

Arzneimittel-Forsch. 11, 1051-1054 (1961).

LSD 955/(BOL)

Aus dem Biologischen Institut Madaus, Köln

Über die Hemmung verschiedener Rattenpfoten-Ödeme durch Serotonin-Antagonisten

Von Günther Vogel und M. L. Marek *)

Einführung

In verschiedenen Versuchsanordnungen läßt sich zeigen, daß Serotonin (5-Hydroxytryptamin)-Effekte durch Lysergsäurediäthylamid (LSD) und Mutterkorn (*Secale*)-Alkaloide antagonistisch beeinflußt werden [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25]. Diese Hemmwirkungen lassen sich erklären, indem die inhibierenden Substanzen als Antimetabolite des

Serotonins aufgefaßt werden [15, 21, 24]. Der Antagonismus Mutterkornalkaloide und LSD $\leftrightarrow$ Serotonin gilt auch für das durch lokale Applikation von Serotonin erzeugte Rattenpfotenödem [5]. Aus der Tatsache, daß verschiedenartige artifizielle Entzündungen der Rattenpfote durch Serotonin-Antagonisten gehemmt werden, wird geschlossen, daß Serotonin am Zustandekommen der Entzündung und des Begleitödems wesentlich beteiligt ist [13]. Auch nach histologischen Befunden — mehr

*) Unter technischer Mitarbeit von I. Bothe u. H. Walther

oder weniger ausgeprägter Zerfall der Mastzellen [26] — wird auf eine unterschiedliche Beteiligung von Serotonin bei den verschiedenen Formen der experimentellen Entzündung der Rattenpfote geschlossen.

Daraus folgt: Wenn bei der Genese verschiedener Entzündungsmodelle Serotonin tatsächlich eine ursächliche Rolle spielt, und wenn im Ergotamin ein echter Serotonin-Antagonist vorliegt, dann müßte bei allen Entzündungs- bzw. Ödemarten zwischen den hemmenden Dosen von LSD und Ergotamin — unabhängig von der absoluten Größe der Dosen — eine stets gleiche Relation gefunden werden. Sie müßte identisch sein mit jener, die am reinen Serotonin-Ödem gegeben ist. Wird diese Prämisse im Experiment nicht bestätigt, dann sind als Schlüsse zu ziehen, daß entweder Serotonin an der Genese der verschiedenen — nachstehend geschilderten — Entzündungsmodelle nicht maßgeblich beteiligt ist oder daß die Hemmwirkung von Ergotamin, wenn eine solche gefunden werden sollte, nicht über eine Hemmung des Serotonins erfolgen kann. Bei der Versuchsplanung waren daher folgende Gesichtspunkte besonders zu berücksichtigen: Es mußten verschiedenartige Rattenpfoten-Ödeme provoziert werden, die sich hinsichtlich des Ausmaßes des Mastzellenzerfalls deutlich unterscheiden. Da die iv. Zufuhr hinsichtlich des Gehaltes im Blut, der Verteilungskinetik und der Konzentration am Wirkort die konstantesten und saubersten Verhältnisse bietet, wurde — neben anderen Applikationsarten — LSD und Ergotamin-d-tartrat vor allem iv. zugeführt.

Methodik

Zu den Versuchen wurden nur männliche Ratten von 120–200 g verwendet, denen die Ödem-provozierenden Wirkstoffe subplantar in eine Hinterpfote appliziert wurden. Größe und zeitlicher Verlauf der Pfortenschwellungen wurden plethysmometrisch dadurch ermittelt, daß die normalen Pfortenvolumina vor der Ödemprovokation gemessen und die Messungen stündlich über 7 h wiederholt wurden. Nur bei dem Hyaluronidase-Ödem erfolgte die Messung über 3 h in kürzeren Abständen. Die Ödemvolumina für jede Meßzeit ergeben sich aus der Differenz der normalen Pfortenvolumina und der Pfortenvolumina jeder weiteren Messung nach der Ödemprovokation. Die Ödemvolumina wurden als Prozentwerte der normalen Pfortenvolumina berechnet. Zur Berechnung der Ödemhemmung in Prozenten wurden die Diagramme der behandelten und der unbehandelten Gruppe aus Ödemvolumen und Meßzeiten für jedes Tier in Papier ausgeschnitten und gewogen. Aus den Gewichten jeder Versuchsgruppe von 10 Tieren wurden der Mittelwert und sein mittlerer Fehler berechnet.

