

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ НА УРОВЕНЬ МЕТАБОЛИТОВ ТРИПТОФАНА В КИШЕЧНИКЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ ГНОТОБИОНТНЫХ МЫШЕЙ

О.П. Шатова^{1*}, А.В. Шестопалов¹, Е.Ю. Златник², И.А. Новикова², А.С. Гончарова², А.Ю. Максимов²

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, 117513, Москва, ул. Островитянова, 1; *эл. почта: shatova.op@gmail.com

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии, 344037, Ростов-на-Дону, ул. 14-я Линия, 63

Микробиота кишечника — один из ключевых поставщиков метаболитов триптофана — катаболитов, которые выполняют различные функции в организме хозяина, в том числе являются сигнальными молекулами. Трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) получила достаточно широкое применение как метод, позволяющий определить вклад микроорганизмов в содержание различных метаболитов в холооргане. В связи с этим целью нашего исследования было изучение влияния ТФМ на уровень метаболитов триптофана в кале и крови у гнотобионтных мышей. Установлено, что как до, так и после ТФМ доминантными метаболитами триптофана в кишечнике являются индол-3-лактат и хинолиновая кислота. ТФМ повышает содержание как индолов (индол-3-ацетата, индол-3-акрилата, индол-3-бутирата, индол-3-лактата), так и кинуренинов (антрилиновой и ксантуреновой кислот) в кишечнике. В сыворотке крови после проведения ТФМ повышаются преимущественно индольные метаболиты (индол-3-бутират, индол-3-карбоксальдегид, индол-3-лактат, индол-3-пропионат), однако также повышаются триптамин и ксантуреновая кислота. Применение ТФМ демонстрирует, что микробиота кишечника — источник не только индольных производных триптофана, а и метаболитов кинуренинового пути.

Ключевые слова: микробиота кишечника; триптофановые катаболиты; трансплантация фекальной микробиоты; индолы; кинуренины

DOI: 10.18097/PBMCR1554

ВВЕДЕНИЕ

Определяющая особенность эпителиальных тканей (кожи, репродуктивного, дыхательного и желудочно-кишечного трактов) — создание барьеров для формирования динамической внешней среды с целью обеспечения гомеостаза организма в целом [1]. В последнее десятилетие накоплено достаточно знаний о том, что колонизация микробиотой различных эпителиальных тканей организма-хозяина имеет важное значение как в его физиологии, так и в развитии различных заболеваний холооргане [2]. Такое влияние опосредованно в значительной степени различными микробными метаболитами и факторами, а не самой микробиотой [3]. Данные микробные вещества принято называть “постбиотиками” [4]. Метаболизм постбиотиков вносит значимый вклад в иммунное обучение хозяина и провокацию его аутоагрессии [5], а также в регуляцию пищевого поведения [6] и в формирование оросенсорных предпочтений. Кроме того, данные вещества принимают участие в развитии метаболических заболеваний, таких как ожирение [7], инсулинорезистентность и сахарный диабет [8]. В ряде работ показана ведущая роль микробиотических метаболитов в развитии рака или наоборот в предотвращении опухолевого роста [9, 10].

Микробный метаболизм пищевых компонентов обеспечивает организм хозяина питательными

веществами, витаминами, короткоцепочечными жирными кислотами, вторичными и третичными желчными кислотами, эссенциальными аминокислотами и их производными [1]. Среди аминокислот одно из важных мест для гомеостаза холооргане занимает триптофан и его метаболиты [11]. Триптофан относится к незаменимым аминокислотам. Считается, что лишь небольшая часть экзогенного триптофана служит субстратом для синтеза белков, а остальной триптофан метаболизируется клетками макроорганизма (кинурениновый и серотониновый пути) или микроорганизмами кишечника (индольный путь) [12]. Девиации в метаболизме данной аминокислоты характеризуют дисбиотический фенотип микробиоты, а это зачастую сопровождается развитием воспалительных заболеваний кишечника [13], метаболических нарушений [7], развитием опухолей [14], прогрессивной развития атеросклероза [15–17] и др. Метаболизм триптофана в кишечнике включает его прямое преобразование кишечными микроорганизмами в индол и его производные, многие из которых являются лигандами для арилгидрокарбонных рецепторов (AhR) [18]. Данные рецепторы напрямую активируются пищевыми молекулами и ксенобиотиками. Передача сигналов AhR считается ключевым компонентом иммунного ответа на участках эпителиальных барьеров, что имеет важное значение для гомеостаза кишечника, обновления эпителия,



целостности барьера и многих типов иммунных клеток, таких как интраэпителиальные лимфоциты, клетки Th17, врождённые лимфоидные клетки, макрофаги и т. д. [19].

