

Aus den Kerekhoff Laboratories of Biology, California Institute of Technology,
Pasadena, California. USA.

ÜBER DIE WIRKUNG VON ACETYLCHOLIN, ADRENALIN,
NOR-ADRENALIN, FAKTOR I UND ANDEREN SUBSTANZEN
AUF DEN ISOLIERTEN ENDDARM DES FLUSSKREBSSES
CAMBARUS CLARKII GIRARD.

Von

ERNST FLOREY*.

Mit 6 Textabbildungen.

(Eingegangen am 29. Juni 1953.)

Einleitung.

Während in einer ganzen Reihe von Arbeiten über pharmakologisch-physiologische Untersuchungen am Herz dekapoder Krebse berichtet wird, ist über das pharmakologische Verhalten des Krebsdarmes nur wenig bekannt. Frühere Untersuchungen von UMRATH (s. FLOREY 1951) hatten gezeigt, daß Acetylcholin bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} die spontanen Kontraktionen isolierter Därme von *Potamobius astacus* L. verstärkt und daß diese Wirkung durch Atropin und Scopolamin beherrschbar ist. Acetylcholinbestimmungen ergaben, daß Därme von *Potamobius* 0,2—1,8 γ Acetylcholin je Gramm Gewebe enthalten. Damit war das Vorhandensein einer fördernden cholinergen Darminnervation nahegelegt. In früheren Arbeiten (FLOREY 1951, 1952) wurde auch eine hemmende Wirkung des Adrenalins auf den Krebsdarm beschrieben. Das bei diesen Versuchen verwendete kommerzielle Injektionspräparat „Adrenosan“ (Sanabo, Wien) enthält jedoch Zusätze, die, wie sich nun bei Nachuntersuchungen herausstellte, für die Hemmungswirkung verantwortlich sind.

Isolierte Därme des in Kalifornien heimischen Flußkrebsses *Cambarus clarkii* GIRARD erwiesen sich als außerordentlich empfindliche Testobjekte. Mit ihrer Hilfe wurde nun die Untersuchung über die mögliche Funktion von Neurohormonen am Krebsdarm erneut in Angriff genommen.

Die folgenden Fragen waren zu klären: 1. Ist die Acetylcholinwirkung spezifisch? 2. Gibt es im Krebsdarm eine spezifische Acetylcholinesterase? 3. Welches ist die Wirkung und mögliche Funktion von Adrenalin? 4. Ist die Adrenalinwirkung spezifisch, und wie wirkt Nor-Adrenalin? 5. Wie wirkt „Faktor I“ (FLOREY 1953b) auf den Darm des Flußkrebsses? (Die diesbezüglichen Versuche wurden kurz erwähnt bei FLOREY 1953a, 1953b.) 6. Wirken die angewendeten Substanzen direkt auf die Darmmuskulatur oder durch Vermittlung von Nerven?

* Hixon Research Fellow.

Methodik.

Zur Entnahme des Darmes wurde der dorsale Teil des abdominalen Panzers der Krebse zusammen mit der Extensormuskulatur abgetrennt. Der Darm wurde sorgfältig herausgelöst und knapp am After und an seinem Übertritt in den Cephalothorax abgetrennt. Zum Test wurde er in ein 5 cm³ fassendes Glasrohr gebracht, an dem mit verschließbaren Ausfluß und Durchlüftungskanüle versehenen unteren Stopfen befestigt und sein oberes Ende mit dem leichten Schreibhebel eines Kymographions verbunden. Als Badeflüssigkeit diente die von VAN HARREVELD 1936 empfohlene Salzlösung (v.H.-Lösung). Zu den 4,5 cm³ v.H.-Lösung des Darmbades wurden gewöhnlich 0,5 cm³ der zu testenden Lösungen zugesetzt. Die in dieser

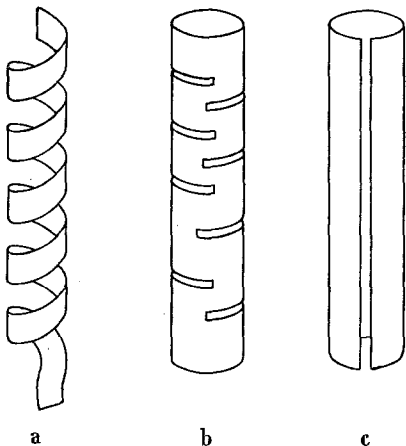


Abb. 1 a—c. Siehe Text.

