

УДК 612.816.7

## АНАЛИЗ ЭКЗО- И ЭНДОЦИТОЗА В НЕРВНОМ ОКОНЧАНИИ МЫШИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

© 2017 г. О. В. Яковлева<sup>а,\*</sup>, А. В. Захаров<sup>а,б</sup>, А. Л. Зефирова<sup>б</sup>, Г. Ф. Ситдикова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

<sup>б</sup>Казанский государственный медицинский университет, 420039, Казань, ул. Бултерова, 49

\*e-mail: a-olay@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.07.2016 г.

Принята к печати 15.09.2016 г.

Сахарный диабет (СД) является системным заболеванием, характеризующимся изменениями во многих органах и тканях, включая двигательную систему. Изучены процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании диафрагмальной мышцы мыши при высокочастотной активности в аллоксановой модели экспериментального СД. С помощью внутриклеточных микроэлектродов регистрировали потенциалы концевой пластинки (ПКП) в условиях одиночной и высокочастотной (50 Гц, 1 мин) стимуляции. У мышей с экспериментальным СД амплитудно-временные параметры ПКП при редком раздражении не отличались от контроля, однако, происходило усиление депрессии и замедление восстановления ПКП в условиях высокочастотной стимуляции. С помощью эндоцитозного маркера FM 1-43 было показано, что у животных с экспериментальным СД происходило усиление свечения нервных терминалей при загрузке красителя во время высокочастотной стимуляции, что предотвращалось блокатором медленного опосредованного динамином 1 эндоцитоза – 1-azakenpaullone (2 мкМ). Кроме того, у модельных животных замедлялось обесцвечивание предварительно загруженных нервных терминалей при длительной стимуляции (50 Гц). Полученные данные показывают, что в условиях экспериментального СД первого типа усиливается рециклирование синаптических везикул по длинному пути, нарушаются механизмы транспорта везикул, что подтверждено методами математического моделирования.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, нервно-мышечное соединение, синаптические везикулы, экзо- и эндоцитоз, математическое моделирование

**DOI:** 10.7868/S0233475517020098

### ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (СД) – хроническое заболевание эндокринной системы человека, характеризующееся длительным повышением концентрации глюкозы в крови и сопутствующими изменениями обмена веществ [1]. Одним из серьезных осложнений СД являются периферические нейропатии, которые характеризуются мышечной слабостью, атрофией мышц [2], функциональными нарушениями двигательных нервных волокон, а также изменениями в нервно-мышечной передаче. В ряде исследований показаны морфологические и функциональные изменения нервно-мышечного синапса как на пре-, так и на постсинаптическом уровнях [3–10].

Передача возбуждения в нервно-мышечном синапсе осуществляется за счет экзоцитоза синаптических везикул, содержащих кванты медиатора. Синаптические везикулы в нервных окончаниях млекопитающих разделяют на три функцио-

нальных пула. Первый, готовый к освобождению (докированные везикулы), и второй (мобилизационный) пул иногда рассматривают как один рециклирующий пул [11]. Рециклирующий пул обеспечивает поддержание синаптической передачи при умеренной стимуляции за счет повторного использования везикул, которые восстанавливаются быстрым эндоцитозом [12, 13]. Третью популяцию составляют везикулы большого резервного пула, которые медленно переходят в рециклирующий пул и используются в ответ на длительную высокочастотную стимуляцию. Восстановление везикул резервного пула происходит за счет образования инвагинаций и эндосомоподобных структур, с поверхности которых отпочковываются везикулы [11, 12]. Для осуществления как процессов быстрого, так и медленного эндоцитоза необходима активация GTP-азы динамин 1 [14], однако, медленный эндоцитоз регулируется исключительно циклом дефосфорилирования и рефосфорилирования динамина 1. Одной из клю-

чевых протеинкиназ, осуществляющих рефосфорилирование динамина 1 и, как следствие, контролирующего медленный путь эндоцитоза, является киназа 3 гликогенсинтазы (GSK3) [15]. Рециклирование синаптических везикул играет ключевую роль в секреции нейромедиаторов, обеспечивая процессы синаптической пластичности как в ЦНС, так и на периферии [16–18].

Целью нашей работы было исследование процессов секреции медиатора, а также экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании мышцы в условиях высокочастотной активности при экспериментальном СД.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Моделирование сахарного диабета.** Экспериментальный СД вызывали с помощью аллоксана (250 мг/кг, Sigma), который инъецировали животным внутривентрально после суточного голодания [19]. Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор. Проведение экспериментов на животных было одобрено Локальным этическим комитетом КФУ (протокол № 8 от 05.05.2015). Концентрацию глюкозы в крови определяли глюкометром Accu-Chek Active (Германия).

**Объект исследования, растворы.** Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы лабораторных белых мышей. Животных выводили из опыта методом цервикальной дислокации после предварительной анестезии с помощью 5% изофлурана (Abbott Laboratories, США) в соответствии с Директивой Совета Европейских сообществ (24 ноября 1986 года; 86/609/ЕЕС).

Нервно-мышечный препарат помещали в ванночку и перфузировали оксигенированным раствором Кребса, содержащим (в мМ): NaCl – 137.0; KCl – 5.0; CaCl<sub>2</sub> – 2.2; MgCl<sub>2</sub> – 1.0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1.0; NaHCO<sub>3</sub> – 16.0; глюкоза – 11.0; ( $t = 20^{\circ}\text{C}$ , pH 7.2–7.4). Сокращения мышечных волокон блокировали d-тубокурарином (2–2.5 мкМ). Для исследования роли медленного эндоцитоза синаптических везикул использовали блокатор киназы-3 гликогенсинтазы (GSK3) – 1-azakenpaullone (Sigma).

**Морфология.** Ткань поджелудочной железы фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 24 ч. С использованием стандартных гистологических методов изготавливали парафиновые срезы с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином [20]. Анализ проводили с помощью микроскопа AxioScope A1, объектив 40×/NA 0.50, оснащенного черно-белой видеокамерой AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия).

**Электрофизиология.** Потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали внутриклеточно при помощи стеклянных микроэлектродов,

заполненных раствором KCl (2.5 М). Двигательный нерв раздражали прямоугольными импульсами сверхпороговой амплитуды с частотой 0.2 Гц (одиночная стимуляция) или 50 Гц (высокочастотная стимуляция). В каждом эксперименте сначала проводили раздражение одиночными стимулами, затем высокочастотной пачкой импульсов с частотой 50 Гц в течение 1 мин, и сразу после ее окончания – одиночными импульсами, регистрируя восстановление амплитуды ПКП. Уровень мембранного потенциала покоя контролировали при помощи милливольтметра. Эксперименты, в которых происходило изменение мембранного потенциала покоя, не учитывали.

