

Біцикллол зменшує прояви атеросклерозу, впливаючи на кишкову мікробіоту

Сяо-Лінь Лі 1, Джин-Джин Цуй 2, Вень-Шен Чжен 1, Цзінь-Лан Чжан 1, Руй Лі 1, Сяо-Лей Ма 1, Мяо Лінь 1, Хуей-Хуей Го 1, Конг Лі 1, Сяо-Ю Ю 1, Пен Ду 1, Лі-Мін Чжао 1, Шуванг Хе 3, Пей Лан 1, Цзянь-Дун Цзян 1 2, Юншен Че 2, Лу-Лу Ван ^{1 2}

- PMID: 35088527
- DOI: [10.1002/смл.202105021](https://doi.org/10.1002/смл.202105021)

1. Державна ключова лабораторія біоактивних речовин та функцій натуральних лікарських засобів, Інститут Матеріа Медика, Китайська академія медичних наук та Медичний коледж Пекінського союзу, 100050, Китай;

2. Інститут медичної біотехнології, Китайська академія медичних наук та Пекін. Медичний коледж Спілки, 100050, Китай

3. Фармацевтичний коледж Шаньдунського університету, 250012, Китай.

#: Рівний внесок у цю роботу.

Кореспонденцію слід надсилати на адресу: Лу-Лу Ван (wanglulu@imm.ac.cn) або Юншен Че (cheyongsheng@163.com) або Цзянь-Дун Цзян (jiang.jdong@163.com)

ВСТУП

Атеросклероз (АС) пов'язаний із високою захворюваністю та смертністю, що лягає все зростаючим тягарем на сучасне суспільство. Біцикллол рослинного походження (ВІС) є універсальною біоактивною сполукою, яку можна використовувати для лікування АС. Однак його ефективність при АС ще не описано. Тут показано, що ВІС нормалізує дисбактеріоз кишкової мікрофлори, викликаний дієтою з високим вмістом жирів у Арое (-/-) мишей. Аналіз метагеномних асоціацій підтверджує, що модуляція вуглевод-активних ферментів і генів, що генерують коротколанцюгові жирні кислоти, у кишкочній флорі є одним із механізмів. Здоров'я кишечника, особливо імунітет та цілісність кишечника, відновлюються за допомогою втручання ВІС, що призводить до покращення динаміки системних імунних клітин та функцій печінки. Відповідно, ендотеліальна активація, інфільтрація макрофагів та накопичення ефірів холестерину в дузі аорти полегшуються ВІС, що зменшує виникнення бляшок. Понад те, доведено, що терапевтичний ефект ВІС на АС передається при трансплантації фекальної мікробіоти. Поточне дослідження вперше демонструє антиатеросклеротичні

ефекти ВІС і показують, що його терапевтичне значення може бути принаймні частково пов'язане з його впливом на мікробіоту кишечника.

Ключові слова: атеросклероз; біцикллол (ВІС); мікробіота кишечника; метагеномні

асоціативні дослідження.

Довгострокова безпека

Щоб вивчити довгострокову безпеку ВІС, ми зберегли NCD та ВІС (100 мг/кг) групи лікування протягом п'яти місяців. Забарвлення HE не виявило будь-яких явних гістологічних відмінностей між основними органами оброблених і необроблених мишей (рис. S30), тоді як рівні в плазмі АЛТ, АСТ, креатиніну та азоту сечовини не показали будь-яких чітких відмінностей у групі, що отримувала ВІС та групи контролю, що вказує на те, що ВІС можна безпечно вводити.

матеріали та методи

Лікування тварин

Дослідження схвалили Інституційний комітет з догляду за тваринами та їх використання. Китайської академії медичних наук та проводиться відповідно до керівних принципів та етики Китайської ради з догляду за тваринами (номер затвердження: 00005970). Шість тижнів 2 старі самці мишей Aroe(-/-) (The Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd, Пекін, Китай) були випадково розділені на чотири групи після акліматизації протягом 1 тижня: нормальний контрольний раціон (NCD), нормальна контрольна дієта з біциклолом (200 мг/кг/добу, NBIC через зонд), контрольна дієта з високим вмістом жирів (WD), HFD з біциклолом (100 мг/кг/добу, LBIC через зонд) або (200 мг/кг/добу) , NBIC через зонд). Доза, використана в цьому дослідженні, була заснована на попередніх дослідженнях.1-5 Кожна група складалася з 15 мишей і всі дієти були придбані у Huaifukang Bioscience Co. (Пекін, Китай). Вага тіла та споживання їжі вимірювали щотижня.Через 20 тижнів неінвазивний та кількісний аналіз ліпідів печінки у мишей проводили за спектром ¹H-MPC та MPT, а у мишей голодували протягом ночі перед умертвінням за допомогою хлоралгідрату внутрішньочеревно (300 мг/кг). Плазма зразки збирали та зберігали при температурі -80°C для біохімічного та цитокінового аналізів. Артеріальну дугу, печінку, жир придатка яєчка, селезінку, нирки та тканини кишечника виділяли та зважували негайно. Частину цих тканин фіксували 10% формаліном для гістологічного, ІГХ та ІF-аналіз, а частину, що залишилася, зберігали при температурі -80 °C для подальшого аналізу. Свіжий кал був заморожений у рідкому азоті і зберігається при температурі -80°C для аналізу мікробіоти кишечника.

Для ТФМ використовували стілець мишей групи NCD (миші-донори NCD), мишей групи WD (донори WD мишей) та мишей групи NBIC (миші-донори NBIC) збирали щодня у стерильних умовах. (Номер дозволу: 00000382). Стілець з однієї групи об'єднували, і 200 мг випорожнення з кожної групи суспендували в 2 мл стерильного фізіологічного розчину. Підвіска була енергійно струшували протягом 10 с, супернатант збирали центрифугуванням при 500 g протягом 2 хв і використовують як трансплантаційний матеріал для перорального введення тваринам-реципієнтам в день трансплантації. Мишам Aroe(-/-) (тваринам- реципієнтам) вводили антибіотики, що містять 0,2 г/л ампіциліну, неоміцин, метронідазол і 0,1 г/л ванкоміцину щодня протягом 2 тижнів, через питво вода. Після останньої дози антибіотиків мишей розділили на FMT-NCD (годували HFD, трансфектувати за допомогою NCD), FMT-WD (нагодований HFD, трансфектований на WD) і FMT-BIC (нагодована група HFD, трансфікована ВІС (n=8). 1 мл свіжого трансплантату з мишам-донорам вводили перорально через зонд щодня протягом 3 місяців.Довгострокова безпека in vivo проводилася протягом 5 місяців для вивчення безпеки ВІС.

Для ТФМ використовували стілець мишей групи NCD (миші-донори NCD), мишей групи WD (донори WD мишей) та мишей групи NBIC (миші-донори NBIC) збирали щодня у стерильних умовах. (Номер дозволу: 00000382). Стілець з однієї групи об'єднували, і 200 мг випорожнення з кожної групи суспендували в 2 мл стерильного фізіологічного розчину. Підвіска була енергійно струшували протягом 10 с, супернатант збирали центрифугуванням при 500 g протягом 2 хв і використовують як трансплантаційний матеріал для перорального введення тваринам-реципієнтам в день трансплантації. Мишам Aroe(-/-) (тваринам- реципієнтам) вводили антибіотики, що містять 0,2 г/л ампіциліну, неоміцин, метронідазол і 0,1 г/л ванкоміцину щодня протягом 2 тижнів, через питво вода. Після останньої дози антибіотиків мишей розділили на FMT-

NCD (годували HFD, трансфектувати за допомогою NCD), FMT-WD (нагодований HFD, трансфектований на WD) і FMT-BIC (нагодована група HFD, трансфікована BIC (n=8). 1 мл свіжого трансплантату з мишам-донорам вводили перорально через зонд щодня протягом 3 місяців. Довгострокова безпека *in vivo* проводилася протягом 5 місяців для вивчення безпеки BIC. Самці були поділені на 2 групи, групу BIC, в якій миші були шлункові зонди з BIC (200 мг/кг/добу); та група NCD, мишам якої вводили через шлунковий зонд фосфатно-сольовий буфер (PBS). Наприкінці експерименту всіх мишей забивали вивих шийки матки. Плазму збирали для аналізу АСТ, АЛТ, креатиніну та сечовини азоту для оцінки печінкової та ниркової токсичності відповідно. Крім того, основні органи, у тому числі серце, печінка, селезінку, легені та нирки фіксували 10% формаліном і фарбували HE для оцінки морфологічної зміни.

Біохімічний та цитокіновий аналіз

Рівні плазми АЛТ, АСТ, холестерину, ТГ, ЛПНЩ-с, глюкози, креатиніну та сечовини азот вимірювали з використанням комерційних наборів для аналізу (Biosino, Пекін, Китай), і всі вимірювання проводилися на автоматичному біохімічному аналізаторі TOSHIBA (TOSHIBA Ltd., Японія), відповідно до інструкцій виробника. LPS був виміряний за допомогою імуноферментного аналізу (ІФА) з використанням люмінометра (BioTek Instrument, Inc., Вермонт, Каліфорнія, США) при 450 нм відповідно до інструкцій виробника (Cloud-clone, Ухань, Китай). Рівень СОД у печінці визначали за допомогою комерційних наборів для аналізу. (Нанкінський інститут біоінженерії Цзяньчен, Нанкін, Китай) за даними виробника протоколи.

Люмінекс аналіз

Зразки плазми мишей розморожували та аналізували на системі Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) з використанням набору для аналізу цитокінів, хемокінів та факторів росту Bio-Plex Pro (Bio-Rad), згідно з протоколом виробника. Вимірювані цитокіни включали IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, гранулоцитарний колонієутворюючий фактор (G-CSF), IFN- γ , TNF- α , хемокін, отриманий з кератиноцитів (KC), макрофагальний запальний білок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β та еотаксин, регульований при активації нормальних Т-клітин експресований та секретований фактор (RANTES) та хемоаттрактантний білок-1 моноцитів (MCP-1). Усі виміри проводилися з використанням програмного забезпечення Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad).

ОТ-ПЦР и вестерн-блотінг

Сумарну РНК екстрагували із тканин з використанням набору для очищення РНК TRIzol® Plus. (Invitrogen, Каліфорнія, США) та спектрофотометр ND2000 (Thermo Scientific, Массачусетс, США). Для цього застосовувалася кількісна оцінка ПЛР в реальному часі, набір Power SYBR Green RNA-to-CT One-Step Kit). Дані аналізували методом 2- $\Delta\Delta$ Ст з гліцеральдегід-3-фосфатом. дегідрогенази (GAPDH), що виступає як ендогенний контрольний ген. Реакція повторилася три рази і всі праймери перераховані в таблиці S3.

Таблиця S4.

Гістологічне та імуногістохімічне фарбування

Зразки тканини аорти, печінки та товстої кишки заливали в парафін і нарізали на шматочки товщиною 4 мкм зрізи для подальшого фарбування. Тканини аорти та печінки фарбували HE, щоб спостерігати морфометричне ураження, тканину печінки фарбували Oil Red O для аналізу жиру накопичення. Для оцінки площі атеросклеротичного ураження аорти розрізали поздовжньо, забарвлювали за допомогою Oil Red O і відскановані в цифровому вигляді з використанням програмного забезпечення Image J для кількісної оцінки уражень області аорти. Товсту кишку фарбували AB-PAS для аналізу кількості келихоподібних клітин. Для ІХК, тканина аорти інкубували з анти-ICAM (Servicebio, Ухань, Китай) та анти-VCAM (Cell Signaling Technology,

Массачусетс (США) антитіла протягом ночі при 4 °С. Потім тканини промивали тричі з PBS, інкубували з козячим вторинним антикроличним антитілом (Servicebio) протягом 50 хв при 37°С і дофарбовували гематоксиліном. Імунопозитивні клітини в тканинах спостерігали і сканували за допомогою світлового мікроскопа (Nikon, Токіо, Японія).

Імунофлуоресцентне фарбування

Для фарбування IF використовували метод посилення сигналу тирамідом (TSA)³. Коротко, для кожного маркер, зразки обробляли первинними кролячими антитілами, а потім інкубували з HRP-кон'югованим козячим вторинним антитілом. Після промивання предметне скло інкубували з флуоресцентний реагент і нагрівають у мікрохвильовій печі для видалення комбінованих антитіл. Те антитіла перераховані в Таблиці S5.

Виділення клітин, фарбування та проточний цитометричний аналіз

Як описано Weigmann et al.,⁶ кишечник мишей промивали холодним PBS, а потім нарізати на сегменти довжиною 1 см. Потім сегменти поміщали в 50 мл центрифужну пробірку, що містить 5 мл збалансованого сольового розчину Хенкса (HBSS), 5 мМ ЕДТА та 1 мМ ДТТ та інкубували 20 хв при 37°C. Епітеліальні клітини кишечника видаляли після вихор протягом 10 с. Сегменти тканини поміщали в пробірку С, що містить 5 мл травного розчину (середя DMEM, 10% FBS, 0,5 мг/мл колагенази D (Roche), 0,1 мг/мл ДНКази I (Sigma), та 3 мг/мл диспази II (Roche)) гомогенізували, і надосадову рідину збирали центрифугуванням при 120 об/хв протягом 45 хв, ресуспендували в буфері MACS і збирали центрифугуванням при 1000 об/хв протягом 10 хв. Суспензію клітин промивали буфером MACS і інкубували з антитілами CD16/32 протягом 10 хвилин на льоду для блокування неспецифічного зв'язування. Надалі клітини були використані для фарбування маркерів імунних клітин.

Імунні клітини піддавали фарбуванню панелі маркерів імунних клітин. Після забарвлення поверхневі молекули клітини фіксували 4% параформальдегідом, пермеабілізували 0,1% сапоніну і забарвлювали цитокін-специфічними моноклональними антитілами (mAb). То для проточної цитометрії використовували наступні mAb: APC-Cy7-анти-мишачий CD45 (кат. № 103116), APC-антимишаний CD4 (кат. № 100516), PE-антимишаний CD3 (кат. № 100308), PerCP-Cy5.5-антимишаний Ly6G (кат. № 127615), APC-антимишовий CD14 (кат. № 123312), FITC-антимишаний 11b (кат. № 101206), PE-Cy7-антимишачий 11c (кат. № 117318), PE-антимишачий F4/80 (кат. № 123110), APC-антимишачий CD206 (кат. № 141708), APC-Cy7-антиминий кат. № 505850), PE-Cy7-антимишовий IL4 (кат. № 504118), PerCP-Cy5.5-антимишачий IL17A (кат. № 506920) та PE-антимишаний FOXP3 (кат. № 126404). Ізотип використовували для контрольного фарбування. Проточний цитометричний аналіз був виконаний на проточному цитометрі (BD Biosciences) і проаналізований з використанням програмного забезпечення FlowJo_V10. Антитіла були придбані у компанії biolegend, Сан-Дієго, Каліфорнія, США.

Аналіз бактеріального складу

Бактеріальний склад кожного зразка аналізували за допомогою аналізу 16S гена рПНК. Загальну ДНК зразків заморожених фекалій екстрагували QIAamp Fast DNA Stool. Міні-набір (Qiagen, Німеччина) згідно з інструкцією виробника. Гени 16S рПНК були ампліфіковані з використанням набору праймерів 341F/806R, спрямованого на область V3-V4, та очищені з використанням набір для екстракції ДНК з гелю АхуPrep (Ахуген, США). Бібліотеки секвенування були створені за допомогою набору для підготовки зразків ДНК TruSeq та секвенування на платформі HiSeq2500 (Illumina, США) (розмір вставки 300 п.н., довжина зчитування 250 п.н.). Послідовності були віднесені до операційних таксономічних одиниць (OTU, ідентичність 97%) після якісної фільтрації з подальшим вибором репрезентативної послідовності з використанням програмного пакету QIIME (Quantitative Insight in Microbial Ecology).

