

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania w Języku Angielskim



Rozprawa doktorska

w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, dyscyplina nauki medyczne

**„Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas
do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym,
wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”**

mgr Patrycja Mojsak

Promotor: **dr hab. n. med. Michał Ciborowski**

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Białystok, 2023

Składam serdeczne podziękowania

Dr hab. n. med. Michałowi Ciborowskiemu

za merytoryczne ukierunkowanie niniejszej rozprawy doktorskiej,
cenne rady i dyskusje, które w sposób znaczący przyczyniły się do jej powstania,

a także za okazaną cierpliwość, życzliwość i wsparcie

w trakcie realizacji i redagowania pracy

dr n. med. Katarzynie Miniewskiej

za zaangażowanie oraz cenne rady związane z niniejszą pracą

Prof. dr hab. n. med. Adamowi Krętowskiemu

za stworzenie wspaniałych warunków do pracy naukowej

Zespołowi Laboratorium Metabolomiki CBK

za przyjazną atmosferę i pomoc przy powstaniu niniejszej pracy

*Niniejszą pracę dedykuję mojemu Mężowi i Rodzicom,
w podziękowaniu za wsparcie i wyrozumiałość
oraz wszelkie słowa otuchy w trakcie jej realizacji*

Spis treści

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską	7
2. Zestawienie publikacji doktoranta	8
3. Wykaz stosowanych skrótów	9
4. Wstęp	13
4.1. Cukrzyca typu 2	13
4.2. Stan przedcukrzycowy.....	14
4.3. Wpływ czynników genetycznych oraz diety na rozwój cukrzycy typu 2	14
4.4. Zaburzenia związane z mikrobiomem jelitowym a rozwój cukrzycy typu 2	16
4.4.1. Wpływ mikrobiomu na produkcję oraz transformację metabolitów	19
4.4.1.1. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe pochodzenia mikrobiologicznego	20
4.4.1.2. Aminokwasy pochodzenia mikrobiologicznego	22
4.4.1.3. Kwasy żółciowe pochodzenia mikrobiologicznego	25
4.4.2. Suplementacja probiotyków a rozwój cukrzycy typu 2.....	27
4.4.3. Występowanie metabolitów związanych z florą jelitową w próbkach biologicznych	28
4.5. Metabolomika.....	29
4.5.1. Przygotowanie próbek do analiz GC-MS.....	30
4.6. Metody analizy danych metabolomicznych	33
5. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską.....	35
5.1. Cele pracy	35
5.2. Materiały i metody.....	36
5.2.2. Pobieranie materiału do badań	40
5.2.3. Metabolity uwzględnione do analiz za pomocą GC-MS.....	40
5.2.4. Powtarzalność, odtwarzalność i stabilność pomiaru wybranych metabolitów	41
5.2.5. Optymalizacja metody przygotowania próbek	41
5.2.6. Przygotowanie próbek klinicznych	42
5.2.7. Analizy GC-MS.....	44

5.2.8. Analiza statystyczna danych metabolomicznych uzyskanych dla próbek klinicznych – Publikacja nr 2	44
5.2.9. Analiza statystyczna próbek klinicznych – Publikacja nr 3.....	44
6. Wyniki.....	45
6.1. Optymalizacja metody przygotowania próbek osocza i surowicy	45
6.2. Wybór rozpuszczalnika do ekstrakcji metabolitów z osocza lub surowicy	45
6.3. Dobór stężenia i objętości odczynnika do metoksymacji	48
6.4. Wpływ warunków metoksymacji oraz sililacji na efektywność derywatyzacji	51
6.6. Wyniki badań metabolomicznych próbek klinicznych – publikacja nr 2	54
6.7. Wyniki badań metabolomicznych próbek klinicznych – publikacja nr 3	58
7. Dyskusja.....	60
7.1. Dobór rozpuszczalników do ekstrakcji	61
7.2. Optymalizacja warunków podczas dwustopniowej derywatyzacji.....	62
7.2.1. Wpływ stężenia oraz objętości odczynnika do metoksymacji.....	62
7.2.2. Wpływ temperatury oraz czasu na proces derywatyzacji	63
7.3. Dysbioza jelitowa, a rozwój cukrzycy typu 2	65
7.3.1. Wpływ metabolitów z grupy węglowodanów na rozwój cukrzycy typu 2.....	66
7.3.2. Wpływ metabolitów z grupy kwasów tłuszczowych na rozwój cukrzycy typu 2 .	67
7.3.3. Wpływ metabolitów z grupy aminokwasów na rozwój cukrzycy typu 2	69
8. Wnioski	72
9. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską	73
9.1. The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step.	73
9.2. A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance	95

9.3. Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes	111
10. Streszczenie	130
11. Summary	132
12. Piśmiennictwo:	134
13. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacji.....	145
14. Zgoda Komisji Bioetycznej	168

1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

Praca przeglądowa:

Patrycja Mojsak, Fernanda Rey–Stolle, Ewa Parfieniuk, Adam Kretowski, Michal Ciborowski: *The role of gut microbiota (GM) and GM–related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM–related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2020: 191, Article ID 113617, MEiN: 100, IF: 3.935.

Prace oryginalne:

Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska–Patruno, Paulina Samczuk, Fernanda Rey–Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michal Ciborowski: *A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC–MS–based plasma metabolome of patients with and without PROX1–genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance*, Current Issues in Molecular Biology 2021: 29; 43 (2): 513–528, MEiN: 70, IF: 2.976.

Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michal Ciborowski: *Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes*, Frontiers in Molecular Biosciences 2022: 9:982672, MEiN: 140, IF: 6.113.

2. Zestawienie publikacji doktoranta

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MNiSW
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	3	13,024	310
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	14	48,05	828
Streszczenia zjazdowe	14	–	–
Razem	31	60,35	1138

3. Wykaz stosowanych skrótów

AAAs	aminokwasy aromatyczne (z ang. <i>aromatic amino acids</i>)
AAs	aminokwasy (z ang. <i>amino acids</i>)
ACN	acetonitryl
Ala	alanina
ANOVA	analiza wariancji (z ang. <i>analysis of variance</i>)
BAAs	kwasy żółciowe (z ang. <i>bile acids</i>)
BCAA	aminokwasy rozgałęzione (z ang. <i>branched chain amino acids</i>)
BCFAs	rozgałęzione kwasy tłuszczowe (z ang. <i>branched chain fatty acids</i>)
BMI	wskaźnik masy ciała (z ang. <i>body mass index</i>)
BSTFA	<i>N,O</i> -bis (trimetylosililo) trifluoroacetamid
CARBs	węglowodany (z ang. <i>carbohydrates</i>)
Cre	kreatynina
CRY2	kryptochromowy regulator dobowy 2 (z ang. <i>Cryptochrome Circadian Regulator 2</i>)
<i>CYP7A1</i>	7 α -hydroksylaza cholesterolu
EDTA	kwask wersenowy (z ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EtOH	etanol
FAMES	estry metylowe kwasów tłuszczowych (z ang. <i>fatty acid methyl esters</i>)
FAs	kwasy tłuszczowe (z ang. <i>fatty acids</i>)
FC	krotność zmiany (z ang. <i>fold change</i>)
FG	stężenie glukozy na czczo (z ang. <i>fasting glucose</i>)
FGF	czynnika wzrostu fibroblastów (z ang. <i>fibroblast growth factor</i>)
Fruc	fruktoza
ft2DM_T1	grupa pacjentów w stanie przedcukrzycowym, u których po pięciu latach obserwacji rozwinęła się cukrzyca typu 2
FXR	receptor jądrowy (z ang. <i>farnesoid X receptor</i>)
Gal	galaktoza
GC-MS	chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (z ang. <i>gas chromatography with mass spectrometry</i>)
GIPR	zależny od glukozy polipeptydowy receptor insulinotropowy (z ang. <i>glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor</i>)
Gln	glutamina

GLP-1	glukagonopodobny peptyd
Glu	kwask glutaminowy
Gly	glicyna
GM	mikroflora jelitowa (z ang. <i>gut microbiota</i>)
Gpbar1	receptor błonowy kwasów żółciowych (z ang. <i>G-protein-coupled bile acid receptor</i>)
GWAS	badanie asocjacyjne całego genomu (z ang. <i>genome wide association study</i>)
HbA1c	hemoglobina glikowana
HCA	hierarchiczna analiza klastrow (z ang. <i>hierarchical cluster analysis</i>)
HDL	lipoproteiny o wysokiej gęstości (z ang. <i>high-density lipoprotein</i>)
His	histydyna
HOMA-B	wskaźnik funkcji komórek β trzustki (z ang. <i>Homeostasis Model Assessment of β-cell function</i>)
HOMA-IR	wskaźnik insulinooporności (z ang. <i>Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance</i>)
HR	grupa wysokiego ryzyka (z ang. <i>high risk</i>)
ICA	analiza składowych niezależnych (z ang. <i>independent component analysis</i>)
IFG	nieprawidłowa glikemia na czczo (z ang. <i>impaired fasting glucose</i>)
IGT	nieprawidłowa tolerancja glukozy (z ang. <i>impaired glucose tolerance</i>)
Ile	izoleucyna
IPA	kwask indolo-3-propionowy
IS	wzorzec wewnętrzny (z ang. <i>internal standard</i>)
isoProp	izopropanol
LC-MS	chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (z ang. <i>liquid chromatography with mass spectrometry</i>)
LDL	lipoproteiny o niskiej gęstości (z ang. <i>low-density lipoprotein</i>)
Leu	leucyna
LPS	lipopolisacharyd
LR	grupa niskiego ryzyka (z ang. <i>low risk</i>)
Lys	lizyna

MANOVA	analiza wielowymiarowa wariancji (z ang. <i>multivariate analysis of variance</i>)
MDMs	metabolity związane z florą jelitową (z ang. <i>microbiota dependent metabolites</i>)
MeOH	metanol
MeOx	metoksymacja
Met	metionina
MSTFA	<i>N,O</i> -metyl (trimetylsilyl) trifluoroacetamid
NF- κ B	kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny (z ang. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated β cells</i>)
NW	posiłek normowęglowodanowy
OA	kwas oleinowy (z ang. <i>oleic acid</i>)
OGTT	doustny test obciążenia glukozą (z ang. <i>oral glucose tolerance test</i>)
OPLS-DA	analiza dyskryminacyjna zmiennych ortogonalnych najmniejszych kwadratów (z ang. <i>Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>)
OrgAs	kwasy organiczne (z ang. <i>organic acids</i>)
Orn	ornityna
PA	kwas palmitynowy (z ang. <i>palmitic acid</i>)
PCA	analiza składowych głównych (z ang. <i>principal component analysis</i>)
PERK	białko retikulum endoplazmatycznego (z ang. <i>protein kinase RNA-like ER kinase</i>)
PreDiab_T1	grupa pacjentów w stanie przedcukrzycowym, u których po pięciu latach nie rozwinęła się cukrzyca typu 2
PreDiab_T2	grupa pacjentów w stanie przedcukrzycowym, u których po pięciu latach utrzymał się ten stan
Pro	prolina
PROX1	białko homeoboksove prospero 1 (z ang. <i>prospero homeobox 1</i>)
PTD	Polskie Towarzystwo Diabetologiczne
PYY	peptyd YY
QCs	próbki kontrolne (z ang. <i>quality control</i>)
RI	wskaźnik retencji (z ang. <i>retention index</i>)

ROC	analiza oceny jakości klasyfikatora (z ang. <i>receiver operating characteristic</i>)
RSD	względne odchylenie standardowe (z ang. <i>relative standard deviation</i>)
RT	temperatura pokojowa (z ang. <i>room temperature</i>)
SA	kwasy stearynowe (z ang. <i>stearic acid</i>)
SCFAs	krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (z ang. <i>short chain fatty acids</i>)
SNP	polimorfizm pojedynczego nuklotydu (z ang. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SVM	maszyna wektorów nośnych (z ang. <i>support vector machine</i>)
T2DM	cukrzyca typu 2 (z ang. <i>type 2 diabetes mellitus</i>)
T2DM_T2	grupa pacjentów, u których po pięciu latach rozwinęła się cukrzyca typu 2
TCF7L2	czynnik transkrypcyjny 7-like 2 (z ang. <i>transcription factor 7 like 2</i>)
TGR5	receptor błony komórkowej
Thr	treonina
TI	intensywność całkowita (z ang. <i>total intensity</i>)
TMA	trimetylamina
TMAO	N-tlenek trimetylaminy
TMCS	trimetylochlorosilan
TMS	grupa trimetylosililowa
TRL4	receptor toll-podobny 4 (z ang. <i>toll-like receptor 4</i>)
Trp	tryptofan
Tyr	tyrozyna
Val	walina
VIP	znaczenie zmiennej w projekcji (z ang. <i>variable importance in projection</i>)
WW	posiłek wysokowęglowodanowy
α -HBA	kwasy alfa-hydroksymasłowe (z ang. <i>alpha-hydroxybutyrate</i>)
5-HT	5-hydroksytryptamina

4. Wstęp

4.1. Cukrzyca typu 2

Cukrzycę typu 2 (z ang. *type 2 diabetes mellitus*, T2DM) uważa się za jedną z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. T2DM jest zaburzeniem metabolicznym charakteryzującym się występowaniem nieprawidłowo wysokiego poziomu glukozy we krwi¹. U osób z T2DM dochodzi do zaburzenia równowagi między ilością insuliny wydzielanej przez komórki β wysp trzustkowych, a zapotrzebowaniem na ten hormon wynikającym z indywidualnie zróżnicowanej insulinooporności². Liczba osób z T2DM w wieku od 20 do 79 lat wzrosła w ciągu ostatnich 10 lat o 62% (z 285 milionów do 463 milionów)³. Szacuje się, że liczba osób chorych na T2DM na całym świecie do 2035 roku przekroczy 592 miliony⁴, natomiast do 2045 roku może wynieść nawet 700 milionów¹.

T2DM może przez wiele lat przebiegać bezobjawowo, a obecnie jedynie pięćdziesiąt procent osób cierpiących na T2DM jest zdiagnozowanych³. Jest to szczególnie groźne z uwagi na to, że zbyt późno wykryta lub źle kontrolowana T2DM prowadzi do wystąpienia wielu powikłań mikro- i makronaczyniowych, które mogą wiązać się z uszkodzeniem licznych narządów wewnętrznych, a niekiedy prowadzić nawet do śmierci⁵. W obliczu stale narastającej liczby pacjentów z T2DM, zasadne jest poszukiwanie nowych rozwiązań umożliwiających lepsze poznanie mechanizmów prowadzących do powstania zaburzeń metabolicznych związanych z rozwojem tej choroby⁶. W znacznym stopniu mogłoby się to przyczynić do opracowania strategii pozwalających na jak najwcześniejszą diagnostykę zaburzeń metabolicznych i T2DM.

Pomimo znacznego postępu medycyny oraz zwiększonego dostępu do technik diagnostycznych, wczesne wykrycie T2DM jest nadal utrudnione, co uniemożliwia jej skuteczne kontrolowanie oraz wdrożenie odpowiedniego leczenia⁷. Dlatego też podejmuje się wielokierunkowe działania mające na celu poszukiwanie nowych rozwiązań, które mogłyby usprawnić wczesną diagnostykę T2DM. W ostatnim czasie dużo uwagi poświęca się badaniom metabolomicznym, które wykorzystuje się między innymi do oceny wpływu różnych czynników odpowiedzialnych za rozwój tej choroby. Należą do nich głównie czynniki środowiskowe, ale także predyspozycje genetyczne⁸. Te ostatnie są jednymi z istotnych niemodyfikowalnych czynników ryzyka rozwoju T2DM. Wśród czynników środowiskowych (modyfikowalnych) wyróżnić można siedzący tryb życia i dietę, a także związaną z nimi styl życia oraz otyłość. Dodatkowo czynniki ryzyka rozwoju T2DM mogą stanowić kombinację

niezrównoważonej diety, siedzącego trybu życia oraz czynników genetycznych, które to również mogą wzajemnie ze sobą oddziaływać⁹. Według ostatnich doniesień literaturowych znaczącą rolę w etiologii T2DM odgrywa również mikroflora jelitowa (z ang. *gut microbiota*, GM)¹⁰, której skład może być zaburzony przez wyżej wymienione czynniki środowiskowe czy też genetyczne.

4.2. Stan przedcukrzycowy

Stan przedcukrzycowy może charakteryzować się nieprawidłową glikemią na czczo (z ang. *impaired fasting glucose*, IFG) i/lub zaburzoną tolerancją glukozy (z ang. *impaired glucose tolerance*, IGT). Według wytycznych PTD (Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego), IFG diagnozuje się na podstawie stężenia glukozy na czczo ≥ 100 mg/dl (5.6 mmol/l), ale < 126 mg/dl (7.0 mmol/l), a IGT jako stężenie glukozy w 120 minucie po doustnym obciążeniu 75 g glukozy w doustnym teście obciążenia glukozą (OGTT, z ang. *oral glucose tolerance*) ≥ 140 mg/dl (7.8 mmol/l), ale < 200 mg/dl (11.1 mmol/l)¹¹. Pomimo, iż zarówno nieprawidłowa glikemia na czczo, jak i nietolerancja glukozy wynikają z insulinooporności, różnią się lokalizacją tego zjawiska. U pacjentów z izolowaną IFG przeważa insulinooporność wątrobowa, z zachowaną prawidłową insulinowrażliwością mięśni szkieletowych. Z kolei pacjenci z izolowaną IGT mają prawidłową lub nieznacznie zmniejszoną wrażliwość hepatocytów na insulinę oraz umiarkowaną lub ciężką insulinooporność mięśni szkieletowych. U pacjentów z jednoczesną IFG i IGT stwierdza się insulinooporność zarówno mięśni szkieletowych, jak i wątroby. Z czasem zaburzenie czynności komórek β trzustki postępuje, prowadząc do rozwoju T2DM¹².

Szacuje się, że u 5–10% osób z IFG i/lub IGT w ciągu roku rozwinię się T2DM¹³. Występowanie stanu przedcukrzycowego niesie ze sobą ryzyko rozwoju T2DM, a jednocześnie jest sygnałem do podjęcia działań profilaktycznych, które mogą pozwolić na zahamowanie rozwoju choroby. Poprzez zmianę trybu życia (np. poprawę nawyków żywieniowych, aktywność fizyczną) czy też suplementację probiotykami można opóźnić proces rozwoju T2DM, a nawet cofnąć stan przedcukrzycowy¹⁴. Określone mikroorganizmy probiotyczne poprzez poprawę wrażliwości na insulinę i pozytywny wpływ na poziom glukozy we krwi mogą zapobiec lub opóźnić rozwój T2DM¹⁵.

4.3. Wpływ czynników genetycznych oraz diety na rozwój cukrzycy typu 2

Badania nad genetycznymi predyspozycjami do rozwoju T2DM mają nie tylko duże znaczenie naukowe, ale także w coraz większym stopniu prognostyczne, profilaktyczne

i terapeutyczne¹⁶. Znanych jest kilkanaście genów, m.in. *GIPR* (z ang. *Gastric Inhibitory Polypeptide Receptor*), *TCF7L2* (z ang. *Transcription Factor 7 Like 2*), *CRY2* (z ang. *Cryptochrome Circadian Regulator 2*) czy białko homeoboksose prospero 1 (z ang. *Prospero homeobox 1, PROX1*), których prawidłowe funkcjonowanie powiązane jest z regulacją poziomu glukozy i insuliny, akumulacją tkanki tłuszczowej, zaburzeniami metabolizmu lipidów oraz insulinoopornością, a zatem również ze skłonnością do zapadania na T2DM¹⁷. Powiązanie tych genów z występowaniem T2DM jest dobrze udokumentowane, jednak nie zostały w pełni poznane mechanizmy związane z funkcjonowaniem tych genów, które są odpowiedzialne za powstanie wczesnych zaburzeń prowadzących do rozwoju T2DM¹⁸.

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w genie *PROX1* jest silnym genetycznym czynnikiem podatności na upośledzenie funkcji komórek β i rozwój T2DM. Badanie Genome Wide Association Studies (GWAS) pozwoliło na identyfikację ponad 100 loci polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (z ang. *single nucleotide polymorphism, SNP*) zaangażowanych w występowanie T2DM¹⁷. Już w 2005 roku Harvey i wsp.¹⁹ badali model zwierzęcy, gdzie heterozygotyczne dorosłe myszy obciążone polimorfizmem w genie *PROX1* stały się otyłe i miały wyższe poziomy insuliny w surowicy oraz były podatne na akumulację lipidów w wątrobie. W innym badaniu potwierdzono, że osoby posiadające ten wariant miały upośledzoną tolerancję glukozy i zwiększoną ilość tłuszczu trzewnego w porównaniu do osób bez tego polimorfizmu. Mimo licznych badań nad zależnością pomiędzy polimorfizmem w genie *PROX1* a T2DM jego rola nie została do tej pory w pełni wyjaśniona, co może świadczyć o bardziej złożonym wpływie genu *PROX1* na procesy towarzyszące rozwojowi T2DM²⁰. Tym samym wydało się uzasadnione przeprowadzenie kolejnych badań próbujących te zależności wyjaśnić.

Gwałtowny wzrost częstości występowania T2DM w ciągu ostatnich kilku dekad nie może być związany tylko z predyspozycjami genetycznymi. Potwierdzono, że nieodpowiednia dieta może być czynnikiem przyspieszającym określone zaburzenia metaboliczne u osób podatnych na T2DM, również z przyczyn genetycznych⁷. Jak dotąd niewiele było badań potwierdzających znaczenie interakcji gen–dieta w rozwoju T2DM^{8,21,22}. Analizy tych interakcji nie tylko w kontekście poszczególnych składników żywieniowych, ale także diety rozpatrywanej pod kątem makroelementów, może pomóc zaprojektować oraz wdrożyć zindywidualizowane zalecenia dietetyczne dla osób z grupy ryzyka. W jednym z badań²² oceniono, przy pomocy chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (z ang. *liquid chromatography with mass spectrometry, LC–MS*) wpływ polimorfizmu w genie *PROX1*

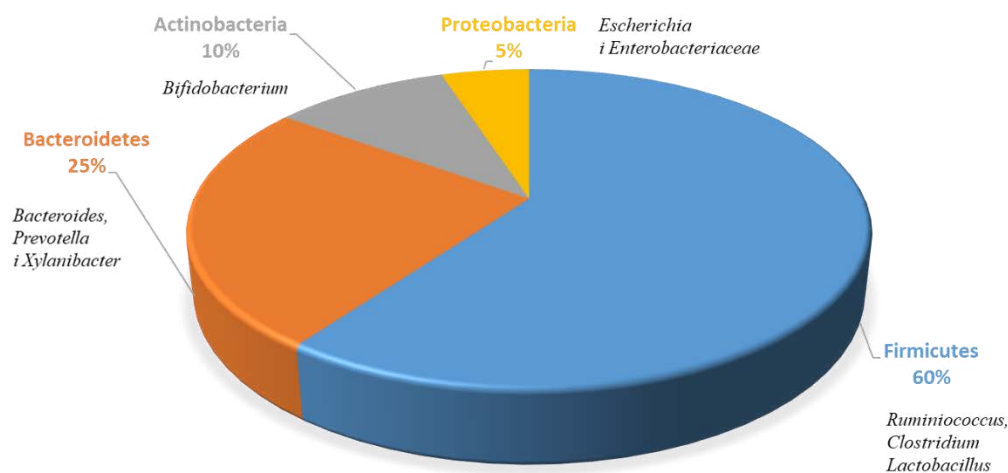
na zmiany w poziomie metabolitów w osoczu zdrowych mężczyzn po posiłku wysokowęglowodanowym (WW) i normowęglowodanowym (NW). Badania te wykazały zmieniony poposiłkowy profil metabolitów u nosicieli genotypu ryzyka ze szczególnym uwzględnieniem metabolitów związanych ze stanem zapalnym, stresem oksydacyjnym, metabolizmem lipidów i kwasów tłuszczowych (z ang. *fatty acids*, FAs). W pracy pt: „A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC–MS–based plasma metabolome of patients with and without PROX1–genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” wchodzącej w skład cyklu publikacji tworzących niniejszą rozprawę zbadano zmiany w profilu metabolitów osocza po posiłku NW i WW na tej samej grupie pacjentów, ale przy użyciu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (z ang. *gas chromatography with mass spectrometry*, GC–MS), która pozwala na pomiar metabolitów należących do innych klas niż wykorzystana w poprzedniej publikacji technika LC-MS. Otrzymane wyniki pozwoliły na identyfikację szlaków, które zmieniają się w zależności od ilości spożytych węglowodanów (posiłek NW lub WW), prowadząc do określonych odpowiedzi metabolicznych, związanych z ryzykiem przyspieszonego rozwoju T2DM. Dodatkowo, możliwe było przeprowadzenie kompleksowej analizy szlaków w oparciu o wyniki otrzymane przy użyciu obu platform analitycznych. Badania te dostarczyły nowych informacji odnośnie interakcji gen–dieta, które mogą być przyczyną rozwoju T2DM. Jest to szczególnie ważne, gdyż w badaniu wzięli udział zdrowi nosiciele alleli ryzyka w genie PROX1.

4.4. Zaburzenia związane z mikrobiomem jelitowym a rozwój cukrzycy typu 2

Mikrobiom jelitowy, którego skład zależy jest m.in. od czynników genetycznych i środowiskowych, ma ogromny wpływ na rozwój T2DM. Badania przeprowadzone na wolnych od drobnoustrojów myszach karmionych dietą wysokotłuszczową i standardową dietą wykazały, że profile metaboliczne osocza zależą głównie od różnorodności i składu drobnoustrojów, niezależnie od rodzaju diety²³. Dieta uboga w błonnik skutkuje zmniejszoną różnorodnością mikrobiomu, a bogata w błonnik zwiększa różnorodność gatunków bytujących w jelicie i ilość produkowanych przez bakterie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (z ang. *short chain fatty acids*, SCFAs) niezbędnych dla właściwego funkcjonowania jelit. Uważa się, że niska zawartość błonnika, wysoka zawartość białka i tłuszczu w pokarmie, a także niezdrowa, wysoko przetworzona żywność mogą wywołać dysbiozę. Dieta wysokotłuszczowa może zwiększyć odsetek gatunków bakterii gram–ujemnych w mikroflorze jelitowej²⁴. Liposacharydy (LPS), główny składnik zewnętrznej błony komórkowej bakterii

gram–ujemnych, może występować w wysokich stężeniach i być wchłaniany przez jelita²⁵. Ponadto, LPS stymuluje nieaktywny układ odpornościowy, wiążąc się z receptorem toll–podobnym (z ang. *toll–like receptor*, TLR), aktywując komórki odpornościowe w celu uwolnienia cytokin zapalnych, co sprzyja insulinooporności spowodowanej odpowiedzią zapalną wywołaną przez endotoksyny²⁶. Innym potencjalnym mechanizmem związanym z homeostazą ekosystemu jelitowego jest układ endokannabinoidowy. LPS oddziałuje z receptorami endokannabinoidowymi, modulując przepuszczalność jelit i translokację LPS, zwiększając poziom krążącego LPS i indukując metaboliczną endotoksemię²⁷.

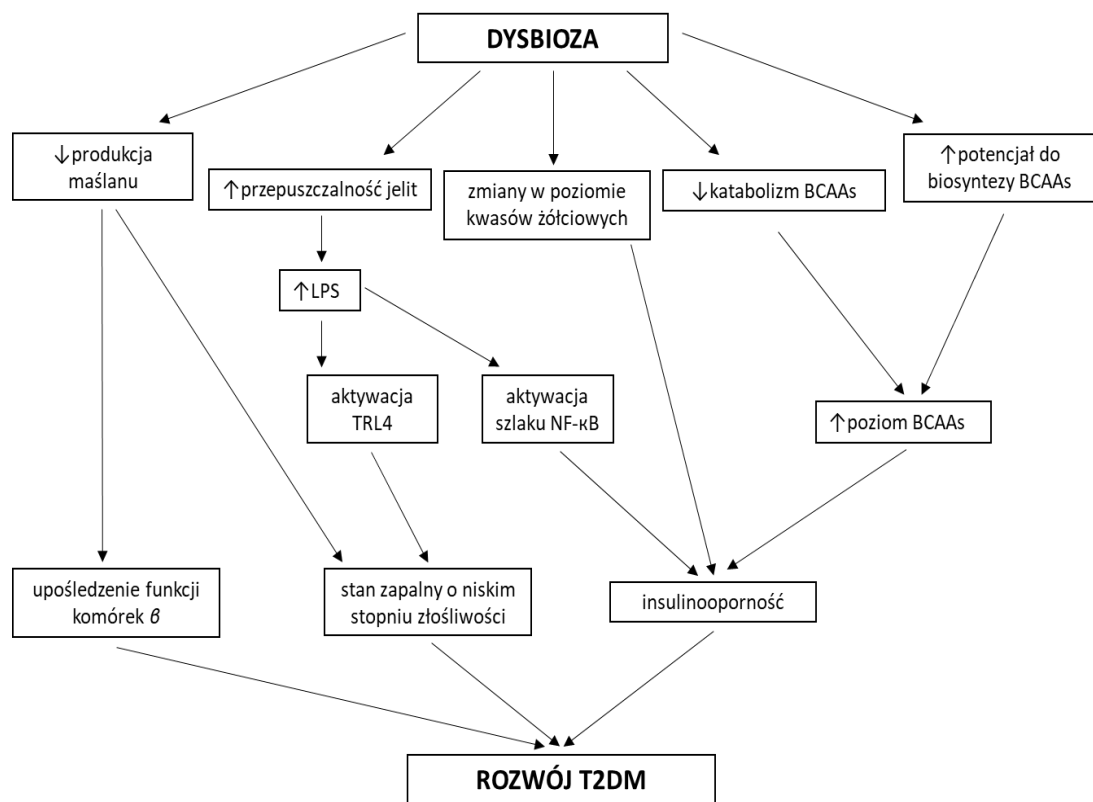
GM jest dużą populacją mikroorganizmów żyjących w przewodzie pokarmowym człowieka⁶. Wśród nich wyróżnia się około 1000 gatunków z ponad 400 różnych rodzajów^{6,10}, należących głównie do pięciu typów (**Rycina 1**): *Firmicutes*, które stanowią 60–80% (z których najważniejsze to *Ruminiococcus*, *Clostridium* i *Lactobacillus*); *Bacteroidetes* stanowiące 20–30% (obejmujące głównie *Bacteroides*, *Prevotella* i *Xylanibacter*) oraz *Actinobacteria*, które stanowią około 10% (z przewagą rodzaju *Bifidobacterium*), natomiast *Proteobacteria* (takie jak *Escherichia* i *Enterobacteriaceae*) są jeszcze rzadziej spotykane^{28,29}.



Rycina 1. Główne gatunki bakterii wchodzące w skład mikrobiomu jelitowego człowieka.

W związku z tym, iż mikroorganizmy te mogą bezpośrednio wpływać na stan zdrowia, w ostatnim czasie cieszą się one coraz większym zainteresowaniem naukowców³⁰. Przeprowadzono wiele badań, na podstawie których potwierdzono, że zaburzenia składu i funkcji GM są obserwowane w patogenezie takich chorób metabolicznych, jak otyłość^{10,31-33}

czy T2DM^{10,31,34-36} (**Rycina 2**). U osób chorych na T2DM potwierdzono zmieniony skład GM w porównaniu ze składem GM osób zdrowych. W pracy przeglądowej pt.: „The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step”, wchodzącej w skład cyklu publikacji tworzących niniejszą rozprawę, przedstawiono aktualny stan wiedzy na ten temat. Informacje zebrane na podstawie przeglądu literaturowego potwierdziły, że GM mogą korzystnie lub negatywnie wpływać na występowanie chorób metabolicznych¹⁰.



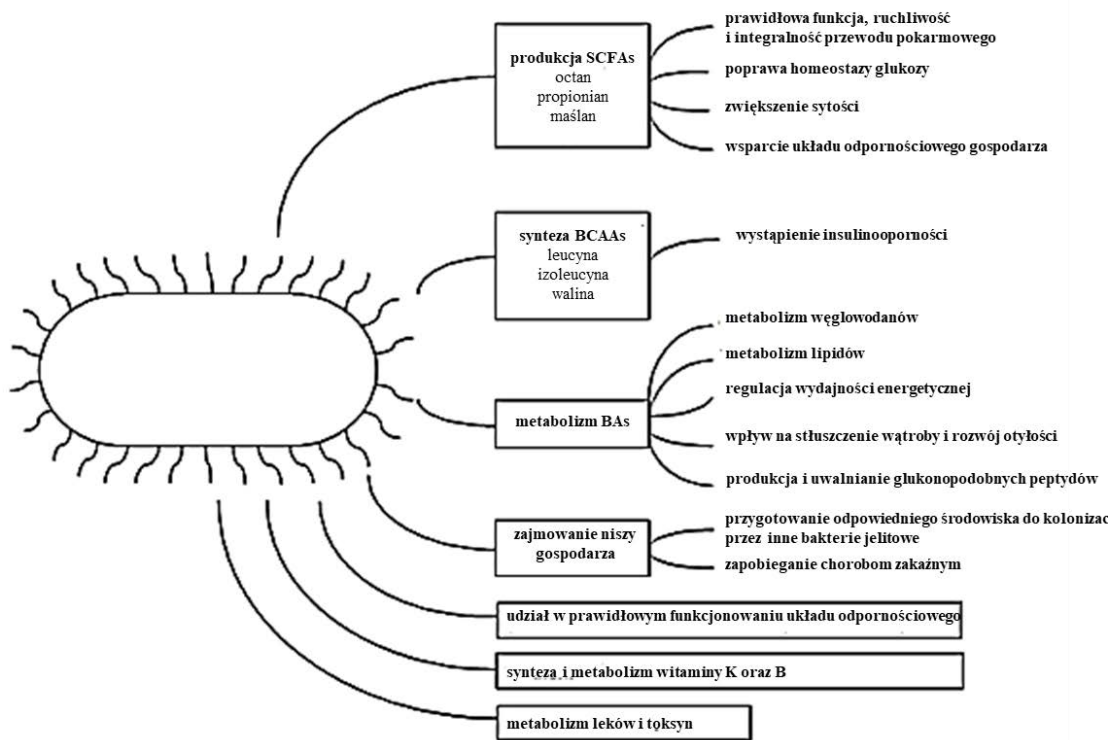
Rycina 2. Wpływ zaburzeń składu GM na rozwój T2DM (BCAAs – aminokwasy rozgałęzione; LPS – liposacharydy; TRL4 – receptor toll-podobny 4; NF-κB – kompleks białkowy działający jako czynnik transkrypcyjny).

Na podstawie danych literaturowych przedstawiających spójne wyniki badań na modelach zwierzęcych oraz u ludzi, można stwierdzić, że rodziny *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia* i *Roseburia* są negatywnie skorelowane, podczas gdy rodziny *Ruminococcus*, *Fusobacterium* i *Blautia* są pozytywnie związane z rozwojem

T2DM. W badaniach przeprowadzonych na ludziach przez Larsen i wsp.²⁵ oraz Karlsson i wsp.³⁷ potwierdzono, że u pacjentów ze zdiagnozowaną T2DM zaobserwowano zmniejszenie liczebności drobnoustrojów wytwarzających kwas masłowy, takich jak: *Roseburia*, *Faecalibacterium* i *Eubacterium* oraz zwiększenie liczebności *Clostridium* i *Lactobacillus*. Sedighi i wsp. zaobserwowali, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* występowały liczniej u osób zdrowych w porównaniu z pacjentami z T2DM, ale nie zaobserwowali istotnej różnicy w liczbie bakterii z rodzaju *Prevotella* między osobami chorymi na T2DM, a zdrowymi³⁸. Szczegółowe informacje dotyczące przeglądu literaturowego zawarte są w publikacji¹⁰ będącej częścią rozprawy.

4.4.1. Wpływ mikrobiomu na produkcję oraz transformację metabolitów

Jak wspomniano powyżej, zaburzenia składu mikrobiomu jelitowego mogą być związane z rozwojem chorób metabolicznych³⁹. Dodatkowo należy podkreślić, że GM jest odpowiedzialna za produkcję lub transformację endogennych małych cząsteczek (z ang. *microbiota dependent metabolites*, MDMs), które regulują interakcje między gospodarzem, a mikroflorą jelitową (**Rycina 3**). Lista takich metabolitów obejmuje głównie SCFAs⁴⁰, rozgałęzione kwasy tłuszczowe (z ang. *branched chain fatty acids*, BCFAs)⁴¹, aminokwasy aromatyczne (z ang. *aromatic amino acids*, AAAs)⁴², aminokwasy rozgałęzione (z ang. *branched chain amino acids*, BCAAs)⁴³, kwasy żółciowe (z ang. *bile acids*, BAs)⁴⁴ oraz inne⁴⁵. Produkcja SCFAs może mieć wpływ na prawidłowe funkcjonowanie układu pokarmowego, ale także poprawę homeostazy glukozy. Synteza BCAAs może mieć wpływ na wystąpienie insulinooporności, a BAs mogą mieć wpływ na metabolizm wielu związków⁴⁶ (**Rycina 3**).



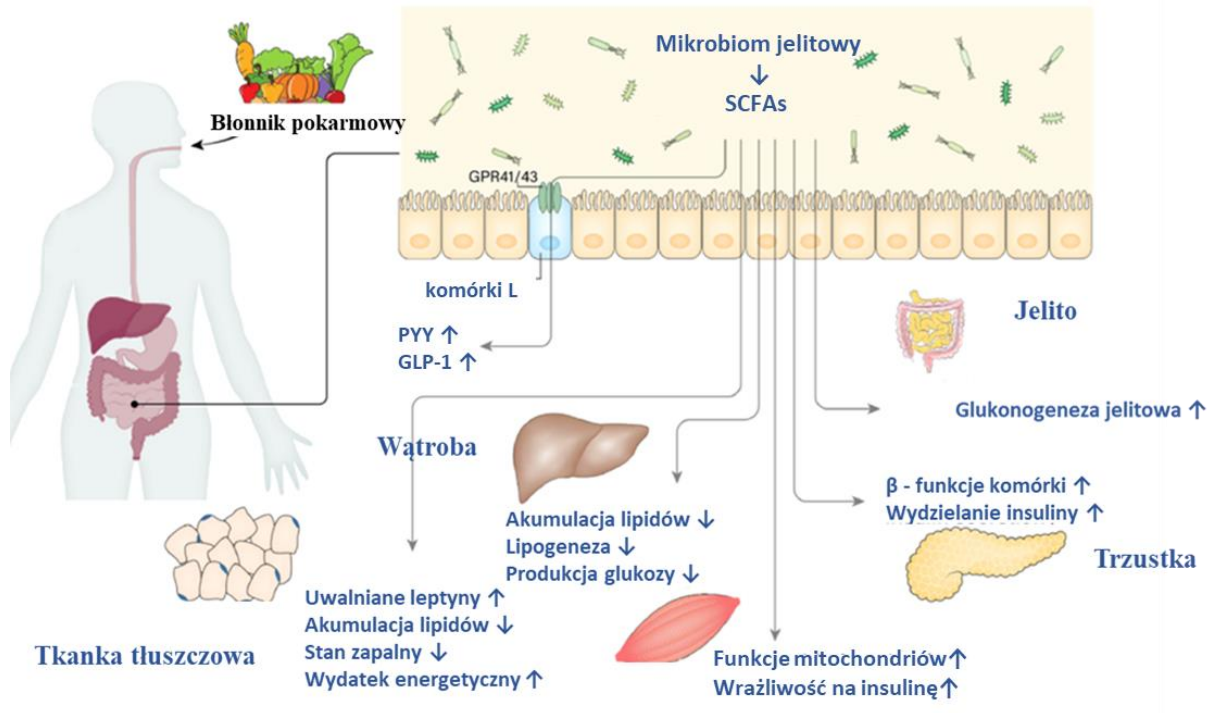
Rycina 3. Udział mikrobiomu jelitowego w utrzymaniu homeostazy gospodarza.

4.4.1.1. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe pochodzenia mikrobiologicznego

SCFAs to klasa najlepiej przebadanych metabolitów związanych z GM¹⁰. Metabolity te powstają w okrężnicy jako końcowe produkty fermentacji złożonych węglowodanów (z ang. *carbohydrates*, CARBs) oraz skrobi czy też błonnika⁴⁷. Definiuje się je jako FAs o mniej niż sześciu atomach węgla, w tym kwas mrówkowy, kwas octowy, kwas propionowy, kwas masłowy i kwas walerianowy. Metabolity te wspomagają procesy regeneracji, uszczelniają ścianę jelit, utrzymują prawidłowe pH. Wykazują również silne działanie przeciwzapalne, hamując aktywność mediatorów stanu zapalnego⁴⁸. Kwas octowy po wchłonięciu do krwiobiegu dociera do tkanek obwodowych, gdzie jest wykorzystywany przez komórki do syntezy FAs i cholesterolu⁴⁰. Metabolit ten jest wytwarzany przez większość bakterii jelitowych, takich jak *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus* i *Streptococcus*⁴⁹. Kwas propionowy jest wytwarzany przez bakterie jelitowe takie jak *Akkermansia*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* i *Ruminococcus* poprzez szlak bursztynianowy, akrylanowy i propanodiolowy. Wchłaniany przez krążenie wrotne, bierze udział w lipogenezie i glukoneogenezie, pełniąc ważną funkcję w utrzymaniu równowagi energetycznej organizmu⁵⁰. Kwas masłowy stanowi źródło energii dla kolonocytów, zwiększa termogenezę oraz utlenianie FAs, działa również przeciwzapalnie.

W wielu badaniach wykazano, że zwiększenie stężenia kwasu masłowego poprawia wrażliwość na insulinę⁵¹. Wytwarzany jest on przez takie gatunki bakterii jak: *Roseburia*, *Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Eubacterium hallii*, *Coprococcus eutactus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Anaerostipes caccae* i *Coprococcus catus*⁵² poprzez szlaki transferazy butyrylo–koenzymu A, fosfotransbutyrylasy czy kinazy maślanowej⁵³.

W literaturze można znaleźć wiele doniesień opisujących związek między poziomem SCFAs, a rozwojem T2DM. Zostały one przedstawione w artykule przeglądowym będącym częścią rozprawy¹⁰. Przeprowadzone badania podkreślają korzystny wpływ SCFA na uwalnianie glukagonopodobnego peptydu 1 (GLP-1) i peptydu YY (PYY) z komórek endokrynych, a tym samym na regulację stężenia glukozy oraz na poprawę wrażliwości na insulinę. Dodatkowo w wątrobie SCFAs mogą hamować lipogenezę, produkcję glukozy i akumulację lipidów. W trzustce metabolity te pobudzają komórki β do wydzielania insuliny. SCFAs aktywują również glukoneogenezę jelitową oraz poprawiają wrażliwość mięśni na insulinę i funkcję mitochondriów (**Rycina 4**)⁴⁶. Na podstawie dokonanego przeglądu literaturowego można pozwolić sobie również na stwierdzenie, że opublikowane dotychczas wyniki są niespójne. Sato i wsp. odnotowali ujemny związek między poziomem SCFAs a T2DM; gdyż w ich badaniu całkowite stężenie SCFAs w kale u pacjentów z T2DM było istotnie niższe niż w grupie kontrolnej⁵⁴. Natomiast Adachi i wsp. nie znaleźli istotnych statystycznie różnic w całkowitym stężeniu SCFAs w kale między grupą kontrolną, a pacjentami z T2DM. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę poszczególne SCFAs, pacjenci z T2DM (w porównaniu z grupą kontrolną) mieli niższy poziom kwasu propionowego, walerianowego i masłowego oraz wyższy poziom bursztynianu w próbkach kału⁵⁵. Schwiertz i wsp. zaobserwowali, że całkowite stężenie SCFAs w próbkach kału otyłych ochotników było o ponad 20% wyższe niż u szczupłych ochotników. Największy wzrost zaobserwowano dla kwasu propionowego, a następnie dla masłowego⁵⁶.



Rycina 4. Pochodzenie SCFAs i ich wpływ na rozwój T2DM (zmodyfikowano na podstawie Du i wsp.⁴⁶).

W wyniku fermentacji błonnika pokarmowego przez bakterie jelitowe uwalniane są SCFAs. SCFAs mogą promować uwalnianie peptydu YY (PYY) i glukagonopodobnego peptydu (GLP-1) z enteroendokrynych komórek L oraz uwalnianie leptyny (hormonu sytości) z tkanki tłuszczowej. Ponadto wzrostowi poziomu SCFAs, towarzyszy wzrost wydatku energetycznego w tkance tłuszczowej oraz zmniejszenie gromadzenia się lipidów. W wątrobie SCFAs mogą hamować lipogenezę, produkcję glukozy i akumulację lipidów. W trzustce SCFAs pobudzają komórki β i promują wydzielanie insuliny. Poza tym znane są doniesienia wskazujące, iż SCFAs aktywują glukoneogenezę jelitową oraz poprawiają wrażliwość mięśni na insulinę oraz funkcje mitochondriów.

4.4.1.2. Aminokwasy pochodzenia mikrobiologicznego

Niektóre z aminokwasów (z ang. *amino acids*, AAs) uwalnianych przez bakterie jelitowe mogą służyć również jako prekursorzy do syntezy SCFAs, przyczyniając się tym samym do rozwoju chorób metabolicznych⁵⁷. FAs o rozgałęzionych łańcuchach, takie jak izomaślan, 2-metylomaślan i izo-walerianian, mogą również pochodzić z fermentacji BCAAs⁵⁸. Glicyna (Gly), treonina (Thr), kwas glutaminowy (Glu) i ornityna (Orn) mogą być metabolizowane przez bakterie beztlenowe do kwasu octowego. Lizyna (Lys), Glu i Thr

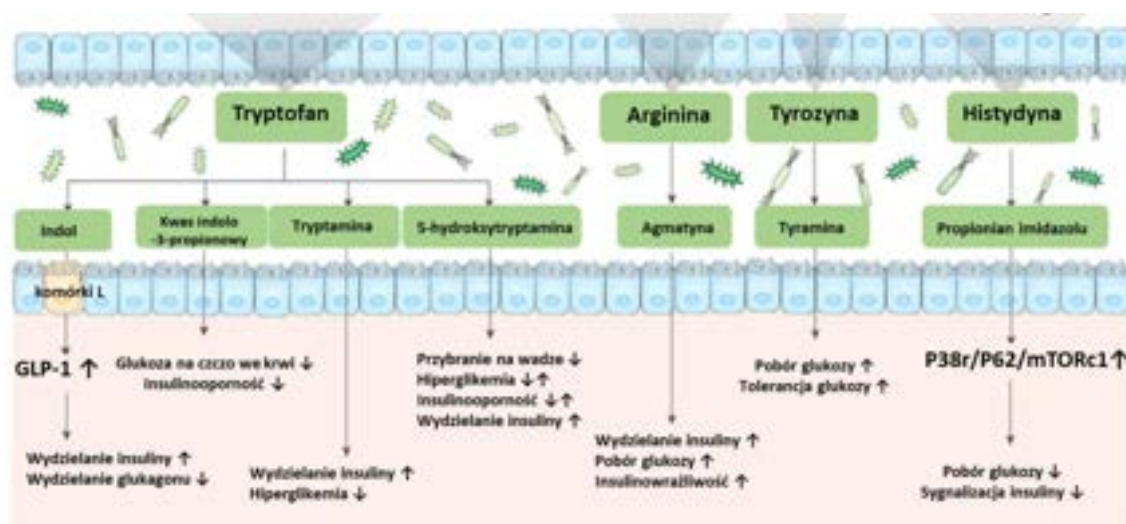
są substratami do produkcji kwasu masłowego. Ponadto, Thr może być wykorzystana do syntezy kwasu propionowego⁵⁹. Alanina (Ala), leucyna (Leu), isoleucyna (Ile), walina (Val) i histydyna (His) są wykorzystywane jako donory wodoru w reakcjach metabolicznych. Natomiast Gly, prolina (Pro), Orn i arginina mają tendencję do działania jako akceptory⁶⁰.

Liczba bakterii fermentujących AAs w jelicie grubym jest bardzo duża, może sięgać nawet 10^{11} na gram suchej masy kałowej⁶¹. *Clostridium bif fermentans* jest dominującą bakterią wykorzystującą Lys lub Pro⁶². Bakterie *Peptostreptococcus* mają duży udział w rozkładzie Glu lub tryptofanu (Trp)⁶³. Trp jest metabolizowany przez bakterie jelitowe do indolu, kwasu indolo-3-propionowego (IPA), tryptaminy i 5-hydroksytryptaminy (**Rycina 5**). Tryptamina hamuje hiperglikemię wywołaną glukozą i wspomaga wydzielanie insuliny. 5-hydroksytryptamina może promować wydzielanie insuliny i hamować przyrost masy ciała, hiperglikemię i insulinooporność. Tyrozyna (Tyr) może ulec rozkładowi do tyraminy pod działaniem dekarboksylazy tyrozynowej drobnoustrojów jelitowych. Tyramina może również stymulować wychwyt glukozy i poprawiać tolerancję glukozy. Ponadto, propionian imidazolu może upośledzać tolerancję glukozy i sygnalizację insulinową⁴⁶.

Bakterie należące do *Clostridium* dominują w procesie fermentacji AAs w jelicie grubym człowieka. Jednak inne gatunki bakterii, takie jak *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Megasphaera elsdenii* i *Selenomonas ruminantium*, mogą być również istotne dla metabolizmu AAs w tej części ludzkiego przewodu pokarmowego⁶⁴. Według dostępnych danych potwierdzono, że GM może również syntetyzować *de novo* w przewodzie pokarmowym niektóre ACNs⁶¹. Argininę mogą wytwarzać *Bacteroides thetaiotaomicron* i *Fusobacterium varium*, Trp mogą wytwarzać *Streptococcus*, *Escherichia coli* i *Enterococcus* natomiast Tyr *Bacillus* i *Serratia*⁶⁴. Te przykłady potwierdzają ogromne znaczenie drobnoustrojów jelitowych w metabolizmie AAs, niezależnie od żywienia i fizjologii gospodarza.

Liczne badania na ludziach wykazały, że stężenia BCAAs i AAAs w próbkach biologicznych (osoczu, kale i moczu) są związane z opornością na insulinę. Na podstawie pomiaru ilości tych metabolitów można ocenić ryzyko rozwoju T2DM^{65,66}. Utlenianie BCAAs może zwiększać utlenianie FAs, a także odgrywać rolę w rozwoju otyłości. Chen i wsp. potwierdzili, że poziom BCAA (Val, Leu i Ile), AAAs (fenyloalaniny (Phe), Trp i Tyr), glukoneogennych AAs (Ala, Glu i glutaminy (Gln)) oraz innych AAs (Orn i Lys) w surowicy powiązany jest z ryzykiem rozwoju T2DM. Wysokie stężenia Val, Leu, Ile, Phe,

Tyr, Ala, Glu, Orn i Lys wiążą się ze zwiększonym ryzykiem, natomiast wysokie stężenie Gln ze zmniejszonym ryzykiem zachorowania na T2DM⁶⁷. Leu, Phe, Gln i Glu mogą indukować wydzielanie insuliny przez komórki β trzustki i powodować rozwój T2DM poprzez hiperinsulinemię, prowadząc do wyczerpania komórek β trzustki. Niektóre mechanizmy, takie jak stymulacja uwalniania glukagonu z komórek trzustki i zwiększenie transaminacji pirogronianu do Ala, silnego promotora glukoneogenezy, mogą wyjaśniać potencjalnie niekorzystną rolę Glu w ryzyku T2DM^{68,69}. W wielu badaniach, również kohortowych, opisano związek pomiędzy poziomem BCAAs w osoczu, a wystąpieniem T2DM^{66,70,71}. Podsumowując, metabolizm aminokwasów i glukozy są ze sobą ściśle powiązane. AAs stanowią główny rezerwuar do glukoneogenezy i wpływają na wydzielanie insuliny oraz glukagonu. Oba procesy ulegają zmianie na wczesnym etapie patogenezy T2DM, co sprawia, że niektóre AAs mogą być dobrymi predyktorami chorób metabolicznych.



Rycina 5. Wpływ AAs na rozwój T2DM (zmodyfikowano na podstawie Du i wsp.⁴⁶).

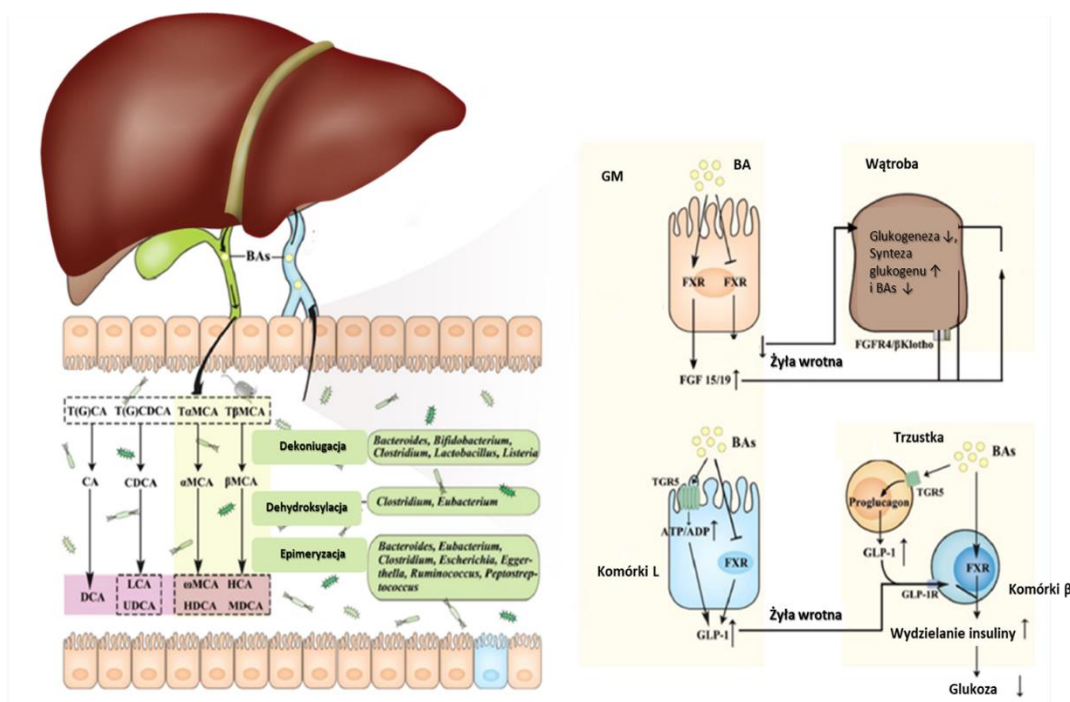
Pochodzący z pożywienia tryptofan jest metabolizowany przez bakterie jelitowe do indolu, kwasu indolo-3-propionowego (IPA), tryptaminy i 5-hydroktryptaminy (5-HT). Indol może stymulować jelitowe komórki L do wydzielania GLP-1, promując w ten sposób wydzielanie insuliny i hamowanie wydzielania glukagonu. IPA obniża poziom glukozy we krwi na czczo i poprawia oporność na insulinę. Tryptamina hamuje hiperglikemię wywołaną glukozą i wspomaga uwalnianie insuliny. 5-HT może promować wydzielanie insuliny i hamować przyrost masy ciała, hiperglikemię i insulinooporność. Metabolit ten wywołuje oporność na insulinę i zwiększa poziom glukozy we krwi. Arginina z pożywienia może być zamieniona przez GM na agmatynę. Agmatyna wspomaga uwalnianie insuliny i poprawia wychwyt glukozy

przez komórki oraz wrażliwość na insulinę. W wyniku działania dekarboksylazy tyrozynowej drobnoustrojów jelitowych Tyr może ulec rozkładowi do tyraminy. Tyramina może stymulować wychwyty glukozy i poprawiać tolerancję glukozy.

4.4.1.3. Kwasy żółciowe pochodzenia mikrobiologicznego

Kolejnym dowodem na udział flory zasiedlającej przewód pokarmowy w patogenezie insulinooporności i T2DM jest wpływ GM na metabolizm BAs i tworzenie wtórnych BAs (**Rycina 6**). Te z kolei, poprzez aktywację między innymi receptora jądrowego (z ang. *farnesoid X receptor*, FXR) i błonowego (z ang. *G-protein-coupled bile acid receptor*, Gpbar1 –TGR5), biorą udział w metabolizmie glukozy, lipidów oraz w regulacji wrażliwości na insulinę. Zaobserwowano, że pacjenci z T2DM mają obniżone stężenie wtórnych BAs⁷². Uważa się również, że duża zawartość tłuszczu w diecie skutkuje zwiększeniem liczebności bakterii gram-ujemnych we florze bakteryjnej przewodu pokarmowego. LPS, który jest integralnym składnikiem zewnętrznej błony komórkowej bakterii gram-ujemnych, indukuje stan zapalny. Przewlekła endotoksemia przyczynia się do wzrostu stężenia glukozy, triglicerydów oraz insulinooporności. Badania wykazały, że u pacjentów z T2DM obserwuje się podwyższone stężenie bakteryjnego LPS⁷³.

Bakterie takie jak *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* i rodzaj *Methanobrevibacter*, zwłaszcza niektóre *Clostridia*, w tym *C. scindens*, *C. hiranonis*, *C. hylemonae* (*Clostridium* klaster XVIa) i *C. sordelli* (*Clostridium* klaster XI) są zdolne do wytwarzania wtórnych BAs⁷³. W jednym z badań potwierdzono dodatnią korelację pomiędzy poziomem BAs, a typami bakterii *Clostridium*, *Parasutterella secunda*, *Turicibacter* sp. i ujemną korelację z *Acidovorax wohlfahrtii*, *Allobaculum stercoricanis*, *Anaerotruncus* sp., *Bacteroides uniformis*, *Blautia glucerasea*, *Butyricimonas virosa*, *Clostridium papyrossolvens*, *Enterococcus gallinarum*, *Microbacterium maritypicum*, *Lachnospiraceae bacterium* i *Lactococcus plantarum*⁵⁹.



Rycina 6. Źródło BAs i ich wpływ na rozwój T2DM (zmodyfikowano na podstawie Du i wsp.⁴⁶).

Kwasy żółciowe (BAs) są syntetyzowane z cholesterolu w wątrobie i wydzielane do żółci oraz dwunastnicy. Sprzężone BAs są przekształcane przez drobnoustroje jelitowe do drugorzędowych BAs poprzez dekoniugację, dehydroksylację i epimeryzację. BAs działają na dwa receptory (jądrowy, z ang. farnesoid x factor FXR oraz receptor kwasu żółciowego sprzężony z białkiem TGR5), regulując homeostazę glukozy w organizmie. Dzięki aktywacji TGR5 przez BAs w komórkach L jelit i α trzustki komórki mogą promować uwalnianie glukagonopodobnego peptydu (GLP-1), który promuje wydzielanie insuliny z komórek β trzustki, obniżając w ten sposób poziom glukozy we krwi. Ponadto aktywacja jelit przez BAs promuje uwalnianie czynnika wzrostu fibroblastów (z ang. fibroblast growth factor, FGF15/19), który wiąże się z wątrobowym receptorem FGF4/ β Klotho i hamuje ekspresję 7 α -hydroksylazy cholesterolu (CYP7A1), zmniejszając w ten sposób syntezę BA w wątrobie. FGF15/19 może również promować syntezę glikogenu w wątrobie i hamować glukoneogenezę w wątrobie. Z drugiej strony, hamowanie jelitowego FXR przez niektóre BAs zmniejsza syntezę ceramidów, a następnie hamuje glukoneogenezę w wątrobie. Poza tym hamowanie FXR w komórkach L jelit może promować wydzielanie GLP-1, poprawiając w ten sposób poziom glukozy we krwi.

Takie składniki żywnościowe jak cholina, karnityna lub betaina mogą być metabolizowane przez mikroflorę jelitową w celu wytworzenia trimetylaminy – TMA, która jest następnie przekształcana w wątrobie do N-tlenku trimetylaminy (TMAO). TMAO aktywuje kinazę białkową retikulum endoplazmatycznego (z ang. *protein kinase RNA-like ER kinase*, PERK) w celu promowania dysfunkcji metabolicznych i hiperglikemii. TMAO może promować oporność na insulinę i zwiększać poziom glukozy we krwi na czczo (z ang. *fasting glucose*, FG). W wątrobie TMAO promuje glukoneogenezę i zmniejsza wątrobowy transport glukozy i stężenie glikogenu (**Rycina 6**).

4.4.2. Suplementacja probiotyków a rozwój cukrzycy typu 2

Przywrócenie prawidłowego składu mikrobiomu jelitowego przez probiotyki było wielokrotnie stosowane w leczeniu T2DM i jej powikłań¹⁵. Mechanizmy działania przeciwcukrzycowego probiotyków obejmują poprawę funkcji bariery jelitowej, zmniejszenie stanu zapalnego, modyfikację GM, obniżenie poziomu cholesterolu i regulację sygnalizacji insulinowej^{15,74,75}. Dysbioza ma znaczący wpływ na funkcję bariery jelitowej, w szczególności powoduje utratę jej integralności, co może prowadzić do stymulacji translokacji do krwiobiegu mediatorów stanu zapalnego, takich jak LPS, co z kolei wywołuje reakcje zapalne i insulinooporność. W kilku badaniach opisano aktywność przeciwutleniającą różnych gatunków bakterii kwasu mlekowego, w tym *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis* i *Lactobacillus plantarum*⁷⁴. Na podstawie przeglądu literaturowego potwierdzone również zostało, że wiele objawów związanych z T2DM i insulinoopornością można złagodzić poprzez uzupełnianie probiotyków takich jak: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* czy *Bifidobacterium* oraz bakterii wytwarzających kwas masłowy, *Clostridium butyricum*, *Roseburia*, *Faecalibacterium* i *Eubacterium*¹⁰. Wykazano, że podawanie *Lactobacillus reuteri* obniża poziom glikemii i stężenie hemoglobiny glikowanej (HbA1c) oraz zapobiega zwłóknieniu nerek⁷⁶. Sugerowano również, że *Bifidobacterium adolescentis* poprawia wrażliwość na insulinę⁷⁷ poprzez zwiększoną produkcję GLP-1. GLP-1 zwiększa tolerancję glukozy poprzez złożone mechanizmy obejmujące modulację wydzielania insuliny, masy komórek trzustki i przyjmowania pokarmu⁷⁸. Wykazano również, że osoby nawet ze zdiagnozowaną T2DM, po spożyciu przez sześć tygodni jogurtu zawierającego *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium lactis* wykazywały obniżoną glikemię na czczo i obniżony poziom HbA1c, a także wyższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej w porównaniu z grupą kontrolną⁷⁹.

4.4.3. Występowanie metabolitów związanych z florą jelitową w próbkach biologicznych

Produkty przemian metabolitów należących do wyżej opisanych grup mogą być ważnymi modulatorami szlaków, odgrywając rolę w rozwoju różnych chorób metabolicznych, w tym także T2DM⁶. Z tego powodu dokładne oznaczenie MDMs w próbkach biologicznych może mieć znaczenie w lepszym zrozumieniu wpływu GM na organizm, a także przyczynić się do ujawnienia nowych metabolitów, które mogą poprawić diagnostykę T2DM. Ustalenie zależności między GM a T2DM może być pomocne w opracowaniu zintegrowanych strategii w celu zapobiegania oraz leczenia T2DM, w tym z wykorzystaniem probiotyków¹⁰. Dlatego też w przeglądzie literaturowym będącym częścią publikacji pt.: „The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step”, wchodzącej w skład cyklu publikacji, przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat składu GM i metabolitów związanych z GM w odniesieniu do postępu i rozwoju otyłości oraz T2DM. MDMs zostały wykryte w różnych próbkach biologicznych, takich jak kał, mocz, surowica czy też osocze^{80,81}. Spośród wszystkich wymienionych próbek, kał jest niezwykle cennym materiałem biologicznym, którego analiza może odzwierciedlać stan zdrowia nie tylko dolnego odcinka przewodu pokarmowego, ale i całego organizmu¹⁰. W wielu badaniach poświęconych składowi GM oraz MDM wykorzystano właśnie ten materiał do badań. Dlatego też w pracy przeglądowej wchodzącej w skład cyklu publikacji¹⁰ skupiono się na sposobach przygotowania próbek kału do analiz przy pomocy GC-MS oraz LC-MS.

Na podstawie przeglądu literaturowego ustalono, że analiza MDMs w tak złożonym materiale jak kał jest dużym wyzwaniem pod względem analitycznym i biochemicznym¹⁰. Kał jest dość trudny do zbadania, ponieważ jest niejednorodny pod względem składu, bogaty w makrocząsteczki i cząstki niestrawionego pokarmu, co może komplikować ich analizę metodami instrumentalnymi⁸². Opracowanie procedury ekstrakcji pozwalającej na uniknięcie efektu matrycowego może być bardzo skomplikowane. Ponadto, skład kału jest wysoce zależny od czynników dietetycznych, a jednocześnie stanowi pierwotną próbkę, w której wyraża się metabolizm organizmu żywiciela i GM⁸³. Dlatego tak ważne jest zastosowanie odpowiedniej metodyki przygotowania próbki i analizy metabolitów, która zrekompensuje dużą zmienność próbki²⁸.

Osocze i surowica są próbkami biologicznymi, które mogą być pozyskiwane w sposób bardziej inwazyjny, ale analiza ich metabolomu może również odzwierciedlać zmiany w całym organizmie⁸⁴, w tym w składzie MDMs^{85,86}. Dodatkowo, analizy przy użyciu GC-MS obu

materiałów dostarczyły wielu cennych informacji odnośnie zmian w poziomie związków drobnocząsteczkowych w kontekście rozwoju T2DM^{6,7,87,88}. Udowodniono również, że wiele gatunków GM mających wpływ na rozwój T2DM wykazuje związek z metabolitami znajdującymi się we krwi⁴⁵. Badania przeprowadzone przez Visconti i wsp.⁸⁹ potwierdziły, że chociaż stężenie metabolitów związanych z GM w krwiobiegu jest znacznie niższe niż w kale, to metabolity te odgrywają ważną rolę w modulowaniu metabolizmu ogólnego gospodarza. Dlatego też na kolejnym etapie badań poświęconych GM oraz T2DM, skupiliśmy się na przeglądzie literatury^{30,86,89-93} oraz informacjach dostępnych w HMDB odnośnie MDM wykrywanych w próbkach surowicy oraz osocza, a także na szlakach metabolicznych, które mogą być zaburzane przez GM. Efekty tej pracy przedstawiono w pierwszej części pracy badawczej pt: „Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes” wchodzącej w skład cyklu publikacji tworzących niniejszą rozprawę. Odpowiednim narzędziem do pomiaru próbek osocza oraz surowicy w kontekście MDM jest metabolomika, głównie z wykorzystaniem takich technik analitycznych jak GC–MS czy LC–MS.

4.5. Metabolomika

Metabolomika jest bardzo dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki. Obok proteomiki, transkryptomiki i genomiki odgrywa istotną rolę w badaniach z zakresu biologii systemów⁹⁴. Celem badań metabolomicznych jest poznanie kompletnego składu metabolitów (metabolomu), który zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego, stopnia rozwoju choroby bądź obecności zaburzeń w funkcjonowaniu komórek, tkanek, narządu lub narządów czy też całego organizmu⁹⁵. Metabolom człowieka to złożona kompozycja drobnocząsteczkowych związków, zazwyczaj o masie molekularnej mieszczącej się w granicach 80 – 1500 Da, należących do różnych klas chemicznych. Wśród nich wyróżnia się m.in. CARBs, lipidy, AAs, peptydy, minerały, aminy biogenne, nukleotydy, kwasy organiczne (z ang. *organic acids*, OrgAs), witaminy czy hormony⁹⁶.

Obecnie metabolomika wykorzystywana jest powszechnie w badaniach biomedycznych skupiających się na poszukiwaniu nowych predyktorów różnych chorób⁹⁷, badaniu efektów terapeutycznych leków lub substancji naturalnych o potencjale terapeutycznym⁹⁸ bądź też ocenie szlaków metabolicznych zaburzonych przez konkretną chorobę lub stan patologiczny⁹⁹. W badaniach mających na celu analizę zmian w szlakach metabolicznych wywołanych przez rozwój choroby specyficzne próbki biologiczne, pobrane bezpośrednio w miejscu występowania stanu patologicznego, mogą dostarczyć bardziej szczegółowych informacji

na temat patogenezы choroby i jej progresji¹⁰. Analiza metabolomiczna próbek biologicznych może pogłębić naszą wiedzę na temat mechanizmów molekularnych stojących za rozwojem T2DM, a nawet wskazać szlaki metaboliczne, które mogą być obiecującymi celami terapeutycznymi dla nowych leków czy probiotyków.

W zależności od rodzaju przeprowadzanych badań wyróżniamy niecelowane analizy metabolomiczne, profilowanie metabolitów i analizy celowane. Analizy niecelowane ukierunkowane są na wykrycie możliwie wszystkich związków obecnych w danej próbce. Ten rodzaj analiz, szczególnie cenny w przypadku badań dotyczących słabo poznanego obszaru, jest często nazywany „metabolicznym odciskiem palca” (z ang. *metabolic fingerprinting*), ponieważ ma na celu określenie profilu metabolitów typowego dla danego stanu biologicznego. Dzięki informacjom uzyskanym w wyniku wielkoskalowych badań metabolomicznych możliwe jest zaobserwowanie i szczegółowa analiza zależności występujących w danym układzie biologicznym. Profilowanie metabolitów skupia się na analizie określonej grupy związków, należących do danej klasy lub szlaku metabolicznego. Analizy celowane skupiają się na oznaczeniu ilościowym wybranego związku lub grupy związków, dzięki czemu preparatyka próbki może być dostosowana do rodzaju metabolitów, co zmniejsza zakłócenia wynikające z obecności w matrycy innych cząsteczek.

Wśród różnych metod analitycznych stosowanych do pomiaru związków biologicznych popularność zyskała spektrometria mas¹⁰, głównie w połączeniu ze wspomnianymi wcześniej technikami rozdziału, tj. GC-MS czy LC-MS⁷. W porównaniu z techniką LC-MS, GC-MS ma znacznie lepszą rozdzielczość chromatograficzną. Jest to również wysoce powtarzalna i czuła technika analityczna, zdolna do wykrywania szerokiej gamy MDMs związanych z rozwojem T2DM, takich jak AAs, FAs, CARBs i sterole. Ponadto, powtarzalne wzorce fragmentacji molekularnej GC-MS sprawiają, że jest to jedno z najbardziej niezawodnych narzędzi do badania metabolitów¹⁴. Oznaczenie wszystkich MDMs przy użyciu LC-MS wymagałoby użycia kilku metod z wykorzystaniem różnych kolumn chromatograficznych¹⁰⁰. Biorąc pod uwagę powyższe w swoich badaniach wykorzystywałam platformę GC-MS.

4.5.1. Przygotowanie próbek do analiz GC-MS

Ze względu na bardzo dużą liczbę metabolitów występujących w materiale biologicznym oraz ich różnorodność, niecelowana analiza metabolomiczna próbek biologicznych, również techniką GC-MS, musi być poprzedzona doбором odpowiedniej strategii analitycznej¹⁰. Nie istnieje jedna uniwersalna metoda pozwalająca na analizę ilościową i jakościową wszystkich

metabolitów zawartych w badanej próbce biologicznej⁶. Wynika to głównie z faktu, że metabolity obecne w materiale biologicznym różnią się pod względem zakresu stężeń, mas cząsteczkowych, stabilności, lotności oraz polarności¹⁰¹. Wykonanie analiz przy użyciu GC–MS wymaga doboru odpowiedniego rozpuszczalnika lub mieszaniny rozpuszczalników na etapie strącania białek oraz ekstrakcji metabolitów, a także przeprowadzenia dodatkowego etapu jakim jest konwersja chemiczna związków określana w dalszej części rozprawy jako derywatywacja¹⁰².

W niecelowanych badaniach metabolomicznych odpowiednio dopracowana metoda przygotowania próbki powinna prowadzić do uzyskania ekstraktu zawierającego możliwie jak najszersze spektrum metabolitów należących do różnych klas. Rozpuszczalniki najczęściej stosowane na etapie przygotowania próbek to: acetonitryl (ACN)^{7,103}, metanol (MeOH)¹⁰⁴ lub mieszanin rozpuszczalników takich jak: ACN:isopropanol (isoProp):H₂O (v:v:v; 3:3:2)^{84,94}; MeOH:H₂O (v:v; 9:1)¹⁰⁵, MeOH:isoProp:H₂O (v:v:v; 3:3:2)⁸⁴ lub MeOH: etanol (EtOH) (v:v; 1:1)¹⁰⁶. W jednym z badań⁹⁴ zostało potwierdzone, że zastosowanie na etapie strącania białek oraz ekstrakcji mieszaniny rozpuszczalników o różnych właściwościach tj. hydrofilowych, lipofilowych i średnio polarnych pozwala na uzyskanie próbki zawierającej szerokie spektrum metabolitów. Istnieje kilka badań porównujących użyteczność różnych rozpuszczalników do ekstrakcji metabolitów, jednak różnorodność wyekstrahowanych metabolitów, które powiązane są z GM nie była duża^{104,107,108}. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, brak jest artykułów metodologicznych porównujących użyteczność tych rozpuszczalników i ich mieszanin do przygotowania próbek surowicy lub osocza do analizy GC–MS w kontekście MDMs.

