

89. Tetsuya Komori*¹ und Hiroshi A. Kuriyama*² : Chemische Studien über die visuelle Funktion. VII. Über den Einfluß verschiedener Alkohole auf die Regeneration des Rhodopsins und auf das Elektretinogramm.

(Pharmazeutisches Institut, Medizinische Fakultät, Universität Kyushu,*¹ und Physiologisches Department, Medizinische Fakultät, Kagoshima Universität*²)

In einer früheren Mitteilung¹⁾ berichtete der Verfasser über die Tatsache, daß der Vergrößerungseffekt der Areca-Alkaloide auf die b-Welle des Elektretinogramms (ERG) zum Förderungseffekt der Rhodopsin-Resynthese (*in vivo*) im geraden Verhältniss steht, während diese Verbindungen keine Wirkung auf das Außen segment der Stäbchen und des Pigmentepithels (*in vitro*) zeigen. Aus diesem Grunde ist der Verfasser zu dem Schluss gekommen, daß die b-Welle des ERG aus dem Übermittlungspfad der Stäbchen bei deren Erregung entsteht und vielleicht nicht aus der Schicht der visuellen Zelle, sondern aus der bipolaren Zelle hervorkommt.

Auch hierbei wurde das Verhältnis zwischen den beiden Effekten durch Verwendung mehrerer Alkohole ganz analog gefunden.

Experimentelles

Elektretinogramm (ERG)—Es wurde die Retina von *Rana nigromaculata* HALLOWELL und *Bufo vulgaris* untersucht. Hierzu wurden ihr drei gleiche Teile, je 1 mm² groß, entnommen, und zwar von Zentrum, Mitte und Peripherie.

Zur Aufzeichnung des ERG wurde der Vorverstärker als Kathode-Anhänger und ein Gleichstrom Hauptverstärker mit 3-Stufen verwendet; die beiden Verstärker wurden zur CR-Kupplung verbunden. Als Rekorder wurde eine Glas-Kapillar-Elektrode benutzt, deren Durchmesser ungefähr 0.5 μ war. Das Innere der Elektrode wurde mit der 3M KCl Lösung gefüllt; der Widerstand war zwischen 20~30 m Ω . Zur Regulierung wurde die Mikro-Steuerung benutzt. Die Spitze der Elektrode wurde festgesetzt. Als Indifferent-Elektrode wurde eine Ag-Platte, 5 mm lang und 3 mm breit, als Schreiber ein 6-Kanal-Tintenschreiber-Oszillograph (San-ei Elektrische Co.) verwendet. Als Kondensator wurde ein Projektionsapparat mit einer 300-W-Birne benutzt. Die Intensität des Reizlichtes war 90 Lux. Nach der Dunkel-Adaptation wurden die Kröten geköpft, die Retinas herausgenommen, und auf Filtrierpapier gesetzt, das samt ihnen in Ringer'sche Lösung eingetaucht wurde. Die Retinas wurden vorsichtig auf die Elektrode aufgebracht, wobei darauf geachtet werden mußte, daß die Retinas nicht verletzt wurden. Nach 1 Min. wurde das erste ERG als Kontrolle aufgezeichnet. Nachdem die Substanzen den Retinas zugesetzt worden waren, wurden alle 3 Min. die Veränderungen im ERG aufgezeichnet.

Die Regeneration des Rhodopsin *in vivo*—Die zur Regeneration von Rhodopsin, das nach der Verabreichung von verschiedenen Verbindungen entstand, angewandten Methoden wurden bereits in einem früheren Bericht beschrieben.¹⁾ Drei Kröten (1 Gruppe), die bis zum Anpassen an Licht 2 Std. lang in dem Apparat gehalten wurden, erhielten in den abdominalen Lymphsack Injektionen von Ringer'scher Lösung mit 1% von einigen Alkoholen (2 ccm/kg). 60 Min. später wurde die Retina aus jedem Auge in der Dunkelkammer unter schwachrotem Licht herausgenommen und das Rhodopsin in 5 cc. von 2-proz. NaClO₄-Lösung, oftmals schüttelnd, extrahiert, und 15 Min. bei 3000 r.p.m. zentrifugiert.

Bei der vergleichenden Untersuchung des Effektes der Alkohole wurde Ringer'sche Lösung als Kontrollsubstanz benutzt. Bei diesem Experiment wurden alle photometrischen Versuche mittels Shimadzu-Spektrophotometers QB-50 ausgeführt. Die optische Dichte wurde bei 500 m μ bestimmt.

*¹ Katakasu, Fukuoka (古森徹哉),

*² Yamashita-machi, Kagoshima (栗山 熙).