Ранее было показано, что продукция кинуренина в кишечнике у гнотобионтных мышей снижена, при нормальной продукции индол-3-ацетата; при этом у стерильных животных отмечен дефицит триптофановых лигандов AhR [20]. В этом контексте не совсем понятно, почему индол-3-ацетат у стерильных животных не снижен, если основным поставщиком индольных метаболитов является микробиота. Предполагается, что воспаление в кишечнике и нарушение его проницаемости развиваются именно из-за дефицита триптофановых лигандов AhR [17]. Потенциально, трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) может обеспечить нормальный уровень триптофановых метаболитов в кишечнике, что может быть перспективным при лечении воспалительных заболеваний в нём. ТФМ — это метод транспортировки фекальной микробиоты здорового донора реципиенту через назогастральный зонд, колоноскоп, клизму, капсулу или их комбинацию для восстановления нормального общего состояния организма. ТФМ получила широкое признание как подход к определению причинной роли микробиома в моделях заболеваний, связанных с дисбиозом кишечника, а также как новый способ терапии, позитивно влияющий на течение различных заболеваний [21]. Показано влияние ТФМ на метаболическую активность микробиоты кишечника и синтез алкилрезорцинолов [22].

Однако остаётся до конца не изученным, как ТФМ влияет на содержание триптофана и его метаболитов в кишечнике и в сыворотке крови реципиентов в норме. Поэтому целью нашего исследования было изучение влияния ТФМ на содержание метаболитов обмена триптофана у гнотобионтных мышей в кишечнике и в сыворотке крови.

МЕТОДИКА

Исследование проведено в Испытательном лабораторном центре Национального медицинского исследовательского центра онкологии.

Животные

Мыши Balb/c germ-free, имеющие germ-free-статус, были получены из “Taconic Biosciences” (США). Вес животных составлял 18–28 г, возраст — 8–10 недель. Период акклиматизации мышей составлял не менее 4 дней. Животных содержали в SPF-зоне вивария в клетках Iso Cage для мышей группами по 5 особей в клетке при температуре 20–23°C, влажности 35–75%, с циркуляцией очищенного воздуха 10–15 л/ч. Был использован подстил для лабораторных животных Rehofix МК 2000 (“JRS”, Германия). Животные получали без ограничений полнорационный гранулированный экструдированный корм (“Лабораторкорм”, Россия) и чистую питьевую воду.

Подстил, корм и бутылочки с водой подвергали автоклавированию при помощи автоклава DGM AND 300 (“DGM Global Trading AG”, Швейцария). Перед началом эксперимента был проведён клинический осмотр и взвешивание животных. Каждому животному был присвоен отдельный идентификационный номер путём прикрепления ушной бирки к ушной раковине.

Были изучены две группы гнотобионтных мышей. Контрольная группа животных (n=10) внутрижелудочно получала 0,9% раствор NaCl. Группе наблюдения (n=10) внутрижелудочно вводили фекальную микробиоту от условно здорового донора женского пола 48 лет, который в последние 3 месяца не принимал антибиотики, про-, пре- или симбиотические препараты.

Эвтаназию проводили путём декапитации на 14 день после последней процедуры ТФМ.

Подготовка фекальной микробиоты для трансплантации экспериментальным животным

Образцы фекалий донора (1 г) были заморожены при температуре -70°C. Для подготовки проб фекалий и трансплантации фекальной микробиоты от замороженной пробы кала донора был произведён скол, который гомогенизировали с использованием ультразвукового гомогенизатора в физиологическом растворе (в соотношении 0,1 г кала и 1000 мкл физ. раствора). Гомогенат фильтровали через беззольный бумажный фильтр средней скорости фильтрации, а фильтрат использовали для последующего введения мышам.

Пути и режимы введения фекальной микробиоты

Введение фекальной микробиоты осуществляли внутрижелудочно. Животным экспериментальной группы внутрижелудочно вводили 100 мкл отфильтрованной взвеси фекальной микробиоты донора трёхкратно (100 мкл/день). Мышам контрольной группы вводили 100 мкл 0,9% физ. раствора трёхкратно (100 мкл/день).

