

Ueber die spezifische Drehung des Fibrinogens.

Von

Dr. F. Mittelbach, Assistent.

(Aus dem medicinisch-chemischen Institute der k. k. deutschen Universität in Prag.)
(Der Redaction zugegangen am 26. Februar 1894.)

Die von Herrmann¹⁾ unternommenen Versuche zur Bestimmung der spezifischen Drehung des Fibrinogens hatten in Folge unzulänglicher Methoden zur Herstellung spontan nicht gerinnender Fibrinogenlösungen zu keinem verlässlichen Resultate geführt. Nachdem aber Arthus in der Entkalkung ein Mittel kennen gelehrt hat, das Blut flüssig zu erhalten, war die Möglichkeit geboten, die Versuche zur Bestimmung der spezifischen Drehung des Fibrinogens mit mehr Aussicht auf Erfolg wieder aufzunehmen.

Als Material zur Darstellung des Fibrinogens verwendete ich Pferdeblut, deshalb, weil sich in ihm die Blutkörperchen schnell und vollkommen senken und so leicht grössere Mengen Blutplasma gewonnen werden können. Zur Entkalkung des Blutes habe ich sowohl Fluorkalium als auch Kaliumoxalat verwendet und zwar, der grösseren Sicherheit wegen, in etwas grösserer Menge, als nach Arthus zur Verhinderung der Gerinnung erforderlich ist.

Die Herstellung des Plasma geschah in folgender Weise. Eine oder mehrere Flaschen zu je 10 Liter Rauminhalt wurden mit der auf je 6 bis 8 Liter Blut gerechneten, in ca. 300 ccm.

¹⁾ Herrmann, diese Zeitschrift, Bd. 11, S. 519.
Zeitschrift für physiologische Chemie. XIX.

Wasser gelösten Menge des Oxalats resp. Fluorids beschickt, das Blut direkt aus dem Blutgefäße portionsweise in die Flasche gebracht und durch kräftiges Schütteln mit der Entkalkungsflüssigkeit innig gemischt. In Folge des durch das Schütteln erzeugten dichten Schaumes gelingt es nur, die Flasche etwas mehr als zu zwei Dritteln zu füllen. Nach kaum einer halben Stunde haben sich die Blutkörperchen abgesetzt, über ihnen steht das stark gelb gefärbte Plasma, das nun sofort abgehebert und verwendet werden kann. Niemals trat eine auch nur schwache Gerinnung ein.

Zur Reindarstellung von Fibrinogenlösungen nun habe ich mich der Hammarsten'schen Aussalzungsmethode bedient, jedoch nicht ohne dieselbe, wenn auch nur in unwesentlichen Punkten, mit Rücksicht theils auf die wirkliche Reindarstellung, theils auf die Schnelligkeit der Darstellung zu modificiren.

Hammarsten hat bekanntlich seine Fibrinogenlösungen sowohl durch ganze Sättigung als auch halbe Sättigung des durch bestimmte Mengen Steinsalz oder Magnesiumsulfatlösung ungerinnbar gemachten Plasmas mit Steinsalz und Wiederauflösung des durch die Sättigung gefällten Fibrinogens gewonnen.

Ich habe beide Methoden angewendet. Allein bei der vollständigen Sättigung des Plasmas habe ich zuletzt nur sehr schwache Fibrinogenlösungen erhalten; sie drehten im Zweidecimeterrohr nur $0,1^\circ$ oder etwas darüber. Ausserdem beanspruchte die völlige Sättigung des Plasmas und die wiederholte Sättigung der rohen Fibrinogenlösung viel Zeit, auch wenn die Lösung des Salzes in gelinder Wärme vorgenommen wurde.

Man sieht überdem bei diesen Sättigungsversuchen, dass die Ausscheidung des Fibrinogens vollendet ist, lang bevor sich alles zur Sättigung nöthige Salz in der Flüssigkeit gelöst hat und dass somit eine vollständige Sättigung überflüssig ist. Aus diesem Grunde habe ich es vorgezogen, das Fibrinogen nur durch halbe Sättigung mit Kochsalz (Steinsalz) abzuscheiden, obwohl dabei ein Verlust von Fibrinogen stattfindet.

