die beiden Hauptkomponenten haben: Metformin, Tropicamid und Oxybuprocain. Zusätzlich zu diesen Medikamenten gibt es auch endogene Faktoren, wie Threonin, Citrulin, Glutathion sowie Methionin-Sulfoxid, die auf die Hauptkomponenten 1 und 2 einwirken (siehe Abbildung 13).

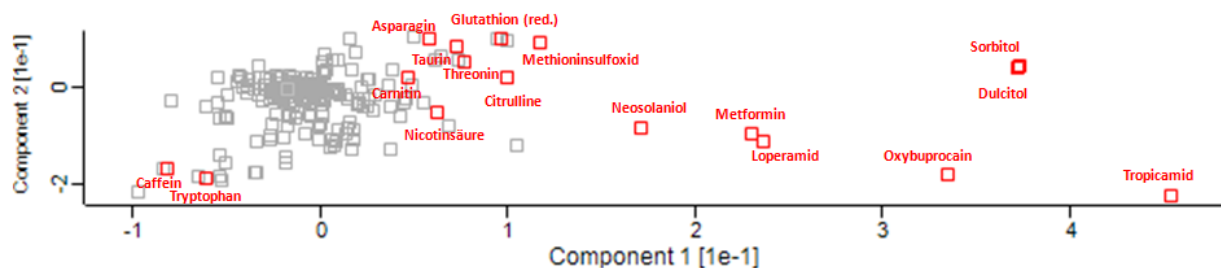


Abbildung 13: Loading-Plot

Auch der Lebensstil der Studienteilnehmer, der durch Sorbitol, Neosolaniol, sowie Caffein beschrieben wurde, zeigte einen Zusammenhang mit der PCA (siehe Abbildung 13). Neosolaniol ist ein Mykotoxin und wird durch Fusarium-Pilze produziert. Dieses Mykotoxin kommt hauptsächlich in Getreide und Brot vor und sein Vorhandensein in Tränen kommt durch die Ernährung zustande. Neben Neosolaniol beschreibt auch der Süßstoff Sorbitol die Lebensweise der Studienteilnehmer. Der Sorbitolgehalt war bei Diabetikern signifikant höher als bei gesunden Probanden, was möglicherweise auf ihre Ernährung zurückzuführen ist, da Sorbitol ein Süßstoff ist, der häufig in Diabetesprodukten eingesetzt wird (siehe Abbildung 14).

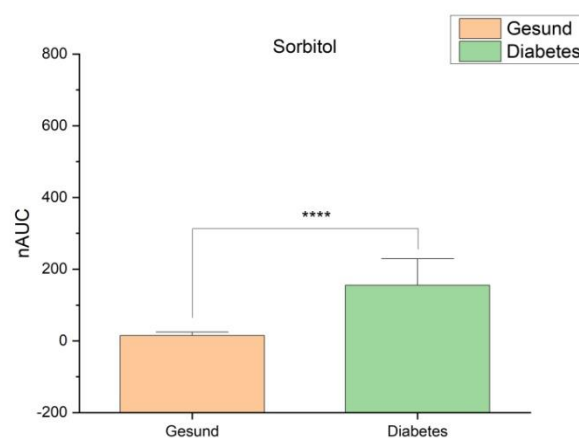


Abbildung 14: Kastengrafiken für Sorbitol (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Für Sorbitol wurde ein Mann-Whitney Test gemacht. ** = p-Wert < 0.0001.**

Bestimmte Einflüsse wurden auch durch körpereigene Stoffwechselprodukte, wie Carnitin und Nicotinsäure verursacht (siehe Abbildung 15). Außerdem wurde auch Loperamid in den Tränen detektiert. Loperamid ist ein Medikament, das zur Behandlung von Durchfallerkrankungen eingesetzt wird. Die Hauptkomponentenanalyse der Metaboliten hat eine erfolgreiche Gruppierung zwischen gesunden Probanden und Diabetikern ermöglicht. Daher hat diese Studie gezeigt, dass die Tränenanalyse eine sehr erfolgreiche Anlage für die prädiktive, präventive und personalisierte Medizin (PPPM) sein kann.

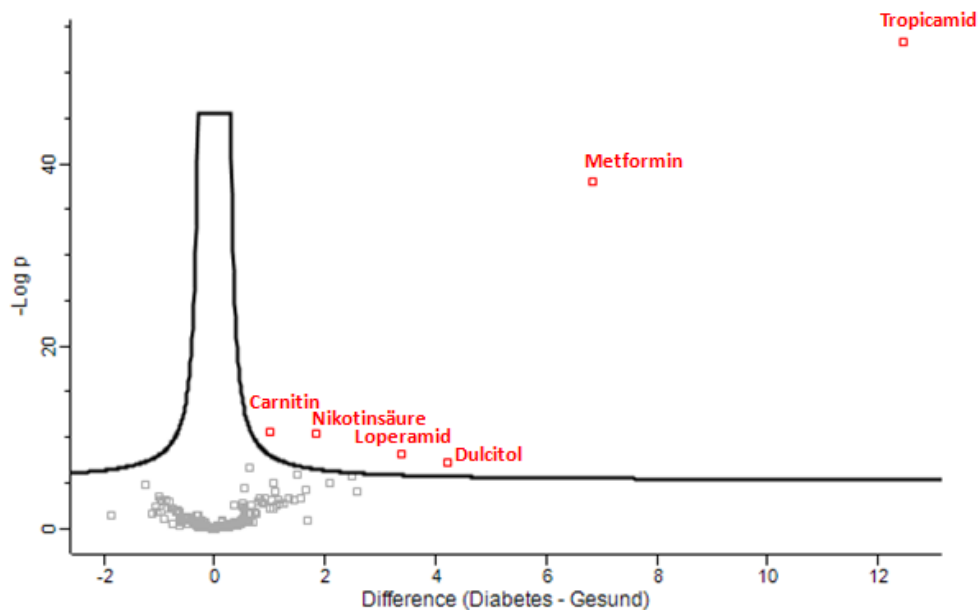


Abbildung 15: Volcano Plot – Metabolite

4.2.1. Medikamente

Sowohl gesunde als auch diabetische Studienteilnehmer erhielten Augentropfen namens Oxybuprocain/Fluorescein (Thilorobin®) zur Messung des Augeninnendrucks. Die LC-MS Analyse zeigte, dass Oxybuprocain in einer signifikant höheren Konzentration in den Tränen von Diabetikern vorhanden war (siehe Abbildung 16). Der Grund dafür könnte sein, dass der Thilorobin®-Wirkstoff aus den Augen von Diabetikern nicht so effektiv abgebaut/ausgeschieden wird wie bei gesunden Teilnehmern. Metformin hingegen stellt ein individuelles Medikament für T2DM-Patienten dar. Durch LC-MS-Analyse wurde Metformin erfolgreich in den Tränen beider Augen von insgesamt sieben T2DM-Patienten (n=14) nachgewiesen (siehe Abbildung 16).

