

УДК 577.121:543.068.7

Метаболиты фекалий как неинвазивные биомаркеры заболеваний желудочно-кишечного тракта

Е. С. Жгун*, Е. Н. Ильина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины федерального медико-биологического агентства России, Москва, 119435 Россия

*E-mail: Al.androva@gmail.com

Поступила в редакцию 26.12.2019

Принята к печати 04.03.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10954

РЕФЕРАТ Как показали недавние исследования, микробиом играет важную роль и в поддержании здорового состояния кишечника человека, и при развитии патологических процессов. В последнее десятилетие отмечено повышение интереса к изучению состава метаболитов фекалий, вызванное, главным образом, возможностью использования метаболомных данных в диагностике заболеваний человека. О метаболитах фекалий известно существенно меньше, чем о метаболитах сыворотки крови, мочи, слюны и цереброспинальной жидкости. Несмотря на инструментальные и методологические достижения метаболомного анализа в целом, анализ фекального метаболома развит существенно хуже главным образом из-за неомогенности состава и отсутствия стандартизированных методов сбора, подготовки и непосредственного анализа образцов. В нашем обзоре суммирована информация о методах изучения метаболитов фекалий, описаны их группы, а также оценен потенциал их использования в диагностике заболеваний желудочно-кишечного тракта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метаболиты фекалий, неинвазивные биомаркеры, воспалительные заболевания кишечника, метаболомный анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БК – болезнь Крона; ВЗК – воспалительные заболевания кишечника; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГХ-МС – газовая хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ЖХ-МС – жидкостная хроматография, сопряженная с масс-спектрометрией; КЖК – короткоцепочечные жирные кислоты; ЛОС – летучие органические соединения; СРК – синдром раздраженного кишечника; ЯК – язвенный колит; ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на стремительное развитие средств анализа и накопление данных о метаболитах человека в целом, метаболиты фекалий изучены слабо. Фекалии очень сложны и неоднородны по своему составу, что существенно затрудняет их анализ. Большую часть твердой фракции (от 84 до 93%) образует органический материал, 25–54% которого составляет бактериальная биомасса, представленная как живыми, так и мертвыми бактериями [1]. В связи с этим большинство исследований состава фекалий человека направлены на определение его бактериальной составляющей с использованием высокопроизводительного секвенирования. Однако фекалии содержат также массивы клеток, больших и малых молекул, отражающих прямой результат употребления пищи, ее переваривания и последующей абсорбции как желудочно-кишечным трактом (ЖКТ), так и кишечными бактериями. К макромолекулам относятся макро-

волокна, белки, ДНК, полисахариды и т.д., а к малым молекулам – сахара, органические кислоты и аминокислоты, нуклеотиды, витамины, летучие органические соединения, которые и формируют метаболом кишечника. Применение интегративного подхода, включающего комплексный анализ метаболитов фекалий, позволяет значительно расширить информацию о его составе [2, 3]. Определение метаболомного профиля все чаще используется для поиска новых биологических маркеров различных патологических состояний и формирования новых гипотез их происхождения.

Наиболее полно описаны и охарактеризованы метаболиты сыворотки крови [4], мочи [5], цереброспинальной жидкости [6], слюны [7], что позволило создать общедоступные справочные базы метаболитов [8]. К настоящему времени база данных метаболитов человека Human metabolome database (<http://www.hmdb.ca/>) [8] содержит информацию

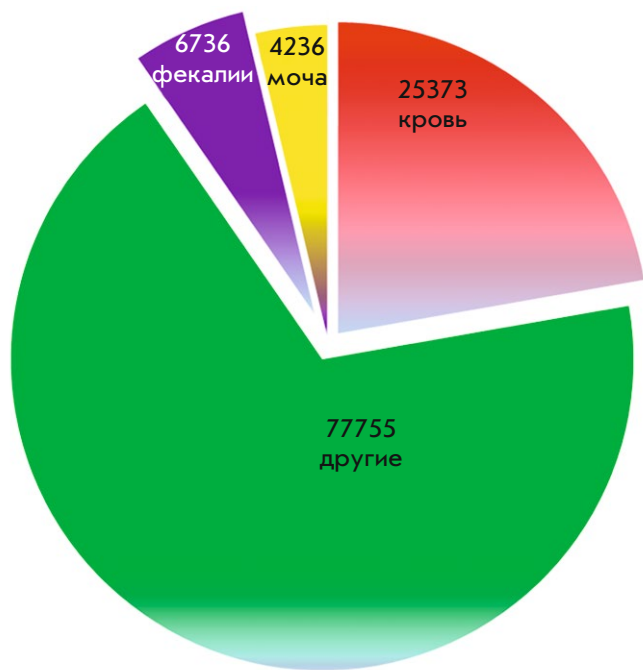


Рис. 1. Количество известных метаболитов человека в различных биологических субстанциях (по данным The Human Metabolome Database (HMDB), <http://www.hmdb.ca/>)

о более чем 100 тысячах соединений, в которой на долю метаболитов крови приходится более 25 тысяч, мочи – свыше 4 тысяч и фекалий – около 7 тысяч (рис. 1). Концентрация практически каждого из этих 100 тысяч метаболитов может изменяться при тех или иных отклонениях от нормы. Однако в качестве маркера заболевания можно использовать только воспроизводимые изменения продукции метаболита. Современные инструментальные методы анализа позволяют определять как индивидуальные метаболиты, так и метаболические профили. Гипо- или гиперпродукция индивидуального метаболита не всегда четко коррелирует с заболеванием, в таком случае он не может рассматриваться как маркер. Однако включение его в состав панели метаболитов, характерных для данного заболевания, делает его диагностически более значимым [9, 10].

В настоящее время описано 6736 метаболитов фекалий, что составляет 5.9% от общего числа охарактеризованных метаболитов. Их изучение как потенциальных неинвазивных диагностических маркеров исключительно важно, поскольку они могут специфически описывать энтерологические процессы и коррелировать с определенными заболеваниями толстой, ободочной или прямой кишки [11, 12].

Изучение фекалий человека продолжается тысячи лет. Врачи Древнего Китая, Египта, равно

как и античной Греции и Рима, по цвету и запаху фекалий оценивали функции кишечника и печени, корректировали диету [13]. Сегодня достижения медицины позволяют применять различные количественные фекальные тесты. Например, фекальный pH-тест для оценки содержания жирных кислот и мальабсорбции углеводов, для выявления непереносимости лактозы; обнаружение кишечных бактериальных инфекций или вырабатываемых ими токсинов (*Clostridium difficile* и *Helicobacter pylori*) с помощью иммунологических методов или молекулярного генотипирования [14, 15]; использование некоторых фекальных белков, особенно кальпротектина, для диагностики и контроля воспалительных заболеваний кишечника [16]. Тест на скрытую кровь в кале применяется для быстрого обнаружения желудочно-кишечных кровотечений и выявления рака толстой кишки на ранних стадиях [17]. Охарактеризованы специфичные для новообразований изменения ДНК, выделенной из фекалий, которые представляют интерес как потенциальные маркеры для выявления колоректального рака [18]. Создана портативная газочувствительная система «электронный нос», предназначенная для обнаружения панели летучих органических соединений (ЛОС) из фекалий и диагностики ряда патологических состояний, включая рак [19].

