

Ueber die Verdauung des Fibrins durch Trypsin.

Von

Dr. August Herrmann.

(Aus dem med.-chem. Laboratorium der deutschen Universität in Prag.)
(Der Redaction zugegangen am 20. Juni 1887.)

Im Anschlusse an seine Untersuchung über erste Produkte der Magenverdauung hat Hasebroek¹⁾ beobachtet, dass bei der Einwirkung von Trypsin auf frisches Fibrin — dagegen nicht auf gekochtes — ebenso wie bei der Einwirkung von Pepsin und Salzsäure, zwei Eiweisskörper in Lösung gehen, von welchen der eine bei 52—54°, der andere bei 72—75° coagulirt. Von diesen beiden Substanzen hatte bereits Otto²⁾ die eine, das Paraglobulin, mit aller Sicherheit nachgewiesen, während das zweite bei 52—54° coagulirende Produkt seiner Beobachtung entgangen war.

Auch ich habe mich mit dieser Frage beschäftigt und die Untersuchung, so wie sie hier vorliegt, zum Abschluss gebracht gehabt, bevor mir die Ergebnisse Hasebroek's bekannt waren. Meine Beobachtungen knüpfen zunächst an die Untersuchung Otto's an. Es war auffällig, dass das Fibrin bei der Trypsinverdauung, während es doch sicher aus Fibrinogen gebildet wird, Paraglobulin liefern sollte. Darin schien ein Widerspruch zu liegen, zu dessen Aufklärung ich auf Veranlassung des Herrn Professor Huppert und unter seiner Leitung diese Untersuchung vorgenommen

1) Hasebroek, diese Zeitschrift, Bd. 11, S. 359. 1887.

2) Otto, diese Zeitschrift, Bd. 8, S. 129. 1883.

habe. Es wurde dabei Fibrin der Trypsinverdauung unterworfen und die ersten Verdauungsprodukte untersucht.

Die zu den Versuchen dienende Trypsinlösung wurde in folgender Weise gewonnen. Von anhaftendem Gewebe befreite Bauchspeicheldrüsen vom Schafe wurden fein zerhackt und nur mit so viel syrupdickem Glycerin übergossen, dass der Gewebsbrei vom Glycerin völlig durchtränkt war. Bei längerem Stehen in Zimmertemperatur löste sich ein grosser Theil der Drüse, ungefähr die Hälfte, und das Filtrat übte dann schon in kleiner Menge eine so bedeutende verdauende Wirkung aus, dass ich dasselbe direkt zu den Verdauungsversuchen verwenden konnte, ohne eine wesentliche Verunreinigung der Verdauungsprodukte fürchten zu müssen.

In einem vorbereitenden Versuch wurde zunächst geprüft, welches von den gewöhnlichen antiseptischen Mitteln am besten geeignet sei, die bei der Pancreasverdauung so häufig auftretende Fäulniss zu verhüten. Vom Thymol, Chloral und Aether in Concentrationen, welche dem gesuchten Ziele entsprachen, erwies sich der Zusatz von Aether als am zweckdienlichsten, da dabei sowohl jede Entwicklung von Bacterien im Verdauungsprodukte, jeder Fäulnissgeruch ausblieb, als auch die Verdauung respektive die Lösung des Fibrins am raschesten vor sich ging.

I. Die definitive Versuchsanordnung war folgende: Eine grössere Menge frischen durch Waschen mit Wasser vom Blut befreiten Fibrins wurde in kleinere Stückchen zerrissen und in eine Flasche gefüllt; hierauf wurde destillirtes Wasser in die Flasche nachgegossen, so hoch, dass gerade das Fibrin vom Wasser bedeckt war, der etwa zwei Liter betragenden Masse einige Kubikcentimeter der Trypsinlösung und etwas Aether hinzugesetzt, so dass das Ganze deutlich nach Aether roch. Die Flasche wurde dann auf Körpertemperatur erwärmt. Nach 24 Stunden war das Fibrin bis auf einen sehr kleinen Rest gelöst, die von diesem Rest abfiltrirte Flüssigkeit zeigte sich vollkommen klar, von gelber Farbe und roch nach Aether. Das gesammte Filtrat wurde bei 40° mit Magnesiumsulphat gesättigt, was nach ungefähr 24 Stunden der Fall war. In der Flasche war während dieser Zeit ein dichter, flockiger Niederschlag entstanden, welcher abfiltrirt sich auf Zusatz von Wasser leicht zu einer klaren schwach gelben Flüssigkeit löste. Diese Lösung wurde nun zunächst auf ihren Coagulationspunkt geprüft.