Arbeit angegebenen Konzentrationen von Substanzen beziehen sich auf die Endverdünnung im Darmbad.

Sämtliche zu testenden Substanzen wurden in v.H.-Lösungen gelöst. Solche Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch hergestellt. Die Gewinnung von Faktor I geschah in der bei FLOREY 1953 b angegebenen Weise durch sukzessive Extraktion von eingedampftem Dialysat von wäßrigen Kochextrakten aus Pferdegehirn mit Äther, Chloroform, absolutem Alkohol und HCl-Alkohol und Fällung aus dem sauren Alkohol mit Äther.

In einigen Versuchen wurden Därme spiralförmig oder in der Längsrichtung aufgeschnitten oder erhielten Einschnitte in wechselndem Abstand. Die Därme wurden zu diesem Zweck auf eine dickere Präpariernadel aufgezogen und ließen sich so mit einer feinen Schere leicht in der gewünschten Weise schneiden. Abb. 1 zeigt die zur Anwendung gekommenen Schnitte.

Folgende Pharmaka wurden verwendet: Acetylcholinchlorid (Merck), Eserinsalicilat (Merck), Atropinsulfat (Merck), Mecholychlorid (Merck), Benzoylcholinchlorid (Merck), Arecolin (Delta Chemical Works), Adrenalin (Mann, Fine Chemicals), dl-arterenol¹ (Winthrop-Stearns Inc.), Ephedrinsulfat (Merck).

Ergebnisse.

Acetylcholin (ACh) erhöht sowohl die Stärke als auch die Frequenz der spontanen Kontraktionen des Darmes. Wenn ACh 10^{-4} — 10^{-7} verwendet wird, tritt bei zunehmender Kontraktionsstärke auch eine Tonuszunahme ein: der Darm erschlafft nicht mehr vollständig und die „Grundlinie“ der registrierten Kurve erreicht ein anderes Niveau. Geringere ACh-Konzentrationen verstärken wohl noch die Darmbewegungen, steigern aber den Tonus nicht. Die Grenze der Wirksamkeit des Acetylcholins liegt hier bei 10^{-11} . Wiederholt konnte beobachtet werden, daß Därme, die bei Beginn des Versuchs keine Spontanaktivität zeigten,

¹ dl-arterenol = Nor-Adrenalin.

nach Zufügen geringster Acetylcholinmengen (10^{-9}) zur Spontanaktivität angeregt wurden und diese auch nach dem Auswaschen beibehielten.

Eserin 10^{-5} — 10^{-6} verursacht selbst sehr oft ein Ansteigen der Spontanaktivität. Besonders auffallend ist diese Wirkung bei Därmen, die vor der Eserinzugabe eine schwache Aktivität zeigten. Eserin sensibilisiert in den angegebenen Konzentrationen den Krebsdarm sehr stark gegenüber Acetylcholin. Am eserinierten Darm bewirkt selbst ACh 10^{-10} eine deutliche Tonussteigerung (Abb. 2). Die Wirkung von Eserin wurde 28mal an 17 Därmen getestet, Acetylcholin 211mal an 24 Därmen.

