

DIE WIRKUNG VON PRENYLAMIN* AUF DIE 5-HT-SPEICHERUNG DER BLUTPLÄTTCHEN

W. BARTHEL und F. MARKWARDT

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Akademie,
Erfurt, DDR

(Received 25 February 1969; accepted 18 March 1969)

Abstract—Prenylamine in low concentrations (10^{-7} M) causes a time-dependent release of 5-HT from rabbit blood platelets. This is due to an effect of this drug on transport and storage mechanisms of 5-HT. High concentrations of prenylamine (5×10^{-5} M) also induce loss of histamine and ATP from platelets. 5-HT-release by prenylamine is not inhibited by removal of Ca^{++} ions or by pretreatment of the blood platelets with NEM. Prenylamine acts like reserpine on isolated 5-HT-storage-organelles.

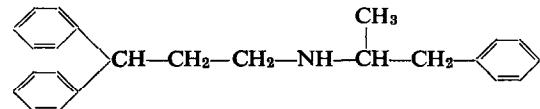
BEI UNTERSUCHUNGEN über den Einfluß von Pharmaka auf den 5-Hydroxytryptamin (5-HT)-Gehalt der Blutplättchen¹ fanden wir, daß Prenylamin bereits in geringen Konzentrationen zu einer Freisetzung des gespeicherten 5-HTs der Blutplättchen führt. Da die durch Prenylamin bewirkte Aminliberation für die pharmakodynamische Wirkung des Mittels von besonderer Bedeutung zu sein scheint, haben wir versucht, den Ablauf der 5-HT-Freisetzung an Hand dieses Modells zu studieren, um auf diese Weise weitere Einblicke in den Mechanismus dieser Wirkung des Prenylamins zu bekommen.

METHODEN

Kaninchenblut wurde gewonnen, indem die mit Hexobarbital (50 mg/kg) narkotisierten Tiere aus einem in die A. carotis eingeführten Polyäthylenkatheter entblutet wurden. Die Blutplättchen wurden aus dem 1:10 mit einer 1%igen EDTA-Lösung verdünnten Blut in der üblichen Weise durch fraktionelle Zentrifugation isoliert, mit Ca-freier Tyrodelösung (0·1% EDTA-Zusatz) zweimal gewaschen und unter dem Phasenkontrastmikroskop gezählt.² Für die Versuche wurden die Blutplättchen in Tyrodelösung, pH 7·4, resuspendiert, die Endkonzentration betrug $0\cdot3 \times 10^9$ Plättchen/ml.

Zur Gewinnung von subzellulären 5-HT-Speicherorganellen wurden Kaninchenblutplättchen in eisgekühlter 0·3 m Saccharoselösung in einem Glashomogenisator mit Teflonpistill (Fa. Braun, Melsungen) 5 min lang homogenisiert. Nach Abzentrifugieren

* Prenylamin (Falicor^(R), Segotin^(R)):



N-[3¹-phenyl-propyl-(2¹)]-1, 1 dephenyl-propyl-(3)-amin

der Zelltrümmer bei 1000 g wurden die Speicherorganellen bei 20,000 g sedimentiert und in einem von Poisner und Trifaro³ angegebenen Inkubationsmedium resuspendiert (KCl 160 mM, NaCl 5 mM, Mg Cl₂ 0.5 mM, Phosphatpuffer, pH 7.0, 10 mM). Alle Präparationsschritte erfolgten bei 0–4°.

Die Bestimmung von 5-HT, Histamin und ATP in den Blutplättchen und den isolierten Speicherorganellen wurde nach früher angegebenen Methoden durchgeführt.⁴

Die Untersuchung der 5-HT-Aufnahme in die Blutplättchen wurde in einer vorangegangenen Arbeit beschrieben.⁵

MATERIALIEN

Prenylamin-Laktat (Falicor^(R), VEB Fahrbberg-List, Magdeburg), Chlorpromazin (Propaphenin^(R), VEB Deutsches Hydrierwerk Rodleben), Cinchocain (Nupercain^(R), CIBA AG, Basel, Schweiz), NEM = N-Äthylmaleimid (Fluka AG, Buchs, Schweiz), Eupaverin^(R) (Merck, Darmstadt).

