

СОЛИ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ УСИЛИВАЮТ АКТИВНОСТЬ Ca^{2+} -АКТИВИРУЕМЫХ K^{+} -КАНАЛОВ БОЛЬШОЙ ПРОВОДИМОСТИ И СНИЖАЮТ КАЛЬЦИЕВЫЕ ОСЦИЛЛЯЦИИ В ГНЗ-КЛЕТКАХ КРЫСЫ

© 2023 г. И.Ф. Шайдуллов*, Е.В. Ермакова*, Д.М. Сорокина*,
О.В. Яковлева*, Г.Ф. Ситдикова*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет,
ул. Кремлевская, 18, Казань, Республика Татарстан, 420008, Россия

E-mail: guzel.sitdikova@kpfu.ru

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 10.01.2023 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Короткоцепочечные жирные кислоты, к которым относятся уксусная, пропионовая, масляная кислоты, являются метаболитами микробиоты, способными оказывать разнообразные физиологические эффекты как в кишечнике, так и за его пределами, включая центральную нервную систему. Целью нашей работы было исследование влияния ацетата, пропионата и бутирата натрия на активность Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов большой проводимости и кальциевые осцилляции в культуре ГНЗ-клеток гипоталамуса крысы. Показано, что исследованные жирные кислоты вызывают дозозависимое увеличение амплитуды интегральных выходящих калиевых токов; эти эффекты предотвращаются тетраэтиламмонием, что указывает на участие Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов большой проводимости в эффектах жирных кислот. Действительно, жирные кислоты повышали вероятность открытия одиночных каналов без изменения амплитуды и среднего времени открытого состояния. Кроме того, они приводили к значительному снижению амплитуды и частоты Ca^{2+} -осцилляций в ГНЗ-клетках. Усиление калиевой проводимости и снижение уровня внутриклеточного Ca^{2+} при действии короткоцепочечных жирных кислот может опосредовать их эффекты в различных возбудимых структурах, такие как снижение сократимости гладкомышечных клеток кишечника и сосудов, гиперполяризация нейронов, регуляция высвобождения гормонов и медиаторов.

Ключевые слова: короткоцепочечные жирные кислоты, Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы большой проводимости, ГНЗ-клетки, кальциевые осцилляции.

DOI: 10.31857/S0006302923040087, EDN: KKCIVI

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), к которым относятся уксусная, пропионовая и масляная кислоты, являются конечными продуктами анаэробной бактериальной ферментации неперевариваемых углеводов или белков в толстой кишке, их суммарная концентрация может достигать 150 мМ [1–5]. КЦЖК поддерживают гомеостаз кишечника через целый ряд локальных эффектов, являясь источником энергии для колоноцитов, способствуя поддержанию целостности кишечного барьера, продукции слизи, защищая от токсического влияния некоторых бактерий, воспаления и снижая риск ко-

лоректального рака [6–9]. Кроме того, КЦЖК участвуют в регуляции перистальтики кишечника, снижая спонтанную и вызванную агонистами холинорецепторов сократительную активность [10–12]. Эффекты КЦЖК на двигательную функцию кишечника могут варьировать при различных патологических состояниях, например, при синдроме раздраженного кишечника, что может быть связано как с изменением концентрации, так и нарушением активности/экспрессии их мишеней действия [12, 13].

Вне желудочно-кишечного тракта КЦЖК проявляют антигипертензивные свойства, вызывая расслабление резистивных артерий и усиливая высвобождение ренина [14–17]. В экспериментальном исследовании гипертензии, вызванной ангиотензином II у мышей, хроническое введение бутирата улучшило индуцированную

Сокращения: КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты, ВК-каналы – Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы большой проводимости, P_o – вероятность открытия одиночного канала.

ацетилхолином вазорелаксацию [18], а добавление ацетата предотвращало развитие гипертонии и сердечной недостаточности [19]. Помимо эффектов в толстой кишке и периферических тканях КЦЖК играют важную роль в оси микробиота–кишечник–мозг, поскольку могут преодолевать гематоэнцефалический барьер с помощью транспортеров монокарбоксилатов, экспрессирующихся в эндотелиальных клетках, как было показано при их инфузии в сонную артерию крысы [20]. Действительно, нарушения микробиоты сопровождаются поведенческими и неврологическими патологиями, такими как депрессии, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, расстройства аутистического спектра, тогда как введение КЦЖК может оказывать позитивное влияние на такие состояния [21].

Механизмы действия КЦЖК включают активацию G-белок-ассоциированных рецепторов GPR41, GPR43 и GPR109a, которые экспрессируются во многих органах, включая тонкий и толстый кишечник, иммунные клетки, жировую ткань, сердце, скелетные мышцы и нейроны [22]. В энтеральных нейронах и гладкомышечных клетках были обнаружены мембранные эффекты КЦЖК – усиление калиевых токов и гиперполяризация, что сопровождалось также повышением уровня внутриклеточного кальция [14, 23–26], однако прямые эффекты на ВК-каналы (Ca^{2+} -активируемые K^{+} -каналы большой проводимости) не были исследованы.

Целью нашей работы был анализ влияния натриевых солей КЦЖК на выходящие K^{+} токи и активность одиночных ВК-каналов и спонтанные Ca^{2+} осцилляции в культуре GN3-клеток гипофиза крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Регистрация активности кальций-активируемых калиевых каналов большой проводимости в культуре GN3 клеток методом патч-кламп. Для исследования активности ВК-каналов использовали линию GN3-клеток (DSMZ, Германия), характеризующуюся высокой экспрессией α -субъединицы ВК-каналов [27]. GN3-клетки культивировали при температуре 37°C, 5% CO_2 и влажности 95% в среде MEM (Sigma, Великобритания), дополненной 7%-й эмбриональной бычьей сывороткой и 3%-й лошадиной сывороткой (обе – Gibco, Новая Зеландия). Клетки культивировали на покровных стеклах, покрытых 0.01% поли-D-лизинном (Sigma, Великобритания). Регистрацию электрических ответов проводили на третьи-четвертые сутки после высаживания. Все эксперименты были выполнены при комнатной температуре при непрерывной перфузии стандартным внеклеточ-

ным раствором, содержащим 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, pH доводили до 7.2 с помощью NaOH. Патч-кламп-регистрацию в режиме «целая клетка» проводили с использованием внутривиточного раствора следующего состава: 145 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 3.63 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, pH 7.2, содержащего 0.5 мкМ свободного Ca^{2+} (рассчитано с помощью расширенного калькулятора Webmaxc, <https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/webmaxc/webmaxcE.htm>). Для анализа эффектов КЦЖК использовали ацетат натрия, пропионат натрия и бутират натрия в концентрациях 1, 3 или 5 mM. Аппликацию исследуемых веществ проводили в течение 3 мин.

