

BIOCHEMISCHE UND CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON ADENINNUCLEOTIDEN AUF BLUTPLÄTTCHEN *IN VITRO**

E. WEBER und E. MORGESTERN †

Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg

(Received 12 June 1967; accepted 17 July 1967)

Abstract—Platelets from pig blood were suspended in citrated plasma and AMP, ADP or ATP was added at final concentrations of 10^{-6} to 10^{-2} M. The ATP, glycogene and serotonin content and the consumption of glucose were measured in the platelets under these conditions. Only high concentrations (10^{-2} M) of the adenine nucleotides influenced the ATP-content of the platelets: AMP lowered it somewhat and ADP or ATP increased it. AMP and ADP induced a small concentration dependant fall in the glycogene content. This effect was obtained with ATP only using final concentrations of 10^{-4} or 10^{-6} M.

No Serotonin was liberated from the platelets by the adenine nucleotides, even if excessive amounts of ADP were used. A significant increase in glucose consumption was observed with 10^{-4} M or more ADP or with 10^{-4} M ATP. AMP was without effect in this respect. ADP produced like blood coagulation, an increase in histochemically demonstrable lipids in granulocytes and in monocytes.

ZAHLREICHE Untersucher haben anhand von *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt, daß Blutplättchen aggregieren, wenn sie in ihrem physiologischen Milieu ADP ausgesetzt werden.¹⁻³

Die mögliche Bedeutung dieser Phänomens geht daraus hervor, daß ADP aus den Plättchen selbst und aus anderen Zellarten gerade unter den Bedingungen frei wird, die zur Bildung eines hämostatischen Pfropfes, vermutlich auch zur Entstehung von Gefäßthromben und anderen aus der Human- und Tierpathologie bekannten Prozessen führen wie z.B. Antigen-Antikörper-Reaktionen oder Endotoxin-Einwirkung.⁴

Eine Reihe von Aspekten dieser Aggregation von Blutplättchen unter dem Einfluß von ADP ist heute gut untersucht. Weniger beachtet wurde dabei das Verhalten verschiedener Plättchenmetabolite und ihre Umsetzungen. Es gibt aber Gründe, die für eine Verknüpfung der Aggregation mit Stoffwechselprozessen der Plättchen sprechen, so z.B. die Tatsache, daß der Vorgang durch Inhibition -SH-Gruppen tragender Fermente⁵⁻⁸hemmbar ist und, daß ein Temperaturkoeffizient besteht.^{5, 9, 10}

In den hier dargestellten Versuchen sollte geklärt werden, ob sich unter der Einwirkung von ADP Veränderungen in den stationären Konzentrationen an ATP, Glykogen und Serotonin sowie am Glucoseverbrauch der Plättchen nachweisen lassen.

* Eine kurz Darstellung der Ergebnisse wurde auf der 29. Tagung der Deutschen Pharmakologischen Gesellschaft in Göttingen vom 27. bis 30. September 1965. vorgetragen.

† Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Eine Abgrenzung der durch die Aggregation gesetzten Effekte wurde durch die vergleichende Anwendung von AMP und ATP versucht, die, den Plättchen jeweils allein zugesetzt, keine oder eine nur geringgradige Aggregation auslösen.

Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Verfahren sowie histochemische Techniken wurden ebenfalls herangezogen und ermöglichen die Aufdeckung einer Lipoid-freisetzenden Wirkung, die von ADP auf die Blutplättchen ausgeübt wird.

METHODEN

Die Versuche führten wir an frisch isolierten Blutplättchen aus Schweineblut durch, welches, 1:10 mit 3,8% Citratlösung verdünnt, im Schlachthof beim Abstechen der Tiere gewonnen wurde. Die mit Hilfe von Differentialzentrifugation erhaltene Plättchenmasse (7–8 Min bei 2200 g zur Gewinnung des plättchenhaltigen Plasmas; 20 Min bei 4600 g zum Absetzen der Zellen) wurde zur Inkubation bei 37° in das vorgesehene Suspensionsmilieu eingewogen und aufgeschwemmt (Einzelheiten s. bei den einzelnen Bestimmungsmethoden). Die angewandten Konzentrationen der Nukleotide AMP, ADP und ATP lagen zwischen 10⁻⁶ M und 10⁻² M und wurden durch Zusatz kleiner Volumina der jeweiligen Nukleotidstammlösung bzw. ihrer Verdünnungen zu jeder Probe erreicht. Den Kontrollansätzen fügten wir das entsprechende Volumen an Lösungsmittel (0,9% NaCl-Lösung) zu. Alle Proben wurden, um Doppelbestimmungen zu ermöglichen, zweifach angesetzt.

(1) ATP-Bestimmung: Plättchen aus Citratblut wurden in homologem, plättchenarmen Plasma einmal gewaschen und im Verhältnis 1:30 (ein Gewichtsteil Zellen + 30 Gewichtsteile Plasma) suspendiert, mit den jeweiligen Zusätzen (25–50 µl/ml Suspension) versehen und 30 Min bei 37° in Gläsern inkubiert, deren innerer Durchmesser passend für ein Teflon-Homogenisatorpistill gearbeitet war. Anschließend setzten wir die Zellen in der Kälte ab und enteiweißten mit HClO₄ (3%). Nach Homogenisieren der Mischung (3 Min) mit Hilfe eines motorangetriebenen Teflon-Pistills (A.H. Thomas u. Co. Philadelphia) wurde sofort mit 40% K₂CO₃-Lösung neutralisiert und in dem durch Zentrifugieren gewonnenen Überstand ATP mit Hilfe der "Biochemica-Test-Kombination" (C. F. Boehringer und Soehne, Mannheim) unter Einführung einiger Modifikationen (Anheben der Konzentration des Triäthanolamin-HCl-Puffers auf 0,8 M; Zugabe von Hydrazinsulfat) bestimmt.

