

Бициклол облегчает атеросклероз, воздействуя на кишечную микробиоту

Сяо-Линь Ли, Цзинь-Цзинь Цуй, Вэнь-Шэн Чжэн, Цзинь-Лань Чжан, Жуй Ли, Сяо-Лей Ма, Мяо Линь, Хуэй-Хуэй Го, Цун Ли, Сяо-Ю Ю, Пэн Ду, Ли-Мин Чжао, Шуван Хэ, Пей Лан, Цзянь-ДунЦзян*, Юниэн Че* и Лу-Лу Ван*

Атеросклероз (АС) связан с высокими уровнями заболеваемости и смертности, что все возрастающим бременем ложится на современное общество. Бициклол (ВІС) представляет собой универсальное биоактивное соединение, которое можно использовать для лечения АС. Однако его эффективность при АС еще не описана. В статье показано, что ВІС нормализует дисбиоз микрофлоры кишечника, вызванный диетой с высоким содержанием жиров у мышей Арое(-/-). Анализ метагеномных ассоциаций подтверждает, что модуляция углеводов-активных ферментов и генов, генерирующих короткоцепочечные жирные кислоты, в кишечной флоре является одним из механизмов. Здоровье кишечника, особенно иммунитет и целостность кишечника, восстанавливаются с помощью применения ВІС, что приводит к улучшению динамики системных иммунных клеток и функций печени. Соответственно, ВІС способствует активации эндотелия, инфильтрации макрофагов и накоплению эфиров холестерина в дуге аорты, тем самым уменьшая возникновение бляшек. Более того, доказано, что терапевтический эффект ВІС на АС передается при трансплантации фекальной микробиоты. Текущее исследование впервые демонстрирует антиатеросклеротические эффекты ВІС и показывает, что его терапевтическое значение может быть, по крайней мере, частично связано с его воздействием на микробиоту кишечника.

1. Введение

Атеросклероз (АС) является основной причиной инфаркта миокарда и инсульта и основной причиной смертности во всем мире¹; однако его патофизиология сложна и выяснена лишь

¹ Х.-Л. Ли, В.-С. Чжэн, Дж.-Л. Чжан, Р. Ли, Х.-Л. Ма, М. Лин, Х.-Х. Го, К. Ли, Х.-У. Ю, П. Ду, Л.-М. Чжао, П. Лан, Ж.-Д. Цзян, Л.-Л. Ван
Государственная ключевая лаборатория биоактивных веществ и функций природных лекарственных средств
Институт Материя Медика

Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза
Пекин 100050, Китай

Электронная почта: jiangjd@imm.ac.cn; wanglulu@imm.ac.cn

Дж.-Дж. Кюи, Ж.-Д. Цзян, Ю. Че, Л.-Л. Ван

Институт медицинской биотехнологии

Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза

Пекин 100050, Китай

Электронная почта: cheys@im.ac.cn

С. Хе

Фармацевтический колледж

Шаньдунский университет

Пекин 250012, Китай

Идентификационный номер(а) ORCID автора(ов) этой статьи можно найти по адресу

<https://doi.org/10.1002/sml.202105021>.

DOI: 10.1002/sml.202105021

частично. Идентификация новых путей, связанных с заболеванием, и терапевтических мишеней для АС имеет решающее значение. В последнее время большое внимание уделяется связи между АС и изменениями в составе микробиоты кишечника и ее метаболической активности.

Микробиом кишечника человека представляет собой сложную экосистему, в которой обитают триллионы микробов, которые развиваются вместе со своим хозяином и устанавливают мутуалистические симбиотические отношения, способствующие их сосуществованию.^[2] Все большее число исследований демонстрируют, что микробиом кишечника непосредственно участвует в таких процессах хозяина, как поглощение питательных веществ, рост и развитие, биологические барьеры, иммунная регуляция и обмен веществ, среди прочего.^[3] Действительно, во многих исследованиях сообщается, что микробный дисбаланс может быть связан с различными кишечными и внекишечными заболеваниями, включая АС^[4]; например, Степанкова и соавт. сообщили, что микробиота кишечника может защищать от АС у мышей *ApoE(-/-)*^[5]. Исследование показало, что у безмикробных мышей *ApoE(-/-)*, получавших корм с низким содержанием холестерина, развивались более тяжелые бляшки АС, чем у обычных мышей *ApoE(-/-)*; однако этот эффект уменьшался, когда мышам *ApoE(-/-)* пересаживали нормальный человеческий микробиом.^[5] Точно так же другая группа обнаружила, что трансплантация фекальной микробиоты (FMT) у стерильных мышей может передавать восприимчивость к АС^[6]. Кроме того, клиническое присутствие бактериальной ДНК в бляшках АС и ее корреляция с их обилием в кишечнике подтверждают возможную причинно-следственную связь между кишечной микробиотой и АС^[7]. Karlsson и соавт. обнаружили, что кишечный микробиом пациентов с симптоматическим АС имеет измененную структуру и метагеном, обогащенный генами, кодирующими синтез пептидогликана, но обедненный фитоендегидрогеназой^[8]. Появляющиеся данные свидетельствуют о том, что анти-АС эффективность многих пищевых добавок, таких как инулин^[9], черника^[10] и рыбий жир^[11], богатый длинноцепочечными мононенасыщенными жирными кислотами, по крайней мере частично опосредована модуляцией их структуры. и/или функции микробиоты кишечника. Действительно, кишечная микробиота была идентифицирована как мощная терапевтическая мишень для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с АС. Бициклол (ВІС, 4,4'-диметокси-5,6,5',6'-диметилен-диокси-2-гидрокси-метил-2'-карбонилбифенил) является синтетическим аналогом активного компонента схизандрина С, экстрагируемого из растения *Fructus schisandrae*, который используется в качестве гепатопротектора с высокой эффективностью и безопасностью во многих странах^[12]. Клинические испытания показали, что ВІС нормализует повышенный уровень сывороточных трансаминаз и улучшает нарушенную функцию печени у пациентов с различными заболеваниями печени.^[12,13] Его гепатопротекторные механизмы по имеющимся данным, связано с его устранением свободных радикалов^[14], активностью антиоксидантного стресса,^[15] противовоспалительными эффектами^[16], подавлением апоптоза, вызванного иммунологическим повреждением^[17], и защитой от повреждения ядерной ДНК^[13]. Клинические исследования показали, что ВІС может ингибировать накопление липидов в печени,^[18] улучшать состояние дислипидемии и резистентности к инсулину (ІР), а также снижать индекс массы тела и соотношение талии и бедер у пациентов с неалкогольной жировой болезнью печени (НАЖБП)^[12]. Поэтому ВІС может быть хорошим кандидатом для лечения АС; однако его благотворное влияние на АС и лежащие в его основе механизмы еще не исследованы. Мы предположили, что эффективность ВІС может быть, по крайней мере, частично опосредована кишечной микробиотой.

Здесь мы стремились выяснить влияние и молекулярные механизмы ВИС на АС с точки зрения микроэкологии кишечника. Насколько нам известно, это исследование является первым, в котором изучается терапевтическая эффективность ВИС при АС и исследуется вклад микробиома кишечника.

2. Результаты

2.1. ВИС улучшает состояние артериальных бляшек у мышей *Apoe(-/-)*, получающих корм с высоким содержанием жиров (HFD)

Во-первых, мы оценили терапевтический эффект ВИС на возникновение артериальных бляшек у мышей *Apoe(-/-)*, получавших HFD (ингредиенты корма показаны в Таблице S1 в дополнительной информации). Как показано на рис. 1A, B, у мышей в группе WD было больше поражений АС, чем у мышей в группе NCD; однако лечение как низкими, так и высокими дозами ВИС значительно уменьшало поражения. Статистический анализ показал, что площадь бляшки у мышей WD была в 17,9 раз выше, чем у мышей NCD, в то время как лечение LBIS и HBIS уменьшало площадь бляшки на 46% и 53% соответственно (рис. 1C). Мы также оценили уровень аортального холестерина эфира (CE) в каждой группе и обнаружили, что HFD значительно увеличивает общее количество CE и насыщенного CE в артерии по сравнению со стандартной диетой (группа WD по сравнению с группой NCD); однако пять месяцев лечения ВИС обратили эти эффекты вспять. АС является многостадийным заболеванием, при котором повреждение эндотелия предшествует образованию бляшек^[21,22]. Таким образом, мы обнаружили экспрессию ICAM-1 и VCAM-1 в аортах мышей *Apoe(-/-)* и обнаружили, что их экспрессия была значительно выше и активируется после кормления HFD. И наоборот, экспрессия ICAM-1 и VCAM-1 была значительно снижена в аортах мышей *Apoe(-/-)*, которых кормили HFD, получавших ВИС (рис. 1D). Впоследствии мы оценили инфильтрацию и поляризацию моноцитов в дуге аорты с помощью проточной цитометрии и анализа флуоресцентного окрашивания. Как показано на рисунке 1E, в ткани аорты мышей в группах LBIS и HBIS рекрутировалось меньше моноцитов, чем в группах WD. Анализ проточной цитометрии также показал, что ВИС значительно снижает количество моноцитов (F4/80⁺/CD11b⁺) в дуге аорты по сравнению с необработанными мышами *Apoe(-/-)*, получавшими HFD (рис. 1F). Кроме того, в дуге аорты мышей в группах LBIS и HBIS наблюдалось меньше макрофагов M1, но больше макрофагов M2, чем в группе WD (рис. 1F, G; рис. S1, вспомогательная информация). Мы также изучили экспрессию цитокинов, в том числе фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), интерлейкина (IL)-1 β и IL-6 (рис. 1H), и обнаружили, что их экспрессия была значительно выше в дуге аорты у мышей WD, чем у мышей NCD, но лечение ВИС приводило к восстановлению в зависимости от дозы. Эффект вмешательства был также подтвержден с помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинга (рис. 1I, J). В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что ВИС может улучшать АС, вызванный HFD, у мышей *Apoe(-/-)*.

2.2. ВИС нормализует дисбактериоз кишечника у мышей *Apoe(-/-)*, получающих корм с высоким содержанием жиров (HFD)

Мы сравнили микробиоту кишечника среди экспериментальных групп мышей *Apoe(-/-)*. Как показано на рисунке 2A, мыши *Apoe(-/-)*, получавшие HFD, демонстрировали заметно более низкую численность и разнообразие кишечных бактерий; однако этот эффект был значительно обращен вспять при применении ВИС. Анализ основных компонентов (PCA) и анализ основных координат (PCoA) показали, что HFD значительно изменил общую структуру кишечного микробиома, ВИС в некоторой степени изменил эти сдвиги вдоль PC1

(рис. 2B). Немеетрическое многомерное шкалирование (NMDS) выявило аналогичную тенденцию (рис. 2B). Не было отмечено существенной разницы в составе кишечной микробиоты между группами NCD и NBIC. Таксономический состав кишечного микробиома в каждой группе был дополнительно проанализирован (рис. 2C; рис. S2, вспомогательная информация). На уровне типа HFD уменьшил относительное количество Bacteroidetes, увеличил относительное количество Firmicutes (рис. 2C-a) и соотношение Firmicutes/Bacteroidetes (рис. S3, вспомогательная информация), в то время как обработка BIC обратила эти изменения вспять. Не было отмечено каких-либо различий между группой NCD и NBIC. На уровне класса семь наиболее выраженных классов модулировались с помощью LBIC в том же направлении, что и у мышей с NCD, шесть из которых модулировались с помощью NBIC (рис. 2C-b). Те же данные наблюдались на уровне отряда (рис. 2C-c), в то время как на уровне семейства 10/12 наиболее регулируемых семейств модулировались с помощью NBIC в том же направлении, что и у мышей NC, из которых 8 модулировались с помощью LBIC (рис. 2 C-d).

