

Effect of Cocaine and Tyramine on Noradrenaline Release and Uptake in Isolated Nerve Vesicles

Isolated noradrenaline (NA) vesicles from sympathetic neurons and their endings¹ release NA at a rapid rate on incubation in phosphate buffer at 20–37°C. Previously depleted vesicles take up NA and various related amines. These basic properties of the vesicles² explain the rapid amine exchange which occurs when the amine pattern is altered in the medium. This is readily demonstrated with the aid of labelled amines³.

The release and uptake is influenced by a variety of drugs, some of which have challenged pharmacologists for long as to the mechanism of their action, such as cocaine and tyramine. Since both of these have intimate relationships with the sympathetic system, it appeared of interest to study their action on the release and uptake of catecholamines in isolated NA vesicles.

Cocaine inhibits the uptake and/or retention of NA in organs *in vivo* and *in vitro*^{4,5}. SAMORAJSKI, MARKS, and WEBSTER⁶ found a delayed uptake of labelled NA in adrenergic neurons of mice at the 2 min interval but normal storage 2 h after cocaine.

Some experiments are reported here on the action of cocaine and tyramine on the release and uptake of NA in bovine nerve vesicles prepared according to EULER and LISHAJKO². The nerve vesicles were incubated in 0.13 M K-phosphate at pH 6.7 at 20°.

The effect of cocaine, tetracaine, procaine and lidocaine on the release rate of NA from isolated splenic nerve vesicles is shown in Figure 1. The release rate is calculated as the reciprocal value of the half-time.

From Figure 1 it is seen that cocaine and its three congeners all inhibited the NA release from isolated transmitter vesicles but only in relatively high concentrations. In order to lower the release rate to one half of that of the control, a cocaine concentration of $3 \cdot 10^{-3} M$ was required. These results make it doubtful whether the cocaine effect observed has any greater physiological significance. Xylocaine was similar in action to cocaine, while procaine and particularly tetracaine were active in lower concentrations.

Incubation of nerve vesicles with ATP in the presence of NA in concentrations of $10^{-5} M$ or higher prevents or retards the net loss of NA which otherwise occurs, presumably by enhancing a simultaneous uptake. This process is only slightly inhibited by cocaine $10^{-3} M$ (Figure 2). The 'protective' effect of NA $10 \mu g/ml$ on the vesicles is influenced in a similar way. Moreover, the uptake of NA

in partially depleted vesicles, with or without added ATP, is only slightly inhibited by cocaine $10^{-3} M$.

We have also tested whether the pharmacodynamic antagonism between cocaine and tyramine is reflected at the transmitter vesicle level. As shown in Figure 3 the enhancing action of tyramine on the NA release from nerve vesicles can be completely suppressed by cocaine and its congeners. The cocaine concentration required is higher than $10^{-4} M$, however. Even if this effect cannot explain the cocaine-tyramine antagonism, it suggests that an action of this kind could occur under certain conditions. In the experiments of LINDMAR and MUSCHOLL⁷, on the other hand, the NA-releasing effect of tyramine on the isolated perfused rabbit's heart was inhibited by cocaine in concentrations less than $10^{-4} M$.

From our results it is seen that cocaine in a concentration of $10^{-4} M$ has only a negligible effect on the spontaneous release and uptake of NA in isolated nerve

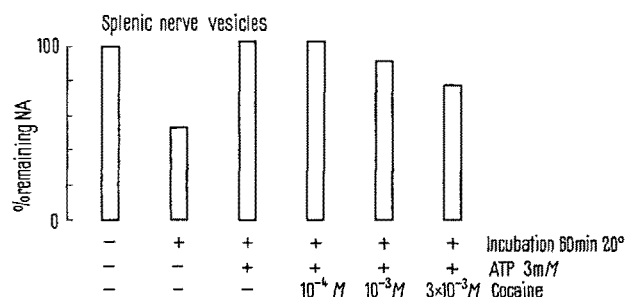


Fig. 2. Effect of cocaine on the NA content in isolated bovine nerve vesicles before and after incubation for 60 min at 20° in phosphate buffer pH 7.0 and in the presence of ATP (3 mM) and NA (6 μM).

