

# UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON HERZGLYKOSIDEN AUF DIE 5-HT-AUFNAHME DER BLUTPLÄTTCHEN

WOLFGANG BARTHEL und FRITZ MARKWARDT

Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Akademie Erfurt, DDR

(Received 21 December 1970; accepted 25 March 1971)

**Abstract**—The influence of the four cardiac glycosides, ouabain, digitoxin, digoxin and gitoxin on the uptake of 5-HT by blood platelets has been investigated. They all inhibited the uptake in a dose-dependent manner. Ouabain which has been studied separately inhibited the 5-HT uptake by a non-competitive mechanism. The inhibition was less if  $K^+$ -ions were omitted from the incubation medium and enhanced by an increase in  $K^+$ -ions. The uptake of 5-HT by the blood platelets has been already diminished by the withdrawal of  $K^+$  from the medium. The results have been discussed in terms of the carrier theory of the transport of norepinephrine proposed by Bogdanski and Brodie.

DIE 5-HT-AUFNAHME in die Blutplättchen ist ein stoffwechselabhängiger Mechanismus, der mehrfach als pharmakologisches Modell der Aminspeicherung untersucht wurde.<sup>1-6</sup> Dabei hat sich gezeigt, daß die Kationen  $Na^+$  und  $K^+$  eine besondere Rolle für diesen Vorgang spielen,<sup>7,8</sup> und daß er durch Ouabain gehemmt werden kann.<sup>2,9</sup>

Für biogene Amine wie Noradrenalin konnte nachgewiesen werden, daß ihre Aufnahme in Organschnitte *in vitro* von einer  $Na^+$ - $K^+$ -stimulierten ATP-ase abhängt und ebenfalls durch Ouabain hemmbar ist.<sup>10-15</sup>

Wir haben daher den Einfluß einiger Herzglykoside auf die 5-HT-Aufnahme der Blutplättchen sowie die Bedeutung der  $K^+$ -Ionen für diesen Vorgang genauer untersucht.

## METHODEN

Blutplättchen von Kaninchen wurden, wie früher beschrieben, isoliert.<sup>16</sup> Die Resuspension für die Versuchsansätze erfolgte in einer Elektrolytlösung folgender Zusammensetzung:  $NaCl$  145 mM,  $KCl$  2,6 mM,  $CaCl_2$  2,3 mM,  $MgCl_2$  2,3 mM,  $NaHCO_3$  12 mM,  $NaH_2PO_4$  0,4 mM, Glukose 5,5 mM, pH: 7,4. Die Aufnahmevereuche wurden, wie in einer vorangegangenen Arbeit angegeben, durchgeführt.<sup>5</sup> Die Messung des 5-HT in den Blutplättchen erfolgte spektrofluorimetrisch. Die Inkubationsdauer betrug 60 min. Die Hemmung der 5-HT-Aufnahme wird in Prozent der Aufnahme des Kontrollansatzes angegeben. Veränderungen der Elektrolytlösung hinsichtlich des Kaliumgehaltes wurden durch äquimolaren Ersatz des  $K^+$  durch  $Na^+$  ausgeglichen.

## MATERIALIEN

5-HT (Serotonin-Kreatininsulfat, Dr. Th. Schuchardt, München), Ouabain = g-Strophanthinum (DAB 7), Digitoxin, Digoxin und Gitoxin (Substanzen des VEB

Arzneimittelwerk Dresden). Die drei letztgenannten Glykoside wurden infolge ihrer schlechten Löslichkeit den Ansätzen in einer Dimethylformamidlösung zugesetzt. Die Dimethylformamidkonzentration in den Ansätzen hatte keinen Einfluß auf die 5-HT-Aufnahme.