На уровне рода, среди 15 основных родов бактерий, которые были значительно изменены воздействием HFD, обработка BIC увеличила количество родов на 9 (показаны красным) и уменьшила количество родов на 3 (показаны синим цветом) по сравнению с мышами WD. Примечательно, что изменения 11/12 были в том же направлении, что и у мышей с NCD, и в благоприятной перспективе (рис. 2D). Кроме того, сообщалось, что шесть родов бактерий, включая *Alloprevotella*, *Bacteroides*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridium* и *Eubacterium*, защищают от AC^[4,23] и усиливаются при введении BIC (рис. S4, вспомогательная информация, показана красным). Соотношение бактерий на каждом уровне было одинаковым в группах NCD и NBIC. Корреляция между параметрами, связанными с AC, и бактериальными таксонами показала, что численность *Bacteroides* демонстрирует значительную отрицательную корреляцию с общим SE плазмы, численность *Dubosiella* отрицательно коррелирует с общим SE печени, *Prevotellaceae* и *Alloprevotella* демонстрируют значительную отрицательную корреляцию со всеми индексами. Аналогичные тенденции также наблюдались для *Lachnospiraceae* и *Alistipes* с липидами печени, площадью масляного красного O в аорте (%) и общим SE. В то время как обилие *Faecalibaculum* положительно коррелировало со всеми признаками, *Desulfovibrionaceae* и *Erysipelotrichaceae* положительно коррелировали с SE печени и масляным красным O артерий (рис. 2E). Анализ размера эффекта линейного дискриминантного анализа (LEfSe) показывает, что *Erysipelotrichia* были по-разному представлены в группе WD, *Bifidobacterium* были по-разному представлены в группе NCD, *Lactobacillus* были по-разному представлены в группе NBIC, а *Ileibacterium* и *Romboutsia* были по-разному представлены в группах LBIC и NBIC соответственно (рис. 2F).

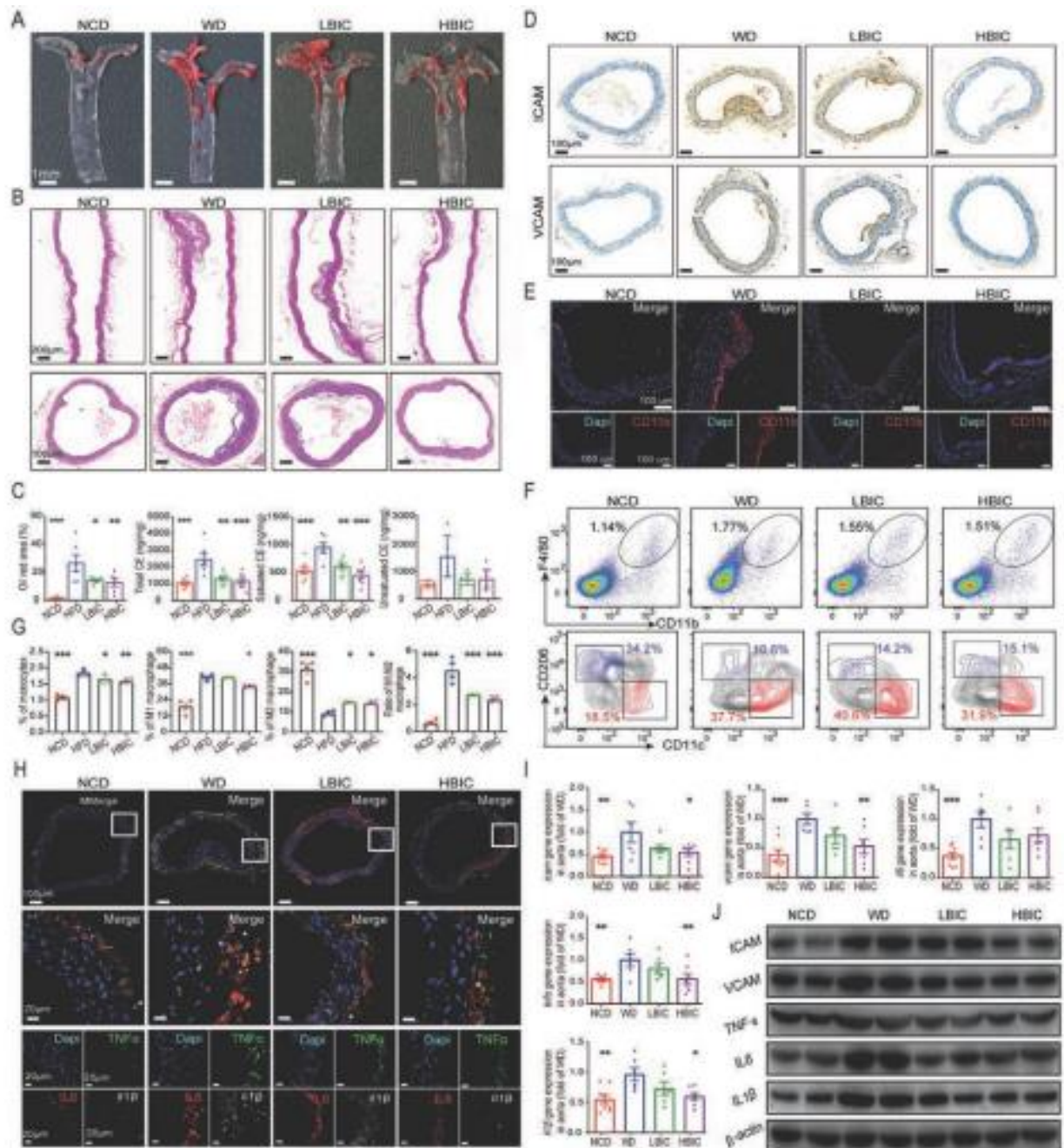


Рисунок 1. ВИС уменьшает образование артериальных бляшек у мышей *ApoE*^{-/-}, получавших HFD. Мышей *ApoE*^{-/-}, получавших HFD, лечили LBIC или HBIC через желудочный зонд в течение 5 месяцев. Нелеченых мышей, получавших HFD, использовали в качестве модельного контроля (WD), тогда как мышей *ApoE*^{-/-}, получавших стандартное питание, использовали в качестве отрицательного контроля (NCD). В конце эксперимента собирали аорты мышей *ApoE*^{-/-} из разных групп. А) Репрезентативное изображение поражения дуги аорты у мышей *ApoE*^{-/-} с использованием окрашивания красным масляным О. Б) Репрезентативное изображение продольного сечения (вверху) и поперечного сечения (внизу) аорты у мышей *ApoE*^{-/-} с использованием окрашивания гематоксилином и эозином (HE). С, слева) Поражения дуги аорты измеряли в процентах от диаметра просвета; С, справа) Сложный эфир холестерина (CE) в артерии. Уровень КЭ в каждом образце оценивали с использованием метода УВЭЖХ-МС/МС. D) Репрезентативное изображение иммуногистохимического окрашивания для ICAM и VCAM. E) Репрезентативное изображение иммунофлуоресцентного окрашивания cd11b в ткани аорты. F) Репрезентативные профили проточного цитометра инфильтрации (вверху) и поляризации (внизу) моноцитов в образцах изолированных клеток артериальной дуги. G) Процент моноцитов, макрофагов типа M1, макрофагов типа M2 и соотношение макрофагов M1/M2. H) Репрезентативные многоцветные иммунофлуоресцентные изображения, окрашенные окрашиванием IL-6 (красный), IL1/J (белый) или TNF- α (зеленый) в тканях аорты. Области интереса (ROI) выделены белым цветом, а их увеличенные изображения показаны ниже. I) Экспрессию *icam*, *vcam*, *IL6*, *IL1b* и *tnfa* мРНК в ткани аорты оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Результаты были нормализованы к GAPDH. J) Экспрессию белков ICAM, VCAM, IL6, IL1/J и TNF- α в ткани аорты оценивали вестерн-блоттингом, β -актин использовали в качестве контроля. Данные представлены как среднее \pm SEM (n = 5-7). Указаны значимые различия: *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с WD по однофакторному тесту ANOVA.

Результаты анализа путей и модулей Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG) показали, что гены, обогащенные у мышей, получавших HFD, кодировали каскад метаболических путей, включая гликан, аминокислотные кофакторы и витамины, вторичные метаболиты, липиды и метаболические болезни. Примечательно, что почти все гены, измененные HFD, были восстановлены при обработке ВИС (рис. 2G, выделено красным). Интересно, что обработка ВИС обогатила несколько родов, генерирующих короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA), такие как *Clostridium* и *Prevotellaceae* для ацетата^[24], *Blautia* для пропионата^[25], и *Bacteroides*, *Ruminococceae*, *Eubacterium*, *Lachnospiraceae_UCG-006* и *Alloprevotella* для масляной кислоты^[26]. Соответственно, лечение ВИС увеличивало уровни бутирата и пропионата в фекалиях мышей, получавших HFD. Группа NBIS имеет такие же уровни фекальных SCFAs, как и у мышей с NCD. Группа NBIS имеет такие же уровни фекальных SCFAs, как и у мышей с NCD (рис. 21). Кроме того, ВИС изменил уровни множества бактерий, связанных с продукцией липополисахарида (ЛПС) и ТМА/ТМАО^[27], включая типы *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, семейства *Lachnospiraceae* и родов *Prevotella*, *Bacteroides* и *Ruminococcaceae*. Подобно изменениям кишечной флоры, концентрация ТМА и ЛПС была выше у мышей WD в сравнении с мышами NCD, и подавлялась лечением ВИС (рис. S5, вспомогательная информация). Интересно, что появление артериальных бляшек согласуется с изменениями кишечной микробиоты. (Рисунок S6, вспомогательная информация). Таким образом, мы предположили, что эффективность ВИС может быть, по крайней мере, частично опосредована кишечной микробиотой.

2.3. Анализ метагеномных ассоциаций (MWAS)

Чтобы понять механизмы воздействия ВИС на кишечную флору, мы инкубировали образцы фекалий мышей WD с ВИС (5 мг г⁻¹ фекалий) в строгих анаэробных условиях (солевой раствор в качестве контроля, в течение 48 ч) и провели анализ MWAS. Полногеномное дробовое секвенирование шести образцов микробиоты (три из группы ВИС и три из контрольной группы с физиологическим раствором) проходят строгий контроль качества (рисунок S7 и таблица S2, вспомогательная информация) для достижения таксономических изменений, анализа функциональных генов и анализа путей.

