

Диагностика нарушенной толерантности к глюкозе прямым масс-спектрометрическим анализом метаболитов в плазме крови

К.б.н. П.Г. ЛОХОВ^{1*}, к.б.н. О.П. ТРИФОНОВА¹, к.б.н. Д.Л. МАСЛОВ¹, к.б.н. Е.Е. БАЛАШОВА¹,
акад. РАН А.И. АРЧАКОВ¹, Е.А. ШЕСТАКОВА², член-корр. РАН М.В. ШЕСТАКОВА²,
акад. РАН И.И. ДЕДОВ²

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» РАН; ²ФГБУ «Эндокринологический научный центр» Минздрава России, Москва

Исследована возможность применения прямого масс-спектрометрического анализа метаболитов в плазме крови для диагностики нарушенной толерантности к глюкозе (НТГ). Образцы плазмы контрольной группы лиц без нарушений углеводного обмена ($n=30$) и пациентов с НТГ ($n=20$) обрабатывали метанолом для осаждения белков, и оставшуюся фракцию метаболитов анализировали на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре. Выявлено 230 ионов метаболитов, уровень которых связан с наличием у пациента НТГ. Точность диагностики на основе масс-спектрометрического анализа данных метаболитов составила 92% (специфичность 94%, чувствительность 89%, площадь под ROC-кривой 0,94, воспроизводимость 85%). Выявленные метаболиты, среди которых эндоканабиноиды, крезол, орнитин, фосфолипиды и жирные кислоты, связаны с ранее описанными риск-факторами сахарного диабета. Таким образом, прямой масс-спектрометрический анализ метаболитов в плазме крови позволяет диагностировать НТГ и может быть использован в клинической практике в качестве альтернативы глюкозотолерантному тесту как более быстрый и воспроизводимый тест.

Ключевые слова: диагностика, метаболиты в плазме крови, масс-спектрометрический анализ, нарушенная толерантность к глюкозе, сахарный диабет.

Diagnostics of impaired glucose tolerance by the direct mass-spectrometric analysis of plasma metabolites

P.G. LOKHOV^{1*}, O.P. TRIFONOVA¹, D.L. MASLOV¹, E.E. BALASHOVA¹, A.I. ARCHAKOV¹, E.A. SHESTAKOVA²,
M.V. SHESTAKOVA², I.I. DEDOV²

¹V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russian Federation; ²Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

We have investigated the possibility of application of the direct mass-spectrometric analysis of plasma metabolites for diagnostics of impaired glucose tolerance (IGT). The plasma samples obtained from the control group of patients showing no disturbances of carbohydrate metabolism ($n=30$) and those with IGT ($n=20$) were treated with methanol to precipitate proteins and the residual fractions were analysed on a quadrupole flight-of-time mass-spectrometer. A total of 230 metabolites were identified the levels of which were attributable to IGT. The accuracy of diagnostics using the mass-spectrometric analysis was 92% (specificity 94%, sensitivity 89%, area under the Roc-curve 0.94, reproducibility 85%). The detected metabolites included endocannabinoids, cresol, ornithine, phospholipids, and fatty acids the presence of which was related to the previously described risk factors of diabetes mellitus. It is concluded that the direct spectrometric analysis of plasma metabolites can be used in routine clinical practice as a more rapid and better reproducible alternative method in comparison with the glucose tolerance test.

Key words: diagnostics, plasma metabolites, mass-spectrometric analysis, impaired glucose tolerance, diabetes mellitus.

Нарушенная толерантность к глюкозе (НТГ) является состоянием, связанным с повышенным риском развития сахарного диабета (СД) 2-го типа (СД2) [1]. В настоящий момент пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ) является золотым стандартом диагностики СД и других нарушений гликемии, в том числе НТГ. Однако этот тест характеризуется низкой воспроизводимостью [2, 3]. Более того, проведение ПГТТ требует времени и подготовки пациента. Таким образом, создание более быстрого и воспроизводимого теста для диагностики НТГ является актуальным.

