

METABOLIZAM ACETILKOLINA
U SIMPATIČKOM GANGLIJU*

BLANKA ŠLAT

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb**(Primito 22. U 1964.)*

Na osnovu podataka iz literature prikazani su historijski podaci i današnje stanje te način gledanja na procese sinteze, deponiranja i oslobađanja acetilkolina, koji se zbivaju u simpatičkom gangliju.

Naročita pažnja posvećena je faktorima koji utječu na sintezu acetilkolina.

Teorija o prijenosu podražaja u ganglijskoj i neuromuskularnoj sinapsi, bazirana na oslobađanju acetilkolina, ima svoju podlogu u perfuzionim pokusima. Za vrijeme perfuzije simpatičkog ganglija i stimulacije preganglijskih nervnih vlakana (1, 2), acetilkolin je nađen u venskom perfuzatu. Perfuzija je izvršena Lockeovom otopinom, kojoj je dodan ezerin da spriječi enzimatsku hidrolizu acetilkolina.

Metabolizam acetilkolina u aktivnim nervnim završecima ispitivali su *Brown* i *Feldberg* (3), te *Birks* i *MacIntosh* (4, 5) i *Mac Intosh* (6). Preparat kojim su se u istraživanjima služili bio je gornji vratni simpatički ganglij mačke. Taj je preparat prikladan jer se lako izolira od cirkulacije i jednostavno kontrolira njegova aktivnost. Osim toga, ganglij sadržava velik broj sinapsa. Gornji vratni ganglij mačke sastavljen je od oko 100.000 neurona usko zbijenih i izmiješanih sa bezbroj ogranaka i butona preganglijskih završetaka (7).

Mnogo tipova nervnih završetaka ispitivano je elektronskim mikroskopom. Postoje varijacije u obliku i veličini sinapse.

Nervni završetak je odijeljen pukotinom oko oko 200 Å od postsinaptičkog neurona. Presinaptička aksoplazma sadržava mitohondrije i veliki broj malih kuglastih elemenata, sinaptičkih mjehurića, koji su karakteristični za eferentne nervne završetke (6).

Ispitivanja elektronskim mikroskopom pokazala su da veličina mjehurića iznosi oko 400 Å u promjeru (8). Anatomske osobe koji su ih prvi opazili (8, 9, 10) neovisno jedan od drugoga, smatrali su te čestice deponima u kojima je sinaptički prenosilac uskladišten prije oslobađanja (11).

U kolinergičnim sinapsama prisutne su tri specifične tvari: kolina-cetilaza (ChAc), acetilkolin (ACh) i kolinesteraza (ChE).

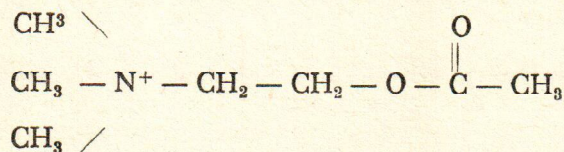
* Izvadak iz disertacije, Zagreb, 1963.

Kolinacetilaza je enzim koji prenosi acetilnu grupu od koenzima A do kolina i time vrši važnu funkciju u sintezi acetilkolina (12). Acetil-kolin je kvarterna amonijska baza koja se sintetizira kao rezultat enzimske reakcije. Acetilkonesteraza je enzim koji katalizira hidrolizu acetilkolina na kolin i octenu kiselinu (13).

Sve tri tvari nađene su uzduž cijelog nervnog vlakna, ali im je koncentracija najveća u nervnim završecima (6, 14). Pretpostavlja se da oba enzima nastaju u nervnoj stanici (15, 16, 17, 18).

Na temelju pretpostavke da mjehurić sadržava jedan tzv. »paket« ili »quantum« ACh, koji se oslobađa kada dolazi do kolizije mjehurića s presinaptičkom membranom, *Birks* (6) je pokušao odrediti koncentraciju ACh u tekućini mjehurića. Izračunana vrijednost količine ACh u jednom mjehuriću iznosi 900 molekula u volumenu od $1,3 \times 10^{-17}$ ml, a koncentracija 0,11 M.

Acetil-kolin je acetilni derivat kvarterne amonijske baze kolina:



Postojanje acetilkolina je dokazano u motornim nervnim vlaknima, u preganglijskim autonomnim nervnim vlaknima i u nekim postganglijskim vlaknima (kolinergična vlakna). Ustanovljeno je da simpatički gangliji sadržavaju 1,3–3,9 μg acetilkolina na 1 kg tkiva (3, 19).

Smatra se da se sinteza acetilkolina zbiva u kolinergičnim nervnim vlaknima i da on ostaje ovdje deponiran u razmjerno velikim količinama. Kako je on vrlo aktivna supstancija, to mora biti deponiran u neaktivnoj formi. Sadržaj acetilkolina u nervnom tkivu varira: mozak sisavaca 0,1–5,9 $\mu\text{g/g}$, žablji mozak 5–10 μg , kolinergični nervi i simpatički gangliji 6–14 $\mu\text{g/g}$ (20).

Gornji vratni simpatički ganglij mačke sadržava za odmora oko 250–300 $\text{m}\mu\text{g}$ ACh (14, 21). Ta se količina mnogo ne mijenja u vrijeme aktivnosti. Nema razlike ni između količine ACh ganglija opskrbljenog krvlju ili perfundiranog hepariniziranom plazmom. Oba ganglija mačke imaju praktički isti sadržaj acetilkolina, pa jedan od njih može služiti kao kontrola.

Acetil-kolin se sintetizira u prisutnosti specifičnog enzima kol' nacetilaze, koja se nalazi u svim kolinergičnim neuronima i sposobna je da prenosi acetilnu grupu koenzima A do kolina (22, 23, 24, 25).

