



УДК 577.1

ПЕРОРАЛЬНЫЕ ДОБАВКИ ИНДОЛ-3-АЦЕТАТА УВЕЛИЧИВАЮТ ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ *Bifidobacterium pseudolongum* И *Akkermansia muciniphila* В КИШЕЧНИКЕ МЫШЕЙ НА ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЕ

© 2025 г. О. П. Шатова*,[#], А. А. Заболотнева*, С. А. Румянцев*, А. В. Шестопапов*

* Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова
(Пироговский Университет), Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 18.05.2025 г.

После доработки 28.05.2025 г.

Принята к публикации 29.05.2025 г.

Известно, что даже непродолжительная диета с высоким содержанием жиров оказывает негативное влияние на метаболическое здоровье холоорганов. Однако, под воздействием рациона, в первую очередь, претерпевает изменения микробиота кишечника. Тип диеты, биологически активные добавки и лекарственные препараты оказывают влияние как на таксономическое разнообразие микробиоты, так и на ее функциональное состояние. Известно, что при участии кишечной микробиоты триптофан подвергается превращению в индол и его различные производные. Также установлена ведущая роль индолов в регуляции экспрессии белков плотных контактов, а соответственно регуляции проницаемости кишечника. Целью нашего исследования была оценка влияния индол-3-ацетата на таксономическое разнообразие микробиоты тонкой и толстой кишки, а также установление потенциальной пребиотической ценности данного индольного производного в условиях кратковременного применения высокожировой диеты. Мыши C57/black6 SPF в возрасте 4–5 недель ($n = 60$, самки) случайным образом были распределены на шесть групп. Высокожировая диета была достигнута путем кормления лабораторных животных кормом с высоким содержанием жиров животного происхождения и обеспечивающей до 30% от общего количества калорий. Индол-3-ацетат применяли вместе со стандартной или высокожировой диетой через атравматический внутрижелудочный зонд в разовой дозе 0,1392 мг на мышью в течение 28 дней. В нашем исследовании впервые было показано, что у мышей C57/black6 SPF на кратковременной высокожировой диете индол-3-ацетат повышает представленность *Bifidobacterium pseudolongum* в микробном сообществе как тонкой кишки, так и толстой кишки. Тогда как повышение *Akkermansia muciniphila* было только в микробном сообществе толстой кишки. Прием индол-3-ацетата обеспечивает нормогликемию у животных на кратковременной высокожировой диете. Применение индол-3-ацетата при различных метаболических заболеваниях ассоциированных с высокожировой диетой и дисбактериозом может быть перспективным терапевтическим подходом к коррекции нарушений метаболизма через модуляцию микробиотического сообщества.

Ключевые слова: Триптофан, индол, индол-3-ацетат, микробиота кишечника, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Akkermansia muciniphila*

DOI: 10.31857/S0132342325050193

ВВЕДЕНИЕ

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) человека колонизирован триллионами микроорганизмов, большинство из которых – комменсальные бактерии, влияющие на здоровье и развитие различных заболеваний организма хозяина [1]. Кишечная микробиота участвует в метаболизме питательных веществ, синтезе короткоцепочечных жирных

кислот (КЦЖК), продукции аминокислот и их производных, образовании витаминов, а также в регуляции метаболизма и формировании иммунитета [2]. Следует отметить, что разнообразие и состав микробного сообщества зависят от многих факторов – диеты, возраста, образа жизни и воздействий окружающей среды, которые, в свою очередь, напрямую или косвенно влияют на метаболизм, иммунные реакции и гомеостаз

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (966) 065-33-62; эл. почта: shatova.op@gmail.com).

Индольный путь утилизации триптофана считается эксклюзивной функцией микробиоты кишечника [5]. Индол – сигнальная молекула как для микробного сообщества, так и для организма хозяина [6]. В кишечнике человека существует градиент концентрации индола, при этом его просветная концентрация выше, чем пристеночная

[6]. Градиент индола в кишечнике позволяет микробиоте “ориентироваться” в экогеографии кишечника и успешно колонизировать его. При этом необходимо отметить, что просветная и пристеночная (мукозальная) микробиота отличаются между собой таксономически [5]. Слой слизи, выстилающий эпителий, колонизирован уникальным микробным сообществом, включая такие виды, как *Bacteroides fragili* и *Akkermansia muciniphila* [7]. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что индол обеспечивает нормальную колонизацию кишечника и препятствует действию патогенов. Показано, что индол подавляет экспрессию генов, обеспечивающих вирулентность патогенов, при этом не влияет на рост и размножение бактерий [6]. Данное влияние реализуется через бактериальную мембрано-связанную гистидиновую сенсорную киназу CpxA.

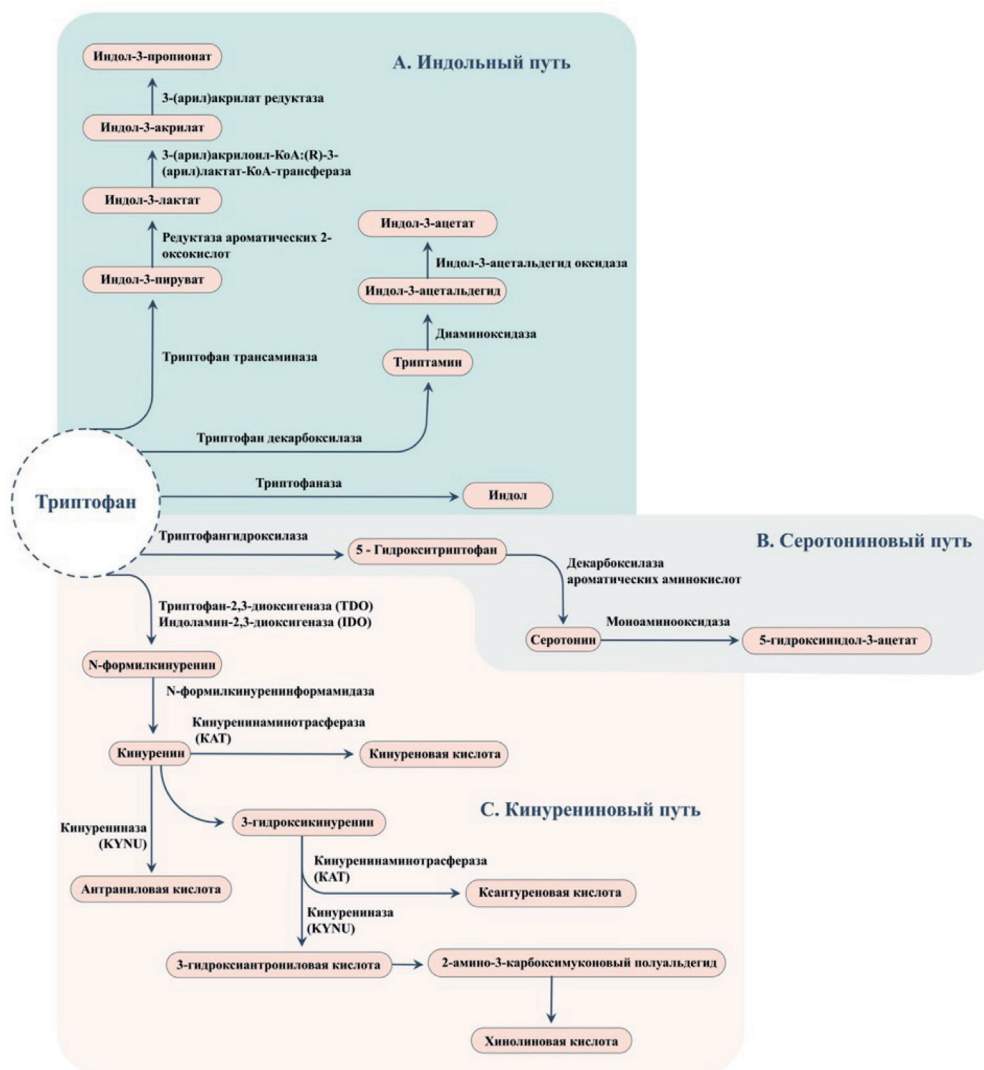


Рис. 1. Основные метаболические пути обмена триптофана.