В данной работе была исследована возможность применения метаболомных методов для диагности-

ки НТГ. В метаболомике большое количество метаболитов может быть определено одномоментно в образце крови, что упрощает диагностику заболеваний [4]. В большинстве случаев метаболомный анализ проводится в несколько стадий [5], применение которых позволяет идентифицировать биомаркеры различных заболеваний, включая метаболиты, указывающие на развитие СД [6]. Среди метаболомных технологий прямой масс-спектрометрический анализ можно считать наиболее приемлемым для применения в клинической диагностике. В данном подходе анализируемый биологический материал непосредственно вносится в источник ионизации масс-спектрометра без какого-либо предварительного

разделения входящих в него веществ хроматографическим или иным методом. Таким образом, являясь одностадийным процессом, прямой масс-спектрометрический анализ характеризуется быстротой выполнения и высокой воспроизводимостью и может быть рассмотрен как прототип клинических анализов [5]. Поэтому именно прямой масс-спектрометрический анализ был исследован в данной работе в качестве средства диагностики НТГ.

Материал и методы

В исследовании были использованы образцы крови пациентов, обратившихся в поликлинику ФГБУ ЭНЦ Минздрава России (Москва). Исследование было одобрено этическим комитетом данного учреждения. Все пациенты подписали информированное согласие на использование образцов их крови в научных исследованиях. Кровь брали из кубитальной вены утром, натощак, с использованием стеклянных вакутейнеров с K_2EDTA (BD Vacutainer, США). Биохимический анализ крови (уровень глюкозы, мочевины, общего холестерина, инсулина, триглицеридов, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП)) проводили на биохимическом анализаторе Architect c4000 («Abbott Diagnostics», США). Гликированный гемоглобин (HbA_{1c}) измеряли анализатором Bio-Rad D10 («Bio-Rad Laboratories», Франция). Глюкозотолерантный тест проводили путем перорального введения пациентам 75 г глюкозы, растворенной в 250 мл воды, и измерения уровня глюкозы в крови через 2 ч. В соответствии с классификацией ВОЗ 2006 г., НТГ диагностировали, если

уровень глюкозы плазмы натощак не превышал 6,0 ммоль/л, а через 2 ч находился в диапазоне от 7,8 до 11,0 ммоль/л включительно [7]. Результаты ПГТТ использовали для формирования двух групп: экспериментальной группы пациентов с НТГ ($n=20$) и контрольной группы лиц без нарушений углеводного обмена ($n=30$) пациентов. В табл. 1 представлены клинические характеристики обеих групп.

Для масс-спектрометрического анализа использовали плазму крови, полученную центрифугированием образцов крови в течение 15 мин при 1600 g и комнатной температуре. Полученную плазму (10 мкл) смешивали с 10 мкл воды («LiChrosolv», Германия) и 80 мкл метанола («Fluka», Германия) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре для осаждения белка. После чего образцы центрифугировали при 13000 g («MiniSpin plus», Германия) в течение 15 мин. Супернатант разбавляли 50-ю объемами метанола, содержащего 0,1% муравьиной кислоты («Fluka») и анализировали на квадруполь-времяпролетном масс-спектрометре maXis Impact («Bruker Daltonics», США), оборудованном электроспрейным источником ионизации. Масс-спектрометр был настроен на детекцию положительно заряженных ионов в диапазоне m/z 50–1000. Точность измерения составляла 1–3 ppm. Растворы образцов вводили в электроспрейный источник ионизации со скоростью 180 мкл/ч с помощью шприцевого насоса. Порядок анализа образцов был рандомизирован.

