

ULOGA IONA NATRIJA, KALIJA, KALCIJA, MAGNEZIJA I OLOVA U SINAPTIČKOJ TRANSMISIJI*

KRISTA KOSTIAL

*Institut za medicinska istraživanja Jugoslavenske akademije znanosti
i umjetnosti, Zagreb*

(Primljeno 15. VII. 1955.)

Autor daje pregled djelovanja nekih iona na sinaptičku transmisiju i lučenje acetilkolina s naročitim osvrtom na vlastite rezultate dobivene metodom perfuzije gornjeg vratnog simpatičkog ganglija mačke.

Fiziolozi su vrlo rano počeli sumnjati, da razlike u ionskoj koncentraciji u stanici i izvan stanice igraju važnu ulogu u propagaciji električkih fenomena. Svaka je stanica organizirana struktura s nekom vrsti graničnog sloja ili mebrane. Taj granični sloj dijeli vanjski od unutarnjeg medija stanice. Između unutarnjeg i vanjskog medija postoji određena razlika potencijala, t. zv. bioelektrični potencijal.

Proučavajući utjecaj iona na biološku aktivnost možemo zapaziti dva efekta: djelovanje iona zbog difuzije ili kojeg drugog načina ulaženja u stanicu i djelovanje zbog vezanja iona na staničnu membranu. Jedno i drugo djelovanje zavisi od fizikalno-kemijskih svojstava određenog iona (1). Znatne promjene u unutarnjem ionskom sastavu stanice imaju manji učinak nego male promjene u staničnoj membrani. Djelovanje iona na protoplazmu svodi se uglavnom na precipitaciju koloida, dok promjene u površinskom sloju stanice pokazuju određeni paralelizam s nekim električkim fenomenima u stanici. Faktor koncentracije je također značajan, jer se djelovanje istog iona znatno razlikuje kod različitih koncentracija. Na površini stanice postoje specifična mjesta za vezanje iona ili različitih supstrata (2). Ioni djeluju na encime, koji se nalaze blizu ili na samoj površini stanice.

O utjecaju iona na nervnu kondukciju postoji vrlo obilna eksperimentalna i teorijska literatura i nekoliko izvrsnih skupnih prikaza (na pr. 3, 1, 4.). Bernsteinova (5) teorija nervne kondukcije pokazala se u mnogome neadekvatna. Modernu ionsku teoriju nervne kondukcije formulirao je Hodgkin. Ta se teorija može sumirati otprilike ovako (4):

* Neki su odlomci uzeti iz disertacije autora (Zagreb 1955).

»Akcioni potencijal zavisi od brzih promjena permeabilnosti membrane za ione natrija i kalija. Temeljna je činjenica, da je K^+ koncentriran u podražljivoj stanici, dok su Na^+ i Cl^- relativno razrijeđeni. Potencijal mirovanja objašnjava se pretpostavkom, da je stanična membrana umjereno prolazna za K^+ i Cl^- , a relativno neprolazna za Na^+ i unutarnje anione. Dalje se pretpostavlja, da se Na^+ , čim uđe u stanicu, izbacuje iz stanice specijalnim sekretornim procesom (natrijska pumpa), koji u krajnjoj liniji mora zavisiti od metabolizma. Kad dođe do depolarizacije nervnog vlakna, bilo djelovanjem električne struje ili širenjem struje iz pokrajnje aktivne regije živca, permeabilnost za natrij se znatno ali prolazno povećava. Ioni natrija zato velikom brzinom ulaze u nervno vlakno i izazivaju obrat u potencijalnoj razlici kroz membranu stanice. Oni su također nosioci struje, koja depolarizira susjedne regije živca. Povećanu permeabilnost za natrij slijedi sličan porast u permeabilnosti za kalij. To povećava brzinu, kojom kalijevi ioni napuštaju vlakno, i potpomaže uspostavljanje membranskog potencijala na osnovnu vrijednost. Izmjena natrija i kalija je neposredni izvor energije za propagaciju nervnih impulsa; međutim je za reverziju te izmjene u toku periode oporavljanja nakon eksplozije električne aktivnosti potrebna metabolička energija. Budući da je nervna aktivnost obično intermitentna, mora se pretpostaviti, da nervna vlakna provode glavni dio svog života otplaćujući dug, koji je nastao za prolaza električnog impulsa.«

