

С. В. ВАСИЛЕВИЧ¹, Е. А. ДЕМИДИК², А. С. ЛЮЛЯ¹, Е. А. МАРКОВА¹, С. В. ФЕДОРОВИЧ¹

ДЕЙСТВИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ И ПИРОВИНОГРАДНОЙ КИСЛОТ НА ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГОМОГЕНАТАХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

¹ Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

² Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Работа нейронов головного мозга в значительной степени может регулироваться микробиотой кишечника. Мессенджерами такой регуляции могут быть короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), прежде всего пропионовая и масляная кислота, синтезируемые микроорганизмами. В представленной работе мы изучили их действие и действие близкой по структуре пировиноградной кислоты на образование продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах печени и мозга крыс. Также нами было исследовано влияние КЦЖК на образование свободных радикалов в синапсосах мозга с помощью флуоресцентного зонда DCFDA. Установлено, что 100 мкМ масляной кислоты вызывают увеличение базального уровня ПОЛ в гомогенате мозга; 10 мкМ, 100 мкМ пропионовой кислоты и 500 мкМ масляной кислоты уменьшают этот же показатель в гомогенате печени. Масляная кислота (50 мкМ и 5 мМ), также, как и пировиноградная кислота в концентрации 50 мкМ, не влияет на образование свободных радикалов в гомогенатах обоих органов, индуцированное 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 . Пропионовая кислота (50 мкМ и 5 мМ) увеличила накопление продуктов ПОЛ в случае реакции Фентона в гомогенате мозга и уменьшила в гомогенате печени. 5 мМ пировиноградной кислоты уменьшили этот же показатель в гомогенатах печени и мозга. Масляная кислота (50 мкМ) не влияла на образование свободных радикалов в синапсосах мозга. Пропионовая кислота (50 мкМ) уменьшила накопление активных форм кислорода в синапсосах, индуцированное 1 мМ H_2O_2 . Таким образом, показано, что КЦЖК и пировиноградная кислота способны регулировать окислительный стресс в мозге и печени.

Ключевые слова: микробиота, пропионовая кислота, масляная кислота, пировиноградная кислота, головной мозг, перекисное окисление липидов.

Введение. Работа нейронов головного мозга в значительной степени может регулироваться микробиотой кишечника [1–3]. Взаимодействие между кишечником и мозгом активно изучается, в настоящее время обсуждается существование оси микробиота-кишечник-мозг [1–3]. Мессенджерами такой регуляции могут быть короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), прежде всего пропионовая и масляная кислота, синтезируемые микроорганизмами [1–3]. Механизм воздействия КЦЖК на клетки головного мозга достаточно сложен и не до конца изучен. Наряду с активацией специфических рецепторов [2–4] он включает в себя регуляцию образования свободных радикалов [5]. Ранее нами было показано, что пропионовая кислота чаще оказывает антиоксидантное действие, а масляная кислота – прооксидантное действие в гомогенатах мозга и печени [6]. В то же время конкретный эффект увеличения или снижения образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) зависел от концентрации КЦЖК и органа [6]. В своей предыдущей работе мы изучали влияние миллимолярных патофизиологических концентраций, соответствующих пропионовой ацидурии или моделированию аутизма [3, 6, 7]. В то же время в физиологических условиях уровень КЦЖК в крови составляет порядка 5–20 мкМ [2, 3]. Поэтому в данной статье мы изучили влияние пропионовой и масляной кислот на образование продуктов перекисного окисления липидов в гомогенатах печени и мозга как в больших концентрациях, так и в микромолярном диапазоне.