Die Ödemhemmung entspricht: $K - B \cdot 100$, wenn K der Mittelwert der Kurvengewichte der Kontrollgruppe und B der Mittelwert der Kurvengewichte der behandelten Gruppe ist. Zur Sicherung der Differenz zweier Meßreihen benutzten wir den t-Test nach Student.

Folgende Ödem-provozierende Substanzen wurden verwendet: Tryptaminhydrochlorid (Serva, Heidelberg)
5-Hydroxytryptamin-creatininsulfat (Fluka, Buchs/Schweiz)
Histamindihydrochlorid (Merck, Darmstadt)
Ovalbumin (Merck, Darmstadt)
Dextran (Makrodex®, Knoll, Ludwigshafen)
Compound 48/80 (Burroughs Wellcome & Co., Tuckahoe N.Y.)
Formalin, 3%ige Lösung
Kaolin-Pulver, 10%ige Suspension
Bäckerhefe, 20%ige Suspension
Polyvinylpyrrolidon (Kollidon®, Badische Anilin- u. Sodafabriken, Ludwigshafen) Molekulargewicht 25 000; als 25%ige Lösung
Trypsin, 2X kristallisiert reines (Serva, Heidelberg)

Als Ödem-hemmende Substanzen wurden benutzt: Lysergsäure-diäthylamid (LSD, Delysid®, Sandoz, Basel) M. G. 323,4, Ergotamin-d-tartrat (Fluka, Buchs/Schweiz) M. G. 1376. Applizierte Dosen in μg (lokal), $\mu\text{g/kg}$ und $\text{Mol} \cdot 10^{-8}$ sowie Applikationsarten und die zeitlichen Beziehungen zwischen Applikation der Hemmsubstanzen und Zufuhr der Ödem-provozierenden Wirkstoffe sind der Tabelle (Ergebnisse) zu entnehmen.

Ergebnisse (vgl. Tabelle)

Für LSD läßt sich nur am Serotonin-Ödem eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung bei iv. Applikation ermitteln. Alle anderen Ödeme zeigen keine eindeutige Hemmung. Höher als 100 $\mu\text{g/kg}$ haben wir wegen beginnender Unverträglichkeit nicht dosiert, obwohl Cerletti (persönl. Mitteilung) die Dosis max. tol. (iv., Ratte) mit 3 mg/kg angibt. Auch bei ip. Applikation von LSD spricht nur das Serotonin-Ödem sicher an. Dagegen gelingt es bei gleichzeitiger intraplantarer Zufuhr folgende Ödeme zu hemmen:

Serotonin,	Dextran,
Tryptamin,	Hyaluronidase,
Compound 48/80,	Histamin,
Ovalbumin,	Bäckerhefe.

Die Hemmung des Kaolin-Ödems bei gleichzeitiger intraplantarer Zufuhr von LSD ist statistisch nicht gesi-

chert, gar nicht beeinflusst werden die Ödeme durch Formalin, Trypsin und Polyvinylpyrrolidon.

Sichere und zum größten Teil streng von der Dosis abhängige Hemmwirkungen nach iv. Zufuhr von Ergotamin-d-tartrat zeigen folgende Ödeme:

Serotonin,	Dextran,
Tryptamin,	Hyaluronidase,
Compound 48/80	Kaolin.
Ovalbumin,	

Die DE_{50} von LSD am Serotonin-Ödem liegt bei $2,1 \cdot 10^{-8}$ Mol/kg, die von Ergotamin am gleichen Ödemmodell bei $7,26 \cdot 10^{-8}$ Mol/kg, die beiden mittleren hemmenden Dosen verhalten sich etwa wie 1:3,5.