Определение содержания триптофана и его метаболитов в кишечнике и сыворотке крови

Стандартные растворы для профилирования метаболитов триптофанового обмена, а также хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА), муравьиная кислота, 6-гидроксиникотиновая кислота, 3-индолакриловая кислота и аскорбиновая кислота были получены от “Sigma-Aldrich” (США). Ацетонитрил был получен от “Chromasolv[®], Sigma-Aldrich Chemie GmbH” (Швейцария).

Количественный анализ метаболитов обмена триптофана в сыворотке крови и кишечнике проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим (МС) детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Анализ проводили при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1200 (“Agilent Inc.”, США) с системой автоматического ввода образцов, термостатом колонки и дегазатором. Хроматографическое разделение

выполняли с использованием аналитической колонки Discovery PFP HS F5 (2,1×150 мм; 3 мкм, “Supelco Inc.”, США). Состав подвижной фазы: фаза А — 0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде; фаза В — 100% ацетонитрил для хроматографии. Градиент подвижной фазы от 1% в до 10% в течение 4 мин, далее до 90% В к 9 мин анализа. Скорость потока подвижной фазы была 0,40 мл/мин.

Для детектирования использован МС детектор на основе тройного квадруполя Agilent 6460 (“Agilent Inc.”) MRM и электрораспылительной ионизацией. Характеристические для каждого соединения родительские и дочерние ионы для режима MRM, а также параметры ионизации и диссоциации были оптимизированы с использованием стандартов исследуемых метаболитов. Полученный сигнал обрабатывали при помощи программного обеспечения Masshunter (“Agilent Inc.”).

Расчёт концентраций метаболитов проводили с использованием внутреннего стандарта (2-гидроксииникотиновая кислота (“Sigma-Aldrich”). Стандартные растворы определяемых соединений готовили с использованием искусственной матрицы, содержащей 2% бычий сывороточный альбумин и 0,9% хлорид натрия. В матрицу добавляли исследуемые метаболиты и проводили подготовку согласно методике анализа [23].

Для подготовки пробы сыворотки крови к 100 мкл крови добавляли внутренний стандарт (2-гидроксииникотиновую кислоту), осаждали белки ацетонитрилом, супернатант упаривали и перерастворяли в 10% метаноле в воде с добавлением аскорбиновой кислоты для предотвращения окисления аналитов.

Для подготовки пробы кала его лиофилизировали до сухого остатка, далее навеску около 5 мг экстрагировали 50% метанолом в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты. После центрифугирования образец анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Методика была валидирована по показателям селективности, линейности, точности, воспроизводимости, матричному эффекту и стабильности аналита. Валидацию проводили в соответствии с руководством по валидации биоаналитических методик FDA [24].

Методы статистического анализа

Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2021. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения MedCalc® Statistical Software v. 22.013 (“MedCalc Software Ltd.”, Бельгия). Все полученные массивы данных были проверены на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро-Уилка. Ввиду преобладания ненормального распределения были использованы методы непараметрического

анализа. Сравнительный анализ выполнялся с расчётом критерия Краскела-Уоллиса. При отвержении нулевой гипотезы ($p < 0,05$) автоматически выполняли апостериорный тест по методу Conover для попарного сравнения групп. Для описания полученных данных использовали медиану и межквартильный размах (Me [Q1; Q3]).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В кале гнотобионтных животных контрольной группы содержание триптофана было незначительно и статистически незначимо (на 11%) выше, чем в группе животных, получавших ТФМ. В содержимом кишечника контрольной группы мышей минорными катаболитами обмена триптофана (до 1 нмоль/г) являются как производные кинуренинового пути, так и индольные метаболиты. К ним относятся: антралиловая кислота, индол-3-карбоксальдегид, индол-3-бутират, индол-3-пропионат, ксантуреновая кислота, гидроксиндол-ацетат, индол-3-ацетат и кинуренин. Среди индольных метаболитов доминантными для гнотобионтных мышей контрольной группы являются индол-3-лактат и индол, а среди кинуренинов — хинолиновая кислота (рис. 1).

