

UNTERSUCHUNGEN AN FRAKTIONIERTEN PLÄTTCHENHOMOGENATEN—III* EIGENSCHAFTEN SEROTONINHALTIGER VESIKEL

E. WEBER, B. SCHMIDT, E. MORGESTERN und H. MONDT

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Heidelberg
Abteilung für Klinische Pharmakologie,
dem Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg
und dem
Institut für Zytologie und Elektronenmikroskopie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

(Received 29 September 1969; accepted 2 December 1969)

Abstract—From homogenized platelets of pigs a fraction (P_1) was obtained by centrifugation at 3000 g for 30 min a fraction (P_1) which contained 87 per cent of the structure-bound serotonin and ATP as well as numerous vesicles with electron-dense contents was isolated. After resuspension of this fraction in buffered saline solution, aliquots were incubated at 0° and 37° for 15 min under various conditions and subsequently separated into sedimentable particles and supernatant. Analyses of the serotonin content in both portions followed. More than 50 per cent of the bound serotonin was freed, with reduction in the electron-dense vesicle contents, during incubation. The rate of release did not change with addition of albumin, or potassium, magnesium and calcium ions in physiological concentrations or iproniazide (5×10^{-4} M). Tyramine (10^{-4} M to 10^{-2} M) and prenylamine (10^{-5} M to 5×10^{-4} M) caused a concentration-dependent release of structure-bound serotonin, whereas under phenoxybenzamine (10^{-5} M to 10^{-3} M) only up to 13 per cent more serotonin occurred in the supernatant than in the controls.

Thrombin and trypsin, with and without addition of calcium, as well as lysozyme and phospholipase D, had no effect on the content of bound serotonin. A series of membrane-damaging substances and procedures led to strong losses of vesicular serotonin. The serotonin vesicles from blood platelets represent a further type of amine-containing storage organelles.

BLASCHKO und Welch¹ sowie Hillarp *et al.*² beschrieben 1953 erstmals in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes Adrenalin-haltige Partikel. Inzwischen ist nachgewiesen, daß biogene Amine in einer Reihe von Geweben in Vesikeln oder Grana gespeichert werden, z.B. Adrenalin oder Noradrenalin in den Nerven und Ganglien des sympathico-adrenalen Systems, im Herzen und im Zentralnervensystem (Übersicht s. bei Holtz und Palm,³ Schümann *et al.*⁴). Auch Serotonin wurde im Zentralnervensystem, in enterochromaffinen Zellen des Darms^{5, 6} und in β -Zellen von Meerschweinchen-Pankreas⁷ sowie in Ganglien von Mercenaria (Venus) mercenaria⁸ in Partikeln gespeichert gefunden.

Über die Art der Verteilung des in Blutplättchen vorhandenen Serotonins wurden zunächst widersprüchliche Auffassungen bekannt. Nach Hughes und Brodie,⁹ Schulz *et al.*¹⁰ sowie Schulz¹¹ kommt Serotonin fast ausschließlich in freier Form in

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Blutplättchen vor. Dagegen stehen Ergebnisse von Baker *et al.*¹² Born,¹³ Buckingham und Maynert,¹⁴ Markwardt *et al.*,¹⁵ Wurzel *et al.*,¹⁶ Solatunturi und Paasonen,¹⁷ Weber *et al.*¹⁸ sowie Weber und Mondt,¹⁹ Minter und Crawford,²⁰ Holmsen *et al.*²¹, denen zufolge zumindest ein wesentlicher Anteil des Serotonin der Blutplättchen als Partikel-gebunden angesehen werden.

Neben diesen auf biochemischem Weg gewonnenen Resultaten wurde in neuester Zeit auch mit Hilfe der Elektronenmikroskopie der Nachweis für eine Bindung von Serotonin an Strukturelemente erbracht. Tranzer *et al.*²² wiesen Serotonin in Blutplättchen verschiedener Spezies in speziellen, submikroskopischen, vakuolenartigen Organellen nach, die von rundlicher Form und im allgemeinen kleiner (500–1500 Å) als die alpha-Granula sind. Ihr Inhalt, der nur selten den gesamten Vesikelquerschnitt ausfüllt, ist stark osmiophil. Angaben von May *et al.*²³ sowie eigene Untersuchungen²⁴ bestätigen diese Befunde.

Nach fraktioniertem Zentrifugieren von Blutplättchenhomogenaten fanden wir in einer als P₁ bezeichneten Fraktion 87% des strukturgebundenen ATP und Serotonin. Sie enthielt auch die Mehrzahl der elektronenoptisch als Serotonin-haltige Vesikel anzusprechenden Organellen.^{19, 24}

Die Wirkung verschiedener Substanzen auf die Aminfreisetzung intakter Blutplättchen ist gut untersucht. Nicht bekannt ist dagegen, inwieweit die Vorgänge an isolierten, Serotonin-haltigen Vesikeln aus Blutplättchen vergleichbar verlaufen. Die hier beschriebenen Versuche an Fraktion P₁ sollten ferner im Zusammenhang mit einer vorausgegangenen Mitteilung²⁵ zur Lösung der Frage beitragen, ob ähnlich wie in anderen Speicherorganellen eine gleichzeitige Beeinträchtigung des ATP- und Amingehaltes stattfindet. Dabei ergaben sich weitere Anhaltspunkte für ein gemeinsames Vorkommen von gebundenem ATP und Serotonin in der gleichen Plättchenstruktur, sowie eine Reihe von Daten, die ihrer Charakterisierung dienen.

METHODE

Die Gewinnung der Schweineplättchen, die Herstellung des Homogenates und der Fraktion P₁ erfolgten wie bei Weber *et al.*²⁶ beschrieben. Für die Inkubation wurden, sofern nicht anders vermerkt, 0.2 ml der Fraktion P₁ mit 3.7 ml Trismaleat-NaCl-Puffer und 0.1 ml Lösung der zu prüfenden Substanz versetzt. Die Inkubation erfolgte 15 Minuten in einem Wasserbad von 37°. Bei Inkubationsende wurden die Proben in ein Eisbad gebracht und nach etwa 2–3 Minuten Abkühlung in der Kühlzentrifuge bei 18,000 g 30 Minuten abgesetzt. Das Sediment wurde in 3 ml Aqua dest. aufgenommen und, ebenso wie aliquote Teile des Überstandes (mit Aqua dest. auf 3 ml aufgefüllt) einem Extraktionsverfahren unterworfen. Dieses sowie die quantitative Bestimmung erfolgten wie bei Weber *et al.*,²⁶ beschrieben. Alle Daten sind in µg Serotonin-Kreatin-Sulfat/0.2 ml Fraktion P₁ angegeben.

