

(10 parts of 5% potassium bichromate + 1 part of 5% potassium chromate) and afterwards enclosed in paraffin.

Results.—In the control group the sections of adrenal medulla treated with chromic salts showed a normal degree of chromaffinity in all the cells, while in those treated with HILLARP's reagent cellular groups were evident containing a dark yellow pigment and irregularly distributed in the remaining parenchyma, which was completely devoid of pigment (Fig. 1A, 3C). In each instance the adrenals of the treated rats showed a histochemical picture strikingly different from that of the normal gland. When doses of 0.5 mg/kg were used, with the chromaffin reaction cellular islets could be observed in the adrenal medulla completely free from pheochromic granules (Fig. 2, 3D). These cellular groups were irregularly distributed; the number of their cellular elements was quite variable. However most of the parenchyma preserved a normal degree of chromaffinity. A sudden passage, without intermediary stages, was always observed between the groups of non-chromaffin cells and the adjacent cellular columns, which were intensely pheochromic. With the HILLARP's reaction potassium iodate, however, it was never possible to show, in any cell, the formation of the characteristic dark pigment (Fig. 1B). On the contrary, the administration of reserpine in stronger doses (1 mg/kg for 4–5 consecutive days) caused the almost complete disappearance of the chromaffinity of every glandular element; the cellular cytoplasm appeared more or less vacuolised, relatively basophil, and completely devoid of pheochromic granules. With intermediate doses increasing progressively from 0.5 mg to 1 mg/kg, a progressive reduction was noted in the number of cells positive to chromaffin reaction; in all these stages HILLARP's reaction was consistently negative.

Discussion.—In agreement with what has been demonstrated by other authors by chemical methods (CARLSSON and HILLARP¹, KRONEBERG and SCHÜMANN²) and by our previous research³, it may be considered, from examination of the histochemical findings described, that the administration of reserpine causes a more or less intense diminution of the catechol amine content in the adrenal medulla. The size of this discharge seems proportionate to the dose of alkaloid administered, to the point of reaching with the highest dosage, the complete depletion of the catecholic content of the gland.

The finding of total disappearance of dark yellow pigment after oxidation with potassium iodate in the cellular tissue of the rats treated with reserpine in doses of 0.5 mg/kg denotes a complete depletion of nor-adrenaline; and since, under these conditions, the chromaffin reaction still demonstrates a high number of positive cells, it may be deduced that the adrenaline content has not, on the contrary, undergone any notable modifications. On the other hand, by comparing of the sections treated with chromic salts with those subjected to oxidation with potassium iodate, it can be observed that the number and the topographical distribution of cellular elements devoid of pheochromic material correspond fairly well the number and the distribution of the cellular elements which, in the normal gland, seem to be rich in pigment with HILLARP's reaction.

Therefore it can be stated that, in the above-considered doses and within the limitations imposed by the histochemical reactions adopted, reserpine causes an almost selective discharge of nor-adrenaline; with stronger doses, besides the liberation of nor-adrenaline, there seems to be also a progressive diminution of adrenaline up to the complete disappearance of all the catecholic content.

F. CAMANNI, O. LOSANA, and
G. M. MOLINATTI

Institute of Medical Pathology of the University of Turin (Italy), March 2, 1958.

Riassunto

Con tecniche istochimiche è stata indagata l'azione della reserpina sul contenuto catecolico della midollare surrenale del ratto. Viene documentata una scarica pressochè selettiva di nor-adrenalina.

Histochemische Untersuchungen über den Einfluss von Iproniazid (Marsilid) auf die durch Reserpin erzeugte Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark

Chemische und histochemische Untersuchungen ergaben, dass Iproniazid durch Hemmung der Monoaminoxidase (MO) *in vivo* nicht nur den Abbau von «freiem» 5-Hydroxytryptamin (5HT, Serotonin) verhindert¹, sondern möglicherweise auch die nach Injektion von Reserpin feststellbare Freisetzung des gespeicherten 5HT aus den Körperdepots hemmt². Grosse Dosen Reserpin setzen auch den Katecholamingehalt verschiedener Gewebe³ und des Blutplasmas⁴ herab, eine Wirkung, die im Gehirn durch Iproniazid-Vorbehandlung signifikant abgeschwächt wird⁵. In der vorliegenden Arbeit soll mit histochemischen Methoden geprüft werden, ob eine solche Abschwächung der Reserpinwirkung an den Katecholaminen des Nebennierenmarkes der Ratte sichtbar gemacht werden kann.