Аналіз метагеномних асоціацій (MWAS)

Фекалії вилучали з мишей WD і інкубували з BIC у строгих анаеробних умовах (сольовий розчин як контроль) протягом 24 годин. Були отримані свіжі зразки, заморожені рідкому азоті, і зберігали при -80°C до аналізу. ДНК екстрагували та збирали бібліотеку фрагментів ДНК побудований у вигляді наступного того ж робочого процесу, що і описаний⁷: виконати генерацію кластера, шаблон гібридизація, ізотермічна ампліфікація, лінеаризація, блокування, денатурація та гібридизація

праймерів для секвенування. Бібліотека ДНК була сконструйована відповідно до інструкцій виробника інструкції (БДІ). По-перше, ми використовували IDBA_UD для складання відфільтрованих парних читань у контиги (параметри min-contig-len 135). Далі база даних прокариотів генів KEGG і був використаний MGENES, в якому гени KEGG із зразків метагенома були анотовані. на основі ортології з бітовою оцінкою >60 для ідентифікації генів KEGG, білків UniRef та CAZymes. Ми ідентифікували 108268 білків UniRef, 14084 білків UniRef та 186717 білків KEGG. гени. Потім відфільтровані читання парних кінців були зіставлені зі зібраними контигами за допомогою Bowtie2 з параметрами за замовчуванням (версія 2.3.2), а результати ґрунтувалися на величезній кількості ORF. Ми також отримали результати аналізу збагачення набору генів за допомогою пакета R clusterProfiler (версія 3.8.1) та виключив набори генів, що містять >30 000 генів або <50 генів для контролю оперативності та точності. Гени, анотовані базою даних UniRef та базою даних CAZymes, були ранжовані на основі величини їхнього ефекту в тестах на генетичну асоціацію випадок-контроль. Гени були аналогічно анотовані базою даних генів KEGG. Альфа-різноманітність (різноманітність усередині вибірки) був проаналізований на основі поширеності генів і кожного рівня (L2: тип, L3: клас, L4: порядок, L5: сімейство, L6: рід, L7: вид) для шести зразків за індексом Шеннона. Статистичний порівняння індексу Шеннона між групами, що отримували ВІС, та контрольною групою розраховували за t-критеріями Стьюдента. Неметричне багатовимірне шкалювання на відмінності Брея-Кертиса та Аналіз подібності Anosim використовувався для оцінки бета-різноманіття.

Аналіз біометаболітів

Аналіз ТМА, ТМАО: Рівні ТМА та ТМАО визначали кількісно за допомогою рідини. хроматографія з мас-спектрометрією, як описано раніше Awwad et al.8, стандартні спектри показані на малюнку S31A. Аналіз SCFAs: Як описано вище, 9 прямих метод ін'єкційної ГХ використовувався для аналізу концентрації SCFAs у зразках фекалій. Це стандартні спектри показані на малюнку S31, час утримування знаходиться в порядку зростання оцтова кислота, пропіонова кислота, ізомасляна кислота, масляна кислота, ізовалеріанова кислота, валеріанова кислота, ізокапронова кислота, гексанова кислота і н-гептана кислота. Виробництво СЕ: рівень СЕ у кожному зразку печінки оцінювали за допомогою методу УВЕЖХ-МС/МС, як описано вище.10 Аналіз ЛПС: вміст ЛПС у зразках визначали за допомогою набору ЛПС ELISA згідно з інструкцією виробника).

Трансмійсна електронна мікроскопія

Як описано в попередніх дослідженнях, 11 кишечників мишей, які отримували ВІС або носій, обробки збирали в кінці експерименту, промивали 0,1 М фосфатом Соренсен буфера (рН 7,4) і фіксували за допомогою Servicebio (G1102, технологія Servicebio). Тоді тканина була тричі промивали буфером і постфіксували протягом 2 год в 1% чотирикислі осмію в тому ж розчині буфера. Зразки знову промивали буфером. Далі тканину зневоднювали у зростаючих концентраціях етанолу, оброблених ацетоном і залитих епоксидною смолою Ероп. Ультратонкі зрізи (товщиною 70 нм) обробляли подвійним фарбуванням свинцем-ураном. Зразки були досліджені за допомогою НІТАСНІ ТЕМ (НТ7700, НІТАСНІ, Токіо, Японія).

Література

1. Liu G-T, Li Y, Wei H-L et al. Toxicity of novel anti-hepatitis drug bicyclol: a preclinical study. World journal of gastroenterology 2005; 11:665-671.
2. Dai H-J, Li D-W, Wang Y-X et al. Induction of heat shock protein 27 by bicyclol attenuates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. European Journal of Pharmacology 2016; 791:482-490.
3. Luo Y, Zhang B, Xu D-Q et al. Protective effect of bicyclol on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 2011; 24:240-246.
4. Sun H, Yu L, Wei H, Liu G. A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted mice tumor model. J Biomed Biotechnol 2012; 2012:584728-584728.

5. Zhu B, Liu GT, Su Wu R, Strada SJ. Chemoprevention of bicyclol against hepatic preneoplastic lesions. *Cancer Biology & Therapy* 2006; 5:1665-1673.
6. Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols* 2007; 2:2307.
7. Junjie, Qin, Yingrui et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55-55.
8. H. M. Awwad, J. Geisel, R. Obeid. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1038, 12
9. L. L. Wang, H. H. Guo, S. Huang, Y. X. Han, J. D. Jiang. *Journal of Chromatography B*, 2017, 105770
10. M. Lin, Z. Wang, D. Wang, X. Chen, J. L. Zhang. *Anal Chem*, 2019, 91, 4504-45128
11. N. D. Mathewson, R. Jenq, A. V. Mathew, M. Koeniqsknecht, A. Hanash, T. Toubai, K. Oravec-Wilson, S. R. Wu, Y. Sun, C. Rossi, H. Fujuwara, J. Byun, Y. Shono, C. Lindemans, M. Calafiore, T. M. Schmidt, K. Honda, V. B. Young, S. Pennathur. M. van den Brink, P. Reddy.

Nature immunology, 2016, 17, 505

Таблиця S1 Інформація про дієту з високим вмістом жирів (HFD).

Продукт #H10141	г%	кал%
Білок 20 1	20	17
Вуглеводи	50	43
Жир	21	40
Усього		100
ккал/г	4,7	
Інгредієнт	г	кал
Казеїн	195	780
Метіонін	3	12
Кукурудзяний крохмаль	50	200
Мальтодекстрін	100	400
Сахароза	341	1364
Целюлоза	50	0
Кукурудзяна олія	10	90

Молочний жир		
Безводний	200	1800
Мінеральна суміш		
M1001	35	0
Карбонат кальцію	4	0
Вітамінний мікс		
V1001	10	40
Холіна бітарtrat	2	0
Холестерин	1,5	0
Антиоксидант ТБГХ	0.04	0
Разом	1001.54	4686

Таблиця S2 Контроль якості MWAS

Таблиця S2-а Висока якість чистих даних

Samp lenam e	#of raw bases	#of clean1 bases	Clean1/R aw (%)	# of clean2 bases (Remove host)	Clean2/R aw (%)
m1	146624529 00	126764031 00	86.45	12662099700	86.36
m2	149867991 00	130210071 00	86.88	13007193300	86.79
m3	149867991 00	129188601 00	86.2	12909795000	86.14
m4	149867991 00	128627886 00	85.83	12854315100	85.77
m5	155126517 00	130188660 00	83.92	13012179000	83.88
m6	150446430 00	123928620 00	82.37	12385260900	82.32

Таблиця S2-в Складальні дані кожного зразка

Sample	Software	Contig Number	Assembly Length (bp)	N50 (bp)	N90 (bp)	Max (bp)	Min (bp)	Average Size (bp)	Mapping Rate (%)
m1	IDBA_UD	361506	3.6E+08	1513	389	291793	300	996	52.53
m2	IDBA_UD	337682	3.45E+08	1645	392	244154	300	1023	53.14
m3	IDBA_UD	346969	3.49E+08	1563	390	279789	300	1005	54.11
m4	IDBA_UD	344513	3.44E+08	1550	387	222503	300	999	53.41

m5	IDBA_UD	350369	3.47E+08	1484	387	332689	300	989	52.96
m6	IDBA_UD	313503	3.12E+08	1543	384	262135	300	993	48.38

Таблиця S3 Послідовність праймерів для ВІД-ПЛР.

Origin	Name	Sequence (5'-3')
Mice	<i>Il1β-F</i>	CAGCTGGAGAGTGTGGATCC
	<i>Il1β-R</i>	TGCTTGTGAGGTGCTGATGT
	<i>Il6-F</i>	AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGA
	<i>Il6-R</i>	GGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
	<i>Tnfa-F</i>	CACAGAAAGCATGATCCGCG
	<i>Tnfa-R</i>	ACTGATGAGAGGGAGGCAT
	<i>Icam-1-F</i>	AGGTGTGATATCCGGTAGAT
	<i>Icam-1-R</i>	CCTTCTAAGTGGTTGGAACA
	<i>Vcam-1-F</i>	CACTTGTGGAAATGTGCCCG
	<i>Vcam-1-R</i>	TCACACTCGTATATGCCGGC
	<i>Abca1-F</i>	GCCTGGATCTACTCTGTGCG
	<i>Abca1-R</i>	GCCGAGCCTCCTTCTCATA
	<i>Cyp7a1-F</i>	CGTGATCCTCTGGGCATCTC
	<i>Cyp7a1-R</i>	CGCAGAGCCTCCTTGATGAT
	<i>Nfkb2-F</i>	AGATCGAGAGGCCTGTAACG
	<i>Nfkb2-R</i>	TCCTCTGCACTTCCTCCTTG
	<i>Tlr4-F</i>	CTGGGGAGGCACATCTTCTG
	<i>Tlr4-R</i>	TCAGGTCCAAGTTGCCGTTT
	<i>Fmo3-F</i>	GGGGCCTGTGGAAATTCTCA
	<i>Fmo3-R</i>	CGGGATAGGGGAAGTCTGGA
	<i>Fxr1-F</i>	CACGAAGACTCCCTCACAGT
	<i>Fxr1-R</i>	CATCCGAACCTTTAGCCAGCC
	<i>Gapdh-F</i>	CTCCCACTCTTCCACCTTCG
	<i>Gapdh-R</i>	TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT

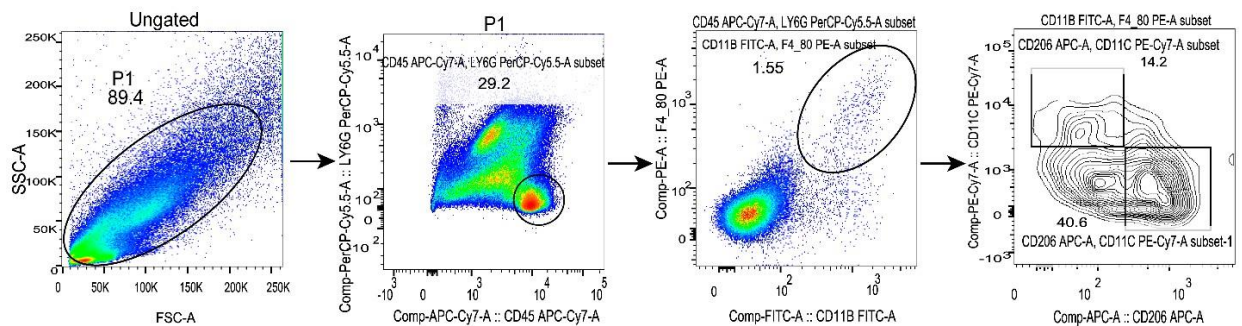
Таблиця S4 Антитіло, використане у вестерн-блот.

Name	Company	Production number	Dilution
TNF- α	Proteintech	60291-1-Ig	1:1000
IL-1 β	Abcam	ab200478	1:250
IL-6	Proteintech	21865-1-AP	1:1000
ABCA1	Immunoway	YN2847	1:1000
CYP7A1	Abcam	ab65596	1:1000

NFκB2	Immunoway	YT3093	1:1000
TLR4	CST	#14358S	1:1000
FMO3	Proteintech	17469-1-AP	1:250
FXR1	CST	#12295S	1:1000
ICAM-1	Invitrogen	MA5407	1:250
VCAM-1	Invitrogen	PA5-80214	1:2000
β-actin	CST	#4970	1:1000

Таблиця S5 Реагенти, що використовуються в імунофлуоресцентному аналізі.

	Name	Company	Product code
Rabbit	IL-6	Abcam	Ab208113
Polyclonal	IL-1β	Abcam	Ab205924
Antibody	TNF-α	Servicebio	GB13452
	ZO-1	Abcam	Ab221547
	Occludin	Abcam	Ab216327
	CYP7α	Invitrogen	PA5-100892
	ABCA1	Abcam	Ab7360
	NFκB	Abcam	Ab32536
	TLR4	Abcam	Ab13556
	Dapi	Servicebio	G1012
Goat anti rabbit IgG	HRP-conjugated	Servicebio	GB23301
Fluorescent dye	Fitc-TSA	Servicebio	G1222
	CY3-TSA	Servicebio	G1223
	647-TSA	Servicebio	G1224



Малюнок S1 Стратегія гейтування FACS для інфільтрованих моноцитів у дузі аорти мишей ApoE (-/-).

Спочатку використовували морфологічний шлюз для видалення дебрису, після чого клітини CD45+/Ly6G були закриті. З цієї популяції були відібрані моноцити CD11b+ і F4/80+, так і макрофаги M1/M2 далі гейтували як клітини CD11C+/CD206- або CD206+/CD11C-.

