

综述

代谢组学在常见眼科疾病中的应用及展望

卢天菊¹, 余雪萌², 陈小虎², 顾开明², 代宝珠², 代艳^{2*}(¹川北医学院眼视光医学院, 南充 637000; ²四川省绵阳市中心医院眼科, 绵阳 621000)

摘要: 代谢组学(metabolomics)是继基因组学和蛋白质组学之后发展起来的一门新兴系统生物学分支学科。代谢组学主要是全面系统地、定性定量地研究生命体对外界刺激、生理病理变化以及基因突变等因素而产生的体内代谢物水平的多元动态变化, 近年来被广泛用于临床疾病的研究。代谢组学研究终端代谢产物的变化规律, 有着较高的灵敏度及准确性, 为疾病研究提供了新的途径, 目前也越来越多地应用于眼科疾病研究。本文主要围绕代谢组学的基本原理及代谢组学在常见眼科疾病中的应用及展望进行综述, 有助于进一步梳理常见眼科疾病的防治策略, 为眼科疾病的机制探索提供思路。

关键词: 代谢组学; 质谱; 眼科疾病

Application prospect of metabolomics in
common ophthalmic diseasesLU Tianju¹, YU Xuemeng², CHEN Xiaohu², GU Kaiming², DAI Baozhu², DAI Yan^{2*}(¹Medical School of Ophthalmology and Optometry, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China;²Department of Ophthalmology, Mianyang Central Hospital, Mianyang 621000, China)

Abstract: Metabolomics is an emerging sub-discipline of systems biology developed after genomics and proteomics. The primary objective is to fully and systematically, qualitatively and quantitatively research the many dynamic changes in metabolite levels in the body caused by external stimuli, physiological and pathological alterations, and genetic mutations, etc. In recent years, it has been widely used in the study of clinical diseases. Metabolomics, which has been used increasingly in the study of ophthalmic disorders, offers a novel method for researching diseases by using high sensitivity and precision to analyze the shifting patterns of terminal metabolites. The paper focuses on the fundamental principles of metabolomics, as well as the application and prospects of metabolomics in common ophthalmic diseases, which will help to rationalize the prevention and treatment strategies for usual ophthalmic disorders and provide concepts for further studies into the mechanisms of ophthalmic disease.

Key Words: metabolomics; mass spectrometry; ophthalmic diseases

代谢组学(metabolomics)由英国帝国理工大学的Nicholson教授等^[1]于1999年提出, 第二年Fiehn等^[2]提出了metabolomics的概念并定义为在限定条

件下生物样本中所有代谢物的定性和定量分析方法, 认为分析生命体内代谢物可以显著扩展和增强现有基因组学方法的效力。目前代谢组学主要

收稿日期: 2023-12-29

基金项目: 四川省卫生健康委员会医学科技项目(21PJ177)

第一作者: E-mail: 1421390222@qq.com

*通信作者: E-mail: daiyan197621@163.com

对生命体内的小分子代谢物(如氨基酸、脂肪酸、糖类、维生素和脂类)进行全局分析以提供关键信息^[3,4]。代谢组学融合生物学、分析化学及统计学等多学科知识,检测生物样本在特定条件下代谢图谱的变化,可直观呈现机体的代谢变化^[5,6]。相比于其他组学方法,代谢组学最接近表型,也是最能调节和代表健康对照和疾病的分子表型,因此代谢组学分析常常作为生物标志物发现的绝佳来源。

