

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-89-96



Метаболизм триптофана при различном эффекте иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого ингибиторами PD-1/PD-L1

Е.Ю. Златник¹, А.Б. Сагакянц¹, И.А. Новикова¹, А.Ю. Максимов¹, О.П. Шатова², С.А. Апполонова², Н.Е. Москалева², С.А. Румянцев², А.В. Шестопалов²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²кафедра биохимии и молекулярной биологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Александр Борисович Сагакянц asagak@rambler.ru

Введение. В структуре онкологической заболеваемости рак легкого занимает 1-е место среди мужчин. С целью изучения молекулярных механизмов инициации и прогрессирования рака легких необходимо исследовать не только сами опухолевые клетки, но и особенности системного метаболизма триптофана. Катаболиты триптофана, будучи в большой степени продуктами метаболической активности микробиоты кишечника, могут влиять на эффективность проведения иммунотерапии ингибиторами контрольных точек. Кинурениновый путь метаболизма триптофана интенсифицируется в организме онкологических пациентов, его продукты имеют проонкогенное и иммуносупрессивное действие, что может препятствовать эффективности иммунотерапии.

Цель исследования – изучение динамики изменений различных метаболитов триптофанового обмена в сыворотке крови и кале больных немелкоклеточным раком легкого при различных эффектах иммунотерапии ингибиторами PD-1 (рецептора программируемой клеточной гибели 1)/PD-L1 (лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1).

Материалы и методы. В исследование были включены образцы сыворотки крови и кала, полученные от 20 больных немелкоклеточным раком легкого, получавших ингибиторы PD-1/PD-L1. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим анализом проведена оценка уровней 13 метаболитов триптофана у больных с различными эффектами иммунотерапии. Достоверность различий между выборками оценивали с помощью непараметрического метода по критерию Манна–Уитни. Они считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. В анализах кала пациентов, у которых наблюдали положительный эффект от иммунотерапии, исходные уровни 5-гидроксииндолацетата и хинолиновой кислоты были ниже, чем у больных с прогрессированием опухоли. Положительная клиническая динамика сопровождалась снижением содержания индол-3-лактата, кинуренина и индол-3-карбоксальдегида в анализах кала больных. В сыворотке пациентов с положительным ответом исходное содержание 5-гидроксииндолацетата, индол-3-ацетата, индол-3-бутирата и хинолиновой кислоты оказалось ниже, чем у пациентов с прогрессированием немелкоклеточного рака легкого. Положительный ответ на иммунотерапию характеризовался повышением уровней индол-3-бутирата и индол-3-пропионата, а отрицательный – не сопровождался статистически значимыми изменениями исследованных триптофановых метаболитов.

Заключение. Профилирование метаболитов триптофана в кале и сыворотке больных немелкоклеточным раком легкого может быть использовано для прогнозирования эффективности иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, иммунотерапия ингибиторами PD-1/PD-L1, метаболиты триптофана, прогнозирование

Для цитирования: Златник Е.Ю., Сагакянц А.Б., Новикова И.А. и др. Метаболизм триптофана при различном эффекте иммунотерапии немелкоклеточного рака легкого ингибиторами PD-1/PD-L1. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(2):89–96. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-89-96.

Metabolism of tryptophan in non-small lung cancer patients with different effect of PD-1/PD-L1 inhibitors immunotherapy

E. Yu. Zlatnik¹, A. B. Sagakyants¹, I. A. Novikova¹, A. Yu. Maksimov¹, O. P. Shatova², S. A. Appolonova², N. E. Moskaleva², S. A. Rumyantsev², A. V. Shestopalov²

¹National Medical Research Centre for Oncology; 63 14th Liniya St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Alexander Borisovich Sagakyants asagak@rambler.ru

Introduction. In the structure of cancer incidence, lung cancer ranks first among men. In order to study the molecular mechanisms of the initiation and progression of lung cancer, it is necessary to study not only the tumor cells themselves, but also the features of the systemic tryptophan metabolism. Tryptophan catabolites, being to a large extent product of the metabolic activity of the intestinal microbiota, can affect the effectiveness of immunotherapy with checkpoint inhibitors. The kynurenine pathway of tryptophan metabolism is intensified in the body of cancer patients; its products have a pro-oncogenic and immunosuppressive effect, which may hinder the effectiveness of immunotherapy.

Objective – to study the dynamics of changes in various metabolites of tryptophan metabolism in the blood serum and feces of patients with non-small cell lung cancer with various effects of immunotherapy with inhibitors of PD-1 (programmed cell death receptor 1)/PD-L1 (programmed cell death receptor 1 ligand).

