(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0125621
(43) 공개일자 2022년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 30/72 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 30/7206 (2013.01)
G01N 33/6848 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0029719
(22) 출원일자 2021년03월05일
심사청구일자 2021년03월05일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
강자헌
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 104동 706호(대치동, 대치삼성아파트)
정인경
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 104동 706호(대치동, 대치삼성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

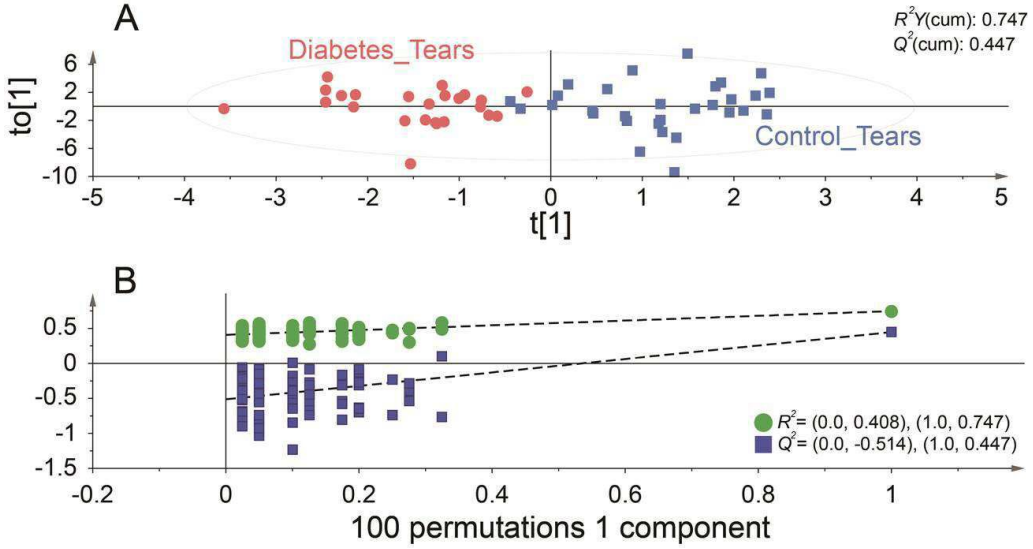
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **눈물을 이용한 당뇨병의 진단 방법 및 키트**

(57) 요 약

본 발명은 당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 내 대사체를 검출하는 물질을 포함하는 당뇨병 진단용 조성물 또는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명은 당뇨병 환자의 눈물을 GC/TOF MS 분석하여 대조군 대비 높거나 낮은 수준을 보이는 대사체를 규명하고, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌 또는 스쿠알렌 수준이 대조군 대비 높을 경우 또는 1,5-안하이드로글루시톨 또는 베타-알라닌 수준이 대조군 대비 낮을 경우에는 대조군 대비 당뇨병이 발병했을 가능성이 높다고 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 2030/8813 (2013.01)
G01N 2800/042 (2013.01)
(72) 발명자
김태기
서울특별시 강동구 아리수로50길 50 208동 602호
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)
김정연
서울특별시 동대문구 신이문로8길 44, 2(이문동)
정유은
경기도 수원시 영통구 에듀타운로 65, 5203동 1802호(이의동, 자연앤자이)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711054979
과제번호	2015M3A9E2030105
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오 의료기술 개발 사업
연구과제명	접안형 당뇨병 진단 기기 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2015.06.01 ~ 2020.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103785
과제번호	2015M3A9E2030139
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오 의료기술 개발 사
연구과제명	눈물 기반 비침습형 자가진단 플랫폼 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2018.04.01 ~ 2020.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 내 1,5-안하이드로글루시톨, 베타-알라닌, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌, 스쿠알렌으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 대사체를 검출하는 물질을 포함하는, 당뇨병 진단용 조성물.

청구항 2

청구항 1의 조성물을 포함하는 당뇨병 진단용 키트.