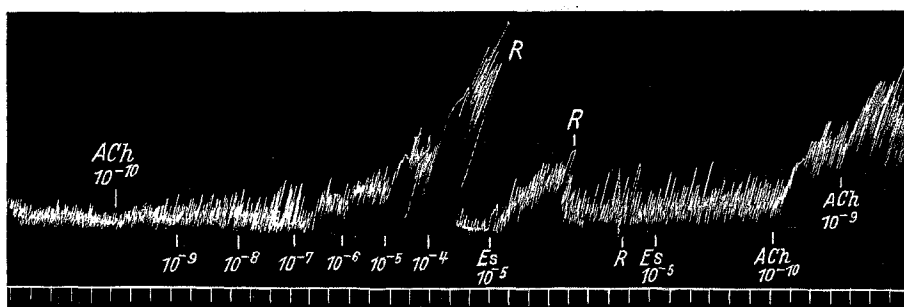


Abb. 2. Isolierter Enddarm von *Cambarus clarkii*. Einfluß von Acetylcholin (ACh) verschiedener Konzentration auf die Spontanaktivität. Nach dem ersten Auswaschen (R) angewendetes Eserin (Es) verursacht Tonussteigerung, da es den Darm gegen das nicht völlig ausgewaschene Acetylcholin sensibilisiert. Nach erneutem, zweimaligem Auswaschen sind zwar die Kontraktionen verstärkt, Eserin verursacht aber selbst keine Tonussteigerung. Nach 3 min Einwirkungszeit von $Es\ 10^{-5}$ hat $ACh\ 10^{-10}$, das vorher nur schwach wirksam war, eine starke Wirksamkeit. Zeitmarken 30 sec.

Atropin blockiert in der Konzentration von 10^{-5} jede Acetylcholinwirkung (Abb. 3). Manchmal hemmt es auch die normale peristaltische Bewegung des Darmes, dies ist jedoch nicht bei allen Fällen der Fall. *Atropin* wurde 32mal an 9 Därmen geprüft.

Acetyl- β -methylcholin (*Mecholyl*) wirkt wie Acetylcholin; die geringste noch wirksame Konzentration beträgt jedoch 10^{-6} . Abb. 4 gibt ein Beispiel einer *Mecholyl*wirkung. Eserin sensibilisiert den Darm gegenüber *Mecholyl* deutlich, jedoch bleibt auch nach Eserin die Schwelle der Wirksamkeit bei 10^{-6} . *Mecholyl* wurde 16mal an 7 Därmen getestet.

Benzoylcholin ist praktisch ohne jede Wirkung. Auch nach Zufügen von Eserin zur Benzoylcholinlösung bleibt diese wirkungslos (Abb. 4). Bei einigen Därmen hat Benzoylcholin 10^{-3} die Spontanaktivität vermindert. Die Substanz wurde 12mal an 6 Därmen getestet.

Arecolin wirkt wie Acetylcholin, ist aber noch etwas schwächer wirksam als *Mecholyl* (Abb. 4). Die Grenze seiner Wirksamkeit liegt bei einer Verdünnung von 10^{-6} . Eserin verändert die *Arecolin*wirkung in keiner Weise. *Arecolin* wurde an 6 Därmen 9mal getestet.

Nikotin erwies sich am Krebsdarm als fast wirkungslos; nur hohe Konzentrationen, wie 10^{-4} verstärken die Kontraktionen des Darmes ein wenig. *Nikotin* wurde 7mal an 3 Därmen geprüft.

Adrenalin verursacht ein Anwachsen der Kontraktionsstärke und des Tonus. Die Grenze seiner Wirksamkeit liegt bei 10^{-7} . Die Ampli-

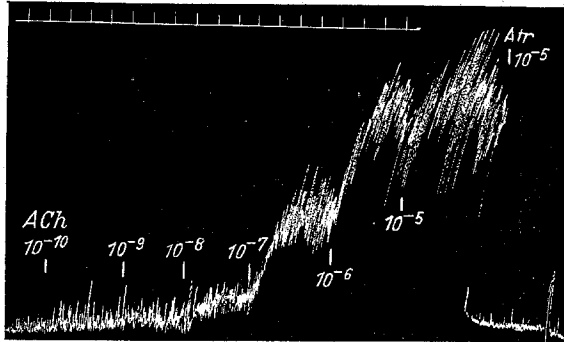


Abb. 3. Isolierter Enddarm von *Cambarus clarkii*. Wirkung steigender Acetylcholin-(ACh)konzentrationen. Atropin (Atr) 10^{-5} blockiert die Wirkung von ACh 10^{-4} völlig und hemmt die Spontankontraktionen. Zeitmarken 30 sec.