## ERGEBNISSE

### 1. Abhängigkeit der Hemmung der 5-HT-Aufnahme von der Glykosidkonzentration

Die Herzglykoside Ouabain, Digitoxin, Gitoxin und Digoxin wurden in ihrer Fähigkeit verglichen, die Aufnahme von 5-HT in die Blutplättchen zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden die Blutplättchen mit steigenden Konzentrationen der Herzglykoside und 25  $\mu$ g 5-HT/ml eine Stunde lang bei 37° inkubiert. Die Dosisabhängigkeit der Hemmung ist in Abb. 1 dargestellt. Die daraus ermittelten  $I_{50}$ -Werte (Glykosidkonzentrationen, welche die Aminaufnahme um 50% hemmen) liegen zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  m.

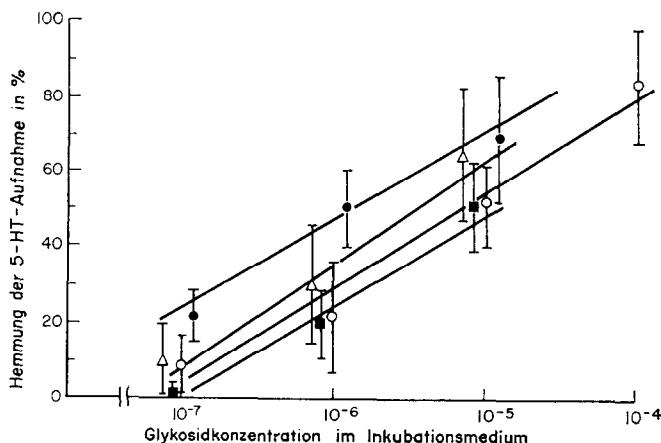


ABB. 1. Hemmung der 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen durch Ouabain ●, Digoxin △, Digitoxin ○ und Gitoxin ■ nach 60 Min. langer Inkubation in Tyrodelösung, pH 7,4, 37°, mit 25  $\mu$ g 5-HT/ml. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 5 Einzelversuchen.

### 2. Abhängigkeit der Aufnahmehemmung von der 5-HT-Konzentration im Inkubationsmedium

Bestimmt man die 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen bei einer Inkubation mit steigenden 5-HT-Konzentrationen im Medium, so erhält man bei der grafischen Darstellung einen charakteristischen Kurvenverlauf. Mit steigender 5-HT-Konzentration im Medium steigt die 5-HT-Aufnahme zunächst steil an und nimmt bei einer Konzentration von 10 bis 20  $\mu$ g 5-HT/ml nur noch wenig zu. Die Aufnahmekurve geht bei noch höheren 5-HT-Konzentrationen in eine Gerade über. Der Beginn der Kurve weist auf eine Sättigung der aktiven Aufnahme hin, während der zweite Kurvenabschnitt, der eine direkte lineare Abhängigkeit der aufgenommenen 5-HT-Menge von der 5-HT-Konzentration im Inkubationsmedium widerspiegelt, als Ausdruck des passiven Diffusionsanteils der 5-HT-Aufnahme angesehen wird.<sup>1,2,4,6</sup>

Um den Einfluß von Ouabain ( $10^{-6}$  m) auf den aktiven Anteil der 5-HT-Aufnahme zu untersuchen, wurde entsprechend einer von Pletscher<sup>6</sup> vorgeschlagenen grafischen

Analyse der 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen der passive Anteil der Aufnahme durch parallele Verschiebung des linearen Kurvenanteils durch den O-Punkt des Koordinatensystems ermittelt und in Abzug gebracht. Die Kurve der 5-HT-Aufnahme unter Ouabain ( $10^{-6}$  m) und  $K^+$ -Entzug zeigt, daß der aktive Anteil der 5-HT-Aufnahme gehemmt wird, während der passive Anteil unbeeinflußt bleibt. Da die Hemmung der aktiven Aufnahme durch eine Steigerung der Aminkonzentration im Inkubationsmedium nicht aufgehoben werden kann, ist das Vorliegen einer nicht-kompetitiven Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch Ouabain anzunehmen.

