

29. Kurt Maurer† und Erich Vincke: Die Synthese heparinwirksamer Verbindungen aus carboxylierter Cellulose*).

[Aus dem Chemischen Institut der Universität Rostock und dem Pharmakologischen Institut der Universität Hamburg.]

(Eingegangen am 1. August 1946.)

Bei der Bedeutung des Heparins für die Thromboseprophylaxe sind von verschiedenen Seiten Versuche unternommen worden, leichter zugängliche, ähnlich gebaute synthetische Ersatzpräparate zu schaffen. Diese haben aber alle den Nachteil, bedeutend toxischer als das Heparin zu sein und schwächer blutgerinnungshemmend zu wirken. Es wurde nun versucht, die Toxizität dadurch zu vermindern, daß man durch Oxydation mit Distickstofftetroxyd carboxylierte Cellulosen darstellte, die mit Schwefelsäure verestert wurden. Die schließlich erhaltenen Natriumsalze sind in Wasser leicht löslich; ihre Zusammensetzung wechselt je nach dem Ausgangsmaterial, der Reaktionszeit und der Temperatur. Verschiedene derartige Verbindungen wurden im Tierversuch hinsichtlich ihrer Toxizität und der Wirkung auf Blutbild, Blutdruck und Blutgerinnung geprüft. Es zeigte sich, daß sich mittels des angegebenen Verfahrens Stoffe von geringer Toxizität herstellen lassen, deren blutgerinnungshemmende Wirkung jedoch von derjenigen des Heparins um ein Mehrfaches übertroffen wird.

Der natürliche Hemmstoff der Blutgerinnung ist 1916 von W. H. Howell und J. MacLean¹⁾ in der Leber entdeckt worden. Howell und E. Holt²⁾ nannten ihn Heparin. Zur Gewinnung eignet sich auch die Lunge, die reich an Heparin ist, wie A. F. Charles und D. A. Scott³⁾, die über die Verteilung im Organismus berichteten, nachwiesen.

Mit der chemischen Strukturaufklärung haben sich außer Howell und Mitarbeitern besonders I. E. Jorpes u. Mitarbeiter⁴⁾, ferner A. F. Charles und D. A. Scott³⁾ neben vielen anderen Forschern beschäftigt⁵⁾.

Als bisheriges Ergebnis kann folgendes über den Bau des Heparins ausgesagt werden: Es ist ein Polysaccharid, das aus äquivalenten Mengen *N*-Acetyl-glucosamin und Glucuronsäure aufgebaut ist. Die Uronsäure ist bisher nur indirekt nachgewiesen worden, während das Glucosamin isoliert werden konnte. Damit gehört der Stoff in die Reihe der Hyaluronsäuren, über die K. Meyer⁶⁾ eingehend berichtet hat. Die freien Oxygruppen der Zuckebausteine sind teilweise mit Schwefelsäure verestert, so daß natürliches Heparin keine einheitliche Verbindung, sondern ein Gemisch darstellt. Die Analysen der wirksamen Präparate schwanken zwischen Werten für Di- und Triester⁷⁾, die Aktivität steigt mit dem S-Gehalt. Die wirksamsten Präparate entsprechen in ihrer Zusammensetzung etwa der einer Mucoitrischwefelsäure⁸⁾. Eine mögliche Tetraschwefelsäure⁷⁾ ist bisher nicht gefunden worden. Ob dies mit der Verknüpfungsart der Bausteine zusammenhängt, ist bis-

*) Der chemisch-präparative Teil wurde von Frl. Dr. Gisela Techel mitbearbeitet.

1) Amer. Journ. Physiol. **41**, 250 [1916]. 2) Amer. Journ. Physiol. **47**, 328 [1918].

3) Journ. biol. Chem. **102**, 425, 431, 437 [1933].

4) Biochem. Journ. **29**, 1817 [1935]; Journ. biol. Chem. **118**, 447 [1937].

5) Literaturübersichten finden sich bei I. E. Jorpes, Heparin, its chemistry, physiology and application in medicine, Oxford University Press, London 1939; Ztschr. physiol. Chem. **278**, 7 [1943].

6) Cold Spring Harbor. Sympos. quantit. Biol. **6**, 91–102 [1938].

7) Ber. auf die Disaccharidgrundeinheit.

