

Ueber Blutgerinnung.

Von

Leon Lilienfeld.

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts in Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 22. Juni 1894.)

Einleitung.

Trotz der ausserordentlich grossen Anzahl von Arbeiten bewährter Autoren aus älterer und neuester Zeit herrscht auf dem Gebiete der Lehre von der Blutgerinnung eine schwer zu bewältigende Verwirrung, aus der sich ein Uneingeweihter schwerlich herausfinden wird. Es gibt heutzutage so viele Theorien, die sich schnurstracks widersprechen, so viele Beobachtungen, die miteinander gar nicht in Einklang zu bringen sind, manche Theorien sind derart complicirt, dass von einer Orientirung (im wahren Sinne des Wortes) an der Hand der mannigfaltigen Einzelforschungen gar nicht die Rede sein kann.

Im Folgenden unternehme ich nicht nur eine Berichterstattung über meine die Blutgerinnung betreffenden Versuche zu liefern, sondern die bisherigen wichtigen Experimente an der Hand der meinigen oder mit Hülfe der meinigen zum

Aufbau einer einheitlichen Theorie zu verwerthen und so vielleicht die Verwirrung zu bannen und die Complicirtheit in Einfachheit überzuführen.

Der äussere Weg, den ich zu diesem Ende einzuschlagen gedenke, besteht in erster Linie in der Behandlung der Blutgerinnungsfrage nach drei von einander vorläufig als unabhängig zu betrachtenden Richtungen, also in einer Trennung des Materials in 1. einen chemischen, 2. einen mikrophysiologischen, 3. einen physiologisch-physikalischen Theil.

Der erste Theil soll sich mit der Frage befassen: welche chemischen Stoffe des Blutes liefern das Fibrin und was geschieht mit diesen Substanzen, indem sie Fibrin bilden?

Stammen die zum Substrat der Faserstoffbildung zusammentretenden Substanzen aus dem Blutplasma oder den organisirten Elementen des Blutes? Oder mit anderen Worten: inwieferne betheiligen sich die Leukocyten, die rothen Blutkörperchen und die Plättchen an der Fibrinentstehung?

Der zweite Theil wird das Problem behandeln: aus welchem Theile der Leukocyten stammen die zur Fibrinbildung nöthigen Stoffe?

Der dritte Theil soll die Frage zu lösen suchen: wesswegen bleibt das Blut innerhalb der lebenden Gefässe flüssig, während es beim Austritt aus denselben gerinnt, oder mit anderen Worten: welche ist die von Brücke entdeckte, von Lister, Hunter, Hewson, Fredericq bestätigte Beziehung der lebenden Gefässwand zu dem Blutgerinnungsvorgange resp. zum Flüssigbleiben des Blutes im lebenden Thiere?

Der chemische Theil.

I. Geschichtlicher Ueberblick.

Ich übergehe hier die ältesten, längst widerlegten Theorien, wonach die Blutgerinnung ausserhalb des Organismus auf der Einwirkung des atmosphärischen Sauerstoffs, oder auf dem Entweichen von Kohlensäure (Scudamore), oder auf dem

