

that of sodium heparin (150 U/mg) when it was injected i.v. 0.5–1 mg/kg body weight. The duration of the activity of heparin was somewhat shorter than that of CPS. No appreciable side effects of CPS were observed at the concentrations used here.

The serum lipid levels after the CPS injection at a dose of 30 mg/kg body weight were determined in 7 cases for triglyceride, total cholesterol and phospholipid by the same method as reported in a previous paper<sup>10</sup>. It is surprising to note that a striking suppression of triglyceride levels was demonstrated in the serum taken  $\frac{1}{2}$ , 1 and 3 h after CPS administration (Table). The suppression appears to be coincidental with the inhibitory effect of CPS on thrombus-formation. Only a slight reduction was observed in total cholesterol levels after injection when initial levels were lower than 310 mg/100 ml. However, when an initial value of total cholesterol was as high as 670 mg/100 ml, a considerable suppression occurred: ranging in value from 304 mg/100 ml to 573 mg/100 ml during 1–9 h after injection. Approximately 20% reduction was found in phospholipid during 1–9 h after injection when initial levels were 95 mg/100 ml to 125 mg/100 ml. In a case which showed 286 mg/100 ml of an initial phospholipid level, it was reduced in range of 138 mg/100 ml to 223 mg/100 ml after the treatment. No appreciable changes were shown in thrombus-formation and lipid levels after i.v. injections of an equivalent amount of physiological saline.

The duration of the effects of CPS was similar to those of the physiological properties reported previously<sup>6</sup>. The serum hexosamine and galactosamine levels, determined by the methods of Boas<sup>12</sup> and Cessi<sup>13</sup> respectively, reached their maximal levels immediately after injection and decreased to initial levels within 3 h.

The present results clearly demonstrate that CPS interferes with thrombus-formation in relation to reduction of serum lipid levels, triglyceride level in particular. Further studies indicated that the inhibitory effects of CPS are associated with the sulfate contents: less inhibition is noticed with lower sulfate amounts.

In connection with antilipemic and anti-atherogenic activities of CPS<sup>5</sup>, the present data would be correlated with our recent study that CPS inhibits lipid synthesis, particularly neutral fat synthesis, in cultured chick aortic cells<sup>14</sup>. These physiological activities of CPS should be of interest in our more recent findings that over-sulfated chondroitin sulfate (molar ratio of uronic acid to sulfur 1.00:2.04) exists in human aortic tissue<sup>4,15</sup>. Significance of the presence of the over-sulfated chondroitin sulfate in vascular tissue is not clear. However, these observations suggest that the over-sulfated chondroitin sulfate, which would possess an anti-thrombogenic property, may play important roles in atherogenesis<sup>16</sup>.

**Zusammenfassung.** Chondroitinpolysulfat führt nach i.v. Injektion bei Kaninchen kurzfristig zu Verlängerung der Thrombusbildungszeit und zu einer Verminderung des Thrombusgewichtes. Möglicherweise besteht eine Beziehung zwischen der Hemmung der Thrombusbildung und der reduzierenden Wirkung von Chondroitinpolysulfat auf Serum Triglyzerid.

K. MURATA, K. IZUKA and T. FURUHASHI

*Department of Physical Therapy and Medicine,  
Faculty of Medicine, University of Tokyo, and  
Seikagaku Kogyo Co., Kurihama, Yokosuka (Japan),  
30 January 1969.*

<sup>12</sup> N. F. BOAS, J. biol. Chem. 204, 553 (1953).

<sup>13</sup> C. CESCI and F. SERAFINI-CESCI, Biochem. J. 88, 132 (1963).

<sup>14</sup> K. MURATA and T. FURUHASHI, Biochim. biophys. Acta 176, 432 (1969).

<sup>15</sup> T. HARADA, K. MURATA, T. FUJIWARA and T. FURUHASHI, Biochim. biophys. Acta, in press.