8) I. E. Jorpes, Ztschr. physiol. Chem. **278**, 7 [1943].

her unbekannt, da man weder Kenntnisse über die Verknüpfungsstelle noch über die sterische Zuordnung der glucosidischen Bindung besitzt.

Die Frage, ob Heparin linearen oder verzweigten Bau besitzt, fand bisher keine Beantwortung, doch lassen sich an synthetischem Vergleichsmaterial darüber einige Aussagen machen.

Bei der Schwierigkeit in der Beschaffung und Reindarstellung, wie bei der Bedeutung des Heparins zur Thrombosebekämpfung hat es nicht an Versuchen gefehlt, synthetische Präparate zu schaffen. Eingehende Untersuchungen liegen vor von S. Bergström⁹⁾, E. Chargaff und F. W. Bancroft¹⁰⁾ und von P. Karrer, H. Koenig und E. Usteri¹¹⁾. Dabei wurde festgestellt, daß niedermolekulare Zuckerschwefelsäureester keine Heparinwirkung besitzen, daß dagegen die Polysaccharidschwefelsäureester alle die Blutgerinnung hemmen. Es besteht jedoch ein sehr großer Unterschied zwischen den verschiedenen Bautypen. Während Cellulose, Pektin, Chitin und Chondroitin als Polyschwefelsäureester die Gerinnung sehr stark hemmen, sind Ester der verzweigten Polysaccharide, wie Stärke, Glykogen und Gummi arabicum nur ganz schwach wirksam. Die langen Kettenmoleküle sind also integrierende Bestandteile der physiologischen Wirkung. Dies konnte am eindrucksvollsten an der Polyvinylsulfonsäure bewiesen werden, die ebenso stark gerinnungshemmend wirkt wie ein Cellulosedischwefelsäureester.

Alle synthetischen Präparate haben aber einen großen Nachteil: Sie wirken mehr oder weniger toxisch. Am verträglichsten scheint die Chondroitinpolyschwefelsäure zu sein, die in ihren Bauelementen dem Heparin gleicht, dieses in der Wirkung aber nicht erreicht. P. Karrer hat eingehende Versuche angestellt, die sich mit der Verringerung der Toxizität beschäftigen. Als Ausgangsmaterial wählte er die Cellulose, deren Polyschwefelsäureester eine sehr starke Hemmwirkung ausübt. Für die Giftwirkung wird die Unlöslichkeit der im Organismus freierwerdenden Cellulose verantwortlich gemacht. Durch Einführung des Glykolsäurerestes in Ätherbindung wurde dieser Mangel weitgehend behoben, so daß die verträgliche Dosis etwa auf das 10-fache stieg.

Wir haben auf einem anderen Weg versucht, die Toxizität zu verringern. Nach einem von K. Maurer und G. Reiff¹²⁾ entwickelten Verfahren ist es möglich, durch Oxydation mit Distickstofftetroxyd (N_2O_4) einen Teil der Zuckerbausteine der Cellulose in Uronsäuren zu verwandeln. Man erhält so carboxylierte Cellulosen, die als Salze leicht löslich sind. Verestert man diese mit Schwefelsäure, so ergeben sich Präparate, welche ebenfalls spielend löslich sind und die Blutgerinnung stark hemmen.

Zur Frage, wieviel Carboxylgruppen in die Cellulose einzuführen sind, um weitgehende Ungiftigkeit zu erzielen, kann im allgemeinen gesagt werden, daß alle „Carbozell“-Präparate (carboxylierte Cellulose), die sich in Natronlauge völlig lösen, weitgehend ungiftig sind. Dies verlangt einen Carboxylierungsgrad von etwa 15% der vorhandenen Glucosebausteine.

Die nächste Frage lautete, wie weit Wirkung und Ungiftigkeit vom Polymerisationsgrad abhängig sind. Je nach dem Ausgangsmaterial und der Oxydationsdauer erhält man nach der Distickstofftetroxyd-Oxydation Carbozell-Präparate von verschiedenem Polymerisationsgrad. Von Zellwolle ausgehend bewegen sich die Polymerisationsgrade zwischen 50 und 150; Zellstoff und Watte liefern Präparate vom Polymerisationsgrad 400—600.

Die Darstellung der Präparate erfolgte im wesentlichen nach dem Verfahren von E. Gebauer-Fülnegg, W. H. Stevens und O. Dingler¹³⁾ unter An-

⁹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **238**, 163 [1936].

¹⁰⁾ Journ. biol. Chem. **115**, 149 [1936].