(2) Glykogen-Bestimmung: Aus einmal in homologem Citratplasma gewaschenen Plättchen stellten wir eine Suspension (1 Gewichtsteil Zellen zu 10 Gewichtsteilen homologem Citratplasma) her und inkubierten jeweils 0,2 ml davon in Zentrifugenröhrchen mit Schliffstopfen zusammen mit den Zusätzen. Am Ende der Inkubationsperiode (15 Min bei 37°) wurden die Zellen in der Zentrifuge bei 2° sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes beschickten wir jede Probe mit 0,350 ml KOH-Lösung (15%) und mazerierten den Röhrcheninhalt 30 Min im siedenden Wasserbad. Die Darstellung und Bestimmung des Glykogens erfolgte nach der Vorschrift von Fong *et al.*¹¹ mit Anthron (genaue Vorschrift s. bei Weber *et al.*¹²) in den zur Inkubation benutzten Röhrchen.

(3) Serotonin-Bestimmung: Jeweils 50 mg ein- bis zweimal in homologem Citratplasma gewaschene Plättchen wurden in 2,95 ml des gleichen Mediums oder in Trismaleat-gepufferter NaCl-Lösung (Trismaleat-Puffer 0,01 M; pH 7,4; 1 Vol. Teil Puffer + 4 Vol. Teile NaCl-Lösung) aufgeschwemmt, mit 50 µl Nukleotidlösung oder NaCl-Lösung versetzt und 20 Min bei 37° inkubiert. Anschließend trennten wir in

der Kälte die Zellen ab und bestimmten im Überstand die von den Plättchen abgegebene Serotoninmenge mit fluorometrischer Technik nach Extraktion der Proben durch Butanol und Heptan entsprechend den Angaben von Brodie *et al.*¹³

(4) Messung des Glucoseverbrauchs: Aus einem Gewichtsteil einmal in Citratplasma des Spendertieres gewaschener Plättchen sowie 10G ewichtsteilen homologem Plasma wurde eine Suspension hergestellt, Jeweils zu 1 ml setzten wir 20 µl der verschiedenen Nukleotidlösungen zu und bestimmten nach Absetzen der Zellen in der Kälte sowohl im Suspensionsmilieu nicht inkubierter Proben als auch im Überstand 20 Min bei 37° gehaltener Proben den Glucosegehalt mit der 'Biochemica-Test-Kombination' (C. F. Boehringer u. Soehne, Mannheim) nach Enteiweißen mit der fünffachen Menge 3,3% HClO₄. Der Glucoseverbrauch der Zellen ergibt sich aus der Differenz des Glucose-Gehaltes im Außenmilieu vor und nach der Inkubation. Bei der gegebenen Linearität zwischen Glucosegehalt und der photometrisch ermittelten Extinction der Meßlösungen* stellt die Extinctionsdifferenz ein direktes Maß des Glucoseverbrauchs dar. Eine angegebene Extinctionsdifferenz von 100 (= Δ Ext. × 10³) entspricht einem Glucoseverbrauch von 2,2 mg Glucose pro g feuchte Zellmasse oder 4,5 × 10¹⁰ Plättchen.

(5) Cytologische Methoden: Phasenkontrast- und fluoreszenzmikroskopische Verfahren: Von den verschiedenen Arten der Versuchsanordnung wurden jeweils Proben entnommen und Deckglaspräparate unter Vermeiden jeden Druckes hergestellt. Zur Mikroskopie diente eine kombinierte Phasenkontrast-Fluoreszenzeinrichtung der Fa. Zeiss, Oberkochen/Wtbg. Für fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen versetzten wir die Plättchensuspensionen mit kleinen Mengen konzentrierter Acridinorange-Lösung (Endkonzentration an Acridinorange 1:10.000 bis 1:20.000).

Cytochemische Untersuchungen: Als Lipoidnachweise wurden der BAKER-Test für Phosphatide, die Färbung mit Sudanschwarz B (SSB) in 50% äthanolischer Lösung und mit Sudan III nach ROMEIS durchgeführt. Die Glykogendarstellung erfolgte mit der PAS-Reaktion. Weitere Angaben zu den angewandten cytochemischen Methoden finden sich bei Morgenstern, Müller und Weber.¹⁴

ERGEBNISSE

I. Cytologische Beobachtungen

1. ADP. Im Vergleich zu Kontrollpräparaten fiel bei Blutplättchen-Suspensionen in Citratplasma, denen ADP zugesetzt war, eine ausgeprägte Neigung der Zellen auf, aneinanderzuhaften. Zahlreiche große aggregierte Zellhaufen beherrschten das Bild. Die einzelnen Blutplättchen behielten aber, sofern die ADP-Konzentratratiion 10⁻⁴ M nicht überstieg, ihr typisches Aussehen bei (homogen erscheinende Zellen mit kurzen Pseudopodien, oft von einem schmalen Hyalomersaum umgeben).