Детектируемые в плазме ионы метаболитов, интенсивность которых связана с наличием у пациентов НТГ [с площадью под ROC-кривой (AUC) >0,7)], были использованы для расчета диагности-

Таблица 1. Клинические характеристики экспериментальной и контрольной групп пациентов

Характеристика	Величина (среднее значение \pm стандартное отклонение/диапазон)		AUC	<i>t</i> -тест (<i>p</i>)
	контрольная группа	пациенты с НТГ		
Число пациентов	30	20	—	—
Пол (м/ж)	15/15	10/10	0,51	—
Возраст, годы	53,3 \pm 14,3/32–82	61,8 \pm 12,2/38–85	0,46	0,0306
ИМТ, кг/м ²	35,4 \pm 8,3/25,0–53,2	33,9 \pm 8,9/23,2–57,0	0,66	0,8173
Уровень глюкозы натощак, ммоль/л	5,5 \pm 0,3/4,8–6,1	5,6 \pm 0,3/5–6,1	0,56	0,6080
Уровень глюкозы в ПГТ, ммоль/л	6,4 \pm 1,0/4,1–7,8	9,9 \pm 1,3/8,2–11,0	1,00 *	0,0000
Инсулин, мкЕд/мл	16,1 \pm 20,0/3,3–100,8	14,5 \pm 7,9/4,9–31,7	0,59	0,7753
HbA_{1c} , % (ммоль/мл)	5,8 \pm 0,4/5,1–6,4 (40 \pm 4,4/32–46)	6,1 \pm 0,4/5,4–6,6 (43 \pm 4,4/36–49)	0,77	0,0003
ЛПНП, ммоль/л	3,4 \pm 0,7/1,7–5,3	3,1 \pm 1,0/1,6–4,7	0,41	0,8108
ЛПВП, ммоль/л	1,2 \pm 0,4/0,7–1,9	1,1 \pm 0,4/0,6–1,9	0,4	0,4534
Общий холестерин, ммоль/л	5,2 \pm 0,8/3,9–6,6	5,1 \pm 1,2/3,0–6,8	0,47	0,4220
Мочевая кислота, мкмоль/л	374 \pm 83/223–514	386 \pm 83/255–581	0,54	0,7182
Триглицериды, ммоль/л	1,3 \pm 0,6/0,5–3,0	1,69 \pm 0,9/0,8–3,9	0,62	0,1314
НОМА-IR	3,2 \pm 2,9/0,82–15	3,6 \pm 2,1/1,1–8,5	0,59	0,8195
НОМА- β	130 \pm 113/31–568	139 \pm 76/55–283	0,58	0,6889
мб-ПГТТ	43 \pm 33/7–152	131 \pm 48/33–202	0,94	0,0000

Примечание. * — AUC для глюкозы в ПГТТ равен 1, так как результат ПГТТ был использован для формирования экспериментальной и контрольной групп.