Патч-пипетки изготавливали из боросиликатных стеклянных капилляров (Sutter Instrument, США) с помощью вытягивающего устройства фирмы Narishigi (Япония). Сопротивление электродов составляло от 3 до 8 МΩ. Далее с помощью микроманипулятора стеклянную пипетку подводили к клетке для формирования гигаомного контакта с мембраной. Значения емкости (C_m) для каждой клетки определяли из параметров «мембранного теста» (pClamp 10.7; Axon Instruments/Molecular Devices, США) через 5–10 мин после установления гигаомного контакта в условиях «whole-cell» («целая клетка») при фиксации потенциала на уровне мембранного потенциала покоя.

Для регистрации выходящих K^{+} -токов использовали конфигурацию «целая клетка», в которой ионные токи вызывались в ответ на серию деполяризующих импульсов длительностью 500 мс от –80 мВ до 80 мВ с интервалом 20 мВ. Активность одиночных каналов регистрировали в конфигурации «outside-out» при потенциале фиксации 30 мВ. Записи в режиме «целая клетка» или «outside-out» были сделаны с помощью усилителя Axopatch-200B, подключенного к интерфейсу Digidata 1440A, с использованием программного обеспечения pClamp 10.7. Частота дискретизации для одноканальной записи составляла 10 кГц. Данные были отфильтрованы с помощью низкочастотного четырехполосного фильтра Бесселя, настроенного на 1 кГц, и проанализированы с помощью программного обеспечения Clampfit (Axon Instruments/Molecular Devices, США).

Флуоресцентная микроскопия. Для анализа влияния КЦЖК на спонтанные кальциевые осцилляции использовали флуоресцентный маркер Fluo-4 AM (1 мкМ). Для окрашивания GN3-клетки инкубировали во внеклеточном растворе, содержащем краситель, в течение 40 мин при температуре 37°C в отсутствие света. Далее клетки промывали внеклеточным раствором 10–20 мин для обеспечения полной деэтерификации слож-

ных эфиров АМ, после чего проводили флуоресцентную визуализацию окрашенных клеток при помощи микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного водным иммерсионным объективом PlanNeofluar 63×/0.9NA. Регистрацию проводили с использованием фильтра возбуждения (BP450–490 нм), светоделителя (FT510 нм) и фильтра эмиссии (LP555 нм). Флуоресцентные картины регистрировали с помощью высокоскоростной камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия). Запись флуоресцентных изображений проводили в течение 30 с, время экспозиции – 500 мс. Далее интенсивность свечения анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ.

Анализ данных. Вероятность открытия одиночного канала (P_o) оценивали, как $P_o = NP/n$, где $NP = [(t_o)/(t_o + t_c)]$ – вероятность открытия каналов, t_o – суммарное время открытого состояния, t_c – суммарное время закрытого состояния, а n – количество уровней открытия каналов в патче. Вольтамперные характеристики (I – V) K^+ -токов были построены на основе измерений амплитуд тока в конце тестовых импульсов, нормализованных к емкости клеток (пА/пФ). Среднюю амплитуду, частоту и длительность колебаний Ca^{2+} -осцилляций определяли в пакете MATLAB (MathWorks, США). Флуоресценцию пика выражали как относительное изменение флуоресценции $(F - F_o)/F_o$ для каждого кадра каждого измерения, где F – пиковая флуоресценция окрашенных клеток, а F_o – фоновая флуоресценция вблизи данной клетки. Количественный анализ флуоресцентных изображений проводили с помощью программы OriginPro 2015 (OriginLab, США).

Статистический анализ проводили с помощью стандартных методик, нормальность распределения выборки определяли при помощи F -теста Фишера и критерия Шапиро–Уилка с использованием программы OriginPro 2015 (OriginLab, США). Достоверность различий определяли с помощью параметрического парного t -критерия Стьюдента или дисперсионный анализ (ANOVA) с применением теста Бонферрони для сравнения независимых выборок. Значение $p < 0.05$ считалось статистически значимым. Все результаты были представлены как среднее $\pm$ ошибка средней, n равно количеству клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффекты КЦЖК на выходящие интегральные калиевые токи и активность одиночных ВК-каналов. Регистрацию интегральных K^+ -токов проводили в режиме фиксации потенциала (*voltage-clamp*) в конфигурации «целая клетка» в ответ на серию деполяризующих потенциалов. Апплика-

ция КЦЖК в концентрациях 1, 3 и 5 мМ приводила к дозозависимым изменениям амплитуды интегральных K^+ -токов в GH3-клетках (рис. 1).

Ацетат натрия в концентрации 1 мМ не приводил к достоверному изменению амплитуды токов ($p > 0.05$, $n = 12$; табл. 1), в концентрации 3 мМ увеличивал амплитуду токов на 67% ($p < 0.05$, $n = 12$; рис. 1а,б), а при 5 мМ – на 77% ($p < 0.05$, $n = 6$; табл. 1). Эффекты ацетата натрия в концентрациях 3 и 5 мМ достоверно отличались от его эффекта в концентрации 1 мМ ($p < 0.05$), а отличия между концентрациями 3 и 5 мМ не наблюдались ($p > 0.05$).

Пропионат натрия в концентрации 1 мМ вызывал увеличение амплитуды тока на 41% ($p < 0.05$, $n = 12$; табл. 1), в концентрации 3 мМ – на 111% ($p < 0.05$, $n = 12$; рис. 1в,г), а при увеличении концентрации до 5 мМ – на 147% ($p < 0.05$, $n = 12$; табл. 1). Эффекты пропионата натрия в концентрациях 3 и 5 мМ достоверно отличались от его эффекта в концентрации 1 мМ ($p < 0.05$), отличия между концентрациями 3 и 5 мМ не наблюдались ($p > 0.05$).