### 3. Einfluß von $K^+$ auf die 5-HT-Aufnahme und die Hemmwirkung des Ouabain

Bei Fehlen von  $K^+$  im Inkubationsmedium wird wie unter dem Einfluß von Ouabain eine Hemmung der 5-HT-Aufnahme der Plättchen gefunden, die 50–70 % beträgt (Abb. 2). Somit wirken Ouabain und  $K^+$ -Entzug gleichsinnig auf die 5-HT-Aufnahme der Blutplättchen.

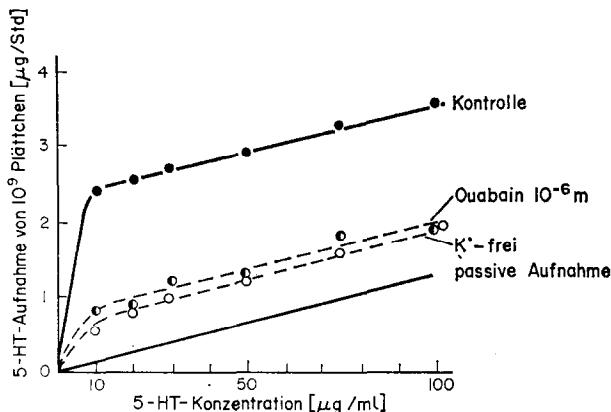


ABB. 2. Einfluß von Ouabain und Kalium-Entzug auf die 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen nach 60 Min langer Inkubation in Tyrodelösung, pH 7,4 37°. Mittelwerte aus je 5 Einzelversuchen.

Untersucht man den Einfluß von  $K^+$  auf die Ouabainwirkung bei schrittweiser Veränderung der  $K^+$ -Konzentration im Inkubationsmedium (10fach, normal,  $\frac{1}{2}$  und  $\frac{1}{10}$ ), so zeigt sich, daß eine Verminderung der  $K^+$ -Konzentration zu einer Abflachung der Dosis-Wirkungs-Kurven führt, was auf eine Abschwächung der Ouabainwirkung hindeutet. Erhöhung des  $K^+$  führt dagegen zu einem steileren Kurvenverlauf, also zu einer Verstärkung der Ouabainwirkung (Abb. 3). Zur Sicherung dieses Ergebnisses wurde die Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch Ouabain in einer Konzentration von  $10^{-5}$  m bei normalem, erhöhtem und erniedrigtem  $K^+$ -Gehalt im Inkubationsmedium in einer größeren Versuchsreihe untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 4) zeigen, daß bei einer Erniedrigung der  $K^+$ -Konzentration eine signifikante Abschwächung, durch Erhöhung der  $K^+$ -Konzentration eine Verstärkung der Ouabain-bedingten Hemmung der 5-HT-Aufnahme auftritt. Außerdem wird nochmals deutlich, daß allein durch  $K^+$ -Entzug die 5-HT-Aufnahme der Blutplättchen vermindert wird.

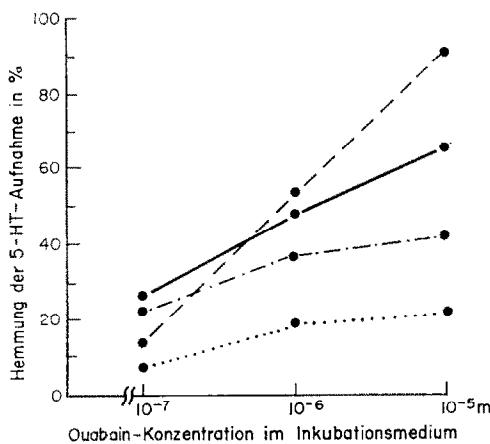


ABB. 3. Beeinflussung der Hemmwirkung von Ouabain durch die K<sup>+</sup>-Konzentration im Inkubationsmedium. Hemmung der 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen nach 60 Min. langer Inkubation mit 25 µg 5-HT/ml in Tyrodelösung, pH 7,4, 37°, bei 10 facher K<sup>+</sup>-Konzentration (●—---●), normaler K<sup>+</sup>-Konzentration (●—●),  $\frac{1}{2}$  normaler K<sup>+</sup>-Konzentration (●—·—·●) und  $\frac{1}{10}$  normaler K<sup>+</sup>-Konzentration (●—·—·—●). Mittelwerte aus je 5 Einzelversuchen.