청구항 3

당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 시료에서 확인된 1,5-안하이드로글루시톨, 베타-알라닌, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌, 스쿠알렌으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌 또는 스쿠알렌 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 당뇨병이 발병했을 가능성이 높다고 진단하는 단계를 더 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 5

청구항 3에 있어서, 1,5-안하이드로글루시톨 또는 베타-알라닌 수준이 대조군 대비 낮으면 대조군 대비 당뇨병이 발병했을 가능성이 높다고 진단하는 단계를 더 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 눈물의 대사물질 분석을 통해 당뇨병을 진단하거나 치료 후 당뇨병의 경과를 모니터링 하기 위한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 당뇨병은 인슐린의 작용이나 분비에 문제가 생겨서 만성적인 고혈당을 초래하는 질환으로 전 세계적으로 수백만 명의 환자가 겪는 흔한 질환이다. 당뇨병은 다양한 유전적, 환경적 요인에 의하여 유발될 수 있다. 이러한 당뇨병은 당뇨병성 망막병증, 신증, 신경병증, 뇌졸중, 심근경색, 그리고 족부 괴저 등 다양한 합병증을 유발하여 환자의 건강에 심각한 영향을 미칠 수 있으며 사망에까지 이를 수 있다.

[0004] 당뇨병 진단방법의 개발은 조기 진단을 통해 빠르고 적절한 치료를 가능하게 하여 환자의 예후를 좋게 할 수 있고, 적절한 모니터링 시스템을 마련하는 것은 고혈당이나 저혈당을 피하고 적절한 혈당 수치를 유지할 수 있도록 하여 합병증 예방에 매우 중요하다.

[0005] 대사체학은 생체의 대사적 변화에 따른 종합적인 대사물질의 변화, 즉 다양한 생리학적, 병리학적 상태를 규명하는 학문이다. 당뇨병은 유전적, 환경적 인자들이 복합적으로 작용하여 발생하는 것이기 때문에 그 병리학을 개별적인 유전자 및 식습관만으로 완전히 이해하기는 매우 어렵다. 그러나 당뇨병의 발생은 필연적으로 대사물질의 변화가 동반되므로, 대사체학적 접근을 통해서 직접적인 생리 변화를 추측하고 병인학을 이해할 수 있다.

[0006] 눈물은 각막의 표면을 유지하며 감염을 억제하는 역할을 할 뿐만 아니라, 영양분을 공급하기 위한 수단으로 사용되며 다양한 대사물질을 포함하고 있으므로 눈물은 질병의 원인이 될 수 있는 대사물질을 포함하고 있을 가능성이 매우 높다. 이러한 특성을 바탕으로 눈물 내 대사물질을 감별하는 키트를 개발하여 질병을 진단할 수 있게 되면 개인이 전문인력의 도움 없이 비침습적으로 간편히 질병을 자가 진단할 수 있다. 따라서 눈물을 이용해서 당뇨병을 진단하는 키트를 발명하는 것은 잠재적 환자가 일상에서 자가 진단을 가능하게 하여 조기 진단의 가능성을 높일 뿐 아니라 진단 후 당대사에 대한 적절한 모니터링을 가능하게 하므로, 병리학 이해를 통한 치료제의 개발도 기대될 수 있어서 매우 중요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제 10-2020-0137312호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 당뇨병 환자에 특이적인 눈물 대사체 바이오마커를 제시하고 대사물질을 통해 정상인과 환자를 감별할 수 있는 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 1. 당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 내 1,5-안하이드로글루시톨, 베타-알라닌, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌, 스쿠알렌으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 대사체를 검출하는 물질을 포함하는, 당뇨병 진단용 조성물.

[0012] 2. 위 1의 조성물을 포함하는 당뇨병 진단용 키트.

[0013] 3. 당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 시료에서 확인된 1,5-안하이드로글루시톨, 베타-알라닌, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌, 스쿠알렌으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법.

[0014] 4. 위 3에 있어서, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌 또는 스쿠알렌 수준이 대조군 대비 높으면 대조군 대비 당뇨병이 발병했을 가능성이 높다고 진단하는 단계를 더 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법.

[0015] 5. 위 3에 있어서, 1,5-안하이드로글루시톨 또는 베타-알라닌 수준이 대조군 대비 낮으면 대조군 대비 당뇨병이 발병했을 가능성이 높다고 진단하는 단계를 더 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 당뇨병 발병여부에 따라서 당뇨병 환자의 눈물에서 특이적으로 증감하는 대사체 바이오마커를 발굴하여, 이를 기반으로 신속하고 정확하게 비침습적으로 당뇨병을 진단할 수 있을 뿐만 아니라 치료 후 모니터링이 가능한 생체표지자를 제공할 수 있다.