Добавление бутирата натрия в концентрации 1 мМ не вызывало достоверных изменений амплитуды K^+ -токов ($p > 0.05$, $n = 12$; рис. 1ж, табл. 1). Повышение концентрации бутирата натрия до 3 мМ и 5 мМ приводило к увеличению амплитуды токов на 73% ($p < 0.05$, $n = 12$) и 142%, соответственно ($p < 0.05$, $n = 12$; рисунок 1д,е, табл. 1). При этом эффекты бутирата натрия в различных концентрациях достоверно различались между собой ($p < 0.05$).

Для выявления роли ВК-каналов в эффектах КЦЖК мы использовали тетраэтиламмоний (1 мМ), который в низких концентрациях специфически блокирует ВК-каналы [28]. Аппликация тетраэтиламмония приводила к значительному снижению амплитуды выходящих K^+ -токов. При этом на фоне его действия эффекты КЦЖК на выходящие K^+ -токи не проявлялись. В качестве примера приведены эффекты ацетата натрия на фоне тетраэтиламмония ($p > 0.05$, $n = 5$; рис. 1з). Было предположено, что усиление выходящих K^+ -токов при действии КЦЖК обусловлено активацией ВК-каналов. Поэтому далее мы анализировали влияние КЦЖК на характеристики одиночных ВК-каналов.

Активность одиночных ВК-каналов регистрировали при потенциале фиксации 30 мВ. В контроле средняя вероятность открытия (P_o) ВК-каналов составила 0.041 ± 0.008 . Аппликация КЦЖК приводило к значительному усилению активности каналов. Так, уже в течение 1 мин применения ацетата натрия и пропионата натрия (3 мМ) P_o увеличивалась на 25% (с 0.053 ± 0.01 до

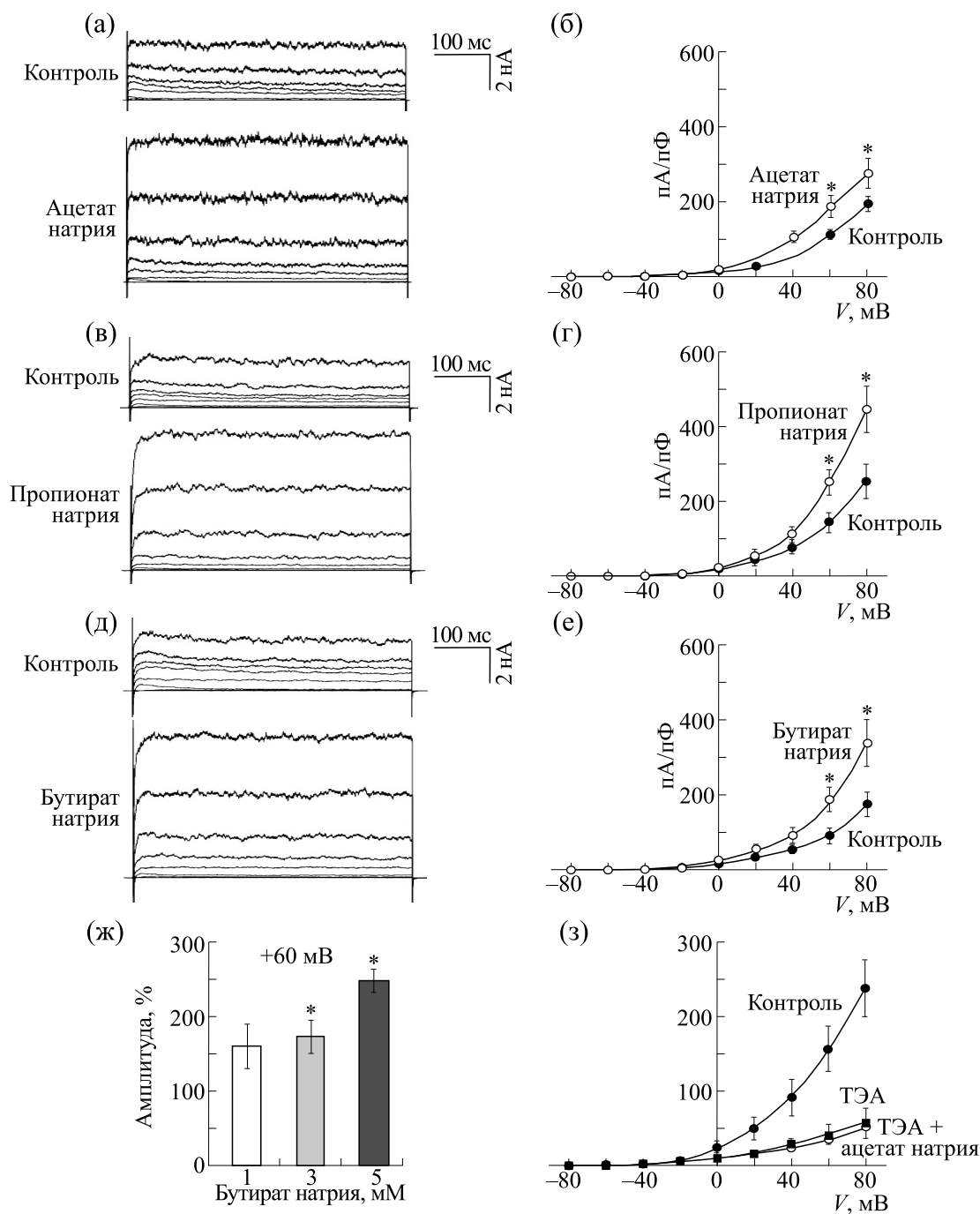


Рис. 1. Эффекты КЦЖК на амплитуду выходящих калиевых токов. Оригинальные записи K^+ -токов в ответ на ступенчатую подачу деполяризующих потенциалов с шагом 20 мВ от -80 до 80 мВ при регистрации в конфигурации «целая клетка» в контроле и при добавлении ацетата натрия (а), пропионата натрия (в) и бутирата натрия (д) в концентрации 3 мМ. Вольтамперная характеристика K^+ -токов в контроле (черные кружки) и в присутствии КЦЖК (белые кружки): ацетата натрия (б), пропионата натрия (г) и бутирата натрия (е). Амплитуда K^+ -токов при действии бутирата натрия в концентрациях 1, 3 и 5 мМ в режиме фиксации потенциала — voltage-clamp при потенциале фиксации 60 мВ (ж). Вольтамперная характеристика K^+ -токов в контроле (черные кружки), при действии тетраэтиламмония (1 мМ; черные квадраты) и ацетата натрия (3 мМ) на фоне тетраэтиламмония (белые кружки) (з). * — $p < 0.05$ — относительно контроля.