Bei 51,8° (normal) Beginn einer Trübung, welche bis 54—55° zunimmt und bei dieser Temperatur deutlich flockig wird, die zwischen den Flocken befindliche Flüssigkeit erscheint wasserklar. Der Niederschlag wird abfiltrirt und das von der coagulirten Eiweisssubstanz befreite Filtrat abermals erhitzt. Bei 61,2° leichte Opalescenz, welche beim Erhitzen bis auf 70° sich nicht ändert, bei dieser Temperatur erscheint neuerlich stärkere Trübung, die bei weiterem Erhitzen bis 75° stetig zunimmt, dann ihren Höhepunkt erreicht; es entstehen deutliche kleine Flöckchen. Diese zweite Trübung zwischen 70° und 75° erscheint nach oberflächlicher Schätzung viel geringer als die zwischen 51° und 55°. Ueber 75° ist eine weitere Coagulation, auch beim Erhitzen bis zum Kochen nicht mehr nachzuweisen, die nach dem Erhitzen bis zu 75° abfiltrirte Flüssigkeit bleibt dabei klar, gibt jedoch starke Biuretreaktion

Der zweite und dritte Versuch, in ganz gleicher Weise angestellt, ergab ganz gleiche Resultate, ausgenommen kleine Differenzen in der Coagulationstemperatur, welche jedoch einen Grad nie überschritten.

Die durch die Lösung des Magnesiumsulphat-Niederschlages erhaltene Flüssigkeit wurde nun so lange dialysirt, bis Chlorbaryum die in den Pergamentschläuchen enthaltene Flüssigkeit nicht mehr trübte. Dabei schied sich die früher in Lösung befindliche Eiweisssubstanz vollkommen aus, im Filtrate entstand durch Kochen kein Niederschlag mehr.

Somit hatte sich also ergeben, dass bei der Trypsinverdauung des Fibrins ausser dem von Otto nachgewiesenen Paraglobulin noch eine zweite Substanz entsteht, welche nach ihrer Fällbarkeit durch Magnesiumsulphat, ihrer Löslichkeit in Neutralsalzlösung, ihrer Unlöslichkeit in reinem Wasser und nach ihrem Verhalten beim Erhitzen gleichfalls den Globulinen beigezählt werden könnte. Dieser zweite globulinartige Körper hat überdem denselben Coagulationspunkt wie das Fibrinogen und das Myosin. Soweit stimmen meine Beobachtungen mit denen von Hasebroek überein.

Es fragt sich nun, welche Bedeutung man den beiden Verdauungsprodukten des Fibrins beilegen soll. Entstehen sie in gleicher Weise aus dem Fibrin und sind sie somit gleichartige Verdauungsprodukte? Von Belang war in dieser Hinsicht die Angabe von Plósz¹⁾, dass das rohe Fibrin ausser dem eigentlichen Fibrin immer noch einen Eiweisskörper enthält, der in Salzlösungen, Säuren und Alkalien leicht löslich ist, aus der Salzlösung durch viel Wasser und Kohlensäure gefällt wird und demnach von Plósz als durch das Fibrin mitgerissenes Paraglobulin betrachtet wird. Auch Kistiakowsky²⁾ konnte aus dem rohen Fibrin durch Salzwasser Globulin auswaschen.

II. Zur Trennung dieses Globulins wurde frisches Fibrin, in gleicher Weise wie früher von Hämoglobin befreit, mit 5procentiger thymolisirter Kochsalzlösung einen Tag stehen gelassen und das Filtrat mit Salz gesättigt, wobei ein mässig starker Niederschlag entstand, welcher auf einem Filter gesammelt wurde. Der Niederschlag löste sich in 5procentiger Kochsalzlösung und coagulirte zwischen 70° und 76° vollständig. Eine bei niedrerer Temperatur gerinnende Substanz wurde dabei nicht wahrgenommen. Es war also nur ein einziges Globulin in Lösung gegangen und dieses besass den Coagulationspunkt des Paraglobulins.

Bei der bisher erfolgten Versuchsanordnung wurde also nicht reines Fibrin, sondern mit Serumglobulin verunreinigtes der Verdauung unterworfen.

III. Demgemäss wurden jetzt die Verdauungsversuche mit Fibrin angestellt, welches durch Extraction mit Kochsalzlösung gereinigt worden war.

Die dazu verwendete Salzlösung war 5procentig und stark thymolisirt. Schneller als bei blossem Einweichen des Fibrins in der Salzlösung ging die Entfernung des Serumglobulins von Statten, wenn das Fibrin in einem Beutel eingeschlossen in immer erneuerter Salzlösung gut durchgeknetet wurde. Das Reinigen wurde so lange fortgesetzt, bis

1) Plósz, Pflüger's Archiv, Bd. 7, S. 382. 1873.

2) Kistiakowsky, daselbst, Bd. 9, S. 442. 1874.

in dem Salzwasser kaum noch coagulable Substanz nachweisbar war. Das Fibrin ganz von solchen zu befreien, ist mir nicht gelungen. Ich habe es versucht, indem ich Fibrin lange in häufig gewechselter, stark thymolisirter Salzlösung liegen liess, aber dabei bemerkt, dass nach 8—14 Tagen, wenn das Waschwasser bereits nur noch mit Phosphorwolframsäure nachweisbare Spuren von Globulin enthielt, trotz der Gegenwart von viel Thymol plötzlich neuerlich grosse Mengen einer Eiweiss-substanz auftraten, welche letztere zum Unterschiede von der bei 75° coagulirenden schon bei 55° vollkommen coagulierte.