代谢组学可根据实验目的和检测代谢物的不同分为靶向代谢组学和非靶向代谢组学(全谱代谢组学)^[7]。非靶向代谢组学通过无偏向性的检测和分析生物样本内的全部小分子代谢物(主要是相对分子量<1 000的内源性小分子化合物),通过生物信息学分析筛选差异代谢物,并对其进行通路分析揭示潜在的代谢机制^[8]。而靶向代谢组学则是针对生物样本中某一类特定代谢物的研究分析,适用于验证筛选出的潜在标志物和代谢通路^[9]。近年来,随着分析技术和信息学发展的日新月异,代谢物鉴定也随之变得愈加成熟。代谢组学的迅速发展,使其在各种疾病的临床诊断、预后评估、发病机制的探索、治疗靶点的发掘和新药疗效监测等方面都显示出巨大的应用潜力^[10,11]。代谢组学的优势主要体现在:样本相对容易获取,对机体损伤小,所获得信息量较大;在分子水平上增加对疾病病理生理学的理解,通过对代谢物通路的研究产生新的疾病机制假说;检测相对便宜,从经济学角度容易使患者接受^[12,13]。

代谢组学目前采用的主要分析技术包括核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和质谱(mass spectrometry, MS)及其联用技术^[14]。NMR技术可以定量分析小分子的代谢产物,分析速度快、选择性好、对分析样品无破坏,但其灵敏度比MS差,若被检样本浓度差别大则无法检出^[15]。基于MS的代谢组学方法则提供了高灵敏度和高选择性相结合的平台。MS联用其他分离分析技术,更能适应对不同性质小分子代谢物的检测,如气相-质谱联用技术(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)可用于分析低沸点、低极性、易挥发的衍生物;液相-质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)多用于

不易挥发和较好电离的代谢物,也是目前应用范围较广泛的分析检测技术^[16]。近年来,超高效液相色谱质谱联用技术(ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UPLC-MS)的问世,可在更短的色谱柱中实现物质组分的分离,极大地提高了检测速率、敏感性和分离效能。它可以从整体上提高色谱的分辨率,减少离子抑制及共洗脱现象,从而可以分析复杂基质中低含量的物质。UPLC-MS是解决代谢组复杂性和缺乏全面覆盖的缺陷的最佳工具,在代谢组学领域具有光明的应用前景^[17]。

1 代谢组学与糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)

DR是目前全球中老年人致盲以及后天性视力丧失的最主要原因。随着生活条件的改善,糖尿病患者数量激增,预计到2030年,DR患者数量会增长到1.91亿^[18]。根据疾病发展的不同阶段和严重程度,DR可分为非增殖性糖网(nonproliferative diabetic retinopathy, NPDR)和增殖性糖网(proliferative diabetic retinopathy, PDR)。当视网膜组织缺血缺氧形成新生血管时,病变则进入PDR。随着近年来代谢组学的飞速发展,使其在DR中的研究也愈加广泛。在DR的代谢研究中常选取玻璃体液、房水、血液等作为样本,在探索DR发病机制、发掘生物标志物以及开发相关药物治疗的研究中也发挥着越来越重要的作用^[19,20]。

Fernandes等^[21]进行了一项为期12年的随访研究,纳入1 349名糖尿病患者(其中1 021名不合并DR, 328名合并DR)进行血浆非靶向代谢组学分析,认为17种代谢物与DR发生有关,其中异亮氨酸、缬氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸水平升高与DR发生有显著相关性。Ma等^[22]结合代谢组学和基因组学,基于双样本孟德尔随机化分析了DR患者血清代谢物的影响作用,提出犬尿氨酸在DR中产生保护效应,可能是未来的潜在治疗靶点。Rhee等^[23]对病程超过15年的2型糖尿病患者是否合并DR进行分组,分析二者的血浆代谢组学,提出血浆中谷氨酰胺和谷氨酸可以作为预测DR的潜在生物标志物。通过相似的实验设计,Zuo等^[24]分析了138名伴或不伴DR的2型糖尿病患者的血清代谢组,发现