Nach Einwirken höherer ADP-Konzentrationen (10⁻³ M und mehr) sahen wir nach kurzer Zeit Bilder, die sich von einer sicheren viskösen Metamorphose der Plättchen nicht unterscheiden ließen. Es kam zur Fusion der Zellen unter Verlust ihrer phasenoptisch erkennbaren Außenmembran und wir beobachteten die Bildung von optisch leeren, schlauchartigen Systemen in den Aggregaten sowie die Ausstoßung von bläschenartigen Gebilden an den Rändern der Plaques. Niemals aber traten Fibrinfäden auf und es fand daher auch keine Koagulation in der Plättchensuspension statt.

* nach Vorschrift der 'Biochemica-Test-Kombination'.
BP—G

Das Fluoreszenzbild der Plättchen nach Anfärben mit Acridinorange ist geprägt durch das Auftreten von 5 bis 20 feinen roten Grana im ungefärbten Zelleib. In den viskösen Plaques, wie sie bei ADP-Konzentrationen von 10^{-2} M auftreten, war eine Abklärung der Granulazahl pro Plättchen nicht mehr möglich. In mit salzaurem Hämatin nach BAKER und Sudanschwarz B gefärbten Ausstrichen stellten sich die Granula der Plättchen in den Plaques nur undeutlich dar und eine leichte Diffusfärbung der Zellhaufen an diesen Stellen wurde sichtbar. In mit Acridinorange gefärbten Deckglaspräparaten war eine vermehrte Empfindlichkeit der Granula gegenüber dem zur Fluoreszenzanregung verwendeten Blaulicht festzustellen. Diese Befunde sprechen für eine vermehrte Labilität der lipoidhaltigen Plättchenstrukturen nach ADP-Gabe in hohen Konzentrationen. Das Plättchenglykogen zeigte cytochemisch keine sichere Abnahme.

Bei niedrigen ADP-Konzentrationen war eine auffällige Abnahme der Granula in den Plättchen nicht zu beobachten. Es war uns aus vorausgegangenen Experimenten bekannt, daß aus Blutplättchen im Verlauf von spontanen oder durch Rekalifizierung induzierten Gerinnungsvorgängen Lipoide frei werden, die sich dann, zumindest teilweise, in Leukocyten wiederfinden lassen (Morgenstern, Müller u. Weber).¹⁵ Auslösendes Agens und Mechanismus dieses Prozesses sind nicht bekannt und bedürfen der näheren Untersuchung. Neben Thrombin kommt besonders ADP als ursächlicher Faktor infrage.

Die mögliche Bedeutung von ADP in diesem Zusammenhang prüften wir an Plättchensuspensionen, die durch Mitverwendung des bei der Gewinnung von plättchenreichem Plasma auf der Erythrocytenschicht sedimentierten 'buffy-coat' mit Leukocyten angereichert waren. Nach der Einwirkung von ADP in Endkonzentrationen von 10^{-4} M und mehr auf mit Acridinorange angefärbten Zellaufschwemmungen, beobachteten wir nach 60 Min Inkubation bei 37° das Auftreten von auffallend großen Fluorochromgrana in den segmentkernigen Granulocyten und in den Monozyten. Die histochemische Bearbeitung zur Eruierung des den vergrößerten Farbstoffgrana zugrunde liegenden stofflichen Substrates ergab übereinstimmend einen positiven Ausfall der auf Lipoide ansprechenden Teste (Supravitalfluorochromierung mit Acridinorange, Baker-Test, SSB, Sudan III (Abb. 1)), während Methoden, die Polysaccharide, Mucopolysaccharide, Proteine oder Nucleinsäuren nachweisen, negative Resultate lieferten. Im plasmafreien Elektrolytmilieu ließen sich die gleichen Erscheinungen aufzeigen, so daß uns der Schluß erlaubt scheint, daß es sich hier um eine Abgabe von Lipoiden aus den Plättchen und ihre Einschleußung in das Cytoplasma weißer Blutzellen handelt.

2. **AMP.** In mit AMP versetzten Proben ließen sich mit keiner der geprüften Konzentrationen Unterschiede zu den unbehandelten Kontrollansätzen feststellen.

3. **ATP.** Im Verlauf einer Inkubationsperiode von 30 Min in Citratplasma unter Zusatz von 10^{-4} M ATP kam es bald zur Entstehung von zunächst kleinen Aggregaten (5-20 Blutplättchen), die bis etwa zur 10. Minute an Größe zunahmen, anschließend aber progressiv disaggregierten, so daß nach etwa der 20. Minute keine Unterschiede zu den Kontrollen wahrnehmbar waren. Bei einer Konzentration von 10^{-6} M und von 10^{-2} M ATP traten in einigen Fällen über wenige Minuten kleine Aggregate auf, ihr Ausmaß blieb unter dem nach ADP-Gabe beobachteten zurück. Sonstige Unterschiede gegenüber den Kontrollen fielen nicht auf.