Das so von Serumglobulin befreite Fibrin wurde zur Entfernung der grössten Menge des Kochsalzes schnell noch mehrmals mit Wasser gewaschen und ausgepresst. Es zeigte, abgesehen von einer geringen Elasticitätsabnahme, keine Veränderung und war vollkommen geruchlos. Auch verdaute es sich ebenso leicht, wie das rohe Fibrin.

Im ersten derartigen Versuch war das Ganze schon nach 14 Stunden bis auf einen kleinen Rest gelöst. Es wurde vom Rückstand abfiltrirt, diesmal mit Kochsalz gesättigt, die sehr reichliche Kochsalzfällung in Wasser gelöst und die Lösung auf ihren Gerinnungspunkt geprüft. Bei 51° entstand eine dichte Trübung, welche bei 56° ihr Maximum erreichte und welche so dicht war, dass das in das Reagensglas, in welchem die Coagulation vorgenommen wurde, eingetauchte Thermometer von dem coagulirten Eiweiss eingehüllt erschien. Die von dem Niederschlag abfiltrirte Flüssigkeit zeigte weiterhin erhitzt bei 61° eine sehr schwache Trübung, welche dann bei 75° noch um ein sehr Geringes vermehrt wurde. Dieser Versuch wurde nun mehrmals mit ganz demselben Resultate wiederholt. Das Hauptprodukt der Verdauung war immer eine bei 55—56° coagulirende Substanz, während das Paraglobulin an Menge sehr zurücktrat, um so mehr, je besser das Fibrin vor der Verdauung mit Salzwasser ausgewaschen worden war.

Es war somit der Beweis erbracht, dass sich unter den Verdauungsprodukten des Fibrins die bei 75° coagulirende Substanz nur bei Verunreinigung des Fibrins mit Paraglobulin nachweisen lässt, bei vorhergegangener Reinigung des Fibrins dagegen kaum oder nur in sehr geringer Menge aufzufinden

ist. Die von diesen Ergebnissen abweichenden, bei der Verdauung von rohem Fibrin gewonnenen Resultate Otto's, das Vorkommen einer bei 55° coagulirenden Globulinsubstanz, welche von Otto nicht erwähnt wird, mussten in der veränderten Versuchsanordnung gelegen sein.

IV. Ich dachte zunächst daran, dass möglicher Weise, da Otto die Verdauung des Fibrins bei Zimmertemperatur vor sich gehen liess, bei der daraus nothwendig resultirenden längeren Verdauungszeit der bei 55° coagulirende Körper durch Peptonisirung verschwunden sei, das Paraglobulin dagegen sich, den Angaben Kühne's entsprechend, resistenter gezeigt habe; doch ergab ein Versuch, in welchem rohes Fibrin bei Zimmertemperatur unter Aetherzusatz mehrere Monate hindurch der Trypsinverdauung ausgesetzt worden war, dass die bei 55° coagulirende Eiweisssubstanz in der Lösung des mit Salz gefällten Niederschlages noch immer in grosser Menge vorhanden war.

V. Ein weiterer Versuch gab aber darüber Aufschluss, in welcher Weise die zweite Substanz in den Versuchen von Otto verloren gegangen war. Eine grössere Menge rohes Fibrin wurde in der oben angeführten Weise der Verdauung unterworfen bis zur Lösung, das Filtrat genau nach Otto mit Magnesiumsulphat gefällt und der Niederschlag in wenig Wasser gelöst. Ich überzeugte mich durch einen Coagulationsversuch, dass in der Lösung noch beide Globuline enthalten waren. Als ich nun zur Gewinnung des Globulins genau nach Otto die Lösung mit Wasser etwa bis auf das 20fache verdünnte und durch die Flüssigkeit längere Zeit Kohlensäure streichen liess, zeigte es sich, dass der entstandene Niederschlag dem Coagulationspunkte nach nur aus Serumglobulin bestand, während in der vom Niederschlage abfiltrirten Flüssigkeit fast ausschliesslich bei 55° coagulirende Eiweisssubstanz enthalten war. Otto hat aber nur den durch Kohlensäure ausgefällten Körper weiter untersucht, die übrigbleibende Flüssigkeit mit dem zweiten Globulin dagegen nicht weiter berücksichtigt.

VI. Meine Bemühungen waren nun weiter darauf gerichtet, das zweite, neben dem Paraglobulin auftretende Verdauungsprodukt näher zu charakterisiren.

Zu den oben (Seite 510) bereits angeführten Eigenschaften füge ich noch hinzu, dass die Substanz nicht bloss durch Sättigung ihrer Lösung mit Magnesiumsulphat, sondern auch mit Kochsalz vollständig gefällt wird, falls man der Flüssigkeit nur genügend Zeit zum Sättigen lässt. Auch durch Sättigen ihrer Lösung mit Ammonsulphat zur Hälfte fiel sie vollständig aus. Die Salzniederschläge lösten sich, von der Mutterlauge abfiltrirt, meist leicht wieder auf blossen Zusatz von Wasser, aber dann nicht vollständig oder auch gar nicht mehr, wenn das Sättigen mit Salz, das bei 40° vorgenommen wurde, lang gedauert hatte. In reinem Wasser war der Körper vollständig unlöslich. Dass er bei der Verdauung auch von rohem Fibrin in Lösung geht, hat seinen Grund in dem dem Fibrin noch beigemengten Salz.

