

Функциональная метаболомика при воспалительных заболеваниях кишечника

Шагалеева О.Ю., Кашатникова Д.А., Воробьева Е.А., Кардонский Д.А.,
Силантьев А.С., Ефимов Б.А., Иванов В.А., Беспярых Ю.А., Калачнюк Т.Н.,
Олехнович Е.И., Захаржевская Н.Б.*

ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика
Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

* natazaha@gmail.com

Ключевые слова: воспалительные заболевания кишечника; ГХ-МС с парофазным способом экстракции; *Bacteroides*, микробиота

Введение: Микробиота желудочно-кишечного тракта характеризуется широким спектром секреторной активности. При развитии воспалительных заболеваний происходят качественные модификации микробиома, что в значительной степени отражается на компонентном составе летучего метаболома. Функциональная метаболомика способствует оценке динамического состояния микробиоты в норме и патологии, используя для формирования комплексного описания состояния микробиоты данные метагеномного и метаболомного анализа. Если для оценки метагенома используют стандартные методы секвенирования, то для исследования летучего спектра метаболома рассматривают различные методические подходы. В данной работе для оценки летучего спектра метаболитов микробиоты использован метод ГХ/МС с парофазным способом экстракции. Для оценки динамического состояния микробиоты проведены эксперименты по формированию колита у животных (крысы/мыши) с последующей терапией воспаления посредством везикул *Bacteroides fragilis* (JIM), обладающих иммуномодулирующими свойствами.

Методы и алгоритмы: Для формирования острого колита и последующей оценке спектра летучего метаболома на стадиях острого колита и стадии самопроизвольной реконвалесценции использовали крыс-самок линии Wistar из Питомника лабораторных животных (Пушино РАН, Московская область) в возрасте 2 мес. (200–230 г). Животные были случайным образом разделены на три группы: контрольная группа (Контроль) ($n = 5$); группа опытная, получавшая декстран сульфат натрия в течение 7 дней, с последующей эвтаназией (ДСН7) ($n = 5$); группа, получавшая декстран сульфат натрия с последующим недельным восстановлением без ДСН (ДНС14) ($n = 5$). Исследование терапевтической эффективности везикул *Bacteroides fragilis* (JIM) посредством комплексного метаболомного и метагеномного анализа в модели острого колита у животных проводилось на мышах линии C57BL/6, возрастом 7–8 недель. Мыши были разделены на три группы: к ($n = 10$), ДСН ($n = 10$), ДСН+В ($n = 10$). Эксперимент включал в себя два цикла воспаление/ремиссия, каждый по 10 дней. Группа ДСН+В с 11 по 20 дни получала везикулы концентрацией 1 мг/кг. Массу тела, консистенцию стула и наличие крови в стуле регистрировали каждые 3 дня. Гистологическую пробоподготовку проводили согласно методу, описанному в публикациях [1]. Клинические проявления воспаления оценивали с помощью индекса активности заболевания (ИАЗ). Анализ метаболома проводили в образцах стула методом ГХ-МС на приборе

Shimadzu QP2010 Ultra с парофазным экстрактором Shimadzu HS-20 [2]. Данные ГХ/МС обрабатывали с использованием программного обеспечения MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) и GraphPad Prism 8.0.1. Секвенирование гена 16S рПНК для групп экспериментальных мышей было выполнено на платформе MinION™. Статистическое сравнение групп проводилось с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и поправки на множественное сравнение FDR. Расчеты проводились на языке программирования Python, с помощью модулей stats (библиотека scipy) и stats.multitest (библиотека statsmodels). Построение графиков осуществлялось с помощью библиотек seaborn и matplotlib.