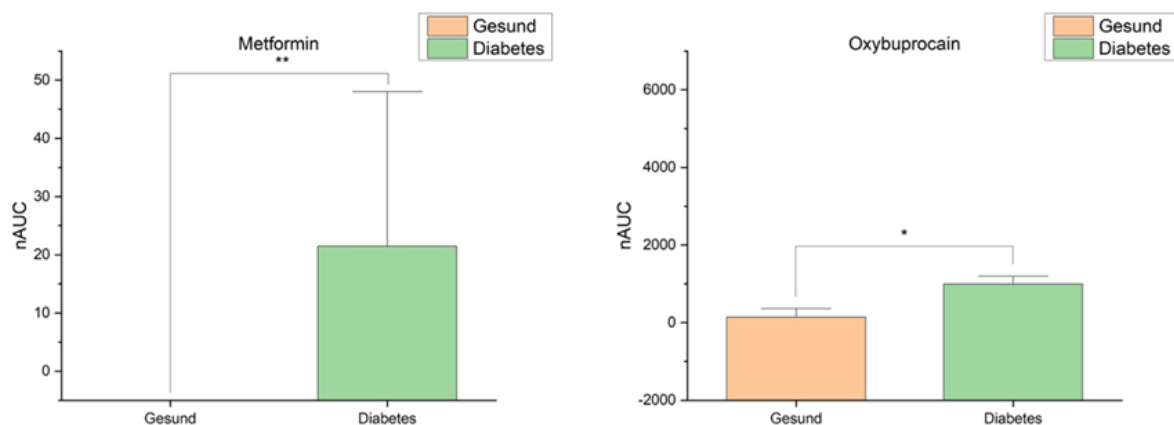


Abbildung 16: Kastengrafiken für Metformin (n = 14 für Diabetes) und Oxybuprocain (n = 16 für Diabetes und n = 49 für Gesund). Für Metformin wurde ein Wilcoxon-Rangtest mit Vorzeichen bei einer Stichprobe durchgeführt, während für Oxybuprocain Mann-Whitney Test gemacht wurde. ** = p-Wert < 0.01 und * p-Wert < 0.05.

Das untargeted Screening ermöglichte es auch, neben Metformin und Oxybuprocain anderen Medikamente, wie zum Beispiel Gabapentin und Bisoprolol, in den Tränen von Studienteilnehmern zu detektieren (siehe Abbildung 17). Gabapentin ist ein Arzneistoff, der zu den Antikonvulsiva gehört, während Bisoprolol ein β -Adrenorezeptorenblocker ist. Der Grund, warum diese Medikamente in den Tränen gefunden wurden, ist auf den Konsum die angeführte Medikation bestimmter Teilnehmer dieser Studie zurückzuführen. Die Studienteilnehmer erhielten vor Beginn dieser Studie einen Fragebogen, auf dem sie die von ihnen eingenommene Medikation ausfüllen sollten und die Daten aus diesem Fragebogen wurden durch die LC-MS Analyse bestätigt.

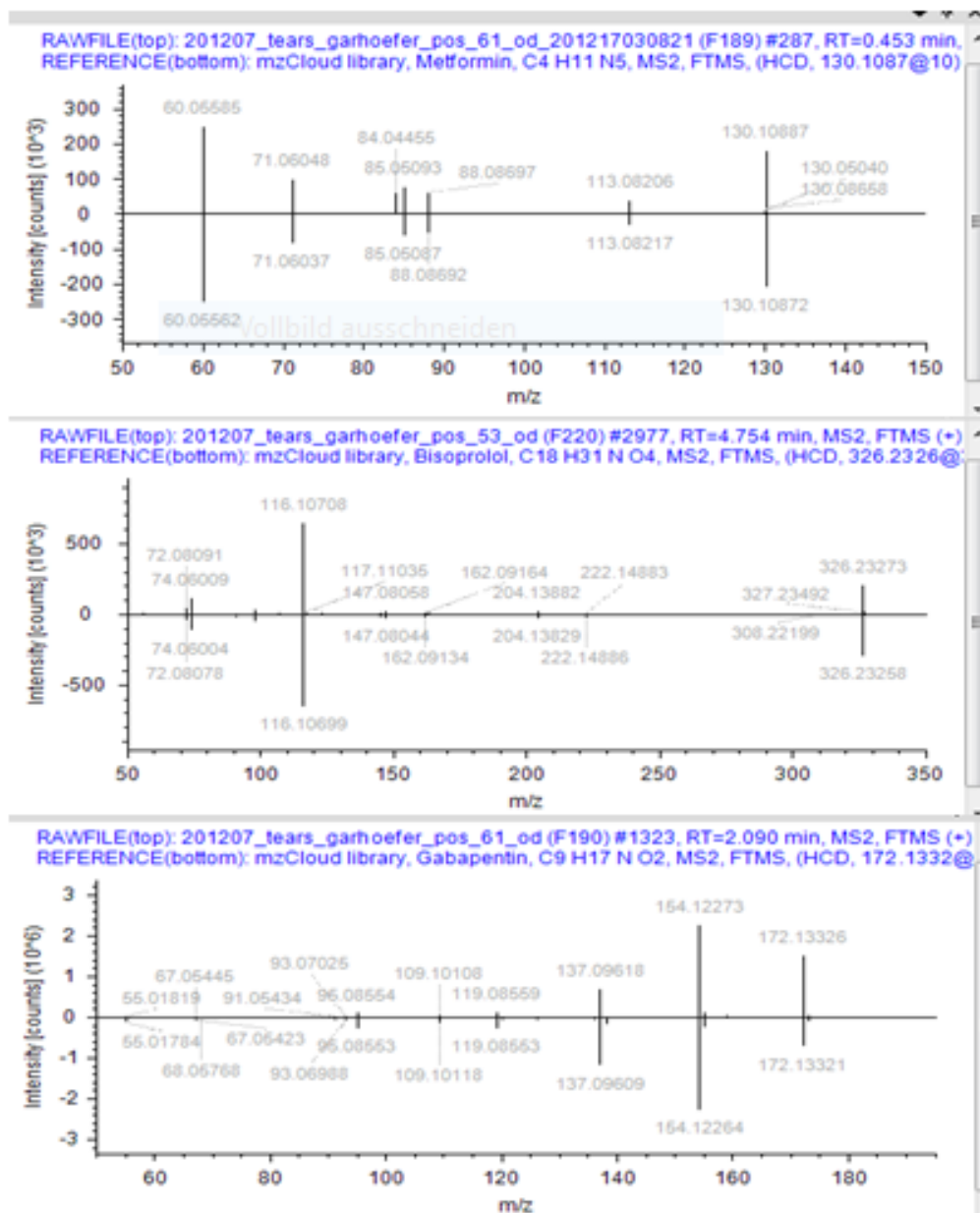


Abbildung 17: Referenzspektren aus mzClod (unten) und gemessenen Spektren (oben) für die eingenommene Medikation (Metformin, Gabapentin und Bisoprolol).

Neben Metformin wurden mittels LC-MS-Analyse auch andere Diabetes-Medikamente wie Vidagliptin, Sitagliptin und Pioglitazone nachgewiesen (siehe Abbildung 18).