Versuchsanordnung. Gruppen von 8 bis 12 männlichen oder weiblichen, 80 bis 120 g schweren Wistar-Ratten eigener Zucht wurden wie folgt behandelt (Tabelle I):

Iproniazid wurde als Phosphat (Marsilid*), Isoniazid als Base (Rimifon*) in äquimolarer Dosierung verwendet. 24 h nach der Reserpininjektion wurden die Ratten getötet (Kontrollgruppen VIII und IX gleichzeitig mit Gruppen VI und VII), die Nebennieren herauspräpariert, einmal zerschnitten und lebensfrisch fixiert. Der *histochemische Nachweis der Katecholamine* erfolgte nach folgenden Methoden: Gruppen I bis V: Fixation in Müllerscher Lösung (Kaliumbichromat 2,5 – Natriumbisulfid 1,0 – Aqua dest. ad 100,0) während 3 Tagen, Paraffineinbettung und Gegenfärbung mit Haemalaun.

Gruppen VI bis IX (nach der Vorschrift von HILLARP und HÖKFELT⁶): Eine Nebenniere pro Tier, während 24 h

* Fabrikmarke.

¹ E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER und L. S. VAN ORDEN, *Exper.* 8, 349 (1952). – E. A. ZELLER, J. BARSKY und E. R. BERMAN, *J. biol. Chem.* 214, 267 (1955). – A. SJOERDSMA, T. E. SMITH, T. D. STEVENSON und S. UDENFRIEND, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 89, 36 (1955).

² A. PLETSCHER, *Helv. physiol. Acta* 14, C 76 (1956); *Exper.* 12, 479 (1956). – G. ZBINDEN, A. PLETSCHER und A. STUDER, *Klin. Wschr.* 35, 565 (1957).

³ M. HOLZBAUER und M. VOGT, *J. Neurochem.* 1, 8 (1956). – A. BERTLER, A. CARLSSON und E. ROSENGREN, *Naturwissenschaften* 43, 521 (1956). – Y. TAKETOMO, P. A. SHORE, E. G. TOMICH, R. KUNTZMAN und B. B. BRODIE, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 119, 188 (1957). – B. B. BRODIE, J. S. OLIN, R. G. KUNTZMAN und P. A. SHORE, *Science* 125, 1293 (1957). – A. PLETSCHER, *Schweiz. med. Wschr.* 87, 1532 (1957).

⁴ M. BURGER, *Helv. physiol. Acta* 14, C13 (1956); *Arch. exp. Path. Pharm.* 230, 489 (1957).

⁵ A. PLETSCHER, *Schweiz. med. Wschr.* 87, 1532 (1957).

⁶ N. A. HILLARP und B. HÖKFELT, *Acta physiol. scand.* 30, 55 (1954); *J. Histochem. Cytochem.* 3, 1 (1955).

Tabelle I

| Gruppe | Anzahl (Ratten) | Geschlecht | Behandlung | | |
|--------|--------------------|------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| | | | 1. Tag, 17 h | 2. Tag, 8 h | 2. Tag, 14 h |
| I | 8 | W | 100 mg/kg Iproniazid intraperitoneal | — | 10 mg/kg Reserpin |
| II | 8 | W | — | — | 10 mg/kg Reserpin |
| III | 10 | W | 100 mg/kg Iproniazid intraperitoneal | — | 10 mg/kg Reserpin |
| IV | 10 | W | 50 mg/kg Isoniazid intraperitoneal | — | 10 mg/kg Reserpin |
| V | 10 | W | — | — | 10 mg/kg Reserpin |
| VI | 12 | M | 100 mg/kg Iproniazid intraperitoneal | 10 mg/kg Reserpin intraperitoneal | — |
| VII | 12 | M | — | id. | — |
| VIII | 12 | M | 100 mg/kg Iproniazid intraperitoneal | — | — |
| IX | 6 | M | — | — | — |

eingelegt in 2,5prozentiger Lösung von Kaliumjodat in Acetatpuffer bei pH 6, 48 h in 5% Formol nachfixiert, Gefrierschnitt. Selektive Darstellung der Noradrenalin-haltigen Zellen. Die andere Nebenniere 24 h eingelegt in ungepufferte Kaliumbichromatlösung (2,5prozentig mit Zusatz von Kaliumbichromat bis zu einem pH zwischen 5 und 6), 48 h Nachfixation in 5% Formol, Gefrierschnitt. Darstellung sowohl der Adrenalin- wie der Noradrenalin-haltigen Zellen.

