

УДК 577.352.4

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ pH-ГРАДИЕНТА МИТОХОНДРИЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА КРЫС

С. В. ГРИНЕВИЧ¹⁾, С. В. ФЕДОРОВИЧ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Изменение метаболизма может влиять на различные трансмембранные потенциалы синаптических митохондрий и антиоксидантные системы защиты клетки. Изучено влияние таких процессов, как удаление глюкозы из инкубационной среды и замена глюкозы на кетоновое тело β -гидроксибутират (БГБ) в количестве 8 ммоль/л, на pH-градиент митохондрий, образование свободных радикалов и уровень восстановленного глутатиона в синаптосомах мозга крыс. Установлено, что замена в инкубационной среде глюкозы на БГБ приводит к повышению митохондриального захвата флуоресцентного зонда акридинового оранжевого, отражающему увеличение pH-градиента митохондрий. В то же время это воздействие не повлияло на уровень флуоресценции зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата, что свидетельствует об отсутствии изменений в образовании свободных радикалов. Также БГБ был неэффективен в качестве антиоксиданта при окислительном стрессе, вызванном внесением в инкубационную среду 1 ммоль/л пероксида водорода или экстраклеточным закислением до уровня pH 6,0. Полное удаление глюкозы из инкубационной среды вызвало небольшое, но статистически достоверное увеличение пула восстановленного глутатиона. Ингибитор пентозофосфатного шунта – 6-аминоникотинамид (1 ммоль/л) – вызвал парадоксальное увеличение содержания восстановленного глутатиона. Сделан вывод о том, что изменение метаболического статуса синаптосом может повлиять на pH-градиент синаптических митохондрий и уровень восстановленного глутатиона.

Образец цитирования:

Гриневич СВ, Федорович СВ. Метаболическая регуляция pH-градиента митохондрий и окислительного стресса в синаптосомах мозга крыс. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2025;2:36–43.
EDN: OHNTEL

For citation:

Hrynevich SV, Fedorovich SV. Metabolic regulation of mitochondrial pH gradient and oxidative stress in rat brain synaptosomes. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2025;2:36–43. Russian.
EDN: OHNTEL

Авторы:

Светлана Владимировна Гриневич – кандидат биологических наук; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Сергей Викторович Федорович – кандидат биологических наук; доцент кафедры биохимии биологического факультета.

Authors:

Svetlana V. Hrynevich, PhD (biology); associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

svetlana14grinevich@gmail.com

Sergey V. Fedorovich, PhD (biology); associate professor at the department of biochemistry, faculty of biology.

fedorovich@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0003-4474-1954>

Ключевые слова: синапс; синапсосома; митохондрия; свободный радикал; кетогенная диета; гипогликемия.

Благодарность. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19-01) и Белорусского государственного университета (грант ректора на имя С. В. Федоровича).

METABOLIC REGULATION OF MITOCHONDRIAL pH GRADIENT AND OXIDATIVE STRESS IN RAT BRAIN SYNAPTOSOMES

S. V. HRYNEVICH^a, S. V. FEDOROVICH^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: S. V. Fedorovich (fedorovich@bsu.by)

Abstract. Metabolic changes may affect different transmembrane potentials of synaptic mitochondria and antioxidant cell defence systems. The influence of processes such as the glucose withdrawing from the incubation medium and its replacing with the ketone body β -hydroxybutyrate (BHB) at a concentration of 8 mmol/L on mitochondrial pH gradient, the formation of free radicals and the reduced glutathione level in rat brain synaptosomes was studied. It was established that replacing glucose with BHB in the incubation medium leads to an enhancement of mitochondrial uptake of the acridine orange fluorescent probe that reflect an increase in the mitochondrial pH gradient. At the same time, this effect did not affect the fluorescence level of the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate probe that indicate no changes in the formation of free radicals. Also BHB was ineffective as an antioxidant against oxidative stress induced by the addition to the incubation medium of 1 mmol/L hydrogen peroxide or extracellular acidification to the pH level of 6.0. Complete withdrawing of glucose from the incubation medium caused a small but statistically significant increase of reduced glutathione pool. The pentose phosphate pathway inhibitor 6-aminocotinamide (1 mmol/L) caused a paradoxical increase of reduced glutathione content. It was concluded that changes in the metabolic status of synaptosomes can affect the synaptic mitochondrial pH gradient and the reduced glutathione level.

Keywords: synapse; synaptosome; mitochondrion; free radical; ketogenic diet; hypoglycemia.

