
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ МЕТАБОЛИТА МИКРОБИОТЫ – МАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ
НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ КООРДИНАЦИЮ, СИЛУ МЫШЦ И УРОВЕНЬ
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦАХ
ПРИ ДИСБИОЗЕ У МЫШЕЙ**

© 2023 г. О. В. Яковлева¹, *, А. И. Муллакаева¹, А. Ф. Салихзянова¹,
Д. М. Сорокина¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹Казанский федеральный университет, Казань, Россия

*E-mail: a-olay@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.03.2023 г.

После доработки 27.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Согласно современным представлениям, состав и разнообразие кишечной микробиоты играют существенную роль в поддержании иммунитета, гомеостаза и в целом физиологических функций организма хозяина. В последние годы появились сообщения о позитивной роли микробиоты и ее метаболитов, особенно короткоцепочечных жирных кислот, в метаболизме и функциональной активности скелетных мышц. Целью нашей работы было проанализировать силу мышц и координацию движений у мышей после инъекции курса антибиотиков широкого спектра действия с одновременным пероральным введением метаболита микробиоты – одного из представителей короткоцепочечных жирных кислот – масляной кислоты. Кроме того, мы определили уровень малонового диальдегида, концентрацию общего глутатиона и активность глутатионпероксидаз в мышцах задних конечностей у мышей с введением антибиотиков и масляной кислоты. Введение антибиотиков мышам-подросткам в течение двух недель приводило к более высокой смертности и снижению прибавки в массе тела, а также вызывало значительные изменения в двигательном поведении, включая повышение горизонтальной двигательной активности, снижение вертикальной двигательной активности, мышечной силы, координации движений. Более высокий уровень окислительного стресса был обнаружен в тканях мышц задних конечностей мышей, получавших антибиотики. В то же время введение препарата масляной кислоты предотвращало наблюдаемые изменения и улучшало не только поведенческие нарушения, но и частично снижало уровень окислительного стресса. Таким образом, использование метаболитов нормальной микробиоты оказывает позитивное влияние на функциональные и биохимические показатели скелетных мышц при дисбиозе, что может быть использовано для предотвращения потери мышечной функции при различных патологических состояниях.

Ключевые слова: антибиотик-индуцированный дисбактериоз, масляная кислота, двигательная активность, мышечная сила, координация движений, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S0869813923060067, EDN: WHCVXS

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным исследованиям, микробиота кишечника оказывает значительный вклад в поддержание здоровья человека, а дисбиоз кишечника прямо

или опосредованно вовлечен в развитие ряда хронических заболеваний, таких как ожирение, диабет 1-го и 2-го типа, аутизм, синдром раздраженного кишечника и другие [1–5]. Доказано непосредственное влияние микробиоты на развитие и деятельность головного мозга, а негативные изменения в составе микробного сообщества могут стать причиной возникновения нервно-психических расстройств [6, 7]. Взаимодействие кишечной микробиоты с нервной системой описывают термином “ось кишечник–мозг”, в которой желудочно-кишечный тракт и головной мозг модулируют функции друг друга [8–11]. Прием антибактериальных препаратов является одним из главных факторов, влияющих на состав и разнообразие кишечной микробиоты, что приводит к нарушениям функций желудочно-кишечного тракта, иммунной и нервной систем [6, 7, 12, 13].

В последнее время все большее внимание уделяется роли микробиоты в поддержании массы тела и функции скелетных мышц, так называемой “оси кишечник–мышцы”, хотя влияние кишечной микробиоты на скелетные мышцы хозяина не является однозначным [14]. Так, было показано, что у мышей со стерильным кишечником (germ-free, GF) или мышей, получавших антибиотики, увеличивается масса тела [15, 16]. С другой стороны, соотношение мышечной массы к массе тела снижалось у GF мышей, а трансплантация микробиоты кишечника от мышей дикого типа привела к восстановлению этого соотношения [17]. Сходные изменения наблюдали и у мышей с введением антибиотиков [1, 18, 19]. При этом показатели мышечной массы улучшались при заселении естественной микрофлорой [1]. Несколько исследований показали снижение физической работоспособности, включая силу мышц и выносливость как у GF-мышей, так и мышей с введением антибиотиков [1, 17, 19, 20].

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), такие как ацетат, пропионат и бутират, являются ключевыми продуктами ферментации не усваиваемых углеводов с помощью бактерий-комменсалов, содержание которых в толстой кишке достигает 150 мМ [21]. Показаны позитивные влияния смеси КЦЖК на соотношение массы мышц к массе тела у GF-мышей [17] и кормления бутиратом у старых мышей [22]. Поскольку потеря мышечной функции и массы тела — это фактор риска и смертности при нервно-мышечных заболеваниях, а также при многих хронических заболеваниях (например, раковой кахексии, ожирении, диабете) [4, 23], поиск стратегий для предотвращения этого феномена является актуальной задачей.

Целью настоящего исследования явился анализ массы тела, силы мышц и координации движений у мышей после инъекции курса антибиотиков и дополнительного введения препарата, содержащего масляную кислоту. Кроме того, мы проанализировали уровень окислительного стресса в скелетных мышцах мышей, получавших антибиотики и препарат масляной кислоты.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

Исследование проведено на 25-дневных мышах массой тела 15–20 г. Животные содержались в полипропиленовых клетках (по 4–5 мышей на клетку) при контролируемой температуре (22–24°C) с 12-часовым циклом день–ночь (свет включался в 08:00) и со свободным доступом к пище и воде

Животные были случайным образом разделены на 4 группы. Мыши группы Ab ($n = 37$) получали внутрибрюшинные (в/б) инъекции 10 мл/кг коктейля из антибиотиков 1 раз в сутки в течение 2 нед. Животные из группы Ab + BA ($n = 33$) дополнительно к в/б введению антибиотиков получали перорально 1 мл суспензии фармакологического препарата “Закофальк” (Др Фальк, Германия) в концентрации 7 мг/кг, соответствующей рекомендуемым дозам для человека.

