



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Metabolomics insight into the gut microbiome of infants with cow's milk allergy

Zhu, P.

Citation

Zhu, P. (2026, January 13). *Metabolomics insight into the gut microbiome of infants with cow's milk allergy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4286434>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4286434>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

De incidentie van voedselallergie is de afgelopen decennia toegenomen, waarbij koemelkallergie (KMA) een van de meest voorkomende voedselallergieën in de vroege kindertijd is. In recente jaren heeft groeiend onderzoek naar het darm microbioom de cruciale rol ervan in de menselijke gezondheid en ziekte benadrukt, inclusief de potentiële impact op KMA in de vroege kindertijd. Men denken dat het darm microbioom een dynamische invloed uitoefent op het immuunsysteem, en daarmee mogelijk de aanvang en progressie van KMA reguleert. Tijdens dit proces worden in de darmen geproduceerde metabolieten in toenemende mate erkend als belangrijke mediator van de wisselwerking tussen het darm microbioom en de gastheer. Dit onderstreept de essentiële rol van metabolomics in het ontrafelen van de invloed van het darm microbioom op KMA bij jonge kinderen.

In metabolomics kunnen metabolomics methoden grofweg worden ingedeeld in targeted (doelgericht) en untargeted (niet specifiek gericht): bij targeted metabolomics ligt de nadruk op nauwkeurige kwantificering van bekende metabolieten, terwijl untargeted metabolomics streeft naar de ontdekking van nieuwe biomarkers via uitgebreide profilering van het metaboloom. Vloeistofchromatografie gekoppeld aan massaspectrometrie met electrospray-ionisatie (LC-ESI-MS) is een van de meest toegepaste technieken binnen metabolomics vanwege zijn hoge sensitiviteit en robuustheid. Echter, door het ionisatiemechanisme van de ESI-bron is de LC-ESI-MS-methode gevoelig voor matrixeffecten, die worden veroorzaakt door mee-eluerende matrixcomponenten en de nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de analyse aanzienlijk kunnen beïnvloeden. Dit blijft een grote uitdaging, met name in untargeted metabolomics, waar effectieve compensatiestrategieën ontbreken.

Daarom is het eerste doel van dit proefschrift om het probleem van matrixeffecten in untargeted metabolomics aan te pakken met de techniek van *post*-kolom infuseren van standaarden (PCIS). Het tweede doel is om inzicht te krijgen in de wisselwerking tussen het darmmicrobiom en voedselallergie in de vroege kindertijd door het fecale metaboloom te onderzoeken bij zuigelingen met KMA.

Hoofdstuk 1 schetst de huidige methodes voor het tegengaan van matrixeffecten in metabolomics en biedt een overzicht van de interconnecties tussen metabolomics, het darmmicrobioom en voedselallergie in de vroege kindertijd. Tevens wordt de reikwijdte van het proefschrift uiteengezet.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van een untargeted metabolomics-methode met PCIS voor het monitoren van matrixeffecten in plasma en feces. De analytische prestatie van deze LC-PCIS-MS-methode werd beoordeeld met targeted analyse van diverse stabiel isotopen-gelabelde (SIL) standaarden. De methode vertoonde goede precisie, nauwkeurigheid, opbrengst en reproduceerbaarheid. Validatie toonde aan dat variatie in matrixeffecten tussen monsters de meetnauwkeurigheid aanzienlijk kan verminderen. Door PCIS te implementeren via post-column infusion van xenobiotische verbindingen tijdens injectie van blanco- en verschillende matrixmonsters, konden zowel absolute (AME) als relatieve (RME) matrixeffecten in kaart worden gebracht. De PCIS-aanpak identificeerde succesvol chromatografische gebieden met ernstige matrixeffecten en leverde resultaten op die vergelijkbaar waren met traditionele *post*-extractie spike-methoden, wat de betrouwbaarheid als techniek voor RME-evaluatie in untargeted metabolomics bevestigt.

