

88. **Tetsuya Komori** : Chemische Studien über die visuelle Funktion. VI.<sup>1)</sup>  
Die Photochemische Verwandtschaft zwischen Rhodopsin und den  
Areca-Alkaloiden sowie verwandten Verbindungen.

(Pharmazeutisches Institut, Medizinische Fakultät, Universität Kyushu\*<sup>1)</sup>)

Wie allgemein bekannt, wird Retinen im Licht durch Einwirkung von Retinen-Reduktase und Diphosphopyridin-Nucleotid (DPN) zu Vitamin-A-Alkohol reduziert. Der enzymatische Prozeß der Resynthese des Rhodopsins verläuft nur über das Neo-b-retinen; dieses wird bei Dunkeladaptation aus dem aufgespeicherten Neo-Vitamin A<sub>b</sub> (cis-Vitamin-A-Alkohol) gebildet; es geht dann durch Kombination mit dem Protein Scotopsin in das Chromoprotein Rhodopsin über.<sup>2-4)</sup>

Die Wirkung gewisser Chemikalien auf diesen resynthetischen Prozeß, insbesondere *in vivo*, wurde in diesem Laboratorium<sup>5-8)</sup> und von Hosoya,<sup>8,9)</sup> Peng,<sup>9)</sup> und Hwang<sup>10)</sup> untersucht.

Meine Absicht war es, den Einfluß der Areca-Alkaloide und verwandter synthetischer Verbindungen zu untersuchen. Bei den vorliegenden Versuchen wurden die Außensegmente der Stäbchen, die das Rhodopsin enthalten, benutzt, und deren Verhalten bei Vorhandensein von DPN und homogenem Pigmentepithel untersucht. Die Resynthese von Rhodopsin und die Wirkung gewisser Chemikalien auf das Elektrotretinogramm (ERG) wurden parallel studiert. Bei den Experimenten erhielt man folgende Resultate.

### Experimentelles

#### A) Verwendete Materialien

**1-Methyl-3-hydroxymethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin Jodmethylat (I)**—Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydronicotinat (Arecolin) wurden in der 10-fachen Menge dehyd. Et<sub>2</sub>O gelöst und unter Zusatz von 0.3 g LiAlH<sub>4</sub> 15 Min. geschüttelt. Die vom Et<sub>2</sub>O befreiten freien Basen wurden in dehyd. EtOH gelöst und dazu die zweifache Menge MeJ zugesetzt. Nach 15-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur bildete sich das farblose Jodmethylat vom Schmp. 121°. C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>ONI (I)—Ber. : C, 35.69; H, 5.994; N, 5.206. Gef. : C, 36.01; H, 6.02; N, 5.082. IR (Nujol) : 3386 cm<sup>-1</sup> (OH).

Den so erhaltenen Kristallen wurde die 4-fache Menge von Ac<sub>2</sub>O zugesetzt, wobei sich 1-Methyl-3-acetoxymethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin Jodmethylat vom Schmp. 95° bildete. C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>NI—Ber. : C, 38.60; H, 5.79; N, 4.50. Gef. : C, 38.46; H, 5.90; N, 4.21.

**Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydroisonicotinat Hydrochlorid (II)**—Zu einer dehyd. MeOH Lösung von 2.2 g Methyl Isonicotinat Jodmethylat (Schmp. 186°. C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>NI—Ber. : C, 34.82; H, 3.58; N, 5.02. Gef. : C, 34.51; H, 3.87; N, 4.98) wurde 0.4 g NaBH<sub>4</sub> nach und nach unter Rühren zugesetzt. Nach halbstündigem Rühren wurde das MeOH unter vermindertem Druck abgedampft und dem Rückstand eine geringe Menge Wasser zugesetzt. Die Reaktionslösung wurde mit Et<sub>2</sub>O ausgeschüttelt und in die dadurch abgetrennte Et<sub>2</sub>O-Lösung HCl-Gas eingeleitet. Der sich hierbei abscheidende Niederschlag

\*<sup>1</sup> Katakasu, Fukuoka (古森徹哉).

- 1) V. Mitt. T. Tsukamoto, T. Komori, N. Kinoshita, N. Toida, H. A. Kuriyama : Dieses Bulletin, **6**, 83 (1958).
- 2) G. Wald, R. Hubbard : J. Gen. Physiol., **32**, 367 (1949).
- 3) R. A. Morton, J. N. Green, F. D. Collins : Biochem. J., **56**, 493 (1954); *ibid.*, **53**, 152 (1953).
- 4) R. Hubbard : J. Gen. Physiol., **39**, 909 (1956).
- 5) T. Tsukamoto, T. Komori : Dieses Bulletin, **3**, 243 (1955).
- 6) *Idem* : *Ibid.*, **3**, 247 (1955).
- 7) T. Tsukamoto, T. Komori, N. Toida, H. A. Kuriyama : Kyushu J. Med. Sci., **8**, 251 (1957).
- 8) T. Tsukamoto, Y. Hosoya, K. Ogo : Unveröffentlichtes Manuskript (1940~1945).
- 9) T. Hwang, Y. Hosoya : Nippon Seirigaku Zasshi, **1**, 64 (1950); cf. M. T. Peng, *et al.* : *Ibid.*, **4**, 229 (1954).
- 10) T. Hwang : *Ibid.*, **1**, 165 (1950); *ibid.*, **1**, 69 (1950).

wurde aus MeOH-Et<sub>2</sub>O umkristallisiert. Weiße Nadeln vom Schmp. 193°. C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>NCl (II)—Ber.: C, 50.14; H, 7.31. Gef.: C, 50.21; H, 7.45. IR (Nujol): 1711 cm<sup>-1</sup> (Ester).