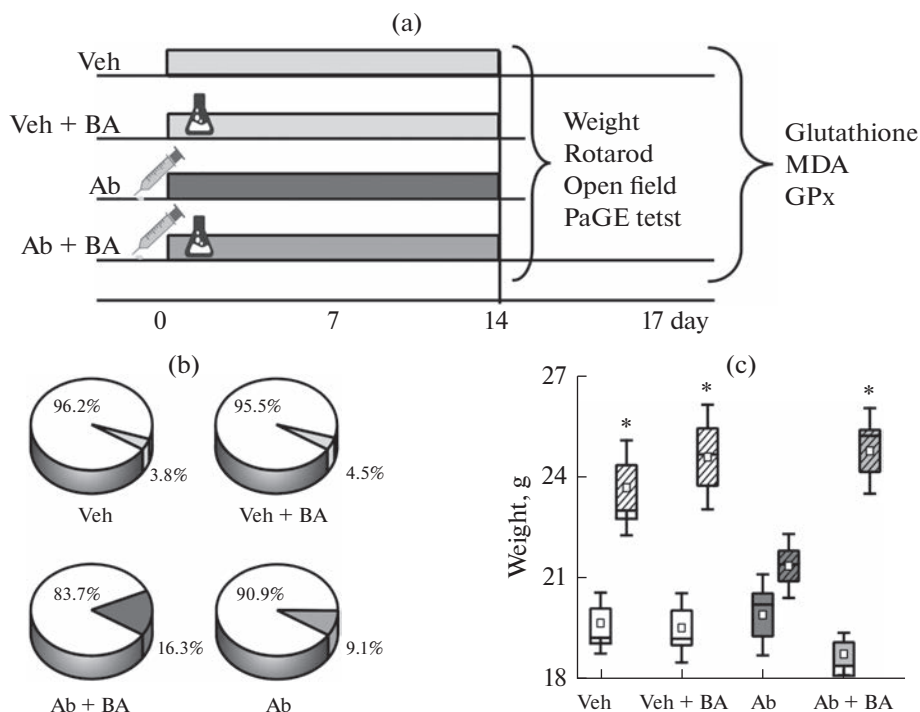


Рис. 1. Эффект антибиотиков на смертность и набор массы тела у мышей. (a) – Схема эксперимента. Veh – Контрольная группа; Veh + BA – контрольная группа мышей, получающих препарат “Закофальк”, содержащий масляную кислоту (BA); Ab – группа мышей, получающих инъекции коктейля антибиотиков; Ab + BA – группа мышей, дополнительно к введению антибиотиков получающих BA; MDA – малоновый диальдегид; GPx – глутатион пероксидазы, PaGE test – тест Сила хвата. (b) – Соотношение выживаемости (белый сектор) к смертности (серый сектор) мышей групп Veh; Veh + BA; Ab; Ab + BA. (c) – Масса тела мышей до и после двух недель эксперимента (заштрихованные квадраты) в группах Veh и Veh + BA (белые квадраты); Ab (темно-серые квадраты); Ab + BA (светло-серые квадраты). Квадраты – SEM, линия – медиана, круг внутри – среднее значение, усы – 5–95 квантиль. * – $p < 0.05$ относительно начальных значений.

Животным контрольной (Veh) группы ($n = 27$) вводили в/б физиологический раствор в эквивалентном объеме. Животные группы Veh + BA ($n = 26$) дополнительно к инъекциям физиологического раствора получали суспензию “Закофальк”.

Коктейль антибиотиков для инъекций был приготовлен в растворе 0.9%-ного NaCl и содержал следующие антибиотики в мг/мл: неомицин 5.0; ванкомицин 25.0; амфотерицин В 0.1; ампициллин 10; метронидазол 5.0 [7, 24].

Сразу после окончания курса антибиотиков мы оценивали смертность, набор массы тела и проводили поведенческие тесты во всех экспериментальных группах. Биохимический анализ мышц задних конечностей выполняли по окончании поведенческих тестов. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1а.

Поведенческие тесты

Тест Открытое поле. В тесте Открытое поле оценивалась двигательная активность животных до и после инъекций. Тест проводился на круглой арене диаметром 60 см со стенкой высотой 36 см, разделенной на 36 квадратов 10×10 см, оборудованной видеосистемой (Open Science, Москва, Россия). Каждое животное поме-

щали в центр Открытого поля и давали возможность исследовать поле в течение 3 мин с регистрацией количества пересеченных квадратов, подъемов на задние лапы в свободной стойке и с опорой. Кроме того, оценивали общую двигательную активность, рассчитанную как сумма квадратов пересечений и количества вставаний на задние лапы. После каждого испытания открытое поле очищали 70%-ным этиловым спиртом и давали высохнуть [25].

Тест Ротарод. Равновесие и координацию движений передних и задних конечностей оценивали с помощью теста Ротарод (Нейроботикс, Россия). Каждую мышь помещали на цилиндр со скоростью вращения 5 см/с и измеряли время до падения. Животных подвергали трем последовательным сеансам тестирования с интервалом 20–30 мин. Регистрировали наибольшее время (с) удержания до падения с вращающегося цилиндра [26].

Тест Сила хвата. Силу мышц конечностей оценивали с помощью теста Сила хвата. Мышей помещали на проволочную сетку и осторожно встряхивали, чтобы побудить животное схватиться за сетку. Сетку переворачивали вверх дном над клеткой и удерживали на высоте 45 см над дном открытой клетки. Оценивалось время (с), проведенное на сетке (до падения). Для анализа отбиралось наибольшее значение из трех попыток [27].

Перекисное окисление липидов и активность глутатионпероксидаз

Образцы ткани мышц задних конечностей замораживали и гомогенизировали в буферном растворе (0.15 М NaCl с фосфатным буфером, соотношение 1 : 10) для дальнейшего анализа. Малоновый диальдегид (МДА) измеряли спектрофотометрически по методике Ohkawa [28]. Гомогенаты тканей смешивали с 20%-ной трихлоруксусной кислотой и 0.03 М 2-тиобарбитуровой кислотой в соотношении 2 : 2 : 1. Смесь нагревали 45 мин при 95°C и центрифугировали 10 мин при 1000 g. В этих условиях МДА легко вступает в реакцию нуклеофильного присоединения с 2-тиобарбитуровой кислотой, образуя красный флуоресцентный метаболит МДА 1 : 2. Поглощение супернатанта контролировали при 532 нм ($\epsilon_{\text{TBA-MDA}} = 1.55 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$) спектрофотометрически (ПЭ-5300ВИ, ЭКОХИМ, Россия). Уровни МДА выражали в мкг/г ткани.