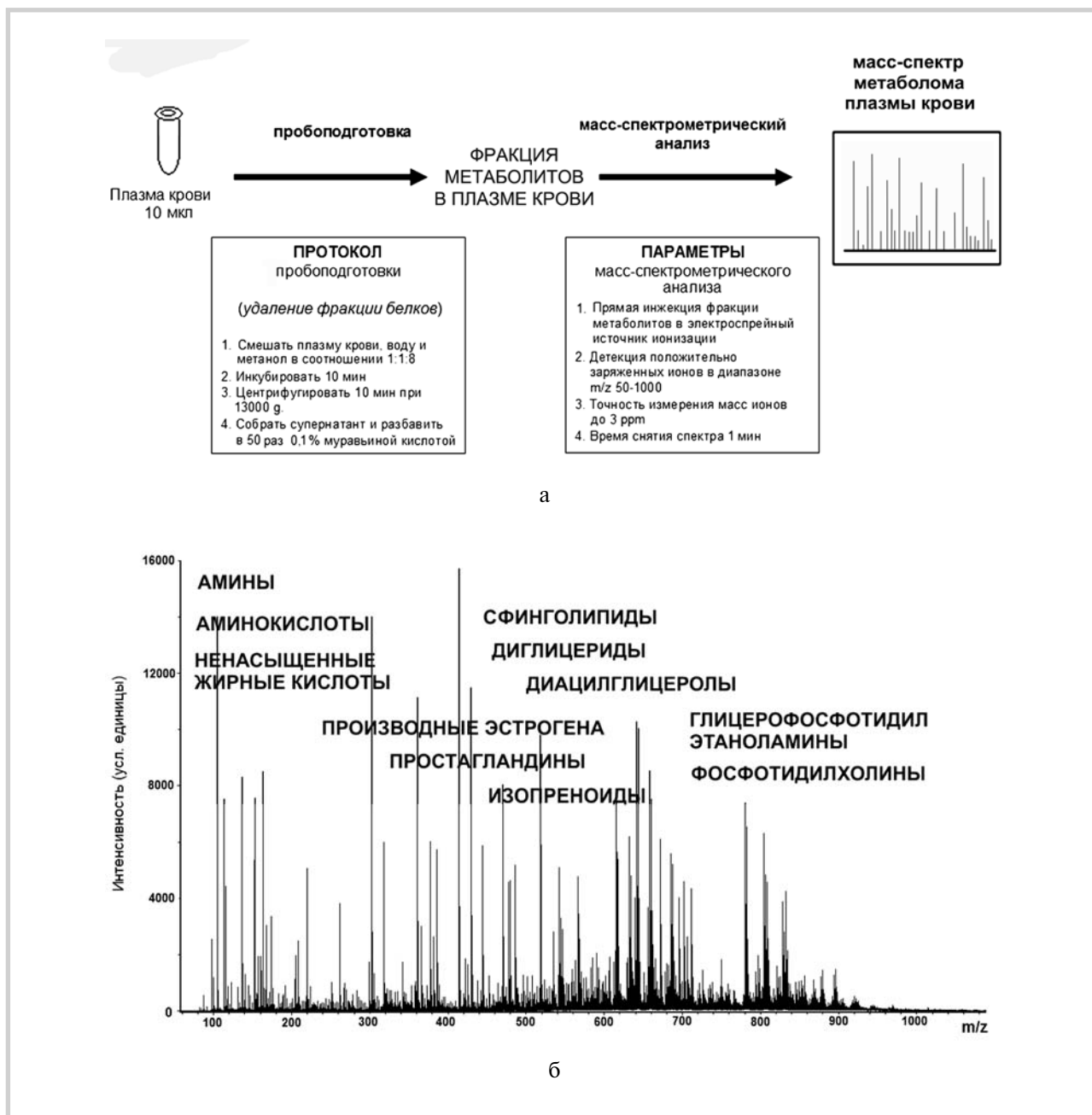


Рис. 1. Протокол метаболомного анализа плазмы, используемый при мб-ПГТТ (а) и масс-спектр, полученный в соответствии с этим протоколом (б).

На спектре показаны основные группы детектируемых метаболитов.

ческого показателя для ПГТТ, работающего на основе совокупности метаболитов плазмы (далее мб-ПГТТ). С этой целью интенсивность каждого такого метаболита рассматривалась как мера отдельного теста, имеющего два результата на НТГ: положительный, равный «1», и отрицательный, равный «0». Интенсивность пика, соответствующая максимальной точности такого теста, бралась за отсечение между положительным и отрицательным результатом теста. Для расчета диагностического показателя

для мб-ПГТТ все положительные результаты, т.е. единицы, суммировались.

Результаты и обсуждение

Масс-спектрометрический анализ низкомолекулярной фракции плазмы позволил детектировать примерно 4000 ионов метаболитов в одном образце (рис. 1). При этом интенсивность 230 ионов коррелировала с наличием НТГ у пациента с АУС более 0,7.