[0018] 또한 본 발명은 대사체 분석을 통한 당뇨병 진단 키트에 적용될 수 있다. 또한 당대사 및 당뇨병 합병증 등의

다양한 병인학 연구에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 OPLS-DA를 이용한 당뇨병 환자와(Diabetes_Tears) 건강한 대조군 (Control Tears) 간의 비교 분석 결과로, 눈물 대사체 프로파일을 나타낸다 (A: score plot; B: permutation tests).

도 2는 Mann Whitney U test와 MetaMapp에 기반하여 당뇨병 환자의 대사물질 변화를 나타낸 것으로, 각 도형은 각 대사물질을 의미한다 (빨간색: 대조군 대비 당뇨병 환자에서 유의미하게 수준이 높은 대사물질; 파란색: 당뇨병 환자에서 유의미하게 감소한 대사물질; 주황색: 그룹 간 통계적 유의미성이 없는 대사물질을 의미). P-value <0.05은 Mann whitney U test 결과에 기반하여 통계적으로 유의미함을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 내 1,5-안하이드로글루시톨, 베타-알라닌, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌, 스쿠알렌으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 대사체를 검출하는 물질을 포함하는, 당뇨병 진단용 조성물을 제공한다:

[0022] 상기 당뇨병은 인슐린 작용의 절대적 혹은 상대적 결핍으로 고혈당과 이에 수반되는 대사 장애일 수 있다.

[0023] 상기 1,5-안하이드로글루시톨은 1,5-AG로도 알려진 물질로, 거의 모든 음식에서 발견되는 자연 발생 단당류일 수 있으며, 건강한 개체의 혈중에 글루코스에 뒤이어 많이 존재하는 글루코스 유도체의 일종으로 화학적 및 생화학적으로 생체 내에서 매우 안정한 물질일 수 있고, 거의 대사되지 않고 요중에 배설될 수 있다.

[0024] 상기 베타-알라닌은 β 탄소에 아미노기가 결합하고 있는 자연적으로 생성되는 β-아미노산일 수 있다.

[0025] 상기 트레오닌은 알파-아미노산의 하나로 필수 아미노산일 수 있다.

[0026] 상기 펜타데칸산은 펜타데실산으로도 불리며 자연계에 드물게 존재하는 포화 지방산일 수 있다

[0027] 상기 만노스는 6개의 탄소원자가 포함된 단당류이고, 알데하이드기를 가지고 있는 알도스로 물질대사, 특히 특정 단백질의 글리코실화에 중요할 수 있다.

[0028] 상기 트레오스는 탄소 원자가 포함된 단당류이고, 알데하이드기를 가지고 있는 알도스일 수 있다.

[0029] 상기 솔비톨은 포도당과 같은 육탄당을 환원하여 얻는 6가 알코올의 일종일 수 있다.

[0030] 상기 세린은 일반적으로 동물성 단백질에서 발견되는 20개의 아미노산 중 하나로 유기 화합물일 수 있다.

[0031] 상기 알라닌은 20개 아미노산 중 하나로, α-아미노산일 수 있다.

[0032] 상기 스쿠알렌은 상어간유, 올리브, 아마란스 씨, 쌀겨, 맥아 등에 많이 함유되어 있는 불포화 탄화수소로서 인체의 여러 조직에도 존재하며, 체내에서 스테로이드 호르몬과 비타민D, 담즙산, 콜레스테롤의 생합성에도 이용될 수 있다.

[0033] 상기 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명은 상기 당뇨병 진단용 조성물을 포함하는 당뇨병 진단용 키트를 제공한다:

[0036] “당뇨병 진단용 키트”는 당뇨병 진단용 조성물이 포함된 키트를 의미하며, 상기 키트는 키트를 사용하기 위한 방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 시료에서 확인된 1,5-안하이드로글루시톨, 베타-알라닌, 트레오닌, 펜타데칸산, 만노스, 트레오스, 솔비톨, 세린, 알라닌, 스쿠알렌으로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 당뇨병 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:

[0039] 상기 대조군은 당뇨병이 없는 정상인 또는 정상인으로부터 분리된 눈물 시료를 의미하는 것일 수 있다.

