

The changes in potential observed by substituting sulfate and choline respectively for chloride and sodium indicate that both the ions permeate more freely from serosal to mucosal side than in the opposite direction.

Active transport of sodium and chloride has been demonstrated in the fish gall bladder by DIAMOND¹¹, and in the rat ileum, *in vivo*, by CURRAN and SOLOMON¹². In the present study, $10^{-4} M$ ouabain and 2,4-dinitrophenol had no noticeable effect on the potential differences generated, leading to the conclusion that active transport was not involved in our observations. The sources of sodium and chloride in freshwater fish are food and water. They can actively absorb sodium and chloride against a high concentration gradient¹³. Rapid diffusion of sodium from the serosal side definitely suggests that absorption of the ion is not accomplished through the midgut¹⁴.

Zusammenfassung. Durch Veränderung des innern oder äußeren Milieus beim isolierten Mitteldarm eines Teleostiers wird das Potential quer zur Wand verändert. Dies

ermöglicht Schlüsse auf die Ionenwanderung und damit Ionenregulation dieses Süßwasserfisches.

S. DATTA¹⁵ and N. B. SAVAGE

Department of Zoology, University of Massachusetts, Amherst (Massachusetts, USA), 16 November 1967.

¹¹ J. M. DIAMOND, J. Physiol. 161, 474 (1962).

¹² P. F. CURRAN and A. K. SOLOMON, J. gen. Physiol. 41, 143 (1957).

¹³ C. L. PROSSER and F. A. BROWN, *Comparative Animal Physiology*, 2nd edn. (W. B. Saunders Co., Philadelphia 1962).

¹⁴ Acknowledgment: This work was carried out at the University of Massachusetts during the tenure of the authors as graduate students. The authors wish to thank Dr. W. R. HARVEY and J. L. ROBERTS for encouragement and facilities.

¹⁵ Present address: Department of Zoology and Entomology, University of Kalyani, Nadia, West Bengal, India.

Noradrenalin-Freisetzung aus isolierten Hypothalamus-Vesikeln

Versuche mit isolierten Hypothalamus-Vesikeln haben ergeben, dass bei der Inkubation bei 37°C Noradrenalin spontan freigesetzt wird und ferner, dass die spontane Aminabgabe durch Kalzium und Acetylcholin gesteigert wird¹. Beide Substanzen sind in der Lage, auch die spontane Noradrenalin-Freisetzung aus den aminspeichernden Partikeln der sympathischen Ganglien und Nerven zu erhöhen², während aus den chromaffinen Granula des Nebennierenmarks die Hormonabgabe durch Kalzium jedoch nicht durch Acetylcholin²⁻⁴ gesteigert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der monovalenten Ionen Natrium und Kalium sowie von Nikotin auf die Amin-Freisetzung untersucht.

Methoden. Noradrenalin-speichernde Vesikel vom Schweine-Hypothalamus wurden, wie früher beschrieben, durch Differentialzentrifugieren isoliert, in $0,3 M$ Saccharose-Lösung pH 6,8 suspendiert und 60 min lang bei 37°C inkubiert¹. Die Inkubate und die nicht inkubierten Kontrollen wurden mit $0,4 N$ HClO_4 extrahiert¹ und im Überstand die Amine nach der Methode von PALMER⁵, im Rückstand das Eiweiß nach der Methode von LOWRY et al.⁶ bestimmt. Der Noradrenalin-Gehalt der Ansätze wurde pro mg Eiweiß berechnet. Als Ausgangswert für die Berechnung der prozentualen Noradrenalin-Freisetzung diente der Noradrenalin-Gehalt/mg Eiweiß der nicht inkubierten Kontrollen. Kalzium, Natrium, Kalium, Acetylcholin und Tetracain wurden als Chloride, Nikotin als Base verwendet.

Versuche. Bei der Inkubation isolierter Hypothalamus-Vesikel bei 37°C werden spontan 24% des vesikulären Noradrenalin freigesetzt (Figur 1). Zugabe von Kaliumchlorid in ansteigenden Konzentrationen führt zu einer dosisabhängigen Steigerung der Aminabgabe, wobei die maximale Noradrenalin-Freisetzung mit $20 \times 10^{-3} M$ Kaliumchlorid erreicht wird. Auch durch Natrium-Ionen wird die spontane Aminabgabe stark erhöht; durch $20 \times 10^{-3} M$ Natriumchlorid werden 57% des Noradrenalin freigesetzt (Figur 1). Höhere Konzentrationen (bis $150 \times 10^{-3} M$ NaCl) sind nicht in der Lage, die Amin-Freisetzung weiter zu steigern. Somit vermögen neben Kalzium- auch Natrium- und Kalium-Ionen in Konzen-

trationen, die in der Zelle vorkommen, die Abgabe von Noradrenalin dosisabhängig zu erhöhen.

