

ВЕЗИКУЛЯРНАЯ ГИПОТЕЗА ОСВОБОЖДЕНИЯ МЕДИАТОРА В СИНАПСЕ

А. Л. ЗЕФИРОВ

Казанский государственный медицинский университет

VESICLE HYPOTHESIS OF THE TRANSMITTER RELEASE IN SYNAPSE

A. L. ZEFIROV

History of formation and modern status of vesicle hypothesis of transmitter release in synapse is outlined. Data concerning molecular mechanisms of formation, filling, emptying and recycling of vesicles at the nerve ending are presented.

Рассмотрены история формирования и современное состояние везикулярной гипотезы освобождения медиатора в синапсе. Представлены данные по молекулярным механизмам образования, заполнения, опустошения и рециклизации везикул в нервном окончании.

www.issep.rssi.ru

Одной из основных задач нейробиологии является выяснение механизмов, лежащих в основе передачи информации с одной нервной клетки на другую. В настоящее время всеобщее признание получила везикулярная гипотеза освобождения медиатора, по которой передача информации от одной возбудимой клетки к другой происходит за счет химического агента – медиатора, который концентрируется в синаптических везикулах и выделяется из них посредством экзоцитоза.

Для исследования роли везикул (секреторных гранул) в процессе межклеточной сигнализации проводят исследования на самых разнообразных объектах: межнейронных синапсах центральной нервной системы позвоночных и беспозвоночных животных, нервно-мышечных синапсах, электрическом органе ската (модифицированная нервно-мышечная система), мозговом слое надпочечников, нейронах гипоталамуса и гипофиза. Оказалось, что освобождение медиаторов, гормонов и других биологически активных веществ осуществляется из везикул по схожим механизмам. Очевидно, что везикулярное освобождение биологически активных веществ (медиаторов, пептидов, гормонов) является универсальным механизмом межклеточных взаимодействий в организме животных и человека. Исключением является выделение из клеток стероидных и тироидных гормонов, а также простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, которые способны проходить через липидный бислой клеточной мембраны. Рассмотрим роль везикул в функционировании синаптических образований.

Синапс. Термин “синапс” впервые введен выдающимся английским физиологом Чарлзом Шерингтоном в 1897 году после пионерских морфологических работ Рамон и Кахала, в которых впервые были получены свидетельства о том, что нервная система состоит из изолированных нервных клеток – нейронов. Слово “синапс” переводится с греческого как соединение, связь. В настоящее время под синапсом понимают специфическое место контакта (межклеточного мембранного

соединения) одной возбудимой клетки с другой, в котором происходит процесс передачи информации путем изменения потенциала мембраны. Основным в нервной системе является химический синапс, названный так потому, что в этом виде соединений в процессе передачи информации участвует медиатор (синонимы – трансмиттер, передатчик, посредник). В таких синапсах одна клетка (пресинаптическая) обладает способностью синтезировать и выделять медиатор в окружающую среду (узкую щель между мембранами клеток – синаптическую щель), а другая (постсинаптическая) – воспринимать и отвечать на это вещество специфической реакцией в виде изменения своего мембранного потенциала (поляризация) и возникновением постсинаптического потенциала. В настоящее время в центральной и периферической нервной системе обнаружено большое число медиаторов.

В самом общем виде комплекснейших биохимических и биофизических молекулярных процессов, происходящих в синапсе, представлен на рис. 1. Эта схема касается синапсов, в которых синаптическая передача осуществляется с помощью таких медиаторов, как ацетилхолин, глутамат, гамма-аминомасляная кислота, глицин и биогенные амины (классические медиаторы). В пептидергических синапсах непосредственной передачи возбуждения обычно не происходит, а секретируемые пептиды изменяют (модулируют) возбудимость нервных клеток, их чувствительность к классическим медиаторам, изменяют их метаболизм.