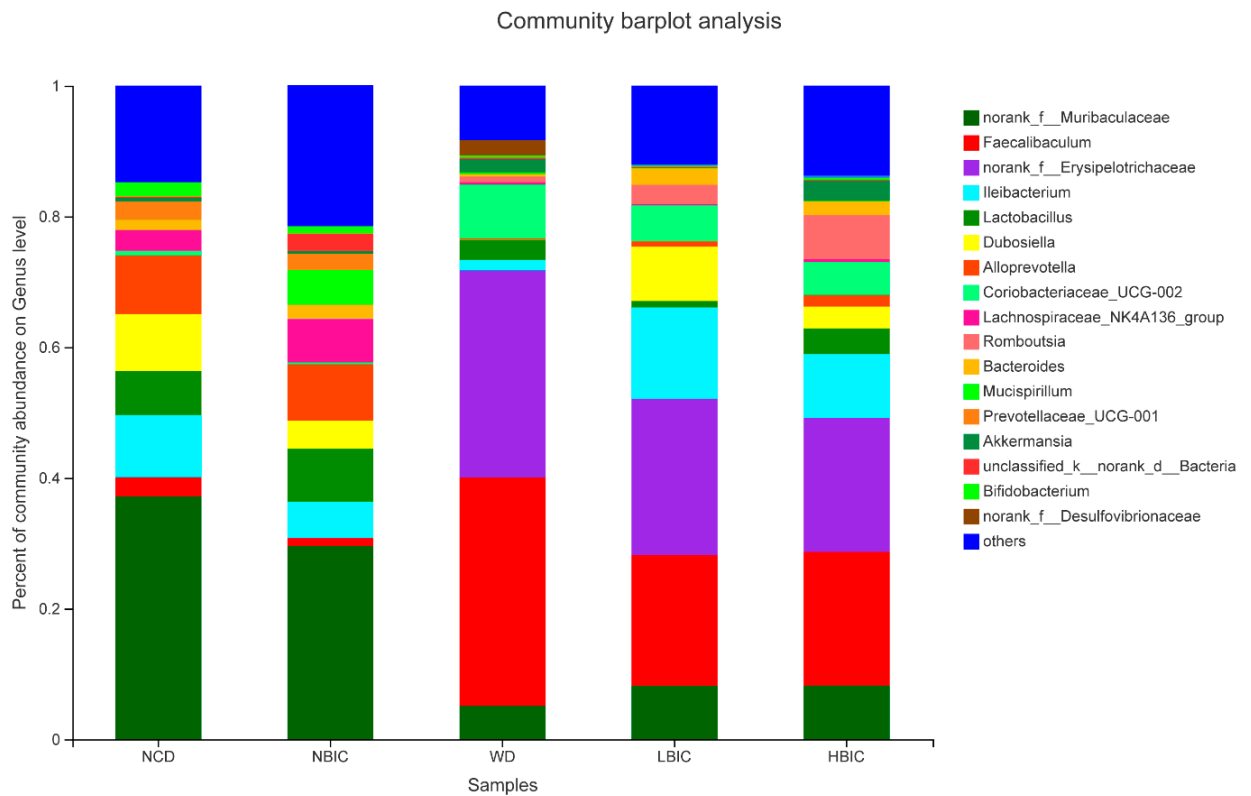
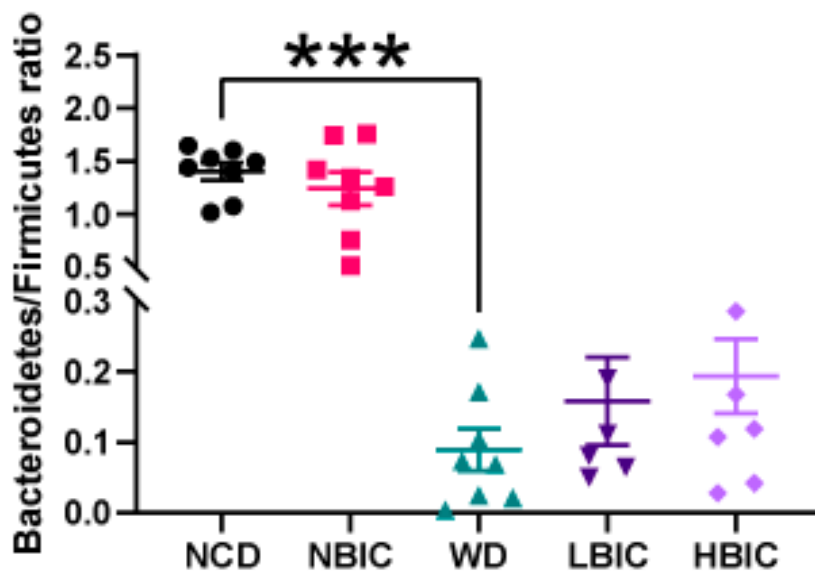
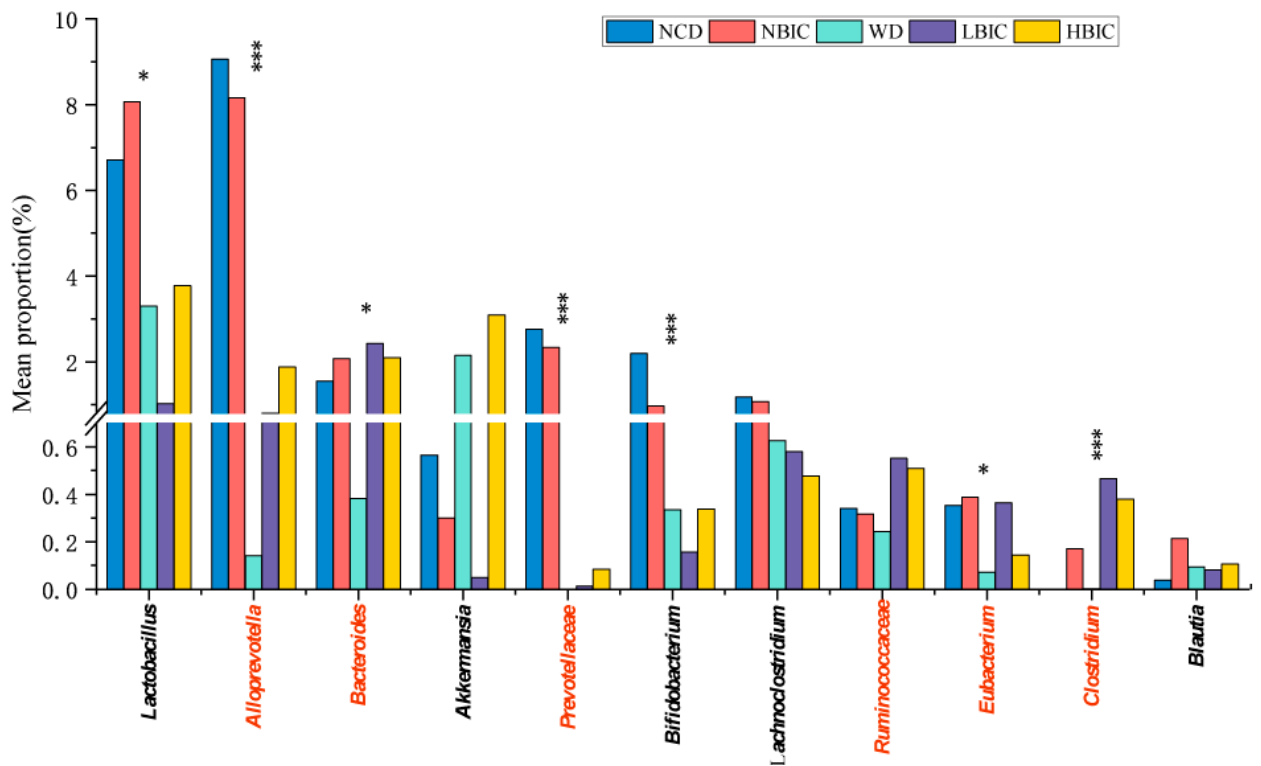


Рисунок S2 Аналіз секвенування гена 16S рРНК лише на рівні роду.

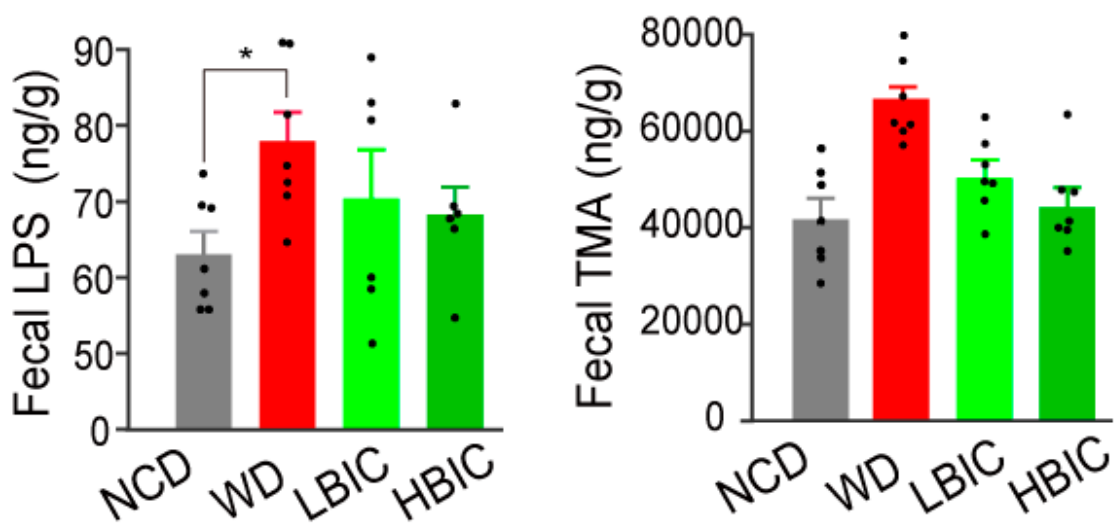


Малюнок S3 Відношення Bacteroidetes до Firmicutes.

Дані представлені як середнє \pm стандартна помилка середнього (n=6-8). Вказані достовірні відмінності: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, в порівнянні з WD односторонній дисперсійний тест.

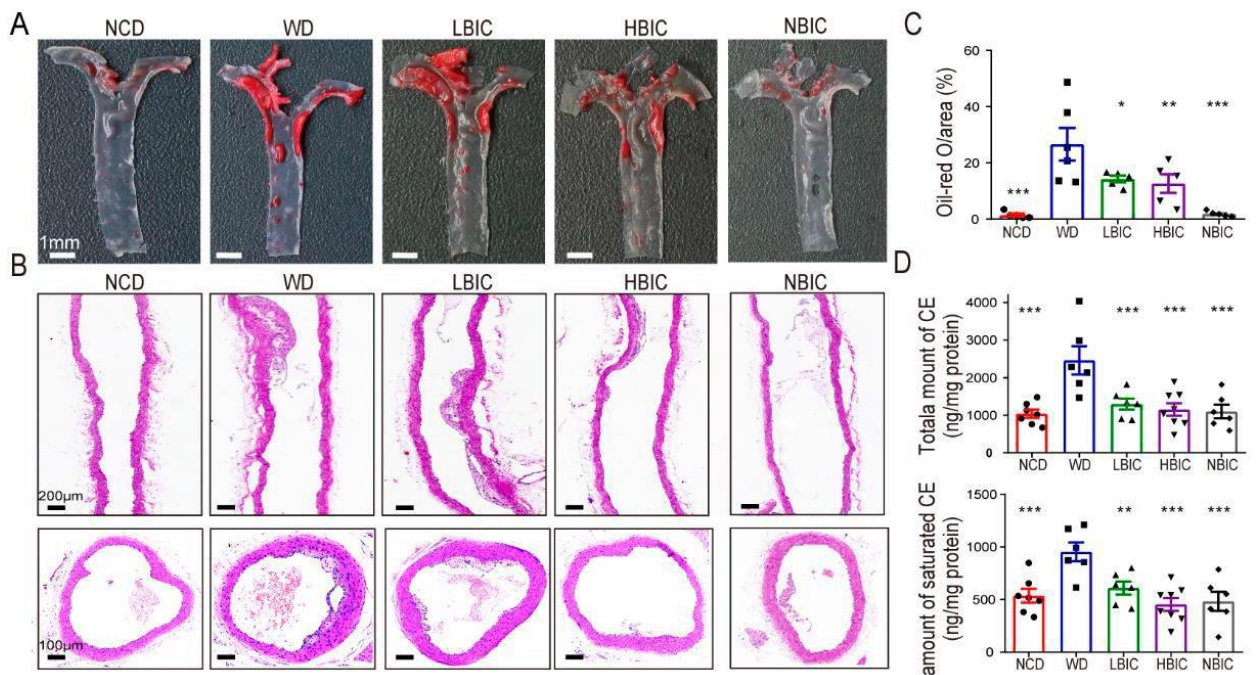


Малюнок S4. Порівняння пологів бактерій, пов'язаних із АС.



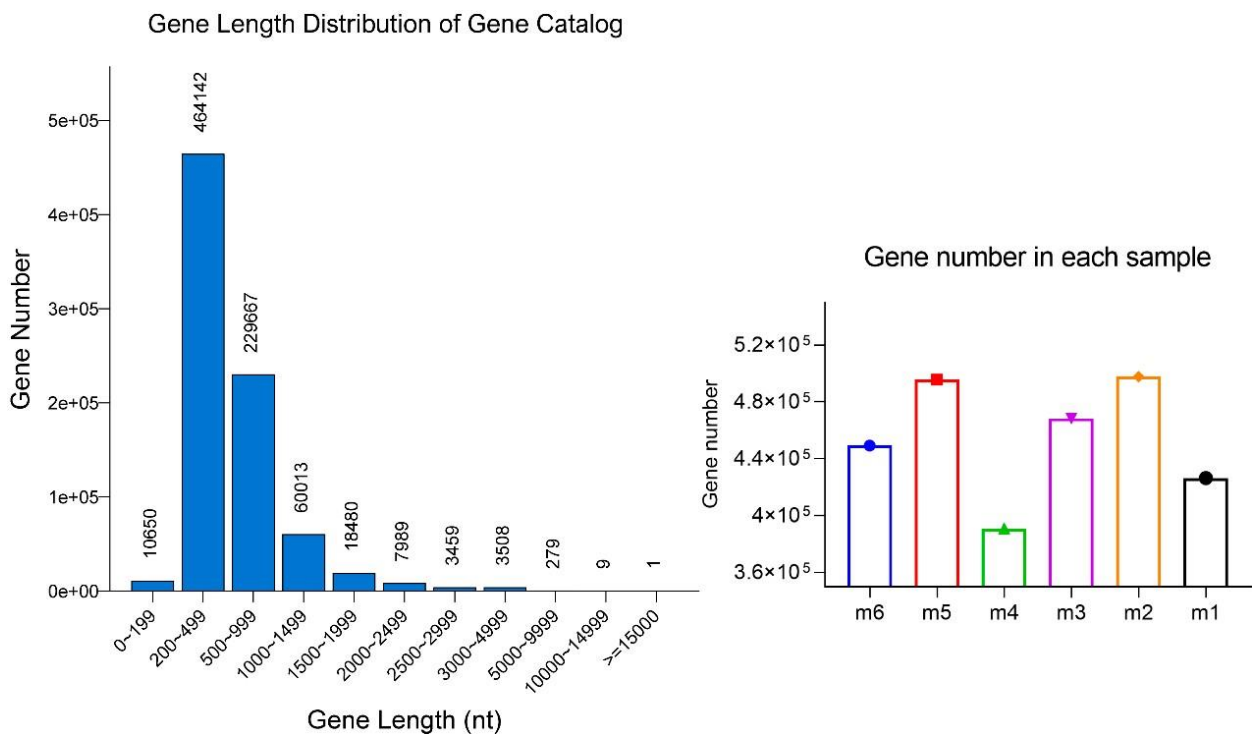
Малюнок S5. Концентрація вмісту ЛПС та ТМА у зразках фекалій.