Um festzustellen, ob neben Acetylcholin auch andere depolarisierende Stoffe die Amin-Freisetzung beeinflussen können, wurden Hypothalamus-Vesikel mit Nikotin inkubiert. Als Vergleich wurden Versuche mit ansteigenden

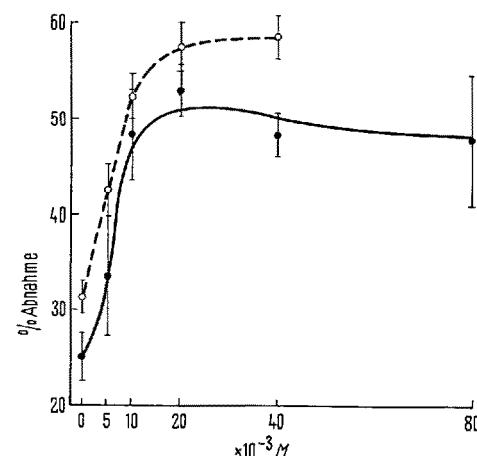


Fig. 1. Freisetzung von Noradrenalin durch Natrium (O----O; $n = 4$) und Kalium (●—●; $n = 5$). Inkubation: 60 min bei 37°C . Mittelwerte und deren mittlere Fehler.

¹ A. PHILIPPU und H. PRZUNTEK, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 258, 251 (1967).

² H. J. SCHÜMANN und A. PHILIPPU, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak., 259, 193 (1968).

³ H. BLASCHKO, P. HAGEN und A. D. WELCH, J. Physiol. 129, 27 (1955).

⁴ M. OKA, T. OHUCHI, H. YOSHIDA und R. IMAIZUMI, Life Sci. 5, 433 (1966).

⁵ J. F. PALMER, J. Pharm. Pharmac. 15, 777 (1963).

⁶ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. 163, 265 (1951).

Acetylcholin-Konzentrationen durchgeführt (Tabelle 1). Während Acetylcholin eine starke und dosisabhängige Zunahme der Amin-Freisetzung verursacht, ist die Wirkung des Nikotins auf die Abgabe von Noradrenalin schwächer. Der grösste Effekt wird mit $0,6 \times 10^{-4} M$ Nikotin erreicht; höhere Konzentrationen sind eher unwirksam, niedrigere Konzentrationen wurden nicht untersucht. Wie bei den Versuchen mit Natrium- und Kalium-Ionen, so konnten auch durch eine weitere Steigerung der Acetylcholin-Konzentration im Inkubationsmedium nicht mehr als 60% des vesikulären Noradrenals freigesetzt werden. Weder die spontane noch die durch Acetylcholin bedingte Aminabgabe liessen sich durch Prostigmin beeinflussen¹.

Bei der gleichzeitigen Inkubation mit Kalzium und Acetylcholin wurde früher keine additive Wirkung beobachtet¹. Auch die gleichzeitige Inkubation mit Kalzium und Kalium bzw. Kalzium und Nikotin (Tabelle II) führt nicht zu einer Addition der einzelnen Wirkungen; die höchste Amin-Freisetzung, die bei der Inkubation mit einzelnen Substanzen oder bei der Kombination amin-freisetzender Stoffe erzielt werden kann, beträgt also nicht mehr als 60% des Amin-Gehaltes nichtinkubierter Vesikel. Es kann deshalb angenommen werden, dass diese Stoffe auf einen labilen intravesikulären «Pool» einwirken und damit nur einen Teil des in den Vesikeln gespeicherten Noradrenals freisetzen können. Demgegenüber sind hohe Prenylamin-Konzentrationen ($1,2 \times 10^{-3} M$) in der Lage, die hypothalamischen Vesikel fast vollständig an Noradrenalin zu verarmen¹, wahrscheinlich durch zusätzliche Einwirkung auf einen anderen intravesikulären «Pool». Für die Existenz verschiedener «Pools» in den aminspeichernden Partikeln sympathischer Nerven sprechen die Befunde von STJÄRNE⁷.

