

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ И β -ГИДРОКСИБУТИРАТА НА МЕМБРАННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ВНУТРИСИНАПТОСОМАЛЬНЫХ МИТОХОНДРИЙ

© 2019 г. Т.Г. Дубовская, С.В. Гриневич, С.В. Федорович

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, ул. Академическая, 27, Минск, 220072, Республика Беларусь

E-mail: fedorovich@ibp.org.by

Поступила в редакцию 26.06.2017 г.

После доработки 01.10.2018 г.

Принята к публикации 18.03.2019 г.

Для лечения различных заболеваний головного мозга используется кетогенная диета, состоящая в замене углеводов на жиры в ежедневном рационе, что приводит к образованию кетоновых тел, прежде всего β -гидроксибутирата. Механизм ее защитного действия до сих пор неясен. В работе изучено совместное действие глюкозы и β -гидроксибутирата на потенциалы плазматической мембраны и митохондрий синапсом. Показано, что добавление кетоновых тел к глюкозосодержащей инкубационной среде не ведет к изменению потенциала плазматической мембраны синапсом, как это было показано ранее для плазматической мембраны нейронов. Установлено, что при инкубации синапсом в среде, содержащей только β -гидроксибутират, происходит деполяризация митохондрий (изменение $\Delta\Psi$). В то же время добавление кетоновых тел в глюкозосодержащую среду приводит к гиперполяризации. Наблюдаемая деполяризация частично компенсируется увеличением ΔpH митохондрий, вызываемым именно деполяризацией митохондриальной мембраны, а не добавлением β -гидроксибутирата. Таким образом, показано, что кетоновые тела могут использоваться синапсами как энергетические субстраты, но β -гидроксибутират является менее эффективным источником энергии, чем глюкоза.

Ключевые слова: синапсомы, кетогенная диета, кетоновые тела, митохондрии, мембранный потенциал, синапс.

DOI: 10.1134/S0006302919030104

Для лечения различных заболеваний центральной нервной системы, прежде всего эпилепсии и болезни Альцгеймера, используется кетогенная диета [1–3]. Суть метода состоит в том, что углеводы в рационе пациентов заменяются жирами. Жиры в печени преобразуются в кетоновые тела, прежде всего в β -гидроксибутират (БГБ) и ацетоацетат, которые в дальнейшем могут использоваться клетками мозга как энергетические субстраты. Основным кетоновым телом является БГБ. Одновременно происходит снижение содержания глюкозы в крови [1–3].

Механизм защитного действия кетогенной диеты до сих пор остается не совсем понятным. Были предложены различные мишени для кетоновых тел, в том числе гистондеацетилаза (эпигенетический механизм), потенциал плазматической мембраны, калиевые каналы [1–3]. Кроме того,

недавно мы показали, что замена глюкозы на БГБ в инкубационной среде приводит к ингибированию эндоцитоза в пресинаптических окончаниях нейронов, что может быть причиной антиконвульсивного эффекта кетогенной диеты [4]. Мы также не обнаружили какого-либо влияния кетоновых тел на потенциал плазматической мембраны [4]. В то же время в гиперполяризующее действие БГБ в нейронах наблюдалось в присутствии глюкозы в инкубационной среде [5]. Поэтому необходимы дополнительные эксперименты по совместному действию глюкозы и БГБ.

Ранее было установлено, что БГБ может использоваться пресинаптическими окончаниями нейронов в качестве энергетического субстрата и окисляться до CO_2 [6]. В то же время остается неизвестным, достаточно ли одних кетоновых тел, чтобы поддерживать потенциал не только плазматической мембраны, но и синаптических митохондрий. Нами было показано, что в условиях гипогликемии митохондриальный потенциал изменяется значительно сильнее, чем потенциал

Сокращения: БГБ – β -гидроксибутират, СССР – карбонилцианид 4-(трифторметокси)фенилгидразона, DiSC3(5) – 3,3'-дипропилтиадикарбоцианин.

плазматической мембраны. Кроме того, падение $\Delta\Psi$ компенсируется увеличением ΔpH [7]. Неизвестно, происходит ли то же самое в случае использования синаптосомами кетоновых тел в качестве энергетического субстрата.