Дані представлені у вигляді середньої SEM (n=5-9). Вказані достовірні відмінності: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, проти WD за допомогою тесту One-way ANOVA

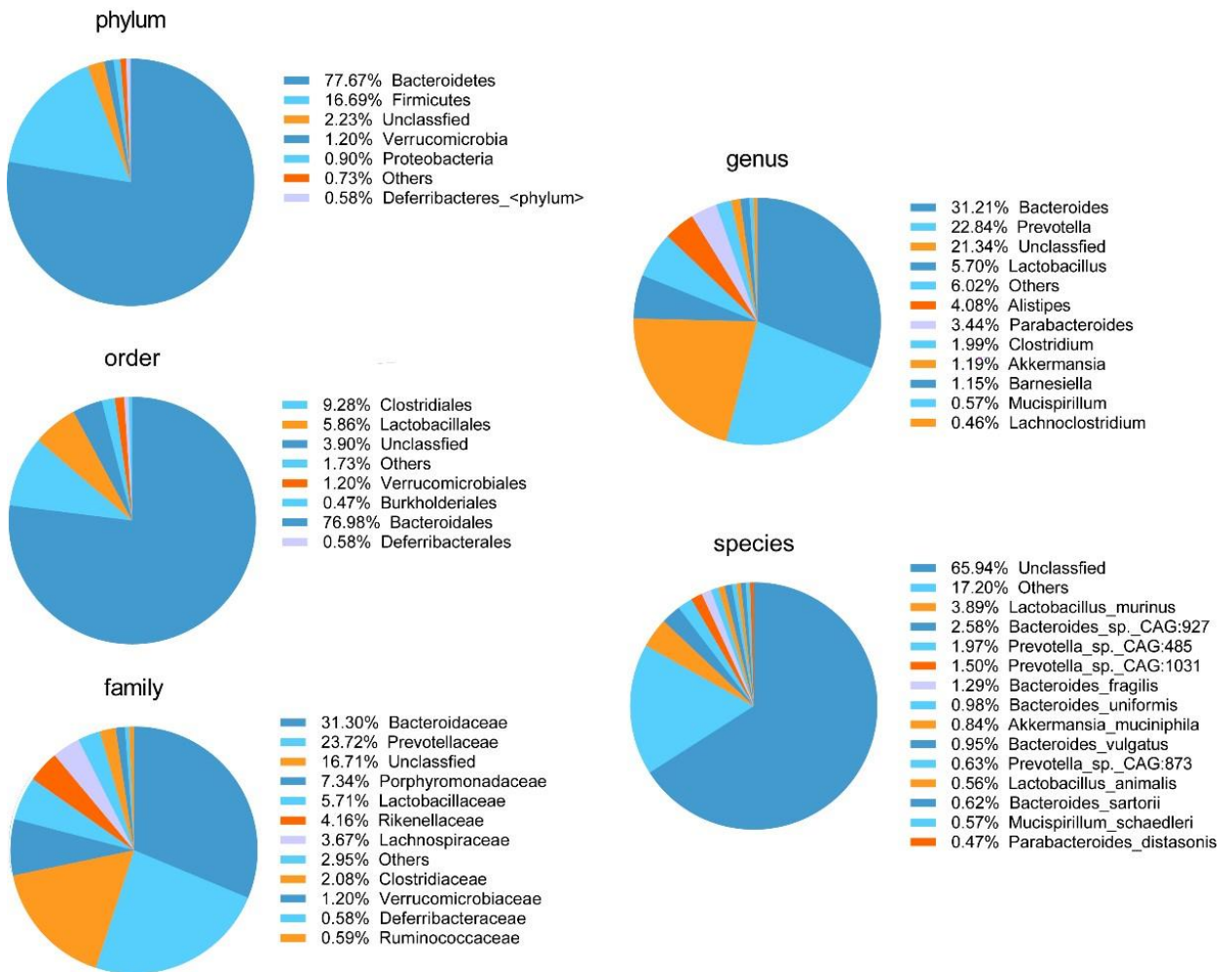


Малюнок S6. Формування артеріальних бляшок у мишей ApoE(-/-) А.

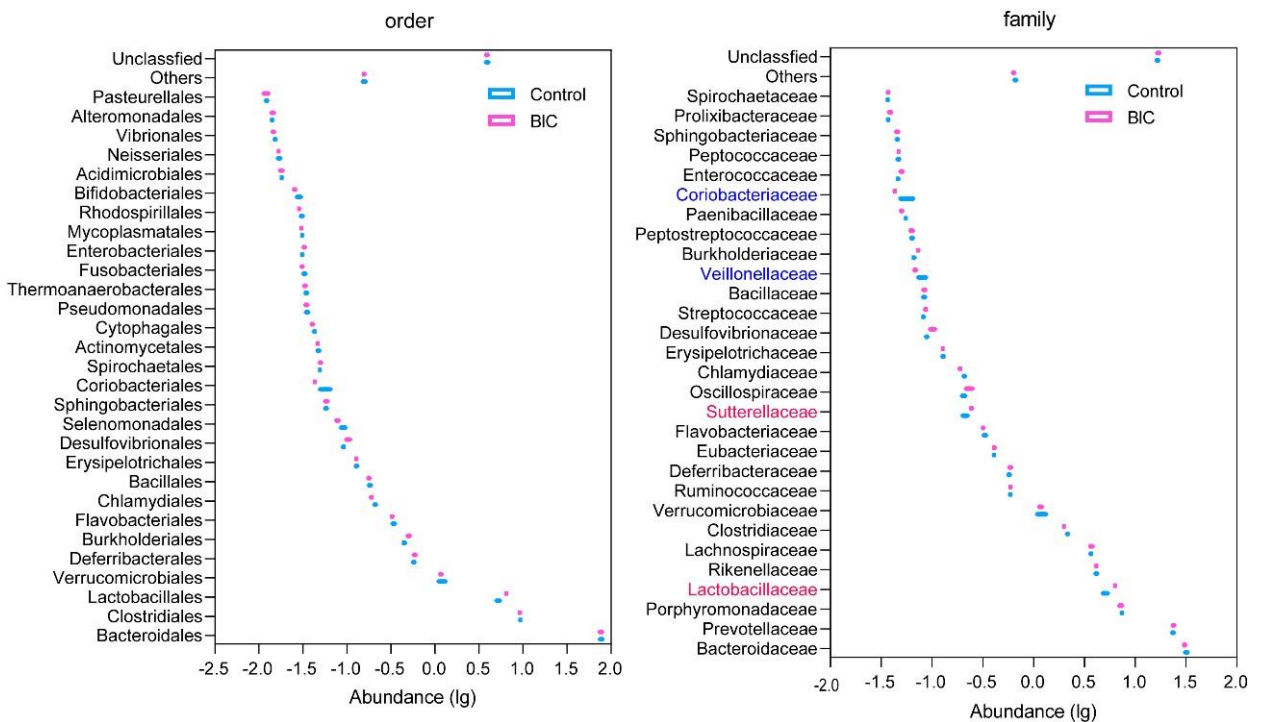
Репрезентативне зображення дуги аорти ураження у мишей ApoE(-/-) з використанням фарбування Oil red-O. В. Репрезентативне зображення поздовжнього перерізу (вгорі) та поперечний переріз (внизу) аорти у мишей ApoE(-/-) з використанням гематоксиліну та еозину (HE) фарбування. С. Ураження дуги аорти вимірювали у відсотках від фарбування Oil Red-O. Д. Ефіри холестерину (ХЕ) в артеріях. Рівень ХЕ в кожному зразку оцінювали за допомогою УВЕРХ-МС/МС. метод.



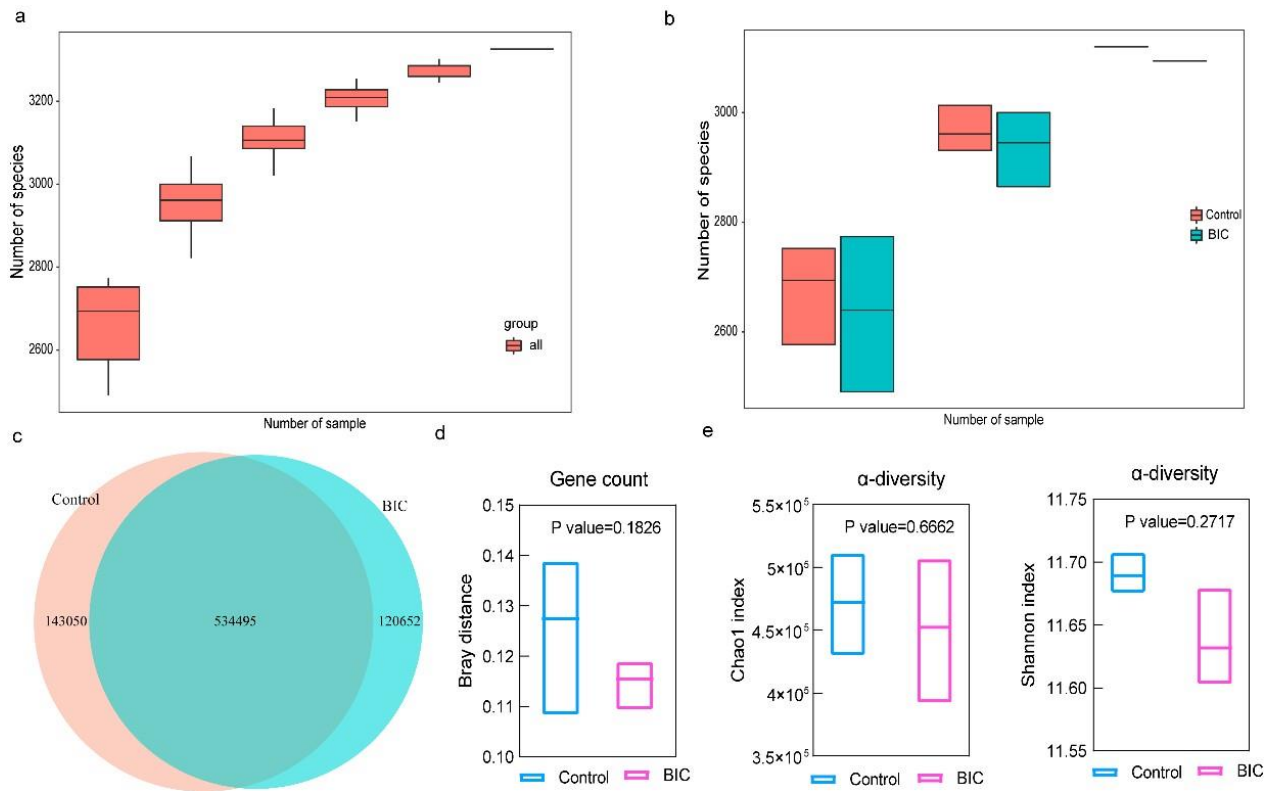
Малюнок S7 Розподіл довжини генів MAWAS та кількості генів у кожному зразку.



Малюнок S8 Профіль відносної великої кількості кишкової флори за типом, загеном, сімейством, родом і рівнем виду.



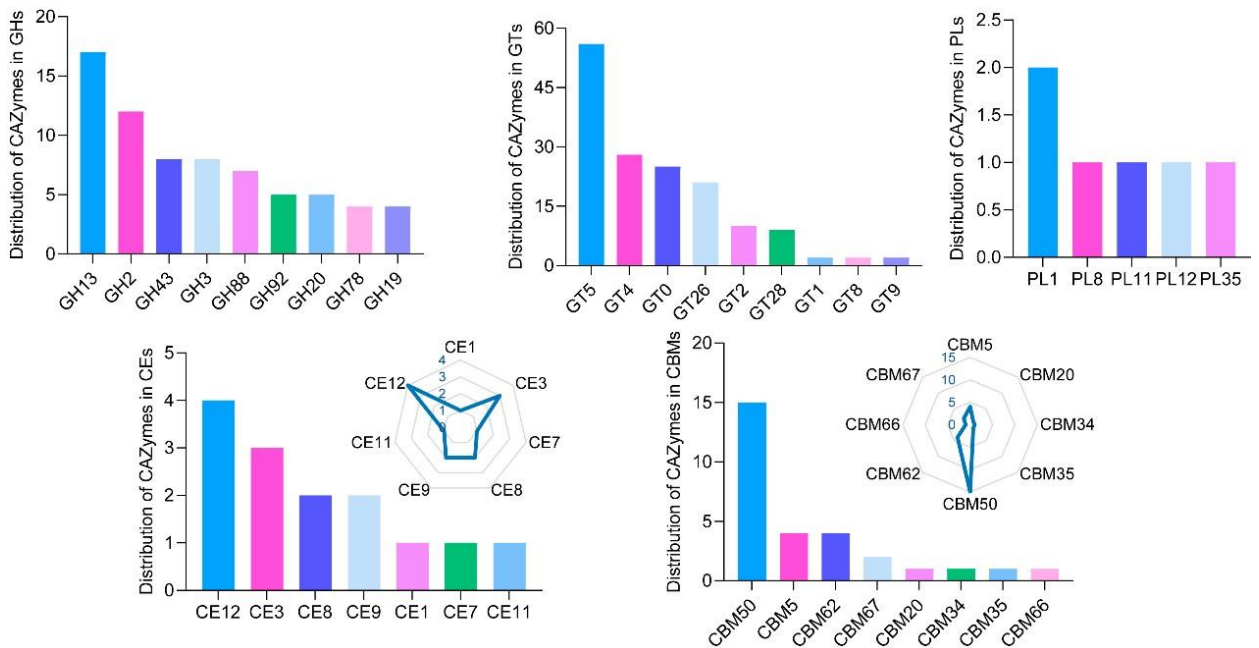
Малюнок S9 Відмінності в мікрібіомах на рівні загону та сімейства між контролем та ВІС групи.



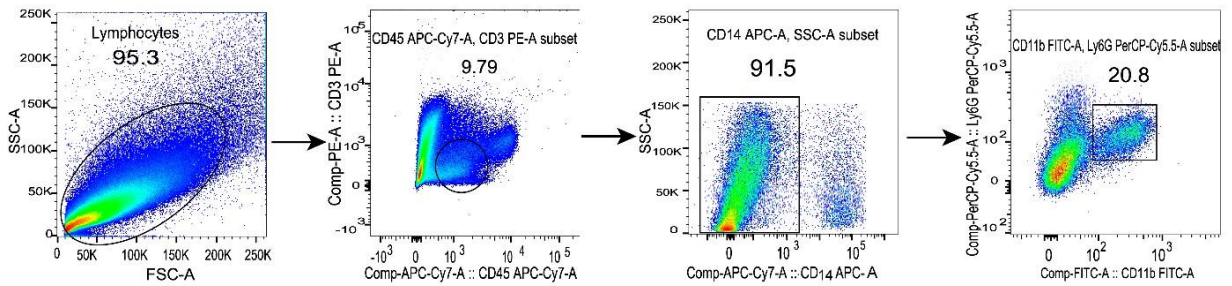
Малюнок S10 Генні відмінності між контрольною групою та групою BIC.

а. Криві розрідження на основі кількості генів у всіх зразках. б. Криві розрідження, засновані на кількості генів у контролі та групі BIC.

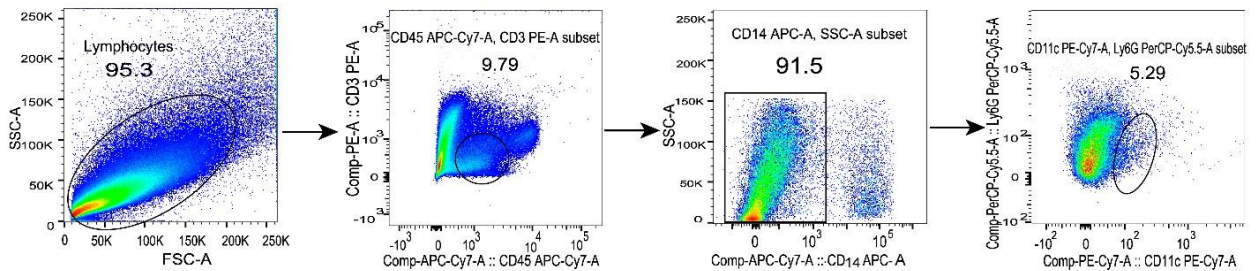
в. Діаграма Венне порівнює контрольну групу з групою BIC на основі кількості генів. д. β -різноманітність (Bray-індекс подібності Кертіса) груп «Контроль» і «BIC» генетично. е. α -різноманітність (Шеннон index та індекс Chao1) груп Control і BIC генетично.