Präparation für die Elektronenmikroskopie

Aus der Fraktion P₁ wurde unmittelbar nach ihrer Gewinnung sowie nach 30 Minuten Inkubation bei 37° der sedimentierbare Anteil durch Zentrifugieren in der Kälte gewonnen. Nach Überführen des Sedimentes in eiskalte Fixierlösung I (Glutaraldehyd, 4% in Natrium-Kakodylatpuffer bei pH 7.3) erfolgte seine Zerkleinerung in Blöckchen von etwa 2 mm Kantenlänge. Nach 2 Stunden Fixierdauer wurde ebenso lange in Puffer mit Saccharosezusatz (0.22 M) gewaschen und dann 1 Stunde lang in

Fixierlösung II (OsO_4 -Lösung nach Caulfield) nachfixiert. Anschließend betteten wir die Blöckchen nach Entwässerung mit Aceton in Araldit ein. Die Kontrastierung erfolgte mit Bleizitrat nach Reynold (1963) oder mit Uranylacetat und nachfolgend Bleiz trat.

Verwendete Substanzen

Phospholipase A für analytische Zwecke (C. F. Boehringer & Söhne, GmbH, Mannheim); Iproniazid (Hoffman-La Roche AG, Basel). Die restlichen Substanzen sind bei Weber *et al.*²⁵ beschrieben.

ERGEBNISSE

Eine Auswertung aller im Verlauf der Untersuchung gemessenen Werte für Serotonin in Überstand und Sediment abgesetzter P_1 -Suspensionen, die mit Trismaleat gepufferter NaCl-Lösung hergestellt und 15 Minuten bei 0° bzw. 37° ohne weitere Zusätze gehalten worden waren, ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Es handelt sich um eine

TABELLE 1. DER SEROTONINGEHALT IN FRAKTION P_1 , DIE 15 MINUTEN BEI 0° BZW 37° GEHALTEN UND ANSCHLIEßEND DURCH ZENTRIFUGIEREN IN SEDIMENT UND ÜBERSTAND AUFGETRENNNT WURDE

	0° (n = 50)		37° (n = 73)	
	μg	%	μg	%
Überstand	3.73 ± 0.23	47.6	6.32 ± 0.29	79.4
Sediment	4.10 ± 0.36	52.4	1.66 ± 0.15	20.6
Σ	7.83 ± 0.33	100.0	7.98 ± 0.28	100.0

Errechnung der Durchschnittswerte der als "Kontrollen" bezeichneten Proben. Der partikelgebundene Anteil beträgt im Durchschnitt 52.4%. Dieses bedeutet, daß während der Herstellung der Suspension von P_1 aus dem durch Zentrifugieren gewonnenen Sediment des Homogenates etwa die Hälfte des Serotonins (in der Kälte!) freigesetzt wird. Vom verbliebenen vesikularen Serotonin ($4.10 \mu\text{g}$) werden während der 15-Min-Inkubationsperiode bei 37° 59% ($2.44 \mu\text{g} = 4.10 \mu\text{g} - 1.66 \mu\text{g}$) an das Außenmilieu abgegeben. Obwohl die Homogenate jeweils aus Plättchen von 3–5 Tieren hergestellt werden, schwanken sowohl die Absolutwerte wie auch die prozentuale Aufteilung in "freies" und "gebundenes" Serotonin nicht unerheblich. Dagegen sind Richtung und Ausmaß der unten beschriebenen Verschiebungen in der Verteilung von Serotonin unter der Einwirkung bestimmter Agenzien gut reproduzierbar.

Während der Inkubation kommt es offensichtlich nicht zu einem Abbau von Serotonin, wie die gleichbleibende Summe des Serotonins aus Sediment und Überstand erkennen läßt.

Zur Überprüfung des Einflusses dreier verschiedener Puffersysteme auf die spontane Serotoninabgabe im Verlauf einer Inkubationsperiode von 15 Minuten bei 37° wurden Plättchen unmittelbar nach ihrer Isolierung in 0.9% NaCl-Lösung, die mit Trismaleat, Tris-HCl oder Imidazol-HCl gepuffert war, suspendiert, dreimal gewaschen und homogenisiert. Es zeigte sich, daß bei Anwendung von Trismaleat nach der

Inkubation am meisten, nach Imidazol am wenigsten Serotonin im Sediment verbleiben war. Aus diesem Grunde wurden die folgenden Versuche unter Zusatz von Trismaleatpuffer ausgeführt.

Der zeitliche Verlauf der Abgabe von Serotonin aus dem Sediment in den Überstand ist in Abb. 1 dargestellt. Man erkennt, daß der größte Verlust an Serotonin aus dem Sediment innerhalb der ersten 5 Minuten erfolgt. Eine doppellogarithmische Darstellung ergibt eine Gerade. Die Ablösung des Serotoninins von der Struktur ist, wie aus Tabelle 2 hervorgeht, temperaturabhängig. Sowohl die Zeit wie Temperaturab-

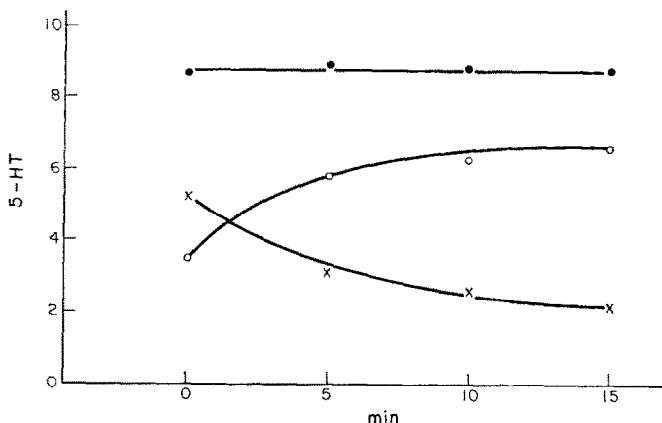


ABB. 1. Abgabe von Serotonin aus dem Sediment (X—X) und gleichzeitiger Anstieg im Überstand (O—O). Die oberste Kurve (●—●) gibt den Verlauf der Summe beider Größen wieder. Ordinate: μg Serotonin-Kreatinininsulfat/0.2 ml Fraktion P₁.

TABELLE 2. DER SEROTONINGEHALT IM ÜBERSTAND VON FRAKTION P₁ NACH 15 MINUTEN INKUBATION BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN. MITTELWERTE AUS 3 VERSUCHEN

t°	Serotonin
0	1.58
10	1.79
20	1.88
30	2.22
37	2.53

hängige Freisetzung von Serotonin entspricht weitgehend den von Da Prada und Pletscher²⁷ an isolierten Vesikeln aus Kaninchenplättchen erhobenen Befunden. Da die Ansätze während der Inkubation kräftig mit einer Frequenz von etwa 80/min geschüttelt wurden, prüften wir in zwei Versuchen bei 37°, ob bei Unterlassen des Schüttelns eine geringere Abgabe von Serotonin in den Überstand erfolgt. Es zeigte sich kein Unterschied zu den geschüttelten Proben.

Es erschien möglich, durch Zusatz von Albumin über eine Stabilisierung der isolierten Partikel eine bessere Erhaltung des Serotoninanteiles im Sediment bei 37° zu erzielen. Eine günstige Beeinflussung war jedoch bei keiner der angewandten Albuminkonzentrationen zu erreichen (Tabelle 3).

