

РЕГУЛЯЦИЯ ЦИКЛА СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ И ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В СИНАПТОСОМАХ МОЗГА КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ЛАКТАТА

© 2021 г. Т.Г. Дубовская*, С.В. Гриневич**, С.В. Федорович*, **

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, Беларусь

**Биологический факультет Белорусского государственного университета, 220030, Минск, ул. Курчатова, 10, Беларусь

E-mail: sergeifedorovich@yahoo.co.uk; fedorovich@bsu.by

Поступила в редакцию 07.12.2020 г.

После доработки 03.03.2021 г.

Принята к публикации 10.03.2021 г.

Различные метаболиты способны модулировать функционирование пресинаптических окончаний нейронов. Мы изучили влияние лактата и агониста его рецептора HCAR1 3,5-дигидроксибензойной кислоты на цикл синаптических везикул и образование активных форм кислорода в синапсосомах мозга крыс. Лактат в концентрации 4 мМ, в отличие от пирувата, фактически не влияет на цикл синаптических везикул. С помощью флуоресцентного зонда акридинового оранжевого продемонстрировано, что 3,5-дигидроксибензойная кислота в концентрации 500 мкМ активирует эндоцитоз. Эта стимуляция позволяет скомпенсировать его потенциальное ингибирование. Лактат, но не 3,5-дигидроксибензойная кислота вызывает увеличение флуоресценции 2',7'-дихлорофлуоресцина диацетата, свидетельствующее об образовании активных форм кислорода. С помощью флуоресцентного зонда митосокс мы также показали образование супероксид-аниона в митохондриях при действии лактата. Таким образом, лактат способен влиять на работу пресинаптических окончаний нейронов за счет стимуляции образования активных форм кислорода и активации эндоцитоза, опосредованной рецептором лактата HCAR1.

Ключевые слова: синапсосомы, лактат, синаптические везикулы, эндоцитоз, активные формы кислорода, митохондрии.

DOI: 10.31857/S0006302921040098

Глюкоза является основным, но не единственным энергетическим субстратом для нейронов. Показано, что нейрональные митохондрии также способны усваивать кетоновые тела, пируват, лактат [1–4]. Все эти вещества химически относятся к монокарбоксилатам. Более того, согласно концепции астроцит-нейронального лактатного челнока лактат как минимум в некоторых случаях является основным энергетическим субстратом [5, 6]. Согласно этой гипотезе, глюкоза преимущественно перерабатывается в лактат в астроцитах, молочная кислота в свою очередь транспортируется в нейроны. Синаптические митохондрии по своим свойствам достаточно сильно отличаются от митохондрий из тела нейронов, но в то же время они также могут использовать монокарбоксилаты в качестве источника

энергии для поддержания синаптической трансмиссии [7, 8].

В то же время физиологическая роль молочной кислоты не исчерпывается участием в метаболизме. К настоящему времени накоплено довольно много доказательств, что лактат является также сигнальной молекулой [6]. Для нее идентифицирован рецептор гидроксикарбоксиловой кислоты 1 (HCAR1), связанный с G-белком [6], который экспрессируется в том числе и на плазматической мембране нейронов [6, 9].

Нервный импульс переходит от нейрона к нейрону с помощью особых веществ – нейромедиаторов. Нейромедиаторы хранятся в синаптических везикулах. При увеличении цитозольной концентрации кальция в пресинаптическом окончании происходит экзоцитоз, слияние мембран синаптических везикул и плазматической мембраны. Для того чтобы подготовиться к экзоцитозу, синаптическая везикула должна пройти эндоцитоз, докинг, прайминг [10]. Стадия докин-

Сокращения: HCAR1 – рецептор гидроксикарбоксиловой кислоты 1, ДГБК – 3,5-дигидроксибензойная кислота, АФК – активные формы кислорода, DCFDA – 2',7'-дихлорофлуоресцина диацетат.

га включает в себя образование физического контакта между мембранами синаптической везикулы и плазматической мембраны. Но для дальнейшего слияния еще должен пройти этап АТФ-зависимого прайминга, вероятно, заключающийся в разборке белковых комплексов [10]. Многие стадии цикла синаптических везикул являются энергозависимыми процессами [10, 11].

Ранее было показано, что негликолитические энергетические субстраты способны быть источником энергии для поддержания цикла синаптических везикул [3, 12]. В то же время замена глюкозы на пируват или кетоновые тела в инкубационной среде ингибирует эндоцитоз в синаптических везикулах мозга крыс [3].