2.3.1. Таксономические изменения, выявленные с помощью MWAS

Как показано на **рисунке 3A-a**, альфа-разнообразию по индексу Шеннона существенно не отличалось между ВИС и контрольными группами с физиологическим раствором на всех таксономических уровнях, но внутригрупповые расстояния были ниже, чем расстояния между группами (рисунок 3A-b), что позволяет предположить, что сообщества микробиомов при лечении ВИС не были похожи на контрольные группы. После изучения профиля относительного обилия кишечной флоры (рис. 3A-c, d; рис. S8 и S9, вспомогательная информация) мы обнаружили, что сравнение видов показало большие различия в факторах контроля ВИС (рис. 3A-d). Из идентифицированных 30 видов 3 принадлежали к роду *Lactobacillus* (включая *Lactobacillales_murinus*, *Lactobacillales_animalis*, *Lactobacillales_johnsonii*) и были обогащены образцами ВИС по сравнению с контролем. Предыдущие исследования предполагали, что введение *Lactobacillus murinus* может снизить уровень системного воспаления, «28» подавить развитие колита^[29], и предотвратить вызванную солью солечувствительную гипертензию^[30].

2.3.2. Функциональный анализ генов

Во-вторых, мы сравнили различия в генах между контрольными группами ВИС и физиологическим раствором и обнаружили, что гены микробиома при лечении ВИС не были похожи на контрольные группы (рисунок S10, вспомогательная информация). Углевод-активные ферменты (CAZymes), кодируемые кишечным микробиомом, имеют решающее значение для расщепления сложных полисахаридов, при этом SCFAs являются основными конечными продуктами^[31]. Здесь мы сравнили характеристики CAZymes между контрольными образцами ВИС и физиологическим раствором. В общей сложности был получен 331 CAZyme-аннотированный идентификатор гена с 37,16% гликозилгидролаз (GH), 48,34% гликозилтрансфераз (GTs), 1,81% полисахаридлиаз (PL), 4,23% углеводной эстеразы (CE) и 8,46% связывающих углеводы модулей (CBM) (рис. 3B-a). Примечательно, что большинство типов CAZymes, особенно GH и PL (два типа фермента, расщепляющего гликозидные связи с образованием SCFAs), обогащены ВИС-группой по сравнению с солевыми группами (рис. 3B-b)^[31]. В GH категории, GH2 (бета-галактозидаза), GH13 (сахарозофосфоорилаза) и GH43 (предшественник бета-глюканазы) являются высокоэкспрессированными, а GT5 (гликогенсинтаза), PL1 (гипотетический белок VcellWH2_04089) и CE12 (рамногалактуронан ацетилэстераза) обогащены категориями в категориях GT, PL и CE соответственно (рис. 3B-c; рис. S11, вспомогательная информация). Чтобы проанализировать корреляцию между кишечным микробиомом и генами CAZyme, соотношение на уровне типа в каждой категории CAZyme сравнивали между группами ВИС и физиологическим раствором. Как показано на рисунке 3B-d, в образцах ВИС и физиологического раствора было получено 9 типов микробиоты и уникальная картина распределения.

Аннотированные с использованием базы данных SwissProt десять лучших белков были получены после сравнения ВИС и контрольных образцов и четырех белков, таких как Q8XNI5 (системный белок A UvrABC), A7LXS8 (бета-глюкозидаза VoGH3A), P20054 (глутамин-зависимая карбамоилфосфатсинтаза), и P15043 (АТФ-зависимая ДНК-хеликаза RecQ) были высоко экспрессированы в образцах ВИС (рис. 3C). Предыдущее исследование показало, что системный белок A UvrABC участвует в распознавании и обработке повреждений ДНК, играя роль в кислотоустойчивости и устойчивости к окислению *Lactobacillus helveticus* CNBL1156^[32]; тогда как β -глюкозидаза представляет собой фермент гликозидгидролазы, который отщепляет остатки сахара от соединения, играющие ключевую роль в гидролизе целлюлозы.

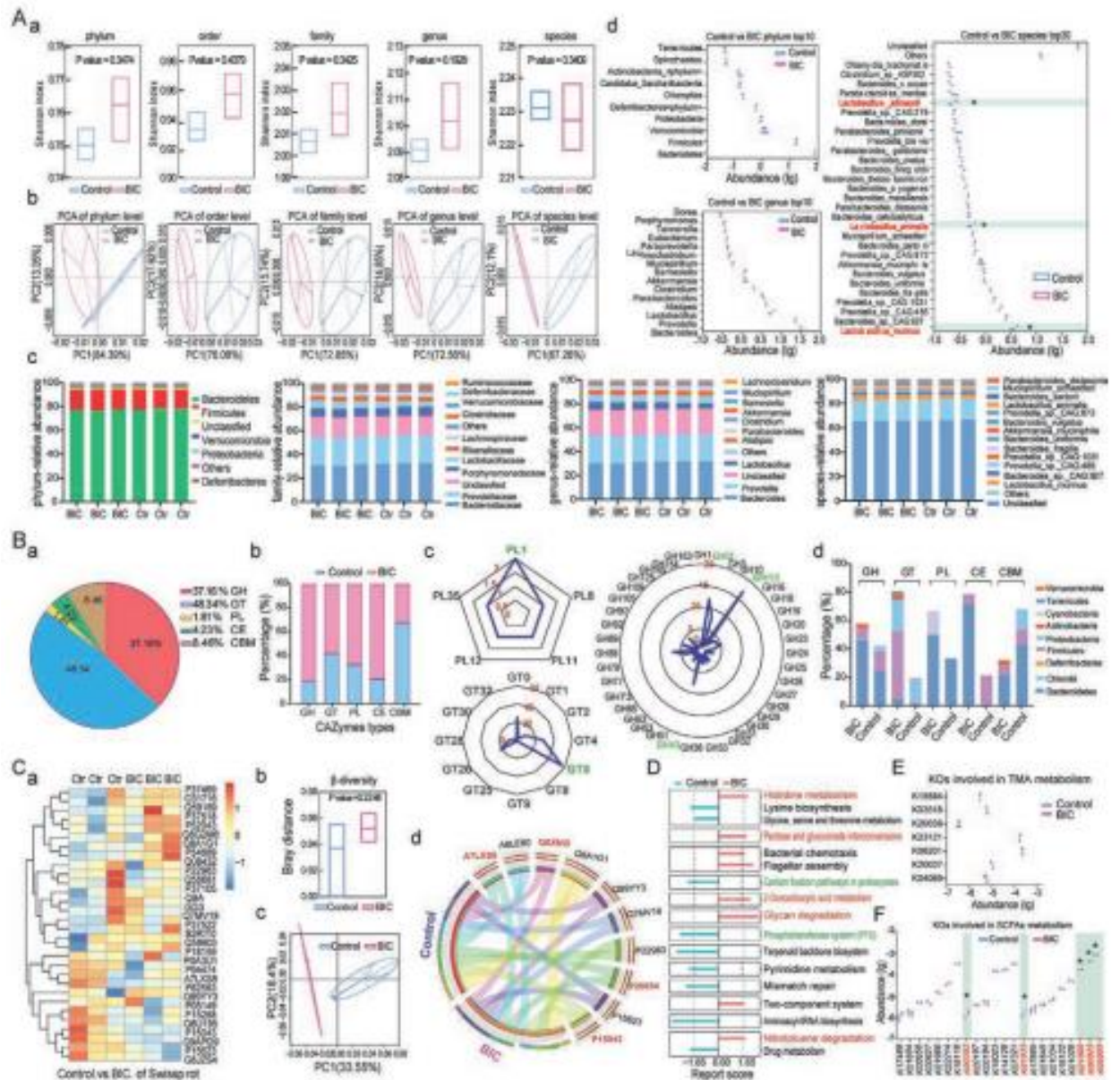


Рисунок 3. Анализ метагеномного ассоциативного исследования (MWAS). Образцы фекалий, собранные у мышей WD, инкубировали с BIC (5 mg g^{-1} фекалий) в строгих анаэробных условиях (солевой раствор в качестве контроля) в течение 48 часов и подвергали анализу MWAS. А) Таксономические изменения, выявленные с помощью MWAS. А-а) а-Разнообразие (индекс Шеннона) на уровне типов, отрядов, семейств, родов и видов; А-б) анализ главных компонент (PCA) на уровне типа, отряда, семейства, рода и вида; А-в) относительная численность на уровне типа, семейства, рода и вида; А-д) H-критерий Крускала-Уоллеса на уровне типов, родов и видов. Красным цветом показаны виды, имевшие существенные различия. В) Функциональный анализ углеводов-активных ферментов (CAZymes). В-а) Процент CAZymes, проанализированных во всех образцах контроля и BIC; В-б) сравнение CAZyme между контролем и группой BIC у каждого субъекта; В-в) количество CAZymes в каждом субъекте; В-д) распределение кишечного микробиома в CAZyme. С) Функциональный анализ аннотации Swissprot. С-а) Топ-30 белков в базе данных Swissprot; С-б) β -разнообразие (индекс сходства Брея-Кертиса) на уровне белков в базе данных Swissprot; С-в) анализ главных компонент (PCA) контроля и группы BIC в базе данных Swissprot; С-д) десять лучших белков из базы данных Swissprot между контрольной группой и группой BIC были показаны на цирковой карте. D) Относительное количество анализа пути энциклопедии генов и геномов (KEGG) между контрольной группой и группой BIC (показана репортерская оценка $> 1,65$ или $< -1,65$). Пути, связанные с худощавым субъектом, образованием SCFA и улучшенной толерантностью к глюкозе, содержанием гликогена в печени и липидами крови, были показаны красным цветом; в то время как те, которые связаны с пациентом с ожирением, нарушением толерантности к глюкозе, резистентностью к инсулину и стеатозом печени, были показаны зеленым цветом. E) Разница KO, участвующих в метаболизме TMA, между контрольной группой и группой BIC. F) Разница KO, участвующих в метаболизме SCFAs, между контрольной группой и группой BIC. Цифры нокаутов, выделенные красным, указывают на то, что нокауты в группе BIC значительно выше, чем в контрольной группе ($P < 0,05$). GT: гликозилтрансферазы; PL: полисахаридиазы; CE: углеводная эстераза; GH: гликозидгидролазы; CBM: углеводсвязывающие модули.