которая воспринимает индол как сигнальную молекулу и таким образом снижает экспрессию гена локуса стирания энтероцитов (*locus of enterocyte effacement, LEE*), уменьшая вирулентность. Регион *LEE* содержит пять основных оперонов – *LEE1–LEE5*, которые кодируют систему секреции III типа (*T3SS*), адгезин (интимин) и его рецептор (*Tir*), а также эффекторные белки. *T3SS* – это своеобразные “молекулярные шприцы”, которые перемещают бактериальные эффекторы в клетки-хозяева, что приводит к изменениям в передаче сигналов и ремоделировании актина [6].

Другие индольные метаболиты также в большой степени продуцируются в толстой кишке и выполняют функции межвидовых сигнальных молекул [4]. В результате множества реакций образуется около двух десятков сигнальных молекул индольного пути катаболизма. Известно, что одна из них – индол-3-ацетат уровень, которого снижается как в слепой кишке, так и в печени у мышей на высокожировой диете [8]. Как было показано в экспериментах *in vitro*, индол-3-ацетат подавляет экспрессию провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли α (*TNF α*), интерлейкина 1 (*IL1*) и СС-хемокина (*CCL2*)) в макрофагах, которые были обработаны пальмитатом и липополисахаридом (*LPS*). В гепатоцитах индол-3-ацетат через арилуглевородородные рецепторы (*AhR*) значительно уменьшает воспаление, которое индуцируется *TNF α* и жирными кислотами [9]. Также установлено, что добавки индол-3-ацетата снижают уровни желчных кислот – производных хенодесоксихолевой кислоты, что указывает на способность индол-3-ацетата напрямую изменять метаболизм желчных кислот в клетках организма хозяина [10]. Показано, что применение индол-3-ацетата на 36% снижает содержание свободных жирных кислот в печени у мышей, находящихся на высокожировой диете. В то же время, показано, что индол-3-ацетат не влияет на показатели α -разнообразия микробиоты кишечника мышей, получавших высокожировую диету на протяжении 8 недель. Кроме того, в этом же исследовании не установлено никаких изменений в фекальном метаболоме на фоне применения индол-3-ацетата [8]. В свою очередь авторы делают вывод, что индол-3-ацетат не влияет на таксономический состав микробиоты кишечника у мышей в условиях применения различных диет [8].

В другом исследовании на лабораторных животных было показано, что добавки триптофана приводят к уменьшению численности *Clostridium*, *Ruminococcus* и *Enterobacter*, а также сопровождаются увеличением численности *Prevotella*, *Roseburia* и *Succinivibrio* в кишечнике [2]. Уста-

новлено, что и добавки триптофана увеличивают экспрессию белков плотных контактов (окклюдина и ZO-1), повышают концентрацию индола, индол-3-ацетата и КЦЖК (изобутирата, изовалериата и пропионата) [2]. При этом трудно определить, было ли вызвано изменение таксономического состава микробиоты непосредственно самим триптофаном или увеличением содержания индола, индол-3-ацетата или КЦЖК. Необходимо также отметить, что *Clostridium* – потенциальные патогенные бактерии, вызывающие кишечные расстройства. Тогда как *Prevotella* и *Roseburia* относятся к продуцентам КЦЖК. В свою очередь КЦЖК – ключевые молекулы в регуляции кишечного гомеостаза как у животных, так и у человека [11, 12]. Проведено исследование, что добавки триптофана стимулируют образование КЦЖК из разветвленных аминокислот, что указывает на регуляторную роль триптофана в метаболизме данных аминокислот как в кишечнике, так и в холооорганизме [2].

Таким образом, установленное благоприятное действие индол-3-ацетата на метаболизм липидов в печени – подавление воспаления и развития фиброза при неалкогольном стеатогепатите [8], может оказаться полезным и в условиях высокожировой диеты и у лиц с ожирением. Так как ожирение характеризуется вялотекущим хроническим воспалением [13], применение добавок индол-3-ацетата может способствовать снижению воспаления и уменьшению инсулинорезистентности. Однако, остается невыясненным вопрос потенциального пребиотического влияния индол-3-ацетата с целью коррекции дисбиоза кишечной микробиоты, формирующийся в условиях кратковременной высокожировой диеты [14] и у лиц, имеющих ожирение [15].

Целью данного исследования была оценка влияния индол-3-ацетата на таксономическое разнообразие микробиоты тонкой и толстой кишки, а также установление потенциальной пребиотической роли данного индольного производного в условиях применения кратковременной высокожировой диеты.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменение массы тела и потребление пищи и воды животными. До начала эксперимента средний вес мышей всех групп составлял 14.4 ± 0.96 г (вес животных варьировал в различных группах не более чем на 10% от среднего веса). После 4 недель кормления мышей, в том числе в группах SDin и HFDin вес мышей значимо не отличался (рис. 2). Средний прирост веса мышей в опытных группах составил 0.94 ± 0.27 г/неделю. Потребление пищи во всех группах составило 2.3 ± 0.18 г/день.

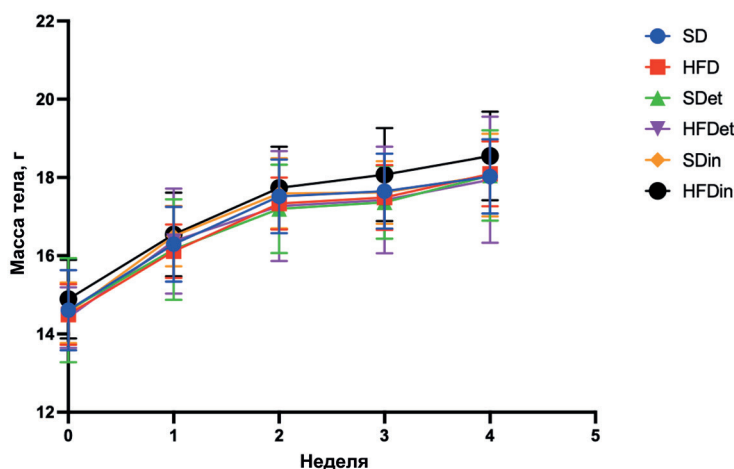


Рис. 2. Динамические кривые массы тела, описывающие изменения веса мышей в течение 4-недельного эксперимента.

Оценка уровня глюкозы, триацилглицеролов (TAG) и холестерина в сыворотке крови. Содержание глюкозы в сыворотке крови были сравнительно выше в группе HFD, чем в группе SD ($p < 0.0001$) и с HFDin ($p < 0.001$) (рис. 3а). При этом сывороточные уровни триацилглицеролов (рис. 3б) и холестерина (рис. 3в) не различались между группами. Возможной причиной отсутствия изменений в липидном обмене может быть кратковременный период применения HFD, которого было недостаточно, чтобы вызвать изменения липидного обмена.

Оценка состава микробиоты кишечника в тонкой и толстой кишке мышей. Разнообразие, богатство и состав микробиоты тонкой кишки (SI) и толстой кишки (LI) были проанализированы у мышей, получавших стандартную или высоко-

жировую диету с добавлением индол-3-ацетата или без него соответственно.

Показано, что у мышей SDin в толстой кишке видовое разнообразие было выше, чем у мышей SD и SDet (рис. 4а). При этом у мышей HFDe микробное разнообразие было статистически значимо ниже, чем в группе мышей HFDin. При этом не было установлено отличий между мышами группы HFD и HFDin.