В данной работе мы изучили совместное действие глюкозы и БГБ на потенциал плазматической мембраны изолированных пресинаптических окончаний нейронов и мембранный потенциал внутрисинаптосомальных митохондрий.

В качестве объекта исследований использовали синаптосомы, изолированные пресинаптические окончания нейронов, сохраняющие основные свойства интактных терминалей [8]. Они способны к экзоцитозу и эндоцитозу, поддерживают потенциал плазматической мембраны и содержат активные митохондрии [7–9]. Мембранный потенциал митохондрий является интегральным биофизическим показателем и достаточно полно характеризует их функциональную активность.

Небольшие размеры синаптосом (600 нм) не позволяют применять электрофизиологические методы для изучения изменений мембранного потенциала, поэтому мы использовали флуоресцентные зонды. В то же время следует отметить, что в отличие от высокоспециализированных нейронов с гигантскими пресинаптическими окончаниями (например, биполярные нейроны сетчатки, каликс Хельда) синаптосомы представляют собой модель «усредненного» синапса и, безусловно, результаты, полученные на этом объекте, важны для понимания биофизики и физиологии синапсов.

Потенциал плазматической мембраны определяли с помощью флуоресцентного зонда 3,3'-дипропилтиадикарбоцианина (DiSC3(5)) [9], $\Delta\Psi$ митохондрий – с помощью флуоресцентного зонда родамин-123 [10], ΔpH митохондрий – с помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый [7]. Схематическое изображение синаптосомы с обозначением изучаемых мембран и указанием того, где и какая трансмембранная разность потенциалов измеряется, приведено на рис. 1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы реактивы: HEPES (4-(2-гидроксиэтил) пиперазин-1-этансульфоновая кислота; Merck, Германия), карбонилцианид 4-(трифторметокси)фенилгидразона (CCCP) (Calbiochem, США), DiSC3(5), родамин-123, DL- β -гидроксибутират натрия (Sigma, США), акридиновый оранжевый (Serva, Германия) Все остальные реактивы – квалификации не ниже «о.с.ч.».

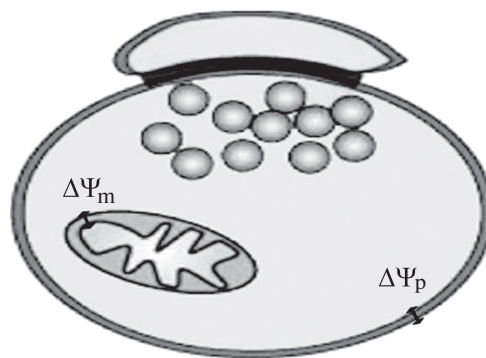


Рис. 1. Схематическое изображение синаптосомы: $\Delta\Psi_p$ – мембранный потенциал плазматической мембраны, $\Delta\Psi_m$ – мембранный потенциал митохондриальной мембраны.

Выделение синаптосом. Синаптосомы изолировали из полушарий мозга крыс по методу Хайоша [11]. Полученный осадок суспендировали в среде А следующего ионного состава (в мМ): NaCl – 132, KCl – 5, MgCl₂ – 1,3, NaH₂PO₄ – 1,2, глюкоза – 10, HEPES – 10, pH 7,4. В экспериментах по изучению влияния кетоновых тел глюкозу замещали на 8 мМ DL- β -гидроксибутирата натрия или дополнительно вносили 4 мМ DL- β -гидроксибутирата натрия к уже имеющейся в инкубационной среде глюкозе (10 мМ). Перед экспериментом суспензию синаптосом (10–20 мг/мл белка) преинкубировали 30 мин при 37°C с соответствующими энергетическими субстратами, после чего их ставили на лед и использовали в эксперименте в течение 3 ч.

