

ДЕЙСТВИЕ ПРОПИОНОВОЙ И
МАСЛЯНОЙ КИСЛОТ НА
ИЗОЛИРОВАННЫЕ
ПРЕСИНАПТИЧЕСКИЕ ОКОНЧАНИЯ
НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА
КРЫС



Демидик Екатерина Александровна
магистрант

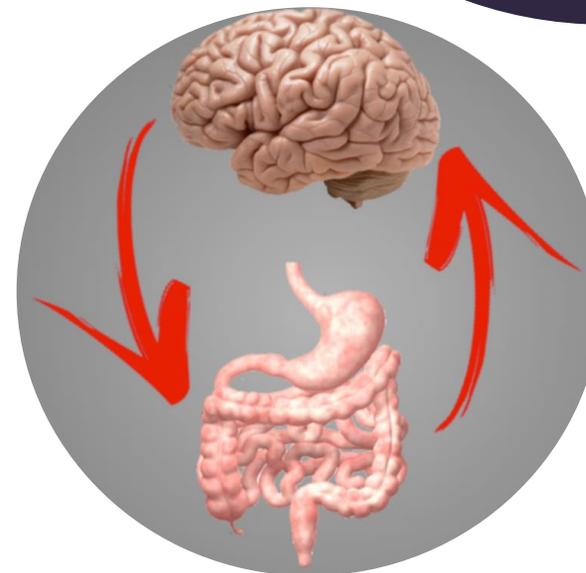
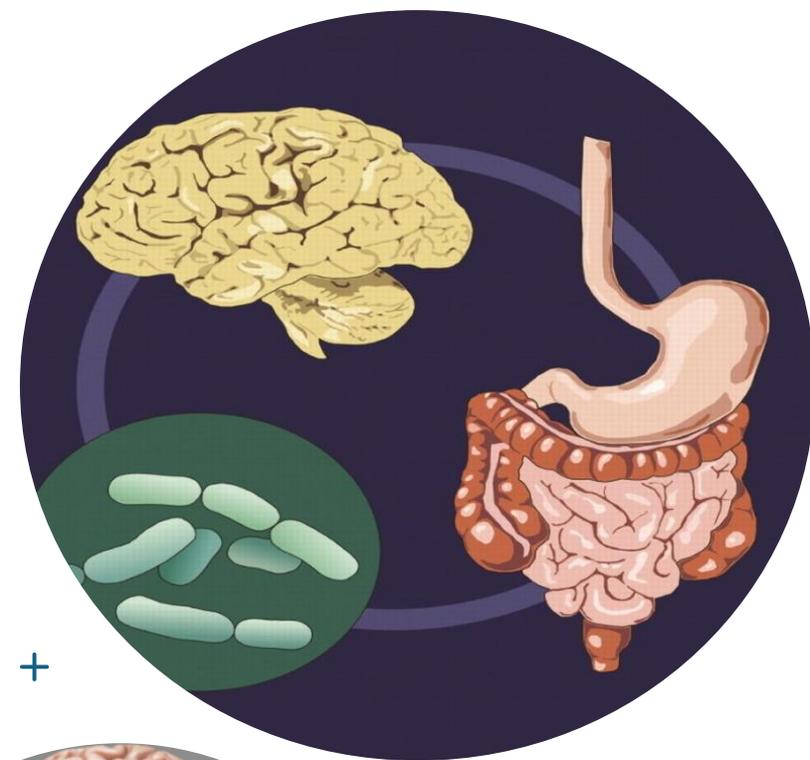
Люля Анастасия Станиславовна
аспирант 2-го года обучения

Научный руководитель: к.б.н., доцент
Федорович Сергей Викторович



ВВЕДЕНИЕ

- Микробиота кишечника и работа головного мозга достаточно тесно связаны через **ось микробиом-кишечник-мозг**. Такая связь оказывает значимое влияние на работу клеток головного мозга.
- Наиболее подходящим объяснением данных механизмов регуляции является **биохимическая гипотеза**, согласно которой различные бактериальные штаммы синтезируют **метаболиты**, которые, проникают в кровоток и **оказывают прямое либо опосредованное влияние на головной мозг**.
- К числу таких метаболитов относятся **короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК)**, такие как **пропионовая кислота (ПК)** и **масляная кислота (МК)**. Как правило, штаммы, продуцирующие **масляную кислоту**, обладают **нейропротекторными свойствами**, а штаммы, продуцирующие **пропионовую кислоту**, вносят свой вклад в **патогенез нейродегенеративных заболеваний**.