Vorerst jedoch untersuchte ich das Verhalten meines Plasmas zu gesättigter Steinsalz- und Bittersalzlösung in jenen Mengen, in denen sie Hammarsten verwendet, um das Plasma ungerinnbar zu machen. Auf Zusatz von $\frac{1}{3}$ Vol. gesättigter Steinsalz- oder $\frac{1}{4}$ Vol. gesättigter Magnesiumsulfatlösung zeigte sich die befremdende Erscheinung, dass die Flüssigkeit Gerinnsel vom Ansehen und der Consistenz einer Fibrin-gallerte abschied. Die gleiche Beschaffenheit hatte übrigens auch der durch vollständiges Sättigen des Plasmas mit Steinsalz gewonnene Niederschlag dargeboten. In der Befürchtung, dass die Entkalkung des Plasmas eine unvollkommene gewesen sein und dasselbe statt Fibrinogen Fibrin abgeschieden haben mochte, wurde dem Plasma vor dem Salzzusatz nochmals Fluorkaliumlösung in reichlicher Menge hinzugefügt, ohne dass aber der Salzniederschlag andere Eigenschaften dargeboten hätte, als vorher. Das Gerinnsel durfte also schon aus diesem Grunde für Fibrinogen angesehen werden. Zusatz von $\frac{1}{3}$ Vol. Wasser veränderte das Plasma nicht.

Nachdem diese Erfahrungen gemacht worden waren, wurde eine grössere Menge von Fluorkaliumplasma mit demselben Vol. gesättigter Steinsalzlösung versetzt, also zur Hälfte gesättigt. Das entstandene Gerinnsel bildete wie in den obigen Versuchen eine zähe Gallerte, welche sich sofort nach dem Eingiessen der Salzlösung zeigte und das ganze Gefäss erfüllte. Wurde beim Eingiessen tüchtig gerührt, so schieden sich nur gelblichweisse zwar gelatinöse, jedoch solide, gut begrenzte Flocken aus, welche sich sehr bald von selbst zu einem auf der Oberfläche schwimmenden Kuchen zusammenklumpten. Dieser löste sich in schwacher Salzlösung auf, war also nicht Fibrin, sondern wie auch seine sonstigen Reactionen noch beweisen, Fibrinogen.

Wiederholt man dieses Verfahren, Fällen in halbgesättigter Lösung und Lösen in circa 6procentiger Salzlösung, so bemerkt man zunächst, dass das gefällte Fibrinogen immer schwerer löslich wird, eine Beobachtung, die bereits Alexander Schmidt machte. Dadurch wird es erklärlich, dass die letzte nach dreimaliger Fällung gewonnene Lösung stets sehr

eiweissarm und damit sowohl zur Eiweissbestimmung wie zur Polarisation nicht sehr tauglich ist. Lösungen von mehr als 0,2% Eiweissgehalt habe ich auf diese Weise niemals erhalten.

Nach Hammarsten wird die Abnahme der Löslichkeit des Fibrinogens durch das lange Verweilen desselben in reinem Wasser bedingt. Diesen schädigenden Einfluss des Wassers schloss Hammarsten dadurch aus, dass er das Fibrinogen schnell abfiltrirte und das abgepresste und zerschnittene Filter wieder mit schwacher Salzlösung behandelte. Mir schien es aber, dass man noch einfacher und schneller das angestrebte Ziel erreichen könne. Denn das Filtriren durch nur ein einziges Filter nimmt lange Zeit in Anspruch und beim Benutzen mehrerer Filter beeinträchtigt das massenhafte Papier die Beurtheilung der vollständigen Lösung sehr. Die Eigenschaft des gefällten Fibrinogens, sich zu einem Klumpen zusammen zu ballen, gestattet vielmehr eine direkte Entfernung des Fibrinogens aus der Flüssigkeit.

Bei der Darstellung des Fibrinogens bin ich nun in folgender Weise zu Werke gegangen.