Entweichen von Ammoniak (Richardson) beruht. Brücke¹⁾ zeigte, dass bei der Blutgerinnung weder etwas hinzutritt, noch wegkommt, dass das Festwerden des Blutes nicht auf einem Temperaturwechsel beruhe, auch nicht darauf, dass im Blute etwa eine übersättigte Lösung vorliegt, die ausserhalb des Organismus erstarrt, dass mit einem Worte sich für das Unlöslichwerden des Fibrins die gangbaren Ursachen nicht verwerthen lassen. Fernerhin hat Brücke durch seinen bekannten Versuch den Nachweis erbracht, dass jener Körper oder jene Körpergruppe, die bei der Gerinnung Fibrin liefert, im Blutplasma als ein durch Wärme coagulirbares Eiweiss vorhanden sei. Beinahe bis an das Ende des XVIII. Jahrhunderts glaubte man nämlich, der Blutkuchen bestehe aus agglutinirten Körperchen. Hewson²⁾ war der Erste, welcher in der Blutgerinnung eine Absonderung einer gewissen Substanz aus dem Plasma, die man jetzt Fibrin nennt, erkannte. Denis³⁾ sättigte Blutplasma mit Kochsalz und erhielt so einen Eiweisskörperniederschlag, welcher nach nachheriger Auflösung in verdünnten Salzlösungen spontan gerann. Diese Mutter-substanz des Fibrins nannte Denis Plasmin. Al. Schmidt hat in dem «Plasmin» ein Gemenge erkannt und hat es in seine Bestandtheile zerlegt: beide sind Globuline und Schmidt gab ihnen den Namen Fibrinogen und fibrinoplastische Substanz. Kühne⁴⁾ nannte letzteren Körper Paraglobulin, Weyl⁵⁾ aber Serumglobulin. Al. Schmidt's Grundexperiment, welchem zufolge Blutserum resp. defibrinirtes Blut in Transsudaten und Exsudaten, im Allgemeinen in einer ganzen Reihe von Körperflüssigkeiten, welche nicht spontan gerinnen, Faserstoffgerinnung hervorrufft, ward zum Ausgangspunkt einer ganzen Reihe von Experimenten, welche schliesslich Al. Schmidt zu einer Theorie führten, die kurz gefasst folgendermassen lautet: Das Fibrinferment, ein Decompositionproduct der Leukocyten, bewirkt die Fibringerinnung, indem

1) Brücke, Virchow's Archiv 12.

2) Hewson's Werke, herausgegeben von Gulliver, S. 29 ff.

3) Denis, Memoires sur le sang, Paris 1889.

4) Kühne, Lehrb. d. physiol. Chemie, S. 174.

5) Weyl, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. I (1877), S. 77.

es den Zusammentritt des Serumglobulins mit dem Fibrinogen zu Fibrin veranlasst. Die Körperflüssigkeiten, welche Schmidt bei seinen Forschungen benutzt hat, zerfallen nach diesem Forscher in solche, welche beide Globuline, aber kein Fibrinferment enthalten; diese nennt Schmidt proplastische Flüssigkeiten. Eine solche gewinnt man am besten dadurch, dass man Blut in einer concentrirten Lösung von $MgSO_4$ auffängt, nach vollbrachter Abschleuderung oder Senkung der rothen Blutkörperchen das Plasma abhebt, filtrirt und im Vacuum über H_2SO_4 zur Trockne bringt und den Rückstand pulverisirt. Der pulverige Rückstand lässt sich beliebig lange aufbewahren und durch Auflösen eines Theiles desselben in 7,5 Theilen Wasser erhält man eine proplastische Reactionsflüssigkeit, welche weder auf Zusatz von Wasser noch für sich allein, noch auf Zusatz von Leukocyten oder anderen Zellen, dagegen nur auf Zusatz von freiem Fibrinferment gerinnt. Viele Körperflüssigkeiten sind proplastischer Art.

Ausserdem finden sich gerinnungsfähige Körperflüssigkeiten, welche auf Zusatz von Fibrinferment allein nicht gerinnen, deren Gerinnung nur durch Zusatz von Fibrinferment und Serumglobulin herbeigeführt wird. Diese Flüssigkeiten enthalten also vom Gerinnungssubstrat nur das Fibrinogen und Schmidt nennt sie deswegen fibrinogene Flüssigkeiten.

Eine dritte von Al. Schmidt angegebene und häufig benutzte Reactionsflüssigkeit ist das kalt filtrirte Pferdeblutplasma, welches durch rasche Abkühlung des Blutes auf 0° , schnelle Senkung der rothen Blutkörperchen, Abgiessen des Plasmas und Filtration desselben bei 0° gewonnen wird. Das so gewonnene Plasma gerinnt nicht nur auf Zusatz von Fibrinferment, aber auch auf Zusatz von Leukocyten allein und anderen Zellenarten — im Gegensatz zu den proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten.

