

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о способности рЛФ инициировать увеличение концентрации кальция в цитозоле нейтрофилов с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых функциональных ответов нейтрофилов.

Работа поддержана грантом президента РФ МК-5074.2016.4.

Литература

1. Ward, P.P. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview / P.P. Ward, E. Paz, O.M. Conneely // Cell Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2540-2548.
2. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview / I.A. García-Montoya [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1820. – P. 226-236.
3. Expression of lactoferrin on human granulocytes: analysis with polyclonal and monoclonal antibodies / A. Afeltra [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1997. – Vol. 109, № 2. – P. 279-285.
4. Timoshenko, A.V. Lectin-triggered superoxide/ H_2O_2 and granule enzyme release from cells / A.V. Timoshenko, K. Kayser, H.J. Gabius // Methods Mol. Med. – 1998. – Vol. 9. – P. 441-451.
5. Grynkiewicz, G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 6. – P. 3440-3450.
6. Studies of the ceruloplasmin-lactoferrin complex / M.O. Pulina [et al.] // Biochem. Cell. Biol. – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 35-39.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИНАПСОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Гриневич С.В., Федорович С.В., Васим Т.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, Минск, Беларусь

Головной мозг является очень затратным органом с точки зрения биоэнергетики. У человека, он, составляя 2 % от веса, потребляет около 20 % всех калорий, поступающих с пищей. Энергия тратится на активный ионный транспорт. Это, прежде всего, поддержание потенциала покоя, проведение потенциала действия и восстановление потенциала покоя после потенциала действия. Значительная часть энергетических затрат приходится на синаптическую трансмиссию.

Электрические сигналы переходят от одного нейрона к другому с помощью специальных веществ нейромедиаторов. Нейромедиаторы хранятся в синаптических везикулах, которые сливаются с плазматической мембраной при увеличении концентрации кальция в цитозоле пресинаптического окончания. Этот процесс называется экзоцитозом. Экзоцитоз является частью достаточно сложного цикла синаптических везикул, включающего в себя также докинг, прайминг и компенсаторный эндоцитоз. Некоторые стадии цикла синаптических везикул, например, прайминг и эндоцитоз являются энергозависимыми. Загрузка синаптических везикул нейромедиаторами также зависит от уровня АТФ. В то же время остается неизвестным, как влияет изменение метаболического статуса синапсов (короткие эпизоды гипогликемии, переход на негликолитические энергетические субстраты, сверхвысокие концентрации кетоновых тел, наблюдаемые при диабетическом кетоацидозе, кетогенная диета) на различные стадии данного цикла.

Мы изучили два метаболические воздействия. В качестве патологии мы взяли гипогликемию, в качестве потенциальной метаболической терапии – кетогенную диету.

В работе мы использовали синаптосомы головного мозга крыс, изолированные пресинаптические окончания нейронов, сохраняющие основные показатели интактных терминалей.

Гипогликемия может вести к гибели нейронов, по своим свойствам напоминающую глутамат-индуцированную. В данной работе мы изучили влияние удаления глюкозы из среды на потенциалы плазматической мембраны и митохондрий в синаптосомах мозга крыс с помощью флуоресцентных зондов DiSC3(5) и JC-1. Также нами было изучены рН градиент синаптических везикул и динамика синаптических везикул с помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый.

Нами показано, что удаление глюкозы из среды приводит к ингибированию K^+ -индуцированного Ca^{2+} -зависимого экзоцитоза и снижению некоторых мембранных потенциалов. По своей чувствительности они расположились в следующем порядке митохондриальный потенциал > потенциал плазматической мембраны > рН градиент синаптических везикул. Причем последний показатель не изменялся по сравнению с контролем. Мы также показали, что гипогликемия приводит к значительному увеличению рН градиента митохондрий [1].

В то же время падение потенциала внутрисинаптосомальных митохондрий может приводить к нарушению внутриклеточной сигнализации, так как эти органеллы являются депо для внутриклеточного кальция. По-

этому мы изучили буферную емкость митохондрий для кальция при гипогликемии с помощью флуоресцентного зонда Rhod-2 AM. Мы показали, что калиевая деполяризация и тапсигаргин приводит к увеличению интенсивности флуоресценции этого зонда. Таким образом, Rhod-2 AM можно использовать для оценки захвата кальция внутрисинапсомальными митохондриями. В то же время ответ на калий был одинаковым, как в контроле, так и при удалении глюкозы из среды. Этот результат показывает, что гипогликемия не влияет на захват кальция внутрисинапсомальными митохондриями.