Ich habe einmal viel Fibrin durch sehr kleine Mengen Trypsinlösung zu verdauen versucht und dabei die Verdauungsflüssigkeit mit den in ihr enthaltenen Produkten wiederholt ganz abfiltrirt und durch neue ersetzt. Dabei ergab sich, dass die späteren Flüssigkeiten fast gar keine coagulable Substanzen enthielten, dass aber sofort solche reichlich in Lösung ging, als etwas Kochsalz hinzugefügt wurde.

Ich muss hier bemerken, dass in den übrigen Versuchen, in welchen das Fibrin ganz verdaut zu sein schien, zwar auch immer ein Rest Substanz übrig blieb, dieser bestand aber den Reaktionen nach nur aus Nuclein.

Die aufgezählten Eigenschaften allein berechtigen nun keineswegs dazu, das zweite Verdauungsprodukt als Globulin aufzufassen, wiewohl ich es, den Beweis vorausnehmend, schon als solches bezeichnet habe. Denn dieselben Eigenschaften kommen auch, mit Ausnahme des Coagulationspunktes, der Heteroalbumose des Fibrins zu.

Wie die folgenden Thatsachen zeigen, ist die Substanz jedoch wirklich ein Globulin.

Darauf weist zunächst eine Beobachtung hin, welche ich beiläufig gemacht habe, wenn sie auch für sich allein nicht eindeutig ist. In

einem Verdauungsversuch nämlich, wo ich der Flüssigkeit 1% kohlen-saures Natron zugesetzt hatte, erhielt ich einen sehr reichlichen Neutralisationsniederschlag, der jedoch in Salzwasser völlig unlöslich war. Statt des erwarteten Globulins war ein Protein entstanden.

Von der Globulinnatur des Produktes habe ich mich direkt dadurch überzeugt, dass es gelang, dasselbe durch Säuren direkt in Protein überzuführen. Eine Lösung des Produktes in 5procentiger Kochsalzlösung wurde mit etwas Salzsäure versetzt, wodurch ein reichlicher Niederschlag entstand. Nach einiger Zeit wurde dieser abfiltrirt und abgepresst, dann in Wasser vertheilt, wobei der Niederschlag wieder in Lösung ging. Die Lösung reagirte sauer; sie wurde neutralisirt und dabei ein Niederschlag erhalten, der sich in Salzwasser als unlöslich erwies. Das Globulin war durch Behandlung mit Salzsäure in Acidalbumin verwandelt worden.

Eine in Salzwasser gelöste Portion des Verdauungsproduktes wurde durch Erhitzen auf 60° coagulirt, der Niederschlag ausgewaschen, in 1procentige Natriumcarbonatlösung gebracht und im Wasserbad digerirt. Der Niederschlag löste sich dabei langsam. Beim Neutralisiren der Lösung entstand ein Niederschlag, welcher in Salzwasser ganz unlöslich war. Der coagulirte Körper war bei der Behandlung mit kohlen-saurem Natrium wieder als Protein in Lösung gegangen, hatte sich also abermals wie ein Globulin verhalten.

Wäre die fragliche Substanz Heteroalbumose gewesen, so hätte sie nach der Behandlung mit Salzsäure sowohl als nach der Coagulation und dem Lösen in kohlen-saurem Natrium mit den ursprünglichen Eigenschaften wieder erhalten werden müssen. Das war jedoch nicht der Fall, sie ist also ohne Zweifel ein Globulin.

Wenn unter den Verdauungsprodukten Albumosen zugegen gewesen wären, so hätte von diesen die Heteroalbumose und ein Theil der Protalbumose beim Sättigen mit Salz zugleich mit den Globulinen gefällt werden müssen. Wurden diese Niederschläge in Wasser gelöst und der fractionirten

Coagulation unterworfen, so trat allerdings auch bei 61° immer eine Trübung ein, aber nur in Spuren. Es dürften also kleine Mengen dieser Albumosen zugegen gewesen sein. Doch war das Globulin nicht das einzige entferntere Verdauungsprodukt, denn das Filtrat vom Salzniederschlag gab immer eine starke Biuretreaktion.

Weiter handelte es sich darum, zu ermitteln, ob das in Rede stehende Globulin mit einem der beiden bekannten bei 55° coagulirenden Globuline, dem Fibrinogen und dem Myosin, identisch oder ein Körper eigener Art sei. Zu diesem Zwecke habe ich versucht, die spezifische Drehung einerseits des Verdauungsproduktes, andererseits des Fibrinogens zu ermitteln. Ich muss jedoch gleich bemerken, dass ich in dieser Hinsicht noch nicht zu entscheidenden Resultaten gelangt bin. Trotz ihrer Unvollkommenheit theile ich meine Versuche dennoch mit, weil die gefundenen spezifischen Drehungen, auch wenn sie nicht identisch sind, doch nicht so weit von einander abweichen, dass man beide Substanzen mit Bestimmtheit als verschieden erklären kann. Die von mir gemachten Erfahrungen dürften zudem lehren, wie die Schwierigkeiten, welche sich darboten, bei einer Wiederholung der Versuche überwunden werden können.

