

Біцикллол полегшує атеросклероз, впливаючи на кишкову мікробіоту

Сяо-Лінь Лі, Цзінь-Цзінь Цуй, Вень-Шен Чжен, Цзінь-Лань Чжан, Жуй Лі, Сяо-Лей Ма, Мяо Лінь, Хуей-Хуей Го, Цун Лі, Сяо-Ю Ю, Пен Ду, Лі-Мін Чжао, Шуван Хе, Пей Лан, Цзянь-ДунЦзян, Юншен Че* та Лу-Лу Ван **

Атеросклероз (АС) пов'язаний з високими рівнями захворюваності та смертності, що все зростаючим тягарем лягає на сучасне суспільство. Біцикллол (ВІС) є універсальною біоактивною сполукою, яку можна використовувати для лікування АС. Однак його ефективність при АС ще не описано. У статті показано, що ВІС нормалізує дисбіоз мікрофлори кишечника, спричинений дієтою з високим вмістом жирів у мишей Ароє(-/-). Аналіз метагеномних асоціацій підтверджує, що модуляція вуглевод-активних ферментів і генів, що генерують коротколанцюгові жирні кислоти, у кишковій флорі є одним із механізмів. Здоров'я кишечника, особливо імунітет та цілісність кишечника, відновлюються за допомогою застосування ВІС, що призводить до покращення динаміки системних імунних клітин та функцій печінки. Відповідно, ВІС сприяє активації ендотелію, інфільтрації макрофагів та накопиченню ефірів холестерину в дузі аорти, тим самим зменшуючи виникнення бляшок. Понад те, доведено, що терапевтичний ефект ВІС на АС передається при трансплантації фекальної мікробіоти. Поточне дослідження вперше демонструє антиатеросклеротичні ефекти ВІС і показує, що його терапевтичне значення може бути принаймні частково пов'язане з його впливом на мікробіоту кишечника.

1. Вступ

Атеросклероз (АС) є основною причиною інфаркту міокарда и інсульта та основною причиною смертності у всьому світі¹; проте його патофізіологія складна та з'ясована лише

¹ Х.-Л. Лі, Ст.-С. Чжен, Дж.-Л. Чжан, Р. Лі, Х.-Л. Ма, М. Лін, Х.-Х. Го, К. Лі, Х.-У. Ю, П. Ду, Л.-М. Чжао, П. Лан, Ж.-Д. Цзян, Л.-Л. Ван
Державна ключова лабораторія біоактивних речовин та функцій природних лікарських засобів
Інститут Матеріа Медика
Китайська академія медичних наук та Медичний коледж Пекінського союзу
Пекін 100050, Китай
Електронна пошта: jiangjd@imm.ac.cn; wanglulu@imm.ac.cn
Дж.-Дж. Кюї, Ж.-Д. Цзян, Ю. Че, Л.-Л. Ван
Інститут медичної біотехнології
Китайська академія медичних наук та Медичний коледж Пекінського союзу
Пекін 100050, Китай
Електронна пошта: cheys@im.ac.cn
С. Хе
Фармацевтичний коледж
Шаньдунський університет
Пекін 250012, Китай
Ідентифікаційний номер(и) ORCID автора(ів) цієї статті можна знайти за адресою
<https://doi.org/10.1002/sml.202105021>
DOI: 10.1002/sml.202105021

частково. Ідентифікація нових шляхів, пов'язаних із захворюванням, та терапевтичних мішеней для АС має вирішальне значення. Останнім часом велика увага приділяється зв'язку між АС та змінами у складі мікробіоти кишечника та її метаболічної активності. Мікробіом кишечника людини є складною екосистемою, в якій мешкають трильйони мікробів, які розвиваються разом зі своїм господарем і встановлюють мутуалістичні симбіотичні відносини, що сприяють їх співіснуванню.^[2] Дедалі більше досліджень демонструють, що мікробіом кишечника безпосередньо бере участь у таких процесах господаря, як поглинання поживних речовин, зростання та розвитку, біологічні бар'єри, імунна регуляція та обмін речовин, среди прочого.^[3] Дійсно, у багатьох дослідженнях повідомляється, що мікробний дисбаланс може бути пов'язаний з різними кишковими та позакишковими захворюваннями, включаючи АС ^[4]; наприклад, Степанкова та співавт. повідомили, що мікробіота кишечника може захищати від АС у мишей *Aroe(-/-)*^[5]. Дослідження показало, що у безмікробних мишей *Aroe(-/-)*, які отримували корм з низьким вмістом холестерину, розвивалися більш важкі бляшки АС, ніж у звичайних мишей *Aroe(-/-)*; проте цей ефект зменшувався, коли мишам *Aroe(-/-)* пересаджували нормальний людський мікробіом.^[5] Так само інша група виявила, що трансплантація фекальної мікробіоти (FMT) у стерильних мишей може передавати сприйнятливості до АС^[6]. Крім того, клінічна присутність бактеріальної ДНК у бляшках АС та її кореляція з їх великою кількістю в кишечнику підтверджують можливий причинно-наслідковий зв'язок між кишковою мікробіотою та АС. ^[7] Karlsson та співавт. виявили, що кишковий мікробіом пацієнтів із симптоматичним АС має змінену структуру та метагеном, збагачений генами, що кодують синтез пептидоглікану, але збіднений фітоендегідрогеназою ^[8]. Дані свідчать про те, що анти-АС ефективність багатьох харчових добавок, таких як інулін^[9], чорниця^[10] і риб'ячий жир^[11], багатий довголанцюжковими мононенасиченими жирними кислотами, принаймні частково опосередкована модуляцією їх структури та/або функції мікробіоти кишечника. Дійсно, кишкова мікробіота була ідентифікована як сильна терапевтична мета для лікування серцево-судинних захворювань, пов'язаних з АС.

Біциклол (ВІС, 4,4'-диметокси-5,6,5',6'-диметилен-діокси-2-гідроксиметил-2'-карбонілбіфеніл) є синтетичним аналогом активного компонента схізандрину С, що екстрагується з рослини *Fructus schisandrae*, який використовується як гепатопротектор з високою ефективністю та безпекою в багатьох країнах ^[12]. Клінічні випробування показали, що ВІС нормалізує підвищений рівень сироваткових трансаміназ та покращує порушену функцію печінки у пацієнтів з різними захворюваннями печінки. ^[12,13] Його гепатопротекторні механізми за наявними даними, пов'язано з його усуненням вільних радикалів^[14], активністю антиоксидантного стресу, ^[15] протизапальними ефектами^[16], придушенням апоптозу, спричиненого імунологічним ушкодженням^[17], та захистом від пошкодження ядерної ДНК ^[13]. Клінічні дослідження показали, що ВІС може інгібувати накопичення ліпідів у печінці, ^[18] покращувати стан дисліпідемії та резистентності до інсуліну (ІР), а також знижувати індекс маси тіла та співвідношення талії та стегон у пацієнтів з неалкогольною жировою хворобою печінки (НАЖП)]. Тому ВІС може бути добрим кандидатом для лікування АС; проте його благотворний вплив на АС і механізми, що лежать в його основі, ще не досліджені. Ми припустили, що ефективність ВІС може бути, принаймні, частково опосередкована кишковою мікробіотою.

Тут ми прагнули з'ясувати вплив та молекулярні механізми ВІС на АС з погляду мікроекології кишечника. Наскільки нам відомо, це дослідження є першим, у якому вивчається терапевтична ефективність ВІС при АС та досліджується внесок мікробіома кишечника.

2. Результати

2.1. ВІС покращує стан артеріальних бляшок у мишей ApoE(-/-), які отримують корм з високим вмістом жирів (HFD)

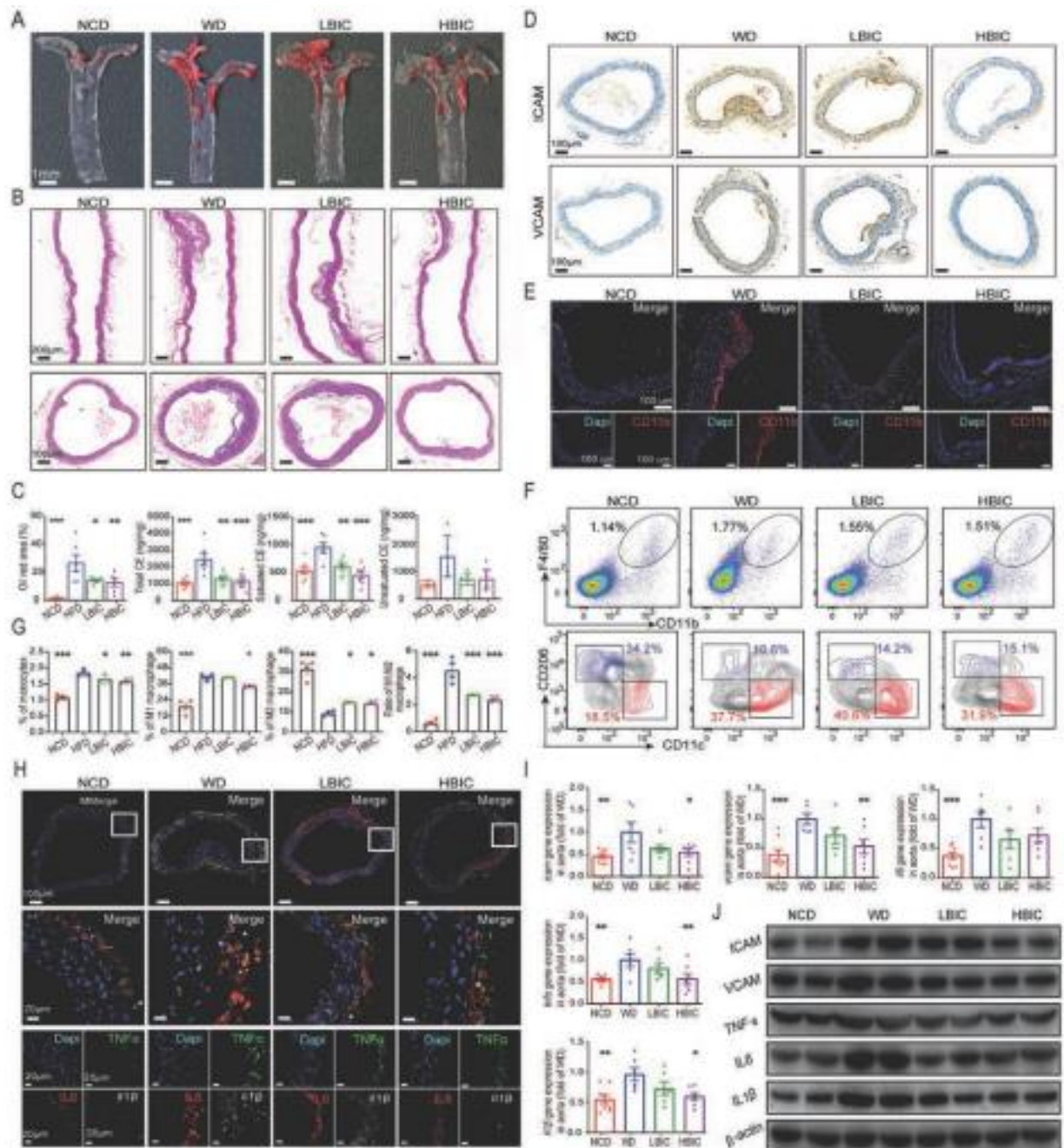
По-перше, ми оцінили терапевтичний ефект ВІС на виникнення артеріальних бляшок у мишей ApoE(-/-), які отримували HFD (інгредієнти корму показані в Таблиці S1 додаткової інформації). Як показано на рис. 1A, B, у мишей у групі WD було більше поразок АС, ніж у мишей у групі NCD; проте лікування як низькими, так і високими дозами ВІС значно зменшувало ураження. Статистичний аналіз показав, що площа бляшки у мишей WD була в 17,9 разів вищою, ніж у мишей NCD, тоді як лікування LBIC та HBIC зменшувало площу бляшки на 46% та 53% відповідно (мал. 1C). Ми також оцінили рівень аортального ефіру холестерину (CE) в кожній групі і виявили, що HFD значно збільшує загальну кількість CE і насиченого CE в артерії в порівнянні зі стандартною дієтою (група WD в порівнянні з групою NCD); проте п'ять місяців лікування ВІС звернули ці ефекти назад. АС є багатостадійним захворюванням, у якому пошкодження ендотелію передують утворенню бляшок[21,22]. Таким чином, ми виявили експресію ICAM-1 і VCAM-1 в аортах мишей ApoE(-/-) і виявили, що їхня експресія була значно вищою і активується після годування HFD. І навпаки, експресія ICAM-1 і VCAM-1 була значно знижена в аортах мишей ApoE(-/-), яких годували HFD, які отримували ВІС (мал. 1D). Згодом ми оцінили інфільтрацію та поляризацію моноцитів у дузі аорти за допомогою проточної цитометрії та аналізу флуоресцентного фарбування. Як показано на малюнку 1E, у тканині аорти мишей у групах LBIC та HBIC рекрутувалося менше моноцитів, ніж у групах WD. Аналіз проточної цитометрії також показав, що ВІС значно знижує кількість моноцитів (F4/80+/CD11b+) у дузі аорти порівняно з необробленими мишами ApoE(-/-), які отримували HFD (рис. 1F). Крім того, у дузі аорти мишей у групах LBIC та HBIC спостерігалось менше макрофагів M1, але більше макрофагів M2, ніж у групі WD (рис. 1F, G; рис. S1, допоміжна інформація). Ми також вивчили експресію цитокінів, у тому числі фактора некрозу пухлини-альфа (TNF- α), інтерлейкіну (IL)-1 β та IL-6 (рис. 1H), і виявили, що їхня експресія була значно вищою в дузі аорти у мишей WD, ніж у мишей NCD, але лікування ВІС призводило до відновлення залежно від дози. Ефект втручання був також підтверджений за допомогою ВІД-ПЛР та вестерн-блот (мал. 1I, J). У сукупності ці результати свідчать, що ВІС може поліпшувати АС, викликаний HFD, у мишей ApoE(-/-).