**Arecolin Hydrochlorid, Arecaidin Hydrochlorid, und Arecolin Jodmethylat**—Diese Verbindungen wurden nach der in den früheren Mitteilungen<sup>5,11)</sup> beschriebenen Methode erhalten.

**Die Homogenate der Außensegmente der Stäbchen**—Das Rhodopsin wurde in der Dunkelkammer nach der von mir verbesserten Kimura'schen Methode<sup>12)</sup> extrahiert: Kröten (*Bufo vulgaris formosus* BOULENGER) wurden 10 Std. im Dunkeln gehalten und nach der in einem früheren Bericht beschriebenen Methode<sup>6)</sup> geköpft. Die Retina wurde herausgenommen, in eine 0.5M NaCl-Lösung gelegt und in Rohrucker-Lösung (sp. Gw. 1.2 in M/15 Phosphat Puffer (pH 7) gelöst) homogenisiert. Das Pigmentepithel wurde entfernt und in NaCl-Lösung konserviert. Das Homogenat jeder entfernten Retina wurde in einem Zentrifugenröhrchen schwebend gehalten. (Kapazität 15 ccm mit einem Gehalt von 2 ccm Rohruckerlösung (sp. Gw. 1.2) in der Röhre). Zuerst wurde diese Homogenatlösung vorsichtig auf die Lösung (sp. Gw. 1.2) gespritzt, darüber kam eine Rohruckerlösung (sp. Gw. 1.15), darauf noch eine Rohruckerlösung (sp. Gw. 1.12) und obendrauf zuletzt destilliertes Wasser. Die Mischungen wurden bei 4000 r.p.m. 15 Min. zentrifugiert, dabei bildete sich eine Sicht der Außensegmente der Stäbchen zwischen den beiden Schichten der Rohruckerlösung (sp. Gw. 1.12 u. 1.15). Dieses Schicht wurde mit einer Pipette in ein anderes Zentrifugenröhrchen überführt, mit Wasser verrührt und wieder zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde mit 2-proz. wäßriger Digitonin-Lösung (1 ccm für je 4 Retinas) verrührt und für den Zweck der Experimente *in vitro* unter 5° gehalten.

Um das reine Rhodopsin der Außensegmente der Stäbchen zu bestimmen, wurde der Zentrifugalniederschlag des Segmenthomogenates langsam in 40-proz. Rohruckerlösung eingespritzt und ferner (in M/15 Phosphat-Puffer von pH 7) Phosphat-Puffer hinzugefügt und 15 Min. bei 3200 r.p.m. zentrifugiert. Das zwischen den Zuckerlösungs- und den Pufferlösungs-Schichten gesammelte Homogenat wurde 1 Std. in 4-proz. Alaun-Lösung bei 5° stehengelassen, um es zu erhärten, und dann zentrifugiert. Danach wurde es gründlich mit Petroläther gewaschen und wiederholt zentrifugiert, um es von in Petroläther löslichen Substanzen zu befreien. Dann wurde es mit Phosphat-Puffer (pH 7), zuletzt mit Wasser gewaschen und mit 2-proz. wäßriger Digitonin-Lösung extrahiert, um Rhodopsin-Extrakt zu erhalten. Dieser Extrakt wurde bei 12000 r.p.m. 15 Min. lang zentrifugiert. Die klare überstehende Flüssigkeit wurde mittels Beckman-Spektrophotometer DK-2 bestimmt. Fig. 1 zeigt daß diese Flüssigkeit in ihrem Absorptionsspektrum mit reinem Rhodopsin identisch ist.

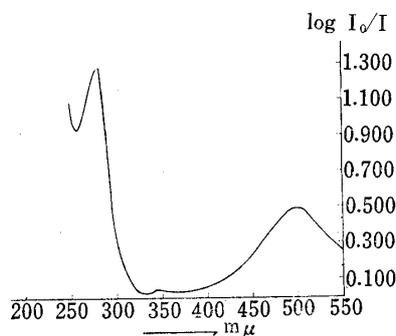


Fig. 1. Absorptions-spektrum des Rhodopsins (*Bufo vulgaris*)

**Das Homogene des Pigmentepithels**—Dem Pigmentepithel von 12 Krötenaugen wurde 0.5M wäßrige Lösung von 1.5 ccm NaCl zur Homogenisierung zugefügt und das erhaltene Homogene unter Null Grad aufbewahrt.

**Diphosphopyridin Nucleotid (DPN)**—Die benutzte Probe wurde von der "Nutritional Biochemicals Corporation U. S. A." hergestellt.

**Digitonin**—Das Produkt der Merck wurde vor jedem Gebrauch mit einer genügenden Menge H<sub>2</sub>O, um eine 2-proz. Suspension zu erhalten, geschüttelt, im Wasserbad bei 100° erhitzt und nach Auflösung sofort abgekühlt.

**Destilliertes Wasser**—Das bei den Experimenten *in vitro* gebrauchte H<sub>2</sub>O wurde mittels eines mit Ionenaustauscher-Harz versehenen Apparates (Japan Organo Co.) hergestellt und hatte einen nicht unter 500 (10<sup>4</sup> × Ω cm) fallenden spezifischen Widerstand.

**B) Methode**—Die zur Regeneration von Rhodopsin, die nach der Verabreichung *in vivo* von (I) und (II) stattfand, angewandte Methode und die benutzten Apparate wurden bereits in einem früheren Bericht<sup>6)</sup> beschrieben.

Eine Anzahl Kröten, die zum Anpassen an Licht in dem Apparat gehalten wurden, wurden einzeln herausgenommen und erhielten in den abdominalen Lymphsack eine Injektion von 0.01M

11) T. Tsukamoto, T. Komori: Yakugaku Zasshi, **73**, 779 (1953).