Ich versuchte zunächst, die bei 55° coagulirende Substanz durch wiederholtes Fällen durch Sättigen mit Salz bei 40° und Lösen von der bei 75° coagulirenden zu trennen. Doch scheiterte dieser Versuch an zweierlei. Geschah die Sättigung vollständig, so fielen beide Substanzen, die bei 55° und die bei 75° coagulirende, zusammen aus; zudem geschah es bei dem Versuche mehrmals, dass, wenn die Sättigung mit Salz lange Zeit in Anspruch nahm, der Niederschlag seine Löslichkeit verlor. Wurde andererseits mit Salz nicht vollkommen gesättigt, so war nach wiederholter derartiger Fällung die Ausbeute an Substanz für weitere Untersuchungen zu gering.

Ich machte daher den Versuch, die spezifische Drehung der bei 55° coagulirenden Substanz durch Differenz zu er-

mitteln, indem ich zuerst die Drehung der beide Substanzen enthaltenden Lösung und ihren Gehalt an organischer Substanz bestimmte, dann die Lösung bis 60° erhitze, den Coagulationsniederschlag abfiltrirte und nun mit dem Filtrate die Bestimmung der Drehung und seines Gehaltes an organischer Substanz wiederholte. Aus der Differenz der beiden beobachteten Drehungen einerseits und der dieser entsprechenden Differenz im Gehalt an organischer Substanz musste sich die spezifische Drehung des durch Coagulation ausgefallten Eiweisses berechnen lassen.

Die Globuline waren dazu mittelst Kochsalz dargestellt und in Kochsalzwasser gelöst worden. Die Lösung wurde in ein Kölbchen gefüllt und diese sammt Inhalt auf einer empfindlichen Waage gewogen, damit man durch abermaliges Wägen nach der vollzogenen Coagulation den Verlust an verdunstetem Wasser bestimmen und ihn wieder ersetzen konnte. Doch betrug die Gewichtsabnahme des erkalteten Kölbchens immer nur einige Centigramme, was vernachlässigt wurde. Das Kölbchen wurde in ein grösseres Gefäss mit Wasser getaucht, so dass sich der Flüssigkeitsspiegel der Lösung unter dem des Wassers befand, das Wasser auf 60° angeheizt und $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ Stunde bei dieser Temperatur erhalten. Es war dabei eine schön flockige Gerinnung aufgetreten. Damit beim Filtriren keine Verdunstung stattfand, wurde ein Trichter mit einem durchbohrten Kork gut in ein Kölbchen gepasst, ein Faltenfilter in den Trichter gelegt und der Trichter mit einer Glasplatte bedeckt. Das Filter war selbstverständlich trocken, das so erhaltene Filtrat war wasserklar.

Die Drehung der ursprünglichen gleichfalls ganz klaren Lösung sowie des Filtrats wurde mit einem sehr empfindlichen Halbschattenapparat, System Lippich, von Rothe in Prag, bestimmt. Von jeder der beiden Flüssigkeiten wurden zwei Proben zumeist in weiten Trockengläschen eingedampft und die Rückstände bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Asche wurde in einer gesonderten Portion in der Weise bestimmt, dass der Trockenrückstand im Platintiegel langsam bei gelinder Hitze verkohlt, die ausgelaugte Kohle verascht, der wässrige Auszug der Kohle in demselben Tiegel verdunstet und der Rückstand durch vorsichtiges Erhitzen getrocknet wurde. Von einem Präparat reichte das Filtrat nach der Coagulation nicht für eine gesonderte Aschenbestimmung; es wurde daher im Platintiegel getrocknet, der Rückstand gewogen und zur Aschenbestimmung verwendet.

Auf diese Weise ist die spezifische Drehung mit zwei verschiedenen Präparaten bestimmt worden. Es ergab sich hierbei Folgendes:

Präparat I.

a) Vor der Coagulation $\alpha_D = -0,702^\circ$.

In 25 cbcm. 1,6967 und 1,7040 gr., im Mittel 1,70035 gr. Trockensubstanz, demnach in 100 cbcm. 6,8014

In 20 cbcm. 1,0166 und 1,0171 gr., im Mittel 1,0107 gr.

Asche, demnach in 100 cbcm. 5,0535

Organisches in 100 cbcm. 1,7479

b) Nach der Coagulation $\alpha_D = -0,5015^\circ$.

In 16 cbcm. 1,0111 u. 1,0116 gr., im Mittel 1,01135 gr. Trockensubstanz

In 16 cbcm. 0,8178 u. 0,8176 gr., im Mittel 0,8177 gr. Asche

Demnach in 16 cbcm. 0,19365 gr. Organisches

In 100 cbcm. 1,2103

Das Filtrat hat in 100 cbcm. 5,1106 gr. Asche ergeben, also mehr wie die ursprüngliche Lösung, wohl deshalb, weil durch ein Filter aus gewöhnlichem Papier filtriert wurde.