Acknowledgements. This work was carried out with financial support from the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. B19-01) and Belarusian State University (rector's grant (S. V. Fedorovich)).

Введение

Патогенез многих заболеваний центральной нервной системы связан с повреждением синапсов [1–4], причиной чего может быть нарушение метаболизма [2]. Возможен и обратный вариант, когда метаболическая терапия используется для лечения различных патологических состояний головного мозга [2; 5; 6]. В то же время неизвестно, как именно метаболические изменения приводят к нарушению либо улучшению синаптической трансмиссии.

Важным регулятором синаптической трансмиссии выступают митохондрии [7; 8]. Ранее нами было показано, что полное удаление глюкозы из инкубационной среды, являющейся моделью гипогликемии, приводит к уменьшению электрического потенциала внутренних мембран внутрисинапсомальных митохондрий и компенсаторному увеличению их рН-градиента [9]. Остается неизвестным, приведет ли замена глюкозы на другой энергетический субстрат, например на пируват или кетоновое тело β -гидроксibuтират (БГБ), к такому же увеличению рН-градиента синаптических митохондрий.

Для лечения различных заболеваний центральной нервной системы используется кетогенная диета. Она предполагает замещение углеводов на жиры в ежедневном рационе больных, что приводит к синтезу кетонных тел [2; 5; 6; 10]. К кетонным телам относят упомянутый выше БГБ, ацетоацетат и ацетон. В норме уровень кетонных тел составляет 0,1 ммоль/л, при нескольких часах голодания он поднимается до 1,0 ммоль/л, а при длительном голодании или соблюдении кетогенной диеты могут достигаться значения 5,0–8,0 ммоль/л [11; 12]. Одной из наиболее распространенных гипотез, объясняющих нейропротекторные свойства кетогенной диеты, является предположение о том, что ее соблюдение приводит к уменьшению накопления свободных радикалов [6; 13]. В то же время не установлено, обладают ли кетонные тела антиоксидантными свойствами на уровне пресинаптического окончания.

В антиоксидантной защите клетки важную роль играют глутатионпероксидаза и используемый этим ферментом восстановленный глутатион [14; 15]. Восстановление глутатиона осуществляется при помощи глутатионредуктазы и НАДФН [16]. Основным путем восстановления НАДФ в нейроне является пентозо-

фосфатный шунт [17]. При некоторых патологических состояниях организма, например при сахарном диабете, может наблюдаться уменьшение содержания глюкозы в плазме, цереброспинальной жидкости, крови [18]. Неизвестно, оказывает ли влияние гипогликемия, при которой пентозофосфатный шунт перестает работать по причине отсутствия субстрата, на содержание восстановленного глутатиона в нейронах.

Основным объектом исследования выступили изолированные пресинаптические окончания нейронов головного мозга – синапсосомы. Они являются способными к освобождению нейромедиаторов и экзоцитозу, имеют тот же протеом, что и интактные терминали [9; 19; 20].

Следует отметить, что pH-градиент внутрисинапсосомальных митохондрий определялся по СССР-чувствительному захвату акридинового оранжевого [9]. Образование свободных радикалов в синапсосомах выявлялось с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (DCFDA) [21]. Уровень восстановленного глутатиона в синапсосомах устанавливался с помощью флуоресцентного зонда монохлорбимана [22].

Материалы и методы исследования

В работе использовались следующие реактивы: акридиновый оранжевый, DCFDA, монохлорбиман, БГБ, 6-аминоникотинамид, карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (СССР), 1-хлор-2,4-динитробензол (ХДНБ) (*Sigma*, США). Все остальные реактивы имеют квалификацию не ниже «о. с. ч.».

Получение синапсосом. Синапсосомы изолировали из полушарий мозга крыс дифференциальным центрифугированием по методу Хайоша [23]. Полученный осадок суспендировали в инкубационной среде следующего ионного состава: NaCl – 132,0 ммоль/л; KCl – 5,0 ммоль/л; MgCl₂ – 1,3 ммоль/л; NaH₂PO₄ – 1,2 ммоль/л; глюкоза – 10,0 ммоль/л (уровень pH 7,4 фиксировался с помощью буфера HEPES (15,0 ммоль/л)). При регистрации флуоресценции в инкубационную среду добавляли 1 ммоль/л CaCl₂. Суспензию синапсосом (10–20 мг/мл белка) предынкубировали 30 мин при температуре 37 °С, после чего синапсосомы ставили на лед и использовали в экспериментах в течение 3 ч. В экспериментах по изучению действия кетоновых тел либо дополнительно вносили в инкубационную среду 8 ммоль/л БГБ, либо замещали глюкозу БГБ в количестве 8 ммоль/л. В обоих случаях синапсосомы инкубировались 30 мин при температуре 37 °С перед измерением флуоресценции. При экспериментальном моделировании гипогликемии синапсосомы инкубировались в инкубационной среде без глюкозы 30 мин при температуре 37 °С перед измерением флуоресценции.