了15种与DR发生密切相关的内源性代谢产物, 提出亚油酸、 α 亚麻酸、半胱氨酸和蛋氨酸、精氨酸和脯氨酸、花生四烯酸以及苯丙氨酸的代谢参与DR的发生发展。Sumarriva等^[25]采用LC-MS技术对83例DR患者和90例2型糖尿病对照者的血浆进行非靶向代谢组学分析, 提出有126种代谢物在DR和糖尿病对照组之间存在显著差异, 而精氨酸、瓜氨酸和脱氢肉碱是导致这些差异的关键代谢物, 并且PDR比NPDR患者血浆中的脱氢肉碱水平明显升高。为进一步深入研究其机制作用, Peters等^[26]对6种精氨酸和瓜氨酸相关代谢物进行了靶向代谢组学分析, 发现与糖尿病对照组比较, DR患者血浆中精氨酸及瓜氨酸水平明显升高, 证实了精氨酸和瓜氨酸在DR中的作用, 但在调整肌酐水平以后, 这种关联却不再明显。此外, Sun等^[27]使用UPLC-MS鉴定出DR患者血浆中存在22种差异代谢物, 并提出这些代谢物的变化与血红蛋白水平成正相关。Xuan等^[28]利用多中心代谢组学研究, 纳入905例样本筛选和验证DR的生物标志物, 这项基于多平台的研究全面揭示了与DR发病和进展相关的代谢失调, 提出由12-羟基二十碳四烯酸和2-哌啶酮组成的生物标志物在区分DR和单纯糖尿病方面其敏感性高于糖化血红蛋白, 同时该研究在444例样本中进行了验证, 对于发现早期DR是具有可行性的。大样本研究和生物标志物的验证是本项多中心研究的优势, 可为DR的早期干预提供指导, 具有重大的临床意义。Chen等^[29]使用GC-MS对40例DR患者和40例糖尿病对照组血浆样本进行分析, 发现11种代谢产物与DR高度相关, 认为戊糖磷酸途径失调与DR发病密切关联, 提出2-脱氧核糖酸和3,4-二羟基丁酸是鉴别有无合并DR的新型生物标志物, 证明了氧化应激参与疾病发病机制, 这为DR的潜在致病机制研究奠定了基础, 也在DR的风险预估和新型治疗措施的开发方面提供价值。这些研究说明, 代谢组学在DR中的研究应用广泛, 对疾病的早期识别及病程进展的监测提供重要线索, 虽然上述研究中所确定的代谢特征并不完全一致, 这可能归因于分析方法、样本和代谢组测定范围的不同。

房水是存在于眼内并为周围无血管的角膜和晶状体供给营养的主要液体。通过房水循环将眼内

代谢物排到血液循环中, 因此房水的代谢组学信息可以直接反映眼睛的生理状态^[30]。Wang等^[31]采集了23例合并DR的糖尿病性白内障患者和25例非糖尿病性白内障患者的房水进行代谢组学分析, 重点介绍了8种来源于房水的差异代谢产物, 提出半乳糖代谢、糖酵解和抗坏血酸-醛固酮代谢是在DR中受到明显干扰的代谢途径。这也意味着房水成分的测定可以作为病情评估、眼前节变化评估和潜在治疗策略的指标。Jin等^[32]对DR、糖尿病、白内障患者的房水进行NMR研究发现, DR患者房水中的乳酸盐、琥珀酸盐、抗坏血酸盐及甲酸盐水平明显下调。而天冬酰胺和异亮氨酸水平上调。他们推测, 这些代谢产物的改变意味着DR患者存在能量代谢和氨基酸代谢失调, 并且房水中丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸等代谢途径的改变, 也在一定程度上提示存在线粒体功能障碍和氧化应激损伤。由此可见, 糖尿病患者的房水代谢组学分析可能是提高DR进展预测的可靠方法。玻璃体作为直接连接视网膜和晶状体的水样介质, 它包含了大量关于眼部和玻璃体视网膜疾病病因学的信息。Tomita等^[33]利用UPLC-MS对43例PDR和21例NPDR的玻璃体液进行分析, 鉴定出158种代谢产物发生变化, PDR患者玻璃体中肌酸下降, 可能与视网膜新生血管的产生相关, 从而加速玻璃体积血的发生。这提示我们, 补充肌酸可能有助于抑制PDR的新生血管产生, 强调了对玻璃体进行代谢组学研究的重要性。虽然对局部眼内液的生物标志物进行精确定量可以为眼科疾病提供较大的价值线索, 然而受限于房水和玻璃体液取材的侵入性, 获取大样本研究及代谢物验证仍具有较大挑战性, 相信在未来基于动物模型的代谢组学研究将有助于提高我们对DR发病机制的进一步阐明。