12) E. Kimura: Nippon Seirigaku Zasshi, **3**, 25 (1953).

Ringer-Lösung, die die unter (A) beschriebenen Chemikalien enthielt und zwar im Verhältnis von 0.6 ccm zu 200 g Körpergewicht.

Die so behandelten Kröten wurden sofort in einen anderen Apparat in der Dunkelkammer gesetzt. 60 Min. später wurde die Retina aus jedem Auge herausgenommen. Diese vier Retinas wurden jedesmal 4 Std. lang in 4 ccm von 1-proz. Digitoninlösung extrahiert und bei 5° gehalten. Der erhaltene flüssige Extrakt zeigte das gleiche Absorptionsspektrum wie Rhodopsin mit einem Absorptionsmaximum bei 500 m $\mu$ .

Der Unterschied der optischen Dichte des Rhodopsins vor und nach dessen Aussetzung unter elektrischem Licht (300 W, 100 v, in einer Entfernung von 20 cm) wurde gemessen, um die Konzentration von Rhodopsin zu bestimmen.

Bei der vergleichenden Untersuchung des Effektes der Chemikalien auf die Rhodopsin-Resynthese wurden mehrere Kröten bei dem Experiment *in vivo* gebraucht; dabei wurde Ringer-Lösung als Kontrolle benutzt. Der Apparat für Hell-Adaptation wurde bei 19~21° gehalten.

**Die Regeneration von Rhodopsin *in vitro***—Zusammenfassung der angewandten Methoden: Die befreiten Außensegmente der Stäbchen wurden gebleicht und sowohl die homogenisierten Pigmentepithelien als auch DPN zugesetzt. Nach Zusatz der oben erwähnten Chemikalien wurde die Mischung 2 Std. im Inkubator gehalten (24°). Der Unterschied der optischen Dichte bei 500 m $\mu$  zwischen inkubiertem und dem durch Belichtung zersetzten Rhodopsin wurde als Menge des regenerierten Rhodopsins bezeichnet. Nachdem 12 Kröten über 10 Std. im Dunkeln gehalten worden waren, wurden die Augen herausgenommen, wobei die rechten und linken gesondert aufbewahrt wurden. Den Außensegmenten der Stäbchen beider Gruppen wurden 3 ccm der 2-proz. wässrige Lösung von Digitonin zugesetzt und die so erhaltenen und die so erhaltenen Lösungen in 3 Teile von je 1 ccm getrennt, d. h. die Außensegmente von je 4 Retinas wurden mit 1 ccm Digitonin-Lösung homogenisiert. Jeder dieser drei Teile wurde in eine Zentrifugenröhre überführt. Dem einen Teil wurden sofort 1 ccm Phosphat Puffer (pH 6.8), 1 ccm dest. H<sub>2</sub>O und 0.5 ccm wässrige Lösung von NaCl (0.5M) zugesetzt, wobei während 2 Std. die Temperatur ständig bei 5° gehalten wurde. Die Substanz wurde dabei im Dunkeln aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Rhodopsin gebleicht und die optische Dichte gemessen. Dabei wurde beobachtet, daß die Rhodopsin-Menge den Unterschied der optischen Dichte vor und nach der Bleichung verursacht.

Die 2 übriggebliebenen Teile wurden 1 Min. in dem Apparat für Hell-Adaptation gebleicht; der Apparat wurde innen mit weißem Email gestrichen, und mit einer 6 mm dicken Glasplatte bedeckt. Als Lichtquelle wurde eine Mazda weißglühende Lampe, 300 W, 100 v, benutzt. Zwischen Lampe und Homogenat der Außensegmente wurde, um dieses vor der Hitze zu schützen, eine Schale mit H<sub>2</sub>O (3 cm tief) gestellt. Der Abstand der Lichtquelle vom Homogenat betrug 20 cm. Zu dem gebleichten Homogenat wurden 0.5 ccm des unter 0° gehaltenen Pigmentepithel-Homogenat und 1 ccm DPN in Phosphat-Puffer-Lösung (pH 6.8) (0.2 mg/ccm) zugesetzt und bei der Kontrollprüfung wurde zu dieser Mischung bis zu 3.5 ccm mit 1 ccm dest. H<sub>2</sub>O zugefügt. Zu dieser Mischung wurde 1 ccm wässrige Lösung der Chemikalien zugesetzt, als die Wirkung der Chemikalien auf die Rhodopsin-Regeneration untersucht wurde. Die Experimental-Mischung wurde unter Abdunkeln im Inkubationsapparat (Temperatur bei 24.5°) gehalten.

Die Rhodopsin-Regeneration-Menge beim Gebrauch der Chemikalien wurde nach folgenden Methoden bestimmt: 24 Kröten (in 2 Gruppen, die eine für die Behandlung der rechten Augen und die andere für die der linken) wurden zu je Vieren gruppiert. Zu den Homogenaten vom Pigmentepithel in jedem Teil wurden erstens DPN und zweitens 1 ccm von 0.01M wässrige Lösung von Nikotinsäureamid zugesetzt und die so erhaltene Mischung wurde inkubiert. Die sogleich\*<sup>2</sup> oder nach 10, 25, 40, 60, und 120 Min. langer Inkubation herausgenommenen Proben wurden analog zentrifugiert. Jede

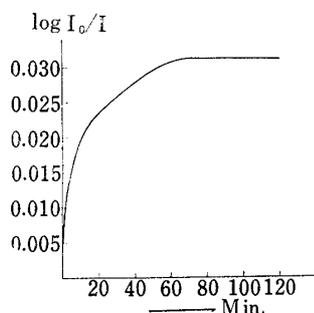


Fig. 2. Rhodopsin-Regeneration beim Gebrauch von 0.01M Nicotinsäureamid;  $\lambda=500$  m $\mu$  (Inkubations-Temp.: 24.5°)