Materials and methods. The study included blood serum and stool samples obtained from 20 patients with non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. Using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric analysis, the levels of 13 tryptophan metabolites were assessed in patients with various effects of immunotherapy. The significance of differences between the samples was assessed using a nonparametric method according to the Mann – Whitney test. They were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. In fecal analyzes of patients in whom a positive effect of immunotherapy was observed, baseline levels of 5-hydroxyindole acetate and quinolinic acid were lower than in patients with tumor progression. Positive clinical dynamics was accompanied by a decrease in the content of indole-3-lactate, kynurenine and indole-3-carboxaldehyde in the feces of patients. In the serum of patients with a positive response, the initial content of 5-hydroxyindole acetate, indole-3-acetate, indole-3-butyrate and quinoline acid was lower than in patients with progression of non-small cell lung cancer. A positive response to immunotherapy was characterized by an increase in the levels of indole-3-butyrate and indole-3-propionate, and a negative response was not accompanied by statistically significant changes in the studied tryptophan metabolites.

Conclusion. Profiling tryptophan metabolites in feces and serum of patients with non-small cell lung cancer can be used to predict the effectiveness of immunotherapy with PD-1/PD-L1 inhibitors.

Key words: non-small lung cancer, immunotherapy with PD-1/PD-L1 inhibitors, tryptophan metabolites, prognosis

For citation: Zlatnik E.Yu., Sagakyants A.B., Novikova I.A. et al. Metabolism of tryptophan in non-small lung cancer patients with different effect of PD-1/PD-L1 inhibitors immunotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(2):89–96. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-89-96.

ВВЕДЕНИЕ

В связи с высокой заболеваемостью метастатическим немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) и недостаточной эффективностью методов его лечения многие исследовательские группы ведут активный поиск новых подходов к терапии данной патологии. Актуальным и обнадеживающим направлением иммунотерапии является применение ингибиторов контрольных точек (ИКТ) системы PD-1 (рецептор программируемой клеточной гибели 1)/PD-L1 (лиганд рецептора программируемой клеточной гибели 1), которые гиперэкспрессированы на Т-лимфоцитах и опухолевых клетках соответственно [1–3]. Однако использование ИКТ не всегда дает желаемый эффект, который зависит не только от экспрессии рецепторов и лигандов, но и от системного метаболизма триптофана.

В настоящее время известно, что опухоль является «ловушкой» не только для глюкозы, но и для незаменимой аминокислоты триптофана. Показано, что в большинстве образцов рака толстой кишки гиперэкспрессированы гены транспортеров триптофана SLC1A5 (solute carrier – растворимые переносчики) и SLC7A5 [4], вследствие чего опухолевое метаболическое микроокружение характеризуется дефицитом

триптофана и повышением содержания иммуносупрессивных триптофановых катаболитов [5]. Многочисленные работы, посвященные изучению роли триптофанового обмена в канцерогенезе, демонстрируют плейотропные эффекты продуктов катаболизма триптофана: кинуренина [5], кинуреновой кислоты [6], индола [7], индол-3-ацетата [8], индол-3-бутирата, самого триптофана, серотонина [9] и др. [10]. Сывороточный уровень триптофана зависит как от поступления с пищей, так и от микробиотического синтеза и реутилизации аминокислоты [11] благодаря катаболизму собственных белков. В макроорганизме триптофан превращается по 3 ключевым путям: серотониновому, индольному и кинурениновому [12]. Последний интенсифицирован в опухолевой ткани [4], что объясняется активирующим действием протоонкогена *c-MYC*, а также генов, гиперэкспрессированных в опухолях и ответственных за ферменты продукции кинуренина: триптофан-2,3-диоксигеназы (TDO2), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO1) и арилформамидазы (AFMID).

Гиперпродукция кинуренина и высокая экспрессия транспортеров триптофана обеспечивают межклеточное вещество опухоли высокой концентрацией кинуренина, участвующего в иммуноредатировании

опухолевого микроокружения и вызывает инактивацию Т-клеток [13] и деградацию Е-кадгерина, что является критическим событием для миграции и метастазирования опухолевых клеток [14]. Согласно недавним исследованиям триптофан путем присоединения к остаткам лизина в различных белках (триптофанилирования) способствует регуляции экспрессии PD-1 [4]. Таким образом, у пациентов со злокачественными новообразованиями, в частности с раком легкого, триптофановый обмен, включающий системный (сывороточный) и локальный (кишечный) компартменты, может отразиться на результативности применения ИКТ [2].

