

© БЕЛЬСКАЯ Л.В., САРФ Е.А., 2024

Бельская Л.В., Сарф Е.А.

## ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИПТОФАНА В СЛЮНЕ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

ФГБОУ ВО «Омский государственный педагогический университет», 644099, г. Омск, Россия

*Метаболизм триптофана связан с прогрессированием, иммунным ответом, а также выбором терапевтической стратегии при раке молочной железы. Цель работы – разработка методики количественного определения триптофана в слюне методом капиллярного электрофореза для оценки потенциальной возможности применения в диагностике рака молочной железы. Проведено исследование на 90 добровольцах, разделенных на 3 группы: основная (рак молочной железы, n=40), группа сравнения (фиброаденомы, n=30) и контрольная группа (условно здоровые, n=20). Показано, что концентрация триптофана в слюне увеличивается в 1,53 раза при раке молочной железы по сравнению с доброкачественными патологиями молочных желез и в 2,11 раза по сравнению со здоровым контролем. Внутри подгруппы больных раком молочной железы слюнная концентрация триптофана меняется неравномерно. Выделены факторы, при которых наблюдается повышение концентрации триптофана в слюне, а именно: отсутствие регионарного метастазирования, высокая и средняя дифференцировка, наличие экспрессии рецепторов HER2, отсутствие экспрессии рецепторов эстрогена и низкая пролиферативная активность опухоли. В целом, предложенный метод может быть ценным инструментом при изучении метаболических изменений, связанных с онкологическими заболеваниями.*

**Ключевые слова:** слюна; капиллярный электрофорез; аминокислоты; триптофан; рак молочной железы

**Для цитирования:** Бельская Л.В., Сарф Е.А. Применение метода капиллярного электрофореза для количественного определения триптофана в слюне больных раком молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4): 117-122. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-117-122>

**Для корреспонденции:** Бельская Людмила Владимировна, канд. хим. наук, зав. научно-исследовательской лабораторией; e-mail: [belskaya@omgpu.ru](mailto:belskaya@omgpu.ru)

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда «Диагностическая и прогностическая значимость аминокислотного профиля слюны при раке молочной железы», проект 23-15-00188.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 06.02.2024  
Принята к печати 16.02.2024  
Опубликовано 26.03.2024

*Bel'skaya L.V., Sarf E.A.*

## APPLICATION OF THE CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRYPTOPHAN IN THE SALIVA OF BREAST CANCER PATIENTS

Omsk State Pedagogical University, 644099, Omsk, Russia

*Tryptophan metabolism is associated with progression, immune response, and choice of therapeutic strategy in breast cancer. The goal of the work is to develop a method for the quantitative determination of tryptophan in saliva using capillary electrophoresis to assess the potential for their use in the diagnosis of breast cancer. A study was conducted on 90 volunteers divided into 3 groups: the main one (breast cancer, n=40), the comparison group (fibroadenomas, n=30) and the control group (conditionally healthy, n=20). It has been shown that the concentration of tryptophan in saliva increases by 1.53 times in breast cancer compared with benign pathologies of the mammary glands and by 2.11 times compared with healthy controls. Within a subgroup of breast cancer patients, tryptophan concentrations vary unevenly. Factors under which an increase in the concentration of tryptophan in saliva is observed are identified, namely: the absence of regional metastasis, high and medium differentiation, the presence of expression of HER2 receptors, the absence of expression of estrogen receptors and low proliferative activity of the tumor. In general, the proposed method can be a valuable tool in the study of metabolic changes associated with cancer.*

**Key words:** saliva; capillary electrophoresis; amino acids; tryptophan; breast cancer.

**For citation:** Bel'skaya L.V., Sarf E.A. Application of the capillary electrophoresis method for the quantitative determination of tryptophan in the saliva of breast cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (4): 117-122 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-117-122>

**For correspondence:** *Bel'skaya L.V.*, PhD in Chemistry, Head of Laboratory, Biochemistry Research Laboratory, Omsk State Pedagogical University; e-mail: [belskaya@omgpu.ru](mailto:belskaya@omgpu.ru)

**Information about authors:**

*Bel'skaya L.V.*, <https://orcid.org/0000-0002-6147-4854>;  
*Sarf E.A.*, <https://orcid.org/0000-0003-4918-6937>.

