

POCHODZENIE ACETYLOCHOLINY (ACH) WYZWALANEJ Z ZAKOŃCZEŃ NERWÓW RUCHOWYCH PRZY ICH DRAŻNIENIU

Z Zakładu Fizjologii Śląskiej A. M. im. L. Waryńskiego w Zabrze-Rokitnicy
oraz z Sekcji Fizjologii Pracy Inst. Medycyny Pracy w Przemysle Węglowym
i Hutniczym

Kierownik: prof. dr *Br. Zawadzki*

Jak słusznie pisze *Kosztójanc* (1949), „zagadnienie chemicznej natury pobudzenia nerwowego nie przypadkowo znajduje się w polu widzenia fizjologów całego świata. Wiąże się ono z podstawowymi problemami współczesnej fizjologii zwierząt i dotyczy bardzo ważnych procesów regulacji i integracji organizmów przy udziale wysoce aktywnych produktów przemiany materii organizmu. Do tego należy dodać, że opracowanie tego zagadnienia ma nie tylko teoretyczne, lecz również i praktyczne znaczenie, gdyż jesteśmy świadkami tego, że chemiczna teoria pobudzenia nerwowego uzyskała dostęp do klinik i w szeregu punktów otrzymała już aprobatę i zastosowanie kliniczne“.

Również *Bykow* (1949) podkreślał znaczenie badań nad mechanizmem przenoszenia impulsów w następujących słowach: „Ukształtowane w naszej szkole poglądy o regulującej roli mózgu dla czynności narządów wewnętrznych koniecznie wymagają dalszego rozwoju i wyjaśnienia istoty mechanizmu wpływu kory mózgowej na narządy wewnętrzne. W bezpośrednim związku z tym pozostaje zagadnienie zbadania mechanizmu przekazywania procesów pobudzenia i hamowania w aparatach synaptycznych ośrodkowego układu nerwowego. Dopóki nie zostaną wykryte podstawowe prawidłowości przebiegu tych złożonych, wzajemnie uwarunkowanych procesów w korze mózgowej, dopóty nie możemy uważać za wyjaśnione w jakimkolwiek stopniu zagadnienie istoty regulującego działania kory“. A dalej (str. 23): „Wszystkie prawidłowości i osobliwości, ustalone w granicach synaps zwojów, możemy z pełnym prawem przenieść na połączenia synaptyczne mózgu, tym bardziej, że i w synapsach ośrodkowego układu nerwowego przenoszenie pobudzeń odbywa się za pośrednictwem ACh, co do czego uzyskano pewne dane w naszej pracowni już w 1934 r.“.

Tak więc zagadnienie przenoszenia impulsów przez synapsy oraz rola ACh w tym przenoszeniu mają niewątpliwie ogromne znaczenie zarówno teoretyczne, jak i praktyczne, czego wyrazem jest olbrzymia liczba prac ogłoszonych w tej dziedzinie.

Jedno z najważniejszych praktycznie zagadnień związanych z przenoszeniem pobudzeń polega na tym, że jak wiadomo przy długotrwałym drażnieniu całego łuku odruchowego lub jego części odśrodkowej zmę-

czenie występuje najwcześniej w połączeniach międzykomórkowych, a więc zarówno w synapsach międzyneuronowych, jak i w płytce końcowej w mięśniu. Chcąc zrozumieć, jak powstaje znużenie synaps, a tym samym chcąc znaleźć sposoby zwalczania tego znużenia, musimy przede wszystkim wiedzieć dokładnie, jakie procesy zachodzą przy przenoszeniu pobudzeń przez synapsy. Z punktu widzenia teorii chemicznego przenoszenia impulsów można znużenie synaps traktować jako wynik zużycia przenośnika wyzwalanego z zakończeń nerwowych w chwili dojścia do nich impulsu. W związku z tym bardzo ważnym staje się zagadnienie skąd pochodzi, gdzie jest wytwarzany przenośnik i czy można wzmóc jego produkcję. Prowadzone w naszych pracowniach badania mają właśnie na celu znalezienie odpowiedzi na te pytania. Niniejsza praca zajmuje się pierwszą częścią zagadnienia, to znaczy pochodzeniem najważniejszego przenośnika, a mianowicie ACh.

Zagadnienie to ma zresztą duże znaczenie dla całej teorii chemicznego przenoszenia impulsów. Teoria ta jak wiadomo miała nie tylko licznych zwolenników, lecz i przeciwników. Pierwsze prace *Loewiego* były poważnie atakowane, dopóki wykrycie esterazy cholinowej oraz jej hamowania przez ezerynę (fizostygmine) nie wskazało drogi otrzymywania ACh wyzwalanej przy drażnieniu nerwów w stanie nierozłożonym. W latach trzydziestych bieżącego stulecia teoria chemicznego przenoszenia odnosiła liczne triumfy, obejmując kolejno wszystkie połączenia nerwowo-efektorowe oraz wiele połączeń międzyneuronowych. Pozwoliło to napisać autorom pierwszego referatu przeglądowego dotyczącego przenoszenia impulsów przez synapsy (*Bronk i Brink, 1939*) następujące słowa: „Najpowszechniej przyjęte wyjaśnienie przenoszenia synaptycznego przyjmuje, że impulsy przedsynaptyczne wyzwalają małą ilość ACh, a ta z kolei wywołuje pobudzenie w ciele komórki“. W latach czterdziestych natomiast zwolennicy teorii elektrycznego przenoszenia zaatakowali ostro teorię chemiczną, tak że w pewnym okresie słuszność jej wydawała się bardzo wątpliwa. Obecnie jednak znowu jesteśmy świadkami jej przewagi nad teorią przenoszenia czysto elektrycznego, czemu dali wyraz *Brooks i Fuortes (1952)* pisząc (str. 374): „Wydaje się ogólnie przyjętym pogląd że depolaryzacja okolicy płytki końcowej przez potencjał płytki końcowej (e. p. p.) jest spowodowana przez ACh wyzwalaną z zakończeń nerwu ruchowego przez impulsy nerwowe“. Nawet *Eccles*, jeden z głównych zwolenników teorii elektrycznego przenoszenia, a tym samym przeciwników teorii chemicznej, ostatnio (*Brock, Coombs i Eccles 1952*) doszedł do wniosku, że teoria chemicznego przenośnika jest jedynym prawdopodobnym wyjaśnieniem hamowania w synapsach, co wg autorów pozwala wnioskować, że pobudzające działanie synaptyczne odbywa się również przy udziale chemicznego przenośnika (l. c. s. 455).

Jedną z głównych trudności teorii chemicznego przenoszenia impulsów przez synapsy polega na tym, że wg jej przeciwników czas opóźnienia synaptycznego jest zbyt krótki na to, żeby w ciągu niego mogła nastąpić synteza, wydzielanie i zadziałanie przenośnika na strukturę pozasynaptyczną. Dlatego *Brown i Feldberg (1937)* uważali, że ACh nie jest wytwarzana przez przybycie impulsu, lecz jest uruchamiana z poprzednio wytworzonego zapasu. Przeciwno temu przypuszczeniu przemawiał jednak według tych autorów stwierdzony przez nich i potwierdzony następnie przez *Kahlsoma i Mac Intosha (1939)* fakt, że podczas długotrwałego

drażnienia włókien przedzwojowych zwoju współczulnego, do płynu przepływającego naczynia zwoju przechodzi znacznie więcej ACh, aniżeli jej się znajduje w drugim zwoju kontrolnym, a mimo to zawartość ACh w zwoju przepłukiwanym zmniejszała się tylko nieznacznie. Tak więc zapasy ACh znajdujące się w samym zwoju nie mogą być jedynym źródłem wyzwolanej ACh. Stwierdzono również (*Brown i Feldberg, l. c.*), że przepłukiwanie zwoju krwią zwiększa wyzwalamie ACh w długo drażnionym zwoju, zaś w braku glukozy w perfuzacji, jak wykazali *Kahlon i Mac Intosh (l. c.)*, ilość wyzwolonej ACh znacznie się zmniejszała. Wyniki te wg wspomnianych autorów można najłatwiej wytłumaczyć przyjmując, że ACh jest wytwarzana w zakończeniach nerwowych bezpośrednio przez każdy impuls, co jednak, jak wspomniałem, wydaje się mało prawdopodobne ze względu na krótki czas opóźnienia synaptycznego. Trudno również przypuścić, że ACh może być syntezowana w dostatecznych ilościach w samych zakończeniach nerwowych ze względu na ich małe rozmiary. Ponadto przypuszczenie to nie wyjaśnia dlaczego, jak to stwierdzili *Loewi i Hellauer (1938)*, *Hellauer (1939)*, *Mac Intosh (1941)* i inni, nerwy cholinergiczne zawierają znaczne ilości ACh, podczas gdy nerwy czuciowe oraz adrenergiczne praktycznie jej nie zawierają.