Цель исследования – изучение динамики изменения различных метаболитов триптофанового обмена в сыворотке крови и кале больных НМРЛ при разном эффекте иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включен 21 пациент с НМРЛ различной морфологии и стадии TNM, получавший ингибиторы PD-1/PD-L1. Средний возраст больных составил $62,3 \pm 5,7$ года. У 1 пациента развилось иммуноопосредованное нежелательное явление (синдром Гийена–Барре), вследствие чего ИКТ были отменены. Среди обследованных в динамике 20 больных НМРЛ (12 мужчин и 8 женщин) при поступлении заболевание I стадии было диагностировано у 2 (9 %) пациентов, II стадии – у 1 (5 %), III стадии – у 5 (24 %), IV стадии – у 13 (62 %).

Больные получали лечение согласно стандартам, а при развитии генерализации им назначали ингибиторы PD-1/PD-L1. Так, 9 (45 %) пациентов исследуемой группы получали атезолизумаб, 8 (40 %) – пембролизумаб и 3 (15 %) – ниволумаб. Больные были разделены на 3 группы в соответствии с ответом на терапию: положительной динамики после иммунотерапии (уменьшение опухоли, ремиссия), отрицательной динамики (прогрессирование заболевания) и стабилизации процесса (отсутствие динамики) (табл. 1). Пациенты исследуемой группы ($n = 20$) ответили на терапию ИКТ следующим образом: у 2 был полный ответ, у 6 – частичный ответ, у 4 – стабилизация процесса и у 8 – отрицательная динамика (прогрессирование заболевания).

Критериями включения пациентов в исследование были отсутствие приема антибиотиков, пре- и/или пробиотических препаратов в течение 3 мес до его начала и наличие письменного информированного согласия на участие в нем. Все больные прошли клиническое обследование, антропометрическую оценку и анкетирование. Также у них были взяты образцы крови и кала для лабораторного анализа.

Количественную оценку 13 метаболитов триптофана в сыворотке крови и кале проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим определением (ВЭЖХ-МС/МС)

с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 (Agilent Inc., США).

Хроматографическое разделение проводили с помощью аналитической колонки Discovery PFP HS F5 ($2,1 \times 150$ мм; 3 мкм). Для детектирования использовался масс-спектрометрический детектор на основе МРМ Agilent 6460 с тройным квадруполем (Agilent Inc., США) и ионизацией электрораспылением. Полученный сигнал обрабатывался с помощью программного обеспечения Masshunter (Agilent Inc., США).

Концентрацию метаболитов рассчитывали методом внутреннего стандарта с использованием 2-гидроксинокотиновой кислоты. Аналитические стандарты были подготовлены с помощью искусственной матрицы, содержащей бычий сывороточный альбумин и хлорид натрия. Изученные метаболиты добавлены в матрицу и приготовлены в соответствии с методом анализа. Для подготовки образцов к 100 мкл сыворотки крови добавляли внутренний стандарт (2-гидроксинокотиновую кислоту), белки осаждали ацетонитрилом, супернатант выпаривали и повторно растворяли в 10 % метаноле с добавлением аскорбиновой кислоты для предотвращения окисления анализируемых веществ. Образцы кала лиофилизировали до сухого остатка, затем навеску массой около 5 мг экстрагировали 50 % метанолом в воде с добавлением внутреннего стандарта и аскорбиновой кислоты. После центрифугирования образец анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Статистический анализ проводили с помощью пакета статистических программ MedCalc и Statistica 13.3 (StatSoft Inc., США), что предполагало расчет основных статистических характеристик выборок, выявление характера распределения показателей с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку полученные данные имели ненормальное распределение, результаты представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Me (нижний квартиль – верхний квартиль)). Достоверность различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При оценке динамики уровня метаболитов триптофана в целом по группе больных было установлено, что на фоне проведения иммунотерапии в сыворотке крови наблюдается повышение уровня хинолиновой кислоты (с Me 162,44 (105,420–214,794) до Me 171,812 (123,548–255,301); $p < 0,05$) и снижение уровня серотонина (с Me 371,693 (264,420–545,143) до Me 309,685 (182,781–475,658); $p < 0,05$). При этом уровень триптофана статистически значимо не изменился, а в кале было обнаружено возрастание этого показателя (с Me 37,025 (19,351–61,810) до Me 57,451 (25,183–83,859); $p < 0,05$) (см. рисунок). Изменений других исследованных метаболитов триптофана обнаружено не было.