In das entkalkte Plasma wird das gleiche Vol. gesättigter Steinsalzlösung unter fortwährendem Umrühren eingegossen; das Umrühren wird so lange fortgesetzt, bis sich deutlich begrenzte Flocken abscheiden. Lässt man dann noch einige Minuten stehen, so ballt sich das gefällte Fibrinogen zusammen und schwimmt als zusammenhängende Schichte auf der Oberfläche, welche man ohne grossen Verlust und Mühe mit der Hand herausfischen kann. Der gallertige Niederschlag wird nun zwischen den Fingern durchgepresst und sofort wieder in 2—3proc. Steinsalzlösung unter fleissigem Rühren zur Lösung gebracht. Das Durchpressen bietet dabei nicht blos den Vortheil, dass das Präcipitat sehr flüssigkeitsarm wird, sondern namentlich auch den, dass der ganze Klumpen in erbsen- bis bohnergrosse Stückchen zerquetscht wird, wovon wesentlich das Gelingen der Lösung abhängt. Diese kleinen Klümpchen, welche sehr consistent sind, ballen sich in der Salzlösung nicht mehr zusammen, sie quellen vielmehr auf, werden wieder gallertig, an ihrer Oberfläche erscheinen Luftblasen, ihre

Contouren werden verschwommen, und in einer bis drei Viertelstunden ist man bei fleissigem Umrühren im Stande, Alles in Lösung zu bringen. Hierauf wird die Lösung in ein anderes Becherglas übergossen, wo bei nur einiger Vorsicht sowohl Schaum als etwa ungelöste kleine Klümpchen zurückbleiben; es wird dadurch ein zeitraubendes Filtriren überflüssig. Diese Lösung wird wieder halb mit Steinsalz gesättigt und so das ganze Verfahren dreimal wiederholt, bis die letzte Lösung, welche man auch, wenn nöthig, zuletzt noch filtriren kann, nur mehr reines Fibrinogen enthält.

Die Menge des auf diese Weise gewonnenen Fibrinogens ist zwar auch keine übermässig grosse, aber mit Rücksicht auf die Schnelligkeit und Leichtigkeit der Darstellung eine ganz befriedigende. Lösungen mit mehr als 0,5% Fibrinogen habe ich jedoch auch bei diesem Verfahren nicht erhalten, allerdings auch nicht zu erhalten gesucht, da schon Lösungen von der angegebenen Concentration wegen ihrer schon beträchtlichen Opalescenz oder Trübung zur Polarisation nicht mehr sehr geeignet sind.

Aus dieser Art der Darstellung geht schon hervor, dass der erhaltene Körper nichts Anderes sein kann als Fibrinogen. Doch habe ich es nicht unterlassen, seine übrigen Eigenschaften zu ermitteln, einerseits um durch eine Vergleichung mit dem Hammarsten'schen Fibrinogen den Beweis für die Identität mit diesem zu vervollständigen, andererseits aber auch um die Reinheit der Substanz zu erweisen.

Der Körper bildet mit schwachen Steinsalzlösungen eine zähflüssige, fadenziehende Flüssigkeit, in den meisten Fällen von schwacher aber deutlich alkalischer Reaction. Die Flüssigkeit zeigt schwache Opalescenz bei mässiger Trübung, welche letztere nach dem Filtriren durch dichtes Filtrirpapier bedeutend schwächer wird, wobei sich aber, wie polarimetrisch festgestellt wurde, der Gehalt an Eiweiss zugleich auch vermindert. Diese Lösung gerinnt für sich trotz tagelangen Stehens bei Zimmertemperatur nicht, sie gerinnt aber stets mit Blutserum, nicht sofort, sondern im Verlauf von 1 bis 2 Stunden zu einer festen Gallerte. Mit einer Spur löslichen Kalksalzes

(Ca Cl₂) konnte nur in einem Falle eine zweifellose Gerinnung nachgewiesen werden. Diese Fibrinogenlösungen werden durch Sättigen mit Steinsalz vollkommen enteiweist, ihre Gerinnungstemperatur liegt bei 56° C. Die Substanz besitzt also alle Eigenschaften des reinen Fibrinogens nach Hammarsten.