Ażeby rozwiązać te trudności, wysunąłem jeszcze w 1938 r. przypuszczenie, że ACh jest wytwarzana w ciałach komórek neuronów cholinergicznych i następnie przesuwana się do zakończeń nerwowych wzdłuż włókien. Po raz pierwszy wzmianka o tym przypuszczeniu ukazała się w druku w odczycie *Czubalskiego (1938)*. Pierwsze próby sprawdzenia tego przypuszczenia wykonano w 1938/39 r. Uzyskane wyniki tymczasowo ogłoszono w r. 1946 (*Zawadzki*).

Przypuszczenie to wyjaśnia po pierwsze, dlaczego ilość wyzwolonej ACh może być znacznie większa, aniżeli jej zawartość w zwoju, bowiem zgodnie z tym przypuszczeniem ACh jest zmagazynowana nie tylko w odcinku włókien przedzwojowych objętych zwojem, ale na całej długości włókien. Prócz tego synteza ACh może zachodzić podczas drażnienia nerwów nie tylko w obrębie zakończeń w zwoju, lecz także w ciele komórki, a ponadto, jak to wykazali *Feldberg (1943)* oraz *Nachmansohn i współpracownicy (1945—1946)*, może ona zachodzić na całej długości włókien nerwowych. Po drugie przypuszczenie to wyjaśnia, dlaczego we włóknach cholinergicznych ACh występuje na całej ich długości, a nie tylko w zakończeniach. Bowiem ACh wytwarzana w ciele komórki musi przesuwać się do zakończeń po włóknie, a więc musi się w nim znajdować, podobnie jak woda w rurze wodociągowej. Dzięki temu włókno stanowi pokaźny magazyn ACh.

W związku ze wspomnianymi pracami *Feldberga (1943)* oraz *Nachmansohna i współpracownicy (1945, 1946)* należy moje pierwotne przypuszczenie rozszerzyć w ten sposób, że ACh jest wytwarzana nie tylko w ciele komórki, lecz również w całym aksonie, a więc prawdopodobnie i w jego zakończeniach. Jednakże ta ostatnia produkcja jest prawdopodobnie znikoma, wobec czego prawie cała wyzwolana ACh musi przedostać się z ciała komórki i z całego aksonu do jego zakończeń. Nasuwa się przy tym pytanie, czy takie przesuwanie się ACh może zachodzić we włóknie z dostateczną szybkością, żeby mogła ona być wyzwalamana w ciągu całego drażnienia, gdyż jak stwierdzają *Brown i Feldberg (1937)* w ciągu 20—40 minut wyzwalała się ilość równa ilości zawartej w kontrolnym zwoju,

a mimo to zawartość ACh w zwoju przepłukiwanym po 3 godzinach drażnienia prawie się nie zmienia. W tymczasowych doniesieniach (Zawadzki 1946, 1952) wysuwałem przypuszczenie, że ACh przesuwa się we włóknach na podstawie przyspieszonej dyfuzji opisanej przez *van den Homerta* (1932). Zagadnienie to omówię dokładniej przy dyskusji wyników.

Podobne przypuszczenie co do miejsca wytwarzania adrenaliny i jej pochodnych wyzwalanych z zakończeń zazwojowych włókien współczulnych wypowiedzieli *Raab* i *Humphreys* (1947). Autorzy ci uważali, że adrenalina i blisko spokrewnione z nią pochodne katecholu są wytwarzane w komórkach zwojowych i spływają (*flow down*) wzdłuż aksonów pod wpływem odpowiednich podniet, po czym są przerabiane na sympatynę w obrębie komórek efektorowych. Również *Kibiakow* (1949) wypowiada pogląd, że adrenalina, wydzielana przez komórki chromochłonne układu nerwowego pijawki, dostaje się do obwodowych aparatów włókien adrenergicznych na drodze rozchodzenia się wzdłuż wypustek tych komórek. Jednakże autorzy ci nie dostarczyli przekonujących dowodów słuszności tych poglądów.

Niniejsza praca miała właśnie na celu wykazanie, że rzeczywiście ACh przesuwa się z ciała komórki oraz z aksonu do zakończeń nerwowych. Wobec tego, że jak to stwierdzili *Dale* i *Feldberg* (1934) oraz *Dale*, *Feldberg* i *Vogt* (1936), podczas drażnienia nerwów ruchowych również wyzwala się ACh, badania przeprowadzono na preparatach nerwowo-mięśniowych żab, gdyż otrzymanie dostatecznej liczby wyników na nerwach przedzwojowych kotów lub królików byłoby bardzo trudne. Jakkolwiek więc uzyskane wyniki dotyczą ściśle biorąc tylko nerwów kulszowych żab, to jednak można z dużym prawdopodobieństwem przyjąć, że znalezione tu wyniki dotyczą wszelkiego przenoszenia chemicznego impulsów.

Plan pracy opierał się na następującym rozumowaniu. Jak wiadomo przy długotrwałym drażnieniu pośrednim preparatu nerwowo-mięśniowego za pomocą serii dostatecznie częstych podniet — kilkadziesiąt razy na sekundę — skurcze mięśni na drażnienie pośrednie znikają pomimo, że ani nerw, ani mięsień nie są jeszcze zmęczone. Zgodnie z powyżej przedstawionym poglądem można przypuszczać, że to tzw. zmęczenie połączenia nerwowo-mięśniowego jest spowodowane wyczerpaniem zapasów ACh zarówno w zakończeniach nerwowych, jak i w całych włóknach ruchowych wskutek tego, że szybkość syntezy ACh w nerwie jest mniejsza od szybkości jej wyzwalań przez zakończenia. Gdyby to przypuszczenie było słuszne, to można oczekiwać, że po dostatecznie długim drażnieniu z dostateczną częstością zawartość ACh w nerwie połączonym z mięśniem powinna się zmniejszyć. Zmniejszanie się zawartości ACh w nerwach drażnionych stwierdziłem już w r. 1938. Również *Rosenblueth*, *Lissák* i *Lanari* (1939) stwierdzili zmniejszanie się zawartości ACh w drażnionych nerwach. *Bieżański* (1952) w pracy wykonanej w Zakładzie Fizjologii A. M. w Warszawie z mojej inicjatywy i pod moim kierunkiem — na życzenie kierownika zakładu prof. *Czubalskiego* — otrzymał podobne wyniki.

Sam fakt zmniejszania się zawartości ACh w nerwach drażnionych nie dowodzi jednak, że ACh przesuwa się z pnia nerwowego do zakończeń w mięśniu czy zwoju. Można bowiem przypuścić, że ACh jest zużywana czy niszczona przez samo drażnienie prądem, albo że wydostaje się z włókien nerwowych na całej ich długości, a nie tylko z zakończeń, albo

wreszcie że wydostaje się z przeciętych w czasie preparowania nerwu gałązek dochodzących do mięśni uda.

Ażeby wykluczyć te możliwości należy drażnić nerwy w takich warunkach, w których ACh nie będzie mogła przedostawać się do zakończeń w mięśniu i sprawdzić, czy i wówczas zachodzi znikanie ACh z nerwu. Można to osiągnąć albo przez zablokowanie nerwów tuż przy mięśniu prądem stałym, albo odcinając nerw tuż przy mięśniu. Jeżeli w tych warunkach ACh nie będzie znikać z nerwu drażnionego identycznie jak w normalnym preparacie, to jedynym, jak sędzę, wyjaśnieniem znikania ACh z nerwu w normalnych warunkach jest przesuwanie się jej do zakończeń w mięśniu.

Dla wykazania, że ciała komórek również biorą udział w wytwarzaniu ACh, należy drażnić nerwy *in situ* w jednakowy sposób, z tym, że jeden nerw będzie połączony z rdzeniem, a drugi odcięty od rdzenia. Jeżeli ciała komórek wytwarzają ACh i jeżeli przenosi się ona do aksonów, to nerwy połączone z rdzeniem powinny zawierać więcej ACh, aniżeli nerwy odcięte.

METODYKA

Badania wykonywano na nerwach kulszowych żaby wodnej (*Rana esculenta*). Preparaty nerwowo-mięśniowe obu tylnych łapek przygotowywano wg metody Scheminzky'ego (1947), unikając w ten sposób zetknięcia nerwów ze skórą oraz zmniejszając do minimum niebezpieczeństwo mechanicznego uszkodzenia nerwu.

