

Eigenschaften eines neuen Heparionoids im Tierversuch und am Menschen

Autor(en): **Studer, A. / Koller, F. / Kaegi, P.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **13 (1957)**

Heft 1-4: **Symposium über Arteriosklerose = Symposium sur l'artériosclérose = Symposium on arteriosclerosis**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307317>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
und dem Krankenhaus Neumünster, Zollikerberg (Zürich)

Eigenschaften eines neuen Heparinoids im Tierversuch und am Menschen

Von **A. Studer, F. Koller, P. Kaegi, K. Vogler, W. Oberhänsli und
M. Kofler**

Die Zahl der Hypothesen zur Pathogenese der Arteriosklerose ist verwirrend groß. Wenn auch diese Reichhaltigkeit der Anschauungen zu einem großen Teil auf noch fehlende Abklärung zurückzuführen ist, so spricht sie doch auch dafür, daß verschiedenste Faktoren im Sinne eines komplexen Geschehens beim Zustandekommen der arteriosklerotischen Wandveränderungen beteiligt sind. Aus dieser Auffassung heraus erscheint es ungerechtfertigt, sich auf eine der beiden grundsätzlichen Hauptkomponenten – Blut und Gefäßwand – konzentrieren zu wollen, ohne die andere zu berücksichtigen. Wenn wir im folgenden Substanzen beschreiben, die in den verabreichten Dosen ausschließlich auf die humorale Komponente wirken, so geschieht es nicht aus der Meinung heraus, daß die humorale Komponente vorwiegend oder gar ausschließlich an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sei. Wir wollen lediglich auf eine Verbindung hinweisen, die nach intravenöser Zufuhr nachweisbar die Zusammensetzung der Blutlipide ohne Schädigung des Gesamtorganismus verändert. Ob und wie weitgehend diese Beeinflussung der Blutlipide als ein möglicher Faktor im Arteriosklerosegeschehen therapeutisch verwertbar ist, wird erst nach längerer Zeit entschieden werden können, da sich der Beurteilung einer Arteriosklerose-Therapie enorme Schwierigkeiten entgegenstellen. Es sei deshalb betont, daß es uns im folgenden nicht darum geht, ein neues Arteriosklerosemittel zu propagieren, sondern verschiedene Eigenschaften eines Heparinoids zu beschreiben, die im Zusammenhang mit der Arteriosklerose von Interesse sein können.

Während die Meinungen über pathogenetische Beziehungen zwischen bestimmten Serumlipoproteiden und der Entstehung der Arteriosklerose noch weit auseinandergehen, bestehen über die Möglichkeiten

einer vorübergehenden Beeinflussung dieser Serumlipoproteide durch Heparin kaum Zweifel. Heparin vermag nach parenteraler Zufuhr die gröberdispersen Lipoproteid-Moleküle in Richtung feinerdispenser Moleküle zu verschieben (*Gofman* u. Mitarb. [1], *Antonini* u. Mitarb. [2]). Diese Wirkung von Heparin ist nicht an seine Eigenschaften als Antikoagulans gebunden. Die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins erscheint in diesem Zusammenhange sogar unerwünscht.

Es ist deshalb von Interesse, nach synthetischen Substanzen vom Typus des Heparins (Heparinoide) zu suchen, welche die Blutgerinnung nur unwesentlich hemmen.

Die Gefahr dieser Stoffe liegt in ihrer Toxizität bei längerer Verabreichung. So kann mit verschiedenen Heparinoiden (Xylan-polyschwefelsäureester, Polygalakturonsäure-polyschwefelsäureester-methylglukosid [Treburon], Chondroitin-polyschwefelsäureester) am Hund gesetzmäßig ein Vergiftungsbild mit Abmagerung, schweren Durchfällen, Beeinträchtigung der Nierenfunktion erzeugt werden (*Studer* u. Mitarb. [3]), das mit Treburon auch am Menschen beobachtet werden konnte (*Hirschboeck* u. Mitarb. [4], *Field* [4a]). Die Ursache wird in einer kapillartoxischen Wirkung dieser Heparinoide gesehen (*Studer* und *Zbinden* [5]).

Im folgenden beschreiben wir Verträglichkeit, gerinnungshemmende Eigenschaften und Wirkung auf die Blutlipide eines neuen Heparinoids, Ro 1-8307/15¹ am Tier und am Menschen.

Es handelt sich um einen partialsynthetischen, am Stickstoff formylierten Chitosan-polyschwefelsäureester mit einem Schwefelgehalt von etwa 15% und einem mit der Ultrazentrifuge bestimmten mittleren Molekulargewicht von ca. 5000.

Tierexperimentelle Untersuchungen

Untersuchungen am Kaninchen

Körpergewicht: 12 intravenöse Injektionen à 20 mg/kg Heparinoid an 5 Tagen der Woche wurden gut ertragen. 4 Tiere blieben praktisch gewichtskonstant (— 80 g bis + 80 g). Ein Tier nahm mit 170 g deutlich zu.

Leukocyten nach einmaliger intravenöser Injektion: 8 Kaninchen zeigten 7 Stunden nach intravenöser Injektion von 20 mg/kg eine deutliche Zunahme von 3500 Zellen/mm³, nämlich von 8700 Zellen vor Versuch auf 12 200 Leukocyten/mm³. Nur ein einziges Tier zeigte eine Zunahme von 13 500 Zellen, die als erheblich zu bezeichnen ist.

Thrombocyten nach einmaliger intravenöser Injektion: Um wichtige Veränderungen erfassen zu können, wurde die Riesendosis von 60 mg/kg

¹ Versuchspräparat.

Kaninchen	vor Versuch	Thrombocytenzahl/mm ³ nach		
		30 Min.	45 Min.	120 Min.
1	375 000	260 000	300 000	300 000
2	410 000	385 000	480 000	455 000
3	320 000	250 000	370 000	360 000

injiziert und die Thrombocytenzahl vor, sowie 30, 45 und 120 Minuten nach der intravenösen Injektion bestimmt.

Aus obigen Zahlen erhellt, daß die Dosis von 60 mg/kg eine Thrombocyten-senkung hervorruft, die aber schon nach zwei Stunden ausgeglichen ist.

Histopathologische Untersuchungen

Das Lebergewebe ist nach 12 intravenösen Injektionen zu 20 mg/kg an 5 Tagen der Woche sowohl bei der Sofortuntersuchung, wie nach einer Latenzzeit von 30–60 Tagen intakt. Mittels der Metachromasie