<sup>16</sup> Acknowledgments. We are grateful to Prof. Y. OSHIMA for his interest and advice in this study. We are also indebted to Dr. T. OKUYAMA for supplying chondroitin polysulfate and to Miss K. OKUBO for skilful assistance.

## Über die Wirkung von Sr-Ionen auf den $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch am Meerschweinchenvorhof

REUTER und SEITZ<sup>1</sup> haben Veränderungen im  $^{45}\text{Ca}$ -Efflux von Meerschweinchenvorhöfen unter der Annahme einer Carrier-vermittelten Austauschdiffusion quantitativ beschrieben. Danach sollen Ca- und Na-Ionen um Bindungsstellen des hypothetischen Carriers an der Außenseite der Myokardzellmembran konkurrieren. Um den Austauschmechanismus weiter zu kennzeichnen, wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung extrazellulärer Sr-Ionen auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch am Vorhof des Meerschweinchengerzens untersucht.

**Methodik.** Die Versuche wurden an linken Meerschweinchenvorhöfen durchgeführt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in der Tabelle aufgeführt. Je nach Versuchsbedingungen enthielten die Lösungen zusätzlich 1,8 bzw. 7,2 mM/l  $\text{CaCl}_2$  und/oder äquimolare Mengen  $\text{SrCl}_2$ . Die Versuchstemperatur betrug 35 °C. Die Methodik der  $^{45}\text{Ca}$ -Abgabe-Experimente und der Aktivitätsmessung wurde bereits beschrieben<sup>1</sup>.

In den  $^{45}\text{Ca}$ -Aufnahme-Experimenten wurden die Vorhöfe in Tyrodelösung mit 1,8 mM/l  $\text{CaCl}_2$  30 min bei 35 °C äquilibriert. Eine Gruppe von Präparaten wurde in  $^{45}\text{Ca}$ -haltige,  $\text{Na}^+$ -freie Lösung eingebracht, die 1,8 oder 7,2 mM/l  $\text{CaCl}_2$  enthielt. Eine zweite Gruppe kam in  $^{45}\text{Ca}$ -haltige,  $\text{Na}^+$ -freie Lösung mit zusätzlich 1,8 oder 7,2 mM/l  $\text{SrCl}_2$ . Die spezifische Aktivität beider Lösungen war gleich. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden die Vorhöfe den aktiven Lösungen entnommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Angaben von REUTER und SEITZ<sup>1</sup>. Von der gesamten  $^{45}\text{Ca}$ -Aktivität der Präparate wurde der auf den Extrazellulärraum (30% des Feuchtgewichtes<sup>2</sup>) entfallende Anteil abgezogen.

<sup>1</sup> H. REUTER und N. SEITZ, J. Physiol. 195, 451 (1968).

<sup>2</sup> H. BAUER, H. LÜLLMANN und M. RICHTER, Pflügers Arch. ges. Physiol. 277, 48 (1963).

Lösung	NaCl	Saccharose	KCl	MgCl <sub>2</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaHCO <sub>3</sub>	Glukose	Tris-Puffer* (mit HCl auf pH 7,4 eingestellt)
Tyrode (I)	137	—	5,4	1,05	0,42	11,9	5	—
Na <sup>+</sup> -freie (II)	—	274	5,4	1,05	—	—	5	5

\* Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Begasung mit 95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> (Lösung I) bzw. 100% O<sub>2</sub> (Lösung II); Zusammensetzung der Lösungen (mM/l).