Индол-3-ацетат увеличивал видовое разнообразие, что также отражено в наблюдаемых операционных таксономических единицах (OTU), которые аналогично максимально были повышены на стандартной диете и добавках индол-3-ацетата (рис. 4б).

Установлено, что в тонкой кишке у мышей на высокожировой диете при добавлении этанола снижается индекс Simpson, в сравнении с живот-

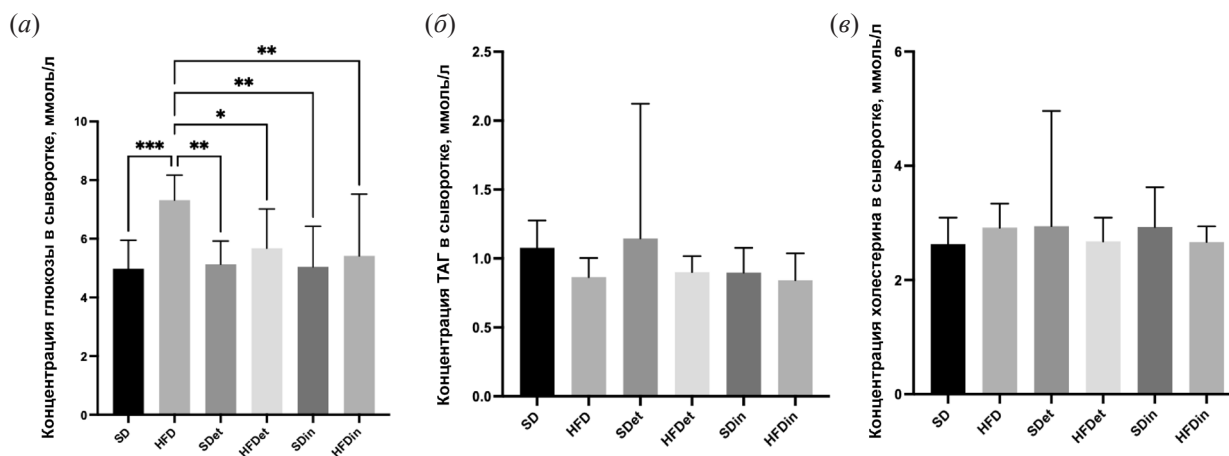


Рис. 3. Результаты измерения уровней (а) глюкозы (б) триацилглицеролов и (в) холестерина в сыворотках крови в разных экспериментальных группах мышей. Сравнения проводились с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнительным тестом Тьюки ($*p < 0.01$, $**p < 0.05$, $***p < 0.001$).

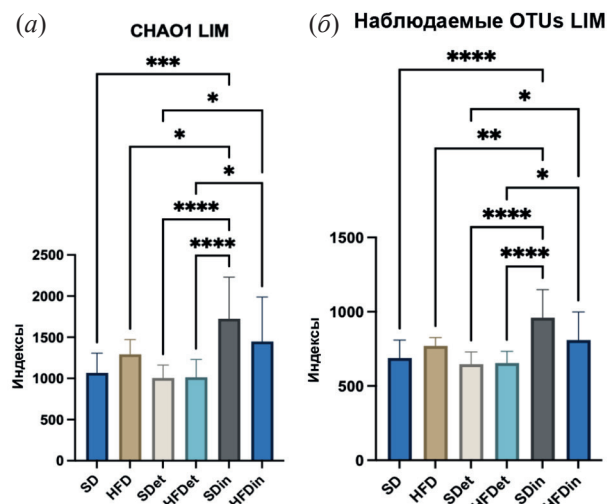


Рис. 4. Результаты однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнением тестом Тьюки для индексов (а) α -разнообразия Chao1, (б) для отдельных OTU, указывающие на изменения в представленности микробиоты толстой кишки мышей. Отличия достоверны при * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

ными HFD или по сравнению с животными SDet (рис. 5а). Полученные данные отражают совместный вклад в снижение видового разнообразия высокожировой диеты и этанола. Индекс PD whole отличался в тонкой кишке для животных на SDin и SD (рис. 5б). Было показано, что добавки индол-3-ацетата к стандартной диете повышают α -разнообразие в тонкой кишке.

При этом в толстой кишке также снижался индекс Simpson у животных HFDin по сравнению с животными HFDet и HFD (рис. 5б). Следует отметить, что нами не установлено статистически значимых отличий для индекса Simpson в толстой кишке у животных на стандартной и высокожировой диетах (рис. 5б). Также проводилась оценка индекса Shannon и установлено статистически значимое отличие в толстой кишке для животных на высокожировой диете. Показано, что у них индекс Shannon выше, чем у животных HFDin (рис. 5в). Таким образом в толстой кишке у животных на высокожировой диете с добавками индол-3-ацетата снижался индекс Simpson и Shannon. Тогда как индекс Chao1 для животных HFDin для видового разнообразия толстой кишки напротив был выше.

Анализ главных координат взвешенной матрицы различий Unifrac не показал существенных различий в β -разнообразии (структуре состава фекальной микробиоты) между SIM и LIM. Тогда как при оценке индекса β -разнообразия Canberra

установлено, что при модификации микробиоты индол-3-ацетатом у животных на стандартной диете β -разнообразие повышается, в сравнении с двумя контрольными группами (SD, SDet). При этом на высокожировой диете у животных при применении индол-3-ацетата значимых отличий от контрольных групп нами не установлено (рис. 6).

Для изучения эффектов диеты с высоким содержанием жиров в сочетании с добавлением индол-3-ацетата на микробиом SIM и LIM мышей мы провели метагеномный анализ последовательности микробиоты тонкой и толстой кишки всех мышей в шести различных группах. На уровне филума микроорганизмы принадлежали в основном к семи филумам: *Firmicutes*, *Tenericutes*, *Bacteroidota*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* и *TM7*. *Firmicutes* был наиболее доминирующим филумом во всех группах. При этом соотношение *Firmicutes/Bacteroidota* не менялось при различных условиях диеты.

Показано, что в тонкой кишке на фоне использования добавок индол-3-ацетата у HFDin-живот-

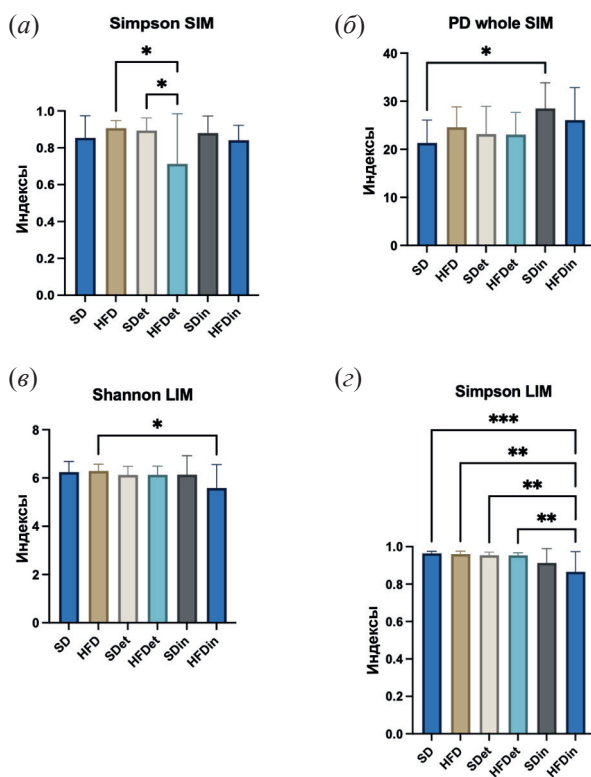


Рис. 5. (а) Индекс Simpson для видового разнообразия в тонкой кишке (SIM) и (з) толстой кишке (LIM). Также (в) индекс Shannon для видового разнообразия в толстой кишке и (б) индекс филогенетического разнообразия (PD). Отличия достоверны при * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

