

In conclusion, it can be said that whatever may be the nature of these allosteric sites on AChE, it is clear from the present data that brain and muscle enzymes are endowed with different sets of them

**Résumé.** La présente étude a révélé chez le rat des différences entre l'AChE du cerveau et celle du muscle, en ce qui concerne les pH optima, la température d'inactivation, le  $K_m$ , les courbes de saturation et la réponse

aux inhibiteurs. L'existence de sites allostériques différents dans l'enzyme des deux organes a aussi été observée. L'auteur suggère que ces propriétés cinétiques distinctes tiennent, en partie du moins, à des différences histophysioliques entre les synapses de ces deux tissus.

J. M. VARELA

Central Institute for Brain Research,  
Ijdijs 28, Amsterdam-0 (The Netherlands), 7 May 1973.

## Untersuchungen zur Thermodynamik des peripheren Sehprozesses

Nach Belichtung des Netzhautgewebes laufen physikalisch-chemische Prozesse ab, die mit der Quantenabsorption beginnen und zu einer transretinalen Potentialänderung (ERG) führen. Bei den potentialbildenden Vorgängen an den Zellmembranen handelt es sich um räumlich und zeitlich ineinandergrifffende, untereinander gekoppelte Reaktionen. Selbst wenn eine grosse Zahl von Einzelreaktionen innerhalb und außerhalb der Zellen abläuft, so lässt sich oft durch das Experiment für die Summe von Vorgängen eine Brutto-Reaktionskonstante angeben, deren Temperaturabhängigkeit Aufschluss über die Aktivierungsenergie des Gesamtorganges gibt<sup>1</sup>. Unter diesem Gesichtspunkt haben wir den Temperatureinfluss auf das Belichtungspotential der isolierten Froschretina näher untersucht.

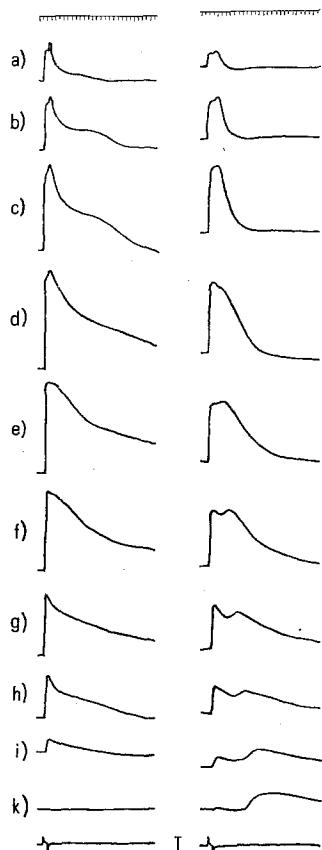


Fig. 1. Temperaturabhängigkeit des Belichtungspotentials einer dunkeladaptierten Froschretina. Die Temperaturen betragen (°C): a) 29,6; b) 27,3; c) 25; d) 20,3; e) 15,7; f) 13,1; g) 10,7; h) 8,8; i) 6,9 und k) 6. Beleuchtungsstärke: linke Reihe 35 Lux, rechte Reihe 0,031 Lux. Oberste Zeile: Zeitmarkierung 1 sec; unterste Zeile: Reizmarke 1 sec, Eichsignal 200 μV.

**Methode.** Wir verwendeten die Technik der isolierten Retina<sup>2-5</sup>. Die Netzhäute von Fröschen (*Rana esculenta*) wurden durch Präparation bei Rotlicht vom anhaftenden Pigmentepithel gelöst und auf dem Netz (Monodur) eines Trägers befestigt. Dieser wurde in die Messkammer einer doppelwandigen Glasapparatur<sup>5</sup> eingeführt, deren Mantelraum von einer thermostatierten Badflüssigkeit durchströmt wurde. Die Messkammer wurde mit 10 cm<sup>3</sup> einer Tyrodelösung gefüllt, durch die gereinigte Luft hindurchperlte. Der pH-Wert betrug 7,7. Alle Versuche wurden bei Dunkeladaptation durchgeführt. Das Belichtungspotential wurde mit Ag/AgCl-Elektroden abgenommen, gleichspannungsgekoppelt verstärkt und auf einem Schreiber sowie Oszillographen registriert. Der Lichtreiz hatte eine Dauer von 1 sec und wurde im Abstand von 3 min ausgelöst. Die Beleuchtungsstärke (J) konnte mit Hilfe von Neutralfiltern im Bereich von 400 bis  $1,3 \times 10^{-5}$  Lux verändert werden. Zur Auswertung wurde die Amplitude der b-Welle des Belichtungspotentials ( $\varnothing_b$ ) herangezogen, die vom tiefsten Punkt der a- bis zum Maximum der b-Welle ausgemessen wurde.