Следует отметить, что после ТФМ у мышей в кишечнике также остаётся доминантным метаболитом индольного обмена индол-3-лактат, а для кинуренинов — хинолиновая кислота. При этом концентрация обоих метаболитов статистически значимо увеличивается. Так, концентрация хинолиновой кислоты в кишечнике повышалась на 47%, а содержание индол-3-лактата увеличилось на много выше — в 6,5 раз. При этом индол-3-ацетат и ксантуреновая кислота после ТФМ переставали быть минорными метаболитами. Содержание индол-3-ацетата после ТФМ повышалось в 7,1 раз, тогда как для ксантуреновой кислоты установлено почти 10-кратное увеличение содержания после проведения ТФМ. Также статистически значимо было повышено в 2,4 раза содержание антралиловой кислоты по сравнению с контрольной группой животных. Индол-3-акрилат был статистически значимо повышен в 1,45 раза в группе наблюдения, а индол-3-бутират был выше в группе наблюдения в 2,2 раза (рис. 1).

Важно отметить, что после ТФМ изменения содержания триптофановых метаболитов произошли не только в содержимом кишечника, а также и в сыворотке крови животных (рис. 2). Статистически значимо в крови животных увеличилось содержание индол-3-бутирата, индол-3-карбоксальдегида, индол-3-лактата, индол-3-пропионата, триптамина и ксантуреновой кислоты.

При этом необходимо отметить, что после проведения ТФМ отмечено статистически значимое увеличение содержания индол-3-бутирата, индол-3-лактата и ксантуреновой кислоты в кишечнике (рис. 1). Данное наблюдение свидетельствует в пользу того, что основным источником указанных сывороточных метаболитов триптофана является именно микробиота кишечника.



Рисунок 1. Содержание в кале (нмоль/г) метаболитов триптофана. Использовали медиану (Me) и межквартильный размах (Q1; Q3). Жирным стилем выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$) содержания метаболитов обмена триптофана в контрольной группе и группе наблюдения.



Рисунок 2. Содержание в крови (нмоль/л) метаболитов триптофана. Использовали медиану (Me) и межквартильный размах (Q1; Q3). Жирным стилем выделены статистически значимые отличия ($p < 0,05$) содержания метаболитов обмена триптофана в контрольной группе и группе наблюдения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наличие индольных метаболитов триптофана в кишечнике у гнотобионтных мышей может быть обусловлено поступлением с пищей, продукцией микробиоты иной локализации, а также частичной контаминацией кишечника и продукция клетками организма хозяина [20]. Повышение содержания в кале метаболитов как кинуренинового, так и индольного путей катаболизма триптофана отражает стимуляцию триптофанового катаболизма после проведения ТФМ. При этом сохраняется преобладание содержания индол-3-лактата и хинолиновой кислоты. Для организма человека доминантными индольными производными в кале являются индол, индол-3-ацетат и индол-3-пропионат [25]. Высокое содержание индол-3-лактата как в контроле, так и в группе наблюдения может отражать активацию метаболизма видоспецифической микробиоты для мышей. Нами показано, что ТФМ стимулирует превращение триптофана по обоим путям катаболизма. Так, после применения ТФМ происходит стимуляция не только специфичного для микроорганизмов индольного пути катаболизма триптофана, а и кинуренинового пути обмена триптофана, характерного для клеток организма-хозяина. Ранее на лабораторных животных (цыплята) было показано, что ТФМ приводит к повышению содержания триптофана, серотонина и индола в содержимом тонкой кишки [26]. При этом происходило увеличение *Lactobacillus* и снижение численности некоторых условно-патогенных бактерий, таких как *Enterococcus* и *Streptococcus*. В этом же исследовании было установлено, что ТФМ увеличивает экспрессию AhR, что, в свою очередь, может поддерживать баланс клеток Th17/Treg [26] и способствовать противовоспалительному эффекту проводимой ТФМ. Можно предположить, что ТФМ меняет микробное разнообразие и вместе с тем значимо влияет как на продукцию триптофана, так и на все три ключевые пути катаболизма данной аминокислоты. Есть данные о существенном повышении триптамина (более чем в 200 раз) после проведения ТФМ человека мышам [12]. Однако в нашем исследовании не установлено статистически значимых отличий в уровнях триптамина в кале или крови мышей после ТФМ.

