

PRO EXPERIMENTIS

Cytochemical and Chromatographic Demonstration of Platelet Histamine Release by Antigen-Antibody Reaction in vitro

Recently, procedures have been developed in our laboratory for staining histamine in cells and for isolating and identifying trace amounts of histamine by means of thin gel electrophoresis. The present report describes our employment of these techniques in the detection of immediate hypersensitivity in rabbits. The results are compared with those obtained using the direct basophil test.

15 young New Zealand albino rabbits were sensitized to albumin by means of 3 intramuscular injections of 2 ml of 0.5% crystalline egg albumin in the complete Freund's adjuvant. Rabbits, number 5-15, received a fourth injection 2 months later. 10 rabbits of equal weight and sex distribution served as controls. The following 3 in vitro tests for sensitization were done.

(a) *Direct basophil test*¹. Heparinized (1/50,000) arterial blood from the ear was incubated with varying concentrations of crystalline egg albumin for 15 min at room temperature (26°C). Saline controls were performed simultaneously. The basophils were stained, enumerated and morphologically typed into 3 classes: normal, degranulating and 'fired'. A significant drop in the absolute number of basophils (over 50%) and/or a striking increase in the percentage of degranulated basophils (100%) as compared with the saline control was interpreted as a positive test.

(b) *Platelet histamine stain*. Heparinized arterial blood was incubated for 5 min at 37°C with and without varying dilutions of crystalline egg albumin (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Platelet rich plasma was then separated by a $2\frac{1}{2}$ min spin at 2500 rpm, using a microcentrifuge. A smear was made and 2 drops of 0.2% o-phthalaldehyde (OPT) in para-xylene applied for 3 min². Slides were viewed in UV-light (3650 Å) within 5 min, using a Leitz fluorescent

microscope (Labolux Leitz, mercury lamp, HBO 200 W, UG 1 filter).

In the normal non-sensitized rabbit, the platelets fluoresce yellow in both the antigen and saline incubation mixtures. In the sensitized state incubation with the antigen leads specifically to a reduction in the number of platelets and to an absence or reduction in fluorescent

Representative data from direct basophil tests in vitro; rabbits tested 1 month after sensitization

Sensitized rabbits	Absolute basophil count ^b			% cells showing degranulation		
	Saline control	Albumin 10^{-3} 15-26°C	Interpretation	Saline control	Albumin 10^{-3}	Interpretation
1	243	28	+	36	0	-
2	140	14	+	40	54	-
3	309	260	-	30	66	+
4	360	228	-	80	82	a
5	221	153	-	27	72	+
6	140	81	-	37	85	+
7	108	5	+	98	100	a
8	165	78	+	69	77	a
9	200	50	+	78	55	a
10	115	125	-	27	74	+
11	78	17	+	80	57	a
12	153	90	-	70	91	a
13	200	90	+	51	80	a
14	65	40	-	80	94	a
15	118	43	+	60	82	a

Cumulative 8 positives

4 positives

Total 12 of 15 rabbits showing positive basophil test, i.e. the count dropped 50% or the number of cells showing degranulation increased by 100%.

o-Phthalaldehyde-histamine thin gel electrophoretic fluorograms of rabbit platelet incubation studies

Ex-ample	Antigen	Fluorogram	Interpretation
1	Egg albumin		No histamine in platelets. Rabbit undergoing reaction. Unreadable test.
	Saline control		
2	Egg albumin		No histamine in platelets exposed to albumin. Rabbit sensitized to albumin. Positive test.
	Saline control		
3	Egg albumin		Histamine present in platelets exposed to albumin. Rabbit not sensitized to albumin. Negative test.
	Saline control		

Histidine Histamine
Application point → Cathode

Control rabbits	Absolute basophil count ^b			% cells showing degranulation		
	Saline control	Albumin 10^{-3} 15-26°C	Interpretation	Saline control	Albumin 10^{-3}	Interpretation
C1	408	410	-	33	33	-
C2	143	120	-	21	37	-
C3	290	245	-	30	35	-
C4	273	250	-	24	24	-
C5	400	312	-	22	17	-
C6	115	125	-	77	70	a
C7	80	86	-	11	14	-
C8	183	115	-	23	13	-
C9	201	190	-	43	43	-
C10	209	226	-	20	24	-

Cumulative - none positive.

^a Unreadable due to marked degranulation in control tubes.

^b Basophil count is number per mm³.

¹ W. B. SHELLEY and W. A. CARO, J. Am. med. Ass. 182, 172 (1962).

² L. JUHLIN and W. B. SHELLEY, J. Histochem. Cytochem., in press (1966).

staining. This specific reduction or disappearance of the yellow fluorescence of the platelets in the presence of the antigen constitutes a positive test.

(c) *Thin gel electrophoresis histamine assay.* Platelet-rich plasma was obtained by spinning heparinized blood for 10 min at 2500 rpm. Aliquots (0.5 ml) were incubated for 30 min at 37 °C with and without egg albumin in varying concentrations. Following this a 2 min high-speed spin at 8000 rpm permitted removal and discarding of supernate. Addition of 0.03 ml of distilled water released the histamine from residual platelet plug. After a second high-speed spin, the distilled water supernate was placed in a 1 mm micro-well in a thin agar gel. 10 min of electrophoresis (Turner Model 310, 200 V, 30 mA) was followed by spraying, first with 0.2N NaOH and then with 1% o-phthalaldehyde in xylene³. By reading with transmitted UV-light (3650 Å) it was possible to see histamine as a distinct separate blue fluorescent spot (Figure).