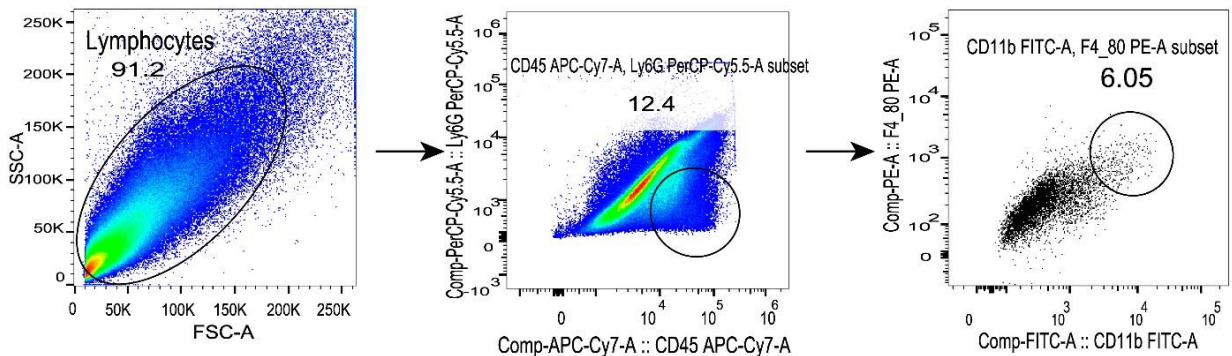
Малюнок S11 Розподіл CAZymes у категоріях GH, GT, PL, CE та CBM



Малюнок S12-а Стратегія гейтування FACS для нейтрофілів у товстій кишці мишей Ароє (-/-). Морфологія ворота спочатку використовувалися для видалення дебрису, після чого клітини CD45+/CD3- закривали. З цього популяції CD4-клітини були гейтовані, а нейтрофіли були гейтовані як CD11b+ та Ly6G+ клітини з CD4-популяції.

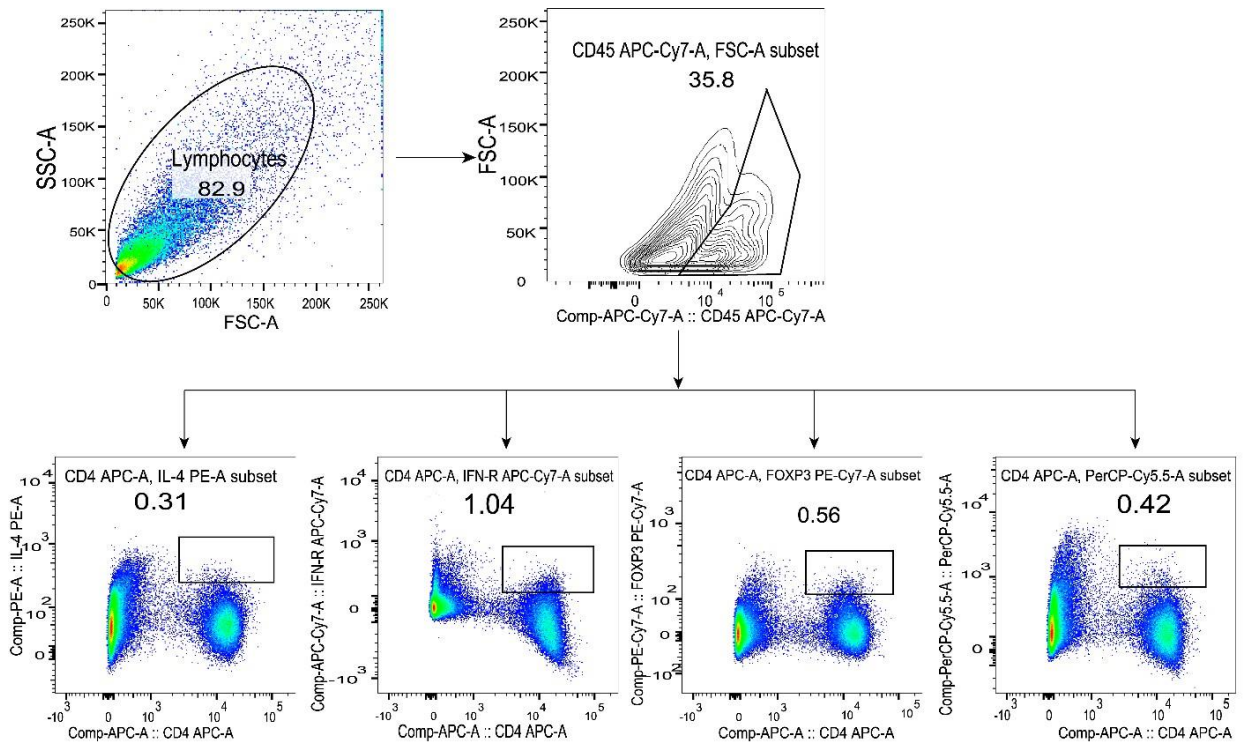


Малюнок S12-б Стратегія гейтування FACS для клітин DC у кишечнику мишей Ароє (-/-). Морфологічні ворота були вперше використані для видалення дебрису, після чого CD45+/CD3- клітини були закриті. З цього популяції CD4-клітини були додатково гейтовані, а DC-клітини були гейтовані як CD11c+ та Ly6G- клітини з CD4- популяції.



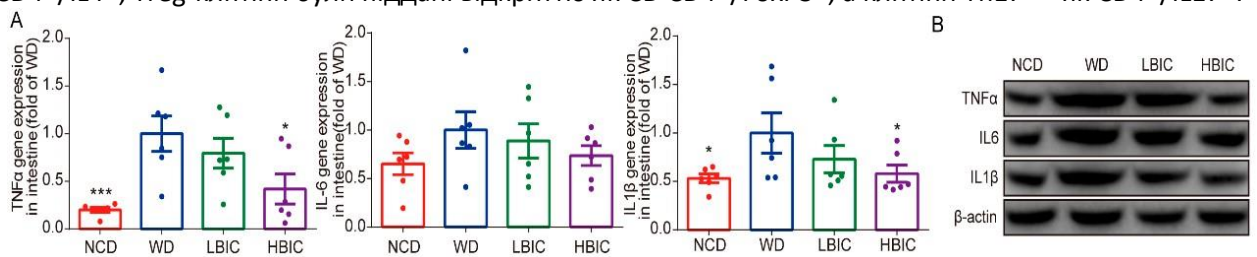
Малюнок S12-с Стратегія гейтування FACS для інфільтрованих моноцитів у кишечнику мишей Ароє (-/-). А

Морфологічні ворота спочатку використовували для видалення дебрису, після чого клітини CD45+/Ly6G- були закриті. З цієї популяції моноцити були відібрані як клітини CD11b+ та F4/80.



Малюнок S12-d Стратегія стробування FACS для інфільтрованих клітин Th1p у кишечнику мишей Аре (-/-).

Морфологічні ворота спочатку використовували для видалення сміття, після чого клітини CD45+ були закриті. З цієї популяції клітини Th1 були зв'язані як CD4+/IFN γ +; Клітини Th2 були закриті як CD4+/IL4+; Treg-клітини були піддані відкриттю як CD4+/FoxP3+, а клітини Th17 — як CD4+/IL17+.



Рисуюнок S13 ВІС зменшує запалення кишечника.

А. Експресію IL-6, IL-1 β і TNF- α мРНК в кишечнику оцінювали за допомогою ОТ-ПЦР. Результати були нормалізовані до GAPDH. Б. Експресію білків IL-6, IL-1 β і TNF- α в кишечнику оцінювали вестерн-блоттингом, β -актин використовували в якості контролю. Дані представлені як середнє значення \pm стандартна помилка середнього (n=5-7). Істотні відмінності вказано: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, у порівнянні з WD за тестом One-way ANOVA.

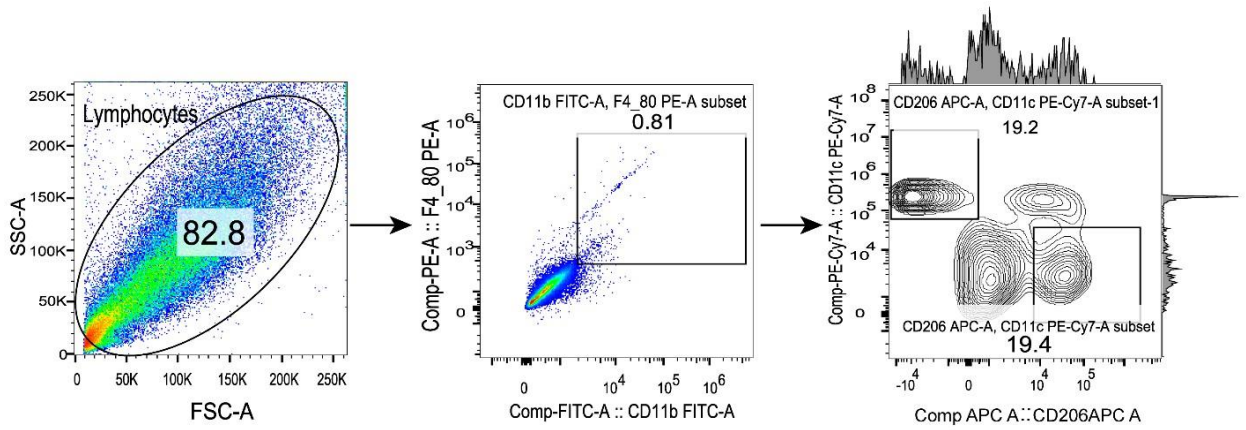


Рисунок S14. Стратегія гейтування FACS для інфільтрованих моноцитів у клітинах Caco-2. Морфологічний гейт був вперше використаний для видалення сміття, після чого моноцити були гейдовані як CD11b+ і F4/80+, а макрофаги M1/M2 також були включені як клітини CD11c+ або CD206+.

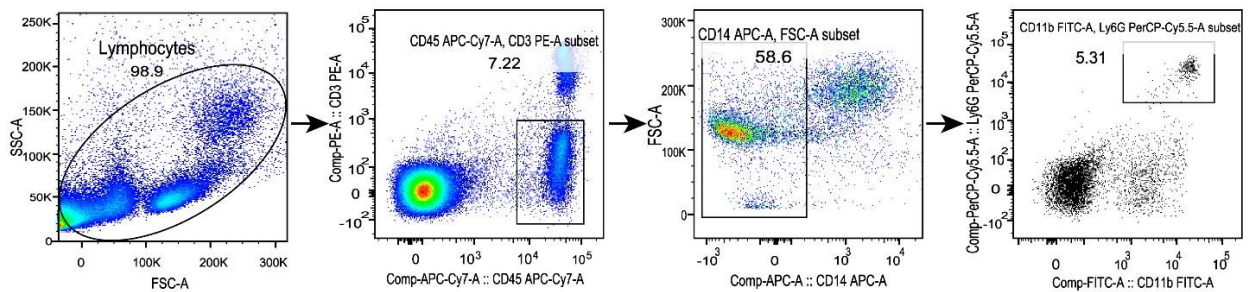


Рисунок S15 Стратегія гейтування FACS для нейтрофілів в циркуляції мишей Арое (-/-).

Морфологічний гейт спочатку використовувався для видалення мусору, після чого CD45+/CD3-клетки були гейтовані. З цієї популяції далі гейтовані CD4-клетки, а нейтрофіли гейтовані як CD11b+ і клітини Ly6G+ з CD4- популяції.

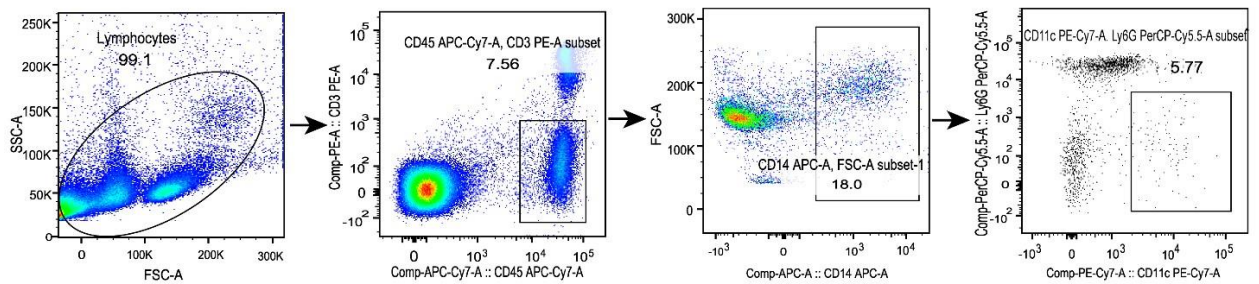


Рисунок S16 Стратегія гейтування FACS для моноцитів в циркуляції мишей Арое (-/-).

Морфологічний гейт спочатку використовувався для видалення мусору, після чого CD45+/CD3-клетки були гейтовані. З цієї популяції далі гейтували CD4+клетки, а нейтрофіли гейтували як CD11c+ і Ly6G-клетки з популяції CD4+.