Несмотря на растущий интерес к изучению метаболитов фекалий, методы сбора, подготовки и анализа образцов до сих пор не стандартизованы. Фекалии достаточно сложны для исследования, так как они негетерогенны по составу, многокомпонентны, богаты макромолекулами и частицами непереваренной пищи, которые могут создавать проблемы при использовании инструментальных методов анализа. Состав метаболитов фекалий сильно варьирует в зависимости от типа принимаемой пищи и представляет собой результат совместного метаболизма хозяина и кишечных микроорганизмов (рис. 2). В отличие от метаболома мочи [5], сыворотки крови [4], цереброспинальной жидкости [6] или слюны [7], метаболом фекалий никогда не подвергался систематическому исследованию. Однако навыки анализа метаболитов различных биоматериалов существенно облегчают оптимизацию методологии при работе с фекалиями и обеспечивают важные количественные контрольные уровни сравнения и дифференциации между болезнью и здоровьем.

На рис. 3 приведены данные о количестве исследований, связанных с изучением метаболитов и неинвазивных метаболитных биомаркеров в важнейших биологических субстанциях человека, таких, как фекалии, сыворотка, плазма, моча за период 2010–2018. Видно, что наиболее изучены плазма крови и моча –



Рис. 2. Метаболиты в кишечнике человека и их связь с организмом хозяина

4793 и 3172 публикации соответственно, в то время как фекалии исследованы значительно меньше, только 198 статей. Интересно отметить, что, несмотря на большее число метаболитов, идентифицированных в фекалиях, чем в моче (практически на 40%), статей, посвященных их изучению, в 15 раз меньше. Такая диспропорция наблюдается и в случае других биологических субстанций (сыворотка, плазма). Число публикаций, посвященных неинвазивным метаболитным маркерам, коррелирует с общим числом публикаций (рис. 3). Так, метаболитные маркеры изучали в 7% публикаций, посвященных метаболитам в моче человека, 1.8% – в плазме, 3% – в сыворотке и 4% – в фекалиях. Можно предположить, что низкое число маркеров, выявленных в фекалиях, обусловлено всего лишь недостаточным интересом мирового научного сообщества к этому объекту.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ

Исследование метаболитов фекалий представляет собой сложную аналитическую задачу, так как молекулярный состав кишечного содержимого формируется соединениями эндогенного – человеческого или микроорганизменного происхождения, и экзогенного – проглоченных, абсорбированных или вдыхаемых соединений (компоненты пищи, газы или дым, средства личной гигиены, консерванты и другие материалы), с которыми человек контактирует повседневно [20]

Основными методами изучения метаболитов фекалий остаются хроматография, масс-спектрометрия и ЯМР. Чувствительность метода и охват определяемых метаболитов существенно варьируют в зависимости от типа аналитического инструмента,

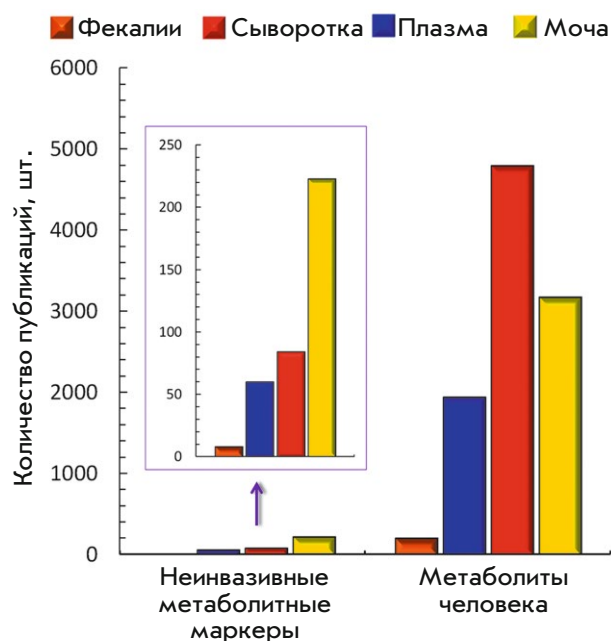


Рис. 3. Количество публикаций, связанных с изучением метаболитов человека и неинвазивных маркеров на их основе в биологических субстанциях (фекалии, сыворотка, плазма, моча), по данным <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> за 2019 год

так как разные платформы имеют разную чувствительность по отношению к метаболитам разных классов. В частности, газовая хроматография (ГХ-МС) наиболее эффективна для детекции летучих и органических соединений, ЯМР – для очень полярных, жидкостная хроматография (ЖХ-МС) – для гидро-

фобных, поэтому идеальным представляется сочетание использования нескольких платформ для достижения максимального охвата идентифицируемых метаболитов. К настоящему моменту комбинацию двух или более аналитических платформ применяли не более чем в 15% из более 100 опубликованных исследований.

Ядерный магнитный резонанс

ЯМР, в частности, ^1H -ЯМР, широко используется для обнаружения метаболитов в биологических образцах. Этот метод обладает рядом преимуществ по сравнению с ЖХ-МС- или ГХ-МС-хроматографией, таких, как очень высокий уровень воспроизводимости, надежная идентификация или классификация соединений, минимальная подготовка проб без химической дериватизации, возможность обнаружения неионных соединений (таких, как сахара и спирты) без нарушения структуры соединения. К недостаткам относится меньшая чувствительность по сравнению с масс-спектрометрическим определением (до 1000 раз на молярном уровне), что существенно сужает возможности использования данного метода [21–23].

Наиболее часто с помощью ЯМР обнаруживают аминокислоты и их производные, карбоновые кислоты, в том числе жирные с короткой и средней длиной цепи и их производные, сахара и желчные кислоты.

Масс-спектрометрические методы анализа

В настоящее время масс-спектрометрический анализ является главной альтернативой ЯМР. Методы МС-анализа можно разделить на прямой и сопряженный с предварительным разделением методами ГХ-МС- или ЖХ-МС-хроматографии или капиллярным электрофорезом (в настоящее время практически не применяется).

Масс-спектрометрический анализ может быть мишень-ориентированным или неориентированным. В первом случае анализ направлен на поиск конкретных классов метаболитов, например, аминокислот, жирных кислот, липидов, углеводов, желчных кислот, а во втором, на получение общей информации о метаболическом разнообразии образца, так называемого метаболического профиля [20, 23].