Результаты: согласно полученным данным общий балл ИАЗ включал снижение массы тела, консистенцию стула и ректальное кровотечение. Показатель ИАЗ в контрольной группе у крыс оставался близким к 0 на протяжении всех экспериментальных процедур. ИАЗ в группах крыс, получавших ДСН (ДСН7 и ДСН14), был значительно выше по сравнению с контрольной группой и увеличивался на 3-й день. Максимальный балл, рассчитанный в группах крыс, получавших ДСН (ДСН7 и ДСН14), был получен на 7-й день, когда была достигнута острая фаза воспаления. Потерю веса животных, диарею и видимую кровь в стуле наблюдали на 7-й день в обеих группах. По данным гистопатологического исследования, толстая кишка контрольных животных имела неповрежденную слизистую оболочку, тогда как в толстой кишке, групп крыс ДСН7 и ДСН14, наблюдалась воспалительная клеточная инфильтрация, истончение слизистой и подслизистой оболочки и эрозия эпителия. Как и ожидалось, значения ИАЗ снизились в группе ДСН14 после прекращения введения ДСН на 8–14 день. Была явно отмечена способность кишечника к восстановлению на 14-е сутки, когда наблюдалась нормализация консистенции стула и восстановление веса животных. Определенное улучшение гистологической картины наблюдалось в группе ДСН14, в которой увеличивалось количество крипт и бокаловидных клеток, а структура слизистой оболочки была более дифференцированной, однако минимальная воспалительная инфильтрация сохранялась. Согласно полученным ГХ/МС данным изменения метаболомного профиля можно было наблюдать уже на третий день после введения ДСН. При этом основные симптомы колита у крыс, такие как диарея и кровь в стуле, за этот период времени еще не были обнаружены. Острая фаза колита у крыс достигала пика на 7-е сутки после введения ДСН и характеризовалась изменениями стула. Различия в метаболомном профиле также регистрировались на 7-й день. Основные изменения коснулись таких соединений, как уксусная кислота, пропановая кислота, пропановая кислота-2-метил-, бутановая кислота, гексановая кислота. Несмотря на улучшение гистологической картины после прекращения введения ДСН, наблюдалась тенденция к прогрессированию изменений профиля ЛОС. Метаболомные изменения продолжали увеличиваться к 14 дню. Произошли значительные изменения в метаболомном профиле для таких соединений, как уксусная кислота, бутановая кислота, пентановая кислота, пропановая кислота, 2-метил-пропановая кислота, гексановая кислота, зарегистрированная в группе DSS14. Изменения относительного количества метаболитов, таких как бензолпропановая кислота и индол, были отмечены на 11-й день.

Во втором эксперименте предварительно были выделены везикулы *Bacteroides fragilis*, которые характеризовались с помощью ПЭМ. Полученные везикулы

использовали для лечения мышей после воздействия ДСН. Всем трем группам на 10-е и 20-е сутки эксперимента проводилось гистологическое исследование тканей кишечника. По данным гистологического исследования в контрольной группе не наблюдались изменения, тогда как в группе ДСН структура слизистой дистальных отделов содержала протяженные очаги воспалительного поражения. В группе ДСН + В наблюдалась меньшая площадь поражения, а повреждения носили очаговый характер и имели значительно меньшую продолжительность. ИАЗ групп ДСН и ДСН+В были значительно выше, чем у контрольной группы, однако в ходе терапии везикулами ИАЗ в группе ДСН+В значительно снизился, по сравнению с группой ДСН. Среди идентифицированных в ходе метаболомного исследования соединений были обнаружены жирные кислоты с короткой, средней и длинной цепью и производные аминокислот. На 10-й день эксперимента между группами ДСН и ДСН+В не было обнаружено существенных различий. На 20-й день, соответствующий окончанию обработки везикулами, можно было выделить три отдельные группы. Контрольная группа значительно отличалась от групп ДСН и ДСН+В по метаболомному спектру. При лечении везикулами в группе ДСН+В можно было наблюдать тенденцию к восстановлению общего профиля метаболитов к контрольным значениям. Анализ изменчивости микробиома в образцах стула на 10й день эксперимента продемонстрировал снижение численности отдельных видов бактерий по сравнению с контрольной группой. К 20-му дню наблюдалась значительная разница между группами ДСН и контрольной группой при этом относительная численность изученных родов бактерий в группе ДСН+В к двадцатому дню наблюдения достигла исходных значений, определенных в контрольной группе. Корреляционный анализ позволил установить, что увеличение *Saccharibacteria* и *Acetivibrio* положительно коррелировало с фенолом и пентановой кислотой, а в группе ДСН преобладание *Lactococcus* и *Romboutsia* отрицательно коррелировало с фенолом и пентановой кислотой.