Квантовая гипотеза освобождения медиатора. Для того чтобы понять, как формировалась везикулярная гипотеза, необходимо остановиться на квантовой гипотезе освобождения медиатора в синапсе. В 1953 году Бернард Катц с сотрудниками, исследуя нервно-мышечный синапс лягушки (медиатор – ацетилхолин), с помощью микроэлектродов зарегистрировали новый класс постсинаптических потенциалов. Эти сигналы возникали случайно, в покое, имели очень маленькую амплитуду и были названы миниатюрными потенциалами концевой пластинки (МПКП). Далее оказалось, что постсинаптические потенциалы, вызванные раздражением двигательного нерва (потенциалы концевой пластинки – ПКП), от раздражения к раздражению варьируют по амплитуде, причем эти колебания кратны амплитуде МПКП. Было предположено, что медиатор в синапсе освобождается в виде мультимолекулярных порций – квантов. В покое случайное освобождение из нервного окончания отдельных порций вызывает появление на постсинаптической мембране МПКП, а в ответ на раздражение происходит синхронное освобождение нескольких десятков или сот квантов и возникает ПКП. Электрофизиологическое определе-

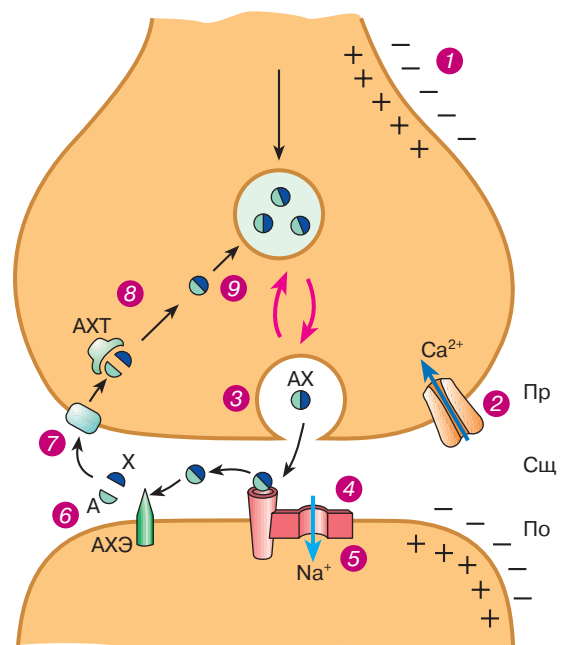


Рис. 1. Последовательность основных процессов при передаче возбуждения в холинергическом синапсе (медиатор – ацетилхолин).

Пр – пресинаптическая мембрана, По – постсинаптическая мембрана, Сщ – синаптическая щель. Главные этапы отмечены цифрами 1–7. Возбуждение нервного окончания сопровождается снижением мембранного потенциала (1) и открытием потенциалозависимых кальциевых каналов, что вызывает вход ионов кальция в нервное окончание (2). Увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция вызывает освобождение ацетилхолина (АХ) из синаптических везикул путем экзоцитоза в синаптическую щель (3) с последующей рециклизацией везикул (показано красными стрелками). Ацетилхолин диффундирует через синаптическую щель и взаимодействует с ацетилхолиновыми рецепторами постсинаптической мембраны (4), результатом чего является открытие каналов и поступление ионов Na в постсинаптическую клетку (5). В результате поступления положительно заряженных катионов мембранный потенциал постсинаптической клетки снижается. Под действием фермента ацетилхолинэстеразы (АХЭ) ацетилхолин в синаптической щели разрушается до ацетата (А) и холина (Х) (6), который при помощи активного транспорта поступает обратно в нервное окончание (7). В нервном окончании осуществляется синтез ацетилхолина из холина и ацетата (катализируется ферментом ацетилхолинтрансферазой (АХТ)) (8). Ацетилхолин поступает в синаптические везикулы (9).

ние показало, что квант медиатора состоит из 1000–10 000 молекул ацетилхолина. В дальнейшем квантовая гипотеза освобождения медиатора получила подтверждение на самых разнообразных объектах и в настоящее время считается общепризнанной.