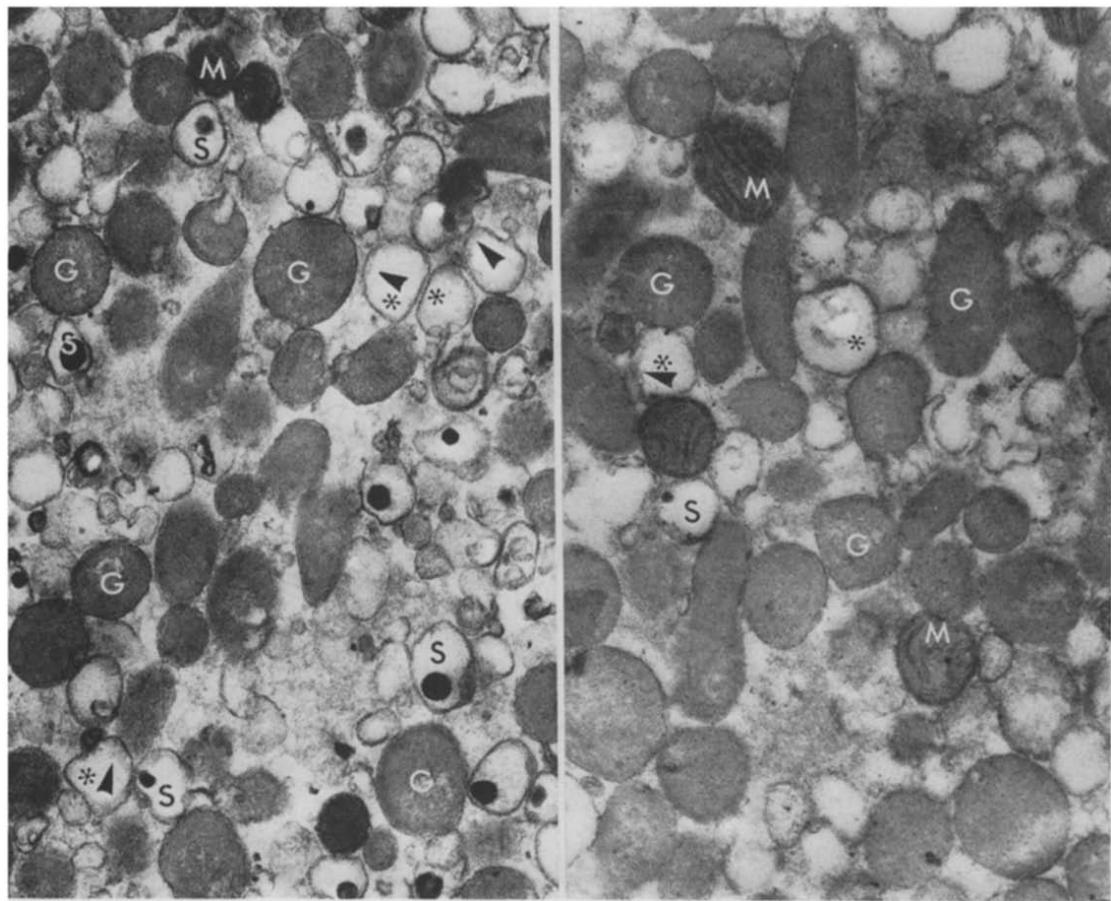


ABB. 2. Elektronenoptische Darstellung von Fraktion P₁ (Uranyl-Bleizitrat-Kontrast).

(a) Zahlreiche Vesikel, häufig mit elektronendichitem Einschluß in frisch gewonnener Fraktion P₁.
(b) Deutliche Abnahme der elektronendichten Einschlüsse nach 30 Minuten Inkubation bei 37°.
Weitere Erklärungen siehe Text.

TABELLE 3. FEHLENDER EINFLUß DES ZUSATZES VON ALBUMIN (%) AUF DIE VERTEILUNG VON SEROTONIN IN FRAKTION P₁. KO = KONTROLLEN

	Ko	1% (n = 2)	2%	Ko (n = 5)	5%
Überstand	6.00	6.20	6.40	3.91	4.09
Sediment	2.70	2.67	2.70	1.17	1.77
Σ	8.70	8.87	9.10	5.08	5.86

Abbildung 2 a zeigt eine elektronenoptische Darstellung von frisch gewonnener Fraktion P₁. Sie besteht aus Vesikeln (S) mit außerordentlich elektronendichten, runden Einschlüssen verschiedener Größe. Der Innenseite der Vesikelmembran haftet meist ein Belag aus weniger elektronendichtem Material an (Pfeil). Ein Teil dieser charakteristischen Vesikel weist keine dichten Einschlüsse auf (Stern). Hierfür bieten sich zwei Möglichkeiten der Erklärung an: Entweder der Einschluß befindet sich außerhalb der Schnittebene, was bei seiner häufig exzentrischen Lage oft zutreffen dürfte, oder es ist eine Abgabe des Vesikelinhaltes vorausgegangen. Weiterhin kommen in der Fraktion alpha-Granula (G) und Mitochondrien (M) vor. Abb. 2 b unterscheidet sich lediglich durch die auffallend geringe Zahl von Vesikeln mit elektronendichtem Einschluß von dem voranstehenden Bild. Im Verlauf einer 30 Minuten-Inkubation bei 37° ist es der chemischen Analyse nach zu einem nahezu vollständigen Verlust (95 %) an Serotonin gekommen. Parallel hierzu verschwindet das morphologische Substrat des Serotonins, der elektronendichte Einschluß. Es handelt sich demnach um eine Abgabe von Serotonin durch die Vesikelmembran, nicht aber um eine Lyse der Speicherorganellen.

Kalium-, Calcium- und Magnesiumionen

Es ist nicht bekannt, ob der Kationengehalt des Suspensionsmilieus für die Freisetzung von Serotonin aus isolierten Blutplättchenorganellen eine Rolle spielt. Aus Tabelle 4 a geht hervor, daß bei einer Endkonzentration von 5.6 mM KCl im Mittel von 7 Versuchen kein Unterschied zur Kontrolle besteht, daß aber die Inkubation in 56 mM KCl-Lösung das gebundene Serotonin freisetzt. Dieses trifft für jeden der vier durchgeführten Versuche zu.

Weder 10⁻²M Calcium noch die Kombination der gleichen Calciumkonzentration mit 5.6 × 10⁻³M Kalium bewirkten Unterschiede zu den Kontrollansätzen (Tabelle 4b). Auch mit Magnesiumionen (10⁻²M und 10⁻³M) wurden keine sicheren Abweichungen von den Kontrollwerten erreicht (Tabelle 4c). In 3 Versuchen bei 25° mit 10⁻²M Magnesium fand sich in jedem Fall deutlich mehr Serotonin im Sediment und weniger im Überstand als in den Kontrollen (Tabelle 4d).