Ekstrahowanie ACh z nerwów wykonywano w pierwszej serii doświadczeń za pomocą 10% kwasu trójchlorooctowego wg metody opisanej przez Gadduma (1936), zaś w drugiej serii za pomocą kwasu solnego.

Przygotowanie wyciągu za pomocą kw. trójchlorooctowego. Po wypreparowaniu wkładano nerwy do uprzednio zważonego naczynka wagowego zawierającego 1 ml 10% kw. trójchlorooctowego i ponownie ważono. Z różnicy obliczano ciężar nerwów. Nerwy zanurzone w kwasie krajano drobno nożyczkami i zostawiano na 1—2 godziny, od czasu do czasu mieszając. Wyciąg przesączano przez bibułę na zwykłym lejku. Naczynko przepłukiwano 3 razy 7% kw. trójchlorooctowym po 1 ml i każdą porcję wlewano do lejka. Połączone przesącze wytrząsano 4—5 razy eterem w szczelnie zamkniętej probówce, usuwając za każdym razem eter z góry ostrożnie pipetą z gumką. Następnie sprawdzano odczyn przesącza papierkiem indykatorowym (czerwień Kongo lub uniwersalny). Jeżeli odczyn był wyraźnie kwaśny, powtarzano wytrząsanie z eterem aż do całkowitego usunięcia kwasu trójchlorooctowego. Następnie przesącz odparowywano w próżni. Po całkowitym odparowaniu pozostałość na parownicze rozpuszczano w 3 ml roztw. Ringera bez NaHCO_3 i badano na zawartość ACh.

Przygotowanie wyciągu za pomocą kwasu solnego. Do dokładnie zważonej płaskodennej probóweczki o średnicy ok. 15 mm i wysokości ok. 32 mm zawierającej 0,5 ml 0,2 N HCl, 1 ml rozt. Ringera bez NaHCO_3 oraz 66 μg salicylanu ezeryny, wkładano wypreparowane nerwy i ponownie ważono. Następnie nerwy drobno krajano nożyczkami, gotowano 2 minuty i przez noc zostawiano w lodówce. Na drugi dzień dodawano 0,5 ml 0,2 N NaOH i 1 ml rozt. Ringera bez NaHCO_3 i po sprawdzeniu, że reakcja jest obojętna, oznaczano zawartość ACh w wyciągu bez sączenia. Całkowita objętość płynu wynosiła i w tym przypadku 3 ml.

Obie metody ekstrakcji dawały na ogół jednakowe wyniki, jednak druga metoda okazała się wygodniejsza w praktyce.

Oznaczanie zawartości ACh w wyciągach wykonywano stale na mięśniu prostym brzucha żaby wodnej metodą Changa i Gadduma (1933). Do porównania używano chlorku acetylochliny firmy Hoffmann--La Roche, wobec czego podane w pracy liczby dotyczące zawartości ACh w nerwach odnoszą się nie do czystej zasady, lecz do chlorku.

Mięsień prosty brzucha przygotowywano w następujący sposób: po zabiciu żaby kładziono ją na grzbiecie i usuwano całkowicie skórę z brzucha. Następnie ostrymi nożyczkami przecinano mięśniówkę brzucha ściśle w linii środkowej. Oba mięśnie proste wypreparowywano od innych mięśni poszukiwaczem na tępo, podkładano nitki pod oba końce, podwiązywano i odcinano na obu końcach. Wycięte mięśnie umieszczano na pewien czas w roztw. Ringera, następnie jeden z nich umocowywano na zgiętej rurce, przywiązując dolny koniec do rurki, zaś górny do dźwigni miografu. Po ustawieniu miografu na takiej wysokości, że jego dźwignia była pozioma, przystawiano drugi koniec dźwigni do walca kimografu i zapisywano linię podstawową. Następnie zanurzano mięsień do roztw. Ringera zawierającego ezerynę w rozc. ok. 1:100 000 i po 15 minutach działano na mięsień na przemian znanymi roztworami ACh i wyciągiem z nerwów, starając się dobrać takie stężenie ACh, przy którym wychylenie dźwigni było jednakowe z wychyleniem spowodowanym przez badany wyciąg.

Roztwory wzorcowe przygotowywano rozpuszczając 100 mg chlorku acetylochliny w 100 ml wody destylowanej zakwaszonej kwasem octowym do pH 4. Roztwór taki przechowywano w lodówce. 1 ml tego roztworu rozcieńczano roztw. Ringera bez NaHCO_3 . Mięsień zanurzano do roztworów czynnych na 3 minuty, po czym przemywano czystym roztw. Ringera i pozostawiano w roztw. Ringera z ezeryną aż do całkowitego rozkurczu. Przez cały czas przepuszczano przez roztwory, w których znajdował się mięsień, pęcherzyki powietrza 1 na sek., przez rurkę, do której był przywiązany mięsień. Znając objętość wyciągu oraz stężenie ACh w płynie wzorcowym obliczano zawartość ACh w odważonej porcji nerwów, a następnie przeliczano na 1 g nerwu.

Nerwy drażniono prądem zmiennym z sieci. Napięcie prądu zmniejszano początkowo za pomocą transformatora dzwonkowego do 3 V, po czym prowadzono prąd transformatora do cewki pierwotnej aparatu saneczkowego Du Bois-Reymonda. Przesuwając wtórną cewkę można zmieniać napięcie prądu zmiennego w szerokich granicach. Takie urządzenie ma następujące zalety: po pierwsze prąd drażniący z wtórnej cewki można dokładnie mierzyć przez cały czas drażnienia za pomocą woltomierza prądu zmiennego, po drugie częstość drażnienia i czas trwania przepływu prądu są bardzo stałe i jednakowe we wszystkich doświadczeniach, po trzecie nie zachodzi polaryzacja elektrod i wreszcie unika się tzw. pozorowego zmęczenia nerwu, opisanego przez *Biedermanna* (1879), a następnie przez *Scheminzy'ego* (piśmiennictwo p. *Zawadzki* 1947), które powstaje przy długotrwałym drażnieniu prądem jednokierunkowym.

Preparaty nerwowo-mięśniowe znajdowały się podczas drażnienia w parowniczkach napełnionych normalnym roztworem Ringera nie zawierającym glukozy. Nerwy unoszono nieznacznie nad powierzchnię płynu i układano na srebrnych elektrodach. Podczas drażnienia przesuwano stale nerw tak, że wciąż nowe odcinki były drażnione i uniesione ponad płyn.

WYNIKI

1. Porównanie zawartości ACh w prawych i lewych nerwach kulszowych tej samej żaby. Ażeby się upewnić, że nerwy lewe tych samych żab mogą służyć jako kontrola zmian

zachodzących w zawartości ACh po drażnieniu w różnych warunkach nerwów prawych oznaczono zawartość ACh w nie drażnionych nerwach symetrycznych. W tym celu natychmiast po wypreparowaniu sporządzano wyciągi z nerwów dwóch lub trzech żab, oddzielnie z lewych i z prawych, i oznaczano zawartość ACh w tych wyciągach. Wyniki tych oznaczeń przedstawia tabela I.

Tabela I

Zawartość ACh w nerwach nie drażnionych, w mikrogramach na 1 g nerwu.
Wyciągi sporządzono za pomocą kwasu trójchlorooctowego

												Średnia
Prawe nerwy	1,6	2,0	2,0	1,6	2,0	3,0	2,5	6,9	3,9	3,4	2,9	
Lewe nerwy	1,6	2,0	2,0	1,6	2,0	3,0	2,5	6,9	4,2	3,4	2,9	

Jak widać z tabeli, zawartość ACh w nerwach różnych żab waha się dość znacznie, natomiast prawe i lewe nerwy tych samych żab zawierają jednakowe ilości ACh. Jednakową zawartość ACh w lewych i prawych nerwach stwierdził również *Bieżański* (1952). Tak więc lewe nerwy mogą służyć jako kontrola zmian zachodzących w nerwach prawych.

2. Wpływ drażnienia prądem o napięciu 0,5 V na zawartość ACh w nerwach normalnych preparatów nerwowo-mięśniowych. W doświadczeniach tych drażniono stale prądem o napięciu 0,5 V, gdyż wstępne doświadczenia wykazały, że takie napięcie daje maksymalny skurcz a zarazem nie uszkadza widocznie nerwu. Drażniono stale nerwy prawe w sposób opisany w metodyce aż do całkowitego ustania skurczów nawet po kilkunastominutowym odpoczynku. Preparaty kontrolne, lewe, przebywały przez cały czas drażnienia w podobnych warunkach jak preparaty drażnione.