1) VI. Mitt. T. Komori : Dieses Bulletin, 9, 551 (1961).

Resultate und Diskussion

Das Schaltschema für das ERG wird in Fig. 1 und die von dem Stückchen der Retina erhaltene Figur des ERG in Fig. 2 gezeigt. In Fig. 2 wurde die d-Welle im Zentrum und die b-Welle im Peripherie-Teil als beherrschend aufgezeichnet.

Im Mitte-Teil wurde das ERG so aufgezeichnet, daß es die Intermediärform zwischen dem ERG des Zentrum- und dem des Peripherie-Teils ergab.

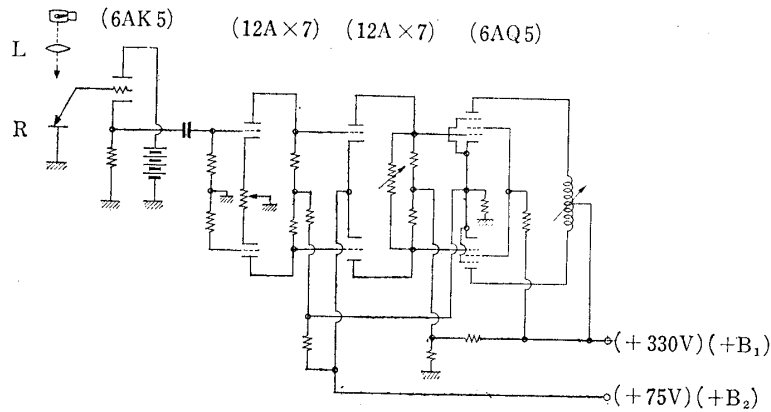


Fig. 1. Schaltschema für E.R.G.
L : Licht R : Retina

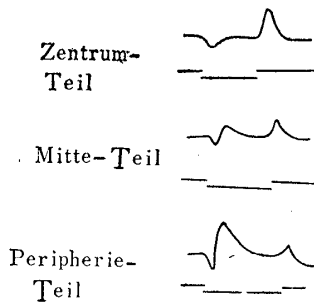


Fig. 2. ERG. kleiner Stückchen der Retina

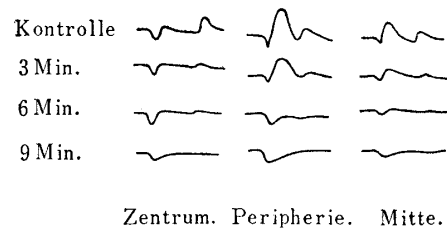


Fig. 3. Wirkung von Methanol (1%)

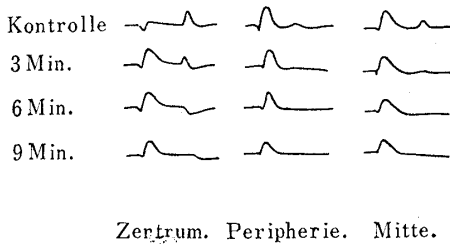


Fig. 4. Wirkung von Äthanol (1%)

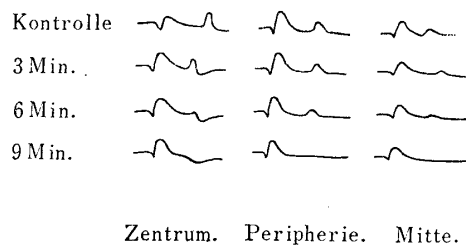


Fig. 5. Wirkung von Allylalkohol (0.1%)

Wenn 1-proz. Methanol-Lösung bei dieser Untersuchung verwendet wurde, wurden die b-Wellen gewöhnlich verkleinert oder verschwanden oft. Wenn 1-proz. Ethanol-Lösung verwendet wurde, wurden die a-Wellen und d-Wellen verkleinert, im Gegensatz dazu wurden die b-Wellen vergrößert. Bei Anwendung von 0.1-proz. Allylalkohol-Lösung wurde die b-Welle vergrößert oder war unverändert. Im Zentrum-Teil aber wurde die b-Welle auffallend vergrößert und die d-Welle verkleinert. Diese Tendenz des ERG mit 1-proz. Allylalkohol-Lösung war genau gleich wie die des ERG mit 0.1-proz. Lösung. Wenn 0.1-proz. Butanol-Lösung verwendet wurde, wurden die a-Wellen und d-Wellen im Zentrum-, Peripherie- und Mitte-Teil verkleinert. Wenn 0.01-proz. Isopropanol-Lösung verwendet wurde, wurden die a-Wellen und d-Wellen verkleinert und die b-Wellen in den