ВЛИЯНИЕ ПРОПИОНОВОЙ (ПК) И МАСЛЯНОЙ (МК) КИСЛОТ НА ЦИКЛ СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА АКРИДИНОВЫЙ ОРАНЖЕВЫЙ

Концентрация 5 мМ КЦЖК характерна для пропионовой ацидурии, в то же время в нормальных физиологических условиях в плазме наблюдается 1-15 мкМ этих соединений, поэтому мы изучили действие 50 мкМ и 5 мМ ПК и МК.

ПК в концентрации 5 мМ ингибирует увеличение флуоресценции акридинового оранжевого, индуцированное калиевой деполяризацией более, чем в 5 раз, в то же время как такая же концентрация МК не оказывает статистически значимого воздействия.

Эти результаты свидетельствуют об ингибировании экзоцитоза при действии ПК.

Мы установили, что более низкие концентрации КЦЖК не оказывают статистически значимого влияния на увеличение флуоресценции акридинового оранжевого, хотя наблюдается некоторая тенденция к его ингибированию.

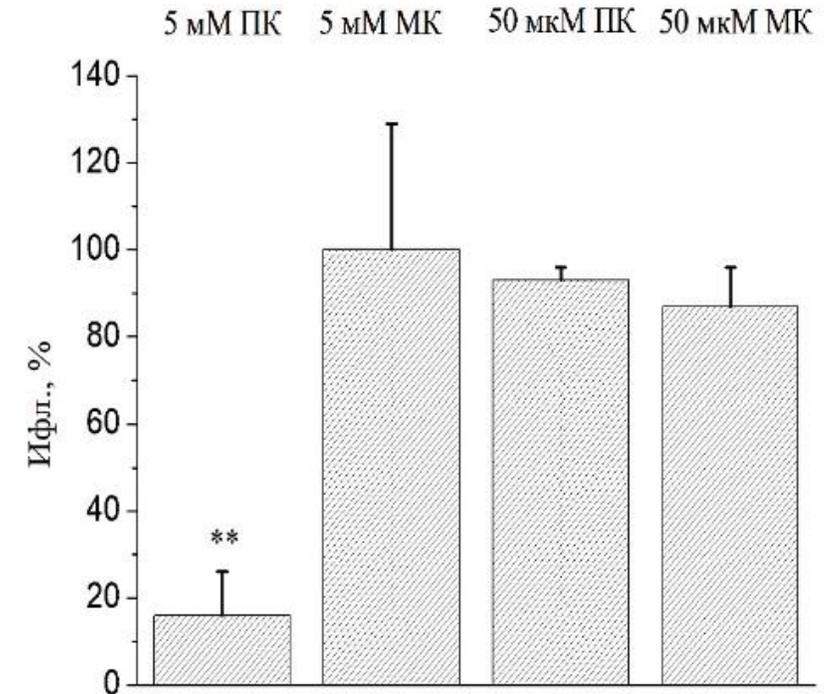


Рисунок 1 – Влияние КЦЖК на экзоцитоз в синапсоммах

** – при $p \leq 0.01$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH_i В СИНАПТОСОМАХ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА ВСЕСФ-АМ

1) Мы провели эксперимент с целью **детектирования pH в синаптосомах** головного мозга. При добавлении ионофоров **монензина и грамицидина**, уравнивающих содержание протонов в цитозоле и внешней среде, наблюдалось увеличение флуоресценции ВСЕСФ. В результате было установлено, что в **синаптосомах pH будет ниже, чем во внеклеточном пространстве**. Нами были получены значения **pH_i для синаптосом 6.99±0.06** (Таб. 1), что близко к полученным нами ранее результатам и литературным данным.