**Ergebnisse.** Der Temperatureinfluss auf das Belichtungspotential der isolierten Froschretina ist in Figur 1 an Hand von Originalektroretinogrammen veranschaulicht. Bei 20°C sind die Potentialwerte am grössten und nehmen sowohl mit fallender wie auch steigender Temperatur ab. Oberhalb von 25°C zeigt sich eine irreversible Schädigung der Netzhautfunktion, die möglicherweise auf einen erhöhten Abbau von thermolabilen Zwischenprodukten des photochemischen Primärprozesses zurückzuführen ist. Bemerkenswert ist ferner, dass bei 6°C im Bereich niedriger Beleuchtungsstärken nur noch die e-Welle registrierbar ist, die einen späten Aus-Effekt darstellt<sup>6</sup>.

Die Temperaturabhängigkeit der Funktion  $\varnothing_b = f(\log J)$  ist für einen charakteristischen Versuch in Figur 2 wiedergegeben. In einem Bereich von 7 bis 30°C ergibt sich bei der gewählten Darstellungsform für niedrige Beleuchtungsstärken ein linearer Kurvenverlauf. Aus der Figur geht hervor, dass die linearen Kurvenabschnitte für alle Temperaturen einen gemeinsamen Schnittpunkt mit der Abszisse aufweisen. Der zugehörige Extinktionswert beträgt 6,7 und entspricht einer Beleuchtungsstärke von  $7,89 \times 10^{-5}$  Lux. Dieser als Schwellenreizstärke zu bezeichnende Wert wird demnach durch die Temperatur

<sup>1</sup> H. NETTER, *Biologische Physikochemie* (Akad. Verlagsgesellschaft Athenaion, Potsdam 1951).

<sup>2</sup> D. OTTOSON und G. SVAETICHIN, *Acta physiol. scand.* 29, Suppl. 106, 538 (1953).

<sup>3</sup> T. FURUKAWA und I. HANAWA, *Jap. J. Physiol.* 5, 289 (1955).

<sup>4</sup> W. SICKEL, *Neurophysiologie und Psychophysik des visuellen Systems* (Eds. R. JUNG und H. KORNHUBER; Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961), p. 80.

<sup>5</sup> U. BORCHARD, *Diss. Math. Nat.*, Univ. Köln 1969.

<sup>6</sup> F. CRESCITELLI und E. SICKEL, *Vision Res.* 8, 801 (1968).

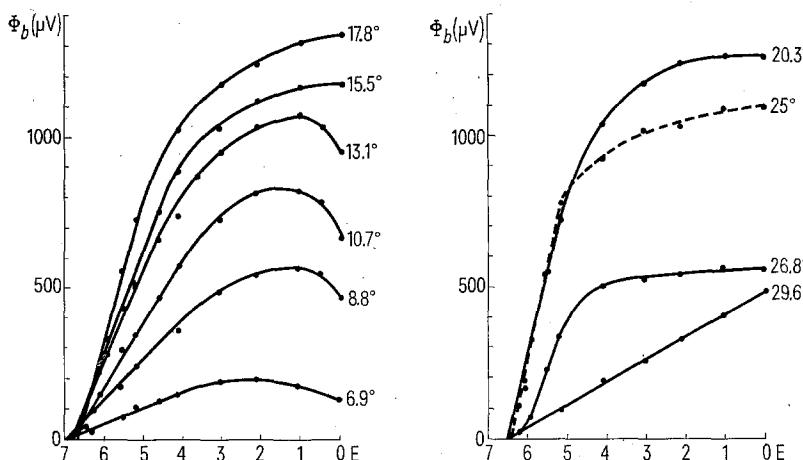


Fig. 2. Temperaturinfluss auf die Funktion  $\Phi_b = f(\log J)$ . Die Extinktion E bezieht sich auf eine maximale Beleuchtungsstärke  $J_0 = 400$  Lux. Reizdauer 1 sec; Reizabstand 3 min; Dunkeladaptation.

nicht verändert. Für die erste Reaktion der Netzhaut auf einen minimalen Lichtreiz ist daher, unabhängig von der Temperatur und somit der Reaktionsgeschwindigkeit, allein die Quantenzahl entscheidend.