Для пирувата рецепторы не известны, для кетоновых тел рецепторы находятся в микроглиальных клетках и их, скорее всего, в отличие от рецепторов для лактата, нет в нейронах [13, 14]. Поэтому в данной работе мы изучили действие лактата и агониста его рецептора 3,5-дигидроксibenзойной кислоты (ДГБК) на цикл синаптических везикул. Также мы проверили, что лактат, как и пируват, способен поддерживать потенциал плазматической мембраны синапсом [1, 3].

Недавно было показано, что сигнальная функция лактата может опосредоваться увеличением образования активных форм кислорода (АФК) [15]. Показано, что пируват ведет к образованию пероксида водорода во внутрисинапсомальных митохондриях [16]. Поэтому мы изучили образование активных форм кислорода (АФК) в синаптических везикулах при действии лактата.

В качестве объекта исследования были использованы синапсомы, изолированные пресинаптические окончания нейронов. Они сохраняют основные свойства интактных нервных терминалей, способны к экзоцитозу и эндоцитозу [3, 17]. Синапсомы также содержат митохондрии, которые способны метаболизировать как глюкозу, так и негликолитические энергетические субстраты [3, 17].

Экзоцитоз и эндоцитоз изучали с помощью флуоресцентного зонда акридинового оранжевого [18], потенциал плазматической мембраны — с помощью зонда DiSC3(5) [19], митохондриальный потенциал — с помощью флуоресцентного зонда JC-1 [20], образование АФК — с помощью флуоресцентного зонда 2',7'-дихлорофлуоресцина диацетата (DCFDA) [21], образование супероксидного анион-радикала в митохондриях — с помощью флуоресцентного зонда митосокса [22].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы реактивы: 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кис-

лота (HEPES) (Merck, Германия), DCFDA, 3,3'-дипропилтиадикарбоцианин (DiSC3(5)), 3,5-дигидроксibenзойная кислота, пируват натрия, лактат натрия, кетоглутарат натрия, хлорид дифенилйодидия (Sigma, США), 5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1'3,3'-тетраэтилбензимидазоло-карбоцианин йодид (JC-1), акридиновый оранжевый (Serva, Германия), митосокс (ThermoFisher Scientific, США). Все остальные реактивы — квалификации не ниже «ос.ч.».

Выделение синапсом. Синапсомы изолировали из полушарий мозга крыс по методу Хайюша [23]. 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. Суспензию синапсом (10–20 мг/мл белка) преинкубировали 10 мин при 37°C, после чего помещали на лед и использовали в эксперименте в течение 3 ч. В экспериментах с использованием различных энергетических субстратов и изучением мембранного потенциала или цикла синаптических везикул глюкозу замещали 4 мМ пирувата или 4 мМ лактата. Также в экспериментах по изучению образования АФК или митохондриального потенциала эти вещества дополнительно вносили к уже имеющейся в инкубационной среде глюкозе (10 мМ). Их растворяли в инкубационной среде А и вносили в объеме 20 мкл. При регистрации флуоресценции в инкубационную среду добавляли 2 мМ CaCl₂.

Определение потенциала плазматической мембраны. Потенциал плазматической мембраны синапсом определяли с помощью флуоресцентного зонда DiSC3(5) по Waseem and Fedorovich [19] с некоторыми модификациями [24]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{\text{возб}} = 640$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 688$ нм и постоянном перемешивании. После выделения синапсомы преинкубировали в среде А с соответствующими энергетическими субстратами 30 мин при 37°C. К 1.8 мл инкубационной среды А добавляли 200 мкл суспензии синапсом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл), после чего в кювету вносили 1 мкМ DiSC3(5). Через одну минуту добавляли 150 мМ KCl. В контрольном эксперименте добавляли 150 мМ NaCl. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Регистрация экзоцитоза и эндоцитоза. Экзоцитоз и эндоцитоз определяли с помощью флуоресцентного зонда акридинового оранжевого по Zoccarato et al. [18] с некоторыми модификациями [24]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США) в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{\text{возб}} = 494$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 529$ нм и постоянном перемешивании. По-

