

|                     |                                                                                                                                                                                           |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Zeitschrift:</b> | Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche |
| <b>Herausgeber:</b> | Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften                                                                                                                                  |
| <b>Band:</b>        | 13 (1957)                                                                                                                                                                                 |
| <b>Heft:</b>        | 1-4: Symposium über Arteriosklerose = Symposium sur l'artérosclérose = Symposium on arteriosclerosis                                                                                      |
| <br><b>Artikel:</b> | Eigenschaften eines neuen Heparionoids im Tierversuch und am Menschen                                                                                                                     |
| <b>Autor:</b>       | Studer, A. / Koller, F. / Kaegi, P.                                                                                                                                                       |
| <b>DOI:</b>         | <a href="https://doi.org/10.5169/seals-307317">https://doi.org/10.5169/seals-307317</a>                                                                                                   |

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 30.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

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 feinerdisperser 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 Blutlipoide eines neuen Heparinoids, Ro 1-8307/15<sup>1</sup> 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/mm<sup>3</sup>, nämlich von 8700 Zellen vor Versuch auf 12 200 Leukocyten/mm<sup>3</sup>. 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

<sup>1</sup> Versuchspräparat.

| Kaninchen | vor Versuch | Thrombocytenzahl/mm <sup>3</sup> 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 Thrombocytenenkung 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**

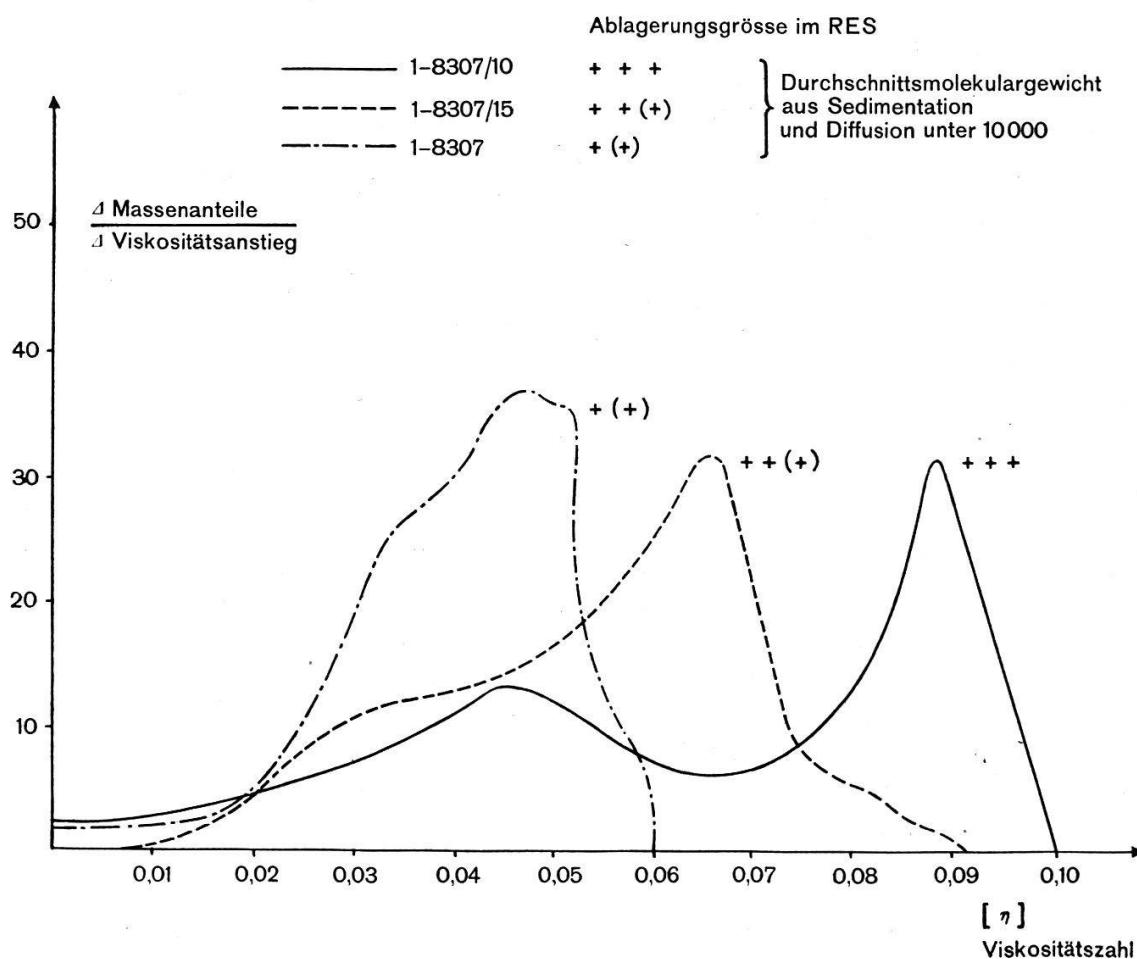


Abb. 1.