Выводы: в модельных экспериментах видно, что симбиоз двух методик (ГХ/МС и метагеномного секвенирования) позволяет неинвазивно отслеживать все этапы воспаления и процессы восстановления эпителия кишечника у подопытных животных. Таким образом данные функциональной метаболомики могут быть использованы для контроля активности воспаления у пациентов с ВЗК.

Functional metabolomics of inflammatory bowel diseases

Shagaleeva O.Yu., Kashatnikova D.A., Vorobyova E.A., Kardonsky D.A.,
Silantev A.S., Efimov B.A., Ivanov V.A., Bespyatykh Yu.A., Kalachnyuk T.N.,
Olekhnovich E.I., Zakharzhetskaya N.B.*

*Lopukhin Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical
Biological Agency, Moscow, Russia*

* natazaha@gmail.com

Key words: inflammatory bowel diseases; GC-MS with headspace extraction; *Bacteroides*; microbiota

Motivation and Aim: The microbiota is characterized by a wide range of secretory activities. Qualitative modifications of the microbiome occur during inflammatory diseases, which is largely reflected in the composition of the volatile metabolome.

Functional metabolomics contributes to the assessment of the dynamic state of the microbiota in health and disease, using data from metagenomic and metabolomic analysis to form a comprehensive description of the state of the microbiota. If standard sequencing methods are used to assess the meta-genome, then various methodological approaches are considered to study the volatile spectrum of the metabolome. In this research, the GC-MS with a headspace extraction method was used to assess the volatile spectrum of microbiota metabolites. To assess the dynamic state of the microbiota, experiments were conducted on the formation of DSS-induced colitis in animals (rat/mice), followed by inflammation treatment by *Bacteroides fragilis* (JIM) vesicles, which are known to have immunomodulatory properties.

Methods and Algorithms: For the formation of acute colitis and subsequent assessment of the spectrum of volatile metabolome at the stages of acute colitis and the stage of spontaneous convalescence, female Wistar rats from the Laboratory Animal Nursery (Pushchino RAS, Moscow region) at the age of 2 months were used. (200–230 g). Animals were randomly divided into three groups: control group (Control) ($n = 5$); experimental group, receiving dextran sodium sulfate for 7 days, followed by euthanasia (DSS7) ($n = 5$); group receiving dextran sodium sulfate followed by a week of recovery without DSS (DSS 14) ($n = 5$). Study of the therapeutic efficacy of *Bacteroides fragilis* (JIM) vesicles through comprehensive metabolomic and metagenomic analysis in an animal model of acute colitis was carried out on C57BL/6 mice, 7–8 weeks old. The mice were divided into three groups: k($n = 10$), DSS ($n = 10$), DSS+V($n = 10$). The experiment included two inflammation/remission cycles, each lasting 10 days. The DSS+V group received vesicles with a concentration of 1 mg/kg from days 11–20. Body weight, stool consistency, and presence of blood in stool were recorded every 3 days. Histological sample preparation was carried out according to the method described in publication [1]. Clinical manifestations of inflammation were assessed using the disease activity index (DAI). Metabolome analysis was carried out in stool samples using GC/MS on a Shimadzu QP2010 Ultra device with a Shimadzu HS-20 headspace extractor [2]. GC/MS data were processed using MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) and GraphPad Prism 8.0.1 software. 16S rRNA gene sequencing for groups of experimental mice was performed on the MinION™ platform. Statistical comparison of groups was carried out using the non-parametric Mann–Whitney test and correction for multiple comparisons FDR. Calculations were carried out in the Python programming language, using the stats (scipy library) and stats.multitest (statsmodels library) modules. The plotting was carried out using the seaborn and matplotlib libraries.