Die Differenz im Gehalt an organischer Substanz beträgt 0,5376 gr. in 100 cbcm. und dies entspricht einer Drehung von

$$\alpha_D = -(0,702 - 0,5015) = -0,2005^\circ,$$

woraus sich berechnet $[\alpha]_D = -37,30$.

Präparat II.

Bei diesem wurde in gleichen Volumen vor und nach der Coagulation gleich viel Asche gefunden. Es braucht bei der Berechnung der spezifischen Drehung also nur der Gehalt an Trockensubstanz berücksichtigt zu werden. Es ergab sich:

a) Vor der Coagulation $\alpha_D = -0,4115^\circ$.

In 25 cbcm. 1,0758 und 1,0772 gr., Mittel 1,0765 gr. Trockensubstanz, demnach in 100 cbcm. 4,3060

b) Nach der Coagulation $\alpha_D = -0,175^\circ$.

In 25 cbcm. 0,9148 und 0,9159 gr., Mittel 0,91535 gr.

Trockensubstanz, demnach in 100 cbcm. 3,6614

Differenz 0,6446

Diesen 0,6446 gr. bei der Coagulation gefällter Substanz in 100 cbcm. entspricht eine Drehung von

$$\alpha_D = -(0,4115 - 0,175) = -0,2365^\circ,$$

woraus sich ergibt $[\alpha]_D = -36,39^\circ$.

In diesen Versuchen wurde also für das fragliche Globulin $[\alpha]_D = -37,3$ und $-36,7^\circ$, im Mittel $-37,0^\circ$ gefunden.

Das Fibrinogen habe ich genau nach der Vorschrift von Hammarsten¹⁾ dargestellt. Die von mir erhaltenen Lösungen waren auch nicht ganz rein, sondern enthielten noch etwas bei 75° coagulirende Substanz. Wiewohl ich immer 20—30 Liter Pferdeblut in Arbeit genommen hatte, war die Ausbeute doch so gering, dass ich eine weitere Reinigung, die ja mit grossen Verlusten verbunden ist, nicht vornehmen konnte. Ich beabsichtigte daher, die Drehungsbestimmung gleichfalls durch Differenz vorzunehmen, wobei ich um so weniger Bedenken trug, als die Methode dann dieselbe gewesen wäre, wie die auf das Verdauungsprodukt angewandte. Ich musste jedoch auf dieses Vorhaben Verzicht leisten, weil die Lösungen milchig coagulirten und nach dem Erhitzen auf 60° ein trübes Filtrat lieferten; alle Bemühungen, eine gute Coagulation und ein klares Filtrat zu erhalten, schlugen fehl.

In einer dritten Fibrinogenlösung, die zwar trüb war, wie die Fibrinogenlösungen immer, schied sich das Eiweiss beim Erhitzen gut in Flocken aus. Aber auch sie war nicht ganz rein, sondern erhielt noch ungefähr 0,1 des Fibrinogens an bei 75° gerinnender Substanz, wie nach der Stärke der Trübungen beim Erhitzen geschätzt wurde. Für eine Differenzbestimmung reichte die Flüssigkeit nicht aus. Gleichwohl habe ich den Versuch einer Drehungsbestimmung gemacht, und wenn auch diese nicht ganz glatt abgelaufen ist, so hat sie doch ein einigermaßen verwerthbares Resultat geliefert.

Die trübe Fibrinogenlösung liess sich durch Filtriren durch Thierkohle vollkommen klären, aber nur auf kurze Zeit. Sie trübte sich immer bald wieder. Ich habe also das Filtrat sofort nach seiner Gewinnung zur Polarisation verwendet und dann weiter verarbeitet. Die Lösung enthielt von Salzen nur Chlornatrium. Es wurden wieder zwei Bestimmungen der Trockensubstanz und des Salzes ausgeführt; ich führe hier aber nur die Mittelzahlen an, weil ich bei beiden Bestimmungen einen Verlust an Salz erlitt.

¹⁾ Hammarsten. Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. Upsala 1875. S. 33; Pflüger's Archiv. Bd. 19, S. 564. 1879.

Es ergab sich $2 \alpha_D = - 0,2914^\circ$. In 100 cbcm. waren im Mittel enthalten 1,9209 gr. feste Substanz und 1,5945 gr. Salz. Aus diesen Daten berechnet sich $[\alpha]_D = - 44,64^\circ$.

Da sich die Menge der organischen Substanz ergibt durch Subtraction des Salzes von der Trockensubstanz und Salz zu wenig gefunden wurde, so stellt sich die Menge der organischen Substanz als zu gross und demnach die specifische Drehung als zu klein heraus. Die Zahl für die specifische Drehung wäre noch zu corrigiren nach der Menge fremder Substanz, welche dem Fibrinogen beigemengt war. Diese konnte Serumalbumin oder Serumglobulin sein. Nimmt man die Beimengung zu 0,1 des Fibrinogens an, wie oben angegeben, und ferner, dass sie Albumin gewesen sei, so würde sich die specifische Drehung um ungefähr $- 1,5^\circ$ erniedrigen, wäre sie Paraglobulin gewesen, um eine etwas geringere Grösse.

