

Aus dem Biologischen Institut Madaus, Köln a. Rh.

Weitere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus des Roßkastanien-Saponins Aescin

Von Günther Vogel, Marie-Luise Marek und Ingrid Stoeckert

Einleitung und Problemstellung

Zur Frage des Wirkungsmechanismus des Roßkastanien-Saponins Aescin konnten bisher nur Teilaspekte erarbeitet werden. So ließ sich z. B. zeigen [9, 10], daß Aescin an durch verschiedene chemische Noxen ausgelösten Entzündungen der Rattenpfote antiexsudativ wirkt, ferner ist eine Inhibierung der Potensschwellung auch möglich, wenn ein Stauungsödem der Rattenhinterpfote erzeugt, das Ödem also primär mechanisch induziert wird [5]. Das Maximum des antiexsudativen Effektes tritt an der Ratte erst nach 16 h auf. Das bedeutet, daß man bei flüchtigen Ödemen Aescin vor der Ödemprovokation zuführen muß (Modell der prophylaktischen Beeinflussung), bei protrahiert verlaufenden tritt der Effekt mit der bekannten Latenzzeit ein [9]. Die Bedeutung des Hypophysenvorderlappen-Nebennierenrindensystems für die Aescin-Wirkung konnte nicht in allen Einzelheiten abgeklärt werden; sicher ist, daß eine intakte und reaktionsfähige Nebennierenrinde (NNR) Voraussetzung für das Wirksamwerden von Aescin ist. Die Anwesenheit der Hypophyse ist für die Aescin-Wirkung dagegen nicht notwendig. Nach iv. Zufuhr verschiedener Saponine resultiert eine Verarmung der NNR an Ascorbinsäure als Ausdruck einer gesteigerten Hormonsynthese [4, 7]. Wenn eine Mehrausschüttung endogener NNR-Hormone Ursache für die antiexsudative Wirkung des Aescins sein sollte, dann müßte sie auch nach Zufuhr anderer Saponine auftreten. Das ist indes nicht der Fall. Aus diesem Grund muß angenommen werden, daß die Aescin-Wirkung trotz der langen Latenz als solche der Substanz zu verstehen ist. Dabei bleibt allerdings offen, ob Aescin einen noch unbekannten endogenen Prozeß anstößt, durch den wirksame Prinzipien freigesetzt werden. Aber auch dieser hypothetische Vorgang wäre an die spezifische Molekülstruktur des Roßkastanien-Saponins gebunden.

Die ödeminhibierende Wirkung von prophylaktisch zugeführtem Aescin war u. a. auch dadurch erklärt worden, daß es „abdichtet“ auf die Wandungen der Blutkapillaren wirken sollte. Dieser permeabilitätsmindernde Effekt ist nicht direkt nachgewiesen worden, er wurde aus der Resistenzhöhung der Blutkapillaren im Petechientest nach Aescin-Zufuhr erschlossen. Ein solcher Mechanismus ist aber nur schwer mit klinischen Beobachtungen vereinbar. Danach muß nämlich zwischen zwei Aescin-Effekten unterschieden werden, einem rasch und kurz wirkenden und einem mit einer Latenz von 10 bis 20 h einsetzenden, aber lang dauernden. Viele Beobachtungen weisen darauf hin, daß z. B. traumatische Ödeme unter Umständen 1–2 h nach Behandlung abzuswellen beginnen. Wird nun postuliert, daß Aescin über eine Minderung der Kapillarpermeabilität wirkt, dann ist damit nicht zu vereinbaren, daß extrakapillär liegende Ödemflüssigkeit leichter durch eben jene Kapillarwandungen hindurchtreten soll, deren Permeabilität vermindert ist. Deshalb muß in Erwägung gezogen werden, daß die Ödemflüssigkeit nach Behandlung mit Aescin vorwiegend auf dem Lymphweg abtransportiert wird.

Ausgehend von diesen Problemen und Überlegungen haben wir drei Hypothesen aufgestellt und versucht, diese experimentell zu bearbeiten und abzuklären.

Hypothese 1 lautet: Es wird für möglich gehalten, daß Aescin an den Zellmembranen direkt angreift und die Wasser- und/oder Salzpermeabilität so ändert, daß nach prophylaktischer Zufuhr, wenn also später eine Ödem-erzeugende Noxe gesetzt wird, weniger Wasser intrazellulär aufgenommen wird. Bei therapeutischer Zufuhr werden die Transportprozesse für Salz und Wasser so aktiviert, daß die Zellen eingedrungenes überschüssiges Wasser wieder eliminieren. An eine

Beeinflussung des Wasserwechsels war um so eher zu denken, als Aescin einen deutlichen diuretischen Effekt besitzt, der erstmalig von Wirth beschrieben wurde. Eine Abklärung dieser Fragen erschien durch Arbeiten an Gewebsschnitten möglich, die in einem hypotonen Milieu ödematös gemacht wurden, wobei der Wasserausstrom in Anwesenheit von Aescin in der Suspensionsflüssigkeit oder nach Vorbehandlung des Tieres mit Aescin beobachtet wurde. Also: Mögliche Förderung der Entquellung gequollenen Gewebes. Zum anderen wurde an Gewebsschnitten, die sich zunächst in einem isotonen Milieu befanden, die Quellung dieser Gewebsschnitte in einem hypotonen Milieu verfolgt, und zwar in Anwesenheit von Aescin in der Suspensionsflüssigkeit oder nach Vorbehandlung des Tieres mit Aescin.

Hypothese 2 lautet: Aescin steigert den Lymphfluß und wirkt dadurch Ödem-beseitigend. Deshalb wurde bei prophylaktischer und therapeutischer Zufuhr von Aescin teils an normalen Tieren, teils an solchen, denen künstlich ein Ödem gesetzt war, der Lymphfluß im Ductus thoracicus (Ratte) gemessen.