Results: Based on the findings, the total DAI score included weight loss, stool consistency, and rectal bleeding. The DAI index in the control group of rats remained close to 0 throughout all experimental procedures. DAI in the groups of rats treated with DSS (DSS7 and DSS14) was significantly higher compared to the control group and increased on the 3rd day. The maximum score calculated in the groups of rats treated with DSS (DSS7 and DSS14) was obtained on day 7, when the acute phase of inflammation was reached. Animal weight loss, diarrhea and visible blood in the stool were observed on day 7 in both groups. According to histopathological examination, the colon of control animals had an intact mucosa, while in the colon of groups of DSS7 and DSS14 rats, inflammatory cell infiltration, thinning of the mucosa and submucosa and erosion of the epithelium were observed. As expected, DAI values decreased in the DSS14 group after stopping DSS administration on days 8–14. The ability of the intestines to recover was

clearly noted on the 14th day, when normalization of stool consistency and restoration of animal weight were observed. A certain improvement in the histological picture was observed in the DSS14 group, in which the number of crypts and goblet cells increased, and the structure of the mucous membrane was more differentiated, but minimal inflammatory infiltration remained. According to the GC/MS data obtained, changes in the metabolomic profile could be observed already on the third day after DSS administration. However, the main symptoms of colitis in rats, such as diarrhea and blood in the stool, have not yet been detected during this period of time. The acute phase of colitis in rats reached its peak on the 7th day after DSS administration and was characterized by changes in stool. Differences in the metabolomic profile were also recorded at day 7. The main changes affected compounds such as acetic acid, propanoic acid, propanoic acid-2-methyl-, butanoic acid, hexanoic acid. Despite improvement in histology after discontinuation of DSS administration, there was a trend toward progressive changes in the VOC profile. Metabolomic changes continued to increase by day 14. There were significant changes in the metabolomic profile for compounds such as acetic acid, butanoic acid, pentanoic acid, propanoic acid, 2-methyl-propanoic acid, hexanoic acid, reported in the DSS14 group. Changes in the relative amounts of metabolites such as benzenepropanoic acid and indole were noted at day 11.

In the second experiment, *Bacteroides fragilis* vesicles were previously isolated and characterized by TEM. The resulting vesicles were used to treat mice after exposure to DSS. All three groups underwent a histological examination of intestinal tissue on the 10th and 20th days of the experiment. According to histological examination, no changes were observed in the control group, whereas in the DSS group, the structure of the distal mucosa contained extensive foci of inflammatory lesions. In the DSS+V group, a smaller area of damage was observed, and the damage was focal in nature and had a significantly shorter duration. The DAI of the DSS and DSS+V groups was significantly higher than that of the control group, but during vesicle therapy, the DAI in the DSS+V group decreased significantly compared to the DSS group. The compounds identified in the metabolomics study included short-, medium- and long-chain fatty acids and amino acid derivatives. On the 10th day of the experiment, no significant differences were found between the DSS and DSS+V groups. At day 20, corresponding to the end of vesicle treatment, three distinct groups could be distinguished. The control group differed significantly from the DSS and DSS+V groups in terms of the metabolomic spectrum. When treated with vesicles in the DSS+V group, a tendency could be observed to restore the overall metabolite profile to control values. Analysis of microbiome variability in stool samples on day 10 of the experiment demonstrated a decrease in the abundance of certain bacterial species compared to the control group. By the 20th day, a significant difference was observed between the DSS groups and the control group, while the relative abundance of the studied bacterial genera in the DSS+V group reached the initial values determined in the control group by the twentieth day of observation. Correlation analysis revealed that the increase in *Saccharibacteria* and *Acetivibrio* was positively correlated with phenol and pentanoic acid, and in the DSS group, the predominance of *Lactococcus* and *Romboutsia* was negatively correlated with phenol and pentanoic acid. **Conclusions:** model experiments show that the symbiosis of two techniques (GC/MS and metagenomic sequencing) allows non-invasive monitoring of all stages of inflammation and restoration processes of the intestinal epithelium in experimental animals. Thus, functional metabolomics data can be used to monitor inflammatory activity in patients with IBD.

Список литературы/References

1. Shagaleeva O.Yu., Kashatnikova D.A., Vorobyeva E.A. et al. Therapeutic effects of *Bacteroides fragilis* vesicles in a model of chemically induced colitis in rats. *Bull Exp Biol Med.* 2024;177(5):586-590. doi 10.47056/0365-9615-2024-177-5-586-590
2. Shagaleeva O.Y., Kashatnikova D.A., Kardonsky D.A. et al. GC-MS with headspace extraction for non-invasive diagnostics of IBD dynamics in a model of DSS-induced colitis in rats. *Int J Mol Sci.* 2024;25(6):3295. doi 10.3390/ijms25063295