\*<sup>2</sup> Das Absorptionsspektrum der Mischung, die 1 Min. lang im Bleich-Apparat gebleicht, der sofort Borat-Puffer (pH 9.0) zugesetzt und die in der Regeneration unterbrochen wurde, war mit demjenigen der Mischung, die 4 Min. lang nach demselben Verfahren untersucht wurden, zwischen 450~550 m $\mu$  identisch.

erhaltene überstehende Flüssigkeit der Proben wurde 4 Min. lang im Bleich-Apparat gehalten, wobei beobachtet wurde, daß der Unterschied der optischen Dichte, der sich vor und nach der Bleichung in dem Absorptions-Maximum bei 500 m $\mu$  zeigte, in der Menge regenerierten Rhodopsins in der Inkubation seinen Grund hatte.

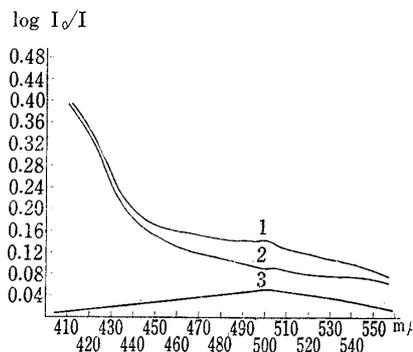


Fig. 3. Differentiales Spektrum des regenerierten Rhodopsins *in vitro* (unter Zusatz von 0.03M Nicotinsäureamid 120 Min. lang inkubierte Mischung)

- 1 : Vor dem Belichten  
2 : Nach dem Belichten  
3 : Regeneriertes Rhodopsin

Die unter Zusetzung von 0.03M Nicotinsäureamid und 120 Min. lang inkubierten Mischungen identifizierten sich mit dem differentialen Spektrum des Rhodopsins. Die photometrischen Messungen wurden alle im Dunkeln, die qualitativen und quantitativen Messungen von Rhodopsin wurden analog mit dem Beckman-Spektrophotometer DK-2 und Hitachi-Spektrophotometer EPU-2 (Schlitz 0.04 cm) ausgeführt.

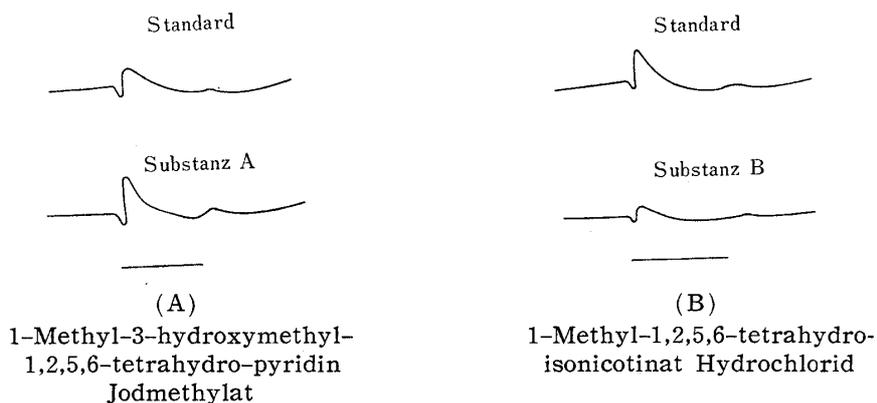


Fig. 4. Effekt der b-Welle des Elektroretinogramms

**Elektroretinogramm (ERG)**—Die Höhe der b-Welle von dem ERG wurde durch Eintropfen der Chemikalien (0.01M) in die Becher der Kröten-Augen nach Dunkeladaptation bestimmt und mit der vor dem Eintropfen verzeichneten Höhe als Kontrolle verglichen. Die Gitter-Elektrode kam von der Retina-Seite der Augenbecher und die Indifferent-Elektrode von der Sklera-Seite. Dabei wurde die aus Zn-ZnSO<sub>4</sub> hergestellte nicht-polarisierte Elektrode und ein San-ei Recorder MPA-204 (Zeitkonstante, 1.5 Sek.) benützt. Die Temperatur des Zimmers wurde bei 15° gehalten und das ERG im Sommer aufgezeichnet.

### Diskussion der Resultate

Die sogenannte Pigment-Migration in der Retina beginnt, wie allgemein bekannt, in dem Augenblick, wenn die Retina dem Licht ausgesetzt wird.

Die Rolle, die jede Zelle des Retina-Pigments bei der Regeneration von Rhodopsin spielt, wurde erst von Kühne<sup>13)</sup> bestätigt, der fand, daß Rhodopsin regeneriert wird, wenn die Retina verblaßt und in direktem Kontakt mit dem Pigmentepithel ist, und weiterhin auch von Hosoya,<sup>14)</sup> Garten,<sup>15)</sup> und Blies,<sup>16)</sup> die bei Untersuchungen des Pigmentepithels

13) A. Ewald, W. Kühne : Unters. Physiol. Inst. Heidelb., I, 139, 248, 370 (1877).

14) Y. Hosoya, T. Sasaki : Tohoku J. Exptl. Med., 32, 447 (1938).

15) S. Garten : Arch. Ophthalmol., 63, 112 (1906).