Aktivni acetat služi za stvaranje acetyl-CoA. *Nachmansohn* i *Machado* (22) i kasnije *Lipmann* (26) uspjeli su dokazati da adenosintrifosfat (ATP) daje energiju koja je potrebna za acetyliranje. Tok acetyliranja je vrlo kompleksan i treba da bude ispunjeno niz uvjeta, da bi se taj proces odvijao optimalno.

Kolinacetilaza. – Raspodjela enzima kolinacetilaze usko je povezana s acetilkolinom (27). Kolinacetilaza se nalazi u različitim koncentracijama u raznim dijelovima ervnog sistema, *Feldberg* i *Uogt* smatraju da nastaje u tijelu stanice, u nekoj vrsti subcelularnih djelića, a da na periferiju dolazi kretanjem aksoplazme.

Hebb i *Smalman* (28) su pokazali da kolinacetilaza sedimentira s mitohondrijskom frakcijom homogenata mozga. Iz pokusa s homogenatom ventralnih korijena, *Hebb*, *Kraus* i *Silver* (29) su zaključili da je aksonska kolinacetilaza smještena u subcelularnim djelićima.

Kolinacetilaza izolirana iz ganglija lignja (30) je nestabilna na sobnoj i povišenoj temperaturi, te kod 55° C gubi aktivnost unutar 10 minuta.

Nachmansohn i *Machado* (22) su pretpostavili da sistem kolinacetilaze sadržava sulfhidrilne grupe, koje su bitni sastavni dio. Formuliran je i mehanizam sinteze acetilkolina, gdje se kao međučlan ne javlja slobodni acil-enzim već enzim sa sulfhidrilnom grupom. Inhibitori kolinacetilaze, za koje se pretpostavlja da se natječu s kolinom, prostigmin, zatim acetilkolin, d-tubokurarin itd., djeluju općenito u relativno visokim koncentracijama (30).

Slobodni acetilkolin je nestabilan i brzo se hidrolizira u prisutnosti specifične esteraze krvi ili tkiva u manje aktivni kolin.

Kolin je sastavni dio lecitina i drugih fosfolipida i nalazi se vjerojatno u svim životinjskim i biljnim tkivima. On nastaje metilacijom etanolamina s metioninom i služi za transmetilaciju (2). Normalna plazma čovjeka, mačke i psa sadržava oko 0,1 — 0,2 mg slobodnog kolina na 100 ml, a plazma kunića 0,15 — 0,52 mg (31). Približno ista količina postoji i u amnionskoj tekućini, a nešto više u urinu, pa u srčanom i skeletnom mišiću.

U pokusima na mozgu ili simpatičkim ganglijima, tj. na tkivu sastavljenom od intaktnih nervnih stanica (3, 32, 33) koncentracija vanstaničnog kolina može, ali ne mora biti faktor koji ograničava sintezu acetilkolina. Opažanja *Birksa* i *MacIntosha* (4) sugeriraju da je intracelularna zaliha kolina ograničena, pa se mora dopunjavati iz vanstanične otopine kad je oslobađanje acetilkolina brzo. Ima pretpostavka (4) o postojanju transportnog mehanizma kolina u staničnoj membrani. Na to su navela Birksova opažanja da za produljenje aktivnosti simpatički ganglij može koristiti kolin za tvorbu acetilkolina i osloboditi oko 30 % kolina, koji je do ganglija doveden krvlju. Presinaptički završeci su vjerojatno opskrbljeni nekom vrstom specijalnog prolaza za ulaz iona kolina.

Pretpostavivši da ekstracelularni kolin može biti faktor koji uvjetuje sintezu ACh kod perfuzije ganglija Lockeovom otopinom, *Brown* i *Feldberg* (3) su dodavali kolin perfuzionoj otopini u koncentraciji $1,4 \times 10^{-5}$ M, pošto je kod produljene stimulacije lučenje acetilkolina bilo reducirano na nisku razinu. U nekim pokusima pokazao se uspjeh.

Kad je kolin bio dodan prije početka stimulacije, oslobađanje acetilkolina padalo je sporije od kontrole bez kolina. Te pokuse su nastavili *Birks* i *MacIntosh* (5) s koncentracijom kolina $3,5 - 10^{-5}$ M. I oni su potvrdili da oslobađanje acetilkolina ostaje na razini znatno višoj nego u pokusima samom Lockeovom perfuzionom otopinom, ali ipak na nižoj nego kod perfuzije plazmom. Međutim, sadržaj ACh stimuliranog ganglija nije se smanjio, što se događa kod perfuzije Lockeovom otopinom, već je pače povećan na 107 %. Gangliji, kojih je perfuzionoju otopini dodan kolin, sintetizirali su ACh poput ganglija perfundiranih plazmom, ali nisu oslobađali acetilkolin maksimalnom brzinom.

Birks i *MacIntosh* (5) zaključuju da plazma sadržava još nepoznati faktor potreban za optimalno oslobađanje ACh.

Ganglij koji je perfundiran Lockeovom otopinom ima nešto slobodnog ekstracelularnog kolina koji je, vjerojatno, pristupačan nervnim završecima za sintezu acetilkolina. Takav ganglij nastavlja da ispušta kolin brzinom od oko 10–50 $\mu\text{g}/\text{min}$. bez obzira na stimulaciju ili prisutnost ezerina (21, 34).

Perry (21) je našao da u vrijeme preganglijske stimulacije, u odsutnosti ezerina, oslobađanje kolina najprije raste pa onda pada: porast može ovisiti o pojavi hidroliziranog ACh, a pad o ulasku ekstracelularnog kolina u stanicu radi sinteze. Na temelju svojih pokusa *Birks* i *MacIntosh* (5) pretpostavljaju da se u aktivnom gangliju kolin oslobađa iz nekih staničnih skladišta iz kojih je pristupačan za sintezu acetilkolina.

Acetilkolinesteraza. – Hidroliza acetilkolina kolinesterazom, zbog velike fiziološke važnosti, bila je predmet intenzivnih istraživanja u posljednjih trideset godina.

