

Aus dem Pharmakologischen Laboratorium der Sandoz A. G., Basel

Über den Angriffspunkt von D-Lysergsäure-diäthylamid und 5-Hydroxytryptamin im Melanophorentest

Von

B. BERDE und A. CERLETTI

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. April 1957)

Vor einigen Jahren haben wir beobachtet, daß D-Lysergsäurediäthylamid (im folgenden als LSD bezeichnet) und 5-Hydroxytryptamin (Serotonin, Enteramin; im folgenden als 5-HT bezeichnet) beim Weibchen des Aquariumfisches *Lebistes reticulatus* („Guppy“) die Melanophoren charakteristisch und antagonistisch beeinflussen^{1,2}. Werden dem Wasser, in welchem sich die Tiere befinden, einige $\mu\text{g/ml}$ LSD zugefügt, so tritt Dunkelfärbung der in heller Umgebung sonst glasig-grauen Fische ein. Die mikroskopische Untersuchung der fixierten Rückenflossen zeigt eine dosisabhängige Auflockerung des Pigmentes: Die bei den helladaptierten Tieren als kompakte, scharf umschriebene „Scheiben“ erscheinenden Melanophoren gehen unter der Einwirkung steigender LSD-Konzentrationen in „Klumpen“- , „Stechapfel“- und „Spinnen“-Form über, wie sie am linken Rand der Abb. 2 jeweils von oben nach unten dargestellt sind. Der LSD-Effekt kann durch höhere Konzentrationen von 5-HT — ebenfalls unmittelbar in das Aquariumwasser verabreicht — verhindert werden. Dieser Befund ist beachtenswert, da LSD wohl ein spezifischer Hemmstoff von 5-HT-Wirkungen ist^{3,4}, der umgekehrte Antagonismus jedoch — nämlich die Verhütung eines LSD-Effektes durch 5-HT — nur in diesem Melanophorentest eindeutig nachgewiesen werden kann.

LSD und 5-HT wurden in den letzten Jahren besonders hinsichtlich ihrer Wirkungen auf das Zentralnervensystem untersucht. Beide Substanzen entfalten aber auch erhebliche periphere Wirkungen. Es erschien deshalb interessant zu prüfen, ob der Melanophoreneffekt von LSD und 5-HT beim *Lebistes* auf einen zentralen oder peripheren Wirkungsmechanismus zurückzuführen ist. Untersuchungen an isolierten Rückenflossen sollten abklären, ob

1. der Melanophoreneffekt von LSD in vitro reproduzierbar ist,
2. diese LSD-Wirkung durch 5-HT auch in vitro gehemmt werden kann,
3. die hierzu nötigen Konzentrationen der beiden Stoffe denjenigen entsprechen, welche die analogen Effekte beim intakten Tier in vivo herbeiführen.

Methodik

Die Versuchsanordnung ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. 25—35 mm lange Weibchen von *Lebistes reticulatus* werden mit dem Kaltblüternarkoticum M.S. 222* (1:2000 in Leitungswasser) narkotisiert. Die Rückenflosse (F) wird abgeschnitten, in die Vertiefung eines hohl geschliffenen Objektträgers (D) in ca. 0,3 (0,2—0,4) ml Leitungswasser oder Pharmakonlösung (E) verbracht und horizontal ausgebreitet. Die Flüssigkeit in der Vertiefung des Objektträgers wird während des Versuches folgenderweise dauernd erneuert: Aus einem Reservoir (A) mit 20 bis 25 cm hydrostatischem Druck fließen pro Stunde ca. 5 (4—6) ml Leitungswasser oder Pharmakonlösung durch eine Capillare (C) in die Vertiefung des Objektträgers. Bei Erreichen eines gewissen Niveaus wird der Überschuß durch eine zweite Capillare (G) mit Hilfe einer Saugflasche (H) und einer Wasserstrahlpumpe (K) jeweils abgesaugt. Auf diese Weise kann das Flüssigkeitsvolumen auf dem Objektträger zwischen den oben angegebenen Grenzen konstant gehalten werden.