Каждый подход имеет свои уникальные преимущества. Мишень-ориентированная масс-спектрометрия в целом более чувствительна и в большей степени позволяет получать количественные результаты, однако ограничена количеством определенных классов молекул, идентифицируемых в процессе анализа. Проект «Американский кишечник» на выборке из более 100 образцов фекалий показал, что мишень-ориентированный анализ неверно иден-

тифицирует до 30% первичных данных и может привести к их неправильной интерпретации [24].

В мишень-неориентированном анализе, напротив, можно получить большой перечень молекул, и, следовательно, обнаружить новые, ранее неизвестные молекулы, однако идентификация полученных спектров представляет собой одну из ключевых задач [25]. Она частично решается путем нахождения совпадений в существующих базах данных спектров и соединений, таких, как HMDB [8], METLIN [26] или ChemSpider [27], в базах данных метаболических путей KEGG [28] или MetaCyc [29]. К примеру, в среднем, только 2% данных, полученных мишень-неориентированной ЖХ-МС, подлежат аннотированию [28–31].

Мишень-неориентированный анализ также обеспечивает лучшую корреляцию с данными микробиома, позволяя определить взаимосвязи между метаболитами и микроорганизмами, которые их продуцируют или утилизируют [20].

Разработано программное обеспечение, позволяющее обрабатывать информацию об образце, полученную мишень-ориентированным и мишень-неориентированным анализом, что позволяет более полно и объективно характеризовать его метаболомный состав и функциональную взаимосвязь с микробиомом [20].

ГХ-МС-хроматография является наиболее распространенным аналитическим методом для исследования метаболитов фекалий. Популярность ГХ-МС объясняется широким спектром определяемых метаболитов, высокой чувствительностью и относительной простотой идентификации соединений. Метод ГХ-МС используется для анализа летучих и нелетучих органических соединений (с предварительной химической дериватизацией соединений для улучшения их летучести).

Использование жидкостной хроматографии, совмещенной с масс-спектрометрией (ЖХ-МС) в фекальной метаболомике менее распространено, чем ГХ-МС, что объясняется более низкой хроматографической эффективностью ЖХ-МС по сравнению с ГХ-МС по форме и разрешению пиков.

Наиболее применимыми для некоторых групп фекальных метаболитов, в частности короткоцепочечных жирных кислот, по-прежнему остаются хроматографические методы анализа. Своего рода «золотым стандартом» остается газовая хроматография (ГХ), которая используется в клинико-диагностической практике с 1952 года [32]. Принцип ГХ основан на газе-носителе в качестве подвижной фазы, в котором соединения разделяются посредством дифференциального взаимодействия с неподвижной фазой колонки [33].

The screenshot displays the Human Fecal Metabolome (HFMDDB) database interface. The main search results show three entries: Butyric acid (HMDB0000039), Hexyl butyrate (HMDB0000039), and Butyl butyrate (HMDB0000039). A detailed view for Butyric acid is shown, including its chemical structure, description, and a table of normal concentrations in various biospecimens.

Concentration Details

Metabolite	HMDB0000039 (Butyric acid)
Biospecimen	Feces
Status	Detected but not Quantified
Data source	Referenced
Concentration	Adult (>18 years old)
Age	Adult (>18 years old)
Sex	Both
Condition	Normal

Normal Concentrations

Biospecimen	Status	Value	Age	Sex	Condition	Reference	Details
Blood	Detected and Quantified	1.0 (0.3-1.5) μ M	Adult (>18 years old)	Both	Normal	Geigy Scientific	Details
Breast Milk	Detected and Quantified	152 \pm 149 μ M	Adult (>18 years old)	Female	Normal	2402187	Details
Cerebrospinal Fluid (CSF)	Detected and Quantified	1.4 (0-2.8) μ M	Adult (>18 years old)	Both	Normal	Geigy Scientific	Details
Feces	Detected but not Quantified		Children (1-13 years old)	Both	Normal	24130022	Details
Feces	Detected but not Quantified		Adult (>18 years old)	Not Specified	Normal	Silke Matys	Details
Feces	Detected but not Quantified		Adult (>18 years old)	Female	Normal	Mette S. Sch.	Details
Feces	Detected but not Quantified		Adult (>18 years old)	Both	Normal	2687349	Details

Рис. 4. Скриншот базы данных метаболитов фекалий человека (<http://www.fecalmetabolome.ca>)

Решающее значение для качественного и количественного обнаружения КЖК имеет предварительная обработка фекалий [34, 35], включающая фильтрацию, центрифугирование, паровую или вакуумную перегонку или простое разбавление образца [33, 36, 37]. Дериватизация КЖК, необходимая для улучшения летучести соединений, достигается депротонированием – подкислением с помощью соляной [38], фосфорной [39], муравьиной [40], серной [41] или щавелевой [42] кислот.

Помимо экстракции различными растворителями, которая приводит к разделению двух взаимно не смешиваемых слоев, эффективна твердофазная микроэкстракция (SPME), которая в настоящее время становится более быстрой, более селективной и более чувствительной методикой из-за меньшего количества примесей [43].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) представляет хорошую альтернативу ГХ. Наиболее распространена ВЭЖХ с обращенной фазой, где неподвижная твердая фаза (колонка) гидрофобна, а подвижная жидкая фаза гидрофильна. Главное ее преимущество по сравнению с ГХ – отсутствие высоких температур. Как и в случае ГХ, для успешного анализа необходима оптимизация подготовки образцов и условий проведения анализа [44, 45].

База данных фекальных метаболитов человека (The human fecal metabolome database HFMDDB)

Опубликованные к настоящему времени результаты примерно 100 исследований, посвященных фекальным метаболитам, позволили создать список из 1890 соединений, охватывающий большинство известных классов метаболитов. Общее количество метаболитов (с учетом изомеров) составляет 6738 и формирует открытую базу данных (<http://www.fecalmetabolome.ca>) (рис. 4) [46]. Каждый метаболит фекалий имеет свой индивидуальный номер и связан с общей базой данных метаболитов человека (The human metabolome database HMDB) [8], которая содержит подробное описание каждого метаболита, включая его структуру, химическую классификацию, известные синонимы, физико-химические свойства, эталонные спектры, полученные с помощью ЯМР, ГХ-МС или ЖХ-МС, а также взаимосвязь с заболеваниями и возможные метаболические пути. Также в базу занесены концентрации метаболитов в фекалиях и других биологических образцах (если имеются) с соответствующими диапазонами, характеризующими норму.

МЕТАБОЛИТЫ В КИШЕЧНИКЕ ЧЕЛОВЕКА

По данным HMDB, бактериальные продукты кишечника составляют большую долю (до 92%) фекального

метаболизма по сравнению с только 3% метаболизма мочи [5]. К микробным метаболитам кишечника относятся коротко- и среднецепочечные жирные кислоты, аминокислоты и их производные, спирты, альдегиды, фенолы и производные полифенолов, индолы и сульфиды [47].