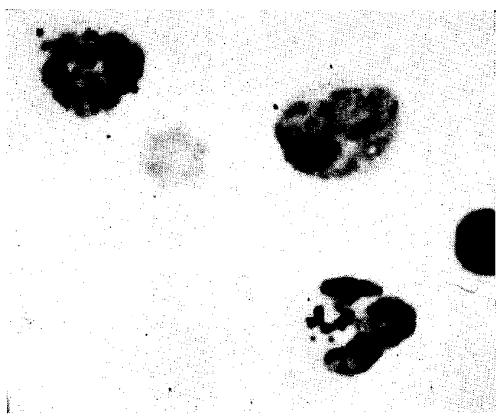


ABB. 1. Granulocyten aus Plättchen-Leukocyten-Suspensionen in Citratplasma unter Zusatz von 10^{-4} M ADP. Ausstrichpräparat; Anfärbung mit Sudan III. Große Lipoideinschlüsse im Cytoplasma der Leukocyten unter Verlust der 'spezifischen' sudanophilen Granulation dieser Zellen.

II. Die Beeinflussung von stationären Metabolitkonzentrationen.

1. **ATP.** Die Beeinflussung des ATP-Bestandes in Blutplättchen durch die drei Adeninnukleotide AMP, ADP und ATP ist in Abb. 2 dargestellt. Kleinere und mittlere Konzentrationen lassen den mittleren ATP-Gehalt der Blutplättchen unverändert. Deutliche Abweichungen ergeben sich erst bei Anwendung exzessiver Mengen (10^{-2} M): AMP senkt dann, ADP und besonders ATP steigern dagegen die ATP-Menge in den Plättchen.

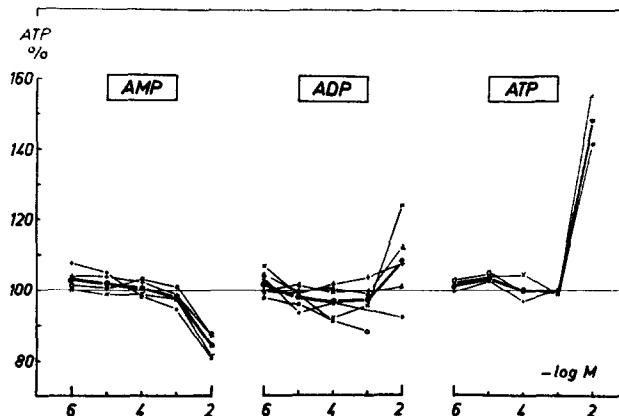


ABB. 2. Der ATP-Bestand in Blutplättchen nach 30 Minuten Inkubation in Citratplasma bei 37°C unter Einwirkung der angegebenen Adeninnukleotide in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-2} M. Ordinate: ATP-Gehalt der Zellen in Prozenten von unter identischen Bedingungen, aber ohne Nukleotide gehaltenen Kontrollen. Abszisse: negativer Logarithmus der angewandten Nukleotidkonzentrationen. Darstellung der Einzelversuche; der stark ausgezogene Strich gibt die Lage des Mittelwertes an.

Die individuelle Schwankung um den Durchschnittswert ist unter der Einwirkung von ADP größer als nach Zugabe der beiden anderen Nukleotide. Es fand sich in drei von sechs Fällen im Bereich von 10^{-6} – 10^{-3} M ein streng konzentrationsabhängiger, wenn auch geringgradiger ATP-Verlust in den Zellen (maximal 10 %).

Bemerkenswert ist die Diskrepanz zwischen morphologischem Befund und dem Ergebnis der ATP-Analyse bei Anwendung der höchsten ADP-Konzentration: Beim Auftreten einer viskösen Metamorphose z.B. nach Einwirken von Thrombin, Muco-polysacchariden oder beim Sanarelli-Shwartzman-Syndrom lässt sich gleichzeitig ein Verlust an Plättchen-ATP nachweisen. Dies war unter dem Einfluß von ADP nicht der Fall.

2. **Glykogen.** Das Verhalten der stationären Glykogenkonzentration in Blutplättchen nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C in Citratplasma unter der Einwirkung von steigenden Mengen AMP, ADP und ATP geht aus Abb. 3 hervor. Sowohl AMP wie ADP führt zu einem individuell verschieden stark ausgeprägten, aber konzentrationsabhängigem Verlust des Plättchenglykogens, der allerdings im Durchschnitt bei AMP maximal 11 %, bei ADP maximal 14 % nicht übersteigt. Der Verlauf der entsprechenden Kurven nach ATP-Zusatz unterscheidet sich von den beiden vorhergehenden: Bei 10^{-4} M ATP findet sich der stärkste mittlere Abfall (11,5 %); höhere ATP-Konzentrationen lassen die Glykogen-Werte aber wieder ansteigen.

Wie bei der Untersuchung des ATP-Bestandes fällt auch hier bei Zugabe von ADP in einer Endkonzentration von 10^{-2} M keine über die Konzentrationsabhängigkeit des Vorganges hinausgehende Verminderung des Glykogenbestandes auf, obwohl sonst eine visköse Metamorphose mit einer hochgradigen Abnahme des Plättchenglykogens verbunden ist (Weber *et al.*¹⁶).