**Acknowledgment.** This research was funded by Russian Science Foundation, grant number 23-15-00188.

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

Received 06.02.2024  
Accepted 16.02.2024  
Published 26.03.2024

**Введение.** Триптофан (Trp) является активным участником многих биологических процессов, его метаболизм существенно влияет на здоровье человека [1]. Изменения концентрации Trp в организме связаны с онкологическими заболеваниями, инфекциями, стрессом и депрессией [2,3]. В связи с этим быстрое и специфическое количественное определение Trp представляет большой интерес для его биохимического изучения [4]. Хотя для определения Trp и его метаболитов доступно множество сложных методов, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрическим детектированием, эти методы требуют дорогостоящего аналитического оборудования, сложных операций и большого количества времени для подготовки и анализа [5-7]. Для определения Trp также используются хемилуминесцентные [8], электрохимические [9] и флуориметрические методы [10,11]. Предложено комбинирование реакции диазосочетания с поверхностно-усиленным комбинационным рассеянием света (SERS) для определения Trp [12]. Спектрофотометрические методы анализа предполагают недорогое оборудование, практически не требующее обслуживания, поэтому они остаются достаточно популярными [13]. Большинство колориметрических методов обнаружения связаны с окислением продуктов конденсации Trp различными альдегидами, например, реакция Хопкинса-Коула [14]. Таким образом, актуальность разработки быстрых, простых и точных методов количественного определения Trp сохраняется.

Несмотря на то, что в литературе описано использование метода капиллярного электрофореза для определения Trp, его определяют обычно одновременно с метаболитами (кинуренин, кинуреновая кислота и др.), при этом комбинируют электрофорез с масс-спектрометрическими техниками [15], УФ-импульсным лазерно-индуцированным обнаружением флуоресценции [16] и т.д. Одним из преимуществ метода капиллярного электрофореза является возможность определения энантиомеров Trp [17]. Простота и доступность этого метода, а также неоспоримые преимущества, которые он дает при выполнении измерений, позволяют использовать его в повседневной лабораторной практике, в том числе и для определения свободного Trp в биологических жидкостях, например, в слюне.

В последние годы интерес к слюне как к диагностическому инструменту возрос [18,19], слюну можно брать неинвазивно и многократно без дискомфорта, связанного с взятием образцов крови [20]. Слюна уже широко используется в генетическом тестировании благодаря ее лучшей транспортной стабильности по сравнению с кровью [21]. Слюна содержит различные вещества и биомаркеры, которые можно использовать в качестве индикаторов здоровья и заболеваний, в частности, для диагностики рака [22–24].

Особое внимание уделяется анализу аминокислот слюны при онкологических заболеваниях, в том числе

при раке молочной железы (РМЖ) [25,26]. В частности, известно, что метаболизм Trp связан с прогрессированием РМЖ [27], иммунным ответом [28], а также выбором терапевтической стратегии [29,30]. Однако содержание Trp в слюне при РМЖ отдельно до настоящего времени не рассматривалось, несмотря на его упоминание в перечне аминокислот, которые анализировали при данной патологии [31–34].

Целью данной работы являлась разработка методики количественного определения Trp в слюне методом капиллярного электрофореза для оценки потенциальной возможности их применения в диагностике РМЖ.

**Материал и методы.** В исследовании случай – контроль приняли участие добровольцы, которые были разделены на 3 группы: основную (РМЖ,  $n=40$ , возраст  $53,3\pm 3,3$  года), группу сравнения (фиброаденомы,  $n=30$ , возраст  $48,9\pm 4,3$  года) и контрольную группу (условно здоровые,  $n=20$ , возраст  $45,9\pm 7,1$  года). Включение в группы происходило параллельно. Критериями включения являлись: женский пол, возраст пациентов 30–60 лет, отсутствие какого-либо лечения на момент проведения исследования, в том числе хирургического, химиотерапевтического или лучевого, отсутствие признаков активной инфекции (включая гнойные процессы), проведение санации полости рта. Критерии исключения: отсутствие гистологической верификации диагноза. Исследования одобрены на заседании комитета по этике БУЗ Омской области «Клинический онкологический диспансер» от 21 июля 2016 г., протокол № 15.