К наиболее распространенным метаболитам фекалий человека (нормированных на вес кала) относятся короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК): уксусная (36 ± 17 мкмоль/г), пропионовая (11 ± 5 мкмоль/г), масляная (6 ± 3 мкмоль/г) и их изоформы (данные получены мишень-ориентированным ГХ-МС [48]), а наименее распространены липиды. Фосфатидилхолины находятся на уровне ниже 0.02 ± 0.01 нмоль/г влажных фекалий (данные получены ЖХ-МС/МС [3]). В малых концентрациях присутствуют и ацилкарнитины (данные ЖХ-МС/МС [3]) и вторичные желчные кислоты, тауроурсодезоксихолевая кислота (0.3 ± 0.37 нмоль/г) и литохолил-таурин (0.51 ± 0.4 нмоль/г) влажных фекалий (ЖХ-МС) [49].

Летучие органические соединения (ЛОС)

Сегодня из различных выделений относительно здоровых людей, находящихся на общей диете, суммарно определены 1840 ЛОС, а именно: 872 из выдыхаемого воздуха; 359 из слюны; 154 из крови; 256 из грудного молока; 532 из кожных выделений; 279 из мочи и 381 из фекалий [50]. Всем этим соединениям присвоены номера регистра CAS (Chemical Abstracts Service registry number – уникальный численный идентификатор химических соединений).

Фекальный метаболом очень богат ЛОС, они составляют около 20% из 1890 уникальных соединений базы данных фекальных метаболитов человека HFMDV [46]. Couch и соавт., используя различные методы твердофазной микроэкстракции ЛОС из газообразной фазы фекалий 17 здоровых доноров, суммарно обнаружили около 2100 различных соединений, многие из которых были идентифицированы на основе совпадений с базой данных NIST [51]. Наиболее распространенными классами ЛОС в фекалиях здоровых доноров являются кислоты и сложные эфиры (> 550 метаболитов), спирты (> 450), алкены (~ 400), алканы (~ 300), альдегиды (> 250) и кетоны (~ 200). Различные исследования в среднем определяют 80–300 ЛОС путем сопоставления спектров и времен удерживания с известными базами данных (например, GC-MS NIST, Wiley) [50–55].

В двух исследованиях газовой наджидкостной фракции фекалий относительно здоровых доноров идентифицированы 297 [52] и 135 [56] различных ЛОС соответственно. Результаты этих исследований во многом подтвердили друг друга, но и выявили не-

которые различия. В среднем, количество ЛОС варьирует от 78 до 125 (медиана = 101). Интересно отметить, что 44 из них присутствовали у 80% доноров и представляли этанол, альдегиды и кетоны (с длинной углеродной цепи 2–7), фенол, серосодержащие соединения и КЖК [52].

Способ забора образцов фекалий крайне важен, так как потенциально может повлиять на результаты метагеномного и метаболомного анализа. Couch и соавт. [51] сравнили образцы, собранные в разных условиях (эндоскопически и в домашних условиях) и выделенные по протоколам быстрой или длинной экстракции, и выявили незначительные различия в их микробиомах и большие различия в метаболомах. При короткой экстракции (20 мин) в образцах, собранных в домашних условиях, наблюдали больше окисленных форм метаболитов (спирты, альдегиды, кислоты / сложные эфиры), а в образцах, собранных эндоскопически, найдено больше восстановленных форм метаболитов (алканы, алкены). Поскольку профиль экстракции ЛОС является гиперболическим, длительная экстракция (18 ч) приводила к идентификации значительно большего количества метаболитов, чем короткая (20 мин) – 1371/2097 и 1404/2190 метаболитов при короткой/длинной экстракции материала, собранного эндоскопически и в домашних условиях соответственно [51].

Принадлежность многих ЛОС фекалий (организму-хозяину или бактерии) и метаболические пути их продукции изучены недостаточно. Растет число свидетельств того, что изменения состава ЛОС могут быть следствием не только пищевых особенностей индивидов, но наличия гастроэнтерологических расстройств, поэтому ЛОС могут представлять диагностический интерес в качестве потенциальных маркеров заболеваний ЖКТ [52–55].

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК)

КЖК – органические жирные кислоты с длиной углеродной цепи от 1 до 6, представляют собой основной результат анаэробной бактериальной ферментации полисахаридов, белков, пептидов и гликопротеинов в кишечнике. Основными субстратами для продукции КЖК служат углеводы, преимущественно неперевариваемые крахмалы и пищевые волокна, конечным продуктом ферментации которых, главным образом, являются ацетат, пропионат и бутират [57]. Их молярное соотношение в толстой кишке и фекалиях в норме постоянно и составляет 60 : 20 : 20 [33, 58]. Большинство их абсорбируется из просвета кишечника клетками-хозяевами [58].

Несмотря на то что арсенал аналитических методов анализа КЖК за последнее десятилетие значительно расширился, газовая хроматография по-

прежнему остается наиболее часто используемым методом количественного определения КЖК в фекалиях, несмотря на некоторые недостатки [33].

МЕТАБОЛИТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЖКТ

Состояние микробиома кишечника может быть охарактеризовано по составу его метаболитов. Клинические исследования сфокусированы на поиске специфических метаболитов или уникальных комбинаций метаболитов, метаболических профилей, которые могли бы служить биомаркерами заболеваний. Поскольку фекалии представляют собой сложную и неоднородную по составу матрицу, получаемые данные очень зависят как от межиндивидуальной изменчивости, так и от возможностей аналитических методов. Поэтому попытки сравнения данных, полученных различными методами, при одном и том же заболевании, могут не выявить явной метаболической тенденции. Тем не менее к настоящему моменту накоплены значимые результаты, позволяющие говорить об исследовании метаболитов фекалий как о новом диагностическом инструменте.

Дифференциальная диагностика ВЗК остается сложной и обычно опирается на симптомы и проведенные исследования (лабораторные анализы, эндоскопия, гистологический анализ и радиологическое исследование) [59]. Эти методы диагностики часто являются дорогостоящими и травматичными. Сывороточные маркеры, такие, как С-реактивный белок, неспецифичны и обнаруживаются при других воспалительных заболеваниях [60]. Разработанные тесты на кальпротектин и лактоферрин в фекалиях пациентов помогают в диагностике ВЗК [16, 61], но, несмотря на информативность, они не являются специфическими, поскольку повышаются при наличии крови в кале при других патологиях – геморрое, полипах или инфекции кишечника, например *Clostridium difficile*, и не могут дискриминировать воспалительные заболевания инфекционной и неинфекционной природы [62].