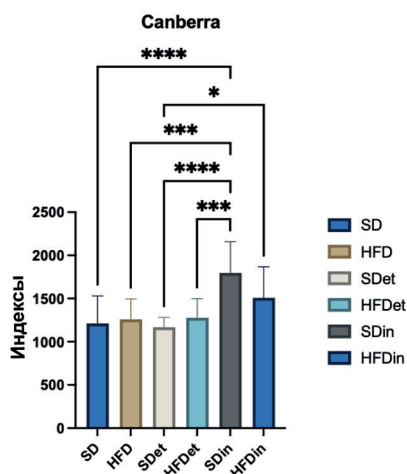


Рис. 6. Индекс Canberra. Отличия достоверны при * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

ных статистически значимо снижается представленность *Desulfovibrionaceae*, в сравнении с животными на стандартной диете и в сравнении с животными на высокожировой диете (рис. 7а). Также нами установлено снижение *Coriobacteriaceae* в толстой кишке у животных HFDin в сравнении с животными HFdet и HFD, а также в сравнении с животными на SD и SDet (рис. 7б). Следует отметить, что в толстой кишке у животных с добавками индол-3-ацетата повышался уровень *Bifidobacteriaceae* только на высокожировой диете (рис. 7в).

При анализе представленности филумов, показано, что именно в толстой кишке происходит более выраженное их изменение при использовании добавок индол-3-ацетата. Установлено, что у животных HFD в сравнении с животными SD резко и статистически значимо снижается процентный состав *Tenericutes*. Так у животных на высокожировой диете при использовании добавок индол-3-ацетата снижается представленность *Actinobacteria* и *Firmicutes* в сравнении с мышами на стандартной диете с добавками этанола (рис. 7г,д). При этом для филума *Actinobacteria* нами не установлено статистически значимого различия между животными на HFD и животными на HFDin (рис. 7г), тогда как для филума *Firmicutes* существуют статистически значимые различия между животными на HFD и животными на HFDin (рис. 7д).

У животных на стандартной диете индол-3-ацетат статистически значимо снижал представленность *Actinobacteria*, *Firmicutes* и *Tenericutes* (рис. 7г,д,е), тогда как представленность *Verrucomicrobia* в этих же группах сравнения увеличи-

валась (рис. 7ж). Также *Verrucomicrobia* увеличивалась и у животных HFDin по сравнению с животными HFD (рис. 7ж).

При анализе влияния добавок индол-3-ацетата на семейства установлено, что в тонкой кишке у животных на стандартной диете увеличивалась представленность семейства *Oscillospira* (рис. 8а). Также в тонкой кишке, но на высокожировой диете добавки индол-3-ацетата увеличили долю семейства *Bifidobacterium* (рис. 8б) и снизили долю *Ruminococcus* (рис. 8в).

В толстой кишке меняется доля четырех семейств при модификации представленности микробиоты кишечника индол-3-ацетатом. Также как и для тонкой кишки в толстой кишке характерно увеличение доли семейства *Bifidobacterium* (рис. 8г) для животных HFDin. Также из полезных семейств увеличивается доля *Akkermansia* в толстой кишке на фоне модификации микробиоты индол-3-ацетатом у животных HFDin (рис. 8д). Интересно отметить, что в сравнении со стандартной диетой у мышей, которые получали этанол (SDet) и у мышей с добавками индол-3-ацетата (SDin) снижалась доля *Lactobacillus* в толстой кишке (рис. 8е). Кроме того, в толстой кишке у животных HFDin снижалась доля *Adlercreutzia* в сравнении с животными контрольной группы HFdet, но не у животных HFD (рис. 8ж).

При анализе представленности видов с применением модуляции микробиоты добавками индол-3-ацетата нами установлено, что в тонкой кишке (рис. 9а) и толстой (рис. 9б) кишке статистически значимо увеличилось содержание *Bifidobacterium pseudolongum* в группе животных HFDin в сравнении со всеми другими изученными группами животных. Также показано статистически значимое увеличение доли *Akkermansia muciniphila* в толстой кишке под влиянием индол-3-ацетата и в группе HFDin в сравнении с HFD, и в группе SDin в сравнении с SDet (рис. 9в).

Нами не было установлено развитие избыточной массы тела или ожирения у мышей на кратковременной HFD. Это может быть обусловлено тем, что в рационе наших животных были добавки жиров животного происхождения. Существуют исследования, которые демонстрируют, что алиментарное ожирение у мышей развивается в течение 3 недель при употреблении в пищу добавок неперевариваемых жирных кислот [16]. То есть важно учитывать какие именно добавки жиров были при моделировании высокожировой диеты.

По потреблению пищи также не было отличий между животными всех 6-ти групп исследования. То есть статистически значимой разницы в пище-