2.2. ВІС нормалізує дисбактеріоз кишечника у мишей ApoE(-/-), які отримують корм з високим вмістом жирів (HFD)

Ми порівняли мікробіоту кишечника серед експериментальних груп мишей ApoE(-/-). Як показано на малюнку 2A, миші ApoE(-/-), що отримували HFD, демонстрували помітно нижчу чисельність та різноманітність кишкових бактерій; проте цей ефект був значно спрямований назад при застосуванні ВІС. Аналіз основних компонентів (PCA) та аналіз основних координат (PCoA) показали, що HFD значно змінив загальну структуру кишкового мікробіома, ВІС певною мірою змінив ці зрушення вздовж PC1 (рис. 2B). Неметричне багатовимірне шкалювання (NMDS) виявило аналогічну тенденцію (рис. 2B). Не було відзначено суттєвої різниці у складі кишкової мікробіоти між групами NCD та HBIC. Таксономічний склад кишкового мікробіома у кожній групі був додатково проаналізований (рис. 2C; рис. S2, допоміжна інформація). На рівні типу HFD зменшив відносну кількість Bacteroidetes, збільшив відносну кількість Firmicutes (рис. 2C-a) та співвідношення Firmicutes/Bacteroidetes (рис. S3, допоміжна інформація), тоді як обробка ВІС звернула ці зміни назад. Не було відзначено жодних відмінностей між групою NCD та HBIC. На рівні класу сім найбільш виражених класів модулювалися за допомогою LBIC у

тому напрямку, що й у мишей з NCD, шість з яких модулювалися за допомогою HBIC (мал. 2C-b). Ті ж дані спостерігалися на рівні загону (рис. 2C-c), у той час як на рівні сімейства 10/12 найбільш регульованих сімейств модулювалися за допомогою HBIC у тому ж напрямку, що й у мишей NC, з яких 8 модулювалися за допомогою LBIC (Рис. 2 C-d).

На рівні роду серед 15 основних пологів бактерій, які були значно змінені впливом HFD, обробка BIC збільшила кількість пологів на 9 (показані червоним) і зменшила кількість пологів на 3 (показані синім кольором) порівняно з мишами WD. Примітно, що зміни 11/12 були в тому ж напрямку, що і миші з NCD, і в сприятливій перспективі (рис. 2D). Крім того, повідомлялося, що шість пологів бактерій, включаючи *Alloprevotella*, *Bacteroides*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Clostridium* та *Eubacterium*, захищають від AC[4,23] та посилюються при введенні BIC (рис. S4, допоміжна інформація, показана червоним). Співвідношення бактерій кожному рівні було однаковим у групах NCD і HBIC. Кореляція між параметрами, пов'язаними з AC, і бактеріальними таксонами показала, що чисельність *Bacteroides* демонструє значну негативну кореляцію із загальним SE плазми, чисельність *Dubosiella* негативно корелює із загальним SE печінки, *Prevotellaceae* та *Alloprevotella* демонструють значну . Аналогічні тенденції також спостерігалися для *Lachnospiraceae* та *Alistipes* з ліпідами печінки, площею олійного червоного O в аорті (%) та загальним SE. У той час як велика кількість *Faecalibaculum* позитивно корелювала з усіма ознаками, *Desulfovibrionaceae* та *Erysipelotrichaceae* позитивно корелювали з SE печінки та олійним червоним O артерій (рис. 2E). Аналіз розміру ефекту лінійного дискримінантного аналізу (LEfSe) показує, що *Erysipelotrichia* були по-різному представлені у групі WD, *Bifidobacterium* були по-різному представлені у групі NCD, *Lactobacillus* були по-різному представлені у групі NBIC, а *Pleibacterium* і *Romboutsia* представлені у групах LBIC та HBIC відповідно (рис. 2F).



Малюнок 1. ВІС зменшує утворення артеріальних бляшок у мишей *ApoE(-/-)*, які отримували HFD. Мишей *ApoE(-/-)*, які отримували HFD, лікували LBIC або HBIC через шлунковий зонд протягом 5 місяців. Нелікованих мишей, які отримували HFD, використовували як модельний контроль (WD), тоді як мишей *ApoE(-/-)*, які отримували стандартне харчування, використовували як негативний контроль (NCD). Наприкінці експерименту збирали аорти мишей *ApoE(-/-)* з різних груп. А) Репрезентативне зображення ураження дуги аорти у мишей *ApoE(-/-)* з використанням фарбування червоним олійним О. В) Репрезентативне зображення поздовжнього перерізу (вгорі) та поперечного перерізу (внизу) аорти у мишей *ApoE(-/-)* з використанням фарбування гематоксиліном та созином (HE). С, зліва) Ураження дуги аорти вимірювали у відсотках від діаметра просвіту; С, праворуч) Складний ефір холестерину (CE) в артерії. Рівень KE у кожному зразку оцінювали з використанням методу УВЕРХ-МС/МС. D) Репрезентативне зображення імуногістохімічного фарбування для ICAM та VCAM. E) Репрезентативне зображення імунофлуоресцентного фарбування cd11b у тканині аорти. F) Репрезентативні профілі проточного цитометра інфільтрації (вгорі) та поляризації (внизу) моноцитів у зразках ізолюваних клітин артеріальної дуги. G) Відсоток моноцитів, макрофагів типу M1, макрофагів типу M2 та співвідношення макрофагів M1/M2. H) Репрезентативні багатобарвні імунофлуоресцентні зображення, пофарбовані фарбуваннями IL-6 (червоний), IL1/J (білий) або TNF-α (зелений) у тканинах аорти. Області інтересу (ROI) виділені білим кольором, які збільшені зображення показані нижче. I) Експресію *icam*, *vcam*, *IL6*, *IL1b* та *tnfa* мРНК у тканині аорти оцінювали за допомогою ВІД-ПЛІР. Результати були нормалізовані до GAPDH. J) Експресію білків ICAM, VCAM, IL6, IL1/J та TNF-α в тканині аорти оцінювали вестерн-блотом, β-актин використовували як контроль. Дані представлені як середнє SEM (n = 5-7). Вказані значні відмінності: *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001 порівняно з WD за однофакторним тестом ANOVA.

шляхів, включаючи глікан, амінокислотні кофактори та вітаміни, вторинні метаболіти, ліпі. Примітно, що майже всі гени, змінені HFD, були відновлені при обробці ВІС (рис. 2G виділено червоним). Цікаво, що обробка ВІС збагатила кілька пологів, що генерують коротколанцюгові жирні кислоти (SCFA), такі як Clostridium і Prevotellaceae для ацетату[24], Blautia для пропіонату[25], і Bacteroides, Ruminococcae, Eubacterium, Alloprevotaya [26] Відповідно, лікування ВІС збільшувало рівні бутирату та пропіонату у фекаліях мишей, які отримували HFD. Група NBIC має такі самі рівні фекальних SCFAs, як і мишей з NCD Група NBIC має такі самі рівні фекальних SCFAs, як і мишей з NCD (рис. 21). Крім того, ВІС змінив рівні безлічі бактерій, пов'язаних з продукцією ліпополісахариду (ЛПС) і ТМА/ТМАО[27], включаючи типи Firmicutes, Actinobacteria та Proteobacteria, сімейства Lachnospiraceae та родів Prevotella, Bacteroides і Ruminococca. Подібно до змін кишкової флори, концентрація ТМА і ЛПС була вищою у мишей WD у порівнянні з мишами NCD, і пригнічувалася лікуванням ВІС (рис. S5, допоміжна інформація).

Цікаво, що поява артеріальних бляшок узгоджується із змінами кишкової мікробіоти. (Малюнок S6, допоміжна інформація). Таким чином, ми припустили, що ефективність ВІС може бути принаймні частково опосередкована кишковою мікробіотою.

