

# Метаболомный профиль сыворотки крови у пациентов с язвенным колитом: патофизиологическая роль, диагностическое и терапевтическое значение

Т.Я.Вахитов<sup>1</sup>, С.В.Кононова<sup>1,2</sup>, Е.В.Демьянова<sup>1,3</sup>, А.С.Моругина<sup>1,3</sup>, В.А.Утсаль<sup>4</sup>,  
Т.С.Салль<sup>1</sup>, М.И.Скалинская<sup>1,5</sup>, И.Г.Бакулин<sup>5</sup>, А.И.Хавкин<sup>6,7</sup>, С.И.Ситкин<sup>1,5,8</sup>

<sup>1</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Институт белка РАН, Пущино, Российская Федерация;

<sup>3</sup>ООО «Иннова Плюс», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>4</sup>Научно-клинический центр токсикологии им. академика С.Н.Голикова Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>5</sup>Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>6</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И.Пирогова, Москва, Российская Федерация;

<sup>7</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Российская Федерация;

<sup>8</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Актуальность и цель исследования.** Во всем мире отмечается неуклонный рост частоты воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), как у детей, так и взрослых. Если в педиатрической популяции преобладает рост болезни Крона, то у пожилых преобладает язвенный колит (ЯК). Целесообразность изучения метаболома при ВЗК подтверждена во многих исследованиях, выявивших изменения эндогенного и микробного метаболизма, связанные с их патогенезом. Состав метаболома биологических жидкостей существенно зависит от пола, поскольку половой диморфизм является триггером метаболических различий между организмами. Ранее нами был изучен метаболический профиль сыворотки крови у пациентов-мужчин с ЯК и выявлены потенциальные биомаркеры заболевания. Целью настоящего исследования было выявление особенностей состава метаболома и потенциальных метаболитов-биомаркеров ЯК у женщин с помощью нецелевого метаболомного анализа сыворотки крови.

**Пациенты и методы.** В исследование были включены 10 женщин с активным ЯК (среднетяжелая и тяжелая атаки; группа пациентов) в возрасте от 23 до 61 года (средний возраст  $35,2 \pm 13,5$  года) и 10 соответствующих им по возрасту условно-здоровых добровольцев (ЗД, группа контроля), не страдающих ВЗК. Метаболомный анализ сыворотки крови был проведен методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии. Классификацию образцов и поиск потенциальных биомаркеров проводили с использованием дискриминантного анализа проекций на латентные структуры (Partial Least Squares-Discriminant Analysis/PLS-DA), метода опорных векторов (Support Vector Machines/SVM) и наивного байесовского классификатора (Naïve Bayes). Для сравнения успешности методов строили ROC-кривые и оценивали площади под ними.

**Результаты.** В сыворотке крови пациентов и ЗД было идентифицировано до 90 низкомолекулярных соединений, различающихся масс-спектрами и временами удерживания. Выявлено 25 соединений, содержание которых в крови значимо ( $p < 0,05$ ) различалось в группах ЗД и пациентов с ЯК. Шесть из 25 соединений (адипиновая кислота,  $\beta$ -глицерофосфат, глицериновая кислота, 2-гидроксимасляная кислота, сквален, 2-пальмитоилглицерин) входили в группу наиболее значимых 15 соединений, выявленных сразу двумя классификаторами (PLS-DA и SVM). Из этих 15 соединений только 7 соединений были идентичны соединениям, значимо менявшимся у мужчин: 2-гидроксимасляная кислота, креатинин,  $\beta$ -глицерофосфат,  $\alpha$ -глицерофосфат, транс-пальмитолеиновая кислота, пальмитиновая кислота, сквален. Часть этих соединений, так же как и у мужчин, связана с нарушением липидного обмена и регуляцией гликолиза ( $\alpha$ -глицерофосфат), а также с нарушением остеогенеза ( $\beta$ -глицерофосфат).

**Заключение.** Исследование показало, что метаболомные профили сыворотки крови женщин с ЯК и здоровых женщин имеют значимые различия. Около половины наиболее значимых соединений, выявленных у больных женщин, идентичны соединениям, значимо менявшимся у мужчин с ЯК. В будущих исследованиях результаты, полученные с помощью нецелевой метаболомики, а также точные механизмы метаболических изменений у больных ВЗК должны быть подтверждены и уточнены с помощью методов целевой метаболомики и других омикс-технологий.

**Ключевые слова:** воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит, метаболом, биомаркеры, газовая хроматография-масс-спектрометрия

**Для цитирования:** Вахитов Т.Я., Кононова С.В., Демьянова Е.В., Моругина А.С., Утсаль В.А., Салль Т.С., Скалинская М.И., Бакулин И.Г., Хавкин А.И., Ситкин С.И. Метаболомный профиль сыворотки крови у пациентов с язвенным колитом: патофизиологическая роль, диагностическое и терапевтическое значение. Вопросы детской диетологии. 2023; 21(5): 5–15. DOI: 10.20953/1727-5784-2023-5-5-15

## Для корреспонденции:

Вахитов Тимур Яшерович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник научной группы «Метаболомика неинфекционных заболеваний» Института экспериментальной медицины, руководитель проекта РНФ №20-65-47026

Адрес: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12  
Телефон: (812) 234-6868  
ORCID: 0000-0001-8221-6910

Статья поступила 06.08.2023, принята к печати 27.10.2023

© Издательство «Династия», 2023

Тел./факс: +7 (495) 660-6004, e-mail: red@phdynasty.ru, www.phdynasty.ru

## For correspondence:

Timur Ya. Vakhitov, PhD, DSc (Biology), Chief Researcher, Non-Infectious Disease Metabolomics Group, Institute of Experimental Medicine; Supervisor for the RSF Project No 20-65-47026

Address: 12 Akad. Pavlov str., Saint Petersburg, 197376, Russian Federation  
Phone: (812) 234-6868  
ORCID: 0000-0001-8221-6910

The article was received 06.08.2023, accepted for publication 27.10.2023

# Serum metabolomic profile in patients with ulcerative colitis: pathophysiological role, diagnostic and therapeutic implications

T.Ya.Vakhitov<sup>1</sup>, S.V.Kononova<sup>1,2</sup>, E.V.Demyanova<sup>1,3</sup>, A.S.Morugina<sup>1,3</sup>, V.A.Utsal<sup>4</sup>,  
T.S.Sall<sup>1</sup>, M.I.Skalinskaya<sup>1,5</sup>, I.G.Bakulin<sup>5</sup>, A.I.Khavkin<sup>6,7</sup>, S.I.Sitkin<sup>1,5,8</sup>

<sup>1</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russian Federation;

<sup>3</sup>Innova Plus LLC, Saint Petersburg, Russian Federation;

<sup>4</sup>S.N.Golikov Scientific and Clinical Center of Toxicology, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Saint Petersburg, Russian Federation;

<sup>5</sup>I.I.Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation;

<sup>6</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation;

<sup>7</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation;

<sup>8</sup>Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russian Federation

The incidence of inflammatory bowel disease (IBD) in both children and adults is increasing worldwide. While Crohn's disease predominates in the pediatric population, ulcerative colitis (UC) more often affects the elderly. The relevance of metabolomic profiling in IBD has been confirmed in several studies revealing changes in endogenous and microbial metabolism associated with their pathogenesis. The metabolome composition of body fluids depends significantly on sex since sexual dimorphism is a trigger for metabolic differences between organisms. We have previously studied serum metabolic profiles in male patients with UC and identified candidate biomarkers of the disease.

**Objective.** To determine the features of metabolome composition and candidate metabolite biomarkers of UC in women using a non-targeted serum metabolomic analysis.

**Patients and methods.** This study included 10 women with active UC (moderately severe and severe attacks; a study group) aged 23 to 61 years (mean age: 35.2 ± 13.5 years) and 10 age-matched healthy volunteers (a control group) without IBD. Serum metabolites were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. Sample classification and search for potential biomarkers were performed using a partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), support vector machines (SVM), and a naïve Bayes classifier. ROC curves and areas under correlated curves were used to compare the success of different methods.

**Results.** In serum samples from patients with UC and healthy volunteers, up to 90 low molecular weight compounds with different mass spectra and retention times were identified. The analysis revealed 25 compounds whose concentrations in the blood differed significantly between the study group and the comparison group ( $p < 0.05$ ). Six of the 25 compounds (adipic acid,  $\beta$ -glycerophosphate, glyceric acid, 2-hydroxybutyric acid, squalene, 2-palmitoylglycerol) were among the most significant 15 compounds detected by two classifiers at once (PLS-DA and SVM). Of these 15 compounds, only 7 were identical to the compounds that significantly altered in men: 2-hydroxybutyric acid, creatinine,  $\beta$ -glycerophosphate,  $\alpha$ -glycerophosphate, trans-palmitoleic acid, palmitic acid, and squalene. Some of these compounds, just as in men, were associated with lipid metabolism disorders and glycolysis regulation ( $\alpha$ -glycerophosphate), as well as with impaired osteogenesis ( $\beta$ -glycerophosphate).