16) A. F. Blies : J. Biol. Chem., 193, 525 (1951).

die Rhodopsin-Lösung benutzten. Die Substanz, welche die Vermehrung der Regeneration von Rhodopsin in dem Pigmentepithels hervorruft, bleibt unbekannt, obwohl sie von Hubbard<sup>4)</sup> zum Teil als Neo-Vitamin A<sub>b</sub> und Isomerase identifiziert worden ist. Hanawa<sup>17)</sup> ist der Meinung, daß die Pigment-Migration von einem Wechsel der Zusammensetzung der Glutaminsäure und anderer Aminosäuren im Epithel begleitet ist. Meine eigenen Experimente über die Regeneration von Rhodopsin *in vitro* mit homogenisiertem Pigmentepithel, DPN und Nicotinsäureamid zeigte gleichfalls, daß das Rhodopsin zu 27.8% ( $\pm 1.4\%$ ) bei der Kontroll-Prüfung und 49.2% bzw. 54% bei der Prüfung mit 0.01M bzw. 0.03M Nicotinsäureamid regeneriert worden war. Rhodopsin wurde während der anfänglichen 40 Minuten im Inkubator in hohem Grade und während der letzten 60~120 Minuten in allmählich geringerem Grade regeneriert. Nicotinsäureamid förderte, auch *in vivo* injiziert, die Resynthese des Rhodopsins und erhöhte die b-Welle des ERG in der extrahierten Retina. Es ist aus den Ergebnissen des Verfassers Experimente zu schließen, daß das Nicotinsäureamid, ein wirksamer Bestandteil von DPN, das *in vivo* durch das Pigmentepithel abgesondert wird, mit der Retinen-Reduktase zusammenwirkt, wobei die Rhodopsin-Resynthese aus Vitamin A beschleunigt wird. Die beschleunigende Wirkung des Nicotinsäureamids ist von großem Interesse, verglichen mit den Tatsachen, die McIlwain, *et al.*<sup>18,19)</sup> bei ihrem Gehirnunersuchungen entdeckte, bei denen der Verlust von DPN um die Hälfte des Normal-Prozentsatzes durch den Zusatz von Nicotinsäureamid vermindert wurde. Fig. 3 zeigt das Absorptionsspektrum des Außensegments, das 2 Stunden lang inkubiert wurde, und dem man 0.03M Nicotinsäureamid zusetzte. In diesem Falle zeigt das Absorptionsspektrum des Rhodopsins den Unterschied vor und nach der Bleichung der inkubierten Experimentalstoffe.

TABELLE I. Wirkungen auf die Förderung der Regeneration des Rhodopsins *in vivo* und auf die Zunahme der Höhe der b-Welle des ERG

	%	ERG (b-Welle)
A) Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydronicotinat Hydrochlorid	$\frac{0.248 \sim 0.212}{0.212} = +16.98$	Zunahme
1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydronicotinsäure Hydrochlorid	$\frac{0.206 \sim 0.212}{0.212} = -0.028$	Abnahme
Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydronicotinat Jodmethylat	$\frac{0.244 \sim 0.212}{0.212} = +15.79$	Zunahme
Nicotinsäureamid	$\frac{0.239 \sim 0.212}{0.212} = +12.73$	"
B) Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydroisonicotinat Hydrochlorid	$\frac{0.092 \sim 0.088}{0.088} = +0.04$	keine
1-Methyl-3-hydroxymethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin Jodmethylat	$\frac{0.101 \sim 0.088}{0.088} = +14.77$	Zunahme
A) Rhodopsin wurde mit 2-proz. wäßriger Lösung von Natrium Cholat (5 Std., 12~14°) extrahiert. Dunkel-Adaptationstemp. : 12~14°.		
B) Rhodopsin wurde mit 1-proz. wäßriger Lösung von Digitonin (4 Std., 5°) extrahiert. Dunkel-Adaptationstemp. : 21°.		

Die Wirkungen der Regeneration von Rhodopsin auf die *in vivo* und *in vitro* gebrauchten Areca-Alkaloide und verwandte Verbindungen werden in Tabelle I und II gezeigt.

Meine Experimente zeigten, daß das Isomere des Arecolins, das Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydroisonicotinat Hydrochlorid (II) keine Wirkung bei den Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* hervorrief und auch für die Höhe der b-Welle des ERG nach der Dosierung der Chemikalien einflußlos blieb oder diese verkleinerte. Dagegen wurde der Effekt

17) I. Hanawa : Nippon Seirigaku Zasshi, **6**, 218 (1956).

18) H. McIlwain, R. Rodnight : Biochem. J., **44**, 470 (1949).

19) P. Handler, J. R. Kline : J. Biol. Chem., **143**, 49 (1942).

TABELLE II. Wirkungen auf die Rhodopsin-Regeneration *in vitro* (120 Min.)

	Mol. Konz.	Optische Dichte der Chemikalien	Effekt (%)	Optische Dichte der Kontrolle	Effekt (%)
Nicotinsäureamid	0.01	0.032/0.065 <sup>a)</sup>	49.2	0.019/0.065 <sup>a)</sup>	29.2
	0.03	0.053/0.098	54.0	0.026/0.098	26.5
Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydro- nicotinat Hydrochlorid	0.01	0.024/0.093	25.8	0.025/0.093	26.8
	0.03	0.026/0.094	27.6	0.025/0.094	26.6
1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydronicotinsäure Hydrochlorid	0.01	0.022/0.084	26.2	0.022/0.084	26.2
Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydro- isonicotinat Hydrochlorid	0.01	0.029/0.115	25.2	0.030/0.115	26.1
1-Methyl-3-hydroxymethyl-1,2,5,6- tetrahydropyridin Jodmethylat	0.01	0.024/0.093	25.8	0.024/0.093	25.8
Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydro- nicotinat Jodmethylat	0.01	0.030/0.115	26.1	0.029/0.115	25.2

a) Nenner : Optische Dichte des originalen Rhodopsins.

von 1-Methyl-3-hydroxymethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin Jodmethylat bei der Untersuchung *in vitro* nicht gefördert, jedoch bei der *in vivo* wurde die Regeneration des Rhodopsins und die Größe der b-Welle des ERG mehr als bei der Kontroll-Prüfung gefördert.