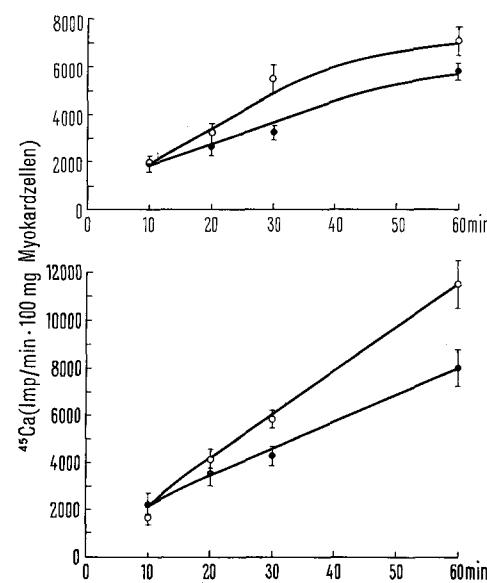
Alle statistischen Angaben erfolgen als Mittelwert  $\pm$  mittlerer Fehler des Mittelwertes; Signifikanzen wurden mit dem Student-(t)-Test geprüft.

**Ergebnisse.** Zu Beginn der Abgabeexperimente wurden die mit <sup>45</sup>Ca beladenen Vorhöfe 60 min in Ca<sup>2+</sup>-freier Tyrodelösung entladen. Die danach messbare <sup>45</sup>Ca-Abgabe ist auf den Ca<sup>2+</sup>-Austausch der Myokardzellen zu beziehen<sup>1,3</sup>. In der 2. Stunde des Experiments wurde die <sup>45</sup>Ca-Abgabe in Tyrodelösung mit 1,8 mM/l CaCl<sub>2</sub> verfolgt (Kontrollperiode). Anschliessend wurde der <sup>45</sup>Ca-Efflux der Vorhöfe 60 min in Ca<sup>2+</sup>-freier Tyrodelösung mit 1,8 mM/l SrCl<sub>2</sub> gemessen. In den letzten 60 min des Abgabevorversuches wurden die Vorhöfe wieder in Ca<sup>2+</sup>-freier Tyrodelösung entladen. Als relatives Mass für die Grösse des <sup>45</sup>Ca-Effluxes wurden die Geschwindigkeitskoeffizienten<sup>1</sup> der <sup>45</sup>Ca-Abgabe während der einzelnen Versuchsperioden errechnet. Im Vergleich zu dem Geschwindigkeitskoeffizienten der <sup>45</sup>Ca-Abgabe während der Kontrollperiode (gleich 1 gesetzt) fand sich bei 5 Versuchen nach 30 min in Ca<sup>2+</sup>-freier, Sr<sup>2+</sup>-haltiger Tyrodelösung ein Geschwindigkeitskoeffizient der <sup>45</sup>Ca-Abgabe von  $0,95 \pm 0,04$ .

In 5 weiteren Experimenten wurde der <sup>45</sup>Ca-Efflux in Tyrodelösung mit 7,2 mM/l CaCl<sub>2</sub> bzw. SrCl<sub>2</sub> untersucht. Diese Badflüssigkeiten wurden in der 2. bzw. 3. Stunde der Abgabeexperimente bei sonst unveränderten Versuchsbedingungen verwendet. In diesen Versuchen ergab sich für den <sup>45</sup>Ca-Efflux der Präparate im Tyrodelösung mit 7,2 mM/l SrCl<sub>2</sub> ein relativer Geschwindigkeitskoeffizient von  $1,09 \pm 0,14$ .

Die <sup>45</sup>Ca-Aufnahme-Experimente wurden in <sup>45</sup>Ca-haltiger, Na<sup>+</sup>-freier Lösung mit 1,8 mM/l oder 7,2 mM/l CaCl<sub>2</sub> mit und ohne Zusatz äquimolarer Mengen SrCl<sub>2</sub> durchgeführt. Eine Na<sup>+</sup>-freie Lösung wurde gewählt, um die Kompetition zwischen Na- und Ca-Ionen um Bindungsstellen der Myokardzelle<sup>1,4-6</sup> zu verhindern. Die Figur zeigt die Ergebnisse der Messungen. Blieben die Vorhöfe länger als 20 min in den aktiven Badflüssigkeiten, so war die <sup>45</sup>Ca-Aufnahme in Sr<sup>2+</sup>-haltigen Lösungen signifikant geringer ( $P < 0,025$ ) als in Sr<sup>2+</sup>-freien.