Beziehung zwischen Molekulargewichtsverteilung und Ablagerungsgröße

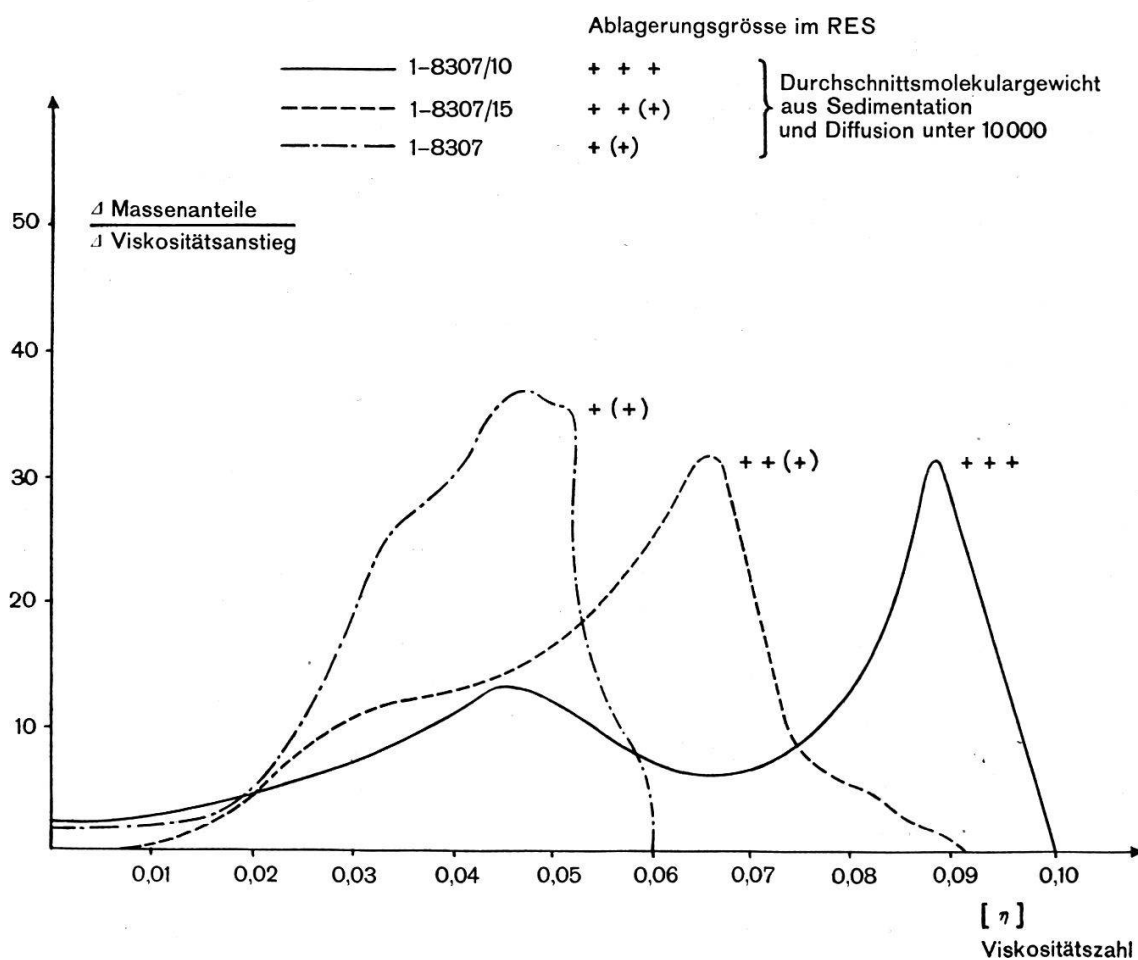


Abb. 1.

läßt sich feststellen, daß die Kupfferschen Sternzellen (nie die Leberzellen) Fremdmaterial eingelagert haben, das nach 60 Tagen wieder verschwunden ist. Die Speicherungsgröße hängt, wie *Husemann* u. Mitarb. [6] nachgewiesen haben, vom Molekulargewicht ab. Allerdings kann, wie unsere einschlägigen Versuche mit verschiedenen Fraktionen von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureestern zeigen, die histologisch erfaßbare Ablagerungsgröße trotz ähnlichem mittleren Molekulargewicht eine deutlich verschiedene sein.

Abb. 1 zeigt die differentiellen viskosimetrischen Massenverteilungskurven von drei dieser Fraktionen, welche sich im mittleren viskosimetrischen Molekulargewicht nur unwesentlich, im Anteil größerer

Tabelle 1

Durchschnittliche Antithrombinzeit nach Quick in Sekunden nach intravenöser, intramuskulärer und oraler Verabreichung verschiedener Dosen von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester Ro 1-8307/10 bzw. /15 im Vergleich zu Heparin

Präparat	Dosis mg/kg	Anzahl Tiere	Std. nach Injektion	Antithrombinzeit in Sek. bei Thrombinverdünnungen			
				1:1000	1:5000	1:10 000	1:20 000
intravenöse Verabreichung							
1-8307/10	5	3	1	4	13	23	44
1-8307/10	10	9	1	4	31	87	∞
1-8307/15	10	4	1	4	12	35	78
Heparin	10	2	1	9	∞		
1-8307/10	20	11	6	4	10	19	50
1-8307/15	20	4	6	4	8	14	23
Heparin	20	61	6	4	65	∞	
intramuskuläre Verabreichung							
Heparin	20	2	1	8	78	∞	
1-8307/10	20	4	1½	4	13	29	56
Heparin	20	6	1½	6	73-∞	∞	
1-8307/10	20	4	4	4	12	28	54
Heparin	20	6	4	8	106-∞	110-∞	∞
Heparin	40	2	1	9	∞		
1-8307/10	40	4	1½	4	22	58	135
orale Verabreichung *							
1-8307/10	500	1	1	4	12	24	55
Heparin	500	1	1	4	12	23	40
1-8307/10	500	1	2	4	11	21	41
Heparin	500	1	2	4	14	27	64
1-8307/10	500	1	4	4	11	25	68
Heparin	500	1	4	4	16	35	112
1-8307/10	500	1	6	4	11	24	61
Heparin	500	1	6	4	15	23	70

* Prothrombinzeit unverändert.

(höher viskoser) Moleküle dagegen deutlich unterscheiden. Die Ablagerungsgröße geht somit dem Gehalt an großen Molekülen parallel.

Gerinnungshemmende Wirkung

Zur Abklärung der gerinnungshemmenden Wirkung an Kaninchen wurde der in Vorversuchen aktivste, gut verträgliche N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester Ro 1-8307/10 (Molekulargewicht 6500, S 15,4%) herangezogen und mit dem zur Beeinflussung der Blutlipide vorgesehenen, schwächer gerinnungsaktiven Präparat Ro 1-8307/15 verglichen.

Klärwirkung in lipämischem Plasma

a) *Untersuchungen am Kaninchen:* In Anlehnung an *Spitzer* [7] wurde die Klärwirkung von Kaninchenplasma nach Vorbehandlung der Kaninchen mit den zu untersuchenden Präparaten gegenüber alimentär lipämischem Hundeplasma gemessen.

Von Hunden wurde lipämisches Plasma gewonnen nach Verfütterung von Lebertran. N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester sowie Heparin wurden Kaninchen intravenös injiziert. Fünf Minuten nach der Injektion wurde Blut entnommen, das Kaninchenplasma mit dem lipämischen Hundeplasma gemischt und die Klärwirkung im Lumetron auf Grund der Änderung der Lichtdurchlässigkeit nach 180 Minuten abgelesen. Die Klärwirkung der zu untersuchenden Präparate wird auf Heparin = 100% bezogen. Sie beträgt mit 5 mg/kg etwa 80–90% von derjenigen des Heparins, das in Dosen von 2,5 mg/kg optimal klärt.

Präparat	Durchschnittliche Klärwirkung in %
1-8307/10	85 ± 10,8
1-8307/15	96 ± 8,4

b) *Untersuchungen am Hund:* Die orale Verabreichung von 500 mg/kg Präparat Ro 1-8307/10 zeigt eine, zwei, vier und sechs Stunden nach der Verabreichung keine Klärwirkung im lipämischen Hundeplasma.

Verträglichkeit

Da die *Verträglichkeit am Hund* von besonderer Bedeutung ist, wurde zusätzlich zu den früher untersuchten (*Studer* u. Mitarb. [3]) und in Tab. 2 mitaufgeführten Heparinoiden, Dextransulfat (2 Präparate des Handels), ferner Chondroitin-polyschwefelsäureester und verschiedene Fraktionen von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureestern auf ihr Verhalten bei intravenöser Injektion von 20 mg/kg an 5 Tagen der Woche geprüft. Die Ergebnisse hinsichtlich Zeit und Auftreten einer Enterocolitis sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

Verträglichkeit verschiedener Heparinoide am Hund im Vergleich zu Heparin bei intravenöser Injektion von 20 mg/kg an 5 Tagen der Woche

Präparat	Anzahl Hunde	tot nach Anzahl Injektionen	Enterocolitis (Durchfälle)
Polygalakturonsäure-polyschwefelsäureester-methylglukosid	4	10	+
Xylan-polyschwefelsäureester (Handelspräparat)	3	9	+
Dextransulfat (Handelspräparate)	3	8	+
Chondroitin-polyschwefelsäureester mittleres Mol.-Gew. 4500–14 000	9	9	+
Mittleres Mol.-Gew. < 3000	2	überlebend nach 60	0
N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester mittleres Mol.-Gew. 32 000	1	12	+
mittleres Mol.-Gew. 5000–8000	6	überlebend nach 60	0
Heparin	4	überlebend nach 60	0

Es erhellt, daß sich Dextransulfat (2 Präparate des Handels) und Chondroitin-polyschwefelsäureester mit einem mittleren Molekulargewicht von 4500–14 000 gleich verhalten wie Treburon und Xylan-polyschwefelsäureester. In allen diesen Fällen kommt es zum typischen Vergiftungsbild mit Abmagerung, schweren Durchfällen, Freßunlust, terminalem Durst, in den meisten Fällen Ansteigen des Rest-N, Eiweißausscheidung im Urin. Als Todesursache findet man nicht Blutungen, sondern schwere, histologisch faßbare degenerative und entzündliche Veränderungen vorwiegend in Niere, Leber und Dünndarm.