2.3.3. Анализ пути

В этом исследовании 135/4262 ортологов KEGG (КО) показали значительную разницу в содержании между ВИС и контрольными образцами с физиологическим раствором ($p < 0,01$). Как показано на рисунке 3D, пути KEGG, относящиеся к системе фосфотрансфераз (PTS), пути фиксации углерода и биосинтезу терпеноидного остова, были значительно обогащены в контрольных образцах с солевым раствором по сравнению с образцами ВИС. Предыдущее исследование показало, что путь PTS положительно коррелирует с видами из типа Firmicutes, и эти три пути были обогащены кишечным микробиомом пациентов с ожирением^[33]. Кроме того, сообщалось, что гены пути фиксации углерода коррелируют с нарушением толерантности к глюкозе, резистентностью к инсулину и стеатозом печени^[34]. Примечательно, что пути, связанные с метаболизмом аминокислот, включая метаболизм глицина, серина и треонина, были истощены в группах ВИС. Это открытие может объяснить феномен, согласно которому ВИС снижает выработку ТМА в кишечной флоре мышей HFD, вероятно, потому, что холин (материалы для синтеза ТМА) может быть получен путем декарбоксилирования и метилирования серина, тогда как серин может быть получен путем метаболизма глицина и треонина. И наоборот, гены, участвующие в метаболизме гистидина, взаимопревращениях пентозы и глюкуроната, метаболизме 2-оксокарбоновой кислоты, деградации гликанов и пути деградации нитротолуола, были увеличены в микробиоме ВИС по сравнению с контрольными солевыми растворами. Эти изменения были аналогичны кишечным микробиомам у контролей, имеющих худощавую конституцию^[35]. Более того, в метагеномах хадза-охотников было зарегистрировано обогащение метаболизма гистидина, важного пути для производства сигналов и рециркуляции углерода, по сравнению с таковыми у городских итальянцев^[36]. Путь взаимопревращения пентозы и глюкуроната коррелирует с деградацией пектина и производством SCFA, улучшенной толерантностью к глюкозе, содержанием гликогена в печени и уровнем липидов в крови^[37]. Интересно, что после сравнения КО, участвующих в пути метаболизма SCFAs, пять КО (включая K00382: комплекс дегидрогеназа/ацетил-КоА-синтаза, K01035: бутирил-КоА-трансфераза, K06889: белок надсемейства альфа/бета-гидролаз и K00925: ацетаткиназа, K01066: *fbp-SEB*) были обнаружены значительно выше в образцах, обработанных ВИС, по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор (рис. 3D).

Вместе эти результаты продемонстрировали, что микробиота кишечника, которая вмешивалась в ВИС, может иметь высокую способность к выработке SCFA, низкий уровень ТМА и дружелюбную среду кишечника.

2.4. ВИС улучшал здоровье кишечника у мышей *Aroe(-/-)*, получавших корм с высоким содержанием жиров (HFD)

2.4.1. ВИС восстанавливает иммунитет кишечника

Дисбактериоз кишечника вызывал иммунную дисрегуляцию и увеличивал риск развития заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания^[38]. Как показано на рисунке 4А, В, дисбиоз, вызванный HFD, приводил к увеличению инфильтрации нейтрофилов и моноцитов; воздействие ВИС подавляло эти явления. Кроме того, введение ВИС восстанавливало Т-лимфоциты за счет уменьшения доли провоспалительных клеток Th1 при одновременном повышении доли противовоспалительных клеток Th2 и Treg (рис. 4С, D; рис. S12, вспомогательная информация). Производство воспалительных цитокинов в кишечнике подавлялось вмешательством ВИС (рис. S13, вспомогательная информация).

2.4.2. ВИС восстанавливает целостность кишечника

Затем мы исследовали влияние ВИС на эпителиальные клетки кишечника мышей в каждой группе и обнаружили, что у мышей Aro(-/-), получавших HFD, было меньше бокаловидных клеток, чем у мышей в группе NCD, в то время как лечение ВИС значительно увеличивало количество бокаловидных клеток (рис. 4E). Кроме того, у мышей Aro(-/-), получавших HFD, было значительно меньше эпителиальных белков плотного соединения, таких как окклюдин и ZO-1, чем у мышей в группе NCD (рис. 4F, G). Лечение ВИС предотвращает это истощение и поддерживает нормальный уровень. Эти данные показали, что ВИС улучшает целостность кишечника, способствуя терапевтическому эффекту. Мы также использовали трансмиссионную электронную микроскопию для изучения микроворсинок и клеточных соединений в стенке кишечника экспериментальных животных и обнаружили, что микроворсинки у мышей NC были плотными и ровными, а у мышей, получавших HFD, были короткими и редкими (рис. 4H, I). У мышей, получавших HFD, наблюдалась интенсивная утечка электронно-плотного пятна; однако целостность кишечника была сохранена при лечении ВИС.

2.4.3. Исследование механизма с помощью системы тройной культуры in vitro

Эффективность микробиоты кишечника с вмешательством ВИС в отношении здоровья кишечника была дополнительно определена в системе тройной культуры клеток Caco2, клеток THP и микробиоты, обработанной ВИС. Как показано на **рисунке 5A**, транслучные фильтры с дифференцированными клетками THP-1 переносили в 12-луночные планшеты, содержащие клетки Caco-2, и инкубировали с кишечной бактериальной суспензией от NCD (Co-NCD), WD (Co-WD) или Мыши NBIC (Co-BIC) в течение 24 часов. Как показано на рисунке 5B, миграция клеток THP увеличивалась бактериями от мышей WD, в то время как это явление подавлялось бактериальной суспензией группы ВИС. Анализ методом проточной цитометрии также показал, что количество инфильтрированных моноцитов (F4/80+/CD11b+) было выше, но доля фенотипа M2 и соотношение M1/M2 были ниже в группе Co-WD по сравнению с группой Co-NCD. (Рисунок 5C,D; рисунок S14, вспомогательная информация). Образцы бактерий от мышей ВИС обратили этот эффект вспять. Кроме того, образцы WD индуцировали значительное увеличение экспрессии il-6, il1b и tnf-a и снижение экспрессии zo-1 и окклюдина в клетках Caco-2 (рис. 5E, F, H). Это воспалительное состояние было подавлено, а целостность восстановлена после обработки образцами ВИС.

2.5. ВИС улучшает динамику иммунных клеток и функцию печени

С течением времени хронический дисбиоз может увеличить распространенность различных заболеваний, нарушая кишечную экосистему и перемещая бактерии и продукты их метаболизма через слизистый барьер. Поэтому мы изучали влияние на внутреннее состояние мышей Aro(-/-) после изменений в кишечнике.

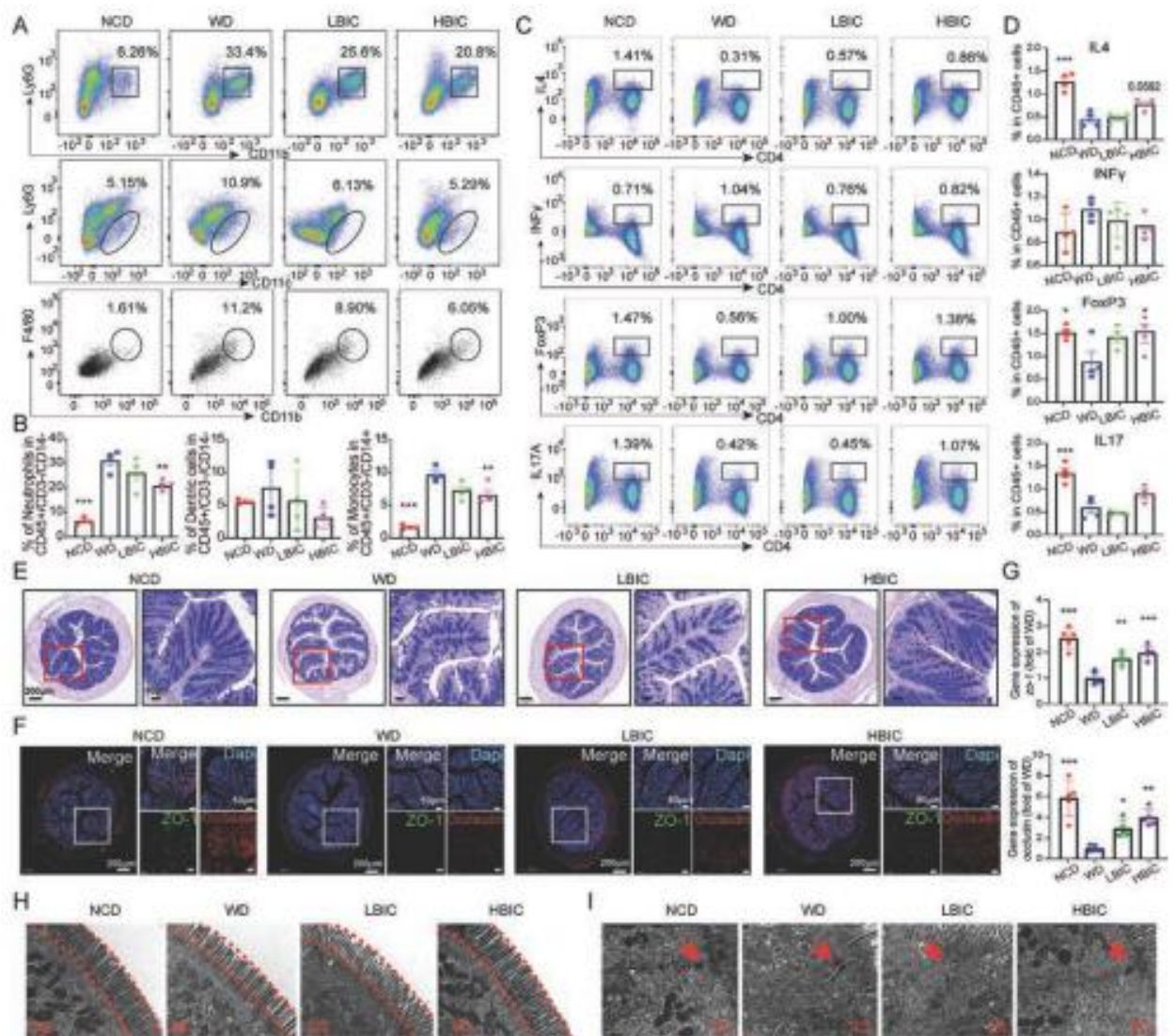


Рисунок 4. ВИС улучшает здоровье кишечника мышей *ApoE(-/-)*, получавших HFD. **A)** Репрезентативные проточные цитометрические профили нейтрофилов, ДК и моноцитов в кишечнике. Выделение иммунных клеток из собственной пластинки кишечника (LP) (описано в разделе «Материалы и методы») окрашивали маркерами иммунных клеток. Нейтрофилы были отобраны как клетки CD11b⁺/Ly6G⁺ из популяций CD45⁺/CD3⁻/CD14⁻ (верхняя линия); Клетки DC были отобраны как клетки CD11c⁺/Ly6G⁻ из популяций CD45⁺/CD3⁻/CD14⁻ (верхняя линия); моноциты были отобраны как клетки F4/80⁺/Cd11b⁺ из популяций CD45⁺/Ly6G⁻ (нижняя строка). **В)** Процент нейтрофилов, ДК и моноцитов. **С)** Репрезентативные проточные цитометрические профили клеток Th1, Th2, Treg и Th17 в ткани кишечника. Клетки Th2 были включены как клетки CD4⁺/IL4⁺ в лимфоциты CD45⁺ (первая линия); Клетки Th1 были включены как CD4⁺/INF⁺ клетки в CD45⁺ лимфоциты (вторая линия); Клетки Treg были включены как клетки CD4⁺/FoxP3⁺ в лимфоциты CD45⁺ (третья линия); Клетки Th17 были включены как CD4⁺/IL17⁺ клетки в CD45⁺ лимфоциты (четвертая линия). **Д)** Процент клеток Thelp1, Thelp2, Treg и Thelp17. **Е)** Репрезентативные изображения бокаловидных клеток с использованием окрашивания АВ-PAS. Области интереса (ROI) обведены красным, а их увеличенные фотографии показаны справа. **Ф)** Репрезентативные изображения мультимимнофлуоресцентного окрашивания для ZO-1 (зеленый) и OCLN (красный). Области интереса (ROI) выделены белым цветом, а их увеличенные фотографии показаны справа. **Г)** Экспрессия генов *zo-1* и окклюдина в образцах. Тотальную РНК экстрагировали из тканей кишечника и анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени на *zo-1* и окклюдин, результаты нормализовали по GAPDH. **Н)** ВИС улучшает плотность и длину микроворсинок (красная пунктирная линия). **И)** ВИС улучшает кишечную непроходимость (белая стрелка). Образцы фиксировали и обрабатывали двойным окрашиванием свинцом и ураном, после чего исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Данные представлены как среднее ± SEM (n = 5). Указаны значимые различия: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с WD по однофакторному тесту ANOVA.