[0040] 상기 당뇨병 환자로부터 분리된 눈물 시료에서 확인된 대사체의 수준을 대조군과 비교하는 단계는 우선적으로 당뇨병 환자 및 정상 대조군에서의 대사체 농도를 측정하는 단계를 포함하고, 상기 대사체의 농도를 비교하여 건강한 대조군 대비 당뇨병 환자군에서 대사체 농도가 유의하게 높거나 낮은 것을 판단하는 것을 의미한다.

[0041] 상기 당뇨병 환자 및 정상 대조군에서의 대사체 농도를 측정하는 단계는 정량기기, 즉 크로마토그래피/질량분석기에 의해 정량화될 수 있다. 상기 정량기기는 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 정량 목적의 크로마토그래피일 수 있고, 정량기기의 종류는 예를 들면 가스 크로마토그래피, 액체-고체 크로마토그래피(Liquid-Solid Chromatography, LSC), 종이 크로마토그래피(Paper Chromatography, PC), 박층 크로마토그래피(Thin-Layer Chromatography, TLC), 기체-고체 크로마토그래피(Gas-Solid Chromatography, GSC), 액체-액체 크로마토그래피(Liquid-Liquid Chromatography, LLC), 포말 크로마토그래피(Foam Chromatography, FC), 유화 크로마토그래피(Emulsion Chromatography, EC), 기체-액체 크로마토그래피(Gas-Liquid Chromatography, GLC), 이온 크로마토그래피(Ion Chromatography, IC), 겔 여과 크로마토그래피(Gel Filtration Chromatograhy, GFC) 또는 겔 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography, GPC)일 수 있고, 바람직하게는 GC/TOF MS(gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석기기일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예**

[0046] **1. 실험방법**

[0047] **(1) 당뇨병 환자 또는 정상인의 눈물 채취**

[0048] 본 발명은 임상연구를 위해 경희의대 강동경희대학교병원 IRB (임상연구 기관윤리위원회)의 승인을 거쳐 강동경희대학교병원의 내분비내과에 진료중인 당뇨병 환자와 당뇨병이 없는 정상인을 대상으로 연구에 동의한 대상자에 한하여 연구를 진행하였다.

[0049] 당뇨병 환자 또는 정상인의 눈물 내 대사체를 동정하기 위해, 총 44명의 당뇨병 환자와 당뇨병이 없는 건강한 성인을 대조군으로 하여 양안을 포함하여 54개의 눈물 샘플을 채취하였다.

[0051] **(2) GC/TOF MS 및 OPLS-DA 분석**

[0052] 각 눈물 샘플 10 μl에 순수 메탄올 990 μl을 섞고 강하게 혼합(vortexing)한 후에 원심분리하여 대사체를 추출하였다. 이후 추출한 대사체를 유도체화 시킨 후 GC/TOF MS 를 이용하여 분석하는데, 그 과정은 다음과 같다. 추출한 검체를 스피드 백으로 건조시킨 후에 5 μl의 40%(w/v)농도의 O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine을 넣고 30° C, 200 rpm에서 90분간 반응을 시킨다. 그리고 45 μl의 N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide를 넣고 37° C, 200 rpm에서 30분간 반응을 실시한다.

[0053] GC/TOF MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석할 때 사용한 컬럼은 RTX-5Sil MS capillary column (30 m length, 0.25 mm film thickness, and 25 mm inner diameter)이며, GC 컬럼 온도 조건은 먼저 50° C에서 5분간 유지시킨 후 330° C까지 승온 시킨 후 1분간 유지하였다. 1μl의 검체를 splitless로 injection 하였다. Transfer line 온도와 Ion source 온도는 각각 280° C, 250° C로 유지시켰다.