2.3. Аналіз метагеномних асоціацій (MWAS)

Щоб зрозуміти механізми впливу ВІС на кишкову флору, ми інкубували зразки фекалій мишей WD з ВІС (5 мг г-1 фекалій) у строгих анаеробних умовах (сольовий розчин як контроль протягом 48 год) і провели аналіз MWAS. Повногеномне дробове секвенування шести зразків мікробіоти (три з групи ВІС і три з контрольної групи з фізіологічним розчином) проходять суворий контроль якості (рисунок S7 та таблиця S2, допоміжна інформація) для досягнення таксономічних змін, аналізу функціональних генів та аналізу шляхів.

2.3.1. Таксономічні зміни, виявлені за допомогою MWAS

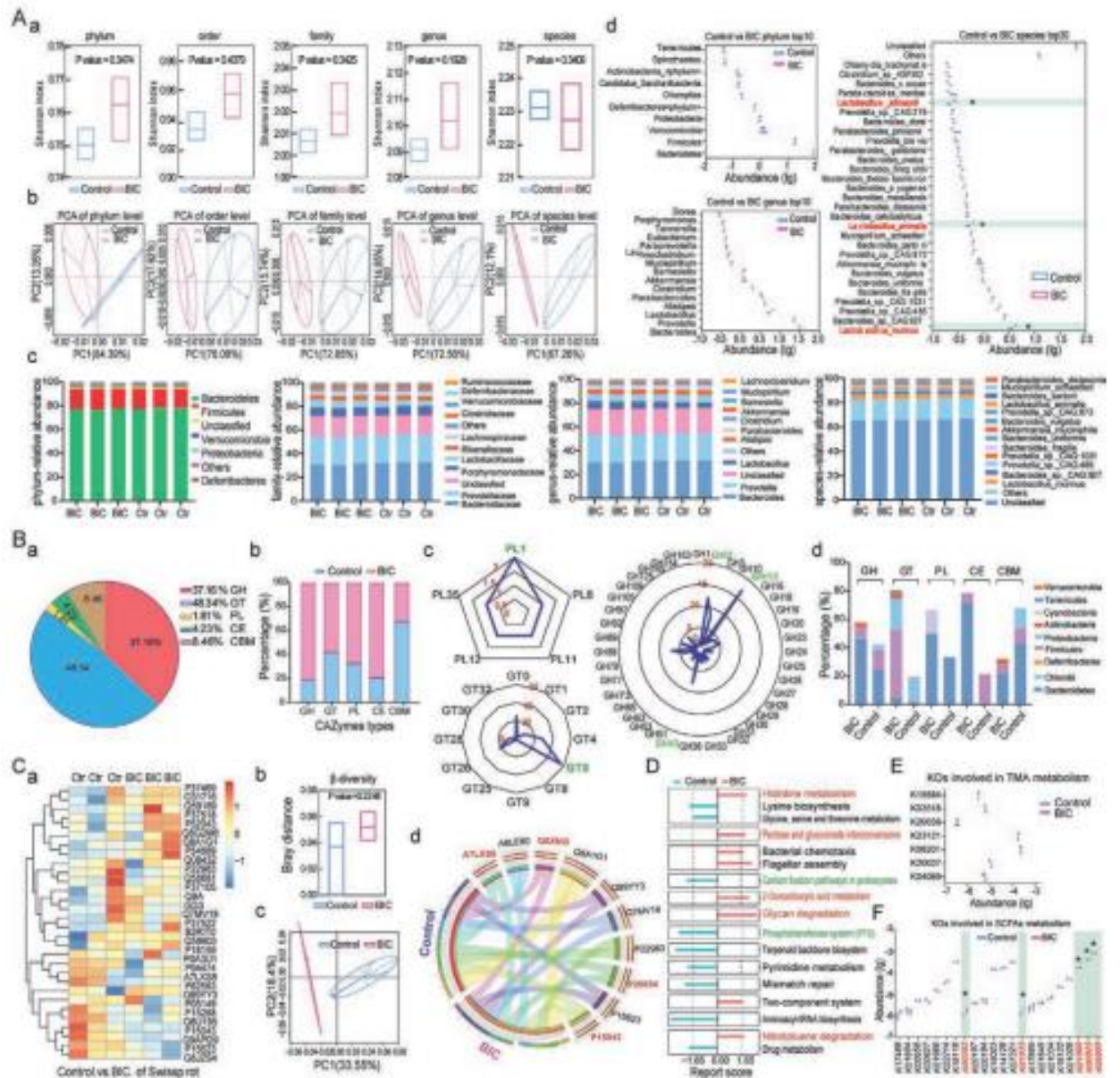
Як показано на мал., Що спільноти мікробіомів при лікуванні ВІС не були схожі на контрольні групи. Після вивчення профілю відносної різноманітності кишкової флори (рис. 3A-c, d; рис. S8 і S9, допоміжна інформація) ми виявили, що порівняння видів показало великі відмінності в факторах контролю ВІС (рис. 3A-d). З ідентифікованих 30 видів 3 належали до роду Lactobacillus (включаючи Lactobacillales_murinus, Lactobacillales_animalis, Lactobacillales_johnsonii) і збагачені зразками ВІС порівняно з контролем. Попередні дослідження припускали, що введення Lactobacillus murinus може знизити рівень системного запалення, «з» придушити розвиток коліту[29], і запобігти викликаній сіллю солечутливою гіпертензією [30].

2.3.2. Функціональний аналіз генів

По-друге, ми порівняли відмінності в генах між контрольними групами ВІС та фізіологічним розчином та виявили, що гени мікробіома при лікуванні ВІС не були схожі на контрольні групи (рисунок S10, допоміжна інформація). Вуглевод-активні ферменти (CAZymes), що кодується кишковим мікробіомом, мають вирішальне значення для розщеплення складних полісахаридів, при цьому SCFAs є основними кінцевими продуктами [31]. Тут ми порівняли характеристики CAZymes між контрольними зразками ВІС та фізіологічним розчином. Загалом було отримано 331 CAZyme-анотований ідентифікатор гена з 37,16% глікозилгідролаз (GH), 48,34% глікозилтрансфераз (GTs), 1,81% полісахаридліаз (PL), 4,23% вуглеводної естерази (CE) і 8,46% модулів, що зв'язують вуглеводи (CBM) (рис. 3B-a). Примітно, що більшість типів CAZymes, особливо

GH і PL (два типи ферменту, що розщеплює глікозидні зв'язки з утворенням SCFAs), збагачені ВІС-групою з осфорилазу) і GH43 (попередник бета-глюканази) є високоекспресованими, а GT5 (глікогента гіпотетичний білок VcellWH2_04089) та CE12 (рамногалактуронан ацетилестераза) збагачені категоріями в категоріях GT, PL та CE відповідно (рис. 3B-c; рис. S11, допоміжна інформація). Щоб проаналізувати кореляцію між кишковим мікробіомом та генами CAZyme, співвідношення на рівні типу у кожній категорії CAZyme порівнювали між групами ВІС та фізіологічним розчином. Як показано на малюнку 3B-d, у зразках ВІС та фізіологічного розчину було отримано 9 типів мікробіоти та унікальна картина розподілу.

Анотовані з використанням бази даних SwissProt десять кращих білків були отримані після порівняння ВІС і контрольних зразків і чотирьох білків, таких як Q8XNI5 (системний білок A UvrABC), A7LXS8 (бета-глюкозидаза BoGH3A), P20054 (глутамін4-залежність АТФ-залежна ДНК-хеліказу RecQ) були високо експресовані у зразках ВІС (мал. 3C). Попереднє дослідження показало, що системний білок A UvrABC бере участь у розпізнаванні та обробці пошкоджень ДНК, граючи роль у кислотостійкості та стійкості до окислення *Lactobacillus helveticus* CNBL1156[32]; тоді як β -глюкозидаза являє собою фермент глікозидгідролази, який відщеплює залишки цукру від сполуки, що відіграють ключову роль у гідролізі целюлози.



Малюнок 3 Аналіз метагеномного асоціативного дослідження (MWAS). Зразки фекалій, зібрані у мишей WD, інкубували з BIC (5 мг г-1 фекалій) у строгих анаеробних умовах (сольовий розчин як контроль) протягом 48 годин і аналізували MWAS. А) Таксономічні зміни виявлені за допомогою MWAS. А-а) α -Різноманітність (індекс Шеннона) на рівні типів, загонів, сімейств, пологів та видів; А-б) аналіз основних компонентів (PCA) на рівні типу, загону, сімейства, роду та виду; А-в) відносна чисельність на рівні типу, сімейства, роду та виду; А-д) Н-критерій Крускала-Уоллса на рівні типів, пологів та видів. Червоним кольором показані види, що мали суттєві відмінності. В) Функціональний аналіз вуглеводно-активних ферментів (CAZymes). В-а) Відсоток CAZymes, проаналізованих у всіх зразках контролю та BIC; В-б) порівняння CAZyme між контролем та групою BIC у кожного суб'єкта; В-в) кількість CAZymes у кожному суб'єкті; В-д) розподіл кишкового мікробіома у CAZyme. С) Функціональний аналіз інструкції Swissprot. С-а) Топ-30 білків у базі даних Swissprot; С-б) β -різноманітність (індекс подібності Брея-Кертца) на рівні білків у базі даних Swissprot; С-в) аналіз основних компонентів (PCA) контролю та групи BIC у базі даних Swissprot; С-д) десять кращих білків з бази даних Swissprot між контрольною групою та групою BIC були показані на цирковій карті. D) Відносна кількість аналізу шляху енциклопедії генів та геномів (KEGG) між контрольною групою та групою BIC (показана репортерська оцінка >1.65 або <-1.65). Шляхи, пов'язані з худорлявим суб'єктом, утворенням SCFA та покращеною толерантністю до глюкози, вмістом глікогену в печінці та ліпідами крові, були показані червоним кольором; в той час, як ті, які пов'язані з пацієнтом з ожирінням, порушенням толерантності до глюкози, резистентністю до інсуліну та стеатозом печінки, були показані зеленим кольором. E) Різниця KO, що беруть участь у метаболізмі TMA, між контрольною групою та групою BIC. F) Різниця KO, що беруть участь у метаболізмі SCFAs, між контрольною групою та групою BIC. Цифри нокаутів, виділені червоним, вказують на те, що нокауту в групі BIC значно вищі, ніж у контрольній групі ($P < 0,05$). GT: глікозилтрансферази; PL: полісахаридліази; SE: вуглеводна естераза; GH: глікозидгідролази; CBM: вуглеводні модулі.