**Флуоресцентная микроскопия.** Для исследования процессов эндоцитоза синаптических везикул использовали флуоресцентный маркер FM 1-43 (3 мкМ), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза оказывается внутри вновь образованных синаптических везикул нервной терминали (“загружается” в нервное окончание). В этом случае показателем интенсивности эндоцитоза является яркость свечения нервного окончания. Для загрузки красителя использовали стимуляцию двигательного нерва с частотой 50 Гц в течение 1 мин. Использовали три протокола “загрузки”. В первом случае FM 1-43 присутствовал в растворе в течение 1 мин во время стимуляции, во втором – 7 мин после ее окончания, в третьем – 1 мин во время стимуляции и 7 мин после ее окончания (рис. 3а).

Для анализа процессов экзоцитоза синаптические везикулы предварительно окрашивали красителем (загружали краситель в нервное окончание по третьему протоколу загрузки). Затем стимулировали двигательный нерв с частотой 50 Гц в течение 20 мин, анализируя снижение интенсивности флуоресценции нервного окончания. В этом случае во время экзоцитоза вместе с освобождением медиатора происходила выгрузка красителя.

Свечение нервных окончаний регистрировали с помощью микроскопа AxioScope A1, оснащенного быстродействующей черно-белой видеокамерой AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия). Наблюдения проводили только на поверхностно лежащих нервных окончаниях. Оценивали среднюю интенсивность свечения на участке нервной терминали длиной 10–20 мкм в относительных единицах (отн. ед.), оценивая свечение пикселя от 0 до 256 [21].

**Математическое моделирование.** Для дополнительного анализа механизмов изменения процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул при СД применили математическое моделирование везикулярного цикла. Использовали модель, включающую два основных пула везикул

(объединенный рециклирующий и резервный) и два вида эндоцитоза (быстрый и медленный) [22].

Все данные обработаны методами вариационной статистики. Для анализа достоверности использовали методы параметрического анализа для независимых выборок с нормальным распределением ( $t$ -критерий Стьюдента) с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Проверку совокупности данных на нормальное распределение проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирного. Количественные результаты исследования представлены в форме среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение,  $n$  – число независимых экспериментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологические изменения островков Лангерганса поджелудочной железы и концентрация глюкозы в крови при экспериментальном сахарном диабете.** Гистологическое исследование ткани поджелудочной железы выявило выраженные деструктивные изменения островков Лангерганса – уменьшение размера и замещение соединительной тканью (рис. 1а,б). Средняя площадь островков Лангерганса у контрольных мышей составила  $1430 \pm 197$  мкм<sup>2</sup> ( $n = 20$ ), а у животных с аллоксановым диабетом –  $1000 \pm 146$  мкм<sup>2</sup> ( $n = 19$ ,  $p < 0.05$ ).

Контрольная группа включала 105 мышей, которым инъецировали физиологический раствор. Концентрация глюкозы в крови у животных этой группы до инъекции составила  $3.7 \pm 0.6$  мМ и не изменялась в течение 45 дней (рис. 1в). Экспериментальная группа состояла из 120 мышей, начальная концентрация глюкозы у которых составила  $3.4 \pm 0.2$  мМ. После инъекции аллоксана у мышей данной группы концентрации глюкозы повысилась до  $6.7 \pm 0.4$  мМ ( $p < 0.05$  относительно начальных значений) к 10-му дню и до  $10.9 \pm 1.2$  мМ ( $p < 0.05$  относительно начальных значений) к 45-му дню эксперимента (рис. 1в). Все последующие эксперименты у животных с экспериментальным СД проводили на 45-й день после введения аллоксана при концентрации глюкозы в крови не менее 9 мМ.

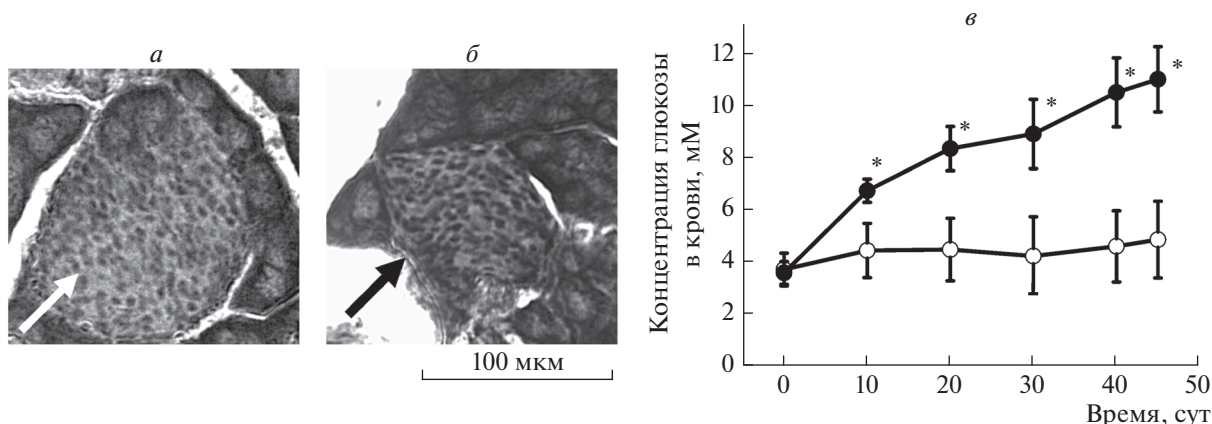
**Особенности секреции медиатора при экспериментальном сахарном диабете в условиях одиночной и высокочастотной стимуляции.** При одиночной стимуляции в контроле средняя амплитуда ПКП составила  $1.54 \pm 0.08$  мВ, время нарастания ПКП –  $0.64 \pm 0.39$  мс, время полуспада –  $2.10 \pm 0.10$  мс ( $n = 17$ ). У животных с экспериментальным СД амплитуда ПКП составила  $1.46 \pm 0.10$  мВ, время нарастания ПКП –  $0.60 \pm 0.62$  мс, время полуспада –  $2.03 \pm 0.10$  мс ( $n = 11$ ). Таким образом, амплитудно-временные параметры ПКП у животных с экспериментальным СД не отличались от параметров у контрольных животных.

В контроле высокочастотное раздражение двигательного нерва (50 Гц, 1 мин) сопровождалось характерными изменениями амплитуды ПКП. После кратковременной фазы облегчения (к пятому сигналу –  $118 \pm 6\%$  от исходной ( $p < 0.05$ )) наблюдалось резкое снижение амплитуды ПКП, которое к 11-му сигналу достигло  $54 \pm 5\%$  ( $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 2а, вкладка). К 10 с стимуляции амплитуда ПКП снижалась до  $39 \pm 3\%$ . Затем в течение последующих 20 с раздражения, наблюдалось состояние плато на уровне примерно 35% от исходной величины, после чего происходило медленное снижение амплитуды ПКП, которая к концу стимуляции составила  $26 \pm 3\%$  ( $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 2а). Восстановление амплитуды ПКП после окончания высокочастотного раздражения происходило очень быстро. Уже в ответ на первое одиночное раздражение (через 1 с) амплитуда ПКП составила  $81 \pm 10\%$ , а через 10 с –  $192 \pm 26\%$  ( $n = 15$ ) от исходной (рис. 2а).