Jak już wspomniano, przygotowanie próbek do analiz przy użyciu GC–MS wymaga przeprowadzenia dodatkowego etapu derywatywacji. Nie każdy odczynnik może być używany na tym etapie, musi on spełniać szereg warunków. Przede wszystkim powinien szybko i całkowicie reagować z analitem, tworzyć z nim tylko jedną pochodną, która będzie stabilna na etapie rozdziału chromatograficznego. Idealna reakcja derywatywacji powinna mieć następujące cechy: (i) powinna być wystarczająco trwała, nawet w przypadku różnorodnych i złożonych matryc; (ii) odczynnik powinien selektywnie reagować z określoną grupą funkcyjną bez możliwości powstania produktów ubocznych; (iii) odczynnik powinien być łatwo syntetyzowany lub dostępny na rynku; (iv) pozostałość odczynnika do derywatywacji nie może zakłócać rozdziału i wykrywania pochodnych analitów lub powinna być łatwa do usunięcia po reakcji derywatywacji¹⁰.

Stosowanych jest kilka rodzajów derywatywacji, takich jak silylacja, acylacja czy estryfikacja, które zostały szczegółowo opisane w pracy przeglądowej wchodzącej w skład cyklu publikacji. W badaniach metabolomicznych standardową procedurą derywatywacji jest silylacja^{109,110}. Pochodne otrzymane w wyniku tego procesu charakteryzują się większą lotnością, stabilnością oraz mniejszą polarnością niż substancje wyjściowe¹¹⁰. Najczęściej przeprowadzana jest dwustopniowa derywatywacja⁹⁴, a pierwszy jej etap polega na reakcji metoksyaminy z grupami karbonyłowymi, wynikiem czego jest powstanie hydrazonów lub oksymów, a także z grupami ulegającymi enolizacji takimi jak aldehydy czy ketony. W ten sposób stabilizowana zostaje między innymi konformacja łańcucha cukrów redukujących oraz zapewniana jest ochrona α -ketokwasów przed dekarboksylacją¹⁰. W drugim etapie stosowana jest silylacja, która prowadzi do zablokowania polarnych grup funkcyjnych (np. aminową, fosforanową, hydroksylową, karbonylową, karboksylową, sulfhydrylową oraz inne) poprzez ich podstawienie grupą trimetylosilylową (TMS) z zastosowaniem odczynnika krzemooorganicznego (zwykle *N,O*-bis(trimetylsilyl) – trifluoroacetamid (BSTFA) lub *N,O*-metyl(trimetylsilyl)– trifluoroacetamid, MSTFA)¹¹¹. Proces ten odbywa się w obecności katalizatora lub bez (zwykle 1% TMS, trimetylochlorosilan (TMCS), trifluoroacetamid, kwas solny, octan potasu, piperidyna lub pirydyna)¹¹⁰. Grupa TMS przyczynia się do zwiększenia stabilności chemicznej i termicznej, stabilizuje rodniki karbonyłowe metabolitów i zatrzymuje przenoszenie ładunku, jak również zwiększa lotność analitu⁹⁴. Niestety, wraz ze wzrostem liczby derywatyzowanych grup, istnieje prawdopodobieństwo otrzymania pochodnej, której masa cząsteczkowa wykroczy poza zakres działania detektora (zazwyczaj 650–1000 *m/z*)¹¹².

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, dotychczas nie przedstawiono kompleksowej optymalizacji metody, obejmującej wpływ popularnych rozpuszczalników i warunków derywatywacji na profilowanie MDMs w próbkach osocza czy surowicy. Z tego powodu przeprowadziliśmy równoległe porównanie różnych procedur przygotowania próbek zarówno dla surowicy i osocza, składających się z jednoczesnego wytrącania białek na bazie rozpuszczalnika z ekstrakcją metabolitów i dwuetapową derywatywacją, koncentrując się na wybranych MDMs. W oparciu o intensywność sygnału i jego względne odchylenie standardowe (z ang. *relative standard deviation*, RSD) zoptymalizowano metodę przygotowania próbki, aby uzyskać najlepszą możliwą metodę pomiaru wybranych MDMs przy użyciu GC–MS. Wyniki badań zostały przedstawione w pracy pt. „Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites

in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes”, wchodzącej w skład cyklu publikacji tworzących niniejszą rozprawę.

Optymalizacja została wykonana dla obu rodzajów próbek pozyskiwanych z krwi pełnej, surowicy i osocza, ponieważ badania metabolomiczne pokazują, iż profile metaboliczne obu rodzajów próbek różnią się¹¹³. Pomimo tego, iż w zależności od rodzaju, klasy lub konkretnego metabolitu, jedna matryca może być lepsza od drugiej do pomiaru danego metabolitu, to w praktyce oba rodzaje materiałów biologicznych były wykorzystywane w badaniach metabolomicznych związanych z T2DM przy użyciu GC–MS¹¹⁴. Ogólnie ujmując, surowica jest preferowana ze względu na nieco wyższe stężenie metabolitów w porównaniu do osocza¹¹⁵. Deproteinizacja surowicy eliminuje frakcję objętościową białek wpływając na to, że pozostałe składniki o małej masie cząsteczkowej znajdują się w mniejszej objętości, dzięki czemu są bardziej skoncentrowane. Z drugiej strony, istnieją badania potwierdzające, że poziom niektórych metabolitów jest mniejszy w surowicy w porównaniu z osoczem zawierającym kwas wersenowy (z ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA)^{116,117}. Osocze jest częściej wybierane ze względu na powtarzalność samego procesu jego otrzymywania z krwi, co nie jest dokładnie kontrolowane w przypadku surowicy¹¹⁷. Ze względu na wszystkie wyżej wymienione czynniki, podjęto wysiłek wykonania kompleksowej optymalizacji metody do oznaczania MDM w obu matrycach. Ostatecznie zoptymalizowaną metodę zastosowano do badań metabolomicznych mających na celu porównanie profilu metabolitów w próbkach pochodzących od czterech grup pacjentów tj. dwóch grup pacjentów ze stanem przedcukrzycowym, w których w jednej grupie po 5 latach obserwacji rozwinęła się T2DM, natomiast pacjenci w drugiej grupie pozostali w stanie przedcukrzycowym. W pracy badawczej wchodzącej w skład cyklu publikacji pt. „Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes” na prośbę recenzentów przedstawiono wyniki tylko dla porównania profilu pacjentów w stanie przedcukrzycowym z osobami u których potwierdzono T2DM (próbki pobrane po 5 latach obserwacji). Natomiast w rozprawie zostały przedstawione wyniki dla wszystkich czterech porównań.

4.6. Metody analizy danych metabolomicznych

Niezwykle istotnym etapem badań metabolomicznych jest analiza ogromnych ilości danych uzyskiwanych podczas pomiarów z wykorzystaniem spektrometrii mas. Wraz z rozwojem metod analizy instrumentalnej, opracowywane są coraz to wydajniejsze narzędzia przetwarzania i normalizacji danych, a także ich analizy statystycznej. Powstają również bazy

widm masowych oraz zintegrowane platformy umożliwiające korelację danych. Dane wygenerowane przy użyciu techniki GC–MS wymagają kompleksowej analizy wstępnej zanim zostaną poddane analizie statystycznej. Obecnie naukowcy dysponują programami pozwalającymi na stosunkowo szybką i zautomatyzowaną wstępną integrację danych przy pomocy odpowiednich algorytmów.

Kolejnym etapem pracy z danymi metabolomicznymi jest ich analiza statystyczna, pozwalająca określić poziomy których metabolitów różnią się pomiędzy porównywanymi grupami w sposób istotny statystycznie. W przypadku porównań pomiędzy dwoma grupami wykorzystywane są często proste testy, jak test t–Studenta lub U–test Manna–Whitney’a. W miarę wzrostu poziomu złożoności eksperymentu można posłużyć się analizą wariancji (z ang. *analysis of variance*, ANOVA) lub jej wielowymiarową odmianą (z ang. *multivariate analysis of variance*, MANOVA)¹¹⁸. Równoległe do klasycznych metod statystycznych wykorzystywane są metody wielowymiarowe, które służą określeniu korelacji pomiędzy poszczególnymi badanymi grupami oraz umożliwiają wizualizację danych. Do najczęściej wykorzystywanych metod tego typu należą, m.in. analiza głównych składowych (z ang. *principal component analysis*, PCA), analiza składowych niezależnych (z ang. *independent component analysis*, ICA) oraz hierarchiczna analiza klastrow (z ang. *hierarchical cluster analysis*, HCA).

Podczas analiz metabolomicznych uzyskuje się widma masowe na podstawie których identyfikuje się zmierzone metabolity. Do identyfikacji związków wykorzystuje się bazy widm masowych, zarówno ogólnodostępne: MassBank, The Golm Metabolome Database, jak i komercyjne: Wiley Registry of Mass Spectral Data, MS/MS Spectral Libraries, NIST Standard Reference Database¹¹⁹. Aby przypisać zidentyfikowane związki do właściwych szlaków metabolicznych można wykorzystać następujące bazy: KEGG, BioCyc, PubChem czy ChemBank¹²⁰.

5. Omówienie prac składających się na rozprawę doktorską

5.1. Cele pracy

Głównym celem badań było poszukiwanie metabolitów związanych z florą jelitową, wskazujących na ryzyko rozwoju T2DM.

Aby zrealizować cel główny, zrealizowano następujące cele pośrednie:

1. Opracowano metodykę przygotowania próbek do analiz przy użyciu GC–MS, dopasowaną do pomiaru wybranych MDMs.
2. Zastosowano metodę GC–MS do pomiaru metabolitów w surowicy krwi osób zdrowych, w stanie przedcukrzycowym i ze zdiagnozowaną T2DM.
3. Wykorzystano technikę GC–MS do oceny poposiłkowych (posiłek wysokowęglowodanowy (WW) i normowęglowodanowy (NW)) zmian w profilu metabolitów osocza u osób z genotypem ryzyka rozwoju T2DM w genie PROX1 w porównaniu do osób z genotypem ochronnym.

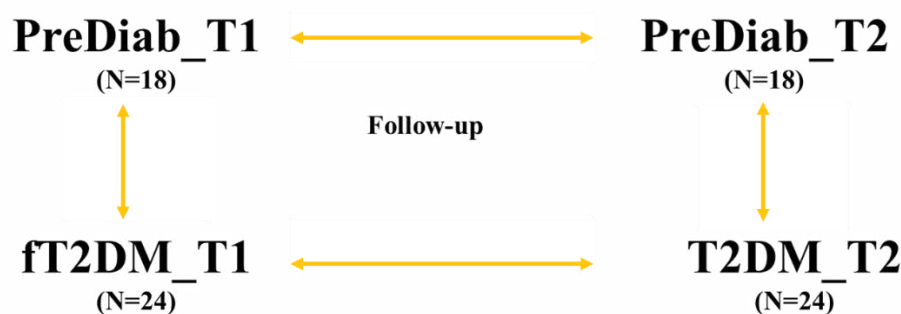
5.2. Materiały i metody

Badania zostały przeprowadzone z wykorzystaniem archiwalnego materiału biologicznego tj. próbek surowicy oraz osocza zgromadzonego podczas realizacji projektu pt. „Rola czynników behawioralnych, antropometrycznych i molekularnych w rozwoju cukrzycy typu 2 – projekt 1000PLUS”²². Protokół badań uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr zgód: R–I–002/290/2008/2009, R–I–002/35/2014 oraz APK.002.239.2022).

5.2.1. Grupy badane i materiał wykorzystany w trakcie poszczególnych badań

Publikacja nr 2

Do optymalizacji metody przygotowania próbek wykorzystano materiał pobrany od zdrowych ochotników. Od każdego z nich pobrano próbki krwi, z których uzyskano osocze i surowicę. Badania właściwe przeprowadzono na próbkach zgromadzonych w ramach projektu 1000PLUS. Do badań włączono próbki pobrane od 42 pacjentów, u których stwierdzono stan przedcukrzycowy na etapie włączenia do projektu. Podczas 5–letniej obserwacji 24 z nich rozwinęło T2DM (grupa T2DM_T2), a pozostałych 18 pacjentów dalej miało stan przedcukrzycowy (grupa PreDiab_T2). Ostatecznie próbki podzielono na cztery grupy: PreDiab_T1 (n=18), PreDiab_T2 (n=18), fT2DM_T1 (n=24), T2DM_T2 (n=24) (**Rycina 7**).



Rycina 7. Podział pacjentów uwzględnionych w badaniu.

Diagnostyka T2DM i stanu przedcukrzycowego była przeprowadzana w oparciu o wytyczne PTD (opisane we wstępie niniejszej rozprawy) tj. na podstawie pomiarów stężenia glukozy podczas OGTT w 0 i/lub 120 min. W pierwszym punkcie czasowym (T1) badane grupy nie różniły się istotnie pod względem wskaźnika masy ciała (BMI), stężenia glukozy w czasie 0 (FG) i 120 minucie OGTT, insuliny na czczo, HbA1c, lipoproteiny niskiej gęstości (z ang.

low-density lipoprotein, LDL), lipoproteiny wysokiej gęstości (z ang. *high-density lipoprotein*, HDL), cholesterolu całkowitego, triglicerydów, wskaźnika insulinoporności (z ang. *Homeostatic Model Assesment – Insulin Resistance*, HOMA-IR) oraz wskaźnika funkcji komórek β trzustki (z ang. *Homeostasis Model Assessment of β -cell function*, HOMA-B). Podczas wizyty kontrolnej (follow-up) takie parametry jak FG, stężenie glukozy w 120 minucie OGTT oraz HbA1c były podwyższone u pacjentów z grupy T2DM_T2. W **Tabeli 2** przedstawiono medianę i zakres wartości uzyskanych z pomiarów antropometrycznych oraz biochemicznych.

Tabela 2. Zestawienie danych klinicznych dla pacjentów z Publikacji nr 2.

Parametry kliniczne	Grupa kontrolna (N= 18)		T2DM (N=24)		*p-wartość Wizyta 1	*p-wartość Wizyta 2
	Wizyta 1 PreDiab_T1	Wizyta 2 PreDiab_T2	Wizyta 1 ft2DM_T1	Wizyta 2 T2DM_T2		
Wiek [lata]	54,6 (33,4–65,9)	56,4 (37,4–70,9)	58,3 (28,9–65,1)	62,5 (41,2–69,2)	0,157	0,146
Kobieta/Mężczyzna	8/10		11/13		–	–
BMI [kg/m ²]	33,0 (25,5–46,7)	33,6 (23,7–47,1)	31,5 (22,8–47,2)	32,5 (21,3–49,4)	0,187	0,219
FG [mg/dL]	107 (100–117)	110 (101–121)	108 (84–128)	131 (138–171)	0,876	0,002
Glukoza 120 min [mg/dL]	124,5 (68,0–182,0)	126,0 (72,0–190,0)	147,5 (68,5–192,0)	206,0 (160,0–229,0)	0,132	<0,001
Insulina [μU/mL]	13,80 (5,59–29,04)	126,00 (72,00–190,00)	11,97 (5,98–35,09)	16,35 (4,73–58,81)	0,618	0,880
HbA1c [%]	5,80 (4,10–6,40)	5,80 (5,10–6,40)	5,95 (4,90–6,60)	6,15 (5,30–7,70)	0,308	0,006
Całkowity cholesterol [mg/dL]	196 (166–324)	181 (125–284)	191 (129–321)	174 (138–310)	0,458	0,723
LDL cholesterol [mg/dL]	123,0 (93,8–228,0)	105,1 (53,6–221,6)	118,2 (57,4–213,0)	93,8 (60,4–213,4)	0,471	0,348
HDL cholesterol [mg/dL]	49,5 (32,0–107,0)	49,7 (29,0–125,0)	51,5 (40,0–71,0)	52,0 (36,0–89,0)	0,517	0,319
Trójglicerydy [mg/dL]	132 (41–227)	107 (33–229)	117 (45–491)	125 (44–232)	0,131	0,875
HOMA-IR	3,4 (1,5–7,8)	4,3 (2,8–10,4)	3,0 (1,5–9,4)	5,2 (1,1–20,0)	0,783	0,479
HOMA-B	112,4 (43,0–275,0)	112,0 (71,0–216,0)	97,0 (42,0–349,0)	85,0 (19,0–277,0)	0,687	0,112

*BMI – wskaźnik masy ciała; FG – stężenie glukozy na czczo; HbA1c– stężenie hemoglobiny glikowanej; LDL – lipoproteiny niskiej gęstości; HDL – lipoproteiny wysokiej gęstości, LDL – lipoproteiny niskiej gęstości; HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności; HOMA-B – wskaźnik funkcji komórek β trzustki; p – wartość obliczona na podstawie U-testu Manna Whitneya.

Publikacja 3

Badania przeprowadzono na próbkach osocza pobranych od 18 zdrowych mężczyzn (uczestników badania 1000PLUS), 12 z genotypem ryzyka w genie *PROX1* oraz 6 z genotypem ochronnym. Podział na grupy przeprowadzono na podstawie polimorfizmu rs340874 w genie *PROX1*. Do grupy wysokiego ryzyka (z ang. *high risk*, HR) włączono homozygotycznych nosicieli allelu wysokiego ryzyka C (genotyp CC, n=12), a do grupy niskiego ryzyka (z ang. *low risk*, LR) homozygotycznych nosicieli allelu ochronnego T (genotyp TT, n=6). Grupy były dopasowane pod względem wieku, parametrów antropometrycznych, FG, insuliny, a także HOMA-IR, HOMA-B czy HbA1c (**Tabela 3**). Na podstawie analizy otrzymanych wyników u żadnego z uczestników nie stwierdzono T2DM czy stanu przedcukrzycowego. Zebrane informacje na temat dziennej miary aktywności fizycznej pokazały, że wszyscy uczestnicy posiadali umiarkowaną lub wysoką (większość uczestników) aktywność fizyczną. Dzielne spożycie energii było również podobne u wszystkich uczestników (1991.8±529.7 kcal) z 20.4±4.4% (19.4±1.4% vs 21.6±4.3% dla LR vs HR, p=0.4) energii z białka, 33.6±5.8% (33.9±10.0% vs 31.7±5.3% dla LR vs HR, p=0.9) z tłuszczu i 42.0±6.3% (41.4±6.2% vs 42.7±6.8% dla LR vs HR, p=0.9) z CARBs. Po około pięciu latach od pierwszej wizyty uczestnicy z kohorty 1000PLUS zostali wezwani na wizytę kontrolną. U sześciu osób z grupy nosicieli alleli ryzyka w rs340874 *PROX1* zaobserwowano pogorszenie wybranych parametrów klinicznych (np. glikemia na czczo, HOMA-IR, HbA1c), które wskazują na rozwój T2DM.

Tabela 3. Zestawienie danych klinicznych dla pacjentów z grup HR i LR (Publikacja nr 3).

Parametry kliniczne	HR	LR	*p-wartość
Wiek [lata]	35,8 ± 6,9	35,2 ± 9,0	0,88
Waga [kg]	91,8 ± 22,2	93,6 ± 23,5	0,89
BMI [kg/m ²]	28,1 ± 5,4	29,1 ± 7,8	0,79
Zawartość tkanki tłuszczowej [%]	23,6 ± 7,7	23,8 ± 9,6	0,96
Beztłuszczowa masa ciała [%]	76,3 ± 10,1	74,3 ± 9,0	0,88
Talia [cm]	105,5 ± 21,5	107,4 ± 21,3	0,94
Biodra [cm]	108,0 ± 10,0	104,4 ± 15,6	0,79
WHR	0,97 ± 0,11	1,03 ± 0,16	0,66
FG [mg/dl]	84,7 ± 5,1	86,2 ± 7,6	0,65
Aktywność insuliny nad czczo [IU/mL]	9,7 ± 7,5	10,4 ± 8,7	0,87
HOMA-IR	2,1 ± 1,8	2,2 ± 1,9	0,89
HOMA-B	150,2 ± 81,4	188,2 ± 156,3	0,53
HbA1c	5,2 ± 0,3	5,2 ± 0,5	0,77

*BMI – wskaźnik masy ciała; FG – stężenie glukozy na czczo; HbA1c – stężenie hemoglobiny glikowanej; HOMA-IR – wskaźnik insulinooporności; HOMA-B – wskaźnik funkcji komórek β trzustki; p-wartość obliczona na podstawie U-testu Manna Whitneya.

Osoby badane otrzymały dwa rodzaje posiłków: WW/ beztłuszczowy (Nutridrink Fat Free, w którym 89% energii pochodzi z CARBs, 0% z tłuszczów, 11% z białek, 450 kcal) i NW/wysokobiałkowy (Cubitan, w którym 45% energii pochodzi z CARBs, 25% z tłuszczów, 30% z białek, 450 kcal). Krew do analiz metabolomicznych została pobrana na czczo oraz 30, 60 i 120 min po spożyciu posiłku.

5.2.2. Pobieranie materiału do badań

W celu pozyskania próbek osocza, krew pobierano do probówek S-Monovette zawierających K₃EDTA (SARSTEDT, Niemcy). Następnie krew odwirowywano przy 15400 x g przez 10 min w 4°C. W przypadku próbek surowicy, krew pobierano do probówek S-Monovette zawierających aktywator krzepnięcia. Następnie probówki przechowywano w pozycji pionowej w temperaturze pokojowej przez 60 minut, aby umożliwić utworzenie skrzepu. Probówki odwirowywano w poziomym rotorze (z odchylaną głowicą) przez 10 minut przy 1300 x g w temperaturze pokojowej (z ang. *room temperature*, RT). Po odwirowaniu frakcję surowicy lub osocza przenoszono do probówek Eppendorfa i przechowywano w -80°C do momentu wykonania analiz.

5.2.3. Metabolity uwzględnione do analiz za pomocą GC-MS

Pomiarami analitycznymi objęto 75 MDMs (**Publikacja 2**). Metabolity te zostały wybrane na podstawie przeglądu literatury^{30,86,89-93} oraz informacji zawartych w HMDB (www.hmdb.ca,

dostęp 20 kwietnia 2022). Wybrane metabolity stanowią dużą i różnorodną grupę związków zróżnicowanych pod względem budowy chemicznej, właściwości fizykochemicznych, jak również stabilności w trakcie analiz przy użyciu GC–MS. Listę analizowanych metabolitów zestawiono w Publikacji nr 2 wchodzącej w skład cyklu publikacji tworzących niniejszą rozprawę.

5.2.4. Powtarzalność, odtwarzalność i stabilność pomiaru wybranych metabolitów

W celu określenia optymalnych warunków podczas opracowywania metody przygotowania próbek do pomiaru MDMs, wzięto pod uwagę następujące kryteria:

- 1) powtarzalność pomiarów,
- 2) intensywności pików dla poszczególnych metabolitów,
- 3) intensywność całkowita (z ang. *total intensity*, TI), która jest sumą intensywności poszczególnych metabolitów,
- 4) odtwarzalność pomiaru,

Stabilność, powtarzalność i odtwarzalność pomiarów dla 75 MDMs oceniono obliczając RSD na podstawie intensywności pików otrzymanych dla każdego metabolitu w zmierzonych próbkach. W celu wyznaczenia powtarzalność przeanalizowano próbki osocza oraz surowicy w 50 powtórzeniach każda, wykonując analizy przy optymalnych parametrach metody. W celu wyznaczenia odtwarzalności przeanalizowano po 10 próbek osocza i surowicy w trzech sekwencjach. W celu wyznaczenia stabilności 75 MDMs, przygotowane próbki osocza oraz surowicy przeanalizowano przy użyciu GC–MS po 8, 24, 36 i 48 godzinach od przygotowania, przechowując je w RT, na automatycznym podajniku do próbek.

5.2.5. Optymalizacja metody przygotowania próbek

Na etapie optymalizacji, wpływ testowanych parametrów był oceniany w oddzielnych sekwencjach, a przygotowanie próbek, z uwzględnieniem badanej przez nas zmiennej wykonane zostało w trzech powtórzeniach. Wszystkie optymalizowane parametry oraz testowane zakresy ich wartości zostały wybrane na podstawie przeglądu literaturowego, jako najczęściej stosowane podczas przygotowania próbek osocza oraz surowicy w badaniach metabolomicznych^{30,94,121-125}. W jednej sekwencji analizowane były próbki badane, kontrolne (z ang. *quality control*, QCs) oraz ślepe próby.

Pierwszym optymalizowanym parametrem był dobór rozpuszczalnika do wytrącenia białek oraz ekstrakcji. Następnie na etapie derywatywacji zoptymalizowano różne zmienne. Najpierw przetestowano wpływ stężenia (10–40 mg/ml, w objętości 10 µl), a następnie objętości (10–50 µl) chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie, rozcieńczonego do objętości 120 µl heptanem zawierającym wzorzec wewnętrzny (z ang. *internal standard*, IS). W kolejnym etapie zbadano wpływ warunków reakcji tj. temperatury i czasu na dwustopniowy proces derywatywacji. W pierwszym etapie, tj. metoksymacji (MeOx), badano wpływ czterech programów temperaturowych i) 37°C przez 30 min (P1), ii) 70°C przed godzinę (P2), iii) RT przez 16 godzin (P3) oraz iv) 70°C przez godzinę, a następnie przez 16 godzin w RT (P4). Podczas optymalizacji warunków na pierwszym etapie, do drugiego etapu stosowano program temperaturowy 37°C przez 30 minut. Następnie, podczas optymalizacji drugiego etapu tj. silylacji, testowano również cztery programy temperaturowe 37°C i 70°C (przez 30 i 60 minut).

5.2.6. Przygotowanie próbek klinicznych

Do strącenia białek oraz ekstrakcji próbek surowicy (50 µl) wykorzystano 150 µl (MeOH:H₂O, 9:1, v:v) (1:3, –20°C) zawierającego IS1 tj. kwas 4-nitrobenzoesowy o stężeniu 25 ppm, a następnie przeprowadzono dwustopniowy proces derywatywacji: 1) MeOX z 30 µL chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie (30 mg/ml, RT, 16 godzin), a następnie 2) silylacji z 30 µL MSTFA zawierającym 1% TMCS (70°C, 1 godzina) (**Rycina 8**). W końcowym etapie do próbek dodano 60 µL heptanu zawierającego IS2 tj. stearynian metylu o stężeniu 20 ppm.

Osocze (40 µl) odbiałczano poprzez dodanie 120 µl (ACN) (1:3, –20°C) zawierającego IS1 tj. kwas 4-nitrobenzoesowy o stężeniu 25 ppm, a następnie przeprowadzono dwustopniową derywatywację: 1) MeOX z 10 µL chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie (15 mg/ml, RT, 16 godzin), a następnie 2) silylację z 10 µL BSTFA zawierającym 1% TMCS (70°C, 1 godzina) (**Rycina 8**). W końcowym etapie do próbek dodano 100 µL heptanu zawierającego IS2 tj. stearynian metylu o stężeniu 20 ppm.

Próbki QCs, które wykorzystano do wyliczenia wartości RSD zostały przygotowane w ten sam sposób jak próbki badane. Sześć próbek QCs zostało nastrzykniętych przed analizą próbek klinicznych, w celu osiągnięcia stanu równowagi układu, aby zapewnić powtarzalność pomiaru. W każdej sekwencji na początku analizowano mieszaninę estrów metylowych kwasów tłuszczowych (z ang. *fatty acids methyl esters*, FAMES), mieszaninę *n*-alkanów, ślepą

próbę oraz sześć próbek QCs, a po każdym ośmiu nastrzyknięciach próbek badanych nastrzykiwano jedną próbkę QC. Pod koniec sekwencji ponownie nastrzykiwano jedną próbkę QC oraz ślepą próbkę.



Rycina 8. Przygotowanie próbek klinicznych: a) osocze i b) surowica.

5.2.7. Analizy GC-MS

Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie kapilarnej DB-5-MS (30 m x 0,25 mm, wypełnionej fazą 5% difenylo- i 95% dimetylopolisiloksanu o grubości 0,25 μ m) z zastosowaniem helu jako gazu nośnego (przepływ 1,0 mL/min) oraz temperaturą kolumny wynoszącą 60°C (przez pierwsze 10 minut), a następnie w gradiencie temperatury rosnącym z szybkością 10°C /min do 325°C utrzymane w najwyższej temperaturze przez 1 minutę (całkowity czas analizy 37,5 minut). Analizy zostały wykonane przy pomocy GC-MS (GC – model 7830B, detektor MS – model 7000D, oba Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Identyfikacja metabolitów została wykonana na podstawie dostępnych baz danych (NIST, Fiehn) oraz własnej biblioteki. Wstępne opracowanie otrzymanych danych wykonano przy pomocy oprogramowania Mass Hunter Unknown 10.1, Mass Hunter Quantitative Analysis 10.1, Mass Hunter Qualitative Analysis B.06.00 oraz Mass Profiler Professional B12.1 (wszystkie Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

5.2.8. Analiza statystyczna danych metabolomicznych uzyskanych dla próbek klinicznych – Publikacja nr 2

Zmienne istotne statystycznie zostały wyselekcjonowane przy pomocy statystyki wielowymiarowej tj. analizy dyskryminacyjnej zmiennych ortogonalnych najmniejszych kwadratów (z ang. *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*, OPLS-DA). Metabolity uznawano za istotne statystycznie jeżeli spełniały dwa warunki: wartość $[p(\text{corr})] > 0.4$ i wartość znaczenia zmiennej w projekcji (z ang. *variable importance in the projection VIP*) > 1 . Walidację modeli OPLS-DA przeprowadzono metodą walidacji krzyżowej, stosując podejście opisane we wcześniejszej publikacji¹²⁶. Statystyka wielowymiarowa została wykonana w programie SIMCA-P+ 13.0.3.0 (Umetrics, Umea, Szwecja). W celu sprawdzenia przydatności istotnych statystycznie metabolitów jako potencjalnych biomarkerów predykcyjnych T2DM wykonano analizę oceny jakości klasyfikatora (z ang. *receiver operating characteristic*, ROC) w MetaboAnalyst 5.0.

5.2.9. Analiza statystyczna próbek klinicznych – Publikacja nr 3

Analizę statystyczną przeprowadzono niezależnie dla każdego z posiłków, WW i NW. W związku z niewielką liczebnością grup, analizę danych przeprowadzono z wykorzystaniem metod nieparametrycznych. W próbkach zależnych różnicę w poziomie metabolitu w 30', 60' i 120' po spożyciu posiłku w porównaniu do poziomu na czczo oceniano testem Wilcoxona, podczas gdy test Manna-Whitney'a użyto do zbadania różnic w poziomie metabolitów na

czczo między grupami HR i LR. Za istotne statystycznie uznano cechy metaboliczne o wartości $p \leq 0.05$. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu oprogramowania R (wersja 4.0.0).

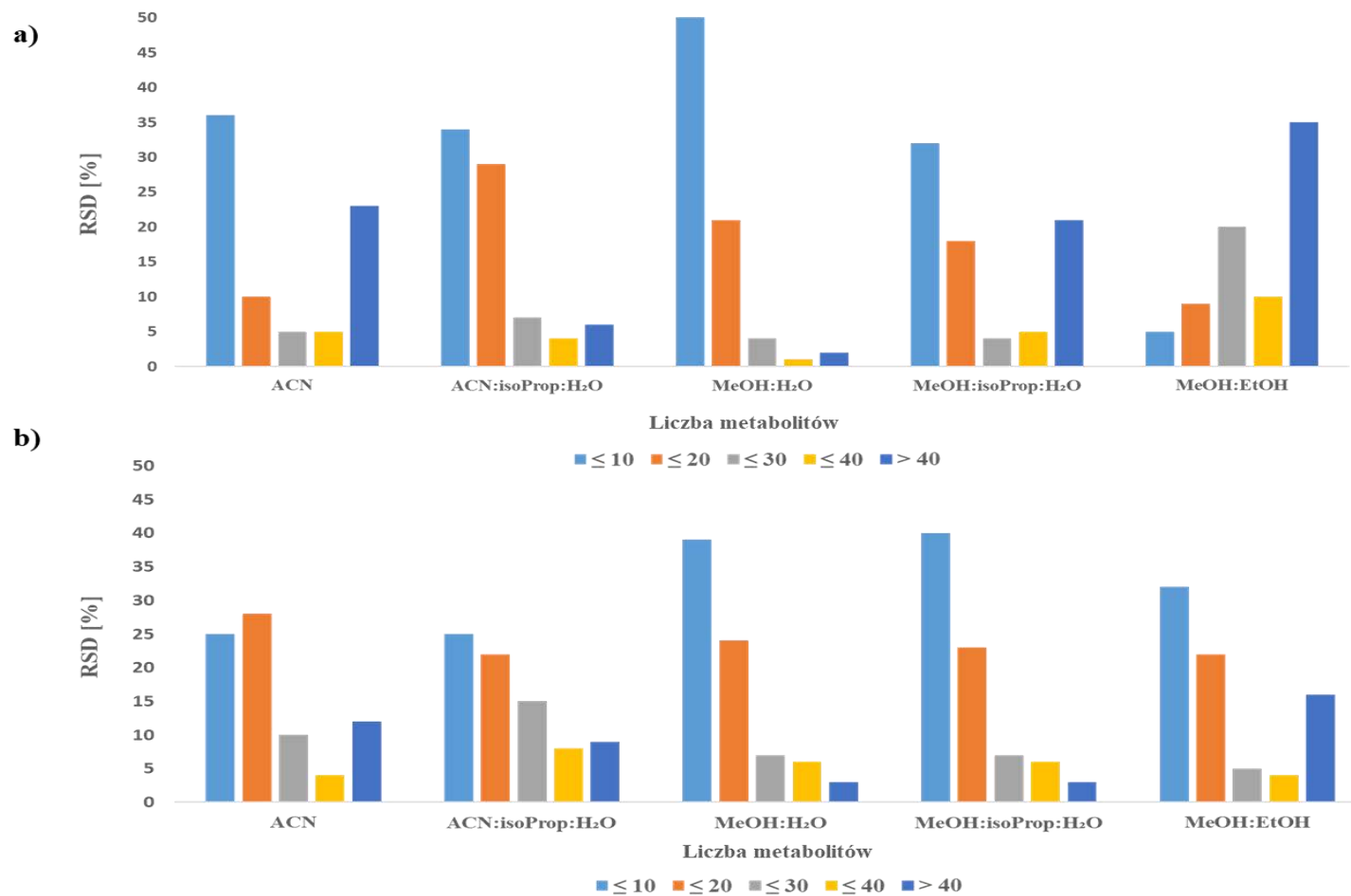
6. Wyniki

6.1. Optymalizacja metody przygotowania próbek osocza i surowicy

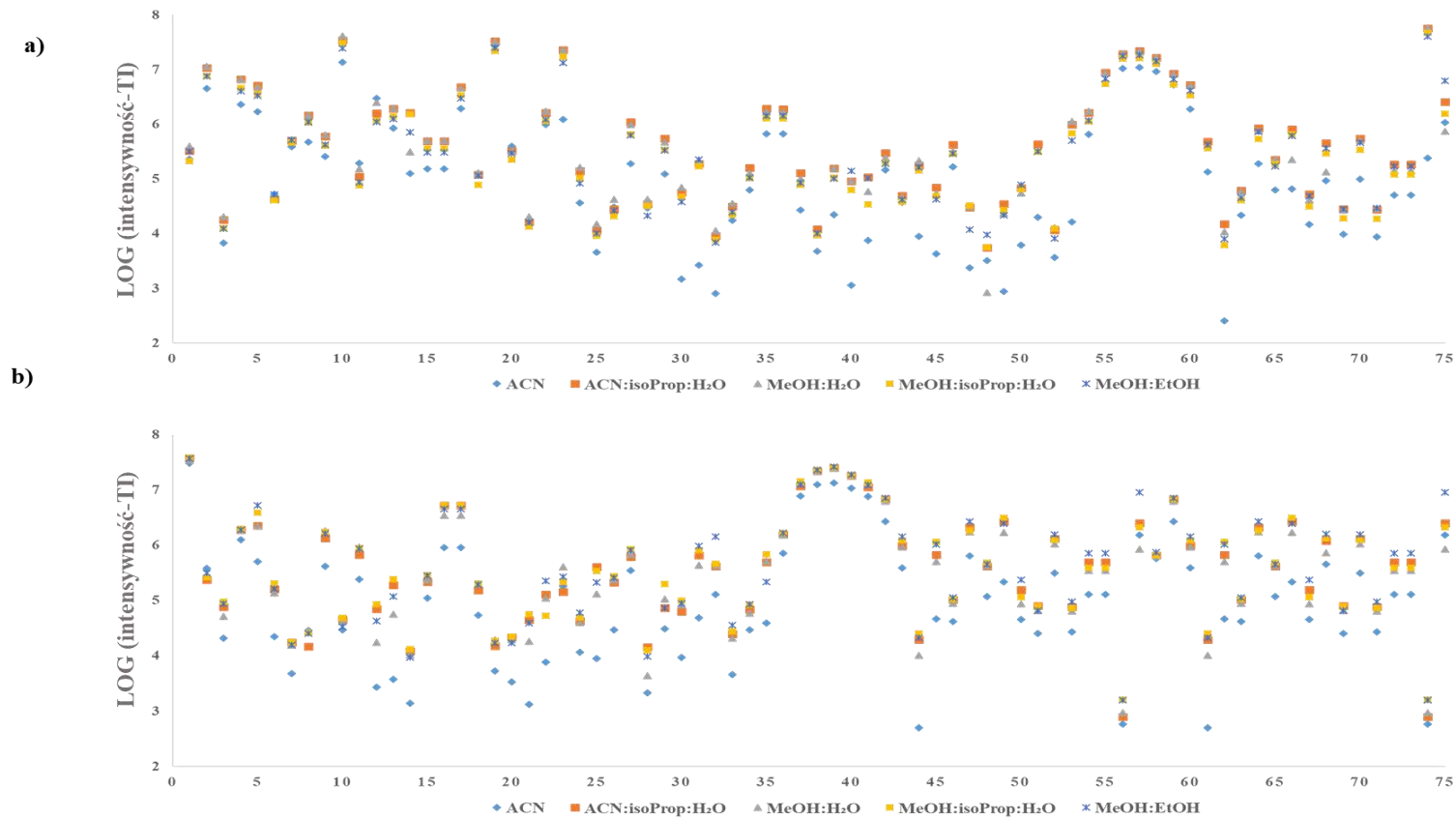
Pierwszym krokiem przed rozpoczęciem optymalizacji metody przygotowania próbek do badań było sprawdzenie, które metabolity związane z GM są wykrywane w osoczu i surowicy przy użyciu GC–MS. Po wstępnej obróbce danych (dekonwolucji, wyrównaniu i normalizacji danych do IS) uzyskano 102 cechy metaboliczne dla obu matryc. Po uwzględnieniu pochodnych tworzących się w wyniku derywatywacji dla niektórych AAs i CARBs pozostało 85 metabolitów. Metabolity przefiltrowano, pozostawiając tylko te, których RSD w próbkach QC było poniżej 30% w obu badanych matrycach. Ostatecznie wybrano 75 MDMs należących do różnych klas, które biorą udział m.in. w takich szlakach biochemicznych jak cykl kwasów trikarboksylowych; metabolizmu pirogronianu, tryptofanu, histydyny, glutationu; biosynteza nienasyconych kwasów tłuszczowych, pierwotnych kwasów żółciowych, kwasów tłuszczowych; waliny, leucyny i izoleucyny; szlaku pentozofosforanowego oraz glukoneogenezy. Szczegółowa lista metabolitów uwzględnionych do optymalizacji umieszczona została w publikacji nr 2 wchodzącej w skład cyklu.

6.2. Wybór rozpuszczalnika do ekstrakcji metabolitów z osocza lub surowicy

W pierwszym etapie optymalizacji dobierano rodzaj rozpuszczalnika do strącania białek i ekstrakcji metabolitów. Została sprawdzona skuteczność powszechnie stosowanych mieszanin rozpuszczalników tj.: ACN:isoProp:H₂O (v:v:v; 3:3:2) MeOH:H₂O (v:v; 9 :1); MeOH:isoProp:H₂O (v:v:v; 3:3:2), MeOH:EtOH (v:v; 1:1) (określane dalej jako rozpuszczalniki) oraz ACN. Na **Rycinach 9 i 10** przedstawiono wartości RSD oraz intensywności sygnałów (panel (a) dla osocza, (b) dla surowicy) uzyskanych w trakcie analizy 75 MDMs przy użyciu platformy GC–MS.



Rycina 9. Wykres słupkowy przedstawiający wartości RSD ≤ 10 , 20, 30 oraz $>40\%$ dla poszczególnych MDMs w zależności od rodzaju użytego rozpuszczalnika do ekstrakcji MDMs z próbek (a) – osocza oraz (b) – surowicy.



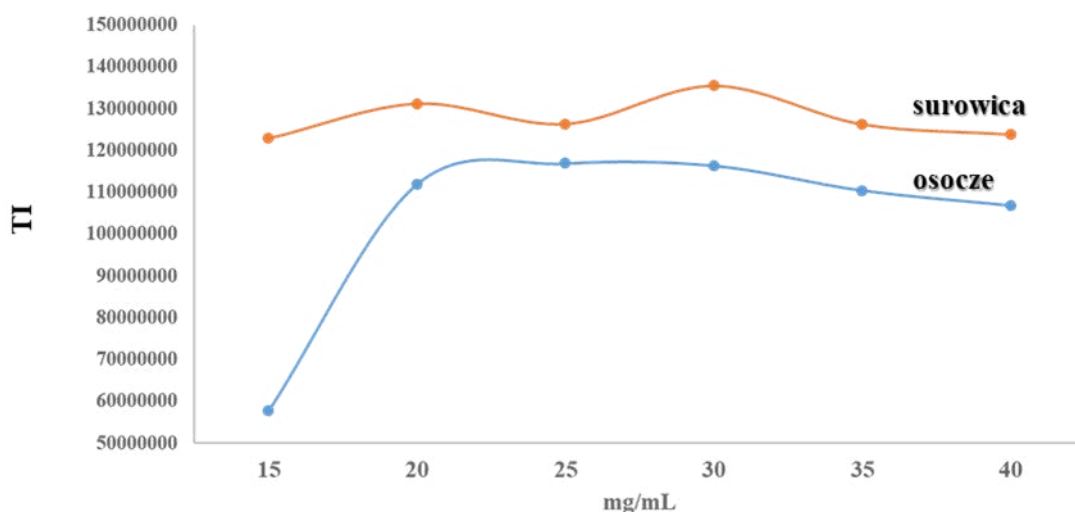
Rycina 10. Wykres przedstawiający logarytm wartości TI uzyskanej podczas analizy 75 MDMs przy użyciu GC-MS w próbkach panel (a) – osocze oraz panel (b) – surowicy.

Na podstawie wyników zaprezentowanych na powyższych rycinach wybrano najlepszą mieszaninę rozpuszczalników ekstrakcyjnych. Intensywności sygnałów uzyskane dla metabolitów wyekstrahowanych za pomocą MeOH:H₂O (v:v; 9:1) oraz MeOH:isoProp:H₂O (v:v:v; 3:3:2) były porównywalne. Analiza próbek osocza przygotowanych przy użyciu mieszaniny MeOH:H₂O (v:v; 9:1) umożliwiła uzyskanie RSD w zakresie od 10–20% dla 21 MDMs oraz poniżej 10% dla 51 MDMs. W przypadku analizy próbek surowicy, RSD mieściło się w zakresie 0,5–8,5% i 10,1%–19,7% odpowiednio dla 40 i 23 MDMs. Ekstrakcja metabolitów przy pomocy MeOH:isoProp:H₂O (v:v:v; 3:3:2) pozwoliła na uzyskanie wartości RSDs, które mieściły się w zakresie 0,7–9,5% i 10,2–19,6% odpowiednio dla 30 i 28 MDMs. Natomiast w próbkach osocza, wartości RSDs w zakresie 2,4–9,6% i 10,5–19,0% odpowiednio dla 22 i 30 MDMs. Ponadto w przypadku obu matryc uzyskane wartości RSDs obliczone na podstawie zmierzonych intensywności sygnałów po ekstrakcji z ACN, MeOH:isoProp:H₂O (v:v:v; 3:3:2) i MeOH:EtOH (v:v; 1:1) miały szerszy zakres RSDs i większą liczbę MDMs w zakresie RSD od 30% do 40% i powyżej 40%, niż przy użyciu pozostałych rozpuszczalników ekstrakcyjnych. Uzyskane wyniki badań pokazały, że najbardziej powtarzalna ekstrakcja była w przypadku zastosowania mieszaniny MeOH:H₂O (v:v; 9:1), która została wybrana do kolejnego etapu optymalizacji.

6.3. Dobór stężenia i objętości odczynnika do metoksymacji

W kolejnym etapie optymalizacji metody przygotowania próbek do pomiaru 75 MDMs porównano wpływ różnych stężeń i objętości odczynnika do MeOx, chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie, na efektywność procesu derywatywacji (**Rycina 11**). Najpierw sprawdzono sześć powszechnie stosowanych stężeń tego odczynnika w zakresie od 15 do 40 mg/ml (co 5 mg/ml), dodawanych w objętości 10 µl do obu matryc (po etapie silylacji uzupełnionych do objętości 120 µl heptanem, zawierającym IS2). W próbkach osocza intensywność pików dla większości analizowanych MDMs (46 z 75) zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia stosowanego odczynnika do MeOx do uzyskania stężenia 30 mg/ml, z pewnym wyjątkiem dla AAs. Intensywność analizowanych metabolitów zmniejszyła się, gdy stężenie chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie było wyższe niż 30 mg/ml. W próbkach surowicy najwyższą intensywność obserwowano przy użyciu stężenia 30 mg/ml. Wykorzystanie wyższych stężeń skutkowało uzyskaniem współmiernych intensywności pików dla metabolitów z wyjątkiem wyników uzyskanych dla kreatyniny (Cre) i AAs (Ala, Phe, metioniny (Met) i Thr). Intensywność pików tych AAs zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia odczynnika do MeOx. TI była najwyższa przy zastosowaniu stężenia 30 mg/ml

w próbkach surowicy oraz 25 mg/ml w próbkach osocza. Jako optymalną wartość do przygotowania obu rodzajów próbek wybrano stężenie chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie równe 30 mg/ml. Wyniki uzyskane dla MDMs po przygotowaniu próbek z wykorzystaniem wybranego stężenia odczynnika do MeOx charakteryzowały się najniższą wartością mediany dla RSD intensywności sygnałów, tj. 9,2% w osoczu i 6,4% w surowicy (**Tabela 4**). Obliczone wartości RSD były poniżej 20% dla 58 MDMs w osoczu i dla 71 MDMs w surowicy.



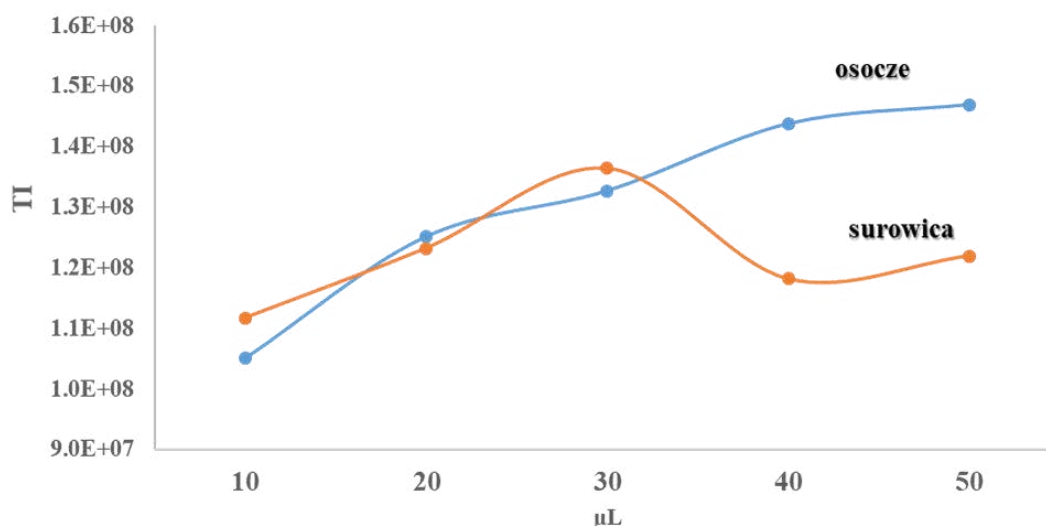
Rycina 11. Wykres zależności sumy intensywności sygnałów (TI) dla MDMs od użytego stężenia chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie.

Tabela 4. Porównanie wpływu różnych stężeń *O*-metoksyaminy HCl w pirydynie (mg/ml) na powtarzalność pomiaru 75 MDM w obu matrycach.

RSD [%]	15	20	25	30	35	40
	(mg/mL)					
	Liczba MDMs (osocze/surowica)*					
≤ 10	2/25	16/36	20/53	39/42	30/52	25/7
≤ 20	1/29	24/20	24/12	18/27	20/8	22/24
≤ 30	2/8	8/6	9/3	7/2	7/8	7/18
> 30	70/13	27/13	22/7	11/4	18/7	21/26
Mediana RSD [%]	84,3/14,7	18,6/11,0	16,4/6,7	9,2/6,4	14,2/9,0	14,0/25,1

* w tabeli przedstawiono liczbę MDMs z RSD dla osocza/surowicy ≤ 10–30% i powyżej 30%.

Następnie sprawdzono wpływ pięciu różnych objętości odczynnika do MeOx na efektywność procesu derywatywacji, tj. 10, 20, 30, 40 i 50 μL , o stężeniu 30 mg/mL (**Tabela 5**). Testy przeprowadzono stosując tą samą objętością odczynnika do silylacji (MSTFA z 1% TMCS), rozcieńczonego po silylacji do 120 μL przy pomocy heptanu zawierającego IS2. Wartości TI obliczone na podstawie sumy sygnałów wzrastały wraz ze wzrostem objętości testowanego odczynnika do MeOx (**Rycina 12**). Najwyższy TI zaobserwowano dla objętości 30 i 50 μL odpowiednio dla surowicy i osocza. W obu badanych matrycach najlepszą powtarzalność pomiaru ($\leq 20\%$ RSD) dla większości wykrytych MDMs uzyskano dla objętości 30 μL chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie. W próbkach osocza wartość mediany RSD była znacznie wyższa dla 10 i 20 μL w porównaniu z innymi wartościami (32,5% dla 10 μL , 29,2% dla 20 μL i 10,1–12,6% dla 30–50 μL). W próbkach surowicy mediana RSD dla wszystkich badanych objętości mieściła się w zakresie 5,0–11,1%. Dodatkowo zaobserwowano, że Lys i kwas askorbinowy nie były wykrywane w żadnej matrycy podczas analizy GC–MS, gdy stosowano objętość 10 i 20 μL MeOx. Natomiast 5–hydroksy–L–Trp był wykrywany tylko w próbkach osocza, niezależnie od objętości MeOx. Wyliczona wartość powtarzalności dla objętości 30 i 40 μL w surowicy była podobna (RSD dla 68 i 65 metabolitów $\leq 20\%$; mediana RSD odpowiednio 7,9 i 7,8%). Dodatkowo TI wszystkich MDM w surowicy był najwyższy dla 30 μL , dlatego w kolejnym kroku optymalizacji wybraliśmy tę objętość odczynnika MeOx do przygotowania obu rodzajów próbek.



Rycina 12. Wykres zależności sumy intensywności sygnałów (TI) analizowanych MDMs od użytej objętości chlorowodoru *O*-metoksyaminy w pirydynie.

Tabela 5. Porównanie wpływu różnych objętości *O*-metoksyaminy HCl w pirydynie (mg/ml) na powtarzalność pomiaru 75 MDM w obu rodzajach próbek.

RSD [%]	10	20	30	40	50
	μL				
	Liczba MDMs (osocze/surowica)*				
≤ 10	9/35	29/54	39/52	35/44	8/47
≤ 20	9/26	28/15	22/14	25/20	5/16
≤ 30	12/7	6/3	6/4	8/3	26/2
> 30	45/7	12/3	8/5	7/8	36/10
Median RSD [%]	32,5/11,1	29,2/5,0	12,6/7,9	10,1/7,8	10,4/8,8

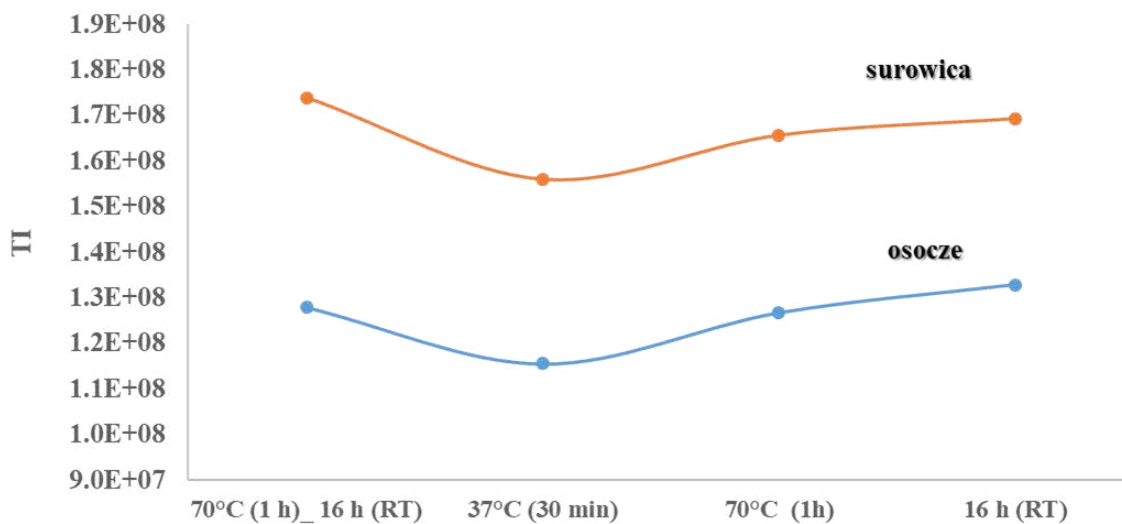
*w tabeli przedstawiono liczbę MDMs z RSD dla osocza/surowicy ≤ 10–30% i powyżej 30%.

6.4. Wpływ warunków metoksymacji oraz sililacji na efektywność derywatywacji

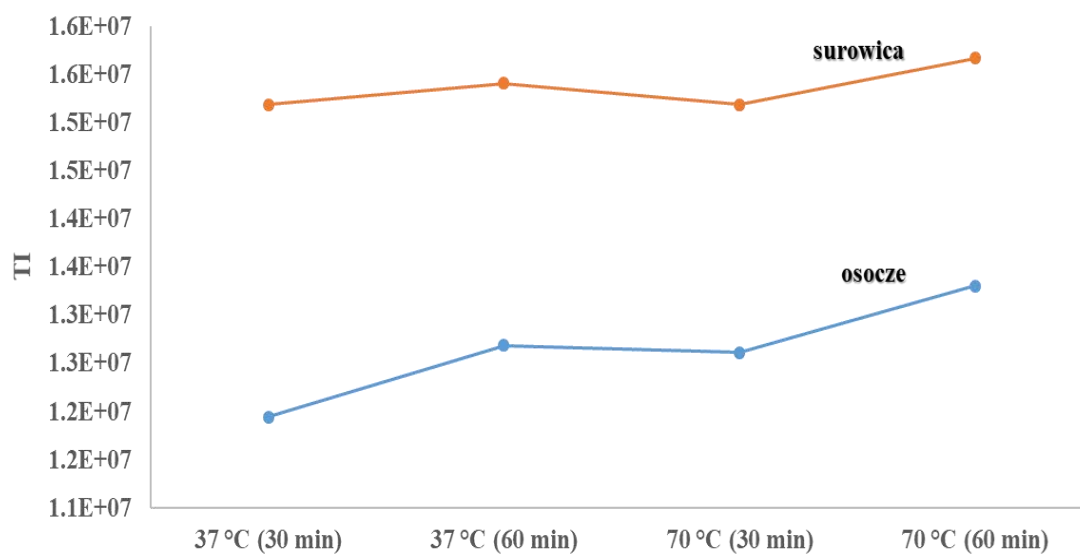
W kolejnym etapie porównano wpływ czasu i temperatury MeOX na efektywność procesu derywatywacji (**Rycina 13**). Przetestowano cztery programy MeOx najczęściej stosowane w badaniach metabolomicznych: (P1) 37°C przez 30 minut, (P2) 70°C przez 1 godzinę, (P3) RT przez 16 godzin oraz (P4) 70°C przez 1 godzinę, a następnie RT przez 16 godzin. Uzyskane wyniki dla wybranych zmiennych przedstawiono w **Tabeli 6**. Wartości powtarzalności wyliczone dla wszystkich MDMs w osoczu były podobne w każdym z rozpatrywanych wariantów. Obliczone wartości RSD dla ponad 70 MDMs były poniżej 20%, podczas gdy mediana RSD wahała się od 4,3 do 7,6%. MDMs wykryte w próbkach surowicy charakteryzowały się wyższą zmiennością pomiarów. Obliczone mediany RSDs mieściły się w zakresie od 9,4 do 18,5% dla wszystkich testowanych programów. Wartości RSD były powyżej 20% dla ponad 30 MDMs, gdy porównano wyniki dla wszystkich testowanych programów, z wyjątkiem MeOx przeprowadzonej dla programu P3. Natomiast wartości RSD były powyżej 30% dla 10 metabolitów, a średnie RSD dla parametru P3 było najniższe (9,4%). Zaobserwowano również różnice w intensywnościach sygnałów uzyskanych podczas pomiaru MDMs w obu badanych rodzajach próbek. Największą intensywność dla większości wykrytych MDMs (53 z 75) w obu matrycach zaobserwowano, gdy zastosowano program P3. Stosując program P1 uzyskano najniższą intensywność dla ponad 50 MDMs w osoczu oraz 48 MDMs w surowicy. Stwierdzono, że intensywność pików MDMs zwiększała się wraz z wydłużaniem czasu MeOx. W przypadku Gly odnotowano dwa piki chromatograficzne (Gly 2TMS i 3TMS). W tym przypadku powierzchnia piku Gly 3TMS wzrastała wraz ze wzrostem czasu reakcji i temperatury. Zaobserwowano również, że disacharydy były niecałkowicie metoksymowane w 37°C przez 30 minut (P1), o czym świadczy znaczne poszerzenie piku

spowodowane wieloma pochodnymi, których nie potwierdzono w 70°C. Więcej szczegółów dotyczących wyników znajduje się w publikacji nr 2 z cyklu.

a)



b)



Rycina 13. Wykres zależności sumy sygnałów dla 75 MDMs od użytego programu na etapie A) MeOX oraz B) sililacji.

Tabela 6. Porównanie wpływu różnych warunków na etapie MeOX na powtarzalność pomiaru 75 MDMs w obu rodzajach próbek.

RSD [%]	P1	P2	P3	P4
	Liczba MDMs (osocze/surowica)*			
≤ 10	63/28	55/23	70/39	61/24
≤ 20	12/15	16/22	4/19	12/16
≤ 30	0/5	2/15	1/7	0/1
> 30	0/27	2/15	0/10	2/34
Median RSD [%]	4,5/15,9	7,6/18,5	4,3/9,4	5,7/17,5

*w tabeli przedstawiono liczbę MDMs z RSD dla osocza/surowicy ≤ 10 –30% i powyżej 30% (P1– w 37°C przez 30 minut; P2 – w 70°C przez 1h; P3– 16 h w RT; P4– w 70°C przez 1 h, 16 h w RT).

Tabela 7. Porównanie wpływu różnych warunków na etapie silylacji na powtarzalność pomiaru 75 MDM w obu rodzajach próbek.

RSD [%]	37°C, 30 minut	37°C, 60 minut	70°C, 30 minut	70°C, 60 minut
	Liczba MDMs (osocze/surowica)*			
<5	38/25	37/17	41/24	37/38
<10	20/21	28/22	22/21	22/14
<15	8/14	7/10	7/13	8/10
<20	5/8	1/2	4/9	3/3
>20	4/7	2/24	1/8	5/10
Median RSD [%]	4,9/7,8	5,4/10,2	5,0/7,8	5,3/5,7

*w tabeli przedstawiono liczbę MDMs z RSD dla osocza/surowicy ≤ 10 –30% i powyżej 30%.

Ostatni test polegał na zbadaniu wpływu temperatury i czasu na proces silylacji. Pierwsza obserwacja (**Rycina 13**) była taka, że TI dla pików wszystkich MDMs było wyższe w surowicy niż w osoczu. Porównując TI dla pików MDMs w różnych warunkach dla obu matryc zaobserwowaliśmy, że TI był najwyższy dla programu 70°C przez 60 min, a TI była porównywalna dla programu przeprowadzonego w 37°C przez 60 min. W próbkach surowicy wyliczona mediana dla poszczególnych wartości RSD była najwyższa (10,2%), gdy zastosowano program 37°C przez 60 min, natomiast najniższą wartość mediany RSD (5,7%) osiągnięto dla programu inkubacji 70°C przez 60 minut (**Tabela 7**). Dodatkowo program ten był korzystny dla AAs i OrgAs, dla których ogólne wartości powtarzalności

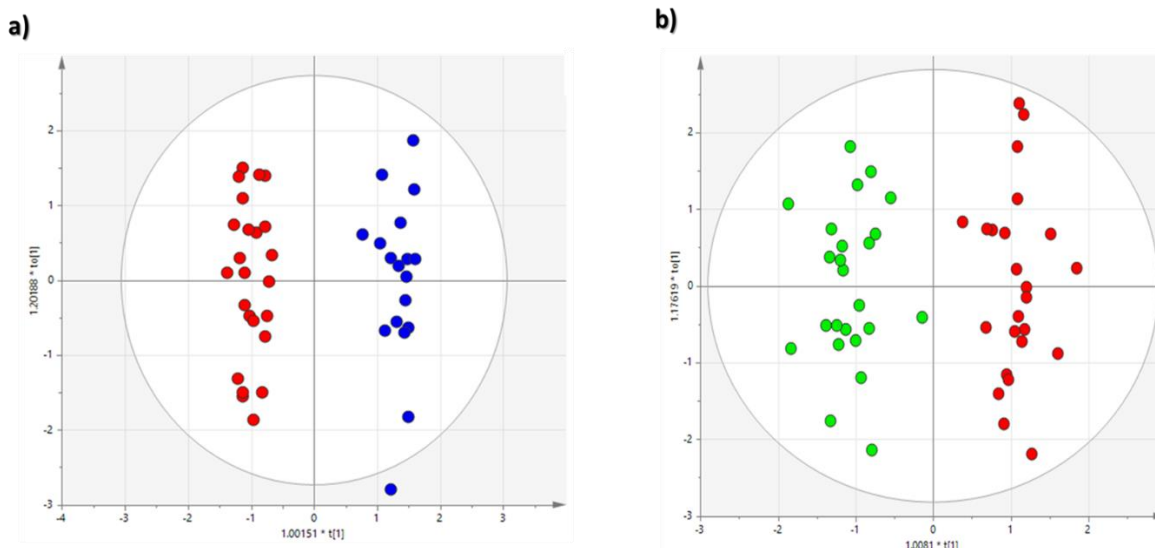
pomiaru poszczególnych metabolitów były najniższe. Zgodnie z wynikami uzyskanymi dla próbek osocza zaobserwowaliśmy, że wartość mediany RSD była porównywalna dla wszystkich programów (4,9–5,4%). Derywatywacja kwasów karboksylowych, takich jak kwas pirogronowy, glicerynowy i mlekowy przebiegała istotnie lepiej, gdy zastosowano program 37°C przez 30 minut, natomiast derywatywacja większości AAs i FAs przebiegała znacznie lepiej, gdy zastosowano program 70°C przez 60 minut. Ostatecznie, ze względu na porównywalne wartości mediany RSD uzyskane dla silicacji w temperaturze 70°C przez jedną godzinę w przypadku obu matryc (odpowiednio 5,3 i 5,7% dla osocza i surowicy), wybrany został ten program do przygotowania próbek przed analizą GC–MS.

6.5. Powtarzalność, odtwarzalność i stabilność pomiarów wybranych metabolitów

Zoptymalizowana metoda przygotowania próbek została oceniona pod kątem powtarzalności, odtwarzalności pomiarów oraz stabilności dla wybranych 75 MDMs. W próbkach osocza wartość mediany RSDs wyniosła 12,6%, w zakresie od 3,5% dla kwasu mlekowego do 37,3% dla Orn. Natomiast w próbkach surowicy mediana RSD wyniosła 13,6%, w zakresie od 4,6 % dla Thr do ponad 50% dla 5–hydroksy–L–Trp, Orn i kwasu asparaginowego. W próbkach osocza odtwarzalność pomiaru między sekwencjami wyniosła 23,5%, podczas gdy w próbkach surowicy odtwarzalność między sekwencjami wyniosła 23,0%. Podsumowując, zoptymalizowana metoda przygotowania próbek charakteryzowała się dobrą powtarzalnością i odtwarzalnością pomiaru MDMs należących do różnych klas, w tym AA, CARB i OrgAs. Uzyskane wyniki wskazują, że większość metabolitów była stabilna nawet po 48 godzinach po derywatywacji, a mediana RSD wahała się między 8,8–12,8% w osoczu i 6,6–9,4% w surowicy. Zaobserwowano, że Gln i kwas benzoesowy tracił stabilność po 8 godzinach, natomiast dwa AAs i FAs w osoczu i cztery AAs w próbkach surowicy zaczynały degradować po 36 godzinach. Więcej szczegółów dotyczących wyników powtarzalności, odtwarzalności oraz stabilności dla poszczególnych MDMs znajduje się w publikacji nr 2 z cyklu.

6.6. Wyniki badań metabolomicznych próbek klinicznych – publikacja nr 2

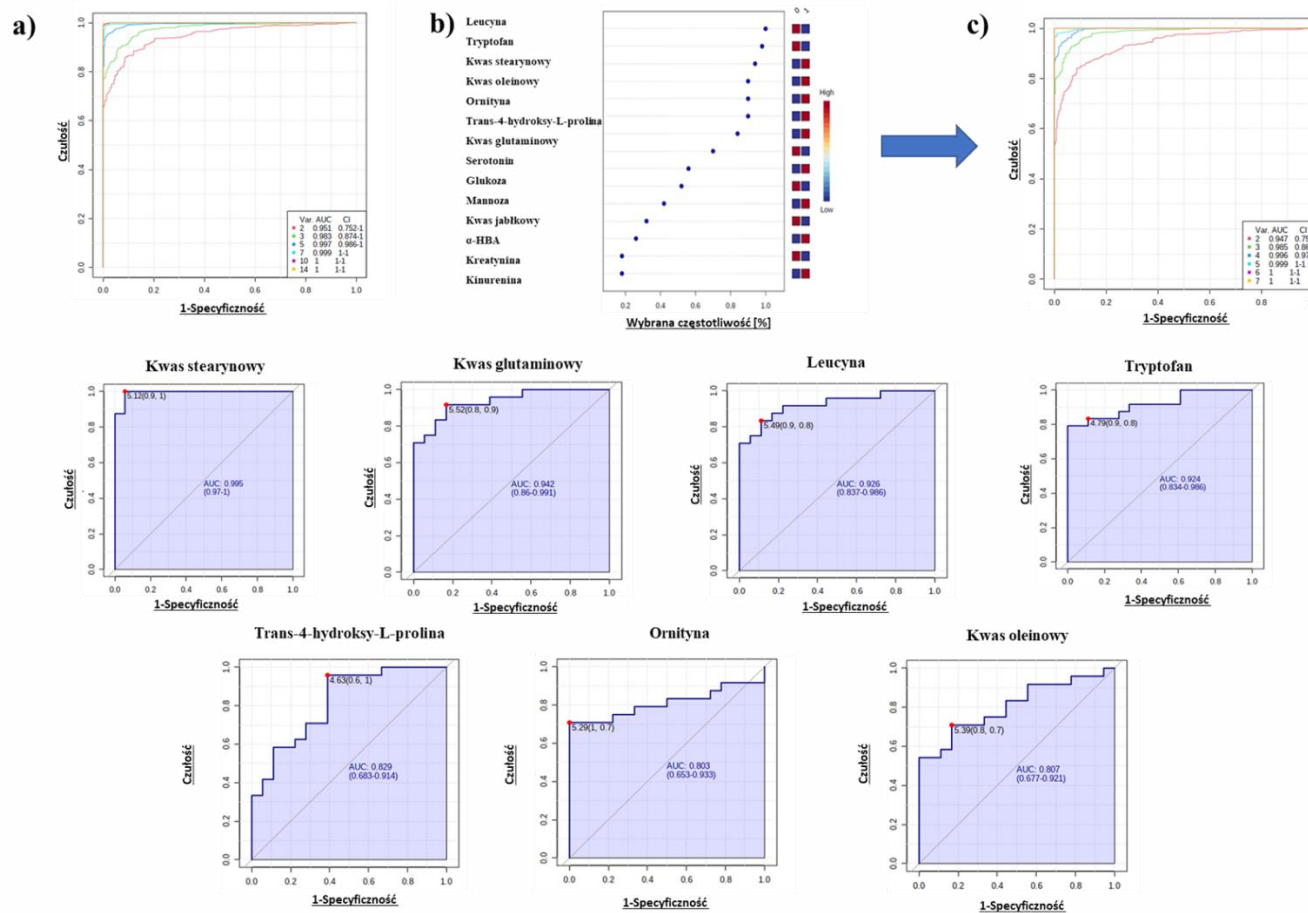
Aby ocenić jakość danych metabolomicznych przeprowadzono analizę PCA. Klastrowanie próbek QCs na wykresie PCA (umieszczonym w pracy badawczej nr 2 z cyklu) świadczy o dobrej jakości uzyskanych danych. Do klasyfikacji próbek wybrano modele OPLS–DA przygotowane dla następujących porównań: A) PreDiab_T2 vs. T2DM_T2 oraz B) ft2DM_T1 i T2DM_T2 (**Rycina 14**).



Rycina 14. Wykresy OPLS–DA przedstawiające klasyfikację próbek z grup ft2DM_T1 i T2DM_T2 oraz PreDiab_T2 i T2DM_T2 (ft2DM_T1 (zielone kółka), PreDiab_T2 (niebieskie kółka) i T2DM_T2 (czerwone kółka)). Wykres OPLS–DA (A) porównanie PreDiab_T2 vs. T2DM_T2 (skalowanie Pareto, $R^2 = 0,912$, $Q^2 = 0,803$) oraz B) ft2DM_T1 i T2DM_T2 (skalowanie Pareto; $R^2 = 0,970$, $Q^2 = 0,804$). Walidacja modeli przeprowadzona zgodnie z Ciborowski i współ.¹²⁶ wykazała prawidłową klasyfikację próbek w $94,5 \pm 5,2\%$ (model a) i $94,0 \pm 6,2\%$ (model b).

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między grupami PreDiab_T1 i ft2DM_T1 oraz PreDiab_T1 i PreDiab_T2. W przypadku porównania PreDiab_T2 i T2DM_T2 wykazano istotność statystyczną dla 18 MDMs, głównie AAs, FAs i CARBs. Dodatkowo dla zmierzonych metabolitów wyliczono wartości krotności zmian (z ang. *fold change*, FC). Wśród statystycznie istotnych metabolitów w grupie T2DM_T2 porównaniu z grupą PreDiab_T2 wzrósł poziom kwasu alfa hydroksymasłowego (α -HBA) (FC=1,24), Leu (FC=1,28), Gln (FC=1,48), Trp (FC=1,96), cysteiny (2,07) i kwasu stearynowego (z ang. *stearic acid*, SA) (FC=1,79), podczas gdy poziom Cre (FC=0,76), Glu (FC=0,65) i Orn (FC=0,63) zmalał. Dodatkowo potwierdzono zmiany w 12 MDMs w grupie ft2DM_T1 w porównaniu z grupą T2DM_T2. Wśród statystycznie istotnych metabolitów poziom fenyloalaniny (FC=1,67), kwasu palmitynowego (z ang. *palmitic acid*, PA) (FC=2,28) oraz kwasu palmitoleinowego (FC=2,13) wzrósł, podczas gdy poziom His (FC=0,83) oraz Glu (FC=0,82) spadł w grupie T2DM_T2 w porównaniu z ft2DM_T1. Więcej szczegółów dotyczących wyników dla poszczególnych MDMs znajduje się w publikacji nr 2 z cyklu.