Diskussion

Zu einer gleichen Relation der hemmenden Dosen von LSD und Ergotamin-d-tartrat auf das Serotonin-Ödem kommen Döpfner u. Cerletti [5], allerdings bei sc. Zufuhr der beiden Substanzen. Die vorliegenden Ergebnisse müssen dahingehend interpretiert werden, daß eine spezifische Wirkung von LSD und Ergotamin-d-tartrat nur beim Serotonin-Ödem vorliegt. Hemmwirkungen an anderen Ödemen werden bei intraplantarer Zufuhr von 10 μg LSD/Pfote erreicht ($3,1 \cdot 10^{-8}$ Mol). Das Serotonin-Ödem ist jedoch mit $2,1 \cdot 10^{-8}$ Mol LSD/kg, iv. verabreicht, ähnlich stark zu inhibieren, beide Dosen sind kaum miteinander zu vergleichen. Überschlagsweise ist damit zu rechnen, daß bei iv. Zufuhr von $2,1 \cdot 10^{-8}$ Mol/kg in einer Pfote höchstens 1% jener LSD-Konzentration auftreten kann, wie sie bei intraplantarer Zufuhr von 10 μg zu erwarten ist. Wenn außer dem Serotonin-Ödem alle übrigen der untersuchten Ödeme durch iv. Injektion von LSD nicht hemmbar sind, dagegen durch eine hohe lokale LSD-Konzentration, so ist daraus zu folgern, daß LSD bei hohen Konzentrationen im Gewebe unspezifisch wirkt; sein Hemmeffekt hat nichts mit seiner spezifischen Anti-Serotonin-Aktivität zu tun. Daraus ergibt sich als weitere Konsequenz, daß bei der Genese der von uns untersuchten Ödeme — abgesehen vom Serotonin-Ödem — Serotonin nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die besondere Bedeutung der Konzentrations- bzw. Dosen-Verhältnisse wird auch durch die Versuche von Parratt u. West [16, 17] unterstrichen, die bei iv. Zufuhr von 1–4 mg/kg LSD (allerdings als 2-Brom-LSD, Bol 148, das weniger toxisch ist) eine Hemmung des Serotonins, Compound 48/80-, Eiereiweiß- und Dextran-Ödems beobachteten. Die genannten Autoren benutzten allerdings weitaus geringere Dosen zur Ödemerzeugung als wir. Bei dem Versuch der Reproduktion ihrer Ergebnisse erhielten auch wir statistisch gesicherte Ödemhemmungen von 50% mit 400 μg = $124 \cdot 10^{-8}$ Mol LSD pro kg iv. am Ovalbumin-Ödem (2 mg/Pfote) und mit 100 μg = $51 \cdot 10^{-8}$ Mol/kg LSD iv. bei den Ödemen nach Dextran und Compound 48/80, wenn wir bei den zwei letzteren Substanzen in der Ödem-provozierenden Dosis auf $\frac{1}{3}$ bzw. $\frac{1}{4}$ der in der Tabelle angegebenen Mengen heruntergingen. In keinem Fall wird dabei aber das für das reine Serotonin-Ödem gefundene molare Dosenverhältnis LSD:Ergotamin = 1:3,5 erreicht. Es hat demnach den Anschein, daß Beteiligung und Bedeutung des Serotonins im Rahmen der Ödemgenese von der Intensität des zum Ödem führenden Reizes abhängen.

Durch Ergotamin-d-tartrat werden viele Ödem-Modelle gehemmt. Eine Relation zwischen mittlerer hemmender LSD- und mittlerer hemmender Ergotamin-Dosis läßt sich nicht angeben, da bei iv. Zufuhr eben nur das Serotonin-Ödem durch LSD gehemmt wird. Die molaren mittleren hemmenden Dosen von Ergotamin-d-tartrat für das Compound 48/80-, das Ovalbumin-, das Dextran-, das Hyaluronidase- und das Kaolin-Ödem liegen in etwa der gleichen Größenordnung. Sie sind jedoch um etwa den Faktor 10 größer als die mittlere wirksame Dosis, die beim Serotonin-Ödem gefunden wurde. Auch die Ergebnisse der Ergotaminversuche sind so zu deuten, daß entweder die Hemmung der Ödeme — außer dem Serotonin-Ödem — nicht über eine Hemmung der Serotonin-Aktivität durch Ergotamin-d-tartrat geht, oder daß Serotonin am Zustandekommen der