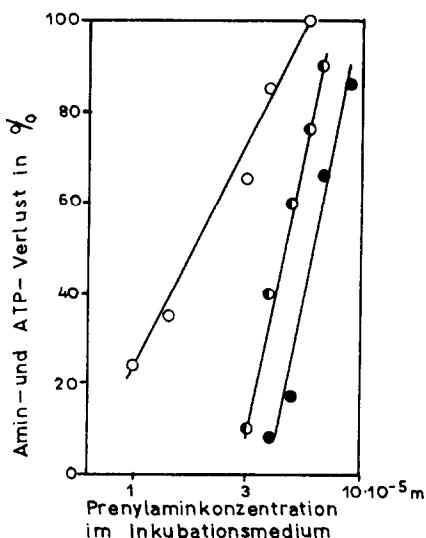


ABB. 1. 5-HT (○)-, Histamin (●)- und ATP (●)-Verlust von Kaninchenblutplättchen bei 30 min langer Einwirkung von Prenylamin in Tyrode-Lösung bei 37°. Mittelwerte aus 3–4 Einzelversuchen.

ERGEBNISSE

1. Der Einfluß der Prenylaminkonzentration auf den 5-HT-, Histamin- und ATP-Gehalt der Blutplättchen

Es wurde der 5-HT-, Histamin- und ATP-Gehalt der Blutplättchen nach 30 min langer Inkubation mit steigenden Prenylaminkonzentrationen im Inkubationsmedium bestimmt (Abb. 1). Dabei zeigte sich, daß der 5-HT-Gehalt bereits bei Einwirkung von 10^{-5} m Prenylamin vermindert wird. Bei Steigerung der Dosis bis auf 10^{-4} m kommt es zu einer völligen Freisetzung. Im Gegensatz dazu setzt die Abnahme des Histamin- und ATP-Gehaltes erst bei Einwirkung von $5 \cdot 10^{-5} \text{ m}$ Prenylamin ein. Abgesehen

davon, daß für die Histamin- und ATP-Liberation wesentlich höhere Prenylamin-Konzentrationen benötigt werden, zeigt die Dosis-Wirkungs-Kurve für die Histamin- und ATP-Freisetzung einen steileren Verlauf und trägt damit Alles- oder Nichts-Charakter.

2. Die Geschwindigkeit der 5-HT-Freisetzung aus Blutplättchen durch Prenylamin

Es wurde der zeitliche Verlauf der 5-HT-Freisetzung aus Blutplättchen bei Prenylaminkonzentrationen (2 und 5×10^{-5} m) untersucht, die nach 30 min langer Inkubation zu einer 50 - bzw. 90% igen Abnahme des 5-HT-Gehaltes in den Blutplättchen führen (Abb. 2). Danach ist die Geschwindigkeit der 5-HT-Abnahme von der Prenylaminkonzentration abhängig. Durch Verlängerung der Einwirkungszeit kann selbst durch noch geringere Prenylaminkonzentrationen (geprüft wurden Konzentrationen bis zu 10^{-7} m) eine 5-HT-Abnahme bis zur völligen Verarmung der

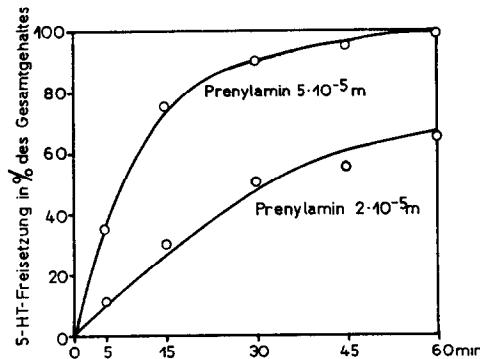


ABB. 2. Zeitlicher Verlauf der 5-HT-Freisetzung aus Kaninchenblutplättchen durch Prenylamin in Tyrode-Lösung bei 37° . Mittelwerte aus 3 Einzelversuchen.