Определение pH-градиента митохондрий. Определение pH-градиента внутрисинапсосомальных митохондрий проводили по СССР-чувствительному накоплению флуоресцентного зонда акридинового оранжевого [9]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (*Varian*, США) при постоянном помешивании в термостатируемой кювете (37 °С) при $\lambda_{\text{возб}} = 494$ нм и $\lambda_{\text{рег}} = 529$ нм.

В 1,8 мл инкубационной среды А, содержащей 2 ммоль/л CaCl₂, добавляли 200,0 мкл суспензии синапсосом до конечной концентрации белка 1 мг/мл. Через 50 с после начала регистрации сигнала вносили 5 мкмоль/л акридинового оранжевого, на 10 мин вносили 10 мкмоль/л СССР.

Определение накопления свободных радикалов в синапсосомах. Для определения образования свободных радикалов в синапсосомах использовали флуоресцентный зонд DCFDA [21; 24]. К суспензии синапсосом (15–20 мг/мл белка) добавляли флуоресцентный зонд DCFDA до конечной концентрации 25 мкмоль/л и инкубировали 60 мин при температуре 37 °С. Загруженные синапсосомы однократно отмывали в десятикратном объеме инкубационной среды А. Осадок суспендировали в 2,0–2,5 мл инкубационной среды и использовали в экспериментах.

Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse при постоянном помешивании в термостатируемой кювете (37 °С) при $\lambda_{\text{возб}} = 501$ нм и $\lambda_{\text{рег}} = 525$ нм.

В 1,8 мл инкубационной среды А, содержащей 2 ммоль/л CaCl₂, добавляли 200,0 мкл суспензии синапсосом до конечной концентрации белка 1 мг/мл. Через 50 с после начала регистрации сигнала вносили 60 мкл HCl (до уровня pH 6,0) или 1 ммоль/л H₂O₂. В контрольном эксперименте в термостатируемую кювету добавляли аналогичное количество воды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную кривую.

Определение уровня восстановленного глутатиона. Уровень восстановленного глутатиона определялся с помощью флуоресцентного зонда монохлорбимана [22; 25]. Аликвоты суспензии синапсосом (200 мкл) добавлялись в соответствующую инкубационную среду (800 мкл) и инкубировались 30 мин при температуре 37 °С. Далее синапсосомы были седиментированы центрифугированием и ресуспендированы в 1 мл инкубационной среды, содержащей 50 мкмоль/л монохлорбимана. Пробы инкубировались 40 мин при комнатной температуре. Реакция останавливалась переносом проб на лед и быстрым центрифугированием. Далее осадок был снова ресуспендирован в 2 мл инкубационной среды и его флуоресценция была измерена на спектрофлуориметре Cary Eclipse при $\lambda_{\text{возб}} = 383$ нм и $\lambda_{\text{рег}} = 485$ нм.

Белок определяли с помощью метода Лоури [26] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 отражено, что добавление CCCP приводит к увеличению флуоресценции акридинового оранжевого. Ранее нами было показано, что этот прирост связан с освобождением и последующим увеличением флуоресценции зонда из митохондриального пула и синаптических везикул [9].

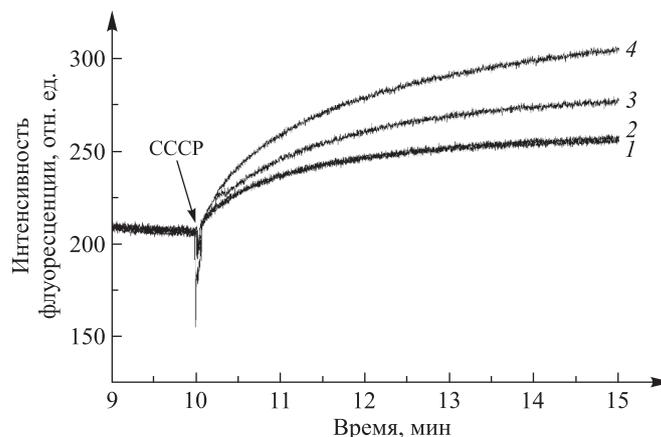


Рис. 1. Влияние БГБ на захват акридинового оранжевого внутрисинапсомальными митохондриями.