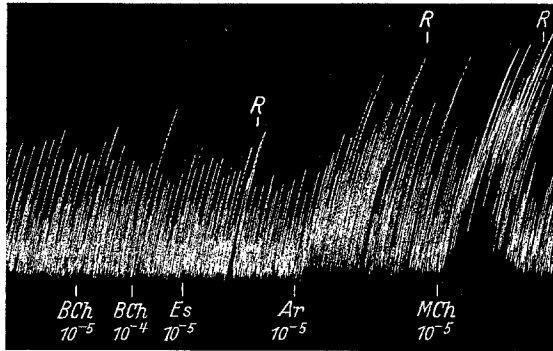


Abb. 4. Isolierter Enddarm von *Cambarus clarkii*. Wirkung von Benzoylcholin (BCh), Eserin (Es), Arecolin (Ar) und Mecholyl (MCh). R = Auswaschen. Maßstab wie Abb. 2.

tude der Darmbewegungen ist nach Adrenalingaben gewöhnlich viel größer als nach entsprechenden Acetylcholingaben. In einigen (12 von 56) Fällen kam es unter Adrenalineinwirkung zu Perioden völliger Erschlaffung des Darmes, die oft $\frac{1}{2}$ —1 min dauerten. Einen typischen Fall zeigt Abb. 5. Eserin verstärkt die Adrenalinwirkung nicht. Sie wird durch Atropin nicht vermindert (56 Versuche, 11 Därme).

Nor-Adrenalin wirkt in derselben Weise wie Adrenalin. Auch seine Wirksamkeitsgrenze liegt bei 10^{-7} . Wie Adrenalin ist es auch imstande, unaktive Därme zur Tätigkeit anzuregen, die auch nach dem Auswaschen beibehalten wird. Eserin und Atropin (Abb. 5) verändern seine Wirk-

samkeit nicht. Auch bei Nor-Adrenalin konnte eine periodenweise Erschlaffung des Darmes beobachtet werden (Abb. 5). Nor-Adrenalin wurde an 13 Därmen 67mal getestet.

Ephedrin wurde an 2 Därmen 5mal geprüft und zeigte keine Wirkung, selbst wenn es in Konzentrationen wie 10^{-4} angewendet wurde.

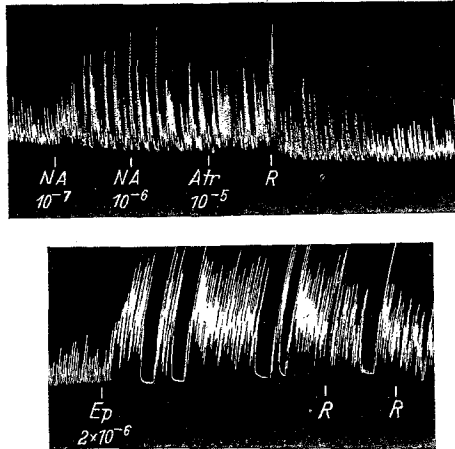


Abb. 5. Isolierter Enddarm von *Cambarus clarkii*. Wirkung von Noradrenalin (NA) und Adrenalin (Ep) auf die Spontankontraktionen. Man beachte die periodenweise auftretende Hemmung. Atropin (Atr) 10^{-5} hat keinen Einfluß auf die Nor-Adrenalin-Wirkung. R = Auswaschen. Maßstab wie Abb. 2.

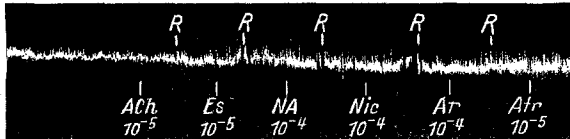


Abb. 6. Isolierter Enddarm von *Cambarus clarkii*; spiralg geschnitten (s. Abb. 1a). Acetylcholin (ACh), Eserin (Es), Noradrenalin (NA), Nikotin (Nic), Arecolin (Ar) und Atropin (Atr) sind ohne erkennbaren Einfluß auf die Spontankontraktionen. R = Auswaschen. Maßstab wie Abb. 2.

Faktor I (gereinigt) wurde an 12 Därmen getestet. Bei diesen Versuchen wurde entweder v.H.-Lösung ohne Bikarbonat oder solche, die auf p_H 6,8 gepuffert war, als Lösungsmittel und Darmbad verwendet. Substanz I 10^{-5} — 10^{-6} hemmt die Spontanaktivität der Därme weitgehend. Sie blockiert wie Atropin die Acetylcholinwirkung, aber auch die Wirkung von Adrenalin und Nor-Adrenalin vollständig (s. Abb. 2 bei FLOREY 1953b). Auch ungereinigte wäßrige Kochextrakte aus Gehirn oder Rückenmark von Maus, Ratte, Kaninchen, Katze und Pferd haben eine derartige hemmende Wirkung, manchmal noch in einer Verdünnung 1:400. Faktor I 10^{-5} blockiert die Wirkung von Acetylcholin 10^{-5} vollständig.