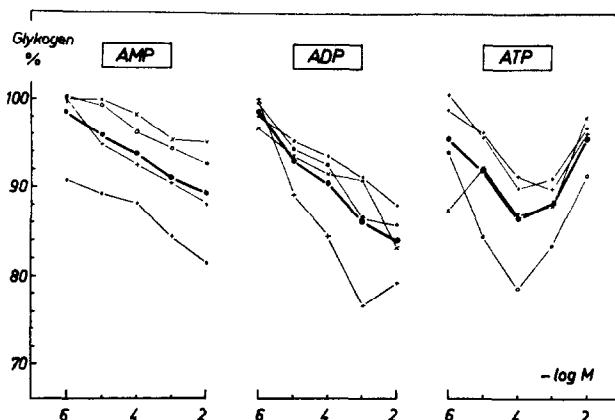


ABB. 3. Der Glykogengehalt in Blutplättchen nach 15 Minuten Inkubation bei 37°C in Citratplasma unter Zugabe der angeführten Adeninnukleotide. Ordinate: Glykogenbestand der Zellen in Prozenten von unter identischen Bedingungen, aber ohne Nukleotide gehaltenen Kontrollen. Abszisse: negativer Logarithmus der angewandten Nukleotidkonzentrationen. Darstellung der Einzelversuche; der stark ausgezogene Strich gibt die Lage des Mittelwertes an.

3. Serotonin. Eine detaillierte Darstellung der Versuche, in denen geprüft wurde, ob der Serotoninbestand der Plättchen unter Einwirkung von ADP Veränderungen erleidet, erübrigt sich, da in keiner der vielfältigen Versuchsanordnungen im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 10^{-3} M Unterschiede zu den ohne ADP inkubierten Kontrollen zutage traten. Der maximale Serotoninverlust der Kontrollen betrug unter den angewandten Bedingungen 2–3 % des Gesamtserotoningehaltes der Zellen.

Die Versuche wurden an Plättchensuspensionen in EDTA- und in Citratplasma sowie in Trismaleat-gepufferter NaCl-Lösung durchgeführt, jeweils ohne und unter wechselnden Konzentrationen von Calcium. (Im Fall von Plasma war den Proben Heparin zur Verhütung der Plasmagerinnung bei der Rekalifizierung beigegeben worden).

In 10 von 12 Versuchen trat unabhängig von der gewählten Versuchsanordnung eine größere Serotoninabgabe in dem Suspensionsmilieu auf, wenn es 10^{-2} M ADP enthielt. In das Elektrolytmedium wurden dabei bis zu 25 %, im Plasmamilieu allerdings höchstens 6 % des gesamten Serotonins der Plättchen frei.

Auch hier war demnach der Verlust an Substrat geringfügiger als bei anderen Prozessen, die sich unter dem Bild einer viskösen Metamorphose abspielen.

III. Veränderungen des Glucoseverbrauchs.

Der Glucoseverbrauch der Plättchen bot unter der Einwirkung der Adeninnukleotide die auffälligsten Befunde (Abb. 4). AMP blieb auch in den höchsten Konzentrationen- ohne jeden Effekt, während 10^{-4} M und mehr ADP mit $P < 0,01$ einen

statistisch gesicherten Mehrverbrauch an Glucose bedingten. ATP hingegen führte nur in einem bestimmten Konzentrationsbereich (10^{-4} M) zu einem signifikanten Anstieg des Glucoseverbrauchs ($P < 0,05$).

Im Elektrolytmedium verursachte ADP ebenfalls eine konzentrationsabhängige, allerdings geringfügige Erhöhung des Glucoseverbrauchs. Um die Möglichkeit zu

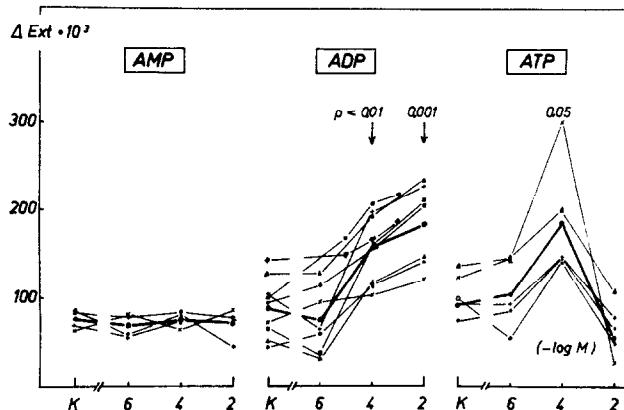


ABB. 4. Der Glucoseverbrauch von Blutplättchen—Suspensionen innerhalb einer 20-Minuten Inkubationsperiode in Citratplasma bei 37° ohne und unter Zusatz der angeführten Adeninnukleotide. Ordinate: Extinktionsdifferenzen als direktes Maß des Glucoseverbrauchs im Versuchsansatz (s. Methoden). Abszisse: negativer Logarithmus der angewandten Nukleotidkonzentration. K = Kontrollen (Inkubation ohne Nukleotidzugabe). Darstellung der Einzelversuche; der stark ausgezogene Strich gibt die Lage des Mittelwertes an.

prüfen, ob der beobachtete ADP-Effekt auf die Aggregation oder in wieweit er auf einen andersartigen spezifischen ADP-Effekt zurückzuführen war, wurde den Plättchen-Suspensionen ADP (10^{-4} M) zusammen mit einem hundertfachen Überschuß an AMP (10^{-2} M) zugesetzt. In diesen Präparaten trat keine Aggregation der Plättchen auf. Der Glucoseverbrauch lag in jedem Fall über dem der Kontrolle, war aber gegenüber der reinen ADP-Wirkung deutlich reduziert (Tabelle 1).

TABELLE 1.