Wir verdanken also Al. Schmidt folgende drei Reactionsflüssigkeiten:

1. Proplastische Flüssigkeiten ($MgSO_4$ -Plasma, Trans- und Exsudate). Gerinnen auf Zusatz von Fibrinferment und nur freiem Fibrinferment.

2. Fibrinogene Flüssigkeiten (z. B. Liquor pericardii des Pferdes). Gerinnen auf Zusatz von Fibrinferment und Serumglobulin, weil sie blos Fibrinogen enthalten.
3. Kalt filtrirtes Pferdeblutplasma. Gerinnt schon auf Zusatz von Leukocyten, selbstverständlich um so leichter mit Fibrinferment.

Worauf beruht nun der Unterschied der proplastischen Flüssigkeiten von dem kalt filtrirten Pferdeblutplasma, dass beide Fibrinogen und Serumglobulin enthalten, während die ersten nur auf Zusatz von Fibrinferment, das letztere dagegen auch auf Zusatz von Leukocyten gerinnt? Nach Al. Schmidt soll das kalt filtrirte Pferdeblutplasma neben Fibrinogen und Serumglobulin auch Stoffe enthalten, welchen die Eigenschaft zukommt, das in den Leukocyten enthaltene Zymogen des Fibrinferments in letzteres überzuführen, Stoffe, die den proplastischen Flüssigkeiten fast vollständig fehlen.

Diese drei Flüssigkeitsarten und die Fibrinfermentlösung — bereitet durch Stehenlassen des Blutserums mit dem 15—20fachen Volumen starken Alkohols, Abfiltriren und Trocknen des Niederschlages und jeweilige Extraction desselben mit Wasser — bilden die Grundlage der Methodik, welche Al. Schmidt und seine Schüler beim Studium der extravasculären Gerinnungsercheinungen verfolgten. Es sei mir gestattet, die wichtigsten Resultate der langjährigen Untersuchungen der Dorpater Schule herauszuschälen und hier kurz anzuführen. Ich will hier manche chronologisch ältere Untersuchungen anderer Forscher absichtlich übergehen, um die Schmidt'schen Anschauungen einheitlich darstellen zu können. Dies geschieht ohne Schaden für die Sache, weil ja Schmidt immer weiter in der einmal angefangenen Richtung seine Untersuchungen fortsetzte und sich wenig um die immerhin bemerkenswerthen Errungenschaften Anderer bekümmerte (Beispiel: Einwirkung der Kalksalze auf die Gerinnung u. s. w.)

Der biologische Schwerpunkt der Theorie von Alex. Schmidt ist die Klarlegung der Beziehungen der Leukocyten zur Blutgerinnung. Der Erste, welcher auf einen Zusammenhang der Blutgerinnung mit den Leukocyten hingewiesen hat,

war Beale¹⁾. Dieser Forscher beobachtete, dass während der Blutgerinnung sich von den Leukocyten kleine Körner ablösen, welche sich in Fibrin umwandeln sollen. Auch Mantegazza²⁾ ist der Anschauung, dass die Leukocyten in Berührung mit Fremdkörpern einen coagulirend wirkenden Eiweissstoff ausscheiden, der im Stande ist, das Fibrinogen des Blutplasmas in Fibrin umzuwandeln. Das Verdienst aber, diese Beziehungen näher zu studiren und auszubauen, gebührt Schmidt und seinen Schülern. Die Beweise, welche Schmidt und seine Schüler für die thatsächliche Betheiligung der Leukocyten an der Faserstoffbildung erbracht hat, sind folgende:

1. Während auf 0° abgekühltes Pferdeblutplasma (von rothen Blutkörperchen befreit) unfiltrirt schnell gerinnt, wenn man es in Zimmertemperatur bringt, gerinnt es filtrirt erst nach Stunden.
2. In gekühltem Pferdeblute, in welchem die Körperchen Zeit haben, sich zu senken, schichten sich die Leukocyten zu oberst auf die Säule der rothen Blutkörperchen, bleiben aber auch vertheilt in den tieferen Plasmaschichten. Wenn nun Gerinnung eintritt, so kann man nach Schmidt beobachten, dass sie in denjenigen Schichten des Plasmas am ausgiebigsten und vollkommensten stattfindet, in welcher sich die meisten Leukocyten befinden.
3. Durch starke und rasche Abkühlung kann man den Zerfall der weissen Blutkörperchen verzögern und ihn so, wenn man das Blut langsam gerinnen lässt, in seinen einzelnen Stadien allmählig verfolgen. Im ersten Augenblick seiner Ausscheidung schliesst der Faserstoff des Blutplasmas die noch nicht zerfallenen Leukocyten ein; dieselben zerfallen aber bald zu Körnerhaufen, auch diese schwinden nach und nach, während der Faserstoff immer sichtbarer wird und deutlich an Masse zunimmt. Endlich sieht man nur Faserstoff und keine Leukocyten.

¹⁾ L. S. Beale: On the germinal matter of the blood whit remarks upon the formation of fibrin. Transactions of the microscop. soc. of London 1864, Vol. XII, N. S., p. 47 ff.

²⁾ Moleschott's Untersuch. zur Naturlehre, XI, 1876.

4. Ein Schüler Schmidt's, Semmer¹⁾, hat ebenfalls direkte Beobachtungen über den Zerfall der weissen Blutkörperchen im Amphibien- und Vogelblut angestellt.
5. von Samson Himmelstjerna²⁾ zeigt, dass das schnelle Gerinnen des gefrorenen und wiederaufgethauten Plasmas, auf einem Untergang der Leukocyten beruht.
6. Heyl³⁾ stellte durch Zählungen der Leukocyten vor und nach der Gerinnung die wichtige Thatsache fest, dass während der Gerinnung 71,3% der vor der Gerinnung dagewesenen Leukocyten, dagegen nur 1,0—2,4% der rothen Blutkörperchen bei diesem Vorgang verschwinden.

Diese und viele andere Beweise, die ich hier nicht aufzählen will, führten nun Schmidt zu der Ansicht, dass ein thatsächlicher Zusammenhang der Blutgerinnung und der Leukocyten besteht.

Diese biologisch bedeutende und interessante Errungenschaft der Schmidt'schen Lehre erfuhr eine schöne Erweiterung durch die Untersuchungen seines Schülers Rauschenbach⁴⁾. Dieser Forscher führte den Nachweis, dass die Beziehung des Gerinnungsvorgangs zu den Leukocyten zwar eine thatsächliche, aber keine specifische ist, weil das Protoplasma überhaupt die Fähigkeit besitzt, im kalt filtrirten Pferdeblutplasma Faserstoffgerinnung einzuleiten. Alle Cellulargebilde, die Rauschenbach in den Kreis seiner Untersuchungen zog, also Lymphdrüsenzellen, Eiterzellen, die lymphoiden Zellen aus der Pericardial- und der Peritonealflüssigkeit des Pferdes, die durch Waschen mit Wasser vom Blutfarbstoff

¹⁾ Semmer, Ueber die Faserstoffbildung im Amphibien- und Vogelblut. Inaug.-Diss., Dorpat 1874.

²⁾ v. Samson Himmelstjerna: Experimentelle Studien über das Blut u. s. w. Inaug.-Diss., Dorpat 1889.

³⁾ Heyl: Zählungsergebnisse, betreffend die weissen und die rothen Blutkörperchen. Inaug.-Diss., Dorpat 1882.