Остаются неизвестными молекулярные механизмы действия КЦЖК на образование и распад активных форм кислорода (АФК). Показано, что структурно близкая к КЦЖК пировиноградная кислота обладает антиоксидантными свойствами за счет связывания пероксида водорода [8, 9]. Поэтому мы также изучили действие пропионовой, масляной и пировиноградной кислот на образование продуктов ПОЛ в присутствии H_2O_2 . Следует отметить, что, в отличие от других тестов на окислительный стресс, в случае ПОЛ пероксид водорода вызывает увеличение накопления продукта только в присутствии Fe^{2+} [6]. По этой причине процесс ПОЛ в наших экспериментах инициировался реактивом Фентона ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$).

Материалы и методы исследования. В работе использованы реактивы: 2'7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCFDA), пропионовая и масляная кислота ("Sigma", США). Все остальные реактивы квалификации не ниже "осч".

Получение гомогената. Гомогенат получали из печени и мозга беспородных белых крыс самцов весом 150–180 грамм, находящихся на стандартном рационе вивария БГУ. Извлекали печень и мозг подопытных животных и два раза промывали в ледяном 0,1 М натрий-фосфатном буфере pH 7,4. Ткани измельчали ножницами в чашке Петри, стоящей на льду и делали навеску 1 г. Гомогенизацию проводили в гомогенизаторе Поттера с притертым тефлоновым пестиком, предварительно добавив 4 мл 0,1 М натрий-фосфатного буфера pH 7,4 и ещё 5 мл через 30 с. Таким образом, мы получали 10 % гомогенат, который сразу же фильтровали через 3–4 слоя марли. В экспериментах с КЦЖК и пировиноградной кислотой соответствующие вещества вносились в фосфатный буфер и гомогенат инкубировался с ними 30 мин. при 37 °С до измерения продуктов ПОЛ.

Получение синапсом. Синапсомы изолировали из полушарий мозга крыс дифференциальным центрифугированием по методу Хайюша [10]. Полученный осадок суспендировали в инкубационной среде следующего ионного состава (в mM): NaCl 132; KCl 5; MgCl_2 1,3; NaH_2PO_4 1,2; глюкоза 10; HEPES 15; pH 7,4. При регистрации флуоресценции в инкубационную среду добавляли 1 mM CaCl_2 . Суспензию синапсом (10–20 мг/мл белка) предынкубировали 30 мин. при 37 °С, после чего её ставили на лед и использовали в эксперименте в течение 3 ч. В экспериментах с изучением действия КЦЖК 50 мкМ соответствующих кислот дополнительно вносились в инкубационную среду перед инкубацией.

Определение уровня ПОЛ. Уровень ПОЛ определяли по накоплению продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [11]. Нами использовались две модификации метода. Согласно первой модификации [6], готовый 10 % гомогенат печени или мозга разводили в натрий-фосфатном буфере до конечной концентрации белка 0,8–1 мг/мл. К 1 мл разведённого гомогената добавляли 1 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 7,4), 0,5 мл 30 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ), 2 мл 0,8 % раствора ТБК. Пробы помещали на 15 мин в кипящую водную баню, выпавший в осадок белок отделяли центрифугированием в течении 10 мин при 1500–3000 об/мин. Полученный супернатант спектрофотометрировали при длине волны 532 нм. Согласно второй модификации [12], нами была пропущена стадия центрифугирования, но измерялась разница в оптической плотности при 532 нм и 560 нм.

Определение накопления свободных радикалов в синапсоммах. Для определения образования свободных радикалов в синапсоммах использовали флуоресцентный зонд DCFDA [13, 14]. К суспензии синапсом (15–20 мг белка/мл) добавляли зонд DCFDA до конечной концентрации 25 мкМ. Инкубировали 60 мин при 37 °С. Загруженные синапсомы однократно отмывали в десятикратном объеме инкубационной среды. Осадок суспендировали в 2–2,5 мл инкубационной среды и использовали в экспериментах.

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) при постоянном помешивании в термостатируемой кювете (37 °С) при $\lambda_{\text{возб/рег}} = 501/525$ нм.