**Conclusion.** Significant differences were found between serum metabolomic profiles in women with UC and healthy volunteers. About half of the most significant compounds detected in the study group were identical to the compounds that were significantly altered in men with UC. In future investigations, the results obtained by non-targeted metabolomics, as well as the exact mechanisms of metabolic changes in UC patients, should be confirmed and clarified using targeted metabolomics and other omics.

**Key words:** inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, metabolome, biomarkers, gas chromatography-mass spectrometry

**For citation:** Vakhitov T.Ya., Kononova S.V., Demyanova E.V., Morugina A.S., Utsal V.A., Sall T.S., Skalinskaya M.I., Bakulin I.G., Khavkin A.I., Sitkin S.I. Serum metabolomic profile in patients with ulcerative colitis: pathophysiological role, diagnostic and therapeutic implications. *Vopr. det. diol. (Pediatric Nutrition)*. 2023; 21(5): 5–15. (In Russian). DOI: 10.20953/1727-5784-2023-5-5-15

**В**ремя воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), таких как язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), продолжает расти, затрагивая практически все регионы мира, особенно индустриально развивающиеся страны [1]. Расходы, связанные с ведением пациентов с ЯК достигают около 30 млрд евро в европейских странах и 15 млрд долларов в США [2]. ЯК представляет собой мультифакториальное генетически детерминированное аутоиммунное воспалительное заболевание и рассматривается как своеобразная полимикробная «инфекция», характеризующаяся стойким нарушением проницаемости кишечного барьера и утончением муцинового слоя с последующей транслокацией микроорганизмов и продуктов микробного происхождения из просвета кишечника в слизистую и подслизистую оболочки. Ведущая роль в патогенезе ЯК отводится измененной микробиоте кишечника – дисбиозу, а не конкретным патогенам [3].

Комменсальные бактерии, ранее находившиеся в верхнем слое муцина, лишаются своей экологической ниши и входят в непосредственный контакт с клетками кишечного эпителия. В результате этого, а также по причине неадекватного иммунного ответа организма изменяется видовой состав микробиоты и, как следствие, поток метаболитов от микробиоты к хозяину. Поток метаболитов со стороны хозяина также претерпевает определенные изменения: с одной стороны, это реакция на изменения состава и метаболической активности микробиоты, с другой – попытка восстановить утраченный гомеостаз путем метаболомных изменений (как известно, многие из метаболитов вовлечены в регуляторные процессы на уровне всего макроорганизма, включая нервную и эндокринную системы). Нарушения метаболизма, обусловленные хроническим воспалением, а также изменения микробного метаболизма при ЯК-ассо-

цированном дисбиозе в условиях нарушенного кишечного барьера оказывают существенное влияние на организм хозяина, сопровождаясь количественными и качественными изменениями метаболома крови [4, 5].

Целесообразность изучения метаболома при ВЗК подтверждена во многих исследованиях, позволивших выявить связанные с их патогенезом нарушения эндогенного и микробного метаболизма [6, 7]. По мнению многих исследователей, метаболомика становится идеальным выбором для изучения патофизиологии заболевания и улучшения подходов к клинической стратификации пациентов, своего рода золотым стандартом аналитического подхода к определению метаболитических сигнатур в биологических жидкостях человека и выявлению потенциальных биомаркеров заболевания [8, 9].

Состав метаболома биожидкостей существенно зависит от пола, поскольку половой диморфизм представляет собой своеобразный триггер метаболитических различий между организмами [9, 10]. По данным немецкого исследования, примерно треть метаболитов сыворотки крови демонстрирует значимые различия между мужчинами и женщинами [11]. Выявленные нами недавно половые различия субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови при ЯК могут отражать специфические особенности иммунопатогенеза заболевания у мужчин и женщин и, вероятно, должны учитываться при ведении пациентов с ВЗК [12]. Тем не менее пол по-прежнему недостаточно учитывается в метаболомных исследованиях, несмотря на рост доказательств клинической важности учета половых различий в контексте диагностики, лечения и прогноза заболеваний [9, 13].

Ранее нами был изучен метаболитический профиль сыворотки крови у пациентов-мужчин с ЯК и выявлены потенциальные биомаркеры заболевания [14]. **Целью** настоящего исследования было выявление особенностей состава метаболома и потенциальных метаболитов-биомаркеров ЯК у женщин с помощью нецелевого метаболомного анализа сыворотки крови.

## Пациенты и методы

Исследуемая когорта состояла из 10 женщин с ЯК в фазе обострения (среднетяжелая и тяжелая атаки; группа пациентов) в возрасте от 23 до 61 года (средний возраст  $35,2 \pm 13,5$  года) и 10 соответствующих им по возрасту условно-здоровых женщин-добровольцев (группа контроля). При этом 70% ( $n = 7$ ) включенных пациенток имели серьезное/неблагоприятное течение заболевания, и только 30% ( $n = 3$ ) – условно мягкое/благоприятное течение ЯК.

У пациентов с ЯК был проведен забор образцов венозной крови. Оценка активности/тяжести заболевания на момент формирования группы проводилась так же, как и в предыдущем исследовании [14, 15]. Все пациенты перед забором крови подписали добровольное информированное согласие с соблюдением всех процедур GCP и в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации (пересмотр 2013 г.). Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом СЗГМУ им. И.И.Мечникова (протокол №7 от 07.10.2020). Забор венозной крови, получение и хранение

сыворотки осуществляли в соответствии с действующими стандартами и методиками, описанными ранее [14].

Анализ проводили, как и ранее [14], методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) с использованием прибора GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Япония) на аналитической капиллярной колонке TR-5MS Thermo Fisher Scientific длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0,25 мкм. Методика анализа включала следующие этапы: 1) транспортировка и хранение образцов сывороток крови при  $-40^{\circ}\text{C}$ , 2) размораживание сывороток крови и двукратная экстракция из них метаболитов двойным объемом ацетонитрила, 3) высушивание в токе азота объединенного экстракта до получения сухого остатка, 4) добавление к сухому остатку в качестве внутреннего стандарта растворенного в метаноле эфира тридекановой кислоты и тридекановой кислоты с последующим высушиванием, 5) проведение реакции силилирования путем добавления силилирующего агента N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA) и инкубации в течение 2 мин при  $80^{\circ}\text{C}$  для проведения реакции получения летучих триметилсилильных производных, 6) добавление хлористого метилена и введение пробы полученного раствора в инжектор хроматографа, 7) хроматографический анализ, 8) обработка результатов (подробно описана в [14]).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием метода PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis), метода опорных векторов (Support Vector Machines/SVM) и наивного байесовского классификатора (Naïve Bayes) [16]. Для сравнения успешности методов строили графики ROC-кривых (Receiver Operating Characteristic Curves) и проводили оценку площадей под ними (AUROC) [17, 18]. Методы PLS-DA и SVM использовали также для поиска потенциальных биомаркеров. Кроме того осуществляли «интеллектуальный поиск» биомаркеров с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни, позволившего выявить группу соединений, медианные концентрации которых значимо ( $p < 0,05$ ) различались в группах здоровых добровольцев и пациентов с ЯК.

## Результаты исследования и их обсуждение

В ходе исследования в составе сыворотки крови пациентов и условно-здоровых добровольцев было идентифицировано до 90 низкомолекулярных соединений, различающихся масс-спектрами и временами удерживания. На основании сравнения площадей пиков идентифицированных метаболитов и стандартного соединения (эфира тридекановой кислоты с тридеканометанолом) известной концентрации, вводимого в каждую из проб, вычисляли условные концентрации всех метаболитов. При анализе сложных хроматографических пиков, включающих несколько соединений, использовали алгоритм, описанный ранее [14]. Последующий статистический анализ матрицы концентраций метаболитов показал, что все примененные в работе классификаторы практически с одинаковым успехом позволяют разделить всех испытуемых на группы пациентов с ЯК и добровольцев, не страдающих этим заболеванием. Пример разделения с использованием классификатора PLS-DA приведен на рис. 1.

