

©Коллектив авторов

ИЗУЧЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ОБМЕНА ТРИПТОФАНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И КАЛОВЫХ ЭКСТРАКТАХ У ДЕТЕЙ С ОЖИРЕНИЕМ

А.В. Шестопалов^{1,5}, О.П. Шатова^{2*}, А.М. Гапонов^{1,5}, Н.Е. Москалева³,
С.А. Анполонова³, А.В. Тутельян¹, В.В. Макаров⁴, С.М. Юдин⁴, С.А. Румянцева^{2,5}

¹Национальный медицинский исследовательский центр

детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1; *эл. почта: shatova.op@gmail.com

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва

⁴Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью, Москва

⁵Центр цифровой и трансляционной биомедицины “Центр молекулярного здоровья”, Москва

Нами установлено, что изменения концентраций метаболитов обмена триптофана в сыворотке крови и в содержимом кишечника являются одним из механизмов формирования метаболического сопряжения в системе “макроорганизм-микробиота кишечника”, который претерпевает значительные изменения при развитии ожирения. У детей с ожирением нет статистически значимого повышения уровня кинуренина в сыворотке крови, но при этом происходит повышение некоторых его сывороточных метаболитов: антрапиновой, кинуреновой и ксантуреновой кислот. При анализе кала у детей с ожирением выявлен повышенный в два раза уровень кинуренина. Поскольку концентрация метаболитов кинуренинового пути соответствует уровню группы здоровых детей, это может свидетельствовать о метаболической активации микробиоты ассоциированной со слизистой оболочкой кишечника. Отсутствие статистически значимых отличий для концентрации индола у здоровых детей и у детей с ожирением в анализах кала и значимое увеличение концентрации индол-3-лактата и индол-3-ацетата в сыворотке крови у детей с ожирением так же свидетельствует в пользу этого предположения.

Ключевые слова: микробиота; триптофан; ожирение; кинуренины; индолы; метаболическое сопряжение

DOI: 10.18097/PBMC20206606494

ВВЕДЕНИЕ

Триптофан является эссенциальной аминокислотой в организме человека [1]; при этом некоторые микроорганизмы кишечника способны синтезировать триптофан по шикиматному пути из метаболитов гликолиза (фосфоенолпирувата) и пентозофосфатного пути (эритрозо-4-фосфата) [2]. Однако до сих пор остаётся не изученным, в каком количестве происходит синтез триптофана микроорганизмами кишечника и обеспечивает ли это потребности организма человека. Помимо участия в синтезе белка триптофан активно метаболизируется как самими микроорганизмами в кишечнике, так и разными тканями организма человека. Также следует отметить, что в макроорганизме существует “эндогенный” триптофан, который входит в состав белков и пептидов и вовлечён в метаболизм. Однако оценить количественно “эндогенный” триптофан в организме человека методологически невозможно на сегодняшний день. Существуют 3 основные пути [3] метаболизма триптофана: индольный, кинурениновый и серотониновый (рис. 1).

Так, в кишечнике протекают все три пути обмена триптофана. Первый путь — это образование индолов, который обеспечивает ферментативная система микробиоты кишечника. Второй путь — образование кинуренинов — протекает не только в бактериях под действием

триптофан-2,3-диоксигеназы (ТДО; КФ 1.13.11.11), но и в эпителиальных и иммунных клетках кишечника благодаря гиперэкспрессии в них регуляторного фермента — индоламин-2,3-диоксигеназы (ИА-2,3-ДО; КФ 1.13.11.52). Третий путь — это продукция серотонина (5-гидрокситриптамина) в энтерохромаффинных клетках кишечника благодаря гиперэкспрессии в них фермента триптофангидроксилазы-1 (ТГ-1; КФ 1.14.16.4) [2]. Непосредственное (прямое) влияние кишечной микробиоты на обмен триптофана включает образование индола и его производных: индол-3-ацетата, индол-3-альдегида, индол-3-ацетальдегида, индол-3-пропионата, индол-3-пирувата, индол-3-акрилата и др. [4]. Данные молекулы являются лигандами для арилгидрокарбонных рецепторов (АГКР) [5], а сам индол является одной из главных сигнальных молекул в кишечнике. Триптофаназа (КФ 4.1.99.1) — фермент, который превращает триптофан в индол, гиперэкспрессирован в *Escherichia coli* и лактобациллах [2]. Так, установлено, что комменсальные микроорганизмы (*Escherichia coli*, *Peptostreptococcus russellii* и лактобациллы) способны к продукции лигандов к АГКР [6].