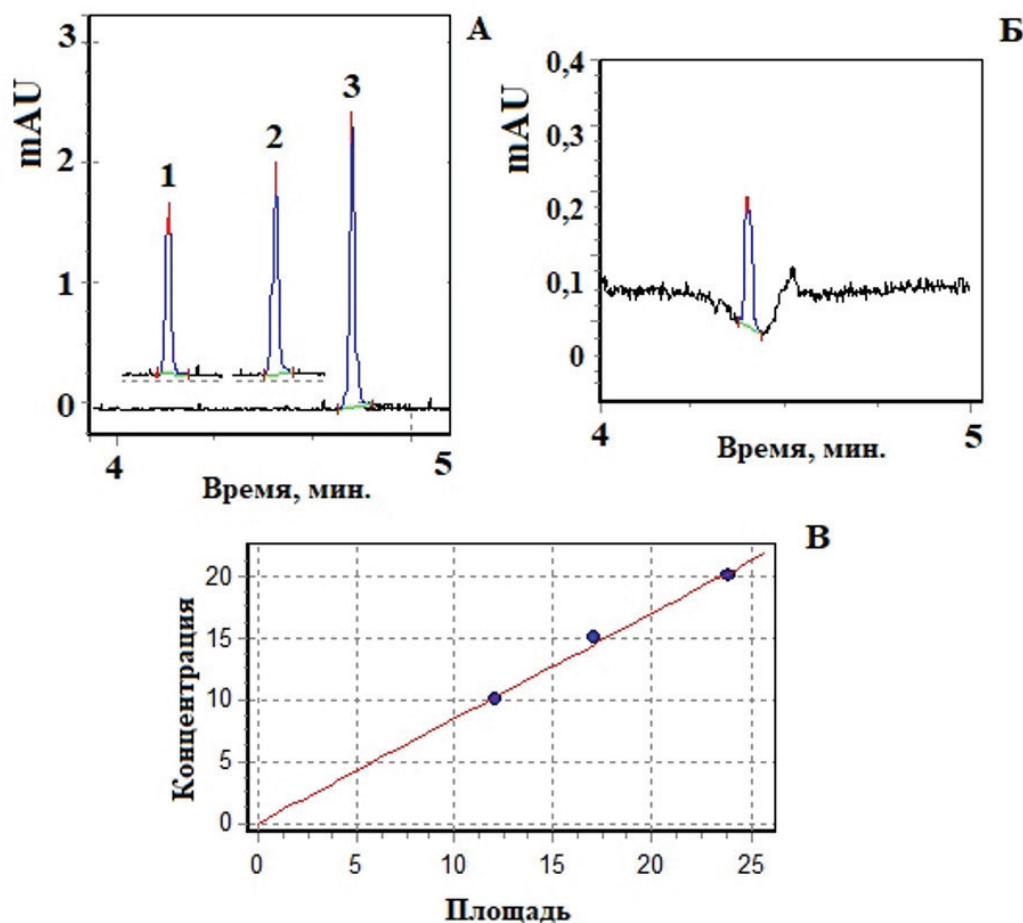
Образцы слюны собирали утром натощак путем сплевывания в стерильные полипропиленовые пробирки после предварительного полоскания полости рта кипяченой водой. У всех испытуемых рассчитывали скорость саливации (мл/мин) и определяли концентрацию общего белка в слюне (г/л) по реакции с пирогаллоловым красным. Статистически значимых различий по данным параметрам между подгруппами не выявлено. Наличие корреляции между концентрацией белка и Trp в слюне не подтверждено ( $r=0,0848$ ).

Исследуемый образец слюны объемом 200 мкл смешивали с 200 мкл 16% раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 7000 об./мин, отбирали 100 мкл надосадочной жидкости и доводили объем до 1 мл бидистиллированной водой. Конечное разведение составило 20 раз. Эксперимент проводили с использованием системы капиллярного электрофореза КАПЕЛЬ-105М с положительной полярностью источника высокого напряжения (Люмэкс, Санкт-Петербург). Ведущий электролит – натрий тетраборнокислый 0,02 моль/л. Для проведения исследований использован кварцевый капилляр  $L_{эф}/L_{общ} = 75/65$  см, внутренний диаметр 50 мкм. Ввод пробы в капилляр пневматический (30 мбар, 5 с), постоянное напряжение 25 кВ, температура 30 °С, время анализа 4-5 минут, рабочая длина волны фотометрического детектора 219 нм [35,36].

Статистический анализ полученных данных выполнен при помощи программ Statistica 10.0 (StatSoft) непараметрическим методом с использованием в зависимых группах критерия Вилкоксона, в независимых группах – U-критерия Манна-Уитни. Описание выборки производили с помощью медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25-го и 75-го перцентилей [LQ; UQ]. Раз-

личия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Количественное определение Трр проводили по предварительно построенному градуировочному графику  $y = 0,8483x$  ( $r^2 = 0,9998$ ) (см рисунок). Правильность и воспроизводимость результатов определения Трр в образцах слюны подтверждена методом «введено-найдено» [37].



Электрофореграммы модельных растворов и слюны.

А - пики триптофана на модельных электрофореграммах при построении градуировочного графика (1 – 10 мкг/л, 2 – 15 мкг/л, 3 – 20 мкг/л); Б – пример электрофореграммы слюны; В – градуировочный график для определения концентрации триптофана в слюне (мкг/л).