Hypothese 3 lautet: Nachdem gezeigt werden konnte [9], daß Aescin weder ein Antagonist zum Histamin noch zum Serotonin ist, wird die Möglichkeit diskutiert, daß es antiexsudativ aus antiphlogistischen Eigenschaften wirken könne. Sowohl bei mechanisch als auch chemisch provozierten Pfortenödemem können Entzündungssubstanzen entstehen, die weder Histamin noch Serotonin sind, die aber durch Aescin antagonisiert werden. Eine Stütze für eine solche Behauptung wären Hemmungsversuche mit Lysergsäurediäthylamid (LSD) an verschiedenen provozierten Ödemen, bei denen Serotonin eine unterschiedliche Rolle spielt. Die hemmende LSD-Dosis muß dabei so dimensioniert sein, daß nur jene Komponente der Entzündung antagonisiert wird, die durch Serotonin bedingt ist. Wenn an einem Ödem, das durch LSD bis zu einem gewissen Grade gehemmt wird, die Aescin-Wirkung voll erhalten ist und sich zu der LSD-Wirkung addiert, dann ergibt sich eine Stütze für die Behauptung, daß Aescin infolge antiphlogistischer Eigenschaften antiexsudativ wirkt. Es müßte Entzündungssubstanzen antagonisieren, die nicht Histamin und nicht Serotonin sind. Deshalb wurden Versuche derart vorgenommen, daß verschiedene Rattenpfortenödeme mit LSD plus Aescin behandelt wurden. Entsprechend diesen Hypothesen wurden die folgenden Versuche durchgeführt.

Methoden und Ergebnisse

Zu 1: Aus methodischen Gründen wurden die Versuche über die Beeinflussung der Zellpermeabilität an Gewebsschnitten *in vitro* vorgenommen.

Wir untersuchten:

- a) den Einfluß von Aescin auf das Ausmaß der Quellung von Geweben im hypotonen Milieu (Modell der prophylaktischen Aescin-Wirkung),
- b) den Einfluß von Aescin auf die Entquellung gequollener Gewebe im isotonen Milieu (Modell der therapeutischen Aescin-Wirkung) an Darm, Hirn, Leber, quergestreifter Muskulatur und Zwerchfell der Maus sowie an Darm und Zwerchfell der Ratte.

In Anlehnung an das Vorgehen von Aebi [1] wurden dazu passende Gewebstücke von Zwerchfell und Darm sowie etwa 1 mm dicke Schnitte von quergestreifter Muskulatur, Leber und Hirn bei 37° C und unter Carbogen-Versorgung [5] 90 min in hypotonen Medien ausgesetzt, im Warburg-Gerät geschüttelt und nach leichtem Abtrocknen auf Filterpapier gewogen. Anschließend wurden die Gewebstücke 16 h bei 105° C getrocknet. Das Ausmaß der Quellung wurde als Prozent Trockengewicht vom Feuchtgewicht berechnet.

Für Leber und Hirn, die zum Teil in der Inkubationslösung zerfielen, wurde die Bestimmung des Trockengewichtes mit entsprechenden Stücken aus Organen desselben Tieres durchgeführt.

Zur Bestimmung der Entquellung verwendeten wir Schnitte, die in einem hypotonen Medium (66,5 mMol/l = 42,3% isoton.) gequollen waren. Die Schnitte wurden gewogen, für weitere 90 min einem

isotonen Medium ausgesetzt und wieder gewogen. Anschließend wurde das Trockengewicht bestimmt. Der Unterschied im Trockengewichtsanteil vom Frischgewicht der ersten und zweiten Wägung gibt ein Maß für die Entquellung. Wir verwendeten sowohl isotonen Phosphatpufferlösungen (pH 7,3), die durch entsprechende Verdünnung hypoton gemacht wurden, als auch von Krebs [5] angegebene Medien, die wir für unsere Zwecke etwas modifizierten. Aescin wurde den zur Quellung bzw. Entquellung verwendeten Medien zugesetzt, weiterhin wurden Tiere, an deren Organen die Quellung bzw. Entquellung bestimmt werden sollte, 16 h vor dem Versuch einmal iv. mit 6 mg Aescin/kg behandelt. In allen Versuchen benutzten wir das chemisch reine Rostkastaniensaponin Aescin (Mol. Gew. 1144) als Na-Salz*).

Inkubationsmedien

1. Isotone Phosphatpufferlösung:

Na₂HPO₄ = 4 g ad 1000 ml aqua dest. pH 7,3
Na₂HPO₄ = 16,4 g

2. Krebslösungen:

Lösung I:	NaCl	9,4 ml
106,6 mM/l	(58 g/l)	
	KCl	0,6 ml
	(74,55 g/l)	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,25 ml
	(147,0 g/l)	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,1 ml
	(246 g/l)	
	aqua dest. ad	50,0 ml

Lösung II: Trispuffer (Tri-(oxymethyl)-amino-methan)

52,9 mM/l	(243 g/l + 170 ml nHCl)	12,5 ml
	Na-Phosphatpuffer	0,15 ml
	Substratgemisch	
	0,456 g + 0,25 ml	
	gesättigte Sodalösg. in	5,0 ml
	aqua dest. ad	20,0 ml

Isotonische Inkubationslösung:

156,5 mM/l	6 ml Lösung I	
	+ 2,4 ml Lösung II	
	+ 3,6 ml aqua dest.	

hypotones Medium 1

106,2 mM/l	3 ml Lösung I	
± 68% isoton.	+ 2,4 ml Lösung II	
	+ 6,6 ml aqua dest.	

hypotones Medium 2

79,6 mM/l	1,5 ml Lösung I	
± 50,9% isoton.	+ 2,4 ml Lösung II	
	+ 8,1 ml aqua dest.	

hypotones Medium 3

66,3 mM/l	0,75 ml Lösung I	
± 42,3% isoton.	+ 2,4 ml Lösung II	
	+ 8,85 ml aqua dest.	

Die Aescin-Dosis war jeweils so eingestellt, daß sie 1 ml aqua dest. ersetzte.