Таблица 1. Плотность выходящих K^+ -токов (пА/пФ) при действии КЦЖК в режиме фиксации потенциала

Вещество	Концентрации КЦЖК					
	Контроль	1 мМ	Контроль	3 мМ	Контроль	5 мМ
Ацетат натрия	96.95 ± 12.07	108.97 ± 19.24	112.06 ± 12.49	186.93 ± 28.42*	78.09 ± 19.76	138.78 ± 34.87*
Пропионат натрия	95.32 ± 19.88	134.49 ± 20.35*	89.95 ± 18.21	189.7 ± 32.96*	126.73 ± 18.28	314.12 ± 21.7*
Бутират натрия	96.36 ± 18.27	154.49 ± 28.54	145.29 ± 27.19	251.48 ± 32.96*	137.69 ± 18.69	342.34 ± 21.82*

Примечание. Потенциал фиксации — 60 мВ; * — $p < 0.05$ относительно контроля.

0.067 ± 0.01; рис. 2а,б) и 71% (с 0.04 ± 0.012 до 0.07 ± 0.016; рис. 2в,г) от уровня контроля ($p < 0.05$, $n = 5$). Эффекты бутирата натрия (рис. 2д,е) были более значительными и P_o увеличилась на 221% (с 0.06 ± 0.01 до 0.13 ± 0.02; $p < 0.05$, $n = 5$; рис. 2ж), что было достоверно больше эффектов ацетата и пропионата натрия ($p < 0.05$; рис. 2ж).

При этом амплитуда и среднее время открытого состояния ВК-каналов при действии всех КЦЖК достоверно не изменялись ($p > 0.05$, $n = 5$; рис. 2з,и). Таким образом, КЦЖК увеличивают амплитуду выходящих калиевых токов в ГНЗ-клетках и повышают вероятность открытия ВК-каналов без изменения их амплитуды и временной кинетики.

Эффекты короткоцепочечных жирных кислот на кальциевые осцилляции. Для анализа влияния КЦЖК на Ca^{2+} -осцилляции в ГНЗ-клетках использовали флуоресцентный маркер Fluo-4 АМ.

В контроле ГНЗ-клетки демонстрировали регулярные изменения уровня внутриклеточного Ca^{2+} со средней частотой 5.63 ± 0.3 имп/мин. Применение КЦЖК в концентрации 3 мМ приводило к значительному снижению амплитуды и частоты осцилляций (рис. 3). На фоне действия ацетата натрия амплитуда снижалась на 45% (с 0.28 ± 0.02 о.е. в контроле и до 0.15 ± 0.02 о.е. к 5-й минуте добавления; $p < 0.05$, $n = 10$; рис. 3а,б), частота снизилась на 22% (с 6.27 ± 1.03 имп/мин до 4.93 ± 0.75 имп/мин; $p < 0.05$, $n = 10$). Аппликация пропионата натрия снизила амплитуду осцилляций на 30% (с 0.12 ± 0.01 о.е. до 0.08 ± 0.01 о.е.; $p < 0.05$, $n = 7$; рис. 3в,г), частота колебаний достоверно снизилась на 35% (с 4.43 ± 0.55 имп/мин до 2.87 ± 0.44 имп/мин; $p < 0.05$, $n = 7$). Бутират натрия также снижал амплитуду на 45% (с 0.11 ± 0.01 о.е. до 0.06 ± 0.01 о.е.; $p < 0.05$, $n = 10$; рис. 3д,е) и частоту осцилляций на 48% относительно контроля (с 4.69 ± 0.27 имп/мин в контроле до 2.44 ± 0.27 имп/мин; $p < 0.05$, $n = 10$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Метаболиты микробиоты играют важную роль в регуляции целостности кишечного барьера, местных иммунных реакций, а также оказывают влияние на перистальтику кишечника и нервную регуляцию функций желудочно-кишечного тракта [29]. Кроме того, все больше данных указывают на регулирующее влияние КЦЖК вне желудочно-кишечного тракта, в том числе в нервной системе [21]. В настоящей работе мы с использованием культуры ГНЗ-клеток впервые показали, что все три исследованные КЦЖК вызывают непосредственную активацию ВК-каналов и угнетают спонтанные Ca^{2+} -осцилляции.

Уксусная, пропионовая и масляная кислоты являются продуктами ферментации углеводов и в высоких миллимолярных концентрациях обнаруживаются как в толстой (до 150 мМ), так и в подвздошной кишке (до 40 мМ) [3, 5, 30, 31]. КЦЖК могут абсорбироваться из кишечника пассивно или с помощью транспортеров монокарбоксилатов, экспрессирующихся в эпителии. Бутират является предпочтительным источником энергии для колоноцитов и потребляется локально, тогда как другие абсорбированные КЦЖК попадают в воротную вену и в основном метаболизируются в печени. Однако дистальная часть толстой кишки не входит в систему портальной вены, что увеличивает доступ КЦЖК в системное кровообращение [32]. В физиологических условиях уровень КЦЖК в периферической крови низкий (в пределах микромолярных — низких миллимолярных концентраций) вследствие их метаболизма в печени, с наибольшим распространением ацетата [22, 33, 34]. Тем не менее, диета с высоким содержанием клетчатки повышает общий уровень КЦЖК в крови с преобладанием ацетата — до 300 мкМ [35]. Более того, введение масляной кислоты в рацион или инъекции пропионата повышают уровни КЦЖК до высоких микромолярных или даже миллимолярных концентраций [36–38].