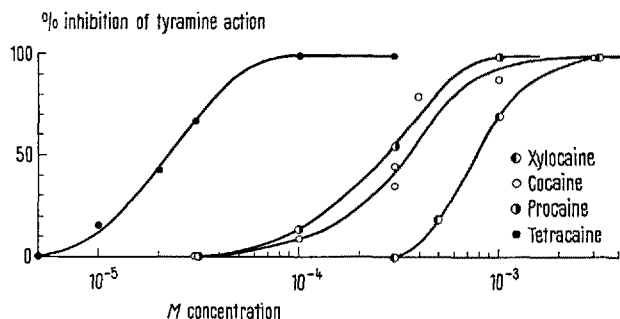


Fig. 3. Inhibitory effect of cocaine, tetracaine, xylocaine and procaine on the NA-release from isolated bovine nerve vesicles, incubated for 60 min at 20° in phosphate buffer pH 6.7 with tyramine $10 \mu g/ml$.

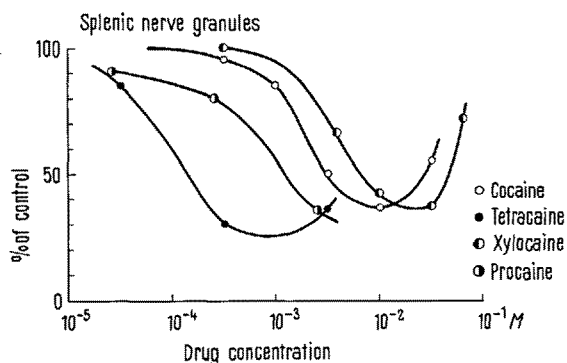


Fig. 1. Effect of cocaine, tetracaine, xylocaine and procaine on NA content in isolated bovine nerve vesicles after incubation for 60 min at 20° in phosphate buffer pH 6.7.

1. U. S. v. EULER and N.-Å. HILLARP, *Nature, Lond.* 177, 44 (1956).
2. U. S. v. EULER and F. LISHAJKO, *Acta physiol. scand.* 57, 468 (1963).
3. U. S. v. EULER, L. STJÄRNE, and F. LISHAJKO, *Life Sci.* 2, 878 (1963).
4. G. HERTTING, J. AXELROD, and L. G. WHITBY, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 134, 146 (1961).
5. R. LINDMAR and E. MUSCHOLL, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 247, 469 (1964).
6. T. SAMORAJSKI, B. H. MARKS, and E. J. WEBSTER, *J. Pharmacol. exp. Therap.* 143, 82 (1964).
7. R. LINDMAR and E. MUSCHOLL, *Arch. exp. Path. Pharmacol.* 242, 214 (1961).

vesicles. Only when the cocaine concentration is increased to $10^{-3}M$, is the uptake (and exchange) slightly or moderately inhibited. It is hard to conceive that an effect requiring a concentration of that order should be of pharmacological significance in vivo, considering the doses which elicit characteristic effects. The weak effect of cocaine on the release and uptake mechanisms in storage vesicles is in keeping with the observations of BLAKELEY, BROWN, and FERRY⁸ that cocaine did not alter the NA outflow from the cat spleen on repeated stimulation of its nerves. The inhibition of NA uptake observed in vivo and in vitro by many authors is therefore probably due to cocaine actions at other than the specific storage sites. Since cocaine is a membrane stabilizer it appears likely that its action is on axon membranes, thereby reducing the passage of NA into the specific axon stores⁹.

Zusammenfassung. Die Ergebnisse sprechen nicht dafür, dass die durch Cocain bedingte Hemmung der Nor-adrenalin-aufnahme an die Granula gebunden ist. Es ist anzunehmen, dass diese vielmehr an die Axonmembrane verlegt ist.

U. S. VON EULER and F. LISHAJKO

Department of Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), January 25, 1965.

⁸ A. G. H. BLAKELEY, G. L. BROWN, and C. B. FERRY, *J. Physiol.*, Lond. 167, 505 (1963).

⁹ This work has been supported by grant NA 04432-02 from the United States Public Health Service and by the Swedish Medical Research Council; Project No. 14X-97-01.

Modifications de la glycémie et des groupements -SH du sang des Lapins durant le reflexe de l'orientation

On sait que l'organisme animal répond aux actions des facteurs environnants, non seulement par des réactions spécifiques, mais aussi par des réactions générales. Ces dernières sont de nature métabolique et sont provoquées par le système nerveux végétatif^{1,2}. Elles assurent la base trophique de ces réactions et peuvent être englobées dans la notion classique du syndrome adaptatif de SELYE³, qui peut être considéré comme l'expression du reflexe d'orientation, largement étudié par les neurologistes.