сле выделения синапсомы преинкубировали в среде с лактатом или агонистом лактатного рецептора 30 мин при 37°C. К 1,8 мл среды А с 2 мМ CaCl_2 добавляли 200 мкл синапсом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл), после чего в кювету вносили 5 мкМ акридинового оранжевого. Через 10 мин, необходимых для уравнивания зонда между синапсомой и инкубационной средой, в кювету добавляли 60 мМ KCl или в качестве контроля делали аналогичную добавку NaCl . В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Определение образования АФК. Образование АФК определяли с помощью флуоресцентного зонда DCFDA по LeBel and Bondy [21] с некоторыми модификациями [25]. После дополнительной однократной отмывки в десятикратном объеме стандартной инкубационной среды А осадок синапсомы суспендировали в этой же среде. К суспензии (10–15 мг/мл белка) добавляли зонд DCFDA до конечной концентрации 25 мкМ и 20% (вес/объем) Pluronic F-127/DMSO (конечная концентрация детергента не превышала 0.05%). Инкубировали 60 мин при 30°C. Загруженные синапсомы однократно отмывали в десятикратном объеме среды А. Осадок суспендировали в 2.0–2.5 мл среды А.

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

К 1.8 мл среды А добавляли 200 мкл суспензии синапсомы до конечной концентрации белка 1 мг/мл. Через 50 с в кювету вносили соответствующий энергетический субстрат. В контрольном эксперименте в кювету добавляли аналогичное количество растворителя. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную кривую.

Определение образования супероксид-аниона во внутрисинапсомальных митохондриях. Образование супероксид-аниона во внутрисинапсомальных митохондриях определялось с помощью флуоресцентного зонда митосокса [22]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{\text{возб}} = 510$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 580$ нм и постоянном перемешивании. После выделения синапсомы инкубировали в среде А 10 мин при 37°C в присутствии 5 мкМ зонда. Избыток экстраклеточного зонда удаляли центрифугированием, а осадок суспендировали в соответствующей инкубационной среде. Далее к 1.8 мл среды А в кювету добавляли 200 мкл синапсомы, предварительно загруженной зондом (до конечной концентрации белка 1 мг/мл). Через одну минуту добавляли энергетические субстраты. В контрольном эксперименте добавляли аналогичное количество инкубацион-

ной среды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Определение мембранного потенциала митохондрий. Мембранный потенциал митохондрий ($\Delta\Psi$) определялся с помощью флуоресцентного зонда JC-1 по Chinopoulos et al. [20] с небольшими модификациями [26]. Флуоресценцию измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse в термостатируемой кювете (37°C) при $\lambda_{\text{возб}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 595$ нм и постоянном перемешивании. После выделения синапсомы (концентрация белка 5 мг/мл) инкубировали в среде А 15 мин при 37°C в присутствии 10 мкг/мл зонда. Избыток экстраклеточного зонда удаляли центрифугированием, а осадок суспендировали в инкубационной среде. Далее к 1.8 мл среды А в кювету добавляли 200 мкл синапсомы (до конечной концентрации белка 1 мг/мл). Через 50 с добавляли энергетические субстраты. В контрольном эксперименте добавляли аналогичное количество инкубационной среды. В дальнейшем из опытной кривой вычитали контрольную.

Белок определяли с помощью метода Лоури [27] с использованием бычьего сывороточного альбумина как стандарта. Результаты представляли в виде среднего арифметического индивидуальных измерений и стандартной ошибки среднего арифметического. Для анализа данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с посттестом Бонферрони. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе мы показали, что лактат может использоваться синапсомой для поддержания потенциала плазматической мембраны (рис. 1). В то же время мы обнаружили небольшую, но достоверную деполяризацию в экспериментах, где синапсомы использовали только лактат в качестве источника энергии (рис. 1). Сходный эффект мы в свое время наблюдали и при использовании пирувата [3]. Потенциал плазматической мембраны не изменялся в экспериментах, в которых лактат добавляли к глюкозо-содержащей инкубационной среде. Это говорит о том, что рецептор лактата не вносит вклад в деполяризацию пресинаптического окончания. Недавно было показано, что лактат может регулировать возбудимость нейронов как минимум в некоторых областях головного мозга [6, 28]. В то же время наши данные показывают, что подобная регуляция, опосредованная рецепторами молочной кислоты, не распространяется на пресинаптические окончания (рис. 1).