Amin-freisetzende Substanzen

Tyramin verminderte konzentrationsabhängig den strukturgebundenen Anteil des Serotonins. Einwirkung von 10⁻²M setzte das strukturgebundene Serotonin völlig, 10⁻⁴M Tyramin etwa zur Hälfte frei (Tabelle 5a). Konzentrationen von 10⁻⁵M und 10⁻⁶M blieben ohne Effekt. Die Anreicherung von Serotonin im Überstand folgt bei halblogarithmischem Darstellung einer Geraden (Abb. 3). Das gleiche Phänomen ergibt sich auch bei Anwendung von Prenylamin (Abb. 3). Der Amin-freisetzende Effekt

TABELLE 4. DIE SEROTONINVERTEILUNG IN FRAKTION P₁ UNTER ZUGABE VON IONEN IN DEN ANGEgebenEN KONZENTRATIONEN. KO = KONTROLLEN

(a)	Ko 5.6 mM (n = 7)	KCl	Ko (n = 4)	KCl 5.6 mM
Überstand	5.84	5.91	6.11	7.05
Sediment	1.04	0.92	1.81	0.97
Σ	6.88	6.83	7.92	8.02
(b)	Ko $\left\{ \begin{array}{l} \text{K}^+ 5.6 \times 10^{-3} \text{ M} \\ \text{Ca}^{2+} 2 \times 10^{-2} \text{ M} \end{array} \right.$ (n = 2)	Ko (n = 4)	$\text{Ca}^{2+} 10^{-2} \text{ M}$	
Überstand	4.69	4.72	4.88	4.81
Sediment	2.81	2.81	2.62	2.78
Σ	7.50	7.63	7.60	7.59
(c)	Ko (n = 6)	Mg^{2+} 10^{-2} M	Ko (n = 2)	Mg^{2+} 10^{-3} M
Überstand	8.10	7.95	5.62	5.88
Sediment	1.45	1.61	1.60	1.06
Σ	9.55	9.56	7.22	6.94
(d)	Ko 25°	Mg^{2+} 10^{-2} M (n = 3)		
		7.89	5.66	
		1.14	2.70	
		9.03	8.36	

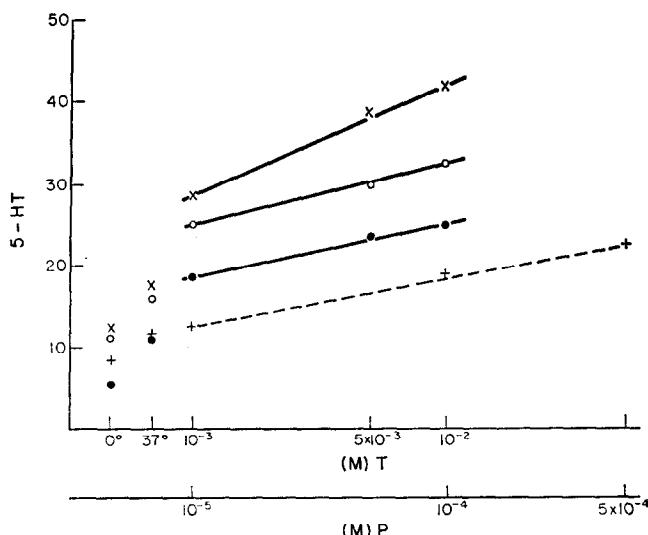
ABB. 3. Dosiswirkungsbeziehung der Anreicherung von Serotonin bei 37° im Überstand der Fraktion P₁ unter dem Einfluß von Tyramin (T; durchgezogene Linien; 3 Einzelversuche) und Prenylamin (P; unterbrochene Linie; Mittelwerte aus 2 Versuchen). Ordinate: μg Serotonin-Kreatininsulfat pro 0.2 ml Fraktion P₁.

TABELLE 5. DAS VERHALTEN DES SEROTONINS IN FRAKTION P₁ NACH ZUSATZ VON TYRAMIN (n = 6) UND PHENOXYBENZAMIN (n = 5)

	(a) Tyramin				(b) Phenoxybenzamin (M)				
	Ko	10 ⁻² M	Ko	10 ⁻⁴ M	0°	37°	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Überstand	6.51	7.96	7.07	7.74	0.93	2.09	2.20	2.39	2.32
Sediment	1.14	0.05	1.48	0.87					
Σ	7.65	8.01	8.55	8.61					

TABELLE 6. DIE SEROTONINVERTEILUNG IN FRAKTION P₁ NACH ZUGABE VON ENZYmen UND EINWIRKUNG MEMBRANABILISIERENDEN SUBSTANZEN ODER EINGRIFFE

(a) (n = 4)	Ko	Thrombin 5 E/ml Ca ²⁺ 10 ⁻² M			Ca ²⁺ 10 ⁻² M
		Thrombin 5 E/ml	Thrombin 5 E/ml Ca ²⁺ 10 ⁻² M	Ca ²⁺ 10 ⁻² M	
Überstand	2.80	2.73	2.43	2.54	
Sediment	2.97	3.90	4.34	3.32	
Σ	5.76	6.63	6.77	5.86	

(b) (n = 8)	Ko	Trypsin			
		500 E/ml	500 E/ml Ca 10 ⁻³ M	100 E/ml	100 E/ml Ca 10 ⁻³ M
Überstand	7.16	6.49	7.10	7.22	7.35
Sediment	1.67	2.00	1.55	1.48	1.25
Σ	8.83	8.49	8.65	8.70	8.60

(c) (n = 4)	Ko	Lysozym			
		500 E/ml	500 E/ml Ca 10 ⁻³ M	100 E/ml	100 E/ml Ca 10 ⁻³ M
Überstand	6.18	6.17	5.90	5.85	5.70
Sediment	1.45	1.48	1.69	1.74	1.94
Σ	7.63	7.65	7.59	7.59	7.64

(d) (n = 5)	Ko	Lipase 0.1 mg/ml			P-Lipase A 0.05 E/ml	P-Lipase D 0.05 E/ml
		3.64	3.50	2.80		
Überstand	2.69	1.97	1.62	2.39		
Sediment	2.38	5.61	5.12	5.19		
Σ	5.07					

(e) (n = 3)	25° Ko	Digitonin 10 ⁻⁵ M			37° Ko	Digitonin 7 × 10 ⁻³ M
		8.00	2.60	5.42		
Überstand	7.89	1.06	2.36	0.00		
Sediment	1.14	9.06	4.96	5.42		
Σ	9.03					

(f) (n = 4)	Ko	Frieren/Tauen		
		5.45	6.87	
Überstand	5.30	1.69		
Sediment	8.75	8.56		
Σ				

(g) (n = 4)	0° Ko	Aqua destillata		
		37°	0°	37°
Überstand	2.39	6.08	7.40	7.49
Sediment	5.12	1.81	0.43	0.15
Σ	7.51	7.89	7.83	7.64

von Prenylamin ist schwächer ausgeprägt als derjenige von Tyramin Phenoxybenzamin dagegen führte in 5 Versuchen bei Anwendung von $10^{-5}M$ zu keiner vermehrten Abgabe von gebundenem Serotonin. Bei $10^{-4}M$ fanden sich durchschnittlich 13% (maximal 18.8%), bei $10^{-3}M$ 11% mehr Serotonin im Überstand als bei den Kontrollen (Tabelle 5b).