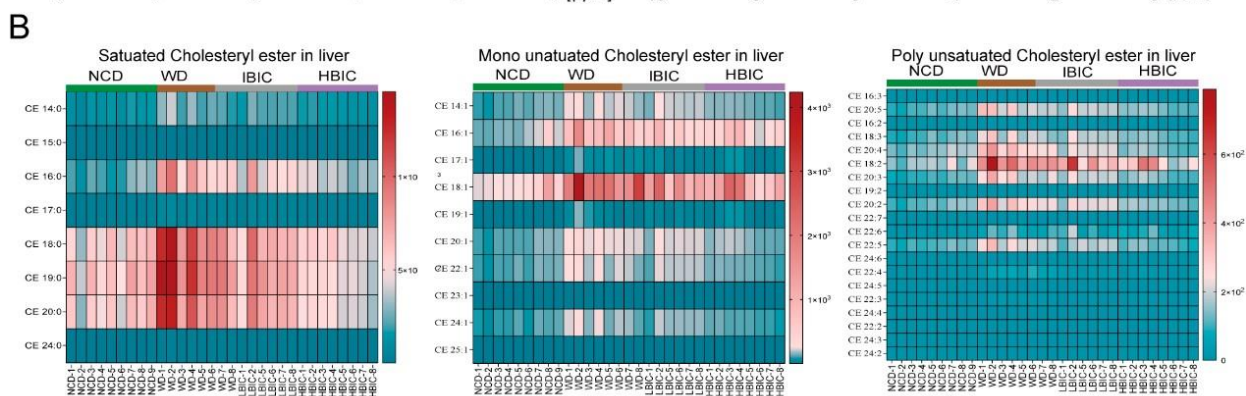
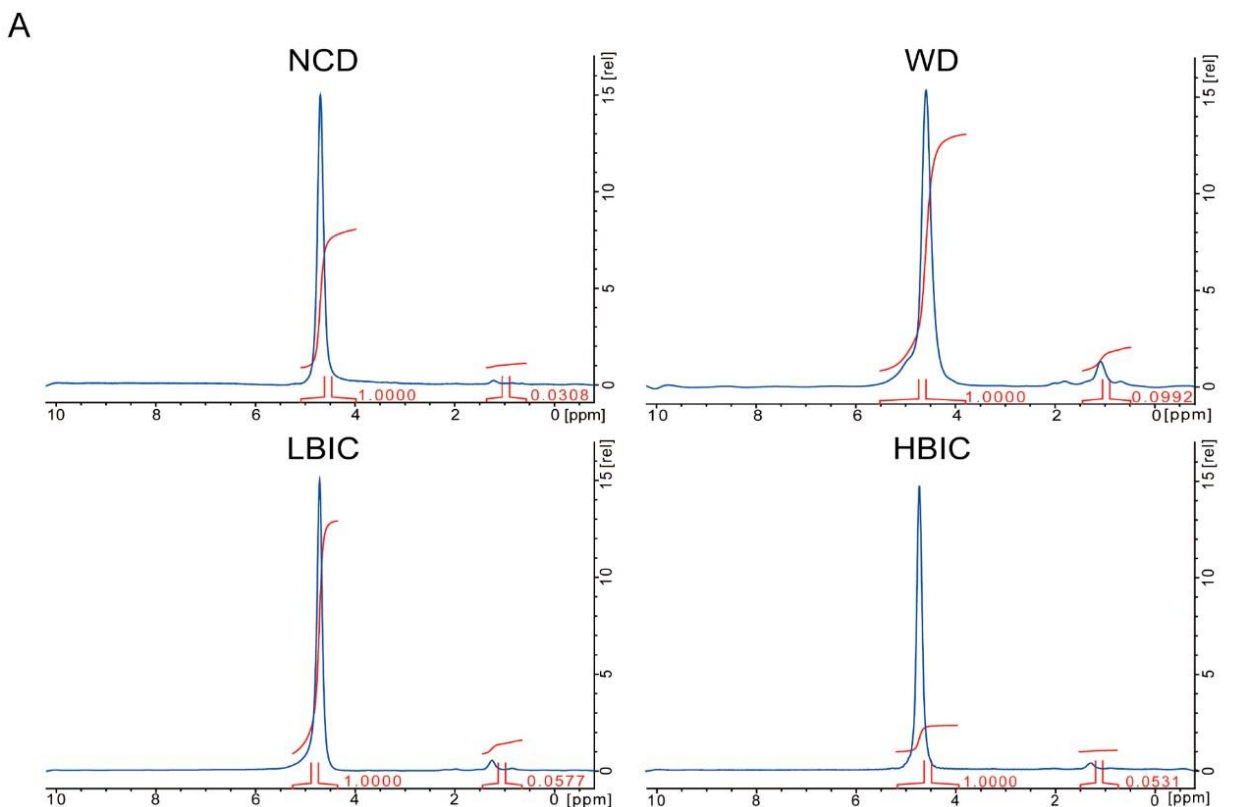
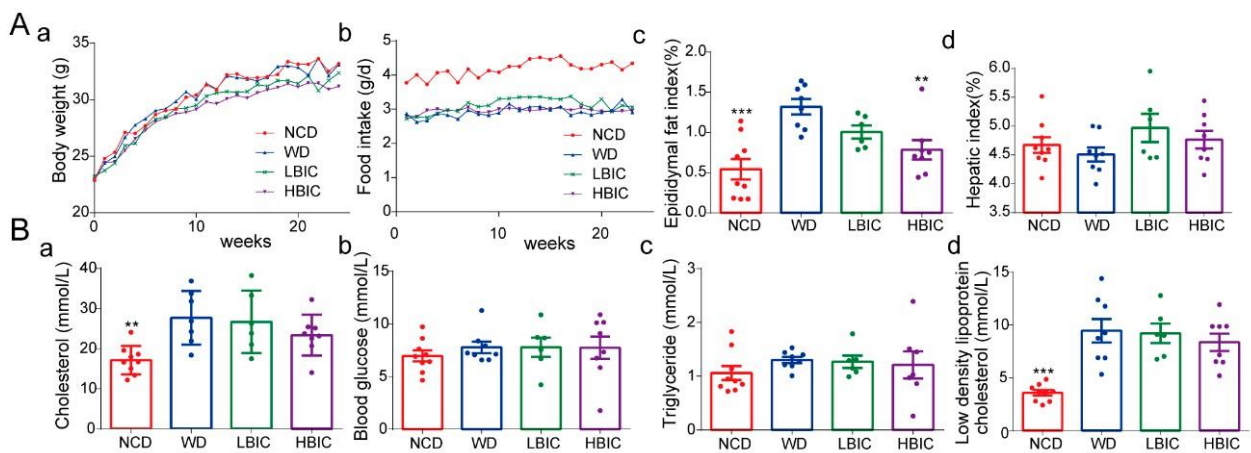


Рисунок S17 ВІС зменшує накопичення жиру в печені в миші *ApoE(-/-)*, отриманих HFD. **A.** Репрезентативні діаграми $^1\text{H-MRS}$ в ткани печені. **B.** Теплові карти рівнів ефіру холестерину в кожному зразку печені. Зміст холестеринового ефіру оцінювали за допомогою UHPLCMS/ MS.

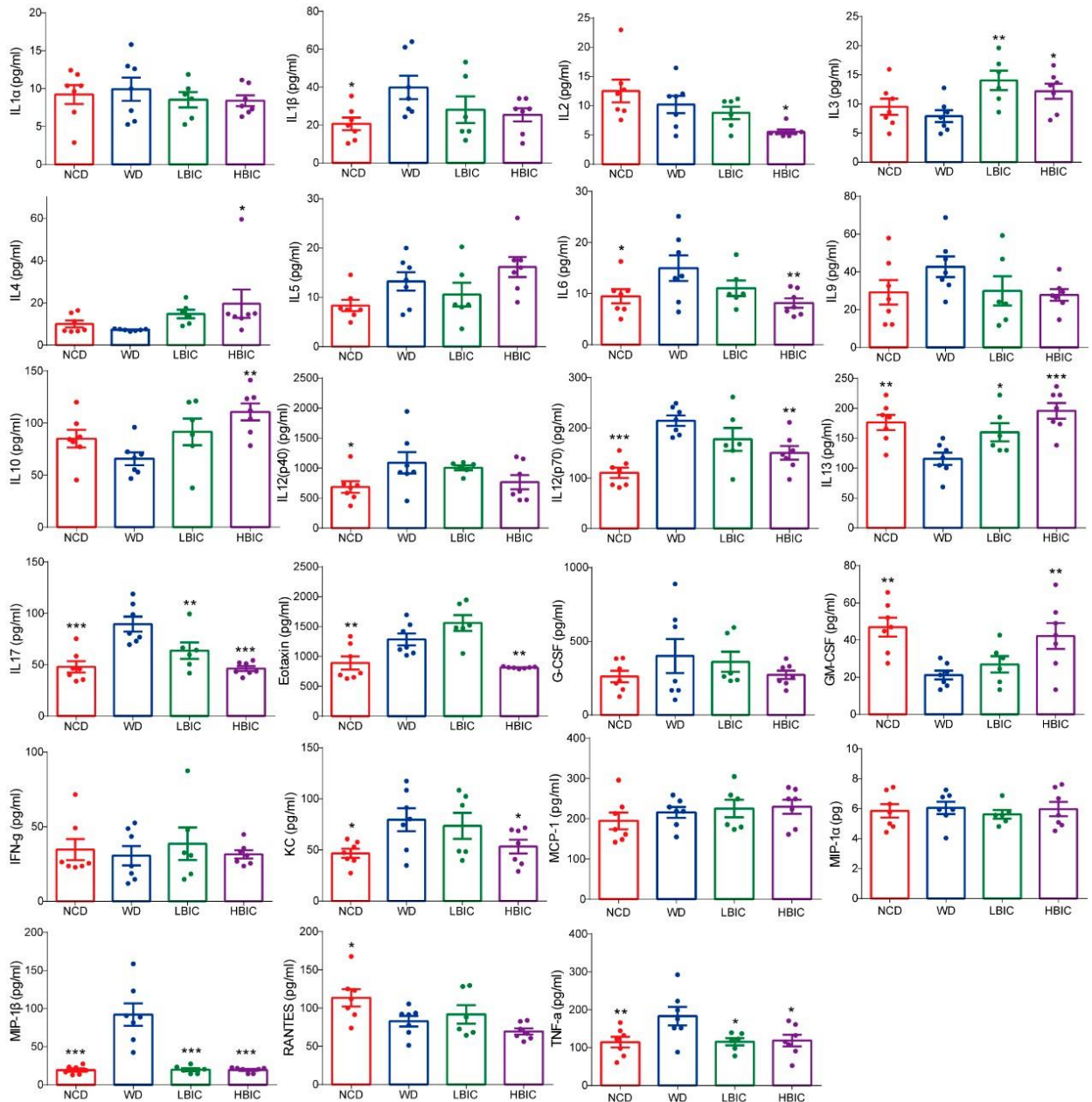


Малюнок S18. Статус у мишей *ApoE(-/-)*, які отримували HFD.

Мишей *ApoE(-/-)*, що отримували HFD, обробляли LBIC або HBIC через шлунковий зонд. Як контроль використовували необроблених мишей, яких годували HFD (WD) та стандартною дієтою для чау-чау (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-с. аналіз індексу жиру придатку яєчка; Оголошення. Аналіз печінкового індексу. В. Рівні TG, холестерину, LDL-с та глюкози у плазмі вимірювали ферментативними методами з використанням автоматичного біохімічного аналізатора. Дані представлені як середнє \pm стандартна помилка середнього (n=5-7). Вказані значні відмінності:

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ порівняно з WD за тестом One-way ANOVA.



Малюнок S19 ВІС послаблює хронічне запалення у мишей Арое(-/-), які отримували HFD.

HFD-живлення миші Арое(-/-), які отримували LBIC або HBIC через шлунковий зонд. Після припинення дії експерименту зразки крові були зібрані та проаналізовані на системі Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) з використанням набору для аналізу цитокінів, хемокінів та факторів росту Bio-Plex Pro (Bio-Rad, США) згідно з протоколом виробника. Виміряні цитокіни включали інтерлейкін-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, фактор колонії гранулоцитів (G-CSF), інтерферон- γ (IFN- γ), фактор некрозу пухлини- α (TNF- α), хемокін кератиноцитів (KC), макрофагальний запальний білок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , еотаксин, що регулюється при активації експресованого та секретованого нормальними Т-клітинами фактора (RANTES) та моноцитарний хемоаттрактантний білок-1 (MCP-1). Усі вимірювання проводилися з використанням програмного забезпечення Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad, США).

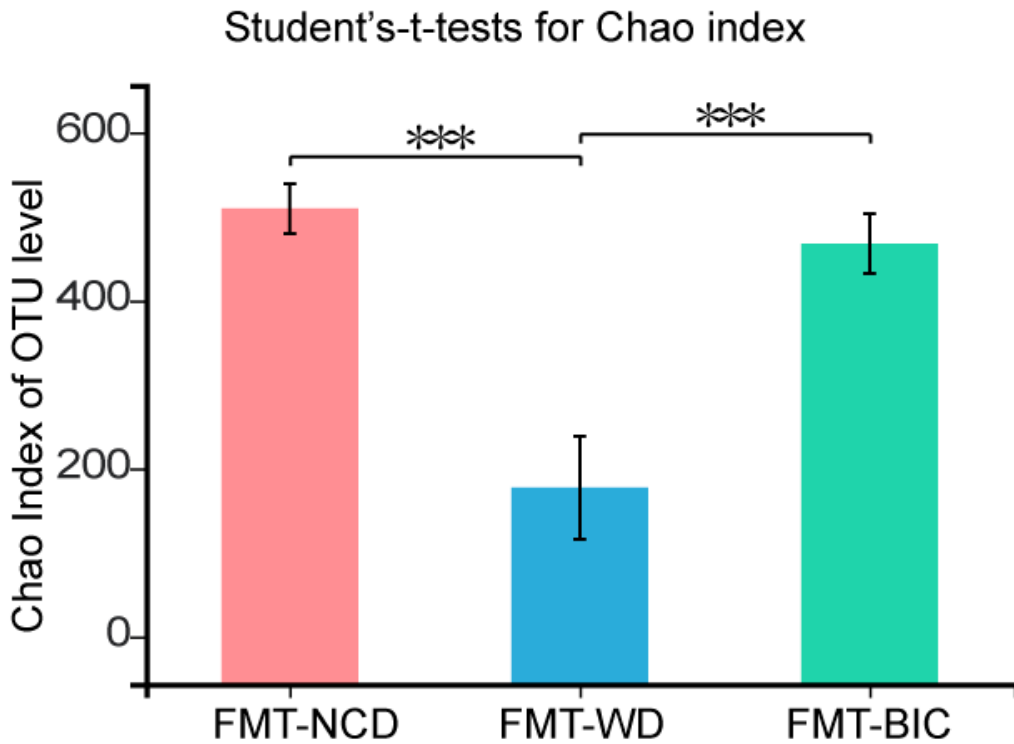


Рисунок S20 Різноманітність і багатство кишечних бактерій. Індекс Хао рівня OTU.

Дані представлені як середнє значення \pm стандартна помилка середнього (n=10-15). Указані достовірні відмінності: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у порівнянні з F-WD за тестом One-way ANOVA.

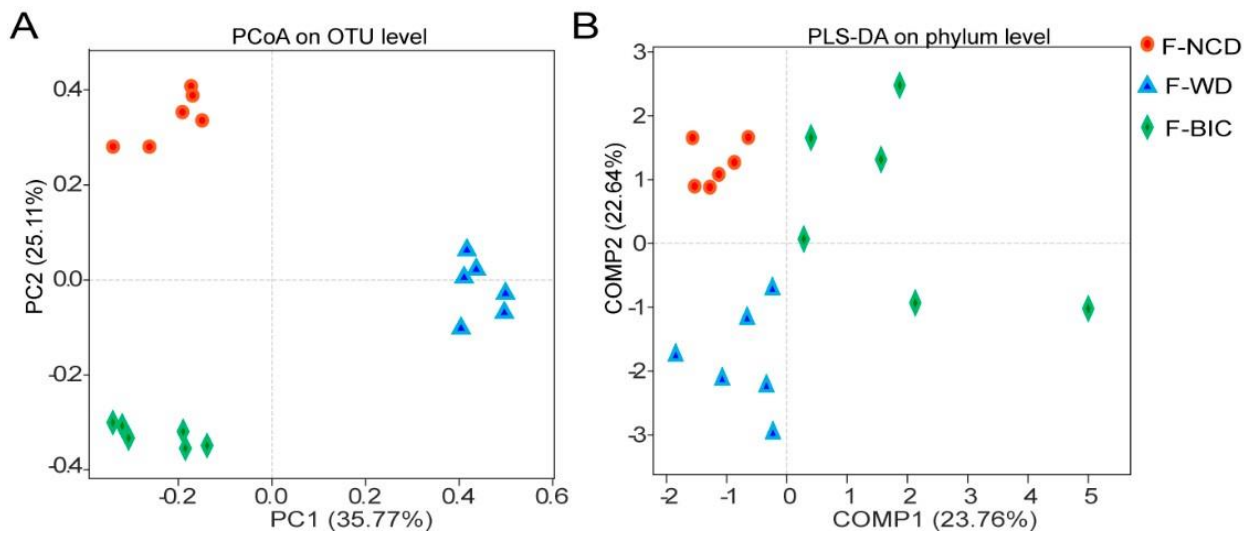


Рисунок S21 Реакція структури кишечної мікробіоти на різні групи тварин.