3 Teilen nahmen etwas zu. Die zunehmende Tendenz der b-Wellen bei Isopropanol (0.01%) war aber nicht auffallend und wenn 0.1-proz. Isopropanol verwendet wurde, wurden die a-Wellen und d-Wellen verkleinert und die b-Wellen ein wenig verkleinert oder waren unverändert. Wenn 0.01-proz. Butanol verwendet wurde, wurden die a-Wellen, b-Wellen und d-Wellen verkleinert und gehemmt. Wenn 0.01-proz. Geraniol verwendet

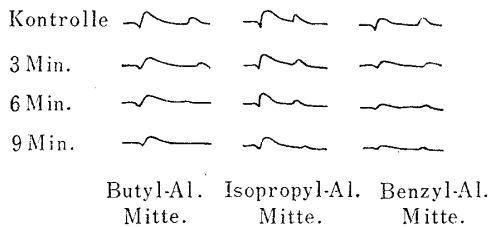


Fig. 6. Wirkung von Butyl-, Isopropyl-, und Benzyl-Alkohol

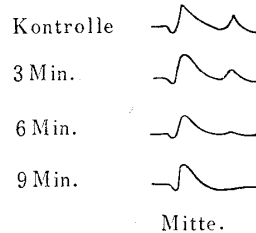


Fig. 7. Wirkung von Geraniol

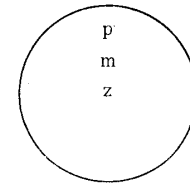


Fig. 8. Schematische Darstellung kleiner Stückchen der Retina
p : Peripherie m : Mitte
z : Zentrum

wurde, wurden die d-Wellen auffallend verkleinert, die a-Wellen waren unverändert und die b-Wellen nahmen nicht zu.

Die Wirkungen von Alkohol-Verbindungen auf die Rhodopsin-Resynthese—Die zur Regeneration von Rhodopsin angewandten Methoden wurden im früheren Bericht beschrieben.^{1,2)} Tabelle I zeigt diese Resultate.

TABELLE I. Wirkungen von Alkohol-Verbindungen auf die Rhodopsin-Resynthese (*in vivo*)

| Verbindung | Rhodopsin-Quantität (log I ₀ /I) | Verbindung | Rhodopsin-Quantität (log I ₀ /I) |
|---------------|---------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|
| Methanol | 0.395 -- | Geraniol | 0.432 -- |
| Äthanol | 0.524 ++ | Citral | 0.425 -- |
| Propanol | 0.498 + | α-Jonon | 0.398 --- |
| Benzylalkohol | 0.442 ± | Ringer'sch Lösung | 0.459 Standard |
| Allylalkohol | 0.496 + | | |

Beim ERG des Retinastückchens wiesen Swaetichin³⁾ und Granit⁴⁾ darauf hin, daß das ERG des Zentrum und das der Peripherie in der Form verschieden war.

Histologisch ist zu sagen, daß die Stäbchen im Peripherie-Teil und die Zapfen im Zentrum reichlich vorhanden sind. In den letzten Mitteilungen beschrieb der Verfasser, daß die Förderungseffekte der Areca-Alkaloide und verwandter Verbindungen auf die Rhodopsin-Resynthese (*in vivo*) zum Vergrößerungs-Effekt der b-Welle des ERG im geraden Verhältnis stehen, und darum die b-Welle des ERG aus dem Leitungsweg des Impulses der Stäbchen herkommt. In diese Experiment wurde klar, daß, wenn Methanol-Lösung verwendet wurde, die b-Wellen in jedem Teil verkleinert wurden und die Wirkung der Rhodopsin-Resynthese gehemmt wurde, dagegen, bei Verwendung von Äthanol und Allylalkohol, die Rhodopsin-Resynthese gefördert und die b-Welle des ERG vergrößert wurde. Diese Tendenz des ERG im Zentrum-Teil ist auffallend. Es scheint uns, daß die Stäbchen im Peripherie-Teil reichlich vorhanden sind und darum die Wirkung der b-Welle beim Kontroll-ERG vor der Zugabe der Alkohole vorherrscht, daß aber im Zentrum-Teil die Stäbchen nur spärlich vorhanden sind, und darum die Wirkung der Chemikalien stark hervortritt.

Es ist auch zu beachten, daß der Verkleinerungs-Effekt der Alkohole auf die d-Welle des ERG⁵⁾ mit dem Effekt der Rhodopsin-Resynthese nicht zusammenhängt.