Кишечная микробиота оказывает регулирующие действие на ИА-2,3-ДО-1 [2, 6, 7]. Данный фермент является скоростью-лимитирующим в кинурениновом пути и участвует в превращении триптофана

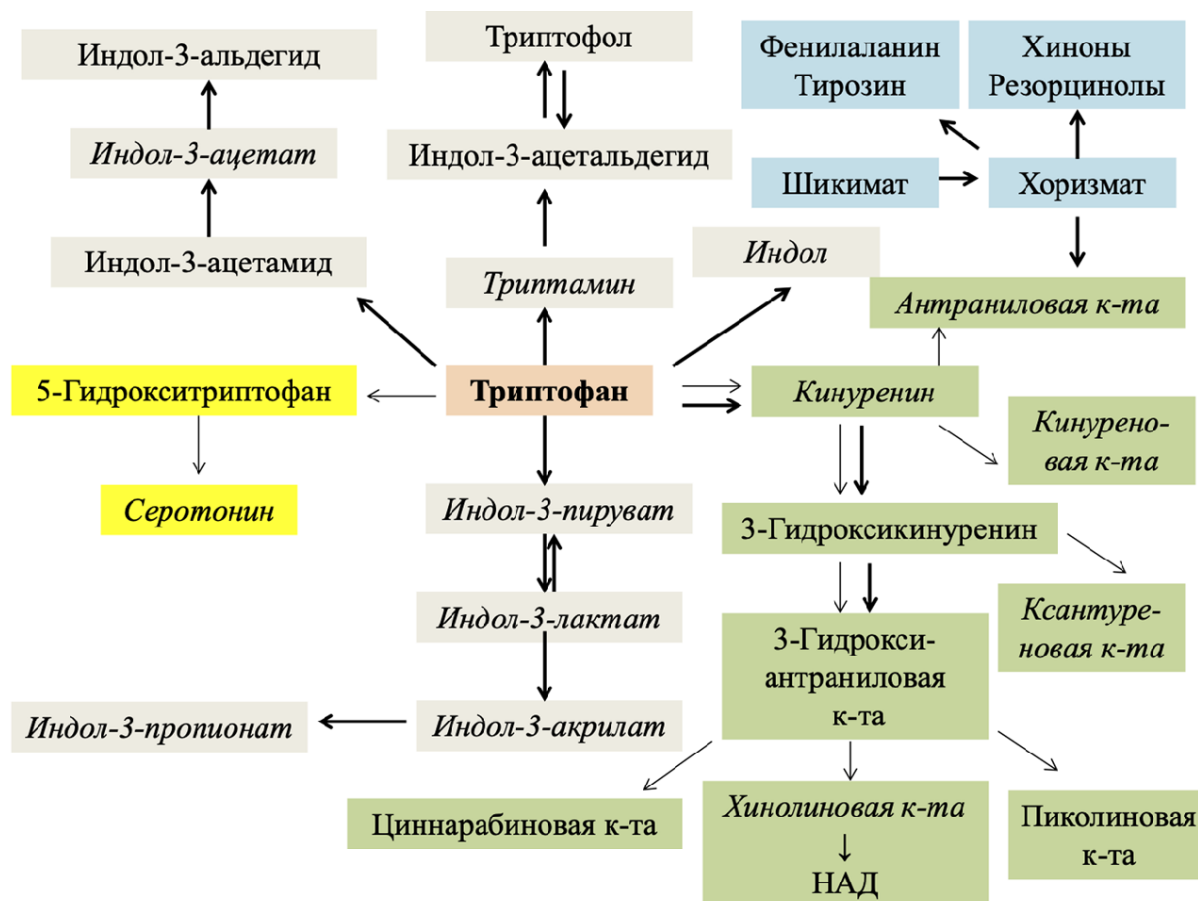


Рисунок 1. Метаболизм триптофана в клетках организма человека (тонкие стрелки) и кишечной микробиоты (толстые стрелки). Курсивом отмечены изученные нами метаболиты. Серая заливка — индолный путь, зелёная — кинурениновый, жёлтая — серотониновый. Голубая заливка — шикиматный путь микробиоты, который метаболически сопрягается с кинурениновым путём обмена триптофана.