2.5.1. ВИС изменяет биометаболиты в кровотоке

Мы впервые обнаружили состояние эндотоксина в кровотоке. Как показано на **рисунке 6А**, уровни ТМА, ТМАО и LPS были повышены у мышей WD, в то время как ВИС способствовал снижению таких изменений.

2.5.2. ВИС улучшает динамику системных иммунных клеток

Недавнее исследование показало, что микробиота кишечника оказывает значительное влияние на системный иммунный ответ^[39]. Текущие результаты подтвердили, что процент нейтрофилов и моноцитов в циркуляции был увеличен у мышей WD после повышения уровней ТМА и LPS, тогда как введение ВИС подавляло эти изменения (рис. 6В, С). Стратегия стробирования показана на рисунках S15 и S16 (вспомогательная информация).

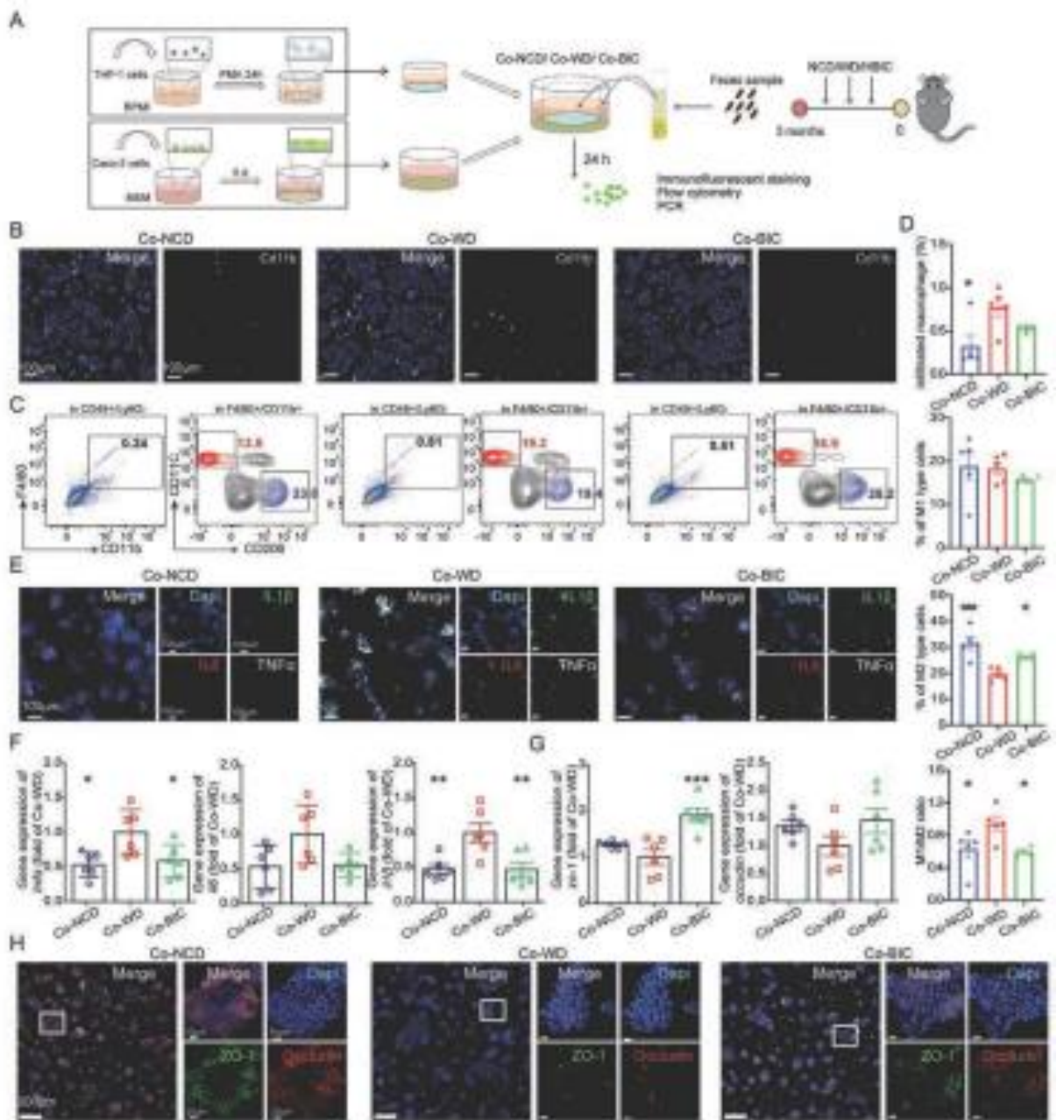


Рисунок 5. Влияние кишечной флоры с вмешательством BIC на эпителиальные клетки кишечника (Caco2). Схема эксперимента показана на (A). Фекалии, собранные от мышей в каждой группе, добавляли в систему совместного культивирования THP-Caco2 на 24 часа. Оценивали инфильтрацию и поляризацию моноцитов, провоспалительные цитокины и плотное соединение. В) Репрезентативное изображение иммунофлуоресцентного окрашивания моноцитов (cd11b, белый). С) Репрезентативные проточные цитометрические профили инфильтрации и поляризации моноцитов. Репрезентативное изображение моноцитов (слева) и макрофагов типа M1/M2 (справа) в образцах изолированных клеток на проточном цитометре. D) Процент моноцитов, макрофагов типа M1, макрофагов типа M2 и соотношение макрофагов M1/M2. E) Репрезентативные многоцветные иммунофлуоресцентные изображения, окрашенные окрашиванием IL-6 (красный), IL-1/J (зеленый) или TNF-а (белый) в образцах клеток. F) Экспрессию мРНК iL6, iL1b и tnfa в клетках Caco2 оценивали с помощью RT-PCR. Результаты были нормализованы к GAPDH. G) Экспрессию мРНК zo-1 и окклюдина в клетках Caco2 оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Результаты были нормализованы к GAPDH. H) Репрезентативные многоцветные иммунофлуоресцентные изображения, окрашенные ZO-1 (зеленый) и OCLN (красный) в образцах клеток. Области интереса (ROI) выделены белым цветом, а их увеличенные фотографии показаны справа. Данные представлены как среднее ± SEM (n = 4). Указаны значимые различия: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с WD по однофакторному тесту ANOVA. Отметка шкалы: 100 мкм для (B) и E; 200 мкм для (H) (слева); 20 мкм для (H) (справа).