2 代谢组学与年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)

AMD是一种影响视网膜黄斑区域的疾病, 会导致中心视力逐渐丧失。在发达国家, AMD是50岁及以上人群失明的主要原因。早期, AMD无明显临床症状, 进展到晚期时, 可分为新生血管性(湿性或渗出性)和非新生血管性(萎缩性、干性或

非渗出性)。目前干性AMD尚无有效疗法,对于湿性AMD,抗血管内皮生长因子治疗现作为一线疗法^[34]。为进一步深入了解AMD的发病机制,我们可借助代谢组学等先进技术来分析和研究。Zhao等^[35]使用UPLC-MS分析了30例湿性黄斑变性患者和30例对照组的血浆代谢组,结果发现,脂类及类脂类分子含有的代谢物数量最多,提出16种可以有效识别湿性AMD的生物标志物,强调了甘油磷脂和鞘脂通路是AMD的关键路径。Lains等^[36]使用非靶向MS技术对391例AMD患者和100例50岁以上正常对照组的血浆代谢组学进行了横断面研究,发现包含脂类、氨基酸及核苷酸等28种代谢产物在AMD和对照组之间有显著差异,这些代谢产物在AMD的不同严重程度阶段也存在差异。2017年,Lains等^[37]使用NMR分析AMD和正常对照的血浆代谢组,提出部分氨基酸、有机酸、二甲基砜和特定脂质的水平发生了变化,可能与病变严重程度关联,从而提供了部分有关疾病进展的生物信息。这些研究有助于了解AMD的病理生理学,并可能成为未来这种致盲疾病的生物标志物确定和精准医学的基础。Acar等^[38]对AMD进行了一次大规模的整合代谢组学分析,鉴定出60种差异代谢物,包括氨基酸、柠檬酸、酪氨酸、高密度脂蛋白和极低密度脂蛋白。一些变化显著的代谢物如柠檬酸与Lains等^[37]的研究结果一致。Acar等^[38]提出,脂蛋白水平与AMD相关的遗传变异有关,而必需氨基酸的减少可能意味着AMD的营养缺乏。这可能表明了AMD的主要致病机制通路之间的生物学相互作用,也意味着多种通路可能需要同时作为成功治疗AMD的靶点。

3 代谢组学与青光眼(glaucoma)

青光眼是一种由于眼压升高和其他因素引起的以视神经损伤和视网膜神经节细胞进行性退化为特征的不可逆致盲性眼病。据预测,到2040年,将有1.18亿人患青光眼。近年来,组学技术陆续被应用于研究青光眼可能的病理机制。目前诊断青光眼仍缺少快速、可靠的诊断方法,临床检查很大程度依赖于定期的结构和功能检查,但这些检查在早期诊断中均缺乏敏感性。青光眼的发生发展很大程度与其相应的代谢改变密切相关,明确