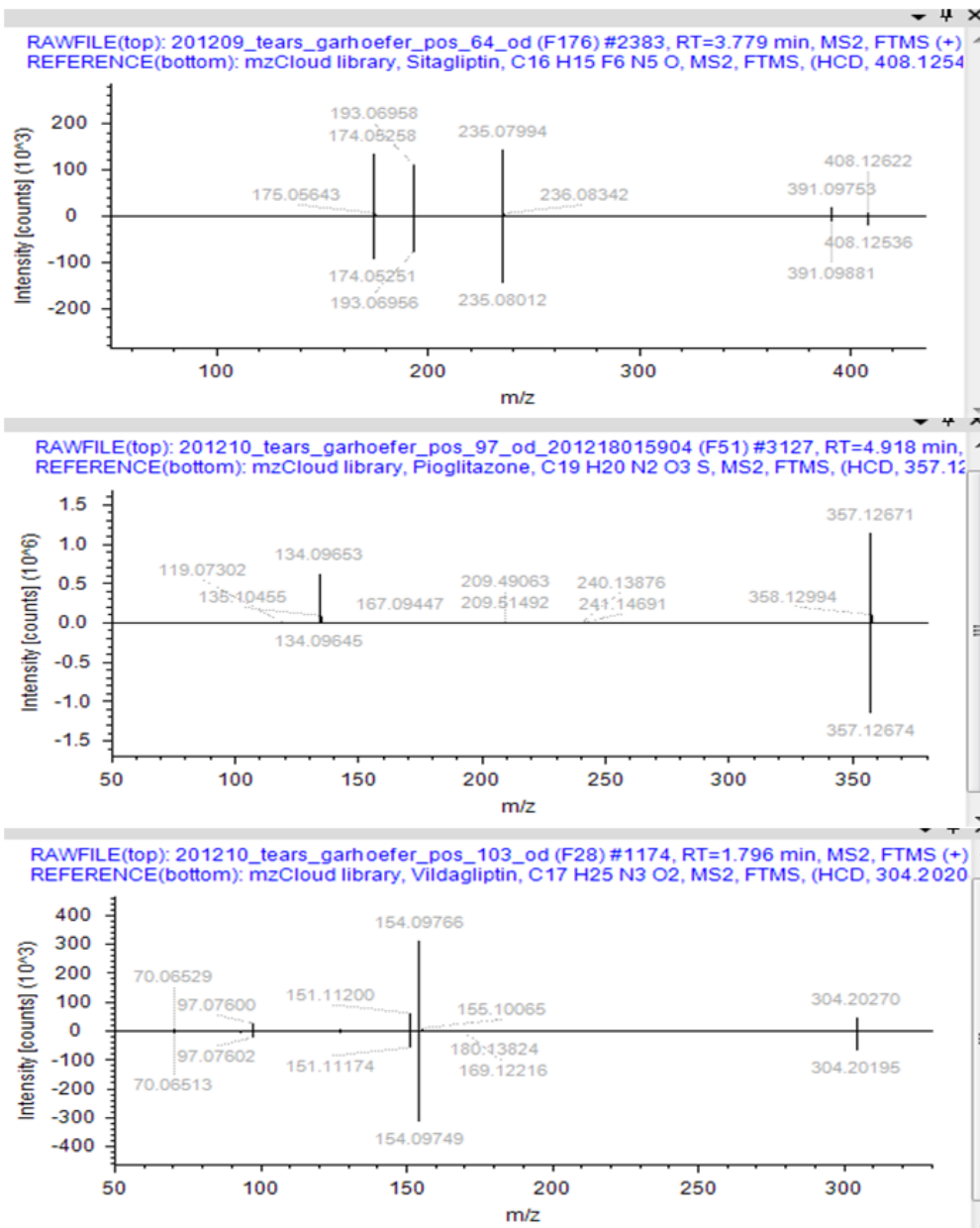


Abbildung 18: Referenzspektren aus mzCloud (unten) und gemessenen Spektren (oben) für die eingenommene Diabetes-Medikation (Vildagliptin, Sitagliptin und Pioglitazone).

Zusätzlich zu den oben genannten Medikamenten wurde auch Tropicamid durch die LC-MS Analyse nachgewiesen. Tropicamid stellt einen Wirkstoff für die Erweiterung der Pupillen dar, der in Form von Augentropfen (Mydriaticum 'Agepha' 0.5%) verabreicht wird. Um eine Pupillenerweiterung zu ermöglichen und Anzeichen der diabetischen Retinopathie feststellen zu können, erhielten alle Diabetes-Patienten dieser Studie Tropicamid (siehe Abbildung 19).

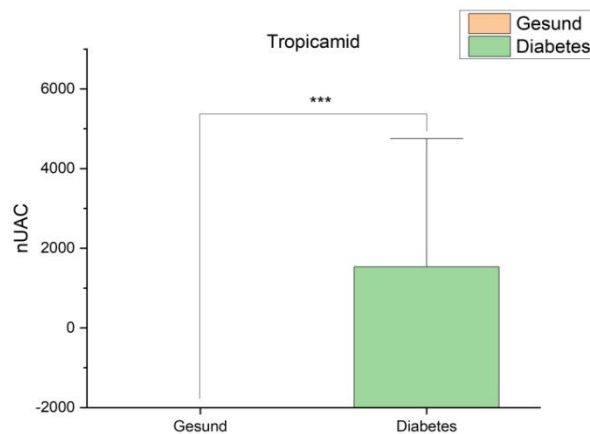


Abbildung 19: Kastengrafiken für Tropicamid (n = 16 für Diabetes). Für Tropicamid wurde ein Wilcoxon-Rangtest mit Vorzeichen bei einer Stichprobe durchgeführt. * = p-Wert < 0.001.**

Mit Hilfe der LC-MS-Analyse wurde Tropicamid bei allen acht Diabetes-Patienten in beiden Augen detektiert (n=16). Dieser Masterarbeit hat gezeigt, dass die Tränenfilmanalysen zur Überprüfung der Compliance von Patienten herangezogen werden können. Compliance-Probleme werden oft von Patienten verursacht, weil sie sich nicht an den verschriebenen Medikamenten hielten. Mit Hilfe der Tränenfilmanalyse kann festgestellt werden ob die Patienten die verschriebenen Medikamente einnehmen und was sie sonst noch nehmen, da dies Resultate möglicherweise beeinflussen könnte.

4.2.2. Aminosäuren und andere endogene Moleküle

Carnitin ist ein körpereigener Metabolit, der eine wichtige Rolle im Fettsäurestoffwechsel spielt (85). Erhöhte zirkulierende Carnitin-Konzentrationen wurden bereits bei Insulinresistenz und Adipositas berichtet und dieser Metabolit könnte ein T2DM-Prädiktor sein (85)(86). Neben Carnitin wurden bei Citrulin, Ornithin und Harnsäure erhöhte Werte in Tränen der Diabetiker gefunden (siehe Abbildung 20). Ornithin ist eine Aminosäure, die im Harnstoffzyklus gebildet wird (87). Erhöhte Ornithin- sowie Harnsäurespiegel wurden bereits mit der Entwicklung von T2DM in Verbindung gebracht (87). Es ist noch immer nicht nachgewiesen, ob die Hyperurikämie zur Entstehung von Diabetes beiträgt, oder nur als Folge der Insulinresistenz und Nierenschädigung in Folge von Diabetes auftritt (88). Die Senkung des Harnsäurespiegels könnte ein neuer Weg zur Vorbeugung von Diabetes darstellen (88).