Таблица 1. Содержание триптофана и его метаболитов в кале пациентов с немелкоклеточным раком легкого до и после иммунотерапии в зависимости от эффекта лечения, нмоль/г

Table 1. Levels of tryptophan and its metabolites in feces of patients with non-small-cell lung carcinoma before and after immunotherapy depending on their response to treatment, nmol/g

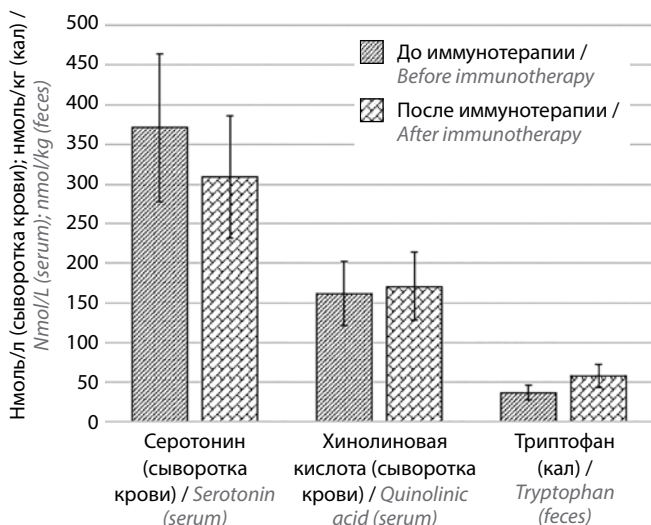
| Метаболит Metabolite | Отрицательная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Negative dynamics, median (lower quartile – upper quartile) | | Положительная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Positive dynamics, median (lower quartile – upper quartile) | | Стабилизация, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Stabilization, median (lower quartile – upper quartile) | |
|--|--|----------------------------------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | До лечения Before treatment | После лечения After treatment | До лечения Before treatment | После лечения After treatment | До лечения Before treatment | После лечения After treatment |
| Триптофан Tryptophan | 32,9 (25,6–70,8) | 76,5 (25,7–92,8) | 41,5 (23,3–53,3) | 50,1 (26,1–64,4) | 11,5 (11,5–48,4) | 39,2 (17,6–62,1) |
| Индол-3-ацетат Indole-3-acetate | 2,95 (1,38–24,60) | 11,30 (6,56–15,70) | 10,10 (3,69–13,40) | 6,66 (3,28–16,80) | 10,60 (3,59–14,40) | 3,86 (2,31–4,81) |
| Индол-3-пропионат Indole-3-propionate | 2,57 (0,83–6,21) | 7,92 (2,72–10,90) | 5,86 (1,49–7,84) | 5,58 (3,76–5,83) | 1,66 (0,95–4,49) | 3,01 (2,55–10,1) |
| Кинуреновая кислота Hyaluronic acid | 3,29 (1,75–8,28) | 1,99 (1,36–4,79) | 2,65 (1,17–10,40) | 5,25 (0,98–9,07) | 0,92 (0,82–1,21) | 1,71 (1,01–6,85) |
| Хинолиновая кислота Quinolic acid | 4,42 (1,73–5,49) | 2,01 (1,86–8,81) | 1,24* (0,91–2,30) | 1,74 (1,06–2,41) | 1,76 (1,21–1,96) | 3,41 (3,18–9,14) |
| Индол-3-карбоксальдегид Indole-3-carboxaldehyde | 1,47 (1,07–4,27) | 1,37 (0,88–2,03) | 3,41 (1,51–4,89) | 1,86* (0,79–2,56) | 2,72 (1,22–6,95) | 1,41 (0,53–2,71) |
| Ксантуреновая кислота Xanthurenic acid | 1,66 (0,43–2,49) | 0,86 (0,42–3,69) | 0,28 (0,15–4,22) | 0,41 (0,03–1,45) | 1,69 (0,48–10,10) | 2,27 (1,72–2,62) |
| Индол-3-бутират Indole-3-butyrate | 0,437 (0,202–0,825) | 0,373 (0,314–0,641) | 0,476 (0,233–0,744) | 0,414 (0,133–0,818) | 0,266 (0,256–0,333) | 0,314 (0,129–0,657) |
| Кинуренин Kinurenin | 0,284 (0,126–1,560) | 0,295 (0,210–1,470) | 0,276 (0,079–0,508) | 0,197** (0,163–0,198) | 0,111 (0,098–0,128) | 0,124 (0,108–0,162) |
| 5-гидроксииндолацетат 5-hydroxyindolacetate | 0,567 (0,150–0,993) | 0,611 (0,195–0,915) | 0,064* (0,025–0,363) | 0,173 (0,038–0,657) | 0,106 (0,045–0,217) | 0,394 (0,184–1,06) |
| Индол-3-лактат Indole-3-lactate | 0,198 (0,122–0,801) | 0,227 (0,204–0,678) | 0,185 (0,142–0,301) | 0,114** (0,066–0,154) | 0,357 (0,136–0,567) | 0,314 (0,143–0,723) |
| Триптамин Tryptamine | 0,136 (0,029–0,430) | 0,123 (0,056–2,110) | 0,096 (0,054–0,175) | 0,041 (0,009–0,201) | 0,257 (0,084–0,344) | 0,191 (0,017–1,320) |
| Антралиловая кислота Anthranilic acid | 0,081 (0,067–0,128) | 0,087 (0,076–0,175) | 0,123 (0,072–0,163) | 0,084 (0,060–0,160) | 0,074 (0,061–0,125) | 0,128 (0,068–0,214) |