Условия	pH _i
Контроль	6.99±0.06
5 мМ ПК	5.94±0.24
5 мМ МК	6.16±0.07

Таблица 1 - Определение pH_i в синаптосомах с помощью флуоресцентного зонда ВСЕСФ-АМ

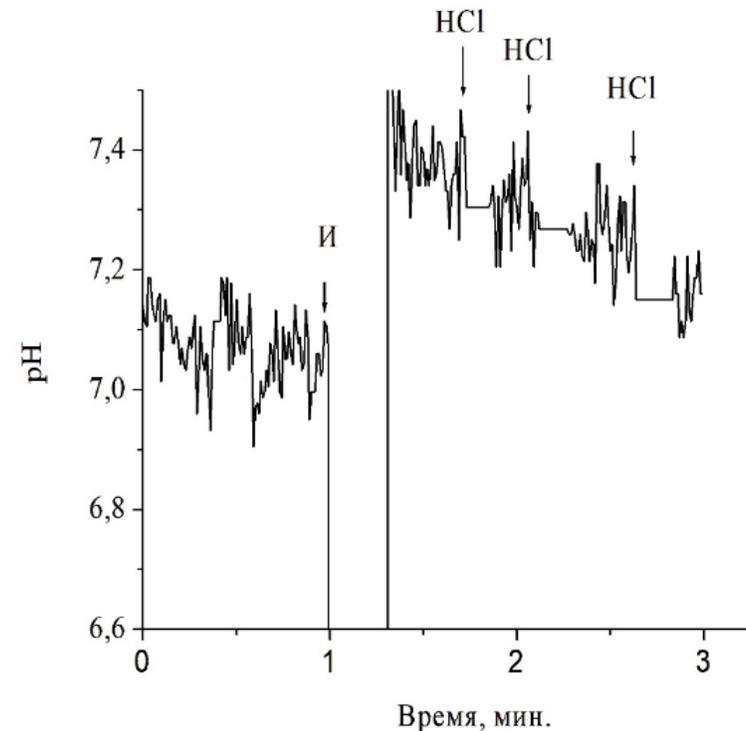


Рисунок 2 – Типичный эксперимент для построения калибровочной кривой

2) Инкубация синаптосом в течении 30 минут с **5 мМ ПК или МК приводит к снижению pH фактически на единицу** (Табл. 1).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH_i В СИНАПСОСОМАХ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗОНДА ВСЕСФ-АМ