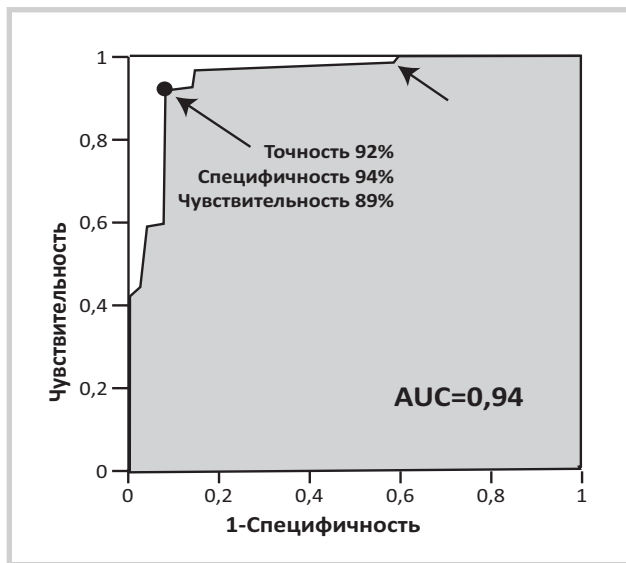


Рис. 2. ROC-кривая для мб-ПГТТ.

Точка, указанная на ROC-кривой, соответствует максимальной точности мб-ПГТТ. Площадь под ROC-кривой (т.е. AUC) выделена затемнением.

Так, уровень 103 ионов увеличивался при НТГ, а 127 ионов, наоборот, уменьшался. Величина AUC для мб-ПГТТ составила 0,94 (рис. 2).

Расчет AUC («Area under ROC-curve» — площадь под ROC-кривой) является общепринятым способом оценки диагностического теста. AUC, равная 0,5–0,6, показывает, что тест не может использоваться для диагностики заболевания; при величине AUC 0,6–0,7 тест имеет низкую диагностическую ценность, 0,7–0,8 — среднюю, а 0,9–1,0 — высокую [8]. AUC для мб-ПГТТ, равная 0,94, показывает, что данный тест является высокоэффективным для диагностики НТГ (максимальная точность теста при этом равна 92%). Однако эффективность мб-ПГТТ не достигла максимально возможного значения, так как контрольная и экспериментальная группы формировались на основе ПГТТ, который также имеет погрешность.

Следует отметить, что основным недостатком ПГТТ является его низкая воспроизводимость [2, 3]. Уровень глюкозы в крови колеблется в широких пределах, и ее коэффициент вариации (CV — coefficient of variation; процентное соотношение стандартного отклонения величины к ее среднему значению) в 2-часовом ПГТТ составляет ~25% [2], что и приводит к очень низкой воспроизводимости результатов. Такой высокий CV неприемлем для биоаналитических тестов, где его значение, равное 15%, рассматривается как максимально допустимое [9].

Уровень метаболитов в крови также имеет высокий CV (~45%) [10]. Как следствие, метаболические тесты с применением масс-спектрометрических методов характеризуются очень низкой воспроизводи-

мостью, что мешает их внедрению в клиническую практику [11]. Применение мб-ПГТТ, основанного на использовании совокупности связанных с НТГ метаболитов, устраняет этот недостаток. Расчет такого многопараметрического показателя приводит к усреднению ошибки, заложенной в измерении отдельных метаболитов. В результате CV диагностического показателя мб-ПГТТ составил всего 7,8%, что существенно ниже показателей CV, допустимых для биоаналитических тестов. Вследствие малого значения CV, измеренная в эксперименте воспроизводимость мб-ПГТТ составила 85% (табл. 2).

Идентификация ионов метаболитов, входящих в мб-ПГТТ, является дополнительным подтверждением релевантности данного теста. Идентифицированные метаболиты, уровень которых в крови увеличивается при НТГ с AUC >0,7, представлены в табл. 3, среди которых как уже известные метаболиты, ответственные за развитие СД, так и ранее не описанные.