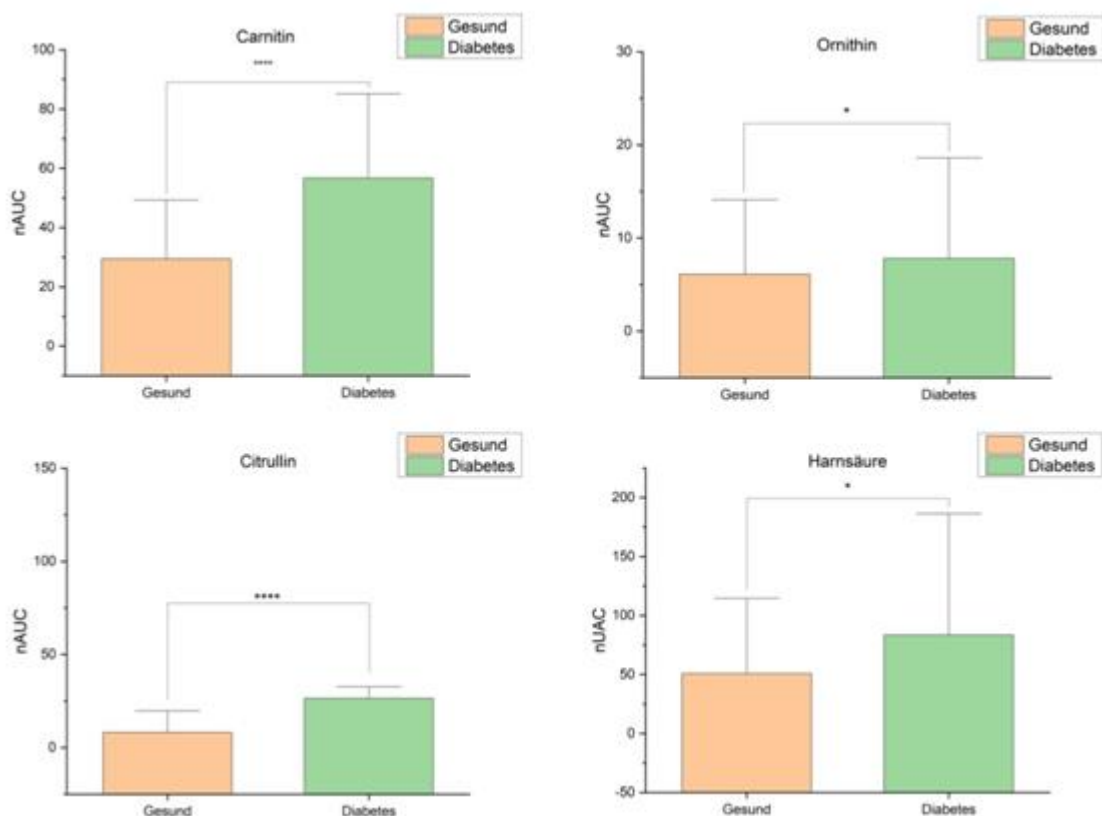


Abbildung 20: Kastengrafiken für Carnitin, Ornithin, Citrulin und Harnsäure (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Es wurde ein Mann-Whitney Test durchgeführt. ** = p-Wert < 0.0001 und * p-Wert < 0.05.**

Da Typ-II-Diabetes eine Stoffwechselerkrankung ist, ist es häufig sehr schwierig, die Risiken einer möglichen Erkrankung vorherzusagen und zu verhindern. Bisher wurden Körpermasseindex oder Nüchtern glukose zur Vorhersage herangezogen. Diese Parameter weisen jedoch häufig eine bestehende Erkrankung hin. Metaboliten-Profilung könnte es uns ermöglichen, auch bei gesunden Menschen die Entwicklung von Diabetes vorherzusagen. Laut einer Studie waren die Konzentrationen von den drei verzweigtkettigen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin) und zwei aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin) vor dem Auftreten von Diabetes erhöht (89). Diese Aminosäuren können als Prädiktoren für Typ-II-Diabetes dienen und ihre erhöhten Konzentrationen können bereits 12 Jahre vor Ausbruch der Krankheit relevant sein (89). Die genannten verzweigtkettigen Aminosäuren zählen zu den essenziellen Aminosäuren und wirken sich positiv auf die Glukosehomöostase, die Regulierung des Körpergewichts sowie die Muskelproteinsynthese aus (90).

Erhöhte Werte dieser Aminosäuren korrelieren jedoch mit einem erhöhten Risiko für Insulinresistenz und T2DM (90). Außerdem wurde in einer weiteren Studie entdeckt, dass auch die aromatischen Aminosäuren mit der Insulinsensitivität korrelieren (90). Durch erhöhten Spiegel an verzweigtkettigen Aminosäuren erfolgt die Aktivierung des mTOR Komplexes, der eine Serin/Threonin-Kinase darstellt (90). mTOR reguliert zahlreiche kritische zelluläre sowie entwicklungsbezogene Prozesse, einschließlich Stoffwechsel und dient der Signalübertragung zwischen Aminosäuren und Insulin (90). Außerdem wird davon ausgegangen, dass die Akkumulation von verzweigtkettigen Aminosäuren eine mitochondriale Dysfunktion fördert. Diese ist mit der Stresskinase-Stimulation und β -Zellen-Apoptosis verbunden. Sowohl die Aktivierung des mTOR-Komplexes, als auch die mitochondriale Dysfunktion stehen in direktem Zusammenhang mit der Insulinresistenz und T2DM (90). Zusätzlich zu den genannten Aminosäuren wurden bei T2DM-Patienten noch folgende Aminosäuren in Tränen nachgewiesen: Asparagin, Glutamin, Glutaminsäure, Methionin, Methionin-Sulfoxid, Serin, Tyrosin, Threonin und Valin (siehe Abbildung 21).