Далее мы изучили действие лактата на цикл синаптических везикул в синапсоме. Ранее мы

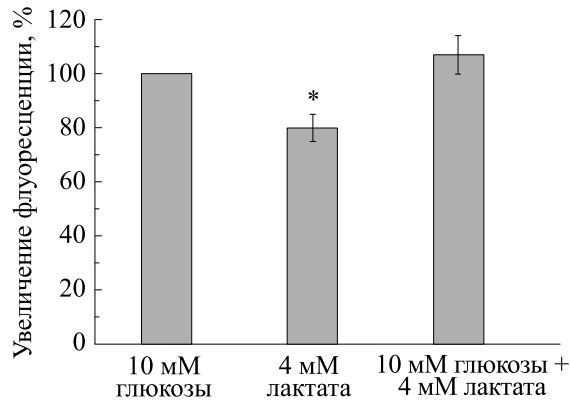


Рис. 1. Влияние лактата на потенциал плазматической мембраны синапсом. За 100% взято увеличение флуоресценции за 4 мин после добавки 150 мМ KCl в контрольной глюкозосодержащей среде. Представлены средние значения шести экспериментов $\pm Sx$.

показали, что замена глюкозы на кетоновые тела приводит к некоторой активации экзоцитоза и ингибированию эндоцитоза, а замена глюкозы на пируват — к ингибированию эндоцитоза [6]. Для изучения цикла синаптических везикул мы использовали флуоресцентный зонд акридиновый оранжевый. Увеличение флуоресценции свидетельствует об экзоцитозе, последующее снижение — о компенсаторном эндоцитозе [18, 24]. Рис. 2 показывает, что замена глюкозы на лактат также приводит к небольшому, но достоверному увеличению экзоцитоза. В то же время полностью отсутствовало ингибирование эндоцитоза (рис. 2), характерное для других негликолитических энергетических субстратов [6]. Мы использовали лактат в концентрации 4 мМ, так как ранее в наших экспериментах была использована такая же концентрация пирувата [6]. Агонист НCAR1 ДГБК не влияет на экзоцитоз, но активирует эндоцитоз (рис. 2). Таким образом, наши результаты позволяют предположить, что актива-