Tab.: Hemmung verschiedener Ödeme an der Rattenpfote nach Behandlung mit LSD und Ergotamin-d-tartrat. Allen Werten für Ödemhemmung (in %) liegen jeweils die Meßwerte an mindestens 20 Tieren pro Dosis und Applikationsweise zugrunde; n = 10 für eine Kontrollgruppe (unbehandelt) und n = 10 für die mit einer Ödem-hemmenden Substanz behandelten. Die statistische Sicherung der Differenz der Kurven des Ödemverlaufes behandelter und unbehandelter Tiere ist in der Tabelle mit **) bezeichnet für p-Werte zwischen 0,1 und 1%, mit *) zwischen 2 und 5%. Keine Kennzeichnung bedeutet, daß der p-Wert über 5% lag, also eine statistische Sicherung nicht vorliegt. †): $DE_{50} = 6,8 \mu\text{g/kg} = 2,1 \cdot 10^{-8} \text{ Mol/kg}$.

Ödemprovokation mit	Lysergsäurediäthylamid (LSD)					Ergotamin-d-tartrat			
	Dosen		Ödemhemmung in % nach 1maliger Applikation			Dosen		Ödemhemmung in % nach 1maliger Applikation, 60 min vor Ödem-Prov.	
	μg	$\text{Mol } 10^{-8}$	gleichzeitige intra-plantar	30 min vor Ödem-Prov.		$\mu\text{g/kg}$	$\text{Mol/kg } 10^{-8}$	iv.	$DE_{50} \text{ Mol/kg } 10^{-8}$
				ip.	iv.				
5-Hydroxytryptamin, 10 μg in 0,05 ml	5/kg	1,55/kg			13	50	3,63	49**)	
	8/kg	2,48/kg			†) 70**)	100	7,26	52**)	
	10	3,10	68**)			330	24,00	67**)	7,26
	20/kg	6,2/kg		89**)	73**)	1000	72,6	76**)	
	50/kg	15,5/kg			79**)	2000	145,2	92**)	
Tryptaminhydrochlorid, 100 μg in 0,1 ml	10	3,10	76**)			1000	72,6	79**)	
Compound 48/80, 20 μg in 0,1 ml	10	3,10	73**)			330	24,0	31**)	
	20/kg	6,2/kg		49**)		1000	72,6	37**)	69,0
	50/kg	15,5/kg			20,0	2000	145,2	73**)	
	100/kg	31,0/kg			4,0				
Ovalbumin, 2 mg in 0,1 ml	10	3,10	49**)			330	24	26**)	
	20/kg	6,2/kg		—7		1000	72,6	57**)	60,0
	50/kg	15,5/kg			11,5	2000	145,2	68**)	
	100/kg	31,0/kg			25,0				
Dextran, 6 mg in 0,1 ml	10	3,1	31**)			330	24	24**)	
	20/kg	6,2/kg		16,5		1000	72,6	46**)	80
	50/kg	15,5/kg			14,5**)	2000	145,2	65**)	
	100/kg	31,0/kg			15,6*)				
Hyaluronidase, 15 IE in 0,1 ml	10	3,1	89**)			1000	72,6	9,5	
	20/kg	6,2/kg		—20		2000	145,2	52*)	≈145
	50/kg	15,5/kg			—6,5				
Histamin, 100 μg /0,1 ml	10	3,1	48**)						
	20/kg	6,2/kg		17					
	50/kg	15,5/kg			—39	2000	145,2	—45	
Kaolin, 10 mg in 0,1 ml	10	3,1	25			500	36,3	32*)	
	20/kg	6,2/kg		—2		1000	72,6	57**)	≈70
						2000	145,2	55**)	
Hefe 20 mg in 0,1 ml	10	3,1	50**)			1000	72,6	35	
	20/kg	6,2/kg		12		2000	145,2	31	
	50/kg	15,5/kg			—4				
Formalin, 3 mg in 0,1 ml	10	3,1	13						
	20/kg	6,2/kg		—2		2000	145,2	11	
Trypsin, 100 μg in 0,1 ml	10	3,1	0			1000	72,6	—12	
						2000	145,2	8	
Polyvinylpyrrolidon, 25%ig 0,2 ml	10	3,1	12			1000	72,6	10	
	20/kg	6,2/kg		8		2000	145,2	26	

(durch Ergotamin hemmbaren) Ödeme nur geringfügig beteiligt ist.