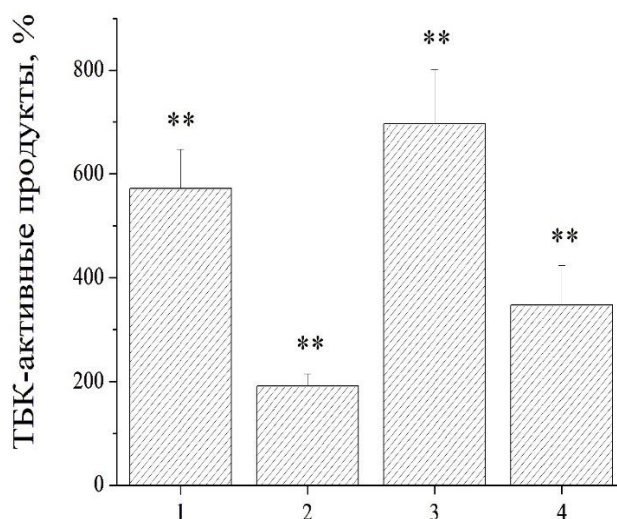
К 1,8 мл инкубационной среды, содержащей 2 mM CaCl_2 , добавляли 200 мкл суспензии синапсом до конечной концентрации белка 1 мг/мл. В случае экспериментов с КЦЖК инкубационная среда также содержала 50 мкМ соответствующей кислоты. Через 50 с после начала регистрации сигнала вносили 1 mM H_2O_2 . В контрольном эксперименте в

кювету добавляли аналогичное количество воды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную кривую.

Белок определяли с помощью метода Лоури [15] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта.

Статистическая обработка производилась с помощью программы Origin 6.0. Результаты представляли в виде среднего арифметического индивидуальных измерений и стандартной ошибки средней арифметической. Если сравнивалось более, чем 2 группы, то использовался дисперсионный анализ (ANOVA) с посттестом Бонферрони.

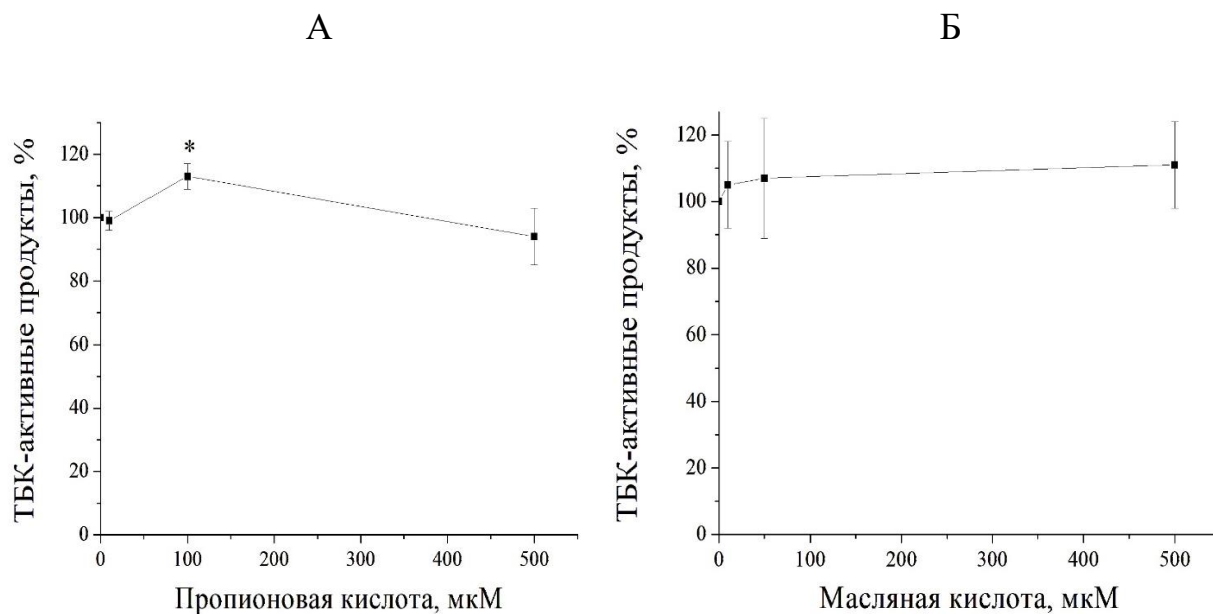
Результаты и их обсуждение. На первом этапе мы убедились, что обе модификации методики определения продуктов ПОЛ с ТБК достаточно эффективны. Вариант без центрифугирования ранее использовался нами только для синапсом. Рисунок 1 показывает, что инкубация гомогенатов с реактивом Фентона в зависимости от органа приводит к увеличению накопления ТБК-активных продуктов в 2–6 раз. Удаление стадии центрифугирования несколько увеличивает амплитуду ответов на стимуляцию образования АФК (рисунок 1), что позволяет предположить потерю окрашенных продуктов при осаждении. Таким образом, без стадии центрифугирования можно обойтись, что сокращает время эксперимента и позволяет избежать амортизации дорогостоящего оборудования.