Plättchen erreicht werden. Damit unterscheidet sich die Prenylamin-bedingte 5-HT-Abnahme wesentlich von der Thrombin-bedingten 5-HT-Freisetzung, welche, wie wir in anderen Untersuchungen gezeigt haben, innerhalb weniger Sekunden ihr Maximum erreicht.²

3. Der Einfluß von Calcium-Entzug, NEM und Eupaverin auf die durch Prenylamin ausgelöste 5-HT-Freisetzung aus Blutplättchen

Um den Einfluß von Calciumionen auf die Prenylamin-bedingte 5-HT-Freisetzung zu untersuchen, wurden die Blutplättchen vor der Prenylaminzugabe (10^{-4} m, Einwirkungszeit 10 min) in einem Trispuffer-NaCl-Medium mit 0.1% EDTA-Zusatz bei 24° inkubiert. Dabei zeigte sich, daß die Entfernung der Calciumionen keinen signifikanten Einfluß auf die durch Prenylamin ausgelöste 5-HT-Abgabe hatte. Ferner wurde der Einfluß von NEM und Eupaverin, welche sich als Hemmstoffe der Thrombin bedingten 5-HT-Freisetzung aus den Blutplättchen erwiesen hatten,⁶ auf die Prenylamin-bedingte Freisetzung untersucht. NEM und Eupaverin besaßen in einer Konzentration von 10^{-4} m keinen signifikanten Einfluß auf die durch Prenylamin

(10^{-4} m, Einwirkungszeit 10 min) in Tyrode bei 37° ausgelöste 5-HT-Freisetzung aus den Blutplättchen.

4. Der Einfluß von Prenylamin auf die 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen

Um die Frage zu klären, ob die Prenylamin-bedingte 5-HT-Abnahme der Blutplättchen über eine Beeinflussung der 5-HT-Aufnahme der Blutplättchen zustande kommt, wurde der Einfluß des Prenylamins auf die Aufnahmefähigkeit der Plättchen für 5-HT untersucht. Die 5-HT-Aufnahme in die Blutplättchen setzt sich aus einem aktiven und passiven Anteil zusammen. Der aktive Anteil der 5-HT-Aufnahme läßt sich graphisch aus der Gesamtaufnahmekurve ermitteln.⁷

Wir untersuchten im folgenden den Einfluß von Prenylamin auf den aktiven Anteil der 5-HT-Aufnahme in die Blutplättchen (Abb. 3). Durch 3 bzw. $5 \cdot 10^{-7}$ m Prenylamin kommt es zu einer deutlichen Hemmung des aktiven Anteils der 5-HT-Aufnahme in die Blutplättchen. Die Analyse des Vorganges nach Lineweaver-Burk ergibt das Vorliegen einer nicht-kompetitiven Hemmung.

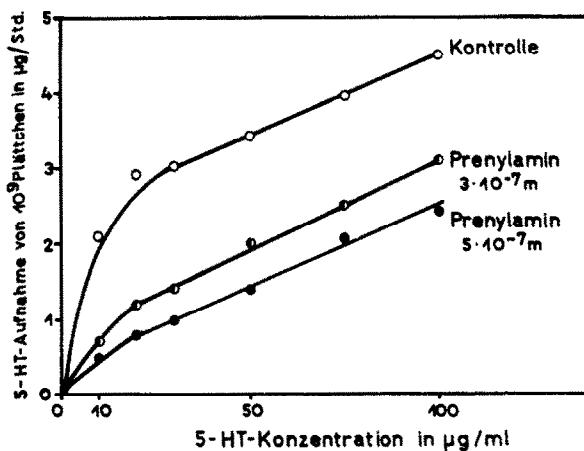


ABB. 3. Einfluß von Prenylamin auf die 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen nach 60 min langer Inkubation in Tyrode-Lösung bei 37°. Mittelwerte aus 3 Einzelversuchen.

