

## Hemmung der Phosphodiesterase aus Rattenherzen durch Intensain®<sup>1</sup>

Zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat (3',5'-AMP) kontrolliert eine Reihe von metabolischen Prozessen. Die zentrale Position, die das 3',5'-AMP sowohl im Fett- als auch im Herzstoffwechsel einnimmt, wurde in den letzten Jahren durch eine Reihe verschiedener Arbeitskreise bestätigt und unterstrichen<sup>2-6</sup>. Da die Adenylcyclase, die nach SUTHERLAND und RALL<sup>5</sup> für den Aufbau des 3',5'-AMP verantwortlich ist, durch Catecholamine aktiviert wird, sieht man das 3',5'-AMP als Mediator der kardialen Catecholaminwirkungen an. Die isoproterenolverstärkende Wirkung des Koronardilatators Intensain veranlasste uns daher, dessen Einfluss auf das Adenylzyklase-System zu untersuchen. Da bis zum Eintritt der vollen Intensain-Wirkung eine auffällige Latenzzeit beobachtet wird, zogen wir zunächst eine Beeinflussung der katabolen Seite des 3',5'-AMP-Systems in Betracht und untersuchten den Einfluss von Intensain auf das 3',5'-AMP-abbauende Enzym Phosphodiesterase.

Phosphodiesterase wurde aus Rattenherzen nach DRUMMOND und PERROTT-YEE<sup>6</sup> durch Homogenisieren des Gewebes in der 10fachen Menge (Gew./Vol.) eiskalten 0,02 M Trispuffers (pH 7,5) und Zentrifugieren bei 0 °C und 40 000 g (60 min) gewonnen. Der klare Überstand wurde als Enzympräparation verwendet. Die Inkubation erfolgte in einem Gemisch aus 0,9 ml 8 × 10<sup>-2</sup> M Trispuffer, pH 8,0, 0,2 ml 3,5 × 10<sup>-2</sup> M MgSO<sub>4</sub>-Lösung, 0,2 ml 3',5'-AMP in verschiedenen Konzentrationen, 0,1 ml einer Lösung von 5 mg alkalischer Phosphatase/10 ml, 0,2 ml Intensain usw. in verschiedenen Konzentrationen, 0,5 ml Enzympräparation in Wasser bei 37 °C (20 min) nach WEISS, DAVIES und BRODIE<sup>7</sup>. Nach Zugabe von 0,2 ml 55prozentiger Trichloressigsäure und 10 min langer Zentrifugation bei 7000 g wurde im klaren Überstand anorganisches Phosphat nach FISKE und

SUBBAROW<sup>8</sup> in der Modifikation nach EPPENDORF (Mikromethode AV 1630 MV) bestimmt.

In jedem Ansatz wurde sowohl vor als auch nach Inkubation der Gehalt an anorganischem Phosphat gemessen. Außerdem wurde der Phosphatgehalt vor und nach Inkubation in Gegenwart von 3',5'-AMP und ohne 3',5'-AMP ermittelt.

Wie aus Tabelle I hervorgeht, hemmt Intensain in einer Konzentration von 10<sup>-3</sup> M/l die Phosphodiesterase aus Rattenherzen in Gegenwart von 10<sup>-4</sup> M 3',5'-AMP/l zu etwa 70%. Höhere Intensain-Konzentrationen konnten nicht mehr getestet werden, da dann der Phosphatnachweis gestört wird. Mit steigender 3',5'-AMP- und fallender Intensain-Konzentration nimmt die Hemmung der Phosphodiesterase ab. Dieses Ergebnis spricht für einen kompetitiven Hemmmechanismus.

Im Organismus wird Intensain zu Intensinsäure metabolisiert. Es war natürlich interessant, zu prüfen, ob dieser

<sup>1</sup> 3-(β-Diäthylamino-äthyl)-4-methyl-7-carbäthoxy-methoxy-2-oxo-(1,2-chromen), Carbochromen.

<sup>2</sup> N. HAUGAARD und M. E. HESS, Pharmac. Rev. 17, 27 (1965).

<sup>3</sup> G. A. ROBISON, R. W. BUTCHER und E. W. SUTHERLAND, Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 703 (1967).