Die Veränderung des Glucoseverbrauches von Blutplättchen innerhalb einer Inkubations-Periode von 20 Minuten bei 37° in Citratplasma durch ADP und durch die Kombination ADP + AMP. Angegeben ist jeweils die Extinktionsdifferenz $\times 10^3$ zwischen den Proben bei Inkubationsbeginn und -ende als direktes Maß des Glucoseverbrauchs (s. Methoden).

	Kontrollen	ADP 10^{-4} M	ADP 10^{-4} M + AMP 10^{-2} M
I	95	157	102
II	54	136	83
III	60	135	89

DISKUSSION

ADP induzierte unseren Befunden zufolge einen statistisch gesicherten Anstieg des Glucoseverbrauches von Schweineplättchen in Citratplasma. ATP verursachte -allerdings nur in einer der angewandten Konzentrationen- das gleiche Ergebnis, wobei in diesen Präparaten ebenfalls Plättchen-Aggregate auftraten. In den mit AMP allein versetzten Proben wiederum kam es weder zur Aggregation noch zu einem gesteigerten Glucoseverbrauch.

Die Möglichkeit, daß es sich im Fall von ATP um einen Effekt des triphosphorylierten Adeninnukleotides selbst handelt, ist nicht auszuschließen, aber unsicher, da ATP im Plasma bei 37°, besonders im Schweineplasma, sehr, schnell zu ADP und anderen Abbaustufen umgesetzt wird (Jorgensen¹⁷; Glynn *et al.*¹⁸; Salzman *et al.*¹⁹ Spaet und Lejnieks²⁰). Hinzu kommt, daß kommerzielle ATP-Präparate mindestens 1% ATP enthalten, bei ihrer Anwendung von vorn herein also eine um rund zwei Zehner-Potenzen niedrigere ADP-Konzentration vorliegt. Bekannt ist, daß eine um den Faktor 10 höhere ATP-Menge den aggregierenden Einfluß von ADP verhindert (O'Brien³). Die Anwendung dieser verschiedenen, mehrfach gesicherten Befunde auf unser Beispiel erlaubt die Interpretation des zunächst überraschenden Ergebnisses des ATP-Zusatzes: Durch die schnell einsetzenden Dephosphorylierungsvorgänge an ATP nimmt die ADP-Menge im Plasma zunächst zu, umso stärker, je höher die Ausgangskonzentration an ATP war. Bei bestimmten Mischungsverhältnissen setzt sich der stimulierende ADP-Effekt auf den Glucoseverbrauch durch wie das aus unserer Versuchsanordnung bei einer Ausgangskonzentration von 10^{-4} M ATP hervorgeht. Bei initial höheren ATP-Mengen (10^{-2}) überwiegt die inhibierende Wirkung und der Glucoseverbrauch nimmt nicht zu.

Die kombinierte Anwendung von AMP und ADP (Tabelle 1) zeigt weiterhin, daß sich durch ein Adeninucleotid neben der Aggregationsneigung der Plättchen auch ein erhöhter Glucoseverbrauch hemmen läßt.

Wie in den hier dargestellten Ergebnissen zum Ausdruck kommt, waren Aggregationsvorgänge von einer meßbaren Vermehrung des Glucoseverbrauches begleitet, sofern ausreichend hohe Wirkstoffkonzentrationen angewendet wurden, eine Beobachtung, die sich auch bei Testung einer Reihe anderer Substanzen ausnahmslos bestätigte. Der erhöhte Umsatz an Glucose kann anhalten unter Bedingungen, die eine Hemmung der Aggregations-Phänomene verursachen (Pfleiderer, Morgenstern und Weber²¹; Pfleiderer, Brossmer, Morgenstern und Weber²²).

Die Glykolyserate von Rinderplättchen in Elektrolytmedium wurde von De Vreker und De Vreker²³ gemessen. Weder ADP (10^{-6} M) noch Fibrinogen allein übten einen Einfluß auf sie aus. Beide Substanzen, den Suspensionen zusammen beigefügt, stimulierten die Glykolyse nur 5–10 Minuten lang. Dann kam es zur Aggregation der Plättchen und gleichzeitig zu einer Inhibition der Glykolyse. Ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen ist angesichts der zahlreichen Verschiedenheiten in der Versuchsanordnung kaum möglich.

Die stationären Metabolitkonzentrationen der Plättchen an ATP, Glykogen und Serotonin unterlagen durch ADP, wenn überhaupt, einer wesentlich geringgradigeren Beeinflussung als der Glucoseverbrauch. Mit der Plättchenaggregation haben diese Erscheinungen offensichtlich nichts zu tun, wie ihr Auftreten z.B. nach AMP-Zusatz beweist. Spaet und Zucker²⁴ sowie Holmsen²⁵ fanden nach Zugabe von ADP in der Größenordnung von 10^{-5} bis bzw. 10^{-6} M zu Humanplättchen keine Freisetzung von

Adeninnukleotiden in das Außenmedium, Resultate, die mit unseren Befunden identisch sind. Die von uns durchgeführte Messung des intrazellulären ATP-Gehaltes (Bestimmung in den sedimentierten Zellen) erlaubt aber einen besseren Einblick in die tatsächlich nach außen verloren gegangenen ATP-Mengen als die mit den intraplasmatischen Abbauvorgängen interferierende Ermittlung der abgegebenen Nukleotide.