в кинуренин [8]. Следует отметить, что ферменты кинуренинового пути экспрессируются во многих тканях, имеющих отношение к энергетическому гомеостазу: жировой, мышечной, печени, поджелудочной железе, кровеносных сосудах и в сердце [9]. Метаболиты кинуренинового пути обмена триптофана являются сигнальными молекулами и принимают участие в регуляции воспалительной реакции и иммунном ответе. Одной из ключевых сигнальных молекул в энергетическом метаболизме является кинуреновая кислота [10], которая реализует свою функцию связываясь с рецептором ассоциированным с G-белком (GPR35). Гиперэкспрессия данного рецептора отмечается в жировой ткани, иммунных клетках и желудочно-кишечном тракте. GPR35 является потенциальной мишенью для терапии сахарного диабета II типа, ожирения и метаболического синдрома (МС) [10]. Периферический кинуренин преодолевает гемато-энцефалитический барьер (ГЭБ) и оказывает влияние на центральную нервную систему [11]. Описано, что кинуренин повышен в сыворотке крови у пациентов с ожирением и МС и положительно тесно коррелирует с концентрацией в крови мочевой кислоты, триацилглицеридов и липопротеинов низкой плотности [12]. Установлено,

что у детей с ожирением сывороточный уровень кинурина коррелирует с сывороточным уровнем инсулина [13]. Показано, что у пациентов с ожирением в толстой кишке изменяется соотношение микроорганизмов, в частности, фирмикутов к бактероидам, за счёт увеличения популяции бактериоидов. Также важно подчеркнуть, что возраст оказывает влияние на микробиологический профиль в кишечнике. Так, у детей преобладают фирмикуты (представителями которых являются *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Veillonella*), тогда как у взрослых бактериоиды, а при старении макроорганизма популяция бактериоидов в кишечнике увеличивается [14].

Следует отметить, что образование более чем 90% серотонина в организме человека происходит в кишечнике в энтерохромаффинных клетках [15]. Контроль за данным направлением метаболизма триптофана осуществляет микробиота кишечника, которая образует дезоксихолевою кислоту, стимулирующую синтез серотонина (ТГ-1) [2].

Таким образом, обмен триптофана наглядно демонстрирует метаболическое сопряжение экосистемы микробиоты кишечника и макроорганизма хозяина. Многие метаболиты обмена триптофана имеют смешанное происхождение. Однако

индолы имеют преимущественно бактериальное происхождение, тогда как кинуренины и серотонин преимущественно тканевое. При развитии ожирения изменяются популяции различных кластеров кишечной микрофлоры и изменяется их метаболическое микроокружение в самом кишечнике и метаболизм макроорганизма в целом. Описанные события приводят и к изменению обмена триптофана. Представленные в доступной литературе сведения о метаболизме триптофана в организме человека и в микроорганизмах кишечника в норме и при ожирении фрагментарны и противоречивы. Кроме того, они не дают представления о метаболическом сопряжении обмена триптофана в системе “макроорганизм-микробиота кишечника”. Поэтому целью данного исследования было изучение особенностей обмена триптофана и его метаболического сопряжения в системе “макроорганизм-микробиота кишечника” у здоровых детей и детей с ожирением.

МЕТОДИКА

Согласно протоколу исследования, в соответствии с критериями включения-исключения, обследовано 199 ребенка 2001-2009 года рождения. Сформировано две клинические группы.

Первую группу составили здоровые дети без метаболических нарушений: 99 человек, из них 39 — девочки, 60 — мальчики с весом от 35 до 72 кг. Средний вес в группе составил 51 кг. Значение ИМТ в группе варьировали от 16,7 до 22,9, при этом среднее значение составляло 20,3.

Вторую группу составили дети с экзогенно-конституциональным ожирением I-III степени: 100 человек, из них 52 — девочки, 48 — мальчики с весом от 53 до 110 кг. Средний вес в группе — 70 кг. Значение ИМТ в группе варьировали от 25,2 до 34, при этом среднее значение составило 27,7.

От всех участников исследования были получены образцы цельной крови, сыворотки крови и кала, взятые согласно протоколу исследования. Транспортировку и хранение образцов осуществляли с соблюдением холодовой цепи при температуре не выше -40°C.

Количественный анализ метаболитов обмена триптофана в сыворотке крови и кале проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Анализ проводили при помощи жидкостного хроматографа Agilent 1200 (“Agilent”, США) с системой автоматического ввода образцов, термостатом колонки и дегазатором. Хроматографическое разделение проводили с использованием аналитической колонки Discovery PFP HS F5 (“Agilent”; 2,1×150 мм; 3 мкм). Состав подвижных фаз: 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 минуте анализа. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,40 мл/мин.

Для детектирования использован масс-спектрометрический детектор на основе тройного квадрупольного Agilent 6460 (“Agilent”) 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”).

Расчёт концентраций метаболитов проводили методом внутреннего стандарта (2-гидроксиникотиновая кислота). Стандарты определяемых соединений готовили с использованием искусственной матрицы, содержащей бычий сывороточный альбумин и хлорид натрия. В матрицу добавляли исследуемые метаболиты и проводили подготовку согласно методике анализа.