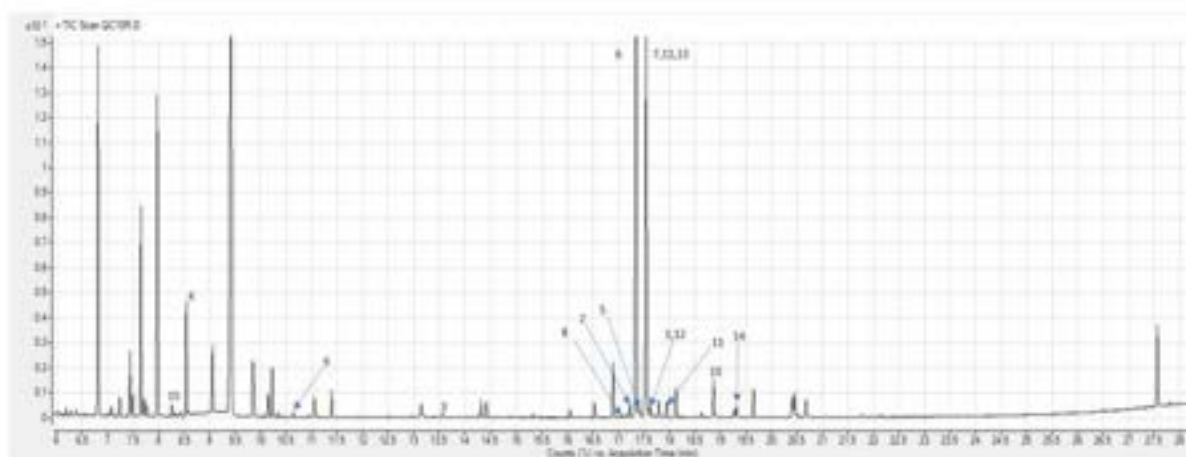
W celu sprawdzenia przydatności istotnych statystycznie metabolitów jako potencjalnych biomarkerów pozwalających na różnicowanie pacjentów w stanie przedcukrzycowym od pacjentów z T2DM wykonano analizy krzywych ROC (rycina 15 A). Krzywe ROC zostały skonstruowane dla 18 istotnych statystycznie MDMs na podstawie ich intensywności w badanych próbkach. Następnie, aby uzyskać lepszy klasyfikator do sporządzenia kolejnej krzywej ROC, wybrano siedem MDMs (pięć AAs oraz dwa FAs) wykazujących wysoką moc dyskryminacyjną (**rycina 15 C**).



Rycina 15. Panel metabolitów różnicujący stan przedcukrzycowy od T2DM. (a) krzywe ROC i wartości AUC w oparciu o model klasyfikacji maszyna wektorów nośnych (z ang. *support vector machine*, SVM) dla wszystkich istotnych statystycznie metabolitów; (b) – wykres najważniejszych i najczęściej wybieranych zmiennych podczas analizy ROC; (c) – krzywe ROC i wartości AUC w oparciu o model klasyfikacji SVM dla 7 MDMs; (d) krzywe ROC dla poszczególnych metabolitów.

6.7. Wyniki badań metabolomicznych próbek klinicznych – publikacja nr 3

Po wstępnej obróbce danych (dekonwolucja, wyrównanie, normalizacja danych i filtrowanie), uzyskano 125 cech metabolicznych z czego 58 metabolitów o RSD poniżej 30% w próbkach QCs. Przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała różnic w poziomach metabolitów między badanymi grupami w próbkach pobranych na czczo. Również w przypadku nosicieli genotypu LR nie zaobserwowaliśmy żadnych istotnych statystycznie MDMs po spożyciu obu posiłków. Natomiast u mężczyzn będących nosicielami genu wysokiego ryzyka, zaobserwowaliśmy zmiany w poziomie 11 MDMs po spożyciu posiłku WW i 5 MDMs po posiłku NC. Na **Rycinie 16** przedstawiono przykładowy chromatogram próbki osocza na którym zaznaczono istotne statystycznie MDMs.



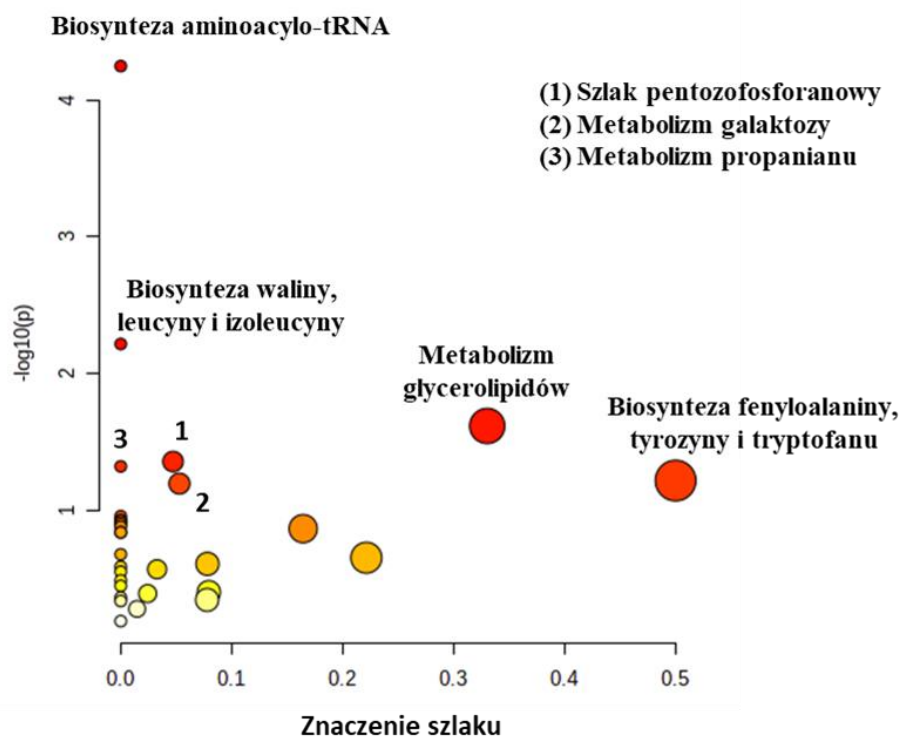
Rycina 16. Przykładowy chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki osocza techniką GC–MS. Na rycinie zaznaczono istotne statystycznie MDMs: 1. Ala, 2. His, 3. Cre, 4. Norleucyna, 5. Galaktozamina, 6. Galaktoza, 7. Alloza, 8. Fruktaza, 9. Kwas glicerynowy, 10. Kwas palmitynowy, 11. 5-Keto-D-glukonian, 12. Kwas glukonowy, 13. Tyramina, 14. Kwas moczowy, 15. Kwas alfa-hydroksymasłowy.

Szczegółowe wyniki przedstawione są na **Rycinie 17** oraz w pracy nr 3, będącej częścią niniejszej rozprawy.

	<u>Posilek WW</u>		<u>Posilek NW</u>	
AAs	Alanina		Alanina	↑
	Histydyna	↑	Histydyna	
	Kreatynina	↓	Kreatynina	
	Norleucyna		Norleucyna	↑
CARBs	Galaktozamina	↑	Galaktozamina	
	Galaktoza	↑	Galaktoza	
	Alloza	↑	Alloza	
	Fruktoza	↑	Fruktoza	
	Kwas glicerynowy		Kwas glicerynowy	↑
	Kwas glukonowy		Kwas glukonowy	↑
HA	5-keto-D-glukonian	↑	5-keto-D-glukonian	
	Kwas α -hydroksymasłowy	↑	Kwas α -hydroksymasłowy	
FA	Kwas palmitynowy	↑	Kwas palmitynowy	↑
PH	Tyramina	↑	Tyramina	
PU	Kwas moczowy	↓	Kwas moczowy	

Rycina 17. Metabolity zmieniające się w sposób istotny statystycznie po spożyciu posiłku NW i/lub WW. AA – aminokwasy, CARB – węglowodany, HA – kwasy hydroksylowe, FA – kwasy tłuszczowe, PH – puryny, KA – ketokwasy. Strzałkami oznaczono metabolity istotne statystycznie. Czerwone strzałki wskazują spadek, natomiast zielone strzałki wzrost poziomu metabolitów u pacjentów z genem ryzyka w porównaniu do pacjentów z genotypem LR.

Dodatkowo analiza przeprowadzona z wykorzystaniem platformy MetaboAnalyst 5.0 pozwoliła na przypisanie istotnych statystycznie metabolitów do odpowiednich szlaków metabolicznych. Należą one m.in. do takich szlaków, które mogą brać udział w rozwoju T2DM, tj.: metabolizm cukrów, glicerolipidów, histydyny czy szlak pentozofosforanowy (**Rycina 18**).



Rycina 18. Szlaki metaboliczne do których należą istotne statystycznie metabolity wykryte metodą GC–MS.

7. Dyskusja

Rozwój technik analitycznych o wysokiej przepustowości, m.in. spektrometrii mas w połączeniu z GC, przyczynił się do powstania nowych metod analitycznych¹⁰. Umożliwiają one jednoczesną analizę szerokiego spektrum metabolitów, należących do różnych klas w złożonych próbkach biologicznych takich jak kał, mocz czy krew⁶. Kał jest materiałem biologicznym często wykorzystywanym do badań nad GM oraz rozwojem T2DM¹²⁷, ponieważ jego skład może bezpośrednio odzwierciedlać stan mikrobiomu jelitowego, a także całego układu pokarmowego¹⁰. Jednak w wielu badaniach poświęconych GM oraz MDMs materiałem wykorzystanym do badań są także surowica czy osocze^{30,81,128}. Stężenie MDMs może być niższe w krwiobiegu niż w kale⁶, mimo to związki te mogą odgrywać ważną rolę w modulowaniu metabolizmu organizmu gospodarza, a także mogą świadczyć o pojawieniu się początkowych zaburzeń metabolicznych prowadzących do rozwoju T2DM⁸⁹. W związku z powyższym uzasadnione było opracowanie kompleksowej i wydajnej metody przygotowania próbek osocza oraz surowicy do pomiaru MDMs. W oparciu o dostępne doniesienia literaturowe jako platformę analityczną odpowiednią do wykonywania tego typu analiz

wybrano GC–MS¹⁰. Przegląd literatury pokazał, że do badań z wykorzystaniem GC–MS stosowanych może być wiele różnych protokołów przygotowania próbek osocza czy surowicy^{30,94,113,121,123,124,129}. Protokoły te różnią się rodzajem stosowanych rozpuszczalników lub warunków inkubacji oraz odczynników użytych na etapie derywatywacji. Pomimo dużego zróżnicowania sposobów przygotowania próbek do badań metabolomicznych, do tej pory ukazało się niewiele prac optymalizacyjnych porównujących wyżej wspomniane zmienne^{101,130-134} w różnych rodzajach próbek. Dlatego też wybrano najczęściej używane rozpuszczalniki i warunki na etapie derywatywacji, a następnie zoptymalizowano protokół przygotowania próbek osocza i surowicy oceniając powtarzalność, odtwarzalność oraz intensywność sygnału wybranych MDMs.

7.1. Dobór rozpuszczalników do ekstrakcji

Powszechnie wiadomo, że w procesie analitycznym istotne znaczenie ma rozpuszczalnik użyty do ekstrakcji analitów. Rodzaj rozpuszczalnika wpływa na efektywność procesu ekstrakcji tj. liczbę, rodzaj i intensywność sygnału uzyskanego dla metabolitów wyekstrahowanych z próbki¹²⁴. Przygotowanie próbek do analiz metabolomicznych najczęściej obejmuje jednoczesne strącenie białek i ekstrakcję metabolitów przy użyciu rozpuszczalnika dodawanego do próbki w stosunku objętościowym 1:3 bądź 1:4. Zazwyczaj dodawany jest zimny rozpuszczalnik, aby zminimalizować stopień konwersji enzymatycznej metabolitów oraz celem poprawy efektywności wytrącania białek¹³⁵. Dlatego w pierwszym etapie badań przetestowano najczęściej stosowane rozpuszczalniki do ekstrakcji metabolitów. Pośród niewielu prac porównujących wpływ różnego rodzaju rozpuszczalników na ekstrakcję metabolitów z próbek osocza oraz surowicy^{104,107,135,136}, w żadnej nie porównywano warunków ekstrakcji w kontekście tak dużej liczby MDMs. W jednej z prac porównano siedem różnych rozpuszczalników do ekstrakcji metabolitów, ale dla metabolomiki opartej na LC–MS. Najlepszą powtarzalność wyników uzyskano stosując do ekstrakcji MeOH:EtOH lub MeOH¹³⁵. W badaniach stanowiących podstawę niniejszej pracy również najlepsze rezultaty zaobserwowano dla MeOH, ale z dodatkiem H₂O w stosunku objętościowym 9:1. W badaniu przedstawionym przez Trygg i współ.¹⁰⁴ pokazano, że wykorzystanie mieszaniny MeOH:H₂O (v/v; 8:1) do ekstrakcji dziesięciu metabolitów z próbek osocza celem analizy na GC–MS zapewniało optymalne wyniki pod względem kompletności, wydajności i powtarzalności procesu ekstrakcji w porównaniu z innymi badanymi rozpuszczalnikami (EtOH, ACN, aceton, chloroform). Obserwacje te są zgodne z wynikami przedstawionymi w niniejszej rozprawie. W innym badaniu sprawdzano wpływ podstawowych rozpuszczalników (aceton, ACN, EtOH,

MeOH i H₂O) i wykazano, że ekstrakcja MeOH z dodatkiem wody pozytywnie wpływa na ekstrakcję metabolitów polarnych dzięki czemu intensywność pików rejestrowanych dla tej grupy związków była wyższa¹⁰⁷.

7.2. Optymalizacja warunków podczas dwustopniowej derywatywacji

Dane literaturowe^{102,130,134} wskazują, że wiele parametrów, które mogą być modyfikowane na obu etapach derywatywacji (MeOx i silylacja) metabolitów przed analizą GC–MS ma wpływ na szybkość i kompletność tego procesu, co może bezpośrednio wpływać na powtarzalność i odtwarzalność pomiarów. Dodatkowo, ze względu na degradację analitów, trudno jest uzyskać dobrą powtarzalność wyników podczas derywatywacji wykonywanej w sposób manualny, ponieważ czas między zakończeniem procesu derywatywacji, a analizą GC różni się w zależności od analizowanej próbki¹³⁰. Pomimo tego podejmowane były próby ulepszenia procedury przygotowania próbek do badań metabolomicznych przy użyciu GC–MS^{102,130,134}. Natomiast w żadnej z tych prac nie przedstawiono dokładnie zoptymalizowanej metody, uwzględniającej wpływ szeregu parametrów na profilowanie tak dużej liczby metabolitów w próbkach osocza i surowicy. Wyniki kompleksowej optymalizacji zostały przedstawione w publikacji nr 2 będącej częścią niniejszej rozprawy. W badaniach tych przeprowadzono bezpośrednie porównanie wpływu różnych zmiennych na proces derywatywacji 75 MDMs w obu matrycach.

7.2.1. Wpływ stężenia oraz objętości odczynnika do metoksymacji

W celu poprawy efektywności detekcji metabolitów w procesie przygotowania próbek wybrano dwustopniową derywatywację tj. MeOx przy użyciu chlorowodoru *O*-metoksyminy w pirydynie oraz silylację. Na podstawie dokonanego przeglądu literatury zauważono, że w większości opisanych protokołów przygotowania próbek osocza lub surowicy po osuszeniu ekstraktu w koncentratorze próżniowym w procesie MeOx dodawano 50–125 µl chlorowodoru *O*-metoksyminy o stężeniu 15–40 mg/ml^{1,7,30,42,108,124,137}. W żadnym z wcześniejszych doniesień literaturowych^{102,108,124,130,134,138}, nie przedstawiono informacji dotyczących wpływu stężenia odczynnika do MeOx na proces derywatywacji. Zgodnie z danymi literaturowymi najczęściej stosowane stężenie odczynnika do MeOx to 20 mg/ml. W badaniach przedstawionych przez Eylem i współ. stwierdzono silną korelację między intensywnością sygnału a stężeniem odczynnika do MeOx, natomiast nie przedstawiono szczegółów¹⁰⁷. Do optymalizacji autorzy zastosowali stężenie 30 mg/ml, chociaż objętość MeOx była inna niż ta wybrana przez nas. W badaniach będących częścią niniejszej rozprawy,

ze względu na lepszą powtarzalność wyników dla obu matryc oraz stosunkowo dużą intensywność sygnału dla większości badanych metabolitów, wybrano stężenie 30 mg/ml. W badaniu przedstawionym przez Fritsche–Guenter i współ.¹³⁴ zoptymalizowana metoda przygotowania próbek była w pełni zautomatyzowana, a analiza otrzymanych wyników potwierdziła, że intensywności metabolitów zmniejszały się wraz ze wzrostem stężenia odczynnika do MeOx.

Na etapie optymalizacji objętości roztworu chlorowodoru *O*-metoksyaminy HCl w pirydynie objętość odczynnika dodawanego na etapie sililacji była taka sama jak objętość odczynnika do MeOx. Takie podejście jest stosowane w wielu badaniach metabolomicznych próbek osocza czy surowicy techniką GC–MS^{102,139}. W innych badaniach wykazano, że wydajną derywatyzację można uzyskać poprzez zmniejszenie ilości MeOx i zwiększenie ilości odczynnika do sililacji⁹⁴, ale ta zależność nie była przez nas sprawdzana. W innej pracy optymalizacyjnej¹³⁰, w której porównywano wyniki uzyskane przy użyciu różnych objętości roztworu *O*-metoksyaminy HCl w pirydynie i MSTFA z 1% TMCS okazało się, że powierzchnie pików analizowanych metabolitów wzrastały wraz ze wzrostem objętości obu odczynników użytych do derywatywacji, co jest zgodne z naszymi wynikami (praca nr 2 wchodząca w skład rozprawy). W badaniu przeprowadzonym przez Bekele i współ.¹⁰¹ zaobserwowano podobny związek między objętością dodawanych odczynników do derywatywacji, a wzrostem liczby oraz intensywności wykrytych metabolitów.

7.2.2. Wpływ temperatury oraz czasu na proces derywatywacji

Kompletność procesów MeOx oraz sililacji zależy od czasu i temperatury inkubacji¹³⁰. W pracach optymalizacyjnych dużo uwagi poświęca się wpływie tych parametrów na efektywność procesu derywatywacji^{108,130}. Najczęściej stosowane warunki MeOx obejmują reakcję w wysokiej temperaturze przez krótki czas lub w niskiej temperaturze przez dłuższy czas. Proces inkubacji prowadzony w wyższej temperaturze i przez dłuższy czas może zapewniać zakończenie MeOx, jednak może to również skutkować postępującą degradacją niestabilnych termicznie metabolitów¹⁰¹. W celu poprawy jakości analiz metabolitów i ich odtwarzalności, jednocześnie minimalizując degradację chemiczną i fizyczną, nieuniknione są kompromisy. Tym bardziej, że wyniki uzyskane w testowanych warunkach temperaturowych różnią się dla każdego metabolitu, chociaż w zakresie różnych klas zauważono pewne trendy. Uważa się, że wyższa temperatura MeOx zwiększa wydajność derywatywacji poprzez zwiększenie rozpuszczalności metabolitów. Bekele i współ.¹⁰¹ stwierdzili, że warunki niskotemperaturowe w krótkim czasie były najkorzystniejsze dla OrgA i AAs, podczas gdy

niska temperatura MeOx przez dłuższy czas lub wysoka temperatura przez krótki czas była najkorzystniejsza dla α -ketokwasów. Według Miyagawa i Bamba¹³⁰ disacharydy nie są w pełni metoksymowane w temperaturze 37°C przez 30 minut. Skutkuje to znacznym poszerzeniem pików spowodowanym obecnością wielu pochodnych, co również zaobserwowano na etapie optymalizacji metody w badaniach opisywanych w niniejszej rozprawie. W innym badaniu zaobserwowano, że metabolity takie jak glukoza czy fruktoza (Fruc) są częściowo metoksymowane w 30°C przez 45 minut, a sacharoza ulega hydrolizie do glukozy i Fruc w 100°C, gdy proces trwa dłużej niż 45 minut¹³¹. Wyniki MeOx w 37°C przez minimum 60 minut okazały się lepsze pod względem wykrywania glukozy i maltozy¹³⁰. Sterole są często derywatyzowane w temperaturze 60–100°C, ale w innym badaniu zaobserwowano degradację tych metabolitów w temperaturze 70°C¹³⁰. Powtarzalność była lepsza dla wszystkich klas, gdy inkubację wykonywano w temperaturze 60°C przez 30 minut. Według Pasikanti i współ.¹³² inkubacja na etapie MeOx musi być wykonywana przez stosunkowo długi czas (do 17 godzin) i/lub w wysokiej temperaturze, aby zapewnić całkowitą derywatyzację. Tak samo jak w badaniu przedstawionym przez Musharraf i współ.¹³³, w którym MeOx przez 16 godzin okazała się najlepsza pod względem liczby wykrywanych metabolitów, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy.

Na koniec porównano warunki dla ostatniego etapu przygotowania próbek – silylacji. Jest to klasyczna metoda derywatyzacji stosowana w celu wprowadzenia grupy silylowej do metabolitu poprzez zastąpienie aktywnych atomów wodoru (grup karboksylowych, aminowych i hydroksylowych) w celu wytworzenia stabilnych, bardziej lotnych i mniej polarnych metabolitów. Do derywatyzacji endogennych metabolitów stosowanych jest kilka odczynników. Jak już zostało wspomniane we wstępie niniejszej rozprawy, najpopularniejsze odczynniki do silylacji to MSTFA i BSTFA, z katalizatorem (1% TMCS) lub bez. W przypadku próbek osocza, MSTFA z 1% TMCS zapewnia bardziej powtarzalne wyniki i umożliwia wykrycie większej liczby metabolitów w porównaniu do BSTFA z 1% TMCS¹⁰². Doniesienia literaturowe wskazują również, że MSTFA jest lepszy od BSTFA pod względem kompletności silylowania metabolitów należących do AAs i amin⁹⁴. W innym badaniu potwierdzono, że MSTFA z 1% TMCS zapewnia bardziej powtarzalne wyniki oraz umożliwia identyfikację w próbkach osocza większej liczby pochodnych niż w przypadku zastosowania BSTFA z 1% TMCS. W związku z powyższym nie sprawdzano wpływu obu tych odczynników na efektywność procesu silylacji i wybrano MSTFA z 1% TMCS.

Podobnie jak na pierwszym etapie, temperatura i czas podczas sililacji wpływają na szybkość reakcji i kompletność procesu. Zaobserwowano wiele zmian w intensywnościach pików metabolitów w różnych matrycach biologicznych dla różnego czasu i temperatury sililacji¹⁰⁷. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi sililację najczęściej przeprowadza się w temperaturze od 30 do 70°C, w czasie od 30 do 120 minut^{84,94,102,140}. W badaniach opisanych w publikacji nr 2 będącej częścią niniejszej rozprawy testowano najczęściej stosowane warunki na tym etapie (37°C i 70°C przez odpowiednio 30 i 60 minut). Długotrwała i wysokotemperaturowa sililacja była korzystna dla metabolitów należących do FAs i CARBs. Z drugiej strony, warunki te miały znikomy wpływ na OrgA i AAs. Trudno jest dostosować dogodne warunki, w których wszystkie grupy funkcyjne byłyby przekształcone w pochodne bez jakichkolwiek strat. Dzieje się tak dlatego, że kinetyka reakcji różni się między konkretnymi grupami związków posiadającymi różne grupy funkcyjne. Idealnym byłoby, gdyby sililacja każdej grupy metabolitów została ukończona w odpowiednim dla danej grupy czasie, co jest niemożliwe przy kompleksowych analizach złożonych próbek biologicznych. Wyzwaniem pozostaje zatem zakończenie reakcji bez efektu degradacji części metabolitów. Wykazano, że metabolity zawierające grupy hydroksylowe, karboksylowe i ketonowe ulegają derywatywacji w ciągu pięciu godzin od dodania odczynnika do sililacji, podczas gdy derywatywacja grup aminowych nadal zachodzi po jednym dniu, kiedy inne produkty zaczynają już degradować¹⁴¹.

W badaniach Danielsson i współl. zostało potwierdzone, że do zakończenia procesu derywatywacji potrzebny jest długi czas inkubacji¹⁴⁰. W naszych badaniach (publikacja 2 z cyklu) zastosowano 16 godzin inkubacji w temperaturze pokojowej dla MeOx oraz jedną godzinę w temperaturze 70°C dla sililacji. W wielu artykułach zostało podkreślone, że dłuższa MeOx w niskiej temperaturze w połączeniu z wysoką temperaturą sililacji daje podobne wyniki do krótkotrwałej MeOx w wysokiej temperaturze w połączeniu z niską temperaturą sililacji¹⁰¹, co jest zgodne z uzyskanymi przez nas wynikami. Musharraf i współl. potwierdzili, że najlepsze wyniki pod względem liczby wykrywanych metabolitów otrzymano dla MeOx przez 16 godzin i jednogodzinnej sililacji¹³³.

7.3. Dysbioza jelitowa, a rozwój cukrzycy typu 2

Dysbioza jelitowa może być kluczowym elementem rozwoju i progresji T2DM⁸⁶. Duże badanie kohortowe wykazało różnice w składzie GM pomiędzy osobami z prawidłową tolerancją glukozy, nieprawidłową glikemią na czczo, nieprawidłową tolerancją glukozy i T2DM¹⁴². Dowodzi to, że GM odgrywa ważną rolę w rozwoju T2DM poprzez regulację

ogólnoustrojowej insulinowrażliwości¹⁴³. W innym badaniu przedstawiono zależność pomiędzy GM a T2DM. Liczebność bakterii z rodzaju *Clostridium* i *Firmicutes* była znacznie obniżona u pacjentów z T2DM, podczas gdy ilość bakterii z klasy *Betaproteobacteria* była znacznie podwyższona i dodatnio skorelowana z poziomem glukozy w osoczu²⁵. Wykazano także, że GM poprzez SCFAs i ich wiązanie z FFAR2 wpływa na produkcję kluczowych cząsteczek sygnałowych insuliny, takich jak GLP-1 i PYY, mających korzystne działanie zmniejszające oporność na insulinę i funkcjonalność komórek β ¹⁴⁴. Dowiedziono, że u pacjentów z potwierdzoną T2DM (w porównaniu do grupy kontrolnej) wzrasta liczba czterech gatunków *Lactobacillus* w jelitach, podczas gdy liczebność pięciu gatunków *Clostridium* obniża się³⁷. W tym samym badaniu wykazano, że dysbioza GM wpływa na poziom metabolitów w krwiobiegu i przyczynia się do rozwoju T2DM. Ponadto potwierdzono, że liczba komórek bakteryjnych *Lactobacillus* była dodatnio skorelowana z FG i HbA1c, natomiast *Clostridium* była ujemnie skorelowana z HbA1c, FG, peptydem C, insuliną i triacyloglicerolami oraz dodatnio skorelowana z HDL i adiponektyną¹⁴⁵. Powyższe doniesienia wskazują, że dysbioza jelitowa powiązana jest rozwojem T2DM, a zmiany w profilu bakterii jelitowych wpływają na skład związków drobnocząsteczkowych obserwowanych w krwiobiegu. Analiza próbek klinicznych pozwoliła na ocenę zmian w poziomie MDMs w kontekście rozwoju T2DM i wpływu posiłków o różnym składzie na zmiany w profilu metabolitów u osób z predyspozycją genetyczną do rozwoju T2DM. Poniżej przedstawiona została interpretacja uzyskanych wyników badań z podziałem na różne klasy MDMs.

7.3.1. Wpływ metabolitów z grupy węglowodanów na rozwój cukrzycy typu 2

GM mają korzystny wpływ na organizm poprzez produkcję SCFAs pochodzących z fermentacji CARBs, a niewystarczająca produkcja SCFAs jest związana z T2DM¹⁴⁶. Bakterie jelitowe są również odpowiedzialne za rozkład niestrawionych przez enzymy CARBs do cukrów prostych i SCFAs. W pracy nr 3 wchodzącej w skład cyklu publikacji zbadano wpływ posiłku WW oraz NW na profil osocza osób z allelem ryzyka rozwoju T2DM w genie *PROX1* (rs340874) oraz osób z allelem ochronnym (grupa kontrolna). Po posiłku WW zaobserwowano znacznie wyższy poziom galaktozy (Gal), Fruc i galaktozaminy u osób z grupy ryzyka w porównaniu do osób z grupy kontrolnej.

Zaburzenia poposiłkowego metabolizmu Gal mogą prowadzić do długotrwałego, stopniowego wzrostu poziomu glukozy w osoczu i przyczyniać się do rozwoju IR¹⁴⁷. Badania na ludziach wykazały, że oprócz Gal, także Fruc może negatywnie wpływać na homeostazę

glukozy we krwi. Fruc wywołuje stres oksydacyjny w mitochondriach i stłuszczenie wątroby prowadząc do IR, wpływa też na adipocyty, komórki śródbłonka naczyń i komórki wysp trzustkowych, a efekty tego działania mogą prowadzić także do rozwoju IR¹⁴⁸. Fruc po spożyciu może ulec utlenieniu, zostać przekształcona w glukozę lub kwas mlekowy czy też wejść w lipogenezę *de novo*. Po spożyciu dużych ilości Fruc podwyższony poziom wątrobowego acetylo-CoA prowadzi do zwiększonej produkcji lipoprotein o bardzo małej gęstości i triacylogliceroli, które są związane z rozwojem T2DM. Ponadto sugeruje się, że galaktozamina może być predyktorem przyszłego rozwoju T2DM¹⁴⁹, chociaż brakuje dokładnych danych dotyczących zależności pomiędzy tym metabolitem a IR lub wydzielaniem insuliny¹⁵⁰. W badaniu przeprowadzonym przez Connelly i współ. stwierdzono również, że potrzebne są dalsze badania w celu ulepszenia modeli predykcyjnych dla T2DM, wykorzystujących właśnie galaktozaminę¹⁵¹.

7.3.2. Wpływ metabolitów z grupy kwasów tłuszczowych na rozwój cukrzycy typu 2

Metabolizm CARBs i tłuszczów są ze sobą ściśle powiązane⁷. FFAs w osoczu mogą być syntetyzowane endogennie z nadmiaru CARBs w procesie lipogenezy *de novo*. Ten proces jest stymulowany przez insulinę we krwi i hamowany przez wysoki poziom hormonów takich jak adrenalina i glukagon. FAs zaangażowane w ten szlak, zostały opisane jako przyczyna i konsekwencja rozwoju T2DM^{152,153-155}. Ponadto dobrze wiadomo, że T2DM i zaburzenia lipidowe (z udziałem FFAs)⁷ są ze sobą ściśle powiązane.

Zmiany w składzie GM mogą także mieć wpływ na poziom lipidów i FAs w krwiobiegu. Zaburzony metabolizm lipidów może wywoływać zmiany w środowisku jelitowym, które mogą prowadzić do dysbiozy GM¹⁵⁶. GM może zmieniać strukturę nabłonka pokrywającego jelita oraz szczelność jelita, regulować metabolizm cholesterolu w wątrobie oraz magazynowanie lipidów w tkance tłuszczowej, a także pobudzać utlenianie lipidów w mięśniach, wpływając w ten sposób na równowagę metaboliczną lipidów¹⁵⁷. Dane przedstawione przez Org i współ. wykazały, że stężenie zarówno nienasyconych, jak i nasyconych FAs w surowicy oraz osoczu na czczo jest silnie związane ze zwiększoną liczebnością komórek bakteryjnych w GM z rodzajów takich jak *Blautia* i *Dorea* oraz zmniejszoną liczebnością *Coprococcus* i *Peptococcaceae*³⁰.

Ponadto, w wielu badaniach metabolomicznych potwierdzone zostało znaczenie FAs w profilaktyce wystąpienia T2DM. Wyniki naszych badań wykazały istotne statystycznie zmiany w poziomie FAs (kwas oleinowy (z. ang. *oleic acid*, OA), SA, PA). Upośledzenie

wydzielenia insuliny, wrażliwości na insulinę czy nietolerancja glukozy są bardzo wyraźnie związane z podwyższonym poziomem nasyconych FAs w osoczu czy surowicy (w tym PA czy SA)^{154,158}. Potwierdzono, że poziomy tych FAs były istotnie wyższe zarówno u nowo zdiagnozowanych^{4,159}, jak i długoterminowo monitorowanych pacjentów z T2DM¹⁵⁵, co jest zgodne z wynikami przedstawionymi w niniejszej pracy. Podwyższony poziom PA w osoczu może przyczyniać się do hiperinsulinemii, a w konsekwencji prowadzić do rozwoju IR. Dodatkowo, IR może być indukowana przez wzrost stężenia FAs w krwiobiegu, które hamują transport glukozy oraz zmniejszają regulację syntezy glikogenu i utlenianie glukozy w mięśniach.

Spośród wszystkich metabolitów uwzględnionych do analizy ROC w publikacji nr 2 – SA wykazywał najwyższą wartość AUC (0.995). Villas-Boas i współ. wykazali, iż zwiększenie poziomu SA w surowicy odgrywa fundamentalną rolę w rozwoju dysfunkcji komórek β i rozwoju T2DM, ponieważ kwas ten jest głównym czynnikiem przyczyniającym się do lipotoksyczności w komórkach β ¹⁰⁹. W innych badaniach zmiany w poziomie FAs zostały potwierdzone jako najważniejsze czynniki prowadzące do rozwoju insulinooporności i T2DM^{159,160}.

Utlenianie lipidów może być przyczyną wzrostu poziomu α -HB. W obu badaniach stanowiących przedmiot niniejszej rozprawy wykazano podwyższony poziom tego metabolitu u pacjentów ze zdiagnozowaną T2DM oraz po posiłku WW u osób obarczonych polimorfizmem pojedynczego nukleotydu w genie *PROX1*. Wysoki poziom α -HB jest powszechny dla T2DM i został wcześniej zidentyfikowany jako predyktor T2DM^{87,161-163}. Wskazanie metabolitów predykcyjnych również w przypadku wyników umieszczonych w publikacji nr 3 z cyklu było istotne dlatego, że u części osób z grupy nosicieli alleli ryzyka w rs340874 *PROX1* zaobserwowano pogorszenie wybranych parametrów klinicznych po pięciu latach od pierwszej wizyty (np. glikemia na czczo, HOMA-IR czy HbA1c). Dodatkowe potwierdzenie podwyższonego poziomu α -HBA w tej grupie badanej może wskazywać na wczesny rozwój T2DM. α -HBA jest produktem ubocznym syntezy kwasu α -ketomasłowego, produktem katabolizmu AA (Thr i Met) i anabolizmu glutationu (szlak powstawania cysteiny) w wątrobie¹⁶⁴. Trico i współ.¹⁶⁵ wykazali, że przyczyną podwyższonego poziomu α -HBA może być przeciążenie metaboliczne (przez BCAAs i wolne FAs) jak również stres oksydacyjny.

7.3.3. Wpływ metabolitów z grupy aminokwasów na rozwój cukrzycy typu 2

Mikroflora jelitowa może ułatwiać produkcję metabolitów na dwa sposoby. Po pierwsze, gatunki zamieszkujące mikroflorę jelitową wykorzystują AAs z pożywienia lub od żywiciela jako elementy do syntezy białek, a dodatkowo AAs w okrężnicy mogą potencjalnie działać jako substraty do produkcji SCFAs^{57,92,166}. Liczne AAs wykorzystywane przez bakterie beztlenowe mogą być metabolizowane do octanu i aminokwasów, w tym Gly, Thr, Glu i Orn⁵⁷, podczas gdy Thr, Lys i Glu mogą być wykorzystywane do syntezy maślanu, a w innym badaniu potwierdzono, że propionian jest syntetyzowany głównie z Thr¹⁶⁷.

GM może syntetyzować *de novo* kilka niezbędnych aminokwasów, co jest potencjalnym czynnikiem regulującym homeostazę aminokwasów⁹³. W szczególności znajdujące się w jelicie grubym bakterie z rodzaju *Clostridium* (bakterie wykorzystujące Lys lub Pro) są kluczowym czynnikiem napędzającym proces fermentacji AAs, podczas gdy bakterie z rodzaju *Peptostreptococcus* są odpowiedzialne za wykorzystywanie Glu lub Trp⁶³. Również bakterie z rodzajów *Fusobacterium*, *Bacteroides* i *Veillonella* oraz gatunki *Megasphaera elsdenii* i *Selenomonas ruminantium* mogą odgrywać znaczącą rolę w metabolizmie AAs w jelicie grubym¹⁰.

W kontekście analizy próbek krwi niezwykle istotny jest fakt, że AAs wyprodukowane przez GM mogą być wchłaniane w jelitach i akumulowane we krwi. W ten sposób GM może wpływać na poziomy AAs we krwi¹⁶⁸, które odgrywają ważną rolę w wielu procesach patofizjologicznych, a zaburzenia metabolizmu AAs są ściśle związane z patogenezą T2DM¹⁶⁰. Wykazano, że niektóre AAs, zwłaszcza BCAAs i AAAs, wiążą się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju T2DM^{162,169}. Potwierdzono, że metabolity te są przydatnymi predyktorami rozwoju T2DM, ponieważ ich poziomy są znacznie podwyższone w stanie przedcukrzycowym i rosną podczas progresji choroby¹⁷⁰. Badanie Framingham Offspring Study wykazało, że na podstawie podwyższonego poziomu AAs można było przewidzieć zwiększone ryzyko rozwinięcia się T2DM nawet do 12 lat przed wystąpieniem choroby⁶⁵.

W publikacji nr 3, stanowiącej część niniejszej rozprawy, u pacjentów z predyspozycją genetyczną do rozwoju T2DM zaobserwowano wyższy poziom Ala i norleucyny w osoczu po posiłku NW, natomiast po posiłku WW podwyższony poziom His. Ala jest metabolitem syntetyzowanym z pirogronianu i AAs (głównie BCAAs) w mięśniach szkieletowych oraz w jelitach, która jest wykorzystywana w procesie glukoneogenezy w wątrobie¹⁷¹. Dlatego też poposiłkowy wzrost Ala w osoczu może zwiększać glukoneogenezę

i może przyczyniać się do rozwoju hiperglikemii u osób z predyspozycjami genetycznymi. Pedersen i współ.¹⁴⁵ zasugerowali, że GM może być ważnym źródłem zwiększonej ilości BCAAs i odgrywać kluczową rolę w insulinooporności, co zostało dokładnie opisane we wstępie niniejszej rozprawy. Jeśli chodzi o BCAAs, w publikacji nr 2 wchodzącej w skład niniejszej rozprawy zaobserwowano różnice w poziomie Leu, której intensywność była znacznie wyższa u pacjentów z T2DM niż u tych ze stanem przedcukrzycowym. Wyniki przedstawione w tej pracy są zgodne z innymi odkryciami wskazującymi na istotny związek BCAAs (zwłaszcza Leu) z T2DM^{42,43,171,172}. Podwyższony poziom BCAAs prowadzi do akumulacji karnityny w mięśniach, co wywołuje stres oksydacyjny i dysfunkcję mitochondriów, a tym samym pogarsza wrażliwość na insulinę¹⁷². Jak już wykazano¹⁷³, niższy poziom Cre w surowicy, może odzwierciedlać mniejszą ilość mięśni szkieletowych, a tym samym mniej miejsc docelowych dla insuliny, co może częściowo wyjaśniać patogenezę T2DM związaną z niższym poziomem Cre w surowicy. W grupie pacjentów z potwierdzoną T2DM zaobserwowano obniżony poziom Cre w porównaniu do osób ze stanem przedcukrzycowym. W badaniu przedstawionym przez Agus i współ.¹⁶⁶ w okrężnicy człowieka zidentyfikowano bakterie i grzyby zdolne do rozkładu Cre. W związku z tym dokładne oznaczenie tych MDMs może mieć zasadnicze znaczenie dla wczesnej diagnozy T2DM.

Wcześniejsze badania sugerowały, że kilka metabolitów szlaku kynureninowego jest diabetogennych dla ludzi, co jest bezpośrednio lub pośrednio kontrolowane przez GM¹⁷⁴. Ścieżka kynureniny, zaangażowana w metabolizm Trp, była wcześniej obserwowana jako ważna w kontekście rozwoju T2DM. Wykazano, że enzym odpowiedzialny za konwersję Trp do kynureniny jest regulowany przez GM¹⁶⁶. W badaniu stanowiącym część niniejszej rozprawy zaobserwowano statystycznie istotne zmiany dla Trp u pacjentów w stanie przedcukrzycowym w porównaniu z T2DM. Jedną z kluczowych funkcji fizjologicznych Trp jest wykorzystanie go jako źródło azotu dla wzrostu niektórych drobnoustrojów (np. *Escherichia coli* i *Klebsiella pneumoniae*), a zatem zmiana poziomu Trp we krwi ma związek z mikroflorą jelitową. Dlatego zmienność w poziomie Trp i związanej z nim mikroflory, wraz z innymi wewnętrznymi i zewnętrznymi czynnikami ryzyka, może być wczesnym predyktorem T2DM. Trp jest również prekursorem syntezy serotoniny w błonie śluzowej jelita^{175,176}. Jak wiemy serotonina kontroluje uwalnianie insuliny, najważniejszego hormonu regulującego stężenie glukozy we krwi¹⁷⁷. Co ciekawe, w publikacji 2 będącej częścią niniejszej pracy, zaobserwowano podwyższony poziom serotoniny, co może być związane

ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia T2DM. Obserwacje te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami¹⁷⁸.

Org i współ. wykazali, że wyższy poziom Gln w osoczu był istotnie związany z wyższą liczebnością bakterii z rodziny *Clostridales*³⁰. Okazało się, że Glu i Gln są powiązane z T2DM. Gln jest transportowana z komórek β do krwi, gdzie jest gromadzona, a następnie przekształcana w Glu¹⁷⁹. Cheng i współ. wykazali, że poziom Glu, i stosunek Gln/Glu w osoczu jest silnie związany z IR. Stężenie Glu jest również jednym z najważniejszych wskaźników retinopatii cukrzycowej¹⁸⁰. W publikacji nr 2 będącej częścią niniejszej rozprawy przeprowadzono także analizę krzywych ROC, aby ocenić użyteczność statystycznie istotnych metabolitów, które w przyszłości mogłyby usprawnić diagnostykę T2DM. Największą zdolność do rozróżniania osób w stanie przedcukrzycowym od pacjentów z T2DM zaobserwowano dla kombinacji pięciu MDMs tj. Glu, OA, SA, Trp, Orn i trans-4-hydrokso-L-Pro Ta kombinacja może służyć jako potencjalny wskaźnik rozwoju T2DM. Dokładność diagnostyczną tego panelu metabolitów można dodatkowo zwiększyć, włączając do niego rutynowe parametry diagnostyczne, takie jak np.: FG czy HbA1c.

8. Wnioski

- ❖ Na podstawie dokonanego przeglądu literatury stwierdzono, że rozwojowi T2DM towarzyszą zmiany w poziomie metabolitów związanych z florą jelitową, głównie węglowodanów, aminokwasów oraz kwasów tłuszczowych.
- ❖ Technika GC–MS pozwala na powtarzalny pomiar w próbkach osocza lub surowicy 75 metabolitów związanych z florą jelitową. W procesie optymalizacji metody wykazano, że najlepsze wyniki uzyskuje się przy przygotowaniu próbek za pomocą metanolu z dodatkiem wody. Objętość i stężenie odczynnika do metoksymacji mają największy wpływ na powtarzalność i intensywność badanych metabolitów, podczas gdy warunki procesu derywatacji w największym stopniu wpływają na kompletność tego procesu.
- ❖ Wykazano różnice w profilach metabolitów związanych z florą jelitową pomiędzy osobami ze stanem przedcukrzycowym oraz ze zdiagnozowaną T2DM. Dodatkowo w oparciu o otrzymane wyniki wykonano analizę krzywych ROC dla wybranych zmiennych i opracowano panel siedmiu metabolitów, który pozwoli odróżnić stan przedcukrzycowy od T2DM łącząc je z innymi rutynowymi parametrami diagnostycznymi, takimi jak FP lub HbA1c.
- ❖ Oba testy prowokacyjne (WW, NW) wywołały zmiany w poziomie MDMs u pacjentów mających predyspozycje genetyczne do rozwoju T2DM, w genie PROX1. Różnice te mogą być źródłem wczesnych zaburzeń składu GM, związanych z przyszłym rozwojem T2DM .

9. Publikacje stanowiące rozprawę doktorską

9.1. The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step.



The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step

Patrycja Mojsak^a, Fernanda Rey-Stolle^b, Ewa Parfieniuk^a, Adam Kretowski^{a,c}, Michal Ciborowski^{a,*}

^a Metabolomics Laboratory, Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland
^b Centre for Metabolomics and Biomarkers (CEMBB), Department of Chemistry and Biochemistry, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, CEU Universities, Urbanización Montepríncipe, 28002 Boadilla del Monte, Madrid, Spain
^c Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

ARTICLE INFO

Article history:
Received 15 May 2020
Received in revised form 31 August 2020
Accepted 2 September 2020
Available online 15 September 2020

Keywords:
GC-MS
LC-MS
Derivatization
Microbiota
Obesity
Diabetes

ABSTRACT

Disruption of gut microbiota (GM) composition is increasingly related to the pathogenesis of various metabolic diseases. Additionally, GM is responsible for the production and transformation of metabolites involved in the development of metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM). The current state of knowledge regarding the composition of GM and GM-related metabolites in relation to the progress and development of obesity and T2DM is presented in this review. To understand the relationships between GM-related metabolites and the development of metabolic disorders, their accurate qualitative and quantitative measurement in biological samples is needed. Feces represent a valuable biological matrix which composition may reflect the health status of the lower gastrointestinal tract and the whole organism. Mass spectrometry (MS), mainly in combination with gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC), is commonly used to measure fecal metabolites. However, profiling metabolites in such a complex matrix as feces is challenging for both analytical chemistry and biochemistry standpoints. Chemical derivatization is one of the most effective methods used to overcome

Abbreviations: AAAA, aromatic amino acids; AAMD-SH, 4-acetamido-7-mercapto-2,1,3-benzoxadiazole; AAs, amino acids; AcA, acetic acid; AcN, acetonitrile; Ala, alanine; AMB, 4-acetamido-7-mercapto-2,1,3-benzoxadiazole; AMBA, N-(4-(aminomethyl) benzyl) aniline; AMBA-d₆, N-(4-(aminomethyl) benzyl) aniline-d₆; AMQ, 4-aminomethylquinoline; Arg, arginine; BA, bile acid; BACS, enzymes bile acid-CoA synthase; BAa, bile acids; BAT, bile acid-amino acid transferase; BA, butyric acid; BCAAs, branched chain amino acids; BCFA, branched chain fatty acids; BMI, body mass index; BQL, *o*-bromoacetylputrescine bromide; BSTFA, N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide; CA, caproic acid; CA, cholic acid; CAR/DVB, Carboxen/divinylbenzene; CAR/PDMS, Carboxen/polydimethylsiloxane; CarA, carbonylic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; CD, collision-induced dissociation; DCA, deoxycholic acid; DMPP, N,N-dimethyl-6,7-dihydro-5H-pyrrolo [3,4-d]pyrimidine-2-amine; DMAP, phosgene; DMBD, 2-dimethylaminoethylamine; DMFA, dimethylaminoethylamine; DMFA, dimethylaminoethylamine; DVB/CAR/PDMS, divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane; ECI, ethyl chloroformate; EDC, N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride; EI, electron impact; ESI, electrospray ionization; FAs, fatty acids; GC, gas chromatography; GC-GC-MS, two-dimensional gas chromatography; GC-FID, gas chromatography with flame ionization detector; GC-TOF/MS, gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry; GCxGC-TOF/MS, two-dimensional gas chromatography and time-of-flight mass spectrometry; GF, gut flora; Gly, glycine; GM, gut microbiota; HA, hexanoic acid; HCl, hydrochloric acid; HFD, high fat diet; HQS, hydroquinone-2-sulfonamide; HSA, histidine; HPLC, high-performance liquid chromatography; HPLC-UV, high-performance liquid chromatography ultraviolet detection; HPLC-UV-vis, high-performance liquid chromatography coupled with UV-vis diode; HS-GC, headspace gas chromatography; HS-SPME, headspace solid phase microextraction; HS-SPME-GC, headspace solid-phase microextraction gas chromatography; IBA, isobutyric acid; ICD, isotope-labeled chemical derivatization; MD, male derivatives; Ile, isoleucine; IPA, isopentanoic acid; IS, internal standard; IBA, isobutyric acid; InCl, isobutyl chloroformate; IVA, isovaleric acid; LA, lactic acid; LC, liquid chromatography; LCA, lithocholic acid; LDL, low-density lipoprotein; Leu, leucine; LODs, limit of detection; MS, mass spectrometry; MCF, methyl chloroformate; MeOH, methanol; MeOX, methoxylation (methoxyamine in pyridine); MRM, multiple reaction monitoring; MS, mass spectrometry; MSTFA, N-trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamide; MTEB, methyltert-butyl ether; MIBTFA, N-tert-butylisobutyl-N-methyltrifluoroacetamide; Na₂SO₄, sodium sulfate; [NH₄]₂SO₄/NaH₂PO₄, ammonium sulfate/sodium dihydrogen phosphate; NMR, nuclear magnetic resonance; OA, organic acid; O-BHA, *o*-benzylhydroxyl amine; PA, pentanoic acid; PA, propionic acid; PCF, propyl chloroformate; PFB-Ir, pentafluorobenzyl bromide; PhD, phenyl derivatives; Pro, proline; QuEChERS, quick, easy, cheap, efficient, rugged, and safe; RP, reversed phase; RSDs, relative standard deviations; SCFAs, short-chain fatty acids; SPE, solid phase extraction; SPME, solid phase microextraction; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TBAHS, tetrabutylammonium hydrogen sulfate; TBMCS, tert-butylmethylchlorosilane; TFA, trifluoroacetic acid; TMS, trimethylchlorosilane; TMS, trimethylsilyl; Trp, tryptophan; UHPLC-ESI-MS/MS, ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; VA, valeric acid; Val, valine; 2-AA, 2-aminoadipic acid; 2-BAP, 2-bromoacetophenone; 2-MBA, 2-methyl butanoic acid; 2-MBA, 2-methylbutyric acid; 2-mFA, 2-methyl hexanoic acid; 2-NPH, 2 Nitrophenyl-hydrantate; 2-FA, 2-fatty amine; 2mFA, 2-methyl pentanoic acid; 2mVA, 2-methyl valeric acid; 3-NPH, 3-nitrophenylhydrazine; 4-mHA, 4-methyl hexanoic acid; 4-MVA, 4-methyl valeric acid.

* Corresponding author.
E-mail address: michal.ciborowski@pmb.ubp.edu.pl (M. Ciborowski).

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113617>
0731-7085/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

these problems. In this review, we provide a comprehensive summary of the derivatization methods of GM-related metabolites prior to GC-MS or LC-MS analysis, which have been published in the last five years (2015–2020). Additionally, analytical methods used for the analysis of GM-related metabolites without the derivatization step are also presented.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	2
2. Methods	3
3. Obesogenic and anti-obesogenic gut microbiota	3
4. Diabetogenic and anti-diabetogenic gut microbiota	4
5. Gut microbiota-derived metabolites	4
5.1. Microbial-derived short-chain fatty acids (SCFAs)	4
5.2. Microbial-derived amino acids (AAs)	5
5.3. Microbial-derived BAs	6
6. Measurement of GM-related metabolites in fecal samples	6
6.1. Derivatization reagents used to modify fecal metabolites before GC-MS analysis	6
6.1.1. Silylation reagents used for the derivatization of GM-related metabolites	6
6.1.2. Alkylation reagents used for the derivatization of GM-related metabolites	12
6.1.3. Headspace solid-phase microextraction with gas chromatography	13
6.2. Derivatization reagents used to modify fecal metabolites before LC-MS analysis	14
6.2.1. Commercially available derivatization reagents for LC-MS analysis of GM-related metabolites	14
6.2.2. Isotope-labeled chemical derivatization (ICD) methods for LC-MS analysis of GM-related metabolites	15
6.3. Determination of GM-related metabolites without a derivatization step	16
7. Conclusions and future perspectives	17
Acknowledgments	18
References	18

1. Introduction

Human gastrointestinal microbiota, also known as gut flora (GF) or gut microbiota (GM), are a large population of microorganisms that live in the gastrointestinal tract (GI) of humans [1]. The human GM has a total mass of 1.5 kg [2] and consists of more than 1000 bacteria from more than 400 different species [2,3]. The human microbiota is mostly composed of five phyla: Firmicutes, which account for 60–80 % (of which the most important are *Luminisococcus*, *Clostridium* and *Lactobacillus*); *Bacteroidetes* (mainly including *Bacteroides*, *Prevotella* and *Xylanibacter*) accounting for 20–30 %; and *Actinobacteria*, which represents the minority of approximately 10 % (with a predominance of the genus *Bifidobacterium*); whereas *Proteobacteria*, such as *Escherichia* and *Enterobacteriaceae*, are even less commonly found [4]. As a component of the human body that may directly affect our health or disease status, these microorganisms have been receiving increasing attention in the last decades [5]. There is an emerging piece of evidence that the disruption of GM composition and function is assuredly implicated in the pathogenesis of such metabolic diseases as obesity [6–8] and type 2 diabetes mellitus (T2DM) [9–11]. Taking into account the global epidemic of obesity and the consequent increase of T2DM prevalence, which is estimated to increase up to 54 % by 2030 [12]; it is crucial to evaluate the relationship between gut microbial content and the development of metabolic disorders. Recently, several reports describing the changes in composition of GM [19–24] and GM-related metabolites [13–15] in association with the progression of obesity and T2DM have been published. The current state of knowledge in this area is presented in this review.

As mentioned above, different types of bacteria can be indicators of metabolic diseases [16], but it is also essential to state that the gut microbiota are responsible for the production or transformation of endogenous small molecules that regulate host-microbiota interactions [17]. The list of such molecules includes short-chain fatty acids SCFAs [18], branched-chain fatty acids

[BCFAs] [19], amino acids (AAs) [20], branched-chain amino acids [BCAAs] [21], bile acids (BAs) [22] and others [13]. The transformation products of these metabolites may be important modulators of different metabolic pathways playing an outstanding role in the development of metabolic disorders [23]. Therefore, an accurate determination of GM-related metabolites in biological samples is crucial for a better understanding of the systemic effect of GM on the whole organism [24] as well as to reveal novel molecules that can improve the diagnosis of various diseases [25]. GM-related metabolites can be detected in blood samples and may reflect the changes in gut flora composition and activity evoked by disease or intervention e.g., bariatric surgery [26,27]. However, to evaluate the actual microbial composition and activity in intestines, feces is the most appropriate sample to study [28]. Feces, due to its direct contact and transient presence in the colon and rectum, represents a valuable biological matrix that reflects the health status of the lower gastrointestinal tract and reflects a unique metabolic interaction between the host and the symbiotic microbes [29]. Unfortunately, profiling of metabolites in fecal samples represents a challenge from both analytical-chemistry and biochemistry standpoints [2]. The composition of feces is highly dependent on short-term dietary factors while also representing the primary specimen where co-metabolism of the host organism and the gut microbiota is expressed [30]. Therefore, it is crucial to apply a proper methodology for sample preparation and metabolites analysis, which will compensate for the highly variable nature of the sample. Assuring this strategy, useful data will be obtained providing insight into ongoing biochemical processes [2].

Among the different analytical methods used for the measurement of various biomolecules, mass spectrometry (MS) has grown in popularity [24,31,32]. It is frequently used in combination with separation techniques, such as gas chromatography (GC) [33] or liquid chromatography (LC) [34–36]. While the preparation of samples for GC-MS analysis requires a transformation of

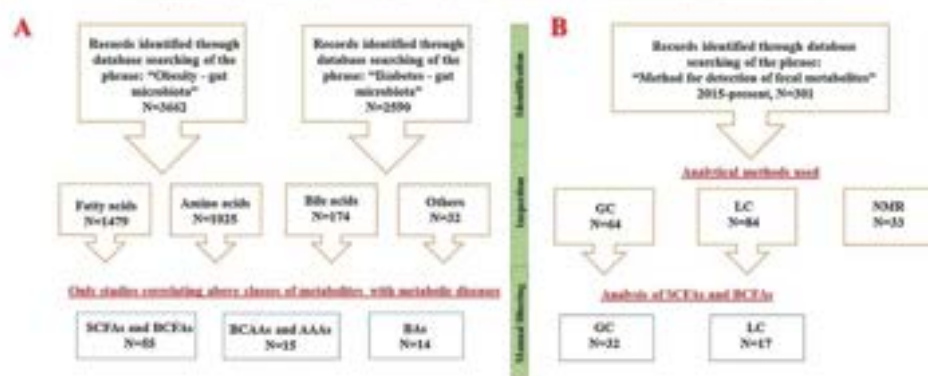


Fig. 1. A flow diagram showing the process of selection of the papers to review.

the metabolites into a more volatile form, in the case of LC-MS, the derivatization of analytes is not usually needed. SCFAs usually require derivatization before both GC-MS or LC-MS analysis due to a non-sufficient volatility, excessive tailing, too strong affinity to the stationary phase and thermal instability [35]. Commonly, the aim of the derivatization process is different for GC-MS and LC-MS analysis. In the case of GC-MS, derivatization pursues to convert the analytes into thermally stable, volatile molecules [37], whereas, in the case of LC-MS, the goal is to provide the derivatives with better retention and ionization efficiency compared to the original metabolites [32]. Analytical derivatization is an extra step of the sample preparation method, during which the structure of the compounds of interest is modified into a product more suitable for analysis [35]. An ideal derivatization reaction should have the following characteristics: (1) it should be robust enough to resist various and complex matrix composition [38]; (2) the reagent can selectively react with the specific functional group under mild conditions and no by-products in the derivatization process are formed; (3) the reagent is easily synthesized or commercially available; (4) the residue of the derivatization reagent cannot interfere with the separation and detection of the derivatives of the analytes or can be easily removed after the derivatization reaction [36].

Therefore, to overcome these problems, a wide variety of new [33,37,39–45] or modified [2,19,46–50] methods for derivatization of GM-related metabolites have been proposed over the last years. Published review articles [2,51–54] have already included many aspects of the analytical protocols applied to determine these compounds in feces, including sample collection, pre-treatment, normalization and analysis. To the best of our knowledge, detailed conditions for fecal metabolites derivatization have not been reviewed before. In this study, we provide a comprehensive summary of the methods for derivatization of GM-related metabolites prior to GC-MS or LC-MS analysis, which have been published in the last five years (2015–2020). Additionally, the most recent analytical methods used for the determination of GM-related metabolites without derivatization are also presented.

2. Methods

Primarily, to collect scientific literature describing dysregulation of gut microbiota composition in relation to the pathogenesis of obesity and/or type 2 diabetes mellitus (T2DM), PubMed was searched (the last search was performed on April 10th, 2020). The phrases “diabetes – gut microbiota” and “obesity–gut microbiota” were introduced, giving 2590 and 3662 articles for each phrase

respectively. The obtained hits were examined, and the following inclusion criteria were used: full journal publication, articles containing data about molecular mechanisms by which gut microbiota contributes to obesity and diabetes and studies on T2DM treatment by changing the gut composition. Moreover, studies were excluded if they did not have any abstract available or failed to mention any correlation between GM composition and metabolic diseases. While inspecting obtained hits, three main classes of GM-related metabolites, that have an impact on the two studied metabolic diseases appeared, i.e., FAs, AAs and BAs. The articles were re-grouped accordingly, and only articles containing information about metabolites from these classes were kept. Subsequently, additional filtering was performed and only studies in which these metabolites were correlated with metabolic diseases were kept. A schematic strategy of this part of the literature search is presented in Fig. 1 (panel A).

Furthermore, PubMed database was also searched (the last search was performed on April 10th, 2020) for all studies containing information about derivatization reagents used for the determination of GM-related metabolites in fecal samples. To focus only on the most currently used reagents, we searched only for the studies published no earlier than the 1st of January 2015. The phrase “method for detection of fecal metabolites” was searched in PubMed, limiting the hits to those published after the above-mentioned date. As a result, 301 records were found. Each of the records was inspected manually, and papers were divided based on the analytical technique used to measure metabolites, i.e., GC, LC or nuclear magnetic resonance (NMR). Papers with the use of NMR were excluded, as derivatization of metabolites before NMR analysis is not performed. During the articles inspection, we have noticed that most of the new or modified derivatization methods for the analysis of GM- and metabolic diseases-related metabolites in fecal samples concern SCFAs and BCFAs. Therefore, in this review, we have focused mainly on derivatization reagents used for the determination of these two groups of metabolites. Finally, 49 research articles (32 for GC and 17 for LC) remained and are described below. The schematic strategy of selection of the literature for this part of the review is presented in Fig. 1 (panel B).

3. Obesogenic and anti-obesogenic gut microbiota

In the last four decades, the global prevalence of obesity has almost reached 650 million people, a number that is six times higher than noted in the 1990s [10]. Several studies, both in humans and in animal models, have shown that the GM contributes to

the pathogenesis of obesity [6,8,12]. Considering animal studies, Ridaura et al. [55] in a landmark study, confirmed that healthy mice transplanted with the microbiota of obese mice become obese within the next two weeks. In another study, *Phylum Firmicutes* (a dominant part of the GM in the human gut [56]) was found substantially decreased after antibiotic treatment of diet-induced obese mice. Additionally, improvement of insulin resistance and amelioration of obesity was also observed [57]. Moya Perez et al. demonstrated that the administration of a specific *Bifidobacterium* strain reduced systemic inflammation and improved metabolic dysfunction in mice with diet-induced obesity [58]. Treatment of obese mice with *Bifidobacterium* MKK4 for eight weeks reduced body and organ weight, improved levels of serum glucose, triglyceride and cholesterol and regulated gut microbiota dysbiosis [59]. Some of *Lactobacillus* species were found associated with weight gain, while most of *Lactobacilli* have an anti-obesity effect [60]. A meta-analysis revealed that *Lactobacillus plantarum* promoted weight loss in animals, and *Lactobacillus gasseri* promoted weight loss in both obese humans and animals [61]. Lau et al. conducted an animal experiment in which Wistar rats became obese after 12-weeks of a high-fat diet (HFD). After the treatment, a lower level of *Bacteroidetes*, *Prevotellia* and *Lactobacillus* was observed in the gut of these animals [62]. Similar alterations, but in mice, were also found by Shang et al. [63].

In humans, most of the published studies indicate that a rise in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio is related to an augmented low-grade inflammatory status and to a more elevated capability of harvesting energy from food. It was also confirmed by Zheng et al. [41] that certain microbial species in the human gut contribute to weight gain while others contribute to weight loss. For example, *Blautia*, *Romboutsia*, *Ruminococcus*, *Clostridium sensu stricto* and *Dorea* were positively correlated with indicators of bodyweight, including waistline and body mass index (BMI) and serum lipids (including low-density lipoprotein, triglyceride, and total cholesterol) [41]. In contrast, the aforementioned clinical indicators were negatively associated with *Bacteroidetes*, *Roseburia*, *Butyrivibrio*, *Alistipes*, *Parasuttrellia*, *Parabacteroides* and *Clostridium IV*. Many authors reported elevated levels of gram-positive and negative bacteria: *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp. and *Proteobacteria* spp. in overweight individuals [64–66]. Abenavoli et al. observed a reduced number of *Bacteroidetes/Firmicutes* ratios in obese compared to non-obese patients [67]. However, these results have been contradicted by other studies. Duncan et al. did not observe any differences in the proportions of *Bacteroidetes* and *Firmicutes* in the feces of lean and obese subjects [68]. Chakraborti et al. reported that human obesity is linked to a reduced abundance of intestinal *Bacteroidetes*, *Faecalibacterium* and *Verrucomicrobia*; and an increased abundance of phylum bacteria: *Actinobacteria* and *Firmicutes* [69].

4. Diabetogenic and anti-diabetogenic gut microbiota

Several research articles [70–72] and the newest reviews [11,73,74] have reported that GM dysbiosis can be a factor for the rapid progression of insulin resistance in T2DM cases. It may reshape intestinal barrier functions and host metabolic and signaling pathways, which are directly or indirectly related to the insulin resistance in T2DM [75]. In 2004, the first evidence was published based on the study on germ-free mice, suggesting that gut microbiota may contribute to the alterations in glucose metabolism [76]. Recent studies have confirmed that the gut microbiome status might be a new biomarker for type 2 diabetes prediction [77,78]. Considering animal and human studies, in which consistent results regarding the differences in bacterial population between diabetic and control subjects were obtained, it can be concluded that the

genera of *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Akkermansia*, and *Roseburia* are negatively associated, while the families of *Ruminococcus*, *Fusobacterium* and *Blautia* are positively associated with T2DM [73].

In addition, pieces of evidence emerging from animal models show that many of the symptoms associated with diabetes and insulin resistance may be improved through replenishing probiotics (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacterium*) and butyric acid-producing bacteria, *Clostridium butyricum*. Many studies performed on animal models have presented differences in the abundance of GM components; however, there is a lack of time-resolved microbial changes during the progression of diabetes. The exception is the study of Zhou et al. who monitored changes in the fecal microbiome during the progress of diabetes from the 8th to the 15th week of age. The fecal microbiome (*Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Bifidobacterium*, *Allobaculum*, *Ruminococcus* and *Akkermansia*) of rats was highly dynamic and underwent significant changes during the progression of diabetes [79].

In humans, Larsen et al. [80] and Karlsson et al. [81] reported that the presence of type 2 diabetes was accompanied by a lowered abundance of butyrate-producing microbes *Roseburia*, *Faecalibacterium* and *Elabacterium* and an increased abundance of *Clostridium* and *Lactobacillus*. The ratios of *Bacteroidetes* to *Firmicutes* and *Bacteroides-Prevotella* group to control group correlated positively and significantly with plasma glucose concentration but not with BMI. Sedighi et al. have observed that the *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium* group was significantly more frequent in healthy individuals compared to T2DM patients, but no significant difference was observed in a copy number of *Prevotella* genus between diabetic and healthy subjects [9]. Long et al. [14] described that the level of two phyla (*Actinobacteria* and *Firmicutes*) and class *Clostridium* was significantly lower in diabetic subjects compared to the control group. Researchers have also reported a strong correlation between T2DM and a higher level of *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Proteobacteria* and *Prevotella* bacteria [9,15,80].

5. Gut microbiota-derived metabolites

As presented above, there is a connection between GM composition and metabolic diseases. The symbiotic relationship between the gut microbiota and the host is regulated and stabilized by a complex network of interactions between them [73]. This crosstalk can potentially be mediated by microbes-synthesized metabolites [82]. GM is exclusively responsible for several essential metabolic functions [83], including SCFAs production [84], AAs synthesis [85], BAs transformation [86] as well as hydrolysis and fermentation of non-digestible substrates [18]. In the last few decades, it became apparent that regulation of the above mentioned metabolic pathways may play a key role in the prevention and treatment of metabolic syndrome [23], bowel disorders [87–89] and certain types of cancer [90].

5.1. Microbial-derived short-chain fatty acids (SCFAs)

SCFAs are a class of the most-thoroughly studied GM-related metabolites [91]. They are generated in the colon as the end products of saccharolytic fermentation of complex carbohydrates and starches by the gut microbiota [92]. These metabolites are defined as groups of FAs with fewer than six carbons, including formic acid, acetic acid (AcA), propionic acid (PA), butyric acid (BcA) and valeric acid (VA). The major gut SCFAs are AcA, PA and BcA, which account for more than 95 % of all the SCFAs and are found in high concentrations in the intestinal tract, ranging from 70 to 140 mM in the proximal colon and from 20 to 70 mM in the distal colon [93]. Acetic

acid, after absorption through systemic circulation, reaches peripheral tissues where it is used by cells for the synthesis of fatty acids and cholesterol [18]. This compound is produced by most of the enteric bacteria such as *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus* and *Streptococcus* [94] via the Wood–Ljungdahl pathway and the acetyl–CoA pathway [84]. Propionic acid is produced by *Akkermansia*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, *Prevotella* and *Ruminococcus* via succinate, acrylate and propionol pathways. It is absorbed through the portal circulation and takes part in gluconeogenesis [69]. Butyric acid mainly serves as an energy source for colonic epithelium [95] and is produced by *Roseburia* spp., *Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, *Eubacterium hallii*, *Coprococcus catus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Anaerostipes caccae* and *Coprococcus catus* [84] via the butyryl–CoA: acetate CoA–transferase routes and the phosphotransbutyrylase/butyrate kinase routes [91].

In literature, many scientific reports describing the association between SCFAs level and obesity/T2DM development can be found, below an analysis of the association published between these elements is shown. However, the obtained results are inconsistent. Muller et al. reported a positive correlation between fecal SCFAs concentration and metabolic disease [96]. Contrary, Sato et al. have reported a negative relationship between SCFAs level and metabolic disease; in this study, a total concentration of SCFAs in patients with T2DM was significantly lower than in the control group [97]. Contrary, Adachi et al. did not find differences in the total concentration of fecal SCFAs between controls and T2DM patients. Nevertheless, considering individual SCFAs, T2DM patients (compared to the control group) had a lower level of fecal PA, VA and BA, and a higher level of succinate [98]. Schwertz et al. observed that a total concentration of SCFA in fecal samples of obese volunteers was more than 20 % higher than that of lean volunteers. The highest increase was observed for PA, followed by BA. No considerable differences in the proportions of the iso-SCFA were observed [99]. According to Rahat–Rozenbloom et al., a higher fecal concentration of SCFA in obese individuals could be due to several factors, including lower SCFA colonic absorption, reduced colonic transit time or increased SCFAs production due to differences in dietary intake or colonic microbiota [100]. Additionally, Fernandes et al. consider that it might also be the result of increased microbial production, shifts in microbial cross-feeding patterns, low mucosal absorption or even the rate of transit alone [101]. Nevertheless, it is known that changes in concentration and proportion of individual SCFA are concurrent with changes in bacterial groups. Rahat–Rozenbloom et al. observed increased Aca and Bca concentrations as well as Firmicutes: Bacteroidetes ratio in obese compared to lean individuals [100]. Fernandes et al. observed significantly increased levels of PA and VA, and a higher level of *Escherichia coli* in lean individuals compared to overweight ones [101].

5.2. Microbial-derived amino acids (AAs)

Several amino acids released by gut bacteria can serve as precursors for the synthesis of SCFAs, contributing to the development of obesity and other metabolic diseases [102]. Branched-chain fatty acids, like isobutyrate, 2-methylbutyrate and isovalerate can be derived from the fermentation of BCAAs [103]. Glycine (Gly), threonine, glutamate and ornithine (Orn) can be metabolized to Aca by anaerobic bacteria. Bca is primarily synthesized from lysine (Lys), glutamate and threonine. Threonine can be utilized for PA synthesis [104]. Alanine (Ala), leucine (Leu), isoleucine (Ile), valine (Val) and histidine preferentially serve as hydrogen donors in metabolic reactions. In contrast, glycine, proline, Orn and arginine tend to act as hydrogen receptors [105].

The abundance of the AAs-fermenting bacteria in the large intestine is very high, and their number can reach up to 10^{11}

per gram of dry feces [85]. *Clostridium bifermentans* is the predominant bacteria for the utilization of lysine or proline [106]. *Peptostreptococcus* spp. bacteria are predominant for the utilization of glutamate or tryptophan (Trp) [107]. Bacteria belonging to the *Clostridium* spp. are dominant for AAs fermentation in the human large intestine. However, other bacterial species, such as *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Megapharma ebdeni* and *Selenomonas ruminantium*, may also be essential for AAs metabolism in this part of the human GI [108]. According to available research data, it has been confirmed that GM can de novo synthesize some of the amino acids in the GI [85]. Arginine can be produced by *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Fusobacterium varium*, Trp by *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Enterococcus* whereas tyrosine by *Bacillus* and *Serratia* [106]. These examples confirm the irreplaceable position of intestinal microbes in AAs metabolism, regardless of host nutrition and physiology. They also indicate bidirectional processes between AAs and gut microbes.

Numerous human studies have consistently demonstrated that concentrations of BCAAs and aromatic amino acids (AAAs) in biological samples (plasma, fecal and urine) are associated with insulin resistance, and have the quality to predict diabetes and obesity development [17,109,110]. Oxidation of BCAAs may increase fatty acid oxidation and also play a role in obesity. Chen et al. confirmed that serum concentrations of BCAAs (Val, Leu, and Ile), AAAs (phenylalanine and tyrosine), gluconeogenic AAs (alanine, glutamate, and glutamine) and other AAs (Orn and Lys), were associated with the risk of T2DM development. High concentrations of valine, leucine, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, alanine, glutamate, ornithine and lysine were associated with an increased risk, while a high concentration of glutamine was associated with a decreased risk of T2DM incidence [111]. Leucine, phenylalanine, glutamine and glutamate may induce pancreatic β -cell insulin secretion and promote T2DM via hyperinsulinemia; leading to pancreatic β -cell exhaustion. Some other mechanisms, such as stimulation of glucagon release from pancreatic α -cells and increasing transamination of pyruvate to alanine, a strong promoter of gluconeogenesis, may explain the potentially unfavorable role of glutamate in T2DM risk [112,113]. In another study with 526 participants being followed for 4.7 years, the association of BCAAs and incident type 2 diabetes did not reach statistical significance after adjustment for insulin resistance [110]. Recently, in a large-scale prospective population-based cohort study, Ruiz–Canela et al. proved the association between plasma concentration of total BCAAs (i.e., valine, leucine, isoleucine) and the risk of type 2 diabetes mellitus [114]. Similar results were obtained by Flores–Guerrero et al., who also reported the relationship between the plasma concentrations of total BCAAs and an increased risk of T2DM development [21]. Ahola–Olli et al. carried a large population-based cohort study (11,896 young adults (24–45 years) with a follow-up of 8–15 years), which aimed to select biomarkers of future type 2 diabetes. Branched-chain and aromatic amino acids, triacylglycerol, linoleic acid and non-esterified cholesterol were indicated as the most reliable biomarkers [115]. Lee et al. reported that 2-aminoadipic acid (2-AAA), a metabolite from Lys metabolic pathway, could be a potential biomarker of obesity and obesity-related metabolic disorders. In this study, a level of 2-AAA was increased in cell and mouse models of obesity-related insulin resistance. The excess level of 2-AAA led to impaired insulin signaling in insulin-sensitive cells (liver, skeletal muscle and adipose cells) and caused abnormal gluconeogenesis [116].