2.3.3. Аналіз шляху

У цьому дослідженні 135/4262 ортологів KEGG (КО) показали значну різницю у вмісті між ВІС та контрольними зразками з фізіологічним розчином ($p < 0,01$). Як показано на малюнку 3D, шляхи KEGG, що відносяться до системи фосфотрансфераз (PTS), шляхи фіксації вуглецю та біосинтезу терпеноїдного кістяка, були значно збагачені в контрольних зразках з сольовим розчином порівняно із зразками ВІС. Попереднє дослідження показало, що шлях PTS позитивно корелює з видами типу Firmicutes, і ці три шляхи були збагачені кишковим мікробіомом пацієнтів з ожирінням [33]. Крім того, повідомлялося, що гени шляху фіксації вуглецю корелюють з порушенням толерантності до глюкози, резистентністю до інсуліну та стеатозом печінки [34]. Примітно, що шляхи, пов'язані з метаболізмом амінокислот, включаючи метаболізм гліцину, серину та треоніну, були виснажені у групах ВІС. Це відкриття може пояснити феномен, згідно з яким ВІС знижує вироблення ТМА в кишковій флорі мишей HFD, ймовірно тому, що холін (матеріали для синтезу ТМА) може бути отриманий шляхом декарбоксілювання та метилювання серину, тоді як серин може бути отриманий шляхом метаболізму гліцину та треоніну. І навпаки, гени, що беруть участь у метаболізмі гістидину, взаємоперетвореннях пентози та глюкуронату, метаболізмі 2-оксокарбонової кислоти, деградації гліканів та шляхи деградації нітратолуолу були збільшені в мікробіомі ВІС порівняно з контрольними сольовими розчинами. Ці зміни були аналогічні кишковим мікробіомам у контролів, що мають худорляву конституцію [35]. Понад те, в метагеномах хадза-мисливців було зареєстровано збагачення метаболізму гістидину, важливого шляху виробництва сигналів і рециркуляції вуглецю, проти такими в міських італійців [36]. Шлях взаємоперетворення пентози та глюкуронату корелює з деградацією пектину та виробництвом SCFA, покращеною толерантністю до глюкози, вмістом глікогену в печінці та рівнем ліпідів у крові [37]. Цікаво, що після порівняння КО, що беруть участь у шляху метаболізму SCFAs, п'ять КО (включаючи K00382: комплекс дегідрогеназу/ацетил-КоА-синтазу, K01035: бутирил-КоА-трансфераза, K06889: білок надродини альфа/бета-9 K01066: fbp-SEB) були виявлені значно вище у зразках, оброблених ВІС, порівняно з контрольною групою, яка одержувала фізіологічний розчин (рис. 3D).

Водночас ці результати продемонстрували, що мікробіота кишечника, яка втручалася в ВІС, може мати високу здатність до вироблення SCFA, низький рівень ТМА та дружнє середовище кишечника.

2.4. ВІС покращував здоров'я кишечника у мишей Aroe(-/-), які отримували корм з високим вмістом жирів (HFD)

2.4.1. ВІС відновлює імунітет кишечника

Дисбактеріоз кишечника викликав імунну дисрегуляцію та збільшував ризик розвитку захворювань, включаючи серцево-судинні захворювання [38]. Як показано на малюнку 4A, дисбіоз, викликаний HFD, приводив до збільшення інфільтрації нейтрофілів і моноцитів; вплив ВІС пригнічував ці явища. Крім того, введення ВІС відновлювало Т-лімфоцити за рахунок зменшення частки прозапальних клітин Th1 при одночасному підвищенні частки протизапальних клітин Th2 та Treg (рис. 4C, D; рис. S12, допоміжна інформація). Виробництво запальних цитокінів у кишечнику пригнічувалося втручанням ВІС (рис. S13, допоміжна інформація).

2.4.2. ВІС відновлює цілісність кишечника

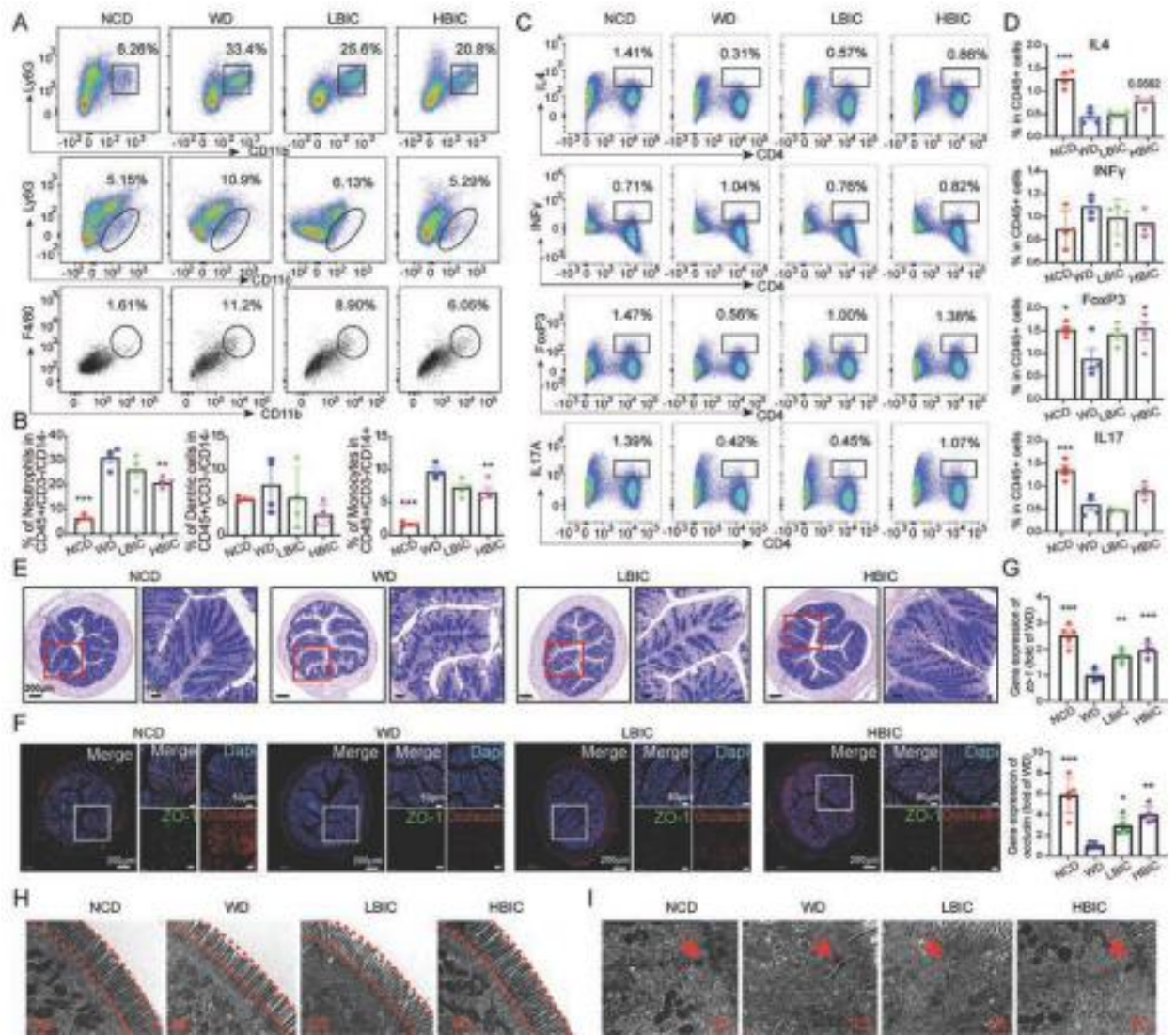
Потім ми досліджували вплив ВІС на епітеліальні клітини кишечника мишей у кожній групі та виявили, що у мишей *Aro^e(-/-)*, які отримували HFD, було менше келихоподібних клітин, ніж у мишей у групі NCD, тоді як лікування ВІС значно збільшувало кількість келихоподібних клітин (рис. 4E). Крім того, у мишей *Aro^e(-/-)*, які отримували HFD, було значно менше епітеліальних білків щільного з'єднання, таких як оклюдин і ZO-1, ніж у мишей у групі NCD (рис. 4F, G). Лікування ВІС запобігає цьому виснаженню та підтримує нормальний рівень. Ці дані показали, що ВІС покращує цілісність кишечника, сприяючи терапевтичному ефекту. Ми також використовували трансмісійну електронну мікроскопію для вивчення мікроворсинок та клітинних сполук у стінці кишечника експериментальних тварин і виявили, що мікроворсинки у мишей NC були щільними та рівними, а у мишей, які отримували HFD, були короткими та рідкісними (рис. 4H, I). У мишей, які отримували HFD, спостерігався інтенсивний витік електронно-щільної плями; проте цілісність кишечника була збережена під час лікування ВІС.

2.4.3. Дослідження механізму за допомогою системи потрійної культури in vitro

Ефективність мікробіоти кишечника з втручанням ВІС щодо здоров'я кишечника була додатково визначена у системі потрійної культури клітин *Caco2*, клітин THP та мікробіоти, обробленої ВІС. Як показано на малюнку 5A, транслункові фільтри з диференційованими клітинами THP-1 переносили в 12-лункові планшети, що містять клітини *Caco-2*, і інкубували з кишковою бактеріальною суспензією від NCD (Co-NCD), WD (Co-WD) або Миші НВІС (Co-VIC) протягом 24 годин. Як показано на малюнку 5B, міграція клітин THP збільшувалася бактеріями від мишей WD, тоді як це явище пригнічувалося бактеріальною суспензією групи ВІС. Аналіз методом проточної цитометрії також показав, що кількість інфільтрованих моноцитів (F4/80+/CD11b+) була вищою, але частка фенотипу M2 та співвідношення M1/M2 були нижчими у групі Co-WD порівняно з групою Co-NCD. (Малюнок 5C,D; малюнок S14, допоміжна інформація). Зразки бактерій від мишей ВІС обернули цей ефект назад. Крім того, зразки WD індукували значне збільшення експресії *il-6*, *il1b* і *tnf-a* та зниження експресії *zo-1* та оклюдина у клітинах *Caco-2* (рис. 5E, F, H). Цей запальний стан був пригнічений, а цілісність відновлена після обробки зразками ВІС.

2.5. ВІС покращує динаміку імунних клітин та функцію печінки

З часом хронічний дисбіоз може збільшити поширеність різних захворювань, порушуючи кишкову екосистему та переміщуючи бактерії та продукти їхнього метаболізму через слизовий бар'єр. Тому ми вивчали вплив на внутрішній стан мишей *Aro^e(-/-)* після змін у кишечнику.