Premda se transmisija u sinapsi razlikuje od kondukcije u aksonu, vrlo je vjerojatno, da transport iona, koji je tako važan u nervnoj kondukciji, igra značajnu ulogu i u sinaptičkoj transmisiji. O djelovanju iona na sinaptičku transmisiju i lučenje acetilkolina postoji međutim malo, uglavnom indirektnih podataka. Fatt i Katz (6) traže verifikaciju svojih rezultata metodikom, koja omogućava direktno mjerenje lučenja acetilkolina. Paton (7) također smatra, da se zaključci o lučenju acetilkolina smiju stvarati samo na temelju mjerenja lučenja acetilkolina, a perfuzija ganglija je jedina metoda, koja takve rezultate može dati. Dosad se ta metodika uglavnom upotrebljavala samo za kvalitativno dokazivanje acetilkolina. Vlastitom modifikacijom (8, 9), koja se sastoji u pravilnom odabiranju frekvencije i trajanja stimulacije u odnosu na periodu odmora, uspjelo nam je izbjeći faktor iscrpljenja acetilkolinske rezerve, pa smo na taj način dobili metodu, koja je prikladna i za kvantitativno istraživanje utjecaja iona na lučenje acetilkolina. Vrlo vjerojatno se rezultati dobiveni metodom perfuzije gornjeg vratnog simpatičnog ganglija mačke mogu primijeniti na sve ganglijske sinapse autonomnog nervnog sistema. Rezultati se možda mogu primijeniti i na neuromuskularne sinapse, koje su farmakološki slične ganglijskoj sinapsi u autonomnom nervnom sistemu, premda, dakako, postoje strukturne razlike. I jedne i druge su periferne sinapse, u kojima je acetilkolin dokazan kao kemijski medijator.

Za natrij su Fatt (10) i Fatt i Katz (6) utvrdili, da sniženje vanjske koncentracije na jednu petinu normalne vrijednosti u Ringerovoj otopini izaziva blokadu neuromuskularne transmisije. Amplituda potencijala motorne ploče proporcionalna je koncentraciji natrija u vanjskom mediju, a senzitivnost receptora na eksternu aplikaciju acetilkolina mijenja se manje s koncentracijom natrija. Na osnovu tih opažanja pred-

ložena je hipoteza, da se acetilkolin luči u zamjenu za natrij, koji ulazi u stanicu. To je t. zv. natrijska teorija lučenja acetilkolina na nervnim završecima.

Provjeravajući Fattovu i Katzovu teoriju o lučenju acetilkolina direktnom metodom dobili smo međutim druge rezultate (11,12). Po hipotezi kationske izmjene moralo bi doći do postepenog pada u lučenju iona acetilkolina u toku postepenog sniženja koncentracije natrijevih iona u perfuzionoj tekućini. Što manje natrija ulazi u nervne završetke kod svakog impulsa, to bi se manje acetilkolina moralo lučiti. Kad smo međutim koncentraciju natrija u perfuzionoj tekućini snizili na jednu polovinu i kasnije na jednu trećinu, nije bilo nikakve korelacije između koncentracije natrija u perfuzionoj otopini i lučenja acetilkolina na preganglijsku stimulaciju. Lučenje acetilkolina je tek palo na očekivanu razinu, kad je koncentracija natrija bila toliko snižena, da je došlo do blokade kondukcije (10% normalne koncentracije natrija u perfuzionoj otopini). Ti pokusi dokazuju, da natrijevi ioni nisu bitni za lučenje acetilkolina s nervnih završetaka.

Ioni natrija utječu međutim specifično na postsinaptički receptor, jer olakšavaju reakciju receptora s acetilkolinom, koja vodi do depolarizacije stanične membrane. To zaključuju Fatt i Katz (6) i po tome, što tubokurarin lakše izaziva depresiju potencijala motorne ploče, ako je koncentracija natrija snižena. Ioni natrija, međutim, nisu bitni za stvaranje aktivnog kompleksa receptora s transmitterom, jer acetilkolin još uvijek djeluje (izaziva depolarizaciju) i u mediju bez natrija. Ta se depolarizacija međutim slabo održava (13).