Ein grundsätzlich anderes Verhalten zeigen N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester mit einem mittleren Molekulargewicht von 5000 bis 8000 sowie ein Chondroitin-polyschwefelsäureester mit einem mittleren Molekulargewicht unter 3000. In diesen Fällen ertragen die Hunde 60 Injektionen zu 20 mg/kg in recht gutem Allgemeinzustand. Zu schweren Darmstörungen kommt es nicht. Leichte Tendenz zu Durchfällen im Verlaufe dieser langen Behandlung war nur ganz vereinzelt während 1–3 Tagen zu beobachten. Ein Tier, das mit N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester behandelt wurde, konnte 7 gesunde Junge werfen, ohne daß die Behandlung abgesetzt werden mußte. Zucker, Urobilinogen und Sediment waren stets o. B., Rest-N nicht erhöht, Thymolprobe negativ.

Histopathologisch lassen sich folgende Befunde erheben:

Leber: regelmäßige Läppchenstruktur, Leberzellbalken normal breit. Leberzellen mit feingranuliertem, nicht verfettetem Protoplasma. Kerne sind regelmäßig, Kapillaren eng bis mittelweit. Kupffersche Sternzellen vermehrt und oft geschwollen, stark beladen mit metachromatisch reagierendem, feinkörnigem Material. Glissonsche Scheiden und Kapsel zart.

Nieren: Glomerula zart. Kapillarschlingen mittelweit, vereinzelt erweitert und gut bluthaltig. Kapillarendothelien überall intakt. Bowmansche Kapseln nicht verdickt. Tubuli normal weit. Tubulusepithelien intakt, hie und da leicht vakuolisiert. Tubuli recti feintropfig verfettet (normaler Befund beim Hund). Die Tubulusepithelien enthalten keine metachromatische Granula, sind aber leicht diffus rotviolett (metachromatisch) verfärbt. Dagegen finden sich kleine, metachromatisch reagierende Granula in den Endothelien der Glomerulumschlingen und in recht beträchtlichem Ausmaß in den Kapillarepithelien des Interstitiums. Interstitium zart, Nierenbecken unverändert.

Milz: mäßig viele, mittelgroße Follikel. Rote Pulpa zellreich. In den Pulpazellen phagozytiert sehr reichlich metachromatisch reagierendes feinkörniges Material. Trabekel und Kapsel zart.

Dünn- und Dickdarm: Schleimhaut intakt. Tiefe Wandschichten o. B.

Herz: normal breite Muskelfasern mit deutlicher Querstreifung. Interstitium zart.

Untersuchung auf Spätschädigung

Um Aufschlüsse über das Verhalten des gespeicherten Materials zu erhalten, wurden an 2 Hunden Gesamtdosen von 1,23 g/kg (41 Injektionen zu 30 mg/kg) verabfolgt, die Hunde 6 Monate bzw. 12 Monate nach Absetzen der Behandlung getötet und histopathologisch untersucht. Hierbei ergaben sich keinerlei Zeichen einer Organschädigung. Die parenchymatösen Organe sind intakt. Das im RES gespeicherte Fremdmaterial hat wesentlich abgenommen, ist aber noch nicht völlig verschwunden.

Toxizität an der Maus

Die Dosis letalis 50% beträgt bei einmaliger intravenöser Verabreichung an der Maus nach 24stündiger Beobachtungszeit 2,4 g/kg. Erfahrungsgemäß hat diese Zahl nicht viel zu bedeuten für die Verträglichkeit, da bei längerer Verabreichung schlecht verträgliche Heparinoide ebenfalls eine günstige Dosis letalis 50% an der Maus aufweisen können.

Ausscheidung

Die Ausscheidung im Urin beträgt beim Hund, gemessen an der noch gerinnungsaktiven Substanz bei der am stärksten gerinnungshemmenden Fraktion Ro 1-8307/10, in 24 Stunden 25–30% des intravenös zugeführten Materials.

Die von *B. Pellmont* durchgeführten *allgemein-pharmakologischen* Untersuchungen (Blutdruck an der Numal-Katze, Durchblutung verschiedener Gefäßgebiete, isoliert schlagendes Säugetierherz, Atmung, isolier-

ter Darm) ergeben keine ins Gewicht fallenden und bei der Verwendung am Menschen zu beachtenden Wirkungen.

Untersuchungen am Menschen

Die Prüfung am Menschen sollte vorwiegend abklären, ob die im Tierversuch erkannten Eigenschaften der N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester sich qualitativ und quantitativ auch beim Menschen nachweisen lassen. Somit war zu prüfen ob:

1. die im Tierversuch gefundenen geringfügigen gerinnungshemmenden Eigenschaften am Menschen quantitativ ähnlich befunden werden;
2. die im Tierversuch festgestellte gute Verträglichkeit auch für den Menschen gilt;
3. die im Tierversuch nachzuweisende antilipämische Wirkung beim Menschen ein mit papierelektrophoretischen Untersuchungen erfaßbares Analogon hat;
4. klinisch feststellbare Zeichen einer antiarteriosklerotischen Wirkung beim Menschen nachweisbar sind.

Gerinnungshemmende Wirkung (Vorversuche mit Ro 1-8307/10)

In einem Vorversuch an 10 gesunden Versuchspersonen wurde die gerinnungshemmende Wirkung der am Kaninchen relativ am stärksten wirksamen Fraktion Ro 1-8307/10 gemessen. Die Prüfung erfolgte durch Ermittlung der Antithrombinzeit vor, eine, zwei und drei Stunden nach einmaliger intravenöser Applikation von Ro 1-8307/10 in der Dosierung von 150 mg bzw. 300 mg im Vergleich zu Heparin (50 mg). Die genannten Dosen wurden an je 4–5 Versuchspersonen verwendet.

Ergebnis: Die gerinnungshemmende Wirkung von Ro 1-8307/10 ist sehr viel schwächer als von Heparin (Abb. 2).

Die Steigerung der Dosis auf 300 mg hatte nur eine mäßige Intensivierung der gerinnungshemmenden Wirkung zur Folge. Deutlich besser als 300 mg Ro 1-8307/10 wirken 50 mg Heparin, das somit mit Sicherheit mehr als sechsmal wirksamer ist als Ro 1-8307/10. Um eine individuell verschiedene Ansprechbarkeit der Patienten auf Heparin bzw. Heparinoide auszuschließen, wurden an drei Versuchspersonen die zwei in Untersuchung stehenden Präparate Ro 1-8307/10 und Heparin vergleichend untersucht und dabei die gefundenen Wirkungsunterschiede bestätigt. N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester hat am Menschen in Übereinstimmung mit den Versuchen am Kaninchen nur eine geringfügige gerinnungshemmende Wirkung. Wie am Kaninchen festgestellt wurde, ist die gerinnungshemmende Wirkung von Ro 1-8307/15, das für

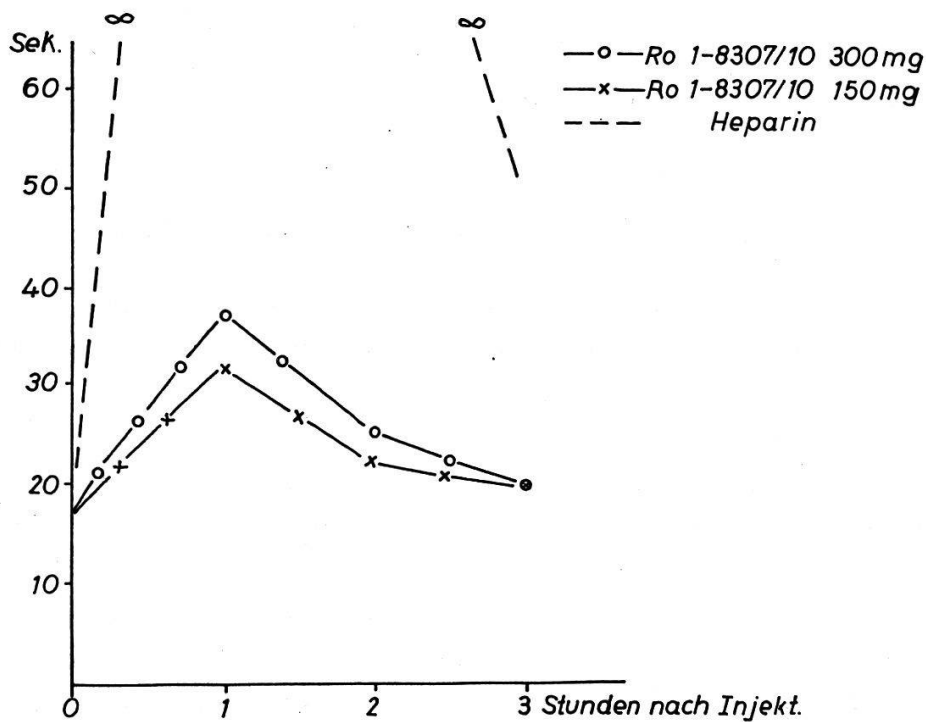


Abb. 2. Antithrombinzeit nach i.v. Injektion von 150 bzw. 300 mg N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester (Ro 1-8307/10) im Vergleich zu 50 mg Heparin. (Durchschnittswerte von je 5 Versuchspersonen für Ro 1-8307/10 und Heparin)

die Beeinflussung der Blutlipide im folgenden herangezogen wird, noch geringer und dürfte praktisch nicht mehr ins Gewicht fallen. Die gerinnungshemmende Wirkung von 300 mg Heparinoid Ro 1-8307/10 läßt sich durch 10 γ Protaminsulfat aufheben.