Tabelle I. Freisetzung von Noradrenalin durch Acetylcholin und Nikotin

Substanz	$\times 10^{-4} M$	Noradrenalin % Abnahme
Acetylcholin	0	26,82 \pm 7,61
	0,17	33,81 \pm 8,48
	0,55	46,11 \pm 4,70
	1,65	51,44 \pm 5,47
Nikotin	0	23,40 \pm 2,76
	0,6	34,32 \pm 4,63
	2,4	29,79 \pm 1,94
	9,6	26,38 \pm 6,14

Inkubation: 60 min bei 37°C. Mittelwerte von 3 (Acetylcholin) bzw. 5 (Nikotin) Versuchen und deren mittlere Fehler.

Tabelle II. Freisetzung von Noradrenalin durch Kalzium, Kalium und Nikotin

Substanz	$\times 10^{-3} M$	Noradrenalin % Abnahme
Kalzium	1,25	25,20 \pm 2,73
Kalium	10	45,94 \pm 2,34
Kalzium +	1,25	48,37 \pm 4,66
Kalium	10	55,63 \pm 2,74
Nikotin	0,06	34,32 \pm 4,63
Kalzium +	1,25	46,92 \pm 6,56
Nikotin	0,06	

Inkubation: 60 min bei 37°C. Mittelwerte von 5 Versuchen und deren mittlere Fehler.

An isolierten chromaffinen Zellen erhöhen sowohl Acetylcholin und Nikotin als auch Kalium die Membran-Permeabilität für Kalzium- und Natrium-Ionen und führen somit zur Depolarisation^{8,9}; die einströmenden Kalzium-Ionen setzen aus den subzellulären Partikeln Amin frei¹⁰. Die Wirkung dieser Stoffe ist demnach abhängig von Kalzium. Es ist möglich, dass diese Substanzen auch die Membran-Permeabilität der Gehirnvesikel erhöhen. Für diese Annahme spricht, dass Tetracain die durch Kalium bedingte Zunahme der Brenzkatechinamin-Abgabe vollständig beseitigt (Figur 2), während durch die verwendeten Tetracain-Konzentrationen (0,25 mal $10^{-3} M$) die spontane Amin-Freisetzung nur geringfügig vermindert wird. Die Amin-Freisetzung aus den hypothalamischen Vesikeln durch Acetylcholin, Nikotin, Kalium und Natrium ist jedoch kalziumunabhängig; wahrscheinlich führen diese Substanzen durch Erhöhung der Membran-Permeabilität direkt zur Amin-Freisetzung aus dem labilen intravesikulären «Pool».

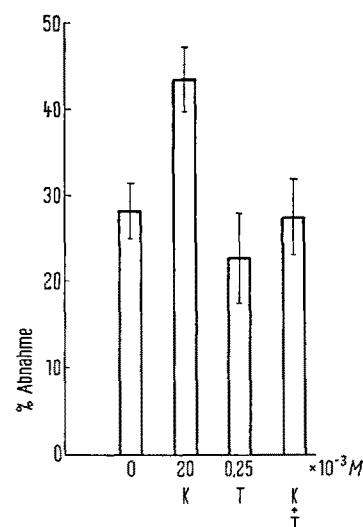


Fig. 2. Einfluss von Tetracain (T) auf die durch Kalium (K) bedingte Noradrenalin-Freisetzung. Inkubation: 60 min bei 37°C, Mittelwerte von 4 Versuchen und deren mittlere Fehler.

Summary. Potassium and sodium from isolated pig hypothalamic vesicles cause a dose dependent release of noradrenaline. The releasing effect of nicotine is less pronounced than that of acetylcholine. No addition of the effects could be observed by simultaneous incubation with calcium and potassium or calcium and nicotine. The effect of potassium is abolished by tetracain.

A. PHILIPPU¹¹ und U. BURKAT

Pharmakologisches Institut, Klinikum Essen der Ruhr-Universität Bochum, 43 Essen (Deutschland), 17. Januar 1968.

⁷ L. STJÄRNE, Acta physiol. scand. 62, Suppl. 228 (1964).

⁸ W. W. DOUGLAS, T. KANNO und S. R. SAMPSON, J. Physiol. 186, 125P (1966).

⁹ W. W. DOUGLAS, T. KANNO und S. R. SAMPSON, J. Physiol. 188, 107 (1967).

¹⁰ A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 252, 339 (1966).

¹¹ Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.