Results. Direct basophil degranulation tests were done on the 15 sensitized rabbits at 1 (Table), 2, and 3 months. At 2 months, 12 of the rabbits still had a positive basophil test but only 6 exhibited a drop in number of over 50%. By 3 months, 11 of the 15 rabbits still had a positive basophil test, but only 4 showed the diagnostic basophil drop.

At 2 and again at 3 months, all 15 of the sensitized rabbits showed a positive platelet histamine stain test. By contrast, all of the control rabbits showed normal

histamine staining of the platelets exposed to the egg albumin. Finally, it was possible in 13 of these 15 rabbits to show on thin gel electrophoresis that platelets from the sensitized rabbits released their histamine upon exposure to the albumin. In the other 2, histamine was not detectable in the platelets using the regular quantities of blood employed by us. None of the 10 control rabbits showed loss of platelet histamine when incubated with the antigen⁴.

Zusammenfassung. Einfache Färbemethode und Elektrophoresetechnik zum Nachweis von Thrombocyten-Histamin zur Aufdeckung einer allergischen Überempfindlichkeit vom Sofort-Typ: zum Versuch dienten gegenüber Ei-Albumin überempfindliche Kaninchen, zum Vergleich der Basophildegranulationstest.

W. B. SHELLEY and L. JUHLIN

University of Pennsylvania School of Medicine, Department of Dermatology, Philadelphia 19104 (Pennsylvania, USA), January 17, 1966.

³ W. B. SHELLEY and L. JUHLIN, J. Chromat., in press (1966).

⁴ These studies were supported by a grant from the JOHN A. HARTFORD Foundation, Inc.

Elektrischer Widerstand, Aussendurchmesser der Spitze und Wandstärke von Glas-Mikroelektroden¹

Für die intrazelluläre Registrierung der elektrischen Aktivität von Einzelneuronen werden Glas-Mikroelektroden (GME) verwendet, deren Aussendurchmesser (AD) an der Spitze im Bereich von 0,5 µ liegt. Zuverlässige Messungen der GME-Spitze sind damit nur elektronenoptisch möglich. Üblicherweise wird der elektrische Widerstand (EW) als Mass der Spitzenöffnung der GME und indirekt auch des AD der Spitze verwendet. Wir hatten uns zum Ziel gesetzt, die Beziehung zwischen EW und elektronenoptisch gemessenem AD zu bestimmen und mit den theoretisch errechneten Werten zu vergleichen. Dabei zeigt sich, dass theoretische und gemessene Werte nur innerhalb eines beschränkten Bereichs übereinstimmen. Von besonderem Interesse war der Nachweis eines konstanten Verhältnisses zwischen Wandstärke (WS) und AD im Bereich der ausgezogenen GME-Spitze.

Material und Methoden. Als Ausgangsmaterial wurden Glasröhrchen aus Pyrex 7740 (Corning 9530) mit einem AD von 1,5 mm und einem mittleren Verhältnis WS zu AD von 1:6,35 verwendet. Die GME wurden auf einem Puller der Firma Industrial Science Associates, Ridgewood, N.Y., hergestellt; dabei resultierten ausgezogene Spitzen von bis zu 0,2 µ AD. Die GME wurden nach TASAKI et al.² mit 3 m KCl-Lösung gefüllt. Der elektrische Widerstand wurde mit der in einem Negative Capacitance Electrometer (Bak Unity Gain Amplifier³) eingebauten «Voltage Ramp»⁴ gegen physiologische Kochsalzlösung gemessen. Die verwendeten Rechteckimpulse von 1 kHz entsprechen in bezug auf die Anstiegszeit einer 50 kHz

Sinusspannung. Diese Methode wurde gewählt, weil sie auch im Tierversuch angewendet wird. Wenn zur Eichung der Apparatur ein bekannter Widerstand mit 5% Toleranz verwendet wird und die Ablesegenauigkeit am Oszilloskop 2 mV ist, beträgt die Genauigkeit der Methode ungefähr 13,5%. Aus einer Serie von 100 GME war es uns möglich, an 22 sowohl EW als auch AD zu bestimmen.

Der Aussendurchmesser (AD) der Elektrodenspitze wurde im Elektronenmikroskop (Typ Elmiskop I) bei einer Strahlspannung von 80 kV mit 8000facher Vergrößerung photographiert (Figur 1A). Die Messung der Spitzen-AD wurde mit einer Messlupe direkt am Negativ ausgeführt (Platten Scientia 23D50). Bei einer Messgenauigkeit von ± 0,1 mm ist der prozentuale Fehler 2,5% im Bereich von 1 µ, 5% im Bereich von 0,5 µ und 25% im Bereich von 0,1 µ.

Die Konstanz des Verhältnisses WS zu AD wurde an sieben mit Phosphorwolframsäure (H₃P[W₃O₁₀]₄) × H₂O als elektronenmikroskopischem Kontrastmittel gefüllten GME überprüft (Figur 1B).

Resultate. (a) Die elektronenmikroskopischen Messungen der mit Kontrastmittel gefüllten GME sind in der Tabelle zusammengestellt. Für das von uns verwendete

¹ Mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds, Projekt Nr. 2903.

² I. TASAKI, E. H. POLLEY und F. ORREGO, J. Neurophysiol. 17, 454 (1954).

³ A. F. BAK, Electroenceph. clin. Neurophysiol. 10, 745 (1958).

⁴ K. FRANK und M. C. BECKER, in *Physical Techniques in Biological Research*, Vol. V, Part A (Ed., W. L. NASTUK; Academic Press, New York 1964), p. 72.