У животных с экспериментальным СД динамика амплитуд ПКП в течение первой секунды высокочастотной стимуляции не отличалась от контрольной (рис. 2а вкладка). Фаза облегчения составила  $112 \pm 3\%$  ( $n = 11$ ,  $p > 0.05$ ), первоначальный спад амплитуды ПКП достигал к 11-му сигналу  $49 \pm 5\%$  ( $n = 11$ ,  $p > 0.05$ ). Однако к 10 с стимуляции амплитуда ПКП снижалась до  $25 \pm 3\%$ , что достоверно ниже значений, полученных в контрольных условиях ( $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ). К концу стимуляции амплитуда ПКП составила  $10 \pm 2\%$  ( $n = 11$ ,  $p < 0.05$ ) (рис. 2а). Восстановление амплитуды ПКП после высокочастотной стимуляции происходило более медленно – в ответ на первый одиночный стимул (через 1 с) амплитуда ПКП составила  $52 \pm 8\%$ , а через 10 с –  $106 \pm 22\%$  ( $n = 9$ ) от начального уровня (рис. 2а). Таким образом, у животных с экспериментальным СД наблюдалась более глубокая депрессия ПКП при высокочастотном раздражении и замедленное восстановление амплитуды ПКП по сравнению с контрольными животными.

Известно, что амплитуда ПКП пропорциональна количеству освободившихся квантов медиатора и, соответственно, количеству везикул, слившихся с пресинаптической мембраной в ответ на раздражение [23]. Сравнение кумулятивных кривых амплитуд ПКП в контроле и в условиях экспериментального СД показало снижение суммарной амплитуды ПКП у модельных животных на 26%, что свидетельствует об уменьшении общего количества квантов медиатора, выделившихся из нервного окончания в процессе всего периода высокочастотного раздражения (рис. 2б).

**Интенсивность эндоцитоза синаптических везикул в условиях экспериментального сахарного диабета.** Показателем загрузки красителя FM 1-43 в нервное окончание при эндоцитозе синаптических везикул служит появление характерного све-



**Рис. 1.** Морфологические изменения ткани поджелудочной железы и концентрация глюкозы в крови и при экспериментальном сахарном диабете. Ткань поджелудочной железы в контроле (а) и при экспериментальном сахарном диабете (б). Стрелка указывает на островок Лангерганса. Видно, что в условиях экспериментального сахарного диабета (на 45-й день после введения аллоксана) наблюдается уменьшение площади островков. в – Динамика концентрации глюкозы в крови у мышей в контроле после инъекции физиологического раствора (белые круги) и аллоксана (250 мг/кг) (черные круги).

чения нервных терминалей (рис. 3з). Для анализа интенсивности процессов эндоцитоза использовали три протокола “загрузки” красителя (см. методику, рис. 3а). Как показано на рис. 3б, у контрольных животных свечение нервных терминалей при загрузке красителем по первому протоколу составило  $85 \pm 3$  отн. ед. ( $n = 14$ ); по второму –  $56 \pm 2$  отн. ед. ( $n = 15$ ); по третьему –  $87 \pm 3$  отн. ед. ( $n = 13$ ). Более высокая интенсивность свечения терминалей при загрузке во время высокочастотной стимуляции (протокол 1) свидетельствует о преобладании процессов быстрого эндоцитоза в нервном окончании мышцы в данных условиях [23, 24].

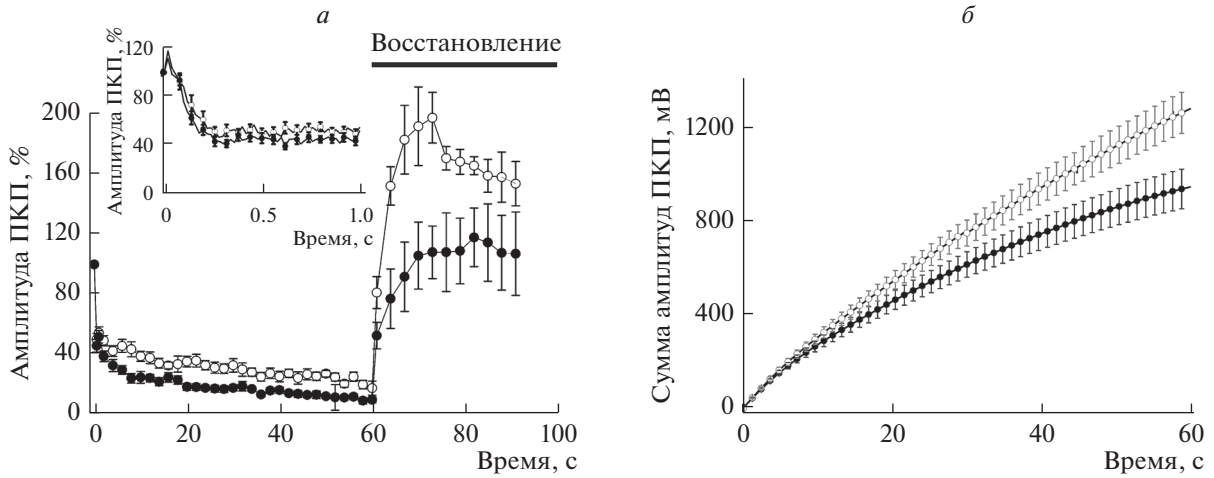
У животных с экспериментальным СД происходило усиление свечения нервных терминалей при всех трех протоколах “загрузки” красителя:  $99 \pm 3$  отн. ед. ( $n = 10, p < 0.05$ ),  $65 \pm 2$  отн. ед. ( $n = 7, p < 0.05$ ) и  $96 \pm 2$  отн. ед. ( $n = 8, p < 0.05$ ) соответственно (рис. 3б). На основании этих данных предположили, что при экспериментальном СД изменяется соотношения быстрого и медленного эндоцитоза за счет усиления вклада медленного.

Недавние исследования показали, что GSK3 является существенным фактором для запуска медленного пути эндоцитоза [15]. Вклад медленного пути рециклирования синаптических везикул оценивали с использованием блокатора GSK3 1-azakenpaullone в концентрации 2 мкМ [25]. Оказалось, что в контроле 1-azakenpaullone (30 мин действия) не влиял на свечение нервных терминалей, загруженных по третьему протоколу ( $81 \pm 4$  отн. ед.,  $n = 5$ , рис. 3в,з). В то же время у животных с экспериментальным СД свечение снижалось до  $65 \pm 2$  отн. ед., ( $n = 6, p < 0.05$ , рис. 3в,з), что достоверно меньше загрузки красителя у модель-

ных животных в отсутствие блокирования GSK3. Таким образом, у модельных мышей усиливаются процессы медленного эндоцитоза синаптических везикул, и этот феномен предотвращается ингибированием GSK3.