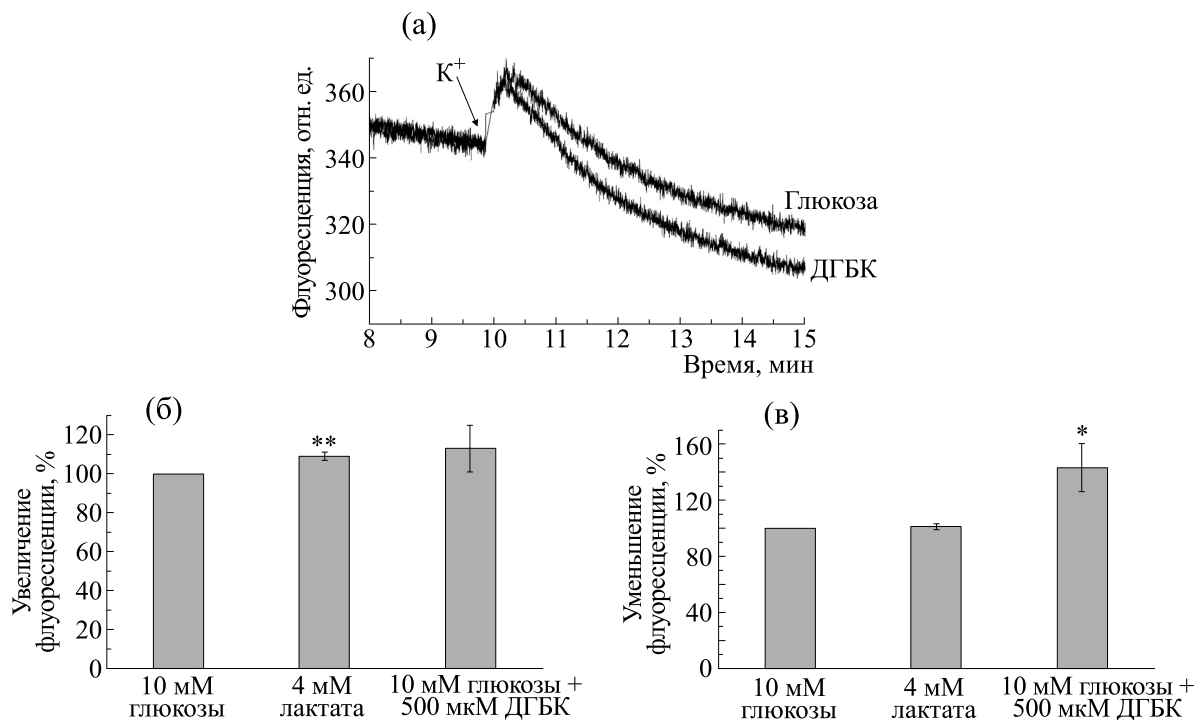


Рис. 2. Влияние лактата на цикл синаптических везикул в синапсом. (а) — Ответ флуоресцентного зонда акридинового оранжевого на калиевую деполяризацию в контрольной глюкозосодержащей инкубационной среде и в инкубационной среде, также содержащей 500 мкМ ДГБК. В указанный стрелкой момент времени в кювету вносили 60 мМ KCl. Представленные кривые отражают результаты четырех независимых измерений. (б) — Влияние лактата на экзоцитоз в синапсом мозга крыс: Инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, либо 4 мМ лактата, либо 10 мМ глюкозы + 500 мкМ ДГБК. За 100% взято увеличение флуоресценции после добавки KCl в контрольной глюкозосодержащей среде. **— $P \leq 0.01$ по отношению к контролю (ответ в глюкозосодержащей среде). Представлены средние значения четырех экспериментов $\pm Sx$. (в) — Влияние лактата на эндоцитоз в синапсом мозга крыс. Инкубационная среда содержала 10 мМ глюкозы, либо 4 мМ лактата, либо 10 мМ глюкозы + 500 мкМ ДГБК. За 100% взято уменьшение флуоресценции за 5 мин после добавки KCl в контрольной глюкозосодержащей среде. *— $P \leq 0.05$ по отношению к контролю (ответ в глюкозосодержащей среде). Представлены средние значения четырех экспериментов $\pm Sx$.