5. Die Beziehungen zwischen Hemmung der 5-HT-Aufnahme und Freisetzung durch Prenylamin

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Aufnahmehemmung und Freisetzung von 5-HT durch Prenylamin wurden die Blutplättchen in Gegenwart unterschiedlicher 5-HT-Konzentrationen und steigenden Prenylaminmengen inkubiert (Abb. 4). Bei einer Konzentration von 25 µg 5-HT/ml im Suspensionsmedium, unter der die aktive 5-HT-Aufnahme der Plättchen ein Maximum erreicht, bewirken 10^{-7} m Prenylamin noch eine starke Hemmung der 5-HT-Aufnahme. In Gegenwart einer Konzentration von 100 µg 5-HT/ml, bei welcher der passive Anteil der 5-HT-Aufnahme überwiegt, kommt es unter 10^{-7} m Prenylamin zu keiner deutlichen Aufnahmehemmung. Bei Abwesenheit von 5-HT im Inkubationsmedium verursachen Prenylaminkonzentrationen von 10^{-7} m eine deutliche Abnahme des 5-HT-Gehaltes der Blutplättchen. Bei Anwesenheit von 5-HT im Inkubationsmedium kommt es

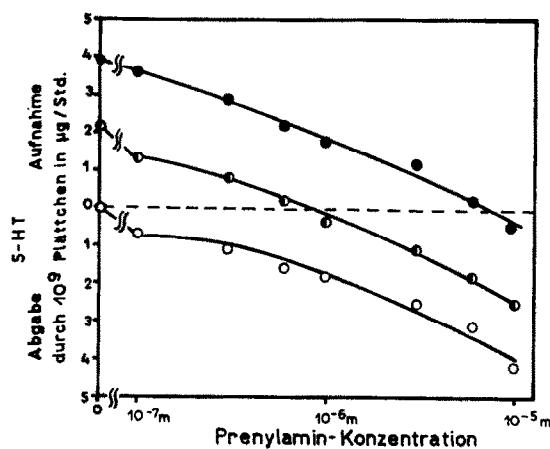


ABB. 4. Einfluß von Prenylamin auf den 5-HT-Gehalt von Kaninchenblutplättchen bei verschiedenen 5-HT-Konzentrationen im Inkubationsmedium nach 60 min langer Inkubation bei 37° (● = 100 µg 5-HT/ml, ○ = 25 µg 5-HT/ml, ○ = ohne 5-HT.) Mittelwerte aus 3 Einzelversuchen.

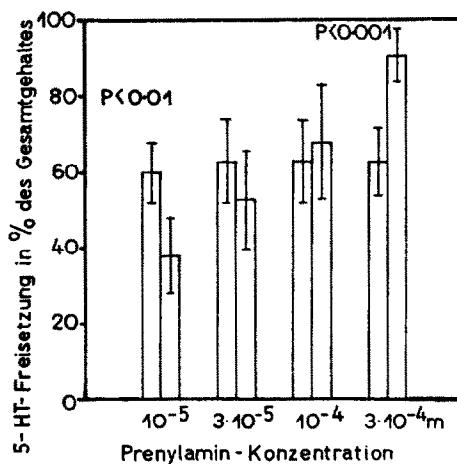


ABB. 5. Einfluß von Prenylamin auf die 5-HT-Abgabe aus subzellulären Strukturen von Kaninchenblutplättchen bei 30 min langer Inkubation bei 24° (Medium siehe Methodik.) Linke Säulen: Spontanfreisetzung. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3–4 Einzelversuchen.

erst nach Erhöhung der Prenylaminkonzentration auf 10^{-6} m zu einer 5-HT-Freisetzung aus den Blutplättchen.

6. Der Einfluß von Prenylamin auf den 5-HT-Gehalt isolierter subzellulärer Strukturen der Blutplättchen

Um die Frage nach dem Angriffspunkt des Prenylamins an den Blutplättchen weiter zu klären, wurden subzelluläre Strukturen von Kaninchenblutplättchen, unter denen sich auch die 5-HT-Speicherorganellen befinden,^{4, 8} mit Prenylamin inkubiert (Abb. 5). Unter diesen Bedingungen bewirkten niedrige Prenylaminkonzentrationen (10^{-5} m) eine signifikante Hemmung der spontanen 5-HT-Freisetzung, während