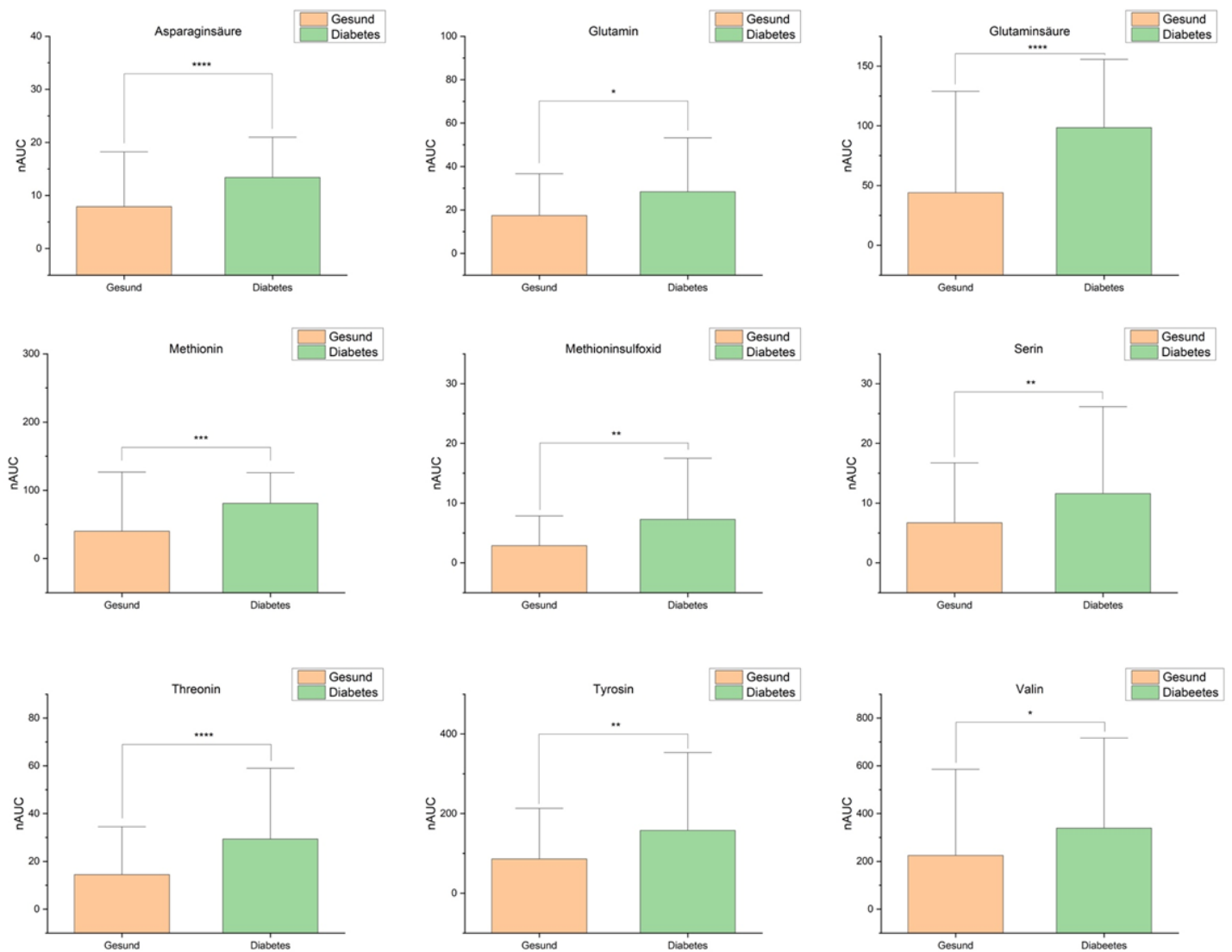


Abbildung 21: Kastengrafiken von essentiellen und nicht-essentiellen Aminosäuren (n = 16 für Diabetes und=127 für Gesund). Für alle aufgeführten Aminosäuren wurde Mann-Whitney Test durchgeführt. **** = p-Wert < 0.0001, *** = p-Wert < 0.001, ** = p-Wert < 0.01 und * p-Wert < 0.05.

4.2.3. Taurin und Nicotinsäure

Neben den bereits erwähnten Metaboliten wurden in den diabetischen Tränen signifikant erhöhte Konzentrationen von Nikotinsäure und Taurin gefunden (siehe Abbildung 22).

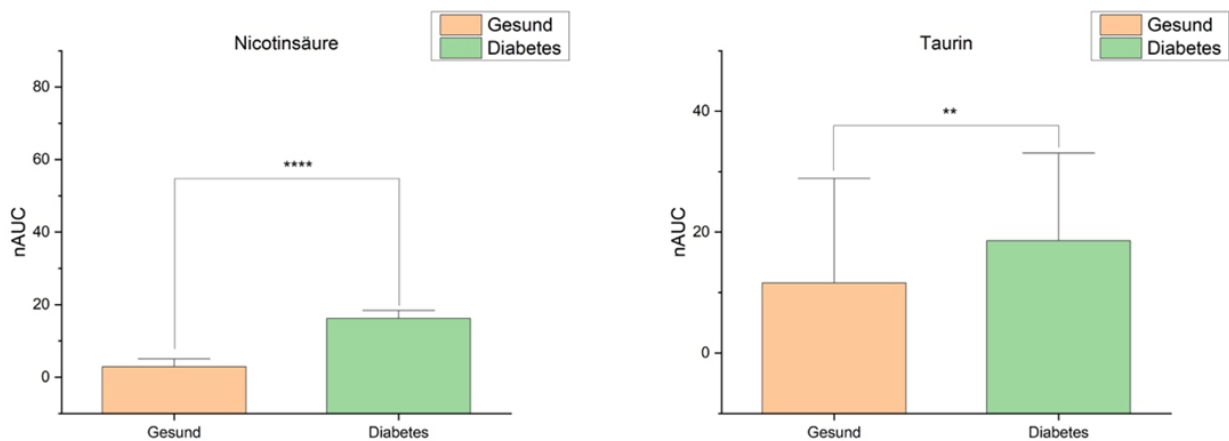


Abbildung 22: Kastengrafiken für Nicotinsäure und Taurin (n = 16 für Diabetes und n = 127 für Gesund). Sowohl für Nicotinsäure, als auch für Taurin wurde Mann-Whitney Test durchgeführt. ** = p-Wert < 0.0001 und ** = p-Wert < 0.01.**

Taurin zählt zu den essentiellen Aminosäuren und besitzt eine wesentliche Funktion bei der Glucosehomöostase, Osmoregulation, Hemmung der Proteinphosphorylierung, Membranstabilisierung, Calcium-Modulation, sowie Sehvermögen (91)(92). Bisher wurden niedrigere Plasmaspiegel bei T2DM-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden berichtet (93). Allerdings wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhten Taurinspiegeln bei den Tränen von T2DM-Patienten und dem Syndrom des trockenen Auges in einer Studie beschrieben (91). In dieser Masterarbeit waren die Taurin-Konzentrationen in den Tränen Diabetespatienten höher als in den Tränen der gesunden Probanden.

Da Taurin eine wichtige Rolle bei den Stoffwechselprozessen spielt, könnte der Taurinspiegel in Tränen in Zukunft als neuartiger Biomarker für T2DM oder diabetische Retinopathie verwendet werden. Bis dato liegen in der Literatur keine Berichte über veränderte Nikotinsäurespiegel im Zusammenhang mit T2DM vor. Daher könnte Nikotinsäure gemeinsam mit Taurin in Zukunft als neuer T2DM-Biomarkerkandidat in Tränenflüssigkeit dienen.

4.3. Limitierungen dieser Masterarbeit

Für die Probenahme wurden in dieser Masterarbeit Schirmer-Teststreifen gewählt, da sie sich in vorherigen Studien als schnelle, genaue, nicht-invasive und einfache Methode zur Probenahme erwiesen haben. Zudem ist die Probenvorbereitung mit der Schirmer-Teststreifen kostengünstig und unkompliziert. Jedoch haben Schirmer-Teststreifen auch gewisse Nachteile, da sie zu einer leichten Augenreizung sowie einer veränderten Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit führen können (5). Darüber hinaus kann auf den Streifen das Wasser aus den Tränenproben verdunsten, was eine Erhöhung der scheinbaren Konzentration und Schwierigkeiten bei der Quantifizierung bewirken kann (5). Weitere Limitationen dieser Masterarbeit inkludieren geringe Anzahl an Studienteilnehmern, die ungleiche Teilnehmerzahl bei gesunden Probanden und Diabetespatienten sowie Nichtgruppierung nach Alter oder BMI. Zum Zweck der möglichen Entdeckung neuer potentieller Biomarker sollte eine Studie mit größerer Anzahl von Teilnehmer durchgeführt werden, die nach Alter und BMI-Parametern gruppiert werden.

4.4. Conclusion + Outlook

In dieser Masterarbeit wurde gezeigt, dass es möglich ist, eine metabolische Phänotypisierung mit der Analyse von Tränen in Kombination mit sensitiven Identifizierungsmethoden wie LC-MS durchzuführen. Die Tränenflüssigkeitsanalyse hat sich als sehr gute Möglichkeit für die Weiterentwicklung der prädiktiven, präventiven und personalisierten Medizin erwiesen, da sie eine patientennahe Labordiagnostik ermöglicht, die im Krankenhaus unmittelbar auf der Krankenstation durchgeführt werden kann. Die Tränen gehören zu den nicht-invasiven Biomatrizen und enthalten zahlreiche Eikosanoide sowie endogene und exogene Metabolite. Im Laufe dieser Studie wurden mehrere Metaboliten gefunden, die in Zukunft als potenzielle Biomarker für den Nachweis von Diabetes Mellitus dienen könnten. Darüber hinaus wurde bestätigt, dass die Tränenanalyse nicht nur Gesundheitszustand und den Lebensstil beschreiben kann, sondern auch die zur Behandlung verwendeten Medikamente identifizieren kann.