[0054] 이후, GC/TOF MS (gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry) 분석을 수행하였다. 우선 결과 값을 통계처리 가능한 수치로 변환하고, 이를 이용하여 통계학적으로 두 생체시료군 (당뇨병 환자군 및 정상 대조군)의 차별성을 검증하기 위해 교부분 최소제곱회귀법(Orthogonal partial least squares discriminant analysis: OPLS-DA)을 수행하여, 두 생체시료군 간의 유의적인 차이를 나타내는 대사체 바이오마커를 선정하고, 해당 바이오마커들에 대해 추가적으로 분석하고 검증하였다.

[0055] **2. 실험결과**

[0056] **(1) GC/TOF MS 분석 결과**

[0057] GC/TOF MS 결과를 보유하고 있는 library에서 찾아 동정하여, 결과적으로 눈물에서 48개의 대사체를 동정하였다(표 1). 구체적으로는 아민류, 아미노산류, 당 및 당 알코올류, 지방산류, 인산류, 유기산류 등을 포함한 총 48개의 대사체를 동정 및 상대정량하였다. 이를 기반으로 당뇨병 환자와 건강한 대조군의 대사체 차이가 있는지 살펴보기 위하여 OPLS-DA를 이용하여 구분하였다.

표 1

[0059]

Category	대사체(metabolites) 규명 (눈물)
Amine	Adenosine
Amino acid	Alanine, Oxoproline, Serine, Threonine, β-alanine
Organic acid	Azelaic acid, Citrate, DL-3-aminoisobutyrate, Fumarate, Galactonate, Gluconic acid lactone, Glycerate, Glycolate, Oxalate, Pyrrole-2-carboxylate, Succinate, Terephthalate, β-hydroxybutyrate
Fatty acid	1-monopalmitin, 1-monostearin, Arachidic acid, Decanoic acid, Dodecanoic acid, Heptadecanoic acid, Lignoceric acid, Myristic acid, Nonanoic acid, Oleic acid, Palmitic acid, Pentadecanoic acid, Stearic acid
Sugar and sugar alcohol	1,5-anhydroglucitol, Fucose, Galactose, Glucose, Glycerol, Mannitol, Mannose, Myo-inositol, Sorbitol, Threitol, Threose, Trehalose
Miscellaneous	1,2,4-benzenetriol, Phosphate, Salicylaldehyde, Squalene

[0060] **(2) OPLS-DA를 이용한 당뇨병 환자군 및 건강한 대조군간 대사체 발현 차이 확인**

[0061] 실시예 1로부터 동정한 48개 대사체의 발현 수준을 확인하고 당뇨병 환자와 건강한 대조군 간의 대사체 프로파일링 차이를 비교하기 위하여 OPLS-DA를 실시하였다.

[0062] 그 결과, 당뇨병 환자와 건강한 대조군의 눈물 내 대사체 프로파일이 명확하게 차이가 나는 것을 확인하였다(도 1A). OPLS-DA 모델의 t[1] 축을 기준으로 건강한 대조군이 양수값을 띠며 당뇨병 환자가 음수값을 띠어서 서로 대사체 프로파일이 완전히 구분되는 것을 확인하였다(표 2). 당뇨병 환자와 건강한 대조군을 구분하는 OPLS-DA 모델이 통계적으로 유의미하게 외부 샘플에도 적용이 가능한지 살펴보기 위하여 permutation test를 진행하였고, 그 R2 값과 Q2 값이 original points보다 낮아서 모델이 통계적으로 유효함을 살펴볼 수 있었다(도 1B).

표 2

[0064]

당뇨병환자	t[1]	대조군	t[1]
당뇨병환자_1	-1.000	대조군_1	0.832
당뇨병환자_2	-0.759	대조군_2	0.618
당뇨병환자_3	-0.582	대조군_3	1.221
당뇨병환자_4	-1.548	대조군_4	0.021
당뇨병환자_5	-1.170	대조군_5	0.460
당뇨병환자_6	-1.249	대조군_6	1.173
당뇨병환자_7	-0.768	대조군_7	0.080
당뇨병환자_8	-2.158	대조군_8	-0.442
당뇨병환자_9	-0.945	대조군_9	0.456
당뇨병환자_10	-1.330	대조군_10	0.808
당뇨병환자_11	-1.369	대조군_11	2.364
당뇨병환자_12	-2.463	대조군_12	1.197
당뇨병환자_13	-2.287	대조군_13	2.392
당뇨병환자_14	-1.597	대조군_14	1.579
당뇨병환자_15	-3.568	대조군_15	2.234
당뇨병환자_16	-0.254	대조군_16	1.199
당뇨병환자_17	-1.532	대조군_17	1.801