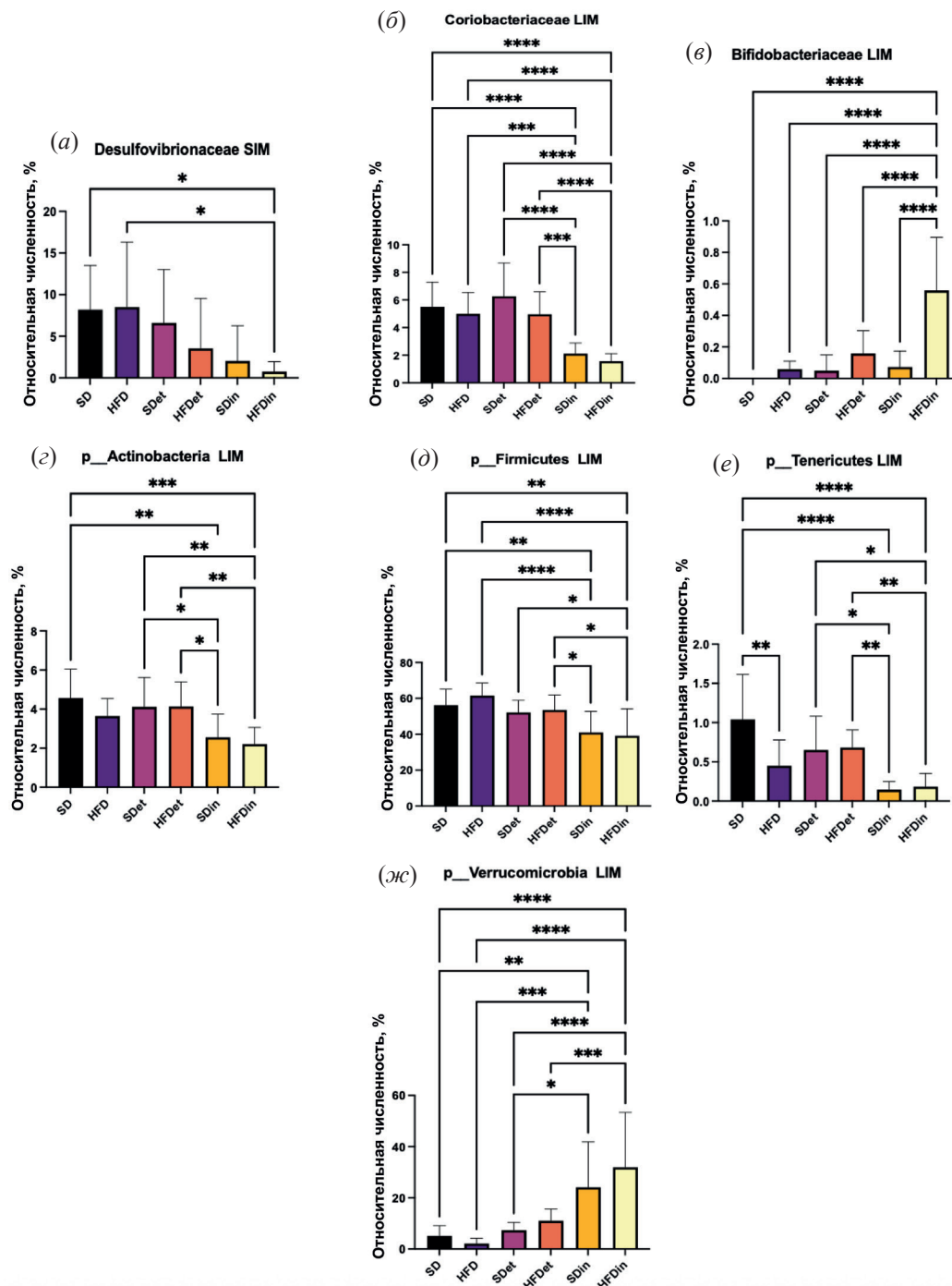


Рис. 7. Влияние различных типов диеты на семейства микробиома кишечника мышей в SIM и LIM. Уровень (а) *Desulfovibrionaceae* SIM, (б) *Coriobacteriaceae* в LIM, (в) *Bifidobacteriaceae* в LIM, (г) *Actinobacteria* LIM, (д) *Firmicutes* в LIM, (е) *Tenericutes* в LIM и (ж) *Verrucomicrobia*. При * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Сравнения проводились с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнительным тестом Тьюки.

вом поведении животных на стандартной диете, диете с высоким содержанием жиров или при использовании добавок этанола/индол-3-ацетата нами установлено не было.

Было показано, что четырехнедельная HFD привела к значительно более высокому содержанию глюкозы в крови натощак у мышей, чем SD, в то время как сывороточные уровни ТАГ и

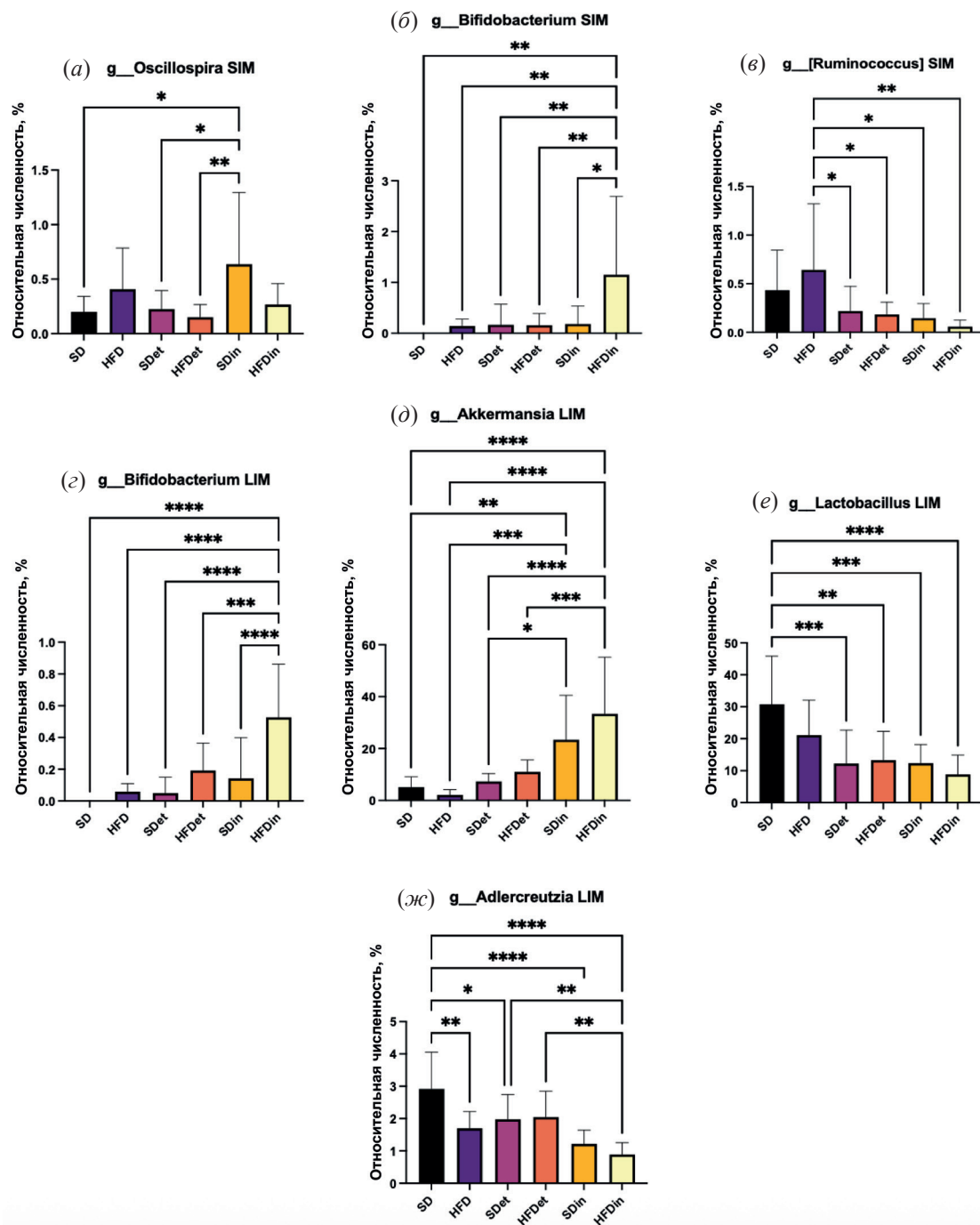


Рис. 8. Влияние различных типов диеты на семейства мышей SIM и LIM. Уровень (а) *Oscillospira* SIM, (б) *Bifidobacterium* в SIM, (в) *Ruminococcus* в SIM, (г) *Bifidobacterium* LIM, (д) *Akkermansia* LIM, (е) *Lactobacillus* LIM, (ж) *Adlercreutzia* LIM. При * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Сравнения проводились с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнительным тестом Тьюки.

холестерола не отличались. Данное наблюдение может быть доказательством того, что HFD первично приводит к нарушению толерантности к глюкозе, а не к нарушению липидного обмена [17]. При этом прием индол-3-ацетата у животных на высокожировой диете сопровождался сниже-

нием уровня глюкозы в сыворотке крови по сравнению с животными, которые находились на высокожировой диете, но не получали индол-3-ацетат. Полученные нами результаты перекликаются с имеющимися исследованиями о том, что более высокий уровень индол-3-ацетата кор-

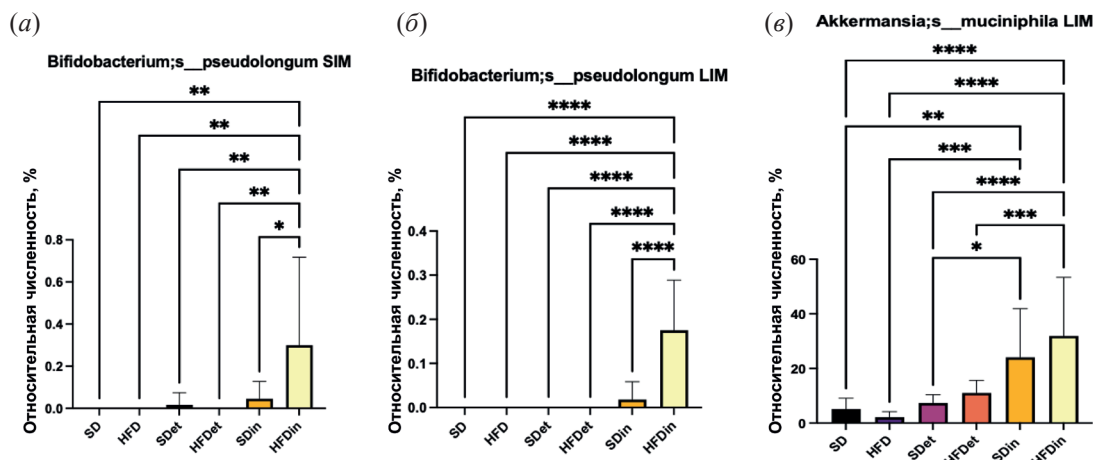


Рис. 9. Влияние различных типов диеты на семейства мышей SIM и LIM. Уровень (а) *Bifidobacterium pseudolongum* SIM, (б) *Bifidobacterium pseudolongum* в LIM, (в) *Akkermansia muciniphila* в LIM. При $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. Сравнения проводились с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим множественным сравнительным тестом Тьюки.