⁴⁾ Rauschenbach: Ueber die Wechselwirkungen zwischen Protoplasma und Blutplasma. Inaug.-Diss., Dorpat 1882.

befreiten «Stromata» — wie ich später zeigen werde, handelt es sich hierbei gerade nicht um Stromata — der rothen Vogelblutkörperchen, die Hefezellen, Spermatozoen und Protozoen aus dem Froschmastdarm wirkten auf das filtrirte Pferdeblutplasma ganz ebenso wie die Leukocyten, d. h. erzeugten darin Gerinnung und erhöhten die Fibrinmenge. Für die folgenden Auseinandersetzungen von grosser Wichtigkeit ist die Beobachtung Rauschenbach's, dass in quantitativer Hinsicht hierbei beträchtliche Unterschiede zur Geltung kamen; die intensivste Einwirkung als Gerinnungserreger zeigten die Spermatozoen. Rauschenbach stellte auch die Thatsache fest, dass die Zellen als solche auf proplastische Flüssigkeiten (z. B. Salzplasma) vollständig unwirksam waren, dass aber ihr Wasserextract auch in proplastischen Flüssigkeiten Fibrinbildung hervorriefen. Diese wässerigen Extracte werden um so wirksamer, je länger das Wasser eingewirkt hat. Grohmann¹⁾ fand, dass auch pflanzliche Protoplasmaformen (verschiedene Schimmel- und Spaltpilze) dieselbe Einwirkung auf kalt filtrirtes Pferdeblutplasma zeigen.

Wenn ich nun die wichtigsten Beobachtungen Schmidt's über das Fibrinferment anführe, so wären es folgende:

Das Fibrinferment kann zu wiederholten Malen Gerinnungen herbeiführen.

Die Wirksamkeit des Fibrinferments wird durch Kochen seiner Lösung zerstört.

Im festen, trockenen Zustande (als gepulverter Alkoholniederschlag) verträgt es viel höhere Wärmegrade, als in wässriger Auflösung.

Eine Temperatur von 37—40° begünstigt seine Wirkung in hohem Maasse.

Kälte verzögert seine Wirkung in hohem Maasse; seine Lösung erleidet aber durch Gefrieren keine Einbusse an Wirksamkeit.

¹⁾ W. Grohmann: Ueber die Einwirkung der zellenfreien Blutplasmas auf einige pflanzliche Mikroorganismen. Inaug.-Diss., Dorpat 1884.

Kleine Ueberschüsse an Alkalien oder Säuren unterdrücken seine Wirkung, welche aber beim Neutralisiren wieder hergestellt werden kann. Grössere Mengen von Alkalien und Säuren zerstören das Fibrinferment vollständig.

Kleine Mengen von Neutralsalzen unterstützen die Wirkung des Fibrinferments, grosse Mengen hemmen sie.

Das Fibrinferment ist im Blutserum gelöst enthalten.

Das aus der Ader direct in Alkohol fliessende Blut gibt einen Niederschlag, welcher ein fast vollkommen unwirksames Wasserextract liefert, es enthält also keine zu berücksichtigenden Mengen von Fibrinferment (Jakowicki¹⁾).

Nachdem Al. Schmidt als feststehende Thatsache annimmt, dass das Fibrinferment ein Zerfallsproduct der Leucocyten ist, in denselben aber nicht als solches, sondern als Zymogen enthalten ist, befasst er sich in seinen neuesten Arbeiten mit der Frage: welche Stoffe des Blutplasmas und Zellprotoplasmas sind es, die das Zymogen in das Fibrinferment überführen, oder — wie er sich ausdrückt — das Fibrinferment von seiner unwirksamen Vorstufe abspalten? Die ersten diesbezüglichen Versuche wurden auf Veranlassung von Schmidt von J. v. Samson Himmelstjerna²⁾ und Nauck³⁾ ausgeführt. Diese prüften eine ganze Reihe verschiedener, ziemlich willkürlich gewählter Stoffe, auf ihre Einwirkung auf filtrirtes Pferdeblutplasma, Denis'sche Plasminlösung und Gallensalzplasma. Hierbei stellte sich heraus, dass alle Stoffe, die sie untersuchten, also Lecithin, Hypoxanthin, Leucin, Glycin, Taurin, Kreatin, Xanthin, Guanin, Harnsäure, Harnstoff, mit Ausnahme des Harnstoffs in bestimmten Mengen wirksam, also gerinnungsbeschleunigend (nicht erregend) waren. Man erzielt aus der Zusammenstellung der Reactionsflüssigkeiten und der Wahl der Substanzen, die Schmidt alle

¹⁾ A. Jakowicki: Zur physiol. Wirkung der Bluttransfusion. Inaug.-Diss., Dorpat 1875.