¹¹⁾ Helv. chim. Acta **26**, 1296 [1943].

¹²⁾ Journ. makromol. Chem. **1**, 27 [1943].

¹³⁾ B. **61**, 2000 [1928].

wendung von Chlorsulfonsäure und Pyridin. Die durch Fällung und Dialyse gereinigten Stoffe stellten durchweg gelbe Pulver dar, die in Wasser leicht löslich und als schwerlösliche Bariumsalze fällbar waren.

Je nach der Reaktionszeit und Temperatur wechselten die Analysenergebnisse. Vor der Veresterung wurden die Carbozellproben aus Natronlauge-Lösung mit Säure umgefällt. Nach der Veresterung wurden an einigen Präparaten CO_2 -Bestimmungen nach Tollens-Lefèvre ausgeführt, um festzustellen, ob bei der Reaktion Carboxylgruppen abgespalten wurden. Dies war nicht der Fall. In der Tafel 1 sind einige Analysendaten zusammengestellt. Es fällt dabei auf, daß nach einmaliger Sulfurierung die Zellwolle nur S-Werte von 15 bis 16% ergibt, während Zellstoff und Watte wesentlich höheren Schwefelgehalt besitzen. Die Versuche sind alle mehrfach reproduziert worden.

Tafel 1. Reaktionsbedingungen und Zusammensetzung der dargestellten Präparate.

Ausgangsmaterial	% CO_2H	Reaktionsbedingungen	% S	% Na
Nr. 11 Zellwolle	21	17 Stdn. 60°	16.1	14.5
„ 35 „	19	6 „ 100°	14.2	10.5
„ 40 „	35	6 „ 100°	15.3	12.5
„ 18 „	60	20 „ 60°	12.3	14.6
„ 31 „	19	6 „ 100°	14.4	12.4
„ 32 Rückstand v. Präp. 31 nachsulfuriert ..	—	6 „ 80°	17.0	12.2
„ 39 Watte	19	6 „ 100°	19.4	13.8
„ 17 Linters	8	17 „ 60°	15.2	12.2
„ 41 Zellstoff	15	8 „ 80°	19.6	14.2

Für das Natriumsalz eines Dischwefelsäureesters einer 20-proz. carboxylierten Cellulose berechnet sich $S = 17.04\%$ und $\text{Na} = 13.47\%$. Dieser Wert für S wurde bei Zellwollepräparaten erst durch Nachsulfurierung erreicht (Präp. 32). Bessere Ergebnisse liefern nach einmaliger Sulfurierung Watte und Zellstoff, deren Analysendaten etwa auf einen Triester stimmen. Die Präparate enthalten 19 und 15% CO_2H ; ber. S 19.9%, Na 15.3%. Zur Kontrolle wurde bei Nr. 32 und 39 das schwerlösliche Bariumsalz isoliert und analysiert. Die Werte stimmen gut auf die angenommenen Formeln.

Um den Unterschied der Polymerisationsgrade der verschiedenen Präparate bestimmen zu können, wurde in einigen Fällen die Viskosität gemessen. Es wurden etwa 1-proz. wäßr. Lösungen bei 20° angewendet (Tafel 2).

Tafel 2. Viskositätsmessungen.

Präp. 31, Zellwolle	Präp. 39, Watte	Präp. 41, Zellstoff	Heparin
$S = 14.4\%$ $\eta_{sp}/c = 0.01388$	$S = 19.4\%$ $\eta_{sp}/c = 0.06043$	$S = 19.6\%$ $\eta_{sp}/c = 0.0967$	$\eta_{sp}/c = 0.01183$

Der Heparinwert ist der Arbeit von P. Karrer entnommen und umgerechnet. Die Zahlen geben an, daß die Zellwollepräparate in der Größenordnung dem Heparin am nächsten kommen.

Beschreibung der Versuche.

Darstellung eines synthetischen Hemmstoffs aus Zellwolle (Präp. Nr. 31 der Tafel 1).

Als Ausgangsmaterial diente Zellwolle „Plavia“ von der Süchs. Zellwolle A. G. Plauen (Polymerisationsgrad etwa 300).

Vor der Veresterung wurde die Zellwolle nach dem üblichen Verfahren carboxyliert. Das erhaltene Carbozell-Präparat enthielt 26.9% CO_2H und hatte die Kupferzahl 14. In Alkalilauge war es völlig löslich.