In conclusion, amino acid and glucose metabolism are closely related. AAs represent the main reservoir for gluconeogenesis and influence insulin and glucagon secretion. Both processes are altered early in the pathogenesis of T2DM, which, at least in theory, makes amino acids good candidates for biomarkers of metabolic diseases.

5.3. Microbial-derived BAs

One of their primary function of BAs is to facilitate the emulsification of dietary fats and to assist the intestinal absorption of lipids and lipophilic vitamins [117]. Bile acids are synthesized in hepatocytes from cholesterol [117]. BA synthesis in humans is estimated to use about half of the 800 mg of synthesized daily cholesterol [22]. In the liver, specifically in peroxisomes, primary BAs are conjugated to either Gly (predominantly in humans) or taurine by the bile acid-CoA synthase (BACS) and bile acid-amino acid transferase (BAT) enzymes. In the intestine, a portion of conjugated cholic acid (CA) and chenodeoxycholic acid (CDCA) are deconjugated by bacterial bile salt hydroxylase to free bile acids. Bacterial 7 α -dehydroxylase removes the 7-OH group from CA and CDCA to form deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA) respectively [86]. The gut microbiome plays a key role in BA synthesis, modification and signaling by transforming host-derived primary BAs into secondary BAs and by their deconjugation (e.g., removal of Gly or taurine) via the enzymatic activity of bile salt hydrolase [118].

The significant components of the human bile acid pool consist of CA, CDCA and DCA, their ratio is roughly 4:4:2. BA level and relative composition can be modulated by gut microbiota [22]. Such bacteria as *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ramnococcus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Streptococcus* and the archaeal genus *Methanobrevibacter*, especially some of the *Clostridia*, including *C. scindens*, *C. hiranonis*, *C. hylemonae* (*Clostridium* cluster XVII) and *C. sordelli* (*Clostridium* cluster XI) are capable of producing secondary bile acids [119]. Lin et al., confirmed that bile acids level was positively correlated with *Clostridium* sp., *Parasutterella secunda*, *Turicibacter* sp. and 11 unclassified species, and negatively correlated with *Acidovorax woelfelii*, *Allobaculum stercoranicum*, *Anaerotruncus* sp., *Bacteroides uniformis*, *Blautia glauceracea*, *Butyrivibrio virosa*, *Clostridium papyrosolvens*, *Enterococcus gallinarum*, *Microbacterium maritipicum*, *Lachnospiraceae* bacterium and *Lactococcus plantarum* [104]. In gallbladder bile, bile acids are conjugated to either glycine or taurine in a ratio of about 3 to 1.4. An increased expression of cholesterol 7- α -hydroxylase is correlated with an increased rate of bile acid synthesis and increased biliary bile acid and cholesterol secretion. Furthermore, an increased rate of bile acid synthesis increases fecal excretion. It reduces serum cholesterol levels by stimulating the uptake of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, thus improving the hyperlipidemic manifestation of diet-induced obesity and diabetes [120].

Cariou et al. reported an increase of deoxycholic acid in T2DM patients [121]. Similarly, Haeussler et al. observed that 12 α -hydroxylated species (sum of CA, DCA, and their conjugates) were significantly higher in patients with T2DM [122]. Bariatric surgery was found to increase the level of BAs. At the same time, a hypocaloric diet, which induced similar weight loss, was associated with a reduction of the level of unconjugated BAs. It suggests that changes in bile acids are not the main reason for the improvement of glucose tolerance following gastric bypass operation [120]. Lin et al. studied a connection between fecal BA concentration and metabolic diseases. Higher levels of deoxycholic, lithocholic and the total BAs were observed in obese and diabetic patients in comparison to the control group [104]. These results are consistent with those reported by Vincent et al., who observed that bile acid concentration is increased in obese patients with type 2 diabetes [123]. The close link between plasma levels of BAs and crucial metabolic parameters raises the possibility that modulation of BA could be used as a therapeutic approach for the treatment of metabolic diseases. Dietary supplementation with CA increased energy expenditure and reduced weight gain during a high-fat diet [83]. BA sequestrants, which increase the CA pool size (while reducing CDCA and DCA pools), also reduced glucose, hemoglobin

and cholesterol levels in patients with type 2 diabetes [85–87]. Thus, therapeutic strategies which increase circulating BA levels or modulate the relative distribution of active BA species could be a practical approach to improve systemic metabolism [22].

6. Measurement of GM-related metabolites in fecal samples

The concentration of SCFAs, BCAAs, AAAs and BAs can be modulated by the differential presence of critical microbial families, thus having significant implications for the pathogenesis of the metabolic disease [79,124]. Consequently, an accurate determination of these metabolites can be essential for the early diagnosis of various diseases. Among metabolites produced by gut microbiota, SCFAs and BCAAs are the most frequently measured in biological samples (e.g., plasma/serum, urine, bile, or feces) because of the important role they might play [125]. Due to the rising popularity of the investigations on the complex interactions between the GM and the host metabolism, fecal samples have gained a significant role in this type of research, being the most accessible biological matrix, which can directly probe the connection between intestinal bacteria and physiology [124]. However, the analysis of GM-related metabolites in this type of biological material can be complicated. Analytical challenges are not only related to the marked compounds but also to the complex matrix they belong to [126]. Successful sample preparation and metabolite analysis require that the methodology applied adequately compensates for the highly variable nature of the sample. It is important to generate useful data and provide reliable insight into ongoing biochemical processes [2]. Identification and accurate measurement of endogenous low-molecular-weight metabolites is also an analytical challenge due to their unique physicochemical properties (such as low vapor pressure and boiling point, and relatively high solubility in aqueous phase) and their low concentrations in biological samples [127]. Therefore, a derivatization process is usually performed before analysis of the abovementioned classes of metabolites. A revision of the recent (2015–2020) literature showed that the newest or modified derivatization methods for the analysis of GM-related metabolites in fecal samples mainly concern SCFAs and BCAAs (Tables 1–4).

6.1. Derivatization reagents used to modify fecal metabolites before GC-MS analysis

Gas-chromatography coupled to mass spectrometry is the most commonly used method for the comprehensive analysis of volatile or semi-volatile and thermally stable compounds with high efficiency [128]. Most of the small molecular weight metabolites (including small acids, alcohols, hydroxy acids, AAs, sugars, FAs and sterols) existing in nature contain functional groups with active hydrogen atoms (–COOH, –OH, –NH and –SH). These groups make them difficult to be analyzed by GC due to several reasons, including insufficient volatility or thermal instability [129,130]. Therefore, a derivatization step before GC analysis is required to improve volatility, thermal stability and chromatographic mobility of analyte, as well as to enhance chromatographic peak shape and to reduce peak tailing (Tables 1 and 2). Additionally, derivatization can also add desired diagnostic fragments to mass spectra for identification purposes [131]; this is especially important during non-targeted analysis.

6.1.1. Silylation reagents used for the derivatization of GM-related metabolites

Silylation is the standard and most widely used derivatization procedure for the analysis of microbial metabolites by GC-MS [130,132]. It introduces a silyl group [–Si(CH₃)₂]

Table 1
GC-based methods for the targeted analysis of SCFAs and BCFAs in feces.

Metabolites	Organism	Sample preparation	Derivatization reaction	Chromatography/ detection/stationary phase	Validation parameters	References
SCFAs and BCFAs (6): AcA, PA, BcA, BcA, VA, IVA	humans	1-propanol	Total time: 5 min; Derivatization (BCF): 1 min room temp	GC-PCI-MS , HP-5MS (30 m × 250 μm, 0.25 μm film thickness). Time of analysis: 40 min	LOQ = 5–30 μM, linear range: 5–5000 μmol L ⁻¹ , RSD < 4 %, R ² > 0.997	[49]
SCFAs (4): AcA, PA, BcA, Va	humans	ethyl ether-hexane (1:1, v/v)	Total time: 20 min	GC-MS; Nukol™ capillary GC column (15 m × 0.53 mm × 0.5 μm film thickness) Supelco; Time of analysis: 15 min	Linear ranges = 5.71–11.20 μg mL ⁻¹ , RSD < 10 %, LOQ = 1.88–3.70 μg mL ⁻¹ , LOQ = 5.7–11.2 μg mL ⁻¹ , Recovery: 96.51–108.83 %, R ² > 0.999	[144]
SCFAs and BCFAs (15): FA, VA, AcA, 3-mPA, PA, ICA, IBA, CA, BcA, 2-mHA, 2-mBA, 4-mHA, IVA, HA	humans and cat	LLE: hexane	Total time: 10 min; Derivatization (BCF): 2 min room temp.	GC-MS, HP-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm) AT; Time of analysis: 20 min	Recovery = 42–98 %, RSD < 10 %, R ² > 0.99	[150]
SCFAs and BCFAs (7): AcA, BcA, PA, IBA, VA, IVA, CA	humans	Phosphoric acid	Total time: 30 min; Derivatization (PCF): 5 min room temp	GC-MS-TQ ; ZB-FFAP column (30 m, 0.25 μm film thickness); Time of analysis: 8 min	LOQ = 0.5–1280 μM	[155]
SCFAs and BCFAs (6): AcA, PA, BcA, BcA, IVA, VA	humans	LLE: butanol	Total time: 30 min	GC-TOFMS; polar VF-WAXms capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) AT; Time of analysis: 15.8 min	LOD = 0.05–0.1 μg mL ⁻¹ , LOD = 0.5–1.0 μg mL ⁻¹ , RSD < 10 %, Accuracy = 93–111 %, Recovery = 95.1–105 %	[192]
SCFAs (4): AcA, PA, BcA and VA	humans	acidic solution	Total time: 1 h without derivatization	GC-MS; ZB-WAX (30 m × 0.25 mm ID, 0.15 μm film thickness) Time of analysis: 28 min	LOD = 0.0033–0.068 μmol g ⁻¹ LOQ = 0.011–0.23 μmol g ⁻¹ , Recovery = 83–110 %, Accuracy = 79–110 %, Precision = CV% < 11 %	[202]
FA (5): LA, OA, SA, MA and CcA	solid samples	acetone, diethyl ether and dimethylformamide - were tested as a derivatization medium and DMF was considered as the best C18 SPE	Total time: 1 h; Derivatization (BSTFA): 15 min at 200 °C	HS-GC-MS ; Ultra 2 (25 m × 0.32 mm, 0.52 μm film thickness) Time of analysis: 20 min	LOD = 0.27–0.57 mg L ⁻¹ R ² > 0.998, RDS = 2.2–4.9 %	[152]
SCFAs (3): AcA, PA, BcA	dogs		Total time: 1 h 20 min; Derivatization (MTBSTFA): 60 min, room temp.	GC-MS, DB-1 MS capillary column (AT); Time of analysis: 20.53 min	LOD = 0.2–0.3 mM, LOQ = 0.8–1.0 mM, Recovery = 96–99 %, RSD < 5 %	[139]
SCFAs and BCFAs (8): AcA, FA, PA, BcA, BcA, 2-MBA, IVA, VA	mice	LLE: hexane	Total time: 2 h; Derivatization (PFBBz): 60 °C for 1.5 h	GC-MS, DB-225 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) (50 S-cyanopropylphenyl)-methylpolysiloxane) AT; Time of analysis: 25 min	LODs = 0.244–0.977 μM LOQ = 0.977–7.813 μM Recovery = 55.7–97.9 % R ² > 0.997	[19]
SCFAs (3): AcA, PA and BcA	mice	LLE: hexane	Total time: 1 h; Derivatization (PFBBz): 60 °C for 30 min	GC-MS; VF-5 MS column (5 % phenyl-methyl; 25 m × 0.25 mm; 0.25 μm film thickness) AT; Time of analysis: 15 min	RSD < 12 % LOQs = 1–20 μM	[40]

Table 1 (Continued)

Metabolites	Organism	Sample preparation	Derivatization reaction	Chromatography/ detection/stationary phase	Validation parameters	References
SCFAs and BCFAs (9): AcA, PA, IBCA, BcA, IVA, VA, 4-mVA, HA, IBCA	mice	LLE: anhydrous diethyl ether (1:1, v/v)	Total time: 2 h 30 min, Derivatization (BSTFA): 37 °C for 2 h	GC-MS; HP-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness) (AT); Time of analysis: 20 min	RSD < 2 %, LODs = 0.064–0.067 µM LOQs = 1.60–1.68 µM Recovery = 81.63–128.4 %, R ² >0.999	[137]
SCFAs (3): AcA, PA, BcA	mice	hexane	Total time: 1 h; Derivatization (PCF): 60 °C for 1 h	GC-MS; HP-5MS capillary column coated with 5 % phenyl-95 % methylpolysiloxane (30 m × 250 µm, 0.25 µm film thickness); Time of analysis: 25 min	Recovery = 67–108 %, RSD < 20 %, MA = 76–97 %, LOD = 0.2–0.8 µg mL ⁻¹ , LOQ = 1–5 µg mL ⁻¹	[154]
SCFAs and BCFAs (6): AcA, PA, IBCA, BcA, IVA, VA	mice	ethyl acetate	Total time: 45 min; without derivatization	GC-MS/MS; ZB-FFAP (30 m × 320 µm × 0.5 µm film thickness); Total time: 13.5 min	LOD = 0.5–0.8 mg L ⁻¹ LOQ = 0.8–1.0 mg L ⁻¹ Recovery = 80–102 % R ² >0.999	[191]
SCFAs (3): AcA, PA and BcA	mice	LLE: N-butanol, tetrahydrofuran and acetonitrile in a 50:30:20 ratio, HCl 0.1 M, 20 mg citric acid and 40 mg sodium chloride anhydrous ethanol	Total time: 15 min without derivatization	GC-MS; DB-23 column (60 m × 0.25 mm × 0.15 µm thick layer of 80.2 % 1-methylnaphthalene; Time of analysis: 12 min	Linear range = 15–10,000 µg mL ⁻¹ , RSD = 15.0 % Accuracy (error relative [ER]) ± 15.0 %, Recovery > 97.0 %	[203]
SCFAs and LCFAs (21)	pigs	anhydrous ethanol	Total time: 30 min; Derivatization (ECF): 10 min room temp.	GC-MS; HP-5MS capillary column coated with polyimide (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness); Time of analysis: 45 min	R ² >0.99, RSD = 1.30–6.73 %, Recovery > 98 %, Linear range = 0.5–50 µg mL ⁻¹	[140]
Metabolites (62): AAs (20), PhDs (15), FAs (6), OAs (6), lDAs (4), BAs (2)	rats	LLE: methanol and chloroform (3:1, v/v)	Total time: 45 min; MOX: 37 °C for 2 h, Derivatization (BSTFA:1 % TMCS): 70 °C for 90 min	GC-TOF/MS; DB-5MS (30 m × 0.25 mm, × 0.25 µm film thickness); [5 %-phenyl]-methylpolysiloxane; Time of analysis: 45 min	LOD = 0.002–0.9 nmol, LOQ = 0.003–0.7 nmol, Linear range: 0.25–50.0 nmol, R ² = 0.9936–0.9998, RSD < 15 %	[43]
SCFAs (3): AcA, PA, BcA	rats	LLE: dichloromethane	Total time: 30 min; Derivatization (PTBBz): 60 °C for 20 min	GC-MS, DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness); Time of analysis: 20 min	Linear range = 0.05–40 µg mL ⁻¹ , R ² >0.997, LOD = 5–24 ng mL ⁻¹ , Recovery > 92 %	[151]
SCFAs (3): AcA, PA and BcA	rats	diethyl ether	Total time: 12 min without derivatization	GC-MS, ZP-FFAP (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness); Time of analysis: 25 min	AcA (2.00 ± 0.24 mg/g dry weight), PA (0.51 ± 0.07 mg/g dry weight) and BcA (0.58 ± 0.11 mg/g dry weight)	[195]
SCFAs and BCFAs (7): AcA, PA, BcA, PA, HA, IBCA, IPA	rats	SPME (DVB/Car/PDMS fiber)	Total time: 30 min without derivatization	SPME-GC; (PEG) column (ZB-FFAP, 25 m × 0.32 mm × 0.25 µm film thickness); Time of analysis: 15 min	LOD = 0.017–4.91 mg L ⁻¹ , LOQ = 0.015–16.38 mg L ⁻¹ , Recovery = 72.7–104.6 %, R ² >0.995	[158]
SCFAs and BCFAs (9): AcA, PA, IBCA, BcA, IVA, VA, HA, 2-ethyl BcA and 2-ethyl HA	rats	HCl/ethanol	Total time: 15 min without derivatization	GC-MS; DB-5 MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm film thickness); [5 %-phenyl]-methylpolysiloxane; Time of analysis: 22 min	LOD = 0.0868–0.393 µg mL ⁻¹ , LOQ = 0.261–1.18 µg mL ⁻¹ , RSD < 2.54 %, Recovery = 92.81–104.1 %	[204]

Table 2
GC-based methods for the non-targeted analysis of SCFAs and BCFAs in feces.

Metabolites	Fecal sample type	Sample preparation	Derivatization reaction	Chromatography/ detection/stationary phase	References
SCFAs and BCFAs (7): Aca, PA, IBA, BA, IVA, VA, hexanoic-6, 6, 6-d3 acid	humans	hexane	Total time: 45 min, Derivatization (ICT); (ultrasonication for 1 min)	GC-MS, DB-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness); Time of analysis: 20 min	[42]
Metabolites (122 and 86): AAs, FAs, phenolics, ld, carbohydrates, sugars and other metabolites	humans	methanol/water	Total time: 26 h; MeOX: 24 h room temp, Derivatization (MSTFA/1 % TMCS): 70 °C for 1 h	GC-MS; HP-5MS capillary column (30 m × 0.250 mm × 0.25 μm film thickness) AT; Time of analysis: 57 min	[47]
AAs, FAs, CarA and PhD	humans	methanol/water (8:2)	Total time: 2 h 40 min; MeOX: 45 °C for 1 h, Derivatization (MSTFA/1 % TMCS): 45 °C for 1 h	GCxGC/TOF-MS; 10 m RTX-5 (10 m × 0.18 mm × 0.20 μm film thickness); Time of analysis: 45 min	[142]
SCFAs, BCFAs, LCFAs (14)	humans	LLE: MTBE	Total time: 20 min	GC-MS, Stabilwax®-DA column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) Restek; Time of analysis: 25 min	[183]
Metabolites (15): Dimethyl sulphide, Aca, ethyl butanoate, ethyl 2-methylbutanoate, dimethyl disulphide, 1-octen-3-one, dimethyl trisulphide, 1-octen-3-ol, ethanoic acid, Bca, 3-methylbutanoic acid, PA, indole and 3-methyl indole	humans	methanol	Total time: 60 min	GC-MS, SOLGEL-WAX (30 m × 0.25 mm, 0.25 μm film thickness) Time of analysis: 30 min	[190]
SCFAs and BCFAs (6): Aca, PA, IBA, Bca, IVA, VA, total SCFAs	humans	ether and metaphosphoric acid	Total time: 30 min	GC-MS; capillary column (30 m × 0.5 mm; Restek); Time of analysis: 18 min	[205]
Metabolites (195): AAs, FAs, CarAs and PhD	mice	methanol	Total time: 2 h 10 min; MeOX: 60 °C for 1 h, Derivatization (MSTFA/1 % TMCS or MTBSTFA/ 1 % TBDMCS): 60 °C for 1 h	GC × GC-MS; DB-5 MS J&W ultra inert column (60 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) and J&W DB-17 column (1 m × 0.1 mm × 0.1 μm film thickness); Time of analysis: 57.5 min	[182]
Metabolites (126): carbohydrates (26 metabolites), AAs (23), FAs (18), CarA (16) and SCFAs (6)	pigs	ethyl acetate	First protocol: Total time: 2 h 40 min; MeOX: 30 °C for 90 min, Derivatization (BSTFA/1 % TMCS): 37 °C for 60 min; Second protocol: Total time: 1 h 40 min; Derivatization (BSTFA/1 % TMCS): 37 °C for 60 min;	GC-TOF/MS; DB-5MS-UI (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) AT; Time of analysis: 45 min	[48]
Metabolites (86): AA, sugars, OA, FA	fish	ACN:2-propanol: H ₂ O	Total time: 2 h 20 min; MeOX: 30 °C for 90 min, Derivatization: (MSTFA): 37 °C for 30 min	GC-MS, DB-5 ms (0.25 mm × 30 m, 0.25 μm film thickness, 10 m DG), Time of analysis: 37 min	[194]
Metabolites (99): SCFAs, AAs, amides and pyrimidines	rats	methanol	Total time: 1 h 20 min; MeOX: 30 °C for 90 min, Derivatization (BSTFA/1 % TMCS): 37 °C for 30 min	GC-MS, TG-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness) Thermo Fisher; Time of analysis: 45 min	[46]
Metabolites (71): AAs, Biogenic amines, Vit, carbohydrates and other metabolites	rats	methanol/water	Total time: 3.5 h; MOX: 60 °C for 90 min, Derivatization (MSTFA): 60 °C for 90 min	GC-MS; HP-5 MS, (29 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness); Time of analysis: 58 min	[2]
Metabolites (36): AAs, sugars, OAs and others	standard mix, humans	methanol/water,	Total time: 3 h 20 min; MeOX: 37 °C for 90 min, Derivatization (MSTFA): 37 °C for 30 min	GC-MS, ZB-1701 (30 m × 0.25 mm × 0.15 μm stationary phase (85 % dimethylpolysiloxane, 14 % cyanopropylphenyl); Time of analysis: 50 min	[133]

Table 3
LC-based methods for the targeted analysis of SCFAs and BCFAs in feces.

GM metabolites	Fecal sample type	Sample preparation	Derivatization reaction	Chromatography/ detection/stationary phase	Validation parameters	Ref.
SCFAs and BCFAs (6): AcA, PA, BcA, 2-mBcA, VA, IVA	humans	MeOH	Total time: 60 min; Derivatization (HATU, AMQ, HOAT): 25 °C for 20 min	UPLC/MS/MS: Waters BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) UPLC column; Time of analysis: 5.5 min	Linear range = 1.5–10000 μM (0.13–74.4 μmol g ⁻¹), R ² = 0.9969–0.9982, Accuracy 85.5 %–104.3 %, Recovery = 95–110 %, RSD: 3.39–12.75 %, Linear range: 1–30000 ng mL ⁻¹ , R ² > 0.995, LOQ = 1–10 ng mL ⁻¹ , LOD = 0.4–2.0 ng mL ⁻¹	[19]
SCFAs and BCFAs (6): AcA, PA, BcA, VA, IVA, HA, IHA	humans	ACN	Total time: 30 min; Derivatization (2-BAP): 40 °C for 20 min	LC-MS/MS: Apollo C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) Time of analysis: 27 min	Recovery = 95–110 %, RSD: 3.39–12.75 %, Linear range: 1–30000 ng mL ⁻¹ , R ² > 0.995, LOQ = 1–10 ng mL ⁻¹ , LOD = 0.4–2.0 ng mL ⁻¹	[44]
SCFAs and BCFAs (12): AcA, BcA, CA, 2,2-dimethylbutyrate, 2-ethylbutyrate, IbcA, IVA, 2-MBcA, 4-MVA, PcA, pivalic, VA	humans	ACN:H ₂ O	Total time: 2 h 30 min; Derivatization (¹² C and ¹³ C-labelled aniline): 4 °C for 2 h	LC-MS/MS: Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); Time of analysis: 15 min	RSD (%) = 3.3–14.6 LOD = 0.1–5.7 nM, LOQ = 0.2–9.1 nM R ² > 0.997 linear range: 1–10000 nM	[45]
SCFAs (3): AcA, PA, BcA	humans	AcN:H ₂ O	Total time: 40 min; Derivatization (3-NPH): 40 °C for 30 min	LC-MS/MS: Kinetex [®] (2.6 μm X8-C18, 2.1 × 50 mm); Time of analysis: 4 min	Recovery = 82–113 %, LODs: 1.9–0.20 mol g ⁻¹ , CV < 10 %	[50]
SCFAs and BCFAs (10): AcA, PA, BcA, IbcA, VA, 2-MBcA, IVA, 3-mVA, IbcCA, CA	humans	ACN:H ₂ O	Total time: 40 min; Derivatization (¹³ C ₆ -labeled 3-NPH): 40 °C for 90 min	LC-MS/MS: Waters BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm); Time of analysis: 15 min	Recovery = 93–108 %, LOD = 0.15–15 fmol LOQ = 0.3–45 fmol R ² > 0.997, Linear range: 0.12–2500 nM, R ² > 0.998	[162]
SCFAs and BCFAs (10): AcA, PA, IbcA, BcA, 2-mBcA, IVA, VA, 3-mVA, isocaproic, CA	humans	MeOH	Total time: 45 min; Derivatization: (3-NPH): 4 °C for 10 min	HPLC-UV: ZORBAX SB-C18 column (4.6 × 250 mm, 5 μm); Time of analysis: 50 min	Recovery = 96.12–100.75 %, LOD 0.011–0.012 mM, LOQ: 0.038–0.040 mM, RSD = 0.23–4.75, R ² > 0.998	[175]
AcA, PA acid, IbcA acid, BcA, 2,2-dimethylpentanoic acid, 2-mBA, IVA, VA, 2,2-dimethylbutyric acid	mice	MeOH	Total time: 10 min; Derivatization (AMB): room temp for 5 min	LC-MS/MS: RP (Pursuit 5 C18 2.0 mm × 150 mm); Time of analysis: 35 min	Recovery = 98.5–116 %, RSD = 0.48–7.7 %, LOQ: 21.7–61.8 ng mL ⁻¹ , R ² > 0.997,	[33]
SCFAs and BCFAs (10) 30-OH: AcA, PA, BcA, IbcA, VA, IVA, HA, 2-ethylbutyric acid	mice	MeOH	Total time: 10 min; Derivatization: (D ₂ O/D ₂ -DHPP): 30 °C for 3 min	UHPLC-MS/MS: C18 column (2.1 × 150 mm, 1.6 μm); Time of analysis: 15 min	Recovery = 80–120 %, RSD = 1.05–9.74 %, R ² > 0.999, CV < 14.8 %	[37]
SCFAs and BCFAs (11): AcA, PA, IbcA, BcA, IVA, VA, 3M-VA, 4M-VA, HA, AcA, 3-OH-BcA	mice	MeOH	Total time: 2 h 30 min; Derivatization (O-BHA): 25 °C for 2 h	LC-MS/MS: Kinetex C18 (2.1 × 100 mm, 2.6 μm); Time of analysis: 35 min	Recovery = 82 %, LOQ: 0.51–1.04 mM, R ² > 0.990	[64]
SCFAs and BCFAs (14): AcA, BcA, IbcA, 2-MBcA, CA, ICA, crotonic acid, 2-methylcrotonic acid, PcA, IA, VA, IVA	mice	diethyl ether	Total time: 45 min; Derivatization (2-NPH): 60 °C for 20 min	HPLC: TSK-gel ODS-80TS column (4.6 × 250 mm); Time of analysis: 60 min	Recovery = 90–115 %, RSD = 1.3–7.7 %, linear range: 1–100 mmol μL ⁻¹ (0.5–50 μmol g ⁻¹)	[174]
FAs (10): AcA, BcA, IbcA, PA, VA, IVA, 2-MBcA, CA, 4-MVA, succinic acid	mice	MeOH	Total time: 20 min; Derivatization (2-PA in DPDS and TPP): 60 °C for 10 min	HPLC-UV: RP BEH C18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm); Time of analysis: 10 min	Recovery = 89.7–100.2 %, RSD = 2.1–9.2 %, LOD = 10–75 nM, LOQ = 25–100 nM, R ² > 0.991	[177]
FAs (23) and AAs (16)	mice	MeOH for extraction thiol metabolites, MTBE for extraction carboxyl, carbonyl, amine metabolites	Total time: 1.5–3.5 h; Derivatization (DMED, D ₂ -DMED, HQB and d ₂ -HQB, 4DMAP, D ₂ -DMAP, BQB and D ₂ -BQB); Carbonyl metabolites: more than 50 °C for 3 h, amine metabolites: 50 °C for 1 h, thiol metabolites: 45 °C for 1 h	LC-MS: Shimadzu VP-ODS column (2.0 × 150 mm, 5 μm); Time of analysis: 60 min	Recovery = 88 %, RSDs: 24 %, R ² > 0.9998	[162]
SCFAs and BCFAs (8): AcA, PA, BcA, IbcA, lactic, valeric, IVAleric and crotonic acids	dogs	hexane and diethyl ether	Total time: 30 min; Derivatization (2-NPH): 60 °C for 20 min	HPLC-MS: YMC-Pack FA 116 (6.0 × 250 mm); Time of analysis: 25 min	Concentration range: 0.1–5.0 nM, Recovery: 95.9 %–118.0 %, R ² = 0.9922–0.9984	[183]

Table 4
LC-based methods for the non-targeted analysis of SCFAs and BCFAs in feces.

GM metabolites	Fecal sample type	Sample preparation	Derivatization reaction	Chromatography/detection/stationary phase	References
Metabolites (189): AAs, BAs, FAs, carnitines	pigs	MeOH/H ₂ O	Total time: 20 minutes	LC-QTOF MS/MS; Poroshell 120 EC-C18 (2.1 × 50 mm, 2.7 μm particle size); Time of analysis: 29 min	[48]
Metabolites (3012)	humans	ACN/H ₂ O	Total time: 2 h; Derivatization [¹³ C ₆ -dansyl chloride]: 40 °C for 60 min	LC-MS; BEH C18 (2.1 mm × 30 cm, 1.7 μm); Time of analysis: 30 min	[181]
Polar metabolites (42)	humans	SPE: MeOH and H ₂ O	Total time: 5 min;	UHPLC-HRMS; Acquity HSS T3 column (Waters Corporation, 2.1 × 150 mm, 1.8 μm); Time of analysis: 18 min	[182]
AAs, FAs, BAs	rats	MeOH/H ₂ O	Total time: 30 min	LC-Q-TOF MS; BEH C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm); Time of analysis: 17 min	[191]

[−Si(CH₃)₃] to the compound by replacing the active hydrogen (e.g., −OH, −SH, −NH₂, −COOH) and generates stable, more volatile and less polar derivatives of the parental metabolite [133]. Silylation is comparatively safe and easy to use. Usually, two reaction steps, methoxylation (MeOX) followed by silylation, are required to inhibit ring formation of reducing sugars by protecting the aldehyde and ketone groups [130]. Various silylation agents, like (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and *N*-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), with or without the presence of a catalyst (usually 1% trimethylsilyl (TMS), trimethylchlorosilane (TMCS), trifluoroacetamide (TFA), hydrochloric acid, potassium acetate, piperidine or pyridine) are commonly used before GC-MS analysis [134]. The TMS group contributes both to chemical and thermal stability, stabilizes carbonyl radicals of metabolites and stops charge transfer as well as increases analyte volatility for GC and GC-MS applications [135]. These derivatization reagents have an excellent and comprehensive reactivity with biological organic molecules. The active hydrogens from acids, alcohols, thiols, amines, amides, ketones and aldehydes are replaced with the trimethylsilyl group [136]. The choice of silylated reagent is based on its reactivity and selectivity towards the particular compound of interest, the intended application, the stability of the derivative and the abundance or nature of reaction by-products [35]. It is also essential that this type of derivatization requires anhydrous reaction conditions, and therefore, the samples and solvents have to be completely free of water [132]. Additionally, the reaction mixture is not separated from the derivatives, therefore, the sample injected into the GC inlet and then mostly on (5-*phenyl*)-methylpolysiloxane type (HP-5 and DB-5) columns, consists not only of the derivatives but also of the residual reagents, which may cause damage to the GC column, reducing its lifetime.

Shan et al., used both, methoxyamine hydrochloride dissolved in pyridine (w/v, 10 mg/mL) and BSTFA (1% TMS), during the derivatization process before GC-MS detection of 99 endogenous metabolites in fecal samples from rats. Among the detected metabolites SCFAs (Aca, PA, Bca), BCFAs (isobutyric acid (iBca), VA, and isovaleric acid (IVA)), amino acids, amides, and pyrimidines were present [46]. Methoxylation and silylation were carried out at 30 °C for 90 min and at 37 °C for 30 min, respectively. Yin et al. developed a gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF/MS) method for the analysis of 64 metabolites representing different classes of GM-related metabolites (SCFAs, BAs, PhD, AAs, etc.) in rat fecal samples. First, MeOX was carried out at 37 °C for two hours. Then, BSTFA with 1% TMCS was added, and the sample was silylated at 70 °C for 90 min before the GC-TOF/MS analysis. Excellent linearity was obtained for 62 reference standards, with correlation coefficients (*R*²) higher than 0.99. Limits of detection (LOD) and limits of qualification (LOQ) for these standards were below 0.9 nM and 1.6 nM, respectively. The reproducibility

and repeatability of the majority of tested metabolites were below 15% [43]. The choice of the derivatization method primarily affects the simultaneous detection of a high number of metabolites from different classes within a single GC-MS analysis. Thus, it makes the sample preparation a time-consuming process. Jain et al. established a TMS- and GC-MS-based methodology, which enabled the detection of 122 and 86 microbial metabolites from fecal and urine samples. Sample preparation consisted of 24 h MeOX step carried out at room temperature. The list of detected metabolites includes amino acids, phenolic compounds, indoles, carbohydrates and sugars [47].

Methoxylation protects ketones and aldehydes by converting carbonyl groups to methoxyamine groups. However, not all compounds are protectable because carbonyl groups adjacent to heteroatoms (nitrogen or oxygen) are not sufficiently electrophilic for nucleophilic attack by the methoxyamine reagent. Therefore, the MeOX step does not alter all metabolites, what makes it optional or unnecessary. Additionally, the removal of the methoxylation step not only reduces the derivatization time but also gives more stability to the final products. For this reason, Lopez-Bascos et al. compared two different derivatization protocols to check the influence of this step on the detection capability of their GC-TOF/MS method [48]. In the first tested derivatization protocol, the residues resulting from the sample preparation step were reconstituted with methoxyamine in pyridine (20 mg mL^{−1}), then BSTFA-TMCS mixture was added to the reconstituted analytical sample. In the second derivatization protocol, the MeOX step was omitted, and the residues were reconstituted in pyridine, and the mixture of BSTFA-TMCS was added. Based on the data obtained, the authors concluded that depending on the objective of the research, one or two derivatization protocols may be required to increase metabolites coverage. Three additional carboxylic acids (CarA) were detected only when the MeOX step was included. On the other hand, 27 metabolites were detected without MeOX. Therefore, the adoption of a unique silylation process allowing derivatization of all functional groups is challenging due to the different kinetics of the reaction. Under the selected conditions, some functional groups are derivatized immediately, while others were delayed. Due to the instability of immediately silylated derivatives, the silylation can not be carried for too long. On the other hand, the time of this reaction can not be too short due to incomplete silylation of the metabolite moieties showing slower reaction kinetics. Therefore, reaching a complete reaction for all metabolites, without any degradation, remains challenging. To sum up, depending on the objective of the study, one or two derivatization protocols may be required [48].

Zhang et al. presented an improved GC-MS method for the measurement of nine fatty acids. SCFAs and BCFAs were extracted with anhydrous ether from acidified fecal water. BSTFA was used as

a derivatization reagent, in combination with the previous dehydration step performed with the use of sodium sulfate (Na_2SO_4). The major SCFAs, including AcA, PA, iBcA, BcA, IVA and VA, were identified and quantified accurately in fecal and serum samples. The derivatization with BSTFA at 37 °C showed excellent linearity ($R^2 > 0.999$), good recoveries (81.27–128.42 %), high repeatability ($\text{RSD} < 2\%$) and LOD of different SCFAs ranging from 0.064 to 0.067 μM . Summarizing, GC-MS analysis of the SCFA standards mix processed with anhydrous Na_2SO_4 showed much higher peak responses than without dehydration, suggesting that performed dehydration is useful in combination with BSTFA derivatization [137].

The other known derivatization reagents, commonly used in GC-MS-based metabolomics, are MSTFA and *N*-tert-Butyldimethylsilyl-*N*-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA). Compared to the reagents presented above, MSTFA and MTBSTFA are less sensitive to moisture and tolerate about 1 % of water [138]. MTBSTFA was used by Minamoto et al. to detect three SCFAs (AcA, PA and BcA) in fecal samples from dogs [139]. Deda et al. used methoxyamine hydrochloride in pyridine with MSTFA to quantify 71 metabolites in rat fecal samples [2]. The combination of MeOX and MSTFA offers distinct advantages. Methoxyamine stabilizes carbonyl radicals of metabolites and stops charge transfer, while MSTFA replaces active hydrogens on a wide range of polar compounds with a $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ group. Recently, Yuan et al. compared two derivatization reagents, MSTFA with 1 % trimethylchlorosilane (TMCS) and MTBSTFA with 1 % tert-butyldimethylchlorosilane (TBDMCS). The reagent volume, incubation time and temperature for both the methoxylation and silylation step were the same. The reaction was carried out at 60 °C for 1 h. A total of 194 metabolites were identified by two-dimensional gas chromatography (GC \times GCM-5) with MSTFA derivatization and 149 by the same method with MTBSTFA derivatization. Detected metabolites belong to amino acids, fatty acid derivatives, carboxylic acids and phenolic compounds [140]. Phua et al. used GC-TOF/MS to profile a wide range of metabolites including carbohydrates, carboxylic acids, hydroxyl acids, fatty acid esters, polyols, long chain alcohols, sterols, phenols, amino acids and other nitrogen-containing compounds in human feces. Following oximation, MSTFA with 1 % TMCS was added and the mixture was incubated at 60 °C for 45 min to form TMS derivatives [141].

In most of the above presented TMS-based protocols, offline derivatization was performed. It causes the generation of unstable products, and consequently, the derivatization of a larger batch of samples at once will result in a higher variability between the samples injected in the same batch. To overcome this problem, Zarate et al. presented a fully automated TMS derivatization protocol using MSTFA as a reagent, applicable to measure 36 metabolites by GC-MS. This automated TMS method showed a better reproducibility and a higher peak intensity for most of the identified metabolites than the manual derivatization method. The exception was the reproducibility of amino and organic acid measurement in wine or plasma samples, which was better when the manual method was used. However, derivatization with the use of methyl chloroformate (MCF) is preferred over TMS for the simultaneous determination of amino and organic acids [130]. In the case of plasma samples, better reproducibility using the manual method was also observed for oxalic acid. However, this early eluting metabolite is a poor indicator of reproducibility. When the automated method was used excellent results for sugars, sugar alcohols and some organic acids (OAs) were achieved. According to the performed literature review (Table 1), it was the first time that an automated TMS method was applied to analyze a large number of complex biological samples [133]. Trost et al. developed an automated derivatization method with the use of two robotic hands

to determine 82 metabolites mainly belonging to AAs (27), FAs derivatives (17), benzene derivatives (10) and CarAs (10) by use of GC-GC/TOF-MS. First, methoxymation reagent was added to each sample, and after that, the samples were incubated and shaken for one hour at 45 °C. Then, MSTFA was added, and the samples were again incubated and shaken at 45 °C for one hour. In this method, the whole derivatization process was carried out for more than 2 h at 45 °C. Unfortunately, such a high temperature can be destructive to some thermolabile compounds [142]. Therefore, to reduce the reaction time from hours to 3–5 min, microwave-assisted methods of silylation were developed [143]. However, microwaves can also cause the degradation of many unstable metabolites present in biological samples [133].

6.1.2. Alkylation reagents used for the derivatization of GM-related metabolites

The results obtained with the use of silylated derivatives have been reported as unreproducible [144]. It was hypothesized that the hydrophilic nature of the reagent yielded an unstable product that was easily hydrolyzable in the presence of water [144]. To overcome this problem, alkylation, as an alternative derivatization reaction improving the stability of compounds, was proposed [130]. Unlike silylation, alkylation offers instantaneous reaction without heating or water exclusion, lower reagent costs and easy separation of the derivatives from the reaction mixture, which causes less damage to the GC-capillary column [35]. Alkyl chloroformate derivatization has advantages of being faster, involving milder reaction conditions (aqueous medium and room temperature) and has better reproducibility and stability [109]. Some studies (Table 1) reported that an acylated compound is more stable than a silylated one, especially for amines or fatty acids. Alkylation with MCF and propyl chloroformate (PCF) improves the stability of compounds by protecting unstable groups. Furthermore, they confer volatility to substances that have many polar, non-volatile groups and will decompose during the heating process. This way, such molecules can be analyzed using gas chromatography [145].

Fecal metabolites, such as amino acids and some organic acids, produce relatively unstable silylated derivatives. Therefore, to analyze these compounds efficiently, an alternative derivatization method should be used [146]. Since methyl- or ethylchloroformates yield higher derivatization efficiency than propylchloroformates, Luan et al. tested alkyl chloroformates with different lengths of alkyl groups to perform derivatization of fecal amino acids, short-chain fatty acids and non-amino organic acids before GC-MS/MS analysis. It was confirmed that carboxylic acids and amino groups could be selectively labeled by propyl and ethyl groups, respectively. Therefore, the chloroformate derivatization method was developed and employed for the profiling of short-chain organic acids. With this method, acetic acid derivatives could be separated on popular HP-5MS capillary column (30 m \times 250 μm i.d. \times 0.25 μm film thickness; Agilent Technologies, USA) from the solvent peak and precisely measured [49]. In 2010, Smart et al. developed an analytical platform with the MCF derivatization process for the analysis of 37 amino and non-amino organic acids using GC-MS [147]. One year later, Villas-Bôas et al. [130] compared silylation (TMS) and alkylation (MCF) derivatization processes for analysis of amino and non-organic amino acids by GC-MS. MCF was found preferable for the analysis of polyfunctional amines, nucleotides and organic acids in microbial metabolomics studies. As chromatography of TMS derivatives seems to suffer from irreproducibility, MCF derivatization appears with a better analytical performance. Zhao et al. improved the previously optimized derivatization method with MCF and ECF. They developed a rapid, simple and sensitive method for the simultaneous analysis of 92, 103, 118 and 52 microbial metabolites in human serum, urine, feces and *Escherichia coli* cell samples, respectively. These metabolites (42

FAs, 37 AAs, 16 CarAs, 9 hydroxy acids, 9 indoles and others) were analyzed in a single run of about 15 min. The proposed method exhibited excellent linearity, reproducibility and has the potential to be used for quantitative analysis of GM-related metabolites [148].

Based on the literature review, silylation arises as a highly recommended method for the derivatization of SCFAs present in biological samples [149,150]. Analysis of these GM-related metabolites can be problematic because of their unique physicochemical properties and low concentration in biological samples [33]. SCFAs can be lost during conventional extraction and derivatization processes due to their properties (relatively high solubility in aqueous media, low pKa values, and low vapor pressure), [151]. Another GC-MS method for the quantification of fecal carboxylic, amino and phenolic acids after derivatization with ethyl chloroformate (ECF) was described by Gao et al. In this method, the efficiency of three solvents (deionized, acidified and alkalinized water) to extract fecal metabolites was tested. Deionized water had a higher extraction efficiency for fecal compounds than acidified or alkalinized water [152]. Zheng et al. developed a GC-MS method for quantification of SCFAs (14 molecules) and BCAAs (3 molecules) using one-step-derivatization procedure with PCF in a reaction system consisting of water, propanol and pyridine (v/v/v = 8:3:2). This method includes a basic aqueous (5 mM NaOH) extraction at 4 °C to protect the volatile SCFAs. This derivatization reagent has many advantages, such as the short reaction time (only 1 min at room temperature) and the ability to perform the derivatization in aqueous media. This accurate, simple and robust method was successfully employed to determine SCFAs and BCAAs in human feces, plasma and urine [153]. Amer et al. compared different methods for extraction and direct derivatization of fecal metabolites. Short- and long-chain fatty acids were derivatized with ethyl chloroformate. Results obtained showed that direct derivatization of 21 fecal fatty acids using the ECF derivatization method, without aqueous extraction step, ensures the highest recovery of volatile short-chain and less water-soluble long-chain FFA. Additionally, ECF-ethanol derivatization gave the highest peak intensity of derivatives, better separation capability and derivatization purity. ECF derivatization is a rapid reaction carried out at room temperature (at pH 5–6). Under these mild conditions, no saponification and/or transesterification reactions would take place [149]. Cai et al. compared two sample preparation protocols for GC-MS-based measurement of three SCFAs in biological samples: the propyl esterification method and acidified water extraction. For the propyl esterification method, samples were derivatized at 60 °C for one hour, and then were extracted with a two-step hexane extraction. In the second protocol, spiked fecal samples were mixed with 1 mL of water, homogenized, and the pH of the suspension was adjusted to 2–3 by adding 12 M HCl. The acidified water method showed a better recovery at higher concentrations, ranging from 87.6 % to 118.9 %; however, it was inferior to the propyl esterification method at lower concentrations. Nevertheless, the propyl esterification method presented better inter- and intraday repeatability compared to the acidified water method, except for propionic acid. To sum up, the propyl esterification method is highly recommended for trace/ultra-trace detection of SCFAs in biological fluids. Because of the more comfortable sample preparation procedure and short run time, the acidified water method is more suitable for studies with large quantities, including samples from large-scale human studies [154]. Recently, Ueyama et al. [42] and Cheng et al. [155] developed the methods for identification of SCFAs (3 molecules) and BCAAs (4) using GC-MS. Both used freeze-dried fecal samples. In the study of Ueyama et al., derivatization with isobutyl chloroformate was followed by liquid-liquid extraction with hexane. In contrast, in the study of Cheng et al., PCF derivatization was followed by liquid-liquid extraction with phosphoric acid.

Both methods allow for reliable FAs measurement without labor-intensive processes. Therefore, these freeze-drying procedures can be applied in basic, clinical, and epidemiological studies.

Before the analysis, SCFAs can be derivatized with such an alkylation reagent as pentafluorobenzyl bromide (PFB-Br) [19,40]. PFB-Br derivatives are freely soluble in many water-miscible, water-immiscible, protic and aprotic organic solvents of general laboratory use, i.e., acetone, acetonitrile (*can*), methanol (MeOH), ethanol or toluene. Because of these much favored physicochemical properties, PFB-Br emerged as the ideal derivatization agent for highly sensitive GC-MS analysis of endogenous and exogenous substances using electron capture detection or after electron-capture negative-ion chemical ionization [156]. In 2018, Hoving et al. developed a fast, reliable and reproducible method with PFB-Br for the separation and quantification of three SCFAs (AcA, PA and BcA) in mouse feces with LOQ ranging from 1 to 20 µM [40]. In the same year, He et al. also used PFB-Br to derivatize five SCFAs (FA, AcA, PA, IBcA and BA) and three BCFAAs (2-methylbutyric, IVA and VA). This method was also successfully applied to analyze fecal samples with the recovery rates for the eight FAs ranging from 55.7 % to 97.9 % [19]. To the best of our knowledge, it was the first study [19] presenting simultaneous detection and quantification of all straight-chain and branch-chain SCFAs. Park et al. developed a method for the GC-MS/MS determination of SCFAs (AcA, PA, BcA) in aqueous fecal samples from rats. In this study, an *in situ* extraction and derivatization were applied for the determination of SCFAs using tetrabutylammonium hydrogen sulfate (TBAHS) and pentafluorobenzyl bromide. TBAHS and PFB-Br showed highly selective reactivity with carboxylic acids, enabling selective extraction. TBAHS, as the phase transfer catalyst, could readily convert SCFAs into SCFA-TBA organic salts, which show good solubility in organic solvents and can rapidly react with PFB-Br to form SCFA-PFB derivatives. It is also important to note that the detection of SCFA-PFB derivatives needed specific MRM ion transitions for MS/MS analysis, enabling high sensitivity, selectivity, and specificity for quantification of these three carboxylic acids. Excellent linearity was obtained for all analytes ($R^2 \geq 0.99$). Recoveries ranged from 92.4 % to 113.1 %, with precision ranging from 0.2 % to 10.2 %, indicating an excellent method accuracy and precision [151].

6.1.3. Headspace solid-phase microextraction with gas chromatography

Derivatization methods described above confirmed that GC-MS can be a suitable technique for volatile compounds analysis and offers several derivatization protocols for these compounds; nevertheless, a loss of SCFAs during sample extraction is expected [152]. Due to this fact, alternative methods are still being sought. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and/or solventless-SPME extraction techniques have also been applied for the extraction of volatile compounds from biological fluids. However, fibers are relatively expensive and fragile, and such an approach also requires additional devices for automated analysis [132]. Already in the year 2007, Garner and co-authors [157] developed an SPME GC-MS method to measure volatile compounds from feces for the diagnosis of gastrointestinal diseases. This was a direct method without any pre-processing steps like liquid extraction, but its detection was limited to such volatile compounds as SCFAs. The method was not reliable for all FAs. Two years ago, [42,155], Furuhashi et al. compared two methods used for fecal samples preparation prior to GC-MS analysis of SCFAs. SPME method and derivatization of the samples with isobutyl chloroformate in aqueous solution (without drying) were compared. It is remarkable that this derivatization protocol can be conducted at room temperature. The signal to noise ratio was compared between SPME and isobutyl esterification methods. For most of the detected SCFAs isobutyl esterification better *s/n* ratios were shown than those measured

by SPME. Taking into account sensitivity, isobutyl esterification can detect SCFAs from feces samples that are under the detection limit for SPME [150]. Kim et al. developed a method for the quantification of four SCFAs (acetic, propionic, butyric and valeric) by use of gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID). Sample preparation consisted of the ethyl ether-hexane (1:1, v/v) liquid extraction followed by the aminopropyl solid-phase extraction (SPE) [144]. Bugelyte and coworkers, developed a simple derivatization prior analysis of a short-chain carboxylic acids (lactic, oxalic, succinic, malic and citric) in dry mass with use of headspace gas chromatography. BSTFA was used as a derivatization reagent and dimethylformamide as a derivatization medium procedure. This method was found as the fastest and cleanest method for analysis of volatile organic compounds in solid or liquid matrices. However, due to a low concentrations of the analytes in the headspace the limits of detection were high and the method was not of practical use. To obtain lower detection limits, higher boiling point solvents should be used. Wherefore methods for determination of short-chain carboxylic acids using HS-GC still need to be improved [132]. Fiorini and coworkers developed and validated a quantitative method to analyze SCFAs in rat feces by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography (HS-SPME-GC). The addition of salt, base or acid during sample preparation was tested. The best results were obtained using the mixture of ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and sodium dihydrogen phosphate NaH_2PO_4 salts [158]. In the other study of the same authors the same salt mixture was found beneficial, in comparison to other commonly used salts for the HS-SPME extraction of SCFAs [159]. Based on these studies it can be concluded that a sensitivity of the method for FFAs analysis can be improved significantly when the $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ salt combination, instead of the more commonly used salts like NaCl and Na_2SO_4 is used as a salting out agent [158,159]. In other research, Fiorini and coworkers have shown that direct sampling of SCFAs from the headspace of the matrix using a suitable SPME fiber, allows sufficient extraction efficiency to detect the targeted analytes avoiding the derivatization step. SCFAs were analyzed in fecal samples using such HS-SPME mixed fibres as Divinylbenzene-Carboxen-Polydimethylsiloxane (DVB-CAR-PDMS), CAR-PDMS or CAR-DVB. The method was fully validated for linearity, sensitivity, accuracy, precision and matrix effect and it was applied to quantify GM-related metabolites in real samples [159].

6.2. Derivatization reagents used to modify fecal metabolites before LC-MS analysis

Due to the high separation capabilities of liquid chromatography and the high specificity of mass spectrometry [160], which allow for the direct detection of a large number of molecules [161], LC-MS/MS is now the most powerful and reliable analytical technique. The application of LC-MS to analyze fecal samples is less common than that of GC-MS. This can be due to the fact that a proper LC-MS quantification of highly polar compounds like carboxylic acids in such complex matrices as feces is challenging [162]. Inherent low concentrations of metabolites, low ionization efficiency, undesirable chromatographic behavior and interferences of a complex biological matrix can be mentioned as the more demanding tasks [163]. Hydrophilic properties of these metabolites result in poor chromatographic separation and insufficient ionization in electrospray ionization (ESI) [33]. To overcome these problems, several chemical derivatization methods or new reagents have been introduced to quantify SCFAs and BCFAs using LC (Tables 3 and 4). This process at the extraction stage offers a suitable way to improve chromatographic behavior and sensitivity. Moreover, the proper validation of a larger number of analytes is allowed [161]. However, several critical factors must be considered,

including the fast reaction time for high throughput, the feasibility of reaction in the presence of water, the sensitivity of derivatives, the applicability to CarAs and fast separation of SCFAs and structural isomers after the derivatization. Although derivatization is not a mandatory step for LC-MS analysis of GM-related metabolites [25], according to Song et al. the challenge lays on the detection of SCFAs by LC-MS because m/z values were in the lowest range of mass spectra, where numerous interfering peaks from solvents and additives are present [33]. Eijk et al. proved that quantification of SCFAs by LC-MS, without chemical derivatization, requires harsh experimental conditions, i.e., an aqueous mobile phase containing 1.5 mM HCl [164]. For this reason, in recent years, the expansion of derivatization methods (Tables 3 and 4) for sample preparation before LC-MS analysis has been observed [165]. Derivatization overcomes the problem of lack of sensitivity, what in the case of metabolite analysis outweighs the inconvenience of this process [163].

6.2.1. Commercially available derivatization reagents for LC-MS analysis of GM-related metabolites

LC-MS-based metabolomics is a sensitive and widely applied analytical tool [155]. The procedures for sample preparation are typically simple, but currently lacks a standardized protocol for handling human fecal samples to cover a wide range of volatile metabolites [166–171]. Chemical derivatization methods for targeted LC-MS analyses were developed in the 1980s, since then, sample preparation methods of GM-related metabolites in biological samples have considerably changed [160]. Already in the year 1985, Miwa et al. introduced a method to measure the concentration of both volatile and non-volatile SCFAs as acid hydrazides with standard high performance liquid chromatography (HPLC) equipment. However, this method has not been applied to measure biological samples, such as feces or serum [172]. Toci et al. used HPLC-UV method, based on 2-Nitrophenylhydrazine (2-NPH) derivatization, for quantification of 12 SCFAs (AcA, BcA, iBcA, 2-mBA, CA, iCA, crotonic, LA, PA, VA, iVA and SA) in feces. Excellent linearity (between 4–500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) was obtained for all FFAs. Determined LOQs ranged from 0.01 to 0.03 $\mu\text{mol g}^{-1}$. The disadvantages of this method were poor peak separation, application of diethyl ether for extraction, an acidic mobile phase at pH 4.5 and a high YMC-Pack FA 250 \times 6 mm ID column temperature (50 °C) which together limited the applicability of this method. Additionally, the validation of the method was only carried out on major SCFAs, while BCFAs were ignored. Moreover, only two trace SCFAs, i.e., iVA and VA, were determined in the samples [173].

Inoue et al. improved the method of Miwa et al. [172] in which HPLC with UV-vis diode detection (HPLC-UV-vis) was used to determine 14 SCFAs species at pH 4.5. In this method, analytes were derivatized with 2-NPH and separated on an octylsilyl column. However, during the analysis, similar limitations, as in the study of Torri et al. [173], were observed. Inoue et al. also used 2-NPH as a pre-column derivatization reagent but in the presence of 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride. 2-NPH derivatives of SCFAs and the internal standard were separated successfully on an octadecyl silyl (C18) reversed-phase (RP) at a very low pH of 2.5. The method was linear for all measured SCFAs in the concentration range of 0.5–50 $\mu\text{mol g}^{-1}$ ($R^2 > 0.998$ for all cases) [174]. Recently, Wang et al. presented a simultaneous quantitative analysis method for both, major and trace, SCFAs and BCFAs by HPLC-UV under a mild reaction condition. Pre-column derivatization and solid-phase extraction were used to determine SCFAs (AcA, PA and BcA) and BCFAs (isobutyrate, 2-methylbutyrate, isovalerate, valerate, 3-methylvalerate, isocaproate and caproate) in human feces. These metabolites were converted to 3-nitrophenylhydrazine derivatives. The removal of the coupling reagent and catalyst from the test solution by SPE

segmental elution was another advantage and novelty of the proposed method. Additionally, SCFA-derivatives were stable for 20 h at room temperature, with RSD values below 0.68 %. Moreover, a low limit of quantification (< 0.04 mM), linearity ($R^2 = 0.998$) at a wide range of concentration (0.04–8.0 mM), and recoveries above 96 % were achieved. The main disadvantage of this method is the time-consuming SPE segmental elution, which led to two different eluents analyzed in two separate HPLC runs [175].

Several chemical derivatization methods have been previously developed (Table 3) to overcome the above-mentioned problems [176]. Increased size and hydrophobicity of the molecules after the derivatization usually afford longer retention time on liquid chromatography, what eliminates interferences related to the early elution and co-elution from C18 types of columns of highly polar nonderivatized SCFAs. The added functional group from the derivatizing agent can potentially enhance the sensitivity through more efficient ionization in ESI and/or generation of unique and highly abundant fragment ions through more facile collision-induced dissociation in the collision cell. A wide variety of derivatization agents, including 2-picolyl amine (2-PA) [177] or *o*-benzylhydroxyl amine (O-BHA) [64] can be used for the derivatization of carboxylic acids with a short carbon alkyl chains prior to LC-MS/MS analysis. Gómez-Gómez et al. have compared the utility of mentioned reagents for the derivatization of carboxylic acids in biological samples [161]. Derivatization with O-BHA showed significant advantages over 2-PA derivatization. Better sensitivity, more stable derivatives and the ability to validate a larger number of metabolites, among others, can be mentioned. In another study, Zeng et al. compared the effectiveness of four commercially available derivatization reagents, i.e. DmPA (dimethylaminopropyl bromide), PA, O-BHA and 3-NPH (3-nitrophenylhydrazine), for the determination of nine SCFAs and BCFA. The analytes were measured in fecal and plasma samples using HPLC-MS/MS. The results showed that the signal of obtained derivatives was decreasing in the following order: 3-NPH > DmPA > BHA > PA for SCFAs. However, acetate could only be detected either with O-BHA or 3-NPH. Finally, *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)-catalyzed derivatization with O-BHA in aqueous-organic solvent was chosen as the best method for the detection of SCFAs, including particularly volatile acetic and propionic acids. The optimized method demonstrated excellent sensitivity and good separation of all isomeric analytes within a short chromatographic time [64].

Considering the low molecular weight and volatility of SCFAs, Ma et al. applied a new derivatization strategy [44]. The authors developed an innovative LC-MS/MS method for the quantification of seven SCFAs (AcA, PA, BcA, VA, IVA, hexanoic (HA) and iso-HA) in plasma and feces. 2-bromoacetophenone (BP) was used as a derivatization agent. The radical acid ions of SCFAs can react with BP by nucleophilic substitution and become the corresponding esters. A sodium carbonate solution was added to prevent volatilization and facilitate the reaction. Due to reagent's reactivity, a non-aqueous solvent (acetonitrile) was used to eliminate the interference of water and increase the reaction response. The method of Ma et al. [44] was characterized by 200–2000-times improved sensitivity in comparison to the conventional GC method [160]. Especially for BcA, a low (1 ng mL^{-1}) limit of quantification was obtained, 1600-fold lower than in the case of GC method ($1.6 \mu\text{g mL}^{-1}$). The above results suggest that the designed LC-MS/MS method with derivatization is more sensitive and robust than the conventional GC method for the measurement of SCFAs in biological samples [44]. Nagatomo et al. used, for the first time, a simple, cost-effective and rapid sample preparation method, such as QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe), for analysis of SCFAs in fecal samples. In this method, derivatization with 2-PA was performed and samples were analyzed with ultra-high performance liquid

chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS). The developed method was used for simultaneous determination of 10 SCFAs (AcA, PA, BcA, iBcA, VA, IVA, 2-methylbutyric, 4-methyl-valeric, succinic and CA) in mice feces. Obtained recovery values ranged from 89.7 % to 100.2 %. Chemical derivatization with 2-PA provided such advantages as short reaction time (only ten minutes), low LOD < 75 nM and LOQ < 100 nM, high reproducibility (RSD from 2.1 to 9.2 %) and good linearity ($R^2 > 0.991$). The most significant disadvantage of this method is the high cost and complex instrumentation setup needed [177].

6.2.2. Isotope-labeled chemical derivatization (ILCD) methods for LC-MS analysis of GM-related metabolites

Isotope-labeled chemical derivatization (ILCD) provides several analytical benefits for LC-MS/MS analysis (Tables 3 and 4), i.e., increased detectability, specificity and chromatographic performance as well as reduced matrix effects, which lead to a high assay accuracy and precision [160]. Several isotopically-labeled pairs of derivatization reagents, such as $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}_2$ -para-dimethylaminophenacyl bromide [178], D_3/D_2 -3-acyloxymethyl-1-methylpyridinium [179] and D_3/D_2 -cholamine [180] $^{13}\text{C}_2$ -dansyl chloride [181], among others, have been used for the identification and relative quantitation of fatty acids by LC-ESI/MS. However, these reagents were not explicitly developed for the targeted analysis of SCFAs. On the other hand, LC-ESI-MS quantitation without the use of isotopically-labeled IS makes the analysis questionable because of the notorious matrix effects observed in ESI. Another disadvantage of the ICD-based methods is the isotope effect in chromatography [160]. The use of ^{15}N -labeling is also a practical approach to avoid chromatographic isotope effect which together with the lower matrix effect, results in precise and accurate measurements of the SCFAs in fecal samples [160].

Accordingly, in 2015, Han et al. developed a new ILCD-LC/ESI-MS method for the analysis of AcA, PA, BA, iBcA, VA, IVA, caproic acid and others in fecal samples. In this method, 3-NPH labeled with $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ was used for sample derivatization. The analysis was subsequently performed using a reversed-phase C_{18} column. The 3-nitrophenylhydrazone derivatives showed excellent in-solution stability, which is very useful for high throughput sample analysis. Derivatization with ^{13}C labeled 3-NPH afforded for the generation of ^{13}C labeled SCFA analogs. Although this approach is so far the most comprehensive method for SCFA labeling, it omits the detection and quantitation of the main 5 SCFAs (determining thus pivalic, 2-ethylbutyric, 2, 2-dimethylbutyric, 3, 3-dimethylbutyric and 2-methylbutyric acid) in human fecal samples. Moreover, ^{13}C -labeled 3-NPH is not widely available and requires expensive custom synthesis. Additionally, the published methodology lacks a post-derivatization quenching step, which could result in an unintended reaction of 3-NPH with residual acetic acid, a common co-solvent in an LC-MS/MS analyses. This method demonstrated good sensitivity and other analytical validation parameters but, to fully resolve the isomers, required a relatively long chromatographic time [161]. Recently, Liebsh et al. improved this method, but only to quantify four fecal SCFAs (AcA, PA, BcA and iBcA). The addition of formic acid stopped the derivatization reaction. To perform accurate quantification, for each straight-chain SCFA, a stable isotope-labeled SCFA ($^{13}\text{C}_2$, D_3]-acetic acid, $[\text{D}_3$]-propionic acid, $[\text{D}_7$]-butyric acid) was added as IS. Additionally, this study demonstrated that the fecal level of SCFAs may change rapidly in aqueous samples, and the addition of organic solvents, such as isopropanol, stops SCFA metabolism [50].

Chan et al. presented a novel method, with ^{12}C - and ^{13}C -aniline derivatization, for the separation, detection and quantitation of 12 SCFAs (AcA, BcA, CA, 2, 2-dimethylbutyric, 2-ethylbutyric, iBcA,

isovaleric, 2-methylbutyric, 4-methylvaleric, PA, pivalic and VA) in human infant stool samples. The analysis was performed using LC-MS/MS within a short analysis time (15 min) on an Acquity UPLC HSS T3 (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) column. Novel sequential derivatization of endogenous and spiked SCFAs in stool via ¹²C- and ¹³C-aniline, facilitated the accurate quantitation of ¹²C-aniline derivatized endogenous SCFAs based on the calibration of exogenously ¹³C-derivatized SCFAs. Despite extensive chromatographic optimization, 3 SCFAs (3, 3-dimethylbutyric, 2-methylvaleric and 3-methylvaleric acid) could not be completely resolved chromatographically. The use of readily available aniline, ring-labeled with either ¹²C or ¹³C, afforded convenient and cost-effective derivatization of SCFAs. The effect of the SCFA/aniline/EDC ratio (1:5:2.5 or 1:10:5) on the performance of derivatization reaction was examined. Additionally, different reaction times and temperatures were tested. Finally, the following optimal reaction parameters were established: SCFA/aniline/EDC ratio of 1:10:5 at 4 °C for 120 min [45].

In the previous studies, the authors mainly focused on alkyl SCFAs, while many other important bioactive fecal SCFAs with carbonyl, hydroxy and alkenyl groups have not been studied [45]. Recently, Zheng et al. developed a highly sensitive method for simultaneous detection of 34 SCFAs by stable isotope labeling coupled with UHPLC-ESI-MS/MS analysis. Isotope labeling reagents, *N*-(4-(aminomethyl)benzyl)aniline (4-AMBA) and *N*-(4-(aminomethyl)benzyl)aniline-^D₃ (4-AMBA-^D₃), were synthesized to label SCFAs from the mice feces. The 4-AMBA-^D₃ labeled SCFAs were used as internal standards to compensate for the ionization variances resulting from a matrix effect and thus minimizing a quantitation deviation in MS detection. Thanks to this derivatization method, the following validation parameters were obtained: low LODs (<0.005 ng mL⁻¹), excellent linearity for 34 SCFAs (R² from 0.9846 to 0.9999) and the intra- and inter-day relative standard deviations (RSDs) not higher than 17.8% and 15.4%, respectively. SCFAs labeled with 4-AMBA improved the separation of isomers by increasing the retention of SCFAs on the reversed-phase column and enhanced the ionization efficiency of SCFAs. In addition, 4-AMBA-^D₃ labeled SCFA standards were used as the internal standards (IS) to ensure accurate quantification in a complex matrix [41]. Yuan et al. used newly synthesized four labeling reagents and their corresponding isotope reagents, 2-dimethylaminoethylamine (DMED, ^D₄-DMED), 2-(2-hydrazinyl-2-oxoethyl)isoquinolin-2-ium bromide (HIQB and ^D₃-HIQB), 4-(*N,N*-dimethylamino) phenylisothiocyanate (DMAP, ^D₄-DMAP) and ω-bromoacetylquinolinium bromide (BQB and ^D₃-BQB), to determine carboxyl, carbonyl, amine and thiol compounds in fecal samples using LC-MS/MS [182]. Wei et al. developed a novel derivatization method, based on ^D₃/^D₄-*N,N*-dimethyl-6,7-dihydro-5*H*-pyrrolo [3,4-*D*]pyrimidine-2-amine (^D₃/^D₄-DHPP), for the global characterization of 10 SCFAs and 30 OH-SCFAs in fecal, liver and serum samples. Analyses were performed using UHPLC coupled with high-resolution mass spectrometry operated in parallel reaction monitoring mode. The MS response of SCFAs and OH-SCFAs was relatively low due to a poor ionization efficiency in ESI source, thereby reducing the sensitivity of detection. With this derivatization strategy, SCFAs and OH-SCFAs were tagged by the DHPP reagent. The introduction of the pyridine ring group and the tertiary amine group into the products exerted two main effects contributing to the MS response enhancement. Firstly, the sensitivity was much higher by changing the ionization mode to positive ionization mode. Secondly, the ionization efficiency was elevated by increasing the alkalinity of the targeted analytes, thereby improving the sensitivity. The advantage of this newly developed method is a short derivatization time (3 min), mild reaction conditions and the ability to perform the analysis without the need of further sam-

ple purification. To achieve the optimal derivatization efficiency the reaction conditions (catalyst, reaction time, reaction temperature and ^D₃-DHPP concentration) were optimized and monitored using LC-MS. The effects of different catalysts (EDCI, EDCI/HOAT and EDCI/HOBT) on the efficiency of derivatization reaction were compared. The best results were obtained when EDCI was used as a catalyst [37].

Song et al. developed a fast and reliable derivatization protocol with the use of 4-acetamido-7-mercapto-2,1,3-benzoxadiazole (AARD-SH). The reaction was carried out for 5 min at room temperature; derivatized samples were analyzed using LC-MS/MS [33]. Contrary, in other studies, the following optimal conditions for the SCFAs derivatization reaction were determined: 30 min. at 40 °C and 1 h at 25 °C for derivatization with 3-NPH [64] and O-BHA [162], respectively. The method developed by Song et al. was applied to measure 17 SCFAs in three biological matrices: mouse feces and plasma as well as in human exhaled breath condensate. SCFAs derivatized with AARD-SH resulted in a reasonable chromatographic separation and good electrospray ionization. The fact that the reaction products kept at 4 °C were stable for a week is remarkable. The specific detection of each SCFA was possible from the unique fragmentation pattern during collision-induced dissociation (CID). The derivatization of SCFAs with AARD-SH increased the size and hydrophobicity of the molecules and resulted in longer retention times in the reversed-phase chromatography. Shorter SCFAs eluted earlier than longer SCFAs and straight-chain SCFAs eluted later than the branched-chain SCFAs, as expected. This method demonstrated good sensitivity and validation parameters (LOQ = 0.293–1.030 μM, RSD < 8%) and finally was applied to profile SCFAs in mice feces obtained from animals on high- or low-fat diets [33]. In the method proposed by Fu et al. [39] seven SCFAs and BCFAs were converted into amide derivatives with 4-aminomethylquinoline (AMQ) which improved their stability and enhanced chromatographic and MS performances. Analyses were performed using UPLC-MS/MS method, which showed good accuracy (85.5–104.3%) and linearity in the range of concentration from 0.13 to 74.4 μmol g⁻¹. The reaction conditions (room temperature for 20 min) were relatively mild and fast compared to those for 2NPH (40 °C for 30 min) [183], 3-NPH (40 °C for 30 min) [50], O-BHA (25 °C for 60 min) [64], 2-bromoacetophenone (40 °C for 20 min) [44] or Dns-PP (37 °C for 150 min) [184].

6.3. Determination of GM-related metabolites without a derivatization step

In the vast majority of published GC-MS and LC-MS methods for the determination of SCFAs, derivatization is an unavoidable step [19,43,47,144,185]. However, new analytical methods have demonstrated that clean-up, concentration and derivatization steps are not always necessary and fatty acids can be analyzed directly after a liquid-liquid extraction (LLE). Such an approach allows for a shorter time of sample preparation and analysis [42,186–190].

In 2012 Garcia-Villalba et al. optimized a fast and straightforward sample preparation protocol based on ethyl acetate extraction and a short (14 min) GC-MS analysis. This method allows for the quantification of six SCFAs in human and rat fecal samples. Good recoveries, repeatability as well as high sensitivity make this method suitable for the analysis of samples with low concentrations of these compounds, ranging between 0.40 μM (0.29 μg g⁻¹)–4.31 μM (3.8 μg g⁻¹) [186]. Recently, Zhang et al. used ethyl acetate to extract six SCFAs and BCFAs from fecal samples. Analytes were measured in extracted samples in only 13.5 min. The limits of detection and quantification using this method were 0.5–0.8 ng L⁻¹ and 0.8–1.0 mg L⁻¹, respectively [191]. Zhao et al. developed and validated a method for simultaneous GC-FID analysis of seven SCFAs in

fecal samples in the range of concentration between 0.261 and 1.18 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The samples were analyzed directly after the extraction, which was performed with 75 % aqueous ethanol solution containing 1 % hydrochloric acid (HCl). These results were contradicted by Hsu et al. who tested six different organic solvents to extract the SCFAs from fecal samples before GC-MS analysis. The list of tested solvents included: methanol, acetonitrile, acetone, chloroform, ethanol and hexane. Compared to other solvents, methanol showed the best extraction efficiency and minimal interferences [192]. These solvent was used also in a previous study by Yu et al. [193] during the analysis of metabolites in human feces. According to Hsu et al. the direct injection of methanol extracts led to the damage of the inlet liner due to the accumulation of non-volatile compounds from the fecal matrix [192]. Hano et al. showed that rinsing feces with 2.5 % NaCl water allowed the robust extraction of fecal metabolites encapsulated within the solid residue by eliminating unstable metabolites. Among the 86 metabolites identified in the NaCl-rinsed fecal samples, 57 showed superior recovery, indicating that NaCl is a better rinsing solvent, particularly for amino acids, organic acids and fatty acids [194].