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<br>mg/kg | Anzahl<br>Tiere | Std. nach<br>Injektion | Antithrombinzeit in Sek.<br>bei Thrombinverdünnungen |               |               |          |
|-------------------------------------|----------------|-----------------|------------------------|------------------------------------------------------|---------------|---------------|----------|
|                                     |                |                 |                        | 1:1000                                               | 1:5000        | 1:10 000      | 1:20 000 |
| <b>intravenöse Verabreichung</b>    |                |                 |                        |                                                      |               |               |          |
| 1-8307/10                           | 5              | 3               | 1                      | 4                                                    | 13            | 23            | 44       |
| 1-8307/10                           | 10             | 9               | 1                      | 4                                                    | 31            | 87            | $\infty$ |
| 1-8307/15                           | 10             | 4               | 1                      | 4                                                    | 12            | 35            | 78       |
| Heparin                             | 10             | 2               | 1                      | 9                                                    | $\infty$      |               |          |
| 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            | $\infty$      |          |
| <b>intramuskuläre Verabreichung</b> |                |                 |                        |                                                      |               |               |          |
| Heparin                             | 20             | 2               | 1                      | 8                                                    | 78            | $\infty$      |          |
| 1-8307/10                           | 20             | 4               | 1½                     | 4                                                    | 13            | 29            | 56       |
| Heparin                             | 20             | 6               | 1½                     | 6                                                    | 73- $\infty$  | $\infty$      |          |
| 1-8307/10                           | 20             | 4               | 4                      | 4                                                    | 12            | 28            | 54       |
| Heparin                             | 20             | 6               | 4                      | 8                                                    | 106- $\infty$ | 110- $\infty$ | $\infty$ |
| Heparin                             | 40             | 2               | 1                      | 9                                                    | $\infty$      |               |          |
| 1-8307/10                           | 40             | 4               | 1½                     | 4                                                    | 22            | 58            | 135      |
| <b>orale Verabreichung *</b>        |                |                 |                        |                                                      |               |               |          |
| 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 vorsehenen, 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 lipämischem 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 Pula zellreich. In den Pulpazellen phagocytiert 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

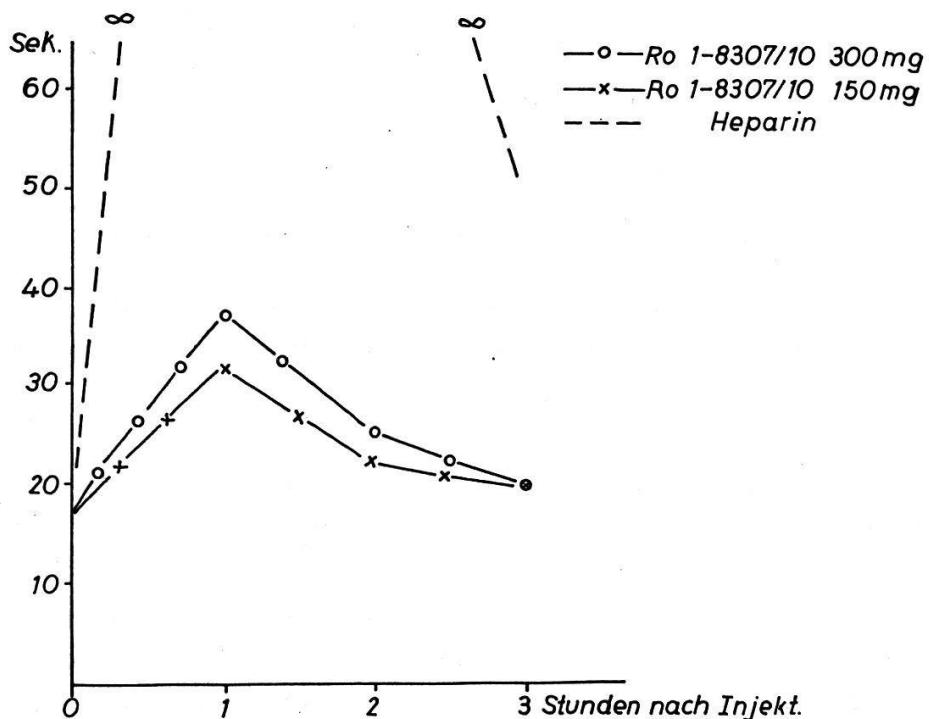


Abb. 2. Antithrombinzeit nach i.v. Injektion von 150 bzw. 300 mg N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester (Ro 1-8307/10) im Vergleich zu 50 mg Heparin.  
(Durchschnittswerte von je 5 Versuchspersonen für Ro 1-8307/10 und Heparin)

die Beeinflussung der Blutlipoide 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  $\gamma$  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 Nebenbefund einen Diabetes mellitus. Bei 30 Patienten ließen sich als Folge des Gefäßprozesses Durchblutungsstörungen verschiedener Organe nachweisen, die zu Beschwerden und Ausfallsymptomen geführt haben:

- periphere Durchblutungsstörungen in 12 Fällen (7 mit arteriosklerotischem Gangrän, 2 mit typischer Claudicatio ohne trophische Störungen, 3 mit Pulslosigkeit ohne Beschwerden);
- zentrale Durchblutungsstörungen in 11 Fällen (schweres organisches Psychosyndrom und arteriosklerotisches Irresein 6, Encephalomalacie mit neurologischen Ausfällen 5);
- 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 cm<sup>3</sup>) 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. Rüttner<sup>2</sup> 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.

#### *Papierelektrophoretische 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) *Gesamtlipoide*: 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 mm<sup>3</sup> der Serumprobe vor und nach der Injektion des Heparinoids sowie einer alkoholischen Trioleinlösung (1 g Triolein ad 100 cm<sup>3</sup> 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 5 cm<sup>3</sup> 20%iger Essigsäure in

<sup>2</sup> 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*<sup>3</sup> bei 590 m $\mu$  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)  $\alpha$ - und  $\beta$ -*Lipoproteide*: Die papierelektrophoretischen Bestimmungen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -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-Aacetat-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 × 24 × 17 cm, Firma Dr. Hösli, Bischoffszell); 25 mm<sup>3</sup> Serum werden sorgfältig mittels einer Mikropipette als 2,5 cm langer Strich aufgetragen. Die Auf trennungen 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 volumenprozentiger Alkohol gegeben und die Lösung unter öfterem Schütteln auf dem Dampfbad zum Sieden erhitzt. Nach zweiminutigem Kochen

---

<sup>3</sup> Quartz-Spektrophotometer, Beckman, Modell DU.

Tabelle 3

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

wird die Lösung zuerst heiß, dann nach dem Abkühlen ein zweites Mal filtriert. Zur Kontrolle der Lösung verdünnt man  $1\text{cm}^3$  derselben mit 50% Alkohol auf  $100\text{ cm}^3$  und mißt die Extinktion bei  $590\text{ m}\mu$  gegen 50%igen Alkohol (Beckman, 1-cm-Küvette). Bei richtig herstellten 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  $100\text{ cm}^3$  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  $100\text{ cm}^3$  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  $\alpha$ - und  $\beta$ -Fraktionen die beschriebenen Flächen mittels eines Planimeters (Modell Amsler, Typ 612) ausgemessen. Der «Schwanz» der  $\beta$ -Lipoproteide, welcher größtenteils aus Chylomikronen besteht, wird nicht gesondert ausgewertet, sondern zur  $\beta$ -Fraktion gerechnet. Die angegebenen Flächenwerte sind in Tab. 3 in Planimeter-Einheiten angegeben und stellen Mittelwerte aus 3 Parallelbestimmungen dar<sup>4</sup>.

<sup>4</sup> 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.

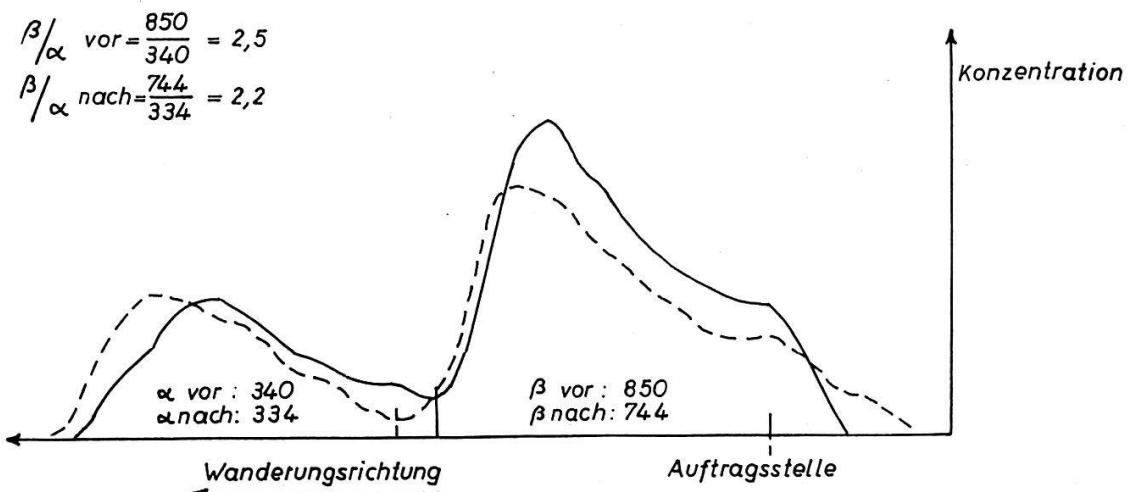


Abb. 3. Paperelektrophorese-Diagramm des Serums von Patientin S. A. vor (—) und eine Stunde nach (---) der 12. i.v. Injektion von 100 mg N-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester.