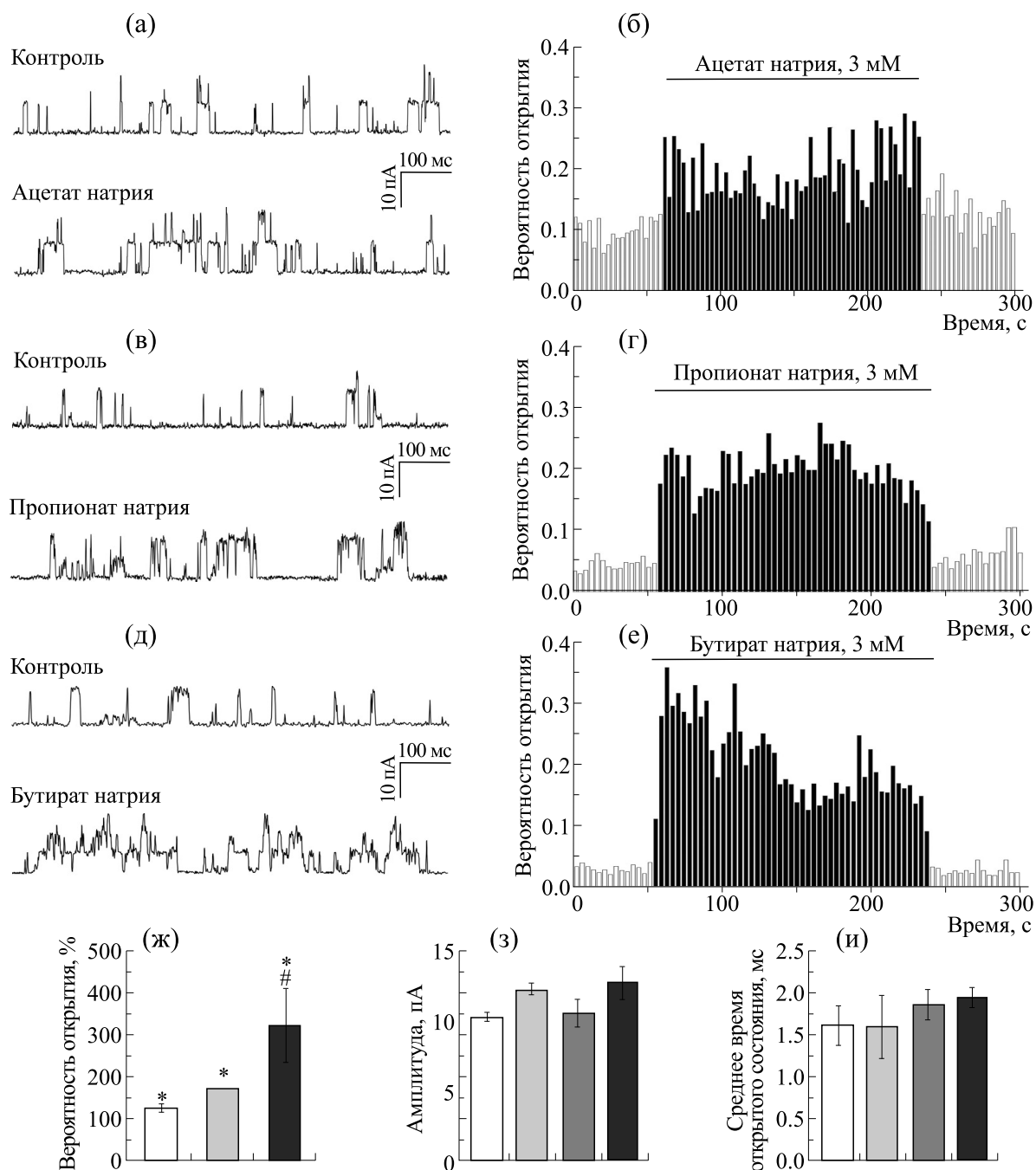


Рис. 2. Эффекты КЦЖК на активность одиночных ВК-каналов. Пример оригинальной записи активности одиночных каналов в контроле и при аппликации ацетата натрия (а), пропионата натрия (в) и бутирата натрия (д) в концентрации 3 мМ. Вероятность открытия ВК-каналов в контроле, в течение 3 мин применения ацетата натрия (б), пропионата натрия (г) и бутирата натрия (е) в концентрации 3 мМ и во время отмывки. Влияние ацетата натрия (белый столбик), пропионата натрия (серый столбик) и бутирата натрия (черный столбик) в концентрациях 3 мМ на вероятность открытия ВК-каналов (ж). За 100% принята величина P_o в контроле. Амплитуда (з) и среднее время открытого состояния (и) ВК-каналов в контроле (белый столбик) и при действии ацетата натрия (серый столбик), пропионата натрия (темно-серый столбик) и бутирата натрия (черный столбик) в концентрациях 3 мМ. *— $p < 0.05$ относительно контроля, # — $p < 0.05$ относительно эффектов ацетата натрия и бутирата натрия.

Транспортеры монокарбоксилатов экспрессируются и в гематоэнцефалическом барьере [39], поэтому ацетат и другие КЦЖК, проникая в мозг,

могут влиять на работу центральной нервной системы, регулируя экспрессию генов, повышая уровень нейротрофического фактора мозга, ней-