Aktivnost tog enzima ima oštro ograničen optimum koncentracije supstrata i bitno se razlikuje od ostalih kolinesteraza, pa većina autora predlaže naziv acetilkolinesteraza (35).

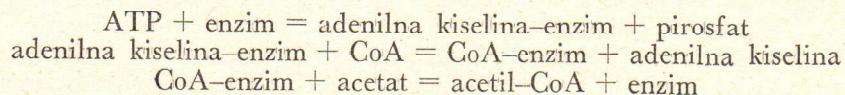
Acetilkolinesteraza (AChE) je prisutna uzduž čitavog kolinergičnog neurona (36, 37). Ustanovljeno je da je koncentracija AChE u presinaptičkoj i postsinaptičkoj membrani u raznim dijelovima kolinergičnog nervnog sistema različita. Postoji mišljenje da se AChE i ChAc sintetizira u perikarionu i prenosi duž aksona (15, 17, 18).

Smatra se da je glavna funkcija AChE hidroliza ACh, pošto je izazvan postsinaptički potencijal. Time je osiguran brzi završetak lokalne depolarizacije.

Postoji mišljenje da je AChE lokalizirana na dva mjesta: na vanjskoj površini presinaptičke membrane (ekstracelularna) gdje se razgrađuje oslobođeni ACh i tako ograničuje trajanje njegova djelovanja; kolinesteraza u samoj nervnoj stanici (intracelularna) je možda povezana s endoplazmatskim retikulumom (17). Prema *MacIntoshu* (6),

vjerojatno je da se intracelularna kolinesteraza nervnih završetaka nalazi na vanjskoj strani sinaptičkih mjehurića ili na unutarnoj strani presinaptičke membrane.

Koenzim A (CoA) – je derivat pantotenske kiseline (38). CoA ima važnu ulogu u intermedijarnom metabolizmu, jer sudjeluje pri procesu transmetiliranja i transfosforiliranja. On lako reagira s acetilnom skupinom, koju zatim prenosi i predaje nekoj drugoj skupini. Pri tom sudjeluje i odgovarajući enzim. Ta reakcija može se prikazati ovako (39):



Sinteza acetilkolina *in vivo* nije ograničena nedostatkom CoA, jer je vjerojatno CoA redovni sastojak stanice (40). Sinteza ACh *in vitro* ovisna je o koncentraciji CoA (41).

»Aktivni acetat« potreban za stvaranje acetil-CoA različitog je intracelularnog porijekla. Ugljikohidrati, aminokiseline i masne kiseline su izvori acetilnih grupa potrebnih za acetiliranje CoA.

Utvrđeno je da je acetil-CoA molekula koja sadržava veliku energiju i predstavlja tip biološki aktivnog i energijom bogatog spoja (42).

Za sintezu acetilkolina u intaktnom neuronu potreban je vanjski izvor glukoze (32, 43). U eksperimentalnim uvjetima, kod perfuzije ganglija Lockeovom otopinom, i glukoza je faktor koji može uvjetovati njegovu sintezu. *MacIntosh* (44) i *Kahlson* i *MacIntosh* (45) su dokazali u perfuzionim pokusima na gangliju mačke da otopina sastavljena samo od anorganskih soli ograničuje sintezu ACh. Može se pretpostaviti da je i stvaranje acetil-CoA ovisno i o ekstracelularnom izvoru acetilne grupe, a to uvjetuje održavanje zalihe ACh na normalnoj razini (14). Za optimalni ACh metabolizam potreba za glukozom može biti možda vezana i uz transport Na^+ ili kolina.

Ezerin inhibira aktivnost kolinesteraze i dodaje se perfuzionoj otopini, kako bi se mogao dokazati prisutni ACh. *H. Shelley* (46) je našla da ezerin u visokim koncentracijama ($2,7 \times 10^{-3}$ M) reducira brzinu sinteze ACh, a kako povećanje koncentracije kolina sprečava tu inhibiciju, zaključila je da se ezerin natječe s kolinom za aktivni centar kolinacetilaze. *Perry* (21) također smatra da ezerin inhibira sintezu ACh, samo je to objasnio kao djelovanje ezerina na sprečavanje hidrolize oslobođenog acetilkolina. *Birks* i *MacIntosh* (5) su našli da u gangliju za perfuzije Lockeovom otopinom koncentracija od 3×10^{-5} M ezerina djeluje inhibitorno na sintezu ACh. Način djelovanja nije još objašnjen. Čini se vjerojatnim da ezerin može utjecati na sintezu na dva načina; prema *Perryju*, on sprečava hidrolizu izlučenog ACh u kolin i octenu kiselinu, a to može biti značajno kod niske koncentracije ezerina, i samo u pokusima gdje perfuziona otopina ne sadržava kolin. Druga je mogućnost da se ezerin natječe s kolinom u nekom procesu

potrebnom za sintezu ACh, a to postaje važno samo ako je koncentracija ezerina visoka. Kad opet kolina ima u suvišku, on to ezerinsko djelovanje poništava.

Sinteza acetilkolina. – Premda ganglij u vrijeme perfuzije Lockeovom otopinom može proizvesti znatne količine ACh u toku stimulacije (3, 45), sinteza ACh je u takvom gangliju mnogo sporija nego pod fiziološkim uvjetima (5). Smanjenje sinteze može se potpuno korigirati ako se Lockeovoj otopini doda kolina. Normalna mačka plazma sadržava dovoljno kolina (31), tj. 5×10^{-6} M, da bi omogućila oslobađanje ACh na maksimalnom nivou. Nervni završeci mora da su veoma efikasni u korištenju kolina iz vanstanične tekućine. Kad se vrši perfuzija gornjeg vratnog ganglija mačke plazmom, acetilkolin se oslobađa brzinom od oko 19 $\mu\text{g}/\text{min}$ kroz neograničeno dugo vrijeme preganglijske stimulacije (5). Taj ACh mora potjecati od kolina plazme.

