

УДК 612.816.7

**ИЗМЕНЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ЭНДОЦИТОЗА
СИНАПТИЧЕСКИХ ВЕЗИКУЛ В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА
В РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ МЫШЦ**

Е.Д. Курмашова, О.В. Яковлева, Г.Ф. Ситдикова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
E-mail: a-olay@yandex.ru

Яковлева Ольга Владиславовна, канд. биол. наук, старший преподаватель кафедры физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

E-mail: a-olay@yandex.ru

Область научных интересов: физиология, синаптический аппарат, нейромедиаторы, регуляция сердечной деятельности.

Ситдикова Гузель Фаритовна, д-р биол. наук, профессор, заведующая кафедрой физиологии человека и животных Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

E-mail:

Guzel.Sitdikova@kpfu.ru

Область научных интересов: физиология, синаптический аппарат, нейромедиаторы, регуляция сердечной деятельности.

Сахарный диабет сильно влияет на биохимические, морфологические и сократительные свойства скелетных мышц. Целью работы явилось выяснение возможности изменения процессов эндоцитоза синаптических везикул при заболевании сахарным диабетом в мышцах мыши различных типов (медленные, быстрые и смешанные). С использованием оптических (флуоресцентных) методов показано, что в условиях моделирования экспериментального сахарного диабета процессы эндоцитоза синаптических везикул в нервных окончаниях камбаловидной мышцы мыши, являющейся мышцей с преобладающими медленных волокон, не изменяются, что свидетельствует о меньшей чувствительности медленных мышечных волокон к воздействию долговременной гипергликемии. При этом показано усиление эндоцитоза синаптических везикул в диафрагмальной мышце и длинном разгибателе большого пальца, что может быть связано с компенсаторными процессами, способствующими поддержанию синаптической передачи у животных с экспериментальным сахарным диабетом.

Ключевые слова:

Сахарный диабет, нервно-мышечное соединение, эндоцитоз, синаптические везикулы.

Сахарный диабет – это эндокринное заболевание, характеризующееся повышением уровня сахара в крови вследствие абсолютного или относительного дефицита инсулина – гормона поджелудочной железы. Оно вызывает функциональные и морфологические изменения в различных органах и тканях, включая нервную, сердечно-сосудистую и мышечную системы. Одним из серьезных осложнений при сахарном диабете являются периферические нейропатии, которые характеризуются мышечной слабостью уменьшением чувствительности, параличами и атрофией. Известно, что сахарный диабет является болезнью, связанной с нарушением функций митохондрий, а значит накоплением в организме свободных радикалов [1, 2]. Сахарный диабет сильно влияет на биохимические, морфологические и сократительные свойства скелетных мышц. Эти эффекты включают в себя снижение аминокислотного транспорта, изменения в мышцах сократительных свойств и снижение синтеза белка, что ведет к снижению скелетной мышечной массы [3].

Преобладание гликолитического/окислительного пути метаболизма в мышечных волокнах характеризует их как быстрые/медленные волокна соответственно. По содержанию в мышце преимущественно тех или иных типов мышечных волокон мышцы делят условно на быстрые, медленные и смешанные. Известно, что нервно-мышечные соединения быстрых и медленных волокон показывают различные особенности выделения медиатора [4] и реакции на патологические воздействия соответственно.

Таким образом, встает вопрос о том, как изменяются процессы эндоцитоза синаптических везикул при заболевании сахарным диабетом в различных типах мышц.

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах различных типов мышц: *m. Diaphragm* (смешанная мышца), *m. Soleus* (медленная мышца), *m. EDL* (быстрая мышца) лабораторных белых мышей. Нервно-мышечный препарат выделяли и помещали в ванночку, перфузируемую оксигенированным раствором Кребса, содержащим (в мМ): NaCl – 137,0; KCl – 5,0; CaCl₂ – 2,2; MgCl₂ – 1,0; NaH₂PO₄ – 1,0; NaHCO₃ – 16,0; глюкоза – 11,0 ($t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7,2–7,4).