**Экзоцитоз синаптических везикул при экспериментальном сахарном диабете.** Для определения динамики экзоцитоза синаптических везикул регистрировали уменьшение интенсивности свечения (“выгрузка” красителя) предварительно загруженных нервных терминалей при стимуляции с частотой 50 Гц (рис. 3д,е) [21, 23] в течение 20 мин. В контроле интенсивность свечения нервных окончаний к 15 с стимуляции составила  $70 \pm 2\%$ , к 30 с –  $63 \pm 2\%$ , к концу 1 мин –  $55 \pm 3\%$ , по отношению к начальному уровню свечения ( $n = 12$ ). К 20 мин стимуляции происходила полная выгрузка красителя и свечение терминалей практически не регистрировалось. У животных с экспериментальным СД обесцвечивание нервных терминалей в течение первых 3 мин происходило медленнее, чем в контроле (рис. 3д). Так, к 15 с стимуляции интенсивность свечения составила  $83 \pm 2\%$ , к 30 с –  $74 \pm 3\%$ , к концу первой минуты –  $64 \pm 2\%$ , ( $n = 10, p < 0.05$ ). После 3–5 мин стимуляции динамика выгрузки красителя не отличалась от контроля. Таким образом, у животных с экспериментальным СД при высокочастотном раздражении окрашенные везикулы теряют краситель более медленно.

**Математическое моделирование изменений, происходящих в нервном окончании, при экспериментальном сахарном диабете.** Дополнительный анализ механизмов изменения процессов экзо- и эндоцитоза при СД проводили с помощью математического моделирования везикулярного цик-



**Рис. 2.** Динамика секреции медиатора во время высокочастотной стимуляции в контроле и у животных с экспериментальным сахарным диабетом. *а* – Изменение амплитуды ПКП в течение 1 мин стимуляции с частотой 50 Гц в контроле (белые круги) и в условиях экспериментального СД (черные круги). На вкладке представлена динамика амплитуды ПКП в течение первой 1 с раздражения. *б* – Кумулятивные кривые амплитуд ПКП при стимуляции с частотой 50 Гц в течение 1 мин в контроле (белые круги) и в условиях экспериментального СД (черные круги).

ла. В модели рассматриваются два пула везикул, объединенный рециклирующий (докированные и мобилизационные) –  $V_d$  и резервный –  $V_s$  (рис. 4а). Приблизительные размеры этих пулов (7000 и 50000 везикул) подобраны по морфологическим описаниям нервно-мышечного синапса теплокровных в [26, 27] (таблица). Экзоцитоз везикул происходит при каждом раздражении, и число высвобожденных квантов медиатора прямо пропорционально количеству везикул в рециклирующем пуле. Коэффициент пропорциональности равен вероятности экзоцитоза одной везикулы при раздражении ( $psr$ ). При этом происходит непрерывное перемещение везикул из резервного пула в рециклирующий и обратно. Интенсивности перемещений выражаются параметрами  $kd_+$ ,  $kd_-$  соответственно (рис. 4а, таблица).

В модели рассматриваются два вида эндоцитоза – быстрый и медленный (рис. 4а). После экзоцитоза (пунктирная стрелка,  $psr$ ) везикулы встраиваются в пресинаптическую мембрану, образуя пул мембранного материала, подлежащего эндоцитозу ( $Ve$ ). При восстановлении вновь образованная везикула попадает, захватывая краситель, либо сразу в рециклирующий пул (быстрый эндоцитоз – стрелка  $ed$ ), либо в резервный (медленный эндоцитоз – стрелка  $es$ ) (рис. 4а) [22, 23]. Ниже приведен вид дифференциальных уравнений, соответствующих описанной модельной схеме:

$$\frac{\partial V_d}{\partial t} = -psr \cdot V_d + kd_+ \cdot lmd(V_d) \cdot V_s - kd_- \cdot V_d + ed \cdot lmd(V_d) \cdot Ve,$$

$$\frac{\partial V_s}{\partial t} = kd_- \cdot V_d + es \cdot Ve - kd_+ \cdot lmd(V_d) \cdot V_s,$$

$$\frac{\partial Ve}{\partial t} = psr \cdot V_d - ed \cdot lmd(V_d) \cdot Ve - es \cdot Ve,$$

$$V_d + V_s + Ve = V_d(t = 0) + V_s(t = 0),$$

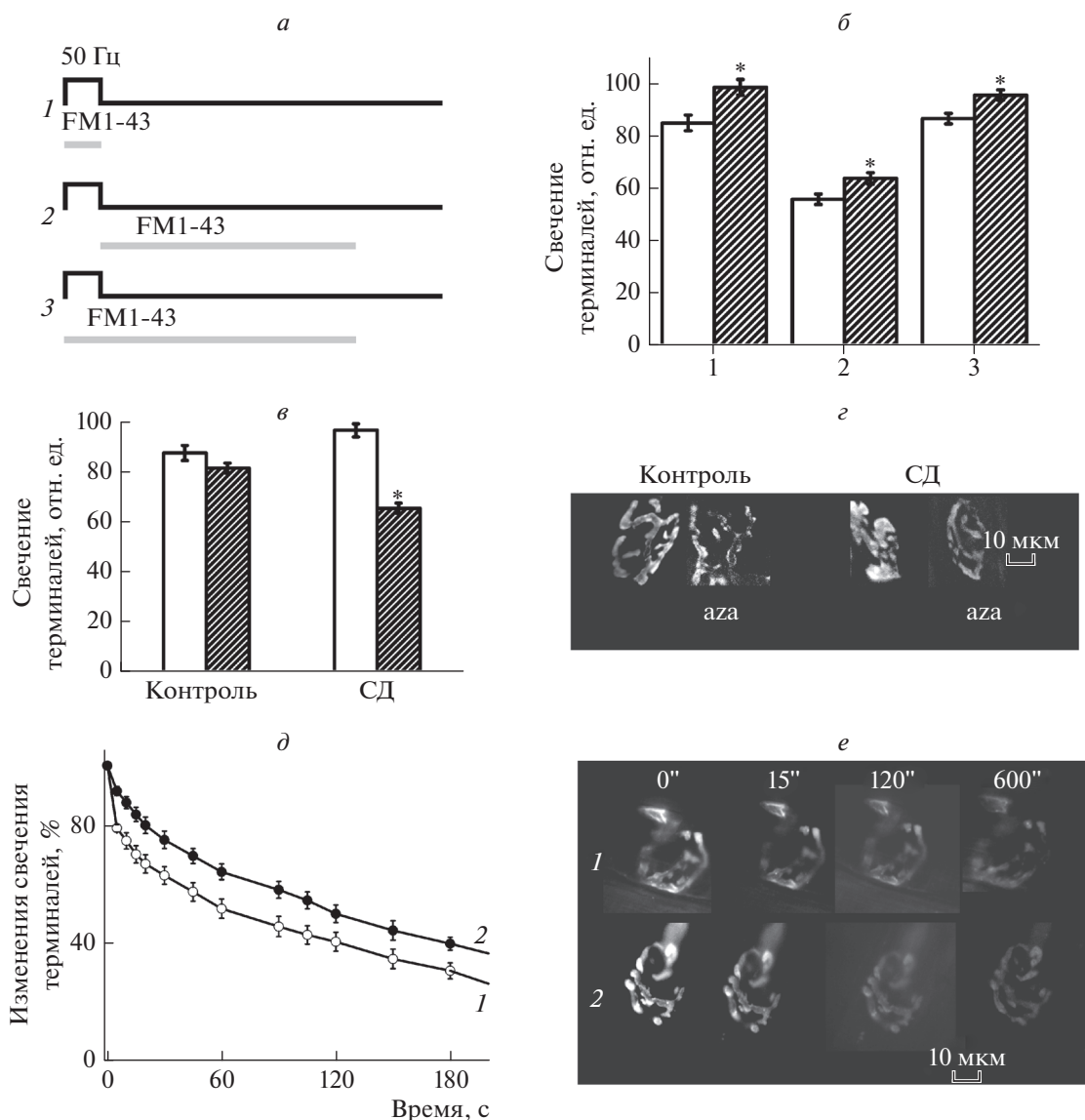
где  $lmd(V_d) = (V_d(t = 0) - V_d(t)) / V_d(t = 0)$  – функция, отражающая ограниченную емкость пула докированных и мобилизованных везикул. Для описания динамики красителя, захваченного при эндоцитозе, составлены следующие уравнения:

$$\begin{aligned} \frac{\partial pdvV_d}{\partial t} &= -psr \cdot pdvV_d + kd_+ \cdot lmd(V_d) \cdot pdvV_s - kd_- \cdot pdvV_d + \frac{\partial pdvV_s}{\partial t} = \\ &= es \cdot Ve \cdot dye(t) + kd_- \cdot pdvV_d - kd_+ \cdot lmd(V_d) \cdot pdvV_s, \end{aligned}$$

где  $pdvV_d$  и  $pdvV_s$  – количество окрашенных везикул в докированном и резервном пулах соответственно,  $dye(t)$  – функция, равная единице в период присутствия красителя в растворе (в соответствии с протоколом загрузки–выгрузки), и нулю в остальные моменты времени.

Решение уравнений производили численно явным методом Эйлера с шагом интегрирования 0.2 мс.

Основной целью исследования на математической модели был поиск различий характеристик везикулярного цикла в контроле и при СД. Для этого подбирали такие параметры моделей ( $psr$ ,  $kd_+$ ,  $kd_-$ ,  $ed$ ,  $es$ ), которые приводили бы к воспроизведению: как электрофизиологических экспериментальных данных – секреции медиато-

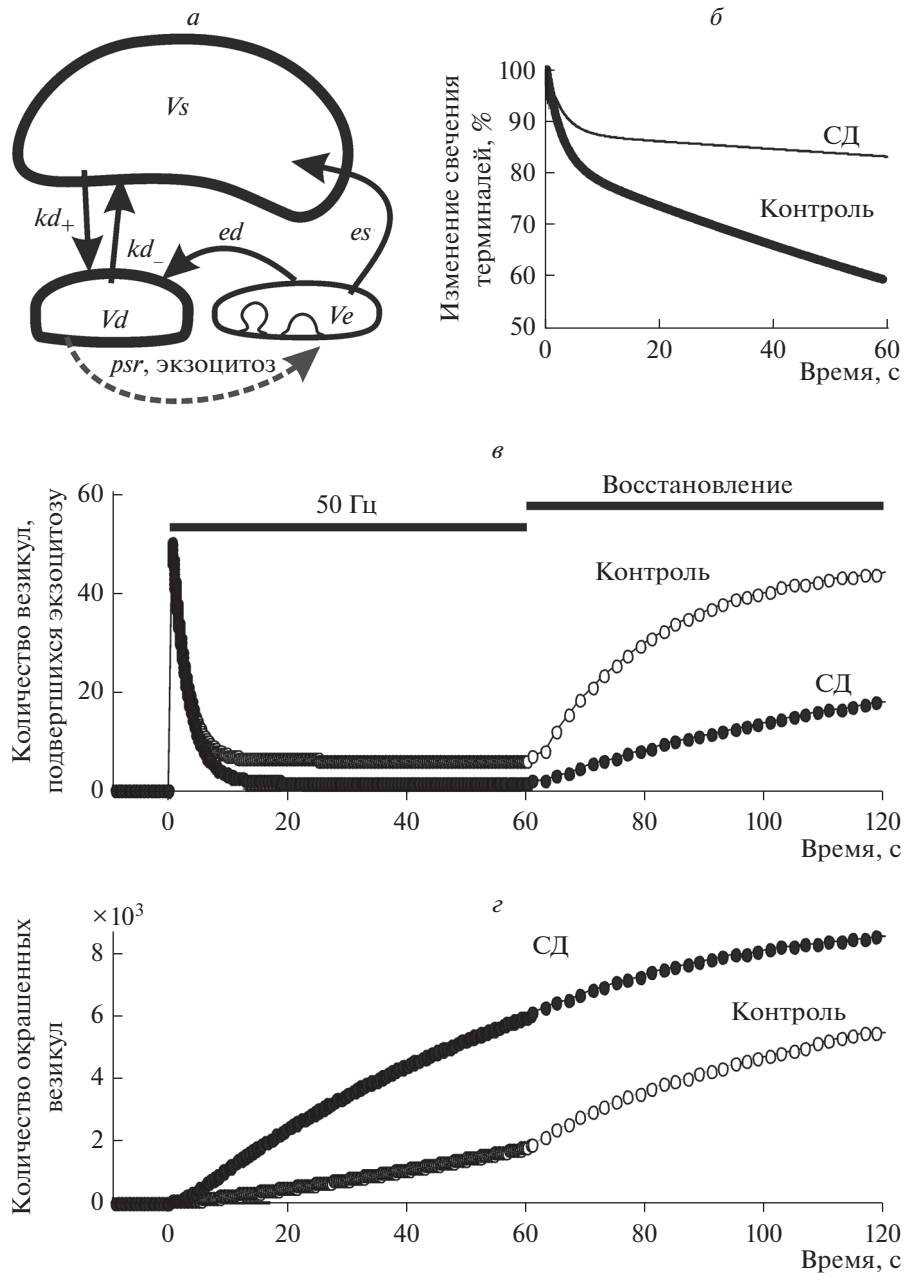


**Рис. 3.** Процессы эндо- и экзоцитоза синаптических везикул в двигательном нервном окончании мышцы в условиях экспериментального сахарного диабета. *a* – Схемы протоколов, используемых для загрузки терминалей: 1 – FM 1-43 присутствовал в растворе в течение 1 мин во время стимуляции, 2 – FM 1-43 присутствовал в растворе в течение 7 мин после окончания стимуляции, 3 – FM 1-43 присутствовал в растворе в течение 1 мин стимуляции и 7 мин после ее окончания. *б* – Интенсивность свечения нервных терминалей в контроле (белые столбики) и при экспериментальном сахарном диабете (заштрихованные столбики) при “загрузке” красителя в соответствии с протоколами 1–3. *в* – Влияние блокатора GSK3 – 1-azakenpaullone (2 мкМ, Aza) на интенсивность свечения нервных терминалей в контроле, при экспериментальном сахарном диабете (СД, белые столбики) и при добавлении 1-azakenpaullone (заштрихованные столбики) при “загрузке” красителя в соответствии с протоколом 3. *г* – Примеры терминалей, окрашенных FM 1-43, при блокировании медленного эндоцитоза (aza) в контроле и при экспериментальном сахарном диабете (СД). *д* – Динамика интенсивности свечения нервных окончаний, предварительно окрашенных флуоресцентным красителем FM 1-43, при стимуляции с частотой 50 Гц в течение первых 3 мин. Белые круги (1) отражают динамику спада в контроле, черные круги (2) – в условиях сахарного диабета. *е* – Примеры терминалей, предварительно окрашенных FM 1-43, во время разгрузки к 15, 120, 600 с стимуляции (50 Гц) в контроле (1) и при экспериментальном сахарном диабете (2).