höhere Prenylaminkonzentrationen (3×10^{-4} m) zu einer Verstärkung der Spontanfreisetzung führen. Nach 30 min langer Inkubation mit 3×10^{-4} m Prenylamin enthalten die subzellulären Speicherorganellen nur noch 20% des 5-HT-Gehaltes der unbehandelten Kontrollen. Die ED₅₀ für die Freisetzung von 5-HT aus den Speicherorganellen durch Prenylamin liegt bei 2×10^{-4} m. Um die Besonderheiten der Prenylamin-bedingten Beeinflussung der 5-HT-Freisetzung aus isolierten Speicherorganellen herauszustellen, wurde der Einfluß von Chlorpromazin und Cinchocain, die in vorangegangenen Untersuchungen eine Wirkung auf den 5-HT-Gehalt der Blutplättchen gezeigt hatten,^{9, 5} auf die subzellulären Strukturen vergleichend untersucht. Chlorpromazin und Cinchocain bewirkten im Konzentrationsbereich von 10^{-6} bis 3×10^{-5} m bzw. 3×10^{-4} m keine Beeinflussung der spontanen 5-HT-Freisetzung aus den Speicherorganellen, bei 10^{-4} Chlorpromazin bzw. 10^{-3} m Cinchocain kam es zu einer deutlichen Erhöhung der Spontanfreisetzung.

BESPRECHUNG

Die Katecholamin-liberierende Wirkung des Prenylamins ist mehrfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Sie wurde sowohl bei Untersuchungen *in vivo*,¹⁰⁻¹³ als auch *in vitro* an isolierten Organen^{6, 10, 12, 14-19} studiert und führte u.a. zu der Annahme, daß die Wirkung des Prenylamins der eines indirekt wirkenden sympathicomimetischen Amins entspricht, welches durch seinen lipophilen Anteil außerdem noch eine erhöhte Affinität zu Zell- und Granulamembranen besitzt.^{15, 20} Über eine Freisetzung von 5-HT durch Prenylamin liegen bisher nur einige Berichte vor. So fanden Schöne u. Lindner¹¹ nach Prenylamin-Gaben eine Abnahme des 5-HT-Gehaltes in Hirn und Herz, und von Lembeck u. Held²¹ wurde gezeigt, daß es bei Einwirkung von Prenylamin auf isolierte Granula der chromaffinen Zellen der Darmschleimhaut zu einer Abnahme des 5-HT-Gehaltes dieser Aminspeicher kommt.

Die 5-HT-liberierende Wirkung des Prenylamins konnte zunächst in den vorliegenden Untersuchungen an Blutplättchen bestätigt werden. Prenylamin bewirkt bereits in relativ geringen Konzentrationen eine spezifische Abnahme des 5-HT-Gehaltes dieser Aminspeicher, die offenbar durch eine Beeinflussung der Aufnahme- und Speicherungsvorgänge für 5-HT zustande kommt. Höhere Prenylaminkonzentrationen führen darüber hinaus—vermutlich durch eine Schädigung der Zellmembran—auch zum Austritt anderer Zellbestandteile wie ATP und Histamin. Da diese relativ hohen Prenylaminkonzentrationen, wie in Untersuchungen von Grobecker u. Mitarb.¹⁵ gezeigt wurde, die Oberflächenspannung deutlich vermindern und hämolytische Effekte hervorrufen, ist anzunehmen, daß diese hohen Prenylamin-Dosen entsprechende Veränderungen der Plättchenmembran hervorrufen können. Auch der an den isolierten 5-HT-Speicherorganellen der Blutplättchen beobachtete 5-HT-freisetzende Effekt kann damit seine Erklärung finden. Die spezifische, nicht auf membranschädigender Wirkung beruhende 5-HT-Liberation durch niedrige Prenylaminkonzentrationen kommt dagegen vermutlich über eine Beeinflussung von Transportvorgängen für dieses Amin zustande. Sie erfolgt ähnlich wie die Wirkung des Reserpins auf die 5-HT-Speicherung der Plättchen.²²

Die 5-HT-Freisetzung aus Blutplättchen durch Prenylamin verläuft somit in vielen Punkten gleich oder ähnlich wie die durch dieses Pharmakon bedingte Aminfreisetzung aus den katecholaminhaltigen Zellen. Dies macht sich auch bei Versuchen zur Beeinflussung des Freisetzungsvorganges durch Calcium und SH-

Blocker bemerkbar. Wie wir bei vergleichenden Untersuchungen an Blutplättchen und Nebennierenmark gezeigt haben,⁶ ist auch die Katecholaminfreisetzung durch Prenylamin aus isoliert durchströmten Nebennieren des Rindes weder durch Calciumentzug noch durch NEM hemmbar.