Предложены несколько моделей, позволяющих с использованием ЯМР-спектроскопии дискриминировать пациентов с ВЗК от здоровых доноров [63–66] и СРК [66]. В одной из первых работ 2007 года Marchesi и соавт. [63] методом ЯМР охарактеризованы экстракты фекалий пациентов с БК и ЯК. Общей в этой и последующих работах картиной метаболических профилей было снижение уровня бутирата, ацетата, метиламина и триметиламина по сравнению с контрольной группой, что коррелирует с изменениями в микробном сообществе кишечника, а также повышение количества аминокислот (лейцин, изолейцин, валин, лизин, аланин, тирозин, фенилаланин,

глицин, глутамат и аспарат) вследствие мальабсорбции, вызванной воспалительными процессами [63]. Vjerrum и соавт. [64] осуществлена попытка дискриминации метаболитов при БК и ЯК, однако, удаление из выборки существенной группы пациентов после хирургических вмешательств или находящихся на иммунологической анти-TNF- α -терапии практически минимизировало значимость метаболомных профилей соответствующих больных. Таким образом, даже небольшие операции на кишечнике или лекарственная терапия налагают значительные индивидуальные отпечатки на метаболомные профили [64].

Основная проблема этих исследований – неспособность метаболических моделей дифференцировать желудочно-кишечные заболевания между собой (например, болезнь Крона и язвенный колит). Не помогает решить эту проблему и сочетанное использование различных методов детекции (ЯМР, ЖХ-МС и ГХ-МС) при обнаружении нелетучих органических соединений [65]. В работе Santoru и соавт. [65] проведен сравнительный структурный анализ метаболома 183 образцов фекалий (82 ЯК, 50 БК, 51 здоровые доноры) методами ЯМР, ГХ-МС и ЖХ-МС. Значительные различия обнаружены в метаболических профилях пациентов с ВЗК и здоровых доноров. При этом наилучшую прогностическую оценку, полученную методом дробных наименьших квадратов (PLS-DA), продемонстрировал ЯМР-анализ. Наихудшие результаты получены методом ЖХ-МС. Всеми тремя методами выявлены сопоставимые картины дискриминационных метаболитов при каждом из заболеваний, основными из которых были аминокислоты и их производные, жирные кислоты, триметиламин оксид, витамины группы В (никотиновая и пантотеновая кислоты). Интересно, что все три платформы не смогли различить два патологических состояния (ЯК и БК) между собой, что говорит о существенном внутреннем сходстве метаболических профилей этих заболеваний [65].

Мишень-неориентированный ЖХ-МС-анализ 155 образцов кала (68 БК, 53 ЯК, 34 здоровых добровольца) позволил детектировать более 8000 низкомолекулярных компонентов, среди которых удалось выделить химические классы и индивидуальные химические соединения, дифференциально представленные при ВЗК.

Метаболиты (3829, 43% от общего числа) были соотнесены с молекулярными классами на основе сравнения с HMDB3.0 и 346 уникальными соединениями и аннотированы в качестве стандартов путем сравнения с базами данных.

В целом метаболические профили пациентов с ВЗК и особенно с БК существенно отличались

от профилей группы здоровых добровольцев. Однако в случае БК локализация воспаления не влияла на метаболическую картину. Следует отметить, что профили пациентов с ЯК были более диффузными, чем у пациентов с БК, и отражали как профили здоровых добровольцев, так и пациентов с БК, что, возможно, связано с различным уровнем воспаления.

Существенно повышенным при БК оказалось содержание первичных желчных кислот (холевой и ксенодезоксихолевой) и понижено содержание вторичных (литохолевой и дезоксихолевой) кислот. Содержание каприловой кислоты, как и КЖК, было понижено в группе ВЗК

Стоит отметить, что пациенты с ВЗК часто сообщают о неприятном запахе фекалий во время обострения болезни. Резидентная микрофлора несет ответственность за ферментацию непереваренной пищи в толстой кишке, продуцируя гнилостные соединения, такие, как аммиак, алифатические амины, жирные кислоты с разветвленной цепью, индол, фенол и летучие серосодержащие соединения, что влияет как на состояние кишечника, так и на состав метаболитов, поэтому нарушение микрофлоры кишечника при ВЗК может привести к изменению запаха фекалий [67, 68].

Очевидно, что точное и воспроизводимое обнаружение ЛОС из биологических образцов имеет большой потенциал для создания неинвазивного диагностического теста для ВЗК. На сегодняшний день опубликовано несколько работ, в которых сравнивается спектр ЛОС в фекалиях и в выдыхаемом воздухе или моче пациентов с ВЗК [52, 53, 67, 69, 70]. Фекалии человека представляют собой конечный продукт приема пищи, пищеварительных и выделительных процессов, бактериального метаболизма [67]. Поэтому анализ ЛОС в фекалиях представляется перспективным для получения дополнительных диагностических знаний.

Показано, что, несмотря на ограниченное обоняние, медицинские работники отличают запах кала пациента, инфицированного *C. difficile* в 31 из 37 случаев [71]. В другой работе медсестры могли диагностировать инфекцию *C. difficile* с чувствительностью 55% и специфичностью 83% [72]. Следует, однако, отметить, что тренированные собаки показывают существенно лучшие результаты (чувствительность 83% и специфичность 98%) [73].

ГХ-МС-анализ ЛОС фекалий позволил найти различия между здоровыми донорами и пациентами с СРК [53], БК [54, 55, 70, 74] и ЯК [52, 55], дискриминировать также пациентов с БК в стадии обострения и ремиссии [54, 55] и даже пациентов с ЯК и кишечной инфекцией [29]. В работе Garner и соавт. [52] сравнили метаболические профили пациен-

тов с ЯК и с инфекциями *Campylobacter jejuni* и *C. difficile* и выявили метаболиты, отличающие заболевания инфекционной природы от ЯК. Так, 1-октен-3-ол чрезвычайно распространен только у пациентов с *Camp. jejuni*, хотя причина его сверхпродукции пока не установлена. Аналогично, серосодержащие соединения (диметилсульфид, диметилтрисульфид, метантиол), обнаруженные во всех образцах, полученных от контрольной группы здоровых доноров, практически отсутствовали в образцах пациентов с инфекциями *Camp. jejuni* и *C. difficile* [52].

В некоторых случаях профилирование ЛОС могло даже указать на микробиологический источник инфекции (вирусы, бактерии, паразиты). В работе Probert и соавт. [75] обнаружены характерные закономерности присутствия летучих органических соединений, в зависимости от природы инфекционной диареи. Соединения фурана указывают на инфекцию *C. difficile*, этилдодеканат – на ротавирус, а отсутствие углеводов и терпенов характеризует заражение *Campylobacter* [75].

В клинической практике иногда бывает сложно отличить пациентов с СРК, которые впервые столкнулись с симптомами заболевания, от ВЗК. Проведен анализ ЛОС газовой фазы наджидкостного пространства, который позволил однозначно отличить СРК от ВЗК и здоровых доноров. Основными дискриминационными метаболитами при СРК, присутствующими в избытке, были сложные эфиры короткоцепочечных жирных кислот, циклогексанкарбоновой кислоты и ее производных. Наиболее частыми сложными эфирами были метиловые эфиры пропионовой и масляной кислот [53].