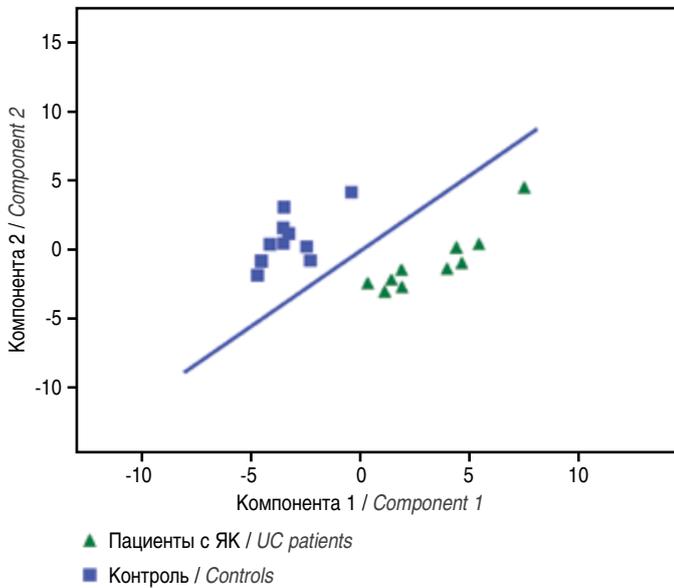


Рис. 1. Разделение всех образцов сыворотки крови на группу пациентов с ЯК и группу условно-здоровых добровольцев (контроль) методом PLS-DA.

Fig. 1. Division of all serum samples into a group of UC patients and a control group by PLS-DA method.

Оценка успешности бинарных классификаторов чувствительности и специфичности с использованием ROC-кривых показана на рис. 2. Основным параметром для оценки успешности классификатора является площадь под ROC-кривой (AUC). Тем не менее и сам вид кривых в ряде случаев имеет немаловажное значение. В нашем случае видно, что метод PLS-DA, несомненно, превосходил метод SVM во всем диапазоне координат. Однако Байесовский классификатор имел преимущества перед двумя другими методами в области специфичности от ~15 до 50%, поскольку позволял выявлять практически 100% больных. В любом случае полученные значения AUC означают превосходное качество модели (классификации) во всех 3 случаях.

Еще одна оценка, средняя точность, для наиболее успешного классификатора PLS-DA оказалась равной 0,918 с дисперсией 0,016. Частота, с которой метод PLS-DA принимал здоровых добровольцев за пациентов с ЯК (доля ложноположительных результатов), составляла 0,03, а частота, с которой метод принимал пациентов с ЯК за здоровых (доля ложноотрицательных результатов), – 0,14.

В соответствии со своими алгоритмами методы PLS-DA и SVM позволяют оценить численный вклад каждого из идентифицированных соединений в разделение групп пациентов с ЯК и условно-здоровых добровольцев. Поскольку алгоритмы у методов разные, полученные ими ранжированные по значимости списки соединений (табл. 1) также несколько различаются. В рамках методологии данных классификаторов эти соединения являются наиболее вероятными потенциальными биомаркерами, с помощью которых можно разделить на группы пациентов с ЯК и здоровых добровольцев. Очень важно, что результаты обоих методов во многом совпадали (табл. 1). Девять соединений из таблицы имели высокие ранги при использовании обоих методов (PLS-DA и

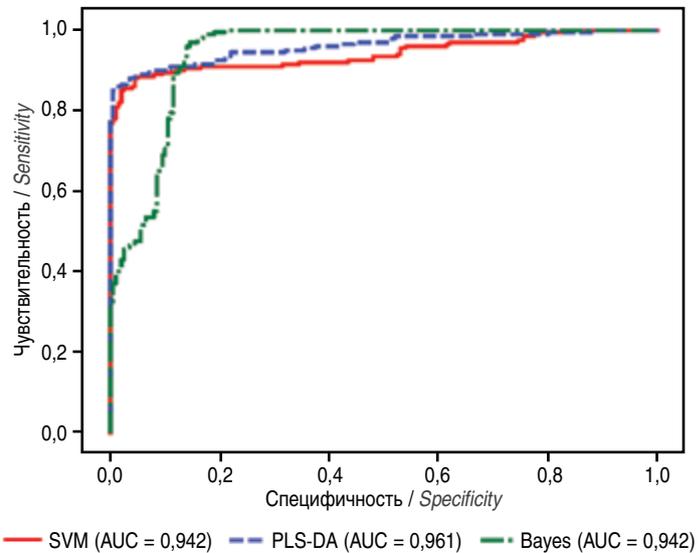


Рис. 2. ROC-кривые чувствительности и специфичности при использовании классификаторов SVM, PLS-DA и Naive Bayes. AUC – площадь под кривой.

Fig. 2. ROC curves representing a sensitivity and specificity using SVM, PLS-DA, and a Naive Bayes classifier. AUC is the area under the curve.

SVM). По шесть других соединений из этого списка имели относительно высокие ранги только в одном из методов. В другом методе эти ранги были ниже. Так, например, в методе PLS-DA стеароглицерин имел ранг 19, маргариновая кислота – 30,  $\alpha$ -кетоизокапроновая кислота – 31, элаидиновая кислота – 16, предполагаемый L-пролин – 20, треоновая кислота – 25.

Алгоритмы, используемые для классификации, как правило, не прозрачны, а их логика не всегда отвечает задачам исследования. В частности, основной нашей целью являлось не разбиение обследованных на группы больных ЯК и здоровых, а выявление соединений, концентрации которых в крови больных и здоровых значимо различались. Этой цели в большей степени отвечает «интеллектуальный» поиск биомаркеров, проведенный нами с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. В результате было выявлено 25 соединений, содержание которых в крови значимо ( $p < 0,05$ ) различалось в группах здоровых добровольцев и пациентов с ЯК. 13 из этих соединений выделены полужирным шрифтом в табл. 1, остальные 12 соединений представлены в табл. 2, 3. Дополнительно можно также отметить несколько метаболитов, уровень значимости для которых несущественно отличался от 0,05. К ним относятся треоновая кислота ( $p = 0,075$ ), пироглутаминовая кислота ( $p = 0,052$ ), цетиловый спирт ( $p = 0,063$ ), стеариновая кислота ( $p = 0,063$ ) и холестерин ( $p = 0,052$ ).

Шесть из 25 соединений, выбранных на основании критерия Манна–Уитни (адипиновая кислота,  $\beta$ -глицерофосфат, глицериновая кислота, 2-гидроксимасляная кислота, сквален, 2-пальмитоилглицерин), входили в группу наиболее значимых 15 соединений, выявленных сразу двумя классификаторами – PLS-DA и SVM (табл. 1). Значимость других 7 соединений также уверенно подтверждалась, но только

одним из классификаторов: PLS-DA (креатинин, янтарная кислота,  $\alpha$ -глицерофосфат, миристиновая кислота) или SVM (2-стеароглицерин, элаидиновая кислота и соединение, предварительно идентифицированное как производное пролина). Этот список может быть дополнен упоминавшимися треоновой и стеариновой кислотами. Таким образом, данные всех трех методов хорошо согласовались друг с другом.

В отличие от больных ЯК мужчин, у которых медианная концентрация практически всех маркерных соединений была выше, чем у здоровых добровольцев [14], у женщин с этим заболеванием соответствующие концентрации могли быть не только выше, но и ниже, чем у здоровых добровольцев (табл. 2, 3). В качестве примеров для этих групп метаболитов на рис. 3 приведены бокс-плоты (Box-plot) для двух основных кислот, янтарной и адипиновой (у больных ЯК медианная концентрация значимо ниже, чем у добровольцев), а также 2-гидроксимасляной (2-ГМК) и элаидиновой (транс-9-октадеценовая) кислот с более высокой медианной концентрацией у больных.

Характерной чертой янтарной кислоты являлось то, что доверительные интервалы для нее в группах пациентов и здоровых добровольцев совсем не перекрывались, т.е. все точки диаграммы «пациенты» не достигали даже нижнего предела размаха концентраций у добровольцев (линия на рис. 3, ограничивающая нижний «ус» снизу). Во всех

остальных случаях диапазоны концентраций маркерных метаболитов у пациентов и здоровых добровольцев частично перекрывались. В качестве примера на рис. 3 приведен график для адипиновой кислоты, на котором видно, что (вследствие упомянутого перекрывания доверительных интервалов) у нескольких больных ЯК ее концентрации в крови оказались выше, чем у некоторых здоровых добровольцев. При этом медианное значение концентрации адипиновой кислоты у больных ЯК было, как уже отмечалось, существенно (и статистически значимо,  $p = 0,0005$ ) ниже, чем у здоровых добровольцев.

Поскольку диапазоны концентраций у больных ЯК и здоровых добровольцев для всех маркерных соединений перекрывались только частично, всегда имелась возможность выделить группу больных, у которых уровень этого соединения был ниже порогового предела – линии, ограничивающей снизу нижний «ус» на Box-plot-диаграмме. Аналогичным образом, для каждого маркерного метаболита, чья медианная концентрация у пациентов с ЯК была значимо повышена, в отдельную группу были выделены пациенты, у которых уровень этого соединения был выше верхнего порогового предела – линии, ограничивающей сверху верхний «ус» на бокс-плотах добровольцев (рис. 3).