Enzyme und Membran-labilisierende Substanzen oder Eingriffe

Aus den beiden folgenden Tabellen ist ersichtlich, daß weder hohe Konzentrationen von Thrombin noch von Trypsin allein oder in Kombination mit Calciumionen nennenswerte Veränderungen gegenüber den Kontrollen verursachten (Tabelle 6a und 6b). Auch Lysozym, an Fraktion P₁ getestet, führte zu entsprechenden Ergebnissen (Tabelle 6c).

Unter Lipase und Phospholipase A kam es in jedem von 5 Versuchen zu einer deutlichen Anreicherung des Amins im Überstand bei gleichzeitiger Abnahme des gebundenen Serotonins, während Phospholipase D keine Wirkung zeigte (Tabelle 6d).

Digitonin wurde bei 37° an insgesamt 11 verschiedenen P₁-Fraktionen getestet, ohne daß ein Effekt nachweisbar wurde (im Mittel 7.03 µg Serotonin im Überstand gegenüber 7.00 µg in den Kontrollansätzen). Weil in dieser Versuchsreihe überdurchschnittlich hohe Verluste an gebundenem Serotonin in den Kontrollen aufgetreten waren, wiederholten wir die Experimente bei 25°, erhielten aber kein anderes Ergebnis als bei 37° (Tabelle 6e). Bei Steigerung der Digitoninkonzentration auf $7 \times 10^{-3}M$ beobachteten wir allerdings, ebenso wie in früheren Versuchen an strukturgebundenem ATP²⁴ nur noch das Vorkommen von "löslichem" Serotonin (Tabelle 6e).

Nach 5maligem Einfrieren und Auftauen war im Sediment der Fraktion P₁ durchschnittlich nur etwa noch die Hälfte der Mengen nachweisbar, die sich in der über die Dauer des Vorganges bei 0° gehaltenen Kontrollen vorfand (Tabelle 6f). Der Verlust betrug in einem Versuch 31%, in den anderen Experimenten lag er deutlich darüber.

Die einschneidende Auswirkung auf den strukturgebundenen Serotoninanteil übte eine mit Aqua dest. ausgelöste Osmolyse aus (Tabelle 6g). Es fand sich nahezu der gesamte Serotoninbestand im Überstand, auch wenn die Proben bei 0° gehalten worden waren.

SH-Gruppen-Inhibitoren

Monojodessigsäure in der kleineren der von uns angewandten Konzentration, $10^{-3}M$, kam in unserer Anordnung sicher kein Effekt zu, während bei einer Endkonzentration von $10^{-2}M$ im Sediment der Serotoninspiegel in allen 5 Versuchen tiefer als in den Kontrollen lag (Tabelle 7a).

Nach Tabelle 7b bewirkte *N*-Äthylmaleimid (NEM) lediglich in der Endkonzentration von $10^{-2}M$ einen Abfall des strukturgebundenen Serotonins. Konzentrationen von $10^{-3}M$ und—in der Tabelle nicht aufgeführt— $10^{-4}M$ waren ohne Wirkung auf den Serotoninbestand.

Aus Tabelle 7c ist zu ersehen, daß Mersalyl in einer Endkonzentration von $10^{-3}M$ und $10^{-4}M$ das gesamte strukturgebundene Serotonin freisetzte, während Konzentrationen von $10^{-6}M$ und $10^{-5}M$ keinen Einfluß zeigten.

Mersalyl störte stark die Serotoninbestimmungsmethode. Es mußten deshalb für jede der 4 untersuchten Mersalylkonzentrationen Eichkurven aufgestellt werden, um den durch Mersalyl verursachten Fehler ausschalten zu können. Die angegebenen

TABELLE 7. DIE WIRKUNG VON SH-GRUPPEN-INHIBTOREN AUF DIE SEROTONIN-VERTEILUNG IN FRAKTION P₁

(a)	Ko (n = 5)	Monojodessigsäure	
		10 ⁻² M	10 ⁻³ M
Überstand	8.84	9.29	8.50
Sediment	1.28	0.85	1.38
Σ	10.12	10.14	9.88

(b)	Ko	NEM (n = 2)	Ko	NEM
			10 ⁻² M	10 ⁻³ M (n = 2)
Überstand	2.60	3.84	4.36	4.28
Sediment	2.36	0.69	1.63	1.67
Σ	4.96	4.53	5.99	5.95

(c)	Ko	10 ⁻³ M (n = 5)	Mersalyl			
			Ko	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M
Überstand	5.77	7.02	3.89	6.01	4.00	4.03
Sediment	1.74	0	2.30	0.27	2.38	2.27
Σ	7.51	7.02	6.19	6.28	6.38	6.30

TABELLE 8. DER EFFEKT VON IPRONIAZID AUF SEROTONIN IN FRAKTION P₁

(n = 1)	Ko	Iproniazid	
		5 × 10 ⁻⁴ M	5 × 10 ⁻⁵ M
Überstand	4.31	4.59	4.42
Sediment	2.92	2.33	2.80
Σ	7.23	6.92	7.22

Werte wurden unter Verwendung dieser Eichkurven, die jeweils linear verliefen, errechnet.

Iproniazid

Es interessierte vor allem, ob die Einwirkung von Iproniazid zu einer Erhöhung der Gesamtserotoninmenge in Fraktion P₁ führt. Dieses war nicht der Fall, so daß kein Hinweis für das Vorkommen einer Monoaminoxydase in Fraktion P₁ gegeben ist (Tabelle 8). Damit in guter Übereinstimmung steht die Tatsache, daß die Gesamtserotoninmenge nach der Inkubation bei 37° nicht unter den Bestand der 0°-Kontrolle abfiel (vergl. Tabelle 1). In den untersuchten Konzentrationen setzte Iproniazid geringe Mengen des strukturgebundenen Serotonin frei.

DISKUSSION

Der lösliche Anteil an Serotonin in frisch gewonnenen Fraktionen aus Schweineplättchen liegt mit durchschnittlich 50%²⁸ sicher über den *in vivo* anzutreffenden Werten. Dies schließen wir aus der ausgeprägten Labilität der hier untersuchten

Serotonin-haltigen Vesikel gegenüber Manipulationen und Inkubation in Elektrolytmilieu, bei der innerhalb 15 Minuten durchschnittlich 60 % des gebundenen Anteiles frei wurden.

In chromaffinen Grana aus Nebennierenmark sollen bis zu 90 % der Katecholamine und in Rindermilznerven bis zu 60 % Noradrenalin unter optimalen Bedingungen gebunden vorliegen.^{28, 29} Potter und Axelrod^{30, 31} bestimmten den entsprechenden Noradrenalinanteil in Rattenherzen zu 77 %.