В указанное время в термостатируемую кювету было внесено 10 мкмоль/л CCCP.

Кривые отражают результаты 4 независимых экспериментов:

- 1 – контроль; 2 – замена в инкубационной среде глюкозы на пируват в количестве 4 ммоль/л;
- 3 – добавление в глюкозосодержащую (10 ммоль/л) инкубационную среду 4 ммоль/л БГБ;
- 4 – замена в инкубационной среде глюкозы на БГБ в количестве 8 ммоль/л

Fig. 1. The influence of BHB on acridine orange uptake by intrasynaptosomal mitochondria.

At the specified time, 10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP was added to the thermostated cuvette.

The curves represent the results of 4 independent experiments:

- 1 – control; 2 – replacement in the incubation medium of glucose with pyruvate in an amount of 4 mmol/L;
- 3 – addition to the glucose-containing (10 mmol/L) incubation medium 4 mmol/L BHB;
- 4 – replacement in the incubation medium of glucose with BHB in an amount of 8 mmol/L

Замещение глюкозы пируватом, являющимся эффективным энергетическим субстратом для синапсом [27], не повлияло на увеличение флуоресценции акридинового оранжевого (см. рис. 1). В то же время замена глюкозы на БГБ привела к стимуляции накопления флуоресценции зонда в кислых компартментах. В эксперименте было использовано 8 ммоль/л DL- β -гидроксибутирата как репрезентативного кетонного тела. Следует отметить, что в клетках может усваиваться только D-изомер, поэтому ожидалось, что около 50 % экзогенного БГБ утилизируется в ходе эксперимента [28]. Ранее нами было установлено, что аналогичное воздействие не влияло на накопление акридинового оранжевого, чувствительного к бафиломицину – ингибитору АТФазы синаптических везикул [29]. Таким образом, дополнительный прирост флуоресценции в случае с БГБ связан с аккумуляцией акридинового оранжевого в митохондриях. Следует отметить, что добавление БГБ в глюкозосодержащую среду вызвало сходный, хотя и менее выраженный эффект (см. рис. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что замена глюкозы на БГБ или добавление БГБ в инкубационную среду приводят к увеличению рН-градиента внутрисинапсомальных митохондрий.

Ранее нами было показано, что гипогликемия и последующий энергетический дефицит обуславливают компенсаторное увеличение рН-градиента при снижении электрического потенциала внутренних мембран внутрисинапсомальных митохондрий [9]. Данные рис. 1 свидетельствуют о том, что таким же действием обладают замена глюкозы на БГБ (но не на пируват) и дополнительное внесение БГБ в инкубационную среду. Известно, что БГБ может использоваться синапсомами в виде энергетического субстрата [29; 30]. Таким образом, кроме энергетического дефицита, дополнительным фактором, активирующим компенсаторное увеличение рН-градиента, может являться высокая цитозольная концентрация кетонных тел. При физиологических условиях основной причиной повышения содержания кетонных тел, в том числе БГБ, в плазме крови представляется голодание [5; 6; 13]. Можно предположить, что в этом случае увеличение рН-градиента синаптических митохондрий, потенциально приводящее к интенсификации синтеза АТФ, является также компенсаторным, позволяющим клетке приспособиться к голоду на уровне организма.

Для изучения окислительного стресса использовались две модели. Первая модель – внесение в инкубационную среду 1 ммоль/л пероксида водорода, являющегося классическим прооксидантом [24]. Вторая модель – снижение экстраклеточного уровня рН до 6,0. Ранее было показано, что такое воздействие приводит к окислительному стрессу за счет протонирования супероксид-анион-радикала и активации ре-

цептора OGR1 (*ovarian cancer G protein-coupled receptor 1*) на плазматической мембране с последующим синтезом супероксид-аниона в электрон-транспортной цепи митохондрий [31; 32]. На рис. 2 отражено, что БГБ, в отличие от ионола (200 мкмоль/л) и аскорбиновой кислоты (500 мкмоль/л) – классических антиоксидантов, не проявляет защитного действия ни в одной из изученных моделей. Кроме того, БГБ был неэффективен и в снижении базального уровня свободных радикалов.