这些代谢物和代谢途径的变化,是代谢组学在青光眼研究中的突破口^[39]。在过去的研究中,发现了许多青光眼的共同代谢特征,包括半胱氨酸、谷氨酸、丙二醛、磷脂酰胆碱等在青光眼患者或动物模型中高表达,而精胺、亚精胺、柠檬酸及维生素C等含量降低。除筛选生物标志物外,Sato等^[40]使用非靶向MS分析了40例青光眼患者和37例白内障对照组的房水代谢物,并使用靶向MS对结果加以验证,发现8种代谢物质存在显著差异,其中病例组房水中谷胱甘肽水平显著降低,可能与视野缺损密切相关。由于血-房水屏障的存在,房水代谢特征相对稳定,受全身和外界代谢因素干扰小,更能准确反映青光眼患者局部代谢微环境的病理变化特征。研究表明,房水的代谢组分析有助于诊断青光眼,提示过度氧化应激可能参与了青光眼的发病机制^[41]。而Benoist等^[42]利用Meta分析也获得相似结论,血清和房水中氧化应激水平升高,并认为丙二醛是青光眼患者血清中反映氧化应激状态的最佳生物标志物。Arai-Okuda等^[43]对高眼压小鼠的视网膜进行GC-MS分析,发现眼压升高超过4周的实验组中D-葡萄糖和L-谷氨酸水平显著高于对照组,表明青光眼进展可能伴随乳酸代谢紊乱。Pan等^[44]进行的一项非靶向代谢组学研究,纳入16例开角型青光眼和24例仅接受白内障手术的患者,从房水样本中筛选出的甲基丙二酸、核糖醇、生物素等14种代谢物作为潜在生物标志物,可以将开角型青光眼和白内障对照组区分开。这一发现对青光眼新型疗法的发掘有一定价值。回顾既往研究发现,所揭示的潜在代谢标志物大体相同,并且每项研究中有显著差异的代谢产物总体变化趋势相同。

4 代谢组学与干眼症(dry eye disease, DED)

DED是最常见的眼表疾病,是由于泪液的质或量以及动力学异常导致的泪膜稳定性下降或眼表微环境失衡所致的慢性疾病。通常可由多因素引起,近年来,干眼发病率逐年攀升,调查显示^[45],全球DED发病率为5%~50%,主要表现为眼内异物感、畏光、灼烧、疼痛和视物模糊等。目前代谢组学对干眼的研究主要集中于对血液、泪液、唾液及尿液样本的分析。最近的一项研究分

析了女性干眼患者和对照组的泪液代谢组及唾液代谢组, 在泪液代谢组中检测出肉碱、精胺、油酰胺及亚精胺发生明显改变, 提出干眼患者的唾液中次牛磺酸水平明显下降^[46]。但本研究纳入样本量较少, 未来还需扩大样本量研究并进一步阐明差异代谢物的确切作用。Oase等^[47]通过分析高脂肪饮食组和正常饮食组小鼠血浆中代谢物变化, 结果显示, 与对照组相比, 高脂肪饮食组小鼠血浆中胆固醇酯、甘油三酯、神经酰胺和神经鞘磷脂水平明显升高, 且高脂肪饮食组睑板腺出现肥大, 说明高脂肪饮食不仅会导致血脂异常, 也会改变睑板腺结构和功能。这表明, 饮食控制是睑板腺功能障碍所致DED治疗策略中值得参考的重要因素。2017年, Vehof等^[48]对2819名受试者进行血清非靶向代谢组学分析, 检测了222种与干眼相关的血清代谢产物, 并提出雄激素可以作为干眼的生物标志物。泪液中类固醇水平的降低提示皮质醇和雄激素在DED中起到重要作用, 也为DED的类固醇激素治疗提供了理论依据。在临床中, 全身或局部的性激素治疗对DED具有一定疗效^[49]。我们需要注意的是, 类固醇受体在人体分布广泛, 类固醇制剂的使用存在一定潜在风险, 因此, 探讨对DED治疗安全有效的激素种类、用量以及剂型是未来研究的重点。

5 代谢组学与圆锥角膜(keratoconus)