Определение потенциала плазматической мембраны. Потенциал плазматической мембраны синаптосом определяли с помощью флуоресцентного зонда DiSC3(5) согласно работе [12] с некоторыми модификациями [7,9]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{возб}$ = 640 нм, $\lambda_{рег}$ = 688 нм, ширине щелей 5 нм и постоянном перемешивании. После выделения синаптосомы преинкубировали в среде А с соответствующими энергетическими субстратами 30 мин при 37°C. К 1,8 мл среды А, содержащей 2 мМ CaCl₂ и соответствующий энергетический субстрат, добавляли 200 мкл суспензии синаптосом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл), после чего на первой минуте инкубации в кювету вносили 1 мкМ DiSC3(5). Через две минуты добавляли 150 мМ KCl. В контрольном опыте вносили только 150 мМ NaCl. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Определение мембранного потенциала митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi$)

определяли с помощью флуоресцентного зонда родамин-123 согласно работе [10] с некоторыми модификациями. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{\text{возб}} = 501$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 525$ нм, ширине щелей 5 нм и постоянном перемешивании. После дополнительной отмывки десятикратным объемом инкубационной среды А синапсосомы ресуспендировали в 2 мл той же среды. К полученной суспензии добавляли 10 мкМ флуоресцентного зонда родамин-123. Далее суспензию инкубировали 15 мин при 37°C. От избытка зонда синапсосомы отмывали десятикратным объемом среды А. Далее синапсосомы ресуспендировали в средах с различными питательными субстратами и инкубировали 30 мин при 37°C в темноте. Перед началом кинетических измерений суспензии уравнивали на льду 10 мин и использовали в эксперименте в течение одного-двух часов.

В кювету с 1,8 мл инкубационной среды А, содержащей 2,0 мМ CaCl_2 и соответствующий инкубационный субстрат, добавляли 200 мкл суспензии синапсосом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл). Через одну минуту добавляли 10 мкМ СССР. В контрольном опыте добавляли 0,1% растворителя диметилсульфоксида. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Определение $\Delta p\text{H}$ митохондрий. $\Delta p\text{H}$ митохондрий определяли с помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый согласно работе [7]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{\text{возб}} = 494$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 529$ нм, ширине щелей 5 нм и постоянном перемешивании. После выделения синапсосомы предынкубировали в среде А с соответствующими энергетическими субстратами 30 мин при 37°C. К 1,8 мл такой же инкубационной среды с 2,0 мМ CaCl_2 добавляли 200 мкл суспензии синапсосом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл), через 1 мин в кювету вносили 5 мкМ акридинового оранжевого. На десятой минуте инкубации добавляли 10 мкМ СССР. В контрольном опыте добавляли 0,1% диметилсульфоксида. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Концентрацию белка определяли методом Лоури [13] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

БГБ составляет 70% всех кетоновых тел, синтезируемых в печени [14]. Концентрация этого

вещества изменяется от 0,1 мМ в норме до 5–8 мМ при голодании или кетогенной диете [3,13]. В нашей прошлой работе [4] мы использовали 8 мМ DL- β -гидроксипутирата натрия. Так как клетки могут использовать только D-изомер БГБ, то в наших экспериментах 50% этого вещества могут использоваться митохондриями синапсосом как энергетический субстрат [4,5,15]. В качестве модели кетоза мы в данной работе в большинстве экспериментов использовали добавление в стандартную инкубационную среду 4 мМ DL- β -гидроксипутирата натрия, так как она уже содержит другой энергетический субстрат глюкозу.

Ранее было предложено, что одним из защитных механизмов действия кетогенной диеты является гиперполяризация плазматической мембраны [5]. Нами было показано, что в синапсосомах замена глюкозы на кетоновые тела в инкубационной среде способна компенсировать деполяризацию плазматической мембраны, индуцированную гипогликемией [2,4]. В то же время мы не наблюдали гиперполяризацию [4]. Мы проверили гипотезу, что для этого эффекта необходимо совместное действие глюкозы и кетоновых тел.

Потенциал плазматической мембраны синапсосом, как и потенциал нейронов, определяется прежде всего калиевым равновесным потенциалом [16]. Поэтому увеличение экстраклеточной концентрации калия до значений его внутриклеточной концентрации приводит к немедленной деполяризации плазматической мембраны [7,16]. Рис. 2а показывает, что калиевая деполяризация приводит к увеличению флуоресценции DiSC3(5) в суспензии синапсосом. Таким образом, этот зонд отражает изменения потенциала плазматической мембраны синапсосом. Рис. 2б показывает, что инкубация в среде, содержащей как глюкозу, так и кетоновые тела не ведет к гиперполяризации синапсосомальной плазматической мембраны.