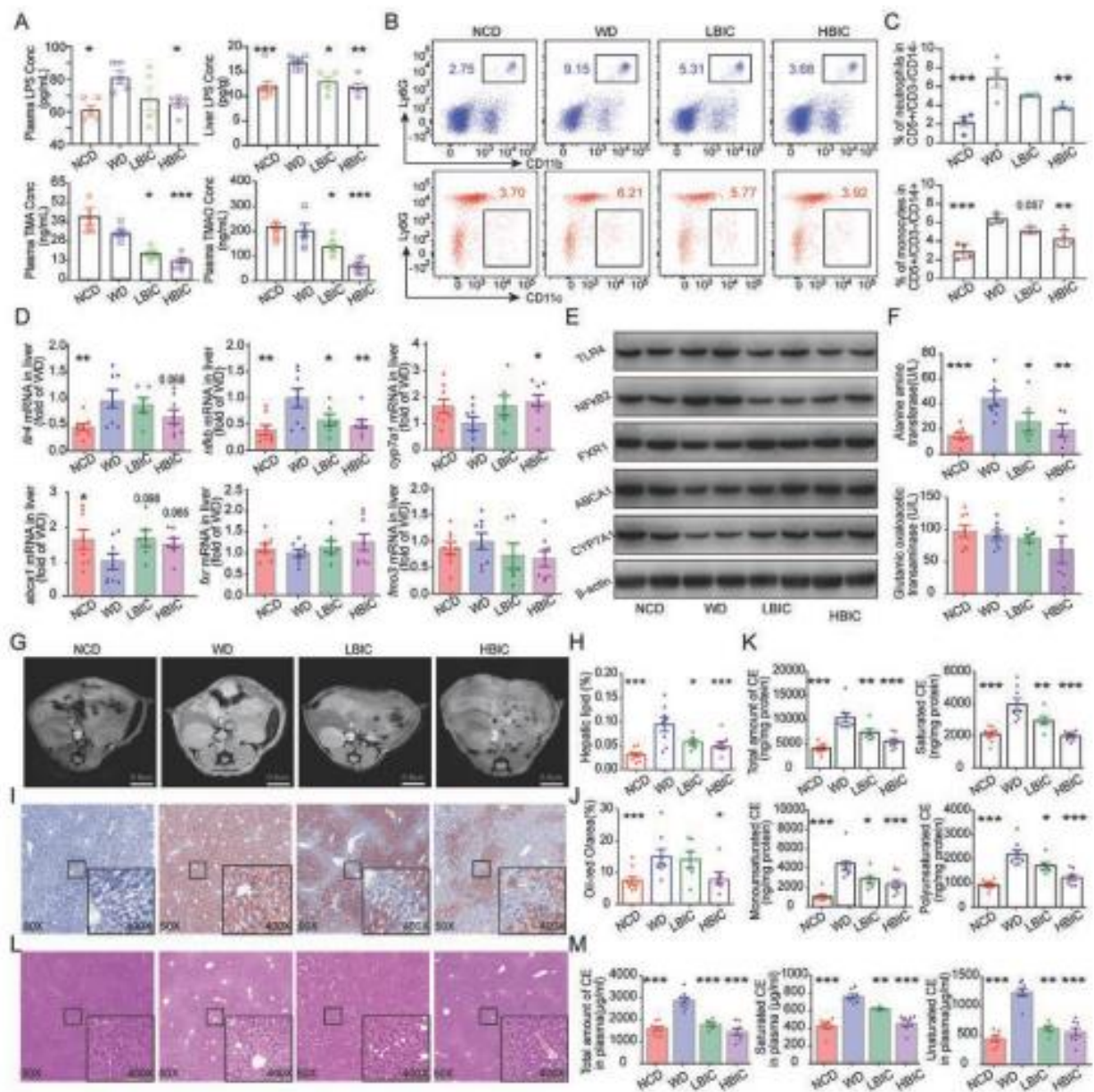


Рисунок 6. ВИС улучшает иммунологический и метаболический статус у мышей ApoE(-/-). Мышам ApoE(-/-), получавшим HFD, давали LBIC или HBIC через желудочный зонд. В качестве контроля использовали необработанных мышей, которых кормили HFD (WD) и стандартным кормом (NCD). А-а) массу тела в каждой группе регистрировали каждую неделю в течение следующих 20 недель; А-б) потребление пищи регистрировали каждую неделю в течение следующих 20 недель. А, (вверху) содержание LPS в печени и плазме; А, (внизу) концентрация ТМА и ТМАО, определенная с помощью ЖХ/МС в образцах плазмы. В, (вверху) Репрезентативная проточная цитометрия для нейтрофилов в плазме; В, (внизу): репрезентативная проточная цитометрия для моноцитов в плазме. С) Процент нейтрофилов и моноцитов. D) Экспрессию мРНК NF-κB, Toll-подобного рецептора 4 (TLR4), ABCA1, CYP7a1, FMO и FXR1 в ткани печени оценивали с помощью RT-PCR. Результаты были нормализованы к GAPDH. E) Экспрессию белков NF-κB, TLR4, ABCA1, CYP7a1 и FXR1 в ткани печени оценивали вестерн-блоттингом, β-актин использовали в качестве контроля. E) уровни АЛТ и АСТ определяли ферментативными методами. G) Репрезентативные изображения МРТ, протестированные с использованием МРТ мелких животных Pharma Scan 70/16 US (Bruker, Германия). H) Процентное содержание липидов в печени рассчитывали по соотношению протонов воды в ТГ. I) Репрезентативные изображения срезов печени, окрашенных маслом. J) Квалификация окрашивания Oil Red O. K) Содержание эфира холестерина в ткани печени оценивали с использованием метода УВЭЖХ-МС/МС. L) Репрезентативные изображения срезов печени, окрашенных HE. M) Уровни эфира холестерина в плазме оценивали с использованием метода УВЭЖХ-МС/МС. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (n > 5). Указаны значимые различия: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с WD по однофакторному дисперсионному анализу.

2.5.3. ВИС улучшает функцию печени

Печень, тесно контактирующая с кишечным трактом, подвергается воздействию значительного количества бактериальных компонентов и их метаболитов. Несколько исследований связывают дисбаланс кишечной микробиоты с рядом сердечно-сосудистых метаболических заболеваний через ось печень-кишка. Как показано на рис. 6D, E, экспрессия *tlr4* и *nfkb* подавлялась вмешательством ВИС, тогда как экспрессия *сур7a1* и *abca1* восстанавливалась введением ВИС. Не было обнаружено никаких изменений в экспрессии **fxr**, но было обнаружено изменение *fmo3* (имеющее решающее значение для образования ТМАО), которое было снижено после введения ВИС. Дальнейшие исследования показали, что воздействие ВИС улучшало уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) у мышей *Apoe(-/-)*, получавших HFD (рис. 6F). Магнитно-резонансная томография (МРТ) печени показала значительно большее количество липидов в печени у мышей с HFD, чем у мышей с NCD, и лечение ВИС резко изменяло такое увеличение в зависимости от дозы (рис. 6G, H; рис. S17A, вспомогательная информация); Окрашивание красным маслянистым О дало аналогичные результаты (рис. 6I, J). Примечательно, что уровни СЕ в печени (включая общий СЕ, насыщенный СЕ, полиненасыщенный СЕ и мононенасыщенный СЕ) были значительно ниже в группе, получавшей HFD, чем в группе NCD, и были значительно снижены после введения ВИС в зависимости от дозы (рис. 6K; рисунок S17B, вспомогательная информация). Окрашивание HE показало, что нарушения функции печени, такие как стеатоз и вздутие живота, были уменьшены у мышей, получавших ВИС (рис. 6L).

2.5.4. ВИС модулирует метаболизм холестерина и статус воспаления

Развитие АС представляет собой сложный процесс, основными факторами которого являются дислипидемия и хроническое воспаление. Лечение ВИС не вызывало серьезных изменений массы тела, потребления пищи и уровня глюкозы в плазме у мышей *Apoe(-/-)*, получавших HFD, но снижало уровни СЕ в плазме (рис. 6M; рис. S18, вспомогательная информация). Затем мы исследовали 23 цитокина плазмы у экспериментальных мышей и обнаружили, что лечение ВИС снижает экспрессию провоспалительных факторов, таких как IL1a, IL1b, IL2, IL6, IL9, IL12 (p40), IL12 (p70), G-CSF, KC, TNF- α , IL17 и MIP-1b, но увеличили экспрессию противовоспалительных факторов, включая IL3, IL4, IL10, IL13 и IL14 (рисунок S19, вспомогательная информация).

2.6. Терапевтический эффект ВИС на АС передавался через ТФМ

Чтобы определить, зависят ли анти-АС эффекты ВИС от микробиоты кишечника, ТФМ использовали у мышей-реципиентов *Apoe(-/-)* через желудочный зонд с образцами фекалий, извлеченными у мышей, получавших стандартный рацион (F-NCD), HFD (F-WD) и мышей-доноров, получавших ВИС (F-BIC). Как показано на **рисунке 7A**-а и рисунке S20 (вспомогательная информация), мыши-реципиенты в группе F-WD показали более низкую численность и разнообразие кишечных бактерий по сравнению с мышами в группе F-NCD; однако этот эффект был частично обратным у мышей F-BIC. PCA и PCoA показали, что общая структура кишечного микробиома мышей F-WD смещена по сравнению с мышами F-NCD. Однако сдвиг вдоль PC1 у мышей F-BIC обратный (рис. 7A-b; рис. S21A, вспомогательная информация); частичный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (PLS-DA) показывает аналогичную тенденцию (рисунок S21B, вспомогательная информация). Таксономический состав микробиома кишечника реципиента предполагал, что желудочный зонд с фекалиями мышей WD снижал относительное количество *Bacteroidetes*, увеличивал относительное количество *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria*, в то время как фекалии доноров ВИС восстанавливали эти изменения (рис.

7A-c). Изменения состава микробиоты кишечника у мышей-реципиентов соответствовали таковым у мышей-доноров (рис. 7A-d; рис. S22, вспомогательная информация).

Впоследствии оценивали содержание метаболитов кишечной микробиоты, включая LPS, SCFAs и TMA, после FMT. Как видно на рисунке 7C, уровни LPS в плазме и печени были выше у мышей F-WD, чем у мышей F-NCD, и подавлялись вмешательством с фекалиями мышей, получавших BIC. Уровни девяти основных SCFAs измеряли в фекалиях мышей-реципиентов. Результат показывает, что количество пропионата и бутирата было значительно ниже у мышей F-WD, чем у мышей F-NCD, в то время как обработка фекалиями мышей BIC увеличивала уровни как бутирата, так и пропионата. Кроме того, уровни TMAO и бетаина в плазме были ниже у мышей F-BIC, чем у мышей F-WD (рисунок S23, вспомогательная информация). Кроме того, целостность кишечника у мышей F-BIC была лучше, чем у мышей F-WD. Как показано на рисунке 7B, у мышей Apoe(-/-) в группе F-WD было меньше бокаловидных клеток и белков плотного соединения эпителия, чем в группе F-NCD. FMT с фекалиями мышей, получавших BIC, предотвращает это истощение и поддерживает нормальный уровень (рис. 7B-a, b). Экспрессия цитокинов, включая TNF- α , IL-1/ и IL-6, была значительно выше в ткани кишечника мышей F-WD, чем мышей F-NCD, но обращалась вспять при лечении BIC (рис. 7B-c). Эффект вмешательства также был подтвержден анализом RT-PCR (рис. 7B-d).

Кроме того, процент нейтрофилов и моноцитов в циркуляции был повышен у мышей F-WD, но желудочный зонд с фекалиями мышей BIC подавлял это увеличение (рис. 7D; рис. S24, вспомогательная информация). Стратегия стробирования показана на рисунке S25 (вспомогательная информация). Затем ключевые молекулы, включая TLR4, NF- κ B, FMO, FXR, ABCA1 и Cyp7a1, оценивали у мышей-реципиентов. Как показано на рисунке S26 (вспомогательная информация), экспрессия NF- κ B была снижена, в то время как экспрессия ABCA1 повышалась у мышей, получавших фекалии от доноров, получавших BIC. TФМ с фекалиями мышей BIC также уменьшала повреждения печени (рисунок S27, дополнительная информация), снижала уровень холестерина в плазме (рисунок S28, подтверждающая информация) и облегчала хроническое воспаление (рисунок S29, подтверждающая информация), вызванное фекалиями мышей WD.

Впоследствии у мышей F-BIC наблюдалось снижение активации эпителия и экспрессии воспалительного фактора по сравнению с мышами F-WD (рис. 7E, F, K). Следовательно, у мышей F-BIC было обнаружено меньшее накопление эфиров холестерина и поражения аорты по сравнению с мышами F-WD (рис. 7G, H) в дополнение к модуляции микробиоты кишечника. Эти результаты показали, что преимущества BIC могут быть, по крайней мере, частично связаны с его влиянием на микробиоту кишечника.