Setzt man verschiedene Gewebe (Darm, Hirn, Leber) über 90 min einem etwa 40% isotonen Medium aus, so kommt es zur Flüssigkeitsaufnahme, die sich im Absinken des Trockengewichtsanteils manifestiert. Wäre die antiödematöse Aescin-Wirkung nach prophylaktischer Gabe im Sinn einer Permeabilitätsminderung, einer „Dichtung“ der Gewebszellen zu verstehen, dann müßte die Quellung im hypotonen Medium geringere Ausmaße annehmen als die der unbehandelten Kontrollen. Tatsächlich zeigen jedoch verschiedene

Aescin-Konzentrationen im therapeutischen und 100fach höheren Dosenbereich keinerlei Beeinflussung des Trockengewichtsanteils: Es kommt weder zu einer Verminderung, noch zu einer Erhöhung der Zellpermeabilität (s. Tab. 1 u. 2).

Die Ergebnisse zum Modell der therapeutischen Aescinwirkung sind in Tab. 3 aufgeführt. Bei Gewebestücken, die zuvor im hypotonen Milieu gequollen waren, kommt es im isotonen Milieu zu einer teilweisen Entquellung. Durch Aescin in verschiedenen Konzentrationen läßt sich das Ausmaß der Entquellung weder im fördernden noch im hemmenden Sinne beeinflussen.

Zu 2: Die Bestimmung des Lymphflusses erfolgte an Ratten von ca. 200 g in Nembutal-Narkose durch Kanulierung des Ductus thoracicus nach Bollmann et al. [2]. Im einzelnen wurden folgende Fragen geprüft:

a) Einfluß von Aescin bei therapeutischer Zufuhr an normalen Tieren. Die iv. Applikation von 0,25; 0,5 und 1,0 mg/kg (in 5,0 ml/kg 0,85% NaCl) erfolgte

Tab. 1: Trockengewichtsanteil in % des Feuchtgewichtes — Wirkung von Aescin auf Gewebsquellung in hypotonem Milieu. In () gesetzte Zahlen: Anzahl der Versuche.

Versuchsbedingungen	Darm	Hirn	Leber	Skelettmuskel	Zwerchfell	+ Aescin
Na-Phosphatpuffer isoton	17,51 (2)	20,7 (4)	19,7 (1)	16,6 (1)	—	—
Na-Phosphatpuffer 1/10 isoton	10,87 (6)	9,03 (10)	11,21 (2)	15,5 (1)	—	—
Na-Phosphatpuffer 1/10 isoton nach 16 h Präinjektion v. Aescin	—	9,84 (4)	—	—	—	6 mg/kg iv.
Na-Phosphatpuffer 1/10 isoton + Aescin	10,12 (1) 11,91 (1) 10,09 (1) 11,97 (5) 7,91 (2) 7,51 (2)	9,0 (1) — 9,1 (7) — 7,7 (1) —	10,6 (1) — 11,23 (1) — 10,62 (1) —	— — — — — —	— — — — — —	5,2 mg/l 10,4 mg/l 20,8 mg/l 41,6 mg/l 83,2 mg/l 166,4 mg/l
	— 9,48 (2) — —	9,23 (7) 8,5 (1) 9,44 (6) 9,8 (1)	— 9,12 (1) — —	— — — —	— — — —	208,0 mg/l 332,8 mg/l 416 mg/l 832 mg/l
	— —	9,13 (7) —	— —	— —	— —	1660 mg/l

Tab. 2: Trockengewichtsanteil in % des Feuchtgewichtes — Wirkung von Aescin auf Gewebsquellung in hypotonem Milieu.

Versuchsbedingungen	Darm	Hirn	Leber	Skelettmuskel	Zwerchfell	+ Aescin
Kontrollen ohne Inkubations-Medium	19,19 (9)	19,90 (22) 18,93 (2)	26,60 (3)	21,8 (1)	19,7 (1)	—
Isotone Krebslsg.	15,62 (3)	14,65 (16)	19,4 (1)	18,6 (1)	21,73 (1)	—
Hypotones Medium 1 (68% isoton)	15,31 (1)	13,69 (1)	—	—	23,66 (1)	—
Hypotones Medium 2 (50,9% isot.)	13,7 (1)	13,54 (1)	—	—	22,23 (1)	—
Hypotones Medium 3 (42,3% isoton)	12,81 (6)	11,48 (11)	17,62 (2)	19,3 (1)	19,98 (1)	—
Hypotones Medium 3 42,3% isot. 16 h nach Injektion von Aescin	—	12,36 (4)	—	—	—	6 mg/kg iv.
Hypotones Medium 3 + Aescin in Suspensionsflüssigkeit	11,46 (1) 11,55 (1) 11,25 (1) 11,11 (3) 11,99 (2) 11,15 (2) — 11,5 (2) — —	10,9 (1) — 13,6 (1) — 12,6 (1) — 11,7 (1) 12,8 (1) 12,08 (9) 13,32 (1) 10,74 (1)	17,05 (1) — 16,73 (1) — 15,73 (1) — — 12,64 (1) — —	— — — — — — — — — —	— — — — — — — — — —	5,2 mg/l 10,4 mg/l 20,8 mg/l 41,6 mg/l 83,2 mg/l 166,4 mg/l 208,0 mg/l 332,8 mg/l 416 mg/l 832 mg/l 1660 mg/l

*) Hersteller: Dr. Madaus & Co., Köln-Merheim.

Tab. 3: Trockengewichtsanteil in % des Feuchtgewichtes bei Verbringen von gequollenem Gewebe in ein isotonisches Milieu — Einfluß von Aescin auf die Gewebsentquellung.

	1 1/2 h	+ 1 1/2 h	Aescin mg/l	n
Darm. Maus	Kontrollen ohne Inkubation			
	16,64		—	24
	hypoton. Medium →	isoton. Medium		
	6,0	10,79	—	22
	isoton. Medium →	isoton. Medium		
	8,44	12,4	—	38
	hypoton. Medium →	isoton. Medium + Aescin		
	5,2	11,33	2,08	15
	8,74	12,96	85,2	8
	7,3	12,3	208,0	13
Zwerdfell Ratte	Kontrollen ohne Inkubation			
	18,77			4
	hypoton. Medium →	isoton. Medium		
	16,13	18,57		15
	hypoton. Medium →	isoton. Medium + Aescin		
	16,63	19,68	2,08	15
	hypoton. Medium →	isoton. Medium + Aescin		
	15,23	17,96	1,0	10

unmittelbar vor Anlegung der Lymphfistel; unbehandelte Kontrollen erhielten das gleiche Injektionsvolumen.