Bei der *mikroskopischen Beurteilung* der histochemischen Katecholamin-Reaktionen (Tab. II) wurde die Intensität der Braunfärbung wie folgt bewertet:

- +++ Intensive Braunfärbung aller positiv reagierenden Zellen
- ++ Mässige Braunfärbung der meisten positiv reagierenden Zellen
- + Starke Abschwächung der histochemischen Reaktionen
- (+) Nur noch wenige Zellen mit schwach positiven Reaktionen
- 0 Keine positive Reaktion oder nur ganz vereinzelte Zellen schwach angefärbt.

Ergebnisse. Mit Ausnahme der 7 von 30 mit Iproniazid vorbehandelten Ratten, die vorzeitig starben, konnten alle Tiere histopathologisch untersucht werden. Die Beurteilung der histochemischen Katecholamin-Reaktionen im Nebennierenmark ergibt sich aus Tabelle II. Die Chromaffinität (Reaktion von Adrenalin und Noradrenalin) ist bei den nur mit Reserpin behandelten Ratten (Gruppen II, V, VII) deutlich abgeschwächt. Sehr oft sind nur noch ganz vereinzelte Nebennierenmarkzellen schwach gelb gefärbt (Abb. 1). Die histochemische Noradrenalin-Reaktion mit Kaliumjodat ist praktisch nega-

tiv. Bei den mit Iproniazid vorbehandelten Ratten (Gruppen I, III, VI) dagegen sind die histochemischen Katecholamin-Reaktionen entweder ebenso stark positiv wie bei den Kontrollen oder, in einzelnen Fällen, nur in geringem Grade abgeschwächt (Abb. 2). Die Vorbehandlung mit äquimolaren Isoniaziddosen (Gruppe IV) hat im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen (Gruppe V) ebenfalls eine gewisse Abschwächung der Reserpinwirkung auf das Nebennierenmark zur Folge. Der Effekt ist jedoch viel weniger deutlich als mit Iproniazid. – Die Tiere der Gruppe VIII wurden nur mit Iproniazid behandelt. Eine Veränderung der Chromaffinität und der Kaliumjodat-Reaktion des Nebennierenmarkes lässt sich bei ihnen erwartungsgemäss nicht feststellen. Degenerative Veränderungen des Nebennierenmarkes sind bei keinem Tier nachweisbar. Die durch Reserpin erzeugte Ausschüttung der Katecholamine erfolgt somit ohne histologisch erkennbare Schädigung der Zellen.

Diskussion. Obwohl Adrenalin und Noradrenalin wahrscheinlich nicht nur durch die MO abgebaut werden⁷, bewirkt die Hemmung dieses Fermentes deutliche Veränderungen im Stoffwechsel der Katecholamine, so namentlich eine Zunahme des Adrenalin- und Noradrenalinehaltes verschiedener Organe⁸. Histochemisch lassen sich die Katecholamine im Nebennierenmark durch die chromaffine Reaktion und die Oxydation mit Kaliumjodat

⁷ E. A. ZELLER, J. BARSKY und E. R. BERMAN, J. biol. Chem. 214, 267 (1955). – E. C. GRIESEMER, J. BARSKY, C. A. DRAGSTEDT, J. A. WELLS und E. A. ZELLER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 84, 699 (1953). – E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN und J. R. FOUTS, J. Allergy 25, 69 (1954). – S. J. CORNE und J. D. P. GRAHAM, J. Physiol. 135, 339 (1957).

⁸ A. PLETSCHER, Schweiz. med. Wschr. 87, 1532 (1957); Exper. 14, 73 (1958).

Tabelle II

| Guppe | Tierzahl (Ratten) | Vorbehandlung | | Reserpin 10 mg/kg intraperitoneal | Spontan gestorben | Intensität der chromaffinen Reaktion (Anzahl Ratten) +++ ++ + (+) 0 | Intensität der Kaliumjodat- Reaktion (Anzahl Ratten) ++ + (+) 0 |
|-------|----------------------|--|--|---|----------------------|---|---|
| | | Iproniazid 100 mg/kg intraperitoneal | Isoniazid 50 mg/kg intraperitoneal | | | | |
| I | 8 | + | — | + | 0 | 2 5 1 0 0 | — — — — |
| II | 8 | — | — | + | 0 | 0 1 3 3 1 | — — — — |
| III | 10 | + | — | + | 1 | 7 2 0 0 0 | — — — — |
| IV | 10 | — | + | + | 0 | 1 3 1 5 0 | — — — — |
| V | 10 | — | — | + | 0 | 0 1 3 3 3 | — — — — |
| VI | 12 | + | — | + | 6 | 3 3 0 0 0 | 1 2 3 0 |
| VII | 12 | — | — | + | 0 | 0 4 3 4 1 | 0 0 3 9 |
| VIII | 12 | + | — | — | 0 | 12 0 0 0 0 | 10 2 0 0 |
| IX | 6 | — | — | — | 0 | 6 0 0 0 0 | 4 1 1 0 |