Därme, welche der Länge nach aufgeschnitten worden waren (Abb. 1a), verhielten sich den zugesetzten Substanzen gegenüber wie unaufgeschnittene Därme. Dagegen waren spiralig aufgeschnittene Därme (Abb. 1b) allen zur Anwendung gelangten Stoffen gegenüber völlig unempfindlich (Abb. 6). Insgesamt wurden 6 derartige Därme untersucht. Alle zeigten eine frequente Spontanätigkeit. Seitlich eingeschnittene Därme (Abb. 1c) waren dann unempfindlich, wenn die Einschnitte, die sich auf einer Seite folgen, einen geringeren Abstand als 5 mm hatten. Betrug der Abstand 5 mm oder mehr, dann verhielten sie sich wie normale Därme und wiesen lediglich eine etwas verringerte Empfindlichkeit auf. 11 derartige Därme wurden untersucht.

Diskussion.

Auf Grund der hier beschriebenen Experimente können die eingangs gestellten Fragen folgendermaßen beantwortet werden: 1. Die Acetylcholinwirkung am Krebsdarm erscheint als spezifisch. Weder das dem Acetylcholin strukturell nahestehende Mecholyl, noch das acetylcholinartig wirkende Arecolin kommen ihm an Wirksamkeit nahe und Benzoylcholin, ein anderer Cholinester, ist gänzlich wirkungslos. 2. Es gehört zu den Charakteristika der echten Acetylcholinesterase, daß sie Acetylcholin schneller zerstört als Mecholyl. Sie wird durch Eserin gehemmt. Eserin sensibilisiert den Darm gegenüber Acetylcholin wesentlich stärker als gegenüber Mecholyl. Benzoylcholin, das von der echten Cholinesterase nicht angegriffen wird, ist auch nach Hemmung der Esterase durch Eserin unwirksam. Das Vorhandensein einer echten Acetylcholinesterase im Krebsdarm ist daher sehr wahrscheinlich. Dies kann als weitere Bestätigung einer spezifischen Acetylcholinwirkung auf den Krebsdarm gewertet werden. 3. und 4. Adrenalin wirkt am Krebsdarm deutlich fördernd. Das nichtmethylierte (Nor-)Adrenalin wirkt in derselben Weise und in derselben Stärke, während das strukturell verwandte Ephedrin wirkungslos ist. Der Adrenalin- und Nor-Adrenalinwirkung kommt also eine gewisse Spezifität zu. Es muß jedoch auffallen, daß Adrenalin und Nor-Adrenalin in manchen Fällen periodenweise hemmen, also ihre Wirkung umkehren. Dies mag so zu verstehen sein, daß das Adrenalin-, bzw. Nor-Adrenalin-Molekül nicht vollkommen in den Funktionszusammenhang, in den es eingebaut wird, paßt, diesen also zwar meistens in Gang hält und fördert, manchmal aber auch hemmt. Beide Substanzen würden dann nicht spezifisch wirken, sondern nur eine andere, adrenalinähnliche Substanz, die normalerweise am Krebsdarm wirksam ist, ersetzen. Es sei hier erwähnt, daß ALEXANDROWICZ und CARLISLE (zitiert nach ALEXANDROWICZ 1953) in Extrakten aus Perikardialorganen dekapoder Krebse (ALEXANDROWICZ 1953) eine adrenalinartige, mit Adrenalin nicht identische Substanz nachweisen