Известно, что амиды жирных кислот (эндоканабиониды), к которым относятся выявленные в исследовании линолеамид, олеамид и стеарамид, играют важную роль в развитии предиабетических нарушений углеводного обмена. Активация эндоканабионидной системы приводит к увеличению потребления пищи [12] и развитию метаболического синдрома (увеличение индекса массы тела, окружности талии, увеличение в крови уровня инсулина) [13]. Повышенный уровень жирных кислот, который зарегистрирован у пациентов с НТГ, также подтверждается ранее полученными данными. Так, метаболический синдром характеризуется повышенным уровнем липидов [14], в том числе и жирных кислот [15].

Фосфатидилхолин, включающий в свой состав углеродные цепи олеиновой и миристиновой кислот, был также увеличен в крови пациентов с НТГ. Данный факт может являться отражением метаболического синдрома, связанного с НТГ и характеризующегося липидными нарушениями.

Децендикислота относится к дикарбоновым кислотам, увеличение экскреции которых с мочой зарегистрировано у пациентов с СД2, и которые рассматриваются как маркеры окислительного воздействия на жирные кислоты [16]. Увеличенный уровень в крови децендикислоты в нашем исследовании может указывать на наличие подобного окислительного воздействия на жирные кислоты при НТГ. Однако для подтверждения этого требуются дальнейшие исследования.

α -Кетоктановая кислота — кетокислота с разветвленным углеродным радикалом, является интермедиатом в катаболизме лейцина. Недавно было установлено, что лейцин и другие аминокислоты с разветвленной углеродной цепью являются биомаркерами риска развития СД [6]. β -Кетоктановая

Таблица 2. Сравнительная характеристика воспроизводимости результатов глюкозотолерантных тестов и коэффициента вариации измеряемых в этих тестах параметров

Тест	Количество измеряемых параметров	Измеряемые параметры	Коэффициент вариации (CV) измеряемых параметров	Воспроизводимость результатов теста
ПГТТ	1	Уровень глюкозы в плазме	25% [3]	56% [3]
мб-ПГТТ	230	Уровень связанных с НТГ метаболитов в плазме	7,8% (~45% для одного параметра [11])	85%

Таблица 3. Метаболиты в плазме, уровень которых увеличивается при НТГ с величиной AUC более 0,7

Метаболит (идентификационный номер в базе)	Молекулярный вес		Детектируемый ион	Элементный состав	Тест Вилкоксона (p)	AUC
	измеренный (m/z)	рассчитанный по элементному составу (Да)				
Линолеамид (Metlin ID 43435)	280,2631	280,2635	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ NO	0,0012	0,77
	302,2432	302,2454	[M+Na] ⁺		0,0101	0,71
Олеамид (HMDB02117)	282,2778	282,2791	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ NO	0,0178	0,71
Стеарамид (HMDB34146)	284,2916	284,2948	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₇ NO	0,0052	0,74
Децендикислота (HMDB00603)	223,0943	223,0941	[M+Na] ⁺	C ₁₀ H ₁₆ O ₄	0,0288	0,72
α- или β-кетоктоановая кислота (HMDB13211 или HMDB10721)	181,0827	181,0835	[M+Na] ⁺	C ₈ H ₁₄ O ₃	0,0335	0,71
Октановая кислота (HMDB00392)	165,0859	165,0886	[M+Na] ⁺	C ₈ H ₁₄ O ₂	0,0183	0,73
Молочная кислота (HMDB00190)	135,0014	135,0029	[M+2Na-H] ⁺	C ₃ H ₆ O ₃	0,0027	0,76
Яблочная кислота (HMDB00156)	178,9882	178,9927	[M+2Na-H] ⁺	C ₄ H ₆ O ₅	0,0204	0,72
Глюкуроновая кислота (HMDB00127)	239,0164	239,0138	[M+2Na-H] ⁺	C ₆ H ₁₀ O ₇	0,0303	0,71
Фосфогликолевая кислота (HMDB00816)	200,9532	200,9535	[M+2Na-H] ⁺	C ₂ H ₅ O ₆ P	0,016	0,74
	156,9831	156,9897	[M+H] ⁺			
П-крезол сульфат (HMDB11635)	211,0033	211,0035	[M+Na] ⁺	C ₇ H ₈ O ₄ S	0,0050	0,76
Орнитин (HMDB00214)	133,0962	133,0972	[M+H] ⁺	C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	0,0227	0,72
Фосфатидилхолин (HMDB08097)	366,7848	366,7805	[M+2H] ²⁺	C ₄₀ H ₈ NO ₈ P	0,0580	0,71