ZUSAMMENFASSUNG

Prenylamin bewirkt in Konzentrationen von 10^{-7} m an eine zeitabhängige Abnahme des 5-HT-Gehaltes von Kaninchenblutplättchen, die über eine Beeinflussung von Transport- und Speichervorgängen für dieses Amin zustande kommt. Hohe Prenylaminkonzentrationen von 5×10^{-5} m an führen darüber hinaus zum Austritt von Histamin und ATP. Die Prenylamin-bedingte 5-HT-Liberation ist weder durch Entionisierung des Calciums noch durch Vorbehandlung der Plättchen mit NEM zu beeinflussen. Auch bei Einwirkung von Prenylamin auf isolierte 5-HT-Speicherorganelle der Plättchen verhält sich Prenylamin ähnlich wie Reserpin.

LITERATUR

1. F. MARKWARDT, *Ann. Med. exp. Fenn.* **46**, 239 (1968).
2. F. MARKWARDT und W. BARTHEL, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **249**, 176 (1964).
3. A. M. POISNER and J. M. TRIFARÓ, *Molec. Pharmac.* **4**, 196 (1968).
4. F. MARKWARDT, W. BARTHEL, A. HOFFMANN und E. WITTWER, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **251**, 255 (1965).
5. F. MARKWARDT, W. BARTHEL und E. GLUSA, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **253**, 336 (1966).
6. F. MARKWARDT, W. BARTHEL und E. GLUSA, *Med. exp. (Basel)* **18**, 176 (1968).
7. A. PLETSCHER, *Br. J. Pharmac.* **32**, 1 (1968).
8. J. P. TRANZER, M. DA PRADA and A. PLETSCHER, *Nature Lond.*, **212**, 1574 (1966).
9. W. BARTHEL, E. GLUSA und F. MARKWARDT, *Med. Pharm. exp. (Basel)* **16**, 39 (1967).
10. A. V. JUORIO and M. VOGT, *Br. J. Pharmac.* **24**, 566 (1965).
11. H. H. SCHÖNE und E. LINDNER, *Arzneimittel-Forsch.* **10**, 583 (1960).
12. H. H. SCHÖNE und E. LINDNER, *Klin. Wschr.* **40**, 1196 (1962).
13. H. O. OBIANWU, *Acta pharmacol. (Kbh.)* **23**, 383 (1965).
14. U. S. v. EULER, L. STJÄRNE and F. LISHAJKO, *Life Sci.* **3**, 35 (1964).
15. H. GROBECKER, P. HOLTZ, D. PALM, I. J. BAK and R. HASSSLER, *Experientia (Basel)* **24**, 701 (1968).
16. P. LUNDBORG, *Experientia (Basel)* **22**, 59 (1966).
17. A. PHILIPPU, D. PALM and H. J. SCHÜMANN, *Nature Lond.*, **205**, 183 (1965).
18. A. PHILIPPU, R. PFEIFER, H. J. SCHÜMANN und K. LICKFELD, *Arch. Pharmak. exp. Path.* **258**, 251 (1967).
19. A. PHILIPPU und H. PRZUNTEK, *Arch. Pharmak. exp. Path.* **258**, 238 (1967).
20. H. GROBECKER, D. PALM und P. HOLTZ, *Arch. Pharmak. exp. Path.* **260**, 379 (1968).
21. F. LEMBECK und H. HELD, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **253**, 409 (1966).
22. Ž. FUKS, R. G. LANMAN und L. S. SCHANKER, *Int. J. Neuropharmac.* **3**, 623 (1964).