Isti autori smatraju da nervni završeci (ili elementi koji ih obavijaju) moraju biti opskrbljeni nekim posebnim mehanizmom koji omogućuje ulazak iona kolina.

MacIntosh (6) smatra da u kolinergični transmisioni sistem treba uključiti, kao specifičnu supstanciju, i nosioca kolina smještenog uz membranu sinapse. Ispitivanja moraju pokazati da li je taj transport aktivan ili pasivan i označiti tačniji smještaj nosača. To može biti i sama presinaptička membrana, ili neka vrsta čestica unutar nervnih završetaka.

Osim kolina, koji u eksperimentalnim uvjetima u vrijeme perfuzije ganglija Lockeovom otopinom može predstavljati faktor koji uvjetuje sintezu acetilkolina, i nedostatak glukoze u perfuzionoj otopini reducira sintezu ACh (14, 44, 45). U nedostatku glukoze, zaliha acetilkolina se iscrpljuje i oslobađanje kod produljene preganglijske stimulacije pada na vrlo nisku razinu. Dodatkom glukoze, manoze, galaktoze, laktata ili piruvata perfuzionoj otopini povećava se sinteza acetilkolina.

Postoji hipoteza (5) da je sama koncentracija acetilkolina u blizini enzima koji ga sintetizira dalji faktor za sintezu ACh. Neophodnost Na^+ iona za sintezu ACh tumače tako da Na^+ unutar nervnih završetaka stimulira tvorbu mjehurića. Kad je acetilkolin uklonjen iz blizine enzima koji ga sintetizira, omogućen je nastavak sinteze, koje brzina onda ovisi o količini supstrata. *Birks* (47) je našao da kod ganglija perfundiranog s otopinom kojoj nedostaje Na^+ zaliha transmitera pada u vrijeme aktivnosti. Pretpostavlja se, ako vanstanični Na^+ utječe na sintezu acetilkolina, da je on povezan s transportom glukoze i kolina u nervne završetke.

Ako je pak intracelularni Na^+ bitan, njegovo djelovanje vjerojatno je vezano uz membranski transport supstrata do enzima koji je uključen u sintezu ACh.

Birks i *MacIntosh* (5) su pokazali da baza hemikolin (HC — 3) djeluje kao inhibitor sinteze acetilkolina, a to se može pripisati njegovoj sposobnosti da kompetitivno inhibira sintezu. I druge baze, pored

HC — 3, mogu smanjiti sintezu ACh. Nekoliko autora (5, 21, 46) je uočilo da ezerin u visokoj dozi ima sličan efekt, ali se njegov način djelovanja razlikuje od djelovanja HC — 3.

Deponiranje acetilkolina. — Prema Perryju (21) sinteza se acetilkolina održava i za stimulacije ganglija, ali ovaj novostvoreni acetilkolin ne oslobađa se dolaskom nervnog podražaja. Perry smatra da se na presinaptičkim završecima javlja acetilkolin u dva oblika: jedan je raspoloživ («available») za momentano oslobađanje, a drugi nije. Taj neraspoločivi acetilkolin postaje postepeno raspoloživ, i to se događa neovisno od stimulacije.

Uskladišteni ACh, koji je raspoloživ za oslobađanje («available stock»), iznosi između 200 — 250 μg , a ta količina odgovara količini ukupnog acetilkolina koji su ekstrakcijom ganglija dobili Brown i Feldberg (3).

Birks i MacIntosh (5) daju nešto drukčije tumačenje. U gangliju, kojega kolinesteraza ostaje aktivna, količinu ACh koja je raspoloživa za oslobađanje dolaskom nervnog impulsa smatraju »zalihom« (depot). Ona mora biti smještena u nervnim završecima, i u prosječnom gangliju iznosi oko 220 μg ACh (oko 85 % od ukupnog ACh koji se može ekstrahirati).

Residualnim (ili stacioniranim — »stationary») ACh smatraju onu frakciju ukupne količine ACh, koja ostaje u gangliju iz kojeg je ACh maksimalno iscrpljen produljenom stimulacijom u prisutnosti supstance HC — 3 koja blokira sintezu acetilkolina. Ta frakcija iznosi oko 40 μg ili 15 % ukupnog ACh koji se može ekstrahirati iz ganglija. »Rezidualni« acetilkolin može biti oslobođen samo postupkom koji razara strukturu ganglija. Autori smatraju da je ta frakcija ACh smještena u vansinaptičkom dijelu preganglijskog aksona, pa je tako prostorno odijeljena od kolinesteraze. Čini se vjerojatnim da su »rezidualni« ACh, kao i »zaliha« smješteni unutar specifičnih subcelularnih čestica, ali još nisu identificirane takve čestice u dosad poznatoj strukturi aksona ili nervnih završetaka.

Isti autori (5, 14) opisali su i treću vrstu intracelularnog ACh. On se nalazi samo u ganglijima kod kojih je izvršena perfuzija plazmom, a kolinesteraza je bila inaktivirana. To je tzv. ACh u suvišku («surplus»). Taj acetilkolin stvara se samo onda kad su perfuzioni uvjeti povoljni za sintezu, a nestaje ga brzo ako se kolinesteraza reaktivira. Njegov smještaj je ipak različit od normalnog acetilkolina u nervnim završecima, budući da se ne oslobađa dolaskom nervnog impulsa. Acetilkolin »u suvišku« nema fiziološko značenje, ali njegovo nastajanje pokazuje da se za odmora u nervnim završecima ACh trajno i polagano stvara i razgrađuje (14). Smatra se (6) da se novonastali ACh ne sprema u sinaptičke mjehuriće u cijelosti kao »zaliha«, već jedan dio odlazi i dalje, vjerojatno u presinaptičku aksoplazmu. Premda ACh »u suvišku« nastaje polako, on može porasti do količine koja je veća od same »za-

lihe« ACh. ACh »u suvišku« ne povećava količinu ACh koja se izlučuje stimulacijom, jer je oslobađanje ACh kod perfuzije ganglija ezeriniziranom plazmom konstantno, a u isto vrijeme se taj acetilkolin »u suvišku« nagomilava.