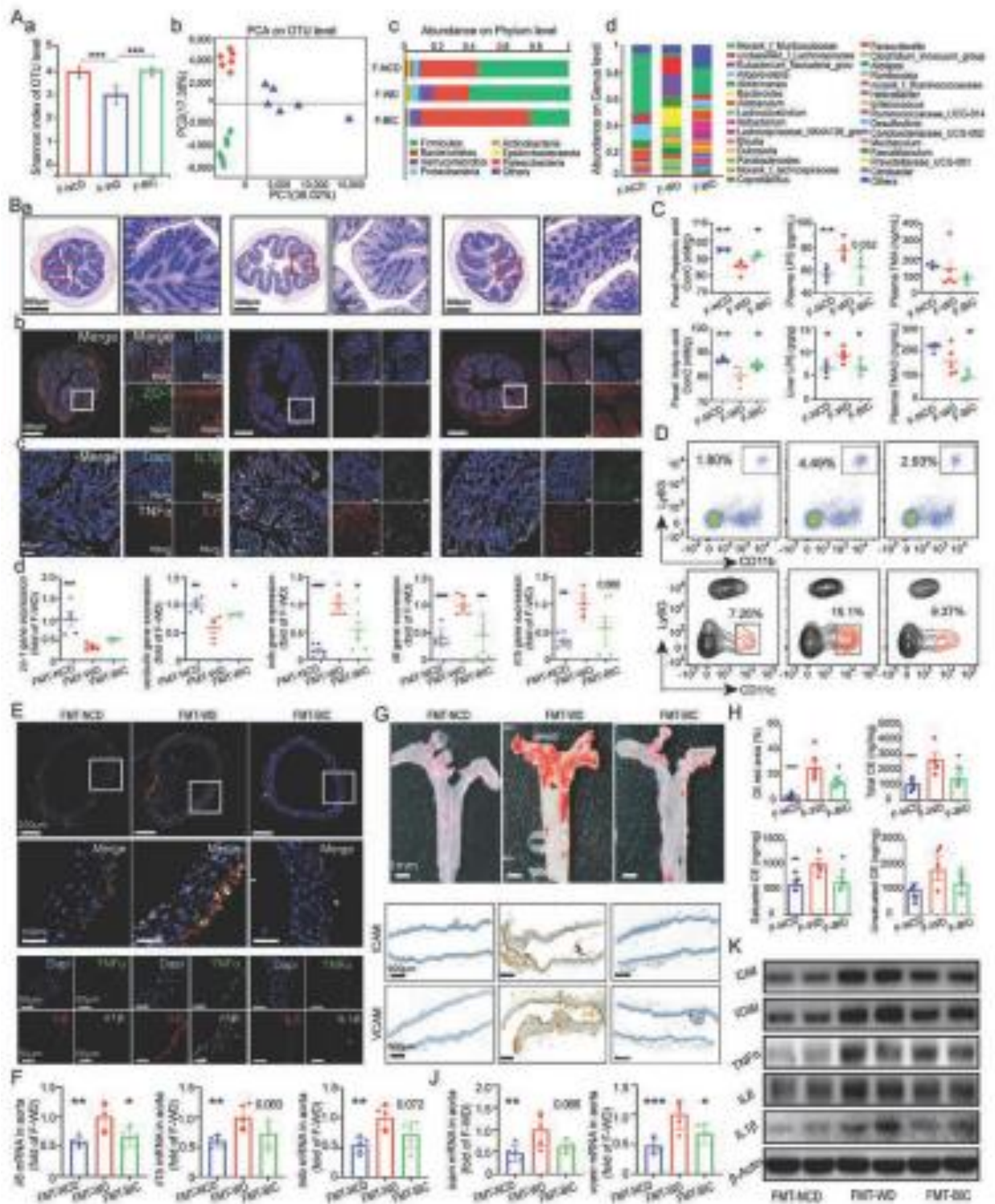


Рисунок 7. Рисунок 7. Терапевтический эффект BIC на AS передавался FMT. Свежие образцы фекалий, извлеченные из групп NCD, WD и NBIC, вводили внутривентрикулярно мышам *Aroee(-/-)* в течение следующих 3 месяцев. В конце эксперимента собирали и анализировали свежие фекалии мыш-реципиентов. А) Структура микробиоты кишечника мыш-реципиентов *Aroee(-/-)*. А-а) Разнообразие и богатство кишечных бактерий и индекс Шеннона уровня OTU; А-б) Реакция структур кишечной микробиоты на разные группы животных, график PCA; А-в) анализ секвенирования гена 16S рРНК на уровне типа; А-д) Анализ секвенирования гена 16S рРНК на уровне рода. В) ТФМ с BIC восстановил здоровье кишечника. В-а) Репрезентативные изображения бокаловидных клеток с использованием окрашивания AB-PAS. Области интереса (ROI) обведены красным, а их увеличенные фотографии показаны справа; В-б) Репрезентативные изображения мультииммунофлуоресцентного окрашивания для ZO-1 (зеленый) и OCLN (красный). Области интереса (ROI) выделены белым цветом, а их увеличенные фотографии показаны справа; В-в) Репрезентативные изображения мультииммунофлуоресцентного окрашивания для TNF α (белый), IL1 β (зеленый) и IL6 (красный); В-д) экспрессия генов *zo-1*, *occludin*, *il6*, *il1* или *tnfa* в образцах. Тотальную РНК экстрагировали из тканей кишечника и анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени; результаты были нормализованы к *GAPDH*. С) Биометаболиты, продуцируемые кишечными бактериями, у мыш-реципиентов *Aroee(-/-)*. С, (слева): уровни пропионовой и масляной

кислот в фекалиях; С, посередине): содержание ЛПС в печени и плазме; С, справа) концентрация ТМА и ТМАО, определенная с помощью ЖХ/МС в образцах плазмы. D, вверху): репрезентативная проточная цитометрия нейтрофилов в плазме; D, внизу): репрезентативная проточная цитометрия для моноцитов в плазме. D) Процент нейтрофилов и моноцитов. E) Репрезентативные многоцветные иммунофлуоресцентные изображения, окрашенные окрашиванием IL-6 (красный), IL-1/ (белый) или TNF- α (зеленый) в тканях аорты. Области интереса (ROI) выделены белым цветом, а их увеличенные фотографии показаны ниже. F) Экспрессию мРНК il6, il1b и tnfa в ткани аорты оценивали с помощью RT-PCR. Результаты были нормализованы к GAPDH. G) Репрезентативное изображение поражения дуги аорты у мышей-реципиентов Aro α (-/-). H) Поражение аорты и эфир холестерина (CE) в артерии. Атеросклеротические поражения дуги аорты измеряли в процентах от диаметра просвета. Сложный эфир холестерина (XЭ) в артерии оценивали с использованием метода УВЭЖХ-МС/МС. I) Репрезентативное изображение ICAM и VCAM с помощью иммуногистохимического анализа. J) Экспрессию icam и vcam мРНК в ткани аорты оценивали с помощью RT-PCR. Результаты были нормализованы к GAPDH. K) Экспрессию белков ICAM, VCAM, IL-6, IL-1/J и TNF- α в стенке аорты оценивали вестерн-блоттингом, β -актин использовали в качестве контроля. Данные представлены как среднее \pm SEM (n = 5). Указаны значимые различия: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 по сравнению с WD по тесту One-way ANOVA. Отметка шкалы 100 мкм (B), (D) и (E).

3. Обсуждение

Это первое исследование, в котором выясняются анти-АС эффекты ВИС с точки зрения микробиоты кишечника, показывающие, что ВИС эффективно модулирует состав, функцию и выработку эндогенных метаболитов кишечной микробиоты у мышей Aro α (-/-), получавших HFD. Здоровье кишечника было восстановлено, что улучшило динамику системных иммунных клеток и функции печени и привело к изменению хронического воспаления и обращению вспять транспорта холестерина (RCT). Следовательно, эндотелиальная активация, инфильтрация макрофагов и накопление CE в дуге аорты были ослаблены, вызывая меньшее появление бляшек при введении ВИС (механизм показан на рисунке 8).

Микробиом кишечника представляет собой уникальную и сложную экосистему, в которой обитают триллионы бактерий, которые имеют тенденцию связываться с хозяином мутуалистическим/комменсальным или оппортунистическим/паразитарным образом. Изменения в кишечной микробиоте стали одной из наиболее надежных детерминант многих хронических состояний, включая АС, и пролили новый свет на разработку новых терапевтических вмешательств^[4]. Многочисленные исследования показали, что разнообразие и богатство кишечника микробиома связаны с хорошим здоровьем, в то время как низкое разнообразие связано с болезнями^[40]. Как правило, люди с низким бактериально-генетическим разнообразием демонстрируют более высокие уровни резистентности к инсулину, триглицеридов в сыворотке, холестерина и маркеров воспаления, а также повышенный вес/ИМТ по сравнению с для людей с высоким разнообразием^[41]. В настоящем исследовании мыши Aro α (-/-), получавшие HFD, демонстрировали заметно низкую численность и разнообразие кишечных бактерий; однако этот эффект был значительно обращен вспять с помощью ВИС. Мы также обнаружили, что ВИС восстанавливает относительную численность Bacteroidetes и соотношение Bacteroidetes/Firmicutes, нарушенное HFD. Дальнейший анализ показал, что ВИС модулировал состав кишечной микробиоты на всех уровнях у мышей Aro α (-/-), получавших HFD, по сравнению с уровнями, наблюдаемыми у мышей NCD. Кроме того, было сообщено о семи наиболее значительно увеличенных родах бактерий, защищающих от АС, тогда как некоторые роды, которые положительно коррелировали с уровнями ТМАО, были снижены в группах, получавших ВИС. Примечательно, что несколько родов, генерирующих SCFA, были увеличены за счет ВИС, в то время как уровни бактерий, связанных с продукцией ТМА/ТМАО, были снижены.

Чтобы дополнительно интерпретировать влияние и механизм ВИС на флору кишечника, мы инкубировали фекалии мышей WD с ВИС и провели анализ MWAS с использованием

полногеномного секвенирования дробовика с большой глубиной (в среднем 13 Gbp/образец). Наш MWAS состоял из четырех основных биоинформационных аналитических конвейеров: филогенетический анализ (таксономические изменения), анализ генов CAZyme, анализ белков и анализ путей). Тесты филогенетических контрольных ассоциаций ВИС показали высокую численность видов, включая *Lactobacillales_murinus*, *Lactobacillales_animalis* и *Lactobacillales_johnsonii*. Предыдущие исследования предполагали, что введение *Lactobacillus murinus* может снизить уровень системного воспаления,^[28] подавить развитие колита,^[29] и предотвратить вызванную солью солечувствительную гипертензию^[30]. Поскольку было трудно обнаружить виды -уровня с использованием анализа последовательности 16S рРНК, эти результаты доказали преимущества метагеномного секвенирования дробовика в определении механизма ВИС на микробиоте кишечника. В микробиоме кишечника гены, кодирующие CAZymes, представляют особый интерес, поскольку они имеют решающее значение для переваривания сложного полисахарида посредством анаэробной ферментации и производства SCFAs. В этом исследовании все типы CAZymes, особенно GH и PL (два типа фермента, расщепляющего гликозидные связи), были выше в кишечной флоре, обработанной ВИС, по сравнению с контрольной группой. Соответственно, различные биологические пути, в том числе связанные с эндогенными метаболитами (например, метаболизм глицина, серина, треонина для образования ТМА и взаимопревращения пентозы и глюкуроната для образования SCFA), были обогащены в сравнении ВИС-контроль.

Эндогенные метаболиты являются ключевыми факторами, связывающими кишечную флору с различными заболеваниями. В соответствии с изменениями в микробиоме кишечника наши результаты показывают, что концентрация ТМА и ЛПС снижалась, в то время как уровни бутирата и пропионата увеличивались при воздействии ВИС. SCFAs полезны для энергетического метаболизма, развития энтероцитов и кишечного иммунитета^[42]. В этом исследовании иммунитет и целостность кишечника, нарушенные HFD, были восстановлены введением ВИС. Интересно, что инкубация системы совместного культивирования TNP-Caco2 с бактериями, обработанными ВИС, снижала инфильтрацию и поляризацию моноцитов по типу M1, в то время как образование плотных соединений увеличивалось, но уровень провоспалительных цитокинов снижался. После этого было обнаружено, что процент моноцитов и нейтрофилов в циркуляции значительно снизился при вмешательстве ВИС. Это явление согласуется с результатами недавнего исследования, в котором микробиота кишечника может влиять на системный иммунный ответ^[39].