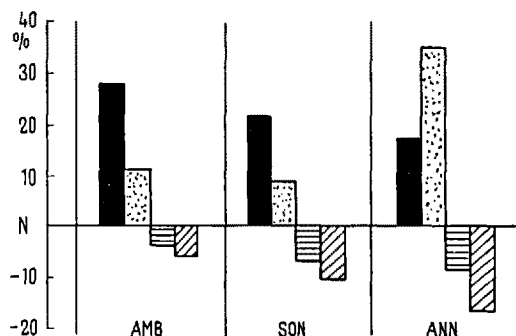
SOUTHWICK⁴, GOLLENDER, LAW et JAKSON⁵ constatent qu'un simple changement du milieu ambiant provoque une baisse évidente des éosinophiles sanguines. IVES et DACK⁶ montrent une leuco- et une lymphocytose et USIEVITCH⁷ une hyperglycémie du sang des chiens simplement introduits dans la chambre d'expériences. WELTMANN⁸, TAPP et MARKOWITZ⁹ signalent, après des manipulations répétées des rats durant trois mois, une augmentation du poids du corps, du cerveau, des surrénales et de la rate, ainsi qu'une baisse de l'activité cholinestérasique. BLOCK¹⁰ montre des modifications essentielles dans la composition cathionique du plasma, après l'immobilisation des chèvres. KRAMOVA et VOROBIOVA¹¹, à la suite des reflexes conditionnés démontrent une hyperexcitabilité corticale envers des doses minimales de certaines substances.

Nous avons déterminées la glycémie et les groupements -SH du sang, chez des lapins pendant l'installation et pendant la disparition du reflexe d'orientation à une nouvelle ambiance et au son. La nouvelle ambiance était la cage de l'actographe située dans le laboratoire, auquel nous avions déjà accoutumé l'animal. Le son était provoqué par une simple sonnerie électrique. Au préalable nous avons fait des analyses du sang par des prises effectuées à des intervalles de 45 min et seulement quand les résultats étaient constants, nous avons passé à la production du reflexe d'orientation proprement dite en introduisant l'animal dans la cage. Nous avons fait 58 expériences et les résultats ont été statistiquement calculés. La Figure représente la moyenne de ces résultats.

L'introduction de l'animal dans sa nouvelle ambiance détermine une augmentation significative de la glycémie

(+ 27%) et des groupements -SH non-protéiques (+ 10,4%), mais une baisse des groupements -SH totaux et protéiques du sang (- 4 à - 6,5%).

L'excitant sonore provoque des modifications semblables de la glycémie et des groupements -SH non-protéiques mais de moindre amplitude, tandis que la baisse des groupements -SH totaux et protéiques est plus grande.



Les variations en % de la glycémie (en noir), des groupements -SH non-protéiques (pointillés), -SH total (hachures horizontales) et -SH protéiques (entrecroisés) dans le sang des lapins pendant l'installation du reflexe d'orientation provoqué par une nouvelle ambiance (AMB), ou par une sonnerie (SON) et après l'accoutumance de l'animal (ACC).

¹ A. E. PORA et M. POP, *Studia Univ. Babes-Bolyai, ser. biol.* fasc. 2, 139 (1963).

² V. V. SUCICOV, *Fiziol. Journ. SSSR* 47, 196 (1961).

³ H. SELYE, *Practitioner* 172, 1027 (1954).

⁴ C. H. SOUTHWICK, *Ecology USA* 40, 156 (1959).

⁵ M. GOLLENDER, O. T. LAW et R. L. JAKSON, *J. comp. Physiol. Psychol.* 53, 520 (1960).

⁶ M. IVES et G. M. DACK, *Lab. clin. Med.* 47, 723 (1956).

⁷ M. A. USIEVITCH, *Jurn. Viskh. Nervn. Delat. SSSR* 7, 177 (1957).

⁸ A. S. WELTMANN et al., *J. appl. Physiol.* 16, 587 (1961).

⁹ J. T. TAPP et H. MARKOWITZ, *Science* 1963, 468.

¹⁰ J. D. BLOCK, *Science* 1958, 1056.

¹¹ A. A. KRAMOVA et A. A. VOROBIOVA, *Fiziol. Journ. SSSR* 46, 11 (1960).