Birks i MacIntosh (5) pretpostavljaju da se »zaliha« ACh sastoji od dvije subfrakcije. Jedna je manja i odmah raspoloživa za oslobađanje, za razliku od druge veće, koja to nije. Postoje dva tumačenja kako te dvije subfrakcije reagiraju na stimulaciju. Jedna je da te dvije subfrakcije reagiraju na stimulaciju neovisno, tj. svaka se oslobađa u karakterističnoj proporciji svog ACh, paralelno, sve dok manja frakcija nije iscrpljena. Drugo tumačenje je da su te dvije subfrakcije ACh povezane u seriju i da ACh iz veće mora preći u manju prije nego se konačno oslobodi. Prednost bilo koje hipoteze traži nove dokaze.

Svi ti nalazi najjednostavnije se obrazlažu pretpostavkom da je »suvišak« ACh slobodan u presinaptičkoj aksoplazmi, a da je acetilkolin iz »zalihe« smješten unutar neke vrste subcelularnih čestica. Kako u nervnom aksonu ti elementi nisu dokazani, to je teško prihvatiti tumačenje da je ACh dobiven ekstrakcijom ganglija smješten u mjehuriće koji su karakteristični za presinaptičku aksoplazmu. Kolinergična vlakna mogu sadržavati isto toliko ACh kao i gangliji (48). Sinaptički završeci sadržavaju ACh vjerojatno u mnogo većim koncentracijama nego akson. ACh bi mogao biti smješten u mjehurićima u aksonu, koji su tako rijetko porazdijeljeni da nisu opaženi elektronskim mikroskopom.

Druga je mogućnost da je sav ACh aksona smješten unutar mitohondrija, a da je samo u sinaptičkim završecima ACh smješten u manje mjehuriće, koji ga dovode do presinaptičke membrane.

Birks i MacIntosh (4) pretpostavljaju da postoje dvije vrste tvorba koje su uključene u mehanizam oslobađanja acetilkolina. Jedne su mitohondriji u kojima se vrši sinteza acetilkolina, a druge su sinaptički mjehurići povezani sa smještajem i oslobađanjem ACh.

MacIntosh (6) smatra da se nešto ACh mora nalaziti u mitohondriju, prije prijenosa do mjehurića. To objašnjava pojavu da se 10 — 15 % ACh u gangliju ne mobilizira ni kod dugotrajne stimulacije (= residualni ACh).

Koncentracija ACh u otopini mjehurića mora biti vrlo visoka (5). Ako novosintetizirani ACh ostaje povezan s kolinacetilazom i unutar mjehurića, daljnja sinteza se obustavlja tako dugo dok je mjehurić intaktan, ali će ponovo započeti poslije oslobađanja acetilkolina, tj. poslije kolizije mjehurića i presinaptičke membrane. Zbog stvaranja acetilkolina »u suvišku« može se pretpostaviti da jedan njegov dio odlazi iz mjehurića u okolnu aksoplazmu, gdje se akumulira ako je kolinesteraza inhibirana.

Bez obzira u kojem je obliku acetilkolin smješten, njegova ukupna količina, koja je spremljena unutar neurona, prije će biti ograničena kapacitetom čestica koje ga sadržavaju, nego sposobnošću neurona da

ga sintetiziraju. Kako nervni završeci sintetiziranja ACh stalno a deponiraju samo određeni dio, zaključeno je (14) da su kod fizioloških uvjeta za odmora i aktivnosti spremišta acetilkolina gotovo zasićena.

Oslobađanje acetilkolina. — Oslobađanje acetilkolina vrši se sporo u vrijeme mirovanja ganglija, ali mnogo brže u vrijeme aktivnosti ganglija. Već su *Feldberg i Gaddum* (1), *Feldberg i Urtiainen* (2) i *MacIntosh* (44) pokazali da venski dio perfuzione tekućine iz ezeriniranog ganglija sadržava male količine ACh. Postoji kontinuirano oslobađanje acetilkolina u vrijeme odmora. Ono iznosi oko 0,15 — 0,5 $\mu\text{g}/\text{min}$, a to znači da treba oko 8 — 16 sati da se ukupni sadržaj acetilkolina izmijeni. Aktivni ganglij pod optimalnim uvjetima izmijeni svoj acetilkolin za oko 10 minuta.

Fatt i Katz (49) smatraju da se pojava spontanih minijturnih potencijala motorne ploče može protumačiti oslobađanjem »quanta« u vrijeme mirovanja.

U vrijeme aktivnosti ganglija, tj. stimulacije, bilo kako dugo ona trajala, oslobađanje ACh ostaje visoko ako je frekvencija podraživanja fiziološka. Tvorba koja sadržava acetilkolin, dolaskom nervnog impulsa oslobađa ga u vanstanični prostor. Ovu mobilizaciju tvorba uzrokuju promjene koje se događaju u njezinoj okolini. To bi moglo biti uvjetovano smanjenjem aksoplazmatske viskoznosti koja, prema mišljenju nekih autora (4, 50), prati svaki podražaj, a koja bi pospjela Brownovo gibanje čestica.

Druga je mogućnost da dolazi do modifikacije u površinskim svojstvima bilo čestica ili membrane, pa to olabavljuje veze između njih. To može biti promjena u ionskom sastavu aksoplazme uz membranu, što se i događa u depolariziranom aksonu.

MacIntosh i Emmelin (34) su u vrijeme perfuzije gornjeg vratnog ganglija mačke sa raznim perfuzionim otopinama (Locke, plazma, defibrinirana krv) ustanovili da se kod određenog broja preganglijskih podražaja količina oslobođenog ACh u prvoj periodu stimulacije iz neiscrpljenog ganglija nalazi unutar uskih granica (26 — 28,5 $\text{pg}/\text{podražaj}$).