A. пока зачетный сюжет. B. График оцнки PLS-DA.

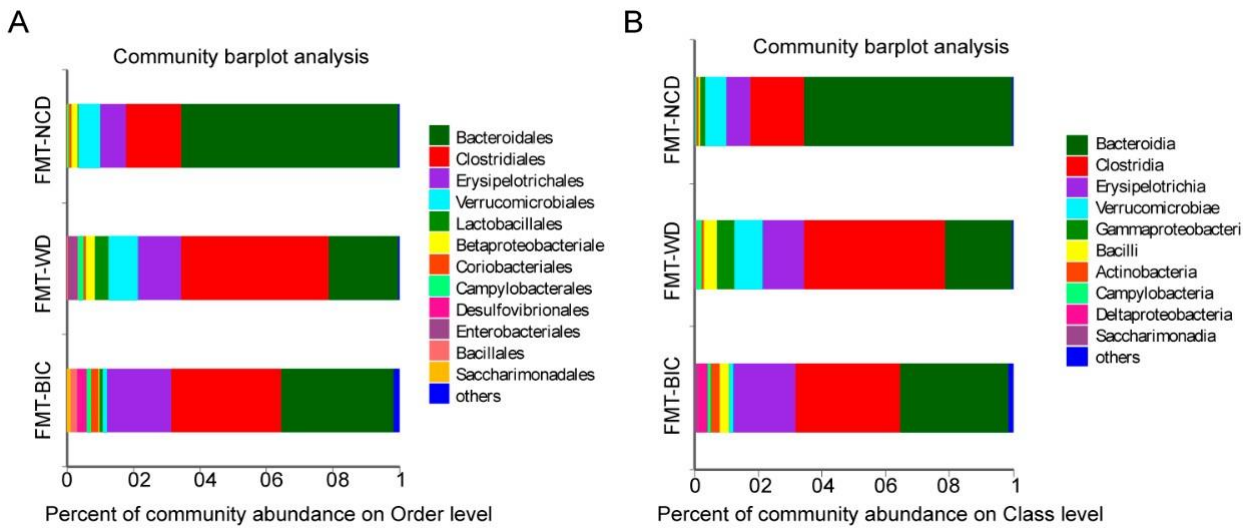


Рисунок S22 Аналіз чисельності спільнот на різних рівнях.

A. Ген 16S рРНК аналіз послідовності на рівні замовлення. Аналіз секвенування гена B 16S рРНК на рівні класу.

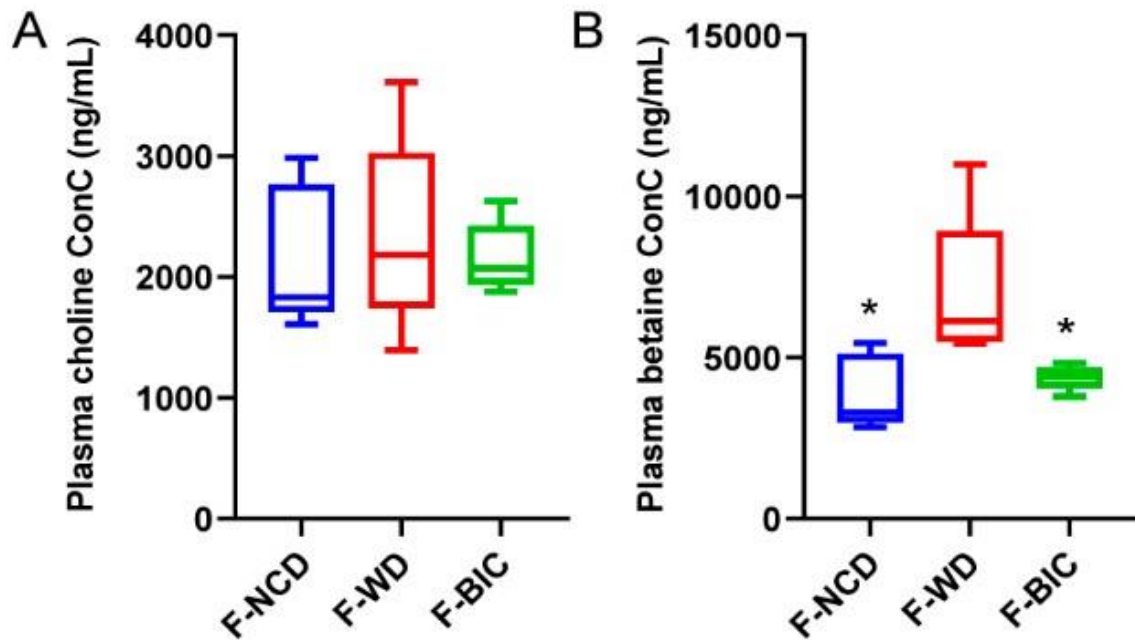


Рисунок S23. Біометаболіти, що продукуються кишечними бактеріями, у мишей-реципієнтів Ароє(-/-). Концентрацію холіну (А) і бетаїну (В) у зразках плазми визначали за допомогою ЖХ/МС.

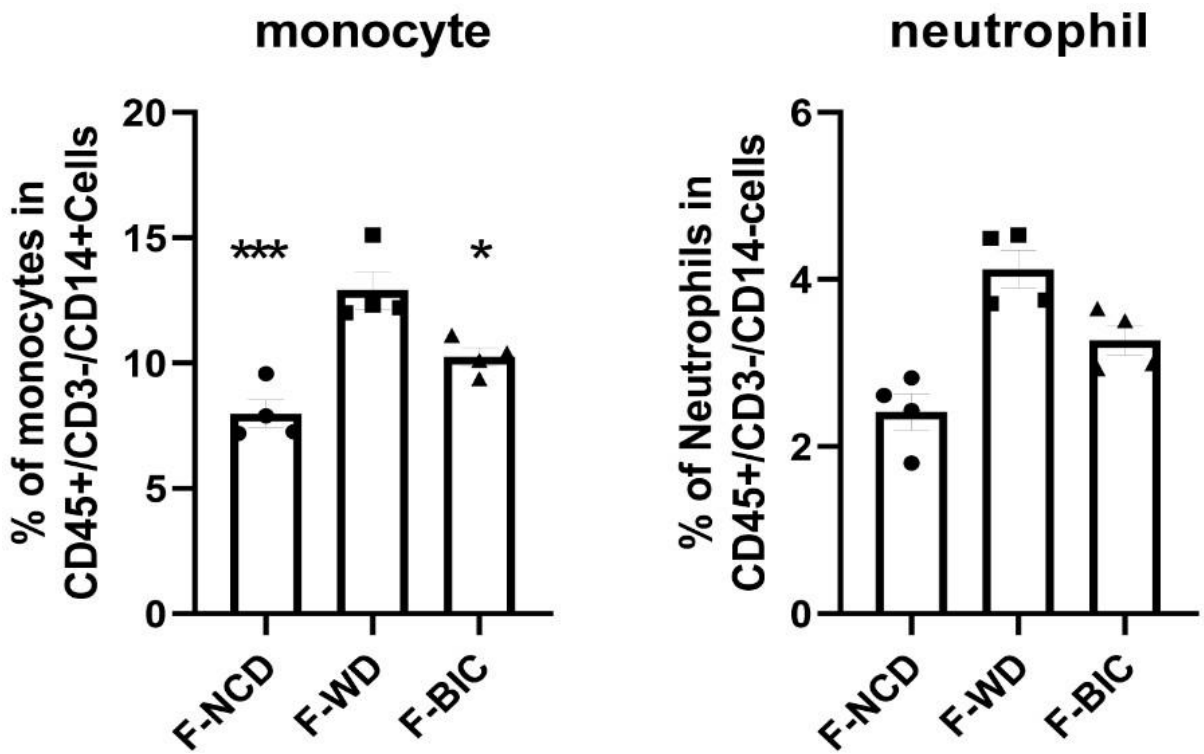


Рисунок S24 Процент нейтрофілів і моноцитів.

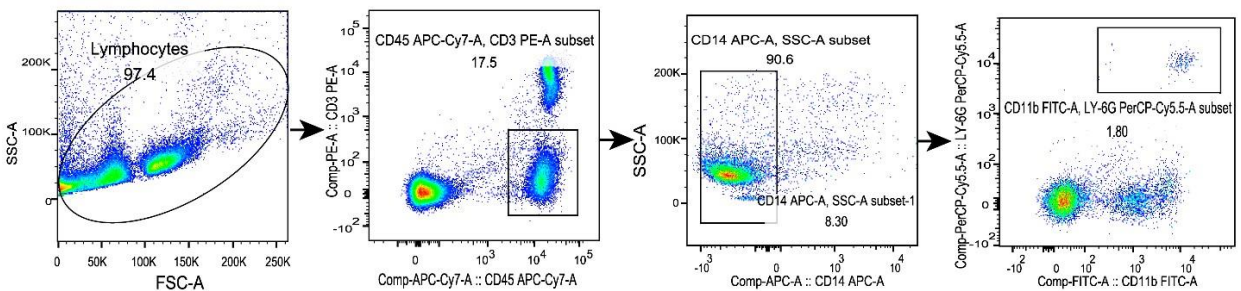


Рисунок S25 - стратегія гейтування FACS для нейтрофілів в циркуляції мишей Ароє (-/-).

Морфологічний гейт спочатку використовувався для видалення мусора, після чого CD45+/CD3-клетки були гейтовані. З цієї популяції далі гейтували CD4-клетки, а нейтрофіли гейтували як CD11b+ і клітини Ly6G+ з CD4- популяції.

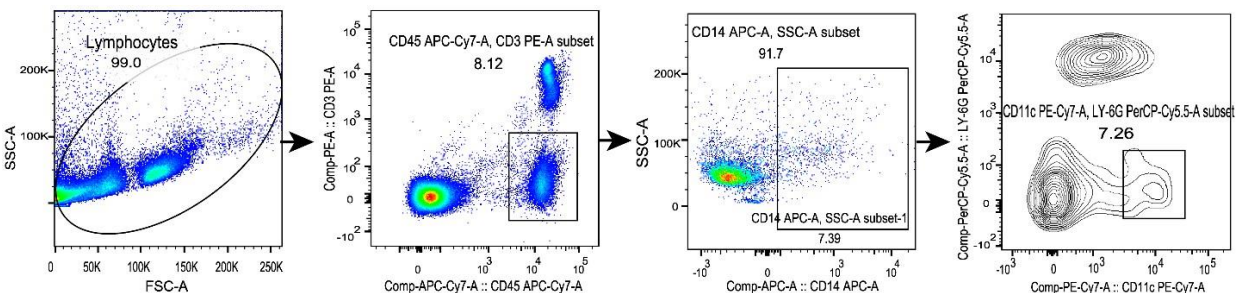
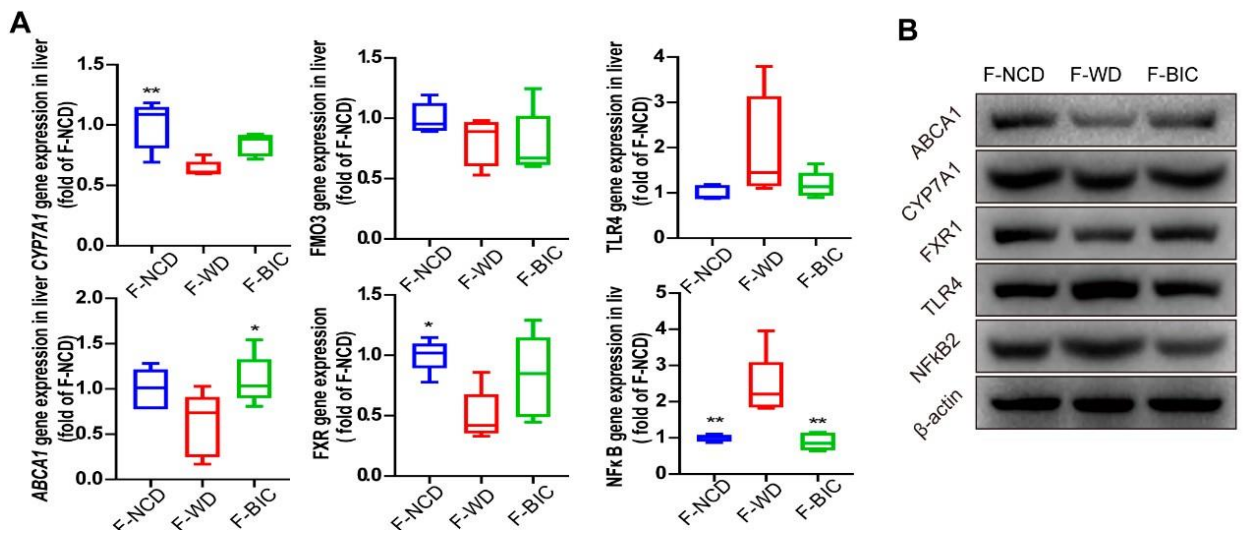


Рисунок S25-b Стратегія гейтування FACS для моноцитів в циркуляції мишей Ароє (-/-).

Морфологічний гейт спочатку використовувався для видалення мусора, після чого CD45+/CD3-клетки були гейтовані. З цієї популяції далі гейтували CD4+клетки, а нейтрофіли гейтували як CD11c+ і Ly6G-клетки з популяції CD4+.



Малюнок S26. Експресія ключових молекул у печінці мишей-реципієнтів *Arое(-/-)*.

Arое(-/-) мишей розділили на три групи: FMT-NCD (годували HFD, пересаджували фекалії миші NCD), FMT-WD (годування HFD, пересаджене фекаліями мишей WD) та FMT-BIC (годування з HFD, трансплантованими фекаліями мишей BIC) ($n = 8$). Свіжий трансплантат від донора мишам вводили через зонд щодня протягом 3 місяців. А. Експресія NF- κ B, Toll-подібна мРНК рецептора 4 (TLR4), ABCA1, CYP7a1, FMO та FXR1 у тканині печінки методом ВІД-ПЛР. Результати були нормалізовані до GAPDH. В. Експресію білка NF- κ B, TLR4, ABCA1, CYP7a1 та FXR1 у тканинах печінки оцінювали за допомогою вестерн-блоту, β -актин використовували як контроль. Дані представлені як середнє \pm стандартна помилка середнього ($n=5-6$). Істотні відмінності вказано: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, порівняно з F-WD за тестом One-way ANOVA.

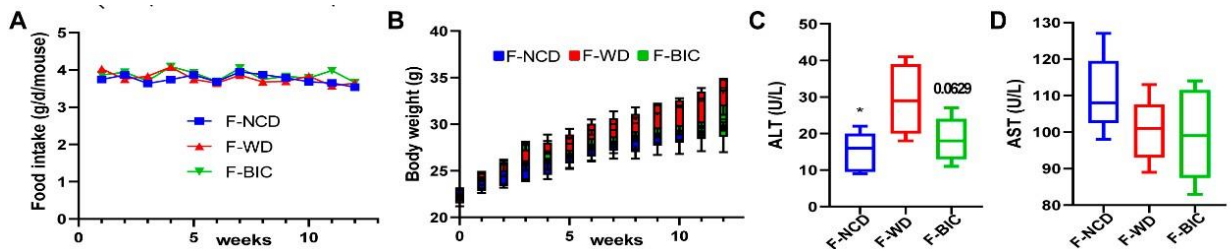


Рисунок S27 Метаболічний статус мишей-реципієнтів *Arое(-/-)*. А. Потреба в їжі реєструвалася кожну тиждень протягом наступних 12 днів. В. Маса тіла в групі зареєстрували кожну тиждень протягом наступних 12 тижнів. Стан печени, профільований за рівнями ALT (Е) і AST (F). Дані представлені у вигляді середнього \pm SEM ($n=5-6$). Указані достовірні відмінності: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, проти F-WD за допомогою тесту One-way ANOVA.