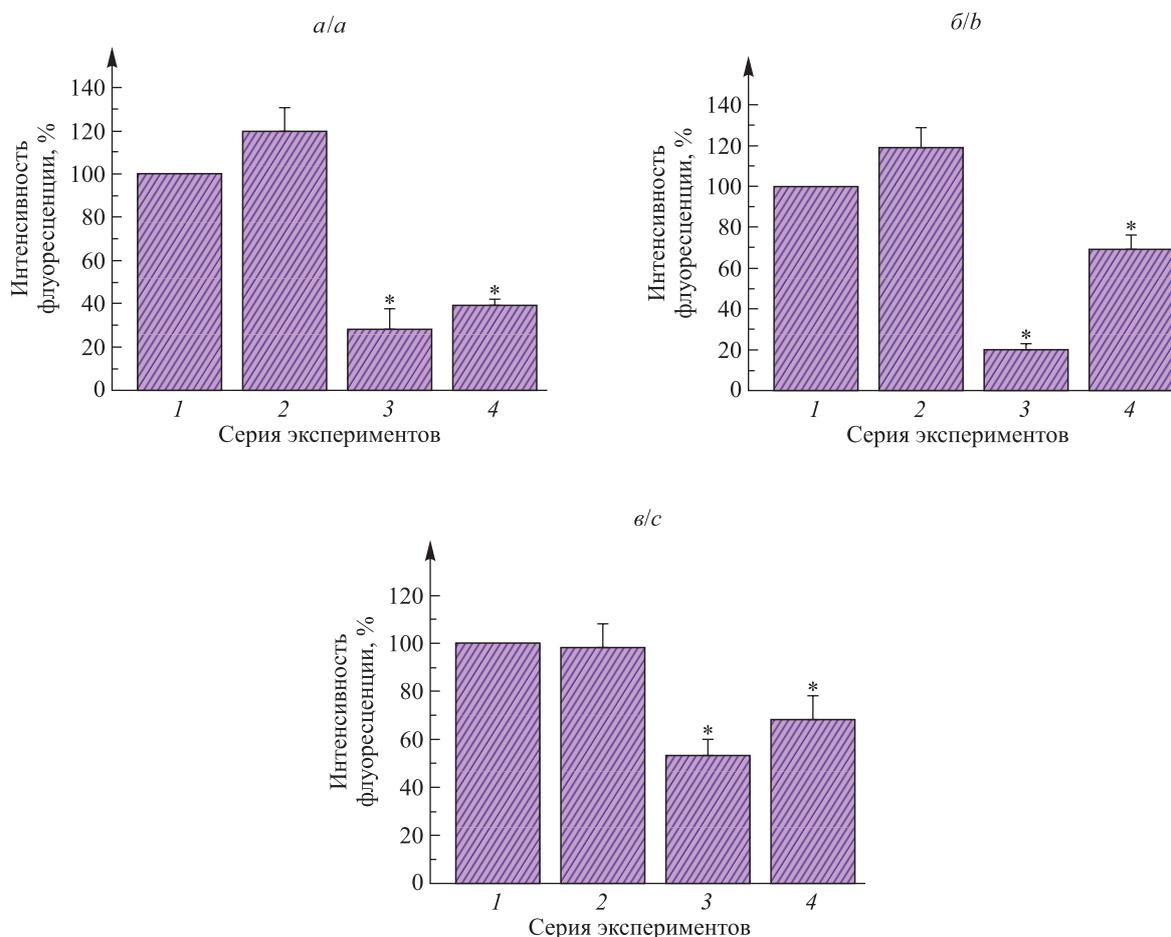


Рис. 2. Влияние БГБ на базальный уровень флуоресценции DCFDA (а) и прирост флуоресценции DCFDA, индуцированный внесением в инкубационную среду 1 ммоль/л пероксида водорода (б) или снижением экстраклеточного уровня pH до 6,0 (в): 1 – контроль; 2 – предынкубация синапсом в течение 30 мин при температуре 37 °С с БГБ в количестве 8 ммоль/л (при измерении флуоресценции инкубационная среда также содержала 8 ммоль/л БГБ); 3 – предынкубация синапсом в течение 30 мин при температуре 37 °С с ионолом в количестве 200 мкмоль/л (при измерении флуоресценции инкубационная среда также содержала 200 мкмоль/л ионола); 4 – предынкубация синапсом в течение 30 мин при температуре 37 °С с аскорбиновой кислотой в количестве 500 мкмоль/л (при измерении флуоресценции инкубационная среда также содержала 500 мкмоль/л аскорбиновой кислоты). За 100 % принята флуоресценция в контрольных условиях. В серии с БГБ представлены средние значения 12 экспериментов и ошибка средней величины ($\pm Sx$), в сериях с ионолом и аскорбиновой кислотой – средние значения 8 экспериментов и ошибка средней величины ($\pm Sx$). Знаком * отмечены статистически значимые различия по отношению к уровню 100 % при $p \leq 0,01$