- 1 – Гомогенат мозга, определение ТБК-активных продуктов с стадией центрифугирования
 2 – Гомогенат печени, определение ТБК-активных продуктов с стадией центрифугирования
 3 – Гомогенат мозга, определение ТБК-активных продуктов без стадии центрифугирования
 4 – Гомогенат печени, определение ТБК-активных продуктов без стадии центрифугирования
 За 100 % взят уровень малонового диальдегида без добавки 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 и составивший $2,11 \pm 0,38$ мкМ/мг белка в гомогенате мозга и $1,48 \pm 0,15$ мкМ/мг белка в гомогенате печени
 Представлены средние значения 10 экспериментов $\pm$ Sx
 ** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

Рисунок 1. Увеличение накопления продуктов ПОЛ в гомогенатах мозга и печени при добавлении 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 , измеренное различными модификациями метода

Далее мы изучили действие микромолярных концентраций КЦЖК на образование продуктов ПОЛ в гомогенате мозга и печени. Рисунок 2 и 3 показывают, что, как и в случае миллимолярных концентраций [6] эффект соединений не был линейным, он зависел от органа и конкретной дозы. Мы показали, что прооксидантным эффектом обладает 100 мкМ масляной кислоты для мозга, а антиоксидантным – 10 мкМ и 100 мкМ пропионовой кислоты, а также 500 мкМ масляной кислоты для печени. Следует отметить, что биологическое действие достаточно небольшой концентрации (10 мкМ) пропионовой кислоты позволяет предположить рецепторный механизм действия [2–4].