ра, так и оптических – изменения светимости терминалей при загрузке–выгрузке красителя.

Целевую функцию рассчитывали как сумму квадратов разностей соответствующих по времени экспериментальных и модельных значений измеряемых величин (квантовый состав и свече-

ние терминали). После предварительной оптимизации параметров модели с помощью комбинации прямого покоординатного поиска экстремума целевой функции и генетического алгоритма [22], производили ручной (под контролем оператора) подбор конечных значений параметров.



**Рис. 4.** Математическое моделирование процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в контроле и при экспериментальном сахарном диабете. *a* – Схема процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул в нервном окончании мышцы. *б* – Количественные характеристики везикулярных пулов и кинетических параметров везикулярного цикла в двигательных нервных окончаниях в контроле и при экспериментальном сахарном диабете.  $V_s$  – резервный пул,  $V_d$  – рециклирующий, объединяющий докированный и мобилизационный пулы,  $V_e$  – мембранный материал, встроенный в пресинаптическую мембрану, образованный везикулами, прошедшими экзоцитоз;  $es$  и  $ed$  – константы скоростей поступления вновь образованных везикул в резервный (медленный путь эндоцитоза) и рециклирующий (быстрый путь эндоцитоза) пулы соответственно;  $kd_+$ ,  $kd_-$  – константы скорости перехода везикул из резервного пула в рециклирующий и обратно;  $psr$  – вероятность высвобождения везикулы при стимуляции. Стрелки указывают увеличение или уменьшение констант. *в* – Модельное воспроизведение количества везикул, подвергшихся экзоцитозу и освободивших медиатор при высокочастотной стимуляции (1 мин, 50 Гц), а также восстановления везикул в рециклирующем пуле (0.2 Гц) в контроле (белые круги) и при экспериментальном сахарном диабете (СД, черные круги). *z* – Модельное воспроизведение количества везикул, захвативших краситель во время и после высокочастотной стимуляции, в контроле (белые круги) и при экспериментальном сахарном диабете (СД, черные круги). *д* – Модельное воспроизведение изменения свечения предварительно загруженных нервных терминалей в условиях высокочастотной стимуляции (50 Гц, 1 мин) в контроле и при экспериментальном сахарном диабете (СД).

Количественные характеристики везикулярных пулов и кинетических параметров везикулярного цикла в двигательных нервных окончаниях в контроле и при экспериментальном сахарном диабете

Параметры	Контроль	Диабет
$kd_+$ , 1/c	0.0062	0.0009 (<)
$kd_-$ , 1/c	0.0004	0.0004
$ed$ , 1/c	0.00522	0.00522
$es$ , 1/c	0.00237	0.0237 (>)
$psr$	0.007175	0.007175
$Vd$ , шт.	7000	7000
$Vs$ , шт.	50000	50000

С использованием данной математической модели показано, что наблюдаемое в экспериментах изменение динамики секреции медиатора, загрузки и выгрузки красителя при СД качественно воспроизводится при изменении двух параметров модели относительно контрольных значений (таблица). Во-первых, увеличение скорости перехода вновь образованных везикул в резервный пул ( $es$ ), что отражает факт преобладания восстановления везикул по длинному пути при СД (рис. 4а–з). Во-вторых, уменьшение скорости перехода везикул из резервного пула в рециклирующий –  $kd_+$  (рис. 4а). Эти результаты указывают на то, что при СД восстановление везикул происходит преимущественно по длинному пути, т.е. доля быстрого рециклирования заметно снижается. Как следствие увеличивается депрессия секреции медиатора при высокочастотном раздражении (рис. 4б). Также наблюдается большее накопление красителя в терминалях, который медленнее выгружается при последующих раздражениях (рис. 4б,з).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Диабетическая нейропатия – одно из наиболее распространенных осложнений СД [2, 28–30]. Нарушения синаптической передачи при СД характерны для периферической и центральной нервной системы и сопровождаются как двигательными расстройствами, так и нарушением когнитивных функций [31]. В нашем исследовании с использованием электрофизиологического и флуоресцентного подходов, а также математического моделирования изучены изменения процессов секреции медиатора и рециклирования синаптических везикул в двигательном нервном окончании мышцы в условиях экспериментального СД.

Для моделирования СД использовали аллоксан, имеющий два механизма действия на ткань поджелудочной железы. Во-первых, аллоксан селективно подавляет глюкозозависимую секре-

цию инсулина, ингибируя глюкокиназу, сенсор глюкозы. Во-вторых, в клетках аллоксан превращается в диалуровую кислоту, что сопровождается генерацией активных форм кислорода [19, 32]. В результате окислительного стресса развивается некроз клеток поджелудочной железы, что является одним из механизмов формирования СД типа 1. Для подтверждения формирования СД типа 1 у мышей опытной группы были проведены гистологические исследования, которые показали выраженные дегенеративные изменения островков Лангерганса и увеличение концентрации сахара в крови.

Для анализа функционального состояния синаптического аппарата при СД оценивали вызванную секрецию медиатора, регистрируя ПКП в условиях одиночной и высокочастотной стимуляции. Анализ ПКП в условиях одиночной стимуляции в контроле и при экспериментальном СД не выявил значительных отличий в их амплитудно-временных параметрах, что свидетельствует об отсутствии изменений в квантовом составе ПКП и механизмах взаимодействия медиатора с постсинаптической мембраной. Наши результаты не согласуются с некоторыми ранее полученными данными. Так, в ряде экспериментальных работ обнаружено снижение амплитуды спонтанных и вызванных ПКП [3, 4, 7, 9, 10]. Другие работы наоборот свидетельствуют об увеличении амплитуды и времени спада миниатюрных и вызванных токов концевой пластинки [9, 10]. По-видимому, эти противоречия связаны с множественными повреждениями, возникающими в области нервно-мышечного соединения в условиях длительной гипергликемии, такими как нарушение функций митохондрии, системы Т-трубочек и миофибрилл, экспрессии и распределения ацетилхолиновых рецепторов на постсинаптической мембране, уменьшение экспрессии и активности ацетилхолинэстеразы [6, 7, 9, 10, 33, 34]. Можно думать, что неоднозначные результаты изучения синаптических нарушений связаны со способом формирования модели СД (с помощью аллоксана или стрептозоцина), сроками исследований, выраженностью гипергликемии, видом животного и типом мышцы, которые могут отличаться по чувствительности к гипергликемии в зависимости от состава мышечных волокон.