Рис. 3а показывает, что протонный ионофор СССР, диссипирующий мембранный потенциал митохондрий, увеличивает флуоресценцию родамин-123 в суспензии синапсосом. Таким образом, этот зонд отражает изменения $\Delta\Psi$ внутрисинапсосомальных митохондрий. Замещение глюкозы на БГБ в инкубационной среде приводит к деполяризации митохондрий по сравнению с контрольной глюкозосодержащей средой (рис. 3б). Сходную и даже более выраженную деполяризацию внутрисинапсосомальных митохондрий мы наблюдали при полном удалении глюкозы из инкубационной среды [7]. В то же время в среде, содержащей и глюкозу и кетоновые тела, наблюдается гиперполяризация

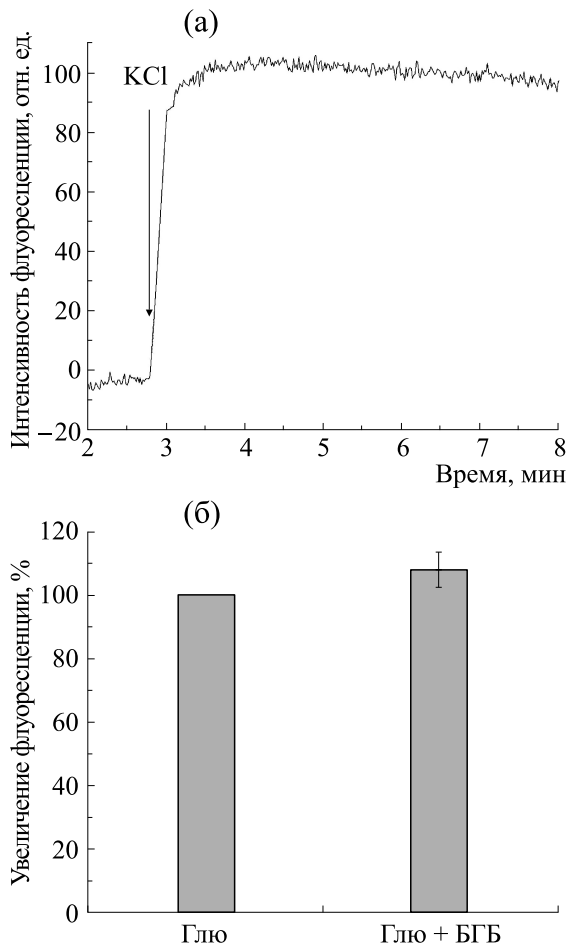


Рис. 2. Влияние различных энергетических субстратов на потенциал плазматической мембраны синапсом. (а) – Ответ флуоресцентного зонда DiSC3(5) в суспензии синапсом на калиевую деполяризацию; стрелкой отмечен момент ввода в кювету 150 мМ KCl. Представленная репрезентативная кривая отражает результаты шести независимых измерений. (б) – Влияние кетоновых тел на потенциал плазматической мембраны синапсом: Глю – инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, Глю + БГБ – инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы + 4 мМ БГБ. За 100% принято увеличение флуоресценции после добавки 150 мМ KCl за 4 мин в контрольной глюкозосодержащей среде. Представлены средние значения восьми экспериментов \pm стандартная ошибка среднего.

