

Die berechnete Säuremenge wird im Vakuum eingedampft und der erkaltete Rückstand mit soviel absol. Alkohol versetzt, daß eine etwa 1 n-Lösung entsteht.

Dazu fügt man eine ebenfalls absol. alkohol. Lösung der Base oder des Alkaloids und fällt das Salz mit Äther, der über Natrium getrocknet und destilliert wurde. Die zunächst ölige Fällung kristallisiert rasch.

1 Teil Harmin-isäthionat löst sich kalt in 1 Teil Wasser;

1 „ Bulbocapnin-isäthionat löst sich kalt in 1 Teil Wasser;

1 „ Papaverin-isäthionat löst sich kalt in 1,5 Teilen Wasser;

1 „ Yohimbin-isäthionat löst sich kalt in 1,5 Teilen Wasser.

Somit übersteigt die Löslichkeit der isäthionsauren Salze die der methansulfosauren bei weitem.

## Über die blutgerinnungshemmende Eigenschaft sulfurierter Hyaluronsäure.

(Kurze Mitteilung.)

Von

**M. Pantlitschko, J. Schmid, F. Seelich und E. Kaiser.**

Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien und der  
II. Medizinischen Universitätsklinik.

Mit 3 Abbildungen.

*(Eingelangt am 10. Jan. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 22. Febr. 1951.)*

Der verwandte chemische Aufbau von Heparin und Hyaluronsäure legte es nahe, die Synthese eines Hyaluronsäurederivates mit Heparinwirkung zu versuchen. Zu diesem Zweck wurde Hyaluronsäure, die nach den üblichen Methoden aus Nabelschnüren gewonnen wurde, einer der üblichen Veresterungen mit Schwefelsäure unterworfen. Es liegt auf der Hand, daß sich eine einheitliche Veresterung nicht ohneweiters erreichen lassen dürfte. Jedenfalls konnten, wie aus dem folgenden hervorgeht, Substanzen gewonnen werden, die bei anscheinend gleich geringer Toxizität wie das Heparin und in Konzentration von gleicher Größenordnung imstande sind, die Blutgerinnung zu verhindern bzw. zu verzögern.

### Beeinflussung der Gerinnungsaktivität in vitro.

Um die Wirkung des Präparates auf den Ablauf der Blutgerinnung näher zu analysieren, untersuchten wir die Aktivität der wichtigsten Gerinnungsfaktoren nach Zusatz steigender Konzentrationen der sulfurierten Hyaluronsäure zu Oxalatblut in vitro. Vom Heparin ist bekannt, daß es in physiologischen Konzentrationen als Antithrombin

wirkt. Erst in hohen Konzentrationen hemmt es auch die Thrombokinase und das Prothrombin. Profibrinolysin wird auch in hohen Konzentrationen nur wenig und nur von bestimmten Heparinarten aktiviert. Ein Vergleich der sulfurierten Hyaluronsäure in bezug auf diese Gerinnungsfaktoren erlaubt Rückschlüsse auf die Wirkungsart.

#### Versuchstechnik:

a) *Bestimmung der Rekalzifikationszeit (RZ).*

0,1 ccm eines 0,01 m Na-Oxalatplasmas wird bei 37,5° C mit 0,1 ccm einer 0,02 m  $\text{CaCl}_2$ -Lösung versetzt und die Gerinnungszeit bestimmt. Normalwerte 60—75 Sek.

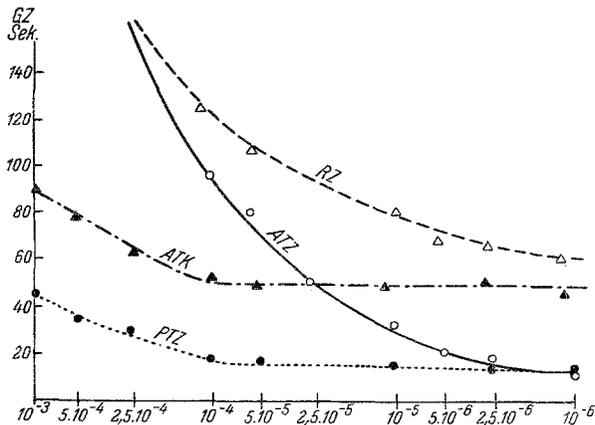


Abb. 1. Verhalten einzelner Gerinnungsfaktoren nach Zusatz verschiedener Mengen sulf. Hyaluronsäure zu 0,1 ccm Oxalatplasma.