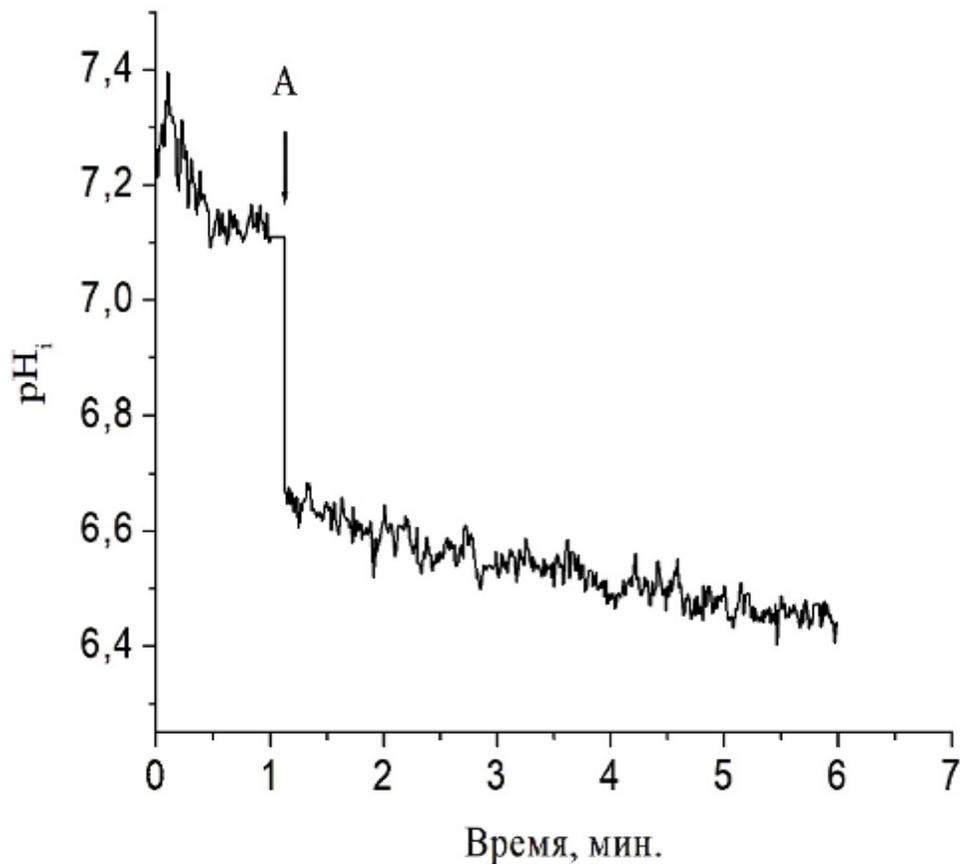


Рисунок 3 – Влияние амилорида на pH_i

3) **Добавление** ингибитора Na⁺/H⁺ обменника амилорида (A) (1 мМ) приводит к **уменьшению** флуоресценции ВСЕСФ, что свидетельствует о **закислении** цитозоля. (Рис. 3)

pH цитозоля нейронов и синапсом всегда будет ниже, чем в окружающей среде за счет пассивного транспорта протонов вследствие отрицательного заряда цитозольной стороны плазматической мембраны. Этот транспорт частично компенсируется активными системами pH регуляции клетки. Основной системой pH регуляции в синапсом является Na⁺/H⁺ обменник, поэтому его ингибирование приводит к дальнейшему закислению цитозоля.

ВЛИЯНИЕ КЦЖК НА ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В СИНАПТОСОМАХ

1. Добавление **5 мМ ПК**, но не 5 мМ МК приводит к быстрому **увеличению флуоресценции DCFDA** в синаптосомах, что свидетельствует об **образовании активных форм кислорода (АФК)**. (Рисунок 4)