В то же время при высокочастотной активности нервно-мышечного синапса нами обнаружены выраженные изменения, связанные с нарушением везикулярного транспорта. Высокочастотная активность является естественным способом функционирования диафрагмальной мышцы, и процессы кругооборота синаптических везикул играют ключевую роль в обеспечении синаптической передачи в таких условиях. Поэтому мы исследовали динамику амплитуд ПКП в условиях стимуляции с частотой 50 Гц. Высокочастотное



раздражение двигательного нерва в контроле сопровождалось первоначальным быстрым спадом секреции медиатора (рис. 2а), который отражает быстрое расходование пула везикул готовых для освобождения медиатора (докированных везикул в области активных зон) [11, 35]. Затем снижение секреции медиатора сменяется длительным состоянием плато, которое, по всей видимости, связано с очень быстрыми процессами восстановления пула докированных везикул [11, 12]. О высокой скорости выполнения пула докированных везикул свидетельствует быстрое (в течение 5 с) восстановление амплитуды ПКП после окончания высокочастотного раздражения в контроле (рис. 2а). В условиях экспериментального СД высокочастотная стимуляция приводила к усилению депрессии амплитуд ПКП по сравнению с контролем, начиная примерно с десятой секунды стимуляции (рис. 2а), что, по-видимому, указывает на нарушение выполнения пула докированных везикул в области активных зон. Это подтверждает и более медленное восстановление амплитуды ПКП после окончания высокочастотного раздражения (рис. 2а).

Выполнение пула докированных везикул при высокочастотной активности осуществляется при помощи двух механизмов: быстрого рециклирования и транспорта везикул из резервного пула. Можно предположить, что у экспериментальных животных нарушаются оба механизма. Известно, что рециклирование и повторное использование синаптических везикул обеспечивается двумя основными путями эндоцитоза — кла-ринзависимым быстрым и медленным [35, 36]. Можно думать, что при экспериментальном СД усиливается именно второй медленный путь. Об этом свидетельствуют следующие экспериментальные факты. Во-первых, увеличение свечения загруженных FM 1-43 терминалей (рис. 3б), что связано с большим поступлением везикул захвативших краситель в резервный пул. В контроле при длительной высокочастотной активности везикулы захватывают краситель путем быстрого эндоцитоза и повторно участвуют в экзоцитозе (короткий быстрый путь), теряя краситель. Если усиливается медленный путь с поступлением везикул в резервный пул, то краситель не успевает выделиться из этих везикул при высокочастотной активности, и количество красителя в нервном окончании возрастает. Во-вторых, блокатор рефосфорилирования динамина 1 GSK3 [15] не изменял свечения в контрольных условиях, но значительно его снижал в условиях СД. Кроме того, усиление депрессии при высокочастотном раздражении также может быть связано с усилением медленного эндоцитоза путем уменьшения количества везикул, доступных к быстрому освобождению, как это наблюдалось в гиппокампе, где

блокатор GSK3 восстанавливал высокочастотную депрессию [15].

По-видимому, медленный путь эндоцитоза не играет существенной роли в рециклировании синаптических везикул в контроле, однако, активируется у мышей с моделью СД. Эти построения подтверждаются данными о том, что при СД в тканях повышена активность GSK3, которая подавляет функцию основных мишеней инсулина, например, гликоген-синтазы [25].

По всей видимости, при экспериментальном СД также замедляются процессы транспорта везикул из резервного пула в пул докированных везикул, что также приводит к усилению депрессии секреции медиатора (амплитуды ПКП) (рис. 2а). На это указывает и более медленная выгрузка красителя из нервных окончаний (рис. 3д,е). Нарушения транспорта везикул при экспериментальном СД могут быть связаны с дезорганизацией цитоскелета, обнаруженной в морфологических исследованиях, и нарушением работы миозиновых моторов, транспортирующих везикулы к активным зонам [7].

Наши предположения о механизмах изменений везикулярного цикла в двигательных нервных терминалях при экспериментальном СД полностью подтверждаются данными математического моделирования. В модельных экспериментах показано, что изменения секреции медиатора, процессов экзо- и эндоцитоза синаптических везикул при СД связаны с усилением медленного эндоцитоза и нарушениями транспорта везикул в нервном окончании (рис. 4).

Таким образом, установлено, что в условиях моделирования экспериментального СД происходит нарушение процесса рециклирования и повторного использования синаптических везикул при высокочастотной активности. Эти изменения связаны с усилением медленного пути эндоцитоза вследствие повышения активности GSK3, а также с замедлением транспорта синаптических везикул в нервном окончании, ведущими к более глубокой депрессии секреции медиатора при высокочастотной активности. Данный феномен может лежать в основе нарушений функции периферического синапса при СД.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vincent A.M., Callaghan B.C., Smith A.L., Feldman E.L. 2011. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat. Rev. Neurol.* 7 (10), 573–583.
2. Said G. 2007. Focal and multifocal diabetic neuropathies. *Arq. Neuropsiquiatr.* 65 (4B), 1272–1278.
3. Constantini S., Schiller Y., Cohen A.M., Rahamimoff R. 1987. Pathophysiology of the neuromuscular junction in diabetic rats. *Isr. J. Med. Sci.* 23 (1–2), 101–106.