В табл. 2, 3 приведены соединения, медианная концентрация которых в соответствии с критерием Манна–Уитни у па-

Таблица 1. Соединения, уровень которых различался между пациентами с ЯК и здоровыми добровольцами при анализе методами PLS-DA и SVM

Table 1. Compounds whose levels differed between UC patients and healthy volunteers when analyzed by PLS-DA and SVM

№ п/п	Наименование соединения / Compound	Изменение уровня при ЯК / Level change in UC	Ранг (PLS-DA) / Rank (PLS-DA)	Ранг (SVM) / Rank (SVM)
1	<b>Адипиновая кислота / Adipic acid</b>	↓	1	1
2	<b><math>\beta</math>-глицерофосфат / <math>\beta</math>-glycerophosphate</b>	↓	2	3
3	<b>Глицериновая кислота / Glyceric acid</b>	↓	3	2
4	<b>2-гидроксимасляная кислота / 2-hydroxybutyric acid</b>	↑	9	7
5	<b>Сквален / Squalene</b>	↓	10	15
6	Пеларгоновая кислота / Pelargonic acid		4	9
7	Цетиловый спирт / Cetyl alcohol		6	4
8	<b>2-пальмитоилглицерин / 2-palmitoylglycerol</b>	↑	11	8
9	Холестерин / Cholesterol		13	5
10	<b>Креатинин / Creatinine</b>	↓	7	
11	<b>Янтарная кислота / Succinic acid</b>	↓	8	
12	<b><math>\alpha</math>-глицерофосфат / <math>\alpha</math>-glycerophosphate</b>	↓	14	
13	<b>2-стеароилглицерин / 2-stearoylglycerol</b>	↓		6
14	<b>Элаидиновая кислота / Elaidic acid</b>	↑		12
15	<b>Предположительно производное L-пролина / Presumably a derivative of L-proline</b>	↓		13
16	Капроновая кислота / Caproic acid		5	
17	Стеариновая кислота / Stearic acid	↑	12	
18	<b>Миристиновая кислота / Myristic acid</b>	↑	15	
19	Маргариновая кислота / Margaric acid			10
20	$\alpha$ -кетоиокапроновая кислота / $\alpha$ -ketoisocaproic acid			11
21	Треоновая кислота / Threonic acid			14

1. Полужирным шрифтом выделены соединения, уровень которых значимо (U-критерий Манна–Уитни,  $p < 0,05$ ) различался между группами.

2. Соединения ранжированы по их вкладу в разделение групп пациентов с ЯК и здоровых добровольцев при анализе методами PLS-DA и SVM соответственно (наименьшее значение ранга соответствует наибольшему вкладу). Ранги указаны только для первых 15 соединений с наибольшим вкладом (для каждого метода).

3. ↑, ↓ – уровень соединения у пациентов с ЯК значимо выше (↑) или ниже (↓), чем у здоровых добровольцев.

1. Compounds whose levels differed significantly (Mann–Whitney U test,  $p < 0.05$ ) between the groups are highlighted in bold.

2. Compounds are ranked according to their contribution to group division when analyzed by PLS-DA and SVM, respectively (the lowest rank value corresponds to the greatest contribution). Ranks are given only for the first 15 compounds with the greatest contribution (for each method).

3. ↑, ↓ – compound levels in patients with UC are significantly higher (↑) or lower (↓) than in healthy volunteers

циентов с ЯК достоверно ниже или выше, чем у здоровых добровольцев. Строки таблиц соответствуют индивидуальным пациентам, условные номера которых помещены в 1-м столбце каждой из таблиц. Заголовки остальных столбцов содержат названия маркерных метаболитов. В ячейках табл. 3 на пересечении строк пациентов и столбцов метаболитов приведены коэффициенты, показывающие отношение минимальной (пороговой) концентрации данного метаболита в группе здоровых добровольцев к его концентрации у данного конкретного больного. Если коэффициент больше 1,0, это означает, что концентрация данного метаболита в крови больного не превышает величину минимального порога,

т.е. ниже, чем у любого здорового испытуемого. Так, например, коэффициент 2,4, находящийся в ячейке на пересечении строки 5-го больного со столбцом глицериновой кислоты, означает, что концентрация глицериновой кислоты в крови данного больного в 2,4 раза ниже, чем пороговая концентрация для этого метаболита в группе здоровых. Для удобства восприятия ячейки с коэффициентами, превышающими 1,0, закрашены серым цветом. Неокрашенные ячейки соответствуют метаболитам, чьи концентрации попадают в диапазоны концентраций у здоровых добровольцев (при этом, однако, в большинстве случаев они остаются ниже медиан у добровольцев).

Таблица 2. Метаболиты, медианный уровень концентраций которых у пациентов статистически значимо ниже, чем у добровольцев. В таблице приведены отношения нижнего предела доверительного интервала концентрации (нижнего «уса») данного метаболита (потенциального маркера) у добровольцев к содержанию данного метаболита у пациента Table 2. Metabolites whose median concentrations were statistically significantly lower in patients than in healthy volunteers. The table shows the ratio of the lower limit of the confidence interval for the concentration (a lower “whisker”) of a given metabolite (a potential marker) in healthy volunteers to the concentration of this metabolite in a patient

Пациент / Patient	L-аланин / L-alanine	L-пролин / L-proline	L-аспарагиновая кислота / L-aspartic acid	L-фенилаланин / L-phenylalanine	L-треонин / L-threonine	Пролина произв. / Proline derivative	$\alpha$ -аминоадипиновая кислота / $\alpha$ -aminoadipic acid	Адипиновая кислота / Adipic acid	Янтарная кислота / Succinic acid	Глицериновая кислота / Glyceric acid	Креатинин / Creatinine	$\beta$ -глицерофосфат / $\beta$ -glycerophosphate	$\alpha$ -глицерофосфат / $\alpha$ -glycerophosphate
№1	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	0,7	0,5	1,3	1,3	2,0	0,4	0,5	0,8
№2	$\geq 10$	5,5	3,9	4,9	2,6	$\geq 10$	$\geq 10$	1,4	$\geq 10$	1,8	1,7	1,4	6,0
№3	0,9	0,6	0,4	1,2	0,6	2,8	9,5	0,9	1,3	0,9	$\geq 10$	1,2	0,7
№4	0,9	0,5	0,6	0,9	0,7	1,4	1,8	0,7	1,7	2,9	0,8	0,8	1,7
№5	0,6	0,5	0,7	1,2	0,7	0,6	0,7	0,8	1,3	2,4	0,6	5,4	2,3
№6	2,3	4,3	7,5	0,6	2,1	7,8	$\geq 10$	6,1	1,1	0,8	1,4	1,4	1,1
№7	0,7	0,4	0,4	1,9	0,8	0,5	0,6	1,5	2,9	1,8	0,8	1,3	4,2
№8	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,6	0,4	0,9	4,9	1,9	0,2	0,8	0,9
№9	$\geq 10$	8,3	6,6	0,8	5,1	4,6	$\geq 10$	17,1	1,3	0,6	3,4	2,0	8,3
№10	0,4	0,3	1,2	0,2	0,3	1,1	1,5	1,4	1,4	1,3	0,6	0,2	0,2

Таблица 3. Метаболиты, медианный уровень концентраций которых у пациентов статистически значимо выше, чем у добровольцев Table 3. Metabolites whose median concentrations were statistically significantly higher in patients than in healthy volunteers

Пациент / Patient	2-ГМК / 2-hydroxybutyric acid	3-ГМК / 3-hydroxybutyric acid	2,3-дигидроксибутират / 2,3-dihydroxybutyric	Миристиновая кислота / Myristic acid	Анте-пентадекановая кислота / Ante-pentadecanoic acid	Петрозелиновая кислота / Petroselinic acid	Транс-пальмитолеиновая кислота / Trans-palmitoleic acid	Пальмитиновая кислота / Palmitic acid	Элаидиновая кислота / Elaidic acid	2-пальмитолглицерин / 2-palmitoylglycerol	2-стеаролглицерин / 2-stearoylglycerol	Сквален / Squalene	$\Sigma$
№1	2,2	5,2	3,5	2,2	1,3	1,4	4,5	1,8	3,9	1,2	0,9	0,7	10
№2	1,5	8,9	3	0,9	0,7	0,8	1	1,1	1,4	0,8	0,7	0,8	5
№3	1,5	1	4,1	1	1,3	2,1	1,1	1,5	1,4	1,1	1	3	9
№4	1,2	3,2	0,9	1,8	1,4	1,3	3,5	1,3	3,5	0,8	0,8	0,9	8
№5	1	0,7	1,2	0,5	0,8	0,8	0,7	0,6	0,9	0,7	0,8	0,7	1
№6	2,4	2,4	1,5	1	1,2	1,2	2,3	1,1	2,3	1,5	1,6	1,4	11
№7	0,6	0,5	0,9	0,9	0,9	1,1	1,2	0,8	1,2	0,8	0,8	1,9	4
№8	0,9	1,1	1,3	1	1	1,1	1,2	0,9	1,2	1	0,9	1,4	6
№9	1,6	1,5	1,3	1,1	0,3	0,6	0,2	0,4	0,7	1	1,1	0,8	5
№10	1,9	1,4	0,7	2	1,3	1,1	1,9	1,3	2	1,3	1,1	0,5	10

В таблице приведены отношения концентрации данного метаболита (потенциального маркера) у пациента к максимальному значению доверительного интервала его концентраций (верхнего «уса» на рис. 3) в группе добровольцев. The table shows the ratio of the concentration of a given metabolite (a potential marker) in a patient to the maximum value of the confidence interval for its concentrations (an upper “whisker” in Fig. 3) in the control group.