Demgemäß ist die Behauptung von Hosoya<sup>20)</sup> vielleicht nur unter den Umständen annehmbar, daß Arecolin nur *in vivo* zu gebrauchen ist und ferner die Alkoxy-carbonyl-, Hydroxymethyl- und insbesondere Methoxy-carbonyl-Gruppe sich nicht in  $\gamma$ -Stellung, sondern in  $\beta$ -Stellung zur 1-Methyl-Gruppe befinden müssen.

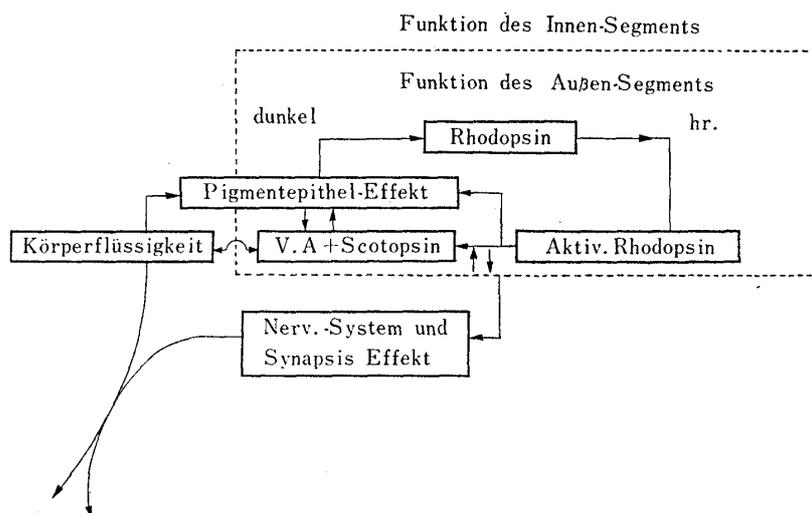
Es ist bekannt, daß Arecolin und die verwandten Verbindungen des Arecolins eine parasynpathetische Wirkung<sup>21~46)</sup> zeigen und Miosis verursachen. Meine Untersuchungen beweisen, daß die oben erwähnten verwandten Verbindungen von Arecolin auf die Resynthese von Rhodopsin einwirken, daß die Resynthese von Rhodopsin bei der Untersuchung *in vitro* durch Vorhandensein des Pigmentepithels nicht gefördert wird, und daß sogar die Rhodopsin fördernden Verbindungen, wenn sie *in vivo* dosiert werden, die Höhe der

- 20) Y. Hosoya : Nippon Seirigaku Zasshi, **19**, 227 (1956); Osaka Shiritsu Daigaku Igaku Zasshi, **2**, 93 (1953).
- 21) P. Breslau : Z. Exptl. Pathol., **7**, 577 (1910).
- 22) G. Fracassi : Arch. Ottalmol., **28**, 154, 179 (1921).
- 23) T. Kruiolv : Arch. intern. Pharmacodynamie, **52**, 404 (1936).
- 24) S. Nakayasu : Japan. J. Med. Sci. **X**, Ophthalmol., **2**, 520 (1940).
- 25) I.C. Ross : J. Comp. Pathol. Therap., **37**, 246 (1925).
- 26) K.J. Huber : Arch. exp. Pathol. Pharmacol., **94**, 327 (1922).
- 27) R. Joachimovitis : Arch. Gynäkol., **123**, 769 (1925).
- 28) C. Heymens : Compt. rend. soc. biol., **87**, 1062 (1922).
- 29) A.J. Kusnaxow : Z. ges. exptl. med., **8**, 334 (1926).
- 30) S. Lang, L. Rigo : Biochem. Z., **192**, 172 (1928).
- 31) G. Carbonaro : Arch. farmacol. sper., **52**, 241 (1931).
- 32) E.S. Lokshina : Byull. Eksptl. Biol. Med., **9**, 272 (1940).
- 33) T. Kiyohara : Folia Pharmacol. Japon., **12**, No. 2, 179 (1931).
- 34) S.O. Romm, J.S. Serdück : Arch. ges. physiol., Pfüger's, **217**, 667 (1927).
- 35) R. Hunt, R.R. Renshaw : J. Pharmacol., **35**, 75 (1929).
- 36) L.H. Schwarte, H.H. Dukes : J. Am. Vet. Med. Assoc., **32**, 180 (1931).
- 37) C. Kadonaga : Folia Pharmacol. Japon., **26**, 73 (1938); *ibid.*, **28**, 57 (1940).
- 38) T. Baturenko : Byull. Eksptl. Biol. Med., **4**, 510 (1937).
- 39) S. Stefanson : Arch. exp. pathol. pharmacol., **185**, 29 (1937).
- 40) A.T. Dorinskaja : Byull. Eksptl. Biol. Med., **11**, 466 (1941).
- 41) W. Feldberg, A. Varticinen : J. Physiol., **83**, 103 (1934).
- 42) M. Preobrazhenskii : Russ. J. Physiol., **12**, 45 (1929).
- 43) F. Sanz : Farmacoterap. actual (Madrid), **4**, 385 (1947).
- 44) L. Wachholz : Deut. Z. ges. gerichtl. Med., **19**, 224 (1932).
- 45) K. Kenten : Japan. J. Med. Sci. **IV**, pharmacol., **7**, proc. japan. pharmacol. soc. 7~9 (1933).
- 46) U.S. v. Euler, B. Domeiz : Acta pharmacol. Toxicol., **1**, 263 (1945).

b-Welle vergrößern, und daß auch die das Rhodopsin vermindern Verbindung die Höhe der b-Welle verkleinern. Daher kann behauptet werden, daß die b-Welle aus dem Impuls des durch die Stäbchen übertragenen Weges stammt. Die Beobachtung von Granit,<sup>47)</sup> daß die Höhe der b-Welle mit der Menge des Rhodopsins im Verhältnis steht, ist in diesem Zusammenhang interessant.