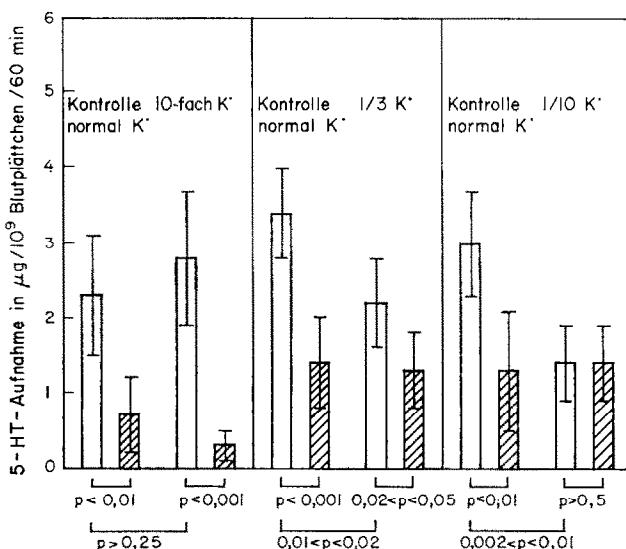


ABB. 4. Einfluß von Ouabain (10<sup>-5</sup>m) auf die 5-HT-Aufnahme von Kaninchenblutplättchen bei verschiedenen K<sup>+</sup>-Konzentrationen im Inkubationsmedium nach 60 Min. langer Inkubation in Tyrodelösung, pH 7,4, 37°, mit 25 µg 5-HT/ml. □ = Kontrolle ▨ = 10<sup>-5</sup>m Ouabain. Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 5 Einzelversuchen. Statistische Analyse nach dem *t*-Test von Student.

## DISKUSSION

Die vorliegende Untersuchung bestätigt zunächst die Angaben von Sneddon,<sup>8</sup> wonach die 5-HT-Aufnahme in die Blutplättchen von der Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Konzentration im Suspensionsmedium beeinflußt wird. Während es bei völligem Fehlen des Na<sup>+</sup> zu einer 100% igen Hemmung der Aminaufnahme kommt, verbleibt bei K<sup>+</sup>-Entzug eine Restaufnahme von ungefähr 40%, die möglicherweise über eine reine

Diffusion zustande kommt und somit auch durch Ouabain bis zu Konzentrationen von  $10^{-5}$  m nicht zu hemmen ist.

Nach Baumgartner und Born besitzen die Blutplättchen in der Membran ein Karriersonst für die Aminaufnahme.<sup>17</sup> Verbindungen, die an der Blutplättchenmembran bzw. an dem hypothetischen Karrier angreifen, wie Imipramin, Lokalanästhetika und Phenothiazine, hemmen die 5-HT-Aufnahme kompetitiv.<sup>4,5,18</sup> Der nicht-kompetitive Charakter der Hemmung der 5-HT-Aufnahme durch Ouabain spricht dafür, daß keine Verdrängung des Amins am Karrier erfolgt. Die Hemmwirkung des Ouabains auf die 5-HT-Aufnahme tritt nur bei Anwesenheit von  $K^+$  im Inkubationsmedium auf und wird bei Überschuß von  $K^+$  verstärkt.