Količina acetilkolina oslobođena u vrijeme preganglijske stimulacije ovisi ne samo o veličini zalihe acetilkolina u gangliju u to vrijeme već i o nizu drugih faktora.

Pokazalo se da oslobađanje acetilkolina može biti smanjeno kad se vrši perfuzija plazmom (6) samo u prisutnosti kisika bez CO_2 . Uzrok smanjenju nije nedostatak acetilkolina u nervnim završecima, već manja količina oslobođenog acetilkolina na svaki preganglijski podražaj. Djelovanje CO_2 na oslobađanje ACh sastoji se vjerojatno u povećanju ionizacije kalcija plazme. *Harvey i MacIntosh* (51) su pokazali da je kalcij potreban za oslobađanje acetilkolina, *Hutter i Kostial* (52) su ustanovili u perfuzionim pokusima i *Castillo i Katz* (53) u elektrofiziološkim analizama da količina oslobođenog ACh varira s koncentracijom kalcija u

širokom području. Unutarnjim kretanjem kalcijevih iona *Flückiger* i *Keynes* (54) tumače na veoma prihvatljiv način mobilizaciju ACh jedinice (»unit«). Prisutnost kalcijevih iona u vanstaničnoj otopini neophodan je preduvjet za oslobađanje acetilkolina u vrijeme presinaptičkog impulsa, a i kod stimulativnog djelovanja kalija. Kod promjena koncentracije kalcija dolazi do odgovarajućih promjena i u ukupnoj količini ACh koja se oslobađa na jedan impuls (52) i u broju spontano oslobođenih kvanta (49, 53).

Ima još faktora koji utječu na oslobađanje ACh. To je nepoznati faktor, prisutan u plazmi, za koji *Birks* i *Mac Intosh* (5) smatraju da je možda povezan na neki način s primanjem ili djelovanjem kalcija. Kad vanstanična sredina oskudijeva materijalom za optimalnu sintezu acetilkolina, višekratno preganglijsko podraživanje može dovesti do redukcije u oslobađanju ACh (4).

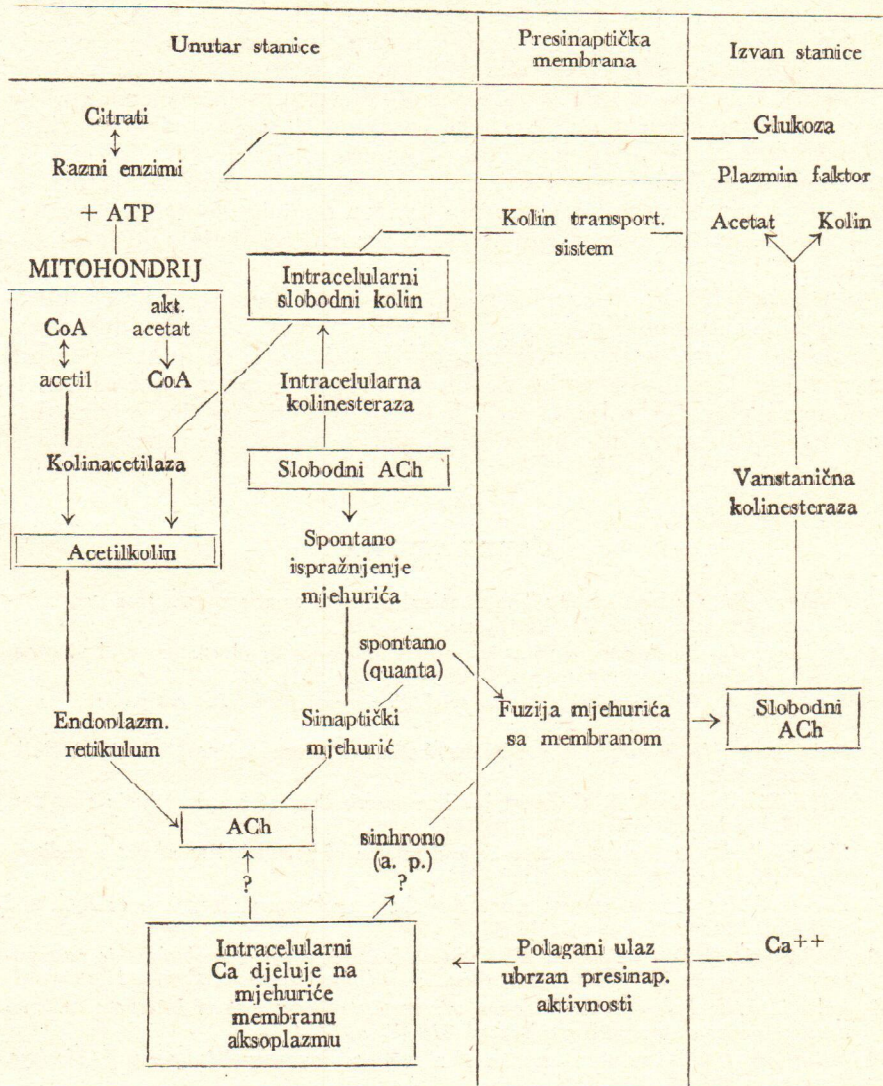
Transmisija pod fiziološkim uvjetima nije nikad smanjena zbog pomanjkanja raspoloživog acetilkolina na nervnim završecima. Duga stimulacija visoke frekvencije blokira transmisiju. To nastaje ili zbog smanjene osjetljivosti postsinaptičke strukture na acetilkolin, ili zbog suviše slobodnog ACh, ili opet zbog asinhronog njegovog oslobađanja, dok je manje vjerojatno da je transmisija blokirana zbog reduciranog oslobađanja ACh na podražaj (5).