Phua et al. suggested that the freeze-drying (or lyophilization) of feces could be used prior to a comprehensive determination of metabolites [141]. The use of the lyophilization process before SCFAs analysis can minimize not only the problems caused by the water content but also provide better stability of the analytes [192]. Fecal samples that were freeze-dried showed a significant increase in the level of SCFAs, BCAAs and AAAs [53]. Hsu et al. confirmed that six SCFAs studied by them were stable and their recoveries were higher than 90 % after lyophilization [192]. In 2015, Etxeberria et al. used diethyl ether to extract SCFAs (acetate, propionate and butyrate) from lyophilized feces [195]. In contrast, the purpose of the study conducted by Han et al. was to develop a fast and accurate method for the GC-MS analysis of SCFAs in mice feces utilizing less complicated procedures [196]. The authors shortened the time required for sample pretreatment. In comparison to the method published by Etxeberria et al. [195], in this novel method, the freeze-drying time was shortened from 12 h to 3.5 h which allowed to complete the sample treatment in one day [196]. Lotti et al. [187] optimized and validated a GC-MS method for the analysis of fifteen short-chain, branched chain and medium-chain fatty acids in the three human samples (fecal water, fecal fermentation supernatants and plasma), without derivatization and lyophilization step. In the first step of LLE optimization, acidified water (pH = 2–3) extracts were directly injected to GC, as described by Zhao et al. [197]. However, this method was discarded due to poor reproducibility observed after a few injections. It was caused by the contamination of inlet and ion source with the water extracts, which affected MS performance. Lotti et al. used different solvents (acidified water, diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate and methyltert-butyl ether (MTBE)) to extract metabolites from fecal samples. Based on the obtained results, recoveries ranging from 75.4 to 124.4 % and coefficient of signals variation lower than 20 %, MTBE was found the most suitable extraction solvent [187]. Hsu et al. compared the utility of chloroform, MTBE and butanol to extract SCFAs from fecal samples. Double extraction with butanol was selected as the most appropriate [192]. Lopez Bascon et al. optimized a method without a derivatization step and 186 metabolites were measured in extracted samples. According to these results, a dual extraction with ethyl acetate and MeOH or MeOH/water should be recommended to fraction the metabolome of feces samples the same solvent was used by Yu et al. in previous study in direct analysis by LC-MS. It was confirmed that most compounds, 126 out of 186, were detected with both extractants. However, 42 and 20 compounds were only detected in ethyl acetate and MeOH extracts, respectively [48].

Cheng et al. used LC-MS to compare the loss of SCFAs (AcA, PA, BcA, IbcA, VA, IVA and CA) during lyophilization or freezing of fresh fecal samples. Both methods provided similar results. In the same study, the authors observed a lower content of SCFAs in acidified lyophilized fecal samples in comparison to fresh frozen samples. It suggests that evaporation should be performed when pH is getting closer to the pKa-values of the FAs [155]. Moosmang et al. also reported a similar number of features between lyophilized and fresh frozen fecal samples, indicating that the choice of method does not affect metabolite coverage appreciably. On the other hand, they also reported large discrepancies in signal intensities between lyophilized and fresh frozen fecal samples. Based on these observations, the authors hypothesized that these discrepancies might be related to improved extraction efficacy for the lyophilized material [169]. In the latest research, Meulebroek et al. showed that the recovery of volatile compounds could be significantly improved by lyophilization, due to a change in volume of the liquid and the gas phase [198].

To sum up, the use of fresh frozen or lyophilized samples for fecal metabolomics is a matter of debate, since each of the procedures may provide advantages and disadvantages [155]. Lyophilization results in a richer profile of volatile organic compounds. However, it may also add potential contaminants to the fecal samples, resulting in increased variability and promote degradation of metabolites [199]. Additionally, lyophilization of the fecal sample can be an extremely time-consuming process. For this reason, freeze-drying can be considered as an alternative method for the preparation of fecal samples. Furthermore, direct analysis of complex samples may lead to a shorter column lifespan and shorter detection performance due to the contamination of the chromatographic system [200].

7. Conclusions and future perspectives

The results of the human and animal studies aiming to evaluate the relationship between gut microbiota composition, GM-related metabolites and metabolic diseases are often contradictory [56]. Therefore, further research is still needed to identify the influence of specific phyla, class, genera or species of gut bacteria on metabolic phenotype. There is an increasing amount of evidence that fecal metabolites may also play an essential role in the development and maintenance of metabolic diseases [201]. Analysis of fecal metabolites is an emerging field that provides an important piece of information about metabolism. The number and scope of the reviewed publications indicate a rapid growth and improvement of analytical methods for the determination of GM-related metabolites in fecal samples. Due to its higher sensitivity, resolution, reproducibility and better reliability, GC-MS has long been the preferred method for the analysis of volatile compounds in biological samples. However, based on the reviewed literature, in the last years, there has been considerable progress in the LC-MS-based analytical methods for the determination of GM-related metabolites in feces. Several novel and improved methods for the derivatization of fecal metabolites prior to LC-MS analysis have been published. The choice of the appropriate derivatization method for the analysis of GM-related metabolites depends on many factors. The selection of the best method is not an easy task. For this reason, in Table 5, we compared the derivatization methods described in this study, including the main advantages and disadvantages. It may be useful for people conducting research in this field. The preparation of fecal samples for LC-MS analysis tends to be much less diverse and typically includes fewer steps or parallel extractions than for GC-MS. Consequently, less complicated sample treatment protocols decrease the risk of handling and measurement error appearance. On the other hand, GC-MS provides superior chromatographic resolution and peak shape in

Table 5
Comparison of GC-MS and LC-MS derivatization methods for the analysis of GM-related metabolites in fecal samples.

Technique	GC	LC
Kind of analytes	suitable for volatile or derivatized analytes	suitable for non-volatile metabolites
The main purpose of the derivatization step	conversion of analytes into thermally stable, volatile molecules.	provide the derivatives with better retention and ionization efficiency
Derivatization methods	Silylation	Commercially available reagents
Reagents	react with active hydrogens	react with functional groups
Total time of sample preparation	45 min–2h	5–45 min
Time of derivatization step	5 min–2h	5–30 min
Time of analysis	20 min–50min	4–60 min
Main advantages	quantification of a large number of metabolites during non-targeted analysis	increasing evaporation and nebulization efficiency, introducing chargeable or easily ionizable moieties and aiding fragmentation in the MS mode; increased detectability, specificity and chromatographic performance and reduced matrix effects, leading to a high assay accuracy and precision
Main disadvantages	require anhydrous reaction conditions, time-consuming process	isotope effect in chromatography, limited availability of stable isotope-labeled analogs and higher material cost
		specific chemical reaction and a reactive functional group in the target compound

comparison to LC-MS. Additionally, in the case of GC-MS mass spectra generated by ionization-induced fragmentation are better for metabolite identification. Conversely, GC-MS clearly shows advantages over LC-MS in terms of deleterious matrix effects. Therefore, the quantification of metabolites with LC-MS requires the use of internal standards, ideally a stable isotope-labeled standard for each analyte. Undiscovered matrix effects may also be a significant source of errors during LC-MS metabolic profiling, especially in the case of heterogeneous samples like feces. In the case of LC-MS analysis, separation of fecal metabolites is usually performed using C18 type of columns, while in case of GC-MS analysis, high-polarity polysiloxane polymer or nitroterephthalic acid-modified polyethylene glycol columns are commonly used.

In conclusion, feces are a very complex and diverse matrix. Despite all the studies discussed in this work, there is still much research to carry out on this topic, in the analytical field to develop an optimal method for the determination of GM-related metabolites and in the biological field to seek for the association between gut bacteria and state of health or disease.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

PM, EP, AK, and MC acknowledge funding from the Medical University of Białystok, Poland (SUB/1/DN/19/005/1196). FR-S acknowledges funding from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades RTI2018-095166-B-I00. We are indebted to Mr. Dan Cherry for his careful English editing and proofreading.

References

- [1] E. Tharby, N. Jager, Introduction to the human gut microbiota, *Biochem. J.* 474 (11) (2017) 1823–1836.
- [2] O. Derda, A.C. Chatzinanous, S. Fawcra, D. Palacharis, N. Rades, G.A. Theodoridis, H.G. Cika, Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1047 (2017) 115–123.
- [3] J. Gerritsen, H. Smidt, G.T. Rijkers, W.M. de Vos, Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics, *Genes Nutr.* 8 (2) (2013) 209–240.
- [4] A. Muñoz-García, C. Diaz-Pérez, F.J. Tinahones, Gut microbiota and type 2 diabetes mellitus, *Endocrinol. Nutr.* 63 (10) (2016) 560–568.
- [5] D. Liang, R.R. Leung, W. Guan, W.W. Au, Connection to: involvement of gut microbiome in human health and disease: brief overview, knowledge gaps and research opportunities, *Gut Pathog.* 11 (2019) 57.
- [6] L. Miele, V. Giorgio, M.A. Alberelli, E. De Canalis, A. Castellan, A. Grieco, Impact of gut microbiota on obesity, diabetes, and cardiovascular disease risk, *Curr. Cardiol. Rep.* 17 (12) (2015) 120.
- [7] P. Gérard, Gut microbiota and obesity, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (1) (2016) 147–162.
- [8] S.M. Haraeb, I. Khan, Y. Kamosani, E. Barbour, S.B. Almusawi, S.M. Bahjri, S.M. Alhabib, G.M. Aljohor, E.I. Aisha, Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6 (2016) 85.
- [9] M. Sedighi, S. Kazavi, F. Navab-Moghadam, M.Z. Khosravi, F. Alaei-Shakeri, A. Mehrizad, N. Amirmozafari, Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals, *Microb. Pathog.* 111 (2017) 302–309.
- [10] A. Pascale, N. Marchesi, S. Govoni, A. Coppola, C. Gazzanoni, The role of gut microbiota in obesity, diabetes mellitus, and effect of metformin: new insights into old diseases, *Curr. Opin. Pharmacol.* 49 (2019) 1–5.
- [11] F. Jernstedt, S. Hasanizadeh, A. Tahvilidari, Y. Farzi, M. Arbab, J.F. Meza, L.A. Sechi, M.J. Nasiri, Is there any association between gut microbiota and type 1 diabetes? A systematic review, *Gut Pathog.* 11 (2019) 46.
- [12] S.H. Bhupathiraju, F.B. Hu, Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications, *Circ. Res.* 118 (11) (2016) 1723–1735.
- [13] E.O. Méndez-Salazar, M.G. Ortiz-López, M.L.A. Granados-Silverio, B. Palacios-González, M. Mesejua, *Corrigendum: altered gut microbiota and compositional changes in*, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 2693.
- [14] J. Long, Q. Cai, M. Strommabel, M.K. Hargreaves, S.R. Bonderson, W.J. Blot, W. Zheng, X.D. Shi, Association of oral microbiome with type 2 diabetes risk, *J. Periodontol. Res. Suppl.* 52 (3) (2017) 636–643.
- [15] A.J. Leite, N.C. Rodrigues, M.J. Gonaga, J.C.C. Pinho, C.A. de Sousa, N.A.V. Stefanotto, W.P. Otonari, D.G. Pinheiro, J.L. Briotti, E. Mathias Junior, V.S. Mariano, G.L.V. de Oliveira, Detection of increased plasma interleukin-6 levels and prevalence of, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1107.
- [16] A. Chávez-Carvajal, K. Nirmalkar, A. Pérez-Lizaso, F. Hernández-Quintero, S. Ramírez-Del-Año, J. García-Mesa, C. Hernández-González, Gut microbiota and predicted metabolic pathways in a sample of Mexican women affected by obesity and obesity plus metabolic syndrome, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2) (2019).
- [17] J. Li, Q.L. Wang, Y. Liu, Y. Ke, Q.Q. Fan, F. Zhou, M.C. An, H.M. Liu, Simultaneous determination of 24 free amino acids in MGC803 cells by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1132 (2019), 121792.
- [18] G. den Besten, K. van Eunen, A.K. Groen, K. Venema, D.J. Reijngoud, B.M. Bakker, The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut

- microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* 54 (9) (2013) 2325–2340.
- [19] L. He, M.A.J. Probst, F. Yuan, X. Yu, P.E. LeKiwicz, X. Wei, W. Peng, C. McClain, X. Zhang. Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short-chain fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1092 (2018) 359–367.
- [20] C. Cao, M. Rotstein, C. Probst, J. Adamski, J. Setisley, A. Lechner. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 55 (1) (2018) 21–32.
- [21] J.L. Flores-Guerrero, M.C.J. Ostf. L.M. Kieweler, E.G. Gruppen, J. Weisk-Diessen, J.D. Ostro, M.A. Connolly, S.J.L. Bakker, R.P.F. Dullaart. Plasma branched-chain amino acids and risk of incident type 2 diabetes: results from the PREVEND prospective cohort study. *J. Clin. Med.* 7 (12) (2018).
- [22] H. Ma, M.E. Patti. Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28 (4) (2014) 573–583.
- [23] J.J. Herdler, B. Blumberg, M. Cave, R. Macthigny, A. Mantovani, M.A. Mendez, A. Nadal, P. Palarea, G. Panfili, R. Sattis, L.V. Vandenbergh, F. Wen. Sati. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod. Toxicol.* 68 (2017) 1–33.
- [24] Y. Deng, Y. Liu, L. Li, Y. Li, X. Zhang, M. Wang, Y. Chen, L. Liu, B. Lu, Z. Xin, Q. Liu. Targeted metabolites for the quantitative measurement of 8 gut microbiota-host co-metabolites in rat serum, urine and feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1110–1111 (2019) 133–143.
- [25] P. Vermeulen, F. Del Chiaro, C. Putignano. Gut microbiota profiling: metabolomics based approach to uncover components affecting human health. *Front. Microbiol.* 7 (2016) 1144.
- [26] B. Murphy, P. Tsai, M. Jülich, A. Liu, L. Plank, M. Booth. Differential changes in gut microbiota after gastric bypass and sleeve gastrectomy bariatric surgery vary according to diabetes remission. *Obes. Surg.* 27 (4) (2017) 917–925.
- [27] P. Sarrasak, M. Laha, J. Gadow, A. Mastrogiovanni, H.R. Hady, J. Dadas, C. Raftan, M. Górka, A. Krowczyński, M. Chłostowski. Gear mechanism bariatric interventions revealed by untargeted metabolomics. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 151 (2018) 219–236.
- [28] M. Panek, H. Opčić-Pajević, A. Barešić, M. Perić, M. Matijević, I. Ljubić, D. Vrančić-Bender, Ž. Krizančić, D. Verbanac. Methodology challenges in studying human gut microbiota - effects of collection, storage, DNA extraction and next generation sequencing technologies. *Sci. Rep.* 9 (1) (2018) 5143.
- [29] C. Rose, A. Parker, B. Jefferson, E. Cartmell. The characterization of feces and urine: a review of the literature to inform advanced treatment technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45 (17) (2015) 1827–1878.
- [30] E.R. Loring, A.J. Johnson, T.D. Specter, C.J. Le Roy. Effect of diet on the gut microbiota: rethinking intervention duration. *Nutrients* 11 (12) (2019).
- [31] A. Bujdak, V. Kalamangas. Quantitative mass spectrometry-based assay development and validation: from small molecules to proteins. *Clin. Biochem.* 46 (6) (2013) 444–455.
- [32] F. Xu, L. Zou, Y. Liu, Z. Zhang, C.N. Ong. Enhancement of the capabilities of liquid chromatography-mass spectrometry with derivatization: general principles and applications. *Mass Spectrom. Rev.* 30 (6) (2011) 1143–1172.
- [33] H.E. Song, H.Y. Lee, S.J. Kim, S.H. Park, H.J. Yoo. A facile profiling method of short chain fatty acids using liquid chromatography-mass spectrometry. *Metabolites* 9 (9) (2019).
- [34] E. Pagliani. Versatile derivatization for GC-MS and LC-MS: allylation with trialkylsulfonium tetrafluoroborate for inorganic anions, chemical warfare agent degradation products, organic acids, and postemetic analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (9) (2020) 1965–1971.
- [35] S. Mollveerana, V. David. Derivatization Methods in GC and GC/MS, 2018.
- [36] A.M. Ferrera, M.E. Laespada, J.L. Powell, B.M. Cordero. In situ aqueous derivatization as sample preparation technique for gas chromatographic determination. *J. Chromatogr. A* 1296 (2013) 70–83.
- [37] J. Wu, L. Xiang, X. Li, Y. Song, C. Yang, F. Ji, A.C.K. Chung, K. Li, Z. Liu, Z. Cai. Derivatization strategy combined with parallel reaction monitoring for the characterization of short-chain fatty acids and their hydroxylated derivatives in mouse. *Anal. Chim. Acta* 1100 (2020) 68–74.
- [38] H.L. Perry, C.A. Evans. Chemical derivatization in bioanalysis. *Bioanalysis* 7 (19) (2015) 2405–2437.
- [39] H. Fu, Q.L. Zhang, X.W. Huang, Z.H. Ma, R.L. Zheng, S.L. Li, H.N. Du, X.C. Sun, F.F. Liu, L.J. Zhao, G.S. Teng, J. Liu. A rapid and convenient derivatization method for quantitation of short-chain fatty acids in human feces by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 33 (2019) e4730.
- [40] L.R. Hoving, M. Heijink, V. van Hammeles, K.W. van Dijk, M. Gies. GC-MS analysis of short-chain fatty acids in feces, cream content, and blood samples. *Methods Mol. Biol.* 1730 (2018) 247–256.
- [41] J. Zheng, S.J. Zheng, W.J. Cai, L. Yu, B.F. Yuan, Y.Q. Peng. Stable isotope labeling combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for comprehensive analysis of short-chain fatty acids. *Anal. Chim. Acta* 1070 (2019) 51–58.
- [42] J. Ueyama, M. Oda, M. Higayama, K. Sagitate, N. Sakai, R. Harada, M. Ito, I. Saito, E. Otsu. Freeze-drying enables homogeneous and stable sample preparation for determination of fecal short-chain fatty acids. *Anal. Biochem.* 588 (2020) 113598.
- [43] S. Yin, P. Guo, D. Hai, L. Xu, J. Shu, W. Zhang, M.J. Khan, L.J. Karlund, Y. Qiu, Y. Liu. Optimization of GC/TOF MS analysis conditions for assessing fecal gut microbiota metabolic interactions: choline riboside alters fecal aromatic amino acids and phenol metabolism. *Anal. Chim. Acta* 995 (2017) 21–33.
- [44] S.R. Ma, Q. Tong, Z.X. Zhao, L. Cong, J.B. Yu, J. Fu, F. Han, L.B. Pan, R. Gu, K. Peng, Z.W. Zhang, Y. Wang, J.D. Jiang. Determination of ferulic acid-epigallocatechin gallate conjugates in human feces through derivatization by 2-bromoisobutyrate. *Anal. Bioanal. Chem.* 411 (14) (2019) 3291–3297.
- [45] J.C. Chan, D.Y. Kish, C.C. Yip, B.W. Lee, E.C. Chan. A novel LC/MS/MS method for quantitative measurement of short-chain fatty acids in human stool derivatized with 1. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 43–53.
- [46] J. Shan, L. Peng, W. Qian, T. Xie, A. Kang, B. Guo, L. Di. Integrated serum and fecal metabolomics study of collagen-induced arthritis rats and the therapeutic effects of the Zhushina Tablet. *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 891.
- [47] A. Jain, X.H. Li, W.N. Chen. An untargeted fecal and urine metabolomics analysis of the interplay between the gut microbiome, diet and human metabolism in Indian and Chinese adults. *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 9191.
- [48] M.A. López-Bacalón, M. Calderín-Santagüta, H. Argüello, L. Moreira, J.J. Carrilón, E. Priego-Lago. Comprehensive analysis of pig feces metabolome by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry in high resolution mode: influence of sample preparation on the identification coverage. *Talanta* 199 (2019) 303–309.
- [49] H. Sun, L. Yang, F. Ji, Z. Cai. GC-MS-MS approach for identification of non-amino organic acid and amino acid profiles. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1047 (2017) 180–184.
- [50] C. Garbisch, J. Ecker, S. Roth, S. Schweizer, V. Örl, H.J. Schöberl, H. Yoon, D. Müller, E. Holler, K. Buchhardt, S. Matysik. Quantification of fecal short chain fatty acids by liquid chromatography tandem mass spectrometry-investigation of pre-analytic stability. *Biomolecules* 9 (4) (2019).
- [51] M. Peñacore, D. Milović-Turk, T. Langerhök. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: a scoping review. *Anal. Biochem.* 526 (2017) 9–21.
- [52] J. Xu, Q. Zhang, J. Zheng, B.-F. Yuan, Y.-Q. Peng. Mass spectrometry-based fecal metabolome analysis. *Trends Anal. Chem.* 112 (2019).
- [53] N. Kato, L. Deng, M. Sato, A.C. Guo, Y. Sajed, H. Hayashi, S. Wase, D.S. Wishart. A review on human fecal metabolomics: methods, applications and the human fecal metabolome database. *Anal. Chim. Acta* 1030 (2018) 1–24.
- [54] J. Fiori, S. Terenzi, M. Candela, R. Gotti. Assessment of gut microbiota fecal metabolites by chromatographic targeted approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 177 (2020) 112867.
- [55] V.K. Kishore, J.J. Faith, F.E. Rey, J. Cheng, A.E. Dvorjan, A.L. Kau, N.W. Griffin, V. Lombardi, B. Henriksen, J.B. Bain, M.J. Marchesi, O. Shkedy, C.P. Semenkovich, K. Feun, D.K. Hayashi, B.J. Igle, M.C. Martin, L.K. Ursell, J.C. Clemente, W. Van Tassan, W.A. Walters, R. Knight, C.B. Newgard, A.C. Heath, J.J. Goodrich. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 341 (6136) (2013) 1241214.
- [56] S.-Y. Cao, C.-H. Zhao, X.-Y. Xu, C.-Y. Tang, H. Corke, R.-Y. Guo, H.-B. Li. Dietary plants, gut microbiota, and obesity: effects and mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.* 92 (2019) 194–204.
- [57] I. Heung, Y.J. Park, Y.R. Kim, Y.N. Kim, S. H. H.Y. Lee, J.K. Seung, Y.J. Seok, J.B. Kim. Alteration of gut microbiota by vancomycin and lactacin A improves insulin resistance via glucagon-like peptide 1 in diet-induced obesity. *FASEB J.* 29 (6) (2015) 2397–2411.
- [58] A. Miya-Pérez, A. Neel, Y. Sato. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7705 reduces obesity-associated inflammation by restoring the lymphocyte-macrophage balance and gut microbiota structure in high-fat diet fed mice. *PLoS One* 10 (7) (2015) e0128976.
- [59] J. Mizuno, S. Kondo, N. Yanagisawa, Y. Odanaka, J.E. Xiao, F. Abe, S. Nakajima, Y. Hamamoto, S. Saitoh, Y. Shimoda. Oral administration of Bifidobacterium breve B-3 modifies metabolic functions in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *J. Nutr. Sci.* 4 (2015) e17.
- [60] K. Marlow, I. Siddiqi, M. O'Shea. Probiotics: how effective are they in the fight against obesity? *Nutrients* 11 (2) (2019).
- [61] M. Millon, F. Thury, F. Argüello, J.P. Casalta, R. Giorgi, C. Habib, D. Basak. Lactobacillus reuteri and Escherichia coli in the human gut microbiota may predict weight gain associated with vancomycin treatment. *Nutr. Diabetes* 3 (2013) e87.
- [62] S. Lee, C. Marques, D. Pretana, M. Saenutha, D. Carvalho, P. Freitas, C. Caldas. The role of FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction: driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutr. Metab.* 13 (2016) 31.
- [63] Y. Shang, E. Khalilpour, H. Derakhshani, L.R. Sakra, C.W. Wu, Y.S. Siow, E. O. Short term high fat diet induces obesity-enhancing changes in mouse gut microbiota that are partially reversed by cessation of the high fat diet. *Lipids* 52 (6) (2017) 499–511.
- [64] M. Zeng, H. Cao. Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1083 (2018) 137–145.
- [65] B.S. Swaminath, P. Kevika, N. Sagarthy, C. Chaitanya. A review on role of microbiome in obesity and antibiotic properties of probiotic supplements. *Biomol. Res.* 2019 (2019) 3291367.
- [66] M.A. Stanculescu, D. Dubler, L.A. Lange, B.D. Wagner, C.A. Loxton. Gut microbiota phenotypes of obesity. *NPJ Biofilms Microbiomes* 5 (2019) 18.

- [97] L. Ahrens, E. Scarpellino, C. Colica, L. Boccato, B. Salehi, J. Shariif-Rad, V. Aarås, B. Romano, A. De Lorenis, A.A. Izzi, R. Capasso, Gut microbiota and obesity: a role for probiotics, *Nutrients* 11 (11) (2019).
- [98] S.H. Duncan, G.E. Lobley, G. Holtrop, J. Ince, A.M. Johnston, P. Louis, H.J. Flint, Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss, *Int. J. Obes.* 32 (11) (2008) 1720–1724.
- [99] C.K. Chakrabarti, New-found link between microbiota and obesity, *World J. Gastroenterol. Pathophysiol.* 6 (4) (2015) 110–115.
- [100] S. Sanna, N.R. van Zuydam, A. Mahajan, A. Karjalainen, A. Vich Vila, U. Vilva, Z. Májajic, A.A.M. Maucuer, D.M.A.E. Jonkers, M. Osting, L.A.R. Joosten, M.G. Ntara, L. Franko, A. Zhernakova, J. Fu, C. Wijmenga, M.J. McCarthy, Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases, *Nat. Genet.* 51 (4) (2019) 600–605.
- [101] M. Faszioui, M. Lopez-Siles, O.A. Diaz-Rizosio, H. Jmel, C. Namsak, C. Abdelvalem, A. Chikhami, B. Naital, H. Jamoussi, A. Abid, K. Gornic, S. Abdelhak, M. Martinez-Medina, R. Kaf, Gut microbiota imbalance in Tunisian participants with type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Biosci. Rep.* 39 (01) (2019).
- [102] K. Ferishad, F. Hildebrand, T. Niebes, G. Fakang, A. Le Chatelier, S. Sunagawa, E. Prifti, S. Vieira-Silva, V. Gudimovskaya, H.K. Pedersen, M. Arastegui, K. Kristiansen, A.Y. Voigt, H. Vestergaard, R. Herczeg, P.J. Costea, J.R. Kultima, J. Li, T. Jaegermann, F. Leventis, J. Dore, H.B. Nielsen, S. Brunak, J. Rasmussen, T. Hansen, J. Wang, S.D. Ehrlich, P. Bork, O. Pedersen, M. Consortium, Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota, *Nature* 528 (7581) (2015) 262–266.
- [103] M. Gearing, Z. Li, H. Yu, R. Rodriguez, D.B. Jung, A. Mangun, N. Shalibekri, Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology, *Elife* 10 (2020), 102590.
- [104] K.A. Tiderman, D.A. Hutchison, J. Ziegler, Probiotics for the treatment of type 2 diabetes: a review of randomized controlled trials, *Diabetes Metab. Res. Rev.* 36 (1) (2020) e1213.
- [105] S. Sharma, P. Tripathi, Gut microbiome and type 2 diabetes: where we are and where to go?, *Nutr. Biosci.* 43 (2019) 101–108.
- [106] F. Räckhild, H. Dang, T. Wang, L.V. Hooper, G.Y. Koh, A. Nagy, C.F. Semenkovich, J.J. Goodrich, The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (44) (2004) 15718–15723.
- [107] W. Aw, S. Fukuda, Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus, *J. Diabetes Investig.* 9 (1) (2018) 5–12.
- [108] O. Ajdin, M. Nawroth, V. Gerdes, The gut microbiome as a target for the treatment of type 2 diabetes, *Curr. Diab. Rep.* 18 (05) (2018) 55.
- [109] W. Zhou, H. Xu, L. Zhao, X. Lu, L. Zhang, Dynamic development of fecal microbiota during the progression of diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats, *Front. Microbiol.* 10 (2019) 232.
- [110] N. Larsen, F.K. Vogensen, F.W. van den Berg, D.S. Nielsen, A.S. Andreasen, B.K. Pedersen, W.A. Al-Soud, S.J. Sørensen, L.H. Hansen, M. Jakobsen, Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults, *PLoS One* 5 (2) (2010) e9085.
- [111] J.H. Karlsson, V. Tremaroli, I. Nookaew, C. Bergström, C.J. Behre, R. Fagerberg, J. Nielsen, F. Räckhild, Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control, *Nature* 498 (7452) (2013) 99–103.
- [112] Z.Y. Zhu, S.K. Lal, The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1835.
- [113] J. Rowland, G. Gilson, A. Heinken, E. Scott, J. Swann, I. Thiele, K. Tuohy, Gut microbiota function: metabolism of nutrients and other food components, *Eur. J. Nutr.* 37 (1) (2008) 1–24.
- [114] M. Sun, W. Wu, Z. Liu, Y. Cong, Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases, *J. Gastroenterol.* 52 (1) (2017) 1–8.
- [115] C.C. Metzger, Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host, *J. Nutr.* 130 (7) (2000) 1857S–1864S.
- [116] C. Staley, A.E. Weingarden, A. Khoruts, M.J. Sadowsky, Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (1) (2017) 47–64.
- [117] C.K. Roberts, A.L. Hoyden, R.J. Barnard, Metabolic syndrome and insulin resistance: underlying causes and modification by exercise training, *Compos. Physiol.* 3 (1) (2013) 1–28.
- [118] A. Filizemak, U. Dastgah, F. Saenzuk, N. Wasilowska, P. Jakimiec, M. Kucharski, D.M. Lebersztyga, M. Chmielewski, Metabolic profiling in children with inflammatory bowel disease, *Adv. Med. Sci.* 65 (1) (2020) 65–70.
- [119] U. Dastgah, J. Dastgah, R. Kucharski, T. Kowalczyk, R. Pietrowska, P. Saenzuk, A. Filizemak, A. Kowalczyk, D. Lebersztyga, M. Chmielewski, Untargeted metabolomics and inflammatory markers profiling in children with Crohn's disease and ulcerative colitis – a preliminary study, *Inflamm. Bowel Dis.* 25 (7) (2019) 1120–1128.
- [120] S.A. Gokhroo, P. Schert, T.N. Beck, E.M. Scolnick, D.J. Hunter, E. Hawk, N. Hopkins, Molecular mechanisms of the preventable causes of cancer in the United States, *Genes Dev.* 32 (13–14) (2018) 888–902.
- [121] W. Peng, H. Ao, C. Peng, Gut Microbiota, Short-chain fatty acids, and herbal medicines, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1254.
- [122] L. Payling, K. Traver, S.M. Lavelley, J. Sims, N. Roy, W. McNeill, The effects of carbohydrate structure on the composition and functionality of the human gut microbiota, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (2020) 233–248.
- [123] R. Corvita-Olivera, J.L. Fachi, A. Vieira, F.T. Sato, M.A. Vinolo, Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids, *Clin. Transl. Immunol.* 5 (4) (2016) e73.
- [124] D. Rios-Covian, P. Ruiz-Mateos, A. Margolis, M. Gormonde, C.G. de Los Reyes-Gavilan, N. Salazar, Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 185.
- [125] X. Wu, Y. Wu, L. He, L. Wu, X. Wang, Z. Liu, Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer, *J. Cancer* 9 (14) (2018) 2510–2517.
- [126] M. Müller, M.A.C. Hernández, G.H. Gonsens, D. Reijnders, J.J. Heut, J.W.E. Jocken, H. van Tilk, E.E. Carboia, E.E. Blauk, Circulating but not fecal short-chain fatty acids are related to insulin sensitivity, lipolysis and GLP-1 concentrations in humans, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 12513.
- [127] J. Sato, A. Kanazawa, F. Ikeda, T. Yoshizawa, H. Goto, H. Abe, K. Kusuya, M. Kawaguchi, T. Shimizu, T. Ogihara, Y. Tamura, Y. Sakurai, R. Yamamoto, T. Mita, Y. Fujitani, H. Fukuda, K. Nonaka, T. Takahashi, T. Aoshima, T. Hirose, S. Nagata, Y. Yamashiro, H. Wataha, Gut dysbiosis and detection of low gut bacterium level of Japanese patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care* 37 (8) (2014) 2343–2350.
- [128] K. Aizawa, T. Sugiyama, Y. Yamaguchi, Y. Tamura, S. Iwata, Y. Hiyata, M. Ito, Y. Yasui, N. Ogasawara, C. Goto, M. Sasaki, E. Kanaga, Gut microbiota disorders cause type 2 diabetes mellitus and homeostatic disturbances in gut-related metabolism in Japanese subjects, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 64 (3) (2019) 231–238.
- [129] A. Schweltes, D. Taras, K. Scheller, S. Bräjer, N.A. Bos, C. Dumas, P.D. Harth, Microbiota and SCEA in lean and overweight healthy subjects, *Obesity* 18 (1) (2010) 190–195.
- [130] S. Rahat-Buzenbloom, J. Fernandez, G.B. Cloer, T.M. Wolaver, Evidence for greater production of colonic short-chain fatty acids in overweight than lean humans, *Int. J. Obes.* 38 (12) (2014) 1525–1533.
- [131] J. Fernandez, W. Su, S. Rahat-Buzenbloom, T.M. Wolaver, E.M. Conelli, Adiposity, gut microbiota and fecal short chain fatty acids are linked in adult humans, *Nutr. Diabetes* 4 (2014) e121.
- [132] E.P. New, C.H. DeSung, S.S. Bensen, The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism, *Nutrients* 7 (4) (2015) 2930–2946.
- [133] R.A. Donadeu, E.C. Tiggemeyer, C.C. Aldrich, Organic matter disappearance and production of short- and branched-chain fatty acids from selected feed sources used in pet foods by a canine *in vitro* fermentation model, *J. Anim. Sci.* 97 (1) (2003) 4532–4536.
- [134] H. Liu, Y. Ai, F. Hao, Y. Wang, H. Tang, Correlations of local metabolomic and microbiomic changes induced by high-fat diet in the pre-obesity state, *Sci. Rep.* 6 (2016) 21818.
- [135] Y. Suzuki, J. Kido, S. Matsumoto, K. Shimizu, K. Nakamura, Associations among amino acid, lipid, and glucose metabolic profiles in childhood obesity, *BMC Pediatr.* 10 (1) (2010) 273.
- [136] Z. Dai, Z. Wu, S. Jiang, W. Zhu, G. Wu, Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction, *Mol. Hum. Reprod.* 21 (5) (2015) 389–409.
- [137] S.V. Keshava, V.H. Chau, B.P. Nolegra, A. Ören, C.K. Matthews, Clusters of isoleucine, leucine, and valine side chains define cores of stability in high-energy states of globular proteins: sequence determinants of structure and stability, *Protein Sci.* 25 (3) (2016) 662–675.
- [138] X.M. Ning Ma, Dietary amino acids and the gut-microbiome-immune axis: physiological metabolism and therapeutic prospects, *Food Sci. Food Saf.* 18 (2018) 221–242.
- [139] T.J. Wang, M.G. Larson, R.S. Vasan, S. Cheng, E.P. Rhee, E. McCabe, G.D. Lewis, C.S. Fox, P.F. Jacques, C. Fernandez, C.J. O'Donnell, S.A. Carr, V.K. Mootha, J.C. Florez, A. Soto, O. Melander, C.B. Clark, R.E. Gerstein, Metabolic profiles and the risk of developing diabetes, *Nat. Med.* 17 (4) (2011) 448–453.
- [140] A. Stanković, M. Cvjetković, N.K. Salonen, P. Soininen, A.J. Kangas, B. Olenberg, J. Paananen, J. Pöhljarski, L.L. Bonnycastle, M.A. Morken, M. Boehnke, P. Pajukanta, A.J. Luzzo, F.S. Collins, J. Viscidi, M. Ala-Korpela, M. Lahti, Hyperglycemia and a common variant of GSK3B are associated with the levels of eight amino acids in 9,388 Finnish men, *Diabetes* 61 (7) (2012) 1893–1902.
- [141] S. Chen, S. Altier, K. Kawahara, Y. Matsumoto, T. Nakagawa, M. Kinoshita, T. Hiyata, S. Yamamoto, T. Hayashi, M. Noda, T. Mizuno, Serum amino acid profiles and risk of type 2 diabetes among Japanese adults in the Hitachi Health Study, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 7010.
- [142] P. Marcher, Glutamate pathways of the beta-cell and the control of insulin secretion, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 131 (2017) 148–153.
- [143] D. Cabrera, M.C. Jacques-Silva, S. Sprier, S.N. Yang, M. Kibler, A. Fachiado, E. Vieira, J.R. Zoccali, R. Kibbey, D.M. Bertram, N.S. Konjon, C. Riccardi, A. Cacchola, P.O. Boggiano, Glucagon is a positive autocrine signal for glucagon release, *Cell Metab.* 7 (6) (2008) 543–554.
- [144] M. Ruiz-Canela, M. Guasch-Arter, E. Toledo, C.R. Clark, C. Rangel, L. Liang, D.D. Wang, D. Corella, B. Estruch, A. Hernandez, E. Yu, E. Gilman-Graza, Y. Zheng, F. Arós, D. Romaguera, C. Desrosier, E. Ros, J. Lapetra, L. Serra-Majem, C. Papanicolaou, D. Portales, M. Taki, J. Salas-Salvado, F.B. Hu, M.A. Martinez-Gonzalez, Plasma branched-chain aromatic amino acids, enriched Mediterranean diet and risk of type 2 diabetes: case-control study within the PREDIMED trial, *Diabetologia* 61 (7) (2018) 1560–1571.
- [145] A.V. Ahola-Olli, L. Mustelin, M. Kallioniemi, J. Kettunen, J. Jalilainen, J. Aavitsen, K. Puukka, A.S. Havulinna, T. Lehtimäki, M. Kahonen, M. Juonala, E. Korhonen-Kuorikoski, V. Salonen, M. Perola, M.B. Järvelin, M. Ala-Korpela, U. Raitakar, P. Würtz, Circulating metabolites and the risk of type 2 diabetes: a prospective study of 11,896 young adults from four Finnish cohorts, *Diabetologia* 62 (12) (2019) 2298–2308.

- [116] H.J. Lee, H.B. Jang, W.H. Kim, K.J. Park, K.Y. Kim, S.I. Park, 2-Aminoadipic acid (2-AA) as a potential biomarker for insulin resistance in childhood obesity, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 13610.
- [117] N. Pavlović, S. Goloburbin-Kim, M. David, B. Stanimirović, H. Al-Sakari, K. Stanok, M. Milev, Bile acids and their derivatives as potential modifiers of drug release and pharmacokinetic profiles, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 1283.
- [118] J.M. Kallion, S.C. Harris, S. Blomqvist, D.J. Kang, P.B. Hyötyläinen, Consequences of bile acid biotransformation by intestinal bacteria, *Gut Microbes* 7 (1) (2016) 22–30.
- [119] J.M. Kallion, D.J. Kang, P.B. Hyötyläinen, J.S. Rajaj, Bile acids and the gut microbiome, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 30 (3) (2014) 332–338.
- [120] W.M. Pandak, C. Kalryana, The acidic pathway of bile acid synthesis: not just an alternative pathway, *Liver Res.* 3 (2) (2019) 85–98.
- [121] R. Carlson, M. Chelvanay, Y. Zhai, E. Poutara, E. Dineer, E. Goyman, N. DeFusse, M. Laville, M. Kronopf, Fasting plasma chenodeoxycholic acid and cholic acid concentrations are inversely correlated with insulin sensitivity in adults, *Nutr. Metab.* 8 (1) (2011) 48.
- [122] K.A. Havelstein, B. Artarraga, S. Camacho, D. Acilo, E. Perramos, Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids, *Diabetes* 62 (12) (2013) 4184–4191.
- [123] K.P. Viscoré, S. Dineer, S. Ghoshal, D.R. Taylor, G. Cross, R.A. Sherwood, L. Fandriks, T. Obbers, M. Weiring, J. Nageband-Zadeh, C.W. de Roos, Higher circulating bile acid concentrations in obese patients with type 2 diabetes, *Ann. Clin. Biochem.* 50 (Pt 4) (2013) 360–364.
- [124] H. Xu, M. Liu, J. Cao, X. Li, D. Fan, Y. Xia, X. Lu, J. Li, D. Ju, H. Zhao, The dynamic interplay between the gut microbiota and autoimmune diseases, *J. Immunol. Res.* 2019 (2019), 7540347.
- [125] M. van de Wouwe, M. Boerhaas, J.M. Lyte, N. Wiley, C. Strain, O'Sullivan, C. Clarke, C. Stanton, T.G. Dinan, J.F. Cryan, Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations, *J. Physiol.* 596 (20) (2018) 4923–4944.
- [126] M.X. Chen, S.Y. Wang, C.H. Kao, L.L. Tsai, Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions, *J. Formos. Med. Assoc.* 118 (Suppl. 1) (2019) S10–S22.
- [127] J.D. Peter, A.W. Hanson, F.F.A. Jesse, M. Ajai, M.H.W. Stan, W.N. Frye, M.S. Tabaya, M.S.M. Almansary, Opportunities and challenges associated with fecal progesterone metabolite analysis, *Vet. World* 11 (10) (2018) 1490–1472.
- [128] J. Cristofalo, J. Quintana, R. Chaler, F. Veronesi, S. Lacorte, Gas chromatography/mass spectrometry comprehensive analysis of organophosphorus, brominated flame retardants, by-products and formulation intermediates in water, *J. Chromatogr. A* 1241 (2012) 1–12.
- [129] H.L. Fish, A.L. West, C.E. Childs, C.C. Burdge, P.C. Calder, The use of gas chromatography to analyze compositional changes of fatty acids in rat liver tissue during pregnancy, *J. Vis. Exp.* (85) (2014).
- [130] S.G. Villas-Boas, K.F. Smart, S. Srivastava, G.A. Lane, Alkylation is sufficient for analysis of amino and non-amino organic acids by GC-MS/MS, *Metabolites* 1 (1) (2011) 3–20.
- [131] F. Fougas, Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography, 2019.
- [132] J.K. Buglyi, B. Borsos, P. Polkai, V. Völgyi, V. Kálmán, V. Vida, Gas chromatography determination of some carboxylic acids: comparison between isolation and headspace analysis, *Chimia* 30 (4) (2010) 227–233.
- [133] E. Zsuzs, V. Boyce, U. Boppinger, S. Greve, S.G. Villas-Boas, P. Baker, F.R. Pina, Fully automated trimethylsilyl (TMS) derivatization protocol for metabolite profiling by GC-MS, *Metabolites* 7 (1) (2016).
- [134] A. Sharrif, M.J. Angew, J.D. Wells, Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogen estrone and 17 α -ethynylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1108 (1) (2006) 121–128.
- [135] O. Felin, Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling, *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 114 (2016) 30.4.1–30.4.32.
- [136] S. Zhang, H. Wang, M.-J. Zhu, A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples, *Talanta* 196 (2019) 248–254.
- [137] S. Zhang, H. Wang, M.-J. Zhu, A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples, *Talanta* 196 (2019) 249–254.
- [138] C. Schrammer, O. Dellmann, B.M. Appenzeller, R. Wenzig, M. Müller, Comparison of MIBQTA and BSTA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis, *Talanta* 77 (4) (2009) 1473–1482.
- [139] Y. Mitsuhashi, T. Mizumoto, A. Inaba, P. Sattawatthachana, A. Banno, Y.R. Kangachari, J.H. McNeely, J. Lalor, J.M. Weiner, J.S. Suchanowski, Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy, *J. Vet. Intern. Med.* 33 (4) (2019) 1688–1693.
- [140] F. Yuan, J. Harder, J. Ma, X. Yin, X. Zhang, M.M. Kowalewicz, Using multiple analytical platforms to investigate the androgen depletion effects on fecal metabolites in a mouse model of systemic lupus erythematosus, *J. Proteome Res.* 19 (2) (2020) 667–676.
- [141] L.C. Phua, P.K. Koh, P.Y. Chan, H.K. Ho, E.C. Chan, Global gas chromatography/trace-to-flight mass spectrometry (GC/TOFMS)-based metabolomic profiling of hypobiotic human feces, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 937 (2013) 103–112.
- [142] R. Troff, L. Ahonen, T. Savitaival, N. Christensen, T. Nielsen, M. Thiele, S. Jacobsen, A. Krug, P. Rossing, T. Hansen, L.O. Dragsted, C. Lyngby-Christensen, Describing the fecal metabolome in cryogenically collected samples from healthy participants, *Sci. Rep.* 10 (1) (2020) 885.
- [143] J.L. Söderholm, M. Dänzer, C.O. Kopp, Microwave-assisted derivatization procedures for gas chromatography/mass spectrometry analysis, *Met. Divers.* 14 (4) (2010) 805–888.
- [144] H. Kim, J. Kwon, S.Y. Choi, Y.G. Ahn, Method development for the quantitative determination of short chain fatty acids in microbial samples by solid phase extraction and gas chromatography with flame ionization detection, *J. Anal. Sci. Technol.* 10 (1) (2019) 28.
- [145] H.F. Kottung, K.A. Kristiansen, S.K. Lien, P. Bruborn, Quantitative analysis of amino and organic acids by methyl chloroformate derivatization and GC-MS/MS analysis, *Methods Mol. Biol.* 1198 (2014) 137–145.
- [146] M.M. Kork, B.H. Jeffers, J. van der Grint, A.C. Tan, T. Hamerstein, Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives, *Metabolomics* 7 (3) (2011) 307–328.
- [147] K.F. Smart, K.B. Aggar, J.R. Van Housen, S.G. Villas-Boas, Analytical platform for metabolome analysis of microbial cells using methyl chloroformate derivatization followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 5 (10) (2010) 1709–1720.
- [148] L. Zhao, Y. Ni, M. Su, H. Li, F. Dong, W. Chen, B. Wu, L. Zhang, S.P. Guiraud, F.P. Martin, C. Rajan, G. Xie, W. Ju, High throughput and quantitative measurement of microbial metabolome by gas chromatography/mass spectrometry using automated alkyl chloroformate derivatization, *Anal. Chem.* 89 (16) (2017) 5505–5511.
- [149] B. Amer, C. Nebel, H.C. Berman, G. Mørtsen, T.E. Dalsgaard, Direct derivatization vs aqueous extraction methods of fecal free fatty acids for GC-MS analysis, *Lipids* 50 (7) (2015) 681–689.
- [150] T. Furuhashi, K. Sugitate, T. Nakai, Y. Jikumaru, G. Ishihara, Rapid profiling method for mammalian feces short chain fatty acid by GC-MS, *Anal. Biochem.* 543 (2018) 51–54.
- [151] N. Park, M.-S. Kim, W.-W. Lee, M. Lee, J. Hong, In situ extraction and derivatization method for rapid analysis of short-chain fatty acids in rat fecal sample by gas chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 9 (2017).
- [152] X. Gao, S. Pijon-Guillet, J.F. Martin, P. Galan, C. Juste, W. Ju, J.L. Sebedin, Metabolite analysis of human fecal water by gas chromatography/mass spectrometry with ethyl chloroformate derivatization, *Anal. Biochem.* 393 (2) (2009) 163–170.
- [153] X. Zheng, Y. Qiu, W. Zhong, S. Becker, M. Su, Q. Li, G. Xie, B.M. Orr, S. Qian, M.D. Spencer, S.H. Zeeval, Z. Zhou, A. Zhao, W. Ju, A targeted metabolomic protocol for short-chain fatty acids and branched-chain amino acids, *Metabolomics* 9 (4) (2013) 818–827.
- [154] J. Cai, J. Zhang, Y. Tian, L. Zhang, E. Hertz, K.W. Krausz, P.B. Smith, F.J. Gonzalez, A.D. Patterson, Orthogonal comparison of GC-MS and, *Anal. Chem.* 89 (15) (2017) 7900–7906.
- [155] K. Cheng, C. Brusius, R. Fritsch, R. Lamsberg, An LC-QToF MS based method for untargeted metabolomics of human fecal samples, *Metabolomics* 16 (4) (2020) 46.
- [156] D. Tušak, Pentafluorobenzyl bromide: A versatile derivatization agent in chromatography and mass spectrometry: I. Analysis of inorganic anions and organophosphates, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1043 (2017) 187–201.
- [157] C.E. Garnett, S. Smith, B. de Lucy-Coverello, P. White, B. Spencer, C.S. Probert, N.M. Ratcliffe, Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease, *FASEB J.* 21 (8) (2007) 1673–1688.
- [158] D. Fiorini, M.C. Bozzelli, R. Gabbanelli, R. Bellini, D. Facetti, A quantitative headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detector method to analyze short chain free fatty acids in rat feces, *Anal. Biochem.* 508 (2016) 12–14.
- [159] D. Fiorini, D. Facetti, R. Gabbanelli, S. Caberelli, R. Bellini, A sorting out system for improving the efficiency of the headspace solid-phase microextraction of short and medium chain free fatty acids, *J. Chromatogr. A* 1409 (2015) 282–287.
- [160] T. Higashi, S. Ogawa, Isotope-coded ESI-enhancing derivatization reagents for differential analysis, quantification and profiling of metabolites in biological samples by LC/MS: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 181–193.
- [161] A. Gámez-Gómez, A. Soldevilla, R. Pizarro, V. Andueza-Fernández, O.J. Pico, Improving liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of polycarboxylic acids in human urine by chemical derivatization. Comparison of n-benzyl diphenylamine and 2-picolyl amine, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 104 (2013) 382–394.
- [162] J. Han, K. Lin, C. Segarra, C.H. Borchers, An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem. Acta* 854 (2015) 86–94.
- [163] Y. Zhu, P. Deng, D. Zhang, Derivatization methods for LC-MS analysis of endogenous compounds, *Bioanalysis* 7 (18) (2015) 2337–2381.
- [164] H.M. van Eijk, J.C. Bloemers, C.H. Dejong, Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in mouse short chain fatty acids in blood, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (8–9) (2009) 718–724.
- [165] D. Zhong, Y. Zhu, Derivatization in Sample Preparation for LC-MS Bioanalysis, 2019, pp. 260–274.

- [166] N. Crulmon, A.L. Boyer, Y. Gattuso, A. Sydor, B. Le Ruez, G. Deruyffels-Pinet, Optimization of fecal sample preparation for untargeted LC-HRMS based metabolomics, *Metabolomics* 13 (8) (2017) 99.
- [167] A. Jiménez-García, C. Ballester, A. Cifuentes, C. Simó, I. Muñoz-González, P.J. Martín Álvarez, B. Barrio-Lacort, M.V. Moreno-Arribas, Fecal metabolomic fingerprint after moderate consumption of red wine by healthy subjects, *J. Proteome Res.* 14 (2) (2015) 897–905.
- [168] E. Löffelholz, E. Vogtmanis, J.N. Sampson, S.C. Moore, H. Nelson, R. Knight, N. Chia, R. Serba, Comparison of collection methods for fecal samples for discovery metabolomics in epidemiologic studies, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 25 (11) (2016) 1483–1490.
- [169] S. Moonzang, M. Pitschkeider, S. Straus, C. Seger, H. Tilg, M. Halabalak, H. Stuppner, Metabolomic analysis-Addressing NMR and LC-MS related problems in human feces sample preparation, *Chin. Chem. Lett.* (2019) 169–176.
- [170] S. Yamashita, J. Fievi, S. Kampeit, S.L. Scherer, C. Conzelmann, M. Rasmie, E. Bagni, F. Yanelli, M. Mucchelli, A.N. Christensen, A.G. Nevry, P. Brigali, M. Candela, Fecal metabolome of the Hadza hunter-gatherers: a host-microbiome integrative view, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32826.
- [171] J. Ziemer, M.A. Jackson, G. Kastenmüller, M. Mangino, T. Liang, A. Telesni, R.P. Mohney, K.S. Small, J.T. Bell, C.J. Steves, A.M. Valdes, T.D. Spector, C. Mesiri, The fecal metabolome as a functional readout of the gut microbiome, *Nat. Genet.* 50 (6) (2018) 790–795.
- [172] H. Miwa, M. Yamamoto, High-performance liquid chromatographic analysis of serum short-chain fatty acids by direct derivatization, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 423 (1987) 33–41.
- [173] T. Tani, K. Kanemitsu, T. Wada, S. Itoh, K. Kitagawa, A. Hagiwara, Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability, *Ann. Clin. Biochem.* 47 (Pt 5) (2010) 447–452.
- [174] H. Inoue, K. Takahara, C. Takahara, N. Tabuchi, N. Okamura, N. Narahata, E. Kagawa, Y. Date, Y. Yasuda, Determination of short-chain fatty acids in mouse feces by high-performance liquid chromatography using 2-nitrophenylhydrazine as a labeling reagent, *Biol. Pharm. Bull.* 42 (5) (2015) 845–848.
- [175] H.Y. Wang, C. Wang, C.X. Gao, Y.F. Zheng, W.H. Hu, T.X.X. Dong, T.J. Wang, X.W.K. Tsien, Simultaneous determination of short-chain fatty acids in human feces by HPLC with ultraviolet detection following chemical derivatization and solid-phase extraction sequential elution, *J. Sep. Sci.* 42 (15) (2019) 2500–2509.
- [176] J.G. Bollinger, G.S. Nisha, G. Boban, M. Sedláček, M.H. Gerb, LC/ESI-MS/MS detection of FA by charge reversal derivatization with more than four orders of magnitude improvement in sensitivity, *J. Lipid Res.* 54 (12) (2013) 3525–3530.
- [177] S. Nagatomo, Y. Okada, M. Ichimura, K. Tsuruyama, R. Inoue, Application of 2-glyoxylamine derivatized ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of short-chain fatty acids in feces samples, *Anal. Sci.* 34 (9) (2018) 1031–1036.
- [178] K. Gao, L. Li, High-performance isotope labeling for profiling carboxylic acid-containing metabolites in biofluids by mass spectrometry, *Anal. Chem.* 82 (21) (2010) 8788–8793.
- [179] W.C. Yang, J. Adamec, F.E. Regnier, Enhancement of the LC/MS analysis of fatty acids through derivatization and stable isotope coding, *Anal. Chem.* 79 (14) (2007) 5150–5157.
- [180] S.M. Lamm, M.R. Shurtwell, R.L. Frey, P.J. Behrman, L.M. Smith, Relative quantification of carboxylic acid metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry using isotopic variants of cholestanol, *Anal. Chem.* 79 (14) (2007) 5143–5149.
- [181] X. Su, N. Wang, D. Chen, Y. Li, Y. Lu, T. Han, W. Xu, L. Li, Derivatization isotope labeling liquid chromatography mass spectrometry for parallel profiling of human urinary and fecal short-chain fatty acids, *Anal. Chim. Acta* 903 (2016) 100–109.
- [182] B.F. Yuan, Q.F. Zhu, N. Guo, S.J. Zheng, Y.L. Wang, J. Wang, J. Xu, S.J. Liu, K. He, T. Hu, Y.W. Zhang, F.Q. Xu, Y.Q. Feng, Comprehensive profiling of fecal metabolome of mice by integrated chemical isotope labeling-mass spectrometry analysis, *Anal. Chem.* 90 (5) (2018) 3512–3520.
- [183] H. Igarashi, K. Ohno, N. Matsuki, A. Fujiwara-Iguchi, H. Kawanishi, K. Fukuhara, E. Uchida, H. Tsujimoto, Analysis of fecal short chain fatty acid concentration in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps, *J. Vet. Med. Sci.* 79 (10) (2017) 1727–1734.
- [184] S. Jiang, Y. Jiao, P. Zhang, Y. Liu, X. Wang, Y. Huang, Z. Zhang, F. Xu, Twin derivatization strategy for high-coverage quantification of free fatty acids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 89 (22) (2017) 12223–12230.
- [185] A.B. Blake, B.C. Good, J.R. Hoenes, J.A. Lafferty, J.M. Striner, J.S. Teitelbaum, Altered microbiota, fecal lactate, and fecal bile acids in dogs with gastrointestinal disease, *PLoS One* 14 (10) (2019), e0224454.
- [186] R. García-Villalba, J.A. Giménez-Bastida, M.T. García-Correa, F.A. Tomás-Barberán, J. Carlos Espin, M. Larrosa, Alternative method for gas chromatography-mass spectrometry analysis of short-chain fatty acids in fecal samples, *J. Sep. Sci.* 35 (15) (2012) 1906–1913.
- [187] C. Letti, J. Robert, F. Fava, K. Touby, F. Mattivi, U. Villanovick, Development of a fast and cost-effective gas chromatography-mass spectrometry method for the quantification of short-chain and medium-chain fatty acids in human biofluids, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (23) (2017) 5555–5567.
- [188] L. Karalátria, S. Ocvirk, A. Wilson, J. Li, C.B. Mahach, D. Sont, J. DeLany, J.K. Nicholson, E.C. Zoerendal, S.J.D. O'Keefe, Differences in fecal gut microbiota, short-chain fatty acids and bile acids link colorectal cancer risk to dietary changes associated with urbanization among rimbawans, *Nutr. Cancer* 71 (8) (2019) 1313–1324.
- [189] B.B. C.K. Kok, M. Dychkowiak, C. Harris, N. Mason, J. Wampler, J. Vanderhoof, D. Rose, K. Hutkins, Short/branched-chain fatty acids in infants receiving extensively hydrolyzed formula, amino acid formula, or human milk through two months of age (P11-076-19), *Curr. Dev. Nutr.* 3 (2019).
- [190] D. Govil, B. de Lacy Costello, A. Smart, P. Jones, A. Macnamer, K. Kestley, N. Kaur, Gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) quantification of metabolites in stool using, *Metabolites* 8 (4) (2018).
- [191] L.F. Zhang Chaocheng, Zhao Hua, Rapid detection of short-chain fatty acids in biological samples, *Chromatographia* 83 (2020) 305–310.
- [192] Y.L. Hua, C.C. Chen, Y.T. Lin, W.K. Wu, L.C. Chang, C.H. Lai, M.S. Wu, C.H. Kuo, Evaluation and optimization of sample handling methods for quantification of short-chain fatty acids in human fecal samples by GC-MS, *J. Proteome Res.* 18 (5) (2019) 1948–1957.
- [193] M. Yu, H. Jia, C. Zhou, Y. Yang, Y. Zhao, M. Yang, Z. Zhu, Variations in gut microbiota and fecal metabolic phenotype associated with depression by 16S rRNA gene sequencing and LC/MS-based metabolomics, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 138 (2017) 231–239.
- [194] T. Hama, M. Ito, K. Ito, M. Uchida, Sample treatment optimization for fish stool metabolomics, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1002 (2018) 258–267.
- [195] U. Eberberber, N. Arias, N. Bajaj, M.Y. Macarulla, M.P. Penttila, J.A. Martinez, F.J. Milligan, Reshaping fecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats, *J. Nutr. Biochem.* 28 (6) (2015) 651–660.
- [196] X. Han, J. Gao, Y. You, M. Yin, C. Ren, J. Zhao, W. Huang, A fast and accurate way to determine short chain fatty acids in mouse feces based on GC-MS, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1099 (2018) 71–82.
- [197] G. Zhan, M. Wyman, J. Ake Jansson, Rapid determination of short-chain fatty acids in culture contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography, *Biomol. Chromatogr.* 20 (8) (2008) 874–882.
- [198] L. Van Meulebeek, S. Carmona, V. Pletkova, M. De Spiegeler, K. Wijnant, N. Michels, S. De Henauw, B. Lapaere, Z. Takata, L. Vanhaecke, Rapid LA-REIMS and comprehensive HPLC-HRMS for metabolic phenotyping of feces, *Talanta* 217 (2020), 121043.
- [199] I. Smith, J. Villanov-Canadarmont, S.P. Davis, C. Collier, H. Gullone, N.J. Cahalan, S. Ebers-Günther, Important considerations for sample collection in metabolomics studies with a special focus on applications to liver functions, *Metabolites* 10 (1) (2020).
- [200] Z.T. Lewis, J.C. Davis, J.T. Smilowitz, J.R. Gerson, C.B. Leffler, D.A. Mills, The impact of freeze-drying infant fecal samples on measures of their bacterial community profiles and milk-derived oligosaccharide content, *Front* 4 (2019) e1612.
- [201] A. Vincenzi, C.I. Le Roy, F. Rosa, N. Rossi, T.E. Martin, R.P. Mahony, W. Li, E. de Suda, J.T. Bell, J.C. Venter, K.E. Nelson, T.D. Spector, M. Falchi, Interplay between the human gut microbiome and host metabolism, *Nat. Commun.* 10 (1) (2019) 4505.
- [202] J. Finn, S. Tarront, M. Candela, P. Brigali, B. Gotti, Simultaneous HS-SPME GC-MS determination of short chain fatty acids, trimethylamine and trimethylamine N-oxide for gut microbiota metabolic profile, *Talanta* 189 (2018) 573–578.
- [203] W.R. Roberts, M.A.R. Vilela, L.A. Calisto, C.M. Ferreira, Use of gas chromatography to quantify short chain fatty acids in the serum, colonic luminal content and feces of mice, *Bioprocess* 8 (22) (2018) e3993.
- [204] X. Zhan, Z. Jiang, F. Yang, Y. Wang, B. Gao, X. Chai, G. Pan, Y. Zhu, Sensitive and simplified detection of antibiotic influence on the dynamic and variable changes of fecal short-chain fatty acids, *PLoS One* 11 (12) (2016), e0167032.
- [205] J. Theandapill, S.P. Hsiao, Y. Wang, C.M. Nyachwaya, R.P. Ames, Bilely β -glucan increases fecal bile acid excretion and short chain fatty acid levels in mildly hypercholesterolemic individuals, *Food Funct.* 9 (6) (2018) 3062–3066.

9.2. A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC–MS–based plasma metabolome of patients with and without *PROX1*–genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance



Article

A Preliminary Study Showing the Impact of Genetic and Dietary Factors on GC–MS–Based Plasma Metabolome of Patients with and without *PROX1*–Genetic Predisposition to T2DM up to 5 Years Prior to Prediabetes Appearance

Patrycja Mojsak ¹, Katarzyna Miniewska ¹, Adrian Godlewski ¹, Edyta Adamska-Patrano ¹, Paulina Samczuk ¹,
Fernanda Rey-Stolle ², Witold Bauer ³, Coral Barbas ², Adam Kretowski ^{1,3} and Michal Ciborowski ^{1,*}

¹ Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok, Poland; patrycja.mojsak@umb.edu.pl (P.M.); katarzyna.miniewska@umb.edu.pl (K.M.); adrian.godlewski@umb.edu.pl (A.G.); edyta.adamska@umb.edu.pl (E.A.-P.); paulina.samczuk@umb.edu.pl (P.S.); witold.bauer@umb.edu.pl (W.B.); adam.kretowski@umb.edu.pl (A.K.)

² Centre for Metabolomics and Bioanalysis (CEMBO), Department of Chemistry and Biochemistry, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo-CEU, CEU Universities, Urbanización Monteprincipe, Boadilla del Monte, 28660 Madrid, Spain; froylo@ceus.es (F.R.-S.); cbarbas@ceus.es (C.B.)

³ Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Skłodowskiej-Curie 24A, 15-276 Białystok, Poland

* Correspondence: michal.ciborowski@umb.edu.pl; Tel./Fax: +48-85-631-81-51



Citation: Mojsak, P.; Miniewska, K.; Godlewski, A.; Adamska-Patrano, E.; Samczuk, P.; Rey-Stolle, F.; Bauer, W.; Barbas, C.; Kretowski, A.; Ciborowski, M. A Preliminary Study Showing the Impact of Genetic and Dietary Factors on GC–MS–Based Plasma Metabolome of Patients with and without *PROX1*–Genetic Predisposition to T2DM up to 5 Years Prior to Prediabetes Appearance. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2021**, *43*, 513–528. <https://doi.org/10.3390/cimb43020039>

Academic Editor: Hidayat Husain

Received: 19 May 2021

Accepted: 24 June 2021

Published: 29 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Risk factors for type 2 diabetes mellitus (T2DM) consist of a combination of an unhealthy, imbalanced diet and genetic factors that may interact with each other. Single nucleotide polymorphism (SNP) in the prospero homeobox 1 (*PROX1*) gene is a strong genetic susceptibility factor for this metabolic disorder and impaired β -cell function. As the role of this gene in T2DM development remains unclear, novel approaches are needed to advance the understanding of the mechanisms of T2DM development. Therefore, in this study, for the first time, postprandial changes in plasma metabolites were analysed by GC–MS in nondiabetic men with different *PROX1* genotypes up to 5 years prior to prediabetes appearance. Eighteen contestants (12 with high risk (HR) and 6 with low risk (LR) genotype) participated in high-carbohydrate (HC) and normo-carbohydrate (NC) meal-challenge tests. Our study concluded that both meal-challenge tests provoked changes in 15 plasma metabolites (amino acids, carbohydrates, fatty acids and others) in HR, but not LR genotype carriers. Postprandial changes in the levels of some of the detected metabolites may be a source of potential specific early disturbances possibly associated with the future development of T2DM. Thus, accurate determination of these metabolites can be important for the early diagnosis of this metabolic disease.

Keywords: NC/HC-meal intake; *PROX1*; plasma; GC–MS; metabolomics; prediabetes; T2DM; carbohydrates; amino acids; fatty acids

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a complex polygenic disorder [1] characterised by the incapability of pancreatic β -cells to increase insulin secretion to compensate for insulin resistance (IR) in peripheral tissues [2]. According to the latest epidemiological studies, the prevalence of people with T2DM worldwide was 463 million in 2019, and this number is expected to increase to 592 million by 2035 [3] and 629 million by 2045 [2]. However, rapid implementation of appropriate prevention and treatment strategies is challenging due to problems with the diagnosis of T2DM in its early stages. The main reason is that the symptoms of T2DM are not obvious or only partially manifested at the beginning of the disease [4]. Additionally, conventional clinical and blood biomarkers, such as BMI, fasting blood glucose or HbA1c levels, are well-established predictors but remain imperfect and provide limited insight regarding underlying pathophysiology [5].

It was confirmed that risk factors for T2DM consist of a combination of an imbalanced diet, sedentary lifestyle and genetic factors that may interact with each other [1]. A proper diet and systematic physical activity are essential lifestyle determinants of potential T2DM development. However, the role of these modifiable factors in the prevention of T2DM strongly depends on genetic susceptibility. Therefore, an indication of T2DM risk subgroups with genetic characteristics known to promote disease development, especially sensitive to specific foods, nutrients or physical activity, may help design and implement individualised and targeted intervention and/or prevention strategies [6]. We have been progressing our understanding of the genetic susceptibility to T2DM, including single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of particular genes. Several genes have been identified that may be associated with T2DM; among these, the prospero homeobox 1 (*PROX1*) is considered an important gene for T2DM risk due to its function regulating glucose-induced insulin secretion [7]. Already, in the year 2005, Harvey et al. [8] reported an animal model in which *PROX1* heterozygous adult mice became obese and had higher serum insulin levels and hepatic lipid accumulation. In the study conducted by Kretowski et al. [9], it was reported that people who possess this variant are more glucose intolerant and have more visceral fat than people lacking it. It was also indicated that mechanisms by which the *PROX1* gene affects the susceptibility to T2DM seem to be more complex [9]. Thus, identifying individuals with high risk for T2DM and elucidating the underlying mechanisms is crucial for developing effective strategies to prevent this disease [5].

The surge in the prevalence of T2DM during the past several decades cannot be explained by only genetic factor alone. It was confirmed that inappropriate diet combined with a genetic predisposition might be a factor accelerating specific changes in the metabolic profile of people susceptible to T2DM. However, reproducible data supporting gene–diet interaction are still sparse, and little knowledge about gene–diet interactions has been applied in public health practice. Thus far, only a few studies have indicated interactions between specific dietary components and individual genetic variants [1,10,11]. Yet, some findings have been replicated, and it is unclear whether the importance of overall dietary habits, including T2DM-related food intake, differs depending on the overall genetic profile [1]. Our recent study [11] was the first to study the influence of *PROX1* gene–diet interaction on the plasma metabolome of healthy genetic risk carriers. In this study, liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LCQTOF-MS) was used to evaluate postprandial changes in plasma metabolites during the high-carbohydrate (HC) and normo-carbohydrate (NC) meal-challenge tests in nondiabetic men with different polymorphisms in the *PROX1* rs340874 gene. This study revealed that plasma metabolites postprandially changing in the high-risk *PROX1* genotype carriers belong to T2DM-related metabolic pathways [11].

Metabolomics has already allowed the identification of metabolites that can serve as potential biomarkers for the diagnosis or treatment of T2DM [12]. The relationships between metabolites level and insulin resistance [13,14], prediabetes [15,16] and T2DM [4,17] have been evaluated in several studies using mass spectrometry (MS) coupled with gas (GC) or liquid (LC) chromatography. Thus far, metabolites such as aromatic amino acids (AAAs), branched-chain amino acids (BCAAs), sugar metabolites and gluconeogenesis substrates (including glucose and fructose), and finally, different lipid subclasses (such as phospholipids, sphingomyelins, triglycerides and also specific lipids), identified using high-throughput metabolomics, have been associated with T2DM or different stages of its development. Considering metabolomics research, LC-MS and GC-MS are complementary platforms [5], and reviewed literature indicate that many T2DM-related plasma or serum metabolites can be measured using GC-MS [18–20]. Additionally, GC-MS is one of the most efficient, reproducible and convenient methods for quantitative and comprehensive metabolomics analysis due to its robustness, excellent separation capability, selectivity and sensitivity [19].

Genetic susceptibility to type 2 diabetes includes single-nucleotide polymorphisms (SNPs) of several genes. Prospero-related homeobox 1 (*PROX1*) plays pivotal roles in

the embryonic formation of several organs and tissues, including liver, pancreas, eye, lymphatic vessel, nerve and cardiac muscle in mice [1–4] and a meta-analysis of a genome-wide association study revealed that the rs340874 SNP in the *PROX1* gene is associated with type 2 diabetes reported in an animal model in which *PROX1* heterozygous adult mice become obese and had higher serum insulin levels and hepatic lipid accumulation.

The present study is a continuation of the above-mentioned study of Adamska-Patrano et al. [11]. To complement previous meal-challenge metabolomics results, in the present work, metabolites were measured in samples from the same patients using GC-MS. Of note, participants of this study were recruited from the cross-sectional study called 1000 PLUS, which has been described in details previously [21]. We have recently performed 5-years of follow-up visits with the individuals from the 1000 PLUS cohort [22]. Interestingly, half of the risk carriers from the present study participated in the follow-up visit, and we observed that their parameters assessing glucose homeostasis (e.g., fasting plasma glucose, HOMA-IR, HbA1c) have worsened, indicating the development of a prediabetic state. Therefore, obtained results revealed novel meal-affected metabolites, which may be connected with the process of T2DM development within the next 5 years. Consequently, this study is of great importance, as it provides new insights into *PROX1* gene–diet interactions and potential T2DM development.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

The study was conducted on selected Polish-origin Caucasian volunteers recruited to the meal-test study from the previously described [11,21] 1000 PLUS cohort. This trial was registered at www.clinicaltrials.gov (accessed on 15 April 2021) as NCT03792685. Taking into consideration the fact that investigated factors can be characterised by sexual dimorphism [23], only male participants were included in the study group. Participants ($n = 18$) were divided into 2 groups based on the *PROX1* rs340874 genotypes: the homozygous carriers of high-risk (HR) allele C (CC genotype, $n = 12$) and carriers of low-risk (LR) allele T (TT genotypes, $n = 6$). When the meal-challenge study was conducted, all participants did not suffer from T2DM, prediabetes or other disorders and did not receive any treatment that might affect the results. Based on the daily physical activity measure assessed with the use of self-administered questionnaires [24], all participants were classified as having moderate or high (the majority of the participants) physical activity. A daily energy intake was also similar for all participants (1991.8 ± 529.7 kcal) with $20.4\% \pm 4.4\%$ ($19.4\% \pm 1.4\%$ vs. $21.6\% \pm 4.3\%$ for LR vs. HR, $p = 0.4$) of energy from protein, $33.6\% \pm 5.8\%$ ($33.9\% \pm 10.0\%$ vs. $31.7\% \pm 5.3\%$ for LR vs. HR, $p = 0.9$) from fat and $42.0\% \pm 6.3\%$ ($41.4\% \pm 6.2\%$ vs. $42.7\% \pm 6.8\%$ for LR vs. HR, $p = 0.9$) from carbohydrates. Five years after the first examination, subjects from the 1000 PLUS cohort were called for a follow-up visit [22]. Seven individuals from the risk carriers group responded to this call, and for six of them, we observed worsening of selected clinical parameters assessing glucose homeostasis (e.g., fasting plasma glucose, HOMA-IR, HbA1c), indicating the development of prediabetic state manifested by increased (within the range of 100–125 mg/dL) fasting plasma glucose (three individuals) or increased (within the range of 5.7–6.4%) HbA1c value (two individuals) or insulin resistance (HOMA-IR = 4.6, one individual).

2.2. Regents

Pentadecanoic acid (99%), methyl stearate standards, HPLC grade methanol and silylation-grade pyridine were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Regents for derivatisation (O-methoxyamine hydrochloride and BSTFA:TMCS (N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with 1% Trimethylchlorosilane), 99:1 (SylonBFT)) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and Supelco (Bellefonte, PA, USA), respectively. Two standard mixes for GC-MS, one containing grain fatty acid methyl esters (C8:0–C22:1, n9) and another standard mix with a mixture of n-alkanes (C8–C40) and

analytical grade heptane, were purchased from Fluka Analytical (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany).

2.3. Working Solution and Standards

Individual stock solutions of 4-nitrobenzoic acid (4-NBA) and methyl stearate (IS) were prepared in methanol and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. These solutions were used to prepare an intermediate solution of each compound which were stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ during the working week and appropriately diluted on the day of the analysis.