Аналогичным образом построена и табл. 3. В ней, как уже отмечалось, приведены маркерные соединения, медианная концентрация которых у пациентов с ЯК выше, чем у здоровых добровольцев. Как и в табл. 2, все коэффициенты в закрашенных ячейках больше 1, однако в данной таблице они показывают, во сколько раз содержание данного метаболита в крови конкретного пациента выше, чем уровень верхнего барьера диапазона его концентраций у добровольцев (верхняя граница верхнего уса). В неокрашенных ячейках все коэффициенты меньше либо равны 1. Это означает, что концентрация данного метаболита ниже уровня верхнего предела для добровольцев в соответствующее число раз. Так, например, коэффициент 0,6 для 2-ГМК у пациента №7 означает, что концентрация этого соединения у данного па-

циента составляет 60% от верхней пороговой концентрации в группе здоровых добровольцев (при этом, как и выше, среднее или медианное значение она может превышать).

Важным показателем отличия больного от здорового может служить количество маркерных соединений, концентрация которых у больного не попадает в диапазон концентраций у здоровых добровольцев. Чтобы узнать их число, достаточно подсчитать для каждого пациента суммарное количество закрашенных ячеек в табл. 2 и 3 (табл. 4). Из табл. 4 видно, что минимальное количество маркеров, равное 6, оказалось у пациентки №5. Интересно, что эта больная была самой старшей (61 год) в группе, единственной курящей женщиной, с наименьшим стажем заболевания (1 год) и наибольшей массой тела (112 кг). Следует также отметить, что эта паци-

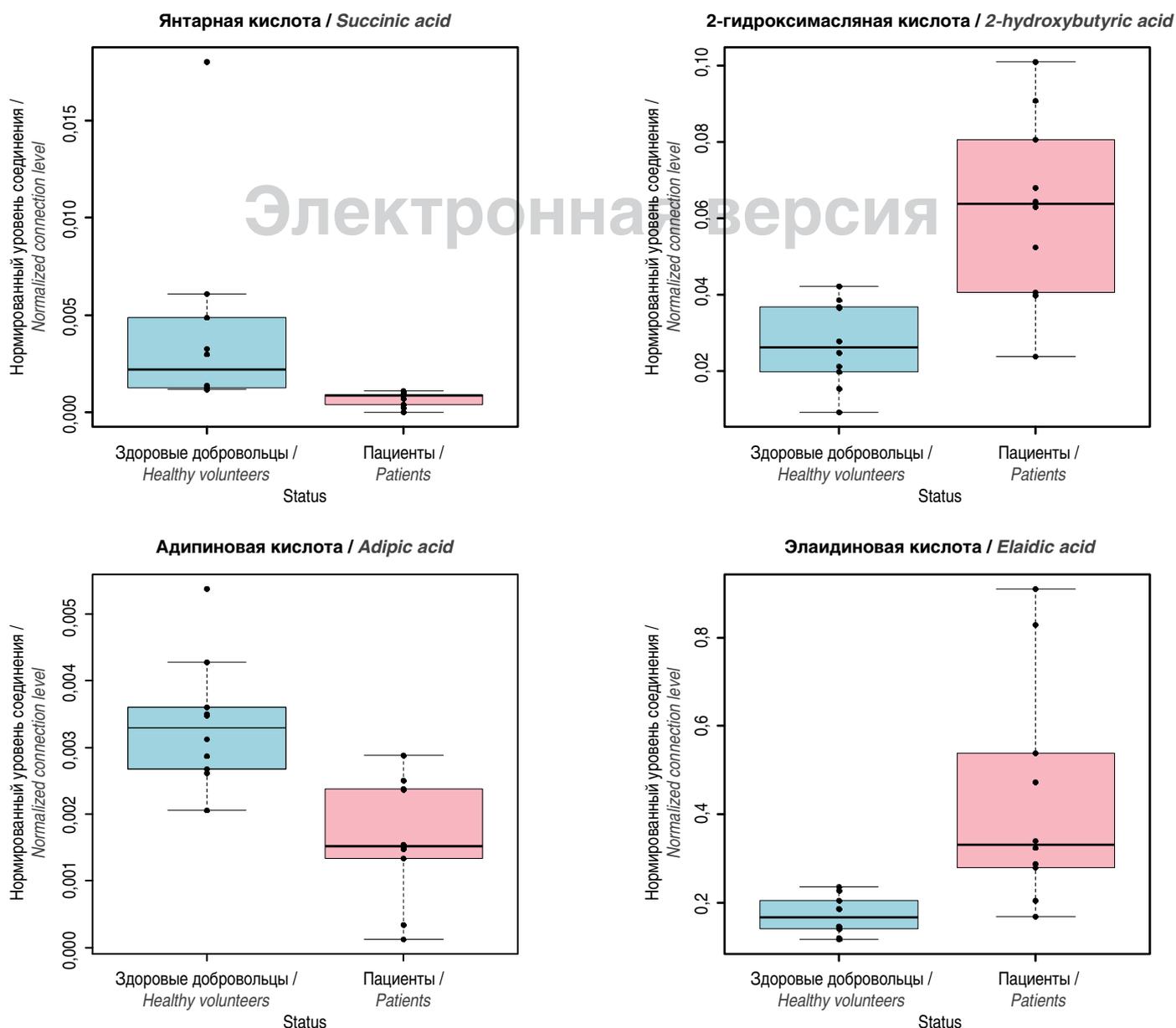


Рис. 3. Примеры Box-plot-диаграмм соединений (потенциальных биомаркеров) с пониженной (янтарная и адипиновая кислоты) и повышенной (элаидиновая и 2-гидроксимасляная кислоты) медианной концентрацией в крови женщин, больных ЯК.

*Fig. 3. Box plots showing the compounds (potential biomarkers) with decreased (succinic and adipic acids) and increased (elaidic and 2-hydroxybutyric acids) median concentrations in the blood of women with UC.*

Таблица 4. Количество метаболитов, концентрации которых у пациентов с ЯК не попадают (выше или ниже соответствующих пороговых значений) в доверительный интервал соответствующих концентраций у здоровых добровольцев  
 Table 4. Number of metabolites whose concentrations in UC patients do not fall (above or below the corresponding thresholds) within the confidence interval for the corresponding concentrations in healthy volunteers

Пациенты / Patients	Ниже, чем у добровольцев / Lower than in healthy volunteers	Выше, чем у добровольцев / Higher than in healthy volunteers	Общая сумма / Total amount	Стаж заболевания (лет) / Disease duration (years)	ИМТ / BMI
№	Сумма / Amount	Сумма / Amount			
№1	3	10	13	3	18
№2	13	5	18	6	25
№3	6	9	15	14	22
№4	5	8	13	10	16,9
№5	5	1	6	1	37,5
№6	11	11	22	15	32,7
№7	6	4	10	3	23,2
№8	2	6	8	2	24
№9	11	5	16	2	17
№10	6	10	16	9	26
Сумма / Amount	68	69	137		

ентка имела мягкое/благоприятное течение заболевания. По составу метаболома характерной ее чертой являлся самый низкий уровень  $\beta$ -глицерофосфата (табл. 2).