Проведен сравнительный анализ состава метаболитов фекалий пациентов с БК и ЯК в стадии обострения и ремиссии и здоровых доноров с целью поиска дискриминационных метаболитов, статистически значимо характеризующих заболевание или его стадию. Выявлено существенное увеличение продукции гептанала, пропанала, бензолацетальдегида, 1-октен-3-ола, 3-метил-1-бутанола, 2-пиперидинона и 6-метил-2-гептанона в группе с БК в активной стадии [54].

Альдегиды (гептаналь, пропаналь и бензолацетальдегид) образуются во время воспалительных процессов в результате окисления липидов и при окислительном стрессе и играют важную роль в повреждении ткани и изъязвлении слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при ВЗК [76, 77]. Оказалось, что альдегиды фекалий более представлены в группе БК в активной фазе, чем на стадии ремиссии и, тем более, у здоровых доноров, поэтому они могут служить маркерами активности заболевания. В группе пациентов с обострением БК также в макси-

мальных уровнях обнаружены вторичные спирты – 1-октен-3-ол и 3-метил-1-бутанол. При этом 1-октен-3-ол не выявлен у пациентов с активной стадией ЯК, поэтому он был признан дискриминационным ЛОС при анализе активной стадии БК.

Aggio и соавт. при помощи газохроматографического анализа «электронный нос» и компьютерного алгоритма исследования метаболитов фекалий (33 пациента с активной и 50 с неактивной стадиями ВЗК, 28 с СРК и 41 здоровый доброволец) показали возможность четкой дискриминации пациентов с активной фазой болезни Крона и СРК – 87%, СРК и здоровых добровольцев – 78% [78].

Широкое применение в практической медицине могут иметь результаты клинического исследования эффективности применения диеты low-FODMAP (диета с низким содержанием ферментируемых сахаров) при СРК. Газохроматографический анализ «электронный нос» показал возможность прогнозирования благоприятного исхода применения диеты по метаболическому профилю пациентов [79].

Большую значимость приобретает количественное определение ЛОС в биологических образцах. Доступные сегодня неинвазивные биомаркеры хоть и могут предоставить общую информацию о заболевании, но не являются специфическими и не могут прогнозировать течение заболевания и возможность осложнений. Изучается диагностический потенциал ЛОС в качестве неинвазивных биомаркеров для оценки активности заболевания, прогноза рисков и эффективности терапии [80].

Развитие технологий «электронный нос» идет по пути создания прикроватных портативных сенсорных приборов, позволяющих диагностировать состояние ЖКТ в режиме реального времени и идентифицировать заболевания по уникальному профилю ЛОС [81, 82].

Накопленный опыт все еще не позволяет повсеместно использовать в клинической практике метаболические профили, характерные для конкретных заболеваний, а тем более дискриминировать индивидуальные метаболиты фекалий с целью постановки диагноза. Альтернативой представляется использование более широких панелей биомаркеров, включающих как метаболиты, так и макромолекулы, которые будут отражать многофакторную патофизиологию заболевания. К примеру, до сих пор использование неинвазивных единичных биомаркеров СРК дает очень умеренные результаты. Разработанная панель из восьми биомаркеров (четыре биомаркера плазмы крови: IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , и четыре биомаркера фекалий: хромогранин А, человеческий

β -дефенсин 2, кальпротектин, капроат) позволила с высоким уровнем достоверности (чувствительность (88.1%) и специфичность (86.5%)) поставить диагноз СРК [83].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ метаболитов фекалий – это новая ветвь метабомики, которая охватывает широкий спектр соединений из легкодоступного биологического материала. Из растущего с каждым годом числа публикаций очевидно, что метабомика фекалий уже заняла свое прочное место в этой области знаний. Ее дальнейшему развитию способствует технологический и инструментальный прогресс используемых методов анализа. К настоящему моменту уже ясно прослеживается ряд общих метаболических тенденций, говорящих о специфике образа жизни и диеты, физиологии кишечника и кишечного микробиома, и сложных взаимодействий между ними в норме и при развитии патологических процессов, хотя достоверные индивидуальные метаболиты-маркеры до сих пор не идентифицированы. Важным шагом в использовании растущего объема данных, существенно облегчающим их интерпретацию, стало создание онлайн-базы данных метаболитов фекалий человека HFMDB. База непрерывно обновляется и содержит уже около 7000 соединений, химическую и биологическую информацию о метаболитах, а также о генах, белках, метаболических путях и возможной связи с заболеваниями.