b) *Bestimmung der Antithrombinzeit (ATZ).*

0,1 ccm eines 0,01 m Na-Oxalatplasmas wird bei 37,5° C mit 0,1 ccm Thrombinlösung „Roche“ versetzt, die mit Veronalacetatpuffer + NaCl (pH 7,4,  $\mu = 0,154$ ) solange verdünnt wurde, bis die Gerinnungszeit mit Normalplasma 8—12 Sek. betrug und die Gerinnungszeit bestimmt.

c) *Bestimmung der Prothrombinzeit (PTZ).*

Methode nach Quick, modifiziert nach J. Schmid.

d) *Bestimmung der Antithrombokinasaktivität (ATK).*

Methode nach J. Schmid.

e) *Bestimmung der Fibrinolyseaktivität.*

Methode nach Halse.

Unser Ausgangsprodukt, Hyaluronsäure aus Nabelschnüren, beeinflusste die RZ erst in Konzentrationen von  $10^{-2}$  g pro 0,1 ccm Oxalatplasma aufwärts. In geringeren Konzentrationen wird weder GZ, RZ, PTZ noch ATZ beeinflusst. Wie aus Abb. 1 ersehen werden kann, verlängert die sulfurierte Hyaluronsäure noch bis zu Konzentrationen von  $10^{-6}$  g pro 0,1 ccm Oxalatplasma deutlich die Antithrombinzeit. Die RZ

zeigt die erste verwertbare Verlängerung in Konzentrationsbereichen, die um eine Zehnerpotenz höher liegen. PTZ und ATK werden erst nach Zugabe von  $5 \cdot 10^{-3}$  g pro 0,1 cm Oxalatplasma deutlich verlängert. Die Fibrinolytaktivierung dürfte nach unseren bisherigen Untersuchungen wesentlich höher als bei den derzeit bekannten Heparinen liegen.

Vergleicht man hiermit die in Abb. 2 dargestellten Werte, die das Ergebnis derselben Untersuchungen mit Zusatz von Liquemin „Roche“

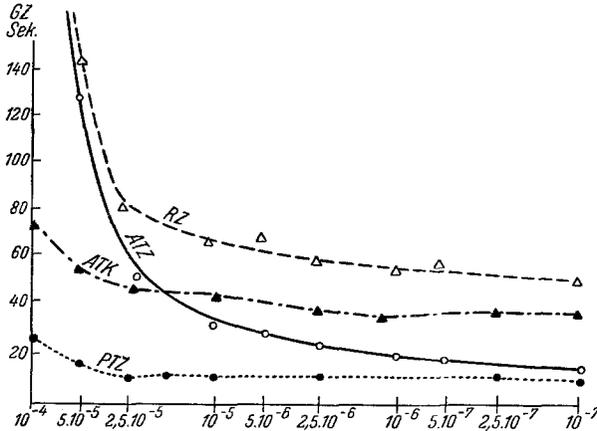


Abb. 2. Verhalten einzelner Gerinnungsfaktoren nach Zusatz verschiedener Mengen von Liquemin „Roche“ zu 0,1 cm Oxalatplasma.

an Stelle der sulfurierten Hyaluronsäure darstellen, so findet man die Aktivität wohl etwas höher, aber sonst gleichartig. Auffallend ist nur der steilere Anstieg der RZ- und ATZ-Kurven.