Die in Tab. 4 zusammengestellten Befunde, welche die stündlichen Lymphflußwerte bis zur 4. h nach der Aescin-Applikation enthält, zeigen, daß bei therapeutischer Applikation ein sicherer Einfluß des Aescins auf den Lymphfluß nicht nachgewiesen werden kann.

b) Da das normale Tier — ohne Ödem — möglicherweise nicht das geeignete Versuchsobjekt sein könnte, haben wir auch an Tieren gearbeitet, denen experimentell Ödeme gesetzt wurden. Eine Stunde nach einer Vorperiode (Lymphfluß-Kontrolle) wurden, mit 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung/kg auf beide Oberschenkel verteilt, Depots gesetzt. Gleichzeitig erhielten die Tiere 0,5 bis 1 mg Aescin in 2,5 ml/kg iv.; die Kontrolltiere wurden analog behandelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengestellt.

Der Lymphfluß von Tieren, die ein Kochsalzödem tragen, ist gegenüber den entsprechenden unbehandelten Tieren (s. Tab. 4) nicht sicher gesteigert. Eine Erhöhung des Lymphflusses durch therapeutisch gegebenes Aescin läßt sich ebenfalls nicht nachweisen. Der Abtransport der Ödemflüssigkeit erfolgt offensichtlich vorwiegend auf dem Blutwege. Versuche, ein durch im. Applikation einer 20%igen Polyvinylpyrrolidonlösung erzeugtes Ödem zu beeinflussen, brachten ebenfalls kein positives Resultat.

In den folgenden Versuchen wurde Aescin „prophylaktisch“ gegeben, d. h. 16–20 h vor Anlegen der Lymphfistel.

c) Die iv. Applikation von 0,5 und 1 mg Aescin/kg in 5 ml 0,85% NaCl/kg erfolgte 16–20 h vor Anlegen der Lymphfistel. Auf eine Behandlung der Kontrollen mit entsprechenden Injektionsvolumina wurde verzichtet.

Tab. 4: Wirkung verschiedener Dosen Aescin auf den Lymphfluß im ductus thoracicus der Ratte.

Substanz	mg/kg iv.	ml/kg iv.	Lymphfluß							
			1. h ml/60 min × 100 g	n	2. h ml/60 min × 100 g	n	3. h ml/60 min × 100 g	n	4. h ml/60 min × 100 g	n
Aescin	0,25	5,0	0,29	3	0,26	3	0,14	3	0,09	3
	0,50	5,0	0,37	12	0,37	12	0,23	9	0,13	7
	1,00	5,0	0,34	7	0,23	6	0,19	6	0,22	5
0,9%ige NaCl-Lsg.	—	5,0	0,36	11	0,26	10	0,25	10	0,33	8

Bei prophylaktischer Zufuhr ergibt sich ein deutlich anderes Bild als bei therapeutischer. In Abhängigkeit von der Dosis kommt es besonders von der 2. h an zu einer deutlichen Senkung des Lymphflusses (s. Tab. 6 u. Abb. 1). Der Unterschied zwischen den nach Zufuhr von 1 mg/kg erhaltenen Werten und den Kontrollwerten ist statistisch gesichert [P =

Tab. 5: Einfluß von verschiedenen Dosen Aescin auf Lymphfluß und Trockengehalt der Lymphe des ductus thoracicus bei Ratten mit im. artifizialen Ödemen.

Lymphfluß-Vorperiode ml/60 min × 100 g	n	Substanz	ml/kg iv.	mg/kg iv.	Ödem ml NaCl/kg im.	Lymphfluß								Trockengehalt der Sammellymphe ohne Vorperiode %
						1. h ml/60 min × 100 g	n	2. h ml/60 min × 100 g	n	3. h ml/60 min × 100 g	n	4. h ml/60 min × 100 g	n	
0,367	15	Aescin	0,5	2,5	10	0,390	15	0,251	14	0,218	13	0,258	10	4,84
0,353	11		1,0	2,5	10	0,341	10	0,196	9	0,126	7	0,130	5	5,32
0,305	11	0,9%ige NaCl-Lsg.	—	2,5	10	0,372	11	0,153	8	0,173	7	0,181	6	5,66

Tab. 6: Einfluß von verschiedenen Dosen Aescin, 16–20 h vor dem Versuch appliziert, auf Lymphfluß und Trockengehalt. Deutliche und von den Dosen abhängige Verminderung des Lymphflusses bei Zunahme des Trockengehalts.

Aescin iv. 16–20 h vor Lymphflußbeginn	Lymphfluß								Trockengehalt der Sammellymphe ohne Vorperiode %
	1. h ml/60 min × 100 g	n	2. h ml/60 min × 100 g	n	3. h ml/60 min × 100 g	n	4. h ml/60 min × 100 g	n	
unbehandelt	0,308 ± 0,017	15	0,218 ± 0,018	14	0,214 ± 0,029	14	0,179 ± 0,032	9	5,18 ± 0,28
0,5 mg/kg	0,220 ± 0,024	15	0,143 ± 0,019	14	0,123 ± 0,019	14	0,124 ± 0,022	12	6,01 ± 0,25
1,0 mg/kg	0,248 ± 0,016	12	0,095 ± 0,013	11	0,080 ± 0,012	10	0,105 ± 0,017	8	6,57 ± 0,32

< 1% (3. u. 4. h). Entsprechend der Verminderung der Lymphmenge steigt ihr Trockengehalt ($P = < 1\% > 0,1\%$).

d) Derselbe Versuch wurde an Tieren mit Kochsalzödem (vgl. b) durchgeführt. Die iv. Applikation von 0,5 mg Aescin in 2,5 ml/kg 0,85% NaCl erfolgte 16 bis 20 h vor Setzen des NaCl-Lösungs-Depots. Eine Stunde nach Beginn der Lymphflußmessung erhielten die Tiere 10 ml physiol. NaCl-Lösung/kg im. auf beide Oberschenkel verteilt. Wie bei c) wurde auf eine Vorbehandlung der — ödemtragenden — Kontrollgruppe verzichtet.