Krankengut

N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester Ro 1-8307/15 wurde an 36 Patienten geprüft, von denen 35 mehr oder weniger deutliche Zeichen einer allgemeinen Arteriosklerose aufwiesen. Ein Patient hatte einen Morbus Buerger. Fünf Patienten zeigten als Nebenfund einen Diabetes mellitus. Bei 30 Patienten ließen sich als Folge des Gefäßprozesses Durchblutungsstörungen verschiedener Organe nachweisen, die zu Beschwerden und Ausfallsymptomen geführt haben:

a) periphere Durchblutungsstörungen in 12 Fällen (7 mit arteriosklerotischem Gangrän, 2 mit typischer Claudicatio ohne trophische Störungen, 3 mit Pulslosigkeit ohne Beschwerden);

b) zentrale Durchblutungsstörungen in 11 Fällen (schweres organisches Psychosyndrom und arteriosklerotisches Irresein 6, Encephalomalacie mit neurologischen Ausfällen 5);

c) coronare Durchblutungsstörungen in 7 Fällen (Infarkte 4, coronare Durchblutungsstörung im EKG mit stenocardischen Beschwerden 3).

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 74 Jahre.

Alter zwischen	51 und 60 Jahren	3 Patienten
	61 und 70 Jahren	7 Patienten
	71 und 80 Jahren	15 Patienten
	81 und 90 Jahren	10 Patienten.

Versuchsplan: N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester wurde in Dosen von 100 mg (= 2 cm³) als 5%ige Lösung 3mal wöchentlich i.v. injiziert.

Verträglichkeit: Die Verträglichkeit von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester war eine ausgesprochen gute. Es traten weder Übelkeit, Brechreiz noch vasomotorische Störungen nach der Injektion auf. Auch die lokale Toleranz an der Injektionsstelle war gut. Allergische Erscheinungen wurden nicht beobachtet. Die gute Verträglichkeit wurde an Patient H. H. autoptisch festgestellt. Der 76jährige Mann ließ bei der Sektion durch PD. Dr. J. Rüttner² eine schwere allgemeine Arteriosklerose erkennen, dagegen keine Organveränderungen, die mit der Applikation von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester in Zusammenhang zu bringen wären. Insbesondere fanden sich in Leber und Niere keine Ablagerungen von metachromatischem Material. Mit Treburon und anderen Heparinoiden wurden gelegentlich Durchfälle beobachtet. Keiner der mit N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester behandelten Patienten zeigte Störungen von seiten des Magen-Darm-Kanals.

Papieroelektrophoretische Bestimmung der Lipoproteide

Die Lipoproteidbestimmungen wurden vor und eine Stunde nach der Heparinoidinjektion vorgenommen, und zwar am Anfang, in der Mitte und am Ende der Behandlung (1., 12. und 24. Injektion).

a) *Gesamtlipide:* Die Untersuchungen folgten im wesentlichen der von Swahn [8] angegebenen Technik: Ein 4 cm breiter und 20 cm langer Filterpapierstreifen wird mit Bleistift in 10 Felder eingeteilt. In je 3 Felder werden mit der Pipette je 25 mm³ der Serumprobe vor und nach der Injektion des Heparinoids sowie einer alkoholischen Trioleinlösung (1 g Triolein ad 100 cm³ Alkohol gelöst) aufgetragen. Ein Feld wird als Nullwert freigelassen. Die an der Luft und 10 Minuten bei 80° C getrockneten Streifen werden mit Sudanschwarz angefärbt (vergleiche Methode A, Seite 249). Nach dem Trocknen und Ausschneiden des Feldes erfolgt die Eluierung des Farbstoffes mit 5cm³ 20%iger Essigsäure in

² Wir danken Herrn PD Dr. J. Rüttner (Histopathologisches Institut der Universität Zürich, Direktor: Prof. Dr. A. von Albertini) für die freundliche Überlassung der Befunde.

Äthanol. Die Extinktionen der einzelnen Proben werden im *Beckman*³ bei 590 m μ ausgemessen. Der Gesamtlipoidgehalt (Tab. 3) errechnet sich aus den Extinktionen nach folgender Beziehung:

$$\text{Lipoidgehalt (mg/100 ml)} = \frac{\text{Ext. Serum}}{\text{Ext. Triolein}} \cdot 1000$$

b) α - und β -*Lipoproteide*: Die papierelektrophoretischen Bestimmungen der α - und β -Lipoproteide stützen sich weitgehend auf die Technik nach *Swahn* [9], *Antonini* [2] sowie *Nikkilä* [10].

1. Apparatur und Technik.

Als Trägermedium wird Whatman-Papier Nr. 1 verwendet. Die mit dem Puffergemisch (Veronal-Na-Acetat-Puffer der Ionenstärke 0,1 mit einem pH von 8,6 nach *Michaelis* [11] befeuchteten, 4 cm breiten Streifen kommen in eine aus Plexiglas bestehende Elektrophoresekammer (42,5 \times 24 \times 17 cm, Firma Dr. Hösli, Bischoffszell); 25 mm³ Serum werden sorgfältig mittels einer Mikropipette als 2,5 cm langer Strich aufgetragen. Die Auftrennungen erfolgen über Nacht bei 80–90 Volt während 14–15 Stunden. Nach dem Entfernen der Streifen aus der Kammer werden sie 30 Minuten bei 40° C auf dem Rahmen vorgetrocknet und anschließend 10 Minuten bei 80° C im Trockenschrank aufgehängt.

2. Färben der Streifen.

Die getrockneten Streifen werden mit Sudanschwarz gefärbt. Anfänglich arbeiteten wir genau nach der Methode von *Swahn* [8] und bestimmten die Extinktionen am nicht-transparenten Streifen (*Methode A*). Dieses Vorgehen hat den Nachteil, daß eine «konzentrationsproportionale» Photometrierung nur bis zu Extinktionen von 0,8 möglich ist und die Stabilität der gesättigten Sudanschwarzlösung etwas zu wünschen übrig läßt. Wir sind deshalb dazu übergegangen, die leicht modifizierte *Methode B* anzuwenden (vgl. *Bansi* u. Mitarb. [12]). In Tab. 3 sind die Einzelbestimmungen mit A oder B bezeichnet, und zwar in der Reihenfolge für die I-, II-, III-Bestimmung während der Behandlung eines Patienten.

Methode A

Farbstofflösung: Zu 0,1 g Sudanschwarz B werden 100 ml 60 volumprozentiger Alkohol gegeben und die Lösung unter öfterem Schütteln auf dem Dampfbad zum Sieden erhitzt. Nach zweiminutigem Kochen

³ Quartz-Spektrophotometer, Beckman, Modell DU.