Naglo povišenje *kalija* u perfuzionoj tekućini stimulira gornji vratni simpatički ganglij (14), a u isto se vrijeme u perfuzatu spontano (bez električke stimulacije) javlja acetilkolin (15). Uzastopnim dodavanjem kalija u perfuzionu tekućinu postepeno se smanjuje spontano lučenje acetilkolina, dok napokon injekcija kalija uopće ne izaziva ni lučenje acetilkolina ni kontrakciju membrane niktitans. Tako paralizirani ganglij postaje neosjetljiv i na predganglijsku električku stimulaciju. U tom je djelovanje kalija slično djelovanju velikih količina acetilkolina. Zbog paralelizma između stimulativnog djelovanja kalija i spontane pojave acetilkolina u gangliju pri povišenoj koncentraciji kalija mogli bismo pomisliti, da se djelovanje kalija može svesti na djelovanje acetilkolina, t. j. kalij depolarizira staničnu membranu i na taj način oslobađa acetilkolin, koji djeluje stimulatивно. Quastel (16) smatra, da bi se lučenje acetilkolina pod utjecajem povišene koncentracije kalija moglo objasniti i specifičnom reakcijom kalija, koji oslobađa acetilkolin iz »vezanog oblika«, a ne samo jednostavnom termodinamičkom depolarizacijom stanične membrane. Te hipoteze, međutim, ne mogu objasniti sve efekte, koji su opaženi u vezi s kalijem. Tako je na primjer opaženo (17), da kalij stimulira kronično denervirani ganglij, koji više ni pod kakvim uvjetima ne može lučiti acetilkolin. Isto tako kurare

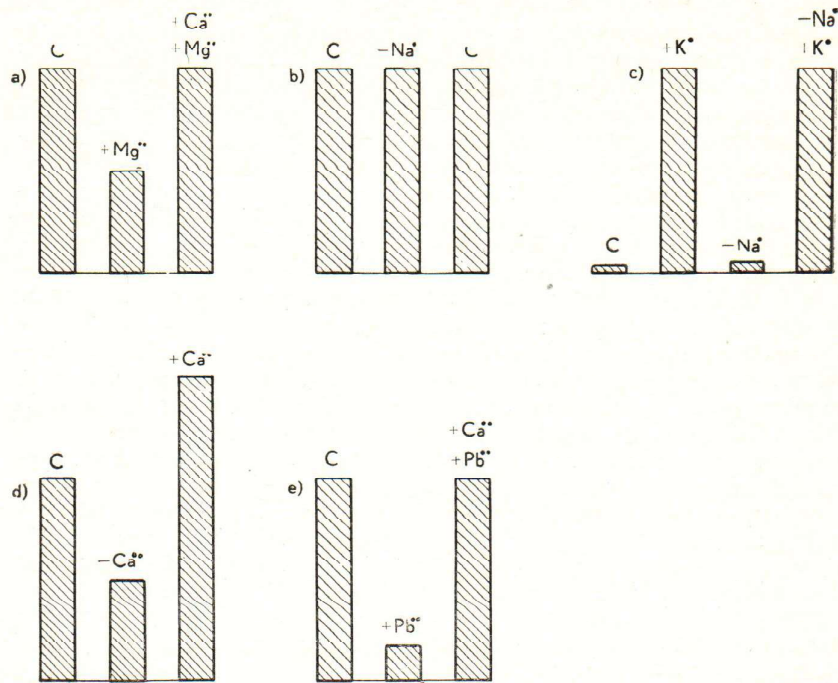
paralizira simpatički ganglij s obzirom na predsinaptičku stimulaciju i s obzirom na djelovanje acetilkolina, ali ne sprečava stimulatívno djelovanje kalija (17). Hutter i Kostial (12) su dokazali, da kalijevi ioni izazivaju lučenje acetilkolina i u odsutnosti natrijevih iona. Pod tim uvjetima kalij ne može izazvati propagirane akcijske potencijale u predganglijskim nervnim vlaknima (18) i njegovo se djelovanje mora pripisati direktnoj depolarizaciji nervnih završetaka.