Die Ursache des kleinen, aber stets reproduzierbaren Verlustes an ATP nach 10^{-2} M AMP ist unklar, ebenso die streng konzentrationsabhängige Glykogenabnahme nach AMP oder ADP-Zusatz.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die Zunahme an ATP nach 10^{-2} M ADP bzw. ATP bietet die Erfahrung, daß sich aus den Adeninnucleotiden im Plasma (oder an den Außenmembranen der Blutzellen) neben Nucleosiden Ribose-1-Phosphat und Ribose-5-phosphat bilden. Diese Verbindungen können nach Aufnahme in die Zellen über Umsetzungen im Pentosephosphat-Shunt einen Anstau einzelner Glieder der Glykolyseketten im Cytoplasma bewirken, der letztlich zu einer Erhöhung des ATP-Bestandes führt.*

Blutplättchen sind mit einem Enzymmuster ausgestattet, welches solche Reaktionsfolgen erlauben würde (Waller *et al.*²⁶) Auch eine direkte Phosphorylierung der membran durchgängigen Nukleoside und Purinbasen ist für andere Zelltypen beschrieben (Literatur s. bei Weber *et al.*²⁷). Schließlich muß der im Fall eines ATP-Zusatzes von 10^{-2} M erfolgende erhebliche Anstieg der intrazellulären ATP-Konzentration z.T. als Artefakt durch Miterfassung von im Interzellularraum eingeschlossenem, exogenen ATP gedeutet werden.

Ob der in drei von sechs Versuchen beobachteten, allerdings deutlich konzentrationsabhängigen minimalen Reduzierung des intrazellulären ATP-Bestandes der Plättchen nach Zuführung von ADP *in vivo* eine Bedeutung zukommen könnte wie sie von Turtle und Firkin²⁸ vermutet wird, muß offenbleiben. Vielleicht besteht ein Zusammenhang mit dem zweiphasigen Aggregationstyp menschlicher Plättchen in Citratplasma, der bei den meisten, aber nicht bei allen Versuchspersonen, beobachtet wird (Mills und Roberts²⁹). Die zweite Aggregationsphase soll durch eine Abgabe von ADP aus den Zellen zustande kommen, eine Verminderung des ATP-Bestandes wäre demnach denkbar.

In den Versuchen von Spaet und Zucker²⁴ blieb entsprechend unseren Befunden auch der Serotoninbestand der Plättchen unverändert.

In morphologischer Hinsicht unterschied sich die Anwendung von ADP in einer Endkonzentration von 10^{-2} M durch das Auftreten von visköse-Metamorphose-ähnlichen Bildern einschneidend von niedrigeren ADP-Konzentrationen. Wir vermögen nicht zu erklären, warum in diesen Fällen die biochemischen Parameter sich nicht wie nach anderen, die visköse Metamorphose auslösenden Agentien verändert, d.h. warum es nicht zu beträchtlichem Absinken der ATP-, Glykogen- und Serotonin-Spiegel kam. Lediglich der Glucoseverbrauch verhielt sich in der erwarteten Weise. Auch in der vermehrten Serotoninabgabe nach 10^{-2} M ADP findet sich der übliche Effekt angedeutet. Offensichtlich müssen morphologisch identische Bilder nicht auch funktionell gleichwertigen Zuständen entsprechen.

* Ob hier ein Zusammenhang mit dem nach zunächst konzentrationsabhängigem Abfall der Glykogenkonzentration in den Plättchen wieder zunehmenden Glykogengehalt bei weiterem Zufügen von ATP besteht, muß offenbleiben (vergl. Abb. 3).

Mustard *et al.*³⁰ haben aufgrund experimenteller Daten als Erste eine Abgabe von Plättchenfaktor III unter dem Einfluß von ADP angenommen. Wir kommen ebenso wie später Silver³¹ und Pizzuto *et al.*³², wenn auch auf völlig anderem Wege, zu dem gleichen Schluß und können erstmals eine Aussage über das Schicksal der (im Überschuß) freigesetzten Lipoide machen. Bemerkenswert erscheint, daß eine Lipoidabgabe prinzipiell ohne Zutun von Thrombin und damit unabhängig von plasmatischen Gerinnungsvorgängen möglich ist.

Eine eindeutige Abnahme der histochemisch nachweisbaren Plättchenlipoide war nicht zu beobachten und wäre, da diese Nachweise einen vergleichsweise groben Indikator darstellen, nur bei einem ausgeprägten Lipoidverlust, wie er zum Beispiel während der Blutgerinnung eintritt, zu erwarten gewesen. Immerhin ließen die Untersuchungen eine vermehrte Labilität der Plättchenlipoide erkennen. Auch besteht die Möglichkeit, daß die abgegebenen Lipoide der Außenmembran der Plättchen entstammen.

Die für die Demonstrierung der wesentlichen Befunde anzuwendenden ADP-Konzentrationen liegen höher als die zur Auslösung der Plättchen-Aggregation notwendigen, die je nach Spezies nur 10^{-7} bis 10^{-6} M betragen. Wir glauben nicht, daß hierdurch die Übertragungsmöglichkeit unserer Befunde auf *in vivo*-Verhältnisse grundsätzlich eingeschränkt wird, denn hier können z.B. im Rahmen der durch Bindegewebsfasern induzierten ADP-Abgabe in oder an Plättchenaggregaten lokal leicht hohe ADP Konzentrationen auftreten.