Tabelle 3

Pat.	Färbemethode		Kontrolle I (1. Inj.)				Kontrolle II (12. Inj.)				Kontrolle III (24. Inj.)			
			Lipoid-Gehalt mg%	β/α	Kurvenflächen		Lipoid-Gehalt mg%	β/α	Kurvenflächen		Lipoid-Gehalt mg%	β/α	Kurvenflächen	
					α	β			α	β			α	β
B. A. ♂	AAA	vor	845	6,9	329	2300	476	6,6	157	1019	561	6,1	235	1448
		nach	697	7,1	284	1995	436	5,2	204	1052	454	5,5	247	1364
G. E. ♀	AAA	vor	459	2,5	562	1365	389	2,8	489	1353	342	3,0	275	820
		nach	349	2,3	573	1285	315	2,7	404	1103	327	2,7	302	787
M-S.M ♀	AAA	vor	495	2,9	466	1362	503	3,4	405	1378	482	2,6	314	830
		nach	453	3,4	448	1522	402	2,9	357	1043	402	2,5	258	654
H. H. ♂	AAA	vor	502	5,5	194	1080	500	5,7	221	1164	475	3,7	374	1380
		nach	428	6,1	170	1023	404	5,0	217	1134	453	3,4	399	1353
S. K. ♀	AAB	vor	775	4,5	303	1311	838	3,1	612	1893	672	2,2	558	1233
		nach	653	3,0	377	1212	723	2,7	597	1603	584	2,1	477	1009
S. J. ♀	ABB	vor	417	4,4	264	1116	491	2,7	220	575	508	3,3	149	470
		nach	302	2,8	336	918	384	2,3	192	449	374	2,7	104	369
B. R. ♂	BBB	vor	510	3,0	345	1024	500	2,6	605	1580	495	2,3	188	424
		nach	461	2,4	366	883	442	2,3	583	1330	424	2,0	326	652
W. P. ♂	BBB	vor	502	2,7	458	1231	414	2,9	194	575	438	3,0	162	420
		nach	485	2,6	457	1175	326	1,7	260	436	391	2,5	149	362
S. M. ♀	BBB	vor	564	7,1	230	1611	720	3,1	465	1446	520	3,1	378	1151
		nach	450	4,9	275	1328	474	4,6	313	1402	386	2,8	311	882
S. A. ♀	BBB	vor	401	2,6	419	1101	476	2,7	285	764	449	2,6	184	469
		nach	344	2,2	512	1112	386	2,1	344	710	405	2,3	190	435
N. E. ♀	BBB	vor	437	2,7	474	1281	496	2,2	539	1200	640	2,7	400	1092
		nach	362	3,0	413	1218	390	2,5	496	1250	464	3,3	300	982
S. L. ♀	BBB	vor	443	2,8	414	1164	717	2,7	325	891	586	3,1	198	621
		nach	359	2,2	499	1107	408	2,1	282	588	438	3,0	165	482
M. F. ♀	BBB	vor	456	2,2	533	1158	533	1,8	380	687	500	2,1	218	446
		nach	423	2,3	512	1175	450	2,3	284	655	469	1,7	271	457
B. H. ♂	BBB	vor	428	2,9	453	1291	445	2,9	241	667	456	3,2	212	668
		nach	355	2,7	515	1392	381	2,4	237	563	414	2,9	189	547
M. M. ♀	BBB	vor	671	3,3	499	1629	619	3,3	336	1104	586	4,5	156	700
		nach	522	3,4	491	1690	446	3,0	338	1007	430	4,3	133	560
T. L. ♀	BBB	vor	274	2,0	402	803	362	1,8	214	338	352	1,8	313	558
		nach	236	1,7	444	743	281	2,2	134	296	314	1,9	246	462
S. A. ♀	BBB	vor	486	1,8	527	947	531	2,4	209	481	479	2,0	329	687
		nach	396	1,9	503	922	469	2,1	231	461	379	2,4	314	692
A. J. ♂	AAB	vor	474	4,1			539	3,5	422	1467	493	3,1	360	1105
		nach	433	3,2			436	4,5	320	1426	450	2,9	343	997

Tabelle 3 (Fortsetzung)

Pat.	Färbemethode		Kontrolle I (1. Inj.)				Kontrolle II (12. Inj.)				Kontrolle III (24. Inj.)			
			Lipoid-Gehalt mg%	β/α	Kurvenflächen		Lipoid-Gehalt mg%	β/α	Kurvenflächen		Lipoid-Gehalt mg%	β/α	Kurvenflächen	
					α	β			α	β			α	β
A. J. ♂ Heparin	BBB	vor	471	3,1	292	893	536	2,3	285	681	547	3,7	211	712
		nach	436	2,9	300	877	431	2,5	204	511	519	3,5	220	714
E. J. ♂	AA	vor	490	4,8	212	1006	499	3,8	298	1128				
		nach	425	4,2	217	868	395	3,3	258	863				
G. B. ♀	AA	vor	454	2,8	516	1463	313	3,1	392	1202				
		nach	376	2,7	500	1302	255	3,4	341	1143				
A. G. ♂	AA	vor	422	2,8	455	1268	468	2,8	399	1048				
		nach	393	2,3	530	1212	406	2,8	338	930				
B. J. ♂	AA	vor	495	7,7	180	1361	498	7,4	183	1348				
		nach	442	5,2	245	1251	478	5,3	243	1282				
K.	AA	vor	411	3,8	232	869	348	3,2	305	943				
		nach	362	3,1	235	728	308	3,1	275	838				
M. E. ♀	AA	vor	515	3,0	483	1390	560	2,3	493	1253				
		nach	450	2,5	533	1300	478	2,6	432	1118				
L. T. ♂	AA	vor	295	1,8	375	673	301	1,7	492	852				
		nach	265	1,5	391	575	266	1,5	515	786				
S. K. ♀	AB	vor	295	3,6	292	1047	309	2,2	482	1078				
		nach	233	4,2	223	930	252	2,2	478	1047				
T. A. ♂	BB	vor	428	2,8	281	776	590	2,3	326	735				
		nach	390	2,7	275	709	470	2,6	267	680				
M. A. ♂	BB	vor					528	2,5	449	1123	543	2,4	248	593
		nach					446	2,5	432	1059	450	2,3	340	772
G.	A	vor	491	4,8	174	847								
		nach	491	3,9	217	805								
K. K. ♂	A	vor	465	3,5	355	1210								
		nach	368	3,5	318	1101								
M. L. ♀	A	vor	446	4,8	159	784								
		nach	354	4,7	156	740								
Z. J. ♀	A	vor	455	2,6	303	778								
		nach	403	2,2	345	768								
S. M. ♀	A	vor	472	3,2	423	1368								
		nach	406	3,7	339	1267								
S. F. ♀	A	vor	383	1,9	384	740								
		nach	337	2,0	346	652								
V. A. ♂	A	vor	350	3,8	367	1362								
		nach	327	3,7	351	1302								
Z. F. ♂	A	vor	577	5,0	226	1125								
		nach	417	3,6	217	770								

wird die Lösung zuerst heiß, dann nach dem Abkühlen ein zweites Mal filtriert. Zur Kontrolle der Lösung verdünnt man 1 cm³ derselben mit 50% Alkohol auf 100 cm³ und mißt die Extinktion bei 590 m μ gegen 50%igen Alkohol (Beckman, 1-cm-Küvette). Bei richtig hergestellten Lösungen schwanken die Werte innerhalb kleiner Grenzen von ca. 0,34 bis 0,36. Für unsere Versuche setzen wir der Lösung 50%igen Alkohol zu, bis sie, 1:100 verdünnt, eine Extinktion von 0,30 aufweist. Die getrockneten Streifen werden 3 Stunden in die beschriebene Farbstofflösung gelegt und unter zeitweiligem Bewegen des Bades angefärbt. Pro Streifen werden 100 cm³ frisch bereiteter Farbstofflösung verwendet. Das Auswaschen geschieht je 15 Minuten in drei Bädern mit 50%igem Äthanol. Nach dem Färben werden die Streifen einige Sekunden auf Filterpapier gelegt und anschließend in waagrechter Lage getrocknet. Die trockenen Streifen werden direkt zur Photometrierung verwendet.

Methode B

Die Herstellung der Sudanschwarzlösung geschieht analog der Methode A. Anschließend wird die gesättigte Lösung mit 50%igem Alkohol versetzt, bis für die 1:100 verdünnte Lösung eine Extinktion von 0,17 resultiert. Angefärbt wird 6 Stunden im zeitweilig bewegten Bade (pro Streifen 100 cm³ Farbstofflösung). Das Auswaschen geschieht 20 Minuten in fließendem Leitungswasser. Nach kurzem Auflegen auf Filterpapier werden die Streifen in feuchtem Zustande in Glycerin gelegt. Zur Auswertung werden sie blasenfrei zwischen zwei Glasplatten gelegt und analog der Methode A nach [3] photometriert.

3. Auswerten der Pherogramme.

Zur quantitativen Auswertung unserer Pherogramme stand das photoelektrische Auswertegerät, Modell 525 der Photovolt Corp., New York, zur Verfügung. Die millimeterweise abgelesenen Extinktionswerte werden auf Millimeterpapier aufgetragen, die erhaltenen Kurven (vgl. Abb. 3) von Hand extrapoliert und zur Konzentrationsbestimmung der α - und β -Fraktionen die beschriebenen Flächen mittels eines Planimeters (Modell Amsler, Typ 612) ausgemessen. Der «Schwanz» der β -Lipoproteide, welcher größtenteils aus Chylomikronen besteht, wird nicht gesondert ausgewertet, sondern zur β -Fraktion gerechnet. Die angegebenen Flächenwerte sind in Tab. 3 in Planimeter-Einheiten angegeben und stellen Mittelwerte aus 3 Parallelbestimmungen dar⁴.