Wenn die Wirkung von LSD und Ergotamin-d-tartrat über eine Hemmung des durch Mastzellen-Zerfall freigesetzten endogenen Serotonins ginge, müßten — analog den Befunden von Zbinden et al. [26] — folgende Ödeme durch LSD und Ergotamin-d-tartrat besonders gut beeinflussbar sein: Das nach Ovalbumin, Compound 48/80 und Bäckerhefe. Die Freisetzung von Serotonin bei der Gewebsreaktion nach Verabreichung von Dextran [9, 20] müßte auch dieses Ödem für die Hemmung durch LSD und Ergotamin prädestinieren. Tatsächlich jedoch werden die genannten Ödeme, bei denen endogenes Serotonin reichlich frei werden soll, durch iv. Zufuhr von LSD nicht gehemmt. Da kaum anzunehmen ist, daß während des Ablaufes einer artifiziellen Entzündung mehr endogenes Serotonin freigesetzt als experimentell exogen (subplantar) zugeführt wird (10 μg), dürfte die fehlende Hemmwirkung von LSD darauf zurückzuführen sein, daß endogen freigesetztes Serotonin bei den geprüften Ödemen nicht Hauptursache der Schwellung ist. Die Tatsache, daß auch andere Ödeme als die, bei denen es zu einem Mastzellenzerfall kommen soll, durch Ergotamin-d-tartrat gehemmt wer-

den, spricht dagegen, daß wir im Ergotamin-d-tartrat eine spezifische Hemmsubstanz für das endogen freigesetzte Serotonin vor uns haben. Ergotamin besitzt offensichtlich einen Hemmeffekt auf verschiedene Ödeme, der anders als über eine Hemmung durch das freigesetzte Serotonin erklärt werden muß. Da weder Ergotamin-d-tartrat noch LSD das durch Polyvinylpyrrolidon erzeugte Pfotenödem [23] zu hemmen imstande sind, muß geschlossen werden, daß Hemmeffekte der beiden Antagonisten des Serotonins bei allen Ödemen außer dem reinen Serotonin-Ödem nicht auf einer Beeinflussung der Kapillarpermeabilität beruhen. LSD und Ergotamin-d-tartrat greifen vermutlich in einer derzeit noch unbekannten Weise direkt in den zellulären Metabolismus ein.

Zusammenfassung

Versuche über die Hemmbarkeit verschiedener Ödem-Modelle an der Rattenpfote mit den Serotonin(5-Hydroxy-tryptamin)-Antagonisten Lysergsäurediäthylamid (LSD) und Ergotamin-d-tartrat bei verschiedenen Applikationsweisen ergeben eine Hemmbarkeit nahezu aller untersuchten Ödem-Modelle durch lokale gleichzeitige LSD-Zufuhr.

Bei iv. Applikation ist das durch Serotonin hervorgerufene Ödem mit LSD gut zu hemmen, die anderen Ödeme sind jedoch im gleichen Dosenbereich nicht hemmbar. Mit Ergotamin-d-tartrat lassen sich sowohl das Serotonin- als auch die meisten anderen Ödeme beeinflussen. Die Relation der mittleren hemmenden molaren Dosen von LSD zu Ergotamin liegt bei 1:3,5. Diese Relation gilt nur für das durch Serotonin hervorgerufene Ödem.

Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß Serotonin bei der Genese der untersuchten Ödeme nur eine untergeordnete, evtl. sehr flüchtige Rolle spielen kann, und daß die Hemmwirkung von Ergotamin nicht auf seiner Eigenschaft als Serotonin-Inhibitor beruht.

Die Hemmwirkung der beiden Serotonin-Antagonisten erfolgt nicht über eine Beeinflussung der Kapillarpermeabilität.