50 g wurden in 300 ccm *n* NaOH gelöst und unter Eiskühlung mit *n* HCl neutralisiert. Unter kräftigem Umrühren schied sich ein etwas schleimiger weißer Niederschlag ab, der 5 mal im Zentrifugenbecher mit Wasser gewaschen wurde. Dann wurde er mit Alkohol und Aceton getrocknet, wobei ein feines lockeres Pulver entstand, das bei 50° getrocknet wurde. $\text{CO}_2\text{H} = 18.9\%$; Ausb. 38 g.

Veresterung: 120 ccm Pyridin und 20 ccm Chloroform wurden in einem 3-Hals-Kolben unter Eiskühlung und Rühren mit 28 ccm Chlorsulfonsäure versetzt, wobei eine halbfeste gelbliche Masse entstand. In diese wurden 12 g umgefälltes Carbozell eingerührt und unter ständigem Rühren auf dem Wasserbad langsam auf 100° erwärmt, wobei sich eine dunkelbraune Lösung bildete. Nach 6 Stdn. wurde das Reaktionsgemisch auf 200 g Eis gegossen, wobei sich ein heller unlöslicher Niederschlag absetzte. Dieser wurde abzentrifugiert und nochmals mit Wasser ausgezogen. Der getrocknete Rückstand betrug 8 g. Er bestand aus wenig sulfuriertem Carbozell und wurde noch einmal nachsulfuriert (Präp. Nr. 32 der Tafel 1).

Die braune Lösung wurde in die 5- bis 7-fache Menge Alkohol eingetragen, wobei ein bräunlicher Niederschlag ausfiel. Nach dem Absaugen wurde in wenig Wasser gelöst und mit *n* NaOH gegen Phenolphthalein neutralisiert, wodurch das Pyridinsalz in das Natriumsalz verwandelt wurde. Dieses wurde wieder mit Alkohol ausgefällt und das gelbe Pulver noch einmal aus wenig Wasser mit Alkohol umgefällt.

Zur Trennung von Natriumsulfat wurde in wenig Wasser gelöst und dialysiert. Im stehenden Dialysator (Cellophan-Membran) war nach 48 Stdn. das Außenwasser, das 4 mal gewechselt wurde, frei von Sulfat-Ionen. Die Lösung wurde bei 40° im Vak. auf 50 ccm eingeengt und in 300 ccm Alkohol eingerührt. Das hellgelbe Pulver wurde abzentrifugiert, unter Aceton einige Zeit stehengelassen, abfiltriert und über Diphosphor-pentoxyd (P_2O_5) getrocknet. Ausb. 6.8 g.

Gef. S 14.3% Na 12.4% CO_2H 19%.

Pharmakologische Auswertung.

Die pharmakologische Prüfung der carboxylierten Cellulose-Derivate betraf ihre Toxizität und Blutdruckwirkung sowie ihre blutgerinnungshemmende Wirkung. Es wurden sowohl Präparate mit niedrigem Carboxylierungsgrad (Nr. 17, 31 und 32) als auch solche mit hohem Carboxylierungsgrad (Nr. 18) ausgewertet.

1) Toxizität: Die Verbindungen wurden zuerst weißen Mäusen im Gewicht von durchschnittlich 18–22 g als 1–2-proz. Lösungen subcutan unter die Rückenhaut injiziert. Für die 4 erwähnten Präparate wurden insgesamt 108 Tiere verwendet.

Der Tod der Tiere erfolgte unter den Zeichen schwerer Benommenheit und Erschöpfung. Bei der Sektion fanden sich in der weit überwiegenden Zahl der Fälle Blutungen in der Lunge, in die Brusthöhle, Bauchhöhle und Hautblutungen¹⁴⁾. Es darf angenommen werden, daß die Blutungen zum Tode der Tiere führten. Es zeigt sich also hier ein ähnliches Bild, wie man es auch vom Heparin her kennt. Bei diesem körpereigenen Stoff kann man, im Gegensatz zu der manchmal geäußerten Ansicht, nicht von einer toxischen Dosis im eigentlichen Sinne des Wortes reden; auch bei ihm erfolgt der Tod der Versuchstiere nach massiven Dosen infolge innerer Blutungen.

¹⁴⁾ Einige Tiere wiesen auch Blutungen aus Nase und Maul auf.