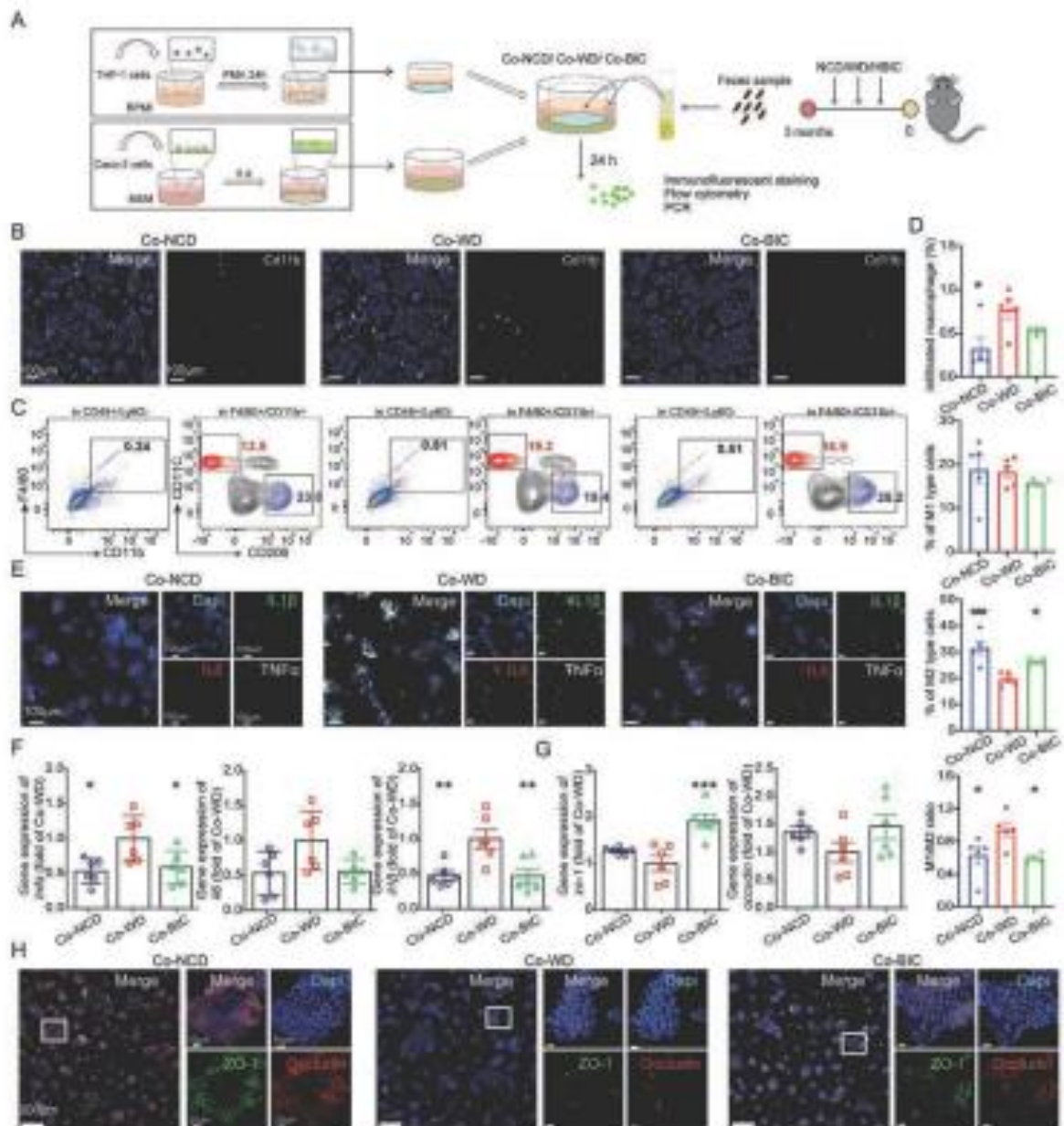
Малюнок 4. ВІС покращує здоров'я кишечника мишей *Aroe(-/-)*, які отримували HFD. А) Репрезентативні проточні цитометричні профілі нейтрофілів, ДК та моноцитів у кишечнику. Виділення імунних клітин із власної платівки кишечника (LP) (описано в розділі «Матеріали та методи») фарбували маркерами імунних клітин. Нейтрофіли були відібрані як клітини CD11b⁺/Ly6G⁺ з популяцій CD45⁺/CD3⁻/CD14⁻ (верхня лінія); Клітини DC були відібрані як клітини CD11c⁺/Ly6G⁻ з популяцій CD45⁺/CD3⁻/CD14⁻ (верхня лінія); моноцити були відібрані як клітини F4/80⁺/Cd11b⁺ із популяцій CD45⁺/Ly6G⁻ (нижній рядок). В) Відсоток нейтрофілів, ДК та моноцитів. С) Репрезентативні проточні цитометричні профілі клітин Th1, Th2, Treg та Th17 у тканині кишечника. Клітини Th2 були включені як клітини CD4⁺/IL4⁺ у лімфоцити CD45⁺ (перша лінія); Клітини Th1 були включені як CD4⁺/INF⁺ клітини CD45⁺ лімфоцити (друга лінія); Клітини Treg були включені як клітини CD4⁺/FoxP3⁺ у лімфоцити CD45⁺ (третя лінія); Клітини Th17 були включені як CD4⁺/IL17⁺ клітини CD45⁺ лімфоцити (четверта лінія). D) Відсоток клітин Thelp1, Thelp2, Treg та Thelp17. E) Репрезентативні зображення келихоподібних клітин із використанням фарбування АВ-PAS. Области інтересу (ROI) обведені червоним, а їх збільшені фотографії показані праворуч. F) Репрезентативні зображення мультиімуннофлуоресцентного фарбування для ZO-1 (зелений) та OCLN (червоний). Области інтересу (ROI) виділені білим кольором, які збільшені фотографії показані праворуч. G) Експресія генів zo-1 та оклюдина у зразках. Тотальну РНК екстрагували з тканин кишечника та аналізували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі на zo-1 та оклюдин, результати нормалізували за GAPDH. H) ВІС покращує щільність та довжину мікрворсинок (червона пунктирна лінія). I) ВІС покращує кишкову непрхідність (біла стрілка). Зразки фіксували і обробляли подвійним фарбуванням свинцем і ураном, після чого досліджували за допомогою електронної мікроскопії, що просвічує (ПЕМ). Дані представлені як середнє SEM (n = 5). Вказані значні відмінності: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 порівняно з WD за однофакторним тестом ANOVA.

2.5.1. ВІС змінює біометаболіти у кровотоку

Ми вперше виявили стан ендотоксину у кровотоку. Як показано на малюнку 6А, рівні ТМА, ТМАО та LPS були підвищені у мишей WD, тоді як ВІС сприяв зниженню таких змін.

2.5.2. ВІС покращує динаміку системних імунних клітин

Нещодавнє дослідження показало, що мікробіота кишечника значно впливає на системну імунну відповідь [39]. 6В, С). Стратегія стробування показана на малюнках S15 та S16 (додаткова інформація).



Малюнок 5. Вплив кишкової флори із втручанням ВІС на епітеліальні клітини кишківника (Caco2). Схема експерименту показано на (А). Фекалії, зібрані від мишей у кожній групі, додавали до системи спільного культивування THP-Caco2 на 24 години. Оцінювали інфільтрацію та поляризацію моноцитів, прозапальні цитокіни та щільну сполуку. В) Репрезентативне зображення імунофлуоресцентного фарбування моноцитів (CD11b, білий). С) Репрезентативні проточні цитометричні профілі інфільтрації та поляризації моноцитів. Репрезентативне зображення моноцитів (ліворуч) та макрофагів типу M1/M2 (праворуч) у зразках ізольованих клітин на проточному цитометрі. D) Відсоток моноцитів, макрофагів типу M1, макрофагів типу M2 та співвідношення макрофагів M1/M2. E) Репрезентативні кольорові імунофлуоресцентні зображення, пофарбовані фарбуванням IL-6 (червоний), IL-1/J (зелений) або TNF-а (білий) у зразках клітин. F) Експресію мРНК *il6*, *il1b* і *tnfa* у клітинах Caco2 оцінювали за допомогою RT-PCR. Результати були нормалізовані до GAPDH. G) Експресію мРНК *zo-1* та *occludin* в клітинах Caco2 оцінювали за допомогою ВІД-ПЛР. Результати були нормалізовані до GAPDH. H) Репрезентативні багатобарвні імунофлуоресцентні зображення, пофарбовані ZO-1 (зелений) та OCLN (червоний) у зразках клітин. Області інтересу (ROI) виділені білим кольором, які збільшені фотографії показані праворуч. Дані представлені як середнє SEM (n = 4). Вказані значні відмінності: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 порівняно з WD за однофакторним тестом ANOVA. Позначка шкали: 100 мкм для (B) та €; 200 мкм для (H) (ліворуч); 20 мкм для (H) (праворуч).

