

SHORT COMMUNICATIONS

Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin aus Thrombocyten durch Harmalin

(Received 2 August 1965; accepted 16 September 1965)

IM ANSCHLUß an die Verabreichung von Reserpin tritt ein langanhaltender Abfall der Konzentration von 5-Hydroxytryptamin (5-HT) im Gehirn von Versuchstieren ein.¹ Harmalin und Isopropylisonicotinsäurehydrazid (Iproniazid) beschleunigen das Wiederansteigen des Spiegels von 5-HT²⁻⁴ und nach Vorbehandlung von Versuchstieren mit Harmalin und Iproniazid tritt nach Reserpin kein Abfall der 5-HT-konzentration ein.^{2, 5-8} Diese Wirkung von Iproniazid und Harmalin könnte auf eine Hemmung abbauender Enzymsysteme, in der Hauptsache der Monoaminoxydase (MAO) zurückgeführt werden, durch welche der schnelle Abbau des freigesetzten Amins verhindert wird.⁹

Paasonen und Pletscher¹⁰ beobachteten eine Hemmung der Reserpinwirkung bei der Freisetzung von 5-HT durch Iproniazid und bei Versuchen zur Freisetzung von 5-HT aus Thrombocyten durch Nikotin fanden wir eine Hemmung der Freisetzung durch Inhibitoren der MAO vom Hydrazin-Typ. Diese Verbindungen hemmen auch die Freisetzung von Histamin *in vitro*¹¹ und von Catecholaminen *in vitro* und *in vivo*^{12, 13} durch Nikotin und wirken antagonistisch auf die durch Nikotin bewirkte Hemmung der Speicherung von 5-HT durch Thrombocyten.¹¹

Um festzustellen, ob die MAO in einer bisher unbekannten Weise bei der Freisetzung von 5-HT beteiligt ist, setzten wir einen Inhibitor der MAO ein, welcher keine Hydrazinstruktur besitzt, nämlich Harmalin, von welchem eine starke, kurzdauernde, reversible Hemmwirkung auf die MAO bekannt ist.

METHODIK

Für die Versuche wurde thrombocytenreiches Plasma von Kaninchen verwendet, methodische Einzelheiten sind früheren Veröffentlichungen zu entnehmen.^{11, 12} Da Harmalin die colorimetrische und die fluorometrische Bestimmung des 5-HT in Thrombocytenextrakten stört, wurde die Bestimmung von 5-HT nach Chromatographie und anschließender Elution der 5-HT-Flecken vorgenommen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Harmalin verursacht nicht nur keine Hemmung der Nikotinwirkung, sondern setzt 5-HT aus Kaninchenthrombocyten *in vitro* und *in vivo* frei. Die Freisetzung ist abhängig von der Harmalin-konzentration, von der Temperatur und von der Wasserstoffionenkonzentration der Inkubationsflüssigkeit. Harmalin ist wirksamer als Nikotin, die durchschnittliche Konzentration, welche 50% der theoretisch möglichen Menge 5-HT freisetzt, beträgt für Harmalin $2,5 \times 10^{-4}$ M und für Nikotin 6×10^{-3} M. Die gleichzeitige Zugabe von Nikotin und Harmalin ergibt im geeigneten Konzentrationsbereich eine Summation der Wirkung.

Die Aufnahme von 5-HT durch Thrombocyten wird durch Harmalin gehemmt, diese Hemmung ist bereits bei einer Harmalinkonzentration von $2,5 \times 10^{-6}$ Merkennbar.

Iproniazid (von 1×10^{-4} bis 1×10^{-2} M) und 1-[2-(Benzylcarbamoyl)-äthyl-2]-isonicotinoylhydrazin (Nialamid) (von $3,5 \times 10^{-4}$ bis $1,3 \times 10^{-2}$ M) beeinflussen die Freisetzung von 5-HT durch Harmalin nicht (s. Tabelle 1).

Aus unseren Ergebnissen ist kein Hinweis für die Beteiligung der Monoaminoxydase bei der Freisetzung von 5-HT aus Thrombocyten abzuleiten. Paasonen¹⁴ beobachtete einen Abbau von 5-HT durch Thrombocyten und Pletscher und Mitarbeiter¹⁵ konnten 5-HT-Metaboliten in Thrombocytenextrakten nachweisen. Unter unseren Versuchsbedingungen ist kein Abbau von 5-HT zu beobachten und die Beteiligung eines monoaminabbauenden Enzyms beim Vorgang der Freisetzung ist schwer vorstellbar.

Die irreversible Hemmung der Monoaminoxidase durch Inhibitoren vom Hydrazintyp kann durch reversible Hemmkörper wie Harmalin und Harmin verhindert werden.^{16, 17} Eine ausreichende Erklärung für diesen Antagonismus, welcher von einigen Autoren als kompetitiv angesehen wird, steht noch aus,¹⁸ doch könnten unsere Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, daß dieser Antagonismus zwischen Hydrazinen und Harmalin auf der freisetzenden Wirkung des Harmalin beruht.

TABELLE 1. FREISETZUNG VON 5-HT DURCH HAR-MALIN UND NIKOTIN¹¹ UNTER DEM EINFLUß VON IPRONIAZID UND NIALAMID

Ansätze:	Freisetzung 5-HT in %.
<i>Harmalin</i> $3,5 \times 10^{-4}$ M	
Zusatz von Iproniazid (molare Konzentration)	
0	49
$3,5 \times 10^{-4}$	48
7×10^{-4}	52
4×10^{-3}	57
$1,3 \times 10^{-2}$	50
Zusatz von Nialamid (molare Konzentration)	
0	48
1×10^{-4}	46
3×10^{-4}	46
5×10^{-4}	47
1×10^{-3}	43
6×10^{-3}	45
1×10^{-2}	48
<i>Nikotin</i> $4,8 \times 10^{-3}$	
Zusatz von Nialamid (molare Konzentration)	
0	60
$2,6 \times 10^{-3}$	31
6×10^{-3}	22

Die Freisetzung von 5-HT durch Harmalin erfolgt sehr wahrscheinlich nach einem anderen Mechanismus wie die Freisetzung, die durch Nikotin bewirkt wird, wie aus der Inaktivität von Iproniazid und Nialamid als Antagonisten der Freisetzung durch Harmalin, geschlossen werden kann.