Die Ergebnisse der Auswertung sind in der Tafel 3 zusammengestellt. Aus ihr ergibt sich, daß die Verbindungen Nr. 17 und 32 als die giftigsten angesehen werden müssen. Bei beiden Verbindungen beträgt die Dosis tolerata 0.20 g/kg Körpergewicht. P. Karrer u. Mitarbeiter¹⁵⁾ geben an, daß die Giftigkeit des Chondroitinschwefelsäure-polyschwefelsäureesters und des Cellulose-glykolsäureäther-polyschwefelsäureesters 3 bis 4 mal größer ist als die des Heparins, während sie 4 bis 6 mal schwächer blutgerinnungshemmend wirken als dieser Stoff¹⁵⁾. Setzen wir voraus, daß auch seine Werte an Mäusen bei subcutaner Applikation gewonnen wurden, so ist für die Verbindungen Nr. 17 und 32 die Dosis tolerata ebenso hoch wie für die erwähnten Derivate der genannten Actoren. Nr. 31 ist unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite bei Toxicitätsprüfungen als etwas ungiftiger anzusehen. Die Verbindung mit der geringsten Giftigkeit ist Nr. 18. Diese Befunde sind deshalb von Interesse, weil sie zeigen, daß die Einführung der Uronsäure in das Molekül offenbar eine Toxicitätsverminderung mit sich bringt.

Wie sich im Verlaufe der Untersuchungen zeigte, wirkten die Verbindungen Nr. 31 und 32 am stärksten blutgerinnungshemmend. Da infolge der intravenös vorzunehmenden Anwendung dieser Stoffe die Verträglichkeit bei dieser Applikationsart besonders interessiert, wurden 2 Kaninchen im Gewicht von 2.5 und 2.6 kg je 50 mg Nr. 31 und 2 Kaninchen im Gewicht von 3.1 und 3.2 kg je 50 mg Nr. 32/kg Körpergewicht (in einigen ccm physiol. Kochsalzlösung gelöst) intravenös injiziert. Diese Dosis, die das 10-fache der bei Kaninchen sehr stark blutgerinnungshemmend wirkenden Menge beträgt, wurde von den Tieren völlig reaktionslos vertragen.

Weiter wurde die Einwirkung der Verbindungen Nr. 31 und 32 auf den Blutstatus in akuten Versuchen geprüft. Zu diesem Zweck erhielten 9 ausgewachsene Kaninchen im Gewicht von 2.4—3.8 kg 20 mg Nr. 31 oder 32/kg Körpergewicht intravenös (1-proz. in physiol. Kochsalzlösung) injiziert, worauf der Hämoglobingehalt und die Zahl der Erythrocyten bestimmt wurden.

Bei der Bewertung der Ergebnisse war zu beachten, daß auch das Blut normaler, nicht-behandelter Tiere hinsichtlich der erwähnten Größen nicht unbeträchtlichen, physiologisch bedingten Schwankungen unterliegt. So fand z. B. G. Fritsch¹⁶⁾ bei 10 untersuchten Kaninchen, daß die Zahl der Erythrocyten von 5.26 bis 6.25 Millionen/cmm Blut schwankte. In Versuchen an 14 gesunden nüchternen Tieren stellten H. A. Oelkers und E. Vincke¹⁷⁾ früher u. a. ebenfalls fest, daß bei normalen Kaninchen die Erythrocytenzahl im Verlaufe eines Tages starken Schwankungen unterliegt.

Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen wurde gefunden, daß es unter der Einwirkung der intravenösen Applikation der erwähnten Dosen Nr. 31 und Nr. 32 nicht zu ausgeprägten Veränderungen der Zusammensetzung des Blutes kommt, soweit es die geprüften Konstanten betrifft. Auf die Wiedergabe von Protokollen wird deshalb verzichtet. Die Verbindungen verhalten sich also in dieser Hinsicht wie Heparin¹⁸⁾.

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob die chronische Applikation der Verbindungen toxisch wirkt. 4 Kaninchen erhielten täglich (außer Sonntags) etwa 2 Wochen lang 20 mg Nr. 31 oder 20 mg Nr. 32/kg Körpergewicht intravenös als 1-proz. Lösung (in physiol. Kochsalzlösung) injiziert. Die Injektionen wurden von den Tieren völlig reaktionslos vertragen. Während dieser Zeit wurde der Blutstatus geprüft; nach Abschluß der Versuche wurden die Tiere getötet und Herz, Leber und Niere histologisch untersucht¹⁹⁾.