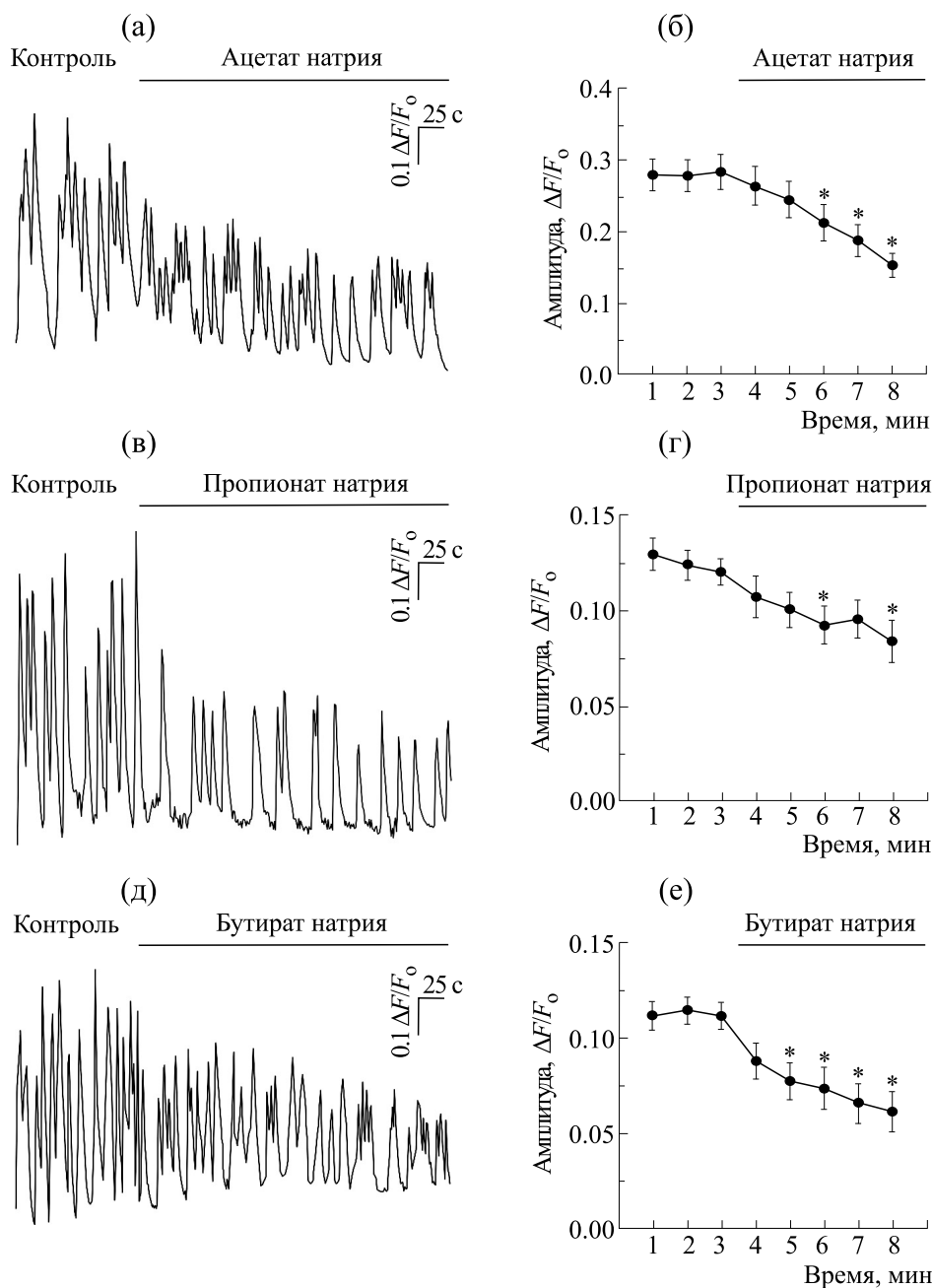


Рис. 3. Эффекты КЦЖК на Ca^{2+} -осцилляции в GH3-клетках. Примеры колебаний свечения флуоресцентного красителя в GH3-клетках в контроле и при действии ацетата натрия (а), пропионата натрия (в) и бутирата натрия (д). Изменение амплитуды Ca^{2+} -осцилляций GH3-клеток в контроле и на фоне аппликации КЦЖК: ацетата натрия (б), пропионата натрия (г) и бутирата натрия (е). * — $p < 0.05$ относительно контроля.

рогенез, синтез и высвобождение нейромедиаторов и нейропептидов [40–42]. Независимо от бактериального метаболизма этанол является источником уксусной кислоты, которая высвобождается в кровеносное русло, и может влиять на различные органы и ткани, включая мозг, при хроническом приеме алкоголя ее концентрации могут увеличиваться до 0.5 мМ [43–45]. Среди известных клеточных механизмов действия

КЦЖК — рецепторы жирных кислот GPR41, GPR43 и GPR109a, однако агонисты этих рецепторов не всегда имитируют эффекты КЦЖК, а антагонисты не предотвращают их действие [46].

ВК-каналы широко распространены в различных тканях, включая нейрональные и гладкомышечные клетки, играют важную роль в регуляции электрической возбудимости, генерации потен-

циалов действия, секреции медиаторов/гормонов или регуляции входящего Ca^{2+} -тока по принципу отрицательной обратной связи [47–51]. Было показано, что уксусная кислота усиливает выходящие K^+ -токи, активируя ВК-каналы в гладкомышечных клетках детрузора морской свинки [26]. В нашей работе мы использовали натриевые соли КЦЖК, которые в концентрации 1, 3 и 5 мМ вызывали повышением амплитуды выходящих K^+ -токов в ГНЗ-клетках. Поскольку ГНЗ-клетки характеризуются высокой экспрессией ВК-каналов, было предположено, что усиление выходящих K^+ -токов связано с активацией ВК-каналов. Действительно, эффекты КЦЖК предотвращались тетраэтиламмонием (1 мМ), который в низких концентрациях является ингибитором ВК-каналов [28].

Активация ВК-каналов зависит от потенциала мембраны и уровня внутриклеточного Ca^{2+} . В энтеральных нейронах бутират натрия вызывал гиперполяризацию мембраны, что блокировалось харибдотоксином, ингибитором ВК-каналов [23, 24]. Авторами было предположено, что этот эффект связан с повышением уровня внутриклеточного Ca^{2+} , однако надо отметить, что в данных работах использовались сверхвысокие концентрации бутирата натрия (50 мМ и более) [23–25]. Усиление активности ВК-каналов в результате высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо вследствие активации G-белок-ассоциированных рецепторов в гладкомышечных клетках брыжеечной артерии было показано и для пропионата натрия в концентрации 25 мМ [14].