Wyniki tych doświadczeń przedstawia tabela II.

Tabela II

Zawartość ACh w nerwach kontrolnych i drażnionych prądem zmiennym o nap. 0,5 V w mikrogramach na 1 g nerwu. Wyciągi sporządzono za pomocą kw. trójchlorooctowego

Czas drażnienia	Nerwy lewe kontrolne	Nerwy prawe drażnione	Różnica	Różnica w % normy
4 ^h 40'	3,4	1,4	-2,0	-59%
6 ^h 55'	1,9	0,7	-1,2	-63%
7 ^h 10'	2,3	1,2	-1,1	-48%
7 ^h 45'	2,9	1,6	-1,3	-45%
5 ^h 50'	1,9	0,9	-1,0	-53%
7 ^h 35'	2,0	0,7	-1,3	-65%
7 ^h 25'	4,4	1,4	-3,0	-68%
6 ^h 40'	3,4	2,0	-1,4	-41%
7 ^h 45'	3,3	0,8	-2,5	-75%
7 ^h 35'	3,1	1,4	-1,7	-55%
Średnia	2,85	1,2	-1,65	-57%

Zmniejszenie zawartości ACh w nerwach drażnionych jest niewątpliwe, wynosi średnio 57% normy. Podobne wyniki uzyskał Bieżański (l. c.), a mianowicie zmniejszenie zawartości ACh w nerwach drażnionych przez 5—6 godzin wynosiło u niego w 15 doświadczeniach średnio ok. 60%. Tak więc nie ulega wątpliwości, że drażnienie nerwów kulszowych żaby powoduje zmniejszenie zawartości ACh w tych nerwach.

3. Zachowanie się ACh w nerwach drażnionych, ale blokowanych prądem stałym tuż przy mięśniu. Chcąc z kolei sprawdzić, czy znikanie ACh z drażnionych nerwów nie jest spowodowane przez samo działanie prądu drażniącego, wykonano serię doświadczeń, w których prawe nerwy kulszowe żaby drażniono prądem o napięciu 0,5 V, podobnie jak w serii 2, z tą jednak różnicą, że nerwy drażnione były zablokowane tuż przy mięśniu za pomocą prądu stałego z akumulatorów. Prąd stały przepuszczano przez nerw za pomocą srebrnych elektrod przez cały czas drażnienia. Lewe nerwy kontrolne pozostawały przez ten czas w roztw. Ringera podobnie jak w serii 2. Wyniki tej serii doświadczeń przedstawia tabela III.

Tabela III

Zawartość ACh w nerwach kontrolnych i drażnionych w mikrogramach na 1 g nerwu. Napięcie prądu drażniącego 0,5 V. W pierwszych 6 doświadczeniach nerwy były blokowane prądem stałym o nap. 2 V, a w pozostałych o nap. 4 V. Czas drażnienia w pierwszych sześciu doświadczeniach 6 godzin, a w pozostałych 7 godzin.

Wyciągi sporządzano za pomocą kwasu trójchlorooctowego

											Srednia
Lewe nerwy kontrolne	2,4	3,2	3,3	1,6	3,0	1,6	2,8	3,4	1,7	3,7	2,65
Prawe nerwy drażnione	2,2	2,5	2,5	1,6	2,5	1,6	2,4	3,6	1,6	3,5	2,4
Różnica	-0,2	-0,7	-0,8	0	-0,5	0	-0,4	+0,2	-0,1	-0,2	-0,25
Różnica w % kontrolnych	-8 %	-22 %	-26 %	0	-17 %	0	-14 %	+6 %	-6 %	-8 %	-9 %

Jak widzimy, zawartość ACh w nerwach drażnionych, ale blokowanych prądem stałym, tylko nieznacznie różni się od zawartości w nerwach kontrolnych, w przeciwieństwie do nerwów drażnionych i nie blokowanych. Można więc w zasadzie przyjąć, że ACh może wydostawać się z nerwów tylko wówczas, gdy impulsy nerwowe dochodzą do ich zakończeń w mięśniach, a zatem że wydostaje się ona w warunkach naszych doświadczeń prawie wyłącznie z zakończeń nerwowych.

4. Zachowanie się ACh w nerwach odciętych od mięśnia i drażnionych. Jeżeli wysunięty z poprzedniej serii wniosek jest słuszny, to należy przypuszczać, że z nerwów odciętych od mięśni, a więc nie mających połączenia z zakończeniami, podczas drażnienia nie powinna znikać ACh. W celu sprawdzenia tego przypuszczenia nerwy wypreparowane jak zwykle, odcinano od mięśni łydkowych i następnie drażniono w sposób opisany w punkcie 2 przez 6 lub 7 godzin. Wyniki tych doświadczeń przedstawia tabela IV.

Wyniki uzyskane w tych doświadczeniach całkowicie zgadzają się z wynikami uzyskanymi przy drażnieniu nerwów blokowanych. Stanowi

Tabela IV

Zawartość ACh w nerwach kontrolnych i drażnionych po odcięciu od mięśnia, w mikrogramach na 1 g nerwu. Napięcie prądu drażniącego 0,5 V. Czas trwania drażnienia w pierwszych trzech doświadczeniach 6 godzin, w następnych 7 godzin.

Wyciągi sporządzano za pomocą kwasu trójchlorooctowego

											Średnia	
Lewe nerwy kontrolne . .	2,8	4,3	5,4	3,6	1,7	3,6	1,9	2,7	2,8	1,4	3,0	
Prawe nerwy drażnione . .	2,3	3,1	5,2	3,4	1,7	3,5	1,9	2,7	2,4	1,4	2,75	
Różnica . . .	-0,5	-1,2	-0,2	-0,2	0	-0,1	0	0	-0,4	0	-0,25	
Różnica w % kontrolnych	-17%	-28%	-4%	-6%	0	-3%	0	0	-14%	0	-8%	

to dodatkowy dowód, że ACh w zasadzie musi dostać się do zakończeń nerwowych w mięśniach ażeby mogła wydostać się z nerwu przy drażnieniu niezbyt silnym prądem.

Należy jednak zwrócić uwagę, że chociaż zmniejszenie się zawartości ACh przy drażnieniu nerwów blokowanych i odciętych od mięśnia było na ogół znacznie mniejsze niż w normalnych preparatach, a nawet w szeregu doświadczeń ACh w ogóle nie zniknęła, to jednak w niektórych doświadczeniach znikanie ACh zachodziło, aczkolwiek zawsze w mniejszym stopniu niż w normalnych preparatach. Ażeby wyjaśnić ten fakt, wysunąłem przypuszczenie, że dla części włókien nerwowych prąd o napięciu 0,5 V jest już zbyt silny i że powoduje on uszkodzenie tych włókien i wychodzenie ACh w miejscach uszkodzenia. Ażeby sprawdzić to przypuszczenie wykonano dwie dalsze serie doświadczeń, w których drażniono nerwy blokowane prądem stałym za pomocą prądu zmiennego o napięciu 5 oraz 10 V. Jeżeli moje przypuszczenie było słuszne, to należało oczekiwać, że pomimo zablokowania nerwów prądem stałym przy drażnieniu silnym prądem ACh powinna zniknąć z nerwów, i to tym bardziej, im silniejszy będzie prąd drażniący.

5. Zachowanie się ACh w nerwach drażnionych silnym prądem i blokowanych prądem stałym. Doświadczenia wykonywano jak w serii 3, z tą różnicą, że drażniono prądem zmiennym o napięciu 5 i 10 V. Wyniki tych doświadczeń przedstawiają tabele V i VI.