Ausserdem aber habe ich noch folgende Wahrnehmungen bei meinen Versuchen gemacht.

Es schien mir wünschenswerth, zu erfahren, wieviel Fibrinogen durch wirklich halbe Sättigung gefällt wird und ob man durch Vermehrung der zugesetzten Salzlösung nicht eine vollkommene Fällung erzielen könnte. Zu diesem Behufe versetzte ich 4 gleiche genau gemessene Volumina der Fibrinogenlösung — mit ungefähr 0,2% Fibrinogen und 1% Steinsalz — der Reihe nach mit 1, 2, 3 und 4 Vol. gesättigter Steinsalzlösung, schüttelte gut um, liess etwa eine halbe Stunde stehen und filtrirte. Die Filtrate waren sämmtlich klar. Die zur Hälfte mit Salz gesättigte Lösung gab mit Essigsäure allein, sowie mit Essigsäure und Ferrocyankalium eine bedeutende Trübung, die zu $\frac{2}{3}$ gesättigte Lösung gab mit Essigsäure und Ferrocyankalium eine zwar schwache, aber deutliche Trübung. In den zwei anderen Proben liess sich auch in einem mehr als doppelt so weiten Glas mit Essigsäure allein keine, mit Essigsäure und Ferrocyankalium nur eine an der Grenze der Wahrnehmbarkeit stehende Trübung nachweisen, die Biuretprobe blieb negativ.

Demzufolge kann man wohl die Prüfung auf Reinheit des Präparates auch so vornehmen, dass man 1 Vol. der Fibrinogenlösung mit 3 bis 4 Vol. gesättigter Steinsalzlösung versetzt und eine Zeit lang stehen lässt, wobei eine reine Fibrinogenlösung vollständig gefällt wird. Davon habe ich bei der Untersuchung meiner Lösung Gebrauch gemacht.

Vergleichshalber habe ich auch das Verhalten zu Ammonsulfat untersucht und konnte bei halber Sättigung mit demselben im Filtrate Eiweiss mit Sicherheit nicht mehr nachweisen.

Bei geringem Zusatz von Essigsäure zu der alkalischen Lösung in Steinsalz wird Fibrinogen gefällt, löst sich im Ueberschuss der Säure zur vollkommen klaren Flüssigkeit auf und kann daraus mit kohlensaurem Natrium leicht wieder

gefällt werden. Mischt man die Säure vorsichtig zu, ohne zu schütteln, so erhält man ein gelatinöses Gerinnsel, ähnlich dem durch Salzfällung entstehenden.

Einmal jedoch habe ich ein ganz eigenthümliches Verhalten beobachtet. Durch Zusatz von einigen Tropfen 50proc. Essigsäure zu einer circa 2% Steinsalz enthaltenden ca. 0,5 proc. Fibrinogenlösung bekam ich zunächst das beschriebene Gerinnsel, welches sich im Ueberschuss der Säure klar löste; wenige Minuten später war jedoch die Gallerte wieder entstanden, welche sich leicht zerschütteln liess, also Fibrin gewiss nicht war. Später beobachtete ich dies nicht mehr, vielleicht weil ich 0,5 proc. Lösungen nicht mehr verwendete.

In Bezug auf die Hitzecoagulation habe ich folgende nur zum Theil mit den Angaben Hammarsten's übereinstimmende Wahrnehmungen gemacht.

Bei schnellem Erhitzen, wie man es erzielt, wenn man das die Fibrinogenlösung enthaltende Reagensglas in auf 56° C erhitztes Wasser bringt, tritt bei Lösungen von 0.1—0.5% Fibrinogen in 1—2 procentiger Salzlösung die erste Trübung bei 53° auf und die Coagulation ist bei 56° vollendet. Eine flockige Fällung erhält man nur dann, wenn man bei der angegebenen Temperatur einmal kräftig mit dem Thermometer umrührt, sonst nur ein zähes, ziemlich homogenes Coagulum. Filtrirt man die Flüssigkeit vom Coagulum ab und erhitzt nochmals, so bekommt man, falls man vorher genügend lange erhitzt hat, — $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde — bei nochmaligem Erhitzen auf 56° keine weitere Trübung. Untersucht man jedoch das Filtrat mit Essigsäure und Ferrocyankalium oder stellt die Biuretprobe an, so kann man in jedem Falle noch in Lösung befindliches Eiweiss nachweisen.