Для подготовки пробы сыворотки крови к 100 мкл сыворотки добавляли внутренний стандарт (2-гидроксиникотиновую кислоту), осаждали белки ацетонитрилом, супернатант упаривали и перерастворяли в 10% метаноле в воде с добавлением 0,02% 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 при 13000 об./мин в течение 10 мин ($g=9,840$) образец анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Методика была валидирована по показателям селективности, линейности, точности, воспроизводимости, матричному эффекту и стабильности аналита. Валидация проводилась в соответствии с руководством по валидации биоаналитических методик FDA [16-17].

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием пакета программы STATISTICA 12.0. В таблицах приведены средние величины (M) и их стандартные отклонения (σ). Статистическую значимость различий средних величин независимых выборок оценивали с помощью параметрического анализа после проверки распределения данных на нормальность. Корреляционный анализ по Спирмену проведён с оценкой статистической значимости коэффициента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе концентраций метаболитов кинуренинового и индольного путей в группе детей нами установлено, что при ожирении статистически значимо в сыворотке крови увеличивается концентрация антрааниловой кислоты (на 50%), кинуреновой кислоты (на 43%), ксантуреновой кислоты (на 62%), индол-3-лактата (на 48%) и индол-3-ацетата (на 42%) (табл. 1).

Таблица 1. Концентрация метаболитов обмена триптофана в сыворотке крови ($M \pm \sigma$)

Метаболит	Содержание метаболита, нмоль/л	
	Здоровые дети (n=99)	Дети с ожирением (n=100)
Антраниловая кислота	27,4 \pm 16,7	41,5 \pm 24,5*
Кинуреновая кислота	17,6 \pm 7,05	25,2 \pm 14,2*
Ксантуреновая кислота	3,61 \pm 2,11	5,84 \pm 4,19*
Индол-3-лактат	459 \pm 180	683 \pm 378*
Индол-3-ацетат	1100 \pm 500	1558 \pm 1206**
Кинуренин	2595 \pm 892	2676 \pm 827
Хинолиновая кислота	67,9 \pm 32,6	66,2 \pm 32,1
Серотонина	1112 \pm 1012	923 \pm 411
Триптамин	0,842 \pm 0,781	0,760 \pm 0,235
5-гидроксииндол-3-ацетат	68,7 \pm 21,4	64,1 \pm 18,3
Индол-3-карбоксальдегид	36,9 \pm 19,4	41,9 \pm 19,1
Индол-акрилат	3,12 \pm 3,91	4,11 \pm 4,23
Индол-3-пропионат	877 \pm 654	1033 \pm 873
Индол-3-бутират	4,18 \pm 6,05	4,91 \pm 3,31

Примечание: * — различия, статистически значимые относительно группы здоровых детей при $p < 0,001$;
 ** — различия, статистически значимые относительно группы здоровых детей при $p < 0,005$.

Обращает внимание, что у детей с ожирением статистически значимого отличия для концентрации кинуренина в сыворотке крови не выявлено. Полученный результат не согласуется с данными литературных источников, свидетельствующими об увеличении именно кинуренина в сыворотке крови при ожирении [2].

При этом нами показана интенсификация всех трёх направлений превращения L-кинуренина в антраниловую, кинуреновую и ксантуреновую кислоты. Из полученных нами данных можно предположить, что у детей при ожирении, вероятно, активированы или гиперэкспрессированы кинурениназа (КФ 3.7.1.3) и кинуренинаминотрансферазы (КФ 2.6.1.7). В отличие от антраниловой кислоты, кинуреновая и ксантуреновая кислоты используются организмом и почти не превращаются в хинолиновую кислоту.

Из метаболитов индольного пути обмена триптофана нами показано, что статистически значимо повышена концентрация в сыворотке крови индол-3-лактата и индол-3-ацетата и также приблизительно на 50 % у детей с ожирением данные показатели выше по сравнению с показателями для здоровых детей. Это согласуется с имеющимися представлениями о повышении образования индолов у пациентов с ожирением на фоне гиперпродукции провоспалительных цитокинов [8-10]. Однако авторы указывают именно на повышение самого индола в кишечнике и его стимулирующую роль в регуляции продукции и секреции глюкагоноподобного пептида-1 энтероэндокринными клетками [18]. А в нашем исследовании показано повышение сывороточной концентрации индол-3-лактата и индол-3-ацетата и их патогенетическая роль в развитии ожирения у детей.