Bei den ödemtragenden Tieren bewirken 0,5 mg Aescin/kg die gleiche deutliche Minderung des Lymphflusses mit Anstieg des Trockenanteiles wie bei intakten (nicht ödemtragenden) Tieren (vgl. Tab. 7).

Zu 3: Zur Verwendung kamen nur männliche Ratten im Gewicht von 150 bis 200 g. Die lokalen Ödeme wur-

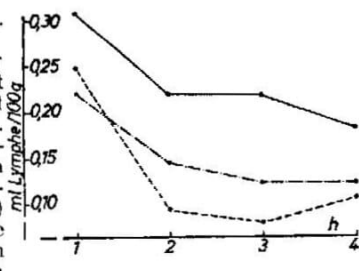


Abb. 1: Ordinate: Lymphfluß, ml/100 g. Abszisse: Zeit in h. — = Lymphfluß 16 h nach 0,5 mg Aescin/kg iv. - - - = 16 h nach 1,0 mg/kg iv. . . . = unbehandelte Kontrollen.

Ödem-provozierenden Substanz und Na-Aescinat, Applikation iv., 16 h vor Ödemprovokation.

Zunächst wurde am Ovalbumin-Ödem jene LSD-Dosis ermittelt, die eine ausreichende, jedoch nicht maximale Hemmung bewirkt.

Entsprechend Tab. 8 ist am Ovalbumin-Ödem 1 µg LSD/Pfote, zugleich mit dem Ovalbumin verabreicht, sicher Ödem-hemmend. Auch mit der zehnfachen LSD-Dosis läßt sich keine vollständige Ödemhemmung erreichen, übrigens auch nicht am Dextran-Ödem (6 mg/Pfote 50% Hemmung), s. Vogel u. Marek [8].

Das Ausmaß der Ödemhemmung nach Behandlung mit der geeigneten LSD-Dosis von 1 µg/Pfote allein, mit 1 mg/kg Aescin allein sowie mit der kombinierten Behandlung LSD + Aescin wurde an vier verschiedenen provozierten Ödemen bestimmt. Die einzelnen Versuchsreihen wurden mit Gruppen von 10 Tieren eines Kollektivs stets an einem Tag durchgeführt. Den Berechnungen der Ödemhemmung in Prozent wurde der Flächenwert der Ödemvolumen/Zeit-Integrale einer mit 5,0 ml NaCl 0,85%/kg behandelten Kontrollgruppe zugrunde gelegt. Aus den Differenzen des mittleren Flächenwertes der Kontrollgruppe gegenüber denen der Gruppen behandelter Tiere wurde die Ödemhemmung in Prozent errechnet. Die statistische Berechnung erfolgte nach dem t-Test nach Student. Die Ergebnisse sind der Tab. 9 zu entnehmen (s. Abb. 2, 3, 4 u. 5).

Tab. 7: Entspricht Tab. 6. Artifizielles Ödem mit 0,9%iger NaCl-Lösung, Kontrollen s. Tab. 6.

Aescin iv. 16–20 h vor Versuchs- beginn	Lymphfluß- Vorperiode ml/60 min × 100 g	n	Ödem ml NaCl/kg im.	Lymphfluß								Trockengehalt der Sammel- lymphe ohne Vorperiode %
				1. h ml/60 min × 100 g	n	2. h ml/60 min × 100 g	n	3. h ml/60 min × 100 g	n	4. h ml/60 min × 100 g	n	
0,5 mg/kg	0,308 ± 0,0268	10	10	0,258 ± 0,0316	10	0,143 ± 0,0314	6	0,261	3	0,161	2	7,05 ± 0,685

den durch Applikation von je 0,1 ml der ödemprovozierenden Lösungen in eine Ratten-Hinterpfote erzeugt. Die Pfotenolumina wurden vor sowie nach der Ödemprovokation stündlich über 7 h gemessen. Zur Berechnung der Ödemhemmung (Ö.H.) s. Vogel u. Marek [8].

Die zur Ödemprovokation verwendeten Substanzen und Dosen sind Tab. 9 zu entnehmen.

Zur Hemmung der Ödeme verwendeten wir Lysergsäure-diaethylamid (LSD 23, Delysid®, Sandoz AG, Basel), Applikation intraplantar zugleich mit der

Tab. 8: Ödemhemmung am Ovalbumin-Ödem (2 mg pro Pfote) mit LSD.

LSD Dosis/ Pfote	Ödemhemmung	
	%	P
10 µg	61,5	0,1
1 µg	44,0	1% > P > 0,1%
0,1 µg	0,1	—

Die Pfotenödeme nach Zufuhr von Ovalbumin, Dextran, Compound 48/80*) und Formalin wurden als Modelle zu beeinflussender Entzündungen deshalb gewählt, weil sie sich hinsichtlich Reversibilität und Schwere der Irritation wesentlich voneinander unterscheiden. Während die Ovalbumin- und die Dextran-Entzündung relativ geringe Gewebsreaktionen bedingen und gut reversibel sind, stellt das Formalin-Ödem den Fall einer schweren nekrotisierenden Entzündung dar. Das Ödem nach lokaler Zufuhr von Compound 48/80 steht hinsichtlich Zeitverlauf, Reversibilität und Schwere der Entzündungsmerkmale zwischen dem Formalin-Ödem und den anaphylaktoiden Ödemen. Außerdem lag der Wahl der Entzündungsmodelle die Notwendigkeit zugrunde, nur mit solchen Entzündungsmodellen zu arbeiten, die in mehr oder weniger ausgeprägtem Maße sowohl durch LSD als auch durch Aescin hemmbar sind.