²⁾ J. v. Samson Himmelstjerna: Ueber leukämisches Blut, nebst Beobachtungen über Entstehung des Fibrinferments. Inaug.-Diss. Dorpat 1885.

³⁾ L. c.

als Producte der regressiven Metamorphose der Eiweisskörper bezeichnet, dass eine Schlussfolgerung aus diesen Versuchen eigentlich nicht zu ziehen ist. Ein wichtigeres Resultat ergaben die Versuche, die Schmidt selbst angestellt hat. Er extrahirte Cellulargebilde mit Alkohol und fand, dass in den Alkohol Stoffe übergehen, denen die Fähigkeit zukommt, im filtrirten Pferdeblutplasma Gerinnung zu erzeugen. Ausserdem sind diese Stoffe, zymoplastische Substanzen — wie Schmidt sie bezeichnet — im Stande, ein Serum, welches durch langes Stehen an der Luft oder Dialyse vollständig unwirksam gemacht worden ist, wieder hochgradig wirksam zu machen. Hieraus zieht Schmidt den Schluss, dass nach Zerstörung des Fibrinfermentes in dem Serum noch grosse Mengen seines Zymogens (Prothrombin) zurückbleiben, welche durch die zymoplastischen Substanzen in Fibrinferment (Thrombin) übergeführt werden und so dem Serum seine gerinnungserregenden Eigenschaften in erhöhtem Maasse wiedergeben.

Also die Theorie von Schmidt: Die Blutflüssigkeit enthält ursprünglich nur zwei Eiweisskörper, das Albumin und die fibrinogene Substanz. Von dem Moment des Austrittes des Blutes aus dem Körper zerfallen die weissen Blutkörperchen, die Zerfallsproducte lösen sich in der Blutflüssigkeit auf und eines derselben ist das Serumglobulin. Die anderen sind die zymoplastischen Substanzen und das Zymogen des Fibrinfermentes, das Prothrombin. Nun führen die zymoplastischen Substanzen das Prothrombin in das Fibrinferment über, welches letzteres nun bei Gegenwart kleiner Mengen von Neutralsalzen den Zusammentritt des Fibrinogens und Serumglobulins zu Fibrin veranlasst.

Einen bedeutungsvollen Wendepunkt in unserer Frage bedeuten die Untersuchungen Hammarsten's¹⁾. Hammarsten war der Erste, welcher eine reine Fibrinogenlösung, der kein Serumglobulin beigemischt war, dargestellt hat, um sich ein sicheres Urtheil über die Bedeutung des Serumglobulins für

¹⁾ O. Hammarsten: Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung. Upsala 1875.

die Gerinnung zu bilden. Seine Methode beruht darauf, dass er aus filtrirtem Bittersalzplasma das Fibrinogen durch Zusatz des gleichen Volums gesättigter Kochsalzlösung ausfällt, filtrirt, in verdünnter Kochsalzlösung löst, wieder mit gesättigter Kochsalzlösung fällt und diesen Process drei bis vier Mal wiederholt. Schliesslich kommt er zu einer Fibrinogenlösung, welche von Serumglobulin befreit ist. Hammarsten zeigte nun, dass diese reine serumglobulinfreie Fibrinogenlösung mit serumglobulinfreier Fibrinfermentlösung vermischt einen typischen, echten Faserstoff liefert. Dadurch war bewiesen, dass das Serumglobulin zur Faserstoffbildung nicht erforderlich ist. Nichtsdestoweniger stellte sich aber heraus, dass das Serumglobulin einen begünstigenden Einfluss auf die Blutgerinnung auszuüben im Stande ist. Aber ebenso befördernd wirkt auch Calciumchlorid, mit Blutserum behandeltes Casein und viele andere Stoffe. Die Einwirkung des Paraglobulins stellt sich Hammarsten folgendermassen vor¹⁾. «Das Fibrin kann in dem Augenblicke seiner Entstehung durch gewisse Stoffe, unter denen das Alkali und die Salze bisher bekannt sind, in Lösung gehalten werden, und in dem Maasse, wie diese Stoffe durch Zusatz von Serumglobulin gebunden werden, muss wegen des Mangels an den nöthigen Lösungsmitteln, eine grössere Menge des gebildeten Faserstoffes ausgeschieden, d. h. die Gewichtsmenge des Faserstoffes vermehrt werden».