Man kann also nur sagen, dass die specifische Drehung des Fibrinogens über 43° , in der Nähe der specifischen Drehung des Paraglobulins gelegen ist, während sich die Drehungsconstante für das Verdauungsprodukt zu $- 37^\circ$ ergeben hat. Der Unterschied ist nicht bedeutend und könnte nur bei einer ganz tadellosen Bestimmung in der Frage nach der Identität beider Substanzen einen Ausschlag geben. Dazu kommt noch, dass sich diese Zahlen nicht ohne Weiteres vergleichen lassen. Die Coagulation des Verdauungsproduktes ist bei 60° vorgenommen worden; bei dieser Temperatur spaltet sich aber nach Hammarsten¹⁾ von dem Fibrinogen ein anderes Globulin ab, welches in Lösung bleibt und das möglicherweise die Drehung der vom Coagulum abfiltrirten Flüssigkeit so ändert, dass man die specifische Drehung des coagulirten Antheiles nicht durch Differenz bestimmen kann.

Ausserdem habe ich noch untersucht, ob sich das Verdauungsprodukt durch Fibrinferment zur Gerinnung bringen

¹⁾ Hammarsten, Pflüger's Archiv, Bd. 22, S. 418. 1880.

liesse, aber immer vergeblich. Auf dieses negative Ergebniss lässt sich jedoch kein Gewicht legen, da das Fibrinogen selbst, wenn es solchen Procedures unterworfen wird, wie es bei dem Verdauungsprodukte der Fall war, nach Hammarsten seine Gerinnungsfähigkeit einbüsst.

VII. Ich füge noch hinzu, dass gekochtes Fibrin bei der Einwirkung von Trypsin die Globuline nicht geliefert hat.

Weiter habe ich noch einige andere Eiweisskörper der Trypsinverdauung unterworfen und im Produkte nach Globulinen gesucht. Reines Serumalbumin lieferte dabei, mochte es in löslicher Form oder coagulirt zu dem Versuch verwendet werden, kein durch Salz fällbares Produkt, reines Casein gab einen mässigen Niederschlag, der aber nur aus Hetero- und Protalbumose bestand. Mit reinem Serumalbumin und mit krystallisirtem Phytovitellin ist Neumeister¹⁾ zu in dieser Hinsicht gleichfalls negativen Resultaten gelangt. Ebenso ist es Hasebroek bei der Pepsinverdauung anderer Eiweisskörper als dem frischen Fibrin ergangen.

Neumeister hat ausserdem beobachtet, dass von reinem Fibrin, welches mit einer 0,2 procentigen Sodalösung 24 Stunden lang auf 40° erwärmt wird, nicht unbedeutende Mengen einer globulinartigen Substanz in Lösung gehen und ferner, dass sich Globulin fast immer wieder in der Flüssigkeit nachweisen lässt, wenn man frisches oder gekochtes Fibrin unter Thymolzusatz mit einer Lösung von 5% Chlor-natrium und 0,4% Soda bei 40° digerirt. Auf Grund dieser Löslichkeitsverhältnisse des Fibrins und weil andere Eiweisskörper bei der Verdauung nicht auch Globulin liefern, erklärt Neumeister die Ansicht, dass das Globulin bereits ein spezifisches Produkt der tryptischen Einwirkung sei, für un-haltbar. Dieser Schluss scheint jedoch nicht voll gerechtfertigt zu sein; denn in seinen Versuchen handelt es sich ja nicht bloss um eine einfache Auflösung in Neutralsalz, sondern auch um die Mitwirkung des Natriumcarbonats.

1) Neumeister, Zeitschr. f. Biologie, Bd. 23, S. 339. 1887.

Viel eher könnte man sagen, dass das Auftreten von Globulin bei der Behandlung von reinem Fibrin mit Kochsalz allein gegen die fermentative Globulinbildung bei der Verdauung spräche; dann müsste freilich diese Kochsalzwirkung auch wirklich nur ein einfacher Lösungsprozess sein. Allein, wie die Umstände ergeben, unter denen dabei das Globulin in Lösung geht, ist diese Voraussetzung doch wohl nicht zulässig.

So berichtet Plósz¹⁾, dass sich das Fibrin bei der Digestion mit Salzlösung bei 30—40° zum grossen Theile löst, mehr oder minder ganz und schnell, während bei der raschen Extraction von rohem Fibrin mit immer neuen Portionen Salzlösung in der Kälte nur das Paraglobulin in Lösung geht, das Fibrin selbst aber zurückbleibt. Dieses verschiedene Verhalten des Fibrins versucht Plósz durch die Annahme zu erklären, dass das Fibrin einen in Salzwasser löslichen, fibrinlösenden Körper enthalte, welcher bei der Digestion des Fibrins mit ein und derselben Salzlösung zur Wirkung komme, bei der Extraction aber schnell entfernt werde. Plósz hegt die Vermuthung, dass es sich dabei um ein Ferment und zwar um Trypsin handle. Hammarsten²⁾ versucht eine andere Erklärung dieser auch von ihm wahrgenommenen Erscheinung. Er ist der Meinung, dass sich das dem Fibrin stets reichlich beigemengte Lecithin bei der Digestion unter Bildung von Neurin zersetzt und dieses das Fibrin löst. Von Belang für einen Erklärungsversuch scheint mir aber die von mir gemachte, bereits oben (S. 512) angeführte Beobachtung zu sein, dass die Lösung des eigentlichen Fibrins erst beginnt, wenn das Paraglobulin bei Zimmertemperatur bereits zum grössten Theile ausgewaschen ist. Unter diesen Umständen kann man doch nicht wohl eine Zersetzung des dem Paraglobulin beigemengten Lecithins als Ursache annehmen. Man gewinnt vielmehr den Eindruck, dass ein fermentativ wirkender Körper hinzugekommen ist.