Антиоксидантный потенциал определяли путем измерения активности глутатион-пероксидаз, оцениваемой по снижению уровня восстановленной формы глутатиона с использованием трет-бутилгидропероксида в качестве субстрата [29, 30]. 1 мл раствора глутатиона смешивали с 1 мл гомогената тканей; смесь разделяли на две центрифужные пробирки (опытную и контрольную) и инкубировали 5 мин. В пробирку добавляли раствор трет-бутилгидропероксида (5 мкМ, 0.02 мл). Через 10 мин в опытную и контрольную пробирки вливали по 0.2 мл холодной 10%-ной трихлоруксусной кислоты. Образцы центрифугировали 15 мин при 1000 g и по 0.1 мл надосадочной жидкости из контрольных и пробирок переносили в химические пробирки, добавляли 2 мл фосфатного буфера (0.2 М, pH 8.0) и 0.05 мл реактива Элмана и перемешивали. Оптическую плотность контрольного и опытного образцов измеряли при 412 нм на спектрофотометре (ПЭ-5300ВИ, ЭКОХИМ, Россия). Активность глутатионпероксидазы выражали в мкМ/г ткани в мин.

Статистический анализ

Статистическую обработку проводили при помощи непараметрических методов с использованием пакета прикладных программ Origin Pro software (OriginLab Corp, США). Для проверки выборки на нормальное распределение применяли тест Шапиро-Уилка (размер выборки 25) и *F*-тест для равных дисперсий. Все групповые данные сравнивались при помощи ANOVA по Краскелу–Уоллису (Kruskal-

Wallis test) с последующим анализом U -критерия Манна–Уитни. Для оценки смертности использовали Хи-квадрат. Различия считались статистически значимыми при $p < 0.05$; n – количество протестированных животных. Все результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ выживаемости и набора массы тела мышей

Анализ выживаемости мышей показал, что инъекции антибиотиков приводили к снижению выживаемости мышей до 83.7% животных ($\chi^2 = 8.64$), тогда как в контроле выживаемость составила 96.2% (рис. 1b). Экспериментальные группы, получающие препарат масляной кислоты, не отличались по выживаемости от контроля ($\chi^2 = 2.33$). Измерение массы тела мышей исследуемых групп показало, что введение антибиотиков приводило к замедлению набора массы тела животными относительно группы контроля и групп, получавших масляную кислоту (рис. 1c). Начальные значения массы тела мышей составили 19.5 ± 0.2 г. В группах Veh и Veh + BA набор массы тела составил 125 и 129% соответственно относительно начальных значений ($n = 25$, $p < 0.05$ и $n = 25$, $p < 0.05$). В группе Ab масса тела животных не увеличилась за 2 нед. инъекций и составила 107% от начальной ($n = 25$). Введение препарата “Закофальк” группе Ab + BA привело к увеличению массы тела до 126% от начальных значений ($n = 25$, $p < 0.05$).

Исследование поведенческих реакций в тесте Открытое поле

Анализ результатов теста Открытое поле показал, что у мышей, получавших инъекции антибиотиков, общая двигательная активность не отличалась от Veh и Ab + BA групп (рис. 2a). При этом горизонтальная активность в группе Ab усиливалась (рис. 2b). Количество пройденных квадратов составило 162.7 ± 10.2 шт., что значимо выше контроля (123.5 ± 7.9 шт., $n = 25$, $p < 0.05$). Количество пройденных квадратов у мышей группы Ab + BA не отличалось от контрольной группы (123.1 ± 8.1 шт., $n = 25$, $p > 0.05$). В связи с тем, что нами не наблюдалось достоверных отличий между группами Veh и Veh + BA по всем параметрам теста Открытое поле, данные группы Veh + BA здесь и далее не представлены.

Вертикальная двигательная активность отражает не только исследовательское поведение животных, но и координацию движений и считается по количеству свободных и пристеночных стоек. Общее количество стоек в группе Ab было значимо ниже (10.4 ± 2.3 шт., $n = 25$, $p < 0.05$) контроля и группы Ab + BA (13.6 ± 2.3 и 15.1 ± 1.8 шт., $n = 25$). Анализ стоек показал (рис. 2d), что в группе Ab наблюдалось резкое снижение количества свободных стоек (0.6 ± 0.3 шт., $n = 25$, $p < 0.05$) относительно групп Veh (4.2 ± 0.8 шт., $n = 25$) и Ab + BA (4.2 ± 0.7 шт., $n = 25$). Количество стоек с опорой на стенку Открытого поля (рис. 2c) в группах не отличалось (9.7 ± 1.5 , 9.6 ± 1.5 , 10.8 ± 1.5 шт., $n = 25$).

Исследование координации движений и мышечной силы

После двух недель инъекций антибиотиков в тесте Ротарод мыши демонстрировали меньшее время пребывания на вращающемся цилиндре (78.6 ± 12.1 с, $n = 25$, $p < 0.05$) относительно контроля (124.2 ± 9.7 с, $n = 25$) и группы Ab + BA (110.6 ± 20.0 с, $n = 25$, рис. 2e).