Hammarsten hat nun beobachtet, dass dieser in Lösung bleibende Eiweisskörper ein sich bei der Hitzecoagulation vom Fibrinogen abspaltendes, bei 65° C gerinnendes Globulin darstellt. Dazu muss ich bemerken, dass ich eine Coagulation des Filtrates nach der Coagulation bei 56°, so oft ich auch die Versuche in Ansehung der Resultate eines so ausgezeichneten Beobachters wie Hammarsten mit peinlichster Vermeidung aller möglichen Fehler, wiederholte, bei 65° eine Coagulation in dem Maasse niemals beobachtet

habe, wo nach Hammarsten's Bestimmungen beiläufig ein Drittel der ursprünglichen Fibrinogenmenge den bei 56° noch löslichen Eiweisskörper ausmacht. Ich bekam zwar ab und zu mit Fibrinogenlösungen bei über 60° ganz zarte Trübungen, aber dann auch jedesmal im Filtrat nochmals solche bei über 70°, was ich dann besser auf Beimengung von Albumin und Globulin als auf das Spaltungsprodukt des Fibrinogens beziehen zu sollen glaubte; die bei weitem grösste Zahl meiner Fibrinogenlösungen zeigte eine Trübung oder gar Coagulation in Flocken bei 65° überhaupt nicht, obwohl sie sonst alle von Hammarsten angeführten Eigenschaften des reinen Fibrinogens besaßen.

Dass die Coagulation bei 56° keine vollständige ist, kann nicht auffallen, da ja die reinen Fibrinogenlösungen, wenn auch nur schwach, so doch deutlich alkalisch sind; beim Erhitzen auf 56° muss nun in dem Maasse, als Fibrinogen coagulirt, der in Lösung bleibende Theil relativ alkalischer werden und allmählig in Albuminat übergehen, welches bei grosser Concentration der Eiweisslösung wohl eine Trübung, niemals aber eine wirkliche Coagulation mit Flockenbildung geben kann. Dass dieser lösliche Eiweissrest in meinen Fibrinogenlösungen in der That Fibrinogen ist, lässt sich unschwer erweisen.

Ausgehend von der Annahme, dass eine vollständige Fällung in der Hitze durch die Alkaleszenz der Lösung verhindert wird, habe ich versucht, durch Neutralisation mit Säure eine vollständige Coagulation in der Wärme zu erzielen. Ich verwendete dazu Essigsäure von beiläufig 0,5%. Bei Verbrauch von nur 1 oder 2 Tropfen dieser verdünnten Säure für 50 cbcm. der Fibrinogenlösung, bleibt nach halbstündigem Erhitzen auf 56° entweder gar kein Eiweiss oder doch nur eine Spur in Lösung, jedenfalls aber viel weniger, als in einer nicht angesäuerten Probe derselben Fibrinogenlösung, wie ich mich aus dem Vergleich mit solchen unter denselben Umständen erhitzten Proben überzeugt habe.

Dass es bei der groben Art, wie der Versuch angestellt wurde, nicht in jedem Falle gelingt, alles Fibrinogen durch Säurezusatz zu coaguliren, ist begreiflich, da es sehr

schwer ist, so kleinen Flüssigkeitsmengen mit minimalem Alkaligehalt die richtige saure Reaction zu ertheilen. Uebrigens bedarf es eines bedeutenden Ueberschusses an Essigsäure, um die Hitzecoagulation zu verhindern, d. h., das Fibrinogen in Acidalbumin überzuführen.

Eine deutliche Spaltung des Fibrinogens bei der Coagulation habe ich also nicht wahrgenommen und meine Beobachtung steht also in diesem Punkte in Widerspruch mit der von Hammarsten.