Summary

The Inhibition of Various Types of Rats' Paws' Edema by Serotonin Antagonists

Experiments on the possibility of inhibiting different model edema of the rat's paw with the serotonin (5-Hydroxytryptamin) antagonists lysergic acid diethylamide (LSD) and ergotamine-d-tartrate in various modes of application showed that almost all of the model edema tested may be inhibited by simultaneous local application of LSD. Following intravenous application, the edema induced by serotonin may be easily inhibited, the other edema, on the other hand, may not be inhibited by the same dosage. Ergotamine-d-tartrate shows influence on the serotonin edema as well as on most of the others. The relation of the mean inhibiting molar dose of LSD and ergotamine is 1:3,5. This relation applies to the serotonin-induced edema only. The a.m. results lead to the conclusion, that the action of serotonin in the development of the edema tested must be negligible and possibly of short duration. The inhibition capacity of ergotamine cannot be due to its capacity as serotonin inhibitor. The inhibiting action of both serotonin antagonists does not take place by influence on the capillary permeability.

Literatur

- [1] Balzer, H., Greeff, K. u. Westermann, E., *Klin. Wschr.* **34**, 1204 (1956)
- [2] Bhattacharya, B. K., *Arch. internat. pharmacodyn. therap.* **103**, 337 (1955)
- [3] Cerletti, A. u. Konzett, H., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **228**, 146 (1956)
- [4] Cerletti, A. and Doepfner, W., *J. Pharmacol. Exper. Therap.* **122**, 124 (1958)
- [5] Doepfner, W. and Cerletti, A., *Internat. Arch. Allergy* **12**, 89 (1958)
- [6] Fingel, E. and Gaddum, J. H., *Fed. Proc.* **12**, 293 (1953)
- [7] Gaddum, J. H. and Hameed, Khan A., *Brit. J. Pharmacol.* **9**, 240 (1954)
- [8] Greeff, K., Benfey, B. G. u. Bokelmann, A., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. path. Pharmac.* **236**, 421 (1959)
- [9] Halpern, B. N., Liacopoulos, P. et Liacopoulos-Briot, M., *Arch. internat. pharmacodyn. therap.* **119**, 56 (1959)
- [10] Herxheimer, H., *J. Physiol.* **122**, 49 P (1953)
- [11] Hillebrecht, J., *Arzneim.-Forsch.* **9**, 625 (1959)
- [12] Meier, R., Tripod, J. et Wirz, E., *Arch. internat. pharmacodyn. therap.* **109**, 55 (1957)
- [13] Mörsdorf, K. u. Fehres, L., *Med. exp.* **1**, 58 (1959)
- [14] Mörsdorf, K. u. Bode, H. H., *Arch. internat. pharmacodyn. therap.* **118**, 292 (1959)
- [15] Page, J. H., *Physiol. Rev.* **34**, 565 (1954)
- [16] Parratt, J. R. and West, G. B., *J. Physiol.* **139**, 27 (1957)
- [17] Parratt, J. R. and West, G. B., *Brit. J. Pharmacol.* **13**, 65 (1958)
- [18] Riechert, W. u. Klein, H., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **213**, 425 (1951)
- [19] Riechert, W. u. Barghorn, H., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **221**, 489 (1954)
- [20] Rowley, D. A. and Benditt, Earl P., *J. Exper. Med.* **103**, 399 (1956)
- [21] Shaw, E. N. and Wolley, D. W., *J. Biol. Chem.* **203**, 979 (1953)
- [22] Shore, P. A., Silver, S. L. and Brodie, B. B., *Experientia* **11**, 272 (1955)
- [23] Vogel, G. u. Marek, M. L., *Arzneim.-Forsch.* **11**, 356 (1961)
- [24] Woolley, D. W., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* **228**, 68 (1956)
- [25] Woolley, D. W. and Shaw, E. N., *Ann. N. Y. Acad. Sc.* **66**, 649 (1957)
- [26] Zbinden, G., Bächtold, H. P. u. Studer, A., *Schweiz. Zschr. allg. Path.* **22**, 300 (1959)

Anschr. d. Verf.: Prof. Dr. med. G. Vogel und Dr. M. L. Marek, Biologisches Institut Dr. Madaus, Köln-Merheim