Hoofdstuk 3 breidt de toepassing van PCIS uit van monitoren naar matrix effect correctie door een innovatieve strategie van infusie van artificiële matrix. De artificiële matrix bestaat uit verbindingen die het electrospray-ionisatie proces verstoren door te concurreren in de ionisatie of de door de oppervlaktespanning van druppels te verhogen, waardoor Coulomb explosie wordt tegengegaan. Het matrixeffect gecreëerd door de artificiële matrix (ME_{art}) voor een specifieke feature wordt bepaald door monsters zowel met als zonder de artificiële matrix te injecteren; dit wordt vervolgens gebruikt om de ideale PCIS te selecteren voor correctie van biologische matrixeffecten (ME_{bio}). Validatie met diverse SIL-standaarden in plasma, urine en feces liet zien dat PCIS-selectie op basis van ME_{art} in 89% van de gevallen overeenkwam met ME_{bio} -selectie. Correctie met PCIS geselecteerd via ME_{art} resulteerde in vergelijkbare of verbeterde matrix effect scores voor respectievelijk 100% (plasma), 84% (urine) en 95% (feces). Aangezien ME_{art} op elk retentietijdstip kan worden beoordeeld, suggereert dit hoofdstuk

dat PCIS gecombineerd met artificiële matrixinfusie veel potentie heeft om matrix effect correctie te realiseren voor features gevonden met untargeted metabolomics.

Hoofdstuk 4 geeft een systematisch literatuurreview van aanpassingen en veranderingen na behandeling in het darm microbioom, metabooloom en immuunrespons bij kinderen (0-12 jaar) met KMA en diermodellen met KMA. Op het taxonomische niveau meldden meerdere studies afnamen in *Bifidobacterium* genus en Lactobacillales-orde, naast toenames in de klasse Clostridia bij kinderen met KMA. Interventiebenaderingen zoals verschillende voedingen, prebiotica, probiotica en synbiotica werden onderzocht. Echter, een duurzame toename van *Bifidobacterium*-niveaus werd alleen gezien bij behandelingen specifiek met *Bifidobacterium*-strains. Veranderingen in het metabooloom betroffen korte keten vetzuren (KKVZ), aminozuren en organische zuren; interventies hielpen deze gedeeltelijk te herstellen met verhoogde KKVZ-niveaus en genormaliseerde aminozuurprofielen. Er is slechts beperkt bewijs over immuunrespons. De review onderstreept dat er nog geen studies zijn die multi-omics benaderingen hebben toegepast om de relatie tussen darm microbioom en KMA in de vroege kindertijd te onderzoeken. De behoefte aan breder metabolomics onderzoek bij KMA is daarmee evident.

Hoofdstuk 5 sluit aan op de lacune beschreven in **hoofdstuk 4** en onderzoekt het fecale metabooloom van zuigelingen met KMA die een dieet kregen met of zonder synbiotische suppletie (inuline, oligofructose en *Bifidobacterium breve* M-16V). Door de zuigelingen in te delen op basis van KMA-status na één jaar of het type interventie, zijn de effecten van zowel KMA-tolerantie-acquisitie als synbiotische suppletie op het fecale metabooloom onderzocht. Zuigelingen die tolerant werden, vertoonden significant meer veranderingen in fecale aminozuren, galzuren en KKVZ, met hogere niveaus van lysine en citrulline, plus aanwijzingen voor verminderde tryptofaan-serotoninemetabolisme, toegenomen secundaire galzuurproductie en verhoogde butyraatspiegels. Dit wijst mogelijk op een gezonder darmmilieu met verbeterde barrièrefunctie en meer volwassen microbiota bij de tolerante groep. Verder toonde de synbiotische suppletie na zes maanden aanzienlijke veranderingen in fecale aromatische melkzuren, purinemetabolieten, vetzuren en galzuren. Een significante stijging van de aromatische

melkzuren (4-hydroxyphenyllactaat en indolelactaat), typische metaboliëten van infant-type *Bifidobacterium*, suggereerde een verhoogde aanwezigheid en activiteit van deze soorten, wat de effectiviteit van de synbiotische suppletie bevestigt.

Hoofdstuk 6 sluit het proefschrift af met een algemene samenvatting en discussie. Het schetst mogelijkheden voor verbeteringen in de implementatie van PCIS voor matrix effect correctie in untargeted metabolomics en biedt aanbevelingen en perspectieven voor de toepassing van metabolomics in het bestuderen van het darm microbiom en KMA in de vroege kindertijd.