*Статистически значимые различия показателей по сравнению с группой, в которой наблюдалась отрицательная динамика ($p \leq 0,05$). **Статистически значимые различия до и после иммунотерапии в каждой группе.

*Statistically significant differences in indicators compared to the group in which negative dynamics was observed ($p \leq 0.05$). **Statistically significant differences before and after immunotherapy in each group.

В табл. 1 и 2 представлены результаты оценки содержания метаболитов триптофана в кале и сыворотке крови пациентов с различным ответом на иммунотерапию: с отрицательным, положительным ответами и стабилизацией процесса. Выявлены статистически значимые различия показателей как до лечения, так и в ходе его проведения. Так, в кале исходное содержание 5-гидроксииндолацетата и хинолиновой кислоты было ниже у пациентов, у которых отмечалась

эффективность терапии, по сравнению с больными с прогрессированием опухоли на фоне лечения (см. табл. 1). Положительная клиническая динамика сопровождалась снижением содержания индол-3-лактата, кинуренина и индол-3-карбоксальдегида в кале. Статистически значимых различий исследованных показателей (в том числе в динамике – до и после лечения) у пациентов со стабилизацией процесса и других групп не отмечено.



Содержание триптофана и его метаболитов в сыворотке крови и кале у пациентов с немелкоклеточным раком легкого до и после иммунотерапии

Levels of tryptophan and its metabolites in serum and feces of patients with non-small-cell lung carcinoma before and after immunotherapy

Анализ содержания метаболитов триптофана в сыворотке крови также выявил ряд статистически значимых различий как до лечения, так и в ходе его проведения (табл. 2). Исходное содержание 5-гидроксииндолацетата, индол-3-ацетата, индол-3-бутирата и хинолиновой кислоты оказалось ниже у пациентов с положительным эффектом иммунотерапии по сравнению с группой больных с отрицательной динамикой; при стабилизации статистически значимых различий до и после лечения не обнаружено.

Положительный ответ на иммунотерапию характеризовался повышением уровней индол-3-бутирата и индол-3-пропионата, тогда как отрицательный ответ не сопровождался статистически значимыми изменениями исследованных метаболитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы установили, что иммунотерапия ингибиторами PD-1/PD-L1 у пациентов с НМРЛ способствует повышению уровня триптофана в кишечнике, по-видимому, за счет активности его микробиоты. При этом

Таблица 2. Содержание триптофана и его метаболитов в сыворотке крови пациентов с немелкоклеточным раком легкого до и после иммунотерапии в зависимости от эффекта лечения, нмоль/г

Table 2. The content of tryptophan and its metabolites in the blood serum of patients with non-small cell lung cancer before and after immunotherapy, depending on the effect of treatment, nmol/g