Установлено, что содержание Трр в слюне здоровых добровольцев составило 42,83 [34,88; 54,77] мкг/л, тогда как в группе сравнения при незлокачественных патологиях молочных желез (фиброаденомы) содержание Трр незначительно повышается – 59,19 [43,85; 99,91] мкг/л ( $p = 0,1107$ ). При РМЖ содержание Трр статистически достоверно повышается до 90,58 [55,82; 133,3] мкг/л как по сравнению с группой контроля ( $p < 0,0001$ ), так и по сравнению с группой с фиброаденомами ( $p = 0,0159$ ).

Максимальное увеличение концентрации Трр в слюне наблюдается на I стадии РМЖ и составляет 102,9 [68,97; 150,9] мкг/л ( $p = 0,0268$ ), на II стадии происходит снижение до 95,58 [56,21; 127,7] мкг/л ( $p = 0,0457$ ), на III-IV стадии – 81,53 [54,18; 84,08] мкг/л ( $p = 0,1514$ ). Здесь и далее значения  $p$  приведены для сравнения с

группой фиброаденом, все различия с контрольной группой статистически значимы ( $p < 0,05$ ). Достоверных различий между разными стадиями РМЖ выявить не удалось, что, вероятно, обусловлено малым размером выборки. Нами предварительно была оценена диагностическая чувствительность и специфичность определения Трр в слюне, которая составила 79,7 % и 59,3 % соответственно без учета стадии заболевания.

Содержание Трр повышается при отсутствии регионарного метастазирования ( $N_0$ ) в большей степени (110,0 [64,48; 139,7] мкг/л,  $p = 0,0039$ ), чем при поражении лимфоузлов  $N_{1,3}$  (92,33 [81,77; 131,2] мкг/л,  $p = 0,0449$ ). Также несколько выше оказывается содержание Трр при высоко- и среднедифференцированном РМЖ (95,78 [55,04; 121,7] мкг/л,  $p = 0,0228$ ) по сравнению с низкодиффе-

ренцированным (87,36 [64,20; 119,8] мкг/л,  $p=0,1012$ ). Интересным является более высокое содержание Тгр в слюне для тройного негативного РМЖ (ТНРМЖ) (120,8 [90,67; 151,2] мкг/л,  $p=0,0037$ ) и люминального В HER2-положительного молекулярно-биологических подтипов РМЖ (102,0 [96,29; 113,3] мкг/л,  $p=0,0397$ ). Для остальных молекулярно-биологических подтипов РМЖ увеличение содержания Тгр в слюне не является статистически значимым ( $p>0,05$ ). Ранее показано, что именно метаболиты Тгр позволяют дифференцировать группу ТНРМЖ от других подтипов РМЖ [38].

Дополнительно мы определили содержание Тгр в зависимости от экспрессии HER2. Установлено, что при HER2-отрицательном статусе содержание Тгр повышается в меньшей степени (87,36 [54,18; 139,7] мкг/л,  $p=0,0455$ ), чем при HER2-положительном (96,3 [83,81; 119,0] мкг/л,  $p=0,0385$ ). Содержание Тгр при отрицательном статусе экспрессии рецепторов эстрогена выше (100,6 [81,53; 154,6] мкг/л,  $p=0,0177$ ), чем при положительном (88,80 [54,39; 124,5] мкг/л,  $p=0,0466$ ). Статус экспрессии рецепторов прогестерона не влияет на содержание Тгр в слюне. Также показано, что при значении пролиферативной активности по экспрессии Ki-67 менее 20% содержание Тгр выше (96,49 [58,57; 126,1] мкг/л,  $p=0,0206$ ), чем при активности более 30% (84,08 [51,91; 140,9] мкг/л,  $p=0,0965$ ).

**Обсуждение.** Известно, что в организме Тгр превращается по трем ключевым путям: серотониновому, индолному и кинурениновому [39]. Кинурениновый метаболический путь интенсифицирован в опухолевой ткани, что объясняется активирующим действием протоонкогена с-Мyc, а также генов, гиперэкспрессированных в опухолях и ответственных за ферменты продукции кинуренина: триптофан-2,3-диоксигеназы, индоламин-2,3-диоксигеназы и арилформамидазы [38,40]. Повышающая регуляция экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы приводит к усилению метаболизма Тгр, что увеличивает продукцию кинуренина, который в свою очередь подавляет дифференцировку Т-клеток и, следовательно, способствует росту и развитию рака [41,42].