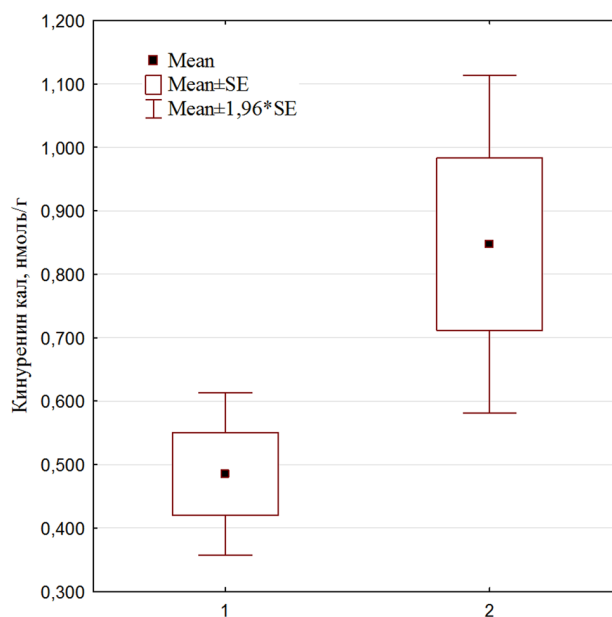


Рисунок 2. Концентрация кинуренина в кале у здоровых детей (1) и у детей с ожирением (2).

При анализе изменений концентраций метаболитов обмена триптофана у детей при ожирении в анализе кала нами установлено, что статистически значимо изменяется концентрация только кинуренина. У детей с ожирением концентрация кинуренина в кале в 2 раза выше, чем у здоровых детей (рис. 2). Следует заметить, что образование кинуренина в кишечнике происходит в скорость-лимитирующей регуляторной реакции катализируемой ИА-2,3-ДО-1 [19], синтез которой индуцируется провоспалительными цитокинами. При этом, в анализе кала для детей

ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ТРИПТОФАНА У ДЕТЕЙ С ОЖИРЕНИЕМ

с ожирением не обнаружено статистически значимого повышения содержания как антраниловой, так и ксантуреновой и кинуреновой кислот. Можно предположить, что кинуренин, который избыточно продуцируется в кишечнике при ожирении, всасывается и достаточно быстро метаболизируется печенью до антраниловой, кинуреновой и ксантуреновой кислот. Вероятно, именно поэтому мы наблюдаем повышение данных метаболитов кинуренина в сыворотке крови у детей с ожирением. Повышение уровня регуляторного фермента образования кинуренина приводит к повышению его концентрации в кишечнике. Кинуренин быстро всасывается и активно конвертируется в кинуреновую, ксантуреновую и антраниловую кислоты в макроорганизме, преимущественно в печени. Данные кислоты связывают с определёнными рецепторами (GPR35, GPR81) жировой ткани, запуская адипоцитарную продукцию провоспалительных цитокинов и лептина, замыкая порочный круг гиперпродукции кинуренина в кишечнике и макроорганизме.

Примечательно, что у детей с ожирением статистически значимо повышена концентрация метаболитов триптофана бактериального происхождения — индол-3-лактата и индол-3-ацетата, тогда как в анализе кала нами не установлено статистически значимых различий в содержании данных метаболитов между группами здоровых детей и детей с ожирением. Можно предположить, что происходит интенсивное всасывание данных метаболитов обмена триптофана из кишечника в кровь благодаря их продукции не внутрипросветной микробиотой, а микроорганизмами, которые ассоциированы со слизистой оболочкой кишечника.

Большая часть метаболитов, продуцируемых микроорганизмами, ассоциированными со слизистой оболочкой кишечника, превращаются ферментами внутри энтероцитов и всасываются в кровь. Тогда как кинуренин образуется внутрипросветной и пристеночной популяцией микроорганизмов.

Следует отметить, что при сравнении групп здоровых детей и детей с ожирением нами не установлено статистически значимых различий в концентрациях индола, хинолиновой кислоты, 3-гидроксииндол-ацетата, индол-3-лактата, индол-3-ацетата, индол-3-карбоксальдегида, индол-акрилата и индола в кале (табл. 2). Данные результаты, вероятно, свидетельствуют, что у детей при ожирении филометаболическое ядро микробиоты глобально не страдает. Возможно, имеет место активное всасывание и биотрансформация бактериальных интермедиатов обмена триптофана в различные метаболиты макроорганизма на уровне энтероцитов и гепатоцитов.

При изучении взаимосвязей различных метаболитов обмена триптофана в сыворотке крови и в кале у здоровых детей нами установлены слабые, но статистически значимые взаимосвязи между содержанием в кале и в сыворотке крови кинуреновой кислоты ($r=0,28$, $p=0,008$) и значимые взаимосвязи между содержанием в кале и в сыворотке крови индол-3-ацетата ($r=0,24$, $p=0,020$) (рис. 3).