<sup>4</sup> K. STOCK und E. WESTERMANN, Arch. Pharmac. exp. Path. 254, 334 (1966).

<sup>5</sup> E. W. SUTHERLAND und T. W. RALL, Pharmac. Rev. 12, 265 (1960).

<sup>6</sup> G. I. DRUMMOND und S. PERROTT-YEE, J. biol. Chem. 236, 1126 (1961).

<sup>7</sup> B. WEISS, J. I. DAVIES und B. B. BRODIE, Biochem. Pharmac. 15, 1553 (1966).

<sup>8</sup> C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

Tabelle I. Hemmung der Phosphodiesterase aus Rattenherzen durch Intensain in Abhängigkeit von 3',5'-AMP. Inkubationsansatz 2,1 ml, Inkubationsdauer 20 min

Intensain (M/l)					
3',5'-AMP (M/l)	Kontrolle		Hemmung		Hemmung
	mM P/g Herz	mM P/g Herz	%	mM P/g Herz	%
10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-4</sup>			
5	7,37 ± 0,60	8,46 ± 0,30	15	5,48 ± 0,60*	26
2,5	6,57 ± 0,47	5,27 ± 0,63	20	3,33 ± 0,47*	49
1	2,67 ± 0,43	1,89 ± 0,22	29	0,78 ± 0,39*	71

Tabelle II. Hemmung der Phosphodiesterase aus Rattenherzen durch Intensinsäure in Abhängigkeit von 3',5'-AMP. Inkubationsansatz 2,1 ml, Inkubationsdauer 20 min

Intensinsäure (M/l)					
3',5'-AMP (M/l)	Kontrolle		Hemmung		Hemmung
	mM P/g Herz	mM P/g Herz	%	mM P/g Herz	%
10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-4</sup>			
5	7,07 ± 0,26	6,40 ± 0,74	10	5,69 ± 0,34	20
2,5	5,72 ± 0,49	6,06 ± 0,71	15	4,98 ± 0,29	13
1	2,79 ± 0,48	2,86 ± 0,29	3	2,60 ± 0,14	7

Tabelle III. Hemmung der Phosphodiesterase aus Rattenherzen durch Theophyllin in Abhängigkeit von 3',5'-AMP. Inkubationsansatz 2,1 ml, Inkubationsdauer 20 min

Theophyllin (M/l)							
3',5'-AMP (M/l)	Kontrolle		Hemmung	mM P/g Herz	Hemmung	mM P/g Herz	Hemmung
	mM P/g Herz	mM P/g Herz					
10 <sup>-4</sup>		10 <sup>-4</sup>	%	5 × 10 <sup>-4</sup>	%	10 <sup>-3</sup>	%
2,5	6,32 ± 0,38	5,99 ± 0,31	5	4,83 ± 0,74	24	3,97 ± 0,52	37
1	3,76 ± 0,27	2,75 ± 0,70	27	2,16 ± 0,25	43	1,22 ± 0,29	68

Die in den Tabellen I-III angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je 4 Einzelversuchen. Der Streubereich ist als ± mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Signifikante Änderungen gegenüber den Kontrollen sind mit einem \* gekennzeichnet.

dem Intensain sehr nahe verwandte Metabolit die gleiche Wirkung auf die Phosphodiesterase hat wie Intensain selbst. Tabelle II zeigt, dass das Verseifungsprodukt nur eine schwache Hemmwirkung besitzt.

Aus Untersuchungen von BUTCHER und SUTHERLAND<sup>9</sup> ist bekannt, dass Xanthin-Derivate die Phosphodiesterase hemmen. Wir untersuchten daher den Einfluss von Theophyllin auf unsere Enzympräparation, einmal, um unsere Versuchsanordnung zu überprüfen, zum anderen, um einen Vergleich zur Wirkungsstärke des Intensain zu erhalten. Die Ergebnisse mit Theophyllin sind in Tabelle III zusammengestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass Theophyllin etwa die gleiche Wirkungsstärke wie Intensain zeigt. Eine etwa 50prozentige Hemmung des Enzyms wird bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-4}$  M Theophyllin/l in Gegenwart von  $10^{-4}$  M 3',5'-AMP/l erreicht.