релирует с лучшим гликемическим профилем у больных ожирением [18].

Нами установлено, что индол-3-ацетат увеличивает α -разнообразие (PD whole) в тонкой кишке у животных на стандартной диете, тогда как в толстой кишке индол-3-ацетат снижает α -разнообразие у животных на высокожировой диете (индекс Shannon и Simpson) или возможно не оказывает противоположное действие, так как HFD значительно модифицирует микробиоту кишечника. Индол-3-ацетат увеличивал индекс Chao1, но только в толстой кишке, что также отражено в наблюдаемых OTU, которые аналогично максимально были повышены на стандартной диете и добавках индол-3-ацетата. Возможно, что такие противоположные результаты отражают то, что индекс Chao1 не учитывает распространенность видов в популяции. При этом следует помнить, что оценка биоразнообразия в пространстве видов в значительной мере некорректна, в первую очередь потому, что никак не учитывается морфологическое, функциональное, экологическое сходство/различие между самими видами [19]. Модели разнообразия, основанные на тех или иных аналитических формулах распределения популяционной плотности, остаются лишь интерпретацией весьма частных гипотез их авторов и не могут служить фундаментом для формально строгой методики оценки биоразнообразия.

У животных в тонкой кишке добавки индол-3-ацетата меняют представленность трех семейств: на стандартной диете увеличивалась доля *Oscillospira*, на высокожировой диете увеличивалась доля

Bifidobacterium и снижалась доля *Ruminococcus*. В толстой кишке менялась доля четырех семейств при модификации представленности микробиоты кишечника индол-3-ацетатом: увеличивалась доля семейства *Bifidobacterium* для животных HFDin, увеличивалась доля *Akkermansia* у животных HFDin. У мышей, которые получали этанол (SDet) и у мышей с добавками индол-3-ацетата (SDin) снижалась доля *Lactobacillus*, у животных HFDin снижалась доля *Adlercreutzia* в сравнении с животными контрольной группы HFDet, но не у животных HFD. Важно отметить, что в нашем исследовании добавление индол-3-ацетата повышает численность одного из микроорганизмов, относящегося к мукозальной микробиоте – *Akkermansia muciniphila*, а не к просветной [17]. При этом данное увеличение будет иметь важное симбиотическое значение, так *Akkermansia muciniphila* один из ключевых поставщиков питательных веществ для многих других микроорганизмов кишечника [20]. За последние 10 лет было показано, что *Akkermansia muciniphila* может предотвращать развитие и облегчать течение ожирения [21], сахарного диабета [22], нейродегенерации, воспаления [23], старения [21] и развития рака [24, 25]. Так *Akkermansia muciniphila* один из доказанных видов, который подвергает деградации муцины. Муцины при этом – главные гликопротеины слизи и ключевые источники углерода, азота и энергии в толстой кишке [26]. Ранее было показано, что на представленность *Akkermansia muciniphila* в кишечнике позитивно влияет прием метформина, триптофана и бетаина [27]. Также было показано, что повышение представленности

Akkermansia muciniphila коррелирует с лучшим гликемическим профилем [27]. При этом наше исследование подтверждает это наблюдение. Совместное повышение *Akkermansia muciniphila* и *Bifidobacterium pseudolongum* на фоне добавок индол-3-ацетата может указывать на то, что *Bifidobacterium pseudolongum* использует продукты деградации муцина как ключевые топливные молекулы, которые им поставляет *Akkermansia muciniphila*. При этом ранее было показано, что применение добавок *Bifidobacterium pseudolongum* приводило к снижению представленности в кишечнике *Akkermansia muciniphila* и к увеличению толщины слоя слизи и авторы при этом излагают общепринятую мысль, что если слой слизи толще, то и состояние кишечника лучше [28]. Однако, в этом направлении произошел пересмотр парадигмы и повышенную деградацию муцинов теперь не всегда принято рассматривать как негативное событие для кишечника и организма в целом [27].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспериментальные животные и дизайн исследования. Все процедуры с участием экспериментальных животных были одобрены биоэтическим комитетом Первого Московского государственного медицинского университета имени И. М. Сеченова, Москва, Россия (протокол № 96 от 2 сентября 2021 г.). Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с соответствующими руководствами и правилами [28, 29]. Все методы описаны в соответствии с рекомендациями ARRIVE.

Мыши C57/black6 SPF ($n = 60$, самки) (выращенные в Питомнике лабораторных животных в Пушкино, Россия) содержались в виварии уровня SPF Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова (Москва, Россия) при следующих условиях: 22°C, влажность 55% и цикл 12/12 ч свет/темнота. Мыши проходили акклиматизацию в виварии в течение одной недели. Для эксперимента отбирали кондиционных особей с гладким шерстным покровом и массой тела в пределах среднестатистических возрастных показателей. Группы формировали с рандомизацией по массе тела и разбросом в группе по массе не более $\pm 10\%$. Вес животных на начало исследования составлял 14.4 ± 0.96 г. В начале эксперимента мыши были случайным образом разделены на шесть нижеописанных групп:

1) 10 мышей, находились на стандартной диете, которым внутрижелудочно через зонд вводили по 0.2 мл воды для инъекций (SD),

2) 10 мышей, находились на высокожировой диете, которым внутрижелудочно через зонд вводили по 0.2 мл воды для инъекций (HFD),

3) 10 мышей, находились на стандартной диете, которым внутрижелудочно через зонд вводили 0.2 мл растворителя – 0.8 % раствор этанола (SDet),

4) 10 мышей, находились на высокожировой диете, которым внутрижелудочно через зонд вводили 0.2 мл растворителя – 0.8% раствор этанола (HFDet),

5) 10 мышей, находились на стандартной диете, которым внутрижелудочно через зонд вводили 0.2 мл раствора индол-3-ацетата (SDin),

6) 10 мышей, находились на высокожировой диете, которым внутрижелудочно через зонд вводили 0.2 мл раствора индол-3-ацетата (HFDin).

Всех животных (возрастом 4–5 недель) кормили в течение 28 дней стандартным полнорационным комбикормом (рецепт ПК-120-2-923, состав рецепта – кукуруза, пшеница, шрот подсолнечный, шрот соевый, мясная мука (птичья), масло растительное подсолнечное рафинированное, Премикс П2 Пушновит (0.5%), L-лизин моногидрохлорид, DL-метионин, фосфат дефторированный, известковая мука, сульфат натрия, энергетическая ценность 311 ккал/100 г, изготовитель АО “Татчинский ККЗ”, ГОСТ Р34566-2019). Доступ к воде был свободный. Использовалась фильтрованная вода, водопроводный фильтр Аквафор В300. Для животных, которые находились на высокожировой диете корм обогащали до 30% триглицеридами животного происхождения (смаец свиной, производитель: М2, ГОСТ 25292-2017) путем смешивания и пропитывания в соотношении корм : смаец – 7 : 3. Контрольные животные не получали добавок смальца.