Pomanjkanje iona *kalcija* izaziva smanjeno lučenje acetilkolina (19), a u isto vrijeme uzrokuje električno pražnjenje ganglijskih stanica, dakle blokadu transmisije uz postganglijsku aktivnost. Copée (20), Kuffler (21) i Castillo i Štark (22) su utvrdili, da promjene u koncentraciji Ca^{++} uzrokuju promjene u amplitudi sinaptičkog potencijala. Fatt i Katz (23) smatraju, da se u ovom slučaju radi o varijaciji broja terminalnih jedinica, koje luče acetilolin. Do zaključka, da promjena sinaptičkog potencijala nastaje zbog promjene broja aktivnih jedinica a ne zbog smanjenja ili povećanja izlučene količine acetilkolina po jedinici, dolaze autori zato, što Ca^{++} ne djeluje na amplitudu minijaturnih sinaptičkih potencijala. Hodgkin (24) u svojoj hipotezi o nervnoj kondukciji pretpostavlja, da »nosač natrija« mora biti vezan s ionom kalcija, da bi mogao djelovati. Uloga Ca^{++} u olakšavanju električnog pražnjenja terminalnih jedinica na predsinaptički impuls mogla bi se prema tome svesti na opće djelovanje Ca^{++} u stvaranju i propagaciji akcijskih potencijala. Fatt (13) pretpostavlja mogućnost, da sličan »nosač« djeluje i u terminalnoj jedinici. On je i ovdje vezan sa Ca^{++} i vjerojatno iznosi acetilolin iz stanice, a možda djeluje i na uobičajeni način, t. j. da unosi Na^+ u stanicu i na taj način aktivira neki mehanizam za prijenos acetilkolina. Kalcijeve soli imaju dekurarizantno djelovanje, koje ostali dvovalentni ioni kao Sr^{++} i Mg^{++} nemaju, nego dapače izazivaju neuromuskularnu blokadu (25).

Harvey i McIntosh (19) su uspoređivali djelovanje Lockeove otopine bez kalcija i izotonične otopine natrijeva klorida na lučenje acetilkolina iz gornjeg vratnog simpatičnog ganglija i došli su do zaključka, da je kod perfuzije ganglija sa 0,9% Na Cl lučenje acetilkolina normalno i transmisija na predganglijsku stimulaciju dobro održana. Otprije je međutim poznato (26), da perfuzija žabljeg mišića izotoničnom otopinom natrijeva klorida izaziva neuromuskularnu blokadu. Tu očiglednu razliku u reakciji neuromuskularne i ganglijske sinapse na manjak kalcijevih iona teško je razumjeti.

Mi smo pokušali direktnom metodom dokazati ovisnost količine izlučenog acetilkolina o koncentraciji kalcija u ekstracelularnoj tekućini, a ponovili smo i navedeni pokus Harveya i McIntosha. Rezultati su potvrdili pretpostavku, da ioni kalcija jednako djeluju na lučenje acetilkolina iz kolinergičnih nervnih završetaka u neuromuskularnoj i ganglijskoj sinapsi (8, 12). Nakon 10 minuta perfuzije sa 0,9%-otopinom Na Cl luči se svega oko 10% normalne količine acetilkolina. Učinak je,

dakle, isti kao kad se perfuzija vrši Lockeovom otopinom bez kalcija. Djelomično odstranjenje kalcija snizuje lučenje acetilkolina, kao što smo mogli očekivati (19). Povišenje koncentracije kalcija (6,3–10,5 mM/l) izaziva pojačano lučenje acetilkolina. Ti rezultati potvrđuju pretpostavku, da pri normalnoj koncentraciji kalcija sudjeluje samo jedan



Grafički prikaz djelovanja iona Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Pb^{2+} na lučenje acetilkolina (metodom perfuzije gornjeg vratnog simpatičkog ganglija mačke)

Stupci prikazuju količinu izlučenog acetilkolina; C = lučenje acetilkolina za vrijeme skupljanja kontrolnog uzorka (perfuzija Lockeovom otopinom), oznake + pred pojedinim ionom označuju dodavanje tog iona perfuzionoj otopini; oznake - označuju oduzimanje tog iona iz perfuzione otopine.

- povišena koncentracija magnezija (10–25 mM/l) izaziva smanjeno lučenje acetilkolina. Kalcij (6,6 mM/l) djeluje antagonistički;
- sniženje natrija na jednu trećinu normalne vrijednosti ne djeluje na lučenje acetilkolina;
- povišenje kalija (23 mM/l) izaziva spontano lučenje acetilkolina (bez stimulacije). Isti efekt izaziva povišena koncentracija kalija u perfuzionoj otopini bez natrija;
- snižena koncentracija kalcija (0,84 mM/l) izaziva smanjeno lučenje acetilkolina, dok povišena koncentracija kalcija (6,6–10,5 mM/l) izaziva obrnuti efekt;
- dotatak olovnih iona (5–40 mikro M/l) perfuzionoj otopini izaziva sniženo lučenje acetilkolina. Kalcijevi ioni djeluju antagonistički na te efekte olovnih iona.

dio mehanizma za lučenje acetilkolina u nervnim završecima. Povišenje koncentracije kalcija i povišena frekvencija stimulacije (27) vjerojatno mobiliziraju ostale jedinice u ganglijskoj kao i u neuromuskularnoj sinapsi.