Die Ursprungsstelle und die Genese des ERG in der Retina bleiben unbekannt. Die Behauptung von Svaetichin, *et al.*<sup>48)</sup> daß das ERG seinen Ursprungsort in den Visuell-Zellen hat, weil sie den elektrischen Strom leiten, wenn man die nervösen Elemente der Zellschicht der Retina gelähmt hat, dürfte unannehmbar sein.<sup>49,50)</sup> Tomita<sup>51)</sup> und seinen Mitarbeitern ist es zuletzt gelungen, ERG aus der inneren Plexiform-Schicht (Bipolarzellen und Horizontalzellen) zu bekommen. Hierbei suchten sie den Ursprungsort des ERG bei dem Fisch *cyprinus auratus*, um das S-Potential mittels einer mit Kaliumferricyanid gefüllten Mikropipette zu induzieren und histologisch Turnbull-Blau zu bilden. Die Untersuchungen von Tomita, *et al.* wurden zwar mit Fischarten durchgeführt, sein Urteil ist aber im Prinzip bei allen Wirbeltieren richtig, weil die Retina fundamental denselben Aufbau bei allen Wirbeltieren hat. Meine eigenen Untersuchungen, daß, wenn Rhodopsin in vermehrter Menge regeneriert ist, die b-Wellen in vergrößerter Form erscheinen, diese Alkaloid-Gruppen sich aber nicht auf die Rhodopsin-Regeneration mit Außensegmenten von Stäbchen und Pigmentepithelien *in vitro* auswirken, stehen in Zusammenhang damit, daß das ERG aus einer anderen Zelle als der visuellen hervorkam. Es läßt sich also mit Sicherheit sagen, daß sich an der Rhodopsin-Regenerations-Wirkung von Areca-Alkaloid *in vivo* andere Faktoren als bei der *in vitro* beteiligen.

Allgemein gesagt, werden die Potential-Veränderungen sehr leicht aufgezeichnet, weil die visuellen und bipolaren Zellen so geordnet sind, daß die Zellen einen rechten Winkel mit der Oberfläche der Retinalmembran bilden. Da es bekannt ist, daß das ERG keine Wirkung auf die optischen Nerven ausübt, sind die Ophthalmoplexus-Zellen nicht als Ursprungsstelle der b-Welle des ERG zu betrachten. Es ist also anzunehmen, daß das Areca-Alkaloid erst die Leitung von Impulsen der den Effekt der Chemikalien leicht leitenden Nerven-Gegend und zwar der Synapsen zwischen Bipolar-Zellen und anderen Zellen er-



Schema 1. Vermutlicher Ablauf des photochemischen Prozesses um das Außen-Segment von Stäbchen

47) R. Granit: "Sensory Mechanism of the Retina," (1947). Oxford University Press, London.

48) D. Ottson, G. Svaetichin: Acta Physiol. Scand., 29, 31, 565 (1953).

49) R. Granit: "Receptors and Sensory Perception, 7189 (1955). Yale University Press, New Haven.

50) E. J. MacNichol, G. Svaetichin: Am. J. Ophthalm., 46, 26 (1958).

51) T. Tomita, M. Murakami, Y. Sato, Y. Hashimoto: Nippon Seirigaku Zasshi, 9, 63 (1959),

leichtert und sich sekundär auf die funktionäre Erhöhung der Visuellzellen der Retina bezieht, also die Resynthese von Rhodopsin fördert. Nach dem Resultat meiner Untersuchungen mit Areca-Alkaloid lassen sich die photochemischen Prozesse um das Außensegment der Stäbchen dahingehend zusammenfassen.

Wenn Rhodopsin belichtet wird, wird es anfänglich im Außensegment des Stäbchens reaktiviert und verwandelt sich zunächst durch das Verblassen in Vitamin-A und Scotopsin; es scheint mir, daß zwei der Protein-Bestandteile im aktivierten Rhodopsin, Histidin und Cystein, an jeder Stelle irgendeine Rolle spielen (siehe letzte Mitteilung<sup>1)</sup>) und daß das Cystein und Histidin im Rhodopsin ihre eigenen Effekte sogleich zu den Visuellzellen und den Synapsen zwischen Bipolar-Zellen und anderen Zellen leiten; es scheint, daß ein Teil des aktivierten Rhodopsins, welches die Entfärbung allmählich hervorruft, durch Vorhandensein von Pigmentepithel-Effekt, im Dunkeln wieder das Rhodopsin resynthetisiert. Der Verfasser nenne die Effekte von Neo-Vitamin A<sub>1</sub>, Retinenreduktase, Retinenisomerase, DPN und anderen Stoffen, welche in den Stäbchen und besonders im Pigmentepithel reichlich vorhanden sind, im allgemeinen Pigmentepithel-Effekt. Auch wird das Rhodopsin von Scotopsin und Vitamin-A beim Pigmentepithel-Effekt resynthetisiert. Wenn der Verfasser in meinen Untersuchungen zu den homogenisierten Außen-Segmenten der Stäbchen das homogenisierte Pigmentepithel, Nicotinsäureamid und die DPN zugesetzt habe, werden ungefähr 51.6% der Rhodopsin-Menge resynthetisiert. Die Außen segmente der Stäbchen mögen aber bei der Metabolie-Aktivität mit den Innen segmenten in Beziehung stehen. Die elektronenmikroskopische Beobachtung der Innen segmente der Stäbchen von Sjöstrand<sup>52)</sup> hat klar gemacht, daß Mitochondria in den Innen segmenten reichlich vorhanden sind. Die Energie-Metabolie in den Mitochondria der Innen segmente mag daher mit dem Veränderungsprozeß, welcher sich bei den Pigmentepithel-Effekten und zwischen dem aktivierten Rhodopsin und Vitamin-A abspielt, konjugiert werden und die Funktion dieser Innen segmente wird wahrscheinlich die Aktivität der Visuell-Zellen beschleunigen.