Mithilfe dieser Biomarkern könnte in Zukunft möglich werden, die Risikopatienten zu erkennen, geeignete Therapie für Patienten zu etablieren, die Wirksamkeit der Therapie sowie die Konsequenz der Patienten bei der Einnahme verschriebener Medikamente mit Hilfe von Compliance Überwachung zu verfolgen.

Abstract

The aim of this master's thesis was to investigate metabolites and eicosanoids in the tears of patients with type 2 diabetes mellitus and to compare them with healthy subjects. Eicosanoids are signaling molecules, which can lead to the initiation of various inflammatory processes, while metabolites serve as biomarkers for pathophysiological and biological reactions in the human body. The main goal of metabolomic studies is to understand the signalling pathways in the human body, as well to discover new biomarkers, which can serve for diagnosis, prognosis and prevention of various diseases.

A total of 20 healthy volunteers and 8 patients with type 2 diabetes mellitus took part in this study. The tear samples were collected at the Vienna General Hospital (AKH) using the Schirmer test strip.

LC-MS using the untargeted screening method was utilized as the method of choice for analysis of the metabolites and eicosanoids. For the LC a reversed phase UHPLC system was obtained, which was coupled to Q-Exactive HF (Thermo-Fischer Scientific™). Q-Exactive HF represents a hybrid instrument that is built of a quadrupole mass filter and an orbitrap mass analyzer. Substances were analyzed using Compound Discoverer Software (Thermo-Fischer Scientific™). The raw data were loaded into the software and verification of measured spectra was performed manually through comparison with an online database.

Tyrosine, carnitine, valine and uric acid, which have been previously identified as blood-borne type 2 diabetes metabolites, were detected in this thesis in significant higher concentrations in diabetic tears. In contrast to healthy subjects, taurine and nicotinic acid were further found to be elevated in the tears of diabetics. Therefore, these 2 metabolites could be used as potential biomarkers to identify T2DM in the future. This study gave us insight into the participants' current therapy by detecting medications such as metformin, gabapentin, and bisoprolol.

In addition to providing insight into the pathology of the disease, tear analysis may be useful in expanding clinical applications by monitoring and preventing the formation of a large number of different metabolic diseases in humans through lifestyle changes.

Zusammenfassung

Das Ziel dieser Masterarbeit war Metabolite und Eikosanoide in den Tränen der T2DM-Patienten zu untersuchen und mit den gesunden Probanden vergleichen. Eikosanoide gehören zu den Signalmolekülen, die zur Auslösung verschiedener Entzündungsprozesse führen können, während Metabolite als Biomarker für pathophysiologische und biologische Reaktionen im menschlichen Körper dienen. Das Hauptziel der metabolomischen Studien ist besseres Verständnis verschiedener Signalwege im menschlichen Körper sowie die Entdeckung neuen Biomarkern, die der Diagnose, Prognose und Prävention verschiedener Krankheiten dienen können.

An dieser Studie nahmen insgesamt 20 gesunde Probanden und 8 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus teil. Die Tränenproben wurden im Allgemeinen Krankenhaus Wien (AKH) unter Verwendung des Schirmer-Teststreifens gesammelt.

Als Methode der Wahl für die Analyse der Metaboliten und Eikosanoiden wurde LC-MS nach dem ungezielten Screening-Verfahren eingesetzt. Für die LC wurde ein Umkehrphasen-UHPLC-System beschafft, welcher an Q-Exactive HF (Thermo-Fischer Scientific™) gekoppelt wurde. Q-Exactive HF stellt ein Hybridinstrument dar, der aus einem Quadrupol-Massenfilter und einem Orbitrap-Massenanalysator besteht. Die Substanzen wurden schließlich unter der Verwendung der Compound Discoverer Software (Thermo-Fischer Scientific™) analysiert.

Die Rohdaten wurden in der Software geladen und die Verifizierung der gemessenen Spektren manuell durch den Vergleich mit der Online-Datenbank durchgeführt.

Tyrosin, Carnitin, Valin und Harnsäure, die bisher mit T2DM assoziiert wurden, wurden in dieser Arbeit in Tränen der T2DM-Patienten in deutlich signifikanten Konzentrationen nachgewiesen. Im Gegensatz zu gesunden Probanden waren Taurin und Nikotinsäure in den Tränen der Diabetiker in deutlich höheren Konzentrationen vertreten. Daher könnten diese 2 Metabolite in der Zukunft als potentielle Biomarker zur Identifizierung der T2DM Einsatz finden.

Diese Studie gab uns einen Einblick in die aktuelle Therapie der Teilnehmer durch den Nachweis von Medikamenten wie Metformin, Gabapentin und Bisoprolol.

Zusätzlich zum Einblick in die Pathologie der Krankheit kann die Tränenflüssigkeitsanalyse bei der Ausweitung klinischer Anwendungen nützlich sein, indem die Entwicklung einer großen Anzahl Stoffwechselerkrankungen beim Menschen durch Änderungen des Lebensstils überwacht und verhindert wird.

Bibliographie

1. Li Y, Bouza M, Wu C, Guo H, Huang D, Doron G, et al. Sub-nanoliter metabolomics via mass spectrometry to characterize volume-limited samples. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-19444-y>
2. Raju KSR, Taneja I, Singh SP, Wahajuddin. Utility of noninvasive biomatrices in pharmacokinetic studies. *Biomed Chromatogr*. 2013;27(10):1354–66.
3. Wagner BD, Accurso FJ, Laguna TA. The applicability of urinary creatinine as a method of specimen normalization in the cystic fibrosis population. *J Cyst Fibros* [Internet]. 2010;9(3):212–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcf.2010.02.004>
4. Khamis MM, Adamko DJ, El-Aneed A. Mass spectrometric based approaches in urine metabolomics and biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev*. 2017;36(2):115–34.
5. Posa A, Bräuer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S, Paulsen F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid. *Ann Anat* [Internet]. 2013;195(2):137–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aanat.2012.10.001>
6. Edna G. Was sind Omics? *PSYCH up2date*. 2014;8:343–6.
7. Holčapek M, Liebisch G, Ekroos K. Lipidomic Analysis. *Anal Chem*. 2018;90(7):4249–57.
8. Chen, C.; Fan, Z.; Xu, H.; Tan, X.; Zhu M. Metabolomics-based parallel discovery of xenobiotics and induced endogenous metabolomic dysregulation in clinical toxicology. *Biomed Chromatogr*. 2018;33.
9. Sato, S.; Parr, E.B.; Devlin, B.L.; Hawley, J.A.; Sassone-Corsi P. Human metabolomics reveal daily variations under nutritional challenges specific to serum and skeletal muscle. *Mol Metab*. 2018;1–11.
10. Shah, S.H.; Kraus, W.E.; Newgard CB. Metabolomics profiling for the identification of novel biomarkers and mechanism related to common cardiovascular diseases. *Circulation*. 2012;1110–20.
11. Davis VW, Bathe OF, Schiller DE, Slupsky CM, Sawyer MB. Metabolomics and surgical oncology: Potential role for small molecule biomarkers. *J Surg Oncol*. 2011;103(5):451–9.
12. Dunn, W.B.; Broadhurst, D.I.; Atherton, H.J.; Goodacre, R.; Griffin JL. Systems level studies of mammalian metabolomes: The roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chem Soc Rev*. 2011;387–426.
13. Fiehn O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol*. 2002;155–71.
14. Oliver SG. Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol*. 1998;373–8.
15. *Metabolomics: Practical Guide to Design and Analysis*. Taylor & Francis Group; 2020.
16. Au A. Metabolomics and lipidomics of ischemic stroke. *Adv Clin Chem*. 2018;31–69.
17. Wishart SD. Advances in metabolite identification. *Bioanalysis*. 2011;3:1769–82.
18. Sas KM, Karnovsky A, Michailidis G, Pennathur S. Metabolomics and diabetes: Analytical and computational approaches. *Diabetes*. 2015;64(3):718–32.