кислота — жирная кислота, которая образуется из малонил-коэнзима. Высокий уровень β-кетоктоановой кислоты был установлен у пациентов с избыточным весом и СД2 [17]. Таким образом, одна из двух, а возможно и обе кетоктоановые кислоты вносят вклад в мб-ПГТТ (используемый метод идентификации метаболитов не позволяет различить α- и β-кетокислоты).

П-крезол сульфат — метаболит микробов и вторичный метаболит п-крезола. Известно, что больные с СД имеют высокую концентрацию как свободного, так и общего п-крезола в крови [18].

Орнитин — аминокислота, произведенная в мочевоом цикле. Уровень орнитина в плазме крови повышен у пациентов с СД2 в результате пониженной активности аргиназы [19].

Фосфогликолевая кислота является субстратом для триозофосфат изомеразы. В литературе нет данных о повышении ее уровня при НТГ у пациентов.

Среди метаболитов, характеризующихся низким уровнем при НТГ, изменение уровня ионов калия вносило основной вклад. Ранее было показано, что калий понижен при диабетическом кетоацидозе [20]. Точнее, в организме происходит интенсивное

выведение положительно заряженных ионов калия через почки, ввиду выделения ими в кровь отрицательно заряженных кетонов, представленных также и при НТГ. Таким образом, зарегистрированное снижение ионов калия подтверждается ранее установленными данными.

Идентификация других метаболитов, также характеризующихся низким уровнем при НТГ, осложнена вследствие некоторых особенностей используемого метода ионизации. Ионизация электроспреем отличается возможностью образования анализируемыми веществами квазионов, в том числе и с калием. В данном исследовании у пациентов с НТГ уровень калия значительно менялся и, как следствие, менялся уровень образующихся калийсодержащих квазионов. Поэтому для анализа метаболитов крови, характеризующихся низким уровнем при НТГ, необходимо дополнительное исследование с использованием других методов ионизации.

Заключение

Выявленные в результате прямого масс-спектрометрического анализа ионы метаболитов,

уровень которых в плазме связан с наличием у пациентов НТГ, позволили создать мб-ПГТТ (т.е. ПГТТ, работающий на основе метаболомного анализа крови), обладающий высокой точностью диагностики. Идентификация выявленных в исследовании метаболитов подтвердила, что мб-ПГТТ основан на метаболической картине крови, отражающей развитие СД у пациента. Дальнейшие исследования мб-ПГТТ на более крупных выборках помогут более полно охарактеризовать эффективность теста, однако уже сейчас данный тест можно рассматривать как более воспроизводимую и быструю альтернативу используемому в клинике ПГТТ.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — И.И. Дедов, А.И. Арчаков, М.В. Шестакова, П.Г. Лохов

Сбор и обработка материала — Е.А. Шестакова, О.П. Трифонова, Д.Л. Маслов, Е.Е. Балашова