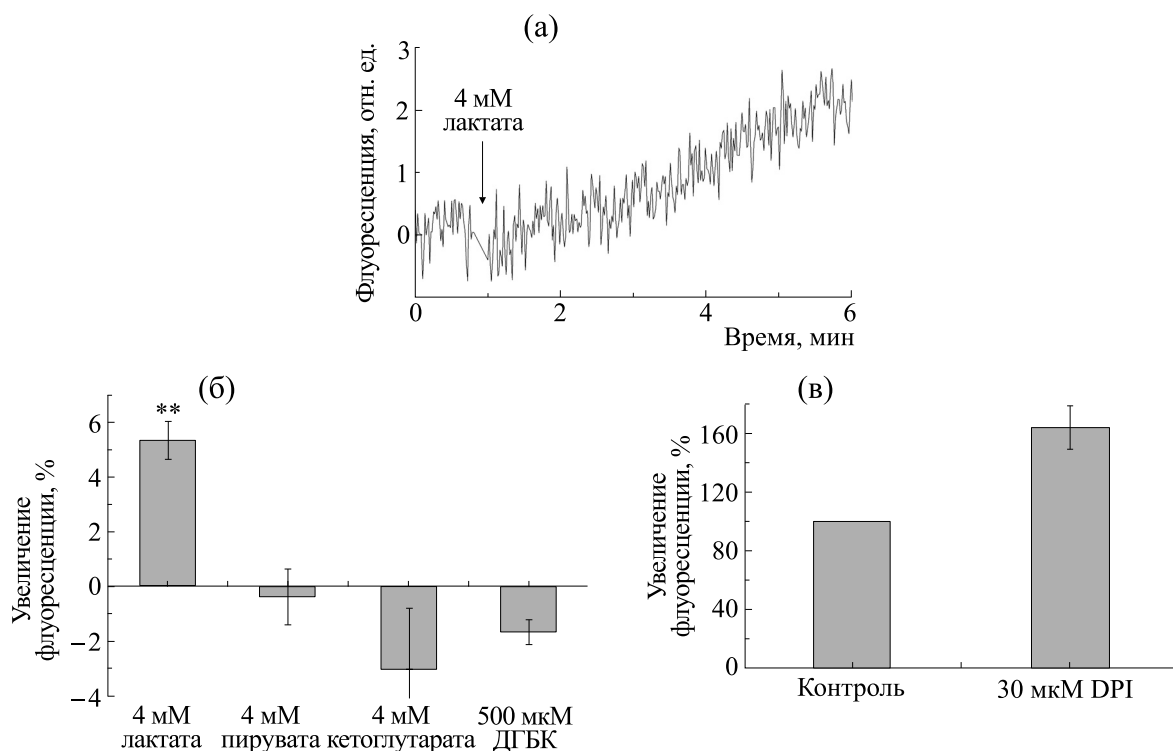


Рис. 3. Влияние монокарбоксилатов на образование АФК в синапсосах мозга крыс. (а) — Увеличение флуоресценции DCFDA при действии лактата. В указанный стрелкой момент времени в кювету вносили 4 мМ лактата. Представленная кривая отражает результаты одиннадцати независимых измерений. (б) — Влияние монокарбоксилатов на флуоресценцию DCFDA в синапсосах. В глюкозосодержащую инкубационную среду добавляли 4 мМ либо лактата, либо пирувата, либо кетоглутарата или 500 мкМ ДГБК. За 100% взято увеличение флуоресценции за 5 мин после добавления 1 мМ H_2O_2 в контрольной глюкозосодержащей среде. ** — $P \leq 0.01$ по отношению к 0. Представлены средние значения шести экспериментов $\pm Sx$ для лактата, четырех экспериментов для пирувата, трех экспериментов для кетоглутарата и тринадцати экспериментов — для ДГБК. (в) — Влияние хлорида дифенилйодиния на образование АФК, индуцированное лактатом: синапсосы были обработаны 30 мкМ хлорида дифенилйодиния, за 100% взято увеличение флуоресценции в контроле после добавления 4 мМ лактата. Представлены средние значения двенадцати экспериментов $\pm Sx$.

ция эндоцитоза при помощи HCAR1 позволяет замаскировать его ингибирование, вызванное лактатом как негликолитическим энергетическим субстратом. Так как лактат в физиологических условиях гораздо более важен для питания нейронов, чем пируват или кетонные тела, мы предполагаем, что обнаруженный нами механизм компенсации обеспечивает стабильность синаптической трансмиссии. В то же время стоит отметить, что лактат, в отличие от пирувата, является формой, которая хорошо проходит через клеточную мембрану, именно поэтому для транспорта из астроцитов в нейрон используется лактат, а не пируват. Однако в нейроне лактат переходит в пируват, который в конечном итоге и является энергетическим субстратом для митохондрий.

Рис. 3а показывает, что добавление 4 мМ лактата к суспензии синапсосов приводит к увеличению флуоресценции DCFDA, свидетельствующее о накоплении АФК. Ранее было показано, что кетоглутарат и пируват вызывают образова-

ние пероксида водорода в синапсосах за счет активации кетоглутаратдегидрогеназы и пируватдегидрогеназы [16]. В то же время рис. 3б показывает, что эти вещества, в отличие от лактата, не ведут к увеличению флуоресценции DCFDA. Флуоресцентный зонд DCFDA реагирует прежде всего на гидроксильный радикал [29]. Гидроксильный радикал в наибольшей степени способен повреждать нейроны по сравнению с другими АФК, но он является вторичным по сравнению с пероксидом водорода или супероксиданион-радикалом [30]. Поэтому наши результаты позволяют предположить, что лактат обладает более сильным прооксидантным действием, чем пируват и кетоглутарат. Видимо, в случае пирувата и кетоглутарата количество образуемого пероксида водорода, являющегося первичной АФК, недостаточно для синтеза гидроксильного радикала.

В синапсосах различные факторы могут вызывать образование АФК за счет образования супероксидного анион-радикала в электрон-

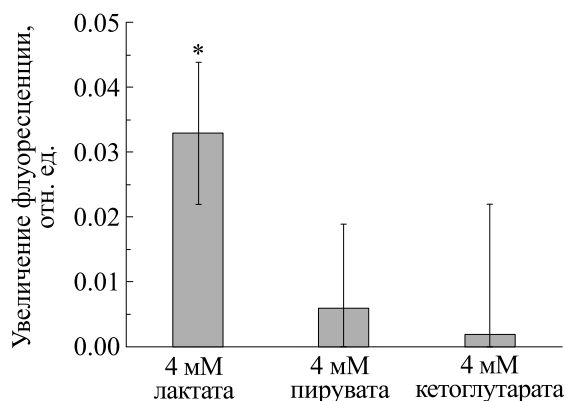


Рис. 4. Влияние монокарбоксилатов на образование супероксид-аниона в митохондриях. В глюкозосодержащую инкубационную среду добавляли 4 мМ лактата, пирувата или кетоглутарата. * — $P \leq 0.05$ по отношению к контролю. Представлены средние значения семи экспериментов $\pm Sx$.