Учитывая, что в организме человека индольный путь потребляет лишь 1% экзогенного триптофана, тогда как кинурениновый путь 95% [27], мы рассчитали сколько потенциально экзогенного триптофана в кишечнике превращается у контрольных мышей и мышей после проведения процедуры ТФМ. Мы приняли содержание триптофана в кишечнике за 100% и рассчитали суммарное содержание отдельно метаболитов индольного пути катаболизма триптофана (сумма всех индольных метаболитов $\times 100$ / содержание триптофана) и отдельно метаболитов кинуренинового обмена (сумма всех метаболитов кинуренинового пути $\times 100$ / содержание триптофана). Как показали наши работы, у контрольных

животных потенциально около 6% триптофана утилизируется по кинурениновому пути, тогда как только 4,1% триптофана подвергается катаболизму по индольному пути. После ТФМ уровень утилизации триптофана по кинурениновому пути достиг 13%, тогда как по индольному пути превращение триптофана превысило 20%. Это подтверждает значимую роль микробиоты кишечника как в образовании метаболитов кинуренинового обмена, так и в образовании метаболитов индольного пути обмена триптофана. Кроме того, количество триптофана, который превращается по индольному пути существенно превышает имеющееся представление об одном проценте утилизации триптофана до индолов.

Следует отметить, что в сыворотке крови преимущественно повысилось содержание именно индольных метаболитов триптофанового обмена. Общепринято считать индольные метаболиты исключительно микробиотическими [28]. Сывороточный серотонин, кинуренин и хинолиновая кислота не отличались у контрольной группы мышей и в группе наблюдения. При этом существуют работы, показывающие, что ТФМ повышает уровень серотонина крови [26]. Важно отметить статистически значимое увеличение ксантуреновой кислоты в крови животных после ТФМ. Ксантуреновая кислота представляет собой метаболит кинуренина, образующийся при трансаминировании 3-гидроксикинуренина. Недавно полученные данные свидетельствуют о том, что ксантуреновая кислота может влиять на функцию мозга и нейротрансмиссию, а также взаимодействовать с метаболитными рецепторами глутамата (mGlu) [29]. Эффекты ксантуреновой кислоты *in vitro* и *in vivo*, по-видимому, опосредованы активацией рецепторов mGlu2 и mGlu3. Однако действие ксантуреновой кислоты может выходить за рамки регуляции рецепторов mGlu и затрагивать разнообразные молекулярные мишени, например везикулярные переносчики глутамата [29]. Ксантуреновая кислота рассматривается как видоспецифичный метаболит, и принято считать, что микробиота её не продуцирует; в её образовании участвуют исключительно клетки макроорганизма [3]. Полученные результаты дают нам возможность предположить, что ксантуреновая кислота также имеет и микробиотическое происхождение. Содержание индол-3-бутирата, индол-3-лактата и ксантуреновой кислоты в сыворотке крови потенциально может отражать состояние абиоза или дисбиоза и подчёркивает ключевую роль микробиоты кишечника в их продукции. Индол и его производные способствуют кишечному иммунному гомеостазу, активируя AhR для защиты кишечного барьера. Активация пути AhR в кишечных эпителиальных клетках жизненно важна для защиты ниш стволовых клеток и поддержания целостности кишечного барьера [30]. Следует отметить, что в нашем исследовании мы использовали принцип “одиночного случайного донора”, при этом есть работы, показывающие подбор “супердонора” или объединение множества доноров [31].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведение ТФМ значимо влияет на метаболизм триптофана в организме и содержание его метаболитов как в кишечнике, так и в сыворотке крови. ТФМ повышает продукцию не только индолных метаболитов, которые общепринято считать микробиотическими, но и метаболитов кинуренинового пути. Доминантными метаболитами триптофана в кишечнике как в контроле, так и после проведённой ТФМ являются индол-3-лактат и хинолиновая кислота. При этом для сыворотки крови статистической значимости в разнице ни для индол-3-лактата, ни для хинолиновой кислоты у животных обследованных групп не установлено. Специфично, что после проведения ТФМ происходит повышение содержания индол-3-бутирата, индол-3-лактата и ксантуреновой кислоты как в содержимом кишечника, так и в сыворотке крови.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