Несмотря на стремительное развитие, методы сбора, подготовки и анализа образцов фекалий до сих пор не стандартизированы и не всегда имеют согласованную интерпретацию результатов, что является серьезным недостатком. Фекалии, имеющие неоднородный состав, представляют сложный образец для исследования. Эта проблема частично решается параллельным использованием нескольких аналитических платформ или комбинированием мишень-ориентированных и мишень-неориентированных подходов, значительно повышающих точность измерения уровня метаболитов и доверия к получаемой информации. Разработка единых подходов к точной количественной оценке метаболитов, полученных с использованием различных аналитических платформ, будет способствовать дальнейшему развитию метабомики фекалий и возможности ее использования в доказательной медицине. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства науки и высшего образования
(соглашение RFMEFI60419X0215).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rose C., Parker A., Jefferson B., Cartmell E. // *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 2015. V. 45. P. 1827–1879.
2. Smirnov K.S., Maier T.V., Walker A., Heinzmann S.S., Forcisi S., Martinez I., Walter J., Schmitt-Kopplin P. // *Inter. J. Med. Microbiol.* 2016. V. 306. P. 266–279.
3. Turrone S., Fiori J., Rampelli S., Schnorr S.L., Consolandi C., Barone M., Biagi E., Fanelli F., Mezzullo M., Crittenden A.N. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 32826.
4. Psychogios N., Hau D.D., Peng J., Guo A.C., Mandal R., Bouatra S., Sinelnikov I., Krishnamurthy R., Eisner R., Gautam B., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 16. P. e16957.
5. Bouatra S., Aziat F., Mandal R., Guo A.C., Wilson M.R., Knox C., Bjorn Dahl T.C., Krishnamurthy R., Saleem F., Liu P. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e73076.
6. Wishart D.S., Lewis M.J., Morrissey J.A., Flegel M.D., Jeroncic K., Xiong Y., Cheng D., Eisner R., Gautam B., Tzur D. // *J. Chromatogr. B.* 2008. V. 871. P. 164–173.
7. Dame Z.T., Aziat F., Mandal R., Krishnamurthy R., Bouatra S., Borzouie S., Guo A.C., Sajed T., Deng L., Lin H. // *Metabolomics.* 2015. V. 11. P. 1864–1883.
8. Wishart D.S., Feunang Y.D., Marcu A., Guo A.C., Liang K., Vázquez-Fresno R., Sajed T., Johnson D., Li C., Karu N. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. D608–D617.
9. Luo P., Yin P., Hua R., Tan Y., Li Z., Qiu G., Yin Z., Xie X., Wang X., Chen W., et al. // *Hepatology.* 2018. V. 67. № 2. P. 662–675.
10. Tian J.S., Xia X.T., Wu Y.F., Zhao L., Xiang H., Du G.H., Zhang X., Qin X.M. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 33820.
11. Lin Y., Ma C., Liu C., Wang Z., Yang J., Liu X., Shen Z., Wu R. // *Oncotarget. LLC.* 2016. V. 7. № 20. P. 29454–29464.
12. Jansson J., Willing B., Lucio M., Fekete A., Dicksved J., Halfvarson J., Tysk C., Schmitt-Kopplin P. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 7. P. e6386.
13. Sigerist H.E. *A History of Medicine: Early Greek, Hindu, and Persian Medicine.* N.Y.: Oxford Univ. Press, 1987.
14. Vaira D., Malfertheiner P., Megraud F., Axon A.T., Deltenre M., Hirschl A.M., Gasbarrini G., O'morain C., Garcia J.M.P., Quina M. // *Lancet.* 1999. V. 354. P. 30–33.
15. Bartlett J.G., Gerding D.N. // *Clin. Infect. Dis.* 2008. V. 46. P. S12–S18.
16. Langhorst J., Elsenbruch S., Koelzer J., Rueffer A., Michalsen A., Dobos G.J. // *Am. J. Gastroenterol.* 2008. V. 103. P. 162–169.
17. Winawer S., Fletcher R., Rex D., Bond J., Burt R., Ferrucci J., Ganiats T., Levin T., Woolf S., Johnson D. // *Gastroenterology.* 2003. V. 124. P. 544–560.
18. Ahlquist D.A., Skoletsky J.E., Boynton K.A., Harrington J.J., Mahoney D.W., Pierceall W.E., Thibodeau S.N., Shuber A.P. // *Gastroenterology.* 2000. V. 119. P. 1219–1227.
19. Meij T.G., Larbi I.B., Schee M.P., Lentferink Y.E., Paff T., Terhaar Sive Droste J.S., Mulder C.J., Bodegraven A.A., Boer N.K. // *Int. J. Cancer.* 2014. V. 134. P. 1132–1138.
20. Melnik A.V., da Silva R.R., Hyde E.R., Aksenov A.A., Vargas F., Bouslimani A., Protsyuk I., Jarmusch A.K., Tripathi A., Alexandrov T., et al. // *Anal. Chem.* 2017. V. 89. P. 7549–7559.
21. Beckonert O., Keun H.C., Ebbels T.M.D., Bundy J., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. // *Nat. Protocols.* 2007. V. 2. P. 2692–2703. DOI:10.1038/nprot.2007.376.
22. Deda O., Gika H.G., Wilson D., Theodoridis G.A. // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 2015. V. 113. P. 137–150.
23. Cajka T., Fiehn O. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. P. 524–545.
24. McDonald D., Hyde E., Debelius J.W., Morton J.T., Gonzalez A., Ackermann G., Aksenov A.A., Behsaz B., Brennan C., Chen Y., et al. // *mSystems.* 2018. V. 3. № 3. P. e00031–18.
25. Naz S., Vallejo M., Garcia A., Barbas C. // *J. Chromatogr. A.* 2014. V. 1353. P. 99–105.
26. Smith C.A., O'Maille G., Want E.J., Qin C., Trauger S.A., Brandon T.R., Custodio D.E., Abagyan R., Siuzdak G. // *Ther. Drug Monit.* 2005. V. 27. P. 747–751.
27. Pence H.E., Williams A. // *J. Chem. Educ.* 2010. V. 87. P. 1123–1124.
28. Kanehisa M., Araki M., Goto S., Hattori M., Hirakawa M., Itoh M., Katayama T., Kawashima S., Okuda S., Tokimatsu T., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. D480–484.
29. Caspi R., Foerster H., Fulcher C.A., Kaipa P., Krummenacker M., Latendresse M., Paley S., Rhee S.Y., Shearer A.G., Tissier C., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. P. D623–631.
30. Wang M., Carver J.J., Phelan V.V., Sanchez L.M., Garg N., Peng Y., Nguyen D.D., Watrous J., Kapono C.A., Luzzatto-Knaan T.H.O., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2016. V. 34. № 8. P. 828–837.
31. da Silva R.R., Dorrestein P.C., Quinn R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112 (41), P. 12549–12550.
32. James A.T., Martin A.J.P. // *Biochem. J.* 1952. V. 50. P. 679–690.
33. Primec M., Micetic-Turk D., Langerholc T. // *Anal. Biochem.* 2017. V. 54. P. 9–21.
34. Lington A.W., Bevan C. // *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology / Ed. Clayton G. D. N. Y.: Wiley, 1994. P. 2585–2760.*
35. Ruppin H., Bar-Meir S., Soergel K.H., Wood C.M., Schmitt M.G. Jr. // *Gastroenterology.* 1980. V. 78. P. 1500–1507.
36. Bielawska K., Dziakowska I., Roszkowska-Jakimiec W. // *Toxicol. Mech. Methods.* 2010. V. 20. P. 526–537.
37. Tangerman A., Nagengast F.M. // *Anal. Biochem.* 1996. V. 236. P. 1–8.
38. Zhao G., Nyman M., Jönsson J.A. // *Biomed. Chromatogr.* 2006. V. 20. P. 674–682.
39. Staudacher H.M., Lomer M.C.E., Anderson J.L., Barrett J.S., Muir J.G., Irving P.M., Whelan K. // *J. Nutr.* 2012. V. 142. P. 1510–1518.
40. Friederich P., Verschuur J., van Heumen B.W.H., Roelofs H.M.J., Berkhout M., Nagtegaal I.D., van Oijen M.G.H., van Krieken J.H.J.M., Peters W.H.M., Nagengast F.M. // *Int. J. Colorectal Dis.* 2011. V. 26. P. 575–582.
41. Tiihonen K., Tynkkynen S., Ouwehand A., Ahlroos T., Rautonen N. // *Br. J. Nutr.* 2008. V. 100. P. 130–137.
42. Schwiertz A., Taras D., Schäfer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., Hardt P.D. // *Obes. (Silver Spring).* 2010. V. 18. P. 190–195.
43. Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice.* 1997.
44. Gutnikov G. // *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.* 1995. V. 671. P. 71–89.
45. Lima E., Abdalla D.S. // *Anal. Chim. Acta.* 2002. V. 465. P. 8–91.
46. Karu N., Deng L., Slae M., Guo A.C., Sajed T., Huynh H., Wine E., Wishart D.S. // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 1030. P. 1–24.
47. Yen S., McDonald J.A., Schroeter K., Oliphant K., Sokolenko S., Blondeel E.J., Allen-Vercos E., Aucoin M.G. // *J. Proteome Res.* 2015. V. 14. P. 1472–1482.
48. Grün C.H., van Dorsten F.A., Jacobs D.M., Le Belleguic M., van Velzen E.J., Bingham M.O., Janssen H.-G., van Duynhoven J.P. // *J. Chromatogr. B.* 2008. V. 871. P. 212–219.
49. Humbert L., Maubert M.A., Wolf C., Duboc H., Mahé M., Farabos D., Seksik P., Mallet J.M., Trugnan G., Masliah J. // *J.*