В тесте Сила хвата контрольные животные находились на сетке в течение 79.1 ± 6.6 с ($n = 25$, рис. 2f). В группе Ab время нахождения на сетке было значимо ниже кон-

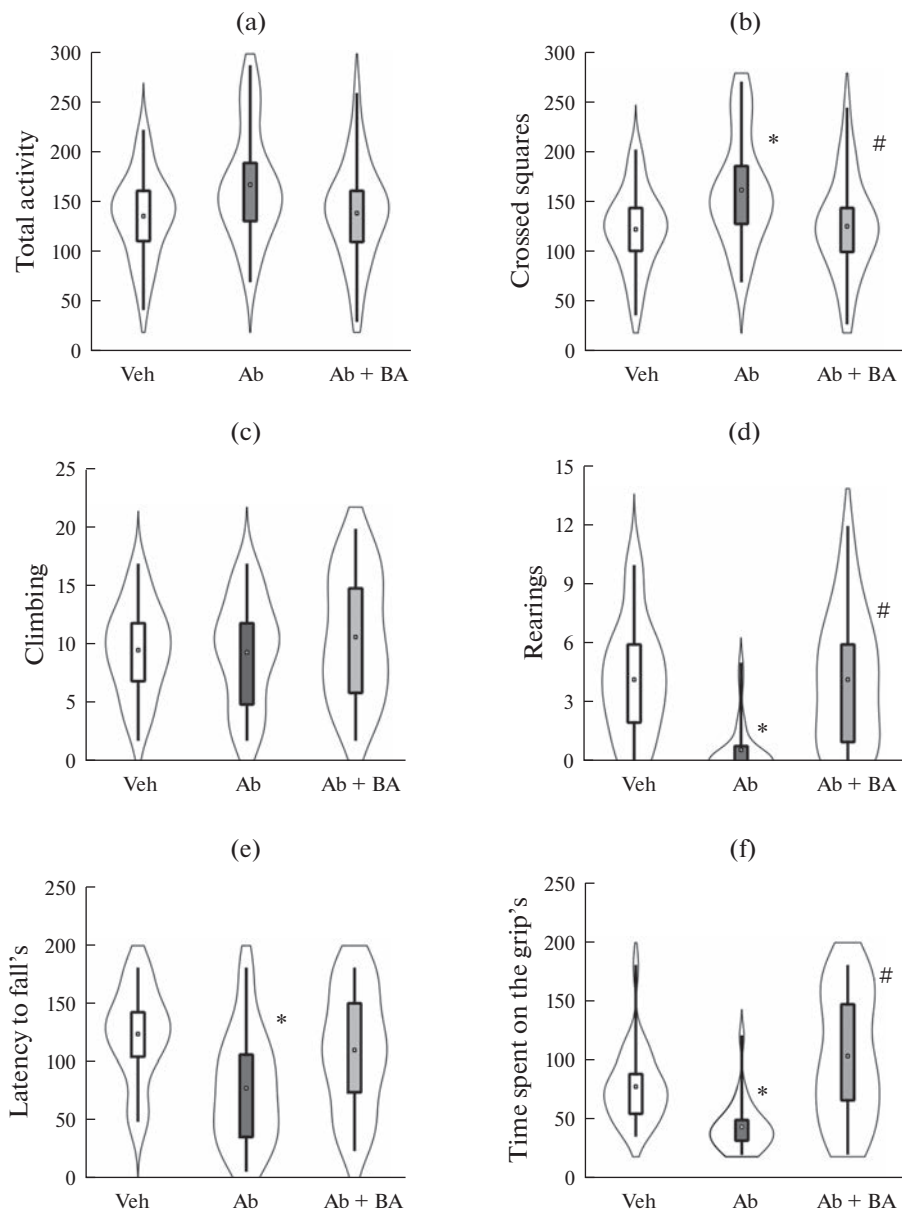


Рис. 2. Влияние антибиотиков и масляной кислоты на двигательную активность в тесте Открытое поле, координацию движений и силу мышц. Общая двигательная активность (a) и количество пересеченных квадратов (b), вертикальная двигательная активность – стойки с опорой на стенку (c) и свободные стойки (d) в тесте Открытое поле; время пребывания на вращающемся цилиндре в тесте Ротород (e) и время пребывания на сетке в тесте Сила хвата (f) у мышей групп Veh; Ab; Ab + BA. Результаты представлены в виде графика плотности распределения данных, где прямоугольники – 25–75%, усы – значения минимума/максимума, квадратик внутри – среднее значение. * – $p < 0.05$ относительно контрольных групп, # – $p < 0.05$ относительно группы Ab.

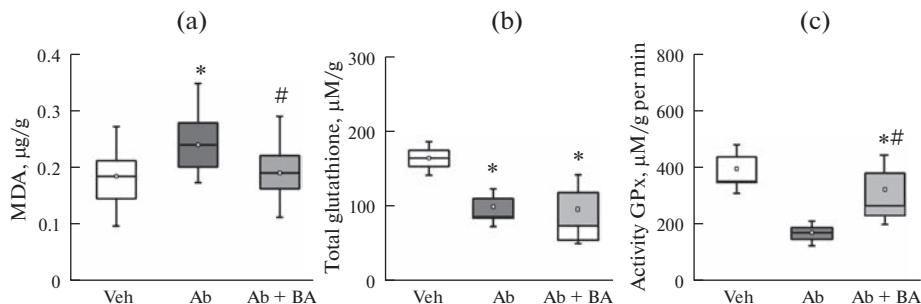


Рис. 3. Уровень окислительного стресса в скелетных мышцах задних конечностей мышей после введения антибиотиков и масляной кислоты. Уровень МДА (а), общий глутатион (б), активность глутатионпероксидазы (с) в мышцах задних конечностей мышей групп контроль (Veh, белые столбцы); Ab (серые столбцы); Ab + BA (светло-серые столбцы). Прямоугольники – 25–75%, черная линия – медиана, квадратик внутри – среднее значение, усы – значения минимума/максимума. * – $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой, # – $p < 0.05$ по сравнению с группой Ab.

трольных значений и составило 45.1 ± 5.5 с ($n = 25$, $p < 0.05$). В группе Ab + BA этот параметр не отличался от контроля (104.3 ± 10.6 с; $n = 25$, рис. 2f).

Влияние масляной кислоты на уровень окислительного стресса в мышцах мышей с инъекциями антибиотиков

Для оценки степени окислительного стресса у мышей измеряли уровень МДА в тканях мышц задних конечностей. Уровень МДА увеличился в группе Ab до 0.24 ± 0.01 мкг/г ($n = 20$) по сравнению с контрольной группой 0.18 ± 0.01 мкг/г ($n = 20$, $p < 0.05$), что указывает на более высокую продукцию активных форм кислорода в мышцах (рис. 3а). У мышей группы Ab + BA уровень МДА был значительно ниже (0.19 ± 0.01 мкг/г, $n = 20$) и не отличался от контрольной группы.