Fig. 2. The influence of BHB on basal level of DCFDA fluorescence (a) and the increase of DCFDA fluorescence induced by the addition of 1 mmol/L hydrogen peroxide to the incubation medium (b) or lowering the extracellular level of pH to 6.0 (c): 1 – control; 2 – preincubation of synaptosomes for 30 min at temperature 37 °C with BHB in an amount of 8 mmol/L (during fluorescence measurement, the incubation medium also contained 8 mmol/L BHB); 3 – preincubation of synaptosomes for 30 min at temperature 37 °C with ionol in an amount of 200 μ mol/L (during fluorescence measurement, the incubation medium also contained 200 μ mol/L ionol); 4 – preincubation of synaptosomes for 30 min at temperature 37 °C with ascorbic acid in an amount of 500 μ mol/L (during fluorescence measurement, the incubation medium also contained 500 μ mol/L ascorbic acid). The 100 % level corresponds the fluorescence in control conditions. The series with BHB presents the average values of 12 experiments and the standard error of the mean ($\pm Sx$), the series with ionol and ascorbic acid present the average values of 8 experiments and the standard error of the mean ($\pm Sx$). Sign * marked statistically significant differences in relation to level 100 % at $p \leq 0.01$

Эксперименты продемонстрировали, что проявление защитного действия со стороны БГБ в различных моделях нейродегенеративных заболеваний связано прежде всего с увеличением экспрессии антиоксидантных ферментов, как это было показано в работе [33], а не с химическими свойствами молекул кетонных тел.

Для изучения пула восстановленного глутатиона в синапсосах в качестве положительного контроля использовался ХДНБ. Это соединение уменьшило флуоресценцию монохлорбимана (рис. 3), что свидетельствует об истощении глутатиона [25]. Удаление глюкозы из инкубационной среды также снизило флуоресценцию зонда на 5 %. Хотя это изменение имело небольшую амплитуду, оно было статистически достоверным ($p \leq 0,01$). Ингибитор пентозофосфатного шунта – 6-аминоникотинамид – парадоксально увеличил содержание восстановленного глутатиона в синапсосах (см. рис. 3). Используемой концентрации 6-аминоникотинамида (1 ммоль/л) было достаточно для полного ингибирования пентозофосфатного шунта [34]. Можно предположить, что в синапсах нейронов есть резервные метаболические пути, поддерживающие уровни восстановленного глутатиона и (или) восстановленного НАДФ даже в условиях ингибирования пентозофосфатного шунта.

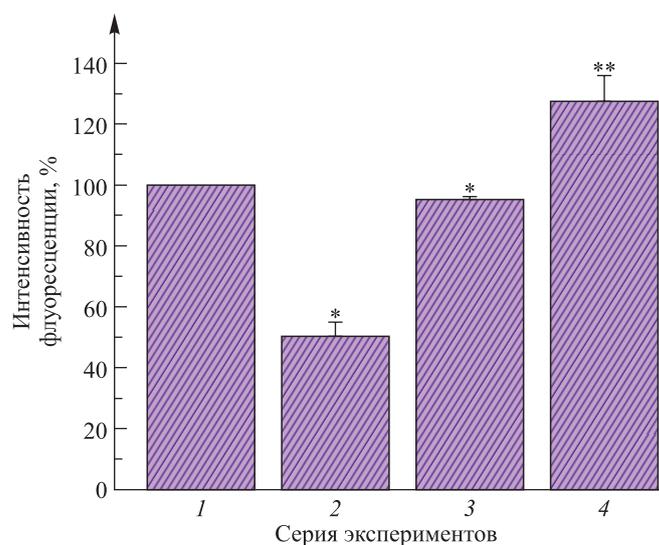


Рис. 3. Изменение флуоресценции монохлорбимана в синапсосах мозга крыс:
1 – контроль; 2 – прединкубация синапсосом в течение 10 мин при температуре 37 °С с ХДНБ в количестве 50 мкмоль/л; 3 – удаление глюкозы из инкубационной среды; 4 – прединкубация синапсосом в течение 30 мин при температуре 37 °С с 6-аминоникотинамидом в количестве 1 ммоль/л (при измерении флуоресценции инкубационная среда также содержала 1 ммоль/л 6-аминоникотинамида).