В ряде работ было определено содержание Тгр в слюне при РМЖ. Так, М. Sugimoto и соавт. [31] и F. Cheng и соавт. [32] показали, что содержание Тгр в слюне при РМЖ растет примерно в 1,5 раза. F. Cheng и соавт. показали, что повышение концентрации Тгр в слюне более выражено для РМЖ I-II стадии, чем для III-IV стадии (в 2,07 и 1,56 раза соответственно), что согласуется с полученными нами данными. По-видимому, более высокая концентрация Тгр на ранних стадиях РМЖ связана с тем, что по мере прогрессирования рака наблюдается усиление катаболизма Тгр, которое может приводить к снижению его концентрации и накоплению метаболитов кинуренина [43]. Концентрация Тгр в слюне здоровых добровольцев составила  $49,3 \pm 64,5$  нг/мл, тогда как при РМЖ –  $101,9 \pm 80,4$  нг/мл для ранних стадий, различия между группами были статистически достоверны ( $p=0,497$ ) [32]. В работе М. Sugimoto и соавт. [31] концентрации не приведены, показано только относительное увеличение содержания Тгр в 1,59 раза при РМЖ по сравнению с контрольной группой. При других видах рака содержание Тгр в слюне также повышается, в частности при плоскоклеточном раке полости рта [44] и ра-

ке щитовидной железы [45]. В первом случае показано изменение концентрации Тгр по сравнению с контрольной группой (в 1,9 раза), во втором указано пороговое значение, при превышении которого можно диагностировать рак щитовидной железы с точностью 73,2% (53,7 нг/мл). F. Cheng и соавт. [32] для РМЖ также показали, что с точностью 76,3 и 78,6% можно диагностировать ранний и распространенный РМЖ при пороговом значении концентрации Тгр в слюне 46,1 и 45,1 нг/мл соответственно. Полученные нами значения концентрации Тгр соответствуют литературным данным и демонстрируют увеличение в 1,53 раза при РМЖ по сравнению с фиброаденомами и в 2,11 раза по сравнению с контрольной группой. Литературные значения диагностической чувствительности определения Тгр в слюне и полученные нами данные хорошо согласуются между собой. Однако высокая гетерогенность РМЖ и широкий разброс значений в зависимости от молекулярно-биологических характеристик опухоли позволяет предположить, что более высокие значения чувствительности можно получить для отдельных подтипов РМЖ при увеличении объема выборки.

Следует отметить, что содержание Тгр в слюне при РМЖ определяли только в нескольких работах, при этом в большинстве работ указано соотношение концентраций при раке и в норме, без указания абсолютных концентраций и интервала варьирования [31,32]. В тех работах, где приведены средние значения, обращает внимание достаточно широкий разброс значений, что может быть связано с небольшим размером выборки 30/87 [31] и 27/28 [32] человек в основной и контрольной группе соответственно, а также ее неоднородностью по расовому и возрастному признакам.

Известно, что аминокислоты из плазмы крови поступают в клетки слюнных желез посредством натрий-зависимых систем активного мембранного транспорта [46]. Они преимущественно вовлекаются в процесс синтеза белков слюны. Метаболизм в самой слюнной железе также может играть важную роль в различиях аминокислотных профилей слюны и крови [31]. Чтобы понять причину различий в аминокислотных профилях слюны, необходима дальнейшая проверка этих результатов путем сравнения профилей слюны с профилями крови и тканей. Ранее нами показано, что содержание аминокислот, в том числе и Тгр, в плазме крови по данным разных авторов существенно различается, однако, в среднем наблюдается уменьшение концентрации Тгр при РМЖ по сравнению с контрольной группой [26]. По-видимому, требуется отдельное обоснование для выявленного факта увеличения концентрации Тгр в слюне при РМЖ, что планируется сделать на следующих этапах исследования.

К другим ограничениям можно отнести небольшой размер выборки пациентов с РМЖ и контрольной группы, определение только Тгр без метаболитов кинуренина, а также отсутствие данных о сопутствующих заболеваниях, характере питания и уровне белкового катаболизма. В дальнейшем необходимо проверить, связаны ли выявленные закономерности с РМЖ или они характерны в целом для онкологических и/или других заболеваний.