Максимальное число маркеров (22) было обнаружено в крови пациентки №6 с наибольшим (15 лет) стажем заболевания (табл. 4). Эта пациентка также отличалась повышенной массой тела, однако стаж заболевания при этом у нее был самым продолжительным из всех обследованных (табл. 4), а течение ЯК – серьезным/неблагоприятным. По составу метаболома она отличалась от других пациентов самым низким уровнем глицератов длинноцепочечных жирных кислот – 2-пальмитоилглицерина и 2-стеароглицерина (табл. 3) – и L-аспарагиновой кислоты (табл. 2). Кроме этого, у нее был самый высокий среди больных уровень 2-ГМК (табл. 3) и янтарной кислот (табл. 2). Показательно, что все 3 последние кислоты являются четырехатомными кислотами, первая из них –  $\alpha$ -оксикислота, а две последних (аспарагиновая и янтарная) – четырехатомные дикарбоновые кислоты, различающиеся только наличием аминогруппы у первой из них.

Если предположить, что метаболические изменения в составе крови постепенно накапливаются в процессе заболевания, можно ожидать, что выраженность различий в составе метаболома пациентов и добровольцев будет возрастать в зависимости от продолжительности (стажа) заболевания (табл. 4), как это уже отмечалось для 2 самых тучных пациенток – №5 и №6. И действительно, вычисленный коэффициент корреляции между количеством маркерных соединений и продолжительностью заболевания оказался равен 0,69, то есть достаточно высоким, чтобы не опровергнуть данное предположение. Поскольку высокое значение коэффициента корреляции далеко не всегда гарантирует наличие соответствующей регрессионной зависимости [19], ее существование было подтверждено (в соответствии с современными рекомендациями) построением точечной диаграммы рассеяния и вычислением коэффициентов уравнения линейной регрессии (тренда) для нее:  $y = 0,75x - 3,77$ .

Далее мы предположили, что одним из значимых показателей, влияющих на состав метаболома, может быть индекс

массы тела (ИМТ). Для проверки этого предположения из рассмотрения были исключены все (3 человека) пациенты с наиболее низкими ИМТ в диапазоне от 16,9 до 18 кг/м<sup>2</sup>. Коэффициент корреляции при этом увеличился до 0,84, а уравнение регрессии приобрело вид:  $y = 0,83x - 4,1$ . Если в дальнейшем зависимость связи числа маркерных соединений и продолжительности заболевания подтвердится, этот факт можно будет использовать как один из показателей при контроле развития заболевания или/и эффективности его терапии.

Физиологическая роль биомаркерных соединений достаточно широко обсуждалась в предыдущих наших работах [7, 14], однако сведения о регуляторных функциях метаболитов постоянно пополняются. Так, например, недавно было показано, что стеариновая кислота может являться регулятором, действует через Toll-подобный рецептор 4 и вызывает при этом стойкое перепрограммирование врожденной иммунной системы [20].

L-треонин играет важную роль в синтезе муцина и его недостаток приводит к снижению синтеза слизи, уменьшению количества бокаловидных клеток и увеличению проницаемости кишечника [21]. Он активно метаболизируется комменсальной микробиотой, а метаболический путь P4-PWY (superpathway of L-lysine, L-threonine and L-methionine biosynthesis I) является одним из значимо меняющихся метаболических путей микробиоты при ВЗК. Снижение уровня L-треонина в сыворотке крови у женщин, вероятно, отражает возможное снижение активности этого пути при ВЗК [22]. Этим же, видимо, объясняется снижение уровня  $\alpha$ -аминоадипиновой кислоты – промежуточного продукта при синтезе лизина некоторыми бактериями [23], хотя в другой работе сообщалось об активации пути синтеза лизина микробиотой больных ВЗК [24]. Сравнительный анализ показал, что 2-кетод-D-глюконовая кислота, ранее идентифицированная как маркерная и находившаяся на первом месте по вкладу в разделение групп больных и здоровых у мужчин, а также маргариновая кислота не имеют такого значения для женщин. Хотя они и были в числе отобранных обоими или одним

из двух классификаторами, изменения их уровней не носили статистически значимого характера. Каприловая, эритроновая, 2-кето-D-глюконовая кислота и пентадекановая кислоты также не оказались значимыми для идентификации метаболитов, свойственных больным у женщин. Уровень определяемой каприловой кислоты у больных ЯК, видимо, все же связан с половым составом исследуемых групп [7, 14].

Ранее мы на основании литературных данных связали их присутствие в метаболоме сыворотки крови главным образом с кишечным метаболизмом или их экзогенным происхождением из продуктов питания. Интересно, что у женщин значимо менялся уровень кислот, явно имевших происхождение из продуктов питания, например, петрозелиновой кислоты, присутствующей в семенах зонтичных растений (петрушка, кориандр и др.). Повышенный уровень элаидиновой кислоты в сыворотке, скорее всего, отражает присутствие маргарина в продуктах питания у больных, поскольку она является трансизомером олеиновой кислоты [25], хотя в следовых количествах ее обнаруживали в козьем и коровьем молоке и мясе. Адипиновая кислота используется в качестве пищевой добавки E355. Интересно, что она снижена у больных ЯК. Пролин важен для синтеза белка и роста клеток и может также служить важным источником энергии для некоторых бактерий [26], что потенциально объясняет снижение уровня потенциального производного пролина в образцах сыворотки.

Из этих 15 соединений только семь были идентичны соединениям, значимо менявшимся у мужчин: 2-гидроксимасляная кислота, креатинин,  $\beta$ -глицерофосфат,  $\alpha$ -глицерофосфат, транс-пальмитолеиновая кислота, пальмитиновая кислота, сквален. Часть этих соединений так же, как и у мужчин, связана с нарушением липидного обмена и регуляцией гликолиза ( $\alpha$ -глицерофосфат), а также с нарушением остеогенеза ( $\beta$ -глицерофосфат).  $\beta$ -глицерофосфат образуется эндогенно и высвобождается из клеток во внеклеточное пространство. Он является субстратом для щелочной фосфатазы и источником фосфата в процессах минерализации [27]. Поэтому разнонаправленное изменение этого маркера у мужчин и женщин может отражать различное нарушение процессов минерализации при патологии.

Сквален может иметь наравне с эндогенным экзогенное происхождение из диетических источников и кишечной микробиоты. У женщин мы не увидели его возможной конкуренции с  $\alpha$ -токоферолом за белок-переносчик, как это можно было предположить у мужчин, где мы наблюдали значимо противоположно направленные изменения концентраций этих соединений [14].

Возможные причины повышения уровня 2-ГМК, наблюдаемые и у мужчин с ЯК, ранее нами уже обсуждались. Это развитие окислительного стресса, повышенный кетогенез и повышенная бактериальная продукция, например, некоторыми видами *Clostridium* [14].

Повышение уровня янтарной кислоты (сукцината) обычно связывают с ухудшением состояния при ЯК, поскольку она увеличивает проницаемость барьера и активирует провоспалительные макрофаги [28]. Однако мы наблюдали значимое падение ее уровня в сыворотке крови у женщин, больных ЯК. Одним из объяснений может быть снижение

продуцирующих ее в качестве промежуточного метаболита бактерий [29].

Сукцинат является важным метаболитом как эндогенного, так и микробного происхождения [30]. Ряд сукцинат-продуцирующих бактерий (*Bacteroides* spp., *Prevotella copri*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Phascolarctobacterium succinatutens*) могут быть источником сукцината в крови [29]. Сообщалось, что ожирение связано с более высоким уровнем циркулирующего сукцината вследствие нарушения передачи сигналов его рецептором SUCNR1. При этом передача сигналов сукцинат-SUCNR1 была описана как основная движущая сила запускаемого гельминтами иммунитета типа 2 в кишечнике [29]. Стоит заметить, что в нашем исследовании мы не нашли у женщин с ЯК в Т-клеточном ответе компонентов Th2-ответа, который наблюдался у мужчин с ЯК [12]. Кроме того, мы не наблюдали и значимых изменений концентрации сукцината в сыворотке крови у мужчин [14], а в более раннем исследовании (с более высокой долей мужчин) уровень янтарной кислоты был даже повышен [7].

## Заключение

Данные, приведенные в табл. 2, 3, являются основой для дальнейшего интеллектуального анализа с использованием, например, «дерева принятия решения», основанного на последовательном сравнении концентраций маркерных соединений в крови пациента с диапазоном концентраций данного метаболита в крови большинства здоровых людей. Этот метод является, на наш взгляд, более обоснованным и достоверным по сравнению с такими классификаторами, как PLS-DA, SVM или Naïve Bayes, способствует лучшему пониманию основ метаболитной диагностики и терапии, путей их практического использования, а также глубинных (на уровне метаболома) механизмов протекания заболевания. Можно было бы полагать, что искусственный интеллект (после соответствующего обучения) справится с задачей диагностики по данным ГХ-МС (или другим аналогичным) значительно легче, быстрее и надежнее, чем человек, однако пропасть между умением что-то сделать и пониманием, каким образом конечный результат был достигнут при этом, окажется еще больше.