Индол-3-ацетат вводили 1 раз в сутки (в утренние часы), 5 дней в неделю, в течение 28 дней. Для этого в день введения смешивали 1 мл индол-3-ацетата (“Sigma Aldrich”, Германия) и 24 мл воды для инъекций или этанола (ввели группу с этанолом, так как в воде индол-3-ацетат был плохо растворим) и перемешивали. Рабочая концентрация индол-3-ацетата при этом составляла 696 мг/л, а разовая доза вещества была 0.1392 мг. При подборе дозы индол-3-ацетата мы ориентировались на результаты собственного предварительного тестирования вещества на животных, а также на данные литературы об экспериментальном использовании индол-3-ацетата [30]. При этом выбранная нами доза была сопоставима с физиологической кон-

центрацией индол-3-ацетата в кишечнике и не имела токсических эффектов.

Оценка массы тела, потребление пищи, уровня глюкозы, триацилглицеролов и холестерина в крови. Массу тела экспериментальным животным определяли каждые 7 дней при помощи электронных лабораторных весов “Sartorius MSA 6202S-1CE-DO Cubis” с классом точности 0.1 г. В конце эксперимента измеряли массу тела животного, длину тела и голени, массу сальника (весы аналитические ACZET CY-64 высокоточные, Индия) и рассчитывается индекс Ли.

Количество съеденного корма определяли ежедневно как разницу между массой выданного корма и массой оставшегося в кормушке корма.

Уровни глюкозы, триацилглицеролов и холестерина в сыворотках крови измеряли для оценки влияния индол-3-ацетата на системный метаболизм. Животные голодали в течении минимум 5 ч со свободным доступом к воде перед определением глюкозы. Сыворотку крови получали индивидуально от каждого животного, в конце эксперимента, при забое животных методом декапитации. Сбор крови осуществлялся в пробирки из шейных кровеносных сосудов. Кровь инкубировали при 37°C в течение 15 мин и центрифугируют 10 мин при 400g при 4°C (центрифуга Eppendorf Centrifuge 5402). Сыворотку собирали с помощью пастеровской пипетки и помещали в стерильные, пластиковые пробирки с завинчивающейся крышкой.

Концентрацию глюкозы, триацилглицеролов и холестерина определяли с помощью тест-наборов GLUC3, TRIGL и CHOL2 соответственно (Roche, Швейцария, номера по каталогу: 04404483190, 05171407188 и 03039773190 соответственно), а также использовали анализатор крови Cobas c311 (Roche, Швейцария).

Подготовка образцов тонкой и толстой кишки. Фрагменты тонкой и толстой кишки были собраны, быстро заморожены в жидком азоте и затем хранились при температуре –80°C до проведения анализа. Ткани кишечника были разрезаны в стерильных условиях на фрагменты длиной около 1 см для проведения метагеномного секвенирования. Затем каждый фрагмент был помещен в отдельную стерильную пробирку Эппендорф, которые затем были помещены на сухой лед и отправлены на анализ таксономической структуры сообщества методом метагеномного высокопроизводительного секвенирования.

Метагеномное высокопроизводительное секвенирование. Анализ микробиоты проводила Научно-исследовательская лаборатория “Мультиомные технологии живых систем” (Казань, Россия). Геномную ДНК выделяли из содержимого кишечника мыши с помощью набора FastDNA

TM Spin Kit for Feces (MP Biomedicals, Санта-Ана, Калифорния, США). С использованием специфических праймеров была амплифицирована область V3–V4 бактериального гена 16S рРНК. Во время второго раунда ПЦР-амплификации каждый образец был баркодирован с помощью индексных праймеров после очистки продукта ПЦР на основе AMPure XP bead (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США, CB55766755). Для определения концентрации ампликонов использовали набор Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и флуориметр Qubit 2.0 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Используя флуориметр Qubit 2.0 и набор для анализа Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), определяли концентрацию ампликонов. Для завершения подготовки библиотеки материалы смешивали в равном молярном соотношении перед секвенированием. Затем библиотеки подвергали высокопроизводительному секвенированию (2 × 300 п.н. прочтений) (Illumina MiSeq, Illumina, Калифорния, США). Необработанные прочтения обрабатывали с использованием программного обеспечения QIIME2 v2023.7.0 [31].

Статистический анализ данных. Статистическое программное обеспечение GraphPad Prism 10 v10.0.2 применялось для обработки данных с использованием непараметрических статистических методов. Однофакторный дисперсионный анализ Уэлча (ANOVA) или множественные тесты Манна-Уитни с двухступенчатым пошаговым подходом (Бенджамини, Кригер и Йекутиели) (коэффициент ложных открытий $Q = 5\%$) применялись для изучения всех экспериментальных данных *in vivo*. Для представления всех данных использовались стандартное отклонение и среднее значение. Считалось, что значения p менее 0,05 указывают на статистическую значимость (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Проводили однофакторный дисперсионный анализ с последующим множественным сравнительным тестом Тьюки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение индол-3-ацетата может быть перспективным с целью коррекции гликемии при употреблении пищи с высоким содержанием жиров. Индол-3-ацетат увеличивает α -разнообразие в тонкой кишке у животных на стандартной диете и его можно рассматривать как потенциальное средство для коррекции дисбиоза с позитивным пребиотическим потенциалом, которое стимулирует симбиотические взаимодействия мукозальных и внутрипросветных микроорганизмов кишечника.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2022-310).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей в качестве объектов исследования. Информированное согласие не требовалось.