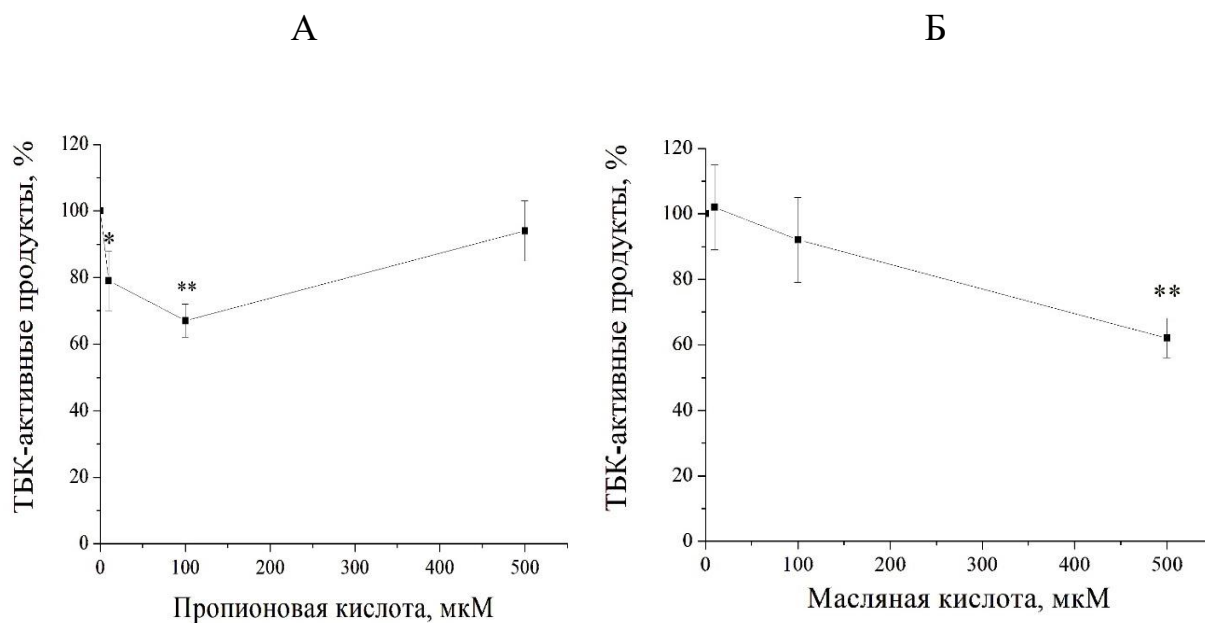


За 100 % взят уровень малонового диальдегида в гомогенате без КЦЖК и составивший $2,11 \pm 0,38$ мкМ/мг белка

Представлены средние значения 8 экспериментов $\pm Sx$

* $p \leq 0,05$ по отношению к 100 %

Рисунок 2. Влияние пропионовой (А) и масляной (Б) кислоты на уровень продуктов ПОЛ в гомогенате мозга



За 100 % взят уровень малонового диальдегида в гомогенате без КЦЖК и составивший $1,48 \pm 0,15$ мкМ/мг белка

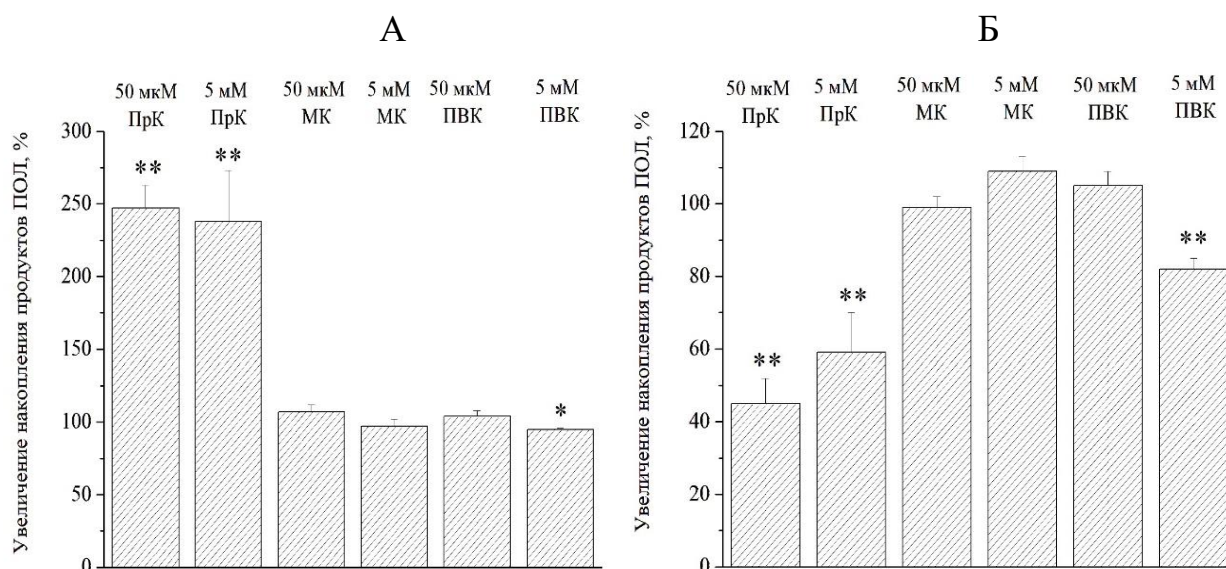
Представлены средние значения 8 экспериментов $\pm Sx$

** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

Рисунок 3. Влияние пропионовой (А) и масляной (Б) кислоты на уровень продуктов ПОЛ в гомогенате печени

На следующем этапе мы изучили действие КЦЖК на прирост продуктов ПОЛ, вызванный добавлением в гомогенат смеси 50 мкМ Fe^{2+} и 1 мМ H_2O_2 . Так как одним из механизмов потенциального ингибирующего действия КЦЖК является связывание с

пероксидом водорода, в этой экспериментальной серии мы также изучили влияние пирувата, хорошо известного естественного скавенджера H_2O_2 [8, 9]. Рисунок 4 показывает, что масляная кислота не оказывает никакого влияния в данной экспериментальной модели, в то же время пропионовая кислота обладает антиоксидантным действием в гомогенате печени и прооксидантным действием в гомогенате мозга. Этот эффект был практически одинаков для физиологической концентрации 50 мкМ и патофизиологической концентрации 5 мМ. Пируват обладает антиоксидантным действием в обоих гомогенатах в концентрации 5 мМ, но был неэффективен в концентрации 50 мкМ (рисунок 4).



ПрК – гомогенат был предынкубирован с пропионовой кислотой

МК – гомогенат был предынкубирован с масляной кислотой

ПБК – гомогенат был предынкубирован с пировиноградной кислотой

За 100 % взят уровень малонового диальдегида после добавления 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 и составивший $4,13 \pm 0,77$ мкМ/мг белка в гомогенате мозга и $2,90 \pm 0,22$ мкМ/мг белка в гомогенате печени

Представлены средние значения 10 экспериментов $\pm$ Sx

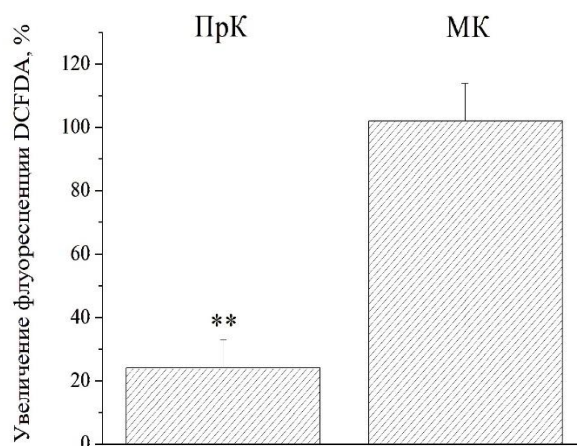
** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

* $p \leq 0,05$ по отношению к 100 %

Рисунок 4. Влияние короткоцепочечных жирных и пировиноградной кислоты на увеличение накопление продуктов ПОЛ, индуцированное 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 в гомогенатах мозга (а) и печени (б)

Разнонаправленность действия пропионовой кислоты в разных органах можно объяснить предположением, что это соединение обладает как прооксидантными, так и антиоксидантными свойствами, и в зависимости от того, какая тенденция окажется сильнее, таким и будет конечный эффект. В мозге одним из основных источников АФК является NADPH-оксидаза микроглиальных клеток [16]. Показано, что микроглиальные клетки могут активироваться КЦЖК, в том числе и пропионовой кислотой [17, 18], что, в свою очередь, может привести к усилению образования свободных радикалов. Поэтому на следующем этапе мы изучили действие КЦЖК на развитие окислительного стресса в синапсомах, изолированных пресинаптических окончаниях нейронов. Этот объект сохраняет многие свойства интактных пресинаптических окончаний и не содержит микроглиальные клетки [10, 19]. При работе с синапсомами мы использовали флуоресцентный зонд DCFDA, так как этот метод более чувствителен по сравнению с определением ТБК-активных продуктов [12, 20]. Также мы в данном случае использовали 1 мМ H_2O_2 без дополнительной добавки ионов железа. Это связано с тем, что в этом тесте, в отличие от теста с ТБК-продуктами, где отсутствует ответ на один пероксид водорода [6], 1 мМ H_2O_2 дает значимый сигнал, который легко может быть измерен [20]. 50 мкМ Fe^{2+} + 1 мМ H_2O_2 приводит к очень быстрому