Везикулярная гипотеза. Использование метода электронной микроскопии для изучения ультраструктуры синапса позволило в 1954 году Де Робертсу и Беннету выявить в цитоплазме двигательного нервного окончания большое количество синаптических везикул диаметром около 50 нм (рис. 2). Поскольку везикулы имели одинаковые размеры и концентрировались у пресинаптической мембраны, было предположено, что квант медиатора находится в синаптической везикуле, а освобождение медиатора происходит путем выделения содержимого везикулы в синаптическую щель путем экзоцитоза. Так была сформулирована везикулярная гипотеза освобождения медиатора в синапсе. В дальнейшем синаптические везикулы были обнаружены во всех химических синапсах нервной системы.

К основным постулатам везикулярной гипотезы необходимо отнести следующие: 1) медиатор в нерв-

ном окончании концентрируется в синаптических везикулах, 2) везикулярный медиатор освобождается путем слияния мембраны везикулы с пресинаптической мембраной (экзоцитоз).

Типы везикул. Как показали электронно-микроскопические исследования, самые разнообразные нервные окончания имеют два типа секреторных везикул: синаптические везикулы (мелкие везикулы) и секреторные гранулы (так называемые крупные или электронно-плотные везикулы) (рис. 2). Мелкие синаптические везикулы однородны по размерам и имеют малый диаметр (около 50 нм). Эти везикулы содержат классические медиаторы. Крупные, электронно-плотные везикулы имеют большой диаметр (около 100 нм), они неоднородны по размерам и содержат электронно-плотные гранулы, представляющие собой крупномолекулярные медиаторы – пептиды и белки (см. рис. 2).

Расположение везикул в синапсе. Первые электронно-микроскопические исследования показали, что существуют две группы мелких синаптических везикул в нервном окончании. Первая группа везикул находится в непосредственной близости от пресинаптической мембраны у электронно-плотных образований. Многочисленные ультраструктурные, биохимические и электрофизиологические данные показали, что именно в этих местах происходит освобождение медиатора. Поэтому электронно-плотные участки пресинаптической мембраны с фиксированными у них синаптическими везикулами получили название активных зон. Вторая группа везикул располагается на некотором удалении от активной зоны (см. рис. 2). Было предположено, что

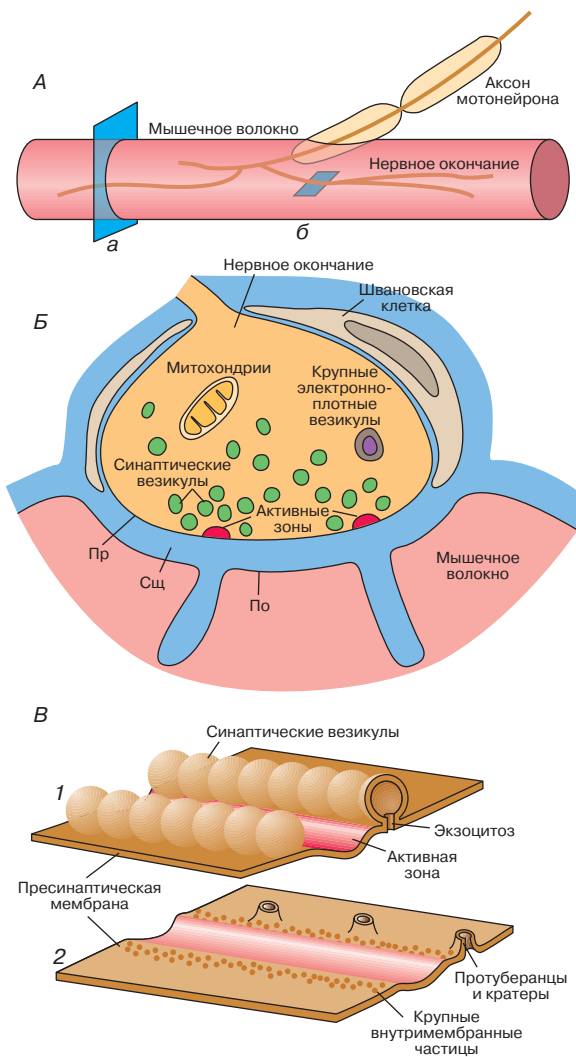


Рис. 2. Ультраструктура химического синапса (схематическое изображение):