Die Empfindlichkeit der Serotoningrana ist—im Gegensatz zu intakten Blutplättchen—eine Eigenschaft, die sie mit Speicherorganellen einiger Gewebe teilen, z.B. Granulasuspensionen aus Rindermilznerven und Synaptosomen aus Rinderhirn.^{32, 33} Auch Noradrenalingrana aus Meerschweinchenherzen sowie aus sympathischen Ganglien weisen eine hohe spontane Abgabe auf.^{34, 35} Entsprechende Grana aus Nebennierenmark und Hypothalamus sowie die Serotoningrana enterochromaffiner Zellen gehören dagegen zu den aus ungeklärten Gründen stabileren Vertretern von Speicherstrukturen.^{36–38}

Hohe Kaliumdosen stimulieren *in vivo* die Katecholaminabgabe aus dem Nebennierenmark.³⁹ Auch *in vitro* werden aus intakten Zellen, z.B. Nebennierenmarkschnitten, Synaptosomen im Rattenzwerchfell, intakten Kaninchenplättchen ebenso wie aus den isolierten Plättchenvesikeln durch Anwendung hoher Kaliumkonzentrationen bzw. Ersatz von Natrium des Inkubationsmilieus durch Kalium, biogene Amine frei.^{40–42} Calcium entleert biogene Amine aus isolierten Grana des Nebennierenmarkes, des Hypothalamus und enterochromaffiner Darmzellen.^{37, 38, 43, 44} Markwardt *et al.*¹⁵ sowie Pletscher *et al.*⁴⁵ beschrieben im Gegensatz zu unseren Beobachtungen entsprechende Befunde an subzellulären serotoninhaltigen Strukturen aus Kaninchenplättchen nach Zugabe von Calcium. An Noradrenalingrana aus Herz und Nerven wiederum bleibt Calcium ohne Effekt.³⁴ Ähnlich wie Calcium führt auch Magnesium in Versuchen von Schumann und Philippu⁴⁶ zu einer vermehrten Freisetzung von Noradrenalin aus isolierten Nebennierenmarkgrana des Rindes. Andererseits beschreiben Greenberg und Kolen⁴⁴ an Nebennierenmarkgrana der Ratte sowie Lembeck und Held³⁸ an Serotoningrana des Darms eine Hemmung der Aminabgabe durch Magnesium, die wir nach $10^{-2}M$ bei 25° ebenfalls beobachteten.

In unseren Versuchen verursacht Tyramin und Prenylamin konzentrationsabhängig eine Abgabe von Serotonin in das Außenmilieu. Phenoxybenzamin erweist sich in dieser Hinsicht nur als schwach wirksam. Tyramin führt nicht nur an der isoliert durchströmten Nebenniere zu Noradrenalinfreisetzung, sondern auch an suspendierten Grana des Markes, an isolierten Noradrenalin-Partikeln aus Milznerven und mikrosomalen Herzfraktionen.^{30, 31, 36, 47–52a} Der Serotoninbestand von intakten Kaninchenplättchen, in Elektrolytmilieu bei 37° inkubiert, entleert sich unter dem Einfluß von Tyramin ebenfalls weitgehend.^{52b–55} Die selektive Verarmung der Blutplättchen an Serotonin unter Tyramin, gekoppelt mit dem vollständigen Verlust des elektronendichten Materials der durchschnittlich 1700 Å messenden Vesikel im elektronenoptischen Bild, ist einer der Hinweise, der zur Identifikation des Vesikelinhaltes geführt hat.⁵⁶ Schumann und Philippu⁴⁸ haben gefunden, daß in Nebennierenmarkgrana Noradrenalin und Tyramin in einem stöchiometrischen Verhältnis (1:1) ausgetauscht werden und, daß die Noradrenalinfreisetzung in diesem Fall ohne eine gleichzeitige ATP-Abgabe vor sich geht. In isolierten Grana aus Blutplättchen induziert Tyramin dagegen einen konzentrationsabhängigen ATP-Verlust.²⁵

Nach Prenylamingabe läßt sich *in vivo* eine Verminderung der Konzentration verschiedener biogener Amine nachweisen.^{57, 58} Auch *in vitro* kommt es in isolierten Speicherorganellen von Nebennierenmark, Nerven, Herz, Hypothalamus und Ganglien zu einem Verlust an Noradrenalin.^{34, 35, 37, 59, 60} Bei Anwendung kleiner Konzentrationen ($\leq 6 \times 10^{-5}$ M) wird im Gegensatz hierzu eine Hemmung der Aminabgabe beobachtet.⁶⁰ Isolierte Grana enterochromaffiner Zellen wiederum verloren ihren Serotoninengehalt unter Prenylaminzusatz bis 5×10^{-4} M bereits bei 0° .³⁸

Serotonin grana aus Blutplättchen verhalten sich nach Zugabe von Phenoxybenzamin (10^{-5} bis 10^{-3} M) anders als Noradrenalingrana des Nebennierenmarkes. Während wir eine nur geringfügige Abnahme des Serotonin bei teilweise sogar leicht erhöhtem ATP-Gehalt²⁵ feststellen konnten, beobachteten von Euler *et al.*,⁶⁰ eine Abgabe von Noradrenalin und ATP im gleichen molaren Verhältnis, wie es in isolierten Grana vorliegt.

Thrombin, vor allem in Kombination mit Calcium, induziert in intakten Blutplättchen, unabhängig von einer Fibrinausfällung im äußeren Milieu, eine Folge von Veränderungen, darunter einen kompletten Serotoninverlust (Literaturübersicht s. bei Marcus und Zucker;⁶¹ Weber,⁶²). Auch andere Proteasen wie Trypsin, Papain und Subtilisin u.a. erzeugen die gleichen Erscheinungen.^{15, 62, 63} Von Bedeutung für die Klärung des Abgabemechanismus ist, daß der Serotoninengehalt isolierter Partikel aus Blutplättchen weder durch Thrombin noch durch Subtilisin oder Trypsin herabgesetzt wird.^{15, 19, 64} Lembeck und Held³⁸ konnten an isolierten Serotonin grana enterochromaffiner Zellen mit hohen Chymotrypsinkonzentrationen ebenfalls keine Serotoninabgabe erreichen.

Die ausbleibende Wirkung der Protease auf den strukturgebundenen Serotonin- und ATP-Gehalt²⁵ in Fraktion P₁ beweist, daß eine schwerwiegende Verunreinigung durch intakte Blutplättchen in unseren Versuchen nicht vorliegt.

Das an Mucopolysaccharidgruppen angreifende Ferment Lysozym erwies sich in unseren Versuchen nicht als wirksam, ebenso wenig Phospholipase A und—ähnlich wie die Serotonin grana enterochromaffiner Zellen—auf Lipase mit Abgabe des Amins.³⁸ Phospholipase D und Lipase veränderten in intakten Schweinplättchen den Glykogengehalt, einen nach unseren Erfahrungen ähnlich wie ATP ansprechenden Parameter, ebenso wenig wie ATP selbst.⁶⁵ Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit elektronenoptischen Beobachtungen von Hovig.⁶⁶

Das Verhalten von gebundenem Plättchenserotonin gegenüber wiederholtem Einfrieren und hypotonem Milieu ist etwa vergleichbar mit demjenigen von Noradrenalin in isolierten Grana des Nebennierenmarkes. Noradrenalinvesikel aus Milznerven oder Rattenherzen sowie synaptische Vesikel erweisen sich gegenüber beiden schädigenden Eingriffen als resistenter (Lit. s. bei Potter,⁶⁷ und Stjärne.⁶⁸).