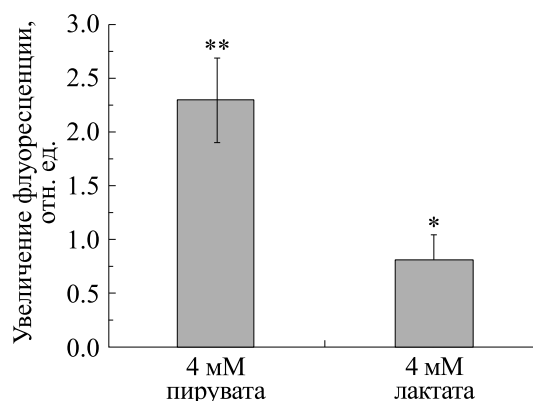


Рис. 5. Влияние монокарбоксилатов на митохондриальный потенциал. В глюкозосодержащую инкубационную среду добавляли 4 мМ лактата или пирувата. * — $P \leq 0.05$ по отношению к контролю; ** — $P \leq 0.01$ по отношению к контролю. Представлены средние значения четырех экспериментов $\pm Sx$.

транспортной цепи митохондрий или NADPH оксидазой [25, 26, 31]. Мы изучили действие специфического ингибитора NADPH-оксидазы хлорида дифенилйодиния [25, 26, 31] на увеличение образования АФК при действии лактата. Рис. 3в показывает, что хлорид дифенилйодиния увеличивает, а не ингибирует влияние молочной кислоты на флуоресценцию DCFDA. Далее мы использовали флуоресцентный зонд митосокс, который специфичен по отношению к супероксид-аниону, образующемуся в митохондриях [22]. Рис. 4 показывает, что лактат, но не пируват или кетоглутарат, вызывает увеличение флуоресценции митосокса, свидетельствующее об образовании супероксид-аниона в электронтранспортной цепи митохондрий.

Ранее было показано, что пируват вызывает гиперполяризацию внутрисинапсоматальных митохондрий [1]. Гиперполяризация митохондрий стимулирует образование АФК в митохондриях [32, 33]. Поэтому мы изучили влияние лактата на потенциал внутрисинапсоматальных митохондрий. Рис. 5 показывает, что и пируват, и лактат вызывают увеличение флуоресценции зонда JC-1 при $\lambda_{\text{рег}} = 595$ нм. Это свидетельствует о гиперполяризации [20]. Мы также наблюдали уменьшение флуоресценции при $\lambda_{\text{рег}} = 595$ нм (данные не показаны), что подтверждает гиперполяризацию [20]. В то же время эффект пирувата был более выражен, чем эффект лактата (рис. 5), что делает связь между потенциалом митохондрий и образованием АФК не столь однозначной. Более сильная гиперполяризация в случае пирувата скорее всего связана с тем, что, в отличие от лактата, это вещество сразу используется в цикле Кребса. Вероятно, в физиологический процесс регуляции образования супероксид-аниона вме-

шивается какой-то другой фактор. Этим фактором, видимо, не является рецептор лактата HCAR1, так как его специфический агонист ДГБК не вызвал образования АФК в синапсоматах (рис. 3а). В то же время было предположено, что существуют и другие типы рецепторов лактата в нейронах [6]. Возможно, именно этот до сих пор неидентифицированный рецептор и является стимулом для образования супероксид-аниона в электронтранспортной цепи внутрисинапсоматальных митохондрий.