| Метаболит Metabolite | Отрицательная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Negative dynamics, median (lower quartile – upper quartile) | | Положительная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Positive dynamics, median (lower quartile – upper quartile) | | Стабилизация, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Stabilization, median (lower quartile – upper quartile) | |
|--|---|----------------------------------|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | До лечения Before treatment | После лечения After treatment | До лечения Before treatment | После лечения After treatment | До лечения Before treatment | После лечения After treatment |
| Триптофан Tryptophan | 20 305 (17 000–24 277) | 17 419 (14 338–18 468) | 14 256 (12 872–22 850) | 16 574 (15 542–22 888) | 18 627 (16 727–20 784) | 20 526 (19 718–28 199) |
| Индол-3-ацетат Indole-3-acetate | 1498 (1055–2093) | 808 (773–1900) | 721* (662–957) | 942 (752–1364) | 1588 (844–2067) | 1813 (1341–2779) |
| Индол-3-пропионат Indole-3-propionate | 502 (286–905) | 316 (235–745) | 211 (110–602) | 726* (656–2397) | 1112 (836–1385) | 1454 (961–2310) |
| Кинуреновая кислота Hyaluronic Acid | 11,80 (8,91–17,70) | 8,97 (5,85–15,50) | 12,20 (5,14–24,50) | 14,50 (11,40–17,80) | 9,64 (7,41–44,50) | 36,30 (16,50–56,20) |
| Хинолиновая кислота Quinolic acid | 181,0 (96,1–256,0) | 171,0 (138,0–249,0) | 136,0* (97,3–140,0) | 167,0 (89,8–244,0) | 179,0 (172,0–430,0) | 337,0 (119,0–1121,0) |
| Индол-3-карбоксальдегид Indole-3-carboxaldehyde | 43,9 (33,3–62,7) | 27,1 (22,2–40,3) | 34,2 (28,7–66,2) | 40,9 (24,5–55,5) | 45,3 (33,8–74,3) | 68,5 (64,1–73,1) |
| Ксантуреновая кислота Xanthurenic acid | 1,230 (0,404–2,160) | 0,862 (0,627–1,470) | 0,845 (0,457–2,910) | 1,170 (0,795–1,490) | 1,050 (0,655–4,870) | 2,710 (2,040–4,140) |
| Индол-3-бутират Indole-3-butyrate | 8,63 (7,03–18,30) | 7,07 (5,75–12,90) | 4,65* (3,78–8,44) | 9,04* (5,93–9,61) | 9,63 (6,85–22,30) | 14,20 (13,50–20,10) |
| Кинуренин Kinurenin | 3125 (2613–4088) | 2117 (1640–2999) | 3034 (2810–4788) | 2735 (1828–3167) | 2615 (2223–3357) | 3048 (2100–3336) |
| 5-гидроксииндолацетат 5-hydroxyindolacetate | 75,9 (63,4–107,0) | 56,6 (42,1–83,8) | 51,7* (38,9–69,5) | 88,8 (54,4–115,0) | 60,4 (53,8–258,0) | 129,0 (89,6–152,0) |

Окончание табл. 2

The end of table 2

| Метаболит Metabolite | Отрицательная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Negative dynamics, median (lower quartile – upper quartile) | | Положительная динамика, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Positive dynamics, median (lower quartile – upper quartile) | | Стабилизация, медиана (нижний квартиль – верхний квартиль) Stabilization, median (lower quartile – upper quartile) | |
|--|--|----------------------------------|--|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | До лечения Before treatment | После лечения After treatment | До лечения Before treatment | После лечения After treatment | До лечения Before treatment | После лечения After treatment |
| Индол-3-лактат Indole-3-lactate | 8,98 (3,38–15,60) | 9,21 (4,84–14,50) | 6,42 (3,45–9,67) | 14,50 (5,72–24,10) | 6,71 (4,62–11,20) | 8,26 (7,11–26,80) |
| Триптамин Tryptamine | 0,187 (0,107–0,345) | 0,104 (0,058–0,194) | 0,091 (0,074–0,121) | 0,105 (0,079–0,139) | 0,096 (0,055–0,131) | 0,176 (0,131–0,371) |
| Антраниловая кислота Anthranilic acid | 20,6 (12,1–25,4) | 16,4 (12,7–27,1) | 11,9 (8,5–24,7) | 20,5 (11,7–21,8) | 11,4 (10,8–36,2) | 28,3 (21,2–45,1) |

*Статистически значимые различия показателей по сравнению с группой, в которой наблюдалась отрицательная динамика ($p \leq 0,05$). *Статистически значимые различия до и после иммунотерапии в каждой группе.

*Statistically significant differences in indicators compared to the group in which negative dynamics was observed ($p \leq 0.05$). *Statistically significant differences before and after immunotherapy in each group.

в сыворотке крови увеличивается уровень хинолиновой кислоты и снижается концентрация серотонина. Положительная динамика течения заболевания при иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 связана с низкой концентрацией как в сыворотке, так и в кале хинолиновой кислоты – токсичного вещества, продуцируемого макрофагами. Скорее всего, это отражает изменение их количества и функциональной активности, что еще предстоит изучить.