¹⁵⁾ P. Karrer u. Mitarbeiter geben für ihr Heparinpräparat, bei dem es sich offenbar um das Präparat „Liquemin Roche“ handelt, als Dosis tolerata 1.0 g/kg Tier an. Es finden sich in der erwähnten Arbeit keine genauen Angaben über Tier- und Applikationsart, so daß wir keinen schlüssigen Vergleich seiner Werte mit den unsrigen anstellen können.

¹⁶⁾ Arch. ges. Physiol. 181, 78 [1920]. ¹⁷⁾ Arch. exper. Pathol. Pharmacol. 188, 53 [1938].

¹⁸⁾ Über die Eignung dieser Verbindung als gerinnungshemmendem Zusatz bei Blutanalysen vergl. O. Wilander, Acta medica Scand. 94, 258 [1938]; s. ferner M. Reinert und A. Winterstein, Arch. intern. Pharmacodyn. 62, 47 [1939].

¹⁹⁾ Für die histol. Prüfung sind wir Herrn Prof. Dr. Th. Fahr (Patholog. Institut der Universität Hamburg) zu großem Dank verpflichtet.

Tafel 3. Bestimmung der Toxicität.

Präparat Nr.	Subcutan injiz. mg Präp./g Maus	Zahl der verwendeten Tiere	Davon gestorben	LD ₅₀	Dosis tolerata (mg/g Maus)
17		23			
	0.20	1	0		0.20
	0.30	4	2		
	0.40	3	0		
	0.50	4	2	—*)	
	0.60	4	2		
	0.70	3	0		
	0.80	1	1		
	1.00	2	1		
1.50	1	1			
18		30			
	0.50	2	0		1.00
	0.60	1	0		
	0.70	2	0		
	0.80	2	0		
	1.00	7	0	> 2.00	
	1.20	5	1		
	1.50	7	1		
	2.00	4	1		
31		20			
	0.10	1	0		0.40
	0.20	1	1		
	0.30	3	0		
	0.40	2	0		
	0.50	4	4	—*)	
	0.60	3	1		
	0.70	3	2		
	0.80	1	1		
	1.00	1	1		
1.50	1	1			
32		35			
	0.20	5	0		0.20
	0.30	8	2		
	0.40	4	3		
	0.50	7	6		
	0.60	4	4		
	0.70	4	4	0.40	
	0.80	1	1		
	1.00	1	1		
	1.50	1	1		

*) Da aus äußeren Gründen nicht genügende Mengen der Verbindung vorhanden waren, mußte auf eine Bestimmung der LD₅₀ verzichtet werden.

Tafel 4. Blutstatus und histologische Befunde.

Kaninchen Nr.	Gew. in kg	Tägl. injiz. mg Verb./kg Körpergew.	Zahl der Injektionen	Blutstatus nach	%Hb	Er $\times 10^{-6}$ /cmm Blut	Histolog. Befund
1	2.1	20 mg Nr. 31	12	0	73	6.04	Entzündl. Herde im Herzen, z. Tl. alterativ entzündl. Natur. Anämische Infarkte in d. Niere. Multiple kl. entzündl. Herdchen i. d. Leber, Speicherung in d. Sternzellen.
				11 ^d	76	6.06	
				15 ^d	78	5.92	
2	1.8	20 mg Nr. 31	10	Tier starb nach 12 ^d . Bruch d. link. Hinterbeines. Große Blutung unter der Haut an der Bruchstelle.			In d. Leber zahlreiche kl. Infiltrate. Herz u. Niere ohne nennenswerten Befund.
3	3.1	20 mg Nr. 32	12	0	79	4.89	In d. Leber Speicherung in den Sternzellen, vielfach Kernschwund u. multiple kl. entzündl. Herdchen. Herz u. Niere ohne nennenswerten patholog. Befund.
				11 ^d	66	6.46	
				15 ^d	71	5.25	
4	2.4	20 mg Nr. 32	11	0	63	5.43	Im Herzen zahlreiche alterativ entzündl. Herdchen, in d. Niere spärliche Infiltrate, reichliche in d. Leber, Speicherung in d. Sternzellen nur sehr gering.
				9 ^d	52	4.25	
				14 ^d	54	4.46	

Hb = Hämoglobin. Er = Erythrocyten.