⁴ Da alle unsere Bestimmungen auf der Fettfärbung mit Sudanschwarz beruhen, d. h. vom färberischen Verhalten der Lipoid-Anteile und den Versuchsbedingungen abhängig sind, handelt es sich bei allen Resultaten um Relativwerte. Diese Werte genügen jedoch unserer Problemstellung, die nur relative Veränderungen unter Einwirkung des Präparates erfassen sollen, vollauf.

$$\frac{\beta}{\alpha} \text{ vor} = \frac{850}{340} = 2,5$$

$$\frac{\beta}{\alpha} \text{ nach} = \frac{744}{334} = 2,2$$

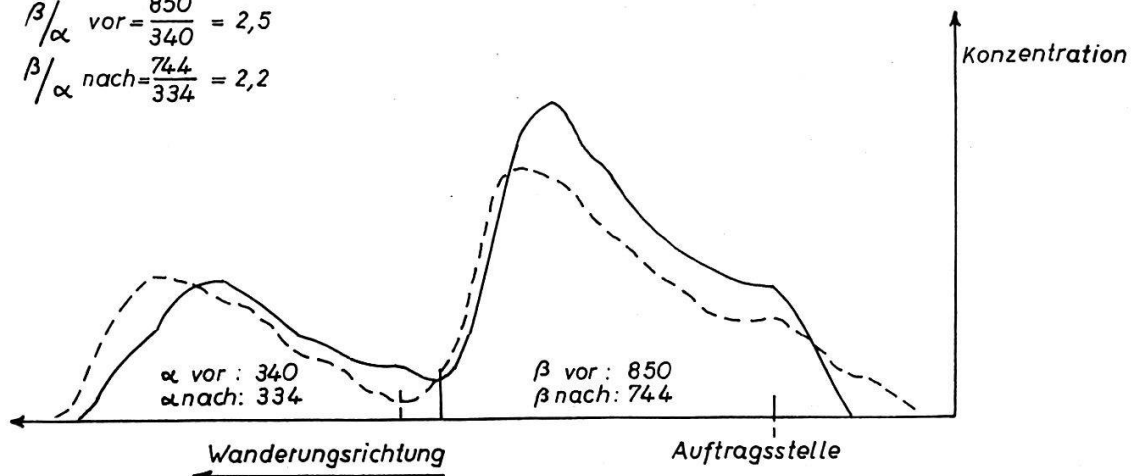


Abb. 3. Papierelktrophorese-Diagramm des Serums von Patientin S. A. vor (—) und eine Stunde nach (---) der 12. i.v. Injektion von 100 mg N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester.

4. Statistische Auswertung der Elektrophorese-Ergebnisse.

Für die statistische Auswertung schien uns das Differenzenverfahren von *Student* [13] die geeignetste Methode zu sein. Die Signifikanzgrenze wurde bei einem $p = 0,05$ festgelegt, d. h. es besteht nur eine 5%ige Wahrscheinlichkeit dafür, daß der Durchschnittswert zufallsbedingt ist.

Ergebnisse

In Tab. 3 sind die Lipoidwerte, die Quotienten β/α -Lipoproteide sowie die α - und β -Lipoproteid-Werte von 35 Patienten vor und eine Stunde nach der intravenösen Injektion von 2 cm³ (= 100 mg) Ro 1-8307/15, von 28 Patienten vor und nach der 12. Injektion des Präparates, von 19 Patienten vor und nach der 24. Injektion, von einem Patienten vor und nach der 1., 12. und 24. Injektion von 2 cm³ Heparin dargestellt. Bei der Betrachtung des Zahlenmaterials in Tab. 3 erhellt, daß die Gesamtlipide nach *Swahn* [8] eine Stunde nach der Injektion von Ro 1-8307/15 stets abnehmen. Ferner ist eine Tendenz zur Abnahme der β -Lipoproteide sowie ein Absinken des Quotienten β/α -Lipoproteide festzustellen (vgl. Abb. 3).

Um die Resultate analytisch besser erfassen zu können, wurden aus Tab. 3 die Werte wie folgt ausgezogen und für die Signifikanzberechnungen in den Tabellen 4, 5 und 6 verwendet.

a) Vorübergehende Abnahme der Gesamtlipide für den einzelnen Patienten (Tab. 4)

Es werden ausschließlich jene Patienten, die alle 24 Injektionen erhalten haben, zur Beurteilung herangezogen. Die Auswertung erfolgt

auf Grund der drei Einzelwerte, erhalten aus den Analysen der Papier-
elektrophorese nach der 1., 12. und 24. Injektion von Ro 1-8307/15. Es
wurde untersucht, ob diese Einzelwerte sich signifikant vom jeweiligen
Ausgangswert vor der Injektion unterscheiden.

Tabelle 4
Signifikanz der Abnahme der Gesamtlipoide für den Einzelpatienten

Patient	Ge- schlecht	Präparat	Signifikanz p
B. A.	♂	Heparinoid Ro 1-8307/15	0,08
G. E.	♀	«	0,15
M.-S. M.	♀	«	0,05
H. H.	♂	«	0,10
S. K.	♀	«	< 0,05
S. J.	♀	«	< 0,05
B. R.	♂	«	< 0,05
W. P.	♂	«	0,18
S. M.	♀	«	0,05
S. A.	♀	«	< 0,05
N. E.	♀	«	0,07
S. L.	♀	«	0,15
M. F.	♀	«	0,10
B. H.	♂	«	< 0,05
M. M.	♀	«	< 0,05
T. L.	♀	«	0,08
S. A.	♀	«	< 0,05
A. J.	♂	«	0,10
A. J.	♂	Heparin	0,15

Es erhellt, daß in der Hälfte der Fälle sich eine Stunde nach der
Injektion von Ro 1-8307/15 eine Abnahme der Gesamtlipoide einstellt,
ist doch in 9 von 18 Fällen die Abnahme trotz der sehr kleinen Differenz-
zahl von 3 bereits signifikant. Der zuerst mit Ro 1-8307/15, anschließend
mit Heparin mit je 24 Injektionen behandelte Patient A. J. zeigte auf
Heparin keine deutlichere Beeinflussung der Gesamtlipoide als vorher
mit Ro 1-8307/15.

b) *Abnahme der Gesamtlipoide, der β -Fraktion und des Quotienten
 β/α -Lipoproteide für alle Fälle*

Tab. 5 vermittelt ein Bild der Beeinflussung der Gesamtlipoide, der
Abnahme der β -Fraktionen sowie der Verschiebung des Quotienten
 β/α -Lipoproteide für alle Fälle, d. h. für die Gesamtzahl der ausgeführten
Analysen (Mittelwerte aus 3 Parallelbestimmungen). Die Signifikanz ist
für alle 3 Kriterien trotz der relativ großen Streuung der Parallelbestim-
mungen sehr hoch, d. h. es besteht nur eine Wahrscheinlichkeit 1:1000,

daß die Gesamtlipoide, der Quotient β/α -Lipoproteide und die β -Fraktion nicht abgenommen haben. Ein Momentaneffekt des Präparates ist nicht anzuzweifeln.

Tabelle 5

Serumlipoproteide vor und 1 Stunde nach intravenöser Injektion von 100 mg N-Formylchitosan-polyschwefelsäureester (Ro 1-8307/15)

	Bestimmungen Anzahl	Mittelwerte		Abnahme %	Signifikanz P
		vor Inj.	1 Std. nach Inj.		
Abnahme der Gesamtlipoide	82	490 mg%	410 mg%	16,5	0,001
Verschiebung des Quotienten β/α -Lipoproteide	82	3,29	3,02	8,2	0,001
Abnahme der β -Lipoproteid- Fraktion (Flächenwerte)	81	1058	943	11,0	0,001

c) *Dauer der Abnahme der Gesamtlipoide und des Quotienten β/α -Lipoproteide*

Ein wesentlich anderes Bild ergibt sich bei der Prüfung auf einen Dauereffekt des Präparates. Hier wurden die Gesamtlipoide und der Quotient β/α -Lipoproteide verfolgt, indem die Differenzen *vor* der 1. und 24. Injektion gebildet wurden. Die Signifikanz (Tab. 6) ist für beide Werte auffallend verschieden, jedoch $> 0,05$, d. h. ein Dauereffekt läßt sich in unseren Versuchen nicht belegen, obwohl die Differenz des Mittelwertes für den Quotienten β/α -Lipoproteide ca. 10% ausmacht.