Так, установленная нами статистически значимая взаимосвязь концентраций кинуреновой кислоты в сыворотке крови и в кале как у здоровых детей, так и у детей с ожирением ($r=0,29$, $p<0,005$) может указывать на то, что кинуреновая кислота также образуется в кишечнике микроорганизмами, ассоциированными с его слизистой оболочкой.

Таблица 2. Концентрация метаболитов обмена триптофана в экстрактах кала ($M \pm \sigma$)

Метаболит	Содержание метаболита, нмоль/г	
	Здоровые дети (n=91)	Дети с ожирением (n=85)
Индол	701±848	574±866
Хинолиновая кислота	4,74±4,67	4,11±4,13
Кинуренин	0,485±0,623	0,847±1,25*
3-гидроксииндолацетат	1,32±1,76	1,55±1,75
Антраниловая кислота	0,386±0,815	0,338±0,339
Ксантуреновая кислота	2,86±5,06	4,03±8,81
Кинуреновая кислота	12,4±19,3	12,7±19,2
Индол-3-лактат	1,37±2,58	7,81±41,3
Индол-3-ацетат	16,3±31,8	19,7±28,3
Индол-3-карбоксальдегид	5,47±5,53	6,86±9,76
Индол-акрилат	0,176±0,259	0,176±0,219
Индол-пропионат	20,9±29,7	25,8±30,9
Триптамин	1,79±5,68	5,43±29,5

Примечание: * — различия, статистически значимые относительно группы здоровых детей при $p<0,001$.