**Заключение.** Таким образом, можно выделить факторы, при которых наблюдается повышение концентра-

ции Трп в слюне: отсутствие регионарного метастазирования, высокая и средняя дифференцировка, наличие экспрессии рецепторов HER2, отсутствие экспрессии рецепторов эстрогена и низкая пролиферативная активность опухоли. Значимость каждого из перечисленных факторов предстоит установить в ходе дальнейших исследований. Однако уже на данном этапе показано, что изучение содержания Трп в слюне может быть ценным инструментом при изучении метаболических изменений, связанных с онкологическими заболеваниями, в частности с РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА ( П П . 1 - 3 4 , 3 8 , 3 9 , 4 1 - 4 5 , 4 7  
С М . REFERENCES )

35. Комарова Н. В., Каменцев Я. С. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ». СПб: ООО «Веда»; 2006.

36. М-04-38-2009. Корма, комбикорма и сырье для их производства. Методика измерений массовой доли аминокислот методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза «Капель». Санкт-Петербург; 2009.

37. Гармаш А.В., Сорокина Н.М. Метрологические основы аналитической химии. М.: Изд-во Московского университета; 2017.

40. Златник Е.Ю., Сагакянц А.Б., Новикова И.А., Максимов А.Ю., Шатова О.П., Апполонова С.А., Москалева Н.Е., Румянцев С.А., Шестопалов А.В. 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.

46. Микаелян Н.П., Комаров О.С., Давыдов В.В., Мейснер И.С. Биохимия ротовой жидкости в норме и при патологии. Учебно-методическое пособие. М.: ИКАР. 2017.

REFERENCES

1. Friedman M. Analysis, nutrition, and health benefits of tryptophan. *International Journal of Tryptophan Research*. 2018; 11: 1178646918802282. DOI: 10.1177/1178646918802282.

2. Lee H.O., Uzzo R.G., Kister D., Kruger W.D. Combination of serum histidine and plasma tryptophan as a potential biomarker to detect clear cell renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.* 2017; 15 (1): 72. DOI: 10.1186/s12967-017-1178-8.

3. Lanser L., Kink P., Egger E.M., Willenbacher W., Fuchs D., Weiss G. et al. Inflammation-induced tryptophan breakdown is related with anemia, fatigue, and depression in cancer. *Front Immunol.* 2020; 11: 249. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00249.

4. Wu Y., Wang T., Zhang C., Xing X.-H. A rapid and specific colorimetric method for free tryptophan quantification. *Talanta*. 2018; 176: 604-9. DOI: 10.1016/j.talanta.2017.08.002.

5. Tong Q., Song J., Yang G., Fan L., Xiong W., Fang J. Simultaneous determination of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, xanthurenic acid and 5-hydroxytryptamine in human plasma by LC-MS/MS and its application to acute myocardial infarction monitoring. *Biomed. Chromatogr.* 2018; 32 (4): e4156. DOI: 10.1002/bmc.4156.

6. Fliieger J., Świąch-Zubilewicz A., Śniegocki T., Dolar-Szczasny J., Pizoń M. Determination of Tryptophan and Its Major Metabolites in Fluid from the Anterior Chamber of the Eye in Diabetic Patients with Cataract by Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Molecules*. 2018; 23 (11): 3012. DOI: 10.3390/molecules23113012.

7. Karakawa S., Nishimoto R., Harada M., Arashida N. Simultaneous Analysis of Tryptophan and Its Metabolites in Human Plasma Using Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Chromatography*. 2019; 40 (3): 127-33. DOI: 10.15583/jpchrom.2019.010.

8. Li L., Guo R., Zhang D., Du X. A novel system of galangin–potassium permanganate–polyphosphoric acid for the determination of trypto-

phan and its chemiluminescence mechanism. *Luminescence*. 2015; 30 (5): 512-8. DOI: 10.1002/bio.2769.

9. Khoshnevisan K., Torabi F., Baharifar H., Sajjadi-Jazi S.M., Afjeh M.S., Faridbod F., Larijani B., Khorramizadeh M. R. Determination of the biomarker L-tryptophan level in diabetic and normal human serum based on an electrochemical sensing method using reduced graphene oxide/gold nanoparticles/18-crown-6. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020; 412: 3615–27. DOI: 10.1007/s00216-020-02598-5.

10. Duru Kamaci Ü., Kamaci M. Boric acid and Schiff base-based fluorescent sensor for detection of L-tryptophan in milk and BSA samples. *Turk. J. Chem.* 2022; 46 (3): 929-40. DOI: 10.55730/1300-0527.3381.

11. Zhang R., Wang L.X., Zhang Y.D., Ge C.H., Wang J.P., Zhang Y., Zhang X.D. A fluorescent sensor of 3-aminobenzenboronic acid functionalized hydrothermal carbon spheres for facility detection of L-tryptophan. *Journal of Fluorescence*. 2018; 28: 439–44. DOI: 10.1007/s10895-017-2205-0.