За 100 % принята флуоресценция в контрольных условиях. В серии с удалением глюкозы представлены средние значения 9 экспериментов и ошибка средней величины ($\pm Sx$), в сериях с ХДНБ и 6-аминоникотинамидом – средние значения 6 экспериментов и ошибка средней величины ($\pm Sx$). Знаком * отмечены статистически значимые различия по отношению к уровню 100 % при $p \leq 0,01$, знаком ** – статистически значимые различия по отношению к уровню 100 % при $p \leq 0,05$

Fig. 3. Change in monochlorobimane fluorescence in rat brain synaptosomes:
1 – control; 2 – preincubation of synaptosomes for 10 min at temperature 37 °C with CDNB in an amount of 50 $\mu\text{mol/L}$; 3 – glucose withdrawing from the incubation medium; 4 – preincubation of synaptosomes for 30 min at temperature 37 °C with 6-aminonicotinamide in an amount of 1 mmol/L (during fluorescence measurement, the incubation medium also contained 1 mmol/L of 6-aminonicotinamide). The 100 % level corresponds the fluorescence in control conditions.

The series with glucose withdrawing presents the average values of 9 experiments and the standard error of the mean ($\pm Sx$), the series with CDNB and 6-aminonicotinamide present the average values of 6 experiments and the standard error of the mean ($\pm Sx$).

Sign * marked statistically significant differences in relation to level 100 % at $p \leq 0,01$, sign ** – statistically significant differences in relation to level 100 % at $p \leq 0,05$

Заключение

Исследование показало, что изменение метаболического статуса синапсосом ведет к изменению рН-градиента синаптических митохондрий, а также к уменьшению пула восстановленного глутатиона. Однако антиоксидантные свойства кетонных тел на уровне синапсов обнаружить не удалось.