19. WHO International Programme on Chemical Safety Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. [Internet]. 2001. Available from: <https://incchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
20. Califf RM. Biomarker definitions and their applications. *Exp Biol Med*. 2018;243(3):213–21.
21. Belhaj MR, Lawler NG, Hoffman NJ. Metabolomics and lipidomics: Expanding the molecular landscape of exercise biology. *Metabolites*. 2021;11(3).
22. Vuckovic D. Current trends and challenges in sample preparation for global metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(6):1523–48.
23. González-Domínguez R, González-Domínguez Á, Sayago A, Fernández-Recamales Á. Recommendations and best practices for standardizing the pre-analytical processing of blood and urine samples in metabolomics. *Metabolites*. 2020;10(6):1–18.
24. Gromski, P.S.; Muhamadali, H.; Ellis, D.I.; Xu, Y.; Correa, E.; Turner, M.L.; Goodacre R. A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—A marriage of convenience or a shotgun wedding. *Anal Chim Acta*. 2015;10–23.
25. Cambiaghi, A.; Ferrario, M.; Masseroli M. Analysis of metabolomic data: Tools, current strategies and future challenges for omics data integration. *Brief Bioinform*. 2016;31–510.
26. Sud, M.; Fahy, E.; Cotter, D.; Brown, A.; Dennis, E.A.; Glass, C.K.; Merrill, A.H.; Murphy, R.C.; Raetz, C.R.H.; Russell DW. et al. LMSD: LIPID MAPS structure database. 2006;
27. Brunmair J, Bileck A, Stimpfl T, Raible F, Del Favero G, Meier-Menches SM, et al. Metabo-tip: a metabolomics platform for lifestyle monitoring supporting the development of novel strategies in predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J* [Internet]. 2021;12(2):141–53. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13167-021-00241-6>
28. Amberg, A.; Riefke, B.; Schlotterbeck, G.; Ross, A.; Senn, H.; Dieterle F. KM. NMR and MS Methods for Metabolomics. In *Drug Safety Evaluation*. Humana Press New York, NY, USA. 2017;1641:229–58.
29. Spener, F.; Legarde, M.; Geloën, A.; Record M. What is lipidomics? *Eur J Lipid Sci Technol*. 2003;481–2.
30. Xianlin Han. LIPIDOMICS Comprehensive Mass Spectrometry of Lipids. 2016.
31. LIPID MAPS®Lipidomics Gateway. Available online: <http://www.lipidmaps.org/resources/databases/index.php> (accessed on 15 December 2020).
32. Alan T. Remaley, M.D., Ph.D., Nader Rifai, Ph.D. and G. Russell Warnick, M.S. MBA. Lipids, Lipoproteins, Apolipoproteins, and Other Cardiovascular Risk Factors. In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 2012. p. 731–805.
33. Züllig T, Trötz Müller M, Köfeler HC. Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(10):2191–209.
34. Wu Z, Bagarolo GI, Thoröe-Boveleth S, Jankowski J. “Lipidomics”: Mass spectrometric and chemometric analyses of lipids. *Adv Drug Deliv Rev*. 2020;159:294–307.
35. Edward A., Dennis; Norris C. P. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;
36. Sonnenweber, Thomas; Pizzini, Alex; Nairz, Manfred; Weiss, Günter; Tancevski I. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018;

37. W. BM. Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *Lipid Res.* 2009;
38. Tessaro H.G., Fernando; Ayala S., Thais; Martins O. J. Lipid Mediators Are Critical in Resolving Inflammation: A Review of the Emerging Roles of Eicosanoids in Diabetes Melitus. *Biomed Res Int.* 2014;
39. Pflugfelder SC, Stern ME. Biological functions of tear film. *Exp Eye Res.* 2020;197(April).
40. Khanna RK, Catanese S, Emond P, Corcia P, Blasco H, Pisella P-J. Metabolomics and lipidomics approaches in human tears: A systematic review. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 2022;1–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2022.01.010>
41. Cwiklik L. Tear film lipid layer: A molecular level view. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2016;1858(10):2421–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.02.020>
42. LY, Chen; L, Zhou; ECY, Chan; J, Neo; RW B. Characterization of the human tear metabolom by LC-MS/MS. *J Proteome Res.* 2011;10(10):4876–82.
43. Zhang X, Zhao L, Deng S, Sun X, Wang N. Dry Eye Syndrome in Patients with Diabetes Mellitus: Prevalence, Etiology, and Clinical Characteristics. *J Ophthalmol.* 2016;1–7.
44. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011;34(SUPPL.1).
45. Haak, Thomas; Palitzsch K-D. *Diabetologie für die Praxis.* Georg Thieme Verlag KG; 2012.
46. Pfeiffer, F. H. Andreas; Klein HH. *The Treatment of Type 2 Diabetes.* 2014.
47. Eid, Stephanie; Sas, M. Kelli; Abcouwer, F. Steven; Feldman, L. Eva; Gardner, W. Thomas; Pennathur, Subramaniam; Fort EP. New insights into the mechanism of diabetic complications: role of lipids and lipid metabolism. 2020.
48. Shih, K Co; Lam, KS-L; Tong L. A systematic review on the impact of diabetes mellitus on the ocular surface. *Nutr Diabetes.* 2017;
49. Griffiths WJ, Koal T, Wang Y, Kohl M, Enot DP, Deigner H-P. “Targeted Metabolomics” in der Biomarkerforschung. *Angew Chemie.* 2010;122(32):5554–75.
50. Michael W. Dong. *HPLC AND UHPLC FOR PRACTICING SCIENTISTS.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2019.
51. McMASTER MC. *LC / MS A Practical User ' s Guide.* WILEY-INTERSCIENCE; 2005.
52. Serwe, Maria; Büggel, Martin; Meyer EH. *Microseparation Techniques V: High Performance Liquid Chromatographie.* In: *Microcharacterisation of Proteins.* WILEY-VCH Verlag GmbH; 1999.
53. Jandera P. *Handbook of Analytical Separations.* 2020. 1–91 p.
54. Rainville, Paul D.; Theodoridis G.; Plumb, Robert S.; Wilson ID. Advances in liquid chromatography coupled to mass spectrometry for metabolic phenotyping. *TrAC Trends Anal Chem.* 2014;61:181–91.
55. Atapattu SN. Solvation properties of acetone-water mobile phases in reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2021;1650:462252. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462252>
56. Drouin, Nicolas; Rudaz SSJ. Sample preparation for polar metabolites in bioanalysis. *R Soc Chem.* 2018;16–20.
57. Fekete, Szabolcs; Schappler, Julie; Veuthey, Jean-Luc; Guillarme D. Current and future trends in UHPLC. *TrAC Trends Anal Chem.* 2014;63:2–13.
58. Chandraman K. *Analytical Chemistry : An Indian Journal An Updated Review on Ultra Performance Liquid Chromatography.* *Anal Chem.* 2016;16(15):1–9.
59. Gross JH. *Massenspektrometrie Ein Lehrbuch.* Springer Spektrum; 2011.
60. Rossi, D.T.; Sinz, M.W.; Dekker M. *Mass Spectrometry in Drug Discovery.* 2002.