Die drei an SH-Gruppen angreifenden Agenzien Monojodessigsäure, NEM und Mersalyl führten ebenfalls zur Abnahme des granulären Plättchenserotoninins. Aus diesen Befunden auf eine Beeinträchtigung durch SH-Gruppen-Hemmer zu blockierende Mechanismen des Amintransports zu schließen (vergl. Taugner und Hasselbach⁶⁹ erscheint verfrüht, um so mehr als die angewandten Konzentrationen an Monojodessigsäure und NEM sehr hoch liegen (10^{-2} M)).

Monoaminoxydase ist nach Untersuchungen von Paasonen und Solatunturi⁷⁰ in Blutplättchen vom Menschen, Hund, Rind und Kaninchen, nicht dagegen in den aus Blut von Pferden, Katzen und Ratten isolierten Zellen enthalten. Latt *et al.*⁷¹

bestimmten in Plättchen von Meerschweinchen und Kaninchen eine deutlich niedrigere Monoaminoxydaseaktivität als in denjenigen von Menschen. Auch sie stellten das Fehlen des Enzyms in Hund- und Rattenplättchen fest. Über das Vorkommen in Blutplättchen vom Schwein liegen uns keine Angaben vor. Auf Grund unserer Beobachtungen—keine Veränderung des Gesamtserotoningehaltes im Verlauf der Inkubation, fehlender Einfluß von Iproniazid—nehmen wir an, daß auch Schweinplättchen frei von Monoaminoxydase sind. Die von uns angewandten Iproniazidkonzentrationen lagen erheblich über den zur Hemmung von Monoaminoxydase in der Leber oder menschlichen Blutplättchen notwendigen.⁷²

Beim Vergleich der Wirkung der getesteten Substanzen bzw. Eingriffe auf strukturgebundenes Serotonin und ATP fanden wir eine vollständige Übereinstimmung (vergl. Weber *et al.*,²⁵). Über die sich daraus ergebenden Konsequenzen sowie über zusätzliche Experimente zu diesem Problem berichten wir in einer weiteren Mitteilung.⁷³

Wir glauben, mit den mitgeteilten Befunden, auch in Verbindung mit den in der vorangegangenen Mitteilung beschriebenen Ergebnissen,²⁵ gezeigt zu haben, daß eine prinzipielle Unterscheidung der serotonininhaltigen Strukturen aus Blutplättchen von anderen Speicherorganellen biogener Amine nicht getroffen werden kann. Andererseits ist der in Blutplättchen vorliegende Granulatyp in der Gesamtheit seiner uns bis heute bekannten Eigenschaften nicht identisch mit den bisher untersuchten Vesikeln oder Grana. Er muß als weitere Variante einer serotonininhaltigen Ultrastruktur den bisher beschriebenen Speicherorganellen zur Seite gestellt werden.

Zusammenfassung—Aus homogenisierten Plättchen vom Schwein wurde durch Zentrifugieren (3000 g; 30 Minuten) eine Fraktion (P_1) gewonnen, welche 87% des strukturgebundenen Serotonins und ATP sowie zahlreiche Vesikel mit elektronendichthem Inhalt enthielt. Nach Resuspendieren dieser Fraktion in gepufferter Kochsalzlösung wurden aliquote Teile bei 0° und 37° 15 Minuten unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und anschließend in sedimentierbare Partikel sowie Überstand aufgetrennt. In beiden Anteilen erfolgten Analysen des Serotoningehaltes.

Mehr als 50% des gebundenen Serotonins wurden unter Abnahme des elektronendichten Vesikelinhaltes während der Inkubation in den Überstand frei. Die Abagberate erfuhr keine Veränderung durch Zusatz von Albumin sowie Kalium-, Magnesium- und Calcium-Ionen in physiologischen Konzentrationen oder Iproniazid (5×10^{-4} M).

Tyramin (10^{-4} M bis 10^{-2} M) und Prenylamin (10^{-5} M bis 5×10^{-4} M) verursachten eine konzentrations abhängige Freisetzung von strukturgebundenem Serotonin, während unter Phenoxybenzamin (10^{-5} M bis 10^{-3} M) nur bis zu 13% mehr Serotonin im Überstand vorlag als in den Kontrollen.

Thrombin und Trypsin, mit und ohne Calciumzusatz, setzten auch in hohen Konzentrationen ebenso wenig vermehrt gebundenes Serotonin frei wie Lysozym und Phospholipase D.

Eine Reihe von membranlabilisierenden Substanzen und Maßnahmen führte zu starken Verlusten des vesikularen Serotonins (Phospholipase A, Digitonin, Osmolyse, mehrfaches Frieren und Tauen), ebenso Inhibitoren von SH-Gruppen (Monojodessigsäure, NEM und Mersalyl).

Die Serotonin-Vesikel aus Blutplättchen stellen eine weitere Variante Amin-haltiger Speicherorganellen mit ihnen entsprechenden Charakteristika dar. Eine völlige Identität der Eigenschaften mit einem bisher bekannten Vesikel- oder Granatyp liegt nicht vor.

LITERATUR

1. H. BLASCHKO und A. D. WELCH, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **219**, 17 (1953).
2. N. Å. HILLARP, S. LAGERSTEDT und B. NILSON, *Acta physiol. scand.* **29**, 251 (1953).
3. P. HOLTZ und D. PALM, *Ergebnisse der Physiologie, Biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie Band 58*, Springer-Verlag, Berlin (1966).