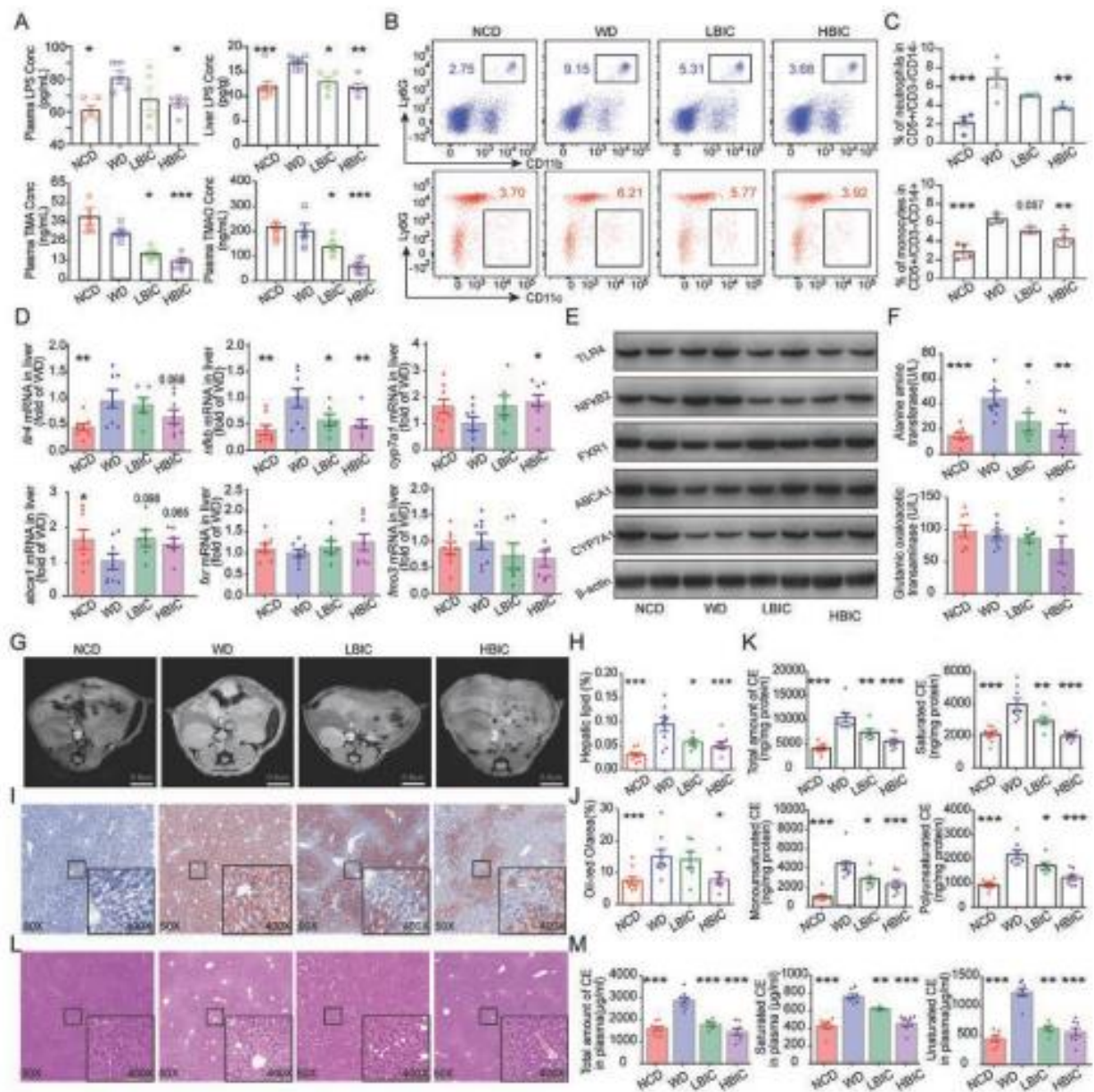


Рисунок 6. ВІС покращує імунологічний та метаболічний статус у мишей *ApoE(-/-)*. Мишам *ApoE(-/-)*, які отримували HFD, давали LBIC або HBIC через шлунковий зонд. Як контроль використовували необроблених мишей, яких годували HFD (WD) та стандартним кормом (NCD). А-а) масу тіла в кожній групі реєстрували щотижня протягом наступних 20 тижнів; А-б) споживання їжі реєстрували щотижня протягом наступних 20 тижнів. А, вгорі) вміст LPS у печінці та плазмі; А, унизу) концентрація ТМА та ТМАО, визначена за допомогою РХ/МС у зразках плазми. В, вгорі) репрезентативна проточна цитометрія для нейтрофілів у плазмі; В, унизу): репрезентативна проточна цитометрія для моноцитів у плазмі. С) Відсоток нейтрофілів та моноцитів. D) Експресію мРНК NF-κB, Toll-подібного рецептора 4 (TLR4), ABCA1, CYP7a1, FMO та FXR1 у тканині печінки оцінювали за допомогою RT-PCR. Результати були нормалізовані до GAPDH. E) Експресію білків NF-κB, TLR4, ABCA1, CYP7a1 і FXR1 у тканині печінки оцінювали вестерн-блотом, β-актин використовували як контроль. E) рівні АЛТ та АСТ визначали ферментативними методами. G) Репрезентативні зображення МРТ, протестированні з використанням МРТ мелких живих тварин 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. ВІС покращує функцію печінки

Печінка, що тісно контактує з кишечником, піддається впливу значної кількості бактеріальних компонентів та їх метаболітів. Декілька досліджень пов'язують дисбаланс кишкової мікробіоти з низкою серцево-судинних метаболічних захворювань через вісь печінка-кишка. Як показано на рис. 6D, E, експресія *tlr4* і *nfkb* пригнічувалася втручанням ВІС, тоді як експресія *sur7a1* та *abca1* відновлювалася введенням ВІС. Не було виявлено жодних змін в експресії *fxr*, але було виявлено зміну *fmo3* (що має вирішальне значення для утворення ТМАО), яка була знижена після введення ВІС. Подальші дослідження показали, що вплив ВІС покращував рівень аланінамінотрансферази (АЛТ) у мишей *ApoE(-/-)*, які отримували HFD (рис. 6F). Магнітно-резонансна томографія (МРТ) печінки показала значно більшу кількість ліпідів у печінці у мишей з HFD, ніж у мишей з NCD, і лікування ВІС різко змінювало таке збільшення залежно від дози (рис. 6G, H; рис. S17A, допоміжна інформація); Забарвлення червоним маслянистим O дало аналогічні результати (рис. 6I, J). Примітно, що рівні CE у печінці (включаючи загальний CE, насичений CE, поліненасичений CE та мононенасичений CE) були значно нижчими у групі, що отримувала HFD, ніж у групі NCD, та були значно знижені після введення ВІС залежно від дози (рис. 6K). малюнок S17B, допоміжна інформація). Забарвлення HE показало, що порушення функції печінки, такі як стеатоз і здуття живота, були зменшені у мишей, які отримували ВІС (рис. 6L).

2.5.4. ВІС модулює метаболізм холестерину та статус запалення

Розвиток АС є складним процесом, основними чинниками якого є дисліпідемія та хронічне запалення. Лікування ВІС не викликало серйозних змін маси тіла, споживання їжі та рівня глюкози в плазмі у мишей *ApoE(-/-)*, які отримували HFD, але знижувало рівні CE у плазмі (рис. 6M; рис. S18, допоміжна інформація). . Потім ми досліджували 23 цитокину плазми у експериментальних мишей і виявили, що лікування ВІС знижує експресію прозапальних факторів, таких як *IL1a*, *IL1b*, *IL2*, *IL6*, *IL9*, *IL12(p40)*, *IL12(p70)*, *G-CSF*, *KC*, *TNF. -a*, *IL17* та *MIP-1b*, але збільшили експресію протизапальних факторів, включаючи *IL3*, *IL4*, *IL10*, *IL13* та *IL14* (рисунок S19, допоміжна інформація).

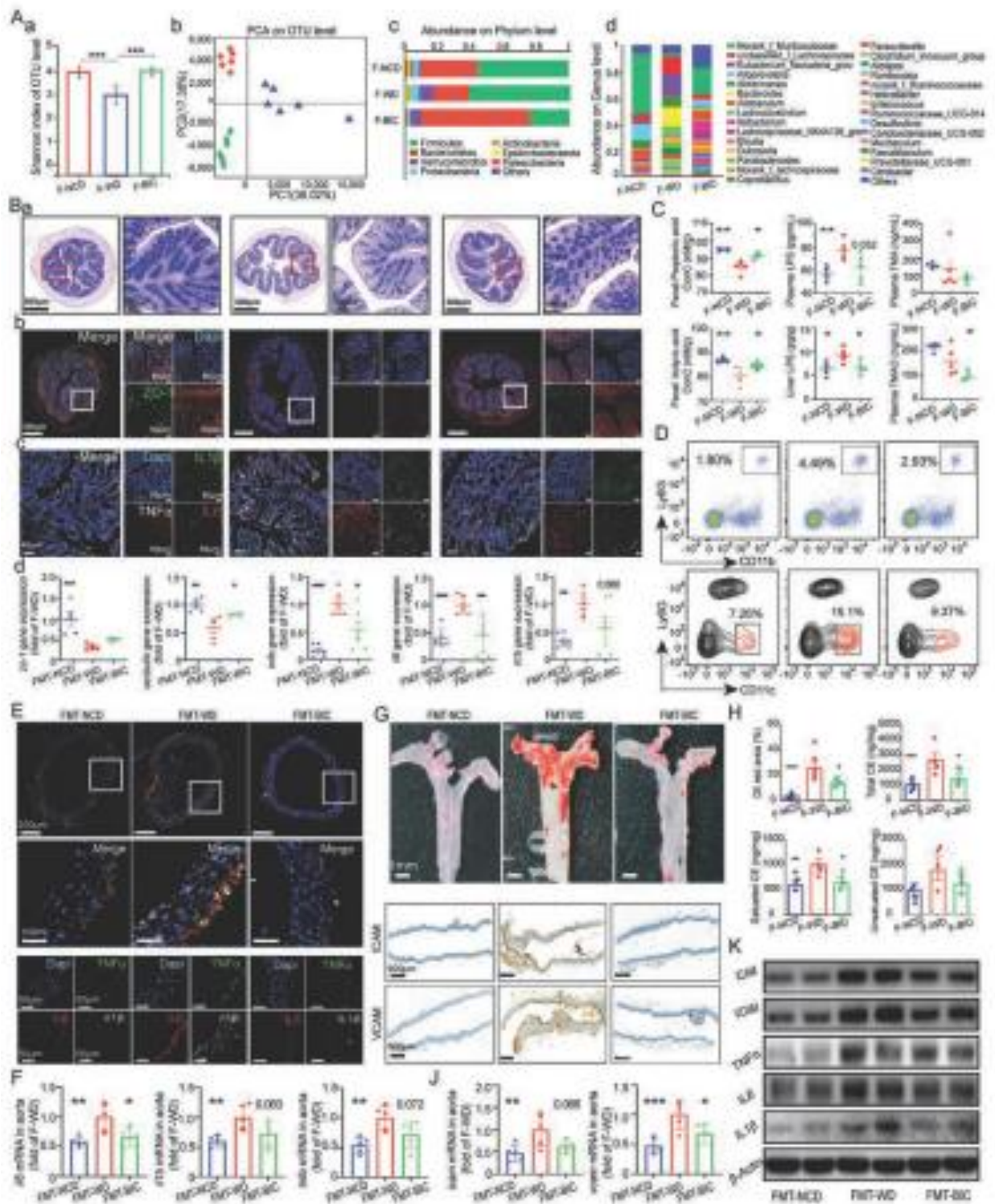
2.6. Терапевтичний ефект ВІС на АС передавався через ТФМ

Щоб визначити, чи залежать анти-АС ефекти ВІС від мікробіоти кишечника, ТФМ використовували у мишей-реципієнтів *ApoE(-/-)* через шлунковий зонд із зразками фекалій, витягнутими у мишей, які отримували стандартний раціон (F-NCD), HFD (F-WD) і мишей-донорів, які отримували ВІС (F-VIC). Як показано на малюнку 7A-a та малюнку S20 (допоміжна інформація), миші-реципієнти у групі F-WD показали нижчу чисельність та різноманітність кишкових бактерій порівняно з мишами у групі F-NCD; однак цей ефект був частково зворотним у мишей F-VIC. PCA та PCoA показали, що загальна структура кишкового мікробіома мишей F-WD зміщена порівняно з мишами F-NCD. Однак зсув вздовж PC1 у мишей F-VIC зворотний (рис. 7A-b; рис. S21A, допоміжна інформація); Частковий дискримінантний аналіз методом найменших квадратів (PLS-DA) показує аналогічну тенденцію (рисунок S21B, допоміжна інформація). Таксономічний склад мікробіома кишечника реципієнта припускав, що шлунковий зонд з фекаліями мишей WD знижував відносну кількість *Bacteroidetes*, збільшував відносну кількість *Firmicutes*, *Actinobacteria* та *Proteobacteria*, тоді як фекалії донорів ВІС відновлювали ці зміни (рис. 7A-c). Зміни складу мікробіоти кишечника у мишей-реципієнтів відповідали таким у мишей-донорів (рис. 7A-d; рис. S22, допоміжна інформація).