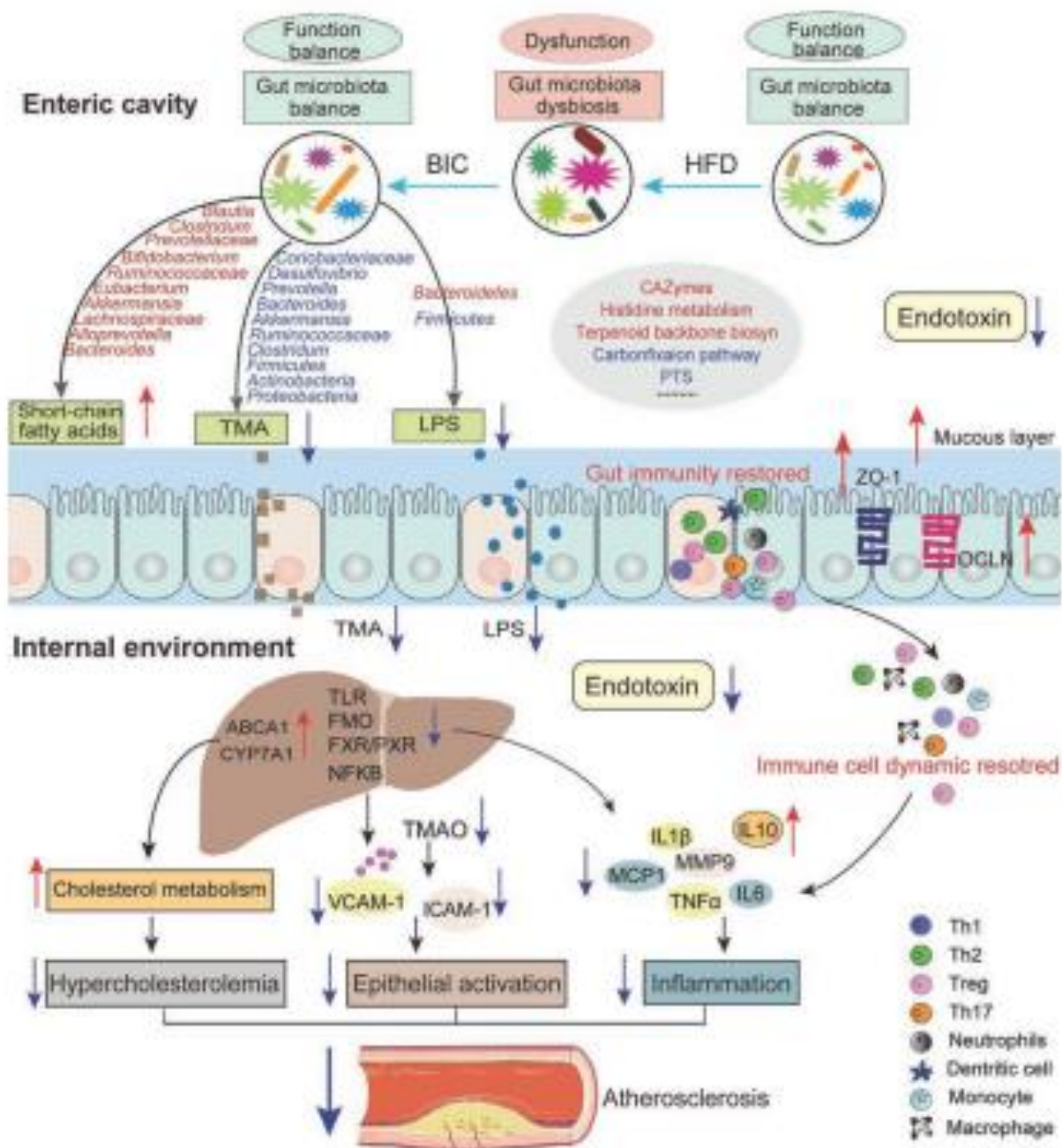


Рисунок 8. Краткое описание механизма BIC. BIC эффективно модулирует состав, функцию и выработку эндогенных метаболитов микробиоты кишечника. Здоровье кишечника, восстановленное с помощью BIC, положительно влияет на динамику системных иммунных клеток и функции печени, что приводит к уменьшению хронического воспаления и гиперхолестеринемии. Следовательно, активация эндотелия, инфильтрация макрофагов и накопление эфиров холестерина (ЭХ) в дуге аорты были ослаблены, вызывая меньшее появление бляшек.

Печень является важным местом, которое связывает микробиоту кишечника с внутренней средой. Он находится в тесном контакте с кишечным трактом и подвергается воздействию многих бактериальных компонентов и их метаболитов. Контакт с кишечными метаболитами и эндотоксинами может привести к хроническому заболеванию печени, усугубляющему формирование АС. ТМАО является продуктом окисления кишечного микробного метаболита при метаболизме печеночными флавиномонооксигеназами (ФМО)^[43]. Связь между ТМАО и сердечно-сосудистыми заболеваниями была отмечена несколькими группами, использующими различные глобальные когорты^[44]. Недавнее исследование показало, что ТМАО уменьшает экспрессию холестерина 7-альфа-гидроксилазы 1 (CYP7a1), фермента, ограничивающего скорость синтеза ВА в катаболизме

холестерина, что приводит к нарушениям RCT и повышению уровня холестерина^[45]. LPS, компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий, был широко изучен при AC^[46]. Приток LPS во внутреннюю систему активирует соответствующие PRR в печени и запускает нижестоящие воспалительные каскады с участием ядерного фактора каппа-В (NF-κB) и митоген-активируемой протеинкиназы, чтобы индуцировать инфильтрацию иммунными клетками^[47]. Активация TLR, индуцированная LPS, может снижать экспрессию CYP7a1 в печени, блокируя экспрессию АТФ-связывающих кассетных транспортеров, A1 и G1, и уменьшая фекальную экскрецию холестерина посредством синтеза ВА. В этом исследовании мы наблюдали скачки уровней LPS и ТМА в печени мышей Apoe(-/-), получавших HFD, однако 20 недель лечения ВИС уменьшали эти повышения. Соответственно, критические молекулы, описанные выше, включая TLR4 и NF-κB, FXR, FMO3, ABCA1 и CYPa1, были скорректированы с помощью вмешательства ВИС. Основываясь на изменениях в динамике клеток системного иммунитета и функциях печени, ВИС обращал вспять хроническое воспаление и снижал концентрацию СЕ в печени и плазме.

АС является многостадийным заболеванием, при котором активация эндотелия была признана первым важным этапом в появлении бляшек^[22]. Несколько исследований показали, что воспаление является основным патогенным фактором^[21]. Хроническое воспаление повышает экспрессию важнейших молекул адгезии, ICAM-1 и VCAM-1, в эндотелиальных клетках, тем самым увеличивая клеточную адгезию и облегчая привлечение моноцитов и других эффекторов из системы кровообращения. ox-LDL в интиме, что приводит к ряду клеточных событий, которые вызывают клеточный атерогенный ответ^[22]. Связь между системным воспалением и эндотелиальной дисфункцией широко подтверждается клиническими и экспериментальными данными^[48]. В этом исследовании ВИС улучшился. хроническое воспаление и недееспособность RCT, индуцированные HFD у мышей Apoe(-/-), тем самым ослабляя активацию эндотелия, инфильтрацию макрофагов и накопление СЕ в дуге аорты и, наконец, облегчая возникновение бляшек. Природные соединения — драгоценные дары матери-природы. Исследование кишечного микробиома пролило новый свет на наше понимание лежащего в его основе механизма. В этом исследовании мы подтвердили, что ВИС может регулировать состав и функцию кишечной микробиоты и изменять выработку кишечных биометаболитов, улучшая метаболизм липидов и состояние воспаления, что указывает на полезное лечение АС. Тем не менее, необходимо проделать дополнительную работу, например, выяснить точные молекулярные механизмы воздействия ВИС на кишечную флору, определить более функциональные метаболиты и их механизмы воздействия на физиологическое здоровье.

4. Вывод

Это исследование продемонстрировало, что ВИС облегчает АС, вызванный HFD, у мышей Apoe(-/-). ВИС восстанавливает гомеостаз микробиоты кишечника, регулирует биометаболиты, связанные с кишечником, и улучшает здоровье кишечника. Системно динамика иммунных клеток и функция печени улучшались, что приводило к изменению хронического воспаления и гиперхолестеринемии. Следовательно, ВИС ослаблял активацию эндотелия, инфильтрацию макрофагов и накопление СЕ в дуге аорты, облегчая появление бляшек. Настоящее исследование является первым, демонстрирующим антиатеросклеротические эффекты ВИС и указывающим на то, что терапевтические эффекты ВИС на АС по крайней мере частично опосредованы микробиотой кишечника.

Вспомогательная информация

Вспомогательную информацию можно получить в онлайн-библиотеке Wiley или у автора.

Благодарности

Эта работа была проведена при поддержке Национального ключевого проекта исследований и разработок (№ 2019YFC170890, Китай), Национального фонда естественных наук Китая (№ 81621064), Инновационного фонда CAMS для медицинских наук (№ 2021-I2M-1-009, 2021-I2M- 1-030 и 2021-I2M-1-070) и Национального масштабного проекта в области науки и техники (№ 2018ZX09721003-008-026). Исследование было одобрено Лабораторным комитетом по уходу и использованию животных Китайской академии медицинских наук и проводилось в соответствии с руководящими принципами и этическими нормами Китайского совета по уходу за животными (номер разрешения: 00005970).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Вклад автора

X.-L.L., J.-J.C., W.-S.Z. и J.-L.Z. в равной мере внесли свой вклад в эту работу. X.-L.L., J.-J.C., W.-S.Z., J.-L.Z., M.L., R.L., X.-L.M., H.-H.G., C.L., X.-Y.Y., L.M.Z., PL, SH и PD выполнены эксперименты и аналитические методы. LLW, YC и J.-D.J. предложили и разработали эксперименты, интерпретировали и обсудили данные, а также рассмотрели и отредактировали рукопись. L.-L.W., Y.C. и J.-D.J. разработали гипотезу, скоординировали проект и написали рукопись.

Заявление о доступности данных

Данные, подтверждающие результаты этого исследования, можно получить у соответствующего автора по обоснованному запросу.

Ключевые слова

атеросклероз, бициклл, кишечная микробиота, полногеномные ассоциативные исследования

Получено: 20 августа 2021 г.

Пересмотрено: 9 декабря 2021 г.

Опубликовано в сети: 27 января 2022 г.