Zusammenfassung—Blutplättchen vom Schaf, bei 37° in Citratplasma suspendiert, wurden mit AMP, ADP oder ATP (Endkonzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-2} M) versetzt. Anschließend erfolgte eine Bestimmung der stationären Konzentrationen an ATP, Glykogen und Serotonin sowie eine Ermittlung des Glucoseverbrauches. Nur die höchste der geprüften Konzentrationen der drei Adeninnucleotide veränderte den ATP-Bestand im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen: AMP verringerte ihn geringfügig und ADP oder ATP erhöhte ihn. Der Glykogengehalt fiel unter AMP und ADP wenig, aber konzentrationsabhängig, ab. ATP übte diesen Effekt nur in einer Endkonzentration von 10^{-4} und 10^{-6} M aus. Serotonin wurde außer durch maximale ADP-Konzentrationen in keinem Fall freigesetzt. Der Glucoseverbrauch stieg unter 10^{-4} M und mehr ADP sowie bei 10^{-4} M ATP signifikant an. AMP führte zu keiner Veränderung des Glucoseverbrauches. In einer Plättchen-Leukozyten-Suspension kam es nach Zusatz von ADP ähnlich wie nach Ablauf von Gerinnungsprozessen zu einer Zunahme histochemisch darstellbarer Lipoide in Granulocyten und Monocyten. Diese Lipoide werden unter der Einwirkung von ADP von den Blutplättchen abgegeben.

LITERATUR

1. A. GAARDER, J. JONSON, S. LALAND, A. HELLEM and P. A. OWREN, *Nature, Lond.* **192**, 531 (1961).
2. G. V. R. BORN, *Nature, Lond.* **194**, 927 (1962).
3. J. R. O'BRIEN, *J. clin. Path.* **15**, 446 (1962).
4. A. J. MARCUS and M. B. ZUCKER, *The physiology of blood platelets*, Grune & Stratton, New York (1965).
5. E. ØLLGAARD, *Thromb. Diath. haemorrh.* **6**, 86 (1961).
6. C. W. ROBINSON JR., R. G. MASON and R. H. WAGNER, *Proc. soc. Exp. Biol. Med.* **113**, 857 (1963).
7. J. R. A. MITCHELL and A. A. SHARP, *Br. J. Haemat.* **10**, 78 (1964).
8. J. R. HAMPTON and J. R. A. MITCHELL, *Nature, Lond.* **210**, 1000 (1966).
9. T. HOVIG, *Thromb. Diath. haemorrh.* **9**, 248 (1963).
10. G. V. R. BORN, *Ann. R. Coll. Surg.* **36**, 200 (1965).
11. J. FONG, F. L. SCHAFER and P. L. KIRK, *Archs Biochem. Biophys.* **45**, 319 (1953).
12. E. WEBER, U. KLEINE und H. WACHTER, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1265 (1965).

13. B. B. BRODIE, E. G. TOMICH, R. KUNTZMAN and P. A. SHORE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **119**, 461 (1957).
14. E. MORGESTERN, R. MÜLLER und E. WEBER, *Histochemistry*, **10**, 309 (1967).
15. E. MORGESTERN, R. MÜLLER und E. WEBER, *Thromb. Diath. haemorrh.* in Druck.
16. E. WEBER und W. UNGER, *Biochem. Pharmac.* **13**, 23 (1964).
17. S. JØRGENSEN, *Acta pharmac. tox.* **12**, 294 (1956).
18. M. F. GLYNN, H. Z. MOVAT, E. A. MURPHY and J. F. MUSTARD, *J. Lab. clin. Med.* **65**, 179 (1965).
19. E. W. SALZMAN, D. A. CHAMBERS, L. L. NERI, *Thromb. Diath. haemorrh.* **15**, 52 (1966).
20. TH. H. SPAET and J. LEJNIEKS, *Thromb. Diath. haemorrh.* **15**, 36 (1966).
21. TH. PFLEIDERER, E. MORGESTERN und E. WEBER, *Klin. Wschr.* **44**, 853 (1966).
22. TH. PFLEIDERER, R. BROSSMER, E. MORGESTERN und E. WEBER, in Vorbereitung.
23. G. G. DE VREKER et R. A. DE VREKER, *Revue Belg. Path.* **31**, 79 (1965).
24. T. H. SPAET and M. B. ZUCKER, *Am. J. Physiol.* **206**, 1267 (1964).
25. H. HOLMSEN, *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **17**, 537 (1965).
26. H. D. WALLER, G. W. LÖHR, F. GRIGNANI und R. GROSS, *Thromb. Diath. haemorrh.* **3**, 520 (1959).
27. E. WEBER, H. HOFFMANN, F. KNAUF, G. MARTENS und U. SCHILDECKER, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **321**, 10 (1960).
28. J. R. TURTLE and B. G. FIRKIN, *Aust. Ann. Med.* **14**, 282 (1965).
29. D. C. B. MILLS and G. C. K. ROBERTS, *Nature, Lond.* **213**, 35 (1967).
30. J. F. MUSTARD, B. HEGARDT, H. C. ROWSELL and R. L. MACMILLAN, *J. Lab. clin. Med.* **64**, 548 (1964).
31. M. J. SILVER, *Am. J. Physiol.* **209**, 1128 (1965).
32. J. PIZZUTO, A. J. GIORGIO and P. DIDISHEIM, *Thromb. Diath. haemorrh.* **15**, 428 (1966).