А – холинергический нервно-мышечный синапс лягушки, образованный аксоном мотонейрона спинного мозга и скелетным мышечным волокном;
 Б – поперечный срез синапса в проекции а, показанной на А. При электронной микроскопии в нервном окончании видны мелкие синаптические везикулы, концентрирующиеся у электронно-плотных участков пресинаптической мембраны – активных зон. Крупные, электронно-плотные везикулы, заполненные медиатором пептидной природы, располагаются вне активных зон;
 В – два листка пресинаптической мембраны, полученные при использовании метода замораживание-скальвание (участок скола обозначен буквой б на А). Пресинаптическая мембрана расслоена на два листка: 1 – внутренний листок, вид со стороны нервного окончания; 2 – наружный листок, вид изнутри пресинаптической мембраны. Видна активная зона (утолщение пресинаптической мембраны), расположенные в два двойных параллельных ряда крупные внутримембранные частицы (кальциевые каналы) и две цепочки синаптических везикул, готовых к экзоцитозу.

везикулы первой группы содержат запас медиатора, готового к освобождению, везикулы второй — мобилизационный запас, который пополняет первый в случае его расходования при активности синапса. Дальнейшая детализация топографии везикул в нервном окончании была проведена при помощи метода замораживания — скальвания (см. рис. 2). Этот метод заключается в том, что замороженный кусочек ткани раскалывают острым ножом, а поверхность скола рассматривают под электронным микроскопом. Поскольку замороженная ткань раскалывается по мембранам, то можно получить детальную ультраструктурную реконструкцию пре- и постсинаптических отделов синапса. Оказалось, что в области активной зоны в пресинаптической мембране концентрируются крупные внутримембранные частицы, около которых располагаются синаптические везикулы. Многочисленные данные указывают на то, что эти частицы являются кальциевыми каналами, которые обеспечивают временное увеличение концентрации ионов кальция в области синаптических везикул при возбуждении, ведущее к освобождению медиатора. Топография активных зон, внутримембранных частиц и везикул в различных синаптических образованиях неодинакова и сильно варьирует от симметричного и упорядоченного расположения до хаотичного. Наиболее красивой и изящной в этом отношении является активная зона нервно-мышечного синапса лягушки, в которой крупные внутримембранные частицы располагаются в виде двух двойных параллельных рядов, идущих поперек нервного окончания, по краям которых располагаются синаптические везикулы (см. рис. 2). При синаптической активности в этих местах появляются кратеры и протуберанцы, свидетельствующие об экзоцитозе синаптических везикул. Всего в двигатель-

ном нервном окончании лягушки может быть несколько сот активных зон, расположенных на расстоянии 1 мкм друг от друга. Крупные везикулы, содержащие медиаторы пептидной природы, располагаются вне активных зон (см. рис. 2).

Формирование везикул. Синаптические везикулы образуются в теле нервной клетки из эндоплазматического ретикула и цистерн аппарата Гольджи, а затем транспортируются по аксону в нервные окончания. По всей видимости, принципиальной разницы в формировании различных типов везикул, заполненных различными медиаторами, не наблюдается. Различия касаются только заполнения и механизмов опустошения везикул (рис. 3).