Ich bin derzeit nicht im Stande, davon eine erschöpfende Erklärung zu geben. Nachdem meine Fibrinogenlösungen überhaupt nur einen Coagulationspunkt zeigen, so kann man an der Reinheit des isolirten Eiweisskörpers nicht mehr zweifeln. Es ist nun Zweierlei möglich: entweder ist das nach der Methode Hammarsten dargestellte Fibrinogen ein anderes, woran man bei der grossen Veränderlichkeit des Fibrinogens stets denken muss, oder ist das vom genannten Autor dargestellte Fibrinogen kein homogener Eiweisskörper. Indessen ist eine andere Möglichkeit auch nicht vollkommen ausgeschlossen. Ich nahm bei meinen Coagulationsversuchen meist Lösungen von 0,2–0,5%, Hammarsten dagegen verwendete nach seiner Methode gewonnene Lösungen von 2–5%. Es wäre nun immerhin denkbar, dass mir bei der starken Verdünnung eine Coagulation bei 65° entgangen sein konnte, die Hammarsten bei seinen zehnfach stärkeren Lösungen beobachtete.

Aus der bisher gegebenen Schilderung der Eigenschaften meines Präparates geht nun wenigstens soviel hervor, dass das Fibrinogen den zur Bestimmung der specifischen Drehung erforderlichen Grad der Reinheit besitzt. Herrmann's Bestimmung kann dagegen insofern nicht befriedigen, als sie, abgesehen davon, dass sie sich nur auf eine einmalige Beobachtung bezieht, mit einem Produkt ausgeführt wurde, welches bei Temperaturen über 70° noch eine deutliche Trübung zeigte, also nicht rein war.

Zu meinen Bestimmungen der spez. Drehung dienten stets frisch bereitete Lösungen, von denen jede vorerst genau auf ihre Eigenschaften und ihre Reinheit geprüft wurde.

Der Drehungswinkel wurde im Zweidecimeterrohr mittelst eines Polarimeters von Lippich bestimmt, welches eine Ablesung von noch $0,005^\circ$ gestattet. Dann wurde der Gehalt der Lösung an organischer Substanz ermittelt. Dazu wurden zunächst 50—100 ccm. der Lösung im Trockengläschen im Luftbad unterhalb 100°C eingedampft und darauf der Rückstand bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Von derselben Lösung dienten 10—20 ccm. zur Aschebestimmung: die Flüssigkeit wurde im Platintiegel in einer Lieben'schen Muffel zur Trockene verdampft, der Rückstand vorsichtig verkohlt, die Asche erst mit heissem Wasser ausgelaugt, dann weiss gebrannt und auf ihr der wässrige Auszug eingedampft. Der Tiegel mit der Asche wurde dann noch über der Flamme erhitzt, doch so, dass der Boden des Tiegels kaum roth wurde. Vom Gewichte der Trockensubstanz wurde das der Asche abgezogen. Alle diese Wägungsbestimmungen wurden paarweise vorgenommen.

In der folgenden Tabelle gebe ich das Gewicht der Trockensubstanz für 100 ccm., das der Asche für 10 ccm. und den Drehungswinkel für das Eindecimeterrohr.

	Rückstand.	Asche.	Eiweiss in 100 ccm.	α_D	$[\alpha]_D$
1.	2,7852	0,2237	0,5322	— $0,28675^\circ$	— $53,9^\circ$
	2,7812	0,2265			
2.	2,7003	0,2412	0,2914	— $0,1575^\circ$	— $54,1^\circ$
	2,7014	0,2107			
3.	1,4300	0,1145	0,2886	— $0,14875^\circ$	— $51,5^\circ$
	1,4302	0,1138			
4.	1,2498	0,1047	0,2048	— $0,1037^\circ$	— $50,6^\circ$
	1,2498	0,1043			

Das Mittel sämmtlicher Bestimmungen beträgt $-52,5^\circ$. Die nicht geringen Abweichungen der einzelnen Werthe von einander erklären sich wohl zur Genüge aus der nur geringen Concentration der Fibrinogenlösungen.

Zum Schlusse spreche ich meinem verehrten Chef, Hrn. Prof. Huppert, nicht bloß für die Anregung sondern auch für das werththätige Interesse, mit dem er die Arbeit verfolgt hat, meinen besten Dank aus.