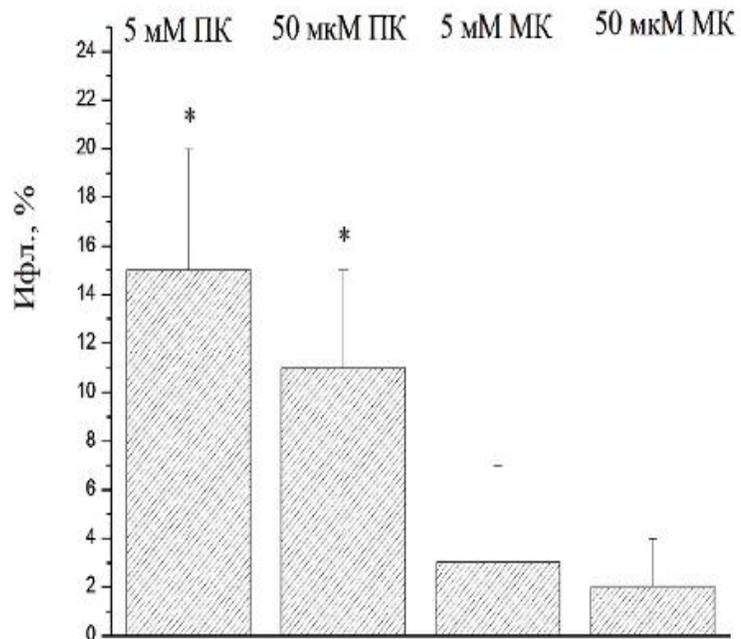


Рисунок 4 – Влияние КЦЖК на флуоресценцию DCFDA в синаптосомах

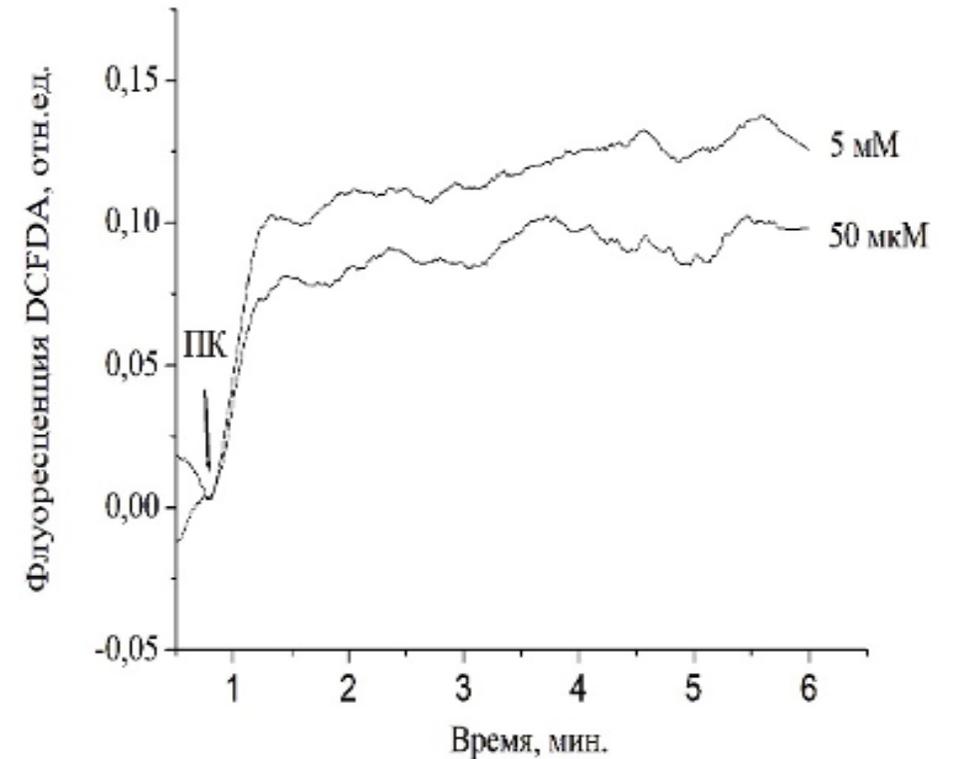


Рисунок 5 – Влияние ПК на флуоресценцию DCFDA в синаптосомах

2. Более низкая концентрация **ПК 50 мкМ** вызвала **менее выраженный**, но по-прежнему статистически значимый **эффект**, что показано на рисунке 5.

ВЛИЯНИЕ КЦЖК НА ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В СИНАПТОСОМАХ

3. Добавление ПК или МК к флуоресцентному зонду DCFDA в бесклеточной системе не оказало никакого влияния. (Рисунок 6)

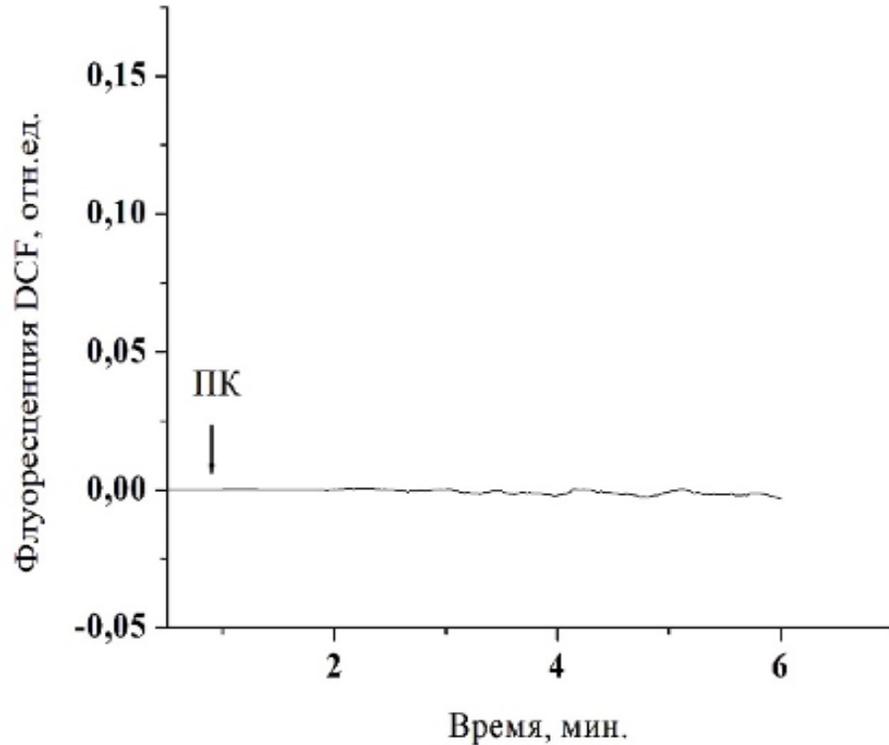


Рисунок 6 – Влияние ПК на флуоресценцию DCF в бесклеточной системе

4. Таким образом, **ПК**, в том числе и в физиологической концентрации, **способно приводить к образованию АФК в синаптосомах.**