За счёт госбюджетных средств.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией и Федеральным законом от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ “Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации” и одобрено Советом по этике Национального медицинского исследовательского центра онкологии (код протокола № 44, дата утверждения 20.12.2019). Донор метаболитов подписал информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования на животных одобрен Советом по этике Национального медицинского исследовательского центра онкологии (код протокола № 44, дата утверждения 20.12.2019).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dong F., Hao F., Murray I.A., Smith P.B., Koo I., Tindall A.M., Kris-Etherton P.M., Gowda K., Amin S.G., Patterson A.D., Perdew G.H. (2020) Intestinal microbiota-derived tryptophan metabolites are predictive of Ah receptor activity. *Gut Microbes*, **12**(1), 1–24. DOI: 10.1080/19490976.2020.1788899
2. Illiano P., Brambilla R., Parolini C. (2020) The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *FEBS J.*, **287**(5), 833–855. DOI: 10.1111/febs.15217
3. Шатова О.П., Шестопалов А.В. (2023) Метаболизм триптофана: новый взгляд на роль триптофановых производных в организме человека. *Успехи современной биологии*, **143**(1), 3–5. DOI: 10.31857/S0042132423010076 [Shatova O.P., Shestopalov A.V. (2023) Tryptophan metabolism: a new look

at the role of tryptophan derivatives in the human body. *Biol. Bull. Rev.*, **13**(2), 81–91.] DOI: 10.1134/S2079086423020068

4. Banfi D., Moro E., Bosi A., Bistoletti M., Cerantola S., Crema F., Maggi F., Giron M., Giaroni C., Baj A. (2021) Impact of microbial metabolites on microbiota-gut-brain axis in inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(4), 1623. DOI: 10.3390/ijms22041623
5. Шатова О.П., Ягодкина Е.М., Кайдошко С.С., Заболотнева А.А., Шестопалов А.В. (2023) Роль метаболитов триптофанового обмена и короткоцепочечных жирных кислот в патогенезе аутоиммунных заболеваний. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*, **109**(8), 1028–1044. DOI: 10.31857/S0869813923080095 [Shatova O.P., Yagodkina E.M., Kaydoshko S.S., Zabolotneva A.A., Shestopalov A.V. (2023) Role of tryptophan metabolites and short-chain fatty acids in pathogenesis of autoimmune diseases. *J. Evol. Biochem. Phys.*, **59**(4), 1360–1373.] DOI: 10.1134/S0022093023040270
6. Шатова О.П., Заболотнева А.А., Микин И.Е., Бриль Д.В., Шестопалов А.В., Румянцев С.А. (2022) Роль метаболитов триптофана в обмене веществ и патогенезе ожирения. *Профилактическая медицина*, **25**(10), 97–103. [Shatova O.P., Zabolotneva A.A., Mikin I.E., Bril D.V., Shestopalov A.V., Roumiantsev S.A. (2022) The role of tryptophan metabolites in metabolism and pathogenesis of obesity. *Russian Journal of Preventive Medicine*, **25**(10), 97–103.] DOI: 10.17116/profmed20222510197
7. Bernard A., le May C., Dastugue A., Ayer A., Blanchard C., Martin J.-C., Pais de Barros J.-P., Delaby P., le Bourgot C., Ledoux S. (2021) The tryptophan/kynurenine pathway: a novel cross-talk between nutritional obesity, bariatric surgery and taste of fat. *Nutrients*, **13**(4), 1366. DOI: 10.3390/nu13041366
8. Zhang B., Chen T., Cao M., Yuan C., Reiter R.J., Zhao Z., Zhao Y., Chen L., Fan W., Wang X., Zhou X., Li C. (2022) Gut microbiota dysbiosis induced by decreasing endogenous melatonin mediates the pathogenesis of Alzheimer's disease and obesity. *Front. Immunol.*, **13**, 900132. DOI: 10.3389/fimmu.2022.900132
9. Basson C., Serem J.C., Hlophe Y.N., Bipath P. (2023) An *in vitro* investigation of l-kynurenine, quinolinic acid, and kynurenic acid on B16 F10 melanoma cell cytotoxicity and morphology. *Cell Biochem. Funct.*, **41**(7), 912–922. DOI: 10.1002/cbf.3843
10. Kumavath R., Pavithran H., Paul S., Anju V.T., Busi S., Dyavaiah M. (2024) Effects of gut microbiome and obesity on the development, progression and prevention of cancer (review). *Int. J. Oncol.*, **64**(1), 4. DOI: 10.3892/ijo.2023.5592
11. Jamshed L., Debnath A., Jamshed S., Wish J.V., Raine J.C., Tomy G.T., Thomas P.J., Holloway A.C. (2022) An emerging cross-species marker for organismal health: tryptophan-kynurenine pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**(11), 6300. DOI: 10.3390/ijms23116300
12. Li X., Zhang B., Hu Y., Zhao Y. (2021) New insights into gut-bacteria-derived indole and its derivatives in intestinal and liver diseases. *Front. Pharmacol.*, **12**, 769501. DOI: 10.3389/fphar.2021.769501
13. Cervenka I., Agudelo L.Z., Ruas J.L. (2017) Kynurenines: tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science*, **357**(6349), eaaf9794. DOI: 10.1126/science.aaf9794
14. Cao Z.G., Qin X.B., Liu F.F., Zhou L.L. (2015) Tryptophan-induced pathogenesis of breast cancer. *Afr. Health Sci.*, **15**(3), 982–985. DOI: 10.4314/ahs.v15i3.36