Der lineare Kurvenabschnitt in Figur 2 lässt sich durch die Beziehung  $\Phi_b = k_b \times \log J + K_b$  beschreiben<sup>7</sup>, wobei  $k_b$  und  $K_b$  konstante Größen darstellen. Die Steigung wird durch den Differentialquotienten  $d \Phi_b / d \log J = k_b$  wiedergegeben, der in charakteristischer Weise von der Temperatur abhängt.  $k_b$  lässt sich als Brutto-Reaktionskonstante auffassen und stellt ein quantitatives Mass für den potentialbildenden Summationsprozess nach Belichtung dar. Nach ARRHENIUS<sup>1,8</sup> ergibt sich aus der Temperaturabhängigkeit von  $k_b$  für den Gesamtorgang der Potentialbildung eine Brutto-Aktivierungsenergie A, unter der Annahme, dass A temperaturunabhängig ist, gemäß folgender Beziehung:  $\log k_b = \log k_0 - A/2,303 RT$ .

In Figur 3 ist  $d \Phi_b / d \log J$  halblogarithmisch gegen  $1/T$  aufgetragen. Aus der Steigung der Kurven im Temperaturbereich von 12–25°C lässt sich eine Brutto-Aktivierungsenergie von  $6,89 \pm 0,18$  Kcal errechnen, der ein  $Q_{10}$ -Wert von 1,47 für eine mittlere Temperatur von 18,5°C entspricht. Physikalisch-chemische Vorgänge in wässrigen Systemen wie Diffusion, Osmose und Leitfähigkeit haben, wie Erfahrungswerte zeigen, einen Temperaturkoeffizienten von 1,1–1,4. Der ermittelte Wert lässt die Deutung zu, dass für den zur b-Welle führenden potentialbildenden Summationsprozess Diffusionsvorgänge verantwortlich sind.

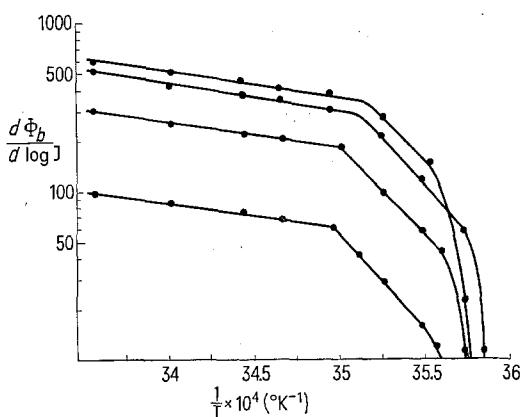


Fig. 3. Halblogarithmische Darstellung des Ausdrucks  $d \Phi_b / d \log J$  in Abhängigkeit von  $1/T$ . Reizdauer 1 sec; Reizabstand 3 min; Dunkeladaptation.

In Figur 3 ist zwischen 8 und 12°C ein weiterer linearer Bereich erkennbar, dem eine Brutto-Aktivierungsenergie von  $49,7 \pm 2,5$  Kcal entspricht. Der zugehörige  $Q_{10}$ -Wert beträgt für eine mittlere Temperatur von 10°C 13,2. Diese Werte deuten darauf hin, dass unterhalb von 12°C in zunehmendem Maße koordinative Glieder des zentralnervösen Netzwerkes ausfallen, bis bei ca. 6°C die b-Welle des Belichtungspotentials nicht mehr auslösbar ist.

**Diskussion.** Bisherige Untersuchungen über die Temperaturabhängigkeit des peripheren Sehprozesses<sup>9–13</sup> haben ergeben, dass mit abnehmender Temperatur eine reversible Verkleinerung des ERG eintritt und die Latenzzeit vom Reiz- bis zum Potentialbeginn zunimmt. Piéron und Ségal<sup>10</sup> ermittelten für die Latenzzeit der a- und b-Welle einen  $Q_{10}$ -Wert von ca. 1,4. Die Untersuchungen von Dettmar und Hanitzsch<sup>13</sup> ergaben für die Temperaturabhängigkeit der b-Wellenamplitude bei einer Beleuchtungsstärke von 12,5 Lux einen  $Q_{10}$ -Wert von 2,34. Die Autoren diskutieren einen Zusammenhang mit dem Sauerstoffverbrauch der Netzhaut.