4. H. J. SCHÜMANN, K. SCHMIDT und A. PHILIPPU, *Life Sci.* **5**, 1809 (1966).
5. N. J. GIARMAN and S. SCHANBERG, *Biochem. Pharmac.* **1**, 301 (1958).
6. R. V. BAKER, *J. Physiol.* **145**, 473 (1959).
7. G. JAIME-ETCHEVERRY und L. M. ZIEHER, *Endocrinology* **83**, 917 (1968).
8. G. A. COTTRELL, *Comp. Biochem. Physiol.* **17**, 891 (1966).
9. F. B. HUGHES und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **127**, 96 (1959).
10. H. SCHULZ, H. STROBACH und E. HIEPLER, *Klin. Wschr.* **42**, 232 (1964).
11. H. SCHULZ *Thrombocyten und Thrombose im elektronenmikroskopischen Bild*. Springer-Verlag, Berlin (1968).
12. R. V. BAKER, H. BLASCHKO und G. V. R. BORN, *J. Physiol., Lond.* **149**, 55 (1959).
13. G. V. R. BORN, Diskussionsbermerkung in *Hämostase-Thrombogenese-Pharmakologisch wirksame Gerinnungsprodukte*. Verhandl. 6. Symp. Deutsche Arbeitsgemeinschaft f. Blutgerinnungsforschung, Erlangen 19.-20.2.1962, Herausgeg. v. S. Witte, Friedrich-Karl Schattauer Verlag, Stuttgart (1963), s.107.
14. S. BUCKINGHAM und E. W. MAYNERT, *J. Pharmac. exp. Ther.* **143**, 332 (1964).
15. F. MARKWARDT, W. BARTHEL, A. HOFFMANN und E. WITTWER, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **251**, 255 (1965).
16. M. WURZEL, A. J. MARCUS und B. W. ZWEIFACH, *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)* **118**, 468 (1965).
17. E. SOLATUNTURI und M. K. PAASONEN, *Ann. Med. exp. Fenn.* **44**, 427 (1966).
18. E. WEBER, U. ROSE und W. UNGER, *Archs Int. Pharmacodyn.* **166**, 36 (1967).
19. E. WEBER und H. MONDT, *Klin. Wschr.* **45**, 165 (1967).
20. B. MINTER und N. CRAWFORD, *Biochem. J.* **109**, 42P (1968).
21. H. HOLMSEN, H. J. DAY und E. STORM, *Biochim. biophys. Acta*, **186**, 254 (1969).
22. J. P. TRANZER, M. DA. PRADA und A. PLETSCHER, *Nature, Lond* **212**, 1574 (1966).
23. B. MAY, I. J. BAK und E. WESTERMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **257**, 313 (1967).
24. E. WEBER, E. MÖRGENSTERN und E. WALTER, in *Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten I*. Internationales Symposium, Wien, 17.-20. Juni (1968). Herausgeber E. DEUTSCH, E. GERLACH und K. MOSER) Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968).
25. E. WEBER, H. E. BRAUN, H. MONDT und H. TOWLIATI, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1913 (1970).
26. E. WEBER, E. WALTER, E. MÖRGENSTERN, H. MONDT, U. ROSE und E. KNAUDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1893 (1970).
27. M. DA PRADA und A. PLETSCHER, *Br. J. Pharmac.* **34**, 591 (1968).
28. W. W. DOUGLAS und A. M. POISNER, *J. Physiol., Lond.* **183**, 236 (1966).
29. U. S. v. EULER, zit. bei L. STJÄRNE, *Pharmac. Rev.* **18**, 425 (1966).
30. L. T. POTTER und J. AXELROD, *J. Pharmac.* **142**, 291 (1963).
31. L. T. POTTER und J. AXELROD, *J. Pharmac.* **142**, 299 (1963).
32. U. S. v. EULER und F. LISHAJKO, *Acta physiol. scand.* **52**, 137 (1961).
33. E. W. MAYNERT und K. KURIYAMA, *Life Sci.* **3**, 1067 (1964).
34. H. J. SCHÜMANN, K. SCHNELL und A. PHILIPPU, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **249**, 251 (1964).
35. A. PHILIPPU, R. PFEIFFER, H. J. SCHÜMANN und K. LICKFELD, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **258**, 251 (1967).
36. H. J. SCHÜMANN und E. WEIGMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **240**, 275 (1960).
37. A. PHILIPPU und H. PRZUNTEK, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **258**, 238 (1967).
38. F. LEMBECK und H. HELD, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **253**, 409 (1966).
39. A. S. OUTSCHOORN, *Br. J. Pharmac.* **7**, 605 (1952).
40. M. OKA, T. OHUCHI, H. YOSHIDA und R. IMAIZUMI, *Jap. J. Pharmac.* **15**, 348 (1965).
41. J. J. HUBBARD und S. KWANBUNBUMPEN, *J. Physiol.* **194**, 407 (1968).
42. M. DA PRADA, J. P. TRANZER und A. PLETSCHER, *J. Pharmac. exp. Ther.* **158**, 394 (1967).
43. A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN *Experientia (Basel)* **18**, 138 (1962).
44. R. GREENBERG und C. A. KOLEN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **121**, 1179 (1966).
45. A. PLETSCHER, M. DA PRADA und J. P. TRANZER, *Experientia* **24**, 1202 (1968).

46. H. J. SCHÜMANN und A. PHILIPPU, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **244**, 466 (1963).
47. H. W. HAAG, A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, *Experientia (Basel)* **17**, 187 (1961).
48. H. J. SCHÜMANN und A. PHILIPPU, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **241**, 273 (1961).
49. H. J. SCHÜMANN und A. PHILIPPU, *Nature, Lond.* **193**, 890 (1962).
50. U. S. v. EULER und F. LISHAKO, *Experientia (Basel)* **16**, 376 (1960).
51. L. STJÄRNE, *Acta physiol. scand.* **62**, suppl. 228 (1964).
- 52a. C. N. GILLIS, *J. Pharmac.* **146**, 54 (1964).
- 52b. J. MCLEAN, A. NICHOLSON und D. HERTLER, *Life Sci.* **9**, 683 (1963).
53. A. PLETSCHER und G. BARTHOLINI, *Helv. Physiol. Acta* **22**, C 84 (1964).
54. A. PLETSCHER, M. DA PRADA und G. BARTHOLINI, *Helv. Physiol. Pharmac. Acta* **23**, C 41 (1965).
55. B. MAY, I. MENKENS und E. WESTERMANN, *Life Sci.* **6**, 2079 (1967).
56. I. J. BAK, R. HASSLER, B. MAY und E. WESTERMANN, *Life Sci.* **6**, 1133 (1967).
57. H. H. SCHÖNE und E. LINDNER, *Arzneimittel-Forsch* **10**, 583 (1960).
58. H. O. OBIANWU, *Acta pharmacol.* **23**, 383 (1965).
59. H. H. SCHÖNE und E. LINDNER, *Klin. Wschr.* **40**, 1196 (1962).
60. U. S. v. EULER, L. STJÄRNE und F. LISHAKO, *Life Sci.* **3**, 35 (1964).
61. A. J. MARCUS und M. B. ZUCKER, *The Physiology of Blood Platelets* Grune u. Stratton, New York (1965).
62. E. WEBER, *Die Beeinflussung Biochemischer und Morphologischer Merkmale von Blutplättchen durch Gerinnungsfördernde und Proteolytische Agenzien*. Habilitationsschrift, Heidelberg (1965).
63. M. G. DAVEY und E. F. LÜSCHER, *Nature, Lond.* **216**, 857 (1967).
64. W. BARTHEL, A. HOFFMANN, F. MARKWARDT und E. WITTWER, *Med. Pharmac. exp.* **14**, 120 (1966).
65. E. WEBER, unveröffentlicht.
66. T. HOVIG, *Thromb. Diath. haemorrh.* **13**, 84 (1965).
67. L. T. POTTER, *Pharmac. Rev.* **18**, 439 (1966).
68. L. STJÄRNE, *Pharmac. Rev.* **18**, 425 (1966).
69. G. TAUGNER und W. HASSELBACH, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **260**, 58 (1968).
70. M. K. PAASONEN und E. SOLATUNTURI, *Ann. Med. exp. Fenn.* **43**, 98 (1965).
71. N. LATT, J. J. RIPPEY und R. S. STACEY, *Br. J. Pharmac. Chemother.* **32**, 427 (1968).
72. D. S. ROBINSON, W. LOVENBERG, H. KEISER und A. SJOERDSMA, *Biochem. Pharmac.* **18**, 109 (1968).
73. E. WEBER, H. TOWLIATI und B. SCHMIDT, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1943 (1970).