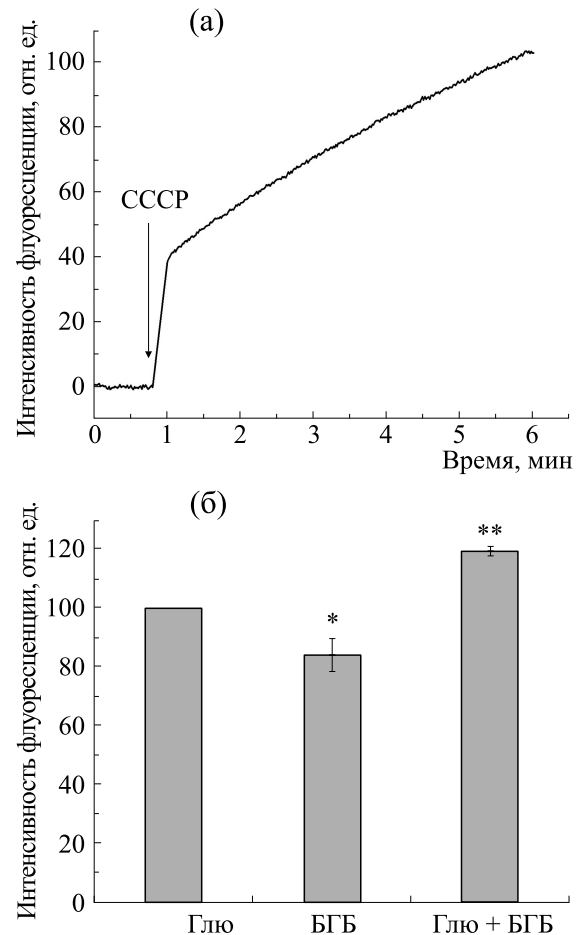


Рис. 3. Влияние различных энергетических субстратов на мембранный потенциал ($\Delta\Psi$) внутрисинапсоматальных митохондрий. (а) – Ответ флуоресцентного зонда родамин-123 в суспензии синапсом на протонный ионофор CCCP; стрелкой отмечен момент ввода в кювету 10 мкМ CCCP. Представленная репрезентативная кривая отражает результаты восьми независимых измерений. (б) – Влияние кетоновых тел на мембранный потенциал внутрисинапсоматальных митохондрий: Глю – инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, БГБ – инкубационная среда содержала 8 мМ БГБ, Глю + БГБ – инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы + 4 мМ БГБ. За 100% принято увеличение флуоресценции после добавки 10 мкМ CCCP за 4 мин в контрольной глюкозосодержащей среде. * – $P \leq 0,05$ по отношению к контролю (ответ на CCCP в контрольной глюкозосодержащей среде); ** – $P \leq 0,01$ по отношению к контролю (ответ на CCCP в контрольной глюкозосодержащей среде). Представлены средние значения 14 экспериментов \pm стандартная ошибка среднего.

(рис. 3б), связанная, вероятно, с дополнительным поступлением ацетильных групп в цикл Кребса. Таким образом, наши результаты показывают, что синаптические митохондрии могут использовать как глюкозу, так и кетоновые тела для поддержания мембранного потенциала. Однако последние являются менее эффективными энергетическими субстратами для синапсов.

Как известно, протондвижущая сила митохондрий ($\Delta\mu_{H^+}$) определяется мембранным потенциалом ($\Delta\Psi$) и pH-градиентом (ΔpH) [17]. Ранее мы показали, что в случае гипогликемии в синаптических митохондриях деполяризация (изменение $\Delta\Psi$) компенсируется увеличением ΔpH , что, вероятно, позволяет поддерживать $\Delta\mu_{H^+}$ на уров-