- Chromatogr. B. 2012. V. 899. P. 135–145.
50. de Lacy Costello B., Amann A., Al-Kateb H., Flynn C., Filipiak W., Khalid T., Osborne D., Ratcliffe N.M. // *J. Breath Res.* 2014. V. 8. P. 014001.
51. Couch R.D., Navarro K., Sikaroodi M., Gillevet P., Forsyth C.B., Mutlu E., Engen P.A., Keshavarzian A. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e81163.
52. Garner C.E., Smith S., de Lacy Costello B., White P., Spencer R., Probert C.S., Ratcliffe N.M. // *FASEB. J.* 2007. V. 21. P. 1675–1688.
53. Ahmed I., Greenwood R., de Lacy Costello B., Ratcliffe N.M., Probert C.S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e58204.
54. Ahmed I., Greenwood R., Costello B., Ratcliffe N., Probert C. // *Aliment Pharmacol. Therapeut.* 2016. V. 43. P. 596–611.
55. DePreter V., Machiels K., Joossens M., Arijs I., Matthys C., Vermeire S., Rutgeerts P., Verbeke K. // *Gut.* 2015. V. 64. P. 447–458.
56. de Preter V., van Staeyen G., Esser D., Rutgeerts P., Verbeke K. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 1476–1483.
57. Bourriaud C., Robins R., Martin L., Kozlowski F., Tenailleau E., Cherbut C., Michel C. // *J. Appl. Microbiol.* 2005. V. 99. P. 201–212.
58. den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D.-J., Bakker B.M. // *J. Lipid Res.* 2013. V. 54. P. 2325–2340.
59. Canavese G., Bassotti G., Astegiano M., Castellano I., Cassoni P., Sapino A., Villanacci V. // *World J. Gastroenterol.* 2013. V. 19. № 3. P. 426–428.
60. Nappo A., Iacoviello L., Fraterman A., Gonzalez-Gil E.M., Hadjigeorgiou C., Marild S., Molnar D., Moreno L.A., Peplies J., Sioen I., et al. // *J. Am. Heart Assoc.* 2013. V. 2. P. 3.
61. Waugh N., Cummins E., Royle P., Kandala N.B., Shyangdan D., Arasaradnam R., Clar C., Johnston R. // *Hlth Technol. Asses.* 2013. V. 17. P. 55.
62. Probert C.S.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. P. 1079–1080.
63. Marchesi J.R., Holmes E., Khan F., Kochhar S., Scanlan P., Shanahan F., Wilson I.D., Wang Y. // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. P. 546–551.
64. Bjerrum J.T., Wang Y., Hao F., Coskun M., Ludwig C., Günther U., Nielsen O.H. // *Metabolomics.* 2015. V. 11. P. 122–133.
65. Santoru M.L., Piras C., Murgia A., Palmas V., Camboni T., Liggi S., Ibba I., Lai M.A., Orrù S., Loizedda A.L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 9523.
66. LeGall G., Noor S.O., Ridgway K., Scovell L., Jamieson C., Johnson I.T., Colquhoun I.J., Kemsley E.K., Narbad A. // *J. Proteome Res.* 2011. V. 10. P. 4208–4218.
67. Probert C.S.J., Ahmed I., Khalid T., Johnson E., Smith S., Ratcliffe N. // *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2009. V. 18. № 3. P. 337–343.
68. Arasaradnam R.P., Covington J.A., Harmston C., Nwokolo C.U. // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2014. V. 39. № 8. P. 780–789.
69. Arasaradnam R.P., Ouaret N., Thomas M.G., Quraishi N., Heatherington E., Nwokolo C.U., Bardhan K.D., Covington J.A. // *Inflamm. Bowel Dis.* 2013. V. 19. № 5. P. 999–1003.
70. Walton C., Fowler D.P., Turner C., Jia W., Whitehead R.N., Griffiths L., Dawson C., Waring R.H., Ramsden D.B., Cole J.A., et al. // *Inflamm. Bowel Dis.* 2013. V. 19. № 10. P. 2069–2078.
71. Burdette S.D., Bernstein J.M. // *Clin. Infect. Dis.* 2007. V. 44. № 8. P. 1142.
72. Johansen A., Vasishtha S., Edison P., Hosein I. // *Age Ageing.* 2002. V. 31. № 6. P. 487–488.
73. Bomers M.K., van Agtmael M.A., Luik H., van Veen M.C., Vandenbroucke-Grauls C.M., Smulders Y.M. // *BMJ.* 2012. V. 345. P. e7396.
74. Cauchi M., Fowler D.P., Walton C., Turner C., Jia W., Whitehead R.N., Griffiths L., Dawson C., Bai H., Waring R.H. // *Metabolomics.* 2014. V. 10. P. 1113–1120.
75. Probert C., Jones P., Ratcliffe N.M. // *Gut.* 2004. V. 53. P. 58–61.
76. Fritz K.S., Petersen D.R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 59. P. 85–91.
77. Rezaie A., Parker R., Abdollahi M. // *Dig. Dis. Sci.* 2007. V. 52. P. 2015–2021.
78. Aggio R.B.M., White P., Jayasena H., de Lacy Costello B., Ratcliffe N.M., Probert C.S. // *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2017. V. 45. № 1. P. 82–90.
79. Rossi M., Aggio R., Staudacher H.M., Lomer M.C., Lindsay J.O., Irving P., Probert C., Whelan K. // *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2018. V. 16. № 3. P. 385–391.
80. Ahmed I., Niaz Z., Ewbank F., Akarca D., Felwick R., Furnari M. // *Biomark. Med.* 2018. V. 12. № 10. P. 1139–1148.
81. Itoh T., Akamatsu T., Tsuruta A., Shin W. // *Sensors.* 2017. V. 17. № 7. P. 1662.
82. McGuire N., Ewen R., Costello C., Garner C.E., Probert C.S., Vaughan C.S., Ratcliff N.M. // *Meas. Sci. Technol.* 2014. V. 25. № 6. P. 065108.
83. Mujagic Z., Tigchlaer E.F., Zhernakova A., Ludwig T., Ramiro-Garcia J., Baranska A., Swerts M.A., Masclee A.A.M., Wijmenga C., van Schooten F.J., et al. // *SciRep.* 2016. V. 6. P. 26420.