Эффективность иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 зависит как от таксономического разнообразия и количества полезных микроорганизмов [14], так и от метаболизма триптофановых производных и их регуляторной функции в отношении различных систем организма. Недавнее таксономическое исследование микробиоты кишечника пациентов с опухолями желудочно-кишечного тракта до и после иммунотерапии PD-1/PD-L1-ингибиторами продемонстрировало, что при положительном ответе на лечение в кишечнике преобладали *Prevotella*, *Ruminococcaceae* и *Lachnospiraceae*. Кроме того, показано, что представленность кишечной микробиоты, продуцирующей короткоцепочечные жирные кислоты (*Eubacterium*, *Lactobacillus* и *Streptococcus*), взаимосвязана с положительным ответом на анти-PD-1/PD-L1-терапию [15, 16].

Также мы установили, что успешность проведения иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1 НМРЛ зависит от концентраций индол-3-ацетата и индол-3-бутирата, которые образуются микробиотой кишечника, т.е. ее эффективность связана с составом микробиотических метаболитов. При этом сама иммунотерапия, по-видимому, способна редактировать микробиоту как таксономически, так и метаболически, поскольку

после лечения изменяется концентрация главного редактора триптофанирования белков – триптофана. Это, в свою очередь, снижает синтез PD-1 и определяет эффективность терапии НМРЛ PD-1/PD-L1-ингибиторами [2, 16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный анализ системного и локального содержания метаболитов триптофана у пациентов с НМРЛ при различном ответе на иммунотерапию ингибиторами PD-1/PD-L1 показал ряд различий, что позволяет выделить как предиктивные, так и характеризующие развитие эффекта факторы. Среди первых низкий уровень хинолиновой кислоты и 5-гидроксииндолацетата в кале и сыворотке крови, а также высокий уровень индол-3-ацетата, индол-3-бутирата в сыворотке, которые позволяют прогнозировать положительный ответ, среди последних – повышение уровней индол-3-пропионата и индол-3-бутирата в сыворотке и снижение содержания индол-3-карбок-сальдегида, индол-3-лактата и кинуренина в кале больных при развитии положительного ответа, что свидетельствует об активации триптофанозного пути метаболизма и о возможном изменении филометаболического ядра микробиоты у данной группы пациентов.

По-видимому, полученные различия связаны с состоянием микробиоты и локального иммунитета, детальное изучение и коррекция которых может способствовать улучшению результатов иммунотерапии. Таким образом, профилирование метаболитов триптофана в кале и сыворотке крови у пациентов с НМРЛ может быть использовано для прогноза эффективности иммунотерапии ингибиторами PD-1/PD-L1.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Wu Y., Chen W., Xu Z.P., Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy-blockade, knockdown, or inhibition. *Front Immunol* 2019;10:2022. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02022.
2. Qin R., Zhao C., Wang C.J. et al. Tryptophan potentiates CD8+ T cells against cancer cells by TRIP12 tryptophanylation and surface PD-1 downregulation. *J Immunother Cancer* 2021;9(7):e002840. DOI: 10.1136/jitc-2021-002840.
3. Кит О.И., Водолажский Д.И., Максимов А.Ю. и др. Молекулярно-генетические и фенотипические особенности больных аденокарциномой легкого жителей юга России. Молекулярная медицина 2016;14(6):35–40. [Kit O.I., Vodolazhsky D.I., Maksimov A.Yu. et al. Molecular genetic and phenotypic characteristics of patients with lung adenocarcinoma among inhabitants of the south of Russia. *Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine* 2016;14(6):35–40. (In Russ.)].
4. Venkateswaran N., Lafita-Navarro M.C., Hao Y.H. et al. MYC promotes tryptophan uptake and metabolism by the kynurenine pathway in colon cancer. *Genes Dev* 2019;33(17–18):1236–51. DOI: 10.1101/gad.327056.119.
5. Platten M., Wick W., Van den Eynde B.J. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res* 2012;72(21):5435–40. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0569.
6. Walczak K., Turski W.A., Rajtar G. Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation in vitro: effects on signaling pathways. *Amino Acids* 2014;46(10):2393–401. DOI: 10.1007/s00726-014-1790-3.
7. Wan Y., Li Y., Yan C. et al. Indole: a privileged scaffold for the design of anti-cancer agents. *Eur J Med Chem* 2019;183:111691. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111691.
8. Chowdhury M.M.I., Kurata K., Yuasa K. et al. Suppression of TNF α expression induced by indole-3-acetic acid is not mediated by AhR activation in Caco-2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2021;85(4):902–6. DOI: 10.1093/bbb/zbaa101.
9. Sakita J.Y., Bader M., Santos E.S. et al. Serotonin synthesis protects the mouse colonic crypt from DNA damage and colorectal tumorigenesis. *J Pathol* 2019;249(1):102–13. DOI: 10.1002/path.5285.
10. Walczak K., Langner E., Szalast K. et al. A tryptophan metabolite, 8-hydroxyquinolindic acid, exerts antiproliferative and anti-migratory effects on colorectal Cancer Cells. *Molecules* 2020;25(7):1655. DOI: 10.3390/molecules25071655.
11. Tzin V., Galili G. The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Book* 2010;8:e0132. DOI: 10.1199/tab.0132.
12. Agus A., Planchais J., Sokol H. Gut microbiota regulation of tryptophan metabolism in health and disease. *Cell Host Microbe* 2018;23(6):716–24. DOI: 10.1016/j.chom.2018.05.003.
13. Liu Y., Liang X., Dong W. et al. Tumor-repopulating cells induce PD-1 expression in CD8+ T cells by transferring kynurenine and AhR activation. *Cancer Cell* 2018;33(3):480–94.e7. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.02.005.
14. Hsu Y.L., Hung J.Y., Chiang S.Y. et al. Lung cancer-derived galectin-1 contributes to cancer associated fibroblast-mediated cancer progression and immune suppression through TDO2/kynurenine axis. *Oncotarget* 2016;7(19):27584–98. DOI: 10.18632/oncotarget.8488.
15. Grenda A., Krawczyk P. Cancer trigger or remedy: two faces of the human microbiome. *Appl Microbiol Biotechnol* 2021;105(4):1395–405. DOI: 10.1007/s00253-021-11125-0.
16. Peng Z., Cheng S., Kou Y. et al. The gut microbiome is associated with clinical response to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in gastrointestinal cancer. *Cancer Immunol Res* 2020;8(10):1251–61. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-1014.