Die in der Tafel 4 wiedergegebenen Versuche zeigen, daß das Blut der Tiere hinsichtlich des Hämoglobingehaltes, sowie der Erythrocytenzahl während der Versuchszeit keine größeren Schwankungen als das unbehandelter Tiere aufwies. Die untersuchten Organe, insbesondere Leber und Herz, zeigten entzündliche Herde und Infiltrate. Es kann ohne ausgedehntere Tierversuche mit verschiedenen Dosen, die z. Zt. aus äußeren Gründen nicht durchgeführt werden können, nicht entschieden werden, ob die Ursache für diese Veränderungen in den toxischen Eigenschaften der Verbindungen selbst begründet liegt, oder ob sie als Folge von durch die chronische Applikation der hohen Dosen an Nr. 31 oder Nr. 32 gesetzten Blutungen in diesen Organen entstanden sind. An weiteren pathologischen Befunden ist eine Speicherung (von Cellulose?) in den Sternzellen der Leber vorhanden.

2) Wirkung auf den Blutdruck: Die Wirkung der Verbindungen Nr. 17, 18, 31 und 32 wurde in der üblichen Weise auf blutigem Wege an 4 Katzen im Gewicht von 1.9 bis 3.1 kg geprüft. Zur Ungerinnbarmachung des Blutes wurde Heparin (10 mg Vetren/kg Körpergew.) verwendet.

In den Versuchen zeigte sich, daß die 4 Verbindungen in Dosen bis zu 20 mg/kg Körper-

gewicht (als 2-proz. Lösungen) den Blutdruck nur kurze Zeit um wenige mm Hg erhöhen. Etwas nachhaltiger wird der Blutdruck durch 40 mg/kg beeinflusst²⁰).

3) Blutgerinnungshemmende Wirkung: Diese wurde an ausgewachsenen nüchternen Kaninchen geprüft, denen die Verbindungen in physiol. Kochsalzlösung gelöst in die Ohrvene injiziert wurden. Die Messung der Blutgerinnungszeit erfolgte bei 25° nach dem Verfahren von B. Szabuniewicz²¹).

Tafel 5. Wirkung auf die Blutgerinnung in vitro.

Versuchs-Nr.	Gew. d. Kaninchens i. kg	mg intravenös injizierte Verb./kg Körpergew.	Blutgerinnungszeit in Min. bei 25° nach:				
			0 min.	5 min.	30 min.	1h	2h
1	2.55	3 mg Nr. 17	4	7	5	6	4
	2.70	3 mg Vetren	4	>120	19	26	8
2	3.20	5 mg Nr. 17	5	42	6	7	6
	2.75	5 mg Vetren	4	>150	>120	43	17
3	3.10	5 mg Nr. 17	8	74	29	18	16
4	3.40	3 mg Nr. 18	7	5	6	7	8
5	2.80	5 mg Nr. 18	5	9	7	7	7
	3.00	5 mg Vetren	4	29	58	22	14
6	3.50	5 mg Nr. 18	6	11	9	7	7
	3.50	5 mg Vetren	3	>120	28	13	10
7	2.40	3 mg Nr. 31	7	12	9	8	7
	2.50	3 mg Vetren	7	120	39	13	8
8	3.00	3 mg Nr. 31	3	44	13	8	6
	2.50	3 mg Vetren	6	>120	68	35	10
9	2.70	5 mg Nr. 31	3	>240	228	33	15
10	2.75	5 mg Nr. 31	5	>240	>180	15	15
11	2.80	3 mg Nr. 32	3	42	15	5	5
	2.60	3 mg Vetren	4	200	24	15	7
12	3.10	3 mg Nr. 32	6	16	17	13	8
	3.10	3 mg Vetren	7	98	70	37	4
13	2.60	5 mg Nr. 32	6	>240	>180	150	20
14	2.80	5 mg Nr. 32	4	>240	>240	56	21

Die Verbindungen wurden in Dosen von 3–5 mg/kg Körpergewicht injiziert. Um einen Vergleich mit Heparin zu ermöglichen, wurde denselben Tieren nach etwa 8–14 Tagen die entsprechende Menge Heparin (Vetren) injiziert und wieder die Blutgerinnungszeit bestimmt. Dieses Verfahren wurde jedoch nicht bei den Versuchen befolgt, in denen die Tiere 5 mg Nr. 31 bzw. 5 mg Nr. 32/kg erhalten hatten. Durch diese Dosen wurde die Blutgerinnung derart stark gehemmt, daß ein analoger Versuch mit Heparin kaum Unterschiede gegenüber denen mit den genannten Verbindungen gezeigt haben dürfte.

