

Die Reaktion der durchströmten Froschlunge auf kleinste Azetylcholinmengen

Das für viele Funktionen im tierischen Organismus so bedeutsame Azetylcholin (ACh) entfaltet seine Wirksamkeit noch in Verdünnungen, die wesentlich über das von andern Stoffen her gewohnte Maß hinausgehen. An geeigneten Objekten, wie Froschherz und Rückenhautmuskel des Blutegels, können durch ACh-Verdünnungen von $1:10^9$ bis $1:10^{10}$ noch Reaktionen ausgelöst werden. Empfindlicher noch spricht die Froschlunge auf geringste auf dem Gefäßweg herangebrachte ACh-Mengen mit einer Vasokonstriktion und einer Kontraktion der glatten Muskelzellen des Lungenparenchyms an¹. Bei dem Versuch, die Grenze der Nachweisbarkeit des ACh an diesem Präparat festzustellen, ergab sich, daß bei Anwendung genügend empfindlicher Registriermethoden noch größenordnungsmäßig 10^2 bis 10^4 Moleküle erfaßbar sind.

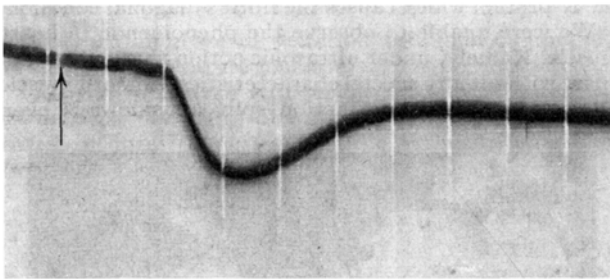


Abb. 1. (Versuch 15a vom 28. Dezember 1948.) Abnahme der Durchströmung der Froschlunge nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-19}$ g Azetylcholin in 1 cm^3 NSA-Ringer ($\uparrow$). Ungefähr 2 Minuten nach der Zugabe erreicht das ACh die Lunge und löst dort eine Vasokonstriktion aus. Zeit 1 Minute.

Wir registrierten die Durchströmung der Froschlunge mit einer Druckdifferentialstromuhr und bei einem Teil der Versuche gleichzeitig die Längenänderungen des Organs mit einer photoelektrischen Methode, die eine nahezu reibungsfreie Aufzeichnung gestattet. Die Lunge wurde während des Versuchs mit einer Ringer-Lösung durchströmt, der Nikotinsäureamid (NSA) $1:10^3$ zugesetzt war. Der Zusatz von NSA erweist sich als vorteilhaft, weil die sonst immer zu beobachtende Tonuszunahme der Lungengefäße bei Ringer-Durchströmung zu einer dauernden Abnahme der Durchströmung führt. NSA erweitert die Gefäße und sensibilisiert gleichzeitig die Lunge gegen ACh². In unseren Versuchen wurden kleinste ACh-Mengen, die wir durch fortlaufende Verdünnung einer Ausgangslösung erhielten, in die zur Lunge strömende Flüssigkeit gegeben, wobei sorgfältig jede Druckänderung im System vermieden werden mußte, da solche allein schon zur Auslösung sog. «Druckreflexe» (Kontraktion der Gefäße und der glatten Muskulatur) führen können. Abb. 1 zeigt die

Wirkung von $2 \cdot 10^{-19}$ g ACh in 1 cm^3 NSA-Ringer auf die Durchströmung. Sobald das ACh die Lunge erreicht hat, tritt eine Abnahme der Durchströmung (Vasokonstriktion) ein. Die Größe der Vasokonstriktion hängt neben der ACh-Menge von der Empfindlichkeit des Präparates ab, die vom Herbst und Winter zum Frühjahr hin kontinuierlich zurückgeht, und auch im Sommer bei hungernden Tieren rasch abnimmt. Offenbar spielt neben anderen Faktoren die Ernährungslage dabei eine wichtige Rolle.

Registriert man gleichzeitig die Durchströmung und Längenänderungen des Gesamorgans, so zeigt sich in Abb. 2 auf eine einmalige Gabe von 10^{-17} g ACh neben der Abnahme der Durchströmung eine Kontraktion der glatten Muskulatur. Zeitlich zuerst erfolgt die Minderung der Durchströmung, der dann nach 30–60 Sekunden die Kontraktion des Gesamorgans folgt. Da eine Einwirkung der relativ wenigen ACh-Moleküle auf die einzelnen glatten Muskelzellen wegen der Schwierigkeiten der Diffusion, dem Vorhandensein von Cholinesterase usw. unwahrscheinlich ist, liegt es nahe, eine direkte periphere Beeinflussung des Tonus der glatten Muskulatur vom Gefäßapparat aus anzunehmen.