Заполнение везикул. Как показали биохимические исследования, медиатор в мелких синаптических везикулах находится в очень высокой концентрации — 100 ммоль/л. Это достигается наличием в мембране везикулы специальных активных транспортных систем. В мембране везикулы имеется протонный насос, который, используя энергию АТФ, создает разность потенциалов на мембране везикулы (содержимое везикулы заряжено положительно по сравнению с цитоплазмой нервного окончания). Везикулы содержат также хлорные каналы. Электрохимический градиент, формируемый протонным насосом, обеспечивает активный транспорт медиатора, который синтезируется в цитоплазме нервного окончания, в везикулу (см. рис. 3). В настоящее время выделены несколько классов таких транспортных молекул, специфичных для биогенных аминов, ацетилхолина, глутамата, ГАМК и глицина. Наряду с медиатором в везикулах находятся АТФ, ионы, ферменты и другие компоненты.

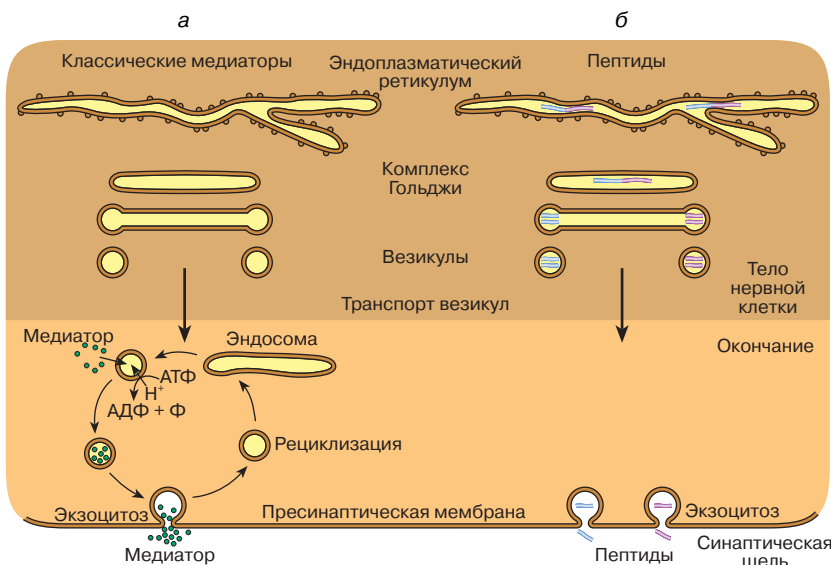


Рис. 3. Формирование, заполнение и опустошение везикул. Образование мелких (а) и крупных (б) синаптических везикул осуществляется в комплексе Гольджи тела нервной клетки, затем они транспортируются в нервное окончание. Мелкие везикулы заполняются классическим медиатором в нервном окончании, а крупные — пептидами в теле нервной клетки, в процессе образования везикул. Везикулы выделяют медиатор в синаптическую щель посредством экзоцитоза. Затем мелкие везикулы посредством рециклизации могут повторно заполняться медиатором и участвовать в экзоцитозе. Последняя способность у крупных везикул отсутствует

Что касается крупных, электронно-плотных везикул, то их заполнение белковыми компонентами начинается уже в процессе образования везикул из эндоплазматического ретикулума. Синтез нейроактивных пептидов происходит подобно синтезу пептидных гормонов. Первоначально крупные аминокислотные последовательности (пептидные цепи) образуются на рибосомах, подобно пептидомам, и помещаются в эндоплазматический ретикулум. В цистернах аппарата Гольджи начинается протеолитический процесс разделения крупных полипептидов на фрагменты с образованием активных пептидов, которые включаются в отпочковывающиеся везикулы (см. рис. 3). Причем разные нейроактивные пептидные фрагменты могут оказаться в различных везикулах, которые транспортируются в нервные окончания нейрона. Во многих нейронах медиаторы и нейропептиды синтезируются и упаковываются в одни и те же везикулы, следовательно, из их нервных окончаний освобождаются несколько различных медиаторов. Эти наблюдения позволяют усомниться в правильности принципа Дейла (1935 год), который гласит, что все нервные окончания, образованные одним нейроном, секретируют только один медиатор.

Опустошение везикул и освобождение медиатора.