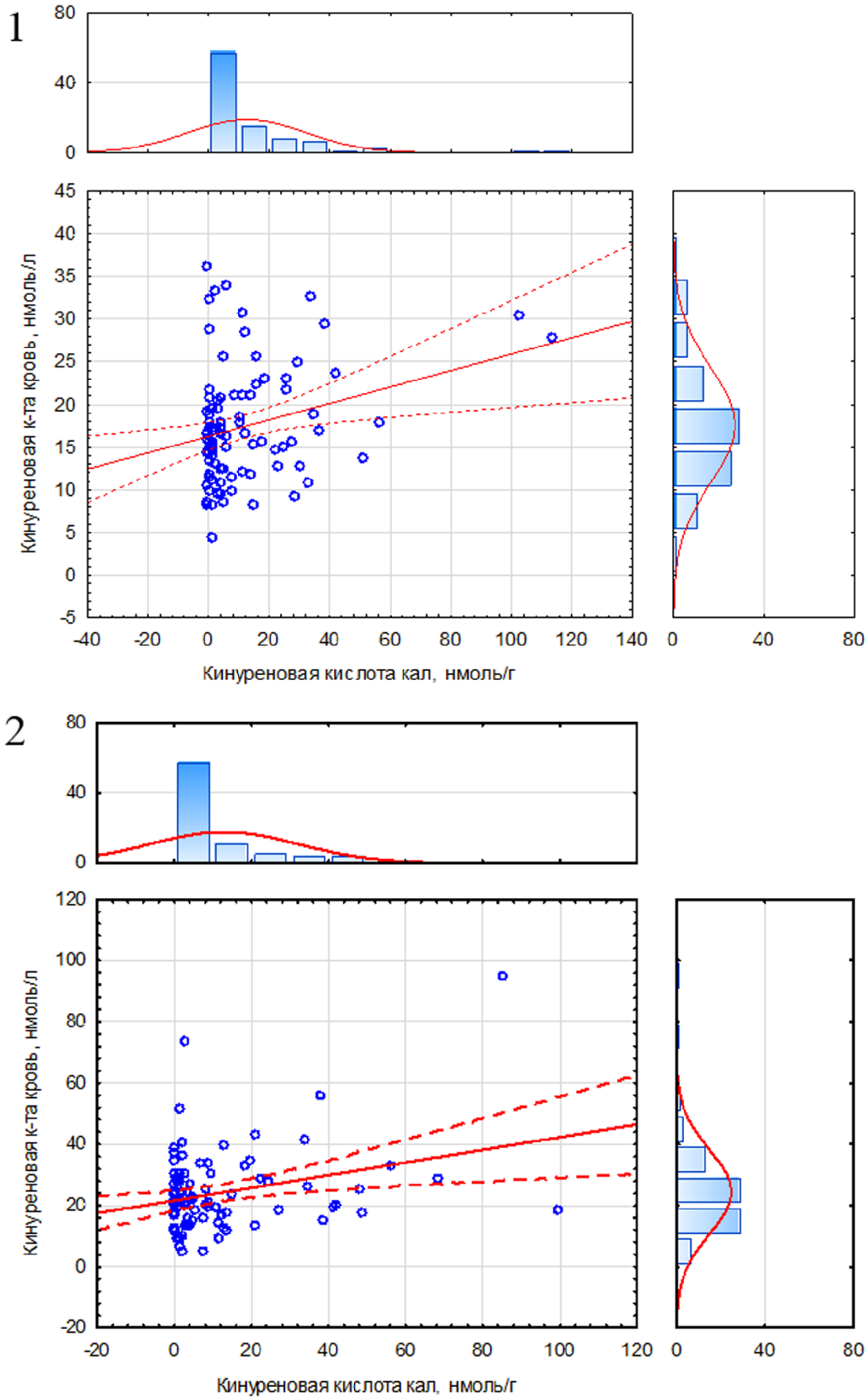


Рисунок 3. Взаимосвязь концентраций кинуреновой кислоты в сыворотке крови с содержанием её в анализе кала у здоровых детей (1) и у детей с ожирением (2).

При этом у детей с ожирением появляется статистически значимая корреляционная связь между концентрацией ксантуреновой кислоты в сыворотке крови и в анализе кала ($r=0,39$, $p<0,001$), между концентрацией индол-пропионата в сыворотке крови и в кале ($r=0,43$), а также согласованное изменение между концентрацией индол-акрилата в сыворотке крови и в кале ($r=0,31$). У здоровых детей эти взаимосвязи отсутствуют, но выявляется статистически значимая корреляционная связь для содержания индол-3-ацетата в сыворотке крови и в кале.

Установленные нами взаимосвязи изменений концентраций метаболитов обмена триптофана в сыворотке крови и в анализе кала у детей свидетельствует о системном изменении продукции кинуреновой и ксантуреновой кислот, которые характерны для больных с ожирением детей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при ожирении у детей метаболизм триптофана и его производных в соматических клетках и в клетках кишечной микробиоты претерпевает существенные изменения для индольного и кинуренинового путей. Так, в содержимом кишечника детей с ожирением увеличивается концентрация кинуренина в два раза по сравнению с группой здоровых детей. В сыворотке крови изменяется концентрация метаболитов кинуренина: кинуреновой, ксантуреновой и антралиновой кислот. При этом сам сывороточный кинуренин статистически значимо не отличается у детей с ожирением и здоровых детей. В содержимом кишечника у детей с ожирением нами не установлено статистически значимых изменений для концентраций метаболитов индольного пути обмена триптофана. Однако в сыворотке крови у детей с ожирением повышены концентрации бактериальных метаболитов триптофанового обмена — индол-3-лактата и индол-3-ацетата. Концентрация серотонина и триптамина в сыворотке крови у детей с ожирением остаются сопоставимыми с нормальными референтными значениями.

Таким образом, впервые показано, что особенности обмена триптофана кишечной микробиотой, сопряжение метаболизма обмена триптофана и его метаболитов на уровне “микробиота-энтероциты”, обмен триптофана и его производных в соматических клетках макроорганизма, а также экскреция триптофановых производных и масштабный сигналинг индолом и кинуреновой кислотой на всю систему “макроорганизм-микробиота кишечника” претерпевают значительное ремоделирование при ожирении у детей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках договора № 0373100122119000041 по проекту “Создание банка биообразцов сыворотки крови и фекалий