Die sehr erwünschte Auswertung der Vasokonstriktion der Froschlunge zum quantitativen Nachweis solcher geringer ACh-Mengen ist deswegen nicht möglich, weil bei einer derartig kleinen Anzahl von Molekülen Wirkungen nur noch mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auftreten und weil außerdem die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Präparate und die jahreszeitlichen Schwankungen eindeutige Beziehungen zwischen ACh-Menge und Größe der Vasokonstriktion nicht zulassen. Jedenfalls ist gezeigt, daß ACh-Mengen von größenordnungsmäßig 10^2 bis 10^4 Moleküle noch sicher nachweisbare Wirkungen entfalten können. Eine genaue Beschreibung unserer Versuchsanordnung und Befunde erscheint demnächst in der Zeitschrift für Biologie.

K. BRECHT und H. KAUMANN¹

Physiologisches Institut der Universität Tübingen, den 1. Juni 1949.

¹ Der Firma Hoffmann-La Roche sind wir für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

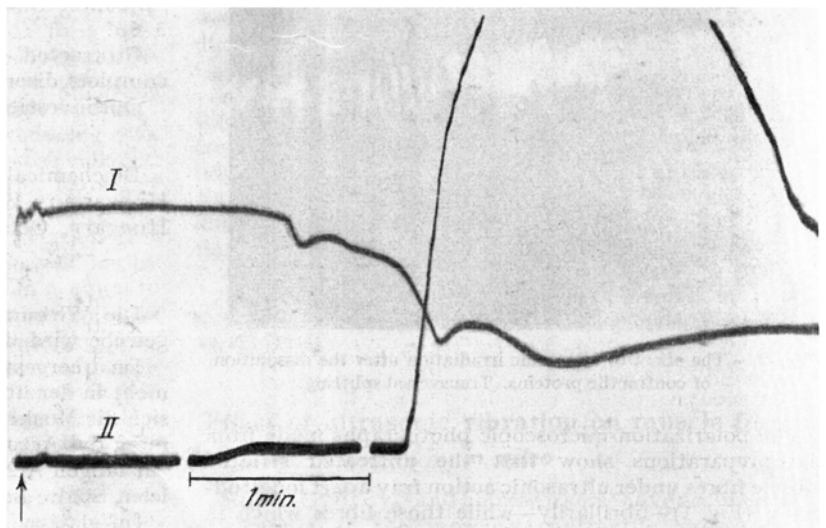


Abb. 2. (Versuch 52 vom 30. April 1949.) Kontraktion der glatten Muskulatur der Froschlunge und Abnahme der Durchströmung nach einer einmaligen Gabe von 10^{-17} g Azetylcholin in 1 cm^3 NSA-Ringer. Kurve I: Durchströmung der Froschlunge. Ausschlag nach unten: Abnahme der Durchströmung. Kurve II: Mechanogramm. Ausschlag nach oben: Kontraktion der Lunge. Zeit 1 Minute.

¹ K. BRECHT, Pflügers Arch. 249, 94 (1947). – H. LULLIES, Diskussionsbemerkung an dem Physiologenkongreß 1948 in Frankfurt.

² K. BRECHT, Pflügers Arch. 246, 553 (1943).

Summary

The reactions of small traces of acetylcholine are investigated at the lungs of frogs, perfused with Ringer solution. Under favourable conditions and nicotinamide added to the perfusing fluid, 10^2 – 10^4 molecules of acetylcholine cause a constriction of the vessels and a contraction of the smooth muscle fibers of the lungs.

Variations, Due to Colour, in the Spike Frequency-Time Curves of Single Retinal Elements

The response in terms of impulse frequency, to different wavelengths and intensities of light from well isolated elements in the cat's retina has been recorded by the micro-electrode technique¹. The number of impulses was counted during short periods (about 0.1 sec.) by an electronic device, with a variable delay from the onset and cessation of illumination. In this

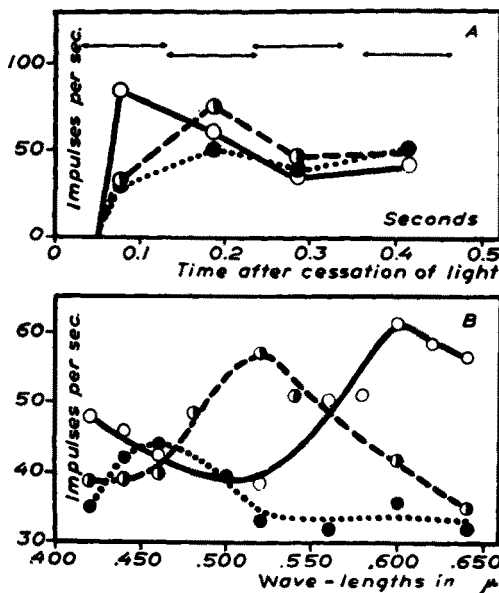


Fig. 1A. - Spike frequency-time curves for the off-effect of single retinal element in three wave-lengths: 600 mμ: line drawn in full, 520 mμ: broken line, 460 mμ: dotted line. Duration and location of counting periods marked above record.