Статистическая обработка данных — П.Г. Лохов

Написание текста — П.Г. Лохов

Редактирование — И.И. Дедов, А.И. Арчаков, М.В. Шестакова

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *The Lancet*. 2012;379(9833):2279-2290. doi: 10.1016/s0140-6736(12)60283-9
2. McDonald GW, Fisher GF, Burnham C. Reproducibility of the oral glucose tolerance test. *Diabetes*. 1965;14:473-480.
3. Ko GTC, Chan JCN, Woo J, Lau E, Yeung VTF, Chow CC, et al. The Reproducibility and Usefulness of the Oral Glucose Tolerance Test in Screening for Diabetes and other Cardiovascular Risk Factors. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine*. 1998;35(1):62-67. doi: 10.1177/000456329803500107
4. Gowda GAN, Zhang S, Gu H, Asiago V, Shanaiah N, Raftery D. Metabolomics-based methods for early disease diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2008;8(5):617-633. doi: 10.1586/14737159.8.5.617
5. Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2007;26(1):51-78. doi: 10.1002/mas.20108
6. Wang TJ, Larson MG, Vasani RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, et al. Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nature Medicine*. 2011;17(4):448-453. doi: 10.1038/nm.2307
7. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation, 2006.
8. Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Medicine*. 1978;8(4):283-298. doi: 10.1016/s0001-2998(78)80014-2
9. U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, C. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001
10. Crews B, Wikoff WR, Patti GJ, Woo H-K, Kalisiak E, Heideker J, et al. Variability Analysis of Human Plasma and Cerebral Spinal Fluid Reveals Statistical Significance of Changes in Mass Spectrometry-Based Metabolomics Data. *Analytical Chemistry*. 2009;81(20):8538-8544. doi: 10.1021/ac9014947
11. Strathmann FG, Hoofnagle AN. Current and Future Applications of Mass Spectrometry to the Clinical Laboratory. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011;136(4):609-616. doi: 10.1309/ajcpw0ta8obbngck
12. Engeli S, Bohnke J, Feldpausch M, Gorzelnik K, Janke J, Batkai S, et al. Activation of the Peripheral Endocannabinoid System in Human Obesity. *Diabetes*. 2005;54(10):2838-2843. doi: 10.2337/diabetes.54.10.2838
13. Sipe JC, Waalen J, Gerber A, Beutler E. Overweight and obesity associated with a missense polymorphism in fatty acid amide hydrolase (FAAH). *International Journal of Obesity*. 2005;29(7):755-759. doi: 10.1038/sj.ijo.0802954
14. Fonseca VA. The metabolic syndrome, hyperlipidemia, and insulin resistance. *Clinical Cornerstone*. 2005;7(2-3):61-72. doi: 10.1016/s1098-3597(05)80069-9
15. Breant B, Suhre K, Meisinger C, Döring A, Altmaier E, Belcredi P, et al. Metabolic Footprint of Diabetes: A Multiplatform Metabolomics Study in an Epidemiological Setting. *PLoS One*. 2010;5(11):e13953. doi: 10.1371/journal.pone.0013953
16. Inouye M, Mio T, Sumino K. Dicarboxylic acids as markers of fatty acid peroxidation in diabetes. *Atherosclerosis*. 2000;148(1):197-202. doi: 10.1016/s0021-9150(99)00263-4
17. Bandyopadhyay GK. Increased Malonyl-CoA Levels in Muscle From Obese and Type 2 Diabetic Subjects Lead to Decreased Fatty Acid Oxidation and Increased Lipogenesis; Thiazolidinedione Treatment Reverses These Defects. *Diabetes*. 2006;55(8):2277-2285. doi: 10.2337/db06-0062
18. Meijers BKI, Bammens B, De Moor B, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Evenepoel P. Free p-cresol is associated with cardiovascular disease in hemodialysis patients. *Kidney International*. 2008;73(10):1174-1180. doi: 10.1038/ki.2008.31
19. Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin Reduces Plasma Arginase Activity in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 2007;31(1):134-139. doi: 10.2337/dc07-1198
20. Kitabchi AE, Umpierrez GE, Miles JM, Fisher JN. Hyperglycemic Crises in Adult Patients With Diabetes. *Diabetes Care*. 2009;32(7):1335-1343. doi: 10.2337/dc09-9032