от здоровых доноров и пациентов с ожирением, метаболическим синдромом, сахарным диабетом II типа, нарушением мукозального барьера желудочно-кишечного тракта с целью выявления кандидатных видонеспецифических медиаторов систем quorum sensing микробиоты человека, модулирующих эндокринную и метаболическую функцию жировой ткани”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование одобрено Локальным независимым этическим комитетом Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н.И. Пирогова Минздрава России протокол № 186 от 26.06.2019 г. Все больные или их представители (для несовершеннолетних) подписали информированное добровольное согласие на использование биологического материала в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Comai S., Bertazzo A., Brughera M., Crotti S. (2020) Adv. Clin. Chem., **95**, 165-218.
- Agus A., Planchais J., Sokol H. (2018) Cell Host Microbe, **23**, 716-724.
- Song P., Ramprasath T., Wang H., Zou M.H. (2017) Cell Mol. Life Sci., **74**, 2899-2916.
- 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) Am. J. Pathol., **188**, 1183-1194.
- Pernomian L., Duarte-Silva M., de Barros Cardoso C.R. (2020) Clin. Rev. Allergy. Immunol., **59**(3), 382-390. DOI: 10.1007/s12016-020-08789-3.
- Wu S., Liu J., Liu C., Yang A., Qiao J. (2020) Cell Mol. Life Sci., **77**, 1319-1343.
- Oxenkrug G.F. (2011) J. Neural Transmission, **118**, 75-85.
- Brandacher G., Hoeller E., Fuchs D., Weiss H.G. (2007) Curr. Drug. Metab., **8**, 289-295.
- Liu J.J., Movassat J., Portha B. (2019) Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care., **22**, 82-90.
- Dadvar S., Ferreira D.M.S., Cervenka I., Ruas J.L. (2018) J. Intern. Med., **284**, 519-533.
- Oxenkrug G., van der Hart M., Roeser J., Summergrad P. (2017) Endocrinol. Diabetes Metab. J., **1**(4), 1-10.
- Mallmann N.H., Lima E.S., Lahwani P. (2018) Metab. Syndr. Relat. Disord., **16**, 135-142.
- Barat P., Meiffred M.C., Brossaud J., Fuchs D., Corcuff J.B., Thibault H., Capuron L. (2016) Psychoneuroendocrinology, **74**, 158-163.
- Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Вахитов Т.Я. (2015) Альманах клинической медицины, **40**, 12-34.[Sitkin S.I., Tkachenko E.I., Vakhitov T.Ya. (2015) Almanah klinicheskoy mediciny, **40**, 12-34.]
- Wang S.Z., Yu Y.J., Adeli K. (2020) Microorganisms, **8**(5), 693.

16. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. September 2013. Revision 1. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration.
17. Guideline on Bioanalytical Method Validation. 01 February 2012. EMEA/CHMP/EWH/192217/2009/Rev. 1 Corr. 2. European Medicines Agency.
18. van Baar A.C.G., Prodan A., Wahlgren C.D., Poulsen S.S., Knop F.K., Groen A.K., Bergman J.J., Nieuwdorp M., Levin E. (2018) *Endocr. Connect.*, **7**, 673-680.
19. Laurans L., Venteclef N., Haddad Y., Chajadine M., Alzaid F., Metghalchi S., Sovran B., Denis R.G., Dairou J., Cardellini M., Moreno-Navarrete J.M., Straub M., Jegou S., McQuitty C., Viel T., Esposito B., Tavitian B., Callebort J., Luquet S.H., Federici M., Fernandez-Real J.M., Burcelin R., Launay J.M., Tedgui A., Mallat Z., Sokol H., Taleb S. (2018) *Nat. Med.*, **24**, 1113-1120.

Поступила в редакцию: 18. 05. 2020.
После доработки: 24. 09. 2020.
Принята к печати: 16. 10. 2020.

THE STUDY OF TRYPTOPHAN METABOLITE CONCENTRATIONS IN BLOOD SERUM AND FECAL EXTRACTS FROM OBESE CHILDREN

A.V. Shestopalov^{1,5}, O.P. Shatova^{2}, A.M. Gaponov^{1,5}, N.E. Moskaleva³,
S.A. Appolonova³, A.V. Tutelyan¹, V.V. Makarov⁴, S.M. Yudin⁴, S.A. Rumyantsev^{2,5}*

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center
of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

²Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia; *e-mail: shatova.op@gmail.com

³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia

⁵Center for Digital and Translational Biomedicine "Center for Molecular Health", Moscow, Russia

We found that changes in the concentrations of tryptophan metabolites in the blood serum and in the intestinal contents are one of the mechanisms for the formation of metabolic coupling in the system "macroorganism-intestinal microbiota", which undergoes significant changes in the development of obesity. Although blood kynurenine remained basically unchanged in obese children we found an increase in some of its serum metabolites: anthranilic, kynurenic and xanthurenic acids. It is noteworthy that in the analysis of fecal matter in obese children, revealed a 2-fold increase in the level of kynurenine while the concentration of kynurenine pathway metabolites corresponded to the level of the group of healthy children. This may indicate the metabolic activation of the microbiota associated with the intestinal mucosa. This is also supported by the absence of statistically significant differences in the concentration of indole in healthy children and in obese children in fecal analyses, and a significant increase in the concentration of indole-3-lactate and indole-3-acetate in the blood serum of obese children.

Key words: microbiota; tryptophan; obesity; kynurenine; indoles; metabolic coupling

Funding. The work was carried out under the agreement No. 0373100122119000041 on the project "Creation of a Bank of blood serum and fecal samples from healthy donors and patients with obesity, metabolic syndrome, type II diabetes mellitus, violation of the mucosal barrier of the gastrointestinal tract in order to identify candidate species-specific mediators of the human microbiota quorum sensing systems that modulate the endocrine and metabolic function of adipose tissue".

Received: 18.05.2020, revised: 24.09.2020, accepted: 16.10.2020.