15. Sudar-Milovanovic E., Gluvic Z., Obradovic M., Zaric B., Isenovic E.R. (2022) Tryptophan metabolism in atherosclerosis and diabetes. *Curr. Med. Chem.*, **29**(1), 99–113. DOI: 10.2174/0929867328666210714153649
16. Chajadine M., Laurans L., Radecke T., Mouttoulingam N., Al-Rifai R., Bacquer E., Delaroque C., Rytter H., Bredon M., Knosp C., Vilar J., Fontaine C., Suffee N., Vandestienne M., Esposito B., Dairou J., Launay J.M., Callebert J., Tedgui A., Ait-Oufella H., Sokol H., Chassaing B., Taleb S. (2024) Harnessing intestinal tryptophan catabolism to relieve atherosclerosis in mice. *Nat. Commun.*, **15**(1), 6390. DOI: 10.1038/s41467-024-50807-x
17. Baumgartner R., Forteza M.J., Ketelhuth D.J. (2019) The interplay between cytokines and the kynurenine pathway in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*, **122**, 154148. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.09.004
18. Alexeev E.E., Lanis J.M., Kao D.J., Campbell E.L., Kelly C.J., Battista K.D., Gerich M.E., Jenkins B.R., Walk S.T., Kominsky D.J., Colgan S.P. (2018) Microbiota-derived indole metabolites promote human and murine intestinal homeostasis through regulation of interleukin-10 receptor. *Am. J. Pathol.*, **188**(5), 1183–1194. DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.01.011
19. Agus A., Planchais J., Sokol 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
20. Lamas B., Richard M.L., Leducq V., Pham H.P., Michel M.L., da Costa G., Bridonneau C., Jegou S., Hoffmann T.W., Natividad J.M., Brot L., Taleb S., Couturier-Maillard A., Nion-Larmurier L., Merabtene F., Seksik P., Bourrier A., Cosnes J., Ryffel B., Beaugerie L., Launay J.M., Langella P., Xavier R.J., Sokol H. (2016) CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. *Nat. Med.*, **22**(6), 598–605. DOI: 10.1038/nm.4102
21. Bokoliya S.C., Dorsett Y., Panier H., Zhou Y. (2021) Procedures for fecal microbiota transplantation in murine microbiome studies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **11**, 711055. DOI: 10.3389/fcimb.2021.711055
22. Shestopalov A.V., Kit O.I., Zabolotneva A.A., Zlatnik E.Y., Maksimov A.Y., Novikova I.A., Sagakyants A.B., Timofeeva S.V., Goncharova A.S., Galina A.V., Appolonova S.A., Markin P.A., Makarov V.V., Yudin S.M., Keskinov A.A., Roumiantsev S.A., Meshkov O.I. (2023) Alkylresorcinols as a new type of gut microbiota regulators influencing immune therapy efficiency in lung cancer treatment. *Advanced Gut Microbiome Research*, **2023**, 2333767. DOI: 10.1155/2023/2333767
23. Sigall Boneh R., van der Kruk N., Wine E., Verburgt C.M., de Meij T.G.J., Löwenberg M., Gecse K.B., Wierdsma N., Derikx J.P.M., de Jonge W.J., d'Haens G., Ghiboub M., van Limbergen J.E. (2025) Tryptophan metabolites profile predict remission with dietary therapy in pediatric Crohn's disease. *Therap. Adv. Gastroenterol.*, **18**, 17562848251323004. DOI: 10.1177/17562848251323004
24. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. May 2018. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration
25. Шестопалов А.В., Шатова О.П., Заболотнева А.А., Гапонов А.М., Москалева Н.Е., Апполонова С.А., Макаров В.В., Юдин С.М., Румянцев А.Г., Румянцев С.А. (2021) Особенности сопряжения кишечного и сывороточного пулов индолов при ожирении. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии, **24**(10), 3–12. [Shestopalov A.V., Shatova O.P., Zabolotneva A.A., Gaponov A.M., Moskaleva N.E., Appolonova S.A., Makarov V.V., Yudin S.M., Rumyantsev A.G., Roumiantsev S.A. (2021) Coupling features of intestinal and serum indole pools in obesity. *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry*, **24**(10), 3–12.] DOI: 10.29296/25877313-2021-10-01
26. Zhang X., Akhtar M., Chen Y., Ma Z., Liang Y., Shi D., Cheng R., Cui L., Hu Y., Nafady A.A., Ansari A.R., Abdel-Kafy E.M., Liu H. (2023) Chicken jejunal microbiota improves growth performance by mitigating intestinal inflammation. *Microbiome*, **10**(1), 107. DOI: 10.1186/s40168-022-01299-8
27. Haq S., Grondin J.A., Khan W.I. (2021) Tryptophan-derived serotonin-kynurenine balance in immune activation and intestinal inflammation. *FASEB J.*, **35**(10), e21888. DOI: 10.1096/fj.202100702R
28. Hendriks T., Schnabl B. (2019) Indoles: metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation. *J. Intern. Med.*, **286**(1), 32–40. DOI: 10.1111/joim.12892
29. Fazio F., Lionetto L., Curto M., Iacovelli L., Copeland C.S., Neale S.A., Bruno V., Battaglia G., Salt T.E., Nicoletti F. (2017) Cinnabarinic acid and xanthurenic acid: two kynurenine metabolites that interact with metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology*, **112**(Pt B), 365–372. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2016.06.020
30. Metidji A., Omenetti S., Crotta S., Li Y., Nye E., Ross E., Li V., Maradana M.R., Schiering C., Stockinger B. (2018) The environmental sensor AHR protects from inflammatory damage by maintaining intestinal stem cell homeostasis and barrier integrity. *Immunity*, **49**(2), 353–362. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.07.010
31. Arora U., Kedia S., Ahuja V. (2024) The practice of fecal microbiota transplantation in inflammatory bowel disease. *Intest. Res.*, **22**(1), 44–64. DOI: 10.5217/ir.2023.00085