Tabela V

Zawartość ACh w mikrogramach na 1 g nerwu, w nerwach kontrolnych i w nerwach blokowanych prądem stałym o nap. 4 V, drażnionych prądem zmiennym o nap. 5 V. Czas drażnienia w pierwszym doświadczeniu 7 godzin, w pozostałych doświadczeniach 6 godzin. Wyciągi sporządzano za pomocą kwasu solnego

											Średnia	
Lewe nerwy kontrolne . .	1,6	3,6	1,3	2,8	3,0	2,5	4,0	3,7	1,4	2,6	2,6	
Prawe nerwy drażnione . .	1,6	3,5	0,9	0,5	1,6	1,2	2,9	2,0	0,4	1,2	1,6	
Różnica . . .	0	-0,1	-0,4	-2,3	-1,4	-1,3	-1,1	-1,7	-1,0	-1,4	-1,0	
Różnica w % kontroli . . .	0	-3%	-30%	-82%	-47%	-52%	-28%	-46%	-71%	-54%	-40%	

Tabela VI

Zawartość ACh w mikrogramach na 1 g nerwu w nerwach kontrolnych i w nerwach blokowanych prądem stałym o nap. 4 V, drażnionych prądem zmiennym o napięciu 10 V. Czas drażnienia stale 7 godzin. Wyciągi sporządzano za pomocą kwasu solnego

Lewe nerwy kontrolne . .	4,0	2,5	2,0	3,1	3,1	5,4	2,2	4,7	2,2	Srednia 4,8	3,4
Prawe nerwy drażnione . .	1,2	1,2	1,0	0,4	0,9	2,5	0,4	1,9	1,0	4,0	1,4
Różnica . . .	-2,8	-1,3	-1,0	-2,7	-2,2	-2,9	-1,8	-2,8	-1,2	-0,8	-2,0
Różnica w % kontroli . . .	-70%	-52%	-50%	-87%	-71%	-54%	-82%	-60%	-55%	-17%	-60%

Zgodnie z przewidywaniem, zawartość ACh w nerwach drażnionych prądem silnym pomimo blokowania zmniejszała się znacznie więcej niż przy drażnieniu prądem słabym, przy czym tym więcej, im silniejszy był prąd. Wobec tego wydaje się prawdopodobne, że istotnie niewielkie znikanie ACh z nerwów blokowanych lub odciętych od mięśnia przy drażnieniu prądem o napięciu 0,5 V było spowodowane uszkodzeniem niewielkiej liczby włókien. W miarę zwiększania napięcia prądu liczba włókien uszkodzonych wzrasta, wskutek czego znikanie ACh jest coraz większe.

6. Zachowanie się ACh w nerwach drażnionych *in situ*, odciętych i nie odciętych od rdzenia. Ażeby przekonać się, czy ACh wyzwalana z zakończeń nerwowych pochodzi przynajmniej częściowo z ciał komórek nerwowych, wykonano następną serię doświadczeń, w której drażniono nerwy kulszowe żaby *in situ*. Żaby usypiano wprowadzając pod skórę na grzbiecie ok. 2 ml 10% uretanu, następnie od strony grzbietowej odsłaniano prawe i lewe nerwy kulszowe na niewielkiej przestrzeni, unikając w miarę możliwości skrwienia. Po odsłonięciu nerwów w pobliżu kręgosłupa po jednej stronie odcinano nerw kulszowy tuż przy rdzeniu, natomiast po drugiej stronie pozostawiono nerw nie naruszony, a tylko podkładano pod odcinek nerwu elektrody. Drażniono nerwy po obydwóch stronach prądem odprowadzonym od tej samej cewki wtórnej aparatu Du Bois-Reymonda, zasilanego prądem zmiennym z transformatora. Dzięki temu napięcie prądu drażniącego oba nerwy było stale jednakowe i wynosiło 0,5 V. Czas drażnienia wynosił stale 6 godzin. Po zakończeniu drażnienia nerwy możliwie szybko i ostrożnie wypreparowywano i oznaczano w nich zawartość ACh. Wyniki tych doświadczeń przedstawia tabela VII.

Jak wynika z tabeli, nerwy odcięte od rdzenia zawierały zaledwie połowę tej ilości ACh, jaka znajdowała się w nerwach nie odciętych od rdzenia. Wobec tego, że warunki drażnienia były ściśle jednakowe, należało oczekiwać, że zawartość ACh powinna w symetrycznych nerwach zmniejszyć się jednakowo. Doświadczenia wykonane w naszym Zakładzie przez M. Krausego potwierdzają to oczekiwanie, gdyż rzeczywiście w nerwach symetrycznych drażnionych jednakowo znalazł on jednakową zawartość ACh. Tak więc widocznie zachowanie połączenia włókien nerwowych z ciałami komórek powoduje, że włókna te zawierają więcej ACh. Fakt ten potwierdza moje przypuszczenie, że ACh jest wytwarzana nie tylko we włóknach nerwowych, lecz również w ciałach ko-

Tabela VII

Zawartość ACh w mikrogramach na 1 g nerwu w nerwach drażnionych *in situ* prądem zmiennym o nap. 0,5 V. Jeden nerw odcięty od rdzenia, a drugi nie odcięty. Czas drażnienia stale 6 godzin. Wyciągi sporządzano za pomocą kwasu solnego

	Średnia										
Nerwy nie odcięte od rdzenia . .	1,8	2,2	0,2	1,8	0,7	1,0	0,8	1,1	0,2	0,4	1,0
Nerwy odcięte od rdzenia . .	0,6	1,2	0,1	0,7	0,5	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2	0,5
Różnica . .	-1,2	-1,0	-0,1	-1,1	-0,2	-0,3	-0,4	-0,9	-0,1	-0,2	-0,5
Różnica w % . . .	-67%	-45%	-50%	-60%	-29%	-30%	-50%	-73%	-50%	-50%	-50%

mórek, i że ta ACh przenosi się z ciał komórek do włókien. Można wprawdzie również przypuścić, że w nerwach połączonych z rdzeniem synteza ACh przebiega szybciej, niż w nerwach odciętych od rdzenia, np. dzięki dopływowi z ciała komórki ciał niezbędnych do syntezy ACh. Najważniejsze jednak jest tutaj, że ciała komórek biorą w ten czy inny sposób udział w wytwarzaniu ACh, występującej w nerwach, a więc zgodnie z wynikami poprzednich doświadczeń przesuwającej się do zakończeń nerwowych i wyzwalanej z nich podczas drażnienia nerwów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

1. Zawartość ACh w normalnych nerwach kulszowych żaby wodnej (*Rana esculenta*). Średnia zawartość ACh w nerwach kulszowych żaby wodnej obliczona z 70 oznaczeń wynosiła w obecnych badaniach 2,9 μg na 1 g nerwu. Wynik ten zgadza się bardzo dobrze z powojennymi wynikami *Bieżańskiego* (l. c.), który w 70 oznaczeniach otrzymał średnią zawartość 3,0 μg na 1 g nerwów kulszowych. Natomiast uzyskane przez nas obecnie wyniki są przeszło dwukrotnie niższe, niż liczby otrzymywane przed wojną zarówno przeze mnie (*Zawadzki* 1946), jak i przez innych autorów. I tak w moich badaniach znajdowałem od 6,4 do 7,2 μg ACh na 1 g nerwu, średnio ok. 6,8. *Hellauer* i *Umrath* (1939) znaleźli w nerwach kulszowych *Rana esculenta* 6,7 μg ACh/g, zaś u *Rana temporaria* 5 μg /g. Jak widać, wyniki uzyskane przez *Hellauera* i *Umratha* u żaby wodnej zgadzają się bardzo dobrze z moimi. Dlaczego więc obecnie, stosując te same metody, otrzymujemy przeszło dwa razy mniejszą zawartość ACh? Mało prawdopodobne jest przypuszczenie, że zawartość ACh w nerwach żab po wojnie się zmniejszyła. Najprawdopodobniej wzorcowa acetylocholina wytwarzana przed wojną zawierała znacznie mniej biologicznie czynnego preparatu, niż to było podawane na etykiecie. Stąd pozorną zawartość ACh w nerwach wypadła odpowiednio większa. Jak wiadomo, acetylocholina jest bardzo nietrwała, być może więc, że przed wojną nie umiano jeszcze zabezpieczać jej przed zniszczeniem w czasie przygotowań do ampułkowania. Za tym, że obecne wyniki są dobre, przemawia to, że jednakowe ilości ACh znajdowano stosując do otrzymania roztworów wzorcowych zarówno szwajcarską acetylocholinę firmy Hoffmann-La Roche, jak i amerykańską

firmy Abbott. Wobec tego, że prawdopodobnie trudno byłoby obecnie znaleźć przedwojenne preparaty acetylocholiny, sprawdzenie mojego przypuszczenia jest w praktyce niewykonalne.