Einen dem Standpunkt der Dorpater Schule gerade entgegengesetzten nimmt Wooldridge ein. Dieser Forscher läugnet vollständig die Betheiligung irgend welcher Formelemente an der Blutgerinnung und versucht den Nachweis zu führen, dass das Blutplasma für sich allein schon alles enthält, was zur Gerinnung nöthig ist. Wooldridge operirt zum grössten Theile mit Peptonplasma. Schmidt-Mühlheim²⁾ und Fano³⁾ nämlich haben gefunden, dass, wenn

¹⁾ L. c., S. 127.

²⁾ Schmidt-Mühlheim: Du Bois-Reym. Arch. 1880.

³⁾ Fano: Du Bois-Reym. Arch. 1881.

man einem Hund in die Blutbahn eine Peptonlösung (wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Albumosen) im Verhältniss von 0,3 gr. Pepton auf 1000 gr. Körpergewicht injicirt, das darauf gelassene Blut flüssig bleibt. Das nach Abschleuderung der Körperchen abgehobene Plasma solchen Blutes bildet nun die Methodik für die Gerinnungsversuche Wooldridge's.

Die Beweise, welche Wooldridge gegen die Betheiligung der Leukocyten und anderer Formelemente an der Blutgerinnung ins Feld führt, sind folgende:

Die Abkühlung, welche die Grundlage der bekannten Versuche Schmidt's, die die Betheiligung der Leukocyten beweisen sollen, bildet, ist für das Blut kein indifferenten Eingriff. Dadurch entfernt man eine Substanz, das A-Fibrinogen, welche durch starkes Abkühlen niedergeschlagen wird. Dieses A-Fibrinogen ist derjenige Körper, welcher dem Plasma die Fähigkeit der Gerinnung verleiht. Peptonplasma ist, wenn es diesen Körper enthält, durch Durchleiten von Kohlensäure, Verdünnen mit Wasser, Filtriren durch eine Thonzelle, Neutralisation mit Essigsäure zum Gerinnen zu bringen. Ist aber das A-Fibrinogen durch Abkühlung entfernt, dann gerinnt das Peptonplasma auf diese Eingriffe hin nicht. Wenn nun zum Plasma das A-Fibrinogen wieder zugesetzt wird, dann erlangt es wieder die Fähigkeit, mit CO_2 u. s. w. zu gerinnen. Ebenso wie A-Fibrinogen wirkt Lecithin. Nachdem aber A-Fibrinogen oder Lecithin auf das Hammarsten'sche Fibrinogen keine gerinnungserzeugende Wirkung ausübt, muss Wooldridge's Ansicht nach im Plasma ein anderes Fibrinogen existiren — das B-Fibrinogen. Das Peptonplasma gerinnt nicht mit Fibrinferment — das daraus gewonnene Hammarsten'sche Fibrinogen oder C-Fibrinogen gerinnt damit; auch in dieser Thatsache findet Wooldridge eine Stütze für seine Anschauung. Das B-Fibrinogen ist die Muttersubstanz des C-Fibrinogens. Die Gerinnung soll nach Wooldridge auf einer