Если постулат о том, что синаптическая везикула является резервуаром для медиатора, не поддается сомнению, то механизм освобождения медиатора из везикулы в синаптическую щель вызывает большие споры и соответственно появление большого количества гипотез и спекуляций.

На рис. 4 представлены три принципиальных механизма освобождения медиатора с участием синаптической везикулы, посредством которых содержимое везикулы может выделиться в синаптическую щель в области активной зоны. Все три механизма зависят от ионов кальция, так как непосредственной причиной выделения кванта медиатора является увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция в месте освобождения медиатора за счет открытия кальциевых каналов при деполяризации пресинаптической мембраны потенциалом действия.

Первый механизм представляет собой типичный экзоцитоз. Он сопровождается полным слиянием везикулы и встраиванием ее мембраны в пресинаптическую. В этом случае все содержимое везикулы оказывается в синаптической щели (медиатор, АТФ, ионы, белки и ферменты), а бывшая внутренняя поверхность мембраны везикулы обращена в сторону синаптической щели.

Второй механизм — это экзоцитоз без полного слияния, с частичным освобождением (шутливо названный “кратковременным поцелуем”). Он характеризуется формированием временной поры (канала) между внутренностью везикулы и окружающей средой. В этом случае через образованную пору по градиенту концентрации медиатор будет диффундировать в синаптическую щель. Причем количество выделенного медиатора (величина кванта) зависит от времени, в течение которого пора находится в открытом состоянии. Предполагают, что везикула при каждом контакте с пресинаптической мембраной через временную пору теряет только часть

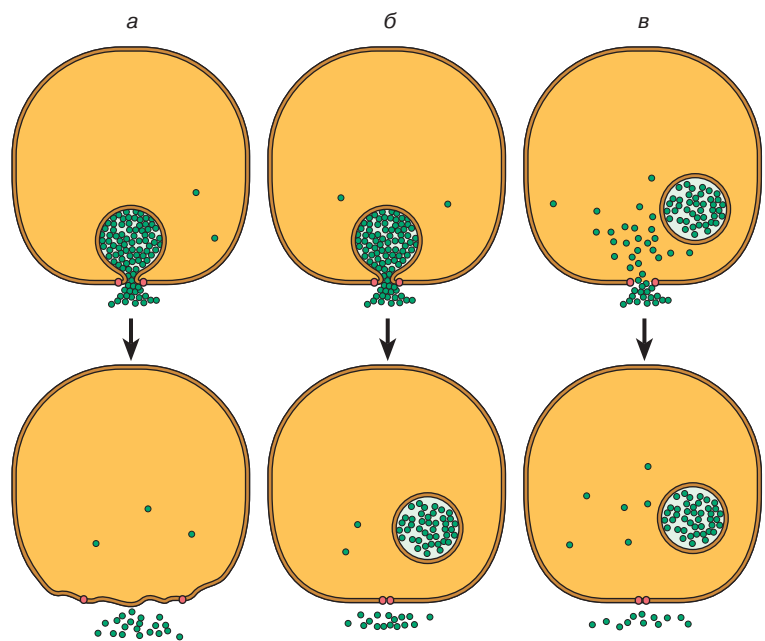


Рис. 4. Механизмы опустошения везикул и освобождения медиатора в синапсе: *а* – экзоцитоз с полным слиянием, *б* – экзоцитоз без полного слияния, *в* – освобождение медиатора в квантовой форме посредством медиатора или канала из цитоплазмы. В третьем случае везикулы осуществляют хранение медиатора и выделение медиатора в цитоплазму

своего содержимого и может многократно участвовать в экзоцитозе. Поскольку пора обладает селективностью, то другие ингредиенты внутривезикулярной среды при этом виде экзоцитоза в синаптическую щель не выделяются.