2. Pochodzenie ACh wyzwalanej z zakończeń nerwowych. Głównym zagadnieniem niniejszej pracy było ustalenie, czy wyzwalana z zakończeń nerwowych w mięśniach podczas drażnienia nerwów ACh jest wytwarzana tylko w zakończeniach nerwowych, czy też raczej w całych włóknach nerwowych, jak również w ciałach neuronów. Wydaje mi się, że uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić z całą pewnością, że ACh wyzwalana z zakończeń nerwowych przynajmniej częściowo pochodzi z włókien nerwowych. Bardzo prawdopodobne jest ponadto, że przy drażnieniu nerwów w ustroju część wyzwalanej z zakończeń ACh pochodzi z ciał neuronów cholinergicznyc. Czy prócz tego ACh jest wytwarzana w samych zakończeniach, tego nie można rozstrzygnąć na podstawie niniejszych badań. Jest to oczywiście zupełnie możliwe, aczkolwiek wydaje się, że udział tego ostatniego źródła w całkowitym wyzwalaniu ACh jest stosunkowo nieznaczny ze względu na małe rozmiary tych zakończeń.

Powstaje z kolei pytanie, jak w świetle wyników obecnej pracy można wyjaśnić pewne fakty, przedstawione przez *Browna i Feldberga* (1936, 1937) oraz przez *Kahlsona i Mac Intosha* (1939), o których wspomniano na wstępie. *Brown i Feldberg* stwierdzili, że jeżeli przepłukiwać górny szyjny zwój współczulny kota roztw. Locke'a zawierającym glukozę i ezerynę, to podczas drażnienia przedzwojowych włókien prawego zwoju trwającego 189 minut do perfuzatu przeszło 1,02 μg ACh, a mimo to zawartość ACh w prawym zwoju po drażnieniu wynosiła 0,2 μg , zaś w lewym kontrolnym 0,28 μg , czyli zawartość ACh w zwoju drażnionym zmniejszyła się w stosunku do kontrolnego tylko o 28,5%. Natomiast, jak wykazali *Kahlson i Mac Intosh*, przy przepłukiwaniu zwoju roztw. Locke'a pozbawionym glukozy, przechodzenie ACh do perfuzatu utrzymywało się tylko 30 do 90 minut, a mimo to zawartość ACh w zwoju drażnionym zmniejszyła się o 50%. Zdaniem *Kahlsona i Mac Intosha* wynik ten stanowi dowód, że synteza zachodzi w samym zwoju i że do tej syntezy konieczna jest glukoza. Równie dobrze możemy jednak przyjąć, że synteza ACh zachodzi nie tylko w zwoju, ale i w nerwach przedzwojowych i że do tej syntezy także potrzebna jest glukoza. W zwoju ACh znajduje się praktycznie tylko w zawartych w nim odcinkach końcowych włókien przedzwojowych oraz we włóknach cholinergicznyc przebiegających przez zwój bez przerwania ciągłości. Dowodzi tego stwierdzony przez *Feldberga* (1943) fakt, że po przecięciu włókien przedzwojowych zawartość ACh w zwoju zmniejsza się bardzo znacznie, a także taki zwój traci zdolność do syntezy ACh. Tak więc glukoza może wzmacniać syntezę ACh nie tylko w zakończeniach nerwowych, ale i w odcinkach włókien przebiegających w obrębie zwoju. Ponadto przy przepłukiwaniu zwoju część perfuzatu może dochodzić również do naczyń zaopatrujących włókna przedzwojowe i wzmacniać w nich syntezę ACh, która następnie przesuwa się do zakończeń w zwoju. Fakty stwierdzone przez *Browna i Feldberga* oraz *Kahlsona i Mac Intosha* można więc wyjaśnić przyjmując, że glukoza znajdująca się w perfuzacie umożliwia syntezę ACh nie tylko w samych zakończeniach nerwowych, lecz przede wszystkim we włóknach przedzwojowych.

Przebieg wyzwalań ACh można sobie wyobrazić w następujący sposób. Z chwilą dojścia pobudzenia do zakończenia nerwowego w zwoju lub mięśniu, następuje zwiększenie przepuszczalności błony komórkowej zakończenia dla ACh (Zawadzki 1937, Fatt i Katz 1952). Dzięki temu określona porcja ACh (wg Achesona, 1948, około 10^{-18} mola ACh na jedną płytkę końcową i na 1 impuls) wydostaje się z zakończenia nerwowego. W miarę powtarzania impulsów zawartość ACh w zakończeniu zmniejsza się, co powoduje przesuwanie się ACh z dalszych odcinków włókna nerwowego do zakończenia. Równocześnie zachodzi synteza ACh w całym włóknie, a także prawdopodobnie w ciele neuronu. Stężenie ACh wyrównuje się w całym neuronie i w przypadku gdy szybkość wychodzenia ACh przewyższa szybkość jej syntezy, zawartość ACh w całym neuronie, a przynajmniej w całym włóknie nerwowym, obniża się równomiernie.

Nasuwa się tu z kolei pytanie, w jaki sposób przesuwanie się ACh we włóknach nerwowych może odbywać się z taką szybkością że, jak twierdzą Rossenblueth, Lissák i Lanari (1939), już po 2 minutach drażnienia nerwów przedzwojowych albo nerwów kulszowych z częstością 60 razy na sekundę, zawartość ACh w nerwach obniża się. Jak widać, przesuwanie się ACh musi zachodzić z szybkością dużo większą, aniżeli drodze zwykłej dyfuzji. Jak już wspominałem we wstępie i dokładnie opisałem w doniesieniu tymczasowym (Zawadzki 1946), tego rodzaju bardzo szybką dyfuzję opisał van den Honert (1932) na granicy fazy wodnej i eterowej w stosunku do oleinianu potasu. Być może więc we włóknach nerwowych istnieją warunki dla tego rodzaju szybkiej dyfuzji. Drugi sposób wyjaśnienia tego zjawiska wskazało wykrycie przez De Robertsa i Schmitta (1948) za pomocą mikroskopu elektronowego tzw. *neurotubules*, czyli cieniutkich rurczek przebiegających wzdłuż włókien nerwowych. Być może, ACh i inne ważne dla życia włókien nerwowych substancje mogą być przesyłane w tych rurkach z dużą szybkością. Tłumaczyłoby to z jednej strony w jaki sposób ACh może tak szybko dostawać się z włókien do ich zakończeń, a z drugiej strony dlaczego ciągłość protoplazmatyczna z ciałem komórki jest konieczna dla utrzymania przy życiu włókien nerwowych.

Tak więc istnieją teoretycznie co najmniej dwie możliwości szybkiego przesuwania się ACh w nerwach, wobec czego nie ma teoretycznych zastrzeżeń przeciw przyjęciu wniosków wypływających z niniejszej pracy.

3. Z kolei zastanówmy się nad zagadnieniem, dlaczego przy drażnieniu nerwu aż do ustania przenoszenia impulsów z nerwu na mięsień ACh nie znika całkowicie z nerwów i dlaczego przy drażnieniu nerwów *in situ* stężenie ACh w nerwach jest niższe, aniżeli przy drażnieniu nerwów wyciętych z ustroju?

Jak widać z tab. II, spadek zawartości ACh w nerwach drażnionych poza ustrojem wynosi średnio zaledwie ok. 60% i nigdy nie przekracza 75% przy drażnieniu prądem o napięciu 0,5 V. Tak więc w momencie, kiedy już ustaje przenoszenie impulsów, a więc kiedy zgodnie z teorią chemicznego przenoszenia ACh przestaje się wyzwalać z zakończeń nerwowych, zawartość jej w nerwie jest jeszcze przeważnie stosunkowo wysoka. W jednym doświadczeniu „zmęczenie“ synapsy nastąpiło wówczas, kiedy nerw stracił dopiero 41% pierwotnej zawartości, a więc zawierał jeszcze 59% pierwotnej zawartości. Również i bezwzględna zawartość ACh po zakończeniu drażnienia była w tym przypadku wysoka, a mianowicie 2 $\mu\text{g/g}$.

podczas gdy w niektórych przypadkach nerwy drażnione zawierały zaledwie 1,6 $\mu\text{g/g}$. Ażeby to wyjaśnić, przypomnijmy sobie, że z nerwów odciętych od mięśnia (p. 4) podczas drażnienia ACh praktycznie biorąc nie znika. Otóż przy preparowaniu nerwu kulszowego żaby przecinamy wszystkie gałązki pochodzące z tego nerwu, ale biegnące do mięśni uda, a zachowujemy połączenia z zakończeniami nerwowymi tylko tych włókien, które biegną do mięśni łydki. Tak więc przy drażnieniu całego wyciętego nerwu kulszowego możemy spowodować wychodzenie ACh tylko z tej części włókien, które biegną do łydki, natomiast w znacznej części włókien wchodzących w skład nerwu zawartość ACh nie może się zmniejszyć, gdyż jej naturalne miejsca wyjścia z włókien są odcięte. Prawdopodobnie więc we włóknach połączonych z zakończeniami zawartość ACh spada tak znacznie, że nie może się ona z nich wydostawać w momencie dojścia impulsu do zakończenia, natomiast w pozostałych włóknach wcale się nie zmienia.