Sinteza i oslobađanje acetilkolina može se ukratko prikazati ovako (4): Mitohondriji koji sadržavaju enzim kolinacetilazu i koenzim A (ili ga sintetiziraju) dolaze strujanjem aksoplazme do nervnih završetaka. Kolin ulazi u nervne završetke specijalnim transportnim mehanizmom i acetilna se skupina prenosi do kolina posredovanjem CoA uz pomoć mitohondrijske kolinacetilaze. Tako sintetizirani acetilkolin prelazi za sada nepoznatim mehanizmom u sinaptičke mjehuriće, koji Brownovim kretanjem dolaze do presinaptičke membrane. Kadgod se mjehurić sudari s presinaptičkom membranom, oslobađaju se jedinice acetilkolina (nekoliko stotina ili nekoliko tisuća molekula). Do takvih sudara dolazi nasumce za odmora, češće za vrijeme podraživanja, a sinhrono i u velikom broju onda kad je membrana depolarizirana nervnim impulsima. Na slijedećoj shemi prikazan je vjerojatan tok metabolizma ACh u nervnim završecima.

Veza između sinteze i oslobađanja acetilkolina. – Kod perfuzije ganglija otopinom koja je optimalna za sintezu acetilkolina, oslobađanje acetilkolina je i za odmora (5) aktivno. U takvom gangliju acetilkolin nastaje brzinom od oko 4 $\mu\text{g}/\text{sek}$, a oslobađa se oko 1/10 te količine. Za dugotrajne stimulacije povećavaju se i oslobađanje i sinteza. Sinteza se povećava možda čak i nešto više nego što je potrebno da održi ravnotežu s povećanim oslobađanjem. Ali ni u najpovoljnijim uvjetima kapacitet kolinacetilaze ganglija nije potpuno iskorišten, a to se vidi po tome što ekstrahirani enzim stvara ACh 4 puta brže.

Sinteza u intaktnom gangliju može biti ograničena količinom supstrata (kolin i acetil-koenzim A) ili pak akumulacijom proizvoda, tj. acetilko-

*Shematski prikaz vjerojatnog toka metabolizma
ACh u nervnim završecima*



(Po Birksu i MacIntoshu (1957), Brit. Med. Bull., 13, 1957)

lina, u blizini enzima koji ga je sintetizirao. Nije vjerojatno da bi kolin bio faktor koji bi ograničavao sintezu ACh. U gangliju za odmora, kao i u aktivnom gangliju, sinteza se održava ako antagonist kolina (HC-3) nije prisutan. Za perfuzije plazmom u aktivnom gangliju oslobađanje ACh ne može se povećati dodavanjem kolina perfuznoj otopini.

Smatra se (5) da je koncentracija acetilkolina u blizini enzima koji ga je sintetizirao faktor koji bi mogao uvjetovati stupanj sinteze. *Birks* (4) i *MacIntosh* (6) pretpostavljaju da koncentracija acetilkolina u mjehurićima mora biti vrlo visoka, i da novostvoreni ACh ostaje unutar mjehurića povezan s kolinacetilazom sve dok ne dođe do kolizije mjehurića s presinaptičkom membranom, a to ponovo uzrokuje sintezu acetilkolina.

MacIntosh (6) je objasnio na koji način oslobađanje potiče sintezu acetilkolina idućom hipotezom, koja nije eksperimentalno dokazana: Možda Na^+ ioni, koji sudjeluju u aktivnosti ganglija unutar nervnih završetaka, stimuliraju tvorbu mjehurića u koje se sprema nosivostvoreni acetilkolin. Uklanjanjem ACh iz blizine enzima koji ga je sintetizirao, omogućuje nastavak sinteze ACh, ako to zaliha supstrata dopušta.

LITERATURA

1. *Feldberg, W., Gaddum, J. H.*: The chemical transmitter at synapses in a sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 81 (1934) 305.
2. *Feldberg, W., Vartiainen, A.*: Further observations on the physiology and pharmacology of a sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 83 (1934) 103.
3. *Brown, G. L., Feldberg, W.*: The acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 88 (1936) 265.
4. *Birks, R. I., MacIntosh, F. C.*: ACh metabolism at nerve endings, *Brit. Med. Bull.*, 13 (1957) 157.
5. *Birks, R., MacIntosh, F. C.*: Acetylcholine metabolism of a sympathetic ganglion, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39 (1961) 787.
6. *MacIntosh, F. C.*: Formation, storage and release of acetylcholine at nerve endings, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (1959) 343.
7. *Koelle, G. B.*: A new general concept of the neurohumoral functions of ACh and AChE, *J. Pharm. Pharmacol.*, 14 (1962) 65.
8. *de Robertis, E. D. P., Bennett, H. S.*: Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1 (1955) 47.
9. *Palade, G. E., Palay, S. L.*: Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses, *Anat. Record*, 118 (1954) 335.
10. *Robertson, J. D.*: The ultrastructure of a reptilian myoneuronal junction, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2 (1956) 381.
11. *Whittaker, U. P.*: The Isolation and Characterization of ACh-containing Particles from Brain, *Biochem. J.*, 72 (1959) 694.
12. *Nachmansohn, D.*: Choline Acetylase. In *Cholinesterases and Anticholinesterase Agents*, Suppl. 15 (1962) Heidelberg.
13. *Nachmansohn, D., Wilson, I. B.*: *Advances in Enzymology*, XII (1951) 259.
14. *MacIntosh, F. C.*: Synthesis and storage of acetylcholine in nervous tissue, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41 (1963) 2555.