圆锥角膜是以角膜中央变薄、局部扩张成锥形突出为特征的一种角膜疾病, 严重威胁视力^[50]。其病因尚不明确, 现有研究认为, 圆锥角膜的发病机制是遗传和环境因素共同作用的结果^[51,52]。圆锥角膜的生物力学特性使患者更容易受到创伤。圆锥角膜的治疗主要是通过佩戴角膜硬性接触镜来改善散光, 或通过角膜基质环植入手术来稳定角膜形状, 角膜移植是最后的治疗手段。目前提出角膜胶原交联术(cornea collagen crosslinking, CXL)能有效改善近视及高散光症状, 阻止疾病的进展。Kryczka等^[53]使用高分辨率NMR和高效液相色谱方法分析圆锥角膜和正常角膜的代谢特征, 发现圆锥角膜中存在高浓度水平的柠檬酸和醋酸盐, 认为圆锥角膜的发生可能与角膜的加速老化密切相关。Daphne等^[54]应用非靶向代谢组学方法

鉴定圆锥角膜的血清生物标志物, 发现圆锥角膜中的硫酸脱氢表雄酮、前列腺素a2、前列腺素16、16-二甲基前列腺素E2和5-羟基二十碳四烯酸显著上调, 可以作为疾病筛查的潜在生物标志物。CXL可以提高角膜硬度和稳定性, 可以用于进展期圆锥角膜且角膜仍有一定厚度的患者。对进展期圆锥角膜进行CXL前后的泪液进行代谢组学分析, CXL治疗6个月后, 有16种有机酸增加而8种有机酸水平下降。其中增幅最大的是具有抗氧化作用的天冬氨酸衍生物N-乙酰-L-天冬氨酸、3-OH丁酸水平明显下降, 提示CXL有助于改善角膜的糖代谢^[55]。

6 展望

代谢组学作为“组学”技术的后起之秀, 为研究临床疾病提供了新的手段, 可以帮助人们更好、更深入地了解生物系统对环境和基因变化的响应, 在揭示复杂性疾病的机制方面和药物代谢模式方面具有独特的优势。由于眼部组织及液体不易获取, 所以代谢组学在眼科学研究相对有限。目前用于眼部疾病研究的代谢组学数据大部分来自少量的临床样本, 相关动物实验开展并不多。代谢组学对于眼部疾病研究的巨大潜力尚未被完全发掘, 医学的未来正向个体化方向发展, 随着代谢组学朝着整合化、自动化和高通量方向发展, 代谢组学必将成为眼科疾病分析和精准医疗的有力工具。

参考文献

- [1] Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, 1999, 29(11): 1181-1189
- [2] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(11): 1157-1161
- [3] Manchester M, Anand A. Metabolomics: strategies to define the role of metabolism in virus infection and pathogenesis. *Adv Virus Res*, 2017, 98: 57-81
- [4] Schmidt DR, Patel R, Kirsch DG, et al. Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(4): 333-358