Że takie tłumaczenie jest słuszne, wynika również z porównania zawartości ACh w drażnionych nerwach izolowanych oraz znajdujących się *in situ*. W tabeli II widzimy, że najmniejsza zawartość ACh we włóknach drażnionych poza ustrojem wynosi 0,7 $\mu\text{g/g}$, średnio zaś znajdujemy 1,2 $\mu\text{g/g}$. Natomiast w tabeli VII można stwierdzić, że w nerwach drażnionych *in situ* w dwóch przypadkach zawartość ACh spadła do 0,1 $\mu\text{g/g}$, w dwóch do 0,2 $\mu\text{g/g}$, a średnia zawartość wynosiła 0,5 $\mu\text{g/g}$. W nerwach drażnionych *in situ* prawie wszystkie włókna wchodzące w skład nerwu mają zachowane połączenia z zakończeniami w mięśniach, wobec czego ACh może wychodzić prawie ze wszystkich włókien, a tym samym ogólna zawartość ACh w nerwie drażnionym *in situ* jest o wiele niższa, niż w nerwie drażnionym poza ustrojem. Jednakże nawet w nerwach drażnionych *in situ* zawartość ACh nie spada do zera. Jest to być może spowodowane przez to, że — jak to wykazał M. Krause w naszym Zakładzie — w nerwach pozostawionych w ustroju zachodzi synteza ACh, w przeciwieństwie do nerwów drażnionych poza ustrojem w roztw. Ringera bez glukozy. W czasie wykonywania doświadczeń z nerwami *in situ* nie zwracano specjalnej uwagi na możliwie szybkie wycięcie nerwów po zakończeniu drażnienia i natychmiastowe umieszczenie w kwasie, wobec czego różnice zawartości ACh w poszczególnych nerwach drażnionych *in situ* mogą pochodzić stąd, że synteza ACh w tych włóknach, które zawierały więcej ACh, trwała dłużej. Być może odgrywa tu również rolę różnica w szybkości syntezy u różnych żab.

4. Rola przenoszenia chemicznego w znużeniu synaps. Jak słusznie podkreśla Missiuro (1947), mechanizm znużenia jest niezwykle zawiły i nie ulega próbom zgłębienia go przy jednostronnym podejściu ze strony biochemicznej. Wynika to stąd, że w przypadku znużenia mamy do czynienia nie z jakimś jednym czynnikiem, lecz z dużym zespołem czynników. Przy badaniu znużenia należy więc uwzględniać znaczenie wszelkich zjawisk biorących udział w pracy ustroju. Wobec tego, że jak wiadomo przy długotrwałym drażnieniu łuku odruchowego znużenie występuje najwcześniej w połączeniach międzykomórkowych, a więc zarówno w synapsach międzyneuronowych, jak i w połączeniach nerwowomięśniowych, wydaje się słusznym rozpatrzeć również możliwość zakłócenia przenoszenia impulsów przez te połączenia w powstawaniu znużenia. Jak wspomniałem we wstępie, z punktu widzenia teorii chemicznego

przenoszenia impulsów przez synapsy można uważać znużenie między innymi za wynik zużycia przekaźnika. Jeżeli to przypuszczenie jest słuszne, to niewątpliwie ważne jest ustalenie, gdzie przekaźnik jest wytwarzany. Daje to bowiem podstawę do badania wpływu różnych czynników na szybkość wytwarzania przekaźnika oraz szybkość dostarczania go do zakończeń.

Jak wynika z obecnej pracy, przekaźnik, a przynajmniej ACh w nerwach kulszowych żaby, wytwarzany jest głównie poza zakończeniami nerwowymi, a mianowicie we włóknie nerwowym i ciele neuronu. Wobec tego badania dotyczące szybkości wytwarzania ACh są prowadzone w naszym Zakładzie przez *M. Krausego* właśnie na włóknach nerwowych. W dalszym ciągu przewiduje się zbadanie syntezy ACh w rdzeniu kręgowym. Tak więc niniejszą pracę można uważać za podstawę do systematycznego badania roli przekaźników chemicznych w znużeniu synaps.

5. Znaczenie uzyskanych wyników dla teorii chemicznego przenoszenia impulsów przez synapsy. Jednym z głównych zarzutów przeciwko teorii przenoszenia chemicznego impulsów jest krótki czas opóźnienia synaptycznego. Wydawało się mało prawdopodobne, żeby w tak krótkim czasie mogła zachodzić synteza i wydzielanie ACh oraz jej zadziałanie na strukturę pozasynaptyczną. Zgodnie z uzyskanymi wynikami można przyjąć, że synteza ACh odbywa się nie w momencie dojścia impulsu do zakończenia i nie w samym tylko zakończeniu, ale stale w miarę obniżania się poziomu ACh poniżej pewnego progu i przy tym w całym neuronie. Wytworzona ACh przesuwa się do zakończeń, dzięki czemu zostaje w nich utrzymany odpowiedni poziom ACh pomimo jej stałego wydzielania. Dopiero przy bardzo długim i częstym drażnieniu poziom ten może spaść prawie do zera, czemu towarzyszy ustanie przenoszenia pobudzeń.

Jeżeli więc synteza ACh nie musi się odbywać dopiero w chwili dojścia do zakończenia impulsu, to oczywiście czynnik czasu odgrywa odpowiednio mniejszą rolę. Opóźnienie synaptyczne potrzebne jest już tylko do wyjścia ACh z zakończenia i podziałania na strukturę pozasynaptyczną, co wobec ścisłego przylegania zakończenia do struktury pozasynaptycznej wymaga bardzo krótkiego czasu.

Uzyskane wyniki tłumaczą również, dlaczego ACh występuje tylko we włóknach cholinergicznym. Gdyby przypuszczenie, że ACh dlatego znajduje się w nerwach, że bierze udział w procesach przewodzenia impulsów po włóknach, było słuszne, to należałoby oczekiwać, że ACh powinna występować we wszystkich włóknach nerwowych, a nie tylko cholinergicznym. W każdym zaś razie wszelkiego rodzaju włókna powinny mieć zdolność syntetyzowania ACh. Tymczasem *Loewi* i *Hellauer* (1938) *Hellauer* (1939), *Mac Intosh* (1941) i inni stwierdzili, że nerwy czuciowe i adrenergiczne prawie nie zawierają ACh, zaś *Feldberg* (1943) wykazał, że nie mają one również zdolności do jej syntezy. Fakty te można najłatwiej wyjaśnić zgodnie z wynikami tej pracy w ten sposób, że we włóknach cholinergicznym ACh, która jako przekaźnik jest wyzwalana z zakończeń, jest wytwarzana w całym neuronie, wobec czego występuje też w całym neuronie, a więc i w nerwach.

Miło mi jest podziękować asystentce techn. *J. Symior* oraz asyst. lek. *M. Krausemu* za pomoc techniczną przy wykonaniu tej pracy.

Б р. З а в а д з к и

ПРОИСХОЖДЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА (АХ), ОСВОБОЖДАЮЩЕГОСЯ ИЗ ОКОНЧАНИЙ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕРВОВ ВО ВРЕМЯ ИХ РАЗДРАЖЕНИЯ

С о д е р ж а н и е

Содержание АХ в левых и правых седалищных нервах лягушки (*Rana esculenta*) одинаково и равняется от 1,6 до 6,9 в среднем 2,9 микрограмма на 1 г нерва.

Раздражение правых нервов переменным током в 0,5 вольт до полного исчезновения сокращений, т. е. в течении 4 час. 40 мин. до 7 час. 45 мин. вызывало уменьшение содержания АХ в раздражаемых нервах по отношению к левым контрольным на 41 до 75%, в среднем на 57%. Если однако же раздражительные нервы были блокированы вблизи мышцы постоянным током силой в 4 вольта так, что импульсы не могли достигать нервных окончаний в мышцах, тогда содержание АХ в раздражаемых в течении 6—7 часов нервах уменьшалось в среднем лишь на 9%. Подобным образом если нервы были отрезаны от мышцы и потом раздражаемы описанным раньше способом, содержание АХ уменьшалось в них только на 8%.

Из этих данных был сделан вывод, что во время раздражения нервов значительная часть АХ перемещается из нервного ствола в нервные окончания в мышце, где он освобождается и служит медиатором импульсов. Перемещение АХ может осуществляться или на основе описанной ван ден Гонертом (*van den Honert*) ускоренной диффузии, или же в нервных трубках („*neurotubules*“) описанных Де Робертсом и Шмиттом (*De Roberts and Schmitt*).