15. Dale, H. H.: Junctional transmission of nervous effects by chemical agents, Proc. Mayo Clin., 30 (1955) 5.
16. Hebb, C. O., Waites, G. M. H.: Choline acetylase in antero- and retro-grade degeneration of a cholinergic nerve, J. Physiol., 132 (1956) 667.
17. Koelle, G. B., Steiner, E. C.: The cerebral distributions of a tertiary and a quaternary anticholinesterase agent following intravenous and intraventricular injection, J. Pharmacol. exp. Ther., 118 (1956) 420.
18. Fukuda, T., Koelle, G. B.: The cytological localization of intracellular neuronal acetylcholinesterase, J. Biophys. Biochem. Cytol., 5 (1959) 443.
19. Chang, H. C., Gaddum, J. H.: Choline esters in tissue extracts, J. Physiol., 79 (1933) 255.
20. Solman: A manual of pharmacology (1957), Philadelphia - London, W. B. Saunders.
21. Perry, W. L. M.: Acetylcholine release in the cat's superior cervical ganglion, J. Physiol., 119 (1953) 439.
22. Nachmansohn, D., Machado, A. L.: The formation of acetylcholine. A new enzyme »choline acetylase«, J. Neurophysiol., 6 (1943) 397.
23. Feldberg, W., Mann, T.: Properties and distribution of the enzyme system which synthesizes acetylcholine in nervous tissue, J. Physiol., 104 (1946) 411.
24. Lipmann, F., Kaplan, O. N.: A common factor in the enzymatic acetylation of sulfanilamide and of choline, J. Biol. Chem., 162 (1946) 743.
25. Nachmansohn, D., Berman, M.: Studies on choline acetylase. III. On the preparation of the coenzyme and its effect on the enzyme, J. Biol. Chem., 165 (1946) 551.
26. Lipmann, F.: Acetylation of sulfanilamide by liver homogenates and extracts, J. Biol. Chem., 160 (1945) 173.
27. Feldberg, W., Vogt, M.: ACh synthesis in different regions of the central nervous system, J. Physiol., 107 (1948) 372.
28. Hebb, C. O., Smallman, B. N.: Intracellular distribution of choline acetylase, J. Physiol., 134 (1956) 385.
29. Hebb, C., Krause, M., Silver, A.: Intracellular binding of choline acetylase in the ventral spinal roots, J. Physiol., 148 (1959) 69P.
30. Berman-Reisberg, R.: Properties and biological significance of choline acetylase, Yale J. Biol. Med., 29 (1957) 403.
31. Bligh, J.: The level of free choline in plasma, J. Physiol., 117 (1952) 234.
32. Quastel, J. H., Tennenbaum, M., Wheatley, A. H. M.: Choline ester formation in, and choline esterase activities of tissues *in vitro*, Biochem. J., 30 (1936) 1668.
33. Mann, P. J. G., Tennenbaum, M., Quastel, J. H.: On the mechanism of acetylcholine formation in brain *in vitro*, Biochem. J., 32 (1938) 243.
34. Emmelin, N., MacIntosh, I. C.: The release of acetylcholine from perfused sympathetic ganglia and skeletal muscles, J. Physiol., 131 (1956) 477.
35. Augustinsson, K. B., Nachmansohn, D.: Distinction between acetylcholinesterase and other choline estersplitting enzymes, Science, 110 (1949) 98.
36. Koelle, G. B.: The elimination of enzymatic diffusion artifacts in the histochemical localization of cholinesterases and a survey of their cellular distribution, J. Pharmacol., 103 (1951) 153.
37. Koelle, G. B.: The histochemical identification of cholinesterase in cholinergic, adrenergic and sensory neurons, J. Pharmacol. exp. Ther., 114 (1955) 167.
38. Lipmann, F., Kaplan, N. O., Novelli, G. D., Tuttle, L. C., and Guirard, B. M.: Coenzyme for acetylation, a pantothenic acid derivate, J. biol. chem. 167 (1947) 869.

39. Kleiner, I. S., Orten, I. M.: *Biochemistry*, (1962), St. Luis.
40. Novelli, G. D.: Metabolic functions of pantothenic acid, *Physiol. Rev.*, 33 (1953) 525.
41. Smallman, B. N.: Mechanisms of acetylcholine synthesis in the blowfly, *J. Physiol.*, 132 (1956) 343.
42. Stadtman, E. R.: The net enzymatic synthesis of acetyl conzyme A, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 535.
43. Crossland, J., Elliott, K. A. G., Pappius, H. M.: Acetylcholine Content of Brain During Insulin Hypoglycemia, *Am. J. Physiol.*, 183 (1955) 32.
44. MacIntosh, F. C.: Liberation of acetylcholine by the perfused superior cervical ganglion, *J. Physiol.*, 94 (1938) 155.
45. Kahlson, G., MacIntosh, F. C.: Acetylcholine synthesis in a sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 96 (1939) 277.
46. Shelley, H.: The inhibition of ACh-synthesis in quinea-pig brain by eserine and neostigmine, *J. Physiol.* 131 (1956) 329.
47. Birks, R. I.: The role of sodium ions in the metabolism of acetylcholine, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41 (1963) 2573.
48. MacIntosh, F. C., Paton, W. D. M.: The distribution of ACh in the peripheral and the central nervous system, *J. Physiol.*, 99 (1941) 436.
49. Fatt, P., Katz, B.: Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings, *J. Physiol.*, 117 (1952) 109.
50. Heilbrunn, L.: *An Outline of General Physiology*, (1952), Philadelphia. - London. W. B. Saunders.
51. Harvey, A. M., MacIntosh, F. C.: Calcium and synaptic transmission in a sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, 97 (1940) 408.
52. Hutter, O. F., Kostial, K.: Effect of magnesium and calcium ions on the release of acetylcholine, *J. Physiol.*, 124 (1954) 234.
53. del Castillo, J., Katz, B.: Quantal components of the end-plate potential, *J. Physiol.*, 124 (1954) 560.
54. Flückiger, E., Keynes, R. D.: The calcium permeability of Loligo axons, *J. Physiol.*, 128 (1955) 41P.

Summary

THE METABOLISM OF ACETYLCHOLINE IN THE SYMPATHETIC GANGLION

The literature summarizing the evidence of certain aspects of the synthesis storage and release of acetylcholine in nerve endings has been reviewed.

Special attention has been paid to the factors possibly affecting the rate of ACh synthesis.

*Institute for Medical Research
incorporating the Institute of
Industrial Hygiene, Zagreb*

*Received for publication
May 22, 1964*