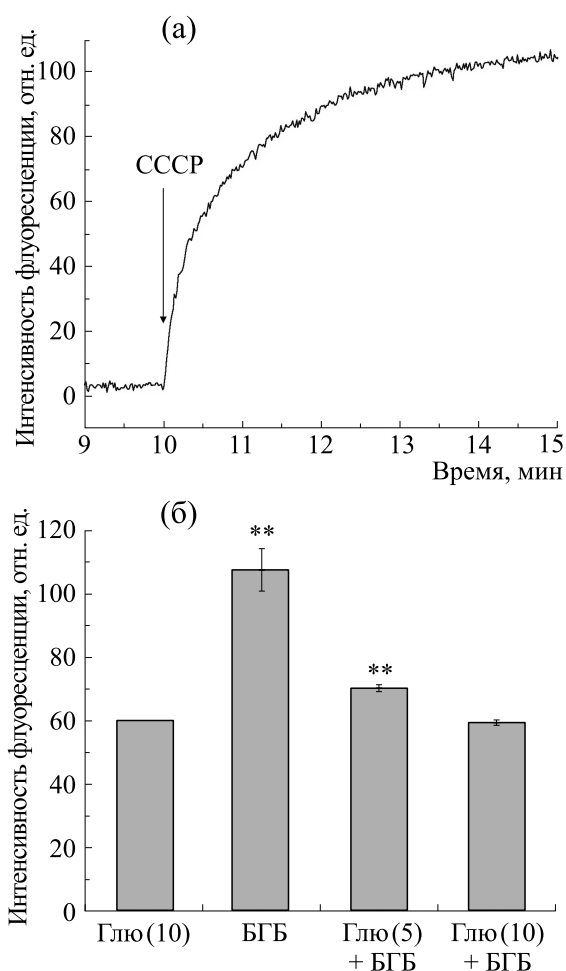


Рис. 4. Влияние различных энергетических субстратов на ΔpH внутрисинапсомальных митохондрий. (а) – Ответ флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый в суспензии синапсом на протонный ионофор СССР; стрелкой отмечен момент ввода в кювету 10 мкМ СССР. Представленная репрезентативная кривая отражает результаты восьми независимых измерений. (б) – Влияние кетоновых тел на ΔpH внутрисинапсомальных митохондрий: Глю – инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, БГБ – инкубационная среда содержала 8 мМ БГБ, Глю(5) + БГБ – инкубационная среда содержала 5 мМ глюкозы + 4 мМ БГБ, Глю(10) + БГБ – инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы + 4 мМ БГБ. За 100% принято увеличение флуоресценции после добавки 10 мкМ СССР за 5 мин в контрольной глюкозосодержащей среде. ** – $P \leq 0,01$ по отношению к контролю (ответ на СССР в контрольной глюкозосодержащей среде). Представлены средние значения 16 экспериментов \pm стандартная ошибка среднего.

не, необходимом для синтеза АТФ [7]. Молекулярная природа этого явления не ясна. Недавно было показано, что митохондриальный белок L-ОРА1 обеспечивает колебания рН митохондрий при изменениях $\Delta\Psi$ [18]. Вполне возможно, что сходный механизм задействован и при ком-

пенсаторном увеличении рН градиента в синаптических митохондриях при гипогликемии. Мы наблюдали также деполяризацию (изменение $\Delta\Psi$) при полной замене глюкозы на БГБ в инкубационной среде (рис. 3б). Остается неизвестным, компенсируется ли оно увеличением ΔpH .

Для оценки ΔpH мы использовали флуоресцентный зонд акридиновый оранжевый [7]. Это соединение концентрируется в кислых органеллах клетки, где флуоресценция зонда тушится. В пресинаптических окончаниях нейронов низкие значения рН наблюдаются в синаптических везикулах, митосомах и межмембранном пространстве митохондрий. При диссипации градиента происходит увеличение флуоресценции. Обычно предполагается, что в синапсоматах акридиновый оранжевый концентрируется исключительно в синаптических везикулах и поэтому он используется для оценки экзоцитоза и эндоцитоза [4,7,19]. В то же время мы показали, что флуоресценция этого зонда также может увеличиваться и в ответ на митохондриальные токсины [7]. Вероятно, его часть (по нашим оценкам в норме около 20% [4]) концентрируется в межмембранном пространстве внутрисинапсомальных митохондрий, где рН ниже цитозольного [7,20]. По оценкам, сделанным в работе [20], рН межмембранного пространства митохондрий составлял 6,88 при рН цитозоля 7,59. По нашим оценкам рН цитозоля синапсомата составляет 7,15 [21], что несколько ниже, чем в клетках ECV304, использованных в работе [20].

Рис. 4а показывает, что протонный ионофор СССР вызывает увеличение флуоресценции акридинового оранжевого. Следует отметить, что фактически это объединенный ответ митохондрий и синаптических везикул, так как СССР диссипирует также потенциал синаптических везикул [7,22]. В то же время ранее мы показали, что накопление акридинового оранжевого синаптическими везикулами при переходе синапсомата на кетоновые тела в качестве энергетического субстрата не изменяется [4]. Поэтому все изменения ответа на СССР в данном случае можно интерпретировать как изменения ΔpH митохондрий.