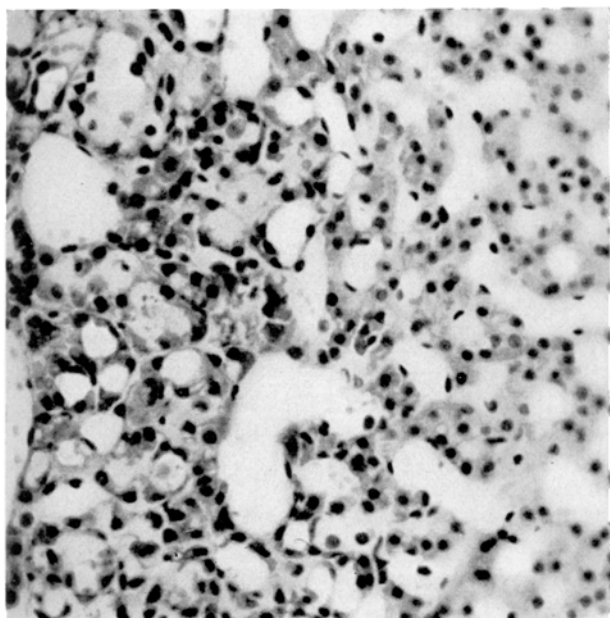


Abb. 1. Nebenniere (Rinde-Mark-Grenze), Ratte. Fixation. K.bichromat-Formol. Gegenfärbung mit Haemalaun; Vergr. 340mal. Status 24 h nach 10 mg/kg Reserpin intraperitoneal. Weitgehender Schwund der Chromaffinität in Nebennierenmark (links im Bild).

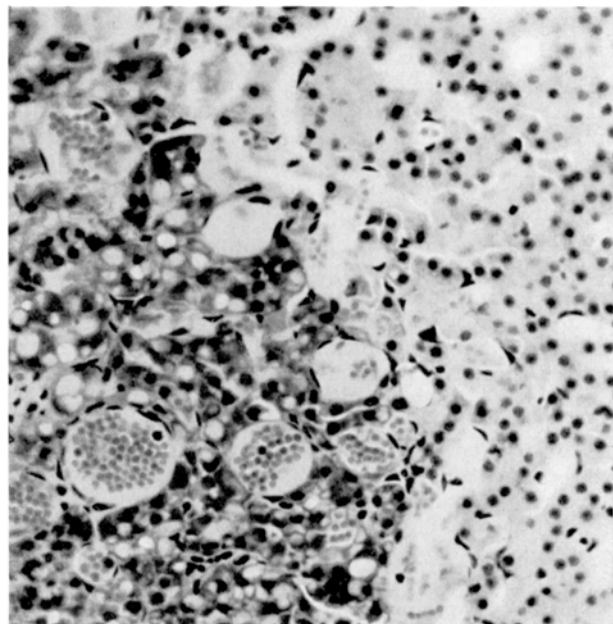


Abb. 2. Nebenniere (Rinde-Mark-Grenze), Ratte. Fixation K.bichromat-Formol. Gegenfärbung mit Haemalaun; Vergr. 340mal. Behandlung mit 100 mg/kg Iproniazid intraperitoneal. 21 h später mit 10 mg/kg Reserpin intraperitoneal. Status 24 h nach Reserpininjektion. Chromaffinität des Nebennierenmarks erhalten (links im Bild).