konnten. 5. Faktor I hemmt die Darmkontraktionen und blockiert die Wirkung von Acetylcholin und Adrenalin. Aus anderen Untersuchungen ist bekannt (FLOREY 1953a, b), daß Faktor I bei *Cambarus clarcii* die neuromuskuläre Übertragung blockiert ohne die Erregungsleitung in den motorischen Axonen zu beeinträchtigen und daß er am Herzen die Automatiezentren hemmt ohne die Kontraktionsfähigkeit des Herzmuskels zu verringern. Aus diesen Versuchen und anderen wurde der Schluß gezogen, daß der aus dem Zentralnervensystem von Wirbeltieren extrahierbare Faktor I die Wirkung peripherer Hemmungsnerven bei dekapoden Crustaceen ersetzen kann und daß diese Hemmungsnerven selbst durch Bildung einer ähnlichen (oder identischen?) Hemmungssubstanz wirken. Über eine hemmende Innervation des Darmes dekapoder Crustaceen ist bisher nichts bekannt. Da aber Faktor I so selektiv wirksam ist und an der Bewegungsmuskulatur wie an den Automatiezentren des Herzens die Wirkung peripherer Hemmungsnerven nachzuahmen vermag, ist anzunehmen, daß er auch am Krebsdarm die Wirkung einer hemmenden Innervation ersetzt. 6. Die Zerschneidungsversuche lehren, daß sämtliche angewendeten Substanzen keine direkte Muskelwirkung haben. Seitlich eingeschnittene oder spiralgig aufgeschnittene Därme zeigen frequente kleine Kontraktionen, sind aber unfähig zu synchronen Kontraktionen des ganzen Darmes. Es ist sehr wahrscheinlich, daß durch die Schnitte nervöse Elemente funktionsunfähig gemacht werden und daß die angewendeten Substanzen, vielleicht mit Ausnahme von Faktor I, Eserin und Atropin, auf dem Wege über diese nervösen Elemente auf den Darm wirken.

Aus den Versuchen, über die in dieser Arbeit berichtet wurde, kann man auf das Vorhandensein einer hemmenden und einer cholinergen, fördernden, vielleicht auch adrenergen, fördernden, Innervation des Krebsdarmes schließen. Über die tatsächliche Anordnung der entsprechenden nervösen Elemente ergeben sich vorläufig noch keine Anhaltspunkte. Die Tatsache, daß die Wirkung von Adrenalin und Nor-Adrenalin durch Eserin und Atropin nicht verändert wird, läßt allerdings darauf schließen, daß eventuell vorhandene adrenerge Neurone nicht indirekt durch Erregung von cholinergen Neuronen wirken.

Zusammenfassung.

Die Wirkung einer Reihe von Substanzen auf den isolierten Enddarm von *Cambarus clarcii* GIRARD wurde geprüft. Es ergab sich, daß Acetylcholin bis zu einer Verdünnung von 10^{-11} die Spontanaktivität spezifisch fördert und daß die untersuchten Därme eine echte Acetylcholinesterase besitzen. Adrenalin und Noradrenalin steigern ebenfalls bis zu einer Verdünnung von 10^{-7} die Spontanaktivität der Därme, mitunter bewirken sie aber periodenweise eine Hemmung. Es ist möglich, daß an

ihrer Stelle normalerweise eine andere adrenalinähnliche Substanz wirksam ist. Die Wirkung von gereinigtem Faktor I (FLOREY 1953a, b) läßt auf eine hemmende Darminnervation schließen. Zerschneidungsversuche ergaben, daß die angewendeten Substanzen, abgesehen von Faktor I, Atropin und Eserin, auf dem Wege über Nerven auf die Darmmuskulatur wirken.

Herrn Professor Dr. C. A. G. WIERSMA, in dessen Abteilung die Arbeit durchgeführt wurde, danke ich für sein Interesse an diesen Untersuchungen und ich möchte auch an dieser Stelle ihm, sowie dem Direktor Professor Dr. G. W. BEADLE und den anderen Mitgliedern des Institutes für ihr aufmerksames Bemühen danken, mir den Aufenthalt in Kalifornien so angenehm als möglich zu machen.

Literatur.

ALEXANDROWICZ, J. S.: Nervous organs in the pericardial cavity of the decapod crustacea. *J. Mar. Biol. Assoc. U. Kingd.* **31**, 563 (1953). — FLOREY, E.: Neurohormone und Pharmakologie der Arthropoden. *Pflanzenschutzberichte (Wien)* **7**, 81 (1951). — Neurohormone und ihre Funktion bei Arthropoden. *Verh. Dtsch. Zool. Ges. (Wilhelmshaven 1951)* **1952**, 199. — Über einen nervösen Hemmungsfaktor in Gehirn und Rückenmark. *Naturwiss.* **40**, 295 (1953). — An excitatory and an inhibitory factor of mammalian central nervous system, and their action on a single sensory neuron. *J. Internat. Physiol.* (im Druck).

Dr. ERNST FLOREY, Zoologisches Institut der Universität Würzburg,
Röntgenring 10.