Наши результаты показывают, что лактат вызывает образование супероксид-аниона в электронтранспортной цепи во внутрисинапсоматальных митохондриях. Этот эффект не связан с активацией HCAR1 (рис. 3). Молочная кислота, в отличие от других негликолитических энергетических субстратов, не ингибирует эндоцитоз. Это связано с активацией эндоцитоза под действием рецептора лактата HCAR1 (рис. 2). Таким образом, лактат способен регулировать функционирование пресинаптических окончаний нейронов за счет стимуляции образования АФК в электронтранспортной цепи митохондрий и активации эндоцитоза, опосредованной HCAR1.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б19-001).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. A. Kauppinen and D. G. Nicholls, *FEBS Lett.* **199**, 222 (1986).
2. M. C. McKenna, J. T. Tildon, J. H. Stevenson, et al., *Dev. Neurosci.* **15**, 320 (1993).
3. S. V. Hrynevich, T. V. Waseem, A. Hebert, et al., *Neurochem. Int.* **93**, 73 (2016).
4. Т. Г. Дубовская, С. В. Гриневич и С. В. Федорович, *Биофизика* **64**, 500 (2019).
5. L. Pellerin and P. J. Magistretti, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1152 (2012).
6. P. J. Magistretti and I. Allaman, *Nature Rev. Neurosci.* **19**, 235 (2018).
7. S. V. Fedorovich, T. V. Waseem, and L. V. Puchkova, *Rev. Neurosci.* **28**, 363 (2017).
8. M. J. Devine and J. T. Kittler, *Nature Rev. Neurosci.* **19**, 63 (2018).
9. H. C. Abrantes, M. Briquet, C. Schmuziger, et al., *J. Neurosci.* **39**, 4422 (2019).
10. T. C. Sudhof, *Neuron* **80**, 675 (2013).
11. S. V. Fedorovich and T. V. Waseem, *Rev. Neurosci.* **29**, 825 (2018).
12. A. S. Tarasenko, M. V. Linetska, L. G. Storchak, et al., *J. Neurochem.* **99**, 787 (2006).
13. C. C. Blad, C. Tang, and S. Offermans, *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 603 (2012).
14. S. P. Fu, J. F. Wang, W. J. Xue, et al., *J. Neuroinflammation* **12**, 9 (2015).
15. A. Tauffenberger, H. Fiumelli, S. Almustafa, et al., *Cell Death Dis.* **10**, 653 (2019).
16. L. Tretter, B. Liktov, and V. Adam-Vizi, *Neurochem. Res.* **30**, 1331 (2005).
17. B. G. Wilhelm, S. Mandad, S. Truckenbrodt, et al., *Science* **344**, 1023 (2014).
18. F. Zoccarato, L. Cavallini, and A. Alexandre, *J. Neurochem.* **72**, 625 (1999).
19. T. V. Waseem and S. V. Fedorovich, *Neurochem. Res.* **35**, 1188 (2010).
20. C. Chinopoulos, L. Tretter, and V. Adam-Vizi, *J. Neurochem.* **73**, 220 (1999).
21. C. P. LeBel and S. C. Bondy, *Neurochem. Int.* **17**, 435 (1990).
22. A. Y. Abramov, A. Scorziello, and M. R. Duchon, *J. Neurosci.* **27**, 1129 (2007).
23. F. Hajos, *Brain Res.* **93**, 485 (1975).
24. S. V. Hrynevich, T. G. Pekun, T. V. Waseem, et al., *Neurochem. Res.* **40**, 1188 (2015).
25. A. V. Alekseenko, V. V. Lemeschenko, T. G. Pekun, et al., *Neurosci. Lett.* **513**, 238 (2012).
26. T. G. Pekun, V. V. Lemeschenko, T. I. Lyskova, et al., *J. Mol. Neurosci.* **49**, 211 (2013).
27. O. Lowry, H. Rosenbrough, H. Farr, et al., *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
28. N. Sada, S. Lee, T. Katsu, et al., *Science* **347**, 1362 (2015).
29. T.-I. Setsukinai, Y. Urano, K. Kakinuma, et al., *J. Biol. Chem.* **278**, 3170 (2003).
30. B. Halliwell, *J. Neurochem.* **97**, 1634 (2006).
31. A. Tarasenko, O. Krupko, and N. Himmelreich, *Neurochem. Int.* **61**, 1044 (2012).
32. S. S. Korshunov, V. P. Skulachev, and A.A. Starkov, *FEBS Lett* **416**, 15 (1997).
33. D. B. Zorov, M. Juhaszova, and S. J. Sollott, *Physiol. Rev.* **94**, 909 (2014).

Regulation of the Synaptic Vesicle Cycle and Reactive Oxygen Species Generation in Rat Brain Synaptosomes in the Presence of Lactate

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*

***Faculty of Biology, Belarusian State University, ul. Kurchatova 10, Minsk, 220030 Belarus*

Different metabolites are able to modulate function of presynaptic endings of neurons. We investigated the influence of lactate and 3,5-dihydroxybenzoic acid, an agonist for the lactate receptor HCAR1, on the synaptic vesicle cycle and the generation of reactive oxygen species in rat brain synaptosomes. Supplementation of lactate (4 mM) versus pyruvate had no significant effect on the synaptic vesicle cycle. With the help of a fluorescent dye acridine orange we demonstrated that 3,5-dihydroxybenzoic acid in the concentration of 500 μ M is amenable for eliciting endocytosis thereby preventing its potential inhibition during this stimulus. In the presence of lactate but not 3,5-dihydroxybenzoic acid there was an increase in 2',7'-dichlorofluorescein diacetate fluorescence, indicating reactive oxygen species generation. Also, using a fluorescent dye MitoSOX, we demonstrated the formation of superoxide anion in mitochondria after the addition of lactate. Therefore, lactate can influence the function of presynaptic endings of neurons through stimulation of reactive oxygen species generation and activation of endocytosis mediated by lactate receptor HCAR1.

Keywords: *synaptosomes, lactate, synaptic vesicles, endocytosis, ROS, mitochondria*