61. Shalley CA. Modern Mass Spectrometry. New York: Springer; 2003.
62. Ardrey RE. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. John Wiley & Sons; 2003.
63. Siuzdak G. The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology. San Diego: MCC Press; 2006.
64. CS Ho, CWK Lam*, MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, KF Ng, MWM Suen and HT. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. Clin Biochem Rev. 2003;24.
65. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. Int J Anal Chem. 2012;2012:1–40.
66. Konermann L, Ahadi E, Rodriguez AD, Vahidi S. Unraveling the Mechanism of Electrospray Ionization. Anal Chem. 2021;
67. Cole RB. Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities and Biological Applications. Wiley, Hoboken; 2010.
68. Lehmann WD. Protein Phosphorylation Analysis by Electrospray Mass Spectrometry: A Guide to Concepts and Practice. 2010;
69. Amad MH. CNB. JGS. ECG. Importance of Gas-Phase Proton Affinities in Determining the Electrospray Ionisation Response for Analytes and Solvents. Mass Spectrom. 2000;
70. Schalley CA. Supramolecular Chemistry Goes Gas Phase: The Mass Spectrometric Examination of Noncovalent Interactions in Host-Guest Chemistry and Molecular Recognition. Mass Spectrom.
71. Cristoni, S.; Bernardi LR. Development of New Methodologies for the Mass Spectrometry Study of Bioorganic Macromolecules. Mass Spectrom Rev. 2003;
72. Heck AJR. van den HRHH. Investigation of Intact Protein Complexes by Mass Spectrometry of Large Biomolecules. Mass Spectrom Rev. 2004;
73. Covey, Thomas R.; Thomson, Bruce A.; Schneider BB. Atmospheric pressure ion sources. Mass Spectrom Rev. 2009;
74. Scheltema RA, Hauschild JP, Lange O, Hornburg D, Denisov E, Damoc E, et al. The Q exactive HF, a benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field orbitrap analyzer. Mol Cell Proteomics. 2014;13(12):3698–708.
75. Michalski A, Damoc E, Hauschild JP, Lange O, Wiegand A, Makarov A, et al. Mass spectrometry-based proteomics using Q exactive, a high-performance benchtop quadrupole orbitrap mass spectrometer. Mol Cell Proteomics. 2011;10(9):1–11.
76. Kelstrup CD, Jersie-Christensen RR, Batth TS, Arrey TN, Kuehn A, Kellmann M, et al. Rapid and deep proteomes by faster sequencing on a benchtop quadrupole ultra-high-field orbitrap mass spectrometer. J Proteome Res. 2014;13(12):6187–95.
77. Jürgen GH. Mass Spectrometry A Textbook, Third Edition. Springer International Publishing; 2004.
78. <https://gateway.on24.com/wcc/eh/2591233/lp/2625586/compound-discoverer-3.2---the-ultimate-toolbox-to-analyze-untargeted-metabolomics-data/>.
79. [https://planetorbitrap.com/data/fe/file/br-65168-compound-discoverer-insights-br65168-en\(1\).pdf](https://planetorbitrap.com/data/fe/file/br-65168-compound-discoverer-insights-br65168-en(1).pdf).
80. Adams, J. Kendra; Pratt, Brian; Bose, Neelanjana; Dubois, G. Laura; John Williams, St. Lisa; Perrott, M. Kevin; Ky., Karina; Kapahi, Pankaj; Sharma, Vagisha; MacCoss, J. Michael; Mosley, Arthur M.; Colton, A. Carol; MacLean, X. Brendan; Schilling, Birgit; WJ. Skyline for Small Molecules: A Unifying Software Package for Quantitative Metabolomics. J Proteome Res. 2020;19(4):1447–58.

81. Tyanova Stefka CJ. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. In: *Cancer Systems Biology Methods and Protocols*. 2018. p. 133–48.
82. Brunmair J, Bileck A, Schmidl D, Hagn G, Meier-Menches SM, Hommer N, et al. Metabolic phenotyping of tear fluid as a prognostic tool for personalised medicine exemplified by T2DM patients. *EPMA J* [Internet]. 2022;13(1):107–23. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13167-022-00272-7>
83. Kastelan, Snjezana; Tomic, Martina; Salopek-Rabatic, Jasminka; Novak B. Diagnostic Procedures and Menagment of Dry Eye. *Biomed Res Int*. 2013;
84. Schulze K, Großjohann R, Paul S, Bossaller L, Tost F. Schirmer's test and strip meniscometry: Comparative consideration in the diagnostics of dry eye. *Ophthalmologe*. 2021;118(6):561–8.
85. Strand E, Rebnord EW, Flygel MR, Lysne V, Svingen GFT, Tell GS, et al. Serum carnitine metabolites and incident type 2 diabetes mellitus in patients with suspected stable angina pectoris. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(3):1033–41.
86. Sun L, Liang L, Gao X, Zhang H, Yao P, Hu Y, et al. Early prediction of developing type 2 diabetes by plasma acylcarnitines: A population-based study. *Diabetes Care*. 2016;39(9):1563–70.
87. Chen S, Akter S, Kuwahara K, Matsushita Y, Nakagawa T, Konishi M, et al. Serum amino acid profiles and risk of type 2 diabetes among Japanese adults in the Hitachi Health Study. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–9.
88. Dehghan A, van Hoek M, Sijbrands EJ, Hofman A WJ. High serum uric acid as a novel risk factor for type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2008;31(2):361–2.
89. Wang, Thomas J.; Larson, Martin G.; Vasan, Ramachandran Vasan S.; Cheng, Susan; Rhee, Eugene P.; McGabe, Elizabeth; Lewis, Georgy D.; Fox, Caroline S.; Jacques, Paul F.; Fernandez, Celine; O'Donnell, Christopher J.; Carr, Stephen A.; Mootha, Vamsi K.; Flor RE. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *NatMed*. 2011;17 (4):448–53.
90. Yoon M-S. The Emerging Rolle of Branched-Chain Amino Acids in Insulin Resistance and Metabolism. *Nutrients*. 2016;
91. ChenZuo L; Murube J; Latorre A del RR. Different concentrations of amino acids in tears of normal and human dry eyes. *Adv Exp Med Biol*. 2002;617–21.
92. Carneiro EM, Latorraca MQ, Araujo E, Beltrá M, Oliveras MJ, Navarro M, et al. Taurine supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2009;20(7):503–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.05.008>
93. Sak D, Erdenen F, Müderrisoglu C, Altunoglu E, Sozer V, Gungel H, et al. The relationship between plasma taurine levels and diabetic complications in patients with type2diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2019;9(3).