In der herausgenommenen Retina beruht die Zunahme der Höhe der b-Welle, welche durch die Dosierung von Areca-Alkaloid erfolgt, nicht auf der verstärkten Funktion des Zirkulationssystems.

Es soll nochmals darauf hingewiesen werden, daß die Leitung der Impulse durch Synapsen zwischen Bipolarzellen und anderen Zellen bei zugesetzten Alkaloiden erleichtert wird. Diese Wirkungen der Alkaloide werden wahrscheinlich von der beschleunigten Zirkulation der Körperflüssigkeit und der folgenden Erhöhung der Funktion des Pigmentepithels, welche die vergrößerte Resynthese von Rhodopsin hervorruft, begleitet.

Alles in allem müssen nicht nur die Theorie des Rhodopsin-Zyklus von Wald, sondern auch die erleichterte Leitung der Impulse durch die Synapsen und die Pigmentepithel-Effekte bei den Untersuchungen über die Rolle von Areca-Alkaloid in Bezug auf die Regeneration von Rhodopsin zusammen in Betracht gezogen werden.

### Schluß

1) Die Areca-Alkaloide und zwei neue synthetisierte verwandte Verbindungen, Methyl 1-Methyl-1,2,5,6-tetrahydroisonicotinat Hydrochlorid und 1-Methyl-3-hydroxymethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin Jodmethylat wurden bezüglich ihrer Wirkungen auf die Regeneration von Rhodopsin *in vivo* und *in vitro*, und auf die b-Welle des Elektroretinogramm untersucht.

2) Der Regenerations-Prozentsatz von Rhodopsin *in vitro* im Vorhandensein von Außensegment von Stäbchen und Pigmentepithel wurde mit Nicotinsäureamid als Standard-Substanz untersucht.

52) F. S. Sjöstrand : J. Cellular Comp. Physiol., 42, 15, 45 (1953).

3) Die Areca-Alkaloide fördern die Regeneration von Rhodopsin *in vivo*, aber nicht *in vitro*, d.h., bei Vorhandensein von Außensegmenten der Stäbchen, Pigmentepithel und DPN.

4) Die Wirkungen auf die Förderung der Regeneration des Rhodopsins *in vivo* und auf die Zunahme der Höhe der b-Welle des ERG waren ganz ausgezeichnet, wenn sich die Methoxycarbonyl-Gruppe im Piperidin-Ring des Arecolins in  $\beta$ -Stellung, jedoch nicht, wenn sie sich in  $\gamma$ -Stellung befand.

5) Aus den Wirkungen der Areca-Alkaloide und verwandten Verbindungen sowohl auf die Rhodopsin-Regeneration *in vivo* und *in vitro*, als auch auf die b-Welle des ERG, vermutet man, daß die b-Welle des ERG aus dem Leitungsweg des Impulses der Stäbchen kommt und der Ursprungsort der b-Welle nicht die visuelle Zelle sondern die bipolare Zelle ist.

6) Die fördernde Wirkung des Areca-Alkaloids auf die Regeneration von Rhodopsin beruht darauf, daß mit den oben angeführten Chemikalien die Leitung der Impulse durch die Synapsen, wie auch die Zirkulation der Körperflüssigkeit beschleunigt wird.

Herrn Prof. T. Tsukamoto, unter dessen freundlicher Leitung diese Arbeit durchgeführt wurde, bin der Verfasser für seine Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet. Herrn Prof. N. Toida vom physiologischen Institutes der Universität Kyushu möchte der Verfasser für seine freundlichen Anregungen und für Diskussion meinen Dank aussprechen. Herrn T. Mōri in dieser Institut, Herrn K. Higuchi und Herrn T. Tomita im physiologischen Institut dieser Universität bin ich für die Mithilfe bei der Herstellung einiger Ausgangsmaterialien und für die Mithilfe bei der Aufzeichnung des Elektretinogramms sehr dankbar. Die Aufnahmen der Absorptionsspektren wurden in der Analytischen Abteilung und die Mikroanalyse in der Mikroanalytischen Abteilung dieser Institutes angefertigt, wofür ich herzlich danken möchte.

### Zusammenfassung

Die Untersuchungen über die Rhodopsin-Regeneration *in vivo* und *in vitro*, und über Elektretinogramme unter Zusatz von Areca-Alkaloiden, und neuen synthetisierten verwandten Verbindungen mit *Bufo vulgaris*, zeigten, daß die verwendeten Alkaloide die Regeneration von Rhodopsin durch Aktivierung der Funktion anderer Teile als Außen segmente der Stäbchen fördern, sich aber an dem Prozeß der Rhodopsin-Resynthese, bei welchem das Rhodopsin aus Scotopsin bei Gegenwart von Pigmentepithel synthetisiert wird, nicht direkt beteiligen.

(Eingegangen am 15. Februar 1960)