Die Angabe eines Temperaturkoeffizienten für die Größe des Belichtungspotentials ist von geringer Aussagekraft, da die Potentialwerte sich in Abhängigkeit von der Extinktion mit der Temperatur ändern. Wir haben daher den Differentialquotienten  $d \Phi_b / d \log J$  im linearen Bereich der Funktion  $\Phi_b = f(\log J)$  verwendet, der sich als quantitatives Mass für den Prozess der Potentialbildung heranziehen lässt. Die ermittelte Brutto-Aktivierungsenergie unterstreicht die Annahme, dass die als b-Welle charakterisierte transretinale Potentialänderung auf Diffusionsprozesse an den Zellmembranen der nervösen Bauelemente zurückzuführen ist. Hierfür spricht ferner die Abhängigkeit des ERG von der extrazellulären  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentration<sup>8</sup>. Analoge Aussagen sollen ebenfalls für die oberflächenpositiven und -negativen Wellen im Cortex gelten, die auf die Depolarisation von tiefen Neuronenschichten zurückgeführt wurden<sup>14</sup>.

<sup>7</sup> W. MÜLLER-LIMMROTH, *Elektrophysiologie des Gesichtssinns* (Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959).

<sup>8</sup> W. J. V. OSTERHOUT, *J. biol. Chem.* 32, 23 (1917).

<sup>9</sup> P. M. NIKIFOROWSKY, *Z. Biol.* 57, 397 (1912).

<sup>10</sup> H. Piéron und J. Ségal, *C. r. Soc. Biol., Paris* 131, 1048 (1939).

<sup>11</sup> L. CORNU und A. CLOTTES, *C. r. Soc. Biol., Paris* 146, 463 (1952).

<sup>12</sup> W. J. FRY, V. J. WULFF und M. BRUST, *J. cell. comp. Physiol.* 45, 265 (1955).

<sup>13</sup> P. DETTMAR und R. HANITZSCH, *Acta biol. med. german.* 14, 720 (1965).

<sup>14</sup> B. D. BURNS und B. GRAFSTEIN, *J. Physiol., Lond.* 118, 412 (1952).

NIKIFOROWSKY<sup>9</sup> wies bereits darauf hin, dass die Eintrittsschwankung nach Einsetzen des Lichtreizes bei tiefen Temperaturen verschwinden kann, obgleich die Verdunklungsschwankung nach Beendigung des Lichtreizes weiterhin bestehen bleibt. Diesem Befund entspricht die Beobachtung, dass der verspätete Aus-Effekt noch bei 6°C auslösbar ist, wenn die b-Welle bereits nicht mehr registrierbar ist.

**Summary.** In a range from 6 to 30°C, the influence of temperature on the relation between the light intensity and the amplitude of the b-wave of the exposure potential

has been investigated for the isolated frog retina. Between 10 and 25°C, the gross activation energy of the response to light leads to a temperature coefficient which shows that the formation of the b-wave is mainly checked by diffusion processes. While at 6°C the b-wave has vanished, a complete delayed off-response can still be registered.

U. BORCHARD

Pharmakologisches Institut der Universität Köln,  
Gleueler Strasse 24, D-5 Köln 41 (Deutschland),  
15. Mai 1973.

### The Effect of Imipramine and Nialamide on the Accumulation of Serotonin in Snail (*Helix pomatia*) Nervous Tissue

Though there is evidence that serotonin is specifically taken up by serotonin-containing nerve terminals<sup>1</sup>, which might be a possible way of inactivation, 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), a major breakdown product of serotonin in mammals<sup>2</sup> also occurs in molluscan nervous tissue<sup>3</sup>. In the light of these observations we decided to analyse the accumulation and catabolism of serotonin in the nervous tissue and identified serotonin-containing somata (GSCs)<sup>4-6</sup> of the snail *Helix pomatia*, using a sensitive microprocedure which detects picomole quantities of this amine<sup>7,8</sup>. Since imipramine potentiates transmission between the GSCs and other cells<sup>9</sup> and inhibits the uptake of serotonin into blood platelets<sup>10</sup>, the role of this chemical in the uptake of serotonin was also studied. In addition, the effects of nialamide, a specific inhibitor of monoamine oxidase (MAO), on the catabolism of <sup>14</sup>C-serotonin were analysed.