Згодом оцінювали вміст метаболітів кишкової мікробіоти, включаючи LPS, SCFAs та TMA, після FMT. Як видно на малюнку 7C, рівні LPS у плазмі та печінці були вищими у мишей F-WD, ніж у мишей F-NCD, і пригнічувалися втручанням з фекаліями мишей, що отримували ВІС. Рівні дев'яти основних SCFAs вимірювали у фекаліях мишей-реципієнтів. Результат показує, що кількість пропіонату та бутирату було значно нижчою у мишей F-WD, ніж у мишей F-NCD, тоді як обробка фекаліями мишей ВІС збільшувала рівні як бутирату, так і пропіонату. Крім того, рівні ТМАО та бетаїну в плазмі були нижчими у мишей F-ВІС, ніж у мишей F-WD (рис. S23, допоміжна інформація). Крім того, цілісність кишечника у мишей F-ВІС була кращою, ніж у мишей F-WD. Як показано на малюнку 7B, у мишей Aro(-/-) у групі F-WD було менше келихоподібних клітин та білків щільної сполуки епітелію, ніж у групі F-NCD. FMT з фекаліями мишей, які отримували ВІС, запобігає цьому виснаженню та підтримує нормальний рівень (рис. 7B-a, b). Експресія цитокінів, включаючи TNF- α , IL-1/ та IL-6, була значно вищою у тканині кишечника мишей F-WD, ніж мишей F-NCD, але зверталася назад при лікуванні ВІС (рис. 7B-c). Ефект втручання також підтверджено аналізом RT-PCR (рис. 7B-d).

Крім того, відсоток нейтрофілів та моноцитів у циркуляції був підвищений у мишей F-WD, але шлунковий зонд з фекаліями мишей ВІС пригнічував це збільшення (рис. 7D; Рис. S24, допоміжна інформація). Стратегію стробування показано на малюнку S25 (допоміжна інформація). Потім ключові молекули, включаючи TLR4, NF- κ B, FMO, FXR, ABCA1 та Сур7a1, оцінювали у мишей-реципієнтів. Як показано на малюнку S26 (допоміжна інформація), експресія NF- κ B була знижена, тоді як експресія ABCA1 підвищувалася у мишей, які отримували фекалії від донорів, які отримували ВІС. ТФМ з фекаліями мишей ВІС також зменшувала пошкодження печінки (малюнок S27, додаткова інформація), знижувала рівень холестерину в плазмі (малюнок S28, підтверджуюча інформація) та полегшувала хронічне запалення (малюнок S29, підтверджуюча інформація), викликане фекаліями.

Згодом у мишей F-ВІС спостерігалось зниження активації епітелію та експресії запального фактора порівняно з мишами F-WD (рис. 7E, F, K). Отже, у мишей F-ВІС було виявлено менше накопичення ефірів холестерину та ураження аорти порівняно з мишами F-WD (рис. 7G, H) на додаток до модуляції мікробіоти кишечника. Ці результати показали, що переваги ВІС можуть бути принаймні частково пов'язані з його впливом на мікробіоту кишечника.



Малюнок 7. Терапевтичний ефект BIC на AS передався FMT. Свіжі зразки фекалій, вилучені з груп NCD, WD і HBIC, вводили внутрішньощлунково мишам *ApoE(-/-)* протягом наступних 3 місяців. Наприкінці експерименту збирали та аналізували свіжі фекалії мишей-реципієнтів. А) Структура мікробіоти кишківника мишей-реципієнтів *ApoE(-/-)*. А-а) Різноманітність та багатство кишкових бактерій та індекс Шеннона рівня OUT; А-б) реакція структур кишкової мікробіоти на різні групи тварин, графік PCA; А-с) аналіз секвенування гена 16S рРНК на рівні типу; А-д) Аналіз секвенування гена 16S рРНК лише на рівні роду. В) ТФМ із BIC відновив здоров'я кишечника. В-а) Репрезентативні зображення келихоподібних клітин з використанням фарбування АВ-PAS. Області інтересу (ROI) обведені червоним, які збільшені фотографії показані праворуч; В-б) Репрезентативні зображення мультиімунофлуоресцентного фарбування для ZO-1 (зелений) та OCLN (червоний). Області інтересу (ROI) виділені білим кольором, а їх збільшені фотографії показані праворуч; В-с) Репрезентативні зображення мультиімунофлуоресцентного фарбування для TNF α (білий), IL1 β (зелений) та IL6 (червоний); В-д) експресія генів *zo-1*, *occludin*, *il6*, *il11* або *tnfa* у зразках. Тотальну РНК екстрагували з тканин кишечника та аналізували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі; результати були нормалізовані до GAPDH. С) Біометаболіти, що продукуються кишковими бактеріями, у мишей-реципієнтів *ApoE(-/-)*. С, (зліва): рівні пропіонової та оліїної кислот у фекаліях; С, (посередині): вміст ЛПС у печінці та плазмі; С, (праворуч) концентрація TMA та TMAO,

визначена за допомогою РХ/МС у зразках плазми. D, вгорі): репрезентативна проточна цитометрія нейтрофілів у плазмі; D, внизу): репрезентативна проточна цитометрія для моноцитів у плазмі D) Відсоток нейтрофілів та моноцитів. E) Репрезентативні багатобарвні імуофлуоресцентні зображення, пофарбовані фарбуванням ІL-6 (червоний), ІL-1/ (білий) або TNF-а (зелений) у тканинах аорти. Области інтересу (ROI) виділені білим кольором, а збільшені фотографії показані нижче. F) Експресію мРНК іl6, іl1b і tnfa у тканині аорти оцінювали за допомогою RT-PCR. Результати були нормалізовані до GAPDH. G) Репрезентативне зображення ураження дуги аорти у мишей-реципієнтів Aroe(-/-). H) Поразка аорти та ефір холестерину (CE) в артерії. Атеросклеротичні ураження дуги аорти вимірювали у відсотках від діаметра просвіту. Складний ефір холестерину (XE) в артерії оцінювали з використанням методу УВЕРХ-МС/МС. I) Репрезентативне зображення ICAM та VCAM за допомогою імуногістохімічного аналізу. J) Експресію іcam та vcam мРНК у тканині аорти оцінювали за допомогою RT-PCR. Результати були нормалізовані до GAPDH. K) Експресію білків ICAM, VCAM, ІL-6, ІL-1/J та TNF-а у стінці аорти оцінювали вестерн-блотом, β-актин використовували як контроль. Дані представлені як середнє SEM (n = 5). Вказані значні відмінності: *p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 порівняно з WD за тестом One-way ANOVA. Позначка шкали 100 мкм (B), (D) та (E).

3. Обговорення

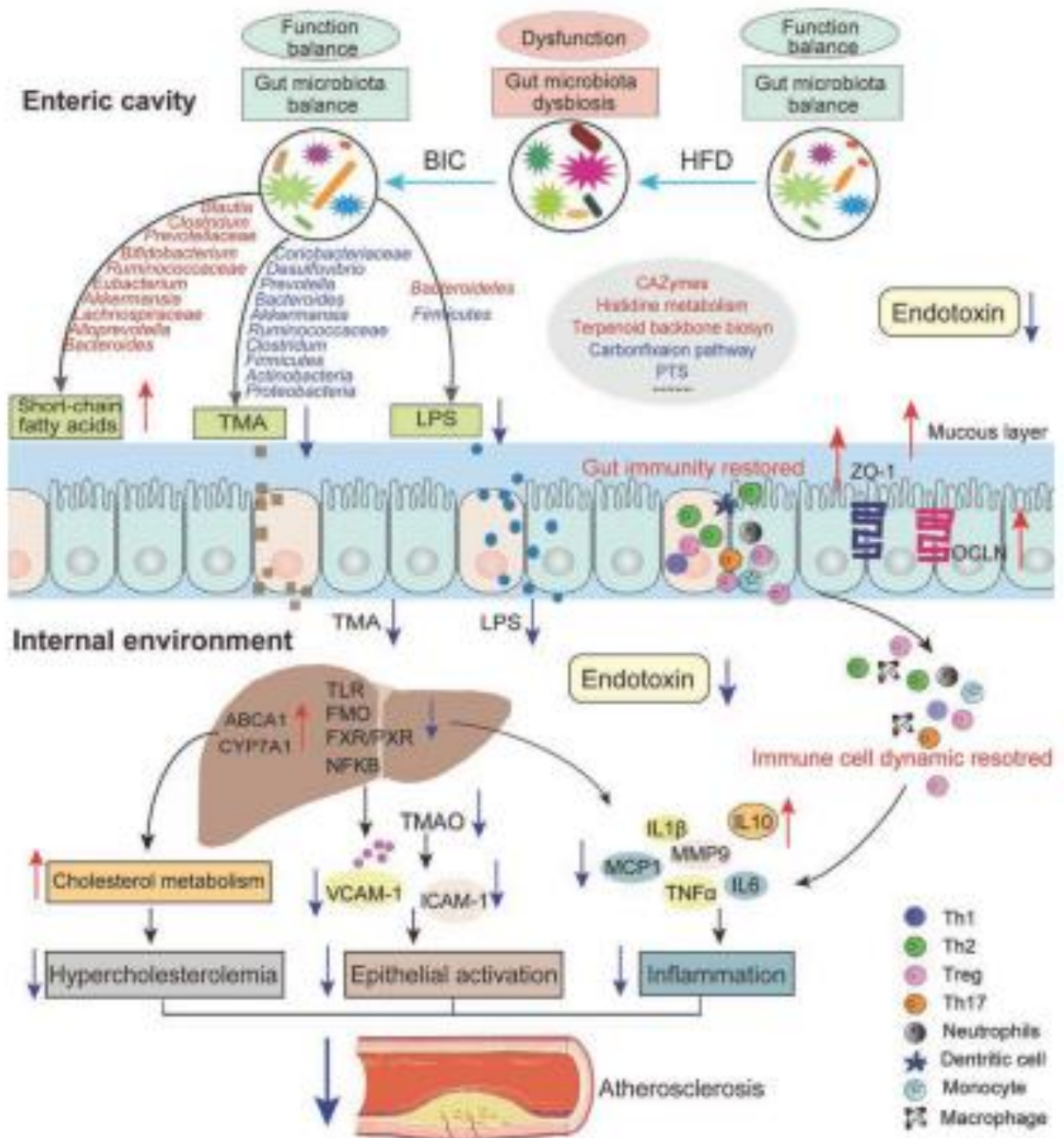
Це перше дослідження, в якому з'ясовуються анти-АС ефекти ВІС з точки зору мікробіоти кишечника, що показують, що ВІС ефективно модулює склад, функцію та вироблення ендогенних метаболітів кишкової мікробіоти у мишей Aroe(-/-), які отримували HFD. Здоров'я кишечника було відновлено, що покращило динаміку системних імунних клітин та функції печінки та призвело до зміни хронічного запалення та обігу назад транспорту холестерину (RCT). Отже, ендотеліальна активація, інфільтрація макрофагів та накопичення CE у дузі аорти були ослаблені, викликаючи меншу появу бляшок при введенні ВІС (механізм показаний на малюнку 8).