#### 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  $\beta/\alpha$ -Lipoproteide sowie die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Lipoproteid-Werte von 35 Patienten vor und eine Stunde nach der intravenösen Injektion von  $2 \text{ cm}^3$  ( $= 100 \text{ mg}$ ) 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  $2 \text{ cm}^3$  Heparin dargestellt. Bei der Betrachtung des Zahlenmaterials in Tab. 3 erhellt, daß die Gesamtlipoide nach *Swahn* [8] eine Stunde nach der Injektion von Ro 1-8307/15 stets abnehmen. Ferner ist eine Tendenz zur Abnahme der  $\beta$ -Lipoproteide sowie ein Absinken des Quotienten  $\beta/\alpha$ -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 Gesamtlipoide 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-<br>schlecht | Präparat                | Signifikanz<br>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 Differenzzahl 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  $\beta$ -Fraktion und des Quotienten  $\beta/\alpha$ -Lipoproteide für alle Fälle*

Tab. 5 vermittelt ein Bild der Beeinflussung der Gesamtlipoide, der Abnahme der  $\beta$ -Fraktionen sowie der Verschiebung des Quotienten  $\beta/\alpha$ -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 Parallelbestimmungen sehr hoch, d. h. es besteht nur eine Wahrscheinlichkeit 1:1000,

daß die Gesamtlipoide, der Quotient  $\beta/\alpha$ -Lipoproteide und die  $\beta$ -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-Formyl-chitosan-polyschwefelsäureester (Ro 1-8307/15)

|                                                             | Bestim-mungen<br>Anzahl | Mittelwerte |                     | Abnahme<br>% | Signi-fikanz<br>p |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------|---------------------|--------------|-------------------|
|                                                             |                         | vor Inj.    | 1 Std.<br>nach Inj. |              |                   |
| Abnahme der Gesamtlipoide                                   | 82                      | 490 mg%     | 410 mg%             | 16,5         | 0,001             |
| Verschiebung des Quotienten<br>$\beta/\alpha$ -Lipoproteide | 82                      | 3,29        | 3,02                | 8,2          | 0,001             |
| Abnahme der $\beta$ -Lipoproteid-Fraktion (Flächenwerte)    | 81                      | 1058        | 943                 | 11,0         | 0,001             |

c) *Dauer der Abnahme der Gesamtlipoide und des Quotienten  $\beta/\alpha$ -Lipoproteide*

Ein wesentlich anderes Bild ergibt sich bei der Prüfung auf einen Dauereffekt des Präparates. Hier wurden die Gesamtlipoide und der Quotient  $\beta/\alpha$ -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  $\beta/\alpha$ -Lipoproteide ca. 10% ausmacht.

Tabelle 6

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

|                          | Bestim-mungen<br>Anzahl | Mittelwerte |              | Signifikanz<br>p |
|--------------------------|-------------------------|-------------|--------------|------------------|
|                          |                         | vor 1. Inj. | vor 24. Inj. |                  |
| Gesamtlipoide            | 18                      | 507 mg%     | 502 mg%      | 0,8              |
| $\beta/\alpha$ -Quotient | 15                      | 3,39        | 3,06         | 0,1              |

Für den Dauereffekt des Quotienten  $\beta/\alpha$ -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 ( $\beta/\alpha$  von 7,1 → 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 cm<sup>3</sup> Heparin) auch quantitativ ähnliche Wirkungen ausübt wie Präparat Ro 1-8307/15.

Tabelle 7

|                       | Flächenwert    |          |         | Lipoidgehalt<br>mg% |
|-----------------------|----------------|----------|---------|---------------------|
|                       | $\beta/\alpha$ | $\alpha$ | $\beta$ |                     |
| 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 gegeben, 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 Thrombozytenabfall 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  $\beta$ -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  $\beta/\alpha$ -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 Blutlipoide 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 (Antithrombinzeit 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  $\beta/\alpha$ -Lipoproteide nach *Antonini* ist vor allem durch den papierelektrophoretisch erfaßbaren signifikanten relativen Abfall der  $\beta$ -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  $\beta/\alpha$  d'*Antonini* sont conditionnés en premier lieu par une diminution importante des lipoprotéines  $\beta$ , 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  $\beta/\alpha$ -lipoprotein quotient according to *Antonini* is due primarily to the significant relative decrease of the  $\beta$ -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 Pisciotta, 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).