Die Gesetzmäßigkeit, wonach — in mehr oder weniger starkem Maße — eine Summation der Hemmwirkungen von Aescin und LSD eintritt, läßt sich beson-

Tab. 9: Die Beeinflussung verschiedener Rattenpfotenödeme durch Aescin, LSD und Aescin + LSD. K = Kontrollgruppe; ↔ Vergleich zweier Versuchsreihen.

Behandlung	Ovalbumin-Ödem 2 mg/Pfote		Dextran-Ödem 2 mg/Pfote		Compound 48/80-Ödem 5 µg/Pfote		Formalin-Ödem 3 mg/Pfote	
	Ö. H. %	P	Ö. H. %	P	Ö. H. %	P	Ö. H. %	P
I Aescin 1 mg/kg	29,2	K ↔ I 2% > P > 1%	30,2	K ↔ I 1% > P > 0,1%	55,0	K ↔ I (0,1%)	25,4	K ↔ I 1% > P > 0,1%
II LSD 1 µg/Pfote	27,8	K ↔ II 0,1%	21,0	K ↔ II 5% > P > 2%	61,3	K ↔ II (0,1%)	8,2	K ↔ II 50% > P > 40%
III Aescin 1 mg/kg + LSD 1 µg/Pfote	62,1	K ↔ III (0,1%) I ↔ III 1% > P > 0,1% II ↔ III (0,1%)	45,4	K ↔ III (0,1%) I ↔ III 30% > P > 20% II ↔ III 10%	77,4	K ↔ III (0,1%) I ↔ III 1% II ↔ III 20% > P > 10%	28,8	K ↔ III 1% > P > 0,1% I ↔ III 80% > P > 70% II ↔ III 10% > P > 5%

ders deutlich am Beispiel des Ovalbumin-Ödems demonstrieren. Eine ähnliche Addition der Wirkungen wird auch am Dextran-Ödem gesehen. Das Ödem nach Zufuhr von Compound 48/80 ist durch Aescin zu über 50% hemmbar, durch LSD zu über 60%. Bei kombinierter Applikation der beiden Hemmstoffe wäre demnach eine vollständige Hemmung zu erwarten, die indes nicht gefunden

*) Formaldehyd-Kondensationsprodukt des p-Methoxy-N-methylphenethylamins.

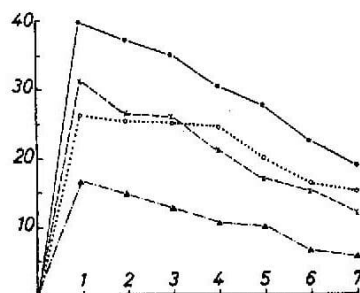


Abb. 2: Ovalbumin-Oedem, 2 mg/Pfote. Ordinate: Oedemvol. % normaler Pfoten volumina. Abszisse: Zeit in h. X—X = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation. O—O = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Ovalbumin. A—A = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Ovalbumin. B—B = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation (Kontrollen).

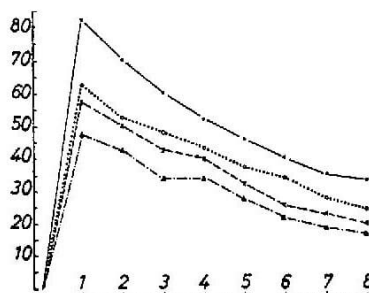


Abb. 3: Dextran-Oedem, 2 mg/Pfote. Ordinate: Oedemvol. % normaler Pfoten volumina. Abszisse: Zeit in h. X—X = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation. O—O = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Dextran. A—A = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Dextran. B—B = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation (Kontrollen).

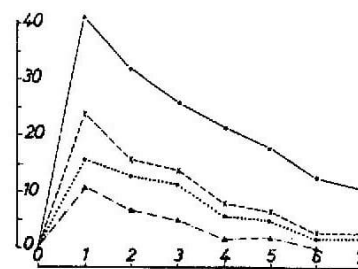


Abb. 4: Compound 48/80-Oedem, 5 µg/Pfote. Ordinate: Oedemvol. % normaler Pfoten volumina. Abszisse: Zeit in h. X—X = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation. O—O = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Compound 48/80. A—A = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Compound 48/80. B—B = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation (Kontrollen).

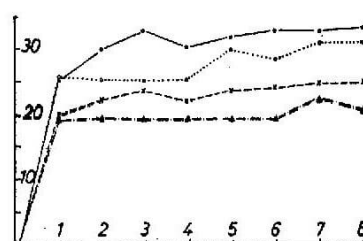


Abb. 5: Formalin-Oedem, 5 mg/Pfote. Ordinate: Oedemvol. % normaler Pfoten volumina. Abszisse: Zeit in h. X—X = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation. O—O = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Formalin. A—A = Aescin, 1 mg/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation + LSD, 1 µg/Pfote, gleichzeitig mit Formalin. B—B = NaCl, 0,85% 5 ml/kg iv., 16 h vor Oedemprovokation (Kontrollen).

wird. Die Oedemgröße nach kombinierter Zufuhr von Aescin und LSD beträgt immer noch 22,6% des Kontroll-Oedems. Das Formalin-Oedem wird durch Aescin zu 25% gehemmt, durch LSD in der vorliegenden Dosierung nur zu 8,2%, die kombinierte Applikation von Aescin und LSD läßt die Hemmung auf einen Wert ansteigen, der über dem durch Aescin bedingten liegt.

Wenn sich auch die Aescin- und die LSD-Wirkung

unter den vorliegenden Bedingungen nicht in jedem Falle einfach addieren, so läßt sich doch die Regel aufstellen, daß bei kombinierter Applikation von Aescin und LSD die Oedemhemmung stets größer ist als die allein durch Aescin und LSD bedingte. Ein zumindest partieller Additionseffekt kann demnach als gesichert gelten.