В целом полученные в настоящем исследовании результаты позволяют заключить, что метаболомные профили женщин с язвенным колитом и здоровых женщин имеют значимые различия. В исследованиях ряда авторов, в т.ч. и наших собственных, было показано, что сам по себе метод ГХ-МС позволяет обнаружить в крови несколько сотен соединений, имеющих индивидуальные масс-спектры и времена удерживания, однако большинство из них до сих пор плохо поддаются идентификации до конкретного химического названия. Многие из этих веществ являются выраженными маркерами заболевания и, даже оставаясь неназванными, могут успешно использоваться в диагностических целях, для выявления индивидуальных особенностей заболевания и в ходе лечения. Однако до тех пор, пока мы не научимся определять их химическую структуру, эти соединения остаются практически бесполезными для понимания механизмов возникновения и протекания заболевания и в целях поиска путей его лечения.

Идентифицированные соединения в этом смысле имеют значительные преимущества, поскольку одни из них вполне доступны для исследования биологических функций [31], другие, при необходимости, могут быть синтезированы в химических лабораториях. В будущих исследованиях результаты, полученные с помощью нецелевой метаболомики, а также точные механизмы метаболических изменений у больных ВЗК должны быть подтверждены и уточнены с помощью методов целевой метаболомики [32] и других омикс-технологий, таких как протеомика, геномика, транскриптомика, метагеномика и метатранскриптомика [8].

#### Информация о финансировании

Работа была выполнена при поддержке РНФ (проект №20-65-47026).

#### Financial support

This study was supported by the Russian Science Foundation (project No 20-65-47026).

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declared no conflicts of interest.

#### Информированное согласие

При проведении исследования было получено информированное согласие пациентов.

#### Informed consent

In carrying out the study, written informed consent was obtained from all the patients.

#### Литература / References

- Du L, Ha C. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2020 Dec;49(4):643-654. DOI: 10.1016/j.gtc.2020.07.005
- Cohen RD, Yu AP, Wu EQ, Xie J, Mulani PM, Chao J. Systematic review: the costs of ulcerative colitis in Western countries. *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Apr;31(7):693-707. DOI: 10.1111/j.1365-2036.2010.04234.x
- Ситкин СИ, Вахитов ТЯ, Демьянова ЕВ. Микробиом, дисбиоз толстой кишки и воспалительные заболевания кишечника: когда функция важнее таксономии. *Альманах клинической медицины.* 2018;46(5):396-425. / Sitkin SI, Vakhitov TYa, Demyanova EV. Microbiome, gut dysbiosis and inflammatory bowel disease: That moment when the function is more important than taxonomy. *Almanac of Clinical Medicine.* 2018;46(5):396-425. DOI: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-396-425 (In Russian).
- Lavelle A, Sokol H. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2020 Apr;17(4):223-237. DOI: 10.1038/s41575-019-0258-z
- Sitkin S, Vakhitov T, Tkachenko E, Avalueva E, Oreshko L, Zhigalova T, et al. P852 A metabolomics approach to discover biomarkers of chronic intestinal inflammation associated with gut microbiota dysbiosis in ulcerative colitis and Celiac Disease. *J Crohns Colitis.* 2018;12(Suppl 1):S547-S548. DOI: 10.1093/ecco-jcc/ijx180.979
- Bauset C, Gisbert-Ferrándiz L, Cosín-Roger J. Metabolomics as a Promising Resource Identifying Potential Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Med.* 2021 Feb 6;10(4):622. DOI: 10.3390/jcm10040622
- Ситкин СИ, Вахитов ТЯ, Ткаченко ЕИ, Лазебник ЛБ, Орешко ЛС, Жигалова ТН, и др. Нарушения микробного и эндогенного метаболизма при язвенном колите и целиакии: метаболомный подход к выявлению потенциальных биомаркеров хронического воспаления в кишечнике, связанного с дисбиозом. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2017;7:4-50. / Sitkin SI, Vakhitov TYa, Tkachenko EI, Lazebnik LB, Oreshko LS, Zhigalova TN, et al. Gut microbial and endogenous metabolism alterations in ulcerative colitis and celiac disease: A metabolomics approach to identify candidate biomarkers of chronic intestinal inflammation associated with dysbiosis. *Experimental and Clinical Gastroenterology.* 2017;7:4-50. (In Russian).
- Wang J, Sun Q, Gao Y, Xiang H, Zhang C, Ding P, et al. Metabolomics window into the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease in recent 5 years. *Int Immunopharmacol.* 2022 Dec;113(Pt B):109472. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109472
- Costanzo M, Caterino M, Sotgiu G, Ruoppolo M, Franconi F, Campesi I. Sex differences in the human metabolome. *Biol Sex Differ.* 2022 Jun 15;13(1):30. DOI: 10.1186/s13293-022-00440-4
- Audano M, Maldini M, De Fabiani E, Mitro N, Caruso D. Gender-related metabolomics and lipidomics: From experimental animal models to clinical evidence. *J Proteomics.* 2018 Apr 30;178:82-91. DOI: 10.1016/j.jprot.2017.11.001
- Krumsiek J, Mittelstrass K, Do KT, Stücker F, Ried J, Adamski J, et al. Gender-specific pathway differences in the human serum metabolome. *Metabolomics.* 2015;11(6):1815-1833. DOI: 10.1007/s11306-015-0829-0
- Кононова СВ, Вахитов ТЯ, Кудрявцев ИВ, Лазарева НМ, Скалинская МИ, Бакулин ИГ, и др. Половые различия в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови при язвенном колите отражают специфические особенности иммунопатогенеза воспалительных заболеваний кишечника у мужчин и женщин. *Вопросы детской диетологии.* 2023;21(4):16-25. / Kononova SV, Vakhitov TYa, Kudryavtsev IV, Lazareva NM, Skalinskaya MI, Bakulin IG, et al. Sex-related differences in the composition of peripheral blood lymphocyte subsets in ulcerative colitis reflect specific features of the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease in men and women. *Vopr. det. dietol. (Pediatric Nutrition).* 2023;21(4):16-25. DOI: 10.20953/1727-5784-20234-16-25 (In Russian).
- Palacios-González B, León-Reyes G, Rivera-Paredes B, Ibarra-González I, Vela-Amieva M, Flores YN, et al. Targeted Metabolomics Revealed a Sex-Dependent Signature for Metabolic Syndrome in the Mexican Population. *Nutrients.* 2022 Sep 6;14(18):3678. DOI: 10.3390/nu14183678
- Вахитов ТЯ, Кононова СВ, Демьянова ЕВ, Моругина АС, Утсаль ВА, Скалинская МИ, и др. Выявление потенциальных биомаркеров воспалительных заболеваний кишечника с помощью нецелевой метаболомики сыворотки крови. *Вопросы детской диетологии.* 2022;20(6):21-32. / Vakhitov TYa, Kononova SV, Demyanova EV, Morugina AS, Utsal VA, Skalinskaya MI, et al. Identification of candidate biomarkers for inflammatory bowel disease using non-targeted serum metabolomics. *Vopr. det. dietol. (Pediatric Nutrition).* 2022;20(6):21-32. DOI: 10.20953/1727-5784-2022-6-21-32 (In Russian).
- Шельгин ЮА, Ивашкин ВТ, Белоусова ЕА, Решетов ИВ, Маев ИВ, Ачкасов СИ, и др. Язвенный колит (K51), взрослые. *Колопроктология.* 2023;22(1):10-44. / Shelygin YuA, Ivashkin VT, Belousova EA, Reshetov IV, Maev IV, Achkasov SI, et al. Ulcerative colitis (K51), adults. *Koloproktologia.* 2023;22(1):10-44. DOI: 10.33878/2073-7556-2023-22-1-10-44 (In Russian).
- Trainor PJ, DeFilippis AP, Rai SN. Evaluation of Classifier Performance for Multiclass Phenotype Discrimination in Untargeted Metabolomics. *Metabolites.* 2017 Jun 21;7(2):30. DOI: 10.3390/metabo7020030
- Carter JV, Pan J, Rai SN, Galandiuk S. ROC-ing along: Evaluation and interpretation of receiver operating characteristic curves. *Surgery.* 2016 Jun;159(6):1638-1645. DOI: 10.1016/j.surg.2015.12.029
- Григорьев СГ, Лобзин ЮВ, Скрипченко НВ. Роль и место логистической регрессии и ROC-анализа в решении медицинских диагностических задач. *Журнал инфектологии.* 2016;8(4):36-45. / Grigoryev SG, Lobzin YuV, Skripchenko NV. The role and place of logistic regression and roc analysis in solving medical diagnostic task. *Journal Infectology.* 2016;8(4):36-45. DOI: 10.22625/2072-6732-2016-8-4-36-45 (In Russian).