Для выявления прямых эффектов КЦЖК на ВК-каналы мы анализировали их влияние на активность каналов в условиях регистрации *outside-out*. Ацетат, пропионат и бутират натрия в концентрации 3 мМ вызывали резкое и значительное повышение вероятности открытия ВК-каналов уже в первые секунды аппликации, эффект сохранялся в течение 3 мин подачи вещества и переставал проявляться при подаче контрольного раствора. Наиболее эффективным действием обладал бутират натрия, который в первую минуту аппликации увеличивал P_o в три раза. КЦЖК при этом не изменяли амплитудно-временные характеристики работы одиночных каналов. Полученные данные впервые указывают на прямые эффекты КЦЖК на ВК-каналы, активация которых будет приводить к гиперполяризации мембраны и/или уменьшению длительности потенциала действия. Эти эффекты могут лежать в основе угнетающего влияния КЦЖК на двигательную активность кишечника, продемонстрированные в ряде исследований [10, 52]. Нами недавно было показано, что КЦЖК, действуя на гладкомышечные клетки и на энтеральные нейроны, вызывают

дозозависимое угнетение спонтанной и вызванной карбахолином сократительной активности препаратов толстой кишки мыши [12, 53]. В нейронах гиппокампа представитель КЦЖК ацетат натрия гиперполяризовал мембрану и снижал частоту потенциалов действия [54].

ГНЗ-клетки по своему происхождению относятся к клеткам переднего гипофиза — соматотрофам, выделяющим гормон роста и пролактин, и характеризуются наличием Ca^{2+} -осцилляций, возникающих вследствие спонтанных потенциалов действия и входа Ca^{2+} через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы, а активность ВК-каналов в зависимости от локализации определяет как поддержание спонтанной активности, так и ее прекращение [55]. Нами выявлены прямые эффекты КЦЖК на ВК-каналы, значительное усиление активности которых будет приводить к гиперполяризации и инактивации потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов и, соответственно, прекращению Ca^{2+} -осцилляций [56, 57].

Активация ВК-каналов и снижение Ca^{2+} -осцилляций в передней доле гипофиза будет приводить к нарушению высвобождения гормона роста и инсулин-подобного фактора, которые оказывают влияние не только на рост и развитие потомства, но также вовлечены в регуляцию когнитивных функций и нейропротекцию при патологиях нервной системы [58–60].

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате нашего исследования было показано, что соли КЦЖК — ацетат натрия, пропионат натрия и бутират натрия вызывают дозозависимое повышение амплитуды выходящих калиевых токов в культуре ГНЗ-клеток гипофиза крысы. Этот эффект предотвращался тетраэтиламмонием в концентрации 1 мМ, что указывает на участие Ca^{2+} -активируемых K^+ -каналов большой проводимости. Действительно, в условиях патч-кламп регистрации одиночных ВК-каналов в конфигурации *outside-out* КЦЖК повышали вероятность открытия без изменения амплитуды и среднего времени открытого состояния. Усиление калиевой проводимости при действии КЦЖК может опосредовать их эффекты в различных возбудимых структурах, такие как снижение сократимости гладкомышечных клеток кишечника [12, 53], расслабление сосудов, гиперполяризацию нейронов в периферической и центральной нервной системе, снижение высвобождения гормонов и нейромедиаторов [23, 24, 50, 51, 54]. Угнетение частоты и амплитуды Ca^{2+} -осцилляций в ГНЗ-клетках гипофиза, ответственных за спонтанное высвобождение гормона роста, будет приводить к нарушению регуляции

процессов роста, развития и функциональной пластичности мозга как в пре-, так и постнатальном онтогенезе [58–60].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-20045).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. Den Besten, K. Van Eunen, A. K. Groen, et al., *J. Lipid Res.*, **54**, 2325 (2013).
2. S. Deleu, K. Machiels, J. Raes, et al., *EBioMedicine*, **66**, 103293 (2021).
3. E. Hosseini, C. Grootaert, W. Verstraete, and T. Van de Wiele, *Nutr. Rev.*, **69**, 245 (2011).
4. D. P. Venegas, M. K. De La Fuente, G. Landskron, et al., *Front. Immunol.*, **10**, 277 (2019).
5. E. Stachowska, M. Wiśniewska, A. Dzieżyc, and A. Bohatyrewicz, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **25**, 4570 (2021).
6. D. L. Topping and P. M. Clifton, *Physiol. Rev.*, **81**, 1031 (2001).
7. S. Fukuda, H. Toh, K. Hase, et al., *Nature*, **469**, 543 (2011).
8. A. L. Kau, P. P. Ahern, N. W. Griffin, et al., *Nature*, **474**, 327 (2011).
9. K. M. Maslowski, A. T. Vieira, A. Ng, et al., *Nature*, **461**, 1282 (2009).
10. N. R. Hurst, D. M. Kendig, K. S. Murthy, and J. R. Grider, *Neurogastroenterol. Motil.*, **26**, 1586 (2014).
11. E. Suply, P. de Vries, R. Soret, et al., *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.*, **302**, G1373 (2012).
12. I. F. Shaidullov, D. M. Sorokina, F. G. Sitdikov, et al., *BMC Gastroenterol.*, **21**, 1 (2021).
13. F. Fan, Y. Chen, Z. Chen, et al., *Mol. Pain.*, **17** (2021).
14. W. Zhang, X. Feng, Y. Zhang, et al., *J. Cell. Mol. Med.*, **24**, 3192 (2020).
15. N. Natarajan and J. L. Pluznick, *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.*, **307**, C979 (2014).
16. J. L. Pluznick, *Gut Microbes.*, **5**, 202 (2013).
17. N. Natarajan, D. Hori, S. Flavahan, et al., *Physiol. Genomics*, **48**, 826 (2016).
18. S. Kim, R. Goel, A. Kumar, et al., *Clin. Sci.*, **132**, 701 (2018).
19. F. Z. Marques, E. Nelson, P. Y. Chu, et al., *Circulation*, **135**, 964 (2017).
20. W. H. Oldendorf, *Am. J. Physiol.*, **224**, 1450 (1973).
21. Y. P. Silva, A. Bernardi, and R. L. Frozza, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, **11**, 25 (2020).
22. B. Dalile, L. Van Oudenhove, B. Vervliet, and K. Verbeke, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, **16**, 461 (2019).
23. G. Haschke, H. Schäfer, and M. Diener, *Neurogastroenterol. Motil.*, **14**, 133 (2002).
24. S. A. Hamodeh, M. Rehn, G. Haschke, and M. Diener, *Neurogastroenterol. Motil.*, **16**, 597 (2004).
25. R. Nitschke, N. Benning, S. Ricken, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **434**, 466 (1997).
26. S. Ghatta, I. Lozinskaya, Z. Lin, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **563**, 203 (2007).
27. G. F. Sitdikova, T. M. Weiger, and A. Hermann, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **459**, 389 (2010).
28. K. D. Thornbury, S. M. Ward, and K. M. Sanders, *Am. J. Physiol. – Cell Physiol.*, **263** (1992).
29. E. Distrutti, L. Monaldi, P. Ricci, and S. Fiorucci, *World J. Gastroenterol.*, **22**, 2219 (2016).
30. J. H. Cummings and G. T. Macfarlane, *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 443 (1991).
31. J. Fernandes, W. Su, S. Rahat-Rozenbloom, et al., *Nutr. Diabetes*, **4**, e121 (2014).
32. D. F. MacFabe, *Microb. Ecol. Heal. Dis.*, **26** (2015).
33. J. H. Cummings, E. W. Pomare, H. W. J. Branch, et al., *Gut*, **28**, 1221 (1987).
34. S. G. Peters, E. W. Pomare, and C. A. Fisher, *Gut*, **33**, 1249 (1992).
35. A. N. Thorburn, C. I. McKenzie, S. Shen, et al., *Nat. Commun.*, **6**, 7320 (2015).
36. M. J. Edelman, K. Bauer, S. Khanwani, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **51**, 439 (2003).
37. I. Kimura, D. Inoue, T. Maeda, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8030 (2011).
38. Z. Jirsova, M. Heczkova, H. Dankova, et al., *Biomed Res. Int.*, **2019**, ID 7084734 (2019).
39. N. Vijay and M. Morris, *Curr. Pharm. Des.*, **20**, 1487 (2014).
40. G. Frost, M. L. Sleeth, M. Sahuri-Arisoylu, et al., *Nat. Commun.*, **5**, ID 3611 (2014).
41. V. Braniste, M. Al-Asmakh, C. Kowal, et al., *Sci. Transl. Med.*, **6**, 263ra158 (2014), DOI: 10.1126/scitranslmed.3009759
42. R. Mirzaei, B. Bouzari, S. R. Hosseini-Fard, et al., *Biomed. Pharmacother.*, **139**, 111661 (2021).
43. H. Nuutinen, K. Lindros, P. Hekali, and M. Salaspuro, *Alcohol*, **2**, 623 (1985).
44. R. A. Wanievski and D. L. Martin, *J. Neurosci.*, **18**, 5225 (1998).
45. D. K. Deelchand, A. A. Shestov, D. M. Koski, et al., *Am. J. Physiol. – Gastrointest. Liver Physiol.*, **315**, G53 (2018).