당뇨병환자_18	-1.182	대조군_18	1.953
당뇨병환자_19	-0.677	대조군_19	1.768
당뇨병환자_20	-2.458	대조군_20	0.895
당뇨병환자_21	-1.257	대조군_21	1.862
당뇨병환자_22	-2.444	대조군_22	1.374
당뇨병환자_23	-1.158	대조군_23	0.973
당뇨병환자_24	-2.138	대조군_24	0.190
		대조군_25	2.294
		대조군_26	1.489
		대조군_27	2.102
		대조군_28	-0.330
		대조군_29	1.977
		대조군_30	1.351

[0065] **(3) Mann Whitney U test를 이용한 당뇨병 환자-특이적으로 증감한 대사물질의 규명**

[0066] 당뇨병의 유무에 따라 눈물에서 유의미하게 증감하는 대사물질을 확인하기 위해, 상기 48개의 대사물질에 Mann Whitney U test를 통해서 신뢰구간을 분석하였다 (표 3). 그 결과, 10 개의 대사물질이 당뇨병 환자의 눈물에서 유의미하게 증감하는 것을 확인하였다 (표 4). 구체적으로는 1,5-anhydroglucitol, β-alanine, threonine, pentadecanoic acid, mannose, threose, sorbitol, serine, alanine, squalene 10개의 대사물질이 건강한 대조군보다 당뇨병 환자의 눈물에서 유의적으로 높거나 낮은 것을 확인할 수 있었다. 10개의 대사물질 중 threonine, pentadecanoic acid, mannose, threose, sorbitol, serine, alanine, squalene은 대조군 대비 당뇨병 환자에서 발현 수준이 높았고, 반면 1,5-anhydroglucitol, β-alanine는 대조군 대비 당뇨병 환자에서 발현수준이 낮았다. 이러한 결과는 MetaMapp로 형상화하여 나타내었다 (도 2).

표 3

[0068]

대사물질	당뇨병 환자 (median)	건강한 대조군 (median)	Fold change (당뇨/대조군)	*p* value
1,5-anhydroglucitol	365	2604	0.14	3.78.E-08
threonine	723	455	1.59	1.28.E-03
pentadecanoic acid	2935	2415	1.22	6.97.E-03
mannose	845	427	1.98	1.34.E-02
threose	314	210	1.50	1.34.E-02
sorbitol	281	199	1.41	2.06.E-02
serine	331	194	1.70	2.16.E-02
alanine	588	446	1.32	2.26.E-02
squalene	259	172	1.51	2.47.E-02
β-alanine	15943	21172	0.75	4.53.E-02
DL-3-aminoisobutyrate	4348	5259	0.83	5.33.E-02
trehalose	433	289	1.50	7.30.E-02
citrate	3850	8216	0.47	7.58.E-02
oxoproline	18103	11538	1.57	7.87.E-02
mannitol	502	340	1.47	8.80.E-02
fumarate	1334	1127	1.18	1.26.E-01
myristic acid	743	710	1.05	1.34.E-01
decanoic acid	930	776	1.20	1.49.E-01
palmitic acid	325987	303955	1.07	1.69.E-01
stearic acid	22754	21299	1.07	1.80.E-01
threitol	393	348	1.13	2.23.E-01
glycerol	25243	38472	0.66	2.58.E-01
glycolate	1448	1103	1.31	2.80.E-01
salicylaldehyde	696	641	1.09	2.88.E-01
adenosine	181	152	1.19	3.21.E-01
azelaic acid	138	133	1.03	3.56.E-01
succinate	908	671	1.35	3.56.E-01