Библиографические ссылки

1. Федорович СВ, Демидчик ВВ. Повреждение синапсов центральной нервной системы при патологиях головного мозга: мембранные механизмы и способы коррекции. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2023;3:4–11. EDN: MRRDMP.
2. Fedorovich SV, Waseem TV. Metabolic regulation of synaptic activity. *Reviews in the Neurosciences*. 2018;29(8):825–835. DOI: 10.1515/revneuro-2017-0090.
3. Hofmeijer J, van Putten MJAM. Ischemic cerebral damage: an appraisal of synaptic failure. *Stroke*. 2012;43(2):607–615. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.632943.
4. Li C, Jiang M, Fang Z-T, Chen Z, Li L, Liu Z, et al. Current evidence of synaptic dysfunction after stroke: cellular and molecular mechanisms. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2024;30(5):e14744. DOI: 10.1111/cns.14744.
5. Fedorovich SV, Voronina PP, Waseem TV. Ketogenic diet versus ketoacidosis: what determines the influence of ketone bodies on neurons? *Neural Regeneration Research*. 2018;13(12):2060–2063. DOI: 10.4103/1673-5374.241442.
6. Gano LB, Patel M, Rho JM. Ketogenic diets, mitochondria and neurological diseases. *Journal of Lipid Research*. 2014;55(11):2211–2228. DOI: 10.1194/jlr.R048975.
7. Fedorovich SV, Waseem TV, Puchkova LV. Biogenetic and morphofunctional heterogeneity of mitochondria: the case of synaptic mitochondria. *Reviews in the Neurosciences*. 2017;28(4):363–373. DOI: 10.1515/revneuro-2016-0077.
8. Devine MJ, Kittler JT. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018;19(2):63–80. DOI: 10.1038/nrn.2017.170.
9. Hrynevich SV, Pekun TG, Waseem TV, Fedorovich SV. Influence of glucose deprivation on membrane potentials of plasma membranes, mitochondria and synaptic vesicles in rat brain synaptosomes. *Neurochemical Research*. 2015;40(6):1188–1196. DOI: 10.1007/s11064-015-1579-0.
10. Omori NE, Malys MK, Woo G, Mansor L. Exogenous ketone bodies and the ketogenic diet as a treatment option for neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Nutrition*. 2024;11:1485280. DOI: 10.3389/fnut.2024.1485280.
11. Dedkova EN, Blatter LA. Role of β -hydroxybutyrate, its polymer poly- β -hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate in mammalian health and disease. *Frontiers in Physiology*. 2014;5:260. DOI: 10.3389/fphys.2014.00260.
12. Paolo A, Bianco A, Damiani E, Bosco G. Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases. *Biomed Research International*. 2014;2014:474296. DOI: 10.1155/2014/474296.
13. Achanta LB, Rae CD. β -Hydroxybutyrate in the brain: one molecule, multiple mechanisms. *Neurochemical Research*. 2017;42(1):35–49. DOI: 10.1007/s11064-016-2099-2.
14. Wei C. The role of glutathione peroxidase 4 in neuronal ferroptosis and its therapeutic potential in ischemic and hemorrhagic stroke. *Brain Research Bulletin*. 2024;217:111065. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2024.111065.
15. Zheng J, Conrad M. Ferroptosis: when metabolism meets cell death. *Physiological Reviews*. 2025;105:651–706. DOI: 10.1152/physrev.00031.2024.
16. Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J. Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of Neuroscience Research*. 2005;79(1–2):157–165. DOI: 10.1002/jnr.20280.
17. Tang BL. Neuroprotection by glucose-6-phosphate dehydrogenase and the pentose phosphate pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2019;120(9):14285–14295. DOI: 10.1002/jcb.29004.
18. Languren G, Montiel T, Julio-Ampilas A, Massieu L. Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: an integrated view. *Neurochemistry International*. 2013;63(4):331–343. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.06.018.
19. Waseem TV, Fedorovich SV. Presynaptic glycine receptors influence plasma membrane potential and glutamate release. *Neurochemical Research*. 2010;35(8):1188–1195. DOI: 10.1007/s11064-010-0174-7.
20. Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, Rammer B, et al. Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science*. 2014;344:1023–1028. DOI: 10.1126/science.1252884.
21. LeBel CP, Bondy SC. Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes. *Neurochemistry International*. 1990;17(3):435–440. DOI: 10.1016/0197-0186(90)90025-o.
22. Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BH. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry*. 2000;286(1):35–37. DOI: 10.1006/abio.2000.4765.
23. Hajós F. An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. *Brain Research*. 1975;93(3):485–489. DOI: 10.1016/0006-8993(75)90186-9.
24. Alekseenko AV, Waseem TV, Fedorovich SV. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate uptake in rat brain synaptosomes. *Brain Research*. 2008;1241:193–200. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.09.012.
25. Pekun TG, Hrynevich SV, Waseem TV, Fedorovich SV. Role of iron, zinc and reduced glutathione in oxidative stress induction by low pH in rat brain synaptosomes. *Springerplus*. 2014;3:560. DOI: 10.1186/2193-1801-3-560.
26. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurements with Folin reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265–275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
27. Kauppinen RA, Nicholls DG. Synaptosomal bioenergetics. The role of glycolysis, pyruvate oxidation and responses to hypoglycaemia. *European Journal of Biochemistry*. 1986;158(1):159–165. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09733.x.
28. Holmgren CD, Mukhtarov M, Malkov AE, Popova IY, Bregestovski P, Zilberter Y. Energy substrate availability as a determinant of neuronal resting potential, GABA signaling and spontaneous network activity in the neonatal cortex *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*. 2010;112(4):900–912. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2009.06506.x.
29. Hrynevich SV, Waseem TV, Hébert A, Pellerin L, Fedorovich SV. β -Hydroxybutyrate supports synaptic vesicle cycling but reduces endocytosis and exocytosis in rat brain synaptosomes. *Neurochemistry International*. 2016;93:73–81. DOI: 10.1016/j.neuint.2015.12.014.
30. McKenna MC, Tildon JT, Stevenson JH, Boatright R, Huang S. Regulation of energy metabolism in synaptic terminals and cultured rat brain astrocytes: differences revealed using aminoxyacetate. *Developmental Neuroscience*. 1993;15(3–5):320–329. DOI: 10.1159/000111351.

31. Pekun TG, Lemeshchenko VV, Lyskova TI, Waseem TV, Fedorovich SV. Influence of intra- and extracellular acidification on free radical formation and mitochondria membrane potential in rat brain synaptosomes. *Journal of Molecular Neuroscience*. 2013;49(1): 211–222. DOI: 10.1007/s12031-012-9913-3.

32. Dubouskaya TG, Hrynevich SV, Waseem TV, Fedorovich SV. Calcium release from intracellular stores is involved in mitochondria depolarization after lowering extracellular pH in rat brain synaptosomes. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2018;78(4): 343–351. DOI: 10.21307/ane-2018-033.

33. Shimazu T, Hirshey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, et al. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*. 2013;339(6116):211–214. DOI: 10.1126/science.1227166.

34. Coyle JP, Johnson C, Jensen J, Farcas M, Derk R, Stueckle TA, et al. Variation in pentose phosphate pathway-associated metabolism dictates cytotoxicity outcomes determined by tetrazolium reduction assays. *Scientific Reports*. 2023;13(1):8220. DOI: 10.1038/s41598-023-35310-5.

Получена 07.01.2025 / исправлена 03.02.2025 / принята 19.02.2025.
Received 07.01.2025 / revised 03.02.2025 / accepted 19.02.2025.