Diese Befunde sind mit den Vorstellungen von Bogdanski und Brodie vereinbar, die diese Autoren über ein Karriersonst haben, das für Noradrenalin in Schnitten von Herzmuskeln wirksam ist.<sup>14</sup> Danach führen eine hohe  $Na^+$ -und eine niedrige  $K^+$ -Konzentration außerhalb der Zelle zu einer Bindung von Amin und  $Na^+$  an den Karrier und eine hohe  $K^+$ - und niedrige  $Na^+$ -Konzentration innerhalb der Zelle zur Ablösung des Amins vom Karrier. Der erforderliche  $Na^+-K^+$ -Gradient wird von der  $Na^+-K^+$  stimulierten ATP-ase aufrechterhalten. Hemmung dieser ATP-ase durch Herzglykoside und Eingriffe in den Kationengradienten führen zu einer Störung der Aminaufnahme. Auch bei Blutplättchen führen  $K^+$ -Abwesenheit im Inkubationsmedium und Ouabain zu einer Hemmung der Aminaufnahme. Die Ursache hierfür könnte in dem  $K^+$ -Verlust der Zelle zu suchen sein, da nach Untersuchungen von Cooley und Cohen<sup>19</sup>  $K^+$ -Entzug und Ouabain zu einem  $K^+$ -Mangel in der Plättchenzelle führen. Unter diesen Bedingungen würde entsprechend den Vorstellungen von Bogdanski und Brodie die Freigabe des Amins vom Karrier in der Zelle gestört. Andererseits kann eine erhöhte  $K^+$ -Konzentration im Inkubationsmedium durch eine Konkurrenz des  $K^+$  mit dem  $Na^+$  am Karrier zu einer Störung der Bindung des Amins an den Karrier und zu einer Verstärkung der Hemmwirkung des Ouabains führen.

#### LITERATUR

1. F. B. HUGHES und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **127**, 96 (1959).
2. H. WEISSBACH, B. G. REDFIELD und E. TITUS, *Nature, Lond.* **185**, 99 (1960).
3. R. S. STACEY, *Br. J. Pharmac.* **16**, 284 (1961).
4. Ž. FUKS, R. C. LANMAN und L. S. SCHANKER, *Int. J. Neuropharmac.* **3**, 623 (1964).
5. F. MARKWARDT, W. BARTHEL und E. GLUSA, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak.* **253**, 336 (1966).
6. A. PLETSCHER, *Br. J. Pharmac.* **32**, 1 (1968).
7. J. R. MCLEAN und D. POTOCZAK, *Archs Biochem.* **132**, 416 (1969).
8. J. M. SNEDDON, *Br. J. Pharmac.* **37**, 680 (1969).
9. A. PLETSCHER, W. P. BURKARD, J. P. TRANZER und K. F. GEY, *Life Sci.* **6**, 273 (1967).
10. H. J. DENGLER, H. E. SPIEGEL und E. O. TITUS, *Science* **133**, 1072 (1961).
11. H. J. DENGLER, I. A. MICHAELSON, H. E. SPIEGEL und E. TITUS, *Int. J. Neuropharmac.* **1**, 23 (1962).
12. A. GIACCHETTI und P. A. SHORE, *Biochem. Pharmac.* **15**, 607 (1966).
13. F. BERTI und P. A. SHORE, *Biochem. Pharmac.* **16**, 2091 (1967).
14. D. F. BOGDANSKI und B. B. BRODIE, *J. Pharmac. exp. Ther.* **165**, 181 (1969).
15. M. F. SUGRUE und P. A. SHORE, *Life Sci.* **8**, 1337 (1969).
16. W. BARTHEL und F. MARKWARDT, *Biochem. Pharmac.* **18**, 1899 (1969).
17. H. R. BAUMGARTNER und G. V. R. BORN, *J. Physiol., Lond.* **201**, 397 (1969).
18. W. BARTHEL, E. GLUSA und F. MARKWARDT, *Med. Pharmac. exp., Basel* **16**, 39 (1967).
19. M. H. COOLEY und P. COHEN, *J. Lab. clin. Med.* **70**, 69 (1967).