Za magnezijeve ione je poznato, da blokiraju ganglijsku i neuromuskularnu transmisiju (28). Taj se efekt Mg^{++} može ukloniti dodatkom ezerina, pa je u tome djelovanje iona magnezija slično djelovanju tubokurarina. U preparatima, međutim, koji su do određene mjere blokirani dodatkom iona magnezija, mišić reagira vrlo dobro na tetaničku stimulaciju živca, iako je transmisija uz sporiju stimulaciju blokirana (29), dakle upravo obrnuto nego u kurariziranom preparatu (30). Ioni magnezija osim toga sprečavaju stimulantno djelovanje kalija i acetilkolina na sinaptički potencijal (28, 31). Zbog toga se smatralo, da ioni magnezija blokiraju transmisiju nespecifičnim djelovanjem na postsinaptički element. Hutter i Kostial (8, 32) su međutim direktnom metodom uspjeli dokazati, da magnezij smanjuje lučenje acetilkolina iz nervnih završetaka i da kalcijevi ioni djeluju antagonistički na te efekte magnezija. Iz tih se pokusa još ne može zaključiti, koliko to djelovanje prinosi blokadi transmisije, jer je poznato, da je količina acetilkolina, koja se oslobodi na maksimalnu stimulaciju predganglijskog vlakna, veća nego je potrebno za maksimalnu ekscitaciju ganglijskih stanica (33). Castillo i Engbaek (34) su o tome dali kvantitativne podatke za neuromuskularnu sinapsu. Oni su ustanovili, da blok, koji magnezij izaziva u neuromuskularnoj sinapsi, nastaje uglavnom zbog smanjenog lučenja acetilkolina, a manju ulogu igra snižena osjetljivost motorne ploče i povišeni prag podražaja postsinaptičkog elementa. Magnezij vrlo vjerojatno djeluje na predganglijske nervne završetke na isti način kao na završetke motornih živaca, t. j. smanjuje broj jedinica, koje reagiraju na jedan nervni impuls (35). Antagonističko djelovanje kalcijevih i magnezijevih iona vjerojatno se također manifestira na tom mjestu.

Naša istraživanja (36, 9) o djelovanju iona olova na lučenje acetilkolina pokazuju, da slobodni ioni olova u koncentraciji od 5–40 mikro-M/l izazivaju djelomičnu, a katkada i potpunu blokadu sinaptičke transmisije. Budući da se pritom smanjuje lučenje acetilkolina, a ganglijske stanice ostaju i dalje osjetljive na egzogeni acetilkolin, možemo zaključiti, da olovo djeluje uglavnom na terminalne završetke predganglijskih nervnih vlakana. Olovni ioni u tim koncentracijama, koje blokiraju ganglijsku transmisiju, ne mijenjaju znatno nervnu kondukciju. Kalcijevi ioni djeluju antagonistički na naprijed navedene efekte olovnih iona. Ako po teoriji P. Fatta (13) pretpostavimo, da u membrani predganglijskih nervnih završetaka postoji faktor sličan encimu, koji se veže za Ca^{++} , a inače posreduje pri iznošenju acetilkolina iz stanice, možda bismo mogli objasniti antagonističko djelovanje kalcijevih iona. Budući da je vjerojatno, da olovo stvara čvršće komplekse s bjelančevinama nego Ca^{++} , olovo će istisnuti Ca^{++} iz kompleksa i tako blokirati trans-

port natrija (i acetilkolina). Ioni kalcija u suvišku istiskuju ione olova iz kompleksa, pa je omogućena normalna funkcija encimskog faktora u membrani. O stvaranju olovnih kompleksa s bjelančevinama relativno se malo zna (37), pa još ne možemo stvarati nikakve definitivne zaključke. Ioni olova su u našim pokusima izazvali blokadu sinaptičke transmisije, prije nego možemo pretpostaviti da je došlo do iscrpljenja acetilkolinske rezerve u gangliju, dakle prije nego bi inhibicija sinteze acetilkolina mogla igrati bitnu ulogu, pa se ti efekti olova ne mogu tumačiti isključivo djelovanjem na sintezu acetilkolina. Ni efekt olova na kolinesterazu (38, 39, 40) nije u tim pokusima mogao igrati bitnu ulogu, jer je olovo izazivalo iste efekte i s dodatkom ezerina perfuzionoj otopini i bez dodatka.

O djelovanju ostalih iona na sinaptičku transmisiju i lučenje acetilkolina nema zasada gotovo nikakvih podataka.