2) T. Tsukamoto, T. Komori : Dieses Bulletin, **3**, 247 (1955).

3) D. Ottoson, G. Svaetichin : Cold Spring Harbor Symposia, Quant. Biol., **17**, 165 (1952); cf. Acta Physiol. Scand., **29**, Suppl. 106, 538 (1954).

4) R. Granit : "Receptor and Sensory Perception." (1956). Yale University Press, U. S. A.

5) K. Ohki : Fukuoka Acta Medica, **44**, 132 (1953).

Diese Arbeit wurde unter der freundlichen Leitung von Herrn Prof. T. Tsukamoto und Herrn Prof. N. Toida durchgeführt, wofür die Verfasser zu großem Dank verpflichtet sind. Herrn S. Soejima danken die Verfasser für seine Mithilfe bei der Aufzeichnung der Elektroretinogramme.

Zusammenfassung

Die Untersuchung über die Rhodopsin-Regeneration *in vivo* sowie den Einfluß verschiedener Alkohole auf das Elektroretinogramm kleiner Stückchen der Retina zeigten, daß die Wirkungen auf die Förderung der Regeneration des Rhodopsins *in vivo* und auf die Zunahme der Höhe der b-Welle des ERG miteinander in Zusammenhang steht. Beide Effekte sind insbesondere im Zentrum der Retina einander direkt proportional.

(Eingegangen am 15. Februar 1960)

UDC 612.843.14

80. Takeo Tsukamoto, Tetsuya Komori und Yasuko Inoue : Chemische Studien über die visuelle Funktion. VIII.¹⁾ Über den Aminosäure-Bestandteil und die N-terminale Aminosäure von Kröten-Scotopsin.

(Pharmazeutisches Institut, Medizinische Fakultät, Universität Kyushu*¹⁾)

In der letzten Mitteilung²⁾ haben die Verfasser über das Scotopsin, den Protein-Bestandteil des lichtempfindlichen Pigments, d. h. das Rhodopsins, das in den visuellen Zellen vorkommt, berichtet und auch darüber, daß das Scotopsin des Rindes aus 18 Aminosäuren zusammengesetzt ist, und daß sich Histidin und Cystein — nach Untersuchung der Titrierungs-Kurve — an dem Bleichungs-Prozeß des Rhodopsins wahrscheinlich beteiligen.

Im Nachstehenden folgen die bei beiden Experimenten erhaltenen Resultate über den Aminosäure-Bestandteil und die N-terminale Aminosäure des Kröten-Scotopsins.

Experimentelles

Die Reinigung des Scotopsins von Kröten-Retina wurde nach der im früheren Bericht beschriebenen Methode^{2,3)} vorgenommen, wodurch die weißen Außen segmente der Stäbchen erhalten wurden.

Um den Scotopsin-Extrakt zu erhalten, wurden die weißen Außen segmente mit 2-proz. wäßriger Lösung von Digitonin extrahiert. Dieser Extrakt wurde bei 12000 r.p.m. 15 Min. lang zentrifugiert. Aus der klaren, überstehenden Flüssigkeit wurde das Trockenpulver im Vakuum bei 2 mm Hg, bei -50° hergestellt. Das erhaltene Trockenpulver wurde nach der elektrophoretischen Untersuchung als rein befunden.

Qualitative Analyse des Aminosäure-Bestandteils durch Hydrolyse—Zur wäßrigen Lösung von Scotopsin-Digitonid wurde die 1.5-fache Menge von HCl (Wako Pure Chemicals Co. Reagens besonderer Qualität, 35%) zugesetzt und die erhaltene Lösung 24 Std. lang bei 105~110° im Bombenrohr erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde der braune Niederschlag abfiltriert und mit H₂O gewaschen. Das Filtrat wurde bei vermindertem Druck abgedampft und getrocknet. Zu dem erhaltenen getrockneten Niederschlag wurde wieder eine geringe Menge H₂O zugefügt und die erhaltene Lösung unter vermindertem Druck wiederholt (fünfmal) abgedampft. Der Rückstand des Niederschlags, den man so von HCl befreit hatte, wurde als Lösung für die Untersuchung verwendet.

*¹ Katakasu, Fukuoka (塚本越夫, 古森徹哉, 井上雍子).

1) VII. Mitt. T. Komori, H. A. Kuriyama : Dieses Bulletin, **9**, 560 (1961).

2) T. Tsukamoto, T. Komori, N. Kinoshita, N. Toida, H. A. Kuriyama : *Ibid.*, **6**, 81 (1958).

3) T. Komori : *Ibid.*, **9**, 551 (1961).