12. Fan M., Lu D., You R., Chen C., Lu Y., Wu Y., Shen H., Feng S. Highly sensitive detection of tryptophan (Trp) in serum based on diazo-reaction coupling with Surface-Enhanced Raman Scattering and colorimetric assay. *Analytica Chimica Acta*. 2020; 1119: 52-9. DOI: 10.1016/j.aca.2020.04.039.

13. Hosokawa S., Morinishi T., Ohara K., Yamaguchi K., Tada S., Tokuhara Y. A spectrophotometric method for the determination of tryptophan following oxidation by the addition of sodium hypochlorite pentahydrate. *PLoS ONE* 2023; 18 (1): e0279547. DOI: 10.1371/journal.pone.0279547.

14. Friedman M., Finley J.W. Methods of tryptophan analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1971; 19 (4): 626–31. DOI: 10.1021/jf60176a010.

15. Arvidsson B., Johannesson N., Citterio A., Righetti P.G., Bergquist J. High throughput analysis of tryptophan metabolites in a complex matrix using capillary electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1159 (1–2): 154-8. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.04.044.

16. Bayle C., Siri N., Poinsot V., Treilhou M., Caussé E., Couderc F. Analysis of tryptophan and tyrosine in cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis and “ball lens” UV-pulsed laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. 2003; 1013 (1–2): 123-30. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00939-7.

17. Fanali C. Enantiomer’s separation by capillary electrochromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019; 120: 115640. DOI: 10.1016/j.trac.2019.115640.

18. Huang Z., Yang X., Huang Y., Tang Z., Chen Y., Liu H., Huang M., Qing L., Li L., Wang Q., Jie Z., Jin X., Jia B. Saliva – a new opportunity for fluid biopsy. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2023; 61 (1): 4-32. DOI: 10.1515/cclm-2022-0793.

19. Song M., Bai H., Zhang P., Zhou X., Ying B. Promising applications of human-derived saliva biomarker testing in clinical diagnostics. *International Journal of Oral Science* 2023; 15 (1): 2. DOI: 10.1038/s41368-022-00209-w.

20. Khurshid Z., Warsi I., Moin S.F., Slowey P.D., Latif M., Zohaib S., Zafar M.S. Biochemical analysis of oral fluids for disease detection. *Adv. Clin. Chem.* 2021; 100: 205-53. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.04.005.

21. Meghnani V., Mohammed N., Giauque C., Nahire R., David T. Performance characterization and validation of saliva as an alternative specimen character for detecting hereditary breast cancer mutations by next generation sequencing. *Int. J. Genomics*. 2016; 2016: 2059041. DOI: 10.1155/2016/2059041.

22. Nijakowski K., Zdrojewski J., Nowak M., Gruszczynski D., Knoll F., Surdacka A. Salivary Metabolomics for Systemic Cancer Diagnosis: A Systematic Review. *Metabolites* 2023; 13: 28. DOI: 10.3390/metabo13010028.

23. Kaczor-Urbanowicz K.E., Wei F., Rao S.L., Kim J., Shin H., Cheng J., Tu M., Wong D.T.W., Kim Y. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. *BBA - Reviews on Cancer* 2019; 1872: 49–59. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.05.007.

24. Eftekhari A., Dizaj S.M., Sharifi S., Salatin S., Khalilov R., Samiei M., Vahed S.Z., Ahmadian E. Salivary biomarkers in cancer. *Adv. Clin. Chem.* 2022; 110: 171-92. DOI: 10.1016/bs.acc.2022.06.005.

25. Bel'skaya L.V., Sarf E.A., Loginova A.I. Diagnostic value of salivary amino acid levels in cancer. *Metabolites*. 2023; 13 (8): 950. DOI: 10.3390/metabo13080950.