Незначительное уменьшение содержания АХ в раздражаемых и заблокированных или отрезанных нервах происходит от частичного повреждения нервных волокон раздражающим током. Это подтверждается тем, что при раздражении заблокированных нервов током в 5 вольт исчезало 40% АХ, а при токе в 10 вольт даже 60%.

Помимо раздражения до прекращения сокращений, АХ не исчезал полностью из нервов раздражаемых вне организма. Это происходит от того, что во время приготовления нервно-мышечного препарата рассекаются все волокна, идущие к мышцам бедра, а из таких волокон АХ почти не исчезает.

Если раздражать оба нерва током в 0,5 вольт *in situ* и только один из них отрезать от спинного мозга, содержание АХ в неотрезанном нерве в два раза больше, чем в отрезанном. Отсюда следует, что или АХ образуется в телах нервных клеток и потом переходит в волокна, или же связь с телом клетки ускоряет синтез АХ в волокнах.

Нервы раздражаемые *in situ* и отрезанные от спинного мозга содержали в среднем 0,5 микрограмма АХ в 1 г нерва, в то время как нервы раздражаемые вне организма содержали в среднем 1,2 микрограмма на 1 г. Это происходит от того, что в нервах раздражаемых *in situ* все волокна соединены со своими окончаниями в мышцах и могли освобождать АХ.

Утомление нервно-мышечных соединений можно рассматривать как истощение АХ во всем двигательном нейроне когда освобождение АХ превосходит его образование.

АХ освобождающийся из нервных окончаний не обязательно должен образоваться под влиянием импульса, который достигает окончания, но происходит из запаса во всем нейроне. Благодаря этому химическая передача импульсов возможна несмотря на очень короткое время синаптической задержки.

Br. Zawadzki

THE SITE OF ORIGIN OF ACETYLCHOLIN (ACH) LIBERATED FROM THE MOTOR NERVE ENDINGS DURING STIMULATION

Summary

The ACh content of left and right sciatic nerves of the frog (*Rana esculenta*) is equal and amounts to from 1,6 to 6,9 μ g/g of nerve, on an average 2,9 μ g/g.

Stimulation of right nerves with a 0,5 V a. c. until complete disappearance of the muscle contractions, i. e. from 4 hrs. 20 min. to 7 hrs. 45 min., has led to a diminution of ACh content in the stimulated nerves in relation to the left control nerves by 41 to 75%, on an average by 57%. If however the stimulated nerves have been blocked near the muscle by a 4 V constant current so that the impulses could not reach the nerve endings in the muscle, the ACh in the stimulated for 6—7 hrs. nerves diminished on an average by 9% only. Also when the nerves have been severed from the muscle and then stimulated as previously described, the ACh content diminished by 8% only. From the above results it is concluded that during stimulation of the nerves a large portion of ACh is transferred from the nerve trunk to the nerve endings in the muscle, where it is liberated and serves as a mediator. The transfer of ACh can occur either on the basis of the accelerated diffusion described by van den Honert or in the „neurotubules“ which were described by de Roberts and Schmitt.

The slight disappearance of ACh from the stimulated and blocked or severed nerves is caused by a partial impairment of the nerve fibres by the stimulating current. This follows from the fact, that stimulation of the blocked nerves with a 5 V a. c. caused disappearance of 40% of ACh, and with a 10 V a. c. even of 60%.

In spite of the stimulation until the disappearance of the contractions, ACh does not disappear completely from the nerves stimulated outside of the body. It is so because during preparation of the nerve all the fibres which go to the thigh muscles are cut, and from such fibres ACh hardly disappears.

When both nerves have been stimulated with a 0,5 V a. c. in situ and only one of them was severed from the spinal cord, the content of ACh in the intact nerve was twice as great as in the severed one. It follows from that either ACh is produced in the nerve cell and then transferred to the axon, or that continuity with the cell body increases the velocity of ACh production in the fibre.

The nerves which were stimulated in situ and severed from the spinal cord contained on an average 0,5 μ g of ACh in 1 g of nerve whereas the nerves stimulated outside the body contained on an average 1,2 μ g/g. It is so because in the nerves which were stimulated in situ all nerve fibres were connected with their endings in the muscles and could discharge ACh.

The fatigue of the neuro-muscular junction is probably caused by the exhaustion of ACh in the whole motor neuron when the liberation of ACh exceeds its production.

ACh which is liberated from the nerve endings must not be necessarily formed by the arrival of the impulses, but is mobilized from a preformed store in the whole neuron. Thanks to it the chemical transmission of impulses is possible in spite of the very short time of synaptic delay.

PIŚMIENNICTWO

1. Acheson G. H.: Physiology of neuromuscular junctions. Chemical aspects. Fed. Proc. 1948, 7, 447. — 2. Biedermann W.: Sitz. ber. d. K. Wiener Ak. 1879, 79, III Abt. 289. — 3. Bieżański W.: Acta Physiol. Pol. 1952, 3, 247. — 4. Brock L. G., Coombs J. S., Eccles J. C.: J. Physiol. 1952, 117, 431. — 5. Bronk D. W., Brink F., Jr.: Ann. Rev. Physiol. 1939, 1, 384. — 6. Brooks C. McC., Fuortes M. G. F.: Ann. Rev. Physiol. 1952, 14, 363. — 7. Brown G. L., Feldberg W.: J. Physiol. 1936, 86, 40P. — 8. Brown G. L., Feldberg W.: J. Physiol. 1937, 88, 265. — 9. Bykow K. M.: Probl. Sow. Fizjol. Bioch. Farmak. 1949, 7, 17. — 10. Chang H. C., Gaddum J. H.: J. Physiol. 1933, 79, 255.
11. Czubalski Fr.: Acta Biol. Experim. 1938, 12, 60. — 12. Dale H. H., Feldberg W.: J. Physiol. 1934, 81, 39. — 13. Dale H. H., Feldberg W., Vogt M.: J. Physiol. 1936, 86, 353. — 14. De Roberts and Schmitt: J. cell. comp. Physiol. 1948, 31, 1. (Cyt. wg C. L. Evans, Principles of Human Physiology, wyd. 10, 1949, s. 172). — 15. Fatt P., Katz B.: J. Physiol. 1952, 118, 73. — 16. Feldberg W.: J. Physiol. 1943, 101, 432. — 17. Gaddum I. H.: Gefässerweiternde Stoffe der Gewebe, Lipsk, 1936. — 18. Hellauer und Umrath: Z. Biol. 1939, 99, 624. — 19. Hellauer: Pflügers Arch. 1939, 242, 382. — 20. Honert T. H. van den: On the mechanism on the transport of organic materials in plants. Proc. roy. Acad. Amsterdam, 1932, 35, 1104.
21. Kahlson G., Mac Intosh F. C.: J. Physiol. 1939, 96, 292. — 22. Kibjakow A. W.: Usp. Sowr. Bioł. 1949, 27, 89. — 23. Kosztójanc Ch. S.: Probl. Sow. Fizjol. Bioch. Farmak. 1949, 7, 29. — 24. Krause M.: Resynteza acetylocholinu (ACh) w drażnionych włóknach nerwowych żaby. (Acta Physiol. Pol. w druku). — 25. Loewi O., Hellauer H.: Pflügers Arch. 1938, 240, 769. — 26. Mac Intosh F. C.: J. Physiol. 1941, 99, 436. — 27. Missiuro W.: Znużenie. Książka 1947. — 28. Nachmansohn D., John H. M.: Science 1945, 102, 250. — 29. Nachmansohn D., John H. M., Berman M.: J. Biol. Chem. 1946, 163, 475. — 30. Raab W., Humphreys R. J.: Am. J. Physiol. 1947, 148, 460.
31. Rosenblueth A., Lissák K., Lanari A.: Am. J. Physiol. 1939, 128, 31. — 32. Scheminzy F.: Physiologisches Praktikum, Wien 1947, s. 128. — 33. Zawadzki Br.: Acta Biol. Exper. 1937, 11, 178. — 34. Zawadzki Br.: Pol. Tyg. Lek. 1946, R. 1, nr 48. — 35. Zawadzki Br.: Acta Biol. Exper. 1947, 14, 69. — 36. Zawadzki Br.: Acta Physiol. Pol., Prace III Zjazdu Polskiego Towarzystwa Fizjol. 1952, 183.

Otrzymano: 5. XI. 1954 r.