2.4. Ethics

The study procedures were conducted in accordance with all of the ethical standards of human experimentation and with the Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the local Ethics Committee (Medical University of Białystok, Poland, R-4-002/35/2009), and before any study procedures, all the participants signed informed consent.

2.5. Meal Challenge Tests

The volunteers were studied twice, within an interval of 2 to 3 weeks, in random order. Participants were instructed to avoid coffee, alcohol and excessive physical exercise on the day before each test and to maintain their regular lifestyle throughout the study. After fasting blood collection, participants received a standardised HC-meal (300 mL, Nutridrink Juice Style, Fat Free, Nutricia, Poland), which provided 450 kcal (89% of energy from carbohydrate—around 100 g, 11% from protein—around 12 g and 0% from fat, or an NC-meal (360 mL, Cubitan, Nutricia, Poland), providing 450 kcal (45% of energy from carbohydrate—around 50 g, 30% from protein—around 34 g and 25% from fat—around 13 g, choline 69 mg/100 mL). The blood for metabolomics analyses was collected at fasting state and 30, 60 and 120 min after meal intake.

2.6. Metabolomics Analysis

Metabolite extraction was performed as described by Dudzik et al. [25] with a small modification. Plasma (40 μL) was deproteinised with 120 μL of 25 ppm 4-NBA in cold acetonitrile (1:3, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), followed by two-step derivatisation: (i) methoximation with *O*-methoxyamine hydrochloride in pyridine (15 mg/mL, room temperature, 16 h) followed by (ii) silylation with BSTFA containing 1% TMCS ($70\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1 h). Metabolic fingerprinting (MF) was performed using an HP 6890 Series GC system equipped with an HP 6890 autosampler and a Mass Selective Detector 5973 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). 1 μL of the derivatised plasma sample with IS was injected onto a DB-5MS capillary GC column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) using helium as carrier gas at a constant gas flow of 1.0 mL/min. The injector temperature was set at $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ and the split ratio to 1:10. The temperature gradient program started at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ held for 1 min, followed by a subsequent increase in temperature to $320\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The GC-MS transfer line, filament source and the quadrupole temperature were set at 280, 230 and $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectively. The electron ionisation (EI) source was set at 70 eV, and the mass spectrometer was operated in full scan mode, applying a mass range from m/z 50 to 600 at a scan rate of 1.38 scan/s.

2.7. Quality Control Samples

To determine the reproducibility of plasma sample preparation and the stability of the analytical platform used, several QC samples were prepared by mixing equal volumes of all analysed samples. Subsequently, preparation of the QC samples was performed using the same procedures as was described above. QC runs were performed prior to the analysis of all plasma samples until system equilibration was achieved.

2.8. GC-MS Data Treatment

Total ion chromatograms (TICs) obtained after the analysis were inspected based on both, quality of the chromatograms and internal standard signals. At first, samples were

processed with Mass Hunter Workstation GC/MS Translator software (version B.04.01) in order to make them compatible with the Mass Hunter Quantitative data analysis (version B.08.00). The resulting data files were exported to Agilent Mass Hunter Unknowns Analysis Tool (version 7.0) for the deconvolution process and metabolites' identification based on GC-MS raw data. In order to obtain a chemical identity of the compounds, the software executed a search against two target libraries. Fiehn's library (version 2013) was used to compare retention time (RT) and spectra extracted during the deconvolution against each compound included in the library. For the non-identified compounds, a mixture of n-alkanes, that was analysed at the beginning of the analytical run was used as a reference for retention time and retention index (RI) comparison with a commercial NIST (National Institute of Standards and Technology) spectral library (version 2.2, 2019). Metabolites with spectrum score higher than 80% and concordant RI based on the alkanes scale were putatively identified using the NIST library. Data obtained by the Unknown Analysis Tool were aligned using Mass Profiler Professional B.12.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Then, Agilent Mass Hunter Quantitative Analysis (version B.08.00) was used for the assignment of the target and qualifiers ions and peak area integration. Prior to the statistical analysis, sample areas were normalised by methyl stearate abundance in order to minimise the response variability coming from the instrument. Finally, data were filtered based on the coefficient of signal variation (CV) in QC samples, considering values lower than 30% as acceptable.

2.9. Pathway Analysis with MetaboAnalyst

Metabolic pathway analysis was performed to identify clusters of metabolites related to key cellular signalling and metabolic networks, which may provide mechanistic insight into the underlying biology of differentially expressed metabolites. For this purpose, MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>, accessed on 5 June 2021) was used, and pathway analysis was performed for statistically significant metabolites detected in this and our previous [11] study. To increase the specificity of the results, *Homo sapiens* organism was selected in the KEGG database.

2.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was performed for NC- and HC-meal independently. Due to the small number of contestants in each group, non-parametric tests were chosen. The Wilcoxon signed-rank test was performed to study the differences between metabolites level in dependent samples (the level of the metabolite in 30', 60' and 120' after meal intake compared to their fasting level), whereas the Mann-Whitney U test was used to test the differences between the level of metabolites in the fasting state of HR- and LR-genotype groups. Statistical analysis was performed using the R software environment (version 4.0.0, <https://www.R-project.org/>, accessed on 15 February 2021).

3. Results

3.1. Baseline Characteristics

The baseline characteristics of the studied population are presented in Table 1. The groups were well matched without any between-group differences in age, anthropometric measurements (body mass index (BMI), body fat and fat-free mass content), fasting glucose and insulin level, as well as HOMA-IR, HOMA-B and glycated haemoglobin (HbA1c).

Table 1. Baseline characteristics of the study groups.

	LR Genotype Carriers	HR Genotype Carriers	<i>p</i>
Age (years)	35.8 ± 6.9	35.2 ± 9.0	0.88
Weight (kg)	91.8 ± 22.2	93.6 ± 23.5	0.89
Body mass index (BMI) (kg/m ²)	28.1 ± 5.4	29.1 ± 7.8	0.79
Body fat content (%)	23.6 ± 7.7	23.8 ± 9.6	0.96
Fat-free mass (%)	76.29 ± 10.1	74.3 ± 9.0	0.88
Waist (cm)	105.5 ± 21.5	107.4 ± 21.3	0.94
Hip (cm)	108.0 ± 10.0	104.4 ± 15.6	0.79
WHR	0.97 ± 0.11	1.03 ± 0.16	0.66
Fasting glucose concentration (mg/dl)	84.7 ± 5.1	86.2 ± 7.6	0.65
Fasting insulin activity (IU/mL)	9.7 ± 7.5	10.4 ± 8.7	0.87
HOMA-IR	2.1 ± 1.8	2.2 ± 1.9	0.89
HOMA-B	150.2 ± 81.4	188.2 ± 156.3	0.53
HbA1c	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.5	0.77

3.2. Metabolomics Results

A GC-MS-based approach was applied for plasma metabolomics analysis of plasma samples from 18 patients. Considering the fact that the run time per sample is 37.5 min, samples were analysed in two analytical batches, according to the type of meal taken (NC- and HC-meal).

First, 525 and 624 raw peaks after the NC-meal and HC-meal were observed in GC-MS data, respectively. After data pretreatment (deconvolution, alignment, data normalisation and filtering), 125 entities were obtained. Finally, 58 metabolites with CVs below 30% in the QC samples of HC- or NC-meal analyses were annotated. In total, 15 significantly different ($p < 0.05$) metabolites were identified (Figure 1). Similarly to our previous study [11], at the fasting state, we did not observe any significant differences in metabolites' levels between studied groups. Whilst postprandially, the HR genotype carriers presented differences in the level of 11 and 5 metabolites after HC- and NC-meal intake, respectively. In the case of LR genotype carriers, we have not observed any metabolites significantly changing postprandially. In the case of LR genotype carriers, we did not observe any metabolites significantly changing postprandially. Metabolites significant in the *PROXI* low- (LR) and high-risk (HR) genotype men after HC-meal and NC-meal intake are presented in Tables 2 and 3, respectively.

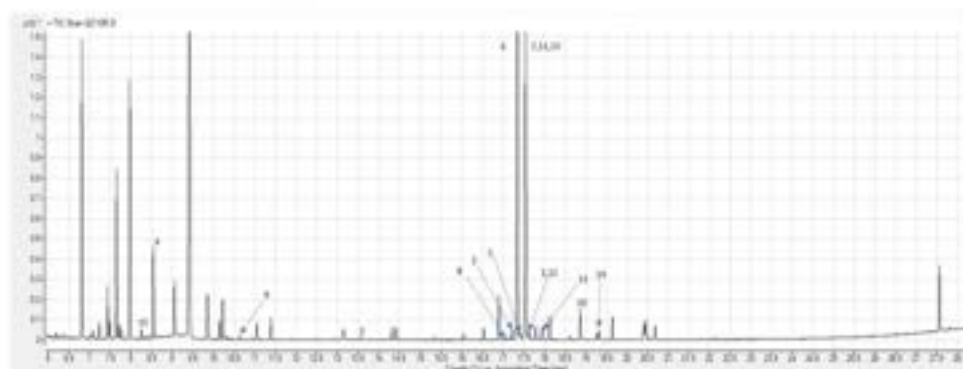


Figure 1. Total ion chromatogram (TIC) of plasma profile obtained by GC-MS with marked statistically significant metabolites. 1. Alanine, 2. Histidine, 3. Creatinine, 4. Noeleucine, 5. Galactosamine, 6. Galactose, 7. Allose, 8. Fructose, 9. Glyceric acid, 10. Palmitic acid, 11. 5-Keto-D-gluconate, 12. Gluconic acid, 13. Tyramine, 14. Uric acid, 15. α -Hydroxybutyric acid.

Table 2. The percentage differences in postprandial plasma metabolite levels after HC-meal intake in the PROXI low- (LR) and high-risk (HR) genotype men. Metabolites that showed statistical significance after Wilcoxon signed-rank test. Mass found in the Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca> accessed, on 20 April 2021); RT, retention time expressed in minutes; *p* value; * *p* value for between-groups comparison (Mann-Whitney U test); CV, coefficient of variation of the metabolites in the QC samples; FC, fold change in the comparison. Eight individuals from the HR group participated in HC-meal.

Compound	Mass (DB)	Molecular Formula	RT (min)	Time after Meal	HR-HC-Meal		LR-HC-Meal		CV (%)	* <i>p</i> Value	HMDB Code
					<i>p</i> Value	FC	<i>p</i> Value	FC			
<i>Amino acids, peptides and analogues</i>											
Histidine	155.1546	C ₆ H ₇ N ₃ O ₂	17.20	0'-60' 0'-120'	0.04 0.02	1.90 2.20	0.19 0.19	1.52 1.30	27	0.02 1.00	HMDB000377
Creatinine	113.1179	C ₄ H ₇ N ₃ O	13.60	0'-30'	0.04	0.70	0.63	0.89	22	0.43	HMDB000562
<i>Carbohydrates and carbohydrate conjugates</i>											
Galactosamine	221.2076	C ₆ H ₁₃ NO ₅	17.40	0'-30' 0'-60' 0'-120'	0.008 0.008 0.008	1.63 1.93 1.89	0.13 0.19 0.31	1.30 1.49 1.27	9	0.66 0.54 0.43	HMDB000803
Galactose	180.1599	C ₆ H ₁₂ O ₆	17.30	0'-30' 0'-60' 0'-120'	0.008 0.008 0.008	1.63 1.89 1.95	0.19 0.31 0.44	1.43 1.43 1.22	10	0.54 0.66 0.43	HMDB000543
Allose	180.1599	C ₆ H ₁₂ O ₆	17.54	0'-30' 0'-60' 0'-120'	0.008 0.008 0.008	2.89 2.04 1.92	0.44 0.44 0.63	1.46 1.30 0.53	9	0.66 0.54 0.54	HMDB001151
Fructose	180.1599	C ₆ H ₁₂ O ₆	17.00	0'-30' 0'-60' 0'-120'	0.008 0.02 0.008	1.82 1.60 1.78	0.63 0.44 0.86	1.29 1.44 1.40	13	0.13 0.33 0.54	HMDB000660
<i>Hydroxy acids and derivative</i>											
5-Keto-glucamate	194.1794	C ₆ H ₉ O ₅	17.53	0'-30' 0'-60' 0'-120'	0.008 0.008 0.008	1.66 2.02 1.92	0.13 0.31 0.31	1.51 1.49 1.28	9	0.43 0.54 0.43	HMDB11731
α-Hydroxybutyric acid	104.1045	C ₄ H ₈ O ₃	7.70	0'-60' 0'-120'	0.008 0.008	1.23 1.33	0.44 0.81	1.15 1.05	10	0.66 0.54	HMDB000008
<i>Fatty acids and conjugates</i>											
Palmitic acid	256.424	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	18.85	0'-60'	0.02	1.42	0.19	0.39	22	0.54	HMDB000220
<i>Phenethylamines</i>											
Tyramine	137.079	C ₈ H ₉ NO	17.60	0'-30' 0'-60' 0'-120'	0.008 0.008 0.008	1.66 2.97 1.95	0.81 0.81 1.00	1.03 1.02 0.87	11	0.03 0.05 0.08	HMDB000306
<i>Purines and purine derivatives</i>											
Uric acid	168.1103	C ₅ H ₄ N ₂ O ₃	19.30	0'-120'	0.04	0.53	0.58	1.25	27	0.54	HMDB000289

Table 3. The percentage differences in postprandial plasma metabolite levels after NC-meal intake in the PROXI low- (LR) and high-risk (HR) genotype men. Metabolites that showed statistical significance after Wilcoxon signed-rank test. Mass found in the Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca> accessed, on 20 April 2021); RT, retention time expressed in minutes; *p* value; * *p* value for between-groups comparison (Mann-Whitney U test); CV, coefficient of variation of the metabolites in the QC samples; FC, fold change in the comparison. Ten individuals from the HR group participated in NC-meal (six common with HC-meal).

Compound	Mass (DB)	Molecular Formula	RT (min)	Time after Meal	HR-NC-Meal		LR-NC-Meal		CV (%)	* <i>p</i> Value Groups	HMDB Code
					<i>p</i> Value	FC	<i>p</i> Value	FC			
<i>Amino acids, peptides and analogues</i>											
Alanine	146.1876	C ₃ H ₇ N ₂ O ₂	7.4	0'-60' 0'-120'	0.04 0.02	2.00 3.70	0.13 0.88	1.26 1.21	25	0.91 0.01	HMDB000361
Nonoic acid	131.173	C ₉ H ₁₇ NO ₂	8.53	0'-30' 0'-60'	0.006 0.04	2.30 2.27	0.88 0.25	0.95 1.75	24	0.11 0.60	HMDB001445
<i>Carbohydrates and carbohydrate conjugates</i>											
Gluconic acid	196.1553	C ₆ H ₁₂ O ₇	17.62	0'-60' 0'-120'	0.04 0.01	1.88 3.47	0.63 0.13	1.17 2.42	14	0.11 0.17	HMDB000625
Glyceric acid	106.0773	C ₃ H ₆ O ₄	9.80	0'-120'	0.02	1.77	0.13	1.73	10	0.02	HMDB000139
<i>Fatty acids and conjugates</i>											
Palmitic acid	256.424	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	18.85	0'-60'	0.01	1.62	0.13	0.62	29	0.91	HMDB000220

Pathway mapping using MetaboAnalyst 5.0 showed that significant metabolites identified in the present study using GC-MS (Figure 2, panel A) and in the previous study [11] using LC-QTOF-MS (Figure 2, panel B) belong to different metabolic pathways. It proves that both analytical platforms provide complementary results. Pathway analysis based on GC-MS data revealed several pathways, including glycerolipid metabolism, histidine metabolism, pentose phosphate pathway or amino sugar and nucleotide sugar metabolism, where disturbance may lead to T2DM development. Metabolic pathways pointed based on LC-MS data are also important in the development of T2DM. Detailed information about all performed pathway analyses are provided in Figure 2, Tables 4 and 5.

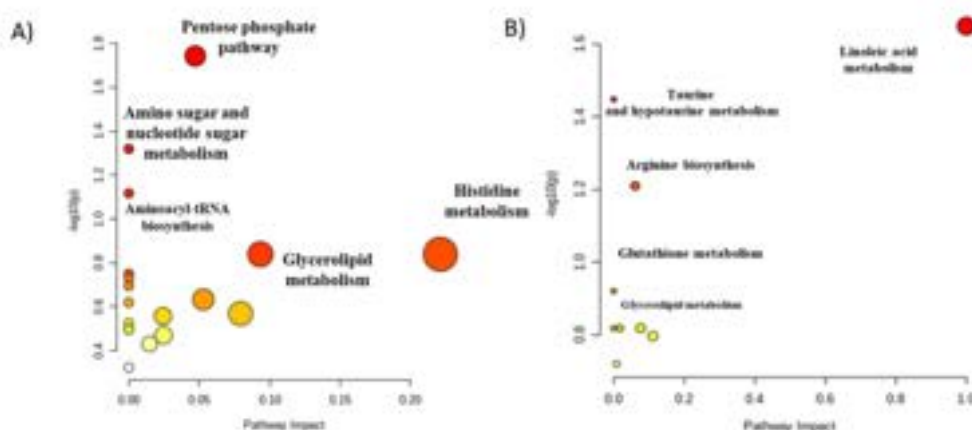


Figure 2. The results of biochemical pathways analysis performed for metabolites detected by GC-MS (panel A) and by LC-QTOF-MS (panel B).

Table 4. Metabolic pathways corresponding to significant metabolites identified in plasma samples with GC-MS.

Pathway Name	No. of Metabolites in the Pathway	No. of Metabolites Detected in Plasma	p-Value	Pathway Impact
Pentose phosphate pathway	22	2	0.018	0.047
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	37	2	0.048	0.000
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	2	>0.05	0.000
Glycerolipid metabolism	16	1	>0.05	0.093
Histidine metabolism	16	1	>0.05	0.221
Selenocompound metabolism	20	1	>0.05	0.000
beta-Alanine metabolism	21	1	>0.05	0.000
Propanoate metabolism	23	1	>0.05	0.000
Galactose metabolism	27	1	>0.05	0.053
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	1	>0.05	0.000
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	1	>0.05	0.080
Glycine, serine and threonine metabolism	33	1	>0.05	0.024
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	1	>0.05	0.000
Fatty acid elongation	39	1	>0.05	0.000
Fatty acid degradation	39	1	>0.05	0.000
Tyrosine metabolism	42	1	>0.05	0.024
Fatty acid biosynthesis	47	1	>0.05	0.014
Purine metabolism	65	1	>0.05	0.000

Table 5. Metabolic pathways corresponding to significant metabolites identified in plasma samples with LC-MS.

Pathway Name	No. of Metabolites in the Pathway	No. of Metabolites Detected in the Plasma	p-Value	Pathway Impact
Linoleic acid metabolism	5	1	0.022	1.000
Taurine and hypotaurine metabolism	8	1	0.036	0
Arginine biosynthesis	14	1	0.062	0.061
Glutathione metabolism	28	1	0.120	0
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	36	1	0.152	0
Glycerophospholipid metabolism	36	1	0.152	0.017
Arachidonic acid metabolism	36	1	0.152	0.076
Arginine and proline metabolism	38	1	0.160	0.111
Primary bile acid biosynthesis	46	1	0.190	0.008

The graphics contain all the matched pathways arranged by $\log(p)$ values (from pathway enrichment analysis) on the y-axis, and pathway impact values (from pathway topology analysis) on the x-axis. The node colour is related to the pathway p-value, and the node radius is determined based on the pathway impact value. The dots symbolise modulated pathways (one dot—one biochemical pathway). Their localisation is dependent on the impact of a pathway in the whole analysis and its statistical significance. The pathway impact is the impact value calculated from pathway topology analysis. The total/maximum importance of each pathway is 1.

4. Discussion

The pathogenesis of T2DM is complex [2], and is characterised by the following triad: genetic predisposition, environmental factors and acquired organ dysfunction. The genetic predisposition to T2DM accompanied by such environmental factors as diet and sedentary lifestyle, along with β -cell dysfunction, IR and hepatic glucose production, leads to prediabetes and T2DM [1].

Meta-analyses of genome-wide association studies have confirmed that the rs340874 single-nucleotide polymorphism in the *PROX1* gene is associated with fasting glycemia and T2DM [26]. However, the mechanism of this link is not fully established [9]. Genetic predisposition–diet interaction is considered as one of the components of this mechanism [27]. We have previously investigated the effect of the meal-challenge test on the plasma metabolome of individuals with a different genetic predisposition to T2DM in the *PROX1* gene using LC-QTOF-MS [11]. However, to the best of our knowledge, how *PROX1* SNPs is related to the postprandial changes of plasma metabolites has not yet been investigated by GC-MS, an analytical platform complementary to LC-MS in metabolomics studies [28].

Therefore, we selected this technique to measure plasma metabolites at fasting and postprandial state to explore the impact of the rs340874 SNPs in the *PROX1* gene on human metabolism. Metabolites detected in the present study were found to be associated with several metabolic pathways (Figure 2), which have already been linked to prediabetes and T2DM [16]. Furthermore, these significant metabolites belong to different chemical classes, i.e., amino acids, carbohydrates, hydroxy acids and others (Figure 3), and using such division are described below.

Carbohydrates are one of the three macronutrients in the human diet, along with protein and fat. As the role of dietary carbohydrates in the development and maintenance of T2DM receives now increasing attention [29], the participants of this study underwent an HC-meal challenge test. The progress of T2DM is often explained by excessive consumption of high-carbohydrates and high-calorie diets [30]. There is a lot of systematic reviews and meta-analyses describing the effect of low carbohydrate diet [29,30] in comparison to normal or high carbohydrate diet [11,27,31] in patients with T2DM, but only some of these studies described the post-meal changes in patients with a genetic predisposition to T2DM [1,11,27].

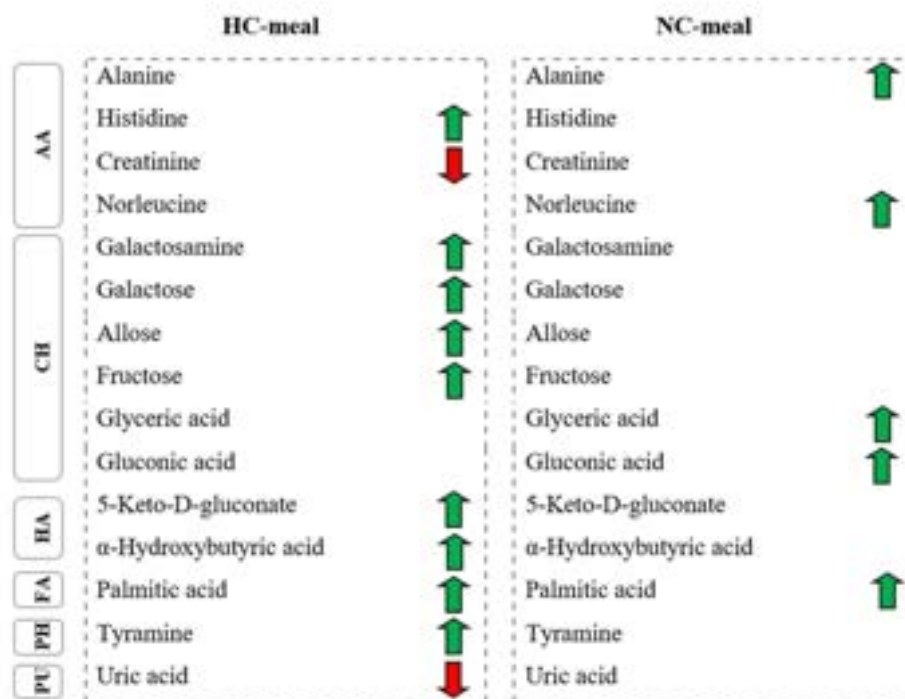


Figure 3. The summary of metabolic alterations observed after NC- and HC-meal intake. AA—Amino acids, CH—Carbohydrates, HA—Hydroxy acids, DI—Dicarboxylic acids, FA—Fatty acids, PH—Phenethylamines, PU—Purines, KA—Keto acids. Red arrows indicate a decrease, whereas green arrows indicate an increase in the metabolite level in HR genotype compared to the LR genotype. Transverse stripes show metabolites common between two meals.

According to the literature review, among compounds involved in carbohydrate metabolism, the levels of malic acid, glucose, mannose, fructose, inositol, sorbitol, xylose, gluconic acid, glucuronic acid and fumaric acid were increased [32–34], whereas the levels of pyruvic acid, deoxygalactose, glycerol-3-phosphate and L-5-anhydroglucitol were decreased in T2DM [28,32,35]. The levels of other metabolites such as citric acid, lactic acid, acetic acid and deoxyglucose were increased in some studies [36,37] and decreased in others [32,36]. Some of the metabolites mentioned above were also found significant in the presented study. After NC-meal intake, we observed changes in two metabolites involved in carbohydrates metabolism, whereas after HC-meal intake, we found significantly higher levels of four metabolites in the HR men (Table 2).

In the present study, 30, 60 and 120 min after HC-meal intake, the HR-genotype carriers presented significantly higher plasma levels for galactose, fructose, D-allose and galactosamine (GlycA). Galactose is a C-4 epimer of glucose and can be rapidly converted to glucose through the Leloir pathway [38]. Postprandially increased galactose metabolism may lead to a long-term, gradual increase in plasma glucose and may contribute to IR [39]. Human studies have shown that in addition to galactose, fructose may contribute negatively to blood glucose homeostasis by causing IR in the liver [40]. It was confirmed in another study that this six-carbon sugar, when ingested in a high amount, increases the risk of T2DM and other metabolic diseases [41]. Fructose, once ingested, can be oxidised, converted to glucose or lactic acid or enter de novo lipogenesis. These metabolic pathways could lead to the development of metabolic disorders. After ingestion of large amounts

of fructose, an increased level of hepatic acetyl CoA leads to increased production of very-low-density lipoprotein and triglycerides, associated with T2DM. GlycA can be a predictor of the future development of T2DM [42], but conclusive data on the relation of GlycA with IR or insulin secretion are missing [43]. Connelly et al. [44] also concluded that further research is needed to understand the inflammatory pathophysiology of T2DM and the ability of GlycA to improve prediction models for T2DM. Low-grade inflammation is known to trigger the development of IR and loss of β -cell function, and both are proposed to be involved in the pathogenesis of T2DM (reviewed here [45,46]).

A recent study shows that fructose-mediated generation of uric acid causes mitochondrial oxidative stress that stimulates fat accumulation independent of excessive caloric intake [40]. Research into the relationship between uric acid and T2DM is the most controversial. A lot of studies confirmed that uric acid was related to an increased risk of T2DM [47,48]. On the other hand, in the study of Li et al. [49], who followed up 4412 non-diabetic patients for around 5 years to study serum urate changes in glucose metabolism, high concentrations of uric acid were not found to be related to an increased risk of T2DM. As shown in Figure 3, we observed a significantly lower uric acid level after HC-meal intake in HR-men.

The metabolism of carbohydrates and fats are closely connected. Plasma FFAs can be synthesised endogenously from excess carbohydrates in the process of de novo lipogenesis. This process is upregulated by insulin in the blood and downregulated by high levels of such hormones as adrenaline and glucagon. Fatty acids involved in this pathway have been recently characterised as a cause [50,51] and a consequence [52] of IR and T2DM. Moreover, it is well known that T2DM and lipid disorders (involving FFAs [53]) are closely associated.

However, different kinds of FFAs have different or even opposite effects on IR and T2DM. For example, saturated fatty acids (SFA) worsen insulin sensitivity and increase the risk of T2DM, but polyunsaturated fatty acids (PUFA), particularly n-3 fatty acids, improve IR [2] and are potentially protective against T2DM [54]. It should be kept in mind that plasma FFAs concentrations reflect their intake and balance between de novo FFA synthesis, storage as TAGs and their lipolysis. During digestion, TAGs are hydrolysed into mono- and diglycerides and FFAs [2].

In the study of Koska et al. [55], it was confirmed that high caloric diets enriched with saturated fatty acids (SFA) or carbohydrates induced whole-body IR in both normal and impaired glucose tolerant subjects. The metabolic response to SFAs can be associated with the induction of serine-phosphorylation through activation of specific serine kinases, resulting in decreased activity of insulin-regulated glucose transporter-4 (GLUT-4) and consequent lower glucose uptake [56]. SFAs can also affect insulin sensitivity by altering the membrane lipid composition, leading to the disorientation of membrane glucose transporter molecules [57].

In our study, HR genotype carriers presented a significantly higher level of palmitic acid (PA) 60 min after both meals. Literature data indicate that impaired insulin secretion, impaired insulin sensitivity and glucose intolerance are strongly associated with elevated plasma levels of saturated FFAs (including palmitic and stearic acid) [3,5,58]. The elevated level of plasma PA may contribute to hyperinsulinemia and consequently the development of IR. It has also been reported that IR could be induced by the increase of circulating FFAs, which inhibit glucose transport and phosphorylation activity and down-regulate glycogen synthesis and glucose oxidation in muscle [59]. In the prospective multi-ethnic cohort study [60], the associations of metabolic perturbations in fatty acid metabolism with a 5-year risk of incident type 2 diabetes, before and after adjusting for insulin sensitivity and IR, were investigated. The researchers found out that PA had the strongest association with the risk of T2DM. Our results also support this observation, as plasma PA level was found to be postprandially increased in HR gene risk carriers up to 5 years prior to T2DM onset. Excessive fatty acid oxidation elevates the intramitochondrial acetyl CoA/CoA and NADH/NAD⁺ ratios and inhibits pyruvate oxidation [61]. Thus, lactate accumulation may occur. This inefficient fat oxidation may cause an increased level of

alpha-hydroxybutyric acid (α -HB). This metabolite is a byproduct of α ketobutyric acid synthesis, a product of amino acid catabolism (threonine and methionine) and glutathione anabolism (cysteine formation pathway) in hepatic tissue. α -HB was previously identified as a marker [16,62,63] and predictor [64,65] of T2DM. In the present study, we also observed a significantly higher level of this metabolite in HR-genotype carriers 60 and 120 min after HC-meal. Consequently, an accurate determination of PA and α -HB can be essential for the early diagnosis of T2DM development, which is an important finding of this study.

Amino acids (AAs) are crucial biological compounds that play a key metabolic and physiological role in all living organisms [66]. It was confirmed that these metabolites are useful diagnostic markers because they are considerably altered in prediabetes state and continue to increase during T2DM progression [67]. The Framingham Offspring Study has shown that elevated AAs were able to predict an increased risk of T2DM up to 12 years prior to disease onset [68]. A less consistent finding is the association of prediabetes or T2DM with higher levels of lysine [69–71], histidine [69] or proline [14,34,70,72].

Our study supported the observations of the relationship between amino acid levels and the risk of T2DM. We noticed higher plasma level of alanine (Ala) and norleucine in HR-genotype carriers after NC-meal. Additionally, we have observed an increased level of histidine in HR-genotype carriers after HC-meal. As mentioned above, accumulation of these metabolites after meal intake may lead to activation of pathways involved in T2DM development.

Alanine is a proteinogenic amino acid which level was found elevated in HR-men in 60 and 120 min after NC-meal intake. It is synthesised from pyruvate and amino acids (mainly BCAAs) primarily in skeletal muscle and intestines and is used for gluconeogenesis in the liver [73]. Therefore, postprandially increased level of Ala in plasma may enhance gluconeogenesis and contribute to fasting hyperglycemia development.

After HC-meal intake, the HR-genotype carriers presented a significantly higher plasma level of histidine and a lower postprandial level of creatinine. Although plasma histidine is an appetite-controlling factor, it also provokes a brain signal to the liver that decreases the expression of gluconeogenic enzymes—most notably glucose-6-phosphatase—and thereby reduces hepatic glucose output. On the other hand, a small Japanese prospective study reached the conclusion that higher dietary intake of BCAAs was a predictor of a lower risk of T2DM. Therefore, arguably, the true dietary determinant of risk might be the histidine ratio to BCAAs or total neutral amino acids. In the diet or in plasma, such a ratio might predict risk better than either histidine or BCAAs per se. On the other hand, studies describe the positive of histidine in preventing T2DM [74].

Many published articles confirm our results for creatinine. For example, in 2009, Harita et al. [75] confirmed that low serum creatinine levels were associated with an increased risk of type 2 diabetes mellitus and dysglycemia. This was also confirmed in the recent studies conducted by Takeuchi et al. [76] and Chutani and Pande [77]. Creatinine is produced after the pyrophosphate cleavage of phosphocreatine to produce energy for muscle activity. Therefore, a lower serum creatinine level might reflect a lower volume of skeletal muscle which means fewer target sites for insulin. In addition, it may partially explain the pathogenesis of T2DM associated with lower serum creatinine. Consequently, an accurate determination of these metabolites can be essential for the early diagnosis of prediabetes or T2DM.

Among other significant metabolites, we observed elevated tyramine level 30 and 60 min after HC-meal in HR-men. This compound is derived from tyrosine and has a good effect on human health. Intake of tyramine might bring a benefit, especially when glucotoxicity or lipotoxicity need to be reduced, i.e., in diabetic and obese condition [78]. In 2003 Visentin et al. [79] reported that tyramine stimulates *in vitro* glucose transport in adipocytes, cardiomyocytes and skeletal muscle and improves *in vivo* glucose utilisation in rats. Carpeni et al. [78] observed that after 12 weeks of tyramine supplementation, non-fasting blood glucose was decreased, but the supplementation did not modify glucose tolerance or fasting glucose level, insulin or circulating lipids.

Our study had several strengths and limitations. One of the strengths was the use of a well-established GC-MS platform, which allowed us to discover novel metabolites, previously not detected using LC-QTOF-MS. A major limitation of our study is a relatively small sample size, but as it was mentioned in our previous studies performed on the same group of patients, it is difficult to find healthy risk genotypes carriers since the general CC genotype frequency is around 6% [9,11]. Furthermore, due to the long and laborious protocols of the meal challenge test, it is also challenging to recruit volunteers willing to participate in this type of study.

5. Conclusions and Future Prospects

Plasma GC-MS profiling provided an efficient way of depicting metabolic perturbations observed in HR-genotype carriers after meals intake. Considering the fact that several of the studied HR-genotype carriers became prediabetic within 5 years, the presented results are of high importance. Alterations in the level of several metabolites can be an early metabolic disturbance predicting early stages of T2DM development, and even some of them, such as α -HB, gluconic acid and PA, can be early predictors of the *PROX1*-related risk of T2DM in healthy people. The obtained result may also help to establish diet recommendations for individuals carrying the T2DM-risk allele in the *PROX1* gene. However, further investigations are required to design an optimal diet. To evaluate the clinical utility of altered metabolites as potential markers of genetic predisposition to T2DM, a targeted method for the determination of significant metabolites should be developed and applied in a large cohort of patients to measure fasting and postprandial plasma samples.

Author Contributions: Conceptualisation: E.A.-P., C.B., A.K. and M.C.; Methodology and software: P.M., K.M., A.G., E.A.-P., P.S., F.R.-S. and W.B.; Formal analysis: P.M., K.M., A.G., P.S., F.R.-S. and W.B.; Investigation: P.M. and E.A.-P.; resources: C.B. and A.K.; Data curation: P.M., A.G., F.R.-S. and W.B.; Writing—original draft preparation: P.M. and K.M.; Writing—review and editing: C.B., A.K. and M.C.; Visualisation: P.M. and A.G.; Supervision: E.A.-P., C.B., A.K. and M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Medical University of Białystok.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Medical University of Białystok (R-I-002/35/2009).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank the staff of the Medical University of Białystok (Poland) for their contribution and help with data collection and laboratory analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ericson, U.; Hindsy, G.; Drake, I.; Schulz, C.-A.; Brunkwall, L.; Hellstrand, S.; Almgren, P.; Orho-Melander, M. Dietary and genetic risk scores and incidence of type 2 diabetes. *Genes Nutr.* **2018**, *13*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sobczak, A.; A. Blindauer, C.; J. Stewart, A. Changes in Plasma Free Fatty Acids Associated with Type-2 Diabetes. *Nutrients* **2019**, *11*, 2022. [[CrossRef](#)]
- Castro-Correia, C.; Sousa, S.; Norberto, S.; Matos, C.; Domingues, V.F.; Fontoura, M.; Calbau, C. The Fatty Acid Profile in Patients with Newly Diagnosed Diabetes: Why It Could Be Unsuspected. *Int. J. Pediatrics* **2017**, *2017*, 6424186. [[CrossRef](#)]
- Yang, S.J.; Kwak, S.-Y.; Jo, G.; Song, T.-J.; Shin, M.-J. Serum metabolite profile associated with incident type 2 diabetes in Koreans: Findings from the Korean Genome and Epidemiology Study. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8207. [[CrossRef](#)]
- Lu, Y.; Wang, Y.; Ong, C.-N.; Subramaniam, T.; Choi, H.W.; Yuan, J.-M.; Koh, W.-P.; Pan, A. Metabolic signatures and risk of type 2 diabetes in a Chinese population: An untargeted metabolomics study using both LC-MS and GC-MS. *Diabetologia* **2016**, *59*, 2349–2359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dietrich, S.; Jacobs, S.; Zheng, J.-S.; Meidtner, K.; Schwingshackl, L.; Schulze, M.B. Gene-lifestyle interaction on risk of type 2 diabetes: A systematic review. *Obes. Rev.* **2019**, *20*, 1557–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Goto, T.; Elbahrawy, A.; Furuyama, K.; Horiguchi, M.; Hosokawa, S.; Aoyama, Y.; Tsuboi, K.; Sakikubo, M.; Hirata, K.; Masui, T.; et al. Liver-specific PROX1 inactivation causes hepatic injury and glucose intolerance in mice. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 624–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Harvey, N.L.; Srinivasan, R.S.; Dillard, M.E.; Johnson, N.C.; Witte, M.H.; Boyd, K.; Sleeman, M.W.; Oliver, G. Lymphatic vascular defects promoted by PROX1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat. Genet.* **2005**, *37*, 1072–1081. [[CrossRef](#)]
9. Kretowski, A.; Adamska, E.; Maliszewska, K.; Wawrusiewicz-Kurylonek, N.; Cifko, A.; Goscik, J.; Bauer, W.; Wilk, J.; Golonko, A.; Waszczeniuk, M.; et al. The rs340874 PROX1 type 2 diabetes mellitus risk variant is associated with visceral fat accumulation and alterations in postprandial glucose and lipid metabolism. *Genes Nutr.* **2015**, *10*, 4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Hindy, G.; Sonestedt, E.; Ericson, U.; Jing, X.J.; Zhou, Y.; Hansson, O.; Renström, E.; Wirfalt, E.; Orho-Melander, M. Role of TCF7L2 risk variant and dietary fibre intake on incident type 2 diabetes. *Diabetologia* **2012**, *55*, 2646–2654. [[CrossRef](#)]
11. Adamska-Patrano, E.; Godzien, J.; Ciborowski, M.; Samczuk, P.; Bauer, W.; Siewko, K.; Gorska, M.; Barbas, C.; Kretowski, A. The Type 2 Diabetes Susceptibility PROX1 Gene Variants Are Associated with Postprandial Plasma Metabolites Profile in Non-Diabetic Men. *Nutrients* **2019**, *11*, 882. [[CrossRef](#)]
12. Long, J.; Yang, Z.; Wang, L.; Han, Y.; Peng, C.; Yan, C.; Yan, D. Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: A systematic review and meta-analysis. *BMC Endocr. Disord.* **2020**, *20*, 174. [[CrossRef](#)]
13. Haeusler, R.A.; Astiarraga, B.; Camastra, S.; Accili, D.; Ferrannini, E. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 α -hydroxylated bile acids. *Diabetes* **2013**, *62*, 4184–4191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Tai, E.S.; Tan, M.L.; Stevens, R.D.; Low, Y.L.; Muehlbauer, M.J.; Goh, D.L.; Ilkayeva, O.R.; Wenner, B.R.; Bain, J.R.; Lee, J.J.; et al. Insulin resistance is associated with a metabolic profile of altered protein metabolism in Chinese and Asian-Indian men. *Diabetologia* **2010**, *53*, 757–767. [[CrossRef](#)]
15. Gaz, C.; Rottenkolber, M.; Prehn, C.; Adamski, J.; Seisler, J.; Lechner, A. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2018**, *55*, 21–32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Dorcely, B.; Katz, K.; Jagannathan, R.; Chiang, S.S.; Oluwadare, B.; Goldberg, I.J.; Bergman, M. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2017**, *10*, 345–361. [[CrossRef](#)]
17. Mook-Kanamori, D.O.; de Mutsert, R.; Reusen, P.C.N.; Prehn, C.; Adamski, J.; den Heijer, M.; le Cessie, S.; Suhre, K.; Rosendaal, F.R.; van Dijk, K.W. Type 2 diabetes is associated with postprandial amino acid measures. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *589*, 138–144. [[CrossRef](#)]
18. Wang, H.; Zhang, H.; Yao, L.; Cui, L.; Zhang, L.; Gao, B.; Liu, W.; Wu, D.; Chen, M.; Li, X.; et al. Serum metabolic profiling of type 2 diabetes mellitus in Chinese adults using an untargeted GC/TOFMS. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *477*, 39–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kvitvang, H.F.; Kristiansen, K.A.; Lien, S.K.; Bruheim, P. Quantitative analysis of amino and organic acids by methyl chloroformate derivatization and GC-MS/MS analysis. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1198*, 137–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Hoving, L.R.; Heijink, M.; van Harmelen, V.; van Dijk, K.W.; Giera, M. GC-MS Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Feces, Cecum Content, and Blood Samples. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1730*, 247–256. [[CrossRef](#)]
21. Ciborowski, M.; Adamska, E.; Rusak, M.; Godzien, J.; Wilk, J.; Cifko, A.; Bauer, W.; Gorska, M.; Kretowski, A. CE-MS-based serum fingerprinting to track evolution of type 2 diabetes mellitus. *Electrophoresis* **2015**, *36*, 2286–2293. [[CrossRef](#)]
22. Sidorkiewicz, L.; Niemira, M.; Maliszewska, K.; Erol, A.; Bielska, A.; Szalkowska, A.; Adamska-Patrano, E.; Szczerbinski, L.; Gorska, M.; Kretowski, A. Circulating miRNAs as a Predictive Biomarker of the Progression from Prediabetes to Diabetes: Outcomes of a 5-Year Prospective Observational Study. *J. Clin. Med.* **2020**, *9*, 2184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lu, J.; Varghese, R.T.; Zhou, L.; Vella, A.; Jensen, M.D. Glucose tolerance and free fatty acid metabolism in adults with variations in TCF7L2 rs7903146. *Metabolism* **2017**, *68*, 55–63. [[CrossRef](#)]
24. Hagströmer, M.; Oja, P.; Sjörström, M. The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): A study of concurrent and construct validity. *Public Health Nutr.* **2006**, *9*, 755–762. [[CrossRef](#)]
25. Dudzik, D.; Iglesias Platas, I.; Izquierdo Renau, M.; Balcells Esponera, C.; Del Rey Hurtado de Mendoza, B.; Lerin, C.; Ramón-Krauel, M.; Barbas, C. Plasma Metabolome Alterations Associated with Extruterine Growth Restriction. *Nutrients* **2020**, *12*, 1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mahajan, A.; Go, M.J.; Zhang, W.; Below, J.E.; Gaulton, K.J.; Ferreira, T.; Horikoshi, M.; Johnson, A.D.; Ng, M.C.; Prokopenko, I.; et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 234–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Adamska-Patrano, E.; Samczuk, P.; Ciborowski, M.; Godzien, J.; Pietrowska, K.; Bauer, W.; Gorska, M.; Barbas, C.; Kretowski, A. Metabolomics Reveal Altered Postprandial Lipid Metabolism After a High-Carbohydrate Meal in Men at High Genetic Risk of Diabetes. *J. Nutr.* **2019**, *149*, 915–922. [[CrossRef](#)]
28. Fiehn, O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2016**, *114*, 30.4.1–30.4.32. [[CrossRef](#)]
29. Czyżewska-Majchrzak, L.; Grzelak, T.; Kramkowska, M.; Czyżewska, K.; Witmanowski, H. The use of low-carbohydrate diet in type 2 diabetes—Benefits and risks. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2014**, *21*, 320–326. [[CrossRef](#)]
30. Goldenberg, J.Z.; Day, A.; Brinkworth, G.D.; Sato, J.; Yamada, S.; Jönsson, T.; Beardsley, J.; Johnson, J.A.; Thabane, L.; Johnston, B.C. Efficacy and safety of low and very low carbohydrate diets for type 2 diabetes remission: Systematic review and meta-analysis of published and unpublished randomized trial data. *BMJ* **2021**, *372*, m4743. [[CrossRef](#)]

31. Tay, J.; Luscombe-Marsh, N.D.; Thompson, C.H.; Noakes, M.; Buckley, J.D.; Wittert, G.A.; Yancy, W.S., Jr.; Brinkworth, G.D. Comparison of low- and high-carbohydrate diets for type 2 diabetes management: A randomized trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102*, 780–790. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Drogan, D.; Dunn, W.B.; Lin, W.; Buijsse, B.; Schulze, M.B.; Langenberg, C.; Brown, M.; Floegel, A.; Dietrich, S.; Rolandsson, O.; et al. Untargeted metabolic profiling identifies altered serum metabolites of type 2 diabetes mellitus in a prospective, nested case control study. *Clin. Chem.* **2015**, *61*, 487–497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Suhre, K.; Meisinger, C.; Döring, A.; Altmajer, E.; Belcredi, P.; Gieger, C.; Chang, D.; Milburn, M.V.; Gall, W.E.; Weinberger, K.M.; et al. Metabolic footprint of diabetes: A multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13953. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Xu, F.; Tavrinharan, S.; Sum, C.F.; Woon, K.; Lim, S.C.; Ong, C.N. Metabolic signature shift in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E1060–E1065. [\[CrossRef\]](#)
35. Fiehn, O.; Garvey, W.T.; Newman, J.W.; Lok, K.H.; Hoppel, C.L.; Adams, S.H. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15234. [\[CrossRef\]](#)
36. Diao, C.; Zhao, L.; Guan, M.; Zheng, Y.; Chen, M.; Yang, Y.; Lin, L.; Chen, W.; Gao, H. Systemic and characteristic metabolites in the serum of streptozotocin-induced diabetic rats at different stages as revealed by a ¹H-NMR based metabolomic approach. *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 686–693. [\[CrossRef\]](#)
37. Gogna, N.; Krishna, M.; Oomsen, A.M.; Dorai, K. Investigating correlations in the altered metabolic profiles of obese and diabetic subjects in a South Indian Asian population using an NMR-based metabolomic approach. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 595–606. [\[CrossRef\]](#)
38. Holden, H.M.; Rayment, I.; Thoden, J.B. Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 43885–43888. [\[CrossRef\]](#)
39. Blaak, E.E.; Antoine, J.M.; Benton, D.; Björck, I.; Bozzetto, L.; Brouns, F.; Damián, M.; Dye, L.; Hulshof, T.; Hobst, J.J.; et al. Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **2012**, *13*, 923–984. [\[CrossRef\]](#)
40. Johnson, R.J.; Nakagawa, T.; Sanchez-Lezada, L.G.; Shafiq, M.; Sundaram, S.; Le, M.; Ishimoto, T.; Sautin, Y.Y.; Lanasa, M.A. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes* **2013**, *62*, 3307–3315. [\[CrossRef\]](#)
41. Ang, B.; Yu, G. The Role of Fructose in Type 2 Diabetes and Other Metabolic Diseases. *Nutr. Food Sci.* **2017**, *8*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
42. Akinkuolie, A.O.; Pradhan, A.D.; Buring, J.E.; Ridker, P.M.; Mora, S. Novel protein glycan side-chain biomarker and risk of incident type 2 diabetes mellitus. *Arter. Thromb. Vasc. Biol.* **2015**, *35*, 1544–1550. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Lorenzo, C.; Festa, A.; Hanley, A.J.; Rewers, M.J.; Escalante, A.; Haflner, S.M. Novel Protein Glycan-Derived Markers of Systemic Inflammation and C-Reactive Protein in Relation to Glycemia, Insulin Resistance, and Insulin Secretion. *Diabetes Care* **2017**, *40*, 375–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Conneally, M.A.; Gruppen, E.G.; Wolak-Dinsmore, J.; Matyus, S.P.; Riphagen, I.J.; Shalunova, I.; Bakker, S.J.; Otvos, J.D.; Dullaart, R.P. GlycA, a marker of acute phase glycoproteins, and the risk of incident type 2 diabetes mellitus: PREVEND study. *Clin. Chim. Acta* **2016**, *452*, 10–17. [\[CrossRef\]](#)
45. Hameed, I.; Masoodi, S.R.; Mir, S.A.; Nabi, M.; Ghazanfar, K.; Ganai, B.A. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J. Diabetes* **2015**, *6*, 598–612. [\[CrossRef\]](#)
46. Lontchi-Yimagou, E.; Sobngwi, E.; Matsha, T.E.; Kengne, A.P. Diabetes mellitus and inflammation. *Curr. Diabetes Rep.* **2013**, *13*, 435–444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Bombelli, M.; Quarti-Trevano, F.; Taddei, M.; Facchetti, R.; Cuspidi, C.; Mancia, G.; Grassi, G. Uric acid and risk of new-onset metabolic syndrome, impaired fasting glucose and diabetes mellitus in a general Italian population: Data from the Pressioni Arteriose Monitorate E Loro Associazioni study. *J. Hypertens.* **2018**, *36*, 1492–1498. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Anothaisintawee, T.; Lertrattananon, D.; Thamakalson, S.; Reutrakul, S.; Ongphiphadhanakul, B.; Thakkinstian, A. Direct and Indirect Effects of Serum Uric Acid on Blood Sugar Levels in Patients with Prediabetes: A Mediation Analysis. *J. Diabetes Res.* **2017**, *2017*, 6830671. [\[CrossRef\]](#)
49. Li, X.; Meng, X.; Gao, X.; Pang, X.; Wang, Y.; Wu, X.; Deng, X.; Zhang, Q.; Sun, C.; Li, Y. Elevated Serum Xanthine Oxidase Activity Is Associated With the Development of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study. *Diabetes Care* **2018**, *41*, 884–890. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Wilding, J.P. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* **2007**, *24*, 934–945. [\[CrossRef\]](#)
51. Boden, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **2011**, *18*, 139–143. [\[CrossRef\]](#)
52. Carmena, R. Type 2 diabetes, dyslipidemia, and vascular risk: Rationale and evidence for correcting the lipid imbalance. *Am. Heart J.* **2005**, *150*, 859–870. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Wyne, K.L. Free fatty acids and type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Med.* **2003**, *115*, 295–365. [\[CrossRef\]](#)
54. Djoussé, L.; Biggs, M.L.; Lemaître, R.N.; King, L.B.; Song, X.; Ix, J.H.; Mukamal, K.J.; Siscovick, D.S.; Mozaffarian, D. Plasma omega-3 fatty acids and incident diabetes in older adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **2011**, *94*, 527–533. [\[CrossRef\]](#)
55. Koska, J.; Ozias, M.K.; Deer, J.; Kurtz, J.; Salbe, A.D.; Harman, S.M.; Reaven, P.D. A human model of dietary saturated fatty acid induced insulin resistance. *Metabolism* **2016**, *65*, 1621–1628. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Kennedy, A.; Martinez, K.; Chuang, C.-C.; LaPoint, K.; McIntosh, M. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. *J. Nutr.* **2008**, *139*, 1–4. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

57. van der Kolk, B.W.; Goossens, G.H.; Jocken, J.W.; Blaak, E.E. Altered skeletal muscle fatty acid handling is associated with the degree of insulin resistance in overweight and obese humans. *Diabetologia* **2016**, *59*, 2686–2696. [CrossRef]
58. Gustavo Vazquez-Jimenez, J.; Chavez-Reyes, J.; Romero-Garcia, T.; Zarain-Herzberg, A.; Valdes-Flores, J.; Manuel Galindo-Rosales, J.; Rueda, A.; Guerrero-Hernandez, A.; Alberto Olivares-Reyes, J. Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression. *Cell. Signal.* **2016**, *28*, 53–59. [CrossRef]
59. Forouhi, N.G.; Imamura, F.; Sharp, S.J.; Koulman, A.; Schulze, M.B.; Zheng, J.; Ye, Z.; Stuijs, I.; Guevara, M.; Huerta, J.M.; et al. Association of Plasma Phospholipid n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids with Type 2 Diabetes: The EPIC-InterAct Case-Cohort Study. *PLoS Med.* **2016**, *13*, e1002094. [CrossRef] [PubMed]
60. Qureshi, W.; Santanen, I.D.; Hanley, A.J.; Watkins, S.M.; Lorenzo, C.; Wagenknecht, L.E. Risk of diabetes associated with fatty acids in the de novo lipogenesis pathway is independent of insulin sensitivity and response: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2019**, *7*, e000691. [CrossRef]
61. Fillmore, N.; Mori, J.; Lopaschuk, G.D. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2080–2090. [CrossRef] [PubMed]
62. Gall, W.E.; Beebe, K.; Lawton, K.A.; Adam, K.P.; Mitchell, M.W.; Nakhle, P.J.; Ryals, J.A.; Milburn, M.V.; Nannipieri, M.; Camastra, S.; et al. alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10883. [CrossRef]
63. Cobb, J.; Eckhart, A.; Motsinger-Reif, A.; Carr, B.; Groop, L.; Ferrannini, E. alpha-Hydroxybutyric Acid Is a Selective Metabolite Biomarker of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care* **2016**, *39*, dc152752. [CrossRef] [PubMed]
64. Varvel, S.A.; Pottala, J.V.; Thielson, D.L.; Caffrey, R.; Dall, T.; Sasinowski, M.; McConnell, J.P.; Warnick, G.R.; Voros, S.; Graham, T.E. Serum alpha-hydroxybutyrate (alpha-HB) predicts elevated 1h glucose levels and early-phase beta-cell dysfunction during OGTT. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2014**, *2*, e000038. [CrossRef]
65. Ferrannini, E.; Natali, A.; Camastra, S.; Nannipieri, M.; Mari, A.; Adam, K.P.; Milburn, M.V.; Kastenmüller, G.; Adamski, J.; Tuomi, T.; et al. Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes* **2013**, *62*, 1730–1737. [CrossRef] [PubMed]
66. Zhang, S.; Zeng, X.; Ren, M.; Mao, X.; Qiao, S. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *8*, 10. [CrossRef] [PubMed]
67. Fikri, A.M.; Smyth, R.; Kumar, V.; Al-Abadla, Z.; Abusnana, S.; Munday, M.R. Pre-diagnostic biomarkers of type 2 diabetes identified in the UAE's obese national population using targeted metabolomics. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 17616. [CrossRef] [PubMed]
68. Wang, T.J.; Larson, M.G.; Vasan, R.S.; Cheng, S.; Rhee, E.P.; McCabe, E.; Lewis, G.D.; Fox, C.S.; Jacques, P.F.; Fernandez, C.; et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 448–453. [CrossRef]
69. Zhang, X.; Wang, Y.; Hao, F.; Zhou, X.; Han, X.; Tang, H.; Ji, L. Human Serum Metabonomic Analysis Reveals Progression Axes for Glucose Intolerance and Insulin Resistance States. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 5188–5195. [CrossRef]
70. Zhou, Y.; Qu, L.; Xiao, Q.; Wang, Y.; Meng, X.; Xu, R.; Wang, S.; Na, R. Obesity and diabetes related plasma amino acid alterations. *Clin. Biochem.* **2013**, *46*, 1447–1452. [CrossRef]
71. Thalacker-Mercer, A.E.; Ingram, K.H.; Guo, F.; Ilkayeva, O.; Newgard, C.B.; Garvey, W.T. BMI, RQ, diabetes, and sex affect the relationships between amino acids and clamp measures of insulin action in humans. *Diabetes* **2014**, *63*, 791–800. [CrossRef] [PubMed]
72. Badoud, F.; Lam, K.P.; Perreault, M.; Zulyniak, M.A.; Britz-McKibbin, P.; Mutch, D.M. Metabolomics Reveals Metabolically Healthy and Unhealthy Obese Individuals Differ in their Response to a Caloric Challenge. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134613. [CrossRef]
73. Holček, M. Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr. Metab.* **2018**, *15*, 33. [CrossRef]
74. Feng, R.N.; Niu, Y.C.; Sun, X.W.; Li, Q.; Zhao, C.; Wang, C.; Guo, F.C.; Sun, C.H.; Li, Y. Histidine supplementation improves insulin resistance through suppressed inflammation in obese women with the metabolic syndrome: A randomised controlled trial. *Diabetologia* **2013**, *56*, 985–994. [CrossRef]
75. Harita, N.; Hayashi, T.; Sato, K.K.; Nakamura, Y.; Yoneda, T.; Endo, G.; Kambe, H. Lower Serum Creatinine Is a New Risk Factor of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32*, 424. [CrossRef]
76. Takesachi, M.; Imano, H.; Muraki, I.; Shimizu, Y.; Hayama-Terada, M.; Kitamura, A.; Okada, T.; Kiyama, M.; Iso, H. Serum creatinine levels and risk of incident type 2 diabetes mellitus or dysglycemia in middle-aged Japanese men: A retrospective cohort study. *BMJ Open Diabetes Res. Care* **2018**, *6*, e000492. [CrossRef]
77. Chutani, A.; Pande, S. Correlation of serum creatinine and urea with glycemic index and duration of diabetes in Type 1 and Type 2 diabetes mellitus: A comparative study. *Natl. J. Physiol. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *7*, 914–919. [CrossRef]
78. Carpené, C.; Schaak, S.; Guilbeau-Frugier, C.; Mercader, J.; Miallet-Perez, J. High intake of dietary tyramine does not deteriorate glucose handling and does not cause adverse cardiovascular effects in mice. *J. Physiol. Biochem.* **2016**, *72*, 539–553. [CrossRef]
79. Visentin, V.; Manj, P.; Bour, S.; Subra, C.; Prévot, D.; Morin, N.; Valet, P.; Monje, M.C.; Nepveu, F.; Carpené, C. Effect of prolonged treatment with tyramine on glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Physiol. Biochem.* **2003**, *59*, 225–232. [CrossRef]

9.3. Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes



OPEN ACCESS

EDITED BY
Raúl González-González,
Universidad de Cádiz, Spain

REVIEWED BY
Alessia Ferrarini,
Spanish National Centre for
Cardiovascular Research, Spain
Szymon Maciejak,
Medical University of Gdansk, Poland

*CORRESPONDENCE
Michał Ciborowski,
michal.ciborowski@umb.edu.pl

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Metabolomics,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Biosciences

RECEIVED 30 June 2022
ACCEPTED 05 September 2022
PUBLISHED 23 September 2022

CITATION
Mojsak P, Maliszewska K,
Klimaszewska P, Miniewska K,
Godzien J, Sieminska J, Kretowski A and
Ciborowski M (2022), Optimization of a
GC–MS method for the profiling of
microbiota–dependent metabolites in
blood samples: An application to type
2 diabetes and prediabetes,
Front. Mol. Biosci. 9:982672.
doi: 10.3389/fmobi.2022.982672

COPYRIGHT
© 2022 Mojsak, Maliszewska,
Klimaszewska, Miniewska, Godzien,
Sieminska, Kretowski and Ciborowski.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes

Patrycja Mojsak¹, Katarzyna Maliszewska²,
Paulina Klimaszewska¹, Katarzyna Miniewska¹,
Joanna Godzien¹, Julia Sieminska¹, Adam Kretowski^{1,2} and
Michał Ciborowski^{1*}

¹Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ²Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Changes in serum or plasma metabolome may reflect gut microbiota dysbiosis, which is also known to occur in patients with prediabetes and type 2 diabetes (T2DM). Thus, developing a robust method for the analysis of microbiota–dependent metabolites (MDMs) is an important issue. Gas chromatography with mass spectrometry (GC–MS) is a powerful approach enabling detection of a wide range of MDMs in biofluid samples with good repeatability and reproducibility, but requires selection of a suitable solvents and conditions. For this reason, we conducted for the first time the study in which, we demonstrated an optimisation of samples preparation steps for the measurement of 75 MDMs in two matrices. Different solvents or mixtures of solvents for MDMs extraction, various concentrations and volumes of derivatizing reagents as well as temperature programs at methoxymation and silylation step, were tested. The stability, repeatability and reproducibility of the 75 MDMs measurement were assessed by determining the relative standard deviation (RSD). Finally, we used the developed method to analyse serum samples from 18 prediabetic (PreDiab group) and 24 T2DM patients (T2DM group) from our 1000PLUS cohort. The study groups were homogeneous and did not differ in age and body mass index. To select statistically significant metabolites, T2DM vs. PreDiab comparison was performed using multivariate statistics. Our experiment revealed changes in 18 MDMs belonging to different classes of compounds, and seven of them, based on the SVM classification model, were selected as a panel of potential biomarkers, able to distinguish between patients with T2DM and prediabetes.

KEYWORDS

GC–MS, optimization, gut microbiota, T2DM, plasma, serum

Introduction

The worldwide prevalence of type 2 diabetes mellitus (T2DM) has risen over the past two decades (Sobczak et al., 2019) and currently, this metabolic disease is a serious public health problem (Fikri et al., 2020). There is an increasing evidence that alterations in gut microbiota (GM) (Lin et al., 2017; Moon et al., 2018; Chen et al., 2019), apart from genetic (Mojsak et al., 2021) and life style factors (Ericson et al., 2018), are important for the development of metabolic diseases. Changes in the gut microbiome composition lead to an imbalanced gastrointestinal habitat which promotes abnormal production of metabolites, inflammatory status, glucose metabolism alteration and even insulin resistance (IR) (Tanase et al., 2020). Particularly, various microbiota-dependent metabolites (MDMs) (Dian et al., 2021), such as short-chain fatty acids, branched-chain fatty acids, amino acids (AAs), branched-chain amino acids (BCAAs), bile acids, tryptophan-derived metabolites, and others (Mojsak et al., 2022; Zhou et al., 2022) have been reported to be closely associated with IR (Menni et al., 2022), prediabetes (Dowdly et al., 2017; Gar et al., 2019) and T2DM (Sobczak et al., 2019; Fikri et al., 2020; Gu et al., 2020; Mojsak et al., 2021).

Metabolomics is a high-throughput approach enabling a global analysis of metabolites in biological systems. Untargeted metabolomics has led to many discoveries of microbiota-dependent metabolic pathways and metabolites linked to host diseases (Moon et al., 2018; Tanase et al., 2020; Mojsak et al., 2022). Consequently, determination of MDMs can be essential for the early diagnosis of T2DM (Mojsak et al., 2022). Among mass spectrometry (MS)-based analytical platforms, gas chromatography (GC-MS) and liquid chromatography (LC-MS) are the most popular analytical techniques used for the separation of MDMs (Chen et al., 2019; Eylem et al., 2022). Compared to LC, GC has a considerably better chromatographic resolution. It is also a highly reproducible and sensitive analytical technique, able to detect a wide variety of MDMs such as AAs, fatty acids (FAs), carbohydrates (CARBs) and sterols related to microbiota and T2DM, that would otherwise need several separations in LC-MS (Hussey, 2020). Additionally, reproducible molecular fragmentation patterns of GC-MS make it one of the most reliable tools for exploring metabolites (Papadimitropoulos et al., 2018). Considering all above-mentioned reasons, GC-MS was used in this study.

MDMs are found in a variety of biological samples such as feces, urine, serum or plasma (Chen et al., 2019). According to Chen et al. (2019), plasma and serum are non-invasively obtained biomarkers and analysis of their metabolome may reflect the changes in the metabolome of the whole organism (Kiseleva et al., 2021), including changes in MDMs composition (Varnocchi et al., 2016). Additionally, both of these blood-derived samples have been used in many GC-MS metabolomics studies related to the development of T2DM

(Lin et al., 2017; Chen et al., 2019). Visconti et al. (2019), proved that many species of GM showed association with blood metabolites, suggesting important effects on host systemic metabolism.

Although GC-MS is a powerful tool to detect MDMs, GC-MS profiling of such metabolites in biofluid samples constitutes an analytical challenge (Mojsak et al., 2022). In order to extend the coverage of MDMs measured with GC-MS, selection of a suitable solvent for the protein precipitation or extraction (He et al., 2021) and a transformation of analysed metabolites into more volatile forms through the derivatisation process, is required (Moldovanu and David, 2018). Many solvents like ACN (Mojsak et al., 2021), MeOH (Trygg et al., 2005) or mixtures of solvents such as ACN:isoProp:H₂O (v/v/v; 3:3:2) (Fiehn, 2016; Kiseleva et al., 2021); MeOH:H₂O (v/v; 9:1) (Mahn et al., 2016); MeOH:isoProp:H₂O (v/v/v; 3:3:2) (Kiseleva et al., 2021) or MeOH:EtOH (v/v; 1:1) (Stenemetz et al., 2021) are commonly used in metabolomics studies. A choice of proper solvent(s) is important, in the study of Fiehn (2016) it was confirmed that the use of hydrophilic, lipophilic and medium-polarity solvents demonstrated high analytical precision and comprehensiveness of the extracted metabolome. There are a few studies comparing the utility of different solvents, however, the variety of investigated mixtures was not that wide (Trygg et al., 2005; He et al., 2020; Eylem et al., 2022). To the best of our knowledge, there is a lack of methodological articles comparing the performance of these solvents and their mixtures for the preparation of serum or plasma samples for the GC-MS analysis of 75 MDMs.

Out of several available derivatisation methods (Moldovanu and David, 2018), methoximation (MeOx) followed by silylation (SIL) is the most commonly used (Peltche-Gunther et al., 2021). According to Fiehn (2016) and Eylem et al. (2022), prior to SIL, MeOx is necessary to protect carbonyl groups of aldehydes and ketones in reducing sugars from the cyclization process, as well as to stabilize α -keto acids against decarboxylation (Zarate et al., 2018). The degree of completion of this process is associated with the concentration and volume of methoxamine HCl in pyridine, as well as incubation time and temperature used during the derivatisation process (Bekete et al., 2014; Moros et al., 2017). The most frequently reported incubation time and temperature for MeOx of biofluid metabolites are 30–90 min at 37–70°C or 16 h at room temperature (RT) (Fiehn, 2016; Beale et al., 2018), whereas the volumes of methoxamine HCl in pyridine used are between 10 and 40 μ l (with the concentration range of 15–40 mg/ml) (Miyagawa and Bamba, 2019). As for the MeOX process, the main factors determining the outcomes of the GC-MS analysis are the volume of SIL reagent as well as the incubation time and temperature (Eylem et al., 2022).

To the best of our knowledge no thoroughly optimized method, which includes the impact of popular solvents and derivatisation conditions for profiling of 75 MDMs present in

human plasma and serum has been presented so far. For this reason, we performed a side-by-side comparison of different serum and plasma samples preparation procedures composed of solvent-based simultaneous protein precipitations with metabolites extraction and two-step derivatization, MeOX followed by SIL focusing on MDMs. Based on the signal intensity and its relative standard deviation (RSD), the methodology for sample preparation and analysis was optimized to obtain the best possible method for the analysis of MDMs. Metabolites were classified as MDMs based on the scientific reports (Lin et al., 2017; Org et al., 2017; Martin et al., 2019; Visconti et al., 2019; Wan et al., 2020; Gójska and Cahova, 2021; Tan et al., 2021) and Human Metabolome Database (HMDB) (HMDB, 2020) (<https://www.hmdb.ca>, accessed, on 29 April 2022). Finally, we used the developed biofluids preparation method to analyse serum samples of patients with prediabetes and T2DM.

Material and methods

Reagents

The following reagents and standards were used: MilliQ[®] water (Millipore, Billerica, MA, United States), heptane (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), pyridine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), O-methoxyamine HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and MSTFA (N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide) with 1% TMCS (Trimethylchlorosilane) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, United States), 4-nitrobenzoic acid (4-NBA) and stearic acid methyl ester (C18:0 methyl ester) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were used as internal standards (ISs) for GC-MS. Individual stock solutions of 4-NBA (IS1) were prepared at the concentration of 25 ppm, then stored at -4°C , whereas methyl stearate (IS2) were prepared at the concentration of 20 ppm, then stored at -20°C . Two standards mixtures for GC-MS, one containing grain fatty acid methyl esters (FAME) (C8:0–C22:1, n9) and another standard mix with mixture of n-alkanes (C8–C40) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, United States).

Optimization of sample preparation for GC-MS analysis

At the optimization stage, plasma and serum samples, as well as all tested combination of parameters, were analysed in separate sequences. Three replicates were used for each optimized condition. In the batches tested samples were analysed together with quality control samples (QCs) and blank samples. Firstly, 50 μl of pooled human plasma or serum were extracted with 150 μl of ACN, ACN:isoPropH₂O (v/v; 3:3:2),

MeOH:H₂O (v/v; 9:1) MeOH:isoPropH₂O (v/v; 3:3:2) and MeOH:EtOH (v/v; 1:1) in order to evaluate the performance of different extraction solvents. Subsequently, a two-step derivatization: 1) MeOX with 20 μl O-methoxyamine HCl in pyridine (15 mg/ml, for 30 min at 37°C) followed by 2) SIL with 20 μl MSTFA containing 1% TMCS (for 30 min at 37°C) was performed.

To optimize the protocol for two-step derivatization process, firstly, we tested different concentrations (10–40 mg/ml, in the volume of 10 μl) and then volumes (10–50 μl) of methoxyamine HCl in pyridine, adjusted to 120 μl with heptane containing IS2. After that, we examined the effects of derivatization temperature and time of the reaction. For MeOX, the derivatization temperature was set to 37°C or 70°C , and the derivatization time was set to 30 min, 60 min or 16 h at RT [30 min at 37°C (P1), 1 h at 70°C (P2), 16 h at RT (P3) and 1 h at 70°C followed by 16 h at RT (P4)]. In the first part of the experiment, SIL conditions were fixed at 30 min and 37°C . Then, when SIL step was being optimized, the derivatization temperature of 37 and 70°C (for 30 and 60 min each) was evaluated. Finally, the optimized method was applied to the analysis of the clinical samples.

Clinical samples preparation

Serum (50 μl) was deproteinized with 150 μl (MeOH:H₂O, 9:1, v/v) (1:3, -20°C) containing IS1, followed by two-step derivatization: 1) MeOX with O-methoxyamine HCl in pyridine (30 mg/ml, RT, 16 h) followed by 2) SIL with MSTFA containing 1% TMCS (70°C , 1 h). Subsequently, sample preparation for QC samples was performed as described above for clinical samples. Preparation of a blank was conducted following the same procedure, but using only solvents. Six QC samples were injected to equilibrate the analytical platform before clinical samples were analysed to ensure that reproducible data was acquired. In each batch, FAMES, mixes of n-alkanes, blank and six QC samples were injected at the beginning of the batch, and one QC sample were injected after every eight sample injections. At the end of the batch, one QC sample and blank were injected again.

Metabolic fingerprinting was performed using GC system (series 7890B) equipped with an 7693A autosampler and a Mass Selective Detector 7000D (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, United States). One μl of the derivatized serum sample with ISs was injected into a DB-5MS capillary GC column (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) using helium as a carrier gas at a constant gas flow of 1.0 ml/min. The injector temperature was set to 250°C and the split ratio to 1:10. The temperature gradient program started at 60°C , was held for 1 min, followed by a subsequent increase in temperature to 320°C at a rate of $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The GC-MS transfer line, filament source and the quadrupole temperature were set to 280, 230, and 150°C ,

respectively. The electron ionisation source was set to 70 eV, and the mass spectrometer was operated in the full scan mode, applying a mass range from m/z 50 to 600 at a scan rate of 1.38 scan/s.

Untargeted GC-MS data analysis

The deconvolution and identification were performed using Mass Hunter Quantitative Unknowns Analysis software (B.07.00, Agilent), alignment with Mass Profiler Professional software (version 13.0, Agilent) and peak integration using Mass Hunter Quantitative Analysis software (version B.07.00, Agilent). The identification was performed mainly based on the accurate mass and product ion spectrum matching against in-house library of 100 authentic standards as well as Fiehn's and NIST 14 libraries. Prior to the statistical analysis, clinical sample areas were normalised by IS abundance in order to minimise the response variability coming from the instrument. Finally, data were filtered based on the coefficient of signal variation (CV) in QC samples, considering values lower than 30% as acceptable.

In order to perform the differential analysis of the metabolomics data, the variables were then filtered as proposed by Godwin et al. (2015). Missing values were replaced by *k*-means nearest neighbour (Armitage et al., 2015) using the in-house built scripts for MATLAB 7.10 R2010a (MathWorks Inc., Natick, MA, United States).

Sample collection

For the first step of optimization, plasma and serum samples were collected from the same individuals. For plasma samples, blood was collected to S-Monovette K3EDTA tubes (SARSTEDT, Germany) and plasma was obtained after centrifugation at $15,400 \times g$ for 10 min at 4°C. For serum samples, blood was collected to S-Monovette tubes containing clot activator and tubes were stored in the vertical position at RT for 60 min to allow the formation of a clot. Afterwards, tubes were centrifuged in a horizontal rotor (swing-out head) for 10 min at $1,300 \times g$ at RT. After centrifugation, serum or plasma fraction was transferred to Eppendorf tubes and stored at -80°C until the day of analysis. All the procedures were approved by the Local Ethics Committee of the Medical University of Białystok (Permit No. R-1-002/193/2019). All donors signed informed consent.