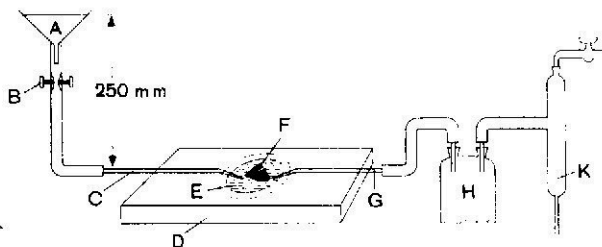


Abb. 1. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für die Untersuchungen an isolier Flossen. A: Reservoir, B: Quetschhahn, C: Zuleitung der Durchströmungsflüssigkeit, hohl geschliffener Objektträger, E: Flüssigkeit in der Vertiefung des Objektträgers, F: Flosse, G: Absaugleitung, H: Saugflasche, K: Wasserstrahlpumpe

Alle 60 Versuche wurden bei Zimmertemperatur (um 20°C) durchgeführt. Die Melanophoren wurden mikroskopisch bei 80facher Vergrößerung beobachtet und der Grad der Ausbreitung des Pigmentes in Abständen von 15 min protokolliert oder aufgezeichnet. In Abb. 2 ist der Verlauf einiger Versuche graphisch dargestellt. Hierfür wurde eine willkürliche Skala verwendet, in welcher der Kontraktionsgrad der Melanophoren folgendermaßen ausgedrückt wurde: „Spinnen“ = 0, „Stech-äpfel“ = 2, „Klumpen“ = 4, „Scheiben“ = 6. Jede Kurve entspricht dem Durchschnitt von 3 Versuchen.

Ergebnisse

a) *Leitungswasser*. Sofort nach Abschneiden der Flosse sind die Melanophoren ausgebreitet; sie zeigen das Bild von „Spinnen“, wenige eventuell das von „Stech-äpfeln“. Bald verdichtet sich aber das Pigment spontan: In ca. 30 min gehen fast alle Zellen in das Stadium „Scheibe“ oder „Klumpen“ über und bleiben ca. 2 Std (gelegentlich bis 4 Std) lang praktisch unverändert in diesem kontrahierten Zustand. Anschließend erfolgt eine langsame, 2 Std oder länger dauernde Expansion bis zum Stadium „Spinne“. Der Ablauf dieser *Spontanreaktion* ist aus Kurve I und Kurve IV in Abb. 2 ersichtlich.

b) *LSD*. Sind vom Beginn des Versuches an wirksame LSD-Mengen im Wasser enthalten, so bleiben die Melanophoren während der ganzen mehrstündigen Beobachtungsperiode expandiert: Die oben beschriebene *spontane Kontraktionsphase fällt aus* (Kurve III in Abb. 2). Es genügt schon eine Konzentration von 5 µg/ml, um diesen Effekt regelmäßig hervorzurufen.

* Das methansulfosaure Salz des Meta-amino-benzoesäure-äthyl-ester.

Werden die Flossen zuerst in Leitungswasser gehalten und wird erst dann auf eine LSD-Lösung umgeschaltet, wenn die Melanophoren bereits kontrahiert sind,