Одним из самых распространенных антиоксидантов является глутатион и группа ферментов, использующая его для обезвреживания перекисей – глутатионпероксидазы. Мы проанализировали концентрацию глутатиона и ферментативную активность глутатионпероксидазы в мышечных тканях. Было обнаружено, что концентрация глутатиона снижалась у животных группы Ab (99.8 ± 11.9 мкМ/г, $p < 0.05$, $n = 20$) относительно контрольных значений (166.4 ± 10.8 мкМ/г, $n = 20$, рис. 3б). В группе Ab + BA содержание глутатиона также было ниже контроля и составило 98.4 ± 22.1 мкМ/г ($p < 0.05$, $n = 20$). Активность глутатионпероксидазы в мышцах мышей группы Ab составила 172.9 ± 19.0 мкМ/г/мин ($n = 20$, $p < 0.05$) и была ниже контрольных значений (399.2 ± 43.3 мкМ/г/мин, $n = 20$, рис. 3с). Активность глутатионпероксидазы в мышцах мышей из группы Ab + BA (321.7 ± 82.0 мкМ/г/мин, $n = 20$) была ниже, чем в контрольной группе, но выше чем у мышей группы Ab.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Взаимодействие микробиоты и скелетных мышц все больше привлекает внимание исследователей в связи с ее влиянием на метаболизм и фенотип мышечных волокон и, как следствие, на их функциональную активность [11]. Кроме того, выяснилось, что добавки с пробиотиками частично предотвращают атрофию скелетных мышц, связанную с онкологической кахексией и саркопенией [31]. В нашем исследовании для анализа роли микробиоты в поддержании двигательной активности и

силы мышц был использован коктейль антибиотиков широкого спектра действия, который приводил к истощению состава бактериальных таксонов, а также дисбалансу в бактериальных сообществах [7]. КЦЖК являются одними из метаболитов микробиоты, содержание которых снижается в условиях применения антибиотиков [32–35]. Поэтому для предотвращения негативных последствий применения антибиотиков нами был использован препарат “Закофальк”, содержащий одного из представителей КЦЖК – масляную кислоту в виде бутирата кальция. Содержание бутирата кальция в препарате составляет 305 мг, и рекомендуемая доза на массу тела у человека – 7 мг/кг. Второй компонент “Закофалька” – инулин – часто используется при лечении синдрома раздраженного кишечника с запорами и способствует снижению времени транзита кишечника. В экспериментах на мышцах показано, что инулин способствует утилизации жиров в мышцах [36, 37], увеличению числа бифидобактерий в толстом кишечнике и, как следствие, усилению естественного синтеза бутирата [38]. Содержание инулина в препарате составляет 250 мг, и при приеме препарата в рекомендуемых дозах организм получает 6 мг/кг инулина, что меньше рекомендуемых доз для человека – 140 мг/кг. Поэтому проявления позитивных эффектов инулина относительно бутирата будет существенно ниже, тем не менее, нельзя исключить позитивные свойства инулина в отношении микробиоты наряду с бутиратом.

В наших экспериментах в группе животных, получавших антибиотики, наблюдалось увеличение смертности и снижение скорости набора массы тела, что, вероятно, связано с развитием воспалительного процесса в желудочно-кишечном тракте, приводящего к нарушению усвояемости питательных веществ [7, 32]. Применение препарата масляной кислоты в группе Ab приводило к восстановлению динамики набора массы тела животных, что согласуется с данными о позитивных эффектах введения смеси КЦЖК или трансплантации микробиоты на массу и мышечную функцию скелетных мышц у GF-мышей [17, 39].

В тесте Открытое поле у мышей группы Ab не наблюдалось изменения общей двигательной активности, но увеличивалась горизонтальная активность, что может указывать на развитие тревожности [40] и требует дополнительного изучения. У мышей этой группы было выявлено снижение общего количества вертикальных стоек, что может быть связано как с уменьшением исследовательской активности, так и с нарушением координации движений. Вертикальная двигательная активность животных в Открытом поле представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (Climbing, стойка с опорой) или остаются на весу (Rearing, стойка без опоры) [25]. Дополнительный анализ с разделением стоек по двум видам не выявил отличий в числе стоек с опорой на стенку между группами, но показал резкое снижение количества стоек на задних лапах без опоры, требующих координации движения для поддержания данной позы, у мышей группы Ab. Снижение времени пребывания на движущемся цилиндре в тесте Ротарод у мышей группы Ab подтверждает предположение о нарушении координации движения. Кроме того, анализ мышечной силы по времени виса животного на сетке показал значительное снижение этого показателя у мышей этой группы Ab.

Снижение силы мышц при дефиците кишечной микробиоты было показано у GF-мышей в исследованиях *ex vivo* [1, 17], где одним из механизмов явилось нарушение сократительной способности миофибрилл за счет снижения экспрессии гена, кодирующего тропонин, а также генов, необходимых для нормальной сборки и развития ацетилхолинового рецептора в нервно-мышечном соединении. Эти изменения нивелировались, когда мышам GF трансплантировали нативную кишечную микробиоту [17]. Ряд исследований указывает также на снижение выносливости у мышей GF или при угнетении микробиоты, оцененной в тестах Плавание,

Бег на тредбане и в Открытом поле [1, 17, 19, 20, 41]. При этом использование пробиотиков у мышей улучшало мышечную массу, способствовало повышению мышечной выносливости и снижению мышечного повреждения, связанного с физическими нагрузками у мышей [41–43].

В нашем исследовании у мышей, получавших препарат масляной кислоты одновременно с антибиотиками, горизонтальная двигательная активность и количество свободных стоек в Открытом поле не отличалось от контроля. Кроме того, время, проведенное на вращающемся цилиндре в тесте Ротарод, и время виса на сетке, отражающей силу мышц конечностей мыши, было сопоставимо с группой контроля. Положительное влияние КЦЖК на силу мышц и выносливость было показано при введении других представителей КЦЖК – пропионата [44], ацетата [19] и смеси КЦЖК [17]. Более того, добавка бутирата в корм улучшала мышечную массу и физическую функцию у старых мышей (26 мес.) [22].

Регуляция функционирования скелетных мышц микробиотой кишечника может осуществляться за счет различных механизмов. Один из основных механизмов, оказывающих вклад в потерю мышечной массы и функции, это системное хроническое воспаление. Микробиота кишечника поддерживает интестинальный барьер, способствуя метаболическому и иммунному гомеостазу [23, 32, 45], а снижение бактериального разнообразия нарушает его целостность, что ведет к проникновению микробных продуктов, таких как липополисахариды, в сосудистое русло и вызывает системное воспаление, метаболические заболевания, снижает мышечную функцию и массу [23, 46]. Кроме того, метаболиты микробиоты поддерживают экспрессию транспортеров глюкозы и КЦЖК в тонком кишечнике, метаболизм глюкозы и липидов в различных тканях [1, 19, 47]. В скелетных мышцах эффекты КЦЖК могут быть опосредованы собственными рецепторами – GPR41 (FFAR3) и GPR43 (FFAR2) [17, 48–50], где КЦЖК модулируют метаболизм липидов, усиливая поглощение и окисление жирных кислот, а также содержание гликогена [1, 19, 51]. Таким образом, путем регуляции мышечного метаболизма и фенотипа волокон микробиота кишечника влияет на физическую работоспособность и сократимость мышц [1]. Интересно, что пробиотические добавки у мышей наряду с увеличением мышечной массы и силы хвата содействовали развитию медленного и окислительного фенотипа мышц, способствующего мышечной выносливости [1, 39].

В нашей работе в скелетных мышцах мышей группы Ab наблюдалось повышение уровня МДА, являющегося маркером окислительного стресса с одновременным снижением активности глутатионпероксидазы. При этом также уменьшался уровень общего глутатиона. Известно, что антибиотики вызывают окислительный стресс в клетках микроорганизмов, составляющих микрофлору кишечника, который, в свою очередь, может оказывать влияние и на клетки организма хозяина [52]. Действительно, у мышей, получавших антибиотики, повышались маркеры окислительного стресса в крови и тканях, а также увеличивалась экспрессия ключевых генов антиоксидантной защиты [52]. При этом оптимальный состав кишечной микробиоты оказывает влияние на синтез белка в скелетных мышцах, биогенез и функцию митохондрий, снижает уровень маркеров воспаления и выработку активных форм кислорода [23, 46]. Сниженная активность глутатионпероксидазы и каталазы в сыворотке крови и печени обнаружены у GF-мышей по сравнению с контрольной группой животных и мышей с реколонизацией [41]. На стареющих крысах в условиях стерильного содержания также было показано снижение активности ферментов антиоксидантной системы глутатиона [53]. В нашей работе применение препарата масляной кислоты в группе мышей Ab восстанавливало активность глутатионпероксидазы и снижало содержание МДА, при этом уровень глутатиона

оставался низким, что, вероятно, указывает на активное использование данного субстрата для обезвреживания активных форм кислорода.

Таким образом, изменения микробиоты, вызванные применением антибиотиков широкого спектра действия, приводят к развитию окислительного стресса в скелетных мышцах задних конечностей мышей, что сопровождается снижением силы мышц, а также нарушением координации движения и двигательной активности. Эти поведенческие нарушения нивелировались применением препарата, содержащего масляную кислоту, который также восстанавливал уровень МДА, активность глутатионпероксидазы и предотвращал смертность и потерю массы тела вследствие использования антибиотиков. Поскольку потеря фенотипа и мышечной функции сопровождается целым рядом патологических состояний, таких как сахарный диабет, онкология, наблюдается при старении, использование метаболитов нормальной микробиоты может стать перспективной стратегией для предотвращения таких состояний.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все экспериментальные процедуры соответствовали этическим стандартам, утвержденным правовыми актами РФ, выполнены с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и были одобрены Локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 33 от 25.11.2021 г.).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда и Кабинета министров Республики Татарстан (проект № 22-25-20045).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (С.Г.Ф., С.Д.М. и Я.О.В.), сбор данных (М.А.И., С.А.Ф., С.Д.М.), обработка данных (Я.О.В., М.А.И., С.А.Ф.), написание и редактирование манускрипта (Я.О.В., С.Г.Ф., М.А.И., С.Д.М., С.А.Ф.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nay K, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, Lefeuvre-Orfila L, Bendavid C, Rué O, Mariadassou M, Bonnieu A, Ollendorff V, Lepage P, Derbré F, Koechlin-Ramonatxo C* (2019) Gut bacteria are critical for optimal muscle function: A potential link with glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 317(1): E158–E171.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00521.2018>
2. *Li G, Jin B, Fan Z* (2022) Mechanisms Involved in Gut Microbiota Regulation of Skeletal Muscle. *Oxid Med Cell Longev* 2022: 151191.
<https://doi.org/10.1155/2022/2151191>
3. *Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB* (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev* 90: 859–904.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009>
4. *Evans WJ* (2010) Skeletal muscle loss: cachexia, sarcopenia, and inactivity. *Am J Clin Nutr* 91(4): 1123S–1127S.
<https://doi.org/10.3945/ajcn.2010.28608A>
5. *Shaidullov IF, Sorokina DM, Sidikov FG, Hermann A, Abdulkhakov SR, Sitdikova GF* (2021) Short chain fatty acids and colon motility in a mouse model of irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol* 21(1): 37.
<https://doi.org/10.1186/s12876-021-01613-y>

6. *Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C* (2000) The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 118(4): 724–734.
[https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(00\)70142-9](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(00)70142-9)
7. *Arslanova A, Tarasova A, Alexandrova A, Novoselova V, Shaidullof I, Khusnutdinova D, Grigoryeva T, Yarullina D, Yakovleva O, Sitdikova G* (2021) Protective effects of probiotics on cognitive and motor functions, anxiety level, visceral sensitivity, oxidative stress and microbiota in mice with antibiotic-induced dysbiosis. *Life* 11(8): 764.
<https://doi.org/10.3390/life11080764>
8. *Adamo KB, Graham TE* (1998) Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol* 84(3): 908–913.
<https://doi.org/10.1152/jappl.1998.84.3.908>
9. *Dinan TG, Cryan JF* (2017) Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. *J Physiol* 595(2): 489–503.
<https://doi.org/10.1113/JP273106>
10. *Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI* (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(3): 979–984.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0605374104>
11. *Bindels LB, Delzenne NM* (2013) Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol* 45(10): 2186–2190.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.021>
12. *Gecse K, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L* (2008) Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 57(5): 591–599.
<https://doi.org/10.1136/gut.2007.140210>
13. *Padmaja S, Green-Johnson J* (2015) Butyric acid inhibits a Toll-like receptor 2 agonist-mediated increase of Toll-like receptor 3-induced chemokine production by HT-29 intestinal epithelial cells. *J Immunol* 194(1): 196.11.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.194.Supp.196.11>
14. *Lustgarten MS* (2019) Role of the gut microbiome and short-chain fatty acids on skeletal muscle mass. *Front Physiol* 10: 1435.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01435>
15. *Nobel YR, Cox LM, Kirigin FF, Bokulich NA, Yamanishi S, Teitler I, Chung J, Sohn J, Barber CM, Goldfarb DS, Raju K, Abubucker S, Zhou Y, Ruiz VE, Li H, Mitreva M, Alekseyenko AV, Weinstein GM, Sodergren E, Blaser MJ* (2015) Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat Commun* 6: 7486.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8486>
16. *Vrieze A, Holleman F, Zoetendal EG, de Vos WM, Hoekstra JBL, Nieuwdorp M* (2010) The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* 53(4): 606–613.
<https://doi.org/10.1007/s00125-010-1662-7>
17. *Lahiri S, Kim H, Garcia-Perez I, Reza MM, Martin KA, Kundu P, Cox LM, Selkirk J, Posma JM, Zhang H, Padmanabhan P, Moret C, Gulyás B, Blaser MJ, Auwerx J, Holmes E, Nicholson J, Wahli W, Pettersson S* (2019) The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med* 11(502): eaan5662.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan5662>
18. *Manickam R, Oh HYP, Tan CK, Paramalingam E, Wahli W* (2018) Metronidazole Causes Skeletal Muscle Atrophy and Modulates Muscle Chronometabolism. *Int J Mol Sci* 9(8): 2418.
<https://doi.org/10.3390/ijms19082418>
19. *Okamoto T, Morino K, Ugi S, Nakagawa F, Lemecha M, Ida S, Ohashi N, Sato D, Fujita Y, Mae-gawa H* (2019) Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 316: E956–E966.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00510.2018.0193-1849/19>
20. *Huang WC, Chen YH, Chuang HL, Chiu CC, Huang CC* (2019) Investigation of the effects of microbiota on exercise physiological adaption, performance, and energy utilization using a Gnotobiotic animal model. *Front Microbiol* 10: 1906.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01906>
21. *Frampton J, Murphy KG, Frost G, Chambers ES* (2020) Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab* 2(9): 840–848.
<https://doi.org/10.1038/s42255-020-0188-7>

22. Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, Kinter M, Remmen HV (2015) The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging Cell* 14(6): 957–970.
<https://doi.org/10.1111/ace.12387>
23. Przewłócka K, Folwarski M, Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, Kaczor JJ (2020) Gut-Muscle Axis Exists and May Affect Skeletal Muscle Adaptation to Training. *Nutrients* 12(5): 1451.
<https://doi.org/10.3390/nu12051451>
24. Desbonnet L, Clarke G, Traplin A, O'Sullivan O, Crispie F, Moloney RD, Cotter PD, Dinan TG, Cryan JF (2015) Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav Immun* 48: 165–173.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004>
25. De Paula Vieira A, de Passillé AM, Weary DM (2012) Effects of the early social environment on behavioral responses of dairy calves to novel events. *J Dairy Sci* 95(9): 5149–5155.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-5073>
26. Karl T, Pabst R, Von Hörsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. *Exp Toxicol Pathol* 55(1): 69–83.
<https://doi.org/10.1078/0940-2993-00301>
27. Weydt P, Hong SY, Klot M, Möller T (2003) Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *NeuroReport* 14(7): 1051–1054.
<https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000073685.00308.89>
28. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2): 351–358.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
29. Razygraev AV, Yushina AD, Titovich IA (2018) Correction to: A Method of Measuring Glutathione Peroxidase Activity in Murine Brain: Application in Pharmacological Experiment. *Bull Exp Biol Med* 165(4): 589–592.
<https://doi.org/10.1007/s10517-018-4219-2>
30. Yakovlev AV, Dmitrieva SA, Krasnova AN, Yakovleva OV, Sitdikova GF (2022) Levels of Protein Carbonylation and Activity of Proteases in the Brain of Newborn Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia. *Neurochem J* 16(3): 243–250.
<https://doi.org/10.1134/S181971242203014X>
31. Varian BJ, Gouresheeti S, Poutahidis T, Lakritz JR, Levkovich T, Kwok C, Teliouis K, Ibrahim YM, Mirabal S, Erdman SE (2007) Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget* 7: 11803–11816.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7730>
32. Mekonnen SA, Merenstein D, Fraser CM, Marco ML (2020) Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Curr Opin Biotechnol* 61: 226–234.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.01.005>
33. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, Eismann K, Otto W, Rojo D, Bargiela R, von Bergen M, Neulinger SC, Däumer C, Heinsen F-A, Latorre A, Barbas C, Seifert J, dos Santos VM, Ott SJ, Ferrer M, Moya A (2013) Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut* 62(11): 1591–1601.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303184>
34. Binder HJ (2010) Role of Colonic Short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu Rev Physiol* 72: 297–313.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135817>
35. Theriot CM, Koenigsknecht MJ, Carlson PE, Hatton GE, Nelson AM, Li B, Huffnagle GB, Li JZ, Young VB (2014) Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nat Commun* 5: 3114.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4114>
36. dos Reis SA, da Conceição LL, Rosa DD, dos Santos Dias MM, do Carmo Gouveia Peluzio M (2015) Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile. *Nutr Hosp* 31(2): 528–534.
<https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.2.7706>
37. Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, François P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J, Cani PD (2011) Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes* 60: 2775–2786.
<https://doi.org/10.2337/db11-0227>
38. Rivière A, Selak M, Lantín D, Leroy F, De Vuyst L (2016) Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria: Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. *Front Microbiol* 7: 979.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

39. Qiu Y, Yu J, Li Y, Yang F, Yu H, Xue M, Zhang F, Jiang X, Ji X, Bao Z (2021) Depletion of gut microbiota induces skeletal muscle atrophy by FXR-FGF15/19 signalling. *Ann Med* 53(1): 508–522.
<https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1900593>
40. Nedogreeva OA, Stepanichev MY, Gulyaeva NV (2020) Removal of the Olfactory Bulbs in Mice Leads to Changes in Affective Behavior. *Neurosci Behav Physiol* 50: 892–899.
<https://doi.org/10.1007/s11055-020-00982-3>
41. Hsu YJ, Chiu CC, Li YP, Huang WC, Huang YT, Huang CC, Chuang HL (2015) Effect of Intestinal Microbiota on Exercise Performance in Mice. *J Strength Condit Res* 29(2): 552–558.
<https://doi.org/10.1519/JSC.0000000000000644>
42. Chen Y-M, Wei L, Chiu Y-S, Hsu Y-J, Tsai T-Y, Wang M-F, Huang C-C (2016) Lactobacillus plantarum TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice. *Nutrients* 8(4): 205.
<https://doi.org/10.3390/nu8040205>
43. Jäger R, Shields KA, Lowery RP, De Souza EO, Partl JM, Hollmer C, Purpura M, Wilson JM (2016) Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *Peer J* 4: e2276.
<https://doi.org/10.7717/peerj.2276>
44. Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham LD, Wibowo MC, Wurth RC, Punthambaker S, Tierney BT, Yang Z, Hattab MW, Avila-Pacheco J, Clish CB, Lessard S, Church GM, Kostic AD (2019) Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med* 25(7): 1104–1109.
<https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>
45. Rastelli M, Cani PD, Knauf C (2019) The gut microbiome influences host endocrine function. *Endocr Rev* 40(5): 1271–1284.
<https://doi.org/10.1210/er.2018-00280>
46. Grosicki GJ, Fielding RA, Lustgarten MS (2018) Gut microbiota contribute to age-related changes in skeletal muscle size, composition, and function: biological basis for a gut-muscle axis. *Calcif Tissue Int* 102(4): 433–442.
<https://doi.org/10.1007/s00223-017-0345-5>
47. Guo A, Li K, Xiao Q (2020) Fibroblast growth factor 19 alleviates palmitic acid-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress via the AMPK/PGC-1 α pathway in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 526(4): 1069–1076.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.04.002>
48. Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Stepewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ (2003) The orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem* 278(13): 11312–11319.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M211609200>
49. Nilsson NE, Kotarsky K, Owman C, Olde B (2003) Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 303(4): 1047–1052.
[https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00488-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00488-1)
50. Ticinesi A, Lauretani F, Milani C, Nouvenne A, Tana C, Del Rio D, Maggio M, Ventura M, Meschi T (2017) Aging gut microbiota at the cross-road between nutrition, physical frailty, and sarcopenia: Is there a gut–muscle axis? *Nutrients* 9(12): 1303.
<https://doi.org/10.3390/nu9121303>
51. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, Cefalu WT, Ye J (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 58(7): 1509–1517.
<https://doi.org/10.2337/db08-1637>
52. Kalghatgi S, Spina CS, Costello JC, Liesa M, Morones-Ramirez JR, Slomovic S, Molina A, Shiri-hai OS, Collins JJ (2013) Bactericidal Antibiotics Induce Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in Mammalian Cells. *Sci Transl Med* 5(192): 192ra85.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006055>
53. Chen LH, Snyder DL (1992) Effects of age, dietary restriction and germ-free environment on glutathione-related enzymes in Lobund-Wistar rats. *Arch Gerontol Geriatr* 14(1): 17–26.
[https://doi.org/10.1016/0167-4943\(92\)90003-m](https://doi.org/10.1016/0167-4943(92)90003-m)

The Effect of the Microbiota Metabolite – Butyric Acid on Motor Coordination, Muscle Strength and the Level of Oxidative Stress in Skeletal Muscles in Mice with Dysbiosis

**O. V. Yakovleva^{a, *}, A. I. Mullakaeva^a, A. F. Salikhzyanova^a,
D. M. Sorokina^a, and G. F. Sitdikova^a**

^a*Kazan Federal University, Kazan, Russia*

^{*}*e-mail: a-olay@yandex.ru*

According to modern concepts, the composition and diversity of the intestinal microbiota play an essential role in maintaining immunity, homeostasis, and, in general, the physiological functions of the host organism. Recently the positive role of the microbiota and its metabolites especially short-chain fatty acids, in the metabolism and functional activity of skeletal muscles was reported. The aim of our work was to analyze muscle strength and motor coordination in mice after injection of broad-spectrum antibiotics with simultaneous administration of a microbiota metabolite – one of the representatives of short-chain fatty acids – butyric acid. In addition, we determined the level of malondialdehyde, the concentration of total glutathione and the activity of glutathione peroxidases in the muscles of the hind limbs in mice with administration of antibiotics and butyric acid. The administration of antibiotics to adolescent mice for two weeks induced higher mortality and decrease of weight, and also caused significant changes in motor behavior, including an increase in horizontal motor activity, decrease in vertical motor activity, muscle strength, and motor coordination. A higher level of oxidative stress was found in the muscle tissues of the hind limbs of mice treated with antibiotics. At the same time, oral administration of butyric acid prevented the observed changes and improved not only behavioral disorders, but also partially reduced the level of oxidative stress. In conclusion, metabolite of normal microbiota has a positive effect on the functional and biochemical parameters of skeletal muscles in dysbiosis, which can be used to prevent loss of muscle function in various pathological conditions.

Keywords: antibiotic-induced dysbiosis, butyric acid, motor activity, muscle strength, coordination of movements, oxidative stress