Tabelle 6

Serumlipoproteide vor der 1. und 24. intravenösen Injektion von je 100 mg N-Formylchitosan-polyschwefelsäureester (Ro 1-8307/15)

	Bestimmungen Anzahl	Mittelwerte		Signifikanz P
		vor 1. Inj.	vor 24. Inj.	
Gesamtlipoide	18	507 mg%	502 mg%	0,8
β/α -Quotient	15	3,39	3,06	0,1

Für den Dauereffekt des Quotienten β/α -Lipoproteide standen uns nur 15 Fälle zur Verfügung; 3 wurden weggelassen, da die Lipoidfärbungen für die Differenzen nicht einheitlich entweder nach A oder B durchgeführt wurden. Das günstigere p von 0,1 ist auf Patient S. M. zurückzuführen, der als Einzelfall besonders stark reagierte (β/α von 7,1 \rightarrow 3,1).

d) Vergleich mit Heparin

Nachstehende Tabelle 7 zeigt, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei Patient A. J. (Tab. 3), daß Heparin bei einmaliger intravenöser Injektion von 100 mg (2 cm³ Heparin) auch quantitativ ähnliche Wirkungen ausübt wie Präparat Ro 1-8307/15.

Tabelle 7

	Flächenwert			Lipoidgehalt mg%
	β/α	α	β	
Patient S.				
vor Injektion	3,4	400	1400	623
1 Std. nach Injektion	3,0	402	1264	556
2 Std. nach Injektion	3,0	459	1551	543
Patient F.				
vor Injektion	3,4	325	1084	459
1 Std. nach Injektion	3,3	296	938	395
2 Std. nach Injektion	3,2	341	1057	407

Klinische Befunde

Eine allfällige anti-arteriosklerotische Wirkung wurde zu erfassen versucht durch Palpation des Pulses, durch Inspektion, Ermittlung der Schrittzahl bei Claudicatio intermittens, Ruhe-Oszillometrie und Hautthermometrie sowie Kontrolle der subjektiven Beschwerden.

Anhaltspunkte für eine klinisch erfaßbare Wirkung von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester ließen sich während der zweimonatigen Behandlungszeit in unserem Krankengut nicht gewinnen. Es wurden weder die ischämischen Schmerzzustände und trophischen Störungen noch die Funktionsausfälle beeinflußt. Dieses negative Verhalten beeindruckt nicht, wenn man bedenkt, daß es sich um schwerste arteriosklerotische Zustände bei einem Durchschnittsalter von 74 Jahren handelt.

Epikrise

Bei der Schaffung neuer Heparinoide ist in erster Linie auf eine gute Verträglichkeit Bedacht zu nehmen. Zur Kontrolle der Verträglichkeit von Heparinoiden erweist sich der Hund als besonders geeignet, da er schon in fast therapieanalogen Dosen Vergiftungssymptome aufweist, die durchaus denjenigen gleichen, wie sie am Menschen mit Heparinoiden (Treburon) beobachtet wurden (*Hirschboeck* u. Mitarb. [4], *Field* [4a]). Verschiedene Heparinoide wie Xylan-polyschwefelsäureester, Chondroitin-polyschwefelsäureester, Dextransulfat führen am Hund nach 9–13 Injektionen von 20 mg/kg zum Exitus; wenn deshalb von der von uns bearbeiteten Klasse der N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäure-

ester 60 Injektionen zu 20 mg/kg klinisch und histopathologisch gut vertragen werden und 6 bzw. 12 Monate nach 41mal 30 mg/kg keine Spätschäden beobachtet wurden, so bedeutet das eine ganz entscheidende Verbesserung der Verträglichkeit. Das Präparat wurde sogar von einem trächtigen Hund vertragen und brauchte während der Trächtigkeit und unmittelbar nach der Geburt nicht abgesetzt zu werden. Die mit den unverträglichen Heparinoiden stets beobachtete Freßunlust, die Abmagerung und vor allem die schweren blutigen Durchfälle bleiben aus. Leber- und Nierenfunktion erfahren keine nachhaltigen Störungen. Hämatologisch sind lediglich leichte Leukocytose und mäßiger Thrombocytopenie festzustellen, die aber nach kurzer Zeit wieder ausgeglichen sind. Ein wichtiger Faktor ist die mit den Methoden der Histologie mittels der Metachromasie feststellbare Speicherung der Heparinoide im reticuloendothelialen System, insbesondere in Leber und Milz. Auch die N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester werden gespeichert, und zwar je nach ihrem Anteil an größeren Molekülen. Beim Kaninchen erfolgt die Entfernung des Fremdmaterials relativ rasch, 60 Tage nach 12 Injektionen à 12 mg/kg; beim Hund bleibt die Speicherung länger erhalten; so konnten wir nach 6 Monaten und 12 Monaten nach Absetzen der 60 Injektionen zu 20 mg/kg metachromatisches Material in den Kupfferschen Sternzellen der Leber nachweisen. Allerdings führte diese Speicherung in dieser Beobachtungszeit nicht zu irgendwelchen Beeinträchtigungen der Organleistungen und auch nicht zu histopathologisch feststellbaren strukturellen Veränderungen der Organe. Aus früheren Untersuchungen (*Studer* u. Mitarb. [3], *Studer* und *Zbinden* [5]) wissen wir, daß die Toxizität der unverträglichen Heparinoide nicht mit der Speicherung zusammenhängt. Die Vergiftungssymptome treten schon nach wenigen Injektionen auf, bevor eine wesentliche Speicherung erfolgen konnte. Wir möchten deshalb das Moment der Speicherung nicht als ernst bewerten, insbesondere auch, weil ein nach 24 Injektionen zu 100 mg N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester autoptisch untersuchter Patient keinerlei Schäden aufwies, die mit der Applikation des Präparates im Zusammenhang stehen könnten und kein Fremdmaterial sich in den parenchymatösen Organen eingelagert hatte. Die Verträglichkeit am Menschen wie am Tier darf als gut bezeichnet werden.

Die zur Prüfung der Beeinflussung der Gesamtlipoide eingesetzten Fraktionen der N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester weisen weder am Tier noch am Menschen eine praktisch ins Gewicht fallende gerinnungshemmende Wirkung auf. Eine Verwendung als Antithromboticum fällt deshalb außer Betracht. Dagegen bleibt ihnen der Einfluß auf die Serumlipoproteide erhalten; sie zeigen Klärwirkung im Tierversuch

sowie eine Reduktion der Gesamtlipoide am Menschen mit relativem Abfall der β -Lipoproteide. Schon jetzt steht fest, daß es sich hierbei nicht um einen Dauereffekt handelt; die Wirkung ist nach spätestens 24 Stunden wieder abgeklungen, und der Gehalt an Gesamtlipoiden hat den Ausgangswert wieder erreicht. Ob eine solche vorübergehende Reduktion der Gesamtlipoide mit Verschiebung des β/α -Quotienten therapeutisch verwertbar ist, läßt sich im jetzigen Moment noch nicht feststellen. Hier kann nur die weitere klinische Erprobung, so schwierig und langwierig sie auch ist, weiterführen. Immerhin dürfte es von Interesse sein, daß mit dem N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester ein Heparinoid zur Verfügung steht, mit dem dieser ganze Fragenkomplex gefahrlos bearbeitet werden kann, um abzuklären, ob eine Beeinflussung der Blutlipide bei Hyperlipämie und bei Arteriosklerose therapeutisch sinnvoll oder wertlos ist.

Zusammenfassung

Es wird über tierexperimentelle und klinische Untersuchungen mit N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester, einem neuen, partial synthetischen Heparinoid mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 5000 berichtet.

Im Gegensatz zu anderen, teils im Handel erhältlichen Produkten erweist sich N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester bei chronischer intravenöser Verabreichung am Hund als sehr gut verträglich. Das für Heparinoide typische Vergiftungsbild (Abmagerung, schwerste Durchfälle, Exitus) entsteht nicht. Hunde zeigen nach 60 intravenösen Injektionen von 20 mg/kg N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester mittels der Metachromasie histologisch nachweisbare Ablagerungen des Präparates im RES, aber keine wesentlichen Organschädigungen, insbesondere keine Spätschädigungen bei der Untersuchung nach einem Jahr. Die Untersuchung verschiedener Polymerisate von N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureestern ergibt eine Parallelität zwischen Molekulargewicht bzw. Molekulargewichtsverteilung und Speicherungsgröße, dagegen keine Beziehung zwischen Speicherungsgröße und Verträglichkeit. Die gute Verträglichkeit wird am Menschen bei fortgesetzter intravenöser Injektion (3mal 100 mg/Woche über 8 Wochen) vollauf bestätigt, insbesondere fehlen Störungen von seiten des Magen-Darm-Kanals.