окислению флуоресцентного зонда внутри синапсом [20], что делает затруднительным его изучение. Рисунок 5 показывает, что 50 мкМ пропионовой, но не масляной кислоты обладает антиоксидантными свойствами в этой экспериментальной модели. Полученные результаты в целом подтверждают гипотезу об прооксидантном действии пропионовой кислоты на микроглиальные клетки, которое маскирует ее антиоксидантное действие. Остается неизвестным механизм, позволяющий этому соединению подавлять окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода или пероксидом водорода + Fe^{2+} .



ПрК – синапсомы были предынкубированы с 50 мкМ пропионовой кислоты. Инкубационная среда также содержала 50 мкМ пропионовой кислоты

МК – синапсомы были предынкубированы с 50 мкМ масляной кислоты. Инкубационная среда также содержала 50 мкМ масляной кислоты

Представлены средние значения 6 экспериментов $\pm$ Sx.

** $p \leq 0,01$ по отношению к 100 %

Рисунок 5. Влияние КЦЖК на увеличение флуоресценции DCFDA в синапсомы мозга крыс

Закключение. Таким образом, нами показано, что даже в микромолярных концентрациях КЦЖК способны оказывать влияние на свободнорадикальные процессы в гомогенатах мозга и печени. Пропионовая кислота способна активировать окислительный стресс, индуцированный $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ в гомогенате мозга и ингибировать его в гомогенате печени. Пропионовая кислота также обладает антиоксидантными свойствами в модели окисления флуоресцентного зонда DCFDA в синапсомы с помощью пероксида водорода. Пировиноградная кислота снижала накопление продуктов ПОЛ, вызванное $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ в гомогенатах печени и мозга.

Литература:

- [1]. Cryan J.F., O’Riordan K.J., Cowan C.S.M. et al. The microbiota-gut-brain axis // *Physiol Rev.* 2019. Vol. 99. P. 1877–2013.
- [2]. Dalile B., Van Oudenhove L., Vervliet B. et al. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019. Vol. 26. P. 461–478.
- [3]. Люля А.С., Федорович С.В. Роль короткоцепочечных жирных кислот в функционировании оси микробиота-кишечник-головной мозг // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2024. N. 1. С. 77–85.
- [4]. Kimura I., Ichimura A., Ohus-Kitano R. et al. Free fatty acid receptors in health and disease // *Physiol Rev.* 2020, Vol. 100. P. 171–210.
- [5]. Gonzalez-Bosch C., Boorman E., Zunszain P.A. et al. Short-chain fatty acids as modulators of redox signaling in health and disease // *Redox Biol.* 2021. Vol. 47. Art. 102165.
- [6]. Яцкевич Е.А., Джавад М., Федорович С.В. Влияние пропионовой и масляной кислот на перекисное окисление липидов в гомогенатах печени и мозга крыс // *Экспериментальная биология и биотехнология.* 2023. N 1. С. 26–32.