Вклад авторов

Е.Ю. Златник: анализ результатов, написание текста статьи;
 А.Б. Сагакянц: анализ результатов, статистическая обработка данных, редактирование;
 И.А. Новикова: подбор материала для лабораторного исследования;
 А.Ю. Максимов: сбор клинического материала;
 О.П. Шатова: проведение исследования, сбор данных, анализ результатов, написание текста статьи, редактирование;
 С.А. Апполонова, Н.Е. Москалева: проведение исследования, сбор данных, анализ результатов;
 С.А. Румянцев: анализ результатов;
 А.В. Шестопалов: общее руководство, разработка научной концепции.

Authors' contribution

E.Yu. Zlatnik: analysis of results, article writing;
 A.B. Sagakyants: analysis of results, statistical data processing, article editing;
 I.A. Novikova: selection of material for laboratory research;
 A.Yu. Maksimov: collection clinical material;
 O.P. Shatova: research, data collection, analysis of results, article writing, article editing;
 S.A. Appolonova, N.E. Moskaleva: research, data collection, analysis of results;
 S.A. Rummyantsev: analysis of results;
 A.V. Shestopalov: general guidance, development of a scientific concept.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Б. Сагакянц / A.B. Sagakyants: <https://orcid.org/0000-0003-0874-5261>
 Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
 И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>
 А.Ю. Максимов / A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>
 О.П. Шатова / O.P. Shatova: <https://orcid.org/0000-0003-4265-1293>
 С.А. Апполонова / S.A. Appolonova: <https://orcid.org/0000-0002-9032-1558>
 Н.Е. Москалева / N.E. Moskaleva: <https://orcid.org/0000-0002-7309-8913>
 С.А. Румянцев / S.A. Rummyantsev: <https://orcid.org/0000-0002-7418-0222>
 А.В. Шестопалов / A.V. Shestopalov: <https://orcid.org/0000-0002-1428-7706>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы по договору № 0373100122121000031 на выполнение научно-исследовательской работы по проекту «Изучение системы IDO1/TDO2-KYN-AhR в системе хозяин – микробиота – опухоль при злокачественных новообразованиях с целью разработки пролекарства для их лечения» от 01.06.2021 г. с ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства.

Financing. The study was carried out within the framework of research work under the contract No. 0373100122121000031 for the implementation of research work under the project “Study of the IDO1/TDO2-KYN-AhR system in the host-microbiota-tumor system in malignant neoplasms in order to develop a prodrug for their treatment”, dated 01.06 .2021 with the Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Biomedical Agency.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании. Одобрено советом по этике при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России (протокол № 44 от 20.12.2019 г.).

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study. Approved by the Ethics Council at the National Medical Research Centre for Oncology (protocol No. 44 of 20.12.2019).