**Materials and method.** The anterior aorta was canulated just before it enters the central ganglia and perfused with snail saline<sup>11</sup> containing either <sup>14</sup>C-serotonin (from Radiochemical Centre, Amersham; specific activity 57 mCi/mM: the concentration of the perfused <sup>14</sup>C-serotonin was always 5.4 µCi/ml of perfused saline; this corresponds to 10<sup>-7</sup> M serotonin) alone, <sup>14</sup>C-serotonin plus imipramine (100 µg/ml) or <sup>14</sup>C-serotonin plus nialamide (1 mg/ml). The perfusion fluid was in a 1.5 ml syringe which could be adjusted so that the time and pressure of the perfused solution could be controlled. After perfusion with 1.5 ml radioactive substance (at a rate of 1.5 ml/4 h), the brain was perfused with snail saline for 5 min and then rapidly dissected. Individual GSCs were carefully

hand-dissected<sup>4-6,12</sup>. The dissection of a single GSC took less than 4 min, so that any further metabolism or redistribution of the labelled substances was kept to the minimum. 6 neuron somata (GSCs) were transferred to a microtube containing 10 µl distilled water and frozen and thawed in liquid nitrogen to release the cell's contents. The sample was then frozen and freeze-dried, resuspended in 2 µl of 0.05 M sodium bicarbonate pH 9 and acetone (dilute 1:2 v/v) and dansylated with 1 µl dansyl chloride (1 mg/ml in acetone)<sup>6,7,12,13</sup>. This extract was then subjected to 2-dimensional microchromatography as described previously<sup>6,7,12,13</sup>. In other experiments,

<sup>1</sup> V. W. PENTREATH and G. A. COTTRELL, Nature new Biol. 239, 213 (1972).

<sup>2</sup> I. H. PAGE and A. CARLSSON, *Handbook of Neurochemistry* (Ed. A. LAJTHA, Plenum Press, New York 1970), Vol. 6.

<sup>3</sup> C. A. MARSDEN, Comp. gen. Pharmac. 3, 1 (1972).

<sup>4</sup> N. N. OSBORNE and V. NEUHOFF, Naturwissenschaften 2, 78 (1973).

<sup>5</sup> N. N. OSBORNE and G. A. COTTRELL, Experientia 28, 656 (1972).

<sup>6</sup> N. N. OSBORNE, Brain Res. 41, 237 (1972).

<sup>7</sup> N. N. OSBORNE, in *Progress Neurobiology* (Ed. G. A. KERKUT and J. W. PHILLIPS, Pergamon Press, Oxford 1973), Vol. 1, part 4, p. 301.

<sup>8</sup> G. BRIEL, V. NEUHOFF and M. MAIER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 353, 540 (1972).

<sup>9</sup> G. A. COTTRELL, Comp. gen. Pharmac. 2, 125 (1971).

<sup>10</sup> M. DA PRADA and A. PLETSCHER, Br. J. Pharmac. 34, 591 (1968).

<sup>11</sup> K. MENG, Zool. Fahr. 68, 193 (1960).

<sup>12</sup> N. N. OSBORNE, Int. J. Neuroscience 3, 215 (1972).

<sup>13</sup> V. NEUHOFF and M. WEISE, Arzneimittel-Forsch. (Drug Res.) 20, 368 (1970).

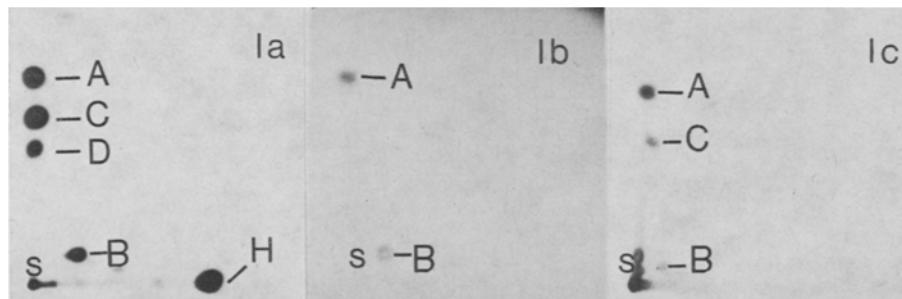


Fig. 1. Autoradiograms of microchromatograms from GSCs (Figure 1b) and brain tissue (Figure 1c) from snails perfused with <sup>14</sup>C-serotonin, and extracts reacted with unlabelled dansyl chloride. Figure 1a is an autoradiogram of pure radioactive dansyl substances to show the chromatographic positions of dansyl serotonin (A and B), dansyl 5-HIAA (C), and dansyl 5-hydroxytryptophol (D). It can be seen that both the GSCs and brain accumulate <sup>14</sup>C-serotonin, whilst only the former converts part of it into 5-HIAA. The original size of a single microchromatogram measured 3 × 3 cm, and was developed in the first dimension (horizontal direction) with water/formic acid (100:3 v/v) and in the second dimension (vertical direction) with benzene/acetic acid (9:1 v/v). s, starting point; H, dansyl-OH, the reactive product between <sup>14</sup>C-dansyl chloride and water.