Мікробіом кишечника є унікальною і складною екосистемою, в якій мешкають трильйони бактерій, які мають тенденцію зв'язуватися з господарем мутуалістичним/коменсальним або опортуністичним/паразитарним чином. Зміни в кишковій мікробіоті стали однією з найбільш надійних детермінантів багатьох хронічних станів, включаючи АС, і пролили нове світло на розробку нових терапевтичних втручань [4]. Численні дослідження показали, що різноманітність та багатство кишечника мікробіома пов'язані з хорошим здоров'ям, тоді як низька різноманітність пов'язана з хворобами [40]. Як правило, люди з низьким бактеріально-генетичним розмаїттям демонструють більш високі рівні резистентності до інсуліну, тригліцеридів у сироватці, холестерину та маркерів запалення, а також підвищену вагу/ІМТ порівняно з для людей з високою різноманітністю[41]. У цьому дослідженні миші Aroe(-/-), які отримували HFD, демонстрували помітно низьку чисельність та різноманітність кишкових бактерій; проте цей ефект був значно звернений з допомогою ВІС. Ми також виявили, що ВІС відновлює відносну чисельність Bacteroidetes та співвідношення Bacteroidetes/Firmicutes, порушене HFD. Подальший аналіз показав, що ВІС модулював склад кишкової мікробіоти на всіх рівнях мишей Aroe(-/-), які отримували HFD, порівняно з рівнями, що спостерігаються у мишей NCD. Крім того, було повідомлено про сім найбільш значно збільшених пологів бактерій, що захищають від АС, тоді як деякі пологи, які позитивно корелювали з рівнями ТМАО, були знижені в групах, які отримували ВІС. Примітно, що кілька пологів, що генерують SCFA, були збільшені за рахунок ВІС, тоді як рівні бактерій, пов'язаних із продукцією ТМА/ТМАО, були знижені.

Щоб додатково інтерпретувати вплив та механізм ВІС на флору кишечника, ми інкубували фекалії мишей WD з ВІС та провели аналіз MWAS з використанням повногеномного секвенування дробовика з великою глибиною (в середньому 13 Gbp/зразок). Наш MWAS складався із чотирьох основних біоінформаційних аналітичних конвеєрів: філогенетичний аналіз (таксономічні зміни), аналіз генів CAZyme, аналіз білків та аналіз шляхів). Тести філогенетичних контрольних асоціацій ВІС показали високу чисельність видів, включаючи *Lactobacillales_murinus*, *Lactobacillales_animalis* та *Lactobacillales_johnsonii*. Попередні дослідження припускали, що введення *Lactobacillus murinus* може знизити рівень

системного запалення, [28] придушити розвиток коліту, [29] та запобігти викликаній сіллю солечутливою гіпертензією [30]. Оскільки було важко виявити види рівня з використанням аналізу послідовності 16S рРНК, ці результати довели переваги метагеномного секвенування дробовика у визначенні механізму ВІС на мікробіоті кишечника. У мікробіомі кишечника гени, що кодують CAZymes, становлять особливий інтерес, оскільки вони мають вирішальне значення для перетравлення складного полісахариду за допомогою анаеробної ферментації та виробництва SCFAs. У цьому дослідженні всі типи CAZymes, особливо GH і PL (два типи ферменту, що розщеплює глікозидні зв'язки), були вищими в кишковій флорі, обробленій ВІС, порівняно з контрольною групою. Відповідно, різні біологічні шляхи, у тому числі пов'язані з ендогенними метаболітами (наприклад, метаболізм гліцину, серину, треоніну для утворення ТМА та взаємоперетворення пентози та глюкуронату для утворення SCFA), були збагачені порівняно з ВІС-контролем.

Ендогенні метаболіти є ключовими факторами, що пов'язують кишкову флору з різними захворюваннями. Відповідно до змін у мікробіомі кишечника наші результати показують, що концентрація ТМА і ЛПС знижувалася, тоді як рівні бутирату та пропіонату збільшувалися при дії ВІС. SCFAs корисні для енергетичного метаболізму, розвитку ентоцитів та кишкового імунітету[42]. У цьому дослідженні імунітет та цілісність кишечника, порушені HFD, були відновлені введенням ВІС. Цікаво, що інкубація системи спільного культивування THP-Caco2 з бактеріями, обробленими ВІС, знижувала інфільтрацію та поляризацію моноцитів за типом M1, тоді як утворення щільних сполук збільшувалося, але рівень прозапальних цитокінів знижувався. Після цього було виявлено, що відсоток моноцитів та нейтрофілів у циркуляції значно знизився за втручання ВІС. Це явище узгоджується з результатами недавнього дослідження, в якому мікробіота кишечника може впливати на системну імунну відповідь [39].



Малюнок 8. Короткий опис механізму BIC. BIC ефективно модулює склад, функцію та вироблення ендогенних метаболітів мікробіоти кишечника. Здоров'я кишечника, відновлене за допомогою BIC, позитивно впливає на динаміку системних імунних клітин та функції печінки, що призводить до зменшення хронічного запалення та гіперхолестеринемії. Отже, активація ендотелію, інфільтрація макрофагів та накопичення ефірів холестерину (EX) у дузі аорти були ослаблені, викликаючи меншу появу бляшок.

Печінка є важливим місцем, яке пов'язує мікробіоту кишечника із внутрішнім середовищем. Він перебуває у тісному контакті з кишечником і піддається впливу багатьох бактеріальних компонентів та його метаболітів. Контакт з кишковими метаболітами та ендотоксинами може призвести до хронічного захворювання печінки, що посилює формування АС. ТМАО є продуктом окислення кишкового мікробного метаболіту при метаболізмі печінковими флавінмонооксигеназ (ФМО) [43]. Зв'язок між ТМАО та серцево-судинними захворюваннями був відзначений кількома групами, що використовують різні глобальні когорти [44]. Нещодавнє дослідження показало, що ТМАО зменшує експресію холестерину 7-альфа-гідроксилази 1 (CYP7a1), ферменту, що обмежує швидкість синтезу ВА в катаболізмі холестерину, що призводить до порушень RCT та підвищення рівня

холестерину[45]. LPS, компонент зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій, був вивчений при АС[46]. Приплив LPS у внутрішню систему активує відповідні PRR у печінці і запускає нижчі запальні каскади за участю ядерного фактора каппа-В (NF- κ B) та мітоген-активованої протеїнкінази, щоб індукувати інфільтрацію імунними клітинами [47]. Активація TLR, індукована LPS, може знижувати експресію CYP7a1 у печінці, блокуючи експресію АТФ-зв'язувальних касетних транспортерів, A1 та G1, та зменшуючи фекальну екскрецію холестерину за допомогою синтезу ВА. У цьому дослідженні ми спостерігали стрибки рівнів LPS та ТМА у печінці мишей Aro κ (-/-), які отримували HFD, проте 20 тижнів лікування ВІС зменшували ці підвищення. Відповідно, критичні молекули, описані вище, включаючи TLR4 та NF- κ B, FXR, FMO3, ABCA1 та CYPa1, були скориговані за допомогою втручання ВІС. Грунтуючись на змінах у динаміці клітин системного імунітету та функціях печінки, ВІС звертав назад хронічне запалення та знижував концентрацію СЕ у печінці та плазмі.

АС є багатадійним захворюванням, у якому активація ендотелію було визнано першим важливим етапом у появі бляшок[22]. Декілька досліджень показали, що запалення є основним патогенним фактором [21]. Хронічне запалення підвищує експресію найважливіших молекул адгезії, ICAM-1 та VCAM-1, в ендотеліальних клітинах, тим самим збільшуючи клітинну адгезію та полегшуючи залучення моноцитів та інших ефektorів із системи кровообігу. ox-LDL в інтимі, що призводить до ряду клітинних подій, що викликають клітинну атерогенну відповідь [22]. Зв'язок між системним запаленням та ендотеліальною дисфункцією широко підтверджується клінічними та експериментальними даними [48]. У цьому дослідженні ВІС покращився. хронічне запалення та недієздатність RCT, індуковані HFD у мишей Aro κ (-/-), тим самим послаблюючи активацію ендотелію, інфільтрацію макрофагів та накопичення СЕ у дузі аорти та, нарешті, полегшуючи виникнення бляшок. Природні сполуки - дорогоцінні дари матері-природи. Дослідження кишкового мікробіома пролило нове світло на наше розуміння механізму, що лежить в його основі. У цьому дослідженні ми підтвердили, що ВІС може регулювати склад та функцію кишкової мікробіоти та змінювати вироблення кишкових біометаболітів, покращуючи метаболізм ліпідів та стан запалення, що вказує на корисне лікування АС. Тим не менш, необхідно зробити додаткову роботу, наприклад, з'ясувати точні молекулярні механізми впливу ВІС на кишкову флору, визначити більш функціональні метаболіти та їх механізми впливу на фізіологічне здоров'я.

4. Висновок

Це дослідження продемонструвало, що ВІС полегшує АС, викликаний HFD, у мишей Aro κ (-/-). ВІС відновлює гомеостаз мікробіоти кишечника, регулює біометаболіти, пов'язані з кишечником, та покращує здоров'я кишечника. Системно динаміка імунних клітин та функція печінки покращувалися, що призводило до зміни хронічного запалення та гіперхолестеринемії. Отже, ВІС послаблював активацію ендотелію, інфільтрацію макрофагів та накопичення СЕ у дузі аорти, полегшуючи появу бляшок. Дане дослідження є першим, що демонструє антиатеросклеротичні ефекти ВІС і вказує на те, що терапевтичні ефекти ВІС на АС принаймні частково опосередковані мікробіотою кишечника.

Допоміжна інформація

Додаткову інформацію можна отримати в онлайн-бібліотеці Wiley або автора.

Подяки

Ця робота була проведена за підтримки Національного ключового проекту досліджень та розробок (№ 2019YFC170890, Китай), Національного фонду природничих наук Китаю (№ 81621064), Інноваційного фонду CAMS для медичних наук (№ 2021-I2M-1-009, 20 -030 та 2021-I2M-1-070) та Національного масштабного проекту в галузі науки і техніки (№ 2018ZX09721003-008-026). Дослідження було схвалено Лабораторним комітетом з догляду та використання тварин Китайської академії медичних наук та проводилося відповідно до керівних принципів та етичних норм Китайської ради з догляду за тваринами (номер дозволу: 00005970).

Конфлікт інтересів

Автори заявляють про відсутність конфліктів інтересів.

Внесок автора

X.-L.L., J.-J.C., W.-S.Z. та J.-L.Z. однаково зробили свій внесок у цю роботу. 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 та PD виконані експерименти та аналітичні методи. LLW, YC та J.-D.J запропонували та розробили експерименти, інтерпретували та обговорили дані, а також розглянули та відредагували рукопис. L.-L.W., Y.C. та J.-D.J. розробили гіпотезу, скоординували проект та написали рукопис.

Заява про доступність даних

Дані, що підтверджують результати цього дослідження, можна отримати у відповідного автора на обґрунтований запит.

Ключові слова

атеросклероз, біцикл, кишкова мікробіота, повногеномні асоціативні дослідження

Отримано: 20 серпня 2021 р.

Переглядів: 9 грудня 2021 р.

Опубліковано в мережі: 27 січня 2022 р.