1) Plósz, a. a. O., S. 383.

2) Hammarsten, Pflüger's Archiv, Bd. 30, S. 451. 1883.

Auch noch eine andere Thatsache weist auf die Theiligung eines Fermentes bei der scheinbar einfachen Lösung des Fibrins durch Salzlösung hin, das ist das von Gautier¹⁾ beobachtete Auftreten eines bei 61° coagulirenden, von Gautier als Albumin bezeichneten Körpers. Auch ich habe Aehnliches beobachtet. Bei dem Auswaschen einer Portion Fibrin mit stark thymolisirtem Salzwasser verringerte sich im Gegensatz zu meinen übrigen Beobachtungen die in Lösung gehende coagulable Substanz nicht mit der Dauer der Extraktion, sondern blieb sich gleich, während das Fibrin bei der fortgesetzten Digestion mit immer erneuerten Mengen thymolhaltigen Salzwassers weich wurde und an Volumen sichtlich abnahm. Ich habe das völlige Verschwinden des Fibrins nicht abgewartet, aber den in einem der letzten Macerationswässer enthaltenen Eiweisskörper durch Sättigen mit Salz zu gewinnen gesucht. Der dabei entsandene Niederschlag löste sich wieder in Wasser und coagulirte, wie das Albumin Gautiers, gleichfalls bei 61°. Die Beschreibung nun, welche Gautier von den Eigenschaften des vermeintlichen Albumins gibt, lässt sich noch recht wohl mit der Annahme vereinigen, dass der coagulable Körper nicht sowohl ein Albumin, sondern Heteroalbumose gewesen sei, die ja diesen Congulationspunkt besitzt. Dazu kommt, dass in dem Versuch von Gautier nicht bloss der coagulable Körper vorhanden war, sondern auch andere nicht coagulable Substanz, also wahrscheinlich noch andere Albumosen und Pepton. Ist diese Vermuthung richtig, was sich freilich erst durch eine eingehende Untersuchung der verschiedenen Produkte ergeben würde, so hätte es sich in dem Gautierschen Versuch um eine Veränderung des Fibrins wie bei der Verdauung gehandelt, die über die Bildung des Globulins noch hinausgegangen wäre. Nehme ich noch dazu, dass in dem von mir so eben beschriebenen Versuch trotz des starken Thymolzusatzes ein, wenn auch schwacher Fäulnissgeruch

1) Gautier, Comptes rendus, T. 79, p. 225; nach Chem. Centralbl. 1874, S. 588.

unverkennbar war, so braucht man nach dem fibrinlösenden Ferment nicht lang zu suchen. Ich bedauere, dass ich dieser beiläufigen Beobachtung nicht diejenige Aufmerksamkeit zugewendet habe, welche sie, wie ich jetzt sehe, verdient.

Gautier hat zwar das Lösungsprodukt bei der Dialyse durch einen Zusatz von Blausäure vor der Fäulniss zu schützen gesucht, dagegen nicht das Fibrin bei der Digestion mit Salzwasser. In meinem Versuch hat sich das Thymol als ein unzureichendes Schutzmittel gegen die Fäulniss erwiesen. Es liegt daher auch die Vermuthung nahe, dass in den oben berichteten Versuchen, mag man desinficirt haben oder nicht, die Fäulniss bei der Lösung des Fibrins in Salzwasser eine Rolle gespielt hat. Das wäre aber ein Analogon zu der Trypsinwirkung, nur mit dem Unterschiede, dass das Trypsin eine unvergleichlich viel schnellere Lösung des Fibrins herbeiführt, als die langsam einsetzende und absichtlich behinderte Fäulniss.

Ich bin daher der Meinung, dass die Bildung des zweiten, bei 55° coagulirenden Globulins aus dem Fibrin einem wirklichen Verdauungsvorgang zu danken, als die Erstwirkung des Verdauungsfermentes aufzufassen ist, eine Erstwirkung, wie etwa die, welche bei der Pepsinverdauung das Acidalbumin mit weit grösserer Schnelligkeit in Lösung bringt, wie die Salzsäure allein.

Bei dieser Auffassung der Sachlage muss man dann auch für die Thatsache, warum von den Eiweisskörpern nur das frische Fibrin bei der Verdauung Globulin liefert, eine andere Erklärung suchen, als wie sie Neumeister angenommen hat. Es eröffnet sich hier der Spekulation ein weites Feld, welches freilich erst dann zu betreten gerathen ist, wenn man sichere Daten über die unter den verschiedenen Verhältnissen aus dem reinen Fibrin entstehenden Globuline besitzt.