- [7]. Haijes H.A., Jans J.J.M., Tas S.Y. et al. Pathophysiology of propionic and methylmalonic acedimias. Part 1, Complications // *J Inherit Metab Dis*. 2019. Vol. 42. P. 730–744.
- [8]. Lopalco A., Dalwadi G., Niu S. et al. Mechanism of decarboxylation of pyruvic acid in the presence of hydrogen peroxide // *J Pharm Sci*. 2016. Vol. 105. P. 705–713.
- [9]. Guarino V.A., Oldham W.M., Loscalzo J. et al. Reaction rate of pyruvate and hydrogen peroxide: assessing antioxidant capacity of pyruvate under biological conditions // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9. Art. 19568.
- [10]. Hajos F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity // *Brain Res*. 1975. Vol. 93. P. 485–489.
- [11]. Kohn H.I., Liversedge M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione // *J Pharmacol Exp Ther*. 1944. Vol. 82. P. 292–300.
- [12]. Лыскова Т.И., Аксенцев С.Л., Федорович С.В. и др. Влияние факторов ишемического повреждения на перекисное окисление липидов в синапсоммах мозга крыс // *Биофизика*. 1997. Т. 42. С. 408–411.
- [13]. LeBel C.P., Bondy S.C. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes // *Neurochem Int*. 1990. Vol. 17, P. 435–440.
- [14]. Alekseenko A.V., Waseem T.V., Fedorovich S.V. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes // *Brain Res*. 2008. Vol. 1241, P. 193–200.
- [15]. Lowry O., Rosebrough H., Farr H. et al. Protein measurements with Folin reagent // *J Biol Chem*. 1952. Vol. 193. P. 265–279.
- [16]. Block M.L., Zecca L., Hong J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms // *Nature Rev Neurosci*. 2007. Vol. 8. P. 57–69.
- [17]. Huuskonen J., Suuronen T., Nuutinen T. et al. Regulation of microglial response by sodium butyrate and short-chain fatty acids // *Br J Pharmacol*. 2004. Vol. 141. P. 874–880.
- [18]. Sampson T.R., Debelius J.W., Thron T. et al. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease // *Cell*. 2016. Vol. 167. P. 1469–1480.
- [19]. Федорович С.В., Демидчик В.В. Повреждение синапсов центральной нервной системы при патологиях головного мозга: мембранные механизмы и способы коррекции // *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023. N 3. С. 4–11.
- [20]. Пекун Т.Г., Васим Т.В., Федорович С.В. Образование активных форм кислорода при экстраклеточном закислении // *Биофизика*. 2012. Т. 57. С. 253–257.

S. V. VASILEVICH¹, E. A. DEMIDIK², A. S. LYULYA¹, E. A. MARKOVA¹, S. V. FEDOROVICH¹

EFFECT OF SHORT CHAIN FATTY AND PYRUVIC ACID ON OXIDATIVE STRESS DEVELOPMENT IN RAT BRAIN AND LIVER HOMOGENATES

¹ Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

² Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

Summary

The functioning of brain neurons is largely regulated by gut microbiota. Short chain fatty acid (SCFA), mainly propionic and butyric acid, which are synthesized by microorganisms, can be messengers of this regulation. In present paper we investigate their influence and structurally close pyruvic acid on formation of lipid peroxidation (LP) products in rat liver and brain homogenates. Also, we study influence of SCFA on free radical formation in brain synaptosomes using DCFDA fluorescent dye. It is established that 100 μ M of butyric acid leads to increase of LP basal level in brain homogenates; 10 μ M, 100 μ M of propionic acid and 500 μ M of butyric acid decrease the same characteristic in liver homogenates. Butyric acid (50 μ M and 5 mM) and also pyruvic acid in concentration 50 μ M did not influence free radical formation induced by 50 μ M Fe^{2+} + 1 mM H_2O_2 in homogenates of both tissues. Propionic acid (50 μ M and 5 mM) increased the accumulation of LP products in case of Fenton reaction in brain homogenates and decrease it liver homogenates. Butyric acid (50 μ M) did not influence free radical formation in brain synaptosomes. Propionic acid (50 μ M) decreased reactive oxygen species formation in synaptosomes which was induced by 1 mM H_2O_2 . Therefore, it was shown that SCFA and pyruvic acid able to regulate oxidative stress in brain and liver.

Keywords: microbiota, propionic acid, butyric acid, brain, lipid peroxidation, pyruvic acid.