For this experiment, 24 individuals with T2DM and 18 with prediabetes were selected from the 1000PLUS cohort, gathered between 2014 and 2017 by the Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Poland (Maliszewska et al., 2019). Ethical approval for the study was obtained from the local Ethics Committee at

the Medical University of Białystok, Poland (R-1-002/290/2008/2009, R-1-002/35/2014, and APK.002.239.2022). The presence of T2DM based on the dysglycemia diagnostic criteria of the Diabetes Poland was confirmed or excluded using glucose concentration measurements during an oral glucose tolerance test (OGTT) at 0 and/or 120 min (Diabetology, 2018). Table 1 presents the median and the range of the anthropometric measurements and biochemical parameters. Presented *p*-value was calculated using the Mann-Whitney *U*-test.

Repeatability, reproducibility and stability of 75 MDM measurements

In order to identify the optimal conditions the following criteria were taken into account 1) repeatability, 2) the peak intensities of individual metabolites 3) the total intensity (TI) of all metabolites. Finally, reproducibility and stability were determined. We used the relative standard deviation (RSD) (defined as the [(standard deviation)/(mean) \times 100]) of metabolite abundance for evaluation of the consistency of metabolites measurement using a GC-MS platform. A commonly accepted maximum tolerance of RSD for GC-MS in metabolomics studies is 30% (Krook et al., 2011). The stability, repeatability and reproducibility of the analysis of 75 MDMs measurement were assessed by calculating RSD of the GC-peak area. To test the repeatability, 50 replicates ($n = 50$) of human plasma and serum were analysed using optimal parameters. To test the reproducibility, 10 quality control samples ($n = 10$) (plasma or serum samples) were analysed over three batches ($s = 3$) within the scope of a biological study, i.e., realistic conditions (Supplementary Table S2). To test the stability, the plasma or serum samples were re-injected after 8, 24, 36, and 48 h (Supplementary Table S3).

Statistical analysis

To select statistically significant metabolites between the PreDiab and T2DM groups multivariate statistics using an orthogonal projections to latent structures discriminant analysis (OPLS-DA) was used. Statistically significant metabolites were chosen based on the predictive loading value [*p* (corr)] and variable importance in the projection (VIP) value. Validation of the OPLS-DA models was performed by cross-validation using the leave 1/3 out approach as described previously (Ciborowski et al., 2012). Multivariate statistics was performed in SIMCA-P + 13.0.3.0 (Umetrics, Umea, Sweden). For statistically significant metabolites, the receiver operating characteristic (ROC) analysis was conducted in MetaboAnalyst 5.0.

TABLE 1 Characteristics of the studied group (median and range).

Clinical parameters	PreDiab N = 18	T2DM N = 24	P-value
Age (years)	36.39 (17.36–70.96)	62.5 (41.36–89.20)	0.146
Female/Male	8/10	13/11	
BMI (kg/m ²)	33.55 (23.66–47.00)	32.51 (21.23–49.30)	0.219
Fasting glucose 0 min [mg/dL]	130 (101–123)	131 (138–171)	0.0018
Glucose 120 min [mg/dL]	126 (73–190)	206 (100–229)	0.0003
Insulin [μ U/ml]	126 (72–190)	16.35 (4.73–56.81)	0.880
HbA _{1c} [%]	5.8 (5.00–6.40)	6.35 (5.3–7.7)	0.0057
LDL cholesterol [mg/dL]	185.1 (33.6–221.6)	93.8 (60.4–213.40)	0.348
Total cholesterol [mg/dL]	181 (123–284)	173.5 (136–310)	0.723
HDL cholesterol [mg/dL]	49.70 (29–125)	52 (36–88)	0.319
Triglyceride [mg/dL]	187 (33–229)	126.5 (44–232)	0.875
HOMA-IR	4.30 (2.80–15.40)	5.20 (3.10–20.00)	0.479
HOMA- β	112.00 (71.00–216.00)	83.00 (19.00–277.00)	0.112

BMI, body mass index; HbA_{1c}, glycated hemoglobin A1c; LDL cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol; HDL cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model assessment for insulin resistance; HOMA- β , homeostasis model assessment for beta (β) cell function; p-value—difference between control and T2DM based on the Mann-Whitney U test; PreDiab—subjects with prediabetes; T2DM—subjects with T2DM.

Results

Optimization step

Initially, based on the literature review (Lin et al., 2017; Ong et al., 2017; Martin et al., 2019; Visconti et al., 2019; Wan et al., 2020; Gojda and Cahova, 2021; Tan et al., 2021) and information provided in HMDB (www.hmdb.ca, access on 20th April 2022) we prepared a database of MDMs and metabolites involved in pathways impacted by GM (Supplementary Table S1). Then, we performed GC-MS analyses of pooled plasma or serum samples to check which MDMs are present in these two matrices. As a result, we observed 335 and 348 raw peaks in plasma and serum, respectively. After data pretreatment (deconvolution, alignment, data normalization and filtering), 102 entities were obtained for both matrices, 85 metabolites could be identified taking into account several derivatives from one metabolite for some AAs and CARBs. Finally, we chose 75 MDMs, representing different analytical classes, with RSD below 30% in both plasma and serum samples (Supplementary Table S1).

Selection of extraction solvent

To select the best solvent for protein precipitation and extraction of plasma and serum samples, four widely used mixtures of solvents: AcN:isoProp:H₂O (v/v/v; 3:3:2) MeOH:H₂O (v/v; 9:1); MeOH:isoProp:H₂O (v/v/v; 3:3:2), MeOH:EtOH (v/v; 1:1) (hereinafter referred to as solvents) and ACN alone were tested. In the Figures 1, 2 we present repeatability and intensity (A—plasma, B—serum) obtained for MDMs

measurement after the extraction with five combinations of solvents in both matrices. MeOH:H₂O mixture (v/v; 9:1) and MeOH:isoProp:H₂O mixture (v/v/v; 3:3:2) were selected as the best extraction solvents for both types of samples. The intensity of the signals for these two solvents were comparable but the extraction using MeOH:H₂O mixture (v/v; 9:1) had better repeatability, and for this reason this solvent was chosen for the next step of optimization. In plasma samples extracted with MeOH:H₂O mixture (v/v; 9:1), 21 MDMs had RSD below 20% and 51 below 10%. However, the RSD of 40 and 23 of all detected MDMs in serum were in the range of 0.5%–8.5% and 10.1%–19.7%, respectively. Additionally, the metabolite signals from ACN, MeOH:isoProp:H₂O (v/v/v; 3:3:2) and MeOH:EtOH (v/v; 1:1) in both matrices had a wider range of RSD and a larger number of MDMs in the RSD range of 30%–40% and above 40% than those obtained with other extraction solvents.

In the next step, we compared the impact of different concentrations and volumes of MeOx on the derivatization process (see Figure 3). For MeOx, a solution of O-methoxyamine HCl in pyridine was employed. First, we compared six commonly used concentrations of O-methoxyamine HCl in pyridine (15, 20, 25, 30, 35, and 40 mg/ml, in the volume of 10 μ l for both matrices, adjusted to 120 μ l with heptane containing IS2). In plasma samples, the intensity of the majority of detected metabolites (46 from 75) increased with the elevated concentration of O-methoxyamine HCl in pyridine up to 30 mg/ml, with some exception for AAs (alanine (Ala), isoleucine (isoLeu), serine, methionine (Met), cysteine (Cys), asparagine, glutamine (Glu) and tyrosine). The intensity of this metabolites decreased when the concentration of O-methoxyamine HCl was higher than 30 mg/ml. In serum samples we observed the highest intensity at the MeOx

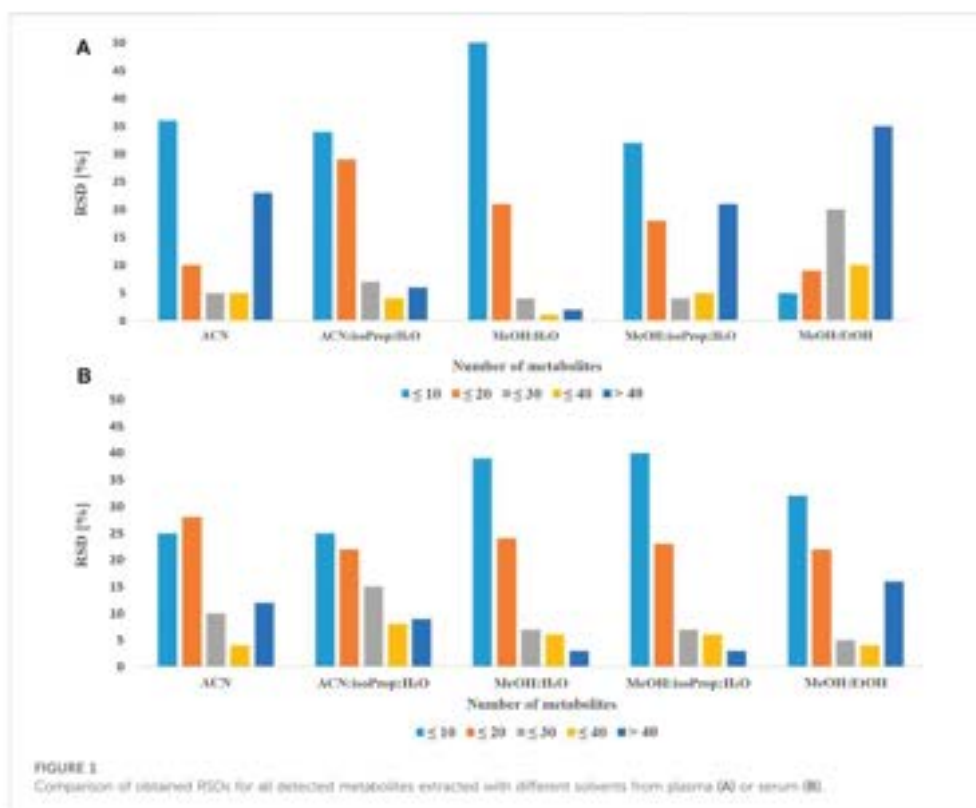
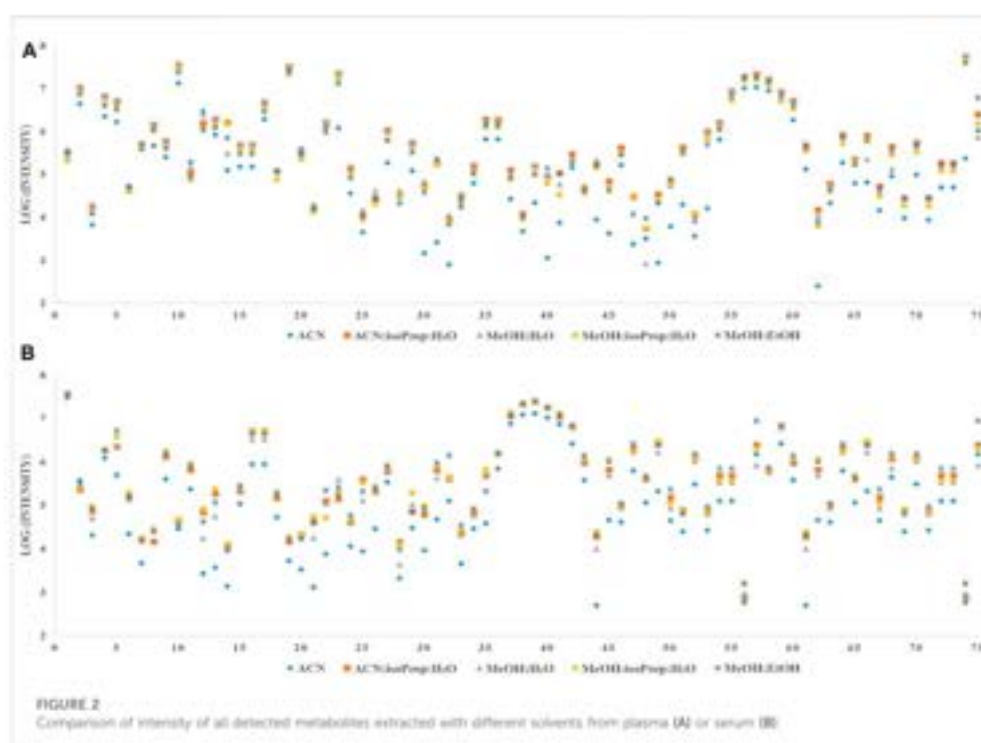


FIGURE 1
Comparison of obtained RSDs for all detected metabolites extracted with different solvents from plasma (A) or serum (B).

reagent concentration of 30 mg/ml, higher concentrations resulted in similar intensity of metabolites with exception for creatinine (Cre) and AAs (Ala, phenylalanine, Met and threonine (Thre)). The intensity of these AAs decreased when the concentration of MeOx increased. TI of tested MDMs was the highest at the concentration of 30 mg/ml in serum samples. In plasma samples, the concentration of 25 mg/ml yields slightly higher TI of MDMs than 30 mg/ml but for the optimization, we have chosen universal concentration of 30 mg/ml of O-methoxyamine HCl in pyridine for two tested matrices. For chosen MeOx concentration the lowest median RSDs of 9.2% and 6.4% (Table 2) was indicated for plasma and serum, respectively. For the selected concentrations, RSD below 20% was found for 58 plasma and 71 serum metabolites.

Subsequently, we tested five different MeOx volumes (10 μ l, 20 μ l, 30 μ l, 40 μ l, and 50 μ l, all at 30 mg MeOx per mL pyridine concentration) (see Table 3) with the same volume of reagent for SIL (MSTFA with 1% TMCS), adjusted to 120 μ l with heptane containing IS2. The TI of

peaks area increased with the larger volume of tested reagent (Figure 3). We observed the highest TI for 30 and 50 μ l for serum and plasma, respectively. The best repeatability ($\leq 20\%$ of RSD) for the majority of detected MDMs was obtained for the volume of 30 μ l of the O-methoxyamine HCl in pyridine in both tested matrices. In plasma samples, the median RSD was much higher for 10 and 20 μ l as compared to other values (32.5% for 10 μ l, 29.2% for 20 μ l, and 10.1–12.6% for 30–50 μ l). In serum samples, the median RSDs for all tested volumes were in the range of 5.0%–11.1%. Additionally, it was observed that lysine (Lys) and ascorbic acid were not detected while using the volume of 10 and 20 μ l MeOx in both matrices, while 5-hydroxy-L-tryptophan was only detected in plasma samples, regardless the volume of MeOx. Due to the fact that reproducibility for volumes of 30 and 40 μ l in serum was similar (RSDs for 68 and 65 metabolites $\leq 20\%$ (RSD); median RSD 7.9 and 7.8%, respectively), the TI of all MDMs was the highest for 30 μ l, for the next step of the optimization we chosen this volume of MeOx for both matrices.



In the next step we compared the effect of different conditions, i.e. time and temperature for MeOx process. We tested four common programs: 30 min at 37°C (P1), 1 h at 70°C (P2), 16 h at RT (P3) and 1 h at 70°C followed by 16 h at RT (P4). Obtained results are presented in Tables 4, 5. Repeatability for all metabolites was similar for all tested conditions in plasma samples, the RSDs for more than 70 MDMs were below 20%, while median RSD varied from 4.3 to 7.6%. In serum samples, we observed more differences in RSD values for tested conditions. The median RSDs were in the range from 9.4 to 18.5% for all tested programs. The RSD values were above 20% for more than 30 MDMs when the results for all tested programs were compared with an exception for MeOx process conducted for the program P3. The RSDs values were above 30% for 10 metabolites and the median RSD for this condition was the lowest (9.4%). We observed differences in the intensities of the metabolites in tested matrices. The highest intensity for the majority of detected MDMs (53 from 75) was observed when program P3 was used in both matrices, the results obtained for program P2 were similar. In plasma samples, the lowest intensity was observed for more than 50 MDMs, whereas in serum samples for 48 MDMs, when the program P1 was used. In the case of valine

(Val) and leucine (Leu) derivatization, two chromatographic peaks were observed in plasma, namely Val 1TMS and Val 2TMS, Leu 1TMS, and 2 TMS. The peak areas of mentioned metabolites were found to increase with longer reaction time. Similarly, derivatization of glycine (Gly) was confirmed by the presence of two chromatographic peaks (Gly 2TMS and 3TMS). In this case, the peak area of Gly 3TMS was elevated with the increasing reaction time and temperature from 37°C, 30 min to 70°C, 1 h and finally 70°C 1h, 16 h (RT). However, in case of acetoacetate, which was confirmed by the presence of acetoacetate 2TMS and 3TMS, the intensity of 3TMS derivative decreased with longer reaction time. In serum samples we observed the same relation for AAs (Val, isoLeu, proline, Lys) and two CARBs, i.e. mannose and glucose. The intensity of the 3TMS derivative of these metabolites increased when temperature and time increased. We also observed that disaccharides were incompletely methoximated at 37°C for 30 min (P1), as we noticed significant peak broadening caused by multi peaks, which was not observed at 70°C.

As the last optimization parameter, we tested the impact of different incubation temperatures and time of SIL process. Our first observation (based on Figure 3) was that the TI of all tested

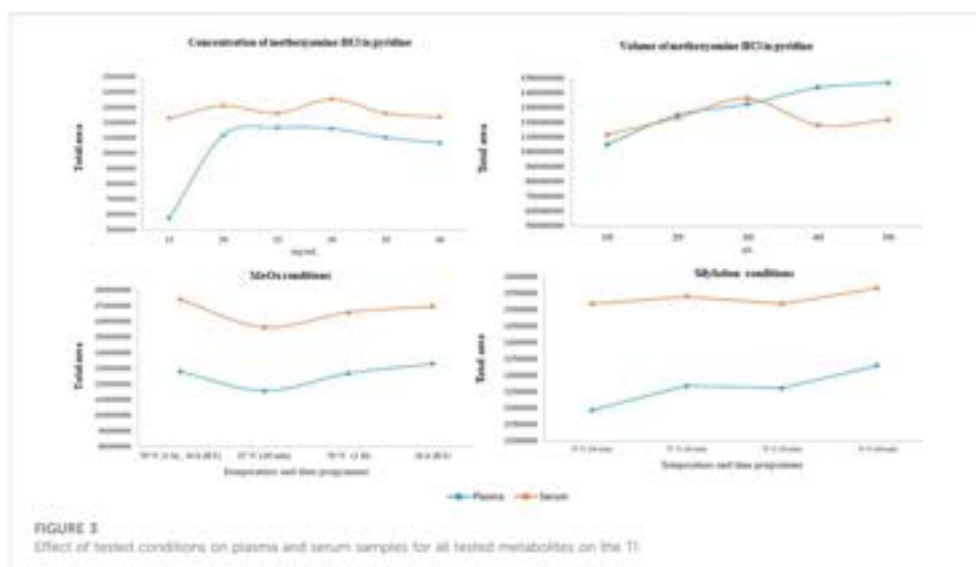


FIGURE 3
Effect of tested conditions on plasma and serum samples for all tested metabolites on the TI.

TABLE 2 Comparison of different concentration of the O-methoxyamine HCl in pyridine (mg/ml) based on the repeatability of 75 MDMs detected in both types of samples, in the table was presented number of MDMs with RSD for plasma/serum $\leq 50\%$ – 30% and above 30% .

RSD (%)	15	20	25	30	35	40
	mg/mL					
	Number of MDMs (plasma/serum)					
≤ 10	3/25	16/36	28/53	38/42	30/52	25/7
≤ 20	1/29	24/20	24/12	18/27	20/8	22/24
≤ 30	2/8	8/6	9/3	7/2	7/8	7/8
> 30	70/13	27/13	22/7	13/4	18/7	21/26
Median RSD (%)	84.3/54.7	38.6/13.0	16.6/6.7	7.2/6.4	14.2/9.0	14.0/25.1

metabolites was higher in serum than in plasma, whereas when we compared the TI of MDMs in different conditions for both matrices, we observed that the TI was the highest for program: 70°C for 60 min, and the TI was comparable for the program performed at 37°C for 60 min. In serum samples, the median RSD was the highest (10.2%) when 37°C at 60 min program was used, the lowest median RSD (5.7%) was achieved when 70°C for 60 min program was tested. Additionally, this program was favorable for AAs and organic acids (OgAs) for which repeatability of individual metabolites was the lowest. According to the results obtained for plasma samples we observed that a median RSDs were

similar for all programs (4.9%–5.4%). Derivatization of carboxylic acids, such as pyruvic, glyceric as well as lactic acid proceeded significantly better when 37°C for 30 min program was used, whereas derivatization of the majority of AAs and FAs proceeded significantly better when 70°C for 60 min program was used. Additionally, at this conditions we did not observed the two chromatographic peaks for Ala and Val in both matrices, what proves that derivatization was complete. Finally, due to the fact that comparable median RSDs were obtained for SIL at 70°C for 1 h for both matrices (5.3% and 5.7% for plasma and serum, respectively), we chose this program for the GC-MS analysis.

TABLE 3 Comparison of different volume of the O-methoxyamine HCl in pyridine (μ l) based on the repeatability of 75 MDMs detected in both types of samples, in the table was presented number of MDMs with RSD for plasma/serum \leq 10%–30% and above 30%.

RSD (%)	10	20	30	40	50
μ l					
Number of MDMs (plasma/serum)					
\leq 10	9/35	28/54	39/52	35/94	8/47
\leq 20	9/26	28/33	22/34	25/20	5/34
\leq 30	12/7	6/3	6/4	8/3	26/2
> 30	45/7	12/3	8/5	7/8	36/10
Median RSD (%)	32.5/11.1	29.2/5.0	12.6/7.9	10.1/7.8	30.4/8.8

Repeatability, reproducibility and stability of microbiota-dependent metabolites measurements

Including 4 h of equilibrium, the analysis of 50 replicates lasted about 35 h which is important as some of AAs are unstable after 36 h. In plasma samples, the repeatability test showed a median RSD of 12.6% ranging from 3.5% (lactic acid) to 37.3% ornithine (Orn). In serum samples, the repeatability test showed a median RSD from 4.6% (Thre) to above 50% (for 5-hydroxy-L-tryptophan, Orn and aspartic acid). In plasma samples, inter-batch median RSD across three batches was 23.3%, whereas in serum samples, inter-batch median RSD across three batches was 23.0% (Supplementary Table S2). Our method showed a good repeatability for compounds from different classes, including AAs, CARB and OrgAs. The repeatability over a long sequence (more than 50 injections at once) was in an acceptable range.

Obtained results showed that the majority of metabolites were stable even 48 h after the derivatisation with the median RSDs range between 8.8% and 12.8% in plasma and 6.6%–9.4% in serum. We observed that glutamine and benzoic acid were

already unstable after 8 h. However, some of MDMs were observed as unstable after 36 h, e.g. two AAs and FAs in plasma and four AAs in serum samples. (Supplementary Table S3).

Comparison results for both matrices

When we took into account intensity of individual metabolites (Supplementary Table S1), we observed that the intensities of 30 MDMs tested in our study were at a similar level in plasma and serum. For some metabolites we observed better reproducibility for plasma samples (see Supplementary Table S2). One third of measured metabolites had a higher intensity in plasma samples (e.g., AAs: Glu, Orn, Cre, GA, and glycine), whereas, the intensity of 22 metabolites was higher in serum samples mainly AAs (e.g., Met, aspartic acid and Cys). The total intensity of all tested metabolites was the higher in serum samples (Figure 3).

Analysis of the clinical samples

Based on the above mentioned results, both matrices were suitable for the analysis of MDMs, but the observed intensity of most MDMs was relatively higher in serum samples. Due to this fact, we chose serum samples for further analysis. After data processing, 324 metabolic signals were detected. Signal grouping and filtering processes rendered a total of 275 metabolites from which a group of 98 metabolites could be identified taking into account several derivatives from one metabolite for some AAs and CARBs. RSD value for 89 metabolites was below 30% (80 MDMs) in the QC serum samples. To find metabolites discriminating the studied groups, OPLS-DA model was built and presented in Figure 4, additionally PCA plot was presented in Figure 5.

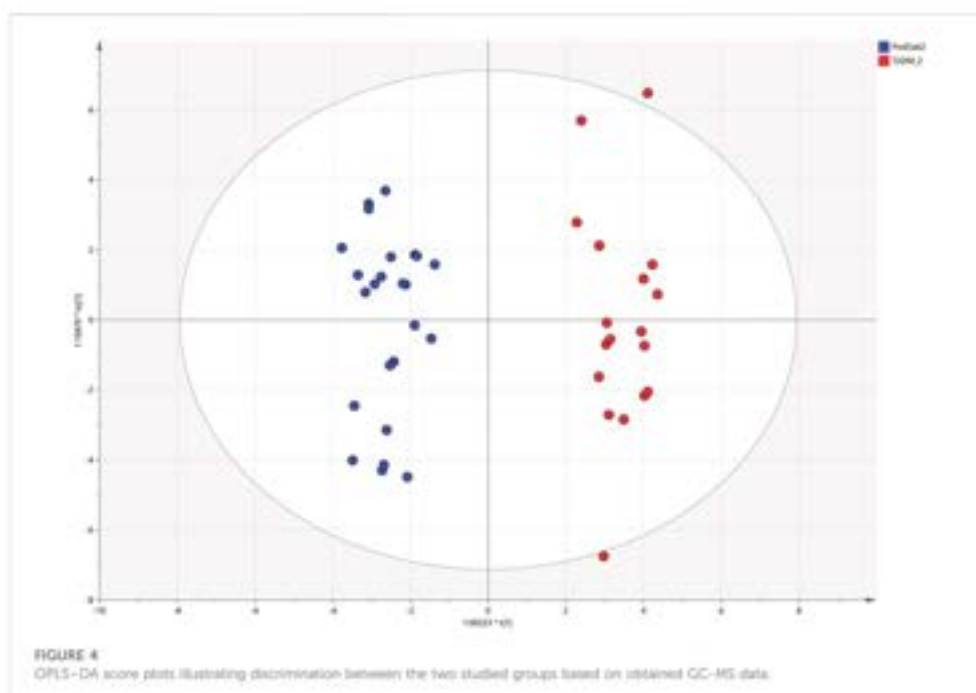
Our experiment revealed changes in 18 MDMs. These metabolites are mainly AAs, FAs, and CARBs (Table 4). In

TABLE 4 Comparison of different MeCs conditions based on the repeatability of 75 MDMs detected in both types of samples, in the table was presented number of MDMs with RSD for plasma/serum \leq 10%–30% and above 30%.

RSD (%)	37°C, 30 min (P1)	70°C, 1 h (P2)	16 h, RT (P3)	1 h 70°C, 16 h RT (P4)
Number of MDMs (plasma/serum)				
\leq 10	43/28	35/23	70/39	61/24
\leq 20	12/15	36/22	4/19	12/16
\leq 30	0/5	2/13	1/7	0/3
> 30	0/27	2/13	0/16	2/34
Median RSD (%)	4.5/13.8	7.6/18.3	4.3/9.4	5.7/17.3

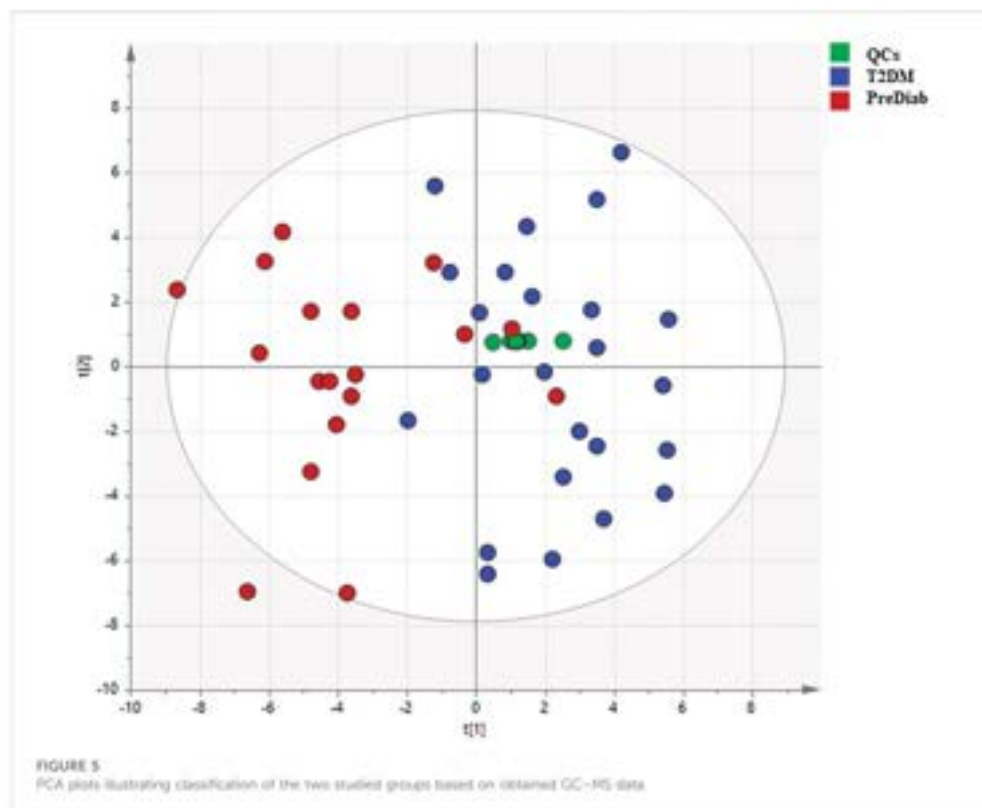
TABLE 5 Comparison of different SIL conditions based on the repeatability of 75 MDMs detected in both types of samples, in the table was presented number of MDMs with RSD for plasma/serum <10%–30% and above 30%.

RSD (%) (Plasma/serum)	37°C, 30 min	37°C, 60 min	70°C, 30 min	70°C, 60 min
<5	36/25	37/17	41/24	37/38
<10	39/21	28/22	22/23	22/14
<15	8/14	7/10	7/13	8/18
<20	5/8	5	4/9	3/3
>20	4/7	2/24	3/8	5/10
Median RSD [%]	4.87.8	5.418.2	5.07.8	5.35.7



the OPLS-DA score plots, the Prediab group and T2DM group were discriminated from each other with the model values of $R^2_{(cum)} = 0.912$ and $Q^2_{(cum)} = 0.803$. A cross-validation results using the “leave 1/3 out” approach showed that excluded samples were classified correctly in $94.5\% \pm 5.2\%$. Among the statistically significant metabolites, alpha-hydroxybutyric acid (α -HBA) (FC = 1.24), Leu (FC = 1.28), Glu (FC = 1.48), tryptophan (Trp) (FC = 1.96), Cys (2.07) and stearic acid (SA) (FC = 1.79) were increased, while Cre (FC = 0.76), glutamic acid (GA) (FC = 0.65) and Orn (FC = 0.65) decreased in T2DM compared to prediabetic patients.

Finally, in order to evaluate a potential of significant metabolites to serve as biomarkers indicating T2DM development in prediabetic patients, a multivariate receiver operating characteristic (ROC) curves were obtained. ROC analysis based on support vector machine (SVM) modeling was employed to perform the automatic selection of the best metabolites combination. ROC curves were constructed for the selected 14 MDMs (Figure 6A) using the relative metabolite contents of the experimental groups. For seven MDMs (out of 14) showing the best discriminatory power (Figure 6B) individual ROC curves were built (Figure 6C).



Discussion

Optimization of the sample preparation step

Recent studies have indicated that GM are associated with various metabolic diseases (Taniue et al., 2020). Most studies used fecal samples as they can directly reflect the human GM composition (Mojsak et al., 2022). However, an increasing number of studies (Vicentini et al., 2019) have revealed that although the concentration of GM related metabolites in circulation is far lower than that in feces, these metabolites play an important role in modulating metabolism. Therefore, it is essential to develop a comprehensive and efficient method for analyzing MDMs in biofluid samples. Based on the literature review, it was noticed that several protocols for the biofluid sample preparation for metabolomics study based on GC-MS are described (Duggan et al., 2013; Fialin, 2017; Liu et al., 2017; Ong et al., 2017; He et al., 2021; Raczkowska et al., 2021), differing in

the type of solvent or derivatization procedures used. Therefore, we chose the most frequently used solvents and variables at the derivatization stage, then we optimized them in the context of the MDMs in two matrices.

Selection of extraction solvents

Solvents are known to be one of the primary factors that affect the number, type, and abundance of endogenous metabolites detected in biological samples (He et al., 2021). The most widely used protocol for global metabolomics is protein precipitation with solvent using a plasma/serum-to-solvent ratio of 1-3 or 4. Cold solvent is added to minimize the extent of enzymatic conversion of metabolites and to improve protein precipitation (Sittler et al., 2016). Therefore, in the first step of this study, we screened the effect of five solvent variants, widely used in GC-MS-based metabolomics. To the best of our knowledge, studies comparing this type of solvent mix are still lacking. Sittler et al. (2016)

TABLE 6 Statistically significant changes for HDMs detected in serum. Metabolites checked in the Human Metabolome Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca> access: 20th April 2022); *rt*, retention time (minutes); *p* (*over*)—predictive loading values in the OPLS-DA, VIP—variable importance in projection; CV, coefficient of variation of the metabolites in the QC samples; FC, fold change in the comparison (PreDiab vs. T2DM).

Metabolites	HMDB	rt	<i>p</i> (<i>over</i>)	VIP	FC	CV in QC [%]
<i>α</i> -hydroxybutyric acid	HMDB00008	7.8	0.63	1.36	1.24	5.9
Creatinine	HMDB00562	13.5	-0.44	1.33	0.76	17.1
Cytine	HMDB00192	20.7	0.39	1.89	1.07	13
Galactonic acid	HMDB00565	18.3	-0.42	1.48	0.7	16.1
Glaconic acid	HMDB00625	18.3	-0.42	1.8	0.67	26.2
Glutamic acid	HMDB00148	13.2	-0.73	2.04	0.65	9.8
Glutamine	HMDB00640	13.2	0.43	1.62	1.48	26
Glycerol 1-phosphate	HMDB00126	15.8	-0.4	1.87	0.82	12.8
Kynurenic acid	HMDB00684	20.1	-0.48	1.27	0.8	13
Leucine	HMDB00687	10.3	0.69	1.58	1.28	9.8
Malic acid	HMDB01514	12.6	-0.44	1.19	0.79	7
Mannose	HMDB00169	17.4	0.67	1.19	1.17	27
Oleic acid	HMDB00207	20.4	0.47	1.42	1.29	5.2
Oxathione	HMDB00214	16.4	-0.55	1.75	0.63	12.5
Serotonins	HMDB00239	22.4	0.53	1.8	0.65	20.8
Stearic acid	HMDB00827	20.8	0.91	2.69	1.79	10
Trans-4-hydroxy-L-proline	HMDB00725	13.1	0.32	1.63	0.96	19.7
Tryptophan	HMDB00929	20.3	0.67	1.75	1.96	26.3

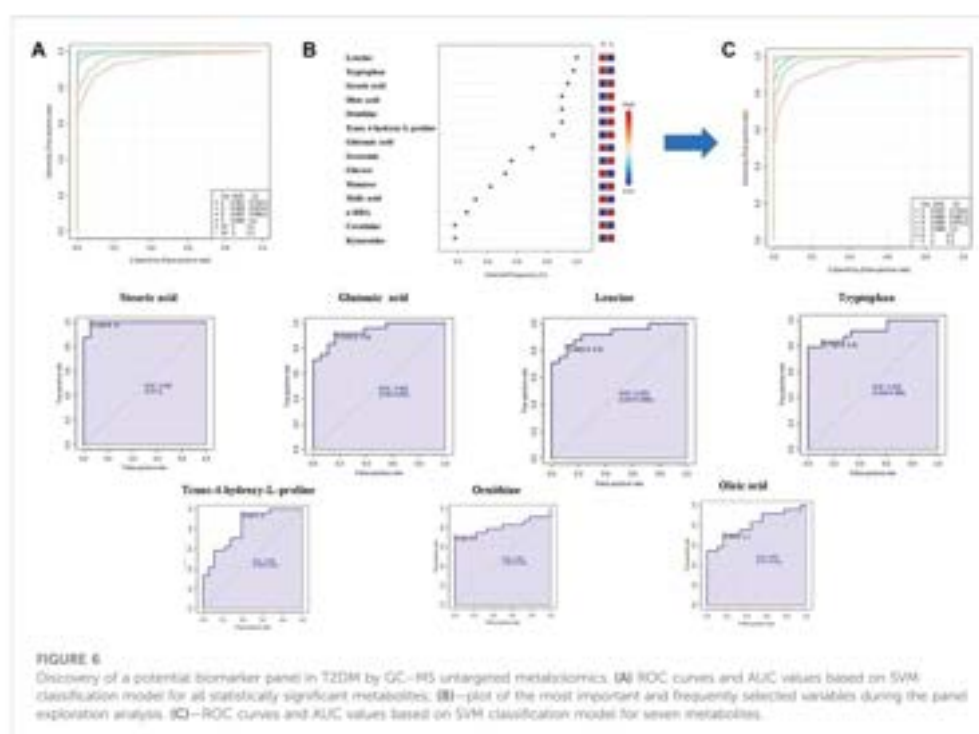
compared seven different extraction solvents but for LC-MS-based metabolomics. Extraction using MeOH:EtOH, and MeOH demonstrated the best repeatability in comparison to all other methods regardless the LC-MS method employed. In our study, we also observed the best results for MeOH but with the addition of H₂O in a ratio of 9:1. In the previous study presented by Ijse et al. (2005) (Trygg et al., 2005), the use of MeOH:H₂O mixture (v/v, 8:1) in GC-MS-based metabolomics analysis of plasma samples provided optimal results in terms of completeness, efficiency, and reproducibility of extraction in comparison to other tested solvents (EtOH, ACN, acetone, chloroform), which is consistent with our findings. According to Can Eylem and coworkers (Eylem et al., 2022), who studied the effect of five different solvents (acetone, ACN, EtOH, MeOH, and H₂O), the addition of water in the MeOH extraction had a positive effect on the extraction of polar metabolites, resulting in higher peak areas.

Optimization of methoxymation and silylation conditions

Based on the literature review (Moros et al., 2017; Miyagawa and Bamba, 2019; Fritsche-Guenther et al., 2021), it was observed that many factors at both stages (MeOx and SIL) contribute to the reaction speed and completeness of derivatization reaction which may directly impact the repeatability and reproducibility of sample analyses. Due to the degradation of metabolites, it is difficult to obtain good repeatability during the batch

derivatization, as the time between completing the derivatization process and GC analysis differ from sample to sample (Miyagawa and Bamba, 2019). Despite this fact, several attempts (Moros et al., 2017; Miyagawa and Bamba, 2019; Fritsche-Guenther et al., 2021) have been made to improve sample preparation procedure for GC-MS metabolomics. In the research presented by Fritsche-Guenther and coworkers (Fritsche-Guenther et al., 2021), different derivatization conditions were taken into account during optimization of the protocol for fully automated and effective protein precipitation and extraction of 42 metabolites from plasma, serum and liver samples. It is known that results for manual and fully automated methods differs, as presented by Zarate et al. (2016). In other studies, researchers (Moros et al., 2017; Miyagawa and Bamba, 2019; Eylem et al., 2022) observed differences in response and repeatability of metabolites due to the change of the parameters of both derivatization steps, and for this reason we optimized method at both stages.

In order to reduce the number of derivatization products, MeOx-derivatization was employed before TMS-derivatization. Different MeOx concentration-volume combinations were reported for derivatization of biofluid samples. In most protocols (Moon et al., 2013; Ong et al., 2017; Gur et al., 2018; Sobczak et al., 2019; He et al., 2020; Mbojak et al., 2021), MeOx in the volume of 50–125 μ l and the concentration of 15–40 mg/ml is added to dried extract. Based on the literature findings (Moros et al., 2017; Miyagawa and Bamba, 2019; Engel et al., 2020; He et al., 2020; Fritsche-Guenther et al., 2021; He et al., 2021), there



is information on the effect of the MeOx concentration on the derivatisation process. The concentration of MeOx reagent most frequently reported in the literature is 20 mg/ml. In the research presented by Eylem and coworkers (Eylem et al., 2022), a high correlation between the response and MeOx concentration was found, but details were not shown. For optimization, authors used the concentration of 30 mg/ml, which is consistent with our study, although the volume of MeOx was different. We chose the concentration of 30 mg/ml due to better repeatability for both matrices and relatively high intensity for most of the studied metabolites. In the study presented by Fritsche-Guenther (Fritsche-Guenther et al., 2021), but in fully automated method of optimization, it was observed that the overall areas of metabolites decreased around 30% with increasing concentration of MeOx.

When we optimized a volume of O-methoxyamine HCl solution in pyridine, the volume of MSTFA with 1% TMCS was also changed to be equal to the volume of O-methoxyamine HCl solution in pyridine. Such approach is used in many GC-MS-based metabolomics studies on plasma or serum samples (Moros et al., 2017; Raciukowika et al., 2021). On the other hand, it was shown that efficient derivatisation can be obtained by

decreasing the amount of MeOx and increasing the amount of SIL reagent (Fiehn, 2016). According to Miyagawa and Bamba (Miyagawa and Bamba, 2019), who presented the comparison of the results obtained with the use of various volumes of O-methoxyamine HCl solution in pyridine, and MSTFA, it was revealed that the peak areas of the number of metabolite derivatives increased (mainly AAs) with the increase of the volume of both reagents employed for the derivatisation, which is consistent with our study. Bekke and coworkers (Bekke et al., 2014) found a similar association between the volume of MSTFA and the number of detected peaks.

Based on the literature review, the degree of completion of the both MeOx and SIL reaction depends on reaction time and temperature (Miyagawa and Bamba, 2019) and a lot of attention has been paid to this step (Miyagawa and Bamba, 2019; He et al., 2020). The most commonly accepted MeOx conditions include either reaction in high temperature for short time or low temperature for prolonged time. On the other hand, incubation process provides the completion of MeOx; however, it could also result in progressive degradation of heat labile metabolites (Bekke et al., 2014). To maximize coverage of metabolites in reproducible way, while minimizing

chemical and physical degradation, compromises are inevitable. The results obtained with different temperature conditions differed depending on a particular metabolite, and in terms of different classes of metabolites some trends were noticed. Higher MeOx temperature is considered to enhance derivatization efficiency by increasing solubility of metabolites. Bekete and coworkers (Bekete et al., 2014) reported that long term, low temperature MeOx was favorable for organic acid and AAs, while either long term low temperature or a short term high temperature MeOx was favorable for α -keto acids. According to Miyagawa and Bamba (Miyagawa and Bamba, 2019), disaccharides were incompletely methoxymated at 37°C for 30 min which resulted in a significant peak broadening caused by multiplexing, which was also observed in the presented study. Shepherd et al. (Shepherd et al., 2007) reported that CARB (glucose and fructose) were partially methoxymated at 30°C for 45 min and sucrose was hydrolyzed to glucose and fructose at 100°C when the process was longer than 45 min. MeOx results at 37°C for minimum 60 min were better in terms of glucose and maltose detection (Miyagawa and Bamba, 2019). Sterols are often derivatized at 60–100°C, but Miyagawa and Bamba observed transformation of these metabolites at 70°C (Miyagawa and Bamba, 2019). Overall, repeatability was better for all of the individual classes when incubation protocol was performed at 60°C for 30 min. According to Pasikanti et al. (Pasikanti et al., 2008), MeOx must be performed over a relatively long period of time (up to 17 h) and/or at high temperature to provide complete derivatization. The same as in the study presented by Mubarruf et al. (Mubarruf et al., 2013), in which MeOx (16 h) was found to be the best in terms of the number of metabolites, which is consistent with our findings.

Finally, we compared the conditions for the last step of sample preparation—SIL. This is a classical derivatization method employed to introduce a silyl group to a metabolite by replacing active hydrogen atoms (of carboxyl groups, amino and hydroxyl groups) to generate stable, more volatile and less polar metabolites. Several derivatization reagents have been applied for the derivatization of endogenous metabolites. The most popular reagents are MSTFA and BSTFA (N,O-Bis (Trimethylsilyl) trifluoroacetamide), with or without the catalyst, 1% TMCS. Morris et al. (2017) demonstrated that MSTFA with 1% TMCS was found to provide more repeatable results and enable the detection of more derivatives compared to BSTFA with 1% TMCS in plasma extracts. In the previous study, Fiehn (2016) also confirmed that MSTFA was superior over BSTFA in regard to the completeness of NH silylation of AAs and amines, and for this reason we did not optimize SIL reagent and chose MSTFA with 1% TMCS for optimization of other derivatization conditions.

Factors like temperature and time of SIL contribute to the reaction speed and completeness of SIL process. Namely, differences in metabolite peak areas of various derivatives were observed in different biological matrices as a result of

changing the SIL time and temperature (Eylem et al., 2022). The most frequently reported temperature and duration of SIL for both matrices range between 30 and 70°C and 30–120 min (Danielsen et al., 2012; Fiehn, 2016; Morris et al., 2017; Kiseleva et al., 2021). Therefore, we compared SIL conditions (37°C and 70°C for 30 and 60 min, respectively) the most commonly used in the metabolomics studies. Long term and high temperature SIL was favorable for FAs and CARB. On the other hand, this conditions had negligible effect on OrgAs and AAs. It is difficult to adapt a unique SIL process at which all functional groups would be derivatized because reaction kinetics differ among functional groups. The ideal scenario would be if SIL of every functional group of metabolites was completed at the selection time. The completion of reaction without any degradation effect for all metabolites remains a challenge. It was proved that metabolites containing -OH, -COOH and ketone groups were derivatized 5 h after the addition of MSTFA whereas the derivatization of -NH₂ groups was still progressing after a day, at which point, other products began to degrade (Moldoveanu and David, 2016).

Multiple peaks are usually produced when this step of derivatization is incomplete. At 70°C for 60 min, we did not observe multiple peaks for AAs such as Ala and Val in neither of matrices, thus we assumed that a SIL process was completed. Danielsen et al. (2012) observed, similarly to our findings, that long incubation time is needed to complete a derivatization process. Furthermore, these results imply that long SIL periods (>30 min) are needed to provide effective derivatization of slowly reacting metabolites. Two peaks were found from the TMS derivatization of sugars (e.g., glucose and mannose), which was in accordance to the previously published literature (Villas-Bóas et al., 2011; Zarate et al., 2016). Finally, we chose 16 h at RT for methoxymation and 1 h at 70°C for SIL. It was proved in the literature that a longer MeOx at low temperature in combination with a high SIL temperature provide a similar results to a short-time methoxymation at a high temperature in combination with a low SIL temperature (Bekete et al., 2014), which is consistent with our findings. In previously reported study it was found that MeOx (16 h) and SIL (1 h) provide the best results in terms of the number of metabolites (Mubarruf et al., 2013).

Results of the comparison between both tested matrices

There are metabolomics studies showing the differences between serum and plasma metabolic profiles (Kaluarachchi et al., 2018). Depending on the type, class or particular metabolite, one matrix can be better than the other to perform metabolomics analyses. In general, serum is favored due to the slightly higher metabolites concentration compared to plasma (Yu et al., 2011), which is consistent with our results

taking into account TI (Figure 3). Deproteinization of serum eliminates the volume fraction of proteins and distributes the remaining small molecular weight constituents in a smaller volume, thus making them more concentrated. On the other hand, there are studies confirming that the level of some metabolites are lower in serum compared to EDTA plasma (Suarez-Diez et al., 2017; Sotelo-Oviedo et al., 2021). It is obvious that serum and plasma are similar in terms of some characteristics and different in other, and these differences may be important for bio specimen selection and metabolite identification in metabolic phenotyping studies. Due to all the above-mentioned factors, we have made the effort to perform a comprehensive optimization for 75 MDMs in both matrices. As far as we know, no comprehensively optimized method, including the impact of most commonly used mixtures of solvents and derivatization conditions, for profiling of both plasma and serum metabolites as MSTFA derivatives has been presented thus far. The most considerable differences concern AAs, associated with GM and T2DM development thus, the optimization of the methods for both matrices is crucial. It has been reported in previous optimization study (Moros et al., 2017), that good repeatability, particularly for AAs is difficult to achieve during batch derivatization, as the time between the completion of derivatization reaction and GC analysis differs from sample to sample. Optimization of repeatable and reproducible method for the quantification of MDMs was essential because we applied this method for the analysis of clinical serum samples to evaluate changes in MDMs related to T2DM development.

Analysis of clinical samples

Many changes in gut composition have been reported in T2DM patients and it was proved that GM may be a significant environmental factor involved in the onset and progression of T2DM (Tanase et al., 2020). Larsen et al. (2010) conducted one of the first studies in humans comparing the GM between individuals with T2D and healthy controls. This study demonstrated that the phylum Firmicutes and the class Clostridia were less abundant in the T2DM group compared to the control group, whereas the class Betaproteobacteria was more abundant in T2DM subjects and positively correlated with plasma glucose level. In the same study (Pedersen et al., 2016) it was shown that dysbiosis of GM impacts serum metabolome and contributes to IR. Therefore, analysis of serum metabolome can be potentially used for T2DM diagnosis, also in the context of MDMs. Based on the literature review we proved that a variety of biological markers detected in biofluids by GC-MS (Gar et al., 2018; Alamiya-Patruni et al., 2019; Mojsak et al., 2021) are associated with T2DM. GC-MS-based metabolomics is a powerful approach for studying pathophysiological processes (Raczkoewska et al., 2021), and has been used to identify

complex endogenous metabolic phenotypes in various diseases (Zhang et al., 2020). For these reasons GC-MS was used to identify the differences in serum samples between diabetic and prediabetic subjects.

Several studies have indicated the influence of bacterial taxa on lipid and FA levels in blood samples (Rooks and Garrett, 2016; Org et al., 2017). The serum FAs profile is determined by host endogenous FA metabolism (Baylín and Campos, 2006). Data presented by Org and coworkers (Org et al., 2017) showed that fasting serum monounsaturated and saturated FAs are strongly associated with an increased abundance of *Blastia* and *Dorea* and decreased abundance of *Coprococcus* and *Pyrococcaceae*. As it can be seen in Table 6, we indicated statistically significant changes in FAs (oleic acid (OA) and SA). Studies using metabolic profiling support the importance of FAs in the prediction of T2DM onset. It was confirmed that FA levels were significantly higher in newly diagnosed (Lu et al., 2016; Castro-Cortés et al., 2017) and long-term monitored patients (Spiller et al., 2018) with T2DM, what is in line with the results of our research. Among all metabolites used for ROC analysis, SA exhibited the highest AUC value (0.995) (Figure 6). An increased concentration of serum SA plays a fundamental role in the development of beta cell dysfunction and T2DM, as this FA is the major contributor to lipotoxicity in beta cells (Vilas-Boas et al., 2021). It was consistent with the findings of Lu et al. (2016) and Zhao et al. (2017), who identified FAs as the most important pathogenic factors for insulin resistance and T2DM.

Lipid oxidation may cause an increase of α -HB level, and we indicated elevated level (FC = 1.24) of this metabolite in T2DM group. It was confirmed that a high level of α -HB is common for T2DM, and it was previously identified as a marker and predictor of T2DM (Gall et al., 2019; Cobb et al., 2016; Vangipurapu et al., 2019; Ferrannini et al., 2022). α -HBA is a byproduct of α -ketobutyric acid synthesis, a product of AA catabolism (Thre and Met) and glutathione anabolism (Cys formation pathway) in hepatic tissue (Souza et al., 2021). Trico and coworkers (Trico et al., 2017) has demonstrated that α -HBA level increased in IR, potentially due to a metabolic overload (through BCAA and free FAs) and oxidative stress (by the higher intracellular NADH/NAD⁺ ratio).

GM can promote the production and utilization of AAs, which can be absorbed across the gut and accumulate in the blood. Thus, the GM could influence serum AA levels (Shen et al., 2021) (Supplementary Table S1). Subjects with IR also exhibit proliferation of *Prevotella copri* and *Bacteroides vulgatus*, which elevate the circulating levels of BCAAs (Li et al., 2017). AAs have an important role in multiple pathophysiological processes (Zhou et al., 2021). Disturbances in AA metabolism are closely involved in the pathogenesis of T2DM. Several AAs, including especially BCAAs and aromatic AAs, have been shown to be associated with increased risk of T2DM (Vangipurapu et al., 2019; Long et al., 2020). Pedersen et al. (2016) suggested that intestinal microbiota could be an

important source of increased levels of BCAAs and play a key role in insulin resistance. In the presented study, in terms of BCAA, differences in the level of Leu were observed. Leu serum abundance was statistically higher in T2DM than in prediabetic patients. Our results are in accordance with the other findings showing significant association of BCAAs (especially Leu) with T2DM (Lynch and Adams, 2014; Flores-Guerrero et al., 2018; Gao et al., 2018; Holobek, 2018).

Elevation of BCAAs leads to accumulation of carnitines in muscle, which induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction, thereby aggravates insulin sensitivity (Lynch and Adams, 2014). As it was already shown (Ju et al., 2019; Mojzani et al., 2021), lower level of Cre in serum, also observed in our study, might reflect a lower amount of skeletal muscle thus fewer target sites for insulin which may partially explain the pathogenesis of T2DM associated with lower serum level of Cre. In the comparison of Prediab vs. T2DM group, we also observed decreased level of this metabolite in T2DM group. In the study presented by Agus and coworkers (Agus et al., 2018), bacteria and fungi capable of degrading Cre have been identified in the human colon. Consequently, accurate determination of these metabolites can be essential for the early diagnosis of T2DM.

Previous studies have suggested that several metabolites of the kynurenine pathway are diabetogenic to humans, which is directly or indirectly controlled by microbiota (Osterburg, 2013). Kynurenine pathway, involved in Trp metabolism, was previously reported as being upregulated in T2DM. Enzyme responsible for conversion of Trp to kynurenine has been shown to be regulated by microbiota (Agus et al., 2018). In our study, we observed statistically significant changes in an essential AA—Trp (FC = 1.96) in prediabetic patients in comparison to T2DM. Trp is also a precursor for serotonin synthesis in the gut mucosa (Jenkins et al., 2019; Gao et al., 2020). Interestingly, in our study, we observed elevated level of serotonin, associated with the increased risk of T2DM which is consistent with previous findings (Vabur et al., 2019).

Org and coworkers (Org et al., 2017) showed the connection between GM and Glu levels. Higher Glu levels in plasma were significantly associated with higher bacterial abundance such as Clostridiales. Several species from unclassified Clostridiales positively correlated with glutamine concentrations. It was revealed that Glu and GA are related to T2DM. In β -cells, glutamine is transported by blood and accumulated in plasma, then further converted to GA (Jemial and Chaudhry, 2013). Cheng et al. reported that plasma Glu, glutamate, and the Glu/ glutamate ratio were strongly associated with IR. GA concentration is also one of the most important indicators of diabetic retinopathy (Cheng et al., 2012).

To evaluate the utility of significant metabolites as potential T2DM biomarkers, ROC curve analyses were performed (Figure 6). The AUC of the combination of five AAs and two FAs revealed the most powerful capability to discriminate between prediabetics and T2DM patients. This combination might serve as a potential T2DM indicator as it provides improved specificity compared to single

metabolite measurement. The diagnostic accuracy of these metabolites could be further enhanced by combining it with other routine diagnostic parameters such as FP glucose or HbA1c.

Conclusion

In the presented study, we focused on the comparison of different sample preparation conditions including different solvents for protein precipitation and two steps of derivatisation, MeOx followed by SIL. We analysed two matrices (serum and plasma) in the context of 75 MDMs. The comprehensive evaluation of the results revealed that sample preparation with methanol with the addition of water provided the most stable signals for MDMs. Our results also suggest that a MeOx volume and concentration has the greatest impact on repeatability and intensity, whereas derivatisation reaction conditions mostly influence the reaction speed and completeness of this process.

It is important to have a repeatable and reproducible method for the determination of MDMs in blood-related samples, as it can be used to study the role of such a metabolites in the development of different diseases. In this study we applied this method to analyze serum samples obtained from prediabetic and T2DM patients. In total, 18 MDMs discriminated T2DM patients from prediabetics. Seven of them (SA, GA, Leu, Trp, Trans-4-hydroxy-L-proline, Orn and OA), based on the SVM classification model, were selected as a panel of potential biomarkers, able to distinguish between patients with T2DM and prediabetes. As our findings were derived from a small group, future validation of these results in a large-scale cohort study is needed.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusion of this article will be available upon request in justified cases.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by the local Ethics Committee at the Medical University of Białystok, Poland (R1002/290/2008/2009, R1002/33/2014, R1002/193/2019 and APK.002.239.2022). Written informed consent was signed by all participants.

Author contributions

PM and PK performed all the experiments and analysed the data, PM, MC, and KMi drafted the manuscript, JG and JS provided technical support for the work, KMa, PM, MC, and AK

designed the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by the Medical University of Białystok, Poland (SUB/I/DN/21/008/4406).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the

reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.982672/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY TABLE S1

List of MCMs considered for optimization. *rt*, retention time; HMDB—Human Metabolome Database; *T*, target ion; *Q1*, first qualifier ion; *Q2*, second qualifier ion; *RI*, retention index. All compounds reported in the table are three methyl silylated (TMS), and the following number refers to the number of active hydrogen replaced with the TMS group, as reported in the Fiehn library. *confirmation in the literature that metabolite may be related to the GM or that metabolite may be part of the pathway that is disturbed by GM.

SUPPLEMENTARY TABLE S2

Repeatability and reproducibility of MCM measurements.

SUPPLEMENTARY TABLE S3

Stability of MCMs in both matrices.

References

- Ademika-Petrano, E., Senczak, P., Ciborowski, M., Godzien, J., Pietrowska, K., Baser, W., et al. (2019). Metabolomics reveal altered postprandial lipid metabolism after a high-carbohydrate meal in men at high genetic risk of diabetes. *J. Nutr.* 149 (3), 915–922. doi:10.1093/jn/dz014
- Agus, A., Planchain, J., and Sekel, H. (2018). Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 23 (6), 716–724. doi:10.1016/j.chom.2018.05.003
- Armitage, E. G., Godzien, J., Alonso-Herranz, V., López-González, A., and Barbas, C. (2015). Missing value imputation strategies for metabolomics data. *Electrophoresis* 36 (24), 3050–3060. doi:10.1002/elpe.201500352
- Baylis, A., and Campos, H. (2006). The use of fatty acid biomarkers to reflect dietary intake. *Curr. Opin. Lipidol.* 17 (1), 22–27. doi:10.1097/01.coxl.0000199914.46720.83
- Beale, D. L., Pina, F. R., Kowczewski, K. A., Prejean, M. M., Nataraja, V. K., Boughton, B. A., et al. (2018). Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research. *Metabolomics* 14 (11), 152. doi:10.1007/s12010-018-1449-2
- Bekalo, E. A., Annarstone, C. E., Hertig, M. L., Nicolai, B. M., and Gerrard, A. H. (2014). Multi-response optimization of the extraction and derivatization protocol of selected polar metabolites from apple fruit tissue for GC-MS analysis. *Anal. Chim. Acta* 824, 42–56. doi:10.1016/j.aca.2014.03.030
- Briš, F., Le Lay, A., Dumas, M. E., and Gauguier, D. (2018). Implication of gut microbiota metabolites in cardiovascular and metabolic diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 75 (21), 3977–3990. doi:10.1007/s00118-018-2901-1
- Castro-Garriga, C., Sosa, S., Norberto, S., Maza, C., Dominguez, V. F., Fontana, M., et al. (2017). The fatty acid profile in patients with newly diagnosed diabetes: Why it could be unexpected. *Int. J. Polym.* 2017, 6024106. doi:10.1155/2017/6024106
- Chen, M. X., Wang, S. Y., Kao, C. H., and Tsai, I. L. (2019). Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *J. Formos. Med. Assoc.* 118 (1), 516–522. doi:10.1016/j.jfma.2018.09.007
- Cheng, S., Bhee, E. P., Larson, M. G., Lewis, G. D., McCabe, E. L., Shen, D., et al. (2012). Metabolic profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation* 125 (18), 2222–2231. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067827
- Ciborowski, M., Tról, J., Martín-Vizcaino, J. L., Egido, J., and Barbas, C. (2012). Metabolomics with LC-QTOF-MS permits the prediction of disease stage in aortic abdominal aneurysm based on plasma metabolic fingerprint. *PLoS One* 7 (3), e31962. doi:10.1371/journal.pone.0031962
- Cobb, J., Eckhart, A., Metzinger-Reif, A., Carr, B., Group, L., and Ferrannini, E. (2016). *n*-Hydroxybutyric acid is a selective metabolite biomarker of impaired glucose tolerance. *Diabetologia* 39, 988–995. doi:10.1007/s00125-015-2752-2
- Danielsson, A. P. H., Moritz, T., Mulder, H., and Spigel, P. (2012). Development of a gas chromatography/mass spectrometry based metabolomics protocol by means of statistical experimental design. *Metabolomics* 8 (1), 50–61. doi:10.1007/s11696-011-0283-4
- Diabetologia, C. (2018). 2018 Guidelines on the management of diabetic patients. A position of Diabetes Poland. *Chc. Diabetol.* 7 (1), 1–80. doi:10.5603/CDK.2018.0001
- Drewey, B., Katz, K., Jagannathan, R., Chiang, S. S., Okwendu, R., Goldberg, J. J., et al. (2017). Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 10, 345–361. doi:10.2147/DMSO.S190074
- Drogan, D., Dunn, W. B., Lin, W., Bojwold, B., Schulz, M. B., Langenberg, C., et al. (2015). Untargeted metabolic profiling identifies altered serum metabolites of type 2 diabetes mellitus in a prospective, nested case control study. *Chc. Chem.* 61 (5), 487–497. doi:10.1371/journal.pone.0142390
- Engel, R., Szulik, P., and Marchetti-Deschmann, M. (2020). Critical considerations for trimethylsilyl derivatives of 24 primary metabolites measured by gas chromatography-random mass spectrometry. *Exp. Sci. Plus* 3 (9), 407–418. doi:10.1002/esp.202009025
- Ericson, U., Hindy, G., Drake, I., Schulz, C.-A., Broadwell, L., Hellstrand, S., et al. (2018). Dietary and genetic risk scores and incidence of type 2 diabetes. *Genes Nutr.* 13, 13. doi:10.1186/s12263-018-0199-1
- Eyles, C. C., Nemesi, E., Dugas, A., Arák, V., Matyas, I., Geiszler, Y., et al. (2022). High-Throughput Single-Step plasma sample extraction optimization strategies with experimental design for LC-MS and GC-MS integrated metabolomics and lipidomics analysis. *Microchem. J.* 179, 107325. doi:10.1016/j.micro.2022.107325
- Ferrannini, E., Natali, A. Fai - Camstra, S., Camstra S. Fai - Nannipieri, M., Nannipieri M. Fai - Mari, A. Fai - Adam, K. P. M. A. Adam Kp Fai - Milborn, M. V., et al. (2022). Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance (1939–2273). *Electron.*
- Fiehn, O. (2016). Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: Combined targeted and untargeted profiling. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 114, 301–430. doi:10.1002/0471142727.m03094114

- Filipi, A. M., Strych, R., Kumar, V., Al-Abdulla, Z., Abomana, S., and Monday, M. R. (2020). Pre-diagnostic biomarkers of type 2 diabetes identified in the UAE's obese national population using targeted metabolomics. *Sci. Rep.* 10 (1), 17818. doi:10.1038/s41598-020-72384-7
- Fluets-Guerrero, I. L., Oubi, M. C. J., Kautzner, L. M., Gruppen, E. G., Wolak-Dinsmore, J., Orosio, J. D., et al. (2019). Plasma branched-chain amino acids and risk of incident type 2 diabetes: Results from the PREVEND prospective cohort study. *J. Clin. Med.* 7 (12), E513. doi:10.3390/jcm7120513
- Fritsche-Guenther, K., Glogovc, Y., Bauer, A., Opatla, T., Kruppa, S., Henning, C. A., et al. (2021). Optimized workflow for on-line derivatization for targeted metabolomics approach by gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites* 11 (2), 808. doi:10.3390/metabo11020808
- Gall, W. E., Roche, K., Lewton, K. A., Adlen, K. P., Mitchell, M. W., Nakhle, P. J., et al. (2019). alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a non-diabetic population. *PLoS One* 14 (3), e019883. doi:10.1371/journal.pone.0198883
- Gao, J., Xu, K., Liu, H., Liu, G., Bai, M., Peng, C., et al. (2018). Impact of the gut microbiota on intestinal immunity mediated by tryptophan metabolism. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8, 13. doi:10.3389/fcimb.2018.00013
- Gao, K., Mu, C. L., Farri, A., and Zhu, W. Y. (2020). Tryptophan metabolism: A link between the gut microbiota and brain. *Adv. Nutr.* 11 (3), 709–723. doi:10.1093/advances/nnaa127
- Gar, C., Batterselhorst, M., Probst, C., Adamski, J., Seisler, J., and Lechner, A. (2016). Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 55 (1), 21–32. doi:10.1080/10409830.2017.1414143
- Geddes, J., Alonso-Herranz, V., Barban, C., and Armitage, E. G. (2013). Controlling the quality of metabolomics data: New strategies to get the best out of the QC sample. *Metabolomics* 11 (3), 518–528. doi:10.1007/s11306-014-0712-4
- Gepde, J., and Cahova, M. (2021). Gut microbiota as the link between elevated BCAAs serum levels and insulin resistance. *Biomolecules* 11 (10), 1434. doi:10.3390/biom11101414
- Gu, X., Al-Dubayy, M., Alshahrani, A., Masood, A., Benabdellakmal, H., Zahra, M., et al. (2020). Distinctive metabolomics patterns associated with insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Front. Mol. Biosci.* 7, 609906. doi:10.3389/fmolb.2020.609906
- Han, S., Van Truong, W., Fischer, C. R., Merrill, B. D., DeFolice, B. C., Sanchez, J. M., et al. (2021). A metabolomics pipeline for the mechanistic investigation of the gut microbiome. *Nature* 599 (7867), 415–420. doi:10.1038/s41586-021-03707-9
- Hatch, M. (2017). Gut microbiota and oxalate homeostasis. *Ann. Transl. Med.* 5 (3), 36. doi:10.2197/atm.2016.12.70
- He, Z., Liu, Z., and Gong, L. (2021). Systematic evaluation of sample preparation strategy for GC-MS-based plasma metabolomics and its application in osteoarthritis. *Anal. Biochem.* 621, 114153. doi:10.1016/j.ab.2021.114153
- He, Z., Liu, Q., Liu, Z., and Gong, L. (2020). Extensive evaluation of sample preparation workflow for gas chromatography-mass spectrometry-based plasma metabolomics and its application in rheumatoid arthritis. *Anal. Chim. Acta* 1115, 136–145. doi:10.1016/j.aca.2020.06.029
- Huang, L. M. (2020). Applying mass spectrometry-based assays to explore gut microbial metabolism and associations with disease. *Crit. Rev. Lab. Med.* 50 (5), 719–732. doi:10.1515/crll-2019-0074
- HMDB 2020. *Handb.* Available at www.ebi.ac.uk/hmdb/ (Accessed on April 20, 2022).
- Hulvök, M. (2019). Branched-chain amino acids in health and disease: Metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutr. Metab.* 15, 33. doi:10.1186/s12986-018-0271-1
- Hu, H., Nakagawa, T., Honda, Y., Yamamoto, S., Okazaki, H., Yamamoto, M., et al. (2019). Low serum creatinine and risk of diabetes: The Japan epidemiology collaboration on occupational health study. *J. Diabetes Investig.* 10 (5), 1209–1214. doi:10.1111/jdi.12824
- Hughes, H. E., Rose, D., and Ashwood, P. (2018). The gut microbiota and dysbiosis in autism spectrum disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 18 (11), 81. doi:10.1007/s11910-018-0887-6
- Jys, A., Trygg, I., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., Antti, H., et al. (2005). Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal. Chem.* 77 (24), 8086–8094. doi:10.1021/ac051211v
- Trygg, I., Gullberg, J., Johansson, A. I., Jonsson, P., Antti, H., Gullberg, J., et al. (2005). Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal. Chem.* 77 (24), 8086–8094. doi:10.1021/ac051211v
- Junkins, T. A., Nguyen, J. C., Polglase, K. E., and Bertrand, P. P. (2016). Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Neurosci.* 9 (1), E36. doi:10.3390/neuro910036
- Jentad, M., and Chandhry, F. A. (2013). The amino acid transporters of the glutamate/GABA-glutamine cycle and their impact on insulin and glucagon secretion. *Front. Endocrinol.* 4, 199. doi:10.3389/fendo.2013.00199
- Kakutani, M., Boulangé, C. L., Karman, I., Lindon, J. C., Ebels, T. M. D., Elliott, P., et al. (2018). A comparison of human serum and plasma metabolites using untargeted 31P NMR spectroscopy and UPLC-MS. *Metabolomics* 14 (3), 32. doi:10.1007/s11306-018-1332-1
- Khalifa, O., Karhan, I., Egeci, E., and Poterriyanna, E. (2021). Defining blood plasma and serum metabolome by GC-MS. *Metabolites* 12 (1), 15. doi:10.3390/metabo12010015
- Kock, M. M., Jellema, R. H., van der Greef, J., Van, A. C., and Harkema, T. (2011). Quantitative metabolomics based on gas chromatography-mass spectrometry: Status and perspectives. *Metabolomics* 7 (3), 307–318. doi:10.1007/s11306-010-0254-3
- Larsen, N., Vigneres, F. K., van der Berg, F. W., Nielsen, D. S., Andreassen, A. S., Pedersen, B. K., et al. (2018). Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 13 (2), e019085. doi:10.1371/journal.pone.0190885
- Li, X., Watanabe, K., and Kimura, I. (2017). Gut microbiota dysbiosis drives and implies novel therapeutic strategies for diabetes mellitus and related metabolic diseases. *Front. Immunol.* 8, 1882. doi:10.3389/fimmu.2017.01882
- Liu, B., Liu, W., Piao, M., and Zhu, H. (2017). A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino Acids* 49 (12), 2083–2090. doi:10.1007/s00726-017-2493-3
- Liu, J., Semt, S., van der Lee, S. J., van der Spek, A., Verhoeven, A., van Klundert, J. B., et al. (2017). Metabolomics based markers predict type 2 diabetes in a 14 year follow-up study. *Metabolomics* 13 (3), 394. doi:10.1007/s11306-017-0292-2
- Long, J., Yang, Z., Wang, L., Han, Y., Peng, C., Yan, C., et al. (2020). Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: A systematic review and meta-analysis. *RMC Endocr. Diab.* 20 (1), 174. doi:10.1186/s12902-020-00653-1
- Lu, Y., Wang, Y., Ong, C.-N., Subramaniam, T., Choi, H. W., Yuan, J.-M., et al. (2016). Metabolic signatures and risk of type 2 diabetes in a Chinese population: An untargeted metabolomics study using both LC-MS and GC-MS. *Diabetologia* 59 (11), 2349–2358. doi:10.1007/s00125-016-4069-2
- Lynch, C. J., and Adams, S. H. (2014). Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10 (12), 723–736. doi:10.1038/nrendo.2014.171
- Malinowska, K., Adamska-Patruno, E., Goslik, J., Lipinska, D., Cicho, A., Kozub, A., et al. (2019). The role of muscle decline in type 2 diabetes development: A 9-year prospective observational cohort study. *Nutrients* 11 (4), 834. doi:10.3390/nut11040834
- Malm, L., Tybring, G., Moritz, T., Lendin, B., and Gull, I. (2016). Metabolomics quality assessment of EDTA plasma and serum samples. *Bioprocess. Biotechnol.* 14 (3), 418–421. doi:10.1089/bt.2015.0092
- Martin, A. M., Sun, E. W., Rogers, G. B., and Keating, D. J. (2019). The influence of the gut microbiome on host metabolism through the regulation of gut hormone release. *Front. Physiol.* 10, 428. doi:10.3389/fphys.2019.00428
- Menni, C., Fuaman E. Fau - Eric, I., Eric I. Fau - Perry, I. R. B., Perry I. Fau - Kastenmüller, G., Shin S. Fau - Petersen, A.-K., Petersen A. Fau - Hyöki, C., et al. (2021). Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach (P09-027X) (Electronic).
- Miao, Y. Y., Xu, C. M., Xu, M., Zhu, H. Q., and Chen, Y. Q. (2018). Relationship between gut microbiota and phosphorus metabolism in hemodialysis patients: A preliminary exploration. *Chin. Med. J. (US)* (27), 2792–2799. doi:10.4137/cm.4999.246079
- Miyagawa, H., and Hamba, T. (2019). Comparison of sequential derivatization with concurrent methods for GC/MS-based metabolomics. *J. Biom. Bieng.* 127 (2), 180–188. doi:10.1006/jbmoc.2018.07815
- Mejsak, F., Misiewicz, K., Godlewski, A., Adamska-Patruno, E., Senczuk, P., Rey-Stolle, F., et al. (2021). A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PDX1 genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance. *Curr. Issues Mol. Biol.* 43 (2), 515–528. doi:10.3390/cimb43020519
- Mejsak, F., Rey-Stolle, F., Parfeniuk, E., Kretowski, A., and Ciborowski, M. (2022). The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolite derivatization step (P07-264X) (Electronic).
- Moldovanu, S., and David, V. Derivatization methods in GC and GC/MS. In (2018). doi:10.5772/intechopen.81954