Поступила в редакцию: 28. 01. 2025.
 После доработки: 24. 04. 2025.
 Принята к печати: 28. 04. 2025.

THE EFFECT OF FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION ON LEVELS OF TRYPTOPHAN METABOLITES IN THE INTESTINE AND SERUM OF GNOTOBIOTIC MICE

O.P. Shatova^{1}, A.V. Shestopalov¹, E.Yu. Zlatnik², I.A. Novikova², A.S. Goncharova², A.Yu. Maksimov²*

¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovitianova str., Moscow, 117997 Russia; *e-mail: shatova.op@gmail.com

²National Medical Research Centre for Oncology,
63, 14th Line str., Rostov-on-Don, 344019 Russia

Gut microbiota is one of the key suppliers of tryptophan metabolites, which perform various functions in the host organism, including their role as signaling molecules. Fecal microbiota transplantation (FMT) is widely used as a method for determining the contribution of microorganisms to the content of various metabolites in the holorganism. In this regard, the aim of our study was to investigate the effect of FMT on the level of tryptophan metabolites in feces and blood in gnotobiotic mice. It was found that both before and after FMT, indole-3-lactate and quinolinic acid were the dominant tryptophan metabolites in the intestine. FMT increased the content of both indoles (indole-3-acetate, indole-3-acrylate, indole-3-butyrate, indole-3-lactate) and kynurenines (anthranilic and xanthurenic acids) in the intestine. In serum of mice after FMT, indole metabolites (indole-3-butyrate, indole-3-carboxaldehyde, indole-3-lactate, indole-3-propionate) predominantly increased; however, tryptamine and xanthurenic acid also demonstrated a clear increase. The use of FMT demonstrates that the intestinal microbiota is a source of not only indole derivatives of tryptophan, but also metabolites of the kynurenine pathway.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Keywords: intestinal microbiota; tryptophan catabolites; fecal microbiota transplantation; indoles; kynurenines

Funding. The study was carried out at the expense of State Budget.

Received: 28.01.2025; revised: 24.04.2025; accepted: 28.04.2025.