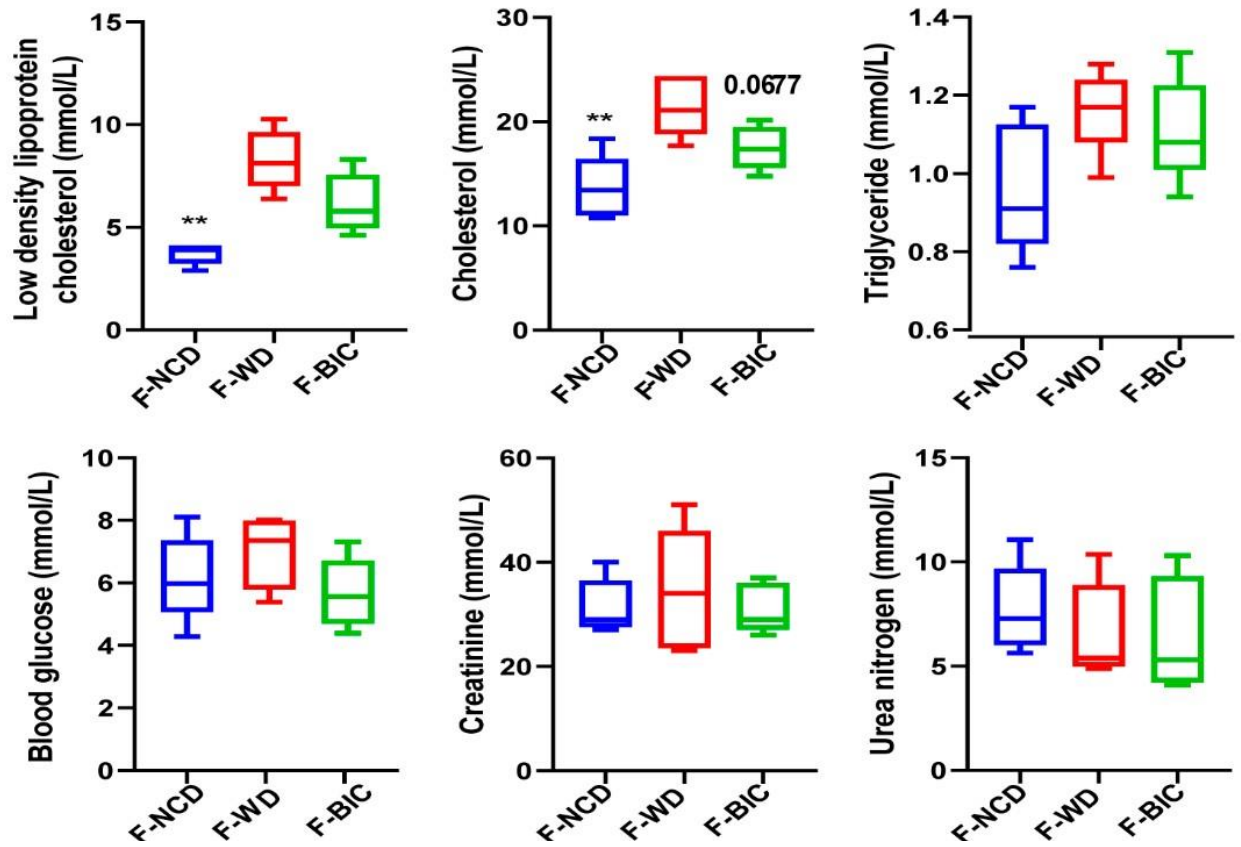
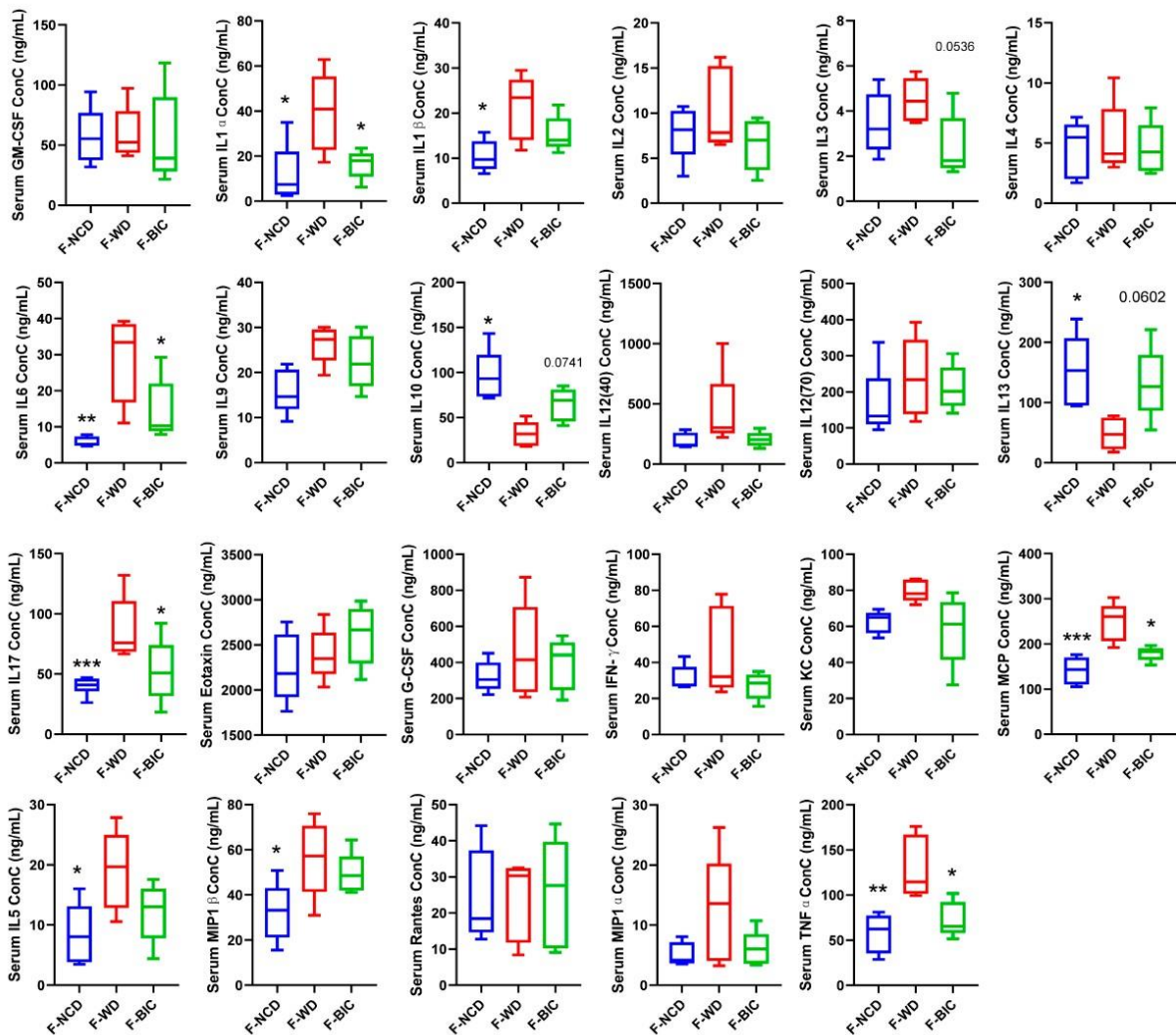


Рисунок S28. Біохімічний індекс у мишей-реципієнтів *ApoE(-/-)*. Данні представлені як середнє значення \pm стандартна помилка середнього. (n=5-6). Указані достовірні відмінності: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ у порівнянні з F-WD за одностороннім тестом ANOVA.



Малюнок S29. Хронічне запалення у мишей-реципієнтів *Arое(-/-)*. Миші *Arое(-/-)* були розділені на три групи: FMT-NCD (годують HFD, пересаджують фекалії мишей NCD), FMT-WD (годування HFD, пересаджене фекаліями мишей WD) та FMT-BIC (годування HFD, трансплантовані фекаліями мишей BIC) (n = 8). Був отриманий свіжий трансплантат від мишей-донорів через шлунковий зонд щодня протягом 3 місяців. Після закінчення експерименту кров зразки збирали та аналізували на системі Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) з використанням Набір для аналізу цитокінів, хемокінів та факторів росту Plex Pro (Bio-Rad, США), згідно з протоколом виробника. Вимірювані цитокіни включали інтерлейкін-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, колонія гранулоцитів фактор (G-CSF), інтерферон- γ (IFN- γ), фактор некрозу пухлини- α (TNF- α), похідний від кератиноцитів хемокін (KC), макрофагальний запальний білок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , еотаксин, регульований при активації нормальні Т-клітини експресують та секретують фактор (RANTES) та моноцити хемоаттрактантний білок-1 (MCP-1). Усі виміри проводилися з використанням Bio-Plex. Програмне забезпечення Manager 6.1 (Bio-Rad, США). Дані представлені як середнє \pm стандартна помилка середнього (n=5-6). Значне зазначено відмінності: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, порівняно з F-WD за однофакторним дисперсійним аналізом тестове завдання.

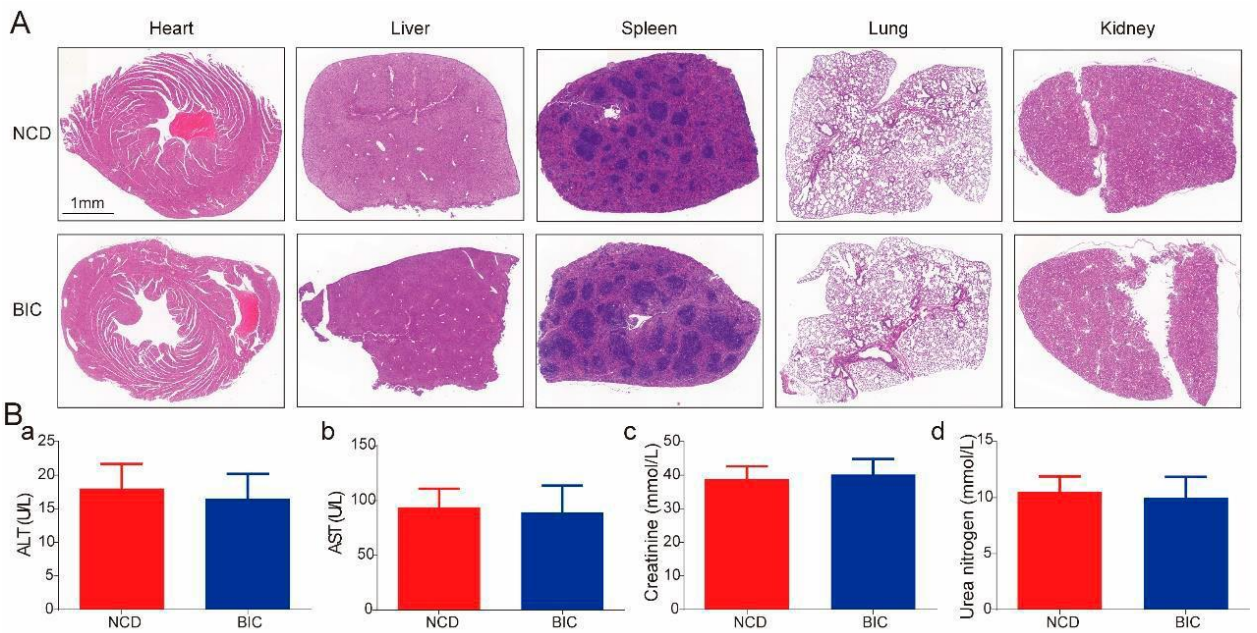


Рисунок S30 Аналіз довгострокової безпеки. Миші *Arое(-/-)* отримували BIC (200 мг кг⁻¹ день⁻¹ BBR) протягом 5 наступних місяців через шлунковий зонд, миші *Arое(-/-)* через шлунковий зонд використовували в якості контролю. А. Окрашивание основных тканей ГЭ. В-а Концентрація ALT, В-б Концентрація ALT, В-с Концентрація CRE В-д Концентрація BUN Дані представлені як середне значення ± SEM (n = 5). Вказані значимі відмінності: **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001 у порівнянні з НИЗ за тестом Oneway ANOVA. Масштабні лінійки, 1 мм.

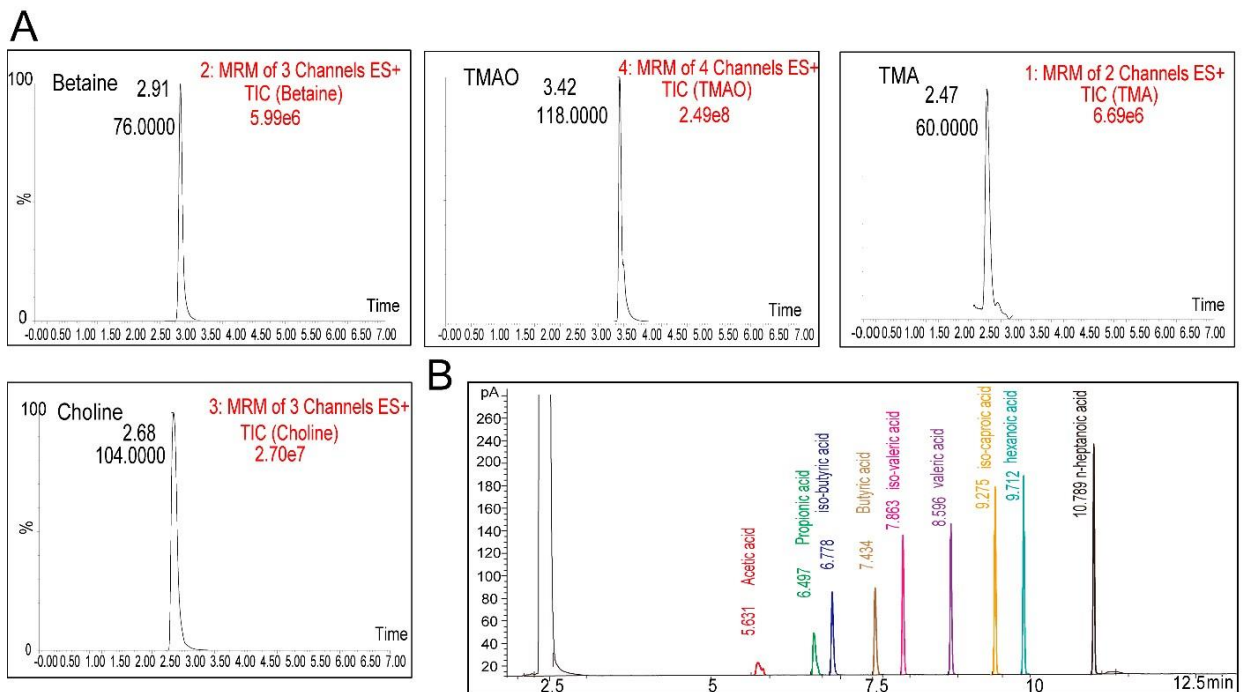


Рисунок S31 Стандартна хроматографія для аналізу. А. Хроматограми репрезентативних Бетаїн, ТМАО, ТМА і холін, профільовані за допомогою ВЭЖХ-МС/МС в зразках. Б. Хроматограми репрезентативних SCFAs, профільованих GC у фекаліях.