- Moons, J. V., Zolnik, C. P., Wang, Z., Qiu, Y., Ueyk, M., Wang, T., et al. (2018). Gut microbiota and plasma metabolites associated with diabetes in women with, or at high risk for, HIV infection. *EBioMedicine* 37, 392–400. doi:10.1016/j.ebiom.2018.10.077
- Moons, K., Liu, C., Kim, S., and Oh, D. C. (2013). Facile determination of the absolute configurations of α -hydroxy acids by chiral derivatization coupled with liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A* 1272, 141–146. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.066
- Moran, G., Chatzigeorgidis, A. C., Gika, H. G., Rakos, N., and Theodoridis, G. (2017). Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. *Biomass. Bioanalysis* 9 (1), 33–45. doi:10.4153/bio-2016-0224
- Mushari, S. G., Mahtar, S., Siddiqui, A. I., Choudhary, M. I., and Rahman, A. (2015). Metabolic profiling of human plasma by different extraction methods through gas chromatography-mass spectrometry—an objective comparison. *Anal. Chem. Acta* 804, 186–189. doi:10.1016/j.aca.2013.10.025
- Ong, E., Blum, Y., Kaefer, S., Mehrbaban, M., Kaszeta, J., Kangas, A. J., et al. (2017). Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol.* 18 (1), 70. doi:10.1186/s12859-017-1194-2
- Österberg, G. (2015). Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-lysaraine and lysaraine-calcitriolamide adenosine dinucleotide metabolic pathways. *Mol. Neurobiol.* 48 (2), 294–301. doi:10.1007/s12035-013-8497-4
- Papadimitropoulos, M. F., Vasileopoulos, C. G., Mages-Niess, C., and Klapp, M. J. (2016). Untargeted GC-MS metabolomics. *Methods Mol. Biol.* 1738, 133–147. doi:10.1007/978-1-4939-7643-9_9
- Parkkari, K. K., Ho, P. C., and Chan, E. C. (2008). Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabolomics platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (18), 2894–2892. doi:10.1002/rcm.3699
- Pedersen, H. E., Gudimovskis, V., Nielsen, H. B., Hyötyläinen, T., Nielsen, T., Jensen, B. A., et al. (2014). Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature* 515 (7512), 376–381. doi:10.1038/nature13646
- Packiewicz, B. A., Mojsak, P., Rójs, D., Telefo, E., Paczkowska-Abdulmalik, M., Hryciuk, J., et al. (2021). Gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics analysis reveals potential biochemical markers for diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Front. Pharmacol.* 12, 770280. doi:10.3389/fphar.2021.770280
- Rooks, M. G., and Garrett, W. S. (2014). Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 14 (6), 544–552. doi:10.1038/nri3616
- Santoro, M. L., Pina, C., Mangia, A., Palmieri, V., Carbone, T., Lippi, S., et al. (2007). Cross-sectional evaluation of the gut-microbiome-metabolome axis in an Italian cohort of BED patients. *Sci. Rep.* 7 (1), 9023. doi:10.1038/s41598-017-10054-3
- Selkig, J., Wong, P., Zhang, X., and Pettersson, S. (2016). Metabolic tinkering by the gut microbiome: Implications for brain development and function. *Gut Microbes* 5 (3), 369–390. doi:10.1080/19443918.2016.1189481
- Shen, G., Wu, L., Ye, B. C., and Qi, N. (2021). Gut microbiota-derived metabolites in the development of diseases. *Gen. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2021, 6658674. doi:10.1155/2021/6658674
- Shepherd, T., Dobson, G., Verrill, S., Conner, S., Griffiths, D., McNicol, J., et al. (2007). Potato metabolomics by GC-MS: What are the limiting factors? *Metabolomics* 3, 475–488. doi:10.1007/s11696-007-0058-2
- Stolker, D. G., Moran, C. S., and Vuckovic, D. (2016). Systematic assessment of seven solvent and solid-phase extraction methods for metabolomics analysis of human plasma by LC-MS. *Sci. Rep.* 6, 38885. doi:10.1038/srep10895
- Schwab, A., Hildebrand, C., and J. Stewart. A. (2019). Changes in plasma free fatty acids associated with type 2 diabetes. *Nutrients* 11 (9), 2022. doi:10.3390/nu11092022
- Seifels-Orlando, J., Chen, S. Y., Hertz-Picciotto, L., and Shephard, C. M. (2021). A comparison of serum and plasma blood collection tubes for the integration of epidemiological and metabolomics data. *Front. Mol. Biosci.* 8, 682134. doi:10.3389/fmolb.2021.682134
- Sessa, A. P., Cunha, D. M., Franco, C., Trizetta, C., Gajon, F., Bayliss, P., et al. (2021). Which role plays 2-hydroxybutyric acid on insulin resistance? *Metabolites* 11 (12), 835. doi:10.3390/metabol11120835
- Spiller, S., Böcher, M., and Hoffmann, B. (2010). Plasma levels of free fatty acids correlate with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.* 20 (11), 2667–2669. doi:10.1111/j.1463-1347
- Sanchez-Diez, M., Adams, J., Adamoli, J., Chausp, S. A., Ischiro, C., Peters, A., et al. (2017). Plasma and serum metabolite association networks: Comparability within and between studies using NMR and MS profiling. *J. Proteome Res.* 16 (7), 2547–2559. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00106
- Saromaru, M., Patrowska, K., Niemczanowicz-Janica, A., Kryszewski, A., and Chlonowski, M. (2021). Applications of metabolomics in forensic toxicology and forensic medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (6), 3616. doi:10.3390/ijms22063616
- Tan, C., Zhang, X., Wan, X., Cao, J., Wu, R., and Duan, S. (2021). The role of gut microbiota and amino metabolism in the effects of improvement of α -cell function after modified jejunoduodenal bypass. *Acta Rep.* 11 (1), 4909. doi:10.3389/acta.2021.490911
- Tanaka, D. M., Gomez, E. M., Nicolas, E., Costes, C. F., Cicciocioppo, M., Haryjo, L. L., et al. (2020). Role of gut microbiota on onset and progression of microvascular complications of type 2 diabetes (T2DM). *Nutrients* 12 (12), E3719. doi:10.3390/nu12123719
- Treth, D., Prinsen, H., Giannini, C., de Graaf, R., Juchem, C., Li, F., et al. (2017). Elevated α -hydroxybutyrate and branched-chain amino acid levels predict deterioration of glycaemic control in adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 102 (7), 2473–2481. doi:10.1210/clinem.2017-06075
- Vangpanupa, J., Stanciková, A., Smith, U., Kaasinen, J., and Laiko, M. (2019). Nine amino acids are associated with decreased insulin secretion and elevated glucose levels in a 7.4-year follow-up study of 5,181 Finnish men. *Diabetes* 68 (6), 1353–1358. doi:10.2337/di18-1034
- Verrucchi, P., Del Chierico, F., and Putignano, L. (2016). Gut microbiota profiling: Metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health. *Front. Microbiol.* 7, 1144. doi:10.3389/fmicb.2016.01144
- Vilas-Boas, E. A., Almeida, D. C., Romo, L. P., Orysi, F., and Capellini, A. B. (2021). Lipotoxicity and β -cell failure in type 2 diabetes: Oxidative stress linked to NADPHase oxidase and ER stress. *Cell* 10 (12), 3128. doi:10.3390/cells10123128
- Vilas-Boas, E. G., Smart, K. F., Sivakumar, S., and Lane, G. A. (2011). Alkylation or silylation for analysis of amino and non-amino organic acids by GC-MS? *Metabolites* 1 (1), 3–20. doi:10.3390/metabol1010003
- Vincenzi, A., Le Roy, C. I., Ross, T., Rossi, M., Martin, T. C., Mohny, R. F., et al. (2019). Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nut. Commun.* 10 (1), 4205. doi:10.1038/s41502-019-12478-8
- Wacławik, B., Bullock, A., Schwaiblmair, M., Adamczak, C., Vekeman, S. A., van Dijk, G., et al. (2021). Gut bacteria-derived 3-hydroxyindole is a potent stimulator of intestinal motility via its action on L-type calcium channels. *PLoS Biol.* 19 (1), e10081070. doi:10.1371/journal.pbio.10081070
- Wan, Y., Yuan, J., Li, J., Li, H., Yin, K., Wang, F., et al. (2020). Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal triacylglyceride cycle intermediates. *Clin. Nutr.* 39 (10), 3189–3198. doi:10.1016/j.clnu.2020.02.014
- Yakov, I. M., Cross, J. D., Green, A. E., Kasting, D. J., Khan, W. J., and Heisberg, G. R. (2019). Emerging roles for serotonin in regulating metabolism: New implications for an ancient molecule. *Endocr. Rev.* 40 (4), 1092–1107. doi:10.1093/er/era0283
- Yu, Z., Kastenmüller, G., He, Y., Böhrer, P., Möller, G., Prehn, C., et al. (2011). Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS One* 6 (7), e21230. doi:10.1371/journal.pone.0021230
- Zarubi, E., Boyle, V., Ruppel, U., Green, S., Vilas-Boas, S. G., Baker, P., et al. (2014). Fully automated trimethylsilyl (TMS) derivatization protocol for metabolite profiling by GC-MS. *Metabolites* 7 (1), 1. doi:10.3390/metabol7010001
- Zhang, X.-w., Li, Q.-h., Xu, Z.-d., and Dou, J.-j. (2020). Mass spectrometry-based metabolomics in health and medical science: A systematic review. *BMC Adv. Res.* 10 (6), 3092–3104. doi:10.1039/C9RA00895C
- Zhao, L., Ni, Y., Yu, H., Zhang, P., Zhao, A., Bao, Y., et al. (2017). Serum stearic acid/palmitic acid ratio as a potential predictor of diabetes remission after Roux-Y gastric bypass in obesity. *FASEB J.* 31 (4), 1449–1460. doi:10.1096/fj.201609278
- Zhou, C., Zhang, Q., Liu, L., Wang, J., Liu, H., and Liu, Z. (2021). Metabolomic profiling of amino acids in human plasma distinguishes diabetic kidney disease from type 2 diabetes mellitus. *Front. Med.* 8, 763473. doi:10.3389/fmed.2021.763473
- Zhou, Z., Sun, B., Yu, D., and Zhu, C. (2022). Gut microbiota: An important player in type 2 diabetes mellitus. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 834485. doi:10.3389/fcimb.2022.834485

10. Streszczenie

Cukrzycę typu 2 (z ang. type 2 diabetes mellitus, T2DM) uważa się za jedną z najgroźniejszych chorób cywilizacyjnych XXI wieku. W początkowym etapie choroba ta zwykle przebiega bezobjawowo, przez co jej wczesne wykrywanie jest utrudnione. Przewlekła hiperglikemia prowadzi do wielu mikro- i makronaczyniowych powikłań, które mogą przyczyniać się do wielonarządowych uszkodzeń. Ze względu na ciągły wzrost liczby osób z T2DM, zasadne jest poszukiwanie nowych rozwiązań pozwalających na zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie tej choroby. W ostatnim czasie dużo uwagi poświęca się badaniom metabolomicznym, które wykorzystuje się między innymi do badania wpływu różnych czynnika odpowiedzialnych za rozwój T2DM.

Znaczącą rolę w etiologii tej choroby odgrywa mikrobiom jelitowy. Jest on odpowiedzialny m.in. za przemiany związków drobnocząsteczkowych, określanych mianem metabolitów zależnych od mikrobiomu (z ang. microbiota dependent metabolites, MDMs), które mogą również przenikać do krwiobiegu. Inne czynniki ryzyka rozwoju T2DM, takie jak niewłaściwa dieta, siedzący tryb życia oraz polimorfizmy genetyczne (np.: w genie PROX 1, z ang. Prospero Homeobox 1) także mogą powodować zmiany w poziomie MDMs. Dlatego też oznaczanie tego typu związków u pacjentów z grupy ryzyka może przyczynić się do wskazania panelu metabolitów biorących udział w procesach biochemicznych prowadzących do rozwoju T2DM. Chromatografia gazowa połączona ze spektrometrią mas (GC-MS) jest często wykorzystywana w badaniach metabolomicznych nad T2DM. Technika ta zyskała dużą popularność m.in. ze względu na możliwość jednoczesnej analizy wielu MDMs, należących do różnych klas. Jednak oznaczanie jak najszerzego spektrum MDMs w próbkach krwi wymaga optymalizacji protokołu przygotowania próbek. Jest to szczególnie ważne w przypadku analiz przy użyciu GC-MS, gdyż w przypadku wielu metabolitów konieczna jest ich derywatywacja przed oznaczeniem tą techniką.

Głównym celem badań było poszukiwanie metabolitów związanych z florą jelitową, wskazujących na ryzyko rozwoju T2DM. Aby zrealizować cel główny, wyznaczono następujące cele pośrednie: i) opracowanie metody przygotowania próbek osocza/surowicy do analiz przy użyciu GC-MS pozwalającej na jak najlepszy pomiar wybranych MDMs, ii) aplikacja opracowanej metody GC-MS do analizy próbek klinicznych celem wskazania różnic w profilu metabolitów surowicy pomiędzy pacjentami ze stanem przedcukrzycowym, a pacjentami ze zdiagnozowaną T2DM, iii) wykorzystanie techniki GC-MS do określenia poposiłkowych (posiłek wysokowęglowodanowy (WW) i normowęglowodanowy (NW))

zmian w profilu metabolitów osocza zdrowych mężczyzn w zależności od obecności polimorfizmu w genie PROX1.

W celu osiągnięcia założeń pracy naukowej i zweryfikowania postawionych hipotez badawczych, przeprowadzono badania naukowe na archiwalnym materiale biologicznym (próbki surowicy oraz osocza) zgromadzonym od ochotników rasy kaukaskiej podczas realizacji projektu pt. „Rola czynników behawioralnych, antropometrycznych i molekularnych w rozwoju cukrzycy typu 2 – projekt 1000PLUS”. Do badań wykorzystano materiał pobrany od 42 pacjentów w stanie przedcukrzycowym (53.0 ± 9.1 lat). Po 5 latach obserwacji u 24 pacjentów rozwinęła się T2DM, natomiast 18 pacjentów pozostało w stanie przedcukrzycowym). Dodatkowo wykorzystano materiał zebrany od 18 zdrowych mężczyzn (35.5 ± 8.0 lat) wśród których 12 charakteryzowało się genotypem ryzyka rozwoju T2DM w genie PROX1, a 6 miało genotyp ochronny. W obu badaniach osoby w porównywanych grupach były dopasowane pod względem parametrów klinicznych i antropometrycznych. Do opracowania metody przygotowania próbek wykorzystano krew od zdrowych osób.

Na podstawie dokonanego przeglądu literatury stwierdzono, że rozwojowi T2DM towarzyszą zmiany w poziomie metabolitów związanych z florą jelitową. Metabolity te to głównie węglowodany, aminokwasy oraz kwasy tłuszczowe. Podczas optymalizacji metody przygotowania próbek osocza/surowicy do oznaczeń MDMs techniką GC-MS okazało się, że najlepsze rezultaty uzyskuje się przy przygotowaniu próbek za pomocą metanolu z dodatkiem wody. Ponadto wykazano, że objętość i stężenie odczynnika do metoksymacji mają największy wpływ na powtarzalność i intensywność oznaczanych metabolitów, podczas gdy warunki procesu derywatywacji w największym stopniu wpływają na kompletność tego procesu. Opracowana metoda pozwala na powtarzalny pomiar w próbkach osocza lub surowicy 75 metabolitów związanych z florą jelitową. Na podstawie analizy próbek klinicznych wykazano różnice w profilu metabolitów związanych z florą jelitową pomiędzy osobami ze stanem przedcukrzycowym oraz ze zdiagnozowaną T2DM. Dodatkowo, w oparciu o otrzymane wyniki, wykonano analizy krzywych ROC dla wybranych zmiennych. Na ich podstawie wskazano panel siedmiu metabolitów, których pomiar w surowicy pozwala odróżnić osoby ze stanem przedcukrzycowym od osób z T2DM. Oba testy prowokacyjne (WW, NW) wywołały zmiany w poziomie MDMs u zdrowych osób mających predyspozycje genetyczne do rozwoju T2DM w genie PROX1, których nie odnotowano u osób z genotypem ochronnym. Różnice w odpowiedzi poposiłkowej mogą być źródłem wczesnych zaburzeń metabolicznych, także w poziomie metabolitów związanych z GM, które mogą być powiązane z przyszłym rozwojem T2DM.

11. Summary

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is considered one of the most dangerous civilization diseases of the 21st century. Often in the initial stage, this disease is asymptomatic, making its early detection challenging. Chronic hyperglycemia leads to various micro- and macrovascular complications that may contribute to multi-organ damage. Due to the continuous increase in the number of people with T2DM, it is reasonable to search for new solutions to understand the mechanisms responsible for the development of this disease. Recently, much attention has been paid to metabolomic studies, which are used, among others, to study the impact of various factors responsible for the development of T2DM.

The intestinal microbiome plays a significant role in the etiology of T2DM. It is responsible, among others, for transforming many small molecule compounds, known as microbiota-dependent metabolites (MDMs), which can also penetrate the bloodstream. Other risk factors for T2DM development, such as unhealthy diet, sedentary lifestyle, and genetic polymorphisms (e.g. in the PROX 1 gene, Prospero Homeobox 1), may also cause changes in the level of MDMs. Therefore, the determination of such compounds in patients at risk can indicate the biochemical processes leading to the development of T2DM. Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) is often used in metabolomics studies on T2DM. Among other applications, this technique has gained great popularity due to its ability to analyze many MDMs belonging to different classes. However, determining the widest possible spectrum of MDMs in blood samples requires optimizing the sample preparation protocol. This is particularly important in the case of GC-MS analysis, as many metabolites require derivatization before determination by this technique.

The main goal of my research was to search for metabolites related to gut microflora indicating the risk of T2DM development. To achieve the primary goal, the following intermediate objectives were set: i) the development of a serum/plasma sample preparation method for GC-MS analysis allowing for the best measurement of selected MDMs, ii) the application of the developed GC-MS method to the analysis of clinical samples to indicate differences in serum metabolic profiles between patients with prediabetes and T2DM, iii) using the GC-MS technique to determine postprandial (high-carbohydrate (HC) and normo-carbohydrate (NC) meal) changes in serum metabolite profiles of healthy men depending on the presence of the PROX1 gene single nucleotide polymorphism.

To achieve the goals and verify the hypotheses, scientific research was conducted on archival biological material (serum and plasma samples) collected from Caucasian volunteers during the implementation of the project entitled "The Role of Behavioral, Anthropometric, and Molecular Factors in the Development of Type 2 Diabetes - the 1000PLUS Project". The material obtained from 42 pre-diabetic patients (53.0 ± 9.1 years) was analyzed. From this group, after 5 years of observation, 24 patients developed T2DM, while 18 patients remained pre-diabetic. Additionally, material collected from 18 healthy men (35.5 ± 8.0 years) was analyzed. Among them, 12 had a genetic polymorphism in the PROX1 gene promoting T2DM development, and 6 had a protective genotype. In both studies, individuals in the groups being compared were matched for clinical and anthropometric parameters. Blood from healthy individuals was used to develop the sample preparation method.

Based on the literature review, it was found that the development of T2DM is accompanied by changes in the level of metabolites related to the gut microbiota. These metabolites are mainly carbohydrates, amino acids, and fatty acids. During the optimization of the sample preparation method for determining MDMs with GC-MS, it was found that the best results are obtained when samples are prepared with methanol and water. In addition, it was shown that the volume and concentration of the methoxyamine reagent have the greatest influence on the repeatability and intensity of the measured metabolites, while the conditions of the derivatization process have the greatest influence on the completeness of this process. The developed method allows the reproducible measurement of 75 serum/plasma metabolites associated with gut microbiota. Based on the analysis of clinical samples, differences in the profile of gut microbiota-related metabolites were shown between individuals with a pre-diabetic state and those with diagnosed T2DM. Additionally, for selected variables ROC curve analyses were performed. It allowed the selection of seven metabolites which measurement in serum allows to distinguish individuals with pre-diabetes from those with T2DM. Both provocative tests (WW, NW) caused changes in the level of MDMs in healthy individuals with genetic predispositions for the development of T2DM in the PROX1 gene, which were not observed in individuals with a protective genotype. These differences in postprandial response may be a source of early metabolic disturbances, also at the level of metabolites related to the gut microbiota, which may be associated with future T2DM development.

12. Piśmiennictwo:

1. Sobczak A, A Blindauer C, J Stewart A. Changes in Plasma Free Fatty Acids Associated with Type-2 Diabetes. *Nutrients*. 2019;11(9):2022. doi:10.3390/nu11092022
2. Li M, Chi X, Wang Y, Setrerrahmane S, Xie W, Xu H. Trends in insulin resistance: insights into mechanisms and therapeutic strategy. *Signal Transduct Target Ther*. Jul 06 2022;7(1):216. doi:10.1038/s41392-022-01073-0
3. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9. *Diabetes Res Clin Pract*. Nov 2019;157:107843. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
4. Castro-Correia C, Sousa S, Norberto S, et al. The Fatty Acid Profile in Patients with Newly Diagnosed Diabetes: Why It Could Be Unsuspected. *International Journal of Pediatrics*. 2017/09/11 2017;2017:6424186. doi:10.1155/2017/6424186
5. Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E Fau - Matsha TE, Matsha Te Fau - Kengne AP, Kengne AP. Diabetes mellitus and inflammation. (1539-0829 (Electronic))
6. Mojsak P, Maliszewska K, Klimaszewska P, et al. Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes. *Front Mol Biosci*. 2022;9:982672. doi:10.3389/fmolb.2022.982672
7. Mojsak P, Miniewska K, Godlewski A, et al. A Preliminary Study Showing the Impact of Genetic and Dietary Factors on GC-MS-Based Plasma Metabolome of Patients with and without. *Curr Issues Mol Biol*. Jun 29 2021;43(2):513-528. doi:10.3390/cimb43020039
8. Ericson U, Hindy G, Drake I, et al. Dietary and genetic risk scores and incidence of type 2 diabetes. *Genes & nutrition*. 2018;13:13-13. doi:10.1186/s12263-018-0599-1
9. Dietrich S, Jacobs S, Zheng J-S, Meidtner K, Schwingshackl L, Schulze MB. Gene-lifestyle interaction on risk of type 2 diabetes: A systematic review. *Obesity Reviews*. 2019;20(11):1557-1571. doi:<https://doi.org/10.1111/obr.12921>
10. Mojsak P, Rey-Stolle F, Parfieniuk E, Kretowski A, Ciborowski M. The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step. (1873-264X (Electronic))
11. Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes:. *Diabetes Care*. 01 2020;43(Suppl 1):S14-S31. doi:10.2337/dc20-S002
12. Dorcely B, Katz K, Jagannathan R, et al. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy*. 2017;10:345-361. doi:10.2147/DMSO.S100074
13. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. Jun 16 2012;379(9833):2279-90. doi:10.1016/S0140-6736(12)60283-9
14. Papadimitropoulos MP, Vasilopoulou CG, Maga-Nteve C, Klapa MI. Untargeted GC-MS Metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2018;1738:133-147. doi:10.1007/978-1-4939-7643-0_9
15. Gomes AC, Bueno AA, de Souza RG, Mota JF. Gut microbiota, probiotics and diabetes. *Nutr J*. Jun 17 2014;13:60. doi:10.1186/1475-2891-13-60
16. Ericson UA-O, Hindy G, Drake I, et al. Dietary and genetic risk scores and incidence of type 2 diabetes. (1555-8932 (Print))
17. Mahajan A, Go MJ, Zhang W, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet*. Mar 2014;46(3):234-44. doi:10.1038/ng.2897

18. Moosazadeh M, Asemi Z, Lankarani KB, et al. Family history of diabetes and the risk of gestational diabetes mellitus in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab Syndr*. Nov 2017;11 Suppl 1:S99-S104. doi:10.1016/j.dsx.2016.12.016
19. Harvey NL, Srinivasan RS, Dillard ME, et al. Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet*. Oct 2005;37(10):1072-81. doi:10.1038/ng1642
20. Kretowski A, Adamska E, Maliszewska K, et al. The rs340874 PROX1 type 2 diabetes mellitus risk variant is associated with visceral fat accumulation and alterations in postprandial glucose and lipid metabolism. (1555-8932 (Print))
21. Hindy G, Sonestedt E, Ericson U, et al. Role of TCF7L2 risk variant and dietary fibre intake on incident type 2 diabetes. *Diabetologia*. Oct 2012;55(10):2646-2654. doi:10.1007/s00125-012-2634-x
22. Adamska-Patruno E, Samczuk P, Ciborowski M, et al. Metabolomics Reveal Altered Postprandial Lipid Metabolism After a High-Carbohydrate Meal in Men at High Genetic Risk of Diabetes. *J Nutr*. 06 2019;149(6):915-922. doi:10.1093/jn/nxz024
23. Rabot S, Membrez M, Blancher F, et al. High fat diet drives obesity regardless the composition of gut microbiota in mice. *Sci Rep*. Aug 31 2016;6:32484. doi:10.1038/srep32484
24. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. Jul 2007;56(7):1761-72. doi:10.2337/db06-1491
25. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*. Feb 2010;5(2):e9085. doi:10.1371/journal.pone.0009085
26. Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, Fontés G, Poitout V. Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF-κB signalling. *PLoS One*. 2012;7(4):e36200. doi:10.1371/journal.pone.0036200
27. Wang X, Yang J, Qiu X, et al. Probiotics, Pre-biotics and Synbiotics in the Treatment of Pre-diabetes: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *Front Public Health*. 2021;9:645035. doi:10.3389/fpubh.2021.645035
28. Deda O, Chatziioannou AC, Fasoula S, et al. Sample preparation optimization in fecal metabolic profiling. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Mar 2017;1047:115-123. doi:10.1016/j.jchromb.2016.06.047
29. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr*. Aug 2011;6(3):209-40. doi:10.1007/s12263-011-0229-7
30. Org E, Blum Y, Kasela S, et al. Relationships between gut microbiota, plasma metabolites, and metabolic syndrome traits in the METSIM cohort. *Genome Biol*. 04 13 2017;18(1):70. doi:10.1186/s13059-017-1194-2
31. Miele L, Giorgio V, Alberelli MA, De Candia E, Gasbarrini A, Grieco A. Impact of Gut Microbiota on Obesity, Diabetes, and Cardiovascular Disease Risk. *Curr Cardiol Rep*. Dec 2015;17(12):120. doi:10.1007/s11886-015-0671-z
32. Harakeh SM, Khan I, Kumosani T, et al. Gut Microbiota: A Contributing Factor to Obesity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:95. doi:10.3389/fcimb.2016.00095
33. Bhupathiraju SN, Hu FB. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res*. May 2016;118(11):1723-35. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306825
34. Sanna S, van Zuydam NR, Mahajan A, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*. 04 2019;51(4):600-605. doi:10.1038/s41588-019-0350-x

35. Fassatoui M, Lopez-Siles M, Díaz-Rizzolo DA, et al. Gut microbiota imbalances in Tunisian participants with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Biosci Rep*. Jun 2019;39(6)doi:10.1042/BSR20182348
36. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. Dec 2015;528(7581):262-266. doi:10.1038/nature15766
37. Karlsson FH, Tremaroli V, Nookaew I, et al. Gut metagenome in European women with normal, impaired and diabetic glucose control. *Nature*. Jun 2013;498(7452):99-103. doi:10.1038/nature12198
38. Sedighi M, Razavi S, Navab-Moghadam F, et al. Comparison of gut microbiota in adult patients with type 2 diabetes and healthy individuals. *Microb Pathog*. Oct 2017;111:362-369. doi:10.1016/j.micpath.2017.08.038
39. Hur KY, Lee MS. Gut Microbiota and Metabolic Disorders. *Diabetes Metab J*. Jun 2015;39(3):198-203. doi:10.4093/dmj.2015.39.3.198
40. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. Sep 2013;54(9):2325-40. doi:10.1194/jlr.R036012
41. He L, Proadhan MAI, Yuan F, et al. Simultaneous quantification of straight-chain and branched-chain short chain fatty acids by gas chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Aug 2018;1092:359-367. doi:10.1016/j.jchromb.2018.06.028
42. Gar C, Rottenkolber M, Prehn C, Adamski J, Seissler J, Lechner A. Serum and plasma amino acids as markers of prediabetes, insulin resistance, and incident diabetes. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 01 2018;55(1):21-32. doi:10.1080/10408363.2017.1414143
43. Flores-Guerrero JL, Osté MCJ, Kieneker LM, et al. Plasma Branched-Chain Amino Acids and Risk of Incident Type 2 Diabetes: Results from the PREVEND Prospective Cohort Study. *J Clin Med*. Dec 2018;7(12)doi:10.3390/jcm7120513
44. Ma H, Patti ME. Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. Aug 2014;28(4):573-83. doi:10.1016/j.bpg.2014.07.004
45. Han S, Van Treuren W, Fischer CR, et al. A metabolomics pipeline for the mechanistic interrogation of the gut microbiome. *Nature*. 07 2021;595(7867):415-420. doi:10.1038/s41586-021-03707-9
46. Du L, Li Q, Yi H, Kuang T, Tang Y, Fan G. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in type 2 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother*. May 2022;149:112839. doi:10.1016/j.biopha.2022.112839
47. Payling L, Fraser K, Loveday SM, Sims I, Roy N, McNabb W. The effects of carbohydrate structure on the composition and functionality of the human gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*. 2020/01/20/2020;doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.01.009>
48. Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*. Feb 2012;61(2):364-71. doi:10.2337/db11-1019
49. Ríos-Covián D, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Gueimonde M, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol*. 2016;7:185. doi:10.3389/fmicb.2016.00185
50. Chakraborti CK. New-found link between microbiota and obesity. *World J Gastrointest Pathophysiol*. Nov 2015;6(4):110-9. doi:10.4291/wjgp.v6.i4.110
51. Wu X, Wu Y, He L, Wu L, Wang X, Liu Z. Effects of the intestinal microbial metabolite butyrate on the development of colorectal cancer. *J Cancer*. 2018;9(14):2510-2517. doi:10.7150/jca.25324

52. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *J Gastroenterol*. Jan 2017;52(1):1-8. doi:10.1007/s00535-016-1242-9
53. Feng W, Ao H, Peng C. Gut Microbiota, Short-Chain Fatty Acids, and Herbal Medicines. *Front Pharmacol*. 2018;9:1354. doi:10.3389/fphar.2018.01354
54. Sato J, Kanazawa A, Ikeda F, et al. Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Aug 2014;37(8):2343-50. doi:10.2337/dc13-2817
55. Adachi K, Sugiyama T, Yamaguchi Y, et al. Gut microbiota disorders cause type 2 diabetes mellitus and homeostatic disturbances in gut-related metabolism in Japanese subjects. *J Clin Biochem Nutr*. May 2019;64(3):231-238. doi:10.3164/jcbn.18-101
56. Schwartz A, Taras D, Schäfer K, et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. Jan 2010;18(1):190-5. doi:10.1038/oby.2009.167
57. Neis EP, Dejong CH, Rensen SS. The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. *Nutrients*. Apr 2015;7(4):2930-46. doi:10.3390/nu7042930
58. Donadelli RA, Titgemeyer EC, Aldrich CG. Organic matter disappearance and production of short- and branched-chain fatty acids from selected fiber sources used in pet foods by a canine in vitro fermentation model. *J Anim Sci*. Nov 2019;97(11):4532-4539. doi:10.1093/jas/skz302
59. Lin H, An Y, Hao F, Wang Y, Tang H. Correlations of Fecal Metabonomic and Microbiomic Changes Induced by High-fat Diet in the Pre-Obesity State. *Sci Rep*. Feb 2016;6:21618. doi:10.1038/srep21618
60. Suzuki Y, Kido J, Matsumoto S, Shimizu K, Nakamura K. Associations among amino acid, lipid, and glucose metabolic profiles in childhood obesity. *BMC Pediatr*. Aug 2019;19(1):273. doi:10.1186/s12887-019-1647-8
61. Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr*. Jul 2000;130(7):1857S-64S. doi:10.1093/jn/130.7.1857S
62. Dai Z, Wu Z, Hang S, Zhu W, Wu G. Amino acid metabolism in intestinal bacteria and its potential implications for mammalian reproduction. *Mol Hum Reprod*. May 2015;21(5):389-409. doi:10.1093/molehr/gav003
63. Kathuria SV, Chan YH, Nobrega RP, Özen A, Matthews CR. Clusters of isoleucine, leucine, and valine side chains define cores of stability in high-energy states of globular proteins: Sequence determinants of structure and stability. *Protein Sci*. Mar 2016;25(3):662-75. doi:10.1002/pro.2860
64. Ning Ma XM. Dietary Amino Acids and the Gut-Microbiome-Immune Axis: Physiological Metabolism and Therapeutic Prospects. *Food Science and Food Safety*. 2018;18:221-242. doi:10.1111/1541-4337.12401
65. Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*. Apr 2011;17(4):448-53. doi:10.1038/nm.2307
66. Stancáková A, Civelek M, Saleem NK, et al. Hyperglycemia and a common variant of GCKR are associated with the levels of eight amino acids in 9,369 Finnish men. *Diabetes*. Jul 2012;61(7):1895-902. doi:10.2337/db11-1378
67. Chen S, Akter S, Kuwahara K, et al. Serum amino acid profiles and risk of type 2 diabetes among Japanese adults in the Hitachi Health Study. *Sci Rep*. May 2019;9(1):7010. doi:10.1038/s41598-019-43431-z
68. Maechler P. Glutamate pathways of the beta-cell and the control of insulin secretion. *Diabetes Res Clin Pract*. Sep 2017;131:149-153. doi:10.1016/j.diabres.2017.07.009
69. Cabrera O, Jacques-Silva MC, Speier S, et al. Glutamate is a positive autocrine signal for glucagon release. *Cell Metab*. Jun 2008;7(6):545-54. doi:10.1016/j.cmet.2008.03.004

70. Ruiz-Canela M, Guasch-Ferré M, Toledo E, et al. Plasma branched chain/aromatic amino acids, enriched Mediterranean diet and risk of type 2 diabetes: case-cohort study within the PREDIMED Trial. *Diabetologia*. 07 2018;61(7):1560-1571. doi:10.1007/s00125-018-4611-5
71. Ahola-Olli AV, Mustelin L, Kalimeri M, et al. Circulating metabolites and the risk of type 2 diabetes: a prospective study of 11,896 young adults from four Finnish cohorts. *Diabetologia*. Dec 2019;62(12):2298-2309. doi:10.1007/s00125-019-05001-w
72. Staley C, Weingarden AR, Khoruts A, Sadowsky MJ. Interaction of gut microbiota with bile acid metabolism and its influence on disease states. *Appl Microbiol Biotechnol*. Jan 2017;101(1):47-64. doi:10.1007/s00253-016-8006-6
73. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Curr Opin Gastroenterol*. May 2014;30(3):332-8. doi:10.1097/MOG.0000000000000057
74. Ardeshirlarijani E, Tabatabaei-Malazy O, Mohseni S, Qorbani M, Larijani B, Baradar Jalili R. Effect of probiotics supplementation on glucose and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *Daru*. Dec 2019;27(2):827-837. doi:10.1007/s40199-019-00302-2
75. Yadav H, Jain S, Sinha PR. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition*. Jan 2007;23(1):62-8. doi:10.1016/j.nut.2006.09.002
76. Lu YC, Yin LT, Chang WT, Huang JS. Effect of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 treatment on renal fibrosis in diabetic rats. *J Biosci Bioeng*. Dec 2010;110(6):709-15. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.006
77. Chen J, Wang R, Li XF, Wang RL. *Bifidobacterium adolescentis* supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. May 2012;107(10):1429-34. doi:10.1017/S0007114511004491
78. Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol*. Feb 2003;17(2):161-71. doi:10.1210/me.2002-0306
79. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition*. May 2012;28(5):539-43. doi:10.1016/j.nut.2011.08.013
80. Hou W, Zhong D, Zhang P, et al. A strategy for the targeted metabolomics analysis of 11 gut microbiota-host co-metabolites in rat serum, urine and feces by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Jan 2016;1429:207-17. doi:10.1016/j.chroma.2015.12.031
81. Chen MX, Wang SY, Kuo CH, Tsai IL. Metabolome analysis for investigating host-gut microbiota interactions. *J Formos Med Assoc*. Mar 2019;118 Suppl 1:S10-S22. doi:10.1016/j.jfma.2018.09.007
82. Zhgun ES, Iliina EN. Fecal Metabolites As Non-Invasive Biomarkers of Gut Diseases. *Acta Naturae*. 2020;12(2):4-14. doi:10.32607/actanaturae.10954
83. Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, Le Roy CI. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients*. Nov 2019;11(12)doi:10.3390/nu11122862
84. Kiseleva O, Kurbatov I, Ilgisonis E, Poverennaya E. Defining Blood Plasma and Serum Metabolome by GC-MS. *Metabolites*. Dec 24 2021;12(1)doi:10.3390/metabo12010015
85. Vernocchi P, Del Chierico F, Putignani L. Gut Microbiota Profiling: Metabolomics Based Approach to Unravel Compounds Affecting Human Health. *Front Microbiol*. 2016;7:1144. doi:10.3389/fmicb.2016.01144
86. Lin R, Liu W, Piao M, Zhu H. A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino Acids*. Dec 2017;49(12):2083-2090. doi:10.1007/s00726-017-2493-3

87. Gall WE, Beebe K, Lawton KA, et al. alpha-hydroxybutyrate is an early biomarker of insulin resistance and glucose intolerance in a nondiabetic population. *PLoS one*. 2010;5(5):e10883-e10883. doi:10.1371/journal.pone.0010883
88. Qiu G, Zheng Y, Wang H, et al. Plasma metabolomics identified novel metabolites associated with risk of type 2 diabetes in two prospective cohorts of Chinese adults. *Int J Epidemiol*. 10 2016;45(5):1507-1516. doi:10.1093/ije/dyw221
89. Visconti A, Le Roy CI, Rosa F, et al. Interplay between the human gut microbiome and host metabolism. *Nat Commun*. 10 2019;10(1):4505. doi:10.1038/s41467-019-12476-z
90. Martin AM, Sun EW, Rogers GB, Keating DJ. The Influence of the Gut Microbiome on Host Metabolism Through the Regulation of Gut Hormone Release. *Front Physiol*. 2019;10:428. doi:10.3389/fphys.2019.00428
91. Wan Y, Yuan J, Li J, et al. Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clin Nutr*. 10 2020;39(10):3189-3198. doi:10.1016/j.clnu.2020.02.014
92. Gojda J, Cahova M. Gut Microbiota as the Link between Elevated BCAA Serum Levels and Insulin Resistance. *Biomolecules*. 09 28 2021;11(10)doi:10.3390/biom11101414
93. Tan C, Zheng Z, Wan X, Cao J, Wei R, Duan J. The role of gut microbiota and amino metabolism in the effects of improvement of islet β -cell function after modified jejunioleal bypass. *Sci Rep*. 02 26 2021;11(1):4809. doi:10.1038/s41598-021-84355-x
94. Fiehn O. Metabolomics by Gas Chromatography-Mass Spectrometry: Combined Targeted and Untargeted Profiling. *Curr Protoc Mol Biol*. Apr 2016;114:30.4.1-30.4.32. doi:10.1002/0471142727.mb3004s114
95. Gonzalez-Covarrubias V, Martínez-Martínez E, Del Bosque-Plata L. The Potential of Metabolomics in Biomedical Applications. *Metabolites*. Feb 19 2022;12(2)doi:10.3390/metabo12020194
96. Suhre K, Meisinger C, Döring A, et al. Metabolic footprint of diabetes: a multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS One*. Nov 2010;5(11):e13953. doi:10.1371/journal.pone.0013953
97. Cobb J, Eckhart A, Motsinger-Reif A, Carr B, Groop L, Ferrannini E. α -Hydroxybutyric Acid Is a Selective Metabolite Biomarker of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*. 2016;39(6):988. doi:10.2337/dc15-2752
98. Blahova J, Martiniakova M, Babikova M, Kovacova V, Mondockova V, Omelka R. Pharmaceutical Drugs and Natural Therapeutic Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmaceuticals (Basel)*. Aug 17 2021;14(8)doi:10.3390/ph14080806
99. Goetzman ES, Gong Z, Schiff M, Wang Y, Muzumdar RH. Metabolic pathways at the crossroads of diabetes and inborn errors. *J Inherit Metab Dis*. 01 2018;41(1):5-17. doi:10.1007/s10545-017-0091-x
100. Heaney LM. Applying mass spectrometry-based assays to explore gut microbial metabolism and associations with disease. *Clin Chem Lab Med*. 04 28 2020;58(5):719-732. doi:10.1515/cclm-2019-0974
101. Bekele EA, Annaratone CE, Hertog ML, Nicolai BM, Geeraerd AH. Multi-response optimization of the extraction and derivatization protocol of selected polar metabolites from apple fruit tissue for GC-MS analysis. *Anal Chim Acta*. May 08 2014;824:42-56. doi:10.1016/j.aca.2014.03.030
102. Moros G, Chatziioannou AC, Gika HG, Raikos N, Theodoridis G. Investigation of the derivatization conditions for GC-MS metabolomics of biological samples. *Bioanalysis*. Jan 2017;9(1):53-65. doi:10.4155/bio-2016-0224
103. Dudzik D, Zorawski M, Skotnicki M, et al. GC-MS based Gestational Diabetes Mellitus longitudinal study: Identification of 2-and 3-hydroxybutyrate as potential prognostic biomarkers. *J Pharm Biomed Anal*. Sep 10 2017;144:90-98. doi:10.1016/j.jpba.2017.02.056

104. A J, Trygg J, Gullberg J, et al. Extraction and GC/MS analysis of the human blood plasma metabolome. *Anal Chem*. Dec 15 2005;77(24):8086-94. doi:10.1021/ac051211v
105. Malm L, Tybring G, Moritz T, Landin B, Galli J. Metabolomic Quality Assessment of EDTA Plasma and Serum Samples. *Biopreserv Biobank*. Oct 2016;14(5):416-423. doi:10.1089/bio.2015.0092
106. Szeremeta M, Pietrowska K, Niemcunowicz-Janica A, Kretowski A, Ciborowski M. Applications of Metabolomics in Forensic Toxicology and Forensic Medicine. *Int J Mol Sci*. Mar 16 2021;22(6)doi:10.3390/ijms22063010
107. Eylem CC, Nemetlu E, Dogan A, et al. High-Throughput Single-Step plasma sample extraction optimization strategies with experimental design for LC-MS and GC-MS integrated metabolomics and lipidomics analysis. *Microchemical Journal*. 2022/08/01/ 2022;179:107525. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107525>
108. He Z, Luo Q, Liu Z, Gong L. Extensive evaluation of sample preparation workflow for gas chromatography-mass spectrometry-based plasma metabolomics and its application in rheumatoid arthritis. *Anal Chim Acta*. Sep 22 2020;1131:136-145. doi:10.1016/j.aca.2020.06.029
109. Villas-Bôas SG, Smart KF, Sivakumaran S, Lane GA. Alkylation or Silylation for Analysis of Amino and Non-Amino Organic Acids by GC-MS? *Metabolites*. Jan 2011;1(1):3-20. doi:10.3390/metabo1010003
110. Shareef A, Angove MJ, Wells JD. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. Mar 2006;1108(1):121-8. doi:10.1016/j.chroma.2005.12.098
111. Zarate E, Boyle V, Rupprecht U, et al. Fully Automated Trimethylsilyl (TMS) Derivatization Protocol for Metabolite Profiling by GC-MS. *Metabolites*. Dec 2016;7(1)doi:10.3390/metabo7010001
112. Schummer C, Delhomme O, Appenzeller BM, Wennig R, Millet M. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta*. Feb 2009;77(4):1473-82. doi:10.1016/j.talanta.2008.09.043
113. Kaluarachchi M, Boulangé CL, Karaman I, et al. A comparison of human serum and plasma metabolites using untargeted. *Metabolomics*. 02 13 2018;14(3):32. doi:10.1007/s11306-018-1332-1
114. Guasch-Ferré M, Hruby A, Toledo E, et al. Metabolomics in Prediabetes and Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care*. May 2016;39(5):833-46. doi:10.2337/dc15-2251
115. Yu Z, Kastenmüller G, He Y, et al. Differences between human plasma and serum metabolite profiles. *PLoS One*. 2011;6(7):e21230. doi:10.1371/journal.pone.0021230
116. Suarez-Diez M, Adam J, Adamski J, et al. Plasma and Serum Metabolite Association Networks: Comparability within and between Studies Using NMR and MS Profiling. *J Proteome Res*. 07 07 2017;16(7):2547-2559. doi:10.1021/acs.jproteome.7b00106
117. Sotelo-Orozco J, Chen SY, Hertz-Picciotto I, Slupsky CM. A Comparison of Serum and Plasma Blood Collection Tubes for the Integration of Epidemiological and Metabolomics Data. *Front Mol Biosci*. 2021;8:682134. doi:10.3389/fmolb.2021.682134
118. Bartel J, Krumsiek J, Theis FJ. Statistical methods for the analysis of high-throughput metabolomics data. *Comput Struct Biotechnol J*. 2013;4:e201301009. doi:10.5936/csbj.201301009
119. Nordström A, Want E, Northen T, Lehtiö J, Siuzdak G. Multiple ionization mass spectrometry strategy used to reveal the complexity of metabolomics. *Anal Chem*. Jan 15 2008;80(2):421-9. doi:10.1021/ac701982e

120. Rey-Stolle F, Dudzik D, Gonzalez-Riano C, et al. Low and high resolution gas chromatography-mass spectrometry for untargeted metabolomics: A tutorial. *Anal Chim Acta*. Jun 01 2022;1210:339043. doi:10.1016/j.aca.2021.339043
121. Drogan D, Dunn WB, Lin W, et al. Untargeted metabolic profiling identifies altered serum metabolites of type 2 diabetes mellitus in a prospective, nested case control study. *Clin Chem*. Mar 2015;61(3):487-97. doi:10.1373/clinchem.2014.228965
122. Fiehn O, Garvey WT, Newman JW, Lok KH, Hoppel CL, Adams SH. Plasma metabolomic profiles reflective of glucose homeostasis in non-diabetic and type 2 diabetic obese African-American women. *PLoS One*. Dec 2010;5(12):e15234. doi:10.1371/journal.pone.0015234
123. Liu J, Semiz S, van der Lee SJ, et al. Metabolomics based markers predict type 2 diabetes in a 14-year follow-up study. *Metabolomics*. 2017;13(9):104. doi:10.1007/s11306-017-1239-2
124. He Z, Liu Z, Gong L. Systematic evaluation of sample preparation strategy for GC-MS-based plasma metabolomics and its application in osteoarthritis. *Anal Biochem*. 05 15 2021;621:114153. doi:10.1016/j.ab.2021.114153
125. Che Z, Liang Y-Z, Li H-D, Deng J, Zhou Z. GC-MS Based Plasma Metabolic Profiling of Type 2 Diabetes Mellitus. *Chromatographia*. 05/01 2009;69:941-948. doi:10.1365/s10337-009-1040-0
126. Ciborowski M, Teul J, Martin-Ventura JL, Egido J, Barbas C. Metabolomics with LC-QTOF-MS permits the prediction of disease stage in aortic abdominal aneurysm based on plasma metabolic fingerprint. *PLoS One*. 2012;7(2):e31982. doi:10.1371/journal.pone.0031982
127. Xu J, Zhang Q, Zheng J, Yuan B-F, Feng Y-Q. Mass spectrometry-based fecal metabolome analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 03/01 2019;112doi:10.1016/j.trac.2018.12.027
128. Zhou C, Zhang Q, Lu L, Wang J, Liu D, Liu Z. Metabolomic Profiling of Amino Acids in Human Plasma Distinguishes Diabetic Kidney Disease From Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:765873. doi:10.3389/fmed.2021.765873
129. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2011;708:191-204. doi:10.1007/978-1-61737-985-7_11
130. Miyagawa H, Bamba T. Comparison of sequential derivatization with concurrent methods for GC/MS-based metabolomics. *J Biosci Bioeng*. Feb 2019;127(2):160-168. doi:10.1016/j.jbiosc.2018.07.015
131. Shepherd T, Dobson G, Verrall S, et al. Potato metabolomics by GC-MS: What are the limiting factors? *Metabolomics*. 12/01 2007;3:475-488. doi:10.1007/s11306-007-0058-2
132. Pasikanti KK, Ho PC, Chan EC. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabolomic platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*. Oct 2008;22(19):2984-92. doi:10.1002/rcm.3699
133. Musharraf SG, Mazhar S, Siddiqui AJ, Choudhary MI, Atta-ur-Rahman. Metabolite profiling of human plasma by different extraction methods through gas chromatography-mass spectrometry--an objective comparison. *Anal Chim Acta*. Dec 04 2013;804:180-9. doi:10.1016/j.aca.2013.10.025
134. Fritsche-Guenther R, Gloaguen Y, Bauer A, et al. Optimized Workflow for On-Line Derivatization for Targeted Metabolomics Approach by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Metabolites*. Dec 18 2021;11(12)doi:10.3390/metabo11120888
135. Sitnikov DG, Monnin CS, Vuckovic D. Systematic Assessment of Seven Solvent and Solid-Phase Extraction Methods for Metabolomics Analysis of Human Plasma by LC-MS. *Sci Rep*. 12 21 2016;6:38885. doi:10.1038/srep38885

136. Dutta A, Shetty P, Bhat S, Ramachandra Y, Hegde S. A mass spectrometric study for comparative analysis and evaluation of metabolite recovery from plasma by various solvent systems. *J Biomol Tech.* Dec 2012;23(4):128-35. doi:10.7171/jbt.12-2304-001
137. Moon K, Lim C, Kim S, Oh DC. Facile determination of the absolute configurations of α -hydroxy acids by chiral derivatization coupled with liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A.* Jan 2013;1272:141-4. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.006
138. Engel B, Suralik P, Marchetti-Deschmann M. Critical considerations for trimethylsilyl derivatives of 24 primary metabolites measured by gas chromatography–tandem mass spectrometry. <https://doi.org/10.1002/sscp.202000025>. *SEPARATION SCIENCE PLUS.* 2020/09/01 2020;3(9):407-418. doi:<https://doi.org/10.1002/sscp.202000025>
139. Raczowska BA, Mojsak P, Rojo D, et al. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy-Based Metabolomics Analysis Reveals Potential Biochemical Markers for Diagnosis of Gestational Diabetes Mellitus. *Front Pharmacol.* 2021;12:770240. doi:10.3389/fphar.2021.770240
140. Danielsson APH, Moritz T, Mulder H, Spégel P. Development of a gas chromatography/mass spectrometry based metabolomics protocol by means of statistical experimental design. *Metabolomics.* 2012/02/01 2012;8(1):50-63. doi:10.1007/s11306-011-0283-6
141. Moldoveanu S, David V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. 2018.
142. Wu H, Tremaroli V, Schmidt C, et al. The Gut Microbiota in Prediabetes and Diabetes: A Population-Based Cross-Sectional Study. *Cell Metab.* Sep 01 2020;32(3):379-390.e3. doi:10.1016/j.cmet.2020.06.011
143. Zhang L, Chu J, Hao W, et al. Gut Microbiota and Type 2 Diabetes Mellitus: Association, Mechanism, and Translational Applications. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:5110276. doi:10.1155/2021/5110276
144. Baothman OA, Zamzami MA, Taher I, Abubaker J, Abu-Farha M. The role of Gut Microbiota in the development of obesity and Diabetes. *Lipids Health Dis.* Jun 18 2016;15:108. doi:10.1186/s12944-016-0278-4
145. Pedersen HK, Gudmundsdottir V, Nielsen HB, et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature.* 07 21 2016;535(7612):376-81. doi:10.1038/nature18646
146. Zhao L, Zhang F, Ding X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science.* Mar 09 2018;359(6380):1151-1156. doi:10.1126/science.aao5774
147. Blaak EE, Antoine JM, Benton D, et al. Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity.* 2012;13(10):923-984. doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01011.x
148. Johnson RJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, et al. Sugar, uric acid, and the etiology of diabetes and obesity. *Diabetes.* Oct 2013;62(10):3307-15. doi:10.2337/db12-1814
149. Akinkuolie AO, Pradhan AD, Buring JE, Ridker PM, Mora S. Novel protein glycan side-chain biomarker and risk of incident type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Jun 2015;35(6):1544-50. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305635
150. Lorenzo C, Festa A, Hanley AJ, Rewers MJ, Escalante A, Haffner SM. Novel Protein Glycan-Derived Markers of Systemic Inflammation and C-Reactive Protein in Relation to Glycemia, Insulin Resistance, and Insulin Secretion. *Diabetes Care.* Mar 2017;40(3):375-382. doi:10.2337/dc16-1569
151. Connelly MA, Gruppen EG, Wolak-Dinsmore J, et al. GlycA, a marker of acute phase glycoproteins, and the risk of incident type 2 diabetes mellitus: PREVEND study. *Clin Chim Acta.* Jan 2016;452:10-7. doi:10.1016/j.cca.2015.11.001

152. Wilding JP. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. *Diabet Med*. Sep 2007;24(9):934-45. doi:10.1111/j.1464-5491.2007.02186.x
153. Carmena R. Type 2 diabetes, dyslipidemia, and vascular risk: rationale and evidence for correcting the lipid imbalance. *Am Heart J*. Nov 2005;150(5):859-70. doi:10.1016/j.ahj.2005.04.027
154. Qureshi W, Santaren ID, Hanley AJ, Watkins SM, Lorenzo C, Wagenknecht LE. Risk of diabetes associated with fatty acids in the de novo lipogenesis pathway is independent of insulin sensitivity and response: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *BMJ Open Diabetes Research & Care*. 2019;7(1):e000691. doi:10.1136/bmjdr-2019-000691
155. Spiller S, Blüher M, Hoffmann R. Plasma levels of free fatty acids correlate with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 11 2018;20(11):2661-2669. doi:10.1111/dom.13449
156. Jia X, Xu W, Zhang L, Li X, Wang R, Wu S. Impact of Gut Microbiota and Microbiota-Related Metabolites on Hyperlipidemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:634780. doi:10.3389/fcimb.2021.634780
157. Rohr MW, Narasimhulu CA, Rudeski-Rohr TA, Parthasarathy S. Negative Effects of a High-Fat Diet on Intestinal Permeability: A Review. *Adv Nutr*. Jan 01 2020;11(1):77-91. doi:10.1093/advances/nmz061
158. Forouhi NG, Imamura F, Sharp SJ, et al. Association of Plasma Phospholipid n-3 and n-6 Polyunsaturated Fatty Acids with Type 2 Diabetes: The EPIC-InterAct Case-Cohort Study. *PLoS Med*. 07 2016;13(7):e1002094. doi:10.1371/journal.pmed.1002094
159. Lu Y, Wang Y, Ong C-N, et al. Metabolic signatures and risk of type 2 diabetes in a Chinese population: an untargeted metabolomics study using both LC-MS and GC-MS. *Diabetologia*. 2016/11/01 2016;59(11):2349-2359. doi:10.1007/s00125-016-4069-2
160. Zhou Z, Sun B, Yu D, Zhu C. Gut Microbiota: An Important Player in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:834485. doi:10.3389/fcimb.2022.834485
161. Cobb J, Eckhart A, Motsinger-Reif A, Carr B, Groop L, Ferrannini E. α -Hydroxybutyric Acid Is a Selective Metabolite Biomarker of Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*. 04/05 2016;39:dc152752. doi:10.2337/dc15-2752
162. Vangipurapu J, Stancáková A, Smith U, Kuusisto J, Laakso M. Nine Amino Acids Are Associated With Decreased Insulin Secretion and Elevated Glucose Levels in a 7.4-Year Follow-up Study of 5,181 Finnish Men. *Diabetes*. 06 2019;68(6):1353-1358. doi:10.2337/db18-1076
163. Ferrannini E, Natali A, Camastra S, et al. Early metabolic markers of the development of dysglycemia and type 2 diabetes and their physiological significance. *Diabetes*. May 2013;62(5):1730-7. doi:10.2337/db12-0707
164. Sousa AP, Cunha DM, Franco C, et al. Which Role Plays 2-Hydroxybutyric Acid on Insulin Resistance? *Metabolites*. Dec 03 2021;11(12)doi:10.3390/metabo11120835
165. Tricò D, Prinsen H, Giannini C, et al. Elevated α -Hydroxybutyrate and Branched-Chain Amino Acid Levels Predict Deterioration of Glycemic Control in Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*. 07 01 2017;102(7):2473-2481. doi:10.1210/jc.2017-00475
166. Agus A, Planchais J, Sokol H. Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease. *Cell Host Microbe*. 06 13 2018;23(6):716-724. doi:10.1016/j.chom.2018.05.003
167. Davila AM, Blachier F, Gotteland M, et al. Re-print of "Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host". *Pharmacol Res*. Mar 2013;69(1):114-26. doi:10.1016/j.phrs.2013.01.003
168. Shen G, Wu J, Ye BC, Qi N. Gut Microbiota-Derived Metabolites in the Development of Diseases. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2021;2021:6658674. doi:10.1155/2021/6658674

169. Long J, Yang Z, Wang L, et al. Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*. 2020/11/23 2020;20(1):174. doi:10.1186/s12902-020-00653-x
170. Fikri AM, Smyth R, Kumar V, Al-Abadla Z, Abusnana S, Munday MR. Pre-diagnostic biomarkers of type 2 diabetes identified in the UAE's obese national population using targeted metabolomics. *Sci Rep*. 10 2020;10(1):17616. doi:10.1038/s41598-020-73384-7
171. Holeček M. Branched-chain amino acids in health and disease: metabolism, alterations in blood plasma, and as supplements. *Nutrition & metabolism*. 2018;15:33-33. doi:10.1186/s12986-018-0271-1
172. Lynch CJ, Adams SH. Branched-chain amino acids in metabolic signalling and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*. Dec 2014;10(12):723-36. doi:10.1038/nrendo.2014.171
173. Hu H, Nakagawa T, Honda T, et al. Low serum creatinine and risk of diabetes: The Japan Epidemiology Collaboration on Occupational Health Study. *J Diabetes Investig*. Sep 2019;10(5):1209-1214. doi:10.1111/jdi.13024
174. Oxenkrug G. Insulin resistance and dysregulation of tryptophan-kynurenine and kynurenine-nicotinamide adenine dinucleotide metabolic pathways. *Mol Neurobiol*. Oct 2013;48(2):294-301. doi:10.1007/s12035-013-8497-4
175. Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, Bertrand PP. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*. Jan 20 2016;8(1)doi:10.3390/nu8010056
176. Gao K, Mu CL, Farzi A, Zhu WY. Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain. *Adv Nutr*. 05 01 2020;11(3):709-723. doi:10.1093/advances/nmz127
177. Al-Zoairy R, Pedrini MT, Khan MI, et al. Serotonin improves glucose metabolism by Serotonylation of the small GTPase Rab4 in L6 skeletal muscle cells. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9:1. doi:10.1186/s13098-016-0201-1
178. Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev*. 08 01 2019;40(4):1092-1107. doi:10.1210/er.2018-00283
179. Jenstad M, Chaudhry FA. The Amino Acid Transporters of the Glutamate/GABA-Glutamine Cycle and Their Impact on Insulin and Glucagon Secretion. *Front Endocrinol (Lausanne)*. Dec 31 2013;4:199. doi:10.3389/fendo.2013.00199
180. Cheng S, Rhee EP, Larson MG, et al. Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation*. May 08 2012;125(18):2222-31. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067827

13. Informacje o charakterze udziału współautorów w publikacji

„The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step” autorów: Patrycja Mojsak, Fernanda Rey–Stolle, Ewa Parfieniuk, Adam Krętowski, Michał Ciborowski, opublikowanej w Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2020:191, Article ID 113623, 25 pp

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant – mgr Patrycja Mojsak	– koncepcja pracy – współuczestnictwo w gromadzeniu literatury – współtworzenie manuskryptu	80%
Fernanda Rey–Stolle	– współuczestnictwo w gromadzeniu literatury – współtworzenie manuskryptu	5%
dr n med. Ewa Parfieniuk	– współuczestnictwo w gromadzeniu literatury	5%
prof. dr hab. Adam Krętowski	– opracowanie koncepcji pracy – ocena merytoryczna pracy	5%
dr hab. Michał Ciborowski	– opracowanie koncepcji pracy – nadzorowanie pracy – analiza i dyskusja wyników – ocena merytoryczna pracy	5%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Patrycji Mojsak.

M^a Fernanda Rey-Stolle Valcarce

14/03/2023, Madrid, Spain

.....
name and last name of the author

.....
date, place

Centre for Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO)

.....
affiliation/name of the university

San Pablo CEU University,
Boadilla del Monte, Madrid, Spain

Statement

I confirm that in the article:

„The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step” by Patrycja Mojsak, Fernanda Rey-Stolle, Ewa Parfieniuk, Adam Krętowski, Michał Ciborowski published in Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2020: 30; 191: 113617 which is a part of the doctoral dissertation of Patrycja Mojsak, my contribution (5%) included a literature search and substantive evaluation of the manuscript.

I agree to use this publication by Patrycja Mojsak, in the procedure for awarding the doctoral degree in the field of medical sciences and health sciences in the discipline of medical sciences.



.....
signature

Dr n med. Ewa Paszkowska

Białystok, 10.05.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsowość, data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step” autorów: Patrycja Mojsak, Fernanda Rey-Stolle, Ewa Parfieniuk, Adam Krętowski, Michał Ciborowski, opublikowanej w Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2020: 191, 113623; wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na współuczestnictwie w gromadzeniu literatury.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ewa Paszkowska
(Parfieniuk)

Prof. dr hab. Adam Krętowski

Białystok, 09.05.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsowość, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„**The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step**” autorów: Patrycja Mojsak, Fernanda Rey-Stolle, Ewa Parfieniuk, Adam Krętowski, Michał Ciborowski, opublikowanej w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2020: 191, 113623, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy oraz ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

dr hab. Michał Ciborowski

Białystok, 09.05.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsce, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„The role of gut microbiota (GM) and GM-related metabolites in diabetes and obesity. A review of analytical methods used to measure GM-related metabolites in fecal samples with a focus on metabolites' derivatization step” autorów: Patrycja Mojsak, Fernanda Rey-Stolle, Ewa Parfieniuk, Adam Krętowski, Michał Ciborowski, opublikowanej w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2020; 191, 113623, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu pracy, analizie i dyskusji wyników oraz ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ciborowski

„Optimization of a GC–MS method for the profiling of microbiota–dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes”

autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Krętowski, Michał Ciborowski; opublikowanej w *Frontiers Molecular Biosciences* 2022: 9, 982672.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant – mgr Patrycja Mojsak	<ul style="list-style-type: none">– opracowanie koncepcji pracy– przeprowadzenie badania– analiza danych– opracowanie manuskryptu	50%
dr n. med. Katarzyna Maliszewska	<ul style="list-style-type: none">– opracowanie koncepcji pracy– ocena merytoryczna uzyskanych wyników,– współtworzenie manuskryptu	20%
mgr Paulina Klimaszewska	<ul style="list-style-type: none">– opracowanie metodyki badania– przeprowadzenie analiz	5%
dr n. med. Katarzyna Miniewska	<ul style="list-style-type: none">– współtworzenie manuskryptu	5%
dr Joanna Godzien	<ul style="list-style-type: none">– ocena merytoryczna pracy	5%
mgr Julia Sieminska	<ul style="list-style-type: none">– analiza danych	5%
prof. dr hab. Adam Krętowski	<ul style="list-style-type: none">– opracowaniu koncepcji pracy– pozyskanie finansowania na przeprowadzenie badania– nadzorowanie pracy	5%
dr hab. Michał Ciborowski	<ul style="list-style-type: none">– opracowanie koncepcji pracy– nadzorowanie pracy– analiza i dyskusja wyników– ocena merytoryczna pracy	5%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Patrycji Mojsak.

Dr Katarzyna Maliszewska

Białystok, 03.05.2013

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsowość, data

Klinika Endokrynologii, Diabetologii
i Chorób Wewnętrznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowane we *Frontiers Molecular Biosciences* 9:982672, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 20 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy, ocenie merytorycznej uzyskanych wyników oraz współtworzeniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

K. Maliszewska

Mgr Paulina Klimaszewska

Białystok, 10.05.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsowość, data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowane we *Frontiers Molecular Biosciences* 9:982672, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu metodyki badania oraz przeprowadzeniu analiz.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Paulina Klimaszewska

Dr n. med. Katarzyna Miniewska

Białystok, 28.01.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsce i data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: an application to type 2 diabetes and prediabetes”, autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Krętowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (2020:191, Article ID 113617), wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na współtworzeniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Katarzyna Miniewska

Dr Joanna Godzien

Białystok, 10.05.2023

.....
imię / nazwisko współzawodnika

.....
miejsce, data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowane we *Frontiers Molecular Biosciences* 9:982672, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Mgr Julia Siemińska

Białystok,

10. 03. 2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsceowość, data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowane we *Frontiers Molecular Biosciences* 9:982672, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na analizie danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Julia Siemińska

Prof. dr hab. Adam Krętowski

Białystok, 10. 05. 2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsce, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowane we *Frontiers Molecular Biosciences* 9:982672, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy, pozyskiwaniu finansowania na przeprowadzone badania oraz nadzorowaniu pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



dr hab. Michał Ciborowski

Białystok, 09.05.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejscowość, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

Optimization of a GC-MS method for the profiling of microbiota-dependent metabolites in blood samples: An application to type 2 diabetes and prediabetes autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Maliszewska, Paulina Klimaszewska, Katarzyna Miniewska, Joanna Godzien, Julia Sieminska, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowane we *Frontiers Molecular Biosciences* 9:982672, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy, nadzorowaniu pracy, analizie i dyskusji wyników oraz ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ciborowski

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC–MS–based plasma metabolome of patients with and without PROX1–genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska–Patruno, Paulina Samczuk, Fernanda Rey–Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Krętowski, Michał Ciborowski opublikowanej w w *Current Issue in Molecular Biology* 2021: 43, 513–528.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant – mgr Patrycja Mojsak	– opracowanie koncepcji pracy – przeprowadzenie badania – analiza danych – opracowanie manuskryptu	60%
dr n. med. Katarzyna Miniewska	– wykonanie analizy statystycznej – współtworzenie manuskryptu	10%
mgr Adrian Godlewski	– opracowanie metodyki badania – przeprowadzenie analiz	5%
dr hab. Edyta Adamska–Patruno	– opracowanie koncepcji pracy	2%
dr n. med. Paulina Samczuk	– przygotowanie próbek do badań, – analiza danych	5%
Fernanda Rey–Stolle	– analiza danych – ocena merytoryczna pracy	2%
dr inż. Witold Bauer	– analiza statystyczna	3%
Coral Barbas	– ocena merytoryczna pracy	3%
prof. dr hab. Adam Krętowski	– opracowaniu koncepcji pracy – nadzorowanie pracy	5%
dr hab. Michał Ciborowski	– opracowanie koncepcji pracy – analiza i dyskusja wyników – ocena merytoryczna pracy	5%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższej publikacji w pracy doktorskiej mgr Patrycji Mojsak.

Dr. n. med. Katarzyna Miniewska

.....
imię i nazwisko współautora

Białystok, 28.01.2023

.....
miejsce i data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Krętowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Current Issue in Molecular Biology 2021: 43, 513-528., wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 10 % polegał na wykonaniu analizy statystycznej oraz współtworzeniu manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Katarzyna Miniewska

Mgr Adrian Godlewski

Białystok,

24.03.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsowość, data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowanej w *Current Issue in Molecular Biology* 2021: 43 (2), 513-528, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu metodyki badania oraz przeprowadzeniu analiz.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Adrian Godlewski

Dr hab. Edyta Adamska-Patrano

.....
imię i nazwisko współautora

Białystok,

09.05.2023
.....
miejsce, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Current Issue in Molecular Biology 2021: 43 (2), 513-528, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 2 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Edyta Adamska Patano

dr n. med. Paulina Samczuk

.....
imię i nazwisko współautora

Białystok, 18.01.2023 r.

.....
miejsowość, data

Laboratorium Metabolomiki, Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

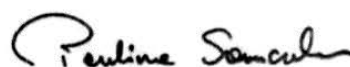
15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Krętowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Current Issue in Molecular Biology 2021: 43, 513-528., wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na przygotowaniu próbek do badań oraz analizie danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



M^a Fernanda Rey-Stolle Valcarce

14/03/2023, Madrid, Spain

.....
name and last name of the author

.....
data, place

Centre for Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO)

.....
affiliation/name of the university

San Pablo CEU University,
Boadilla del Monte, Madrid, Spain

Statement

I confirm that in the article:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” by Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michał Ciborowski published in Current Issue in Molecular Biology 2021: 43 (2), 513-528 which is a part of the doctoral dissertation of Patrycja Mojsak, my contribution (2%) included data analysis and substantive evaluation of the manuscript.

I agree to use this publication by Patrycja Mojsak, in the procedure for awarding the doctoral degree in the field of medical sciences and health sciences in the discipline of medical sciences.



.....
signature

Dr inż. Witold Bauer

.....
imię i nazwisko współautora

Białystok, 09.05.2023

.....
miejsce i data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROXI-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Corał Barbas, Adam Krętowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Current Issue in Molecular Biology 2021: 43, 513-528., wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 3% polegał na wykonaniu analizy statystycznej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Coral Barbas Arribas

14/03/2023, Madrid, Spain

.....
name and last name of the author

.....
date, place

Centre for Metabolomics and Bioanalysis (CEMBIO)

.....
affiliation/name of the university

San Pablo CEU University,
Boadilla del Monte, Madrid, Spain

Statement

I confirm that in the article:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” by Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patruno, Paulina Sameczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michal Ciborowski published in Current Issue in Molecular Biology 2021: 43 (2), 513-528 which is a part of the doctoral dissertation of Patrycja Mojsak, my contribution (3%) included substantive evaluation of the manuscript.

I agree to use this publication by Patrycja Mojsak, in the procedure for awarding the doctoral degree in the field of medical sciences and health sciences in the discipline of medical sciences.



.....
signature

Prof. dr hab. Adam Krętowski

.....
imię i nazwisko współautora

Białystok, 09.05.2023

.....
miejsowość, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a
15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROXI-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patrano, Paulina Samczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Current Issue in Molecular Biology 2021: 43 (2), 513-528, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy oraz nadzorowaniu pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.



Dr hab. Michał Ciborowski

Białystok, 09.05.2023

.....
imię i nazwisko współautora

.....
miejsce, data

Centrum Badań Klinicznych

.....
nazwa jednostki

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

ul. Marii Skłodowskiej-Curie 24a

15-276 Białystok

Oświadczenie

Oświadczam, iż mój udział w przygotowaniu publikacji:

„A preliminary study showing the impact of genetic and dietary factors on GC-MS-based plasma metabolome of patients with and without PROX1-genetic predisposition to T2DM up to 5 years prior to prediabetes appearance” autorów: Patrycja Mojsak, Katarzyna Miniewska, Adrian Godlewski, Edyta Adamska-Patruno, Paulina Sameczuk, Fernanda Rey-Stolle, Witold Bauer, Coral Barbas, Adam Kretowski, Michał Ciborowski opublikowanej w Current Issue in Molecular Biology 2021: 43 (2), 513-528, wchodzącej w skład rozprawy doktorskiej „Wykorzystanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas do poszukiwania metabolitów związanych z mikrobiomem jelitowym, wskazujących na ryzyko rozwoju cukrzycy typu 2”, wynoszący 5 % polegał na opracowaniu koncepcji pracy, analizie i dyskusji wyników oraz ocenie merytorycznej pracy.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie przez Patrycję Mojsak publikacji w postępowaniu o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Ciborowski

14. Zgoda Komisji Bioetycznej

KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIwersYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 19.05.2022 r.

Uchwała nr: APK.002.239.2022

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz. U. z 2021 r. poz. 790 z późn. zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Poszukiwanie metabolitów związanych z rozwojem i czynnikami predysponującymi do rozwoju cukrzycy typu 2” przez dr hab. Michała Ciborowskiego wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 19.05.2022 r. do XII.2023 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Powinno:

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik jednostki, w której eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wielośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08
prorektorat@umwb.edu.pl

Białystok, 30-01-2014

Uchwała nr: R-1-002/32/2014

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Rola czynników behawioralnych, antropometrycznych i molekularnych w rozwoju cukrzycy typu 2 u pacjentów z nadwagą i otyłością” przez prof. dr hab. Marię Górską wraz z zespołem badawczym.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB

Prof. dr hab. Elżbieta Hassman-Poznańska

UNIwersytet Medyczny
w Białymstoku
KOMISJA BIOETYCZNA
15-010 Białystok, ul. Jana Kochanowskiego 1

Uchwała nr: R-I-002/35/2009

29-01-2009r.

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP / Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** /na prowadzenie tematu badawczego: „Analiza genetycznych uwarunkowań odpowiedzi metabolicznej na dietę o różnej zawartości węglowodanów, białek i tłuszczu. Poszukiwanie genetycznych markerów do indywidualizacji żywienia pacjentów z otyłością i cukrzycą typu 2” przez prof. dr hab. Marię Górską wraz z zespołem badawczym.

Przewodnicząca Komisji


prof. dr hab. Elżbieta Hassmann-Poznańska