Рис. 4б показывает, что полная замена глюкозы на 8 мМ БГБ приводит к почти двукратному увеличению накоплению акридинового оранжевого в СССР-чувствительном пуле синапсомата. Это довольно выраженный эффект, однако в случае полной гипогликемии он был еще сильнее [7]. Добавление даже половины от концентрации глюкозы в контрольных экспериментах к БГБ-содержащей инкубационной среде приводит к значительному снижению СССР-чувствительного накопления акридинового оранжевого (рис. 3б). Нам не удалось обнаружить различий в

ΔpH внутрисинапсомальных митохондрий при их инкубации в средах, содержащих 10 мМ глюкозы или 10 мМ глюкозы + 4 мМ БГБ (рис. 3б). Таким образом, наши результаты показывают, что деполяризация митохондрий частично компенсируется увеличением ΔpH при переходе синапсом на использование кетоновых тел в качестве энергетического субстрата. Так как этот эффект блокировался добавлением глюкозы в БГБ-содержащую инкубационную среду, то можно предположить, что он связан именно с деполяризацией (изменением $\Delta\Psi$), а не влиянием кетоновых тел или продуктов его метаболизма на митохондрии.

В итоге в данной работе, в продолжение предыдущей [4], мы показали, что кетоновое тело БГБ приводит к следующим изменениям в синапсом:

Замена глюкозы на БГБ ведет к деполяризации митохондрий (изменению $\Delta\Psi$) и увеличению ΔpH митохондрий при сохранении неизменным потенциала плазматической мембраны. Добавление БГБ в глюкозосодержащую среду ведет к гиперполяризации митохондрии (изменению $\Delta\Psi$) при сохранении неизменными ΔpH митохондрий и потенциала плазматической мембраны.

Для изучения данных показателей мы использовали потенциал-чувствительные зонды DiSC3(5) и родамин-123, а также pH-чувствительный зонд акридиновый оранжевый. Специфичность ответа определялась не только специфичностью и даже не столько специфичностью зонда, сколько специфичностью стимула, позволяющего зондам освободиться из различных компартментов синапсом. Потенциал плазматической мембраны определяется калиевым равновесным потенциалом, и мы освобождали накопившийся DiSC3(5) с помощью высокой концентрации экстраклеточного калия. Митохондриальный потенциал определяется, согласно теории Митчелла, протонным градиентом, поэтому мы освобождали родамин-123 из внутрисинапсомальных митохондрий при помощи протонного ионофора СССР. Специфичность различных потенциалчувствительных зондов к различным компартментам клетки носит, безусловно, довольно относительный характер [23], тем не менее, было продемонстрировано преимущественное накопление родамина-123 в митохондриях [24].

Мы показали, что БГБ может использоваться пресинаптическими окончаниями нейронов в качестве энергетического субстрата. В то же время кетоновые тела в концентрациях, близким к тем, что наблюдаются при кетоновой диете, являются менее эффективными по сравнению с глюкозой и, вероятно, могут не полностью поддер-