19. Chatterjee S, Firat A. Generating Data with Identical Statistics but Dissimilar Graphics. *The American Statistician*. 2007;61(3):248-254. DOI: 10.1198/000313007X220057
20. Hata M, Andriessen EMMA, Hata M, Diaz-Marin R, Fournier F, Crespo-Garcia S, et al. Past history of obesity triggers persistent epigenetic changes in innate immunity and exacerbates neuroinflammation. *Science*. 2023 Jan 6;379(6627):45-62. DOI: 10.1126/science.abj8894
21. Gaifem J, Gonçalves LG, Dinis-Oliveira RJ, Cunha C, Carvalho A, Torrado E, et al. L-Threonine Supplementation During Colitis Onset Delays Disease Recovery. *Front Physiol*. 2018 Sep 5;9:1247. DOI: 10.3389/fphys.2018.01247
22. Ma Y, Zhang Y, Xiang J, Xiang S, Zhao Y, Xiao M, et al. Metagenome Analysis of Intestinal Bacteria in Healthy People, Patients With Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 26;11:599734. DOI: 10.3389/fcimb.2021.599734
23. Nishida H, Nishiyama M, Kobashi N, Kosuge T, Hoshino T, Yamane H. A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: a key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Res*. 1999 Dec;9(12):1175-83. DOI: 10.1101/gr.9.12.1175
24. Lo Sasso G, Khachatryan L, Kondylis A, Battey JND, Sierro N, Danilova NA, et al. Inflammatory Bowel Disease-Associated Changes in the Gut: Focus on Kazan Patients. *Inflamm Bowel Dis*. 2021 Feb 16;27(3):418-433. DOI: 10.1093/ibd/izaa188
25. Plötz T, Krümmel B, Laporte A, Pingitore A, Persaud SJ, Jörns A, et al. The mono-unsaturated fatty acid oleate is the major physiological toxic free fatty acid for human beta cells. *Nutr Diabetes*. 2017 Dec 21;7(12):305. DOI: 10.1038/s41387-017-0005-x
26. Xie D, Li F, Pang D, Zhao S, Zhang M, Ren Z, et al. Systematic Metabolic Profiling of Mice with Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *J Inflamm Res*. 2021 Jul 2;14:2941-2953. DOI: 10.2147/JIR.S313374
27. Wang X, Schröder HC, Müller WE. Enzymatically synthesized inorganic polymers as morphogenetically active bone scaffolds: application in regenerative medicine. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2014;313:27-77. DOI: 10.1016/B978-0-12-800177-6.00002-5
28. Fremder M, Kim SW, Khamaysi A, Shimshilashvili L, Eini-Rider H, Park IS, et al. A transepithelial pathway delivers succinate to macrophages, thus perpetuating their pro-inflammatory metabolic state. *Cell Rep*. 2021 Aug 10;36(6):109521. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109521
29. Fernández-Veledo S, Vendrell J. Gut microbiota-derived succinate: Friend or foe in human metabolic diseases? *Rev Endocr Metab Disord*. 2019 Dec;20(4):439-447. DOI: 10.1007/s11154-019-09513-z
30. Connors J, Dawe N, Van Limbergen J. The Role of Succinate in the Regulation of Intestinal Inflammation. *Nutrients*. 2018 Dec 22;11(1):25. DOI: 10.3390/nu11010025
31. Салль ТС, Ситкин СИ, Вахитов ТЯ. Биологическая активность метаболитов кишечной микробиоты. В книге: Жизнеобеспечение при критических состояниях. XXIV Всероссийская конференция с международным участием: сборник тезисов. М., 2022. / Sall' TS, Sitkin SI, Vakhitov TYa. Biologicheskaya aktivnost' metabolitov kishhechnoi mikrobioty. V knige: Zhizneobespechenie pri kriticheskikh sostoyaniyakh. XXIV Vserossiiskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem: sbornik tezisov. M., 2022. (In Russian).
32. Xu H, Pan LB, Yu H, Han P, Fu J, Zhang ZW, et al. Gut microbiota-derived metabolites in inflammatory diseases based on targeted metabolomics. *Front Pharmacol*. 2022 Sep 27;13:919181. DOI: 10.3389/fphar.2022.919181
- Моругина Анна Сергеевна, соисполнитель проекта РФФ №20-65-47026 Института экспериментальной медицины; научный сотрудник микробиологической группы ООО «Иннова Плюс»  
ORCID: 0000-0003-3054-3615
- Утсаль Виктор Альбертович, старший научный сотрудник НКЦТ им. С.Н.Голикова ФМБА России  
Scopus Author ID: 6504428488
- Салль Татьяна Сергеевна, ведущий инженер отдела биохимии Института экспериментальной медицины  
ORCID: 0000-0002-5890-5641
- Скалинская Мария Игоревна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М.Рысса Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова; соисполнитель проекта РФФ №20-65-47026 Института экспериментальной медицины  
ORCID: 0000-0003-0769-8176
- Бакулин Игорь Геннадьевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней, гастроэнтерологии и диетологии им. С.М.Рысса Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова  
ORCID: 0000-0002-6151-2021
- Хавкин Анатолий Ильич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель Московского областного центра детской гастроэнтерологии, гепатологии; главный научный сотрудник отдела педиатрии Научно-исследовательского клинического института детства Министерства здравоохранения Московской области; главный научный сотрудник Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. академика Ю.Е.Вельтищева Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И.Пирогова; профессор кафедры педиатрии с курсом детских хирургических болезней Медицинского института Белгородского государственного национального исследовательского университета  
ORCID: 0000-0001-7308-7280
- Ситкин Станислав Игоревич, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник научной группы «Метаболизма неинфекционных заболеваний» Института экспериментальной медицины; доцент Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И.Мечникова, заведующий НИГ эпигенетики и метабеномики Института перинатологии и педиатрии НМИЦ им. В.А.Алмазова  
ORCID: 0000-0003-0331-0963

#### Information about co-authors:

Svetlana V. Konoнова, PhD (Biology), Principal Investigator for the RSF Project No 20-65-47026, Institute of Experimental Medicine; Leading Engineer of the Group of Protein Synthesis Regulation, Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences  
ORCID: 0000-0002-7373-7797

Elena Demyanova, PhD (Pharmacy), Co-Investigator for the RSF Project No 20-65-47026, Institute of Experimental Medicine; Senior Researcher, Microbiological Group, Innova Plus LLC  
ORCID: 0000-0002-1872-3464

Anna S. Morugina, Co-Investigator for the RSF Project No 20-65-47026, Institute of Experimental Medicine; Researcher, Microbiological Group, Innova Plus LLC  
ORCID: 0000-0003-3054-3615

Viktor A. Utsal, Senior Researcher, Golikov Research Clinical Center of Toxicology, Federal Medical Biological Agency  
Scopus Author ID: 6504428488

Tatyana S. Sall, Leading Engineer, Department of Biochemistry, Institute of Experimental Medicine  
ORCID: 0000-0002-5890-5641

Maria I. Skalinskaya, MD, PhD, Assoc. Professor of the S.M.Ryss Department of Propedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Dietetics, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University; Co-Investigator for the RSF Project No 20-65-47026, Institute of Experimental Medicine  
ORCID: 0000-0003-0769-8176

Igor G. Bakulin, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the S.M.Ryss Department of Propedeutics of Internal Diseases, Gastroenterology and Dietetics, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University  
ORCID: 0000-0002-6151-2021

Anatoly I. Khavkin, MD, PhD, DSc, Professor, Head of the Moscow Regional Center of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, Research Clinical Institute of Childhood, Ministry of Health of the Moscow Region; Chief Researcher of the Department of Gastroenterology, Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University; Professor, Department of Pediatrics with a Course in Pediatric Surgical Diseases, Institute of Medicine, Belgorod National Research University  
ORCID: 0000-0001-7308-7280

Stanislav I. Sitkin, MD, PhD, Leading Researcher, Institute of Experimental Medicine; Assoc. Professor, I.I.Mechnikov North-Western State Medical University; Head of the Epigenetics & Metagenomics Research Group of the Institute of Perinatology and Pediatrics, Almazov National Medical Research Centre  
ORCID: 0000-0003-0331-0963

#### Информация о соавторах:

Кононова Светлана Витальевна, кандидат биологических наук, ответственный исполнитель проекта РФФ №20-65-47026 Института экспериментальной медицины; ведущий инженер группы регуляции биосинтеза белка Института белка РАН  
ORCID: 0000-0002-7373-7797

Демьянова Елена Валерьевна, кандидат фармацевтических наук, соисполнитель проекта РФФ №20-65-47026 Института экспериментальной медицины; старший научный сотрудник микробиологической группы ООО «Иннова Плюс»  
ORCID: 0000-0002-1872-3464