phosphate	321326	345026	0.93	3.75.E-01
glycerate	373	347	1.07	4.03.E-01
lignoceric acid	1373	1283	1.07	5.08.E-01
nonanoic acid	906	864	1.05	5.08.E-01
glucose	2774	3070	0.90	5.42.E-01
arachidic acid	299	258	1.16	5.66.E-01
galactose	2239	2225	1.01	6.14.E-01
heptadecanoic acid	412	380	1.08	6.14.E-01
dodecanoic acid	502	555	0.91	7.15.E-01
gluconic acid lactone	166	169	0.98	7.15.E-01
terephthalate	367	388	0.95	7.28.E-01
oleic acid	503	527	0.95	7.94.E-01
myo-inositol	5814	4962	1.17	8.07.E-01
pyrrole-2-carboxylate	382	371	1.03	8.07.E-01
β-hydroxybutyrate	298	320	0.93	8.48.E-01
fucose	1838	1744	1.05	8.89.E-01
galactonate	238	232	1.03	9.44.E-01
oxalate	24031	23295	1.03	9.44.E-01

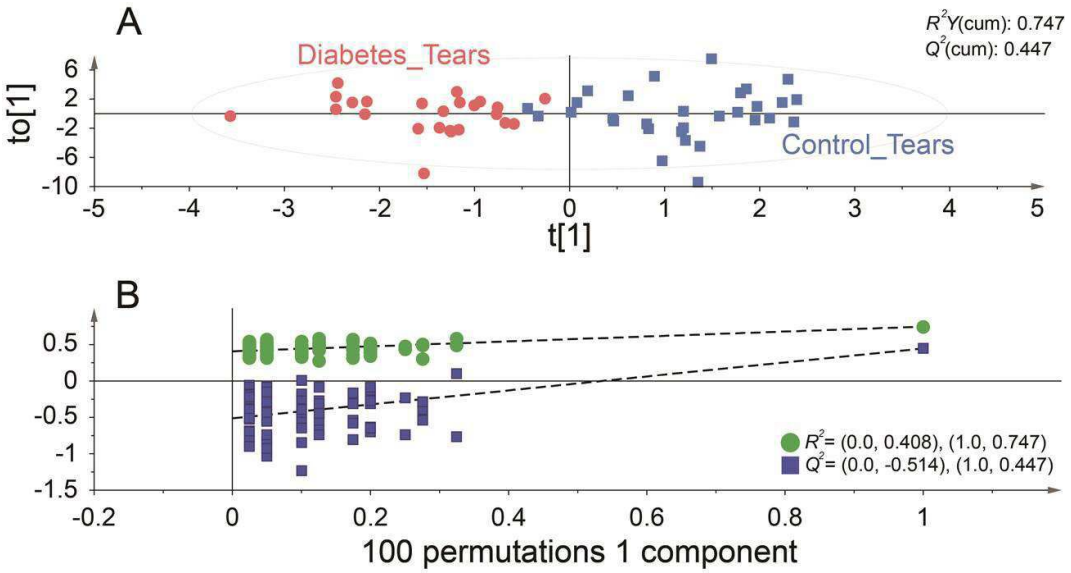
표 4

[0069]