Die Ergebnisse finden sich in der Tafel 5. Diese zeigen, daß Nr. 17 und 18 in Dosen von 3 mg/kg praktisch nicht und in Dosen von 5 mg/kg nicht unbedingt sicher die Blutgerinnung längere Zeit auf ein Vielfaches der Norm erhöhen. Die analogen Dosen Vetren wirkten bei den verwendeten Tieren außerordentlich stark blutgerinnungshemmend. Dagegen hemmen Nr. 31 und Nr. 32 die Blutgerinnung bereits in Mengen von 3 mg/kg stark; die Injektion von 5 mg dieser Verbindungen/kg macht das Blut der Versuchstiere

²⁰) Anm. d. Redaktion: Die von den Autoren zur Wiedergabe bestimmten Blutdruckkurven konnten aus technischen Gründen nicht aufgenommen werden.

²¹) Arch. exper. Pathol. und Pharmakol. 187, 497 [1937].

im Maximum der Wirkung für viele Stunden ungerinnbar (Versuch 8–14). Allerdings erreichen auch die Verbindungen 31 und 32 nicht den Wirkungsgrad des Heparins, wie sich aus den Werten für 3 mg/kg ergibt. Dagegen ist der Verlauf der Blutgerinnungshemmung unter Berücksichtigung der physiol. Schwankungen dieser Werte qualitativ bei allen Verbindungen derselbe. Aus den aufgeführten Versuchen ergibt sich kein Anhaltspunkt dafür, daß sich die Wirkungsdauer mit dem Polymerisationsgrad ändert.

Weiter zeigten diese Versuche bereits, daß die Wirkung von Nr. 31 und Nr. 32 von derjenigen des Heparins um ein Mehrfaches übertroffen wird. Dieser Befund wurde durch Versuche in vitro bestätigt, bei denen ein Vergleich der Wirkung von Nr. 32 mit Heparin durchgeführt wurde²²⁾.

Die Auswertung erfolgte an Kaninchenblut. Die Gerinnungszeit wurde in nicht parafinierten Röhrchen bei 37° bestimmt. Alle Ansätze enthielten 2 ccm Blut, die zu prüfende Lösung und soviel physiol. Kochsalzlösung, daß das Gesamtvolumen 2.5 ccm betrug.

Aus der Tafel 6 ergibt sich, daß 0.20, 0.24 und 0.28 ccm der Vetren-Lösung praktisch dieselben Gerinnungszeiten ergeben wie dieselben Volumina der Lösung von Nr. 32. Da diese Lösung 5-fach konzentrierter als die Vetren-Lösung war, folgt daraus, daß Nr. 32 bei Versuchen in vitro an Kaninchenblut etwa $\frac{1}{5}$ der Wirksamkeit des Heparinpräparates „Vetren“ besitzt.

Tafel 6. Wirkung von Heparin und Präparat Nr. 32 auf die Blutgerinnung in vitro.

Nr.	Lösung	ccm Lösung je Ansatz	γ Verbindung je Ansatz	Gerinnungszeit bei 37° in Min.
1	„Vetren“	0.04	2	26
2	2 mg/40 ccm physiol.	0.08	4	32
3	Kochsalzlösung.	0.12	6	39
4	1 ccm = 50 γ Heparin	0.16	8	45
5		0.20	10	51
6		0.24	12	53
7		0.28	14	62
8		0.36	18	64
9	Verb. Nr. 32	0.04	10	9
10	10 mg/40 ccm physiol.	0.08	20	16
11	Kochsalzlösung.	0.12	30	25
12	1 ccm = 250 γ Verb. Nr. 32	0.16	40	27
13		0.20	50	49
14		0.24	60	55
15		0.28	70	57
16		0.36	90	etwa 120

Zusammenfassend darf festgestellt werden, daß es sich bei Verbindung Nr. 31 um ein stark blutgerinnungshemmend wirkendes Cellulose-Derivat von geringer Toxizität handelt.

²²⁾ Für die liebenswürdige Mitteilung dieses Auswertungsverfahrens sind wir Hrn. Dr. Detzel, Hamburg, zu großem Dank verpflichtet.