- [5] Sun J, Xia Y. Pretreating and normalizing metabolomics data for statistical analysis. *Genes Dis*, 2023, 11(3): 100979
- [6] Joshi R, Sharma S, Kumar D. Advances of ion mobility platform for plant metabolomics. *Crit Rev Anal Chem*, 2024, 54(1): 175-191
- [7] Ribbenstedt A, Ziarrusta H, Benskin JP, et al. Development, characterization and comparisons of targeted and non-targeted metabolomics methods. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0207082
- [8] Mitra A, Choi S, Boshier PR, et al. The human skin volatome: a systematic review of untargeted mass spectrometry analysis. *Metabolites*, 2022, 12(9): 824
- [9] Yan X, Li L, Liu P, et al. Targeted metabolomics profiles serum fatty acids by HFD induced non-alcoholic fatty liver in mice based on GC-MS. *J Pharm BioMed Anal*, 2022, 211: 114620
- [10] Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(7): 451-459
- [11] Zhou J, Zhong L. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry based metabolomics in predictive and personalized medicine. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1049016
- [12] Taylor J, King RD, Altmann T, et al. Application of metabolomics to plant genotype discrimination using statistics and machine learning. *Bioinformatics*, 2002, 18(suppl_2): S241-S248
- [13] Zamboni N, Saghatelian A, Patti GJ. Defining the metabolome: size, flux, and regulation. *Mol Cell*, 2015, 58(4): 699-706
- [14] Nagana Gowda GA, Raftery D. NMR-based metabolomics. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1280: 19-37
- [15] Emwas AH, Roy R, McKay RT, et al. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites*, 2019, 9(7): 123
- [16] van de Velde B, Guillaume D, Kohler I. Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry in metabolomics: Past, present, and future perspectives. *J Chromatography B*, 2020, 1161: 122444
- [17] Perez de Souza L, Alseekh S, Scossa F, et al. Ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry variants for metabolomics research. *Nat Methods*, 2021, 18(7): 733-746
- [18] Youngblood H, Robinson R, Sharma A, et al. Proteomic biomarkers of retinal inflammation in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4755
- [19] Midena E, Frizziero L, Midena G, et al. Intraocular fluid biomarkers (liquid biopsy) in human diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2021, 259(12): 3549-3560
- [20] Haines NR, Manoharan N, Olson JL, et al. Metabolomics analysis of human vitreous in diabetic retinopathy and rhegmatogenous retinal detachment. *J Proteome Res*, 2018, 17(7): 2421-2427
- [21] Fernandes Silva L, Hokkanen J, Vangipurapu J, et al. Metabolites as risk factors for diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes: a 12-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2023, 109(1): 100-106
- [22] Ma L, Dong Y, Li Z, et al. Relationship between circulating metabolites and diabetic retinopathy: a two-sample Mendelian randomization analysis. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 4964
- [23] Rhee SY, Jung ES, Park HM, et al. Plasma glutamine and glutamic acid are potential biomarkers for predicting diabetic retinopathy. *Metabolomics*, 2018, 14(7): 89
- [24] Zuo J, Lan Y, Hu H, et al. Metabolomics-based multidimensional network biomarkers for diabetic retinopathy identification in patients with type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diab Res Care*, 2021, 9(1): e001443
- [25] Sumarriva K, Uppal K, Ma C, et al. Arginine and carnitine metabolites are altered in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(8): 3119-3126
- [26] Peters KS, Rivera E, Warden C, et al. Plasma arginine and citrulline are elevated in diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmology*, 2022, 235: 154-162
- [27] Sun Y, Zou H, Li X, et al. Plasma metabolomics reveals metabolic profiling for diabetic retinopathy and disease progression. *Front Endocrinol*, 2021, 12: 757088
- [28] Xuan Q, Ouyang Y, Wang Y, et al. Multiplatform metabolomics reveals novel serum metabolite biomarkers in diabetic retinopathy subjects. *Adv Sci*, 2020, 7(22): 2001714
- [29] Chen L, Cheng CY, Choi H, et al. Plasma metabolomic profiling of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 2016, 65(4): 1099-1108
- [30] Serrano-Marín J, Marin S, Bernal-Casas D, et al. A metabolomics study in aqueous humor discloses altered arginine metabolism in Parkinson's disease. *Fluids Barriers CNS*, 2023, 20(1): 90
- [31] Wang H, Fang J, Chen F, et al. Metabolomic profile of diabetic retinopathy: A GC-TOFMS-based approach using vitreous and aqueous humor. *Acta Diabetol*, 2020, 57(1): 41-51
- [32] Jin H, Zhu B, Liu X, et al. Metabolic characterization of diabetic retinopathy: an ¹H-NMR-based metabolomic approach using human aqueous humor. *J Pharm BioMed Anal*, 2019, 174: 414-421
- [33] Tomita Y, Cagnone G, Fu Z, et al. Vitreous metabolomics profiling of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 2021, 64(1): 70-82