Для исследования процессов эндоцитоза синаптических везикул использовали флуоресцентный маркер FM 1-43 (3 мМ), который обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза синаптических везикул оказывается внутри нервной терминали («загрузка» терминали). Показателем эндоцитоза и загрузки флуоресцентного красителя в синаптические везикулы являлось появление ярко светящихся пятен внутри нервного окончания. Стимуляция двигательных нервов производилась в зависимости от типа мышцы: *m. Diaphragm* с частотой 50 Гц производили в течение 1 минуты, *m. Soleus* – 5 сек 1 Гц и 10 сек 10 Гц в течение 15 минут, *m. EDL* – 60 сек гиперкалиевым раствором Кребса.

Регистрацию свечения нервных окончаний проводили с помощью микроскопа AxioScore A1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного быстродействующей черно-белой видеокамерой AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия). Оценивали среднюю интенсивность свечения в относительных единицах (о.е.), оценивая свечение пикселя от 0 до 256. Все данные обработаны методами вариационной статистики. Количественные результаты исследования представлены в форме: среднее значение \pm стандартное отклонение, n – число независимых экспериментов.

Для создания модели сахарного диабета мышам после суточного голодания внутрибрюшинно инъецировали аллоксан (200 мг/кг, фирма Sigma). Начальный уровень глюкозы у мышей составлял в среднем 4 ± 2 ммМ/л ($n = 55$). На 45-е сутки животных с повышенным уровнем глюкозы (> 9 ммМ/л) выводили из опыта. Забор крови осуществляли из хвостовой вены, изменения производили глюкометром Accu-Chek Active (Германия).

В норме при стимуляции двигательного нерва диафрагмальной мышцы свечение составило 87 ± 3 о.е. ($n = 14$, рис. 1). Исследование влияния сахарного диабета на процессы эндоцитоза синаптических везикул показало, что у животных с экспериментальным сахарным диабетом свечение терминалей диафрагмальной мышцы выше нормы (95 ± 3 о.е., $n = 8$, $p < 0,05$, рис. 1). Мы выбрали для изучения нервно-мышечную передачу во время высокочастотной стимуляции потому, что высокочастотная стимуляция является физиологическим модулятором синаптической передачи, и мы считали, что данное условие поможет нам изучить незначительные изменения, едва выраженные в нормальных условиях. Полученные данные указывают на усиление процессов эндоцитоза синаптических везикул в нервных окончаниях диафрагмальной мышцы мышей с моделью сахарного диабета.

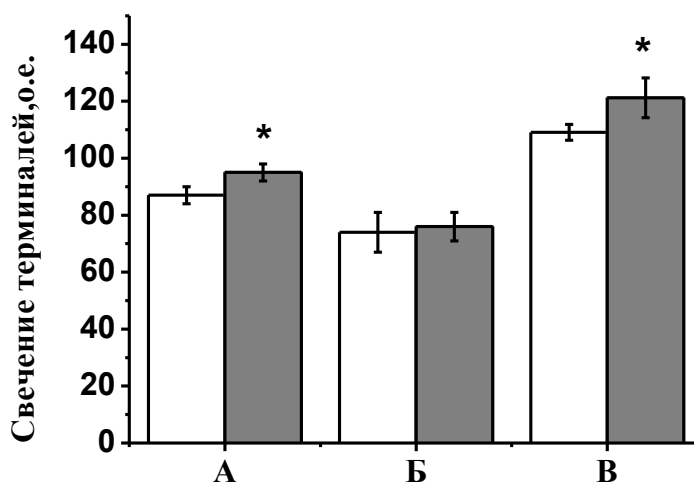


Рис. 1. Влияние экспериментального сахарного диабета на эндоцитоз синаптических везикул (захват красителя FM 1-43 в нервное окончание) при высокочастотной стимуляции (50 Гц). Контроль – белые столбики, в условиях сахарного диабета – окрашенные столбики; А – на препаратах диафрагмальной мышцы; Б – на препаратах камбаловидной мышцы; В – на препаратах EDL; * – $p < 0,05$

В норме свечение терминалей камбаловидной мышцы в контроле составило 74 ± 7 о.е. ($n = 8$, рис. 1). Исследование влияния модели сахарного диабета на процессы эндоцитоза синаптических везикул показало, что в камбаловидной мышце не происходило достоверного изменения свечения терминалей – 76 ± 5 о.е. ($n = 6$, $p > 0,05$, рис. 1). Полученные данные указывают, что в условиях экспериментального сахарного диабета не наблюдается изменений в процессах эндоцитоза синаптических везикул в камбаловидной мышце.