Третий механизм предполагает наличие специфического белка (медиатофора) или канала, встроенного в пресинаптическую мембрану и способного освободить медиатор из цитоплазмы нервного окончания. В этом случае везикулы выполняют не связанную с экзоцитозом функцию (содержат резервный медиатор, который при необходимости поступает в цитоплазму нервного окончания). Каждый из этих механизмов среди исследователей имеет своих приверженцев и подтверждается научными наблюдениями. Возможно, в различных образованиях и для различных везикул существуют разные механизмы освобождения медиатора.

Рециклизация везикул. Под процессом рециклизации понимают процесс повторного образования, заполнения и использования везикул после их опустошения и экзоцитоза. Если считать, что освобождение медиатора происходит путем экзоцитоза с полным сливанием, то естественно, что при активности синапса будет происходить уменьшение количества и в конечном итоге исчезновение везикул. Однако в нервном окончании наряду с процессом экзоцитоза осуществляется также эндоцитоз, то есть процесс образования новых везикул из фрагментов пресинаптической мембраны. Для мелких везикул этот процесс заключается в том, что после экзоцитоза из фрагмента пресинаптической мембраны путем эндоцитоза образуется везикула, которая через стадию эндосомы вновь заполняется медиатором и может участвовать в освобождении медиатора (см. рис. 3). В модели экзоцитоза без полного сливания рециклизация заключается в отхождении опустошенной везикулы от пресинаптической мембраны и повторном заполнении ее медиатором. Процесс рецикликации везикул достаточно быстрый и занимает не более 1 мин. Крупные, электронно-плотные везикулы, заполненные пептидами, не могут восстанавливаться после экзоцитоза (см. рис. 3).

Кальциевые каналы и экзоцитоз. Процесс освобождения медиатора зависит от ионов кальция. В покое внутриклеточная концентрация ионов кальция ничтожно мала, что связано с функционированием мощных внутриклеточных систем, связывающих свободные ионы кальция (митохондрии, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, синаптические везикулы), а также системы активного транспорта кальция из нервного окончания. При возбуждении происходит кратковременное открытие кальциевых каналов и поступление ионов кальция в нервное окончание. Эти ионы, взаимодействуя со специфическими белками синапти-

ческой везикулы и пресинаптической мембраны, инициируют экзоцитоз и освобождение медиатора. Для осуществления экзоцитоза необходимо создание критической (достаточно высокой) концентрации ионов кальция у везикулы в очень короткий промежуток времени. Нетрудно представить, что вероятность экзоцитоза везикулы будет зависеть от количества кальциевых каналов у везикулы и расстояния от канала до места экзоцитоза. Учитывая, что в цитоплазме нервного окончания диффузия ионов кальция от канала происходит очень быстро, а эффективность кальцийсвязывающих систем очень высока, критическая концентрация кальция создается только у некоторых везикул, поэтому вероятность освобождения медиатора невелика. Так, в активной зоне нервно-мышечного синапса лягушки, содержащей около 50 готовых для экзоцитоза везикул и около 200 кальциевых каналов, в ответ на возбуждение в естественных условиях подвергается экзоцитозу не более одной везикулы. Поскольку в нервном окончании лягушки имеется несколько сот активных зон, то в ответ на нервный импульс экзоцитоз может наблюдаться одновременно в ста и более везикулах с освобождением большого количества медиатора. В центральных синапсах, имеющих малое количество активных зон, при возбуждении освобождается только несколько квантов медиатора.

Молекулярная машина экзоцитоза. В настоящее время считают, что освобождение медиатора посредством экзоцитоза включает в себя четыре основных этапа (рис. 5): 1) транспорт (мобилизация) везикулы, заполненной медиатором из резервного запаса в запас, доступный к освобождению, располагающийся у активной зоны; 2) стыковка (докиривание) везикулы с местом освобождения у активной зоны; 3) слияние мембраны везикулы с плазматической мембраной (экзоцитоз); 4) рециклизация везикулы посредством эндоцитоза.