- [34] Hussain RM, Shaukat BA, Ciulla LM, et al. Vascular endothelial growth factor antagonists: promising players in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 2653-2665
- [35] Zhao T, Li J, Wang Y, et al. Integrative metabolome and lipidome analyses of plasma in neovascular macular degeneration. *Heliyon*, 2023, 9(10): e20329
- [36] Láins I, Chung W, Kelly RS, et al. Human plasma metabolomics in age-related macular degeneration: meta-analysis of two cohorts. *Metabolites*, 2019, 9(7): 127
- [37] Láins I, Duarte D, Barros AS, et al. Human plasma metabolomics in age-related macular degeneration (AMD) using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0177749
- [38] Acar İE, Lores-Motta L, Colijn JM, et al. Integrating metabolomics, genomics, and disease pathways in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 2020, 127(12): 1693-1709
- [39] Barbosa-Breda J, Himmelreich U, Ghesquière B, et al. Clinical metabolomics and glaucoma. *Ophthalmic Res*, 2018, 59(1): 1-6
- [40] Sato K, Saigusa D, Kokubun T, et al. Reduced glutathione level in the aqueous humor of patients with primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma. *NPJ Aging*, 2023, 9(1): 28
- [41] Cáceres-Vélez PR, Hui F, Hercus J, et al. Restoring the oxidative balance in age-related diseases-an approach in glaucoma. *Ageing Res Rev*, 2022, 75: 101572
- [42] Benoist d'Azy C, Pereira B, Chiambaretta F, et al. Oxidative and anti-oxidative stress markers in chronic glaucoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0166915
- [43] Arai-Okuda M, Murai Y, Maeda H, et al. Potentially compromised systemic and local lactate metabolic balance in glaucoma, which could increase retinal glucose and glutamate concentrations. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 3683
- [44] Pan CW, Ke C, Chen Q, et al. Differential metabolic markers associated with primary open-angle glaucoma and cataract in human aqueous humor. *BMC Ophthalmol*, 2020, 20(1): 183
- [45] Rao SK, Gokhale N, Matalia H, et al. Inflammation and dry eye disease—where are we? *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(5): 820-827
- [46] Fineide FA, Tashbayev B, Elgstøen KBP, et al. Tear and saliva metabolomics in evaporative dry eye disease in females. *Metabolites*, 2023, 13(11): 1125
- [47] Osae EA, Bullock T, Chintapalati M, et al. Obese mice with dyslipidemia exhibit meibomian gland hypertrophy and alterations in meibum composition and aqueous tear production. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22): 8772
- [48] Vehof J, Hysi PG, Hammond CJ. A metabolome-wide study of dry eye disease reveals serum androgens as biomarkers. *Ophthalmology*, 2017, 124(4): 505-511
- [49] Nuzzi R, Caselgrandi P. Sex hormones and their effects on ocular disorders and pathophysiology: current aspects and our experience. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3269
- [50] Sharif R, Bak-Nielsen S, Hjortdal J, et al. Pathogenesis of Keratoconus: The intriguing therapeutic potential of Prolactin-inducible protein. *Prog Retinal Eye Res*, 2018, 67: 150-167
- [51] Teo AWJ, Mansoor H, Sim N, et al. *In vivo* confocal microscopy evaluation in patients with keratoconus. *J Clin Med*, 2022, 11(2): 393
- [52] Teo AWJ, Zhang J, Zhou L, et al. Metabolomics in corneal diseases: a narrative review from clinical aspects. *Metabolites*, 2023, 13(3): 380
- [53] Kryczka T, Ehlers N, Nielsen K, et al. Metabolic profile of keratoconic cornea. *Curr Eye Res*, 2013, 38(2): 305-309
- [54] Daphne Teh AL, Jayapalan JJ, Loke MF, et al. Identification of potential serum metabolic biomarkers for patient with keratoconus using untargeted metabolomics approach. *Exp Eye Res*, 2021, 211: 108734
- [55] Sağlık A, Koyuncu İ, Soydan A, et al. Tear organic acid analysis after corneal collagen crosslinking in keratoconus. *Eye Contact Lens Sci Clin Pract*, 2020, 46(2): S122-S128