Протокол исследования на животных был одобрен Институциональным наблюдательным советом (или Этическим комитетом) Этического комитета по исследованиям на животных Первого Московского государственного медицинского университета им. И. М. Сеченова, Россия (протокол № 96 от 2 сентября 2021 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи и внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shen J., Yang L., You K., Chen T., Su Z., Cui Z., Wang M., Zhang W., Liu B., Zhou K., Lu H. // *Front Immunol.* 2022. V. 13. P. 762580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.762580>
2. Liang H., Dai Z., Liu N., Ji Y., Chen J., Zhang Y., Yang Y., Li J., Wu Z., Wu G. // *Front Microbiol.* 2018. V. 9. P. 1736. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01736>
3. Zhang Q., Zhao Q., Li T., Lu L., Wang F., Zhang H., Liu Z., Ma H., Zhu Q., Wang J., Zhang X., Pei Y., Liu Q., Xu Y., Qie J., Luan X., Hu Z., Liu X. // *Cell Metab.* 2023. V. 35. P. 943–960. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2023.04.015>
4. Shatova O. P., Shestopalov A. V. // *Biology Bulletin Rev.* 2023. V. 13. P. 81–91. <https://doi.org/10.1134/s2079086423020068>
5. Vaga S., Lee S., Ji B., Andreasson A., Talley N.J., Agréus L., Bidkhorji G., Kovatcheva-Datchary P., Park J., Lee D., Proctor G., Ehrlich S.D., Nielsen J., Engstrand L., Shoaie S. // *Sci Rep.* 2020. V. 10. P. 14977. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71939-2>
6. Kumar A., Sperandio V. // *MBio.* 2019. V. 10. P. e03318-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01031-19>
7. Lee H., Lee Y., Kim J., An J., Lee S., Kong H., Song Y., Lee C.K., Kim K. // *Gut Microbes.* 2018. V. 9. P. 155–165. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1405209>
8. Ding Y., Yanagi K., Yang F., Callaway E., Cheng C., Hensel M.E., Menon R., Alaniz R.C., Lee K., Jayaraman A. // *Elife.* 2024. V. 13. P. 87458. <https://doi.org/10.7554/eLife.87458>
9. Kumar A., Sperandio V. // *mBio.* 2020. V. 10. P. e03318-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03318-19>
10. Krishnan S., Ding Y., Saeidi N., Choi M., Sridharan G.V., Sherr D.H., Yarmush M.L., Alaniz R.C., Jayaraman A., Lee K. // *Cell Reports.* 2019. V. 23. P. 1099–1111. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.080>
11. Silva Y.P., Bernardi A., Frozza R. L. // *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020. V. 11. P. 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>
12. Yao Y., Liu Y., Xu Q., Mao L. // *Molecules.* 2024. V. 29. P. 379. <https://doi.org/10.3390/molecules29020379>
13. Coutinho W., Halpern B. // *Diabetol Metab Syndr.* 2024. V. 16. P. 6. <https://doi.org/10.1186/s13098-023-01233-4>
14. Dapa T., Ramiro R.S., Pedro M.F., Gordo I., Xavier K.B. // *Cell Host Microbe.* 2022. V. 30. P. 183–199. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.01.002>
15. Contreras-Rodriguez O., Arnoriaga-Rodríguez M., Miranda-Olivos R., Blasco G., Biarnés C., Puig J., Rivera-Pinto J., Calle M.L., Pérez-Brocal V., Moya A., Coll C., Ramió-Torrentà L., Soriano-Mas C., Fernandez-Real J.M. // *Int J Obes.* 2022. V. 46. P. 30–38. <https://doi.org/10.1038/s41366-021-00953-9>
16. Шестопалов А.В., Кроленко Е.В., Недорубов А.А., Борисенко О.В., Попруга К.Э., Макаров В.В., Юдин С.М., Гапонов А.М., Румянцев С.А. // *Бюлл. эксперимент. биол. и мед.* 2024. Т. 178. С. 256–264. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2024-178-8-256-264>
17. Lee J., Kim M.J., Moon S., Lim J.Y., Park K.S., Jung H.S. // *Endocrinol. Metabolism.* 2023. V. 38. P. 782–787. <https://doi.org/10.3803/EnM.2023.1738>
18. Prudencio A.P., Machado N.M., Fonseca D.C. // *Clin. Nutr. ESPEN.* 2021. V. 46. P. S552. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.09.035>
19. Zou Y., Zhao P., Axmacher J. C. // *Ecosphere.* 2023. V. 14. P. 4363. <https://doi.org/10.1002/ecs2.4363>
20. Jian H., Liu Y., Wang X., Dong X., Zou X. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 3900. <https://doi.org/10.3390/ijms24043900>
21. van der Lugt B., van Beek A.A., Aalvink S., Meijer B., Sovran B., Vermeij W.P., Brandt R.M.C., de Vos W.M., Savelkoul H.F.J., Steegenga W.T., Belzer C. // *Immun. Ageing.* 2019. V. 16. P. 6. <https://doi.org/10.1186/s12979-019-0145-z>

22. Hasani A., Ebrahimzadeh S., Hemmati F., Khabbaz A., Hasani A., Gholizadeh P. // J. Med. Microbiol. 2021. V. 70. P. 10.
[https://doi.org/ 10.1099/jmm.0.001435](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001435)
23. Rodrigues V.F., Elias-Oliveira J., Pereira Í.S., Pereira J.A., Barbosa S.C., Machado M.S.G., Carlos D. // Front Immunol. 2022. V. 13. P. 934695.
[https://doi.org/ 10.3389/fimmu.2022.934695](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.934695)
24. Hou X., Zhang P., Du H., Chu W., Sun R., Qin S., Tian Y., Zhang Z., Xu F. // Front Pharmacol. 2021. V. 12. P. 725583.
[https://doi.org/ 10.3389/fphar.2021.725583](https://doi.org/10.3389/fphar.2021.725583)
25. Gubernatorova E.O., Gorshkova E.A., Bondareva M.A., Podosokorskaya O.A., Sheynova A.D., Yakovleva A.S., Bonch-Osmolovskaya E.A., Nedospasov S.A., Kruglov A.A., Drutskaya M.S. // Front Immunol. 2023. V. 14. P. 1303795.
[https://doi.org/ 10.3389/fimmu.2023.1303795](https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1303795)
26. Cani P.D., Depommier C., Derrien M., Everard A., de Vos Willem M. // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2022. V. 19. P. 625–637.
[https://doi.org/ 10.1038/s41575-022-00631-9](https://doi.org/10.1038/s41575-022-00631-9)
27. <https://docs.cntd.ru/document/901909691/titles/7EA0KF>
28. <https://www.fgu.ru/upload/iblock/f5a/fkamlebvdp6ic-91d37ole41wxd06qe5.pdf>
29. Shaheen N., Miao J., Xia B., Zhao Y., Zhao J. // FASEB J. 2025. V. 15. P. 70574. P.
[https://doi.org/ 10.1096/fj.202500295R](https://doi.org/10.1096/fj.202500295R)
30. Martinez-Guryn K., Hubert N., Frazier K., Urlass S., Musch M.W., Ojeda P., Pierre J.F., Miyoshi J., Sonntag T.J., Cham C.M., Reardon C.A., Leone V., Chang E.B. // Cell. Host. Microbe. 2018. V. 23. P. 458–469.
[https://doi.org/ 10.1016/j.chom.2018.03.011](https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.03.011)
31. Bolyen Evan, Rideout Jai Ram, Dillon Matthew R. // Nat. Biotechnol. 2019. V. 37, P. 852–857.
[https://doi.org/ 10.1038/s41587-019-0252-6](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0252-6)

Oral Indole-3-acetate Supplementation Increases the Abundance of *Bifidobacterium pseudolongum* and *Akkermansia muciniphila* in the Intestine of Mice on a High-Fat Diet

O. P. Shatova^{*,#}, A. A. Zabolotneva^{*}, S. A. Rumyantsev^{*}, and A. V. Shestopalov^{*}

[#] Phone: +7 (966) 065-33-62; e-mail: shatova.op@gmail.com

^{*} Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University),
Ministry of Health of the Russian Federation,
ul. Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997 Russia

It is known that even a short-term high-fat diet has a negative effect on the metabolic health of the organism. However, under the influence of diet, first of all, the intestinal microbiota undergoes changes. The type of diet, dietary supplements and drugs affect both the taxonomic diversity of the microbiota and its functional state. It is known that with the participation of the intestinal microbiota, tryptophan is converted into indole and its various derivatives. The leading role of indoles in the regulation of the expression of tight junction proteins, and accordingly the regulation of intestinal permeability, has also been established. The aim of our study was to assess the effect of indole-3-acetate on the taxonomic diversity of the microbiota of the small and large intestines, as well as to establish the potential prebiotic value of this indole derivative under conditions of short-term use of a high-fat diet. C57/black6 SPF mice aged 4–5 weeks (n=60, females) were randomly divided into six groups. A high-fat diet was achieved by feeding laboratory animals a high-fat diet of animal origin, providing up to 30% of the total calories. Indole-3-acetate was administered together with a standard or high-fat diet via an atraumatic intragastric tube at a single dose of 0.1392 mg per mouse for 28 days. In our study, we showed for the first time that in C57/black6 SPF mice on a short-term high-fat diet, indole-3-acetate increases the representation of *Bifidobacterium pseudolongum* in the microbial community of both the small intestine and the colon. Whereas, the increase in *Akkermansia muciniphila* was only in the microbial community of the colon. Indole-3-acetate intake provides normoglycemia in animals on a short-term high-fat diet. The use of indole-3-acetate in various metabolic diseases associated with high-fat diet and dysbacteriosis may be a promising therapeutic approach to correct metabolic disorders through modulation of the microbiotic community.

Keywords: tryptophan, indole, indole-3-acetate, gut microbiota, *Bifidobacterium pseudolongum*, *Akkermansia muciniphila*