#### Beeinflussung der Gerinnungsaktivität in vivo.

Für die Bestimmung der Wirksamkeit der sulfurierten Hyaluronsäure am lebenden Organismus injizierten wir zwei Kaninchen je 1 mg des Präparates pro Kilogramm Körpergewicht gelöst in entsprechender Menge 0,01 n-NaOH und Verdünnung mit Michaelispuffer ( $pH$  7,4) und untersuchten anschließend nach 45 Min., 2, 3, 4 und 5 Stdn. die GZ, RZ, ATZ und PTZ. Außerdem wurden noch in denselben Zeitabständen die Leukozyten gezählt und Differentialblutbilder angefertigt, um eventuelle toxische Nebenwirkungen erkennen zu können. Von der wichtigen Bestimmung der Fibrinolytaktivität mußte in dieser Versuchsreihe aus technischen Gründen Abstand genommen werden.

In Abb. 3 sind die erhaltenen Werte dargestellt. GZ, RZ und ATZ bleiben 5 bis 6 Stdn. nach der Injektion noch erhöht. Die PTZ ist nur bis 2 Stdn. nach der Injektion mäßig verlängert. Die gleichen Versuche

mit Liquemin „Roche“, sowie Thrombozid ergeben eine etwa 3 Stdn. anhaltende Wirkung.

Sowohl die Leukozytenzahl als auch die Differentialblutbilder blieben während der Dauer der Versuche und am nächsten Tag völlig unverändert. Zur weiteren Bestimmung der Toxizität wurden drei Mäusen von je 30 g Gewicht 10, 100 bzw. 1000  $\gamma$  sulfurierter Hyaluronsäure s. o. injiziert. Alle drei Mäuse überlebten den Versuch ohne schädliche Nebenwirkung, obwohl die stärkste Konzentration für einen normalen Menschen etwa 2 g bedeuten.

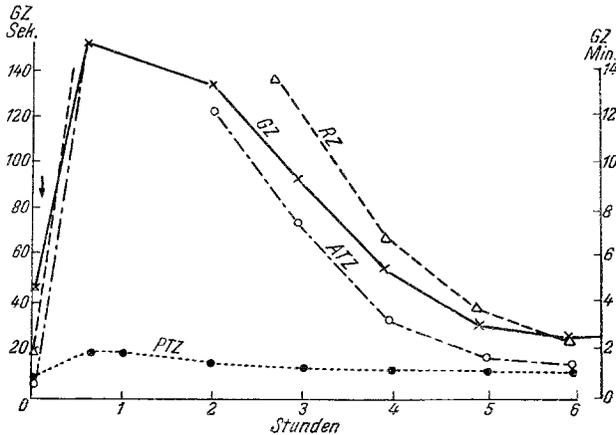


Abb. 3. Verhalten einzelner Gerinnungsfaktoren nach i. v. Injektion ( $\nabla$ ) von 5,0 mg sulf. Hyaluronsäure an 5 kg schwerem Kaninchen.

Durch die oben angeführten Ergebnisse scheint die eingangs erwähnte Vermutung, daß man durch Sulfurierung von Hyaluronsäure Verbindungen vom Wirkungstypus des Heparins erhalten kann, gerechtfertigt. Die in dieser Mitteilung nur flüchtig erwähnte Fibrinolytaktivitätssteigerung scheint außergewöhnlich hohe Werte zu erreichen. Ähnliche Eigenschaften besitzt nach *Ungar* und *Mist* auch die nicht sulfurierte Hyaluronsäure. Gerade der Fibrinolytaktivitätssteigerung mißt man aber heute große Bedeutung für die Rückbildung frischer Thrombosen bei. Die Wirkungsdauer der sulfurierter Hyaluronsäure ist länger als die des Heparins, toxische Nebenwirkungen konnten in unseren Versuchsreihen nicht festgestellt werden.

### Zusammenfassung.

Durch Sulfurierung von Hyaluronsäure gelingt es, Präparate zu erhalten, die in ähnlichen Konzentrationen und auf dieselbe Weise wie Heparin die Gerinnung des Blutes verhindern, ohne toxisch zu wirken.

Ein ausführlicher Bericht über unsere Ergebnisse erscheint in Kürze.