Literatura

1. Steinbach, H. B., u E. S. Guzman Barron: Modern Trends in Physiology and Biochemistry, New York, 1952, str. 173.
2. Mazia, D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 8 (1940) 195.
3. Hodgkin, A. L., J. Physiol., 90 (1937) 183.
4. Bullock, T. K., Trans. Third Conference on Nerve Impulse, New York, 1952.
5. Bernstein, J., Pflüger's Arch. ges. Physiol. 92 (1902) 521.
6. Fatt, P. i B. Katz, J. Physiol., 118 (1952) 73.
7. Paton, W., Arch. Intern. Pharmacodyn., 47 (1954) 267.
8. Hutter, O. F. i Krista Kostial, J. Physiol. 124 (1954) 234.
9. Kostial, K., Utjecaj nekih iona na lučenje acetilkolina, Disertacija, Zagreb, 1955.
10. Fatt, P., J. Physiol., 111 (1950) 408.
11. Hutter, O. F. i K. Kostial, Biol. Bull., 107 (1954).
12. Hutter, O. F. i K. Kostial, J. Physiol., 129 (1955) 159.
13. Fatt, P., Physiol. Rev., 34 (1954) 674.
14. Feldberg, W. i A. Vartiainen, J. Physiol., 83 (1934) 103.
15. Brown, G. L. i W. Feldberg, J. Physiol., 86 (1936) 290.
16. Quastel, J. H., Trans. First Conference on Nerve Impulse, New York, 1950.
17. Davson, H., A Textbook of Gen. Physiol., London, 1951.
18. Brown, G. L. i F. C. McIntosh, J. Physiol., 96 (1939) 10 P.
19. Harvey, A. M. i F. C. McIntosh, J. Physiol., 97 (1940) 408.
20. Koppée, G., Arch. Intern. Physiol., 53 (1943) 327.
21. Kuffler, S. W., J. Neurophysiol., 7 (1944) 17.
22. del Castillo, J. i L. Stark, J. Physiol., 116 (1952) 507.
23. Fatt, P. i B. Katz, J. Physiol., 117 (1952) 109.
24. Hodgkin, A. L., Biol. Rev., 26 (1951) 339.
25. Rosenblueth, A., Transmission of Nerve Impulses at Neuroeffector Junctions and Peripheral Synapses, New York, 1950.
26. Locke, F. S., Zbl. Physiol., 8 (1894) 166.
27. Larrabee, M. G. i D. W. Bronk, J. Neurophysiol., 10 (1947) 139.
28. Engback, L., Pharmac. Rev., 4 (1952) 396.
29. Naess, K., Acta Pharm. Tox. Kbh., 8 (1952) 137.
30. Bremer, F. i J. Titeca, C. R. Soc. Biol., Paris, 107 (1931) 253.
31. Stanbury, J. B., J. Pharmacol., 93 (1948) 51.
32. Hutter, O. F. i K. Kostial, J. Physiol., 120 (1953) 53 P.

33. *Brown, G. L. i W. Feldberg*, J. Physiol., 88 (1936) 265.
34. *del Castillo, J. i L. Engbaek*, J. Physiol., 124 (1954) 370.
35. *del Castillo, J. i B. Katz*, Nature, Lond., 171 (1953) 1016.
36. *Kostial, K., V. B. Vouk i Lj. Purec*, Arh. Hig. Rada, 5 (1954) 351.
37. *Cohn, E. J., D. Surgeon et al.*, Faraday Soc. Discussions, 13 (1953) 176.
38. *Frommel, E. et al.*, H. Physiol. Pharmacol. Acta, 4 (1946) 297.
39. *Frommel, E., A. D. Herschberg i J. Piquot*, C. R. soc. phys. hist. nat. Genève, 60 (1943) 97.
40. *Frommel, E., A. D. Herschberg et al.*, H. Physiol. Pharmacol. Acta, 2 (1944) 169.

Summary

THE EFFECT OF SODIUM, POTASSIUM, CALCIUM,
MAGNESIUM AND LEAD IONS ON SYNAPTIC
TRANSMISSION

The effects of sodium, potassium, calcium, magnesium and lead ions on acetylcholine output and synaptic transmission are briefly summarised. Author's own results obtained by direct measurement of the acetylcholine output from the superior cervical ganglion of the cat are discussed.

*Toxicology Department,
Institute of industrial Hygiene,
Z a g r e b*

*Received for publication
15 July 1955*