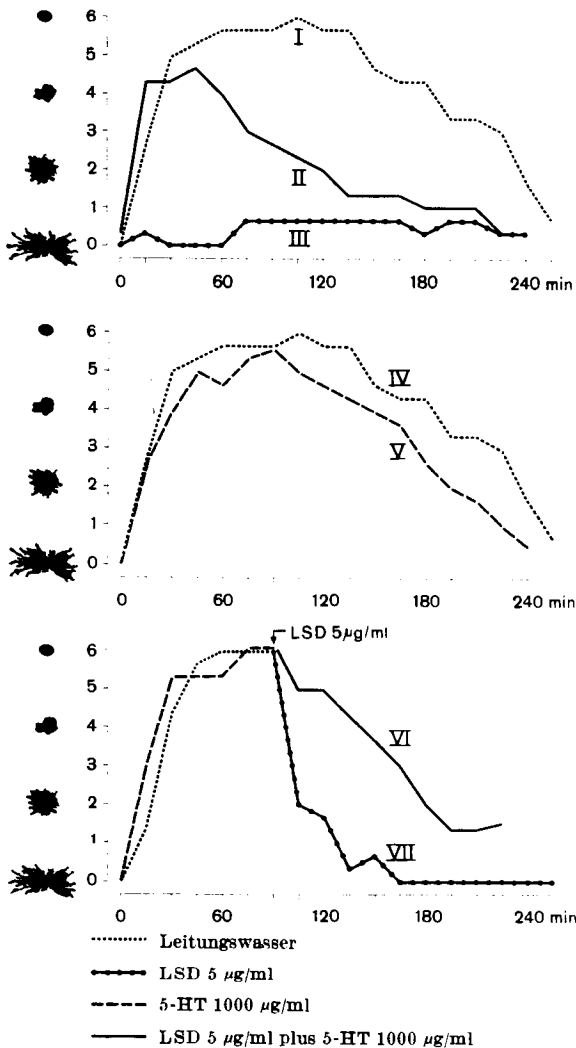


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Melanophorenreaktionen in einer willkürlichen Skala dargestellt. Der Kontraktionsgrad der Melanophoren ist wie folgt ausgedrückt: „Spinnen“ = 0, „Stechäpfel“ = 2, „Klumpen“ = 4, „Scheiben“ = 6. Jede Kurve entspricht dem Durchschnitt von 3 Versuchen. I und IV: Leitungswasser. II: LSD 5 µg/ml plus 5-HT 1000 µg/ml. III: LSD 5 µg/ml. V: 5-HT 1000 µg/ml. VI: Zuerst 5-HT 1000 µg/ml, anschließend 5-HT 1000 µg/ml plus LSD 5 µg/ml. VII: Zuerst Leitungswasser, anschließend LSD 5 µg/ml

so erfolgt eine rasche Wiederausbreitung des Pigmentes. Schon ca. 15 min nach Einwirkung von 5 µg/ml sind die Zellen wesentlich aufgelockert und nach ca. 45 min sind fast alle im Stadium „Spinne“ (Kurve VII in Abb. 2). Dieser Effekt tritt nach Umschalten auf 10 µg/ml LSD noch rascher ein.

c) *5-HT*. Die unter a) beschriebene Spontanreaktion der Melanophoren wird durch 1000 $\mu\text{g/ml}$ 5-HT praktisch *nicht beeinflusst*. Vielleicht ist die Kontraktion am Anfang etwas verlangsamt und die Wiederausbreitung des Pigmentes am Ende des Versuches etwas beschleunigt (Kurve V in Abb. 2). Diese Unterschiede sind jedoch fraglich, und der allgemeine Charakter der Kurven ist identisch.

d) *LSD und 5-HT*. Werden die Flossen vom Anfang des Versuches an in einem Milieu gehalten, welches 1000 $\mu\text{g/ml}$ 5-HT und 5 $\mu\text{g/ml}$ LSD enthält, so wird der Effekt des letzteren *partiell antagonisiert*: In der Regel kontrahieren sich die Melanophoren zuerst wie normal, d. h. wie wenn kein LSD in der Lösung enthalten wäre. Anschließend breitet sich aber das Pigment früher wieder aus als es in Leitungswasser oder in einer 5-HT-Lösung der Fall wäre (Kurve II in Abb. 2). Die Wirkung von 10 $\mu\text{g/ml}$ LSD wird durch 1000 $\mu\text{g/ml}$ 5-HT im Prinzip ähnlich beeinflusst. Der partielle Hemmeffekt ist zwar etwas weniger stark als gegenüber 5 $\mu\text{g/ml}$ LSD, aber er ist eindeutig vorhanden.

Eine praktisch *vollständige Hemmung der LSD-Wirkung* läßt sich — zumindest in einem bestimmten Dosisbereich — durch prophylaktische Verabreichung von 5-HT erzielen: Wenn eine Flosse während des ganzen Versuches in 1000 $\mu\text{g/ml}$ 5-HT gehalten wird und 5 $\mu\text{g/ml}$ LSD zusätzlich erst dann verabreicht werden, wenn die Melanophoren bereits kontrahiert sind (z. B. 90 min nach Versuchsbeginn), so schützt 5-HT vollkommen gegen den Effekt von LSD (Kurve VI in Abb. 2). Die Wirkung höherer LSD-Dosen (z. B. 10 $\mu\text{g/ml}$) wird in dieser Versuchsanordnung ebenfalls — allerdings nur noch partiell — gehemmt.

Diskussion

Unter physiologischen Bedingungen wird der Ausbreitungsgrad des Pigmentes in den Melanophoren von Teleosteen unmittelbar durch die Einwirkung von chemischen Übermittlersubstanzen („neurohumours“) bestimmt. Diese werden z. T. durch Drüsen mit innerer Sekretion (vor allem Hypophyse), z. T. durch periphere Nervenendigungen freigesetzt. In beiden Fällen spielt das Zentralnervensystem eine wichtige Rolle, da es die aus der Retina kommenden, für den Farbenwechsel entscheidenden afferenten Impulse verarbeitet und auf die beiden oben genannten efferenten Systeme umschaltet⁶. In Anbetracht der einleitend erwähnten physiologischen bzw. pharmakologischen Eigenschaften von 5-HT und LSD hätte man deshalb vermuten können, daß diese Stoffe die Melanophoren von *Lebistes reticulatus* durch einen zentralen Angriffspunkt beeinflussen.