Die gerinnungshemmende Wirkung beträgt im Tierversuch (Anti-thrombinzeit am Kaninchen) sowie am Menschen nur einen Bruchteil von derjenigen des Heparins. Diese angedeutete gerinnungshemmende Wirkung wäre für eine Thromboseprophylaxe und -therapie völlig ungenügend.

N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester bewirkt wie Heparin Klärung von lipämischem Plasma.

Klinische Versuche ergeben nach einmaliger Injektion eine vorübergehende signifikante Abnahme der Gesamtlipoide nach *Swahn*, wie sie bei Heparin beobachtet wird. Diese Abnahme der Gesamtlipoide sowie das Absinken des Quotienten β/α -Lipoproteide nach *Antonini* ist vor allem durch den papierelektrophoretisch erfaßbaren signifikanten relativen Abfall der β -Lipoproteide bedingt. Ein diesbezüglicher Dauereffekt nach chronischer Applikation konnte nicht beobachtet werden.

Der therapeutische Wert einer Beeinflussung der Blutlipoide durch Heparin bzw. Heparinoide läßt sich noch nicht abschätzen. Orientierende klinische Versuche an 36 Patienten (Durchschnittsalter 74 Jahre) mit schwerer allgemeiner Arteriosklerose ergaben erwartungsgemäß weder subjektive noch objektive Besserungen. Versuche an jüngerem Krankengut in weniger fortgeschrittenem Krankheitsstadium sind eingeleitet.

Résumé

Ce travail porte sur des expériences chez l'animal et sur des investigations cliniques, faites au moyen d'un ester polysulfurique de N-formyl-chitosane, nouvel héparinoïde partiellement synthétique d'un poids moléculaire moyen d'environ 5000.

Au contraire d'autres produits dont certains sont dans le commerce, l'ester polysulfurique de N-formyl-chitosane a été très bien toléré par le chien, lors d'administration intraveineuse prolongée. Les symptômes d'intoxication typiques observés après l'emploi des héparinoïdes connus jusqu'ici (amaigrissement, diarrhées très graves, exitus) ne se déclarent pas. Après 60 injections i.v. de 20 mg/kg d'ester polysulfurique de N-formyl-chitosane, les chiens révèlent des dépôts du produit dans le système réticulo-endothélial, dépôts qui peuvent être mis en évidence grâce à la métachromasie, mais il n'y a pas de lésions organiques importantes, en particulier, on ne trouve pas de lésions tardives, lors de l'examen effectué une année plus tard. Il ressort de l'examen des différents polymérisats d'ester polysulfurique de N-formyl-chitosane, qu'il existe un parallélisme entre le poids moléculaire (c'est-à-dire la répartition des poids moléculaires) et le «pouvoir de stockage», tandis qu'il n'y a pas de rapport entre cette répartition et la tolérance. La bonne tolérance se confirme chez l'homme, en cas d'administration i.v. prolongée (3 fois 100 mg par semaine pendant 8 semaines); en particulier, on n'observe aucun trouble gastro-intestinal.

Dans les essais chez l'animal (temps d'antithrombine chez le lapin) ainsi que dans l'expérimentation clinique, l'effet anticoagulant ne repré-

sente qu'une très petite partie de celui de l'héparine. De toute façon, cette activité anticoagulante minime serait totalement insuffisante pour la prophylaxie ou le traitement des thromboses.

Tout comme l'héparine, l'ester polysulfurique de N-formyl-chitosane exerce un effet clarifiant dans le plasma lipémique. Des essais cliniques ont démontré, qu'après une injection i.v. unique, il y a une diminution significative mais passagère des lipides totaux d'après *Swahn*, comme on peut l'observer après l'injection d'héparine. Cette réduction des lipides totaux ainsi que l'abaissement du quotient lipoprotidique β/α d'*Antonini* sont conditionnés en premier lieu par une diminution importante des lipoprotéines β , diminution que l'on peut déterminer par électrophorèse sur papier. Un effet durable de ce phénomène, après application prolongée, n'a pas été observé.

Il n'est pas encore possible d'évaluer la valeur thérapeutique de l'influence exercée par l'héparine ou les héparinoïdes sur les lipides sanguins. Des essais cliniques préliminaires portant sur 36 malades (âge moyen 74 ans) atteints d'artériosclérose générale grave, se sont terminés, comme on devait s'y attendre, sans aucune amélioration subjective ni objective. On poursuit les expérimentations sur des malades plus jeunes, à des stades moins avancés de la maladie.

Summary

Animal experiments and clinical investigations with polysulfuric acid ester of N-formyl-chitosan, a new partially synthetic heparinoid of an average molecular weight of approx. 5000, are reported.

Contrary to other products, some of which are available commercially, the polysulfuric acid ester of N-formyl-chitosan proves to be well tolerated on chronic i.v. administration to dogs. The intoxication symptoms typical of heparinoids (emaciation, very severe diarrhea, death) do not occur. After 60 i.v. injections of 20 mg/kg of polysulfuric acid ester of N-formyl-chitosan, dogs show deposits of the preparation in the reticulo-endothelial system which can be demonstrated histologically by means of metachromasia; but there are no significant organic lesions and, particularly, no late lesions on examination after one year. The investigation of various polymers of polysulfuric acid esters of N-formyl-chitosan reveals that there is a parallel between molecular weight or the distribution of molecular weight and the amount of substance accumulated, whereas no relation can be observed between the amount of substance accumulated and the tolerance. In man the good tolerance is confirmed on prolonged i.v. administration of the product (100 mg 3 times weekly for 8 weeks), and there are, in particular, no gastro-intestinal disturbances.

In animal experiments as well as in man, the anticoagulant activity (determined by measuring the antithrombin time in the rabbit) represents only a fraction of that of heparin. This slight anticoagulant effect would be entirely insufficient for the prevention or treatment of thrombosis.

Like heparin, the polysulfuric acid ester of N-formyl-chitosan has a clearing effect on lipemic plasma.

Clinical investigations show that after a single i.v. injection there is a significant temporary decrease in the total lipids according to *Swahn*, as is produced by heparin. This decrease of total lipids as well as the diminution of the β/α -lipoprotein quotient according to *Antonini* is due primarily to the significant relative decrease of the β -lipoproteins which can be determined by means of paper electrophoresis. A permanent effect of this kind on chronic administration is not observed.

So far, it is not possible to determine the therapeutic value of an influence of heparin or heparinoids on the blood lipids. A pilot clinical investigation in 36 patients (average age 74 years) suffering from severe general arteriosclerosis led, as was to be expected, to neither subjective nor objective improvement. Investigations have been started in younger patients with the disease in a less advanced stage.

1. *Graham, D. J., Lyon, T. P., Gofman, J. W., Jones, H. B., Yankley, A., Simonton, J., und White, S.*: *Circulation* **4**, 666 (1951). – 2. *Antonini, F. M., Piva, G., Salvini, L., und Sordi, A.*: *G. Geront. Suppl.* **1** (1953). – 3. *Studer, A., Engelberg, R., und Randall, L. O.*: *Thrombose und Embolie. I. Intern. Tagung, Schwabe, Basel 1955*, S. 863. – 4. *Hirschboeck, J. S., Madison, F. W., und Pisciotto, A. V.*: *Amer. J. Sci.* **227**, 279 (1954). – 4a. *Field, J. B.* zit. in *Hirschboeck, J. S. und Mitarb.*: *Amer. J. Sci.* **227**, 279 (1954). – 5. *Studer, A., und Zbinden, G.*: *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* **17**, 780 (1954). – 6. *Husemann, E., Pfannemüller, B., und Hertlein, W.*: *Experientia* **9**, 379 (1953). – 7. *Spitzer, J. J.*: *Amer. J. Physiol.* **171**, 492 (1952). – 8. *Swahn, B.*: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **5**, Suppl. 9, pp. 114 (1953); **4**, 247 (1952). – 9. *Swahn, B.*: *Scand. J. clin. Lab. Invest.* **4**, 98 (1952). – 10. *Nikkilä, E. A.*: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **5**, Suppl. 8., pp. 101 (1953). – 11. *Michaelis, B.*: *Biochem. Z.* **234**, 139 (1931). – 12. *Bansi, H. W., Gronow, R. Th., und Redetzki, H.*: *Klin. Wschr.* **30**, 101, (1955). – 13. *Gosset, W. S.* («Student»): *Biometrika* **6**, 1 (1908).