**Diskussion.** In Ca<sup>2+</sup>-haltiger Ringerlösung ist die Kontraktionshöhe des Froschventrikels von dem Quotienten der extrazellulären (Ca<sup>2+</sup>)/(Na<sup>+</sup>)<sup>2</sup> abhängig<sup>4,6</sup>, in Sr<sup>2+</sup>-haltiger Ringerlösung von dem Quotienten der extrazellulären (Sr<sup>2+</sup>)/(Na<sup>+</sup>)<sup>2</sup><sup>7</sup>. Die Austauschkinetik beider Ionen ist an diesem Präparat ähnlich<sup>5</sup>. Der Quotient der extrazellulären (Ca<sup>2+</sup>)/(Na<sup>+</sup>)<sup>2</sup> bestimmt auch den Ca<sup>2+</sup>-bzw. Na<sup>+</sup>-aktivierbaren Anteil des <sup>45</sup>Ca-Effluxes am Meerschweinchenvorhof<sup>1</sup>. Die vorliegenden Messungen zeigen, dass Ca-Ionen in der Aktivierung des <sup>45</sup>Ca-Effluxes der Myokardzellen durch Sr-Ionen ersetzt werden können. Liegt ein Carrier-vermittelter Ca<sup>2+</sup>-Austausch am Myokard vor, so ist eine Abnahme des <sup>45</sup>Ca-Influxes in Sr<sup>2+</sup>-haltigen Lösungen im Vergleich zur <sup>45</sup>Ca-Aufnahme in Sr<sup>2+</sup>-freien Lösungen mit gleichem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt zu vermuten. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Annahme.



<sup>45</sup>Ca-Aufnahme am Meerschweinchenvorhof in Na<sup>+</sup>-freien Lösungen. Ordinate: aufgenommenes <sup>45</sup>Ca in Imp/min · 100 mg Myokardzellen. Abszisse: Verweildauer der Präparate in den aktiven Lösungen in min. Untere Bildhälfte: ○, <sup>45</sup>Ca-Aufnahme in Lösung II mit 1,8 mM/l CaCl<sub>2</sub>; ●, in Lösung II mit 1,8 mM/l CaCl<sub>2</sub> und 1,8 mM/l SrCl<sub>2</sub>. Obere Bildhälfte: ○, <sup>45</sup>Ca-Aufnahme in Lösung II mit 7,2 mM/l CaCl<sub>2</sub>; ●, in Lösung II mit 7,2 mM/l CaCl<sub>2</sub> und 7,2 mM/l SrCl<sub>2</sub>.

**Summary.** When CaCl<sub>2</sub> in Tyrode solution was replaced by SrCl<sub>2</sub>, <sup>45</sup>Ca efflux from guinea-pig auricles did not change significantly. In Na-free solution, however, <sup>45</sup>Ca influx was reduced when, in addition to CaCl<sub>2</sub>, SrCl<sub>2</sub> was present in the solution, suggesting an equivalent replacement of Ca by Sr at membrane sites<sup>1</sup>.

H. G. GLITSCH

Pharmakologisches Institut der Universität,  
65 Mainz (Deutschland), 16. Dezember 1968.

<sup>3</sup> S. WINEGRAD und A. M. SHANES, J. gen. Physiol. 45, 371 (1962).

<sup>4</sup> W. WILBRANDT und H. KOLLER, Helv. physiol. Acta 6, 208 (1948).

<sup>5</sup> R. NIEDERGERKE und E. J. HARRIS, Nature 179, 1068 (1957).

<sup>6</sup> H. C. LÜTTGAU und R. NIEDERGERKE, J. Physiol. 143, 486 (1958).

<sup>7</sup> I. WEYNE und A. DE HEMPTINE, C. r. Soc. Biol. 161, 962 (1967).