26. Bel'skaya L.V., Gundyrev I.A., Solomatin D.V. The role of amino ac-

- ids in the diagnosis, risk assessment, and treatment of breast cancer: A Review. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023; 45 (9): 7513-37. DOI: 10.3390/cimb45090474.
27. Zarate L.V., Miret N.V., Nicola Candia A.J., Zappia C.D., Pontillo C.A., Chiappini F.A., Monczor F., Candolfi M., Randi A.S. Breast cancer progression and kynurenine pathway enzymes are induced by hexachlorobenzene exposure in a Her2-positive model. *Food and Chemical Toxicology*. 2023; 177: 113822. DOI: 10.1016/j.fct.2023.113822.
  28. Xue L., Wang C., Qian Y., Zhu W., Liu L., Yang X., Zhang S., Luo D. Tryptophan metabolism regulates inflammatory macrophage polarization as a predictive factor for breast cancer immunotherapy. *International Immunopharmacology* 2023; 125: 111196. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.111196.
  29. Limón Pacheco J.H., Elizondo G. Interplay between Estrogen, Kynurenine, and AHR Pathways: An immunosuppressive axis with therapeutic potential for breast cancer treatment. *Biochemical Pharmacology* 2023; 217: 115804. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115804.
  30. Zhao Y., Pu C., Liu Z. Essential amino acids deprivation is a potential strategy for breast cancer treatment. *The Breast* .2022; 62: 152–61. DOI: 10.1016/j.breast.2022.02.009.
  31. Sugimoto M., Wong D.T., Hirayama A., Soga T., Tomita M. Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010; 6: 78–95. DOI: 10.1007/s11306-009-0178-y.
  32. Cheng F., Wang Z., Huang Y., Duan Y., Wang X. Investigation of salivary free amino acid profile for early diagnosis of breast cancer with ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 2015; 447: 23–31. DOI: 10.1016/j.cca.2015.05.008.
  33. Zhong L., Cheng F., Lu X., Duan Y., Wang X. Untargeted saliva metabolomics study of breast cancer based on ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with HILIC and RPLC separations. *Talanta*. 2016; 158: 351-60. DOI: 10.1016/j.talanta.2016.04.049.
  34. Murata T., Yanagisawa T., Kurihara T., Kaneko M., Ota S., Enomoto A., Tomita M., Sugimoto M., Sunamura M., Hayashida T. et al. Salivary metabolomics with alternative decision tree-based machine learning methods for breast cancer discrimination. *Breast Cancer Res. Treat* 2019; 177: 591-601. DOI: 10.1007/s10549-019-05330-9.
  35. Komarova N.V., Kamentsev Ya.S. Practical guide to the use of capillary electrophoresis systems "KAPEL". St.Petersburg: Veda LLC; 2006. (in Russian)
  36. M-04-38-2009. Feed, compound feed and raw materials for their production. Methodology for measuring the mass fraction of amino acids by capillary electrophoresis using the KAPEL capillary electrophoresis system. St. Petersburg; 2009. (in Russian)
  37. Garmash A.V., Sorokina N.M. Metrological foundations of analytical chemistry. Moscow: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta; 2017. (in Russian)
  38. Ala M. The footprint of the kynurenine pathway in every cancer: a new target for chemotherapy. *Eur. J. Pharmacol.* 2021; 896: 173921. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.173921.
  39. 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.
  40. Zlatnik E.Yu., Sagakyants A.B., Novikova I.A., Maksimov A.Yu., Shatova O.P., Appolonova S.A., Moskaleva N.E., Rummyantsev S.A., Shestopalov A.V. Metabolism of tryptophan in non-small lung cancer patients with different effect of PD-1/PD-L1 inhibitors immunotherapy. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2022; 9 (2): 89-96. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-2-89-96. (in Russian)
  41. Liu X-h., Zhai X-y. Role of tryptophan metabolism in cancers and therapeutic implications. *Biochimie*. 2021; 182: 131-9. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.01.005.
  42. Sarangi P. Role of indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 in immunosuppression of breast cancer. *Cancer Pathogenesis and Therapy*. 2023. DOI: 10.1016/j.cpt.2023.11.001.
  43. Platten M., Wick W., Van de Eynde B.J. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. *Cancer Res*. 2012; 72: 5435–40. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0569.
  44. Ohshima M., Sugahara K., Kasahara K., Katakura A. Metabolomic analysis of the saliva of Japanese patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep*. 2017; 37: 2727–34. DOI: 10.3892/or.2017.5561.
  45. Zhang J., Wen X., Li Y., Zhang J., Li X., Qian C., Tian Y., Ling R., Duan Y. Diagnostic approach to thyroid cancer based on amino acid metabolomics in saliva by ultra-performance liquid chromatography with high resolution mass spectrometry. *Talanta*. 2021; 235: 122729. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122729.
  46. Mikaelyan N.P., Komarov O.S., Davydov V.V., Meisner I.S. Biochemistry of oral fluid in normal and pathological conditions. Educational and methodological manual. Moscow: IKAR; 2017. (in Russian)
  47. Gong S., Wang Q., Huang J., Huang R., Chen S., Cheng X., Liu L., Dai X., Zhong Y., Fan C., Liao Z. LC-MS/MS platform-based serum untargeted screening reveals the diagnostic biomarker panel and molecular mechanism of breast cancer. *Methods*. 2024; 222: 100–11. DOI: 10.1016/j.ymeth.2024.01.003.