Diskussion

Die negativen Befunde über die Beeinflussung der Entquellung ödematösen oder der Quellung normalen Gewebes brauchen nicht diskutiert zu werden; Aescin beeinflusst die geprüften Vorgänge nicht. Mit der gewohnten langen Latenz vermindert es den Lymphfluß bei gleichzeitiger Steigerung des Trockengehalts der Lymphe. Diese Wirkung kann als Folge seiner „kapillarabdichtenden“ Eigenschaften aufgefaßt werden [6]. Für eine Steigerung des lymphatischen Abtransportes von Ödemflüssigkeit durch Aescin ergeben sich keine Anhaltspunkte. Welche Schlüsse erlauben nun die Ergebnisse nach kombinierter LSD- plus Aescinzufuhr? Soweit aus pharmakologischen Antagonismen überhaupt auf die an der Oedemgenese beteiligten Entzündungssubstanzen geschlossen werden kann, müßten die vorliegenden Experimente in folgender Weise interpretiert werden: Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß Aescin weder ein Antagonist zum Histamin noch zum Serotonin ist. Andererseits ist LSD ein potenter Antagonist des Serotonins, das bei den vorliegenden Entzündungen stets beteiligt ist. Wenn die kombinierte Applikation von Aescin plus LSD eine stärkere Wirkung entfaltet als jede der beiden Hemm-

substanzen allein, wenn weiter LSD distinkt gegen Serotonin gerichtet ist, folgt daraus, daß Aescin eine antiphlogistische Wirkungskomponente hat, die sich gegen eine oder mehrere Entzündungssubstanzen richtet, die nicht Histamin oder Serotonin sein können. Dabei steht die lange Latenz der Wirkung einer solchen Deutung nicht entgegen. Es ist durchaus möglich, daß die antiphlogistische Wirkung kein direkter Aescin-Effekt ist, sondern daß Aescin einen noch unbekannten endogenen Vorgang — Freisetzung endogener antiphlogistischer wirksamer Substanzen — anstößt, oder daß es erst in eine wirksame Verbindung überführt werden muß. Wie dem auch sei — die antiexsudative Wirkung wäre so zu verstehen, daß infolge der Antagonisierung laufend sich bildender Entzündungssubstanzen die Begleiterscheinungen der Entzündung (Ödem) und die Entzündung selbst im Sinne einer rascheren Rückbildung beeinflusst werden.

Zusammenfassung

Zur weiteren Abklärung des Wirkungsmechanismus des Rofkastanien-Saponins Aescin werden folgende Hypothesen experimentell geprüft:

Aescin verändert die Permeabilität von Zellen derart, daß in einem hypotonen Milieu weniger Flüssigkeit aufgenommen bzw. vermehrt aufgenommene Flüssigkeit nach Verbringen in ein isotones Milieu rascher eliminiert wird.

Aescin bewirkt eine Ödem-Ausschwemmung durch Steigerung des Lymphflusses.

Aescin wirkt antiexsudativ durch Antagonisierung von Entzündungssubstanzen, die nicht Histamin und Serotonin sind.

Weder nach Vorbehandlung der Tiere mit Aescin noch bei Anwesenheit von Aescin in der Suspensionsflüssigkeit wird die Flüssigkeitsaufnahme isolierter Gewebe in einem hypotonen Milieu vermindert. Die Entquellung isolierter Gewebe in einem normotonen Milieu, die vorher in einem hypotonen ödematös gemacht wurden, wird durch Aescin nicht gefördert.

Weder an intakten Tieren noch an solchen, die ein artifizielles Ödem tragen, steigert Aescin den Lymphfluß im ductus thoracicus der Ratte, wenn es unmittelbar vor Beginn der Lymphflußmessung appliziert wird. Bei Applikation 16 h vor dem Versuch resultiert an normalen und ödemtragenden Tieren eine deutliche Verminderung des Lymphflusses mit Steigerung des Trockengehalts der Lymphe. Dieser Befund wird als Folge einer verminderten Filtration von Lymphe nach „Membrandichtung“ der Blutkapillaren gedeutet.

Am Rattenpfotenödem nach lokaler Applikation von Ovalbumin, Dextran, Compound 48/80 und Formalin kommt es zur Summation der Hemmwirkungen von

Lysergsäure-diaethylamid und Aescin. Dieser Befund wird so gedeutet, daß — da Aescin kein Histamin-Antagonist ist — es Entzündungssubstanzen antagonisiert, die nicht Histamin und Serotonin sein können. Die antiexsudative bzw. die Ödemabflutung beschleunigende Wirkung von Aescin wird auf eine antiphlogistische Wirkungskomponente des Roßkastanien-Saponins zurückgeführt.

Summary

Further Studies on the Mechanism of Action of the Saponin Aescin contained in Horse-chestnuts

The following hypotheses have been made the subject of experimental studies to explain the mechanism of action of aescin:

1. Aescin changes the cell permeability, resulting in reduced inflow of fluid in hypotonic surroundings or in more rapid elimination of fluid following transfer to isotonic surroundings.
2. Aescin causes excretion of edematous fluid through increase of fluid flow.
3. The action of aescin is anti-exsudative by antagonizing phlogistic substances other than histamine or serotonin.

The following results were obtained:

Neither pre-treatment of the experimental animals with aescin nor the presence of aescin in the suspension media reduces the fluid inflow of isolated tissues in hypotonic surroundings. Aescin does not stimulate the excretion of fluid from isolated tissues in normotonic surroundings which have previously been made edematous in hypotonic surroundings. Aescin, if applied immediately prior to the lymph flow measurements, does not increase the lymph flow in the ductus

thoracicus in rats, neither in the normal animals nor in animals with artificial edema. If aescin is applied 36 hrs before the onset of the experiment, marked reduction of the lymph flow and increased content of dry substances in the lymph is found both in normal and in edematous animals. This is regarded as a sign of reduced filtration of lymph substances following "membrane occlusion" in the blood capillaries. In the rat's paw's edema provoked by local application of ovalbumin, dextran, compound 48/80, or formalin, summation of the inhibitive effects of lysergic acid diethylamide and aescin is observed. This finding may be explained by antagonistic action of aescin (which is not an histamine antagonist) towards phlogistic substances other than histamine or serotonin. The anti-exsudative effect of aescin, and its stimulating action on the excretion of edema fluid, are attributed to an antiphlogistic component of the horse-chestnut saponin.