ZUSAMMENFASSUNG

Harmalin setzt aus Kaninchenthrombocyten *in vitro* und *in vivo* 5-Hydroxytryptamin frei und verhindert die Speicherung von 5-Hydroxytryptamin durch isolierte Thrombocyten. Die Freisetzung folgt den gleichen Kriterien wie die Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin durch Nikotin, mit der Ausnahme, daß Hemmkörper der Monoaminoxidase vom Hydrazin-Typ die Freisetzung von 5-Hydroxytryptamin durch Harmalin nicht beeinflussen.

SUMMARY

Harmaline releases 5-hydroxytryptamine from rabbit blood platelets *in vitro* and *in vivo*. The alkaloid inhibits the uptake of 5-hydroxytryptamine by isolated thrombocytes. The release is very similar to the release caused by nicotine with the exception that inhibitors of the monoamineoxydase of the hydrazine type are ineffective.

*Klinisch-Chemisches Institut an der
Chirurgischen Klinik der Universität München*

HELMUT SCHIEVELBEIN
HERIBERT PETER
IVAR TRAUTSCHOLD
EUGEN WERLE

LITERATURVERZEICHNIS

1. A. PLETSCHER, P. A. SHORE and B. B. BRODIE, *Science* **122**, 374 (1955).
2. B. B. BRODIE, S. SPECTOR, R. KUNTZMAN and P. A. SHORE, *Naturwissenschaften* **45**, 243 (1958).
3. A. PLETSCHER, *Schweiz. med. Wschr.* **87**, 1532 (1957).
4. P. A. SHORE, L. GILLESPIE, S. SPECTOR and D. PROCKOP, *Naturwissenschaften* **45**, 340 (1958).
5. B. B. BRODIE, A. PLETSCHER and P. A. SHORE, *J. Pharmac.* **116**, 9 (1956).
6. A. PLETSCHER, *Helv. physiol. pharmac. Acta* **14**, C 76 (1956).
7. A. PLETSCHER, H. BESENDORF and H. P. BAECHTHOLD, *Archs. exp. Path. Pharmac.* **232**, 499 (1958).
8. A. L. BARTLET, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **15**, 140 (1960).
9. S. SPECTOR, R. KUNTZMAN, P. A. SHORE and B. B. BRODIE, *J. Pharmac.* **130**, 256 (1960).
10. M. K. PAASONEN and A. PLETSCHER, *Experientia* **16**, 30 (1960).
11. H. SCHIEVELBEIN, *Arzneimittel Forsch.* **13**, 916 (1963).
12. H. SCHIEVELBEIN and B. ZITZELSBERGER, *Medna. exp.* **11**, 239, 247 (1964).
13. A. F. DE SCHAEFDRYVER and P. PREZIOSI, *Archs int. Pharmacodyn. Ther.* **121**, 177 (1959).
14. M. K. PAASONEN, *Biochem. Pharmac.* **8**, 241 (1961).
15. M. DA PRADA, G. BARTHOLINI and A. PLETSCHER, *Experientia* **21**, 135 (1965).
16. A. PLETSCHNER and H. BESENDORF, *Experientia* **15**, 25 (1959).
17. A. HORITA and C. CHINN, *Biochem. Pharmac.* **13**, 371 (1964).
18. J. H. BIEL, A. HORITA and A. E. DRUKKER, *Psychopharmacological Agents*. M. Gordon, Herausg. 1. 359, New York (1964).

Biochemical Pharmacology, 1966, Vol. 15, pp. 197-200. Pergamon Press Ltd., Printed in Great Britain.

Identification of substances interfering with the fluorometric determination of brain histamine

(Received 6 August 1965; accepted 5 October 1965)

THERE are two principal procedures available for the determination of histamine in biological material: a bioassay method and the fluorometric procedure which is dependent upon the fluorescence of a histamine-*o*-phthalaldehyde (OPT) complex.¹ Both procedures require a preliminary purification of the tissue extract prior to assay. When the fluorometric procedure was introduced, the results obtained indicated good general agreement with the bioassay method, in tissues from various organs and animal species. In 1961, Graham² reported that the fluorometric procedure was inadequate for the analysis of liver and plasma in her laboratory. Carlini and Green^{3, 4} have since reported that when a rat brain extract is purified by the method of Adam,⁵ the bioassay procedure gives values approximately one third of those previously obtained by either bioassay or fluorescence assay. These authors indicate that the previously reported ostensible agreement between the two assay methods is due to the presence of substances other than histamine which give a histamine-like response on bioassay and in the fluorometric method—substances other than histamine which also fluoresce with OPT. In the present work, the substances that form fluorescent compounds with OPT are identified, and a procedure for their separation from brain histamine is described.

Examination of the fluorescence spectrum of authentic histamine, in contrast to "brain histamine" obtained by either a solvent purification procedure,¹ or a chromatographic procedure using Dowex 1-X8⁶ as shown in Fig. 1, indicates a spectral shift to the shorter wavelengths. The extent of this shift is considerably greater in the presence of phosphate (as illustrated) than chloride ion (the procedure used by Shore *et al.*).¹