5. В то же время **сама по себе ПК не обладает прооксидантной активностью.**

ВЛИЯНИЕ КЦЖК НА ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ В СИНАПТОСОМАХ

Следует отметить, что **увеличение флуоресценции при действии ПК составило лишь 10-15% от эффекта 1мМ Н₂О₂** (Рис. 7), который сам по себе не является сильным окислителем. Это позволяет предположить, что в данном случае **АФК является скорее сигнальными молекулами**, а не фактором повреждения биологических мембран.

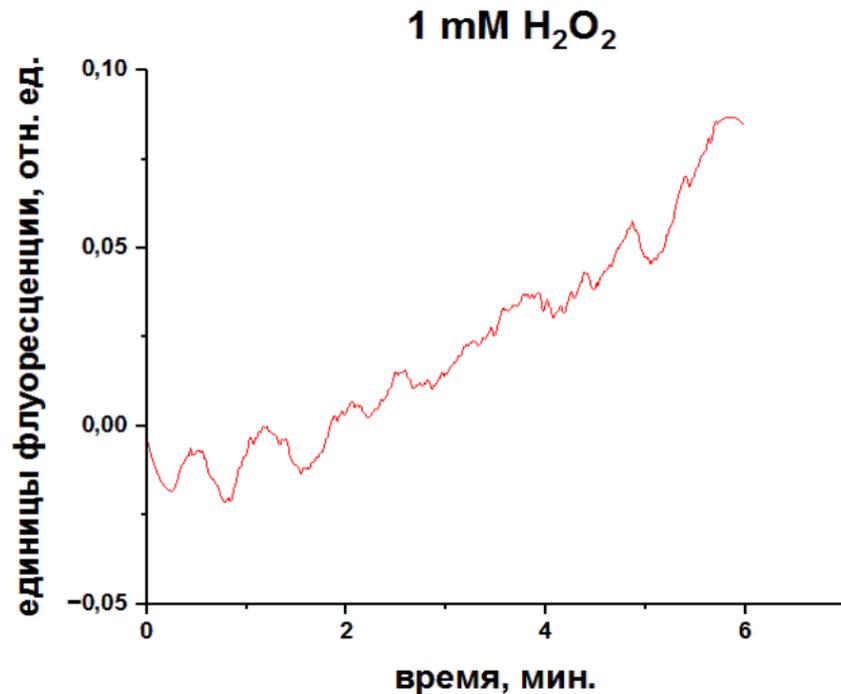


Рисунок 7 – Влияние 1 мМ Н₂О₂ на флуоресценцию DCFDA в бесклеточной системе

Одним из механизмов действия КЦЖК на клетки является активация специфических G-протеин связанных рецепторов на плазматической мембране. Основными рецепторами для ПК и МК являются **GPR41** и **GPR43**, причем у GPR41 аффинность по отношению к ПК значительно выше, чем к МК. Это позволяет предположить, что обнаруженные нами эффекты, особенно **увеличение образования АФК, связаны с активацией GPR41**, но безусловно эта гипотеза требует дальнейшей экспериментальной проверки.

ВЫВОДЫ:

1. В контрольных условиях внутрисинапсосомальное рН составляет 6.99 ± 0.06 . При инкубации синапсосом с 5 мМ ПК и МК происходит снижение рН до 5.94 ± 0.24 и 6.16 ± 0.07 соответственно.
2. С помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый показано, что 5 мМ ПК ингибирует экзоцитоз более чем в 5 раз, в то же время ни 5 мМ МК, ни 50 мкМ обоих КЦЖК не повлияли на этот процесс.
3. Установлено, что 50 мкМ и 5 мМ ПК приводит к увеличению флуоресценции DCFDA, свидетельствующему о накоплении АФК. МК в таких же концентрациях была неэффективна.

Таким образом, обе изученные КЦЖК закисляют цитозоль изолированных пресинаптических окончаний нейронов, но только ПК ингибирует экзоцитоз и увеличивает образование АФК.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!