**Summary.** Intensain causes *in vitro* a significant and apparently competitive inhibition of phosphodiesterase, which transforms the 3',5'-AMP to 5'-AMP. These results explain some intensain effects, especially the period of

latency to reach the maximum effect, the inotropic action and its reaction under the influence of  $\beta$ -blocking and  $\beta$ -stimulating agents<sup>10-13</sup>.

R. E. NITZ, E. SCHRAVEN  
und D. TROTTNOW

*Medizinisch-Biologische Forschungsabteilung der  
Cassella Farbwerke Mainkur AG, 6 Frankfurt a. M.-  
Fechenheim (Deutschland), 26. Januar 1968.*

- <sup>9</sup> R. W. BUTCHER und E. W. SUTHERLAND, *J. biol. Chem.* 237, 1244 (1962).  
<sup>10</sup> H. J. BRETSCHNEIDER, H. J. EBERLEIN, H.-M. KABUS, G. NELLE und W. REICHMANN, *Arzneimittel-Forsch.* 13, 255 (1963).  
<sup>11</sup> R. E. NITZ, 4. Weltkongress f. Kardiologie Mexiko, Bd. 5, 182 (1962).  
<sup>12</sup> R. E. NITZ und E. PÖTZSCH, *Arzneimittel-Forsch.* 13, 243 (1963).  
<sup>13</sup> H. G. SCHOEPKE, T. D. DARBY und H. J. BRONDYK, *Abstracts Interamerikan. Pharmakologenkongress Mexiko 1966.*

## Acceleration of Turnover of <sup>14</sup>C-Catecholamines in Rat Brain by Chlorpromazine

Neuroleptics, e.g. chlorpromazine (CPZ) and haloperidol, are supposed to enhance the cerebral turnover of catecholamines under normothermic conditions. For this assumption only indirect evidence is available. Thus, CPZ (a) increases the formation of <sup>14</sup>C-catechol compounds from <sup>14</sup>C-tyrosine<sup>1,2</sup>, (b) accelerates the disappearance of norepinephrine and dopamine after inhibition of the catecholamine production<sup>3-5</sup>, (c) enhances the increase of normetanephrine as well as of 3-methoxytyramine induced by monoamine oxidase inhibitors<sup>6</sup>, and (d) leads to accumulation of endogenous homovanillic acid (HVA)<sup>7-12</sup>. It may, however, be argued that (a) fractionation and measurement of the specific radioactivity of the various catecholamines have not yet been carried out, (b/c) neuroleptics might interfere with both the metabolism and the effect of inhibitors of tyrosine hydroxylase and monoamine oxidase respectively, and (d) CPZ possibly inhibits a transport system for the cerebral outflux of HVA<sup>13,14</sup>.

The present experiments have been carried out in order to measure the cerebral turnover of catecholamines in a more direct way. For this purpose, the specific radioactivity of cerebral dopamine and norepinephrine was

determined in rats given L-2-<sup>14</sup>C-tyrosine and L-2-<sup>14</sup>C-3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) respectively.

**Experimental.** Groups of 3 female rats of a closed colony of Wistar origin (100-110 g body weight) received CPZ i.p. (10 mg/kg) and were subsequently kept in an environment of 31-32 °C to prevent fluctuations in body temperature. Controls were administered saline and remained at room temperature (22 °C). L-2-<sup>14</sup>C-Tyrosine (5 mg/kg; 105  $\mu$ C/mg) and L-2-<sup>14</sup>C-dopa (5 mg/kg; 125  $\mu$ C/mg) respectively were injected s.c. Immediately after decapitation, the total brain was homogenized in 0.4 N HClO<sub>4</sub>; the radioactive metabolites were fractionated on Dowex 50, X-4, and subsequently submitted to paper chromatography similarly to previous experiments<sup>15</sup>. The content of total norepinephrine and dopamine respectively was measured spectrophotofluorimetrically<sup>16,17</sup>. The specific radioactivity of the catecholamines is calculated as follows:

$$\frac{\mu\text{g } ^{14}\text{C-amine/g fresh brain} \times 100}{\mu\text{g total amine/g brain}}$$

**Results.** Pretreatment with CPZ increases the specific radioactivity of dopamine in rat brain by 74% ( $p < 0.01$ )