Literatur

- [1] Aebi, H., *Helv. physiol. pharmacol. acta* 11, 96 (1953)
- [2] Bollman, J. L., Cain, J. C. and Grindlay, J. H., *J. Laborat. Clin. Med.* (St. Louis), 33, 1349 (1948)
- [3] Haase, H., pers. Mitteil., unveröffentlichte Versuche
- [4] Jakubíková, K., Machková, J., Slavičková, O. u. Vacek, L., *Arzneim.-Forsch.* 10, 956 (1960)
- [5] Krebs, H. A., *Biochim. biophysica acta*, N.Y. 4, 249 (1950)
- [6] Lorenz, D. u. Marek, M. L., *Arzneim.-Forsch.* 10, 263 (1960)
- [7] Vacek, L. u. Kozlik, V., *Arzneim.-Forsch.* 11, 325 (1961)
- [8] Vogel, G. u. Marek, M. L., *Arzneim.-Forsch.* 11, 1051 (1961)
- [9] Vogel, G. u. Marek, M. L., *Arzneim.-Forsch.* 12, 815 (1962)
- [10] Vogel, G. u. Uebel, H., *Arzneim.-Forsch.* 10, 275 (1960)
- [11] Wirth, W., pers. Mitteil., unveröffentlichte Versuche.

Für die Verf.: Prof. Dr. G. Vogel, Biologisches Institut Madaus, 5 Köln-Merheim

Aus dem Institut für Lungenfunktionsforschung, Bodum.
in Verbindung mit der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster;
Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. W. T. Ulmer

Funktionsanalytische Untersuchungen über die Wirkung von 2,6-Bis-(diaethanolamino)-4,8-dipiperidino-pyrimido(5,4-d)pyrimidin auf die Lunge

Von K. Reeschuch und W. T. Ulmer

Im Gegensatz zu der einheitlichen Beurteilung der die Coronardurchblutung steigernden Wirkung und der günstigen Beeinflussung des Herzstoffwechsels durch 2,6-Bis-(diaethanolamino)-4,8-dipiperidino-pyrimido(5,4-d)pyrimidin (Dipyridamol, Persantin®) sind die Literaturangaben über dessen Wirkung auf die Lungenfunktion widersprechend [6, 4, 5, 9, 8, 2, 3]. Mit den vorliegenden Untersuchungen soll versucht werden, zur Frage der Persantin-Wirkung auf die Lungenfunktion Stellung zu nehmen.

Methodik

31 Patienten mit Lungenfunktionsstörungen, von denen 17 stärkere Obstruktionen hatten und 14 bei Silikosen vorwiegend restriktive Veränderungen zeigten, standen zur Untersuchung zur Verfügung.

10 Patienten erhielten 10 mg, 13 Patienten 20 mg Persantin, 8 Patienten 2 cm³ physiologische NaCl-Lösung i.v.

Gemessen wurden: Atemminutenvolumen, Vitalkapazität, 1-Sekundenwert und Hyperventilationstest mit dem Palmotest der Fa. Godart, das Residualvolumen mit Helium und einem Hitzdrahtgasanalysator (Fa. Godart), alveolärer Kohlendruck mit dem Ultrarotabsorptionsschreiber (Fa. Hartmann & Braun), arterieller Sauerstoff- und Kohlendruck mit der Teflon-überzogenen Elektrode (Fa. Eschweiler), Arbeitsbelastung mit drehzahlabhängigem Ergometer (Fa. Jaeger).

Versuchsablauf: Nach einer Ruhespirometrie wurde in die A. brachialis eine Verweilkanüle eingelegt und bei gleichzeitiger Schreibung des alveolären Kohlendruckes arterielles Blut zur Blutgasanalyse entnommen. In eine Armvene wurden darauf 0,01, 0,02 Persantin bzw. physiologische NaCl-Lösung i.v. gegeben. 15 und 30 min später wurde erneut Blut zur Blutgasanalyse entnommen. In 13 Fällen wurde nach 5 min nach der i.v. Persantingabe eine Blutprobe entnommen. 15 min nach der Gabe des Pharmakons konnten erneut alle spirometrischen Meßgrößen bestimmt werden.

9 Versuchspersonen (5 nach Persantin und 4 nach NaCl) unterzogen sich einer Belastung von 70 Watt im Liegen am Fahrradergometer über 6 min. 15–30 min nach der Belastung wurden die Blut-, Alveolargas- und Spirometriewerte kontrolliert.

Die Eichung des Ultrarotabsorptionsschreibers und der Blutgas-elektroden erfolgte nach jedem Versuch mit nach Schöland analysierten Gasgemischen.

Sollwerte für das Atemminutenvolumen: Sauerstoffverbrauch mal 28. Sollwerte der Montanunion für die Vitalkapazität, den 1-Sekundenwert und das Residualvolumen.

Ergebnisse

Spirometrie: Das Atemminutenvolumen zeigte vor und 15 min nach Persantin keine Differenzen.

Auch die Atemtiefe und Atemfrequenz ließen keine auf Persantin zurückzuführende Beeinflussung erkennen (Tab. 1).

Tab. 1: Atemminutenvolumen, Atemtiefe und Atemfrequenz vor und 15 min nach Persantin.

		Atemminuten- volumen		Atem- tiefe cm ³	Atem- frequenz
		l	% des Soll		
vor 15 min nach	Persantin	10,1	+ 43,2	580	18,5
		9,9	+ 37,5	530	18,7
n		25	25	25	25

Die Kochsalzversuche zeigten gleiches Verhalten wie die Persantinversuche (Tab. 2).

Tab. 2: Atemminutenvolumen, Atemtiefe und Atemfrequenz vor und 15 min nach 2 cm³ physiologischer NaCl.

		Atemminuten- volumen		Atem- tiefe	Atem- fre- quenz
		l	% des Soll	cm ³	
vor	} 2 ccm physiol. NaCl	11,1	+60	539	20,4
15 min nach		10,5	+49	515	20,1
n		8	8	8	8

Auch die Vitalkapazität und das Residualvolumen (in % der Ist- und Soll-Totalkapazität) wurden weder durch Persantin noch durch NaCl-Lösung beeinflusst (Tab. 3).