В первом этапе принимает участие целое семейство белков-синапсинов, которые связываются с актиновыми нитями цитоскелета и мембраной синаптической везикулы. Фосфорилирование синапсина Са/кальмодулинзависимой протеинкиназой 11 или протеинкиназой А уменьшает эту связь и обеспечивает транспорт везикулы к месту освобождения.

Три класса белков играют важную роль в стыковке и экзоцитозе — это белки мембраны синаптической везикулы синаптобревин и синаптотагмин, а также белки пресинаптической мембраны SNAP-25 и синтаксин, взаимодействующие с кальциевыми каналами.

Большое значение в процессах транспорта и стыковки везикул в настоящее время отводится семейству p21ras белков и его представителям — Rab3. Считают, что этот гуанозинтрифосфат (ГТФ), связывающий белок, взаимодействует с белками экзоцитоза синаптической

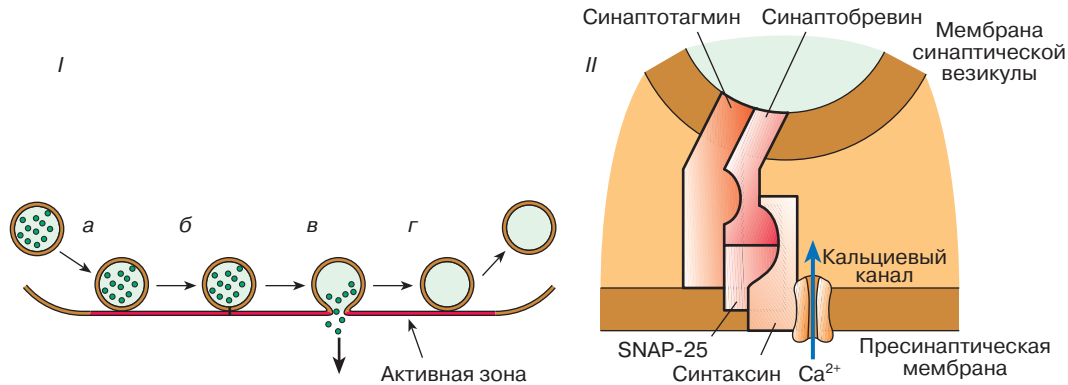


Рис. 5. Основные этапы и молекулярные механизмы освобождения медиатора посредством синаптической везикулы: I – мобилизация (а), докиривание (б), экзоцитоз (в) и рециклизация синаптической везикулы (г); II – основные синаптические белки и гипотетическая схема их взаимодействия при освобождении медиатора

везикулы и предотвращает стыковку везикулы с белками, формирующими пору слияния. Активация ГТФазы ведет к диссоциации этого белка, прекращению этого взаимодействия, что приводит к стыковке и экзоцитозу синаптической везикулы.

В третьем этапе участвует также синаптофизин, везикулярный белок, состоящий из четырех трансмембранных сегментов. Этот белок способен формировать каналы в искусственных липидных мембранах, поэтому считают, что он участвует в формировании временной поры между секреторной везикулой и плазматической мембраной. По всей видимости, синаптофизин выполняет определенную роль и в четвертом этапе – рециклизации везикулы. Одна из многочисленных схем, объясняющих участие различных белков в процессе экзоцитоза синаптической везикулы, представлена на рис. 5.

Таково современное состояние везикулярной гипотезы освобождения медиатора в синапсе. Представленные данные позволяют считать, что передача возбужде-

ния в синапсе осуществляется за счет химических посредников – медиаторов, которые концентрируются в синаптических везикулах и освобождаются из нервных окончаний посредством экзоцитоза. Благодаря внедрению новых научных технологий и усилиям ученых различных специальностей в ближайшие годы можно ожидать значительных научных успехов и достижений в этой области нейробиологии.

Рецензент статьи В.А. Ткачук

Андрей Львович Зефирин, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета, заслуженный деятель науки Республики Татарстан, лауреат государственной премии Республики Татарстан. Область научных интересов – нейрофизиология и синаптология. Автор более 200 публикаций.