Fig. 1B. - Analysis of 9 elements. Average spike frequency for counting period of 0.1 sec. located on top of the three maxima for red, green and blue as explained in text.

way the time course of the frequency pattern in the impulse cutbursts at "on" and "off" was analysed in an extensive material. Decerebrated, fully dark-adapted cats were used, and, since the retina in that state is dominated by visual purple (VP), the records were made with lights having, in all wave-lengths, an equal stimulating efficiency for that substance. The VP curve used for this purpose was that obtained by DONNER and GRANIT² from pure on-elements in the cat. The elements were studied at a level 100–1000 times the threshold.

Pure on-elements, when investigated in this way, gave in all wave-lengths an identical response within the limits of error. A great number of the on-off- and pure

off-elements behaved in the same manner. But in many of them a difference was noted between responses to different wave-lengths. A typical result is shown in Fig. 1A that gives the frequency-time curves for wave-lengths 600, 520 and 460 mμ, for the off-effect of an on-off-element at 130 times the threshold. At that level the on-effect was wholly inhibited for this particular element. The latency of discharge was the same in all wave-lengths. The Figure shows that the element responded in the red (600 mμ) with a much higher frequency in the beginning of the discharge than in the green and the blue (520 and 460 mμ) that gave practically the same response. In the second interval, about 0.2 sec. after "off", the green stimulus gave the strongest effect. There is also an indication of a late rise in the "blue" curve, although it cannot be regarded as significant for this particular element. It has, however, been observed that, when there is a "blue" effect, it regularly occurs later than the "red" or the "green" ones.

There thus seems to be specific "red", "green" and "blue" contributions to the response, occurring at different times after the beginning of the discharge and somehow superimposed on the effect of VP. This result has been confirmed with about 50 elements both at "on" and "off".

The distribution in spectrum of these "red", "green" and "blue" maxima was determined by following throughout the spectrum the particular interval in which they occur. Average curves for this type of experiment are shown in Fig. 1B. The curves give the frequency of discharge as a function of wave-length at three particular time-intervals (curve drawn in full: 0.1 sec. delayed 0.03 sec., broken line: 0.1 sec. delayed 0.17 sec., dotted line: 0.1 sec. delayed 0.24 sec.). The position of the counting period in relation to time from "on" or "off", determines if a frequency maximum in red, green or blue is obtained. It should be noted that either one or two of the three maxima (600, 520 and 460 mμ) turn up, whatever time-interval is chosen, except in the very first part of the discharge that often gives the same effect in all wave-lengths. This effect is probably caused by VP. Hitherto it has not been possible to find elements giving frequency maxima in other spectral regions than the ones mentioned above. In the same single element usually two, more rarely all three effects are observed.

The maxima of the three curves, shown in Fig. 1B coincide with those of the averaged modulators obtained by GRANIT¹, by two different methods from the cat's retina. However, the shape of the curves do not show the photosensitivity of the receptors concerned because the results have been obtained with stimuli, graded in terms of VP.

A moderate (50–100 times) variation of the intensity does not affect the results obtained; the responses still maintain their typical maxima in different parts of the spectrum. Also with stimuli of equal energy, red light gives rise to an early effect, green to a somewhat later one and blue to a still later, although the results in this case are more difficult to interpret, because of the unequal VP stimulation.

It is interesting to recall that the sensation-time curves, determined psychophysically for various colours (see e.g. summary by BILLS²) also tend to rise in the order found above for single elements of the cat's retina. Furthermore, when, as in our experiments often

¹ R. GRANIT, *Sensory Mechanisms of the Retina*, (Oxford University Press, 1947).

² K. O. DONNER and R. GRANIT, *Acta physiol. Scand.* 17, 161 (1949).

¹ R. GRANIT, *J. Neurophysiol.* 8, 195 (1945); *J. Neurophysiol.* 11, 253 (1948).

² M. A. BILLS, *Psychol. Monogr.* 28, 5 (1920).