Die Ergebnisse der hier beschriebenen Untersuchungen sprechen jedoch dafür, daß der *Melanophoreneffekt von LSD und seine Hemmung durch 5-HT auf einem peripheren Wirkungsmechanismus beruhen*: Sowohl LSD als auch 5-HT entfalten ihren charakteristischen Einfluß auf die Pigmentverteilung auch an der isolierten Flosse *in vitro*, d. h. auch nach Ausschaltung des Zentralnervensystems. Entscheidend scheint uns besonders die Tatsache zu sein, daß die wirksamen Konzentrationen *in vitro* durchaus denjenigen entsprechen, welche die gleichen Effekte beim intakten Tier *in vivo* herbeiführen. Die LSD-Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$, welche an der isolierten Flosse regelmäßig wirksam ist, entspricht ziemlich genau

der ED₁₀₀ beim Ganztier¹; dabei wird in beiden Versuchsanordnungen das Auftreten des Stadiums „Spinne“ als Wirkungskriterium betrachtet. Auch die *in vitro* hemmend wirksame 5-HT-Konzentration (1000 µg/ml) ist mit derjenigen *in vivo* identisch¹.

Im Gegensatz zu diesem peripheren Wirkungsmechanismus bei *Lebistes reticulatus* scheinen die Melanophoreneffekte von LSD und 5-HT bei *Rana temporaria* auf einen zentralen (hypophysären?) Angriffspunkt zurückzuführen zu sein, da sie an hypophysektomierten Tieren nicht reproduziert werden können⁵. Die Befunde an *Rana temporaria* sind mit denjenigen an *Lebistes reticulatus* freilich nicht ohne weiteres vergleichbar. Wohl wurde bei beiden Tieren ein gewisser Antagonismus zwischen LSD und 5-HT beobachtet, aber es bestehen auch wesentliche Unterschiede. Diese betreffen bereits die Eigenwirkung der beiden Substanzen: Während beim Grasfrosch sowohl LSD als auch 5-HT eine Dunkelfärbung der helladaptierten Tiere bewirken, wird beim Fisch das Pigment nur durch LSD ausgebreitet. Weiterhin ist die Regulation des Farbenwechsels bei den beiden Tiergattungen verschieden. Während die Verdunkelung bei Amphibien — unter physiologischen Bedingungen — praktisch ausschließlich vom Melanophorenhormon bewirkt wird, ist die diesbezügliche Rolle der Hypophyse bei Teleosteen (zu welchen der *Lebistes* gehört) bei weitem nicht so dominierend⁶.

Summary

1. The effect of LSD on the melanophores of the female guppy fish (*Lebistes reticulatus*) resulting in expansion of pigment can be reproduced *in vitro* on isolated dorsal fins.
2. This effect *in vitro* is, like the effect *in vivo*, inhibited by 5-hydroxytryptamine.
3. The concentrations of both substances effective *in vitro* correspond closely to those which elicit identical effects in the intact fish.
4. It may therefore be assumed that the effects on the melanophores are due to peripheral actions of the two substances.

Literatur

- ¹ BERDE, B., u. A. CERLETTI: Über den Melanophoreneffekt von D-Lysergsäure-diäthylamid und verwandten Verbindungen. *Helvet. physiol. Acta* **14**, 325 (1956). — ² CERLETTI, A., u. B. BERDE: Die Wirkung von D-Lysergsäure-diäthylamid (LSD 25) und 5-Oxytryptamin auf die Chromatophoren von *Poecilia reticulatus*. *Experientia* **11**, 312 (1955). — ³ GADDUM, J. H.: Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5-hydroxytryptamine. *J. of Physiol.* **121**, 15 P (1953). — ⁴ GADDUM, J. H., and K. A. HAMEED: Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *Brit. J. Pharmacol.* **9**, 240 (1954). — ⁵ KAHR, H., u. W. FISCHER: Die Wirkung des 5-Oxytryptamins auf das Pigmentsystem der Haut. *Klin. Wschr.* **35**, 41 (1957). — ⁶ PARKER, G. H.: *Animal colour changes and their neurohumours*. Cambridge University Press 1948.

Dr. B. BERDE und Dr. A. CERLETTI,
Pharmakologisches Laboratorium der Sandoz A. G., Basel (Schweiz)