4. Kimura I., Okazaki M., Kimura M. 1993. Streptozocin-diabetes modifies acetylcholine release from mouse phrenic nerve terminal and presynaptic sensitivity to succinylcholine. *Jpn. J. Pharmacol.* **62** (1), 35–41.
5. Magariños A.M., McEwen B.S. 2000. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97** (20), 11056–11061.
6. Fahim, A.M., Al Shuaib W., Davidson N. 1999. Depolarization affects neuromuscular junction of streptozotocin-diabetic mice. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand).* **45** (2), 259–263.
7. Fahim M.A., Hasan M.Y., Alshuaib W.B. 2000. Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *J. Appl. Physiol.* **89** (6), 2235–2240.
8. Marques M.J., Santo Neto H. 2002. Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of non-obese diabetic mice. *Anat. Rec.* **267** (2), 112–119.
9. Souayah N., Potian J.G., Garcia C.C., Krivitskaya N., Boone C., Routh V.H., Mc Ardle J.J. 2009. Motor unit number estimate as a predictor of motor dysfunction in an animal model of type 1 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **297** (3), E602–608.
10. Garcia C.C., Potian J.G., Hognason K., Thyagarajan B., Sultatos L.G., Souayah N., Routh V.H., Mc Ardle J.J. 2012. Acetylcholinesterase deficiency contributes to neuromuscular junction dysfunction in type 1 diabetic neuropathy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303** (4), E551–561.
11. Rizzoli S.O., Betz W.J. 2005. Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* **6** (1), 57–69.
12. Richards D.A., Guatimosim C., Betz W.J. 2000. Two endocytic recycling routes selectively fill two vesicle pools in frog motor nerve terminals. *Neuron.* **27** (3), 551–559.
13. Deák F., Schoch S., Liu X., Südhof T.C., Kavalali E.T. 2004. Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nat. Cell. Biol.* **6** (11), 1102–1108.
14. Clayton E.L., Anggono V., Smillie K.J., Chau N., Robinson Ph.J., Cousin M.A. 2009. The phospho-dependent dynamin-syndapin interaction triggers activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *J. Neurosci.* **29**, 7706–7717.
15. Clayton E.L., Sue N., Smillie K.J., O’Leary T., Bache N., Cheung G., Cole A.R., Wyllie D.J., Sutherland C., Robinson P.J., Cousin M.A. 2010. Dynamin I phosphorylation by GSK3 controls activity-dependent bulk endocytosis of synaptic vesicles. *Nat. Neurosci.* **13** (7), 845–851.
16. Saheki Y., De Camilli P. 2012. Synaptic vesicle endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **4** (9), a005645.
17. Зефирова А.Л. 2007. Везикулярный цикл в пресинаптическом нервном окончании. *Росс. физиол. журн.* **5**, 544–562.
18. Wu L-G., Hamid E., Shin W., Chiang H-Ch. 2014. Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* **76**, 22.1–22.31.
19. Lenzen S. 2008. The mechanisms of alloxan- and streptozocin-induced diabetes. *Diabetologia.* **51**, 216–226.
20. Sitdikova G.F., Islamov R.R., Mukhameyarov, Permyakova V.V., Zefirov A.L., Palotas A. 2007. Modulation of neurotransmitter release by carbon monoxide at the frog neuro-muscular junction. *Curr. Drug Metab.* **8** (2), 177–184.
21. Yakovleva O.V., Shafigullin M.U., Sitdikova G.F. 2013. The role of nitric oxide in the regulation of neurotransmitter release and processes of exo and endocytosis of synaptic vesicles in mouse motor nerve endings. *Neurochem. J.* **7** (2), 103–110.
22. Zakharov A.V., Petrov A.M., Kotov N.V., Zefirov A.L. 2012. Experimental and modeling investigation of the mechanism of synaptic vesicles recycling. *Biophysics.* **57** (4), 508–518.
23. Зефирова А.Л., Петров А.М. Гиниатуллин А.Р. 2008. Роль сигнального каскада цАМФ в круговороте синаптических везикул двигательного нервного окончания. *Нейрохимия.* **3**, 202–210.
24. Betz W.J., Angelson J.K. 1998. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 347–363.
25. Forde J.E., Dale T.C. 2007. Glycogen synthase kinase 3: a key regulator of cellular fate. *Cell Mol. Life Sci.* **64** (15), 1930–1944.
26. Schneggenburger R., Meyer A.C., Neher E. 1999. Released fraction and total size of a pool of immediately available transmitter quanta at a calyx synapse. *Neuron.* **23** (2), 399–409.
27. Sakaba T., Neher E. 2001. Quantitative relationship between transmitter release and calcium current at the calyx of held synapse. *J. Neurosci.* **21** (2), 462–476.
28. Pirart J., Lauvaux J.P., Rey W. 1978. Degenerative diabetic complications. Is persistent hyperglycemia more dangerous than wide glycemic fluctuations? *Nouv Presse Med.* **7** (44), 4031–4035.
29. Brown M.J., Asbury A.K. 1984. Diabetic neuropathy. *Ann. Neurol.* **15** (1), 2–12.
30. Guy R.J., Dawson J.L., Garrett J.R., Laws J.W., Thomas P.K., Sharma A.K., Watkins P.J. 1984. Diabetic gastroparesis from autonomic neuropathy: surgical considerations and changes in vagus nerve morphology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **47** (7), 686–691.
31. Biessels G.J., Gispen W.H. 2005. The impact of diabetes on cognition: what can be learned from rodent models? *Neurobiol. Aging.* **1**, 36–41.
32. Szkudelski T., Kandulska K., Okulicz M. 1998. Alloxan *in vivo* does not only exert deleterious effects on pancreatic B cells. *Physiol. Res.* **47** (5), 343–346.
33. Nimnual A.S., Chang W., Chang N.S., Ross A.F., Gelman M.S., Prives J.M. 1998. Identification of phosphorylation sites on AChR delta-subunit associated with dispersal of AChR clusters on the surface of muscle cells. *Biochemistry.* **37** (42), 14823–14832.
34. Kiss G., Somogui Y., Ver I. 2001. Streptozocin-induced diabetes alters the oligomerization pattern of acetylcholinesterase in rat skeletal muscle. *Diabetologia.* **44**, 220–223.
35. Rosenmund C., Stevens C.F. 1996. Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapse. *Neuron.* **16** (6), 1197–1207.
36. Zhu Y., Xu J., Heinemann S.F. 2009. Two pathways of synaptic vesicle retrieval revealed by single-vesicle imaging. *Neuron.* **61** (3), 397–411.

## Analysis of Exo- and Endocytosis in the Mouse Nerve Ending in Experimental Diabetes Mellitus

O. V. Yakovleva<sup>1,\*</sup>, A. V. Zaharov<sup>1,2</sup>, A. L. Zefirov<sup>2</sup>, G. F. Sitdikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Privolzhskii) Federal University, ul. Kremlevskaya 18, Kazan, 420008 Russia*

<sup>2</sup>*Kazan Medical University, ul. Butlerova 49, Kazan, 420039 Russia*

\*e-mail: a-olay@yandex.ru

Diabetes mellitus (DM) is a systemic disease characterized by changes in many organs and tissues, including the motor system. The aim of this work was a study of the processes of exo- and endocytosis in the motor nerve ending of mouse diaphragm during high-frequency activity in experimental alloxan model of DM. Endplate potentials (EPPs) was recorded using intracellular microelectrodes during single and high-frequency (50 Hz, 1 min) stimulation. In mice with experimental DM the amplitude-temporary parameters of EPPs did not differ from the control; however, an increase in the EPPs depression and a slower recovery was observed during high frequency stimulation. Using an endocytosis dye FM 1-43, it was shown that in animals with experimental DM the intensity of fluorescence of nerve terminals loaded by high-frequency stimulation was higher than in control. This effect was prevented by an inhibitor of slow dynamin-mediated endocytosis – 1-azakenpallone (2  $\mu$ M). In addition, the bleaching of pre-loaded nerve terminals during high-frequency stimulation was slower in animals with DM. The obtained results suggest that in experimental DM the recycling of synaptic vesicles via the long path becomes more pronounced and the mechanisms of the vesicular transport are impaired. This hypothesis was confirmed by methods of mathematical modeling.

**Keywords:** diabetes mellitus, neuromuscular junction, synaptic vesicles, exocytosis, endocytosis, mathematical modeling