leicht darstellen⁹. Damit wird es auch möglich, den bei Belastung mit grossen Reserpindosen auftretenden Schwund der Katecholamine sichtbar zu machen. Bei Hemmung der MO durch Iproniazid wird die Wirkung des Reserpins auf den Adrenalin- und Noradrenalinstoffwechsel deutlich vermindert: Der Gehalt dieser beiden Stoffe sinkt im Gehirn weniger stark ab⁵, und beide histochemischen Katecholamin-Reaktionen des Nebennierenmarkes sind nicht oder nur wenig abgeschwächt. Aus diesen Befunden darf geschlossen werden, dass die MO bei der Freisetzung der Katecholamine aus den Speicherzellen eine gewisse Rolle spielt. Für diese Annahme spricht auch die Beobachtung, dass nach Vorbehandlung mit Isoniazid, welches die MO in viel geringerem Masse hemmt¹⁰, die Reserpin-bedingte Ausschüttung der Katecholamine aus dem Nebennierenmark fast ebenso ausgeprägt ist wie bei nicht vorbehandelten Ratten. Die Verhältnisse sind somit sehr ähnlich wie beim 5HT: Auch dieses Monoamin wird, wie chemische Bestimmungen¹¹ und histochemische Untersuchungen der enterochromaffinen Zellen¹² ergaben, durch Reserpin freigesetzt und beim Iproniazid-vorbehandelten Tier trotz Injektion subletaler Reserpindosen teilweise in den Speicherzellen festgehalten¹³.

Kürzlich wurde festgestellt, dass Iproniazid in vielen Fällen von Angina pectoris eine günstige therapeutische

Wirkung ausübt¹⁴. Es wurde angenommen, dass diese Wirksamkeit mit den Veränderungen des Katecholamin-Stoffwechsels in Zusammenhang steht¹⁵. Adrenalin und Noradrenalin sollen jedoch ungünstig auf den Stoffwechsel des Herzmuskels wirken¹⁶, so dass die Vermehrung dieser zwei Stoffe im Myocard die therapeutische Wirksamkeit des Iproniazid bei Coronarinsuffizienz nicht erklärt. Die vorliegenden Ergebnisse könnten nun, wie dies von PLETSCHER¹⁵ vermutet wurde, dahin interpretiert werden, dass die Hemmung der MO durch Iproniazid zwar eine Ansammlung der Katecholamine in den Organen bewirkt, jedoch die Freisetzung dieser für den Myocardstoffwechsel ungünstig wirkenden Stoffe hemmt und die Bindung an strukturelle Elemente in den Zellen verstärkt.

G. ZBINDEN und A. STUDER

Abteilung für experimentelle Medizin der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel, 12. März 1958.

Summary

A single injection of 10 mg/kg reserpine causes marked decrease of catecholamine in the medulla of the adrenal gland of rats. Histochemically, this can be shown by the disappearance of chromaffinity and of the potassium iodate reaction. After pretreatment with 100 mg/kg of iproniazid, reserpine injection induces little or no decrease in the histochemical reactions of adrenalin and noradrenalin. In animals pretreated with equimolar doses of isoniazid, however, histochemical catecholamine reactions are well preserved in all cells of the adrenal medulla. These results suggest that monoamine oxidase plays a part in the reserpine-induced release of catecholamine.

¹⁴ T. CESARMAN, Arch. Inst. Cardiol. Méc. 27, 563 (1957); Circulation, im Druck. – P. COSSIO, Pren. méd. Argent. 44, 2679 (1957). – W. SCHWEIZER, Vortrag Schweiz. Cardiologische Gesellschaft, 17. November 1957, Genf; Cardiologia 33, Nr. 1 (1958).

¹⁵ A. PLETSCHER, Exper. 14, 73 (1958).

¹⁶ W. RAAB, Adv. Cardiol. vol. 1 (S. Karger, Basel/New York 1956), p. 65.

⁹ N. A. HILLARP und B. HÖKFELT, Acta physiol. scand. 30, 55 (1954); J. Histochem. Cytochem. 3, 1 (1955). – O. ERÄNKÖ, J. Histochem. Cytochem. 4, 11 (1956); Nature 168, 250 (1951); 175, 88 (1955).

¹⁰ E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER und L. S. VAN ORDEN, Exper. 8, 349 (1952). – E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN, und J. R. FOUTS, J. Pharm. exp. Ther. 106, 427 (1952). – E. A. Zeller und J. BARSKY, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 81, 459 (1952).

¹¹ A. PLETSCHER, P. A. SHORE und B. B. BRODIE, Science 122, 374 (1955); J. Pharm. exp. Ther. 116, 84 (1955).

¹² E. P. BENDITT und R. L. WONG, Amer. J. Path. 32, 638 (1956). – G. ZBINDEN, A. PLETSCHER und A. STUDER, Schweiz. med. Wschr. 87, 629 (1957).

¹³ A. PLETSCHER, Helv. physiol. Acta 14, C 76 (1956); Exper. 12, 479 (1956). – G. ZBINDEN, A. PLETSCHER und A. STUDER, Klin. Wschr. 35, 565 (1957).