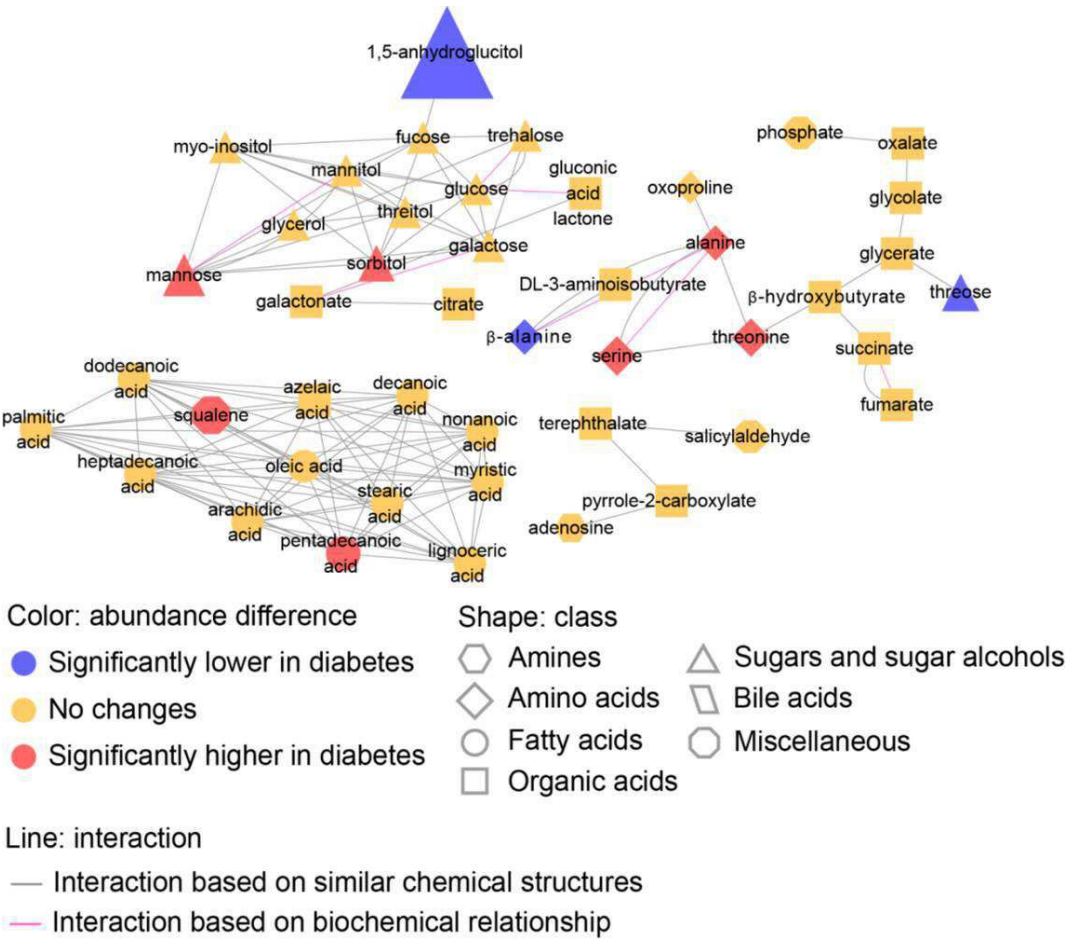
Category	대사물질	당뇨병 환자 (중앙값)	건강한 대조군 (중앙값)	Fold change (당뇨/대조군)	*p* value
아미노산	알라닌	588	446	1.32	2.26.E-02
	세린	331	194	1.70	2.16.E-02
	트레오닌	723	455	1.59	1.28.E-03
	베타-알라닌	15943	21172	0.75	4.53.E-02
지방산	펜타데칸산	2935	2415	1.22	6.97.E-03
당 및 당 알코올	1,5-안하이드로글루시톨	365	2604	0.14	3.78.E-08
	만노스	845	427	1.98	1.34.E-02
	트레오스	314	210	1.50	1.34.E-02
	솔비톨	281	199	1.41	2.06.E-02
기타	스쿠알렌	259	172	1.51	2.47.E-02

도면

도면1


A
R^2Y(cum): 0.747
Q^2(cum): 0.447
Diabetes_Tears
Control_Tears
to[1]
t[1]
B
R^2= (0.0, 0.408), (1.0, 0.747)
Q^2= (0.0, -0.514), (1.0, 0.447)
100 permutations 1 component

도면2


1,5-anhydroglucitol
myo-inositol
fucose
trehalose
mannitol
gluconic acid lactone
glucose
threitol
glycerol
galactose
sorbitol
mannose
galactonate
citrate
oxoproline
alanine
DL-3-aminoisobutyrate
β-alanine
serine
threonine
phosphate
oxalate
glycolate
glycerate
β-hydroxybutyrate
threose
succinate
fumarate
dodecanoic acid
azelaic acid
decanoic acid
palmitic acid
squalene
nonanoic acid
heptadecanoic acid
oleic acid
myristic acid
stearic acid
arachidic acid
pentadecanoic acid
lignoceric acid
terephthalate
salicylaldehyde
pyrrole-2-carboxylate
adenosine
Color: abundance difference
Significantly lower in diabetes
No changes
Significantly higher in diabetes
Shape: class
Amines
Amino acids
Fatty acids
Organic acids
Sugars and sugar alcohols
Bile acids
Miscellaneous
Line: interaction
Interaction based on similar chemical structures
Interaction based on biochemical relationship