46. H. Berkefeld, B. Fakler, and U. Schulte, *Physiol. Rev.*, **90**, 1437 (2010).
47. A. Hermann, G. F. Sitdikova, and T. M. Weiger, *Biomolecules*, **5**, 1870 (2015).
48. И.Ф. Шайдуллов, М.У. Шафигуллин, Д.М. Габитова и др., *Журн. эволюц. биохимии и физиологии*, **54** (5), 355 (2018).
49. A. N. Mustafina, A. V. Yakovlev, A. S. Gaifullina, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **465**, 825 (2015).
50. A. S. Gaifullina, A. V. Yakovlev, A. N. Mustafina, et al., *FEBS Lett.*, **590**, 3375 (2016).
51. N. B. Dass, A. K. John, A. K. Bassil, et al., *Neurogastroenterol. Motil.*, **19**, 66 (2007).
52. И. Ф. Шайдуллов, Н. Н. Хаертдинов, Д. Н. Шарфутдинова и др., *Уч. записки КГВАМ им. Н.Э. Баумана*, **249** (1), 240 (2022).
53. N. Cullen and P. L. Carten, *Brain Res.*, **588**, 49 (1992).
54. S. S. Stojilkovic, J. Tabak, and R. Bertram, *Endocr. Rev.*, **31**, 845 (2010).
55. I. Shaidullov, E. Ermakova, A. Gaifullina, et al., *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, **473**, 67 (2021).
56. M. N. Yoon, M. J. Kim, H. S. Koong, D. K. Kim, S. H. Kim, H. S. Park, *Alcohol.*, **63**, 53 (2017).
57. V. Andreu-Fernández, A. Bastons-Compta, E. Navarro-Tapia, et al., *Sci. Rep.*, **9** (1), 1562 (2019).
58. N. D. Åberg, K. G. Brywe, and J. Isgaard, *Sci. World J.*, **6**, 53 (2006).
59. F. Nyberg and M. Hallberg, *Nat. Rev. Endocrinol.*, **9**, 357 (2013).

Salts of Short-Chain Fatty Acids Increase the Activity of the Large Conductance, Ca^{2+} -Activated K^+ Channels and Reduce Calcium Oscillations in Rat GH3 Cells

I.F. Shaidullov*, E.V. Ermakova*, D.M. Sorokina*, O.V. Yakovleva*, and G.F. Sitdikova*

**Kazan (Volga region) Federal University, Kremlevskaya ul., 18, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia*

The short-chain fatty acids such as acetic, propionic and butyric acids are microbiota metabolites that can exert a series of physiological effects both in the intestine and other organs, including the central nervous system. The present work aimed to examine the effects of sodium acetate, propionate, and butyrate on the activity of large conductance Ca^{2+} activated K^+ channels and calcium oscillations in rat pituitary GH3 cells. It has been shown that fatty acids under study cause a dose-dependent increase in the amplitude of total outward potassium currents and these effects are prevented by tetraethylammonium, a Ca^{2+} activated K^+ channel blocker, indicating the involvement of Ca^{2+} activated K^+ channels in the effects of fatty acids. It is worthy of note that fatty acids increased open probability of single channels with no changes in the amplitude and the mean channel open time. In addition, fatty acids were associated with a significant reduction in the amplitude and frequency of Ca^{2+} oscillations in GH3 cells. An increase in potassium conductance and a decrease in the intracellular Ca^{2+} level can mediate the effects of short-chain fatty acids in various excitable structures, such as a relaxation of intestinal and vascular smooth muscle cells, hyperpolarization of neurons, and the regulation of hormone and neurotransmitter release.

Keywords: short-chain fatty acids, large conductance Ca^{2+} activated K^+ channels, GH3 cells, calcium oscillations