Биофизические параметры пресинаптического окончания не благоприятствуют избыточному неконтролируемому освобождению глутамата при гипогликемии. В качестве компенсаторных механизмов можно предложить увеличение pH градиента митохондрий, сохранность pH градиента синаптических везикул и ингибирование экзоцитоза [1].

Для лечения различных заболеваний мозга, прежде всего эпилепсии и болезни Альцгеймера, используется кетогенная диета. Принцип этого метода состоит в замене углеводов на жиры в ежедневном питании, что приводит к росту содержания кетонных тел, прежде всего бета-гидроксибутирата и ацетоацетата в крови. Несмотря на клиническое использование метода, механизм действия кетогенной диеты во многом остается непонятным.

Мы изучили действие замены глюкозы на бета-гидроксибутират в инкубационной среде на цикл синаптических везикул в синапсосах мозга крыс. На первом этапе мы убедились с помощью флуоресцентного зонда DiSC3(5), что переход на негликолитические энергетические субстраты не влияет на потенциал плазматической мембраны. С помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый мы показали, что замена глюкозы на бета-гидроксибутират в инкубационной среде сохраняет цикл синаптических везикул, но кетонные тела способны модифицировать его. Происходит некоторое увеличение экзоцитоза и ингибирование эндоцитоза. Поддерживаемый кетонными телами экзоцитоз был чувствителен к ингибитору транспортера монокарбоксилатов – альфа-циано-4-гидроксициннамоновой кислоте. Просто добавление бета-гидроксибутирата в глюкозо-содержащую среду не влияет на эндоцитоз, замена глюкозы на пирuvat приводит к такому же ингибированию, как и замена на кетонные тела. Ингибирование эндоцитоза также было подтверждено с помощью флуоресцентного зонда FM2-10. С помощью флуоресцентного зонда акридиновый оранжевый в синапсосах было показано, что переход на кетонные тела не влияет на pH градиент синаптических везикул [2].

Захват синапсосомами кетоновых тел и пирувата может приводить к закислению цитозоля как минимум по двум причинам. Во-первых, эти вещества являются кислотами, во-вторых, транспорт монокарбоксилатов через плазматическую мембрану сопряжен с захватом протонов. Поэтому мы изучили влияние замены глюкозы на бета-гидроксибутират или пируват в инкубационной среде с помощью флуоресцентного зонда BCECF-AM. Вопреки ожиданиям, такое воздействие не привело к существенным изменениям pH_i.

Таким образом, негликолитические энергетические субстраты бета-гидроксибутират и пируват способны поддерживать цикл синаптических везикул, но они модифицируют его, ингибируя эндоцитоз. Ингибирование эндоцитоза может быть одним из механизмов антисудорожного действия кетогенной диеты [2].

Литература

1. Hrynevich, S.V. Influence of glucose deprivation on membrane potentials of plasma membranes, mitochondria and synaptic vesicles in rat brain synaptosomes / S.V. Hrynevich [et al.] // *Neurochem. Res* – 2015. – Vol. 40. – P. 1188-1196.
2. Hrynevich S.V. β -hydroxybutirate supports synaptic vesicle cycling but reduces endocytosis and exocytosis in rat brain synaptosomes / S.V. Hrynevich [et al.] // *Neurochem. Int.* – 2016. – Т. 93. – P. 73-81.

РЕАКЦИЯ НЕЙТРОФИЛОВ НА УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ В КРОВИ *EX VIVO*

Гусев А.А.¹, Гусев С.А.¹, Власова И.И.¹, Басырева Л.Ю.¹,
Балабушевич Н.Г.², Федоркова М.В.¹, Михальчик Е.В.¹

¹ *ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия*

² *МГУ им М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия*

Углеродные нанотрубки рассматривают в качестве перспективного средства доставки лекарственных препаратов, основы для создания биосенсоров и тканевой инженерии. Для предотвращения побочных эффектов необходима оценка взаимодействия нанотрубок с различными компонентами крови. Ранее было показано, что однослойные углеродные нанотрубки (ОУНТ) вызывают активацию тромбоцитов в крови *ex vivo*, приводящую к появлению агрегатов тромбоцитов и повышение свертываемости