В норме при стимуляции EDL свечение составило 109 ± 3 о.е. ($n = 7$, рис. 1). Исследование влияния сахарного диабета на процессы эндоцитоза синаптических везикул показало, что у животных с экспериментальным сахарным диабетом свечение терминалей диафрагмальной мышцы выше нормы (121 ± 6 о.е., $n = 6$, $p < 0,05$, рис. 1). Полученные данные указывают на усиление процессов эндоцитоза синаптических везикул в нервных окончаниях диафрагмальной мышцы и EDL мышц с моделью сахарного диабета.

Морфологические исследования указывают на то, что при сахарном диабете в нервной терминали наблюдается деградация митохондрий, снижение количества синаптических везикул и дезорганизация цитоскелета [5]. Усиление процессов эндоцитоза у экспериментальных животных, по-видимому, является компенсаторным механизмом, способствующим восполнению рециклирующего пула во время высокочастотной активности. Действительно, ранее было показано, что у диабетических мышечных примерно 10 % всех концевых пластин представляют собой прорастающие синапсы [3], что может являться ответом неповрежденных аксонов на аномальные условия [6]. На камбаловидной мышце при высокочастотной стимуляции показано, что диабетический нерв относительно устойчив к высокой частоте стимулирования и количество тетанических сбоев в нем уменьшается по сравнению с их числом в норме [7]. При сахарном диабете наблюдаются различия в активности ацетилхолинэстераз в различных типах мышц. Так, не были найдены изменения в активности в диафрагмальной мышце [8]. В камбаловидной мышце сохраняется профиль ацетилхолинэстеразы, которая совпадает с характеристикой нормальных медленных мышц [9]. Большие изменения, наблюдаемые в содержании G4 формы ацетилхолинэстеразы диабетических быстрых мышц, имеет важное значение в диабетической дисфункции быстрых мышц [9].

Работа выполнена при поддержке РФФИ № 12-04-97081/12

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lenzen S. The mechanisms of alloxan- and streptozocin-induced diabetes // *Diabetologia* – 2008. – V. 51. – P. 216–226.
2. Desco M.C. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol // *Diabetes*. – 2002 – V. 51, № 4. – P. 1118–1124.
3. Marques M.J., Neto H.S. Acetylcholine Receptors and Nerve Terminal Distribution at the Neuromuscular Junction of Non-obese Diabetic Mice // *The Anatomical Record* – 2002 – V. 267 – P. 112–119.
4. Brian R. Activity-Dependent Plasticity of Transmitter Release from Nerve Terminals in Rat Fast and Slow Muscles// R. Brian, V.N. Martinov, A. Nja, T. Lomo, G.S. Bewick // *The Journal of Neuroscience*. – 2013. – P. 9340–9348.
5. Frid A. New injection recommendations for patients with diabetes / A. Frid, L. Hirsch, R. Gaspar et al. // *Diabetes & Metabolism*. – 2010. – V. 3. – P. 4–16.
6. Brown M.C., Holland R.L., Hopkins W.G. Motor nerve sprouting– *Ann Rev Neurosci*. – 1984. – V. 4 – P. 17–42.
7. Schiller Y., Rahamimoff R. Neuromuscular Transmission in Diabetes: Response to High-Frequency Activation // *The Journal of Neuroscience*. – 1989. – V. 9(11). – P. 3709–3719.
8. Matsui T., Kimura I., Kimura M. Increase in the activities of plasma pseudocholinesterase dependent on the blood glucose level and its relation to the hypersensitivity to acetylcholine in striated muscles of KK-CA y mice with diabetes // *JpnJPharmacol*. – 1990. – V. 54. – P. 97–103.
9. Kiss G. Streptozotocin-induced diabetes alters the oligomerization Pattern of acetylcholinesterase in rat skeletal muscle / G. Kiss, J. Somogyi, P. Csermely et al. // *Diabetologia*. – 2001. – V. 44. – P. 220–223.

Поступила 21.01.2015 г.