живать все функции синапсов ([4], также см. рис. 2б в данной статье). Ранее уже высказывалось предположение, что кетоновые тела могут давать энергию для основных функций нейрона, но не так эффективны в поддержании синаптической трансмиссии, как глюкоза [25]. Таким образом, можно предположить, что «контролируемый гипометаболизм», возникающий при кетогенной диете в синапсах, способен обеспечивать энергией основные функции нейрона в покое, но не способен удовлетворить повышенные энергетические потребности, возникающие в синапсах при судорогах [26,27], что может приводить к прекращению неконтролируемого освобождения нейромедиаторов с последующим выходом из эпилептического припадка.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б17-006).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. B. Gano, M. Patel, and J. M. Rho, *J. Lipid Res.* **55**, 2211 (2014).
2. S. V. Hrynevich, T. V. Waseem, and S. V. Fedorovich, *Int. J. Neurol. Res.* **2**, 285 (2016).
3. L. B. Achanta and C. D. Rae, *Neurochem. Res.* **42**, 35 (2017).
4. S. V. Hrynevich, T. V. Waseem, A. Hebert, et al., *Neurochem. Int.* **93**, 73 (2016).
5. C. D. Holmgren, M. Mukhtarov, A. E. Malkov, et al., *J. Neurochem.* **112**, 900 (2010).
6. M. C. McKenna, J. T. Tildon, J. H. Stevenson, et al., *Dev. Neurosci.* **15**, 320 (1993).
7. S. V. Hrynevich, T. G. Pekun, T. V. Waseem, et al., *Neurochem. Res.* **40**, 1188 (2015).
8. B. G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt, et al., *Science* **344**, 1023 (2014).
9. T. V. Waseem and S. V. Fedorovich, *Neurochem. Res.* **35**, 1188 (2010).
10. A. V. Alekseenko, V. V. Lemeshchenko, T. G. Pekun, et al., *Neurosci. Lett.* **513**, 238 (2012).
11. F. Hajos, *Brain Res.* **93**, 485 (1975).
12. S. B. Hladky and T. J. Rink, *J. Physiol.* **263**, 287 (1976).
13. O. Lowry, H. Rosenbrough, H. Farr, et al., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
14. E. N. Dedkova and L. A. Blatter, *Front. Physiol.* **5**, 260 (2014).
15. Y. C. Tsai, Y. C. Chou, A. B. Wu, et al., *Life Sci.* **78**, 1385 (2006).
16. M. P. Blaustein and J. M. Goldring, *J. Physiol.* **247**, 589 (1975).
17. R. Rizzuto, D. De Stefani, A. Raffaello, et al., *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **13**, 566 (2012).
18. M. Rosselin, J. Santo-Domingo, F. Bermont, et al., *EMBO Rep.* **18**, 451 (2017).
19. F. Zoccarato, L. Cavallini, and A. Alexandre, *J. Neurochem.* **72**, 625 (1999).

20. A. M. Porcelli, A. Ghelli, C. Zanna, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **326**, 799 (2005).
21. T. G. Pekun, V. V. Lemeshchenko, T. I. Lyskova, et al., *J. Mol. Neurosci.* **57**, 454 (2013).
22. J. W. Hell, P. R. Maycox, and R. Jahn, *J. Biol. Chem.* **265**, 2111 (1990).
23. Т. Г. Пекун, Т. В. Васим и С. В. Федорович, *Биофизика* **59**, 100 (2014).
24. L. V. Johnson, M. L. Walsh, and L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 990 (1991).
25. T. Arakawa, T. Goto, and Y. Okada, *Neurosci. Lett.* **130**, 53 (1991).
26. V. Rangaraju, N. Calloway, and T. A. Ryan, *Cell* **156**, 825 (2014).
27. G. Zsurka and W.S. Kunz, *Lancet Neurol.* **14**, 956 (2015).

The Combined Influence of Glucose and β -Hydroxybutyrate on Membrane Potential of Intrasyntosomal Mitochondria

T.G. Dubouskaya, S.V. Hrynevich, and S.V. Fedorovich

*Institute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
ul. Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072, Belarus*

A ketogenic diet is used as a treatment for different brain diseases. This diet aims to replace carbohydrates with fat throughout the day so ketone bodies, the predominant one is β -hydroxybutyrate, are produced. The mechanism of the protective effect of the ketonic diet remains poorly studied. We investigate the combined influence of glucose and β -hydroxybutyrate on synaptosomal plasma and mitochondrial membrane potentials. We have shown that the presence of ketone bodies in a glucose-containing incubation medium causes no alterations in synaptosomal plasma membrane potential as it was previously demonstrated for the neuronal plasma membrane. It has been found that mitochondrial depolarization ($\Delta\Psi$ changes) occurs during incubation of synaptosomes in the medium only with β -hydroxybutyrate. In contrast, the presence of ketone body in the glucose-containing incubation medium leads to mitochondria hyperpolarization. The observed depolarization is partially compensated by mitochondrial ΔpH increase induced by mitochondrial depolarization but not because of the presence of β -hydroxybutyrate. We have shown that ketone bodies can be used by synapses as energetic substrates, but β -hydroxybutyrate used as an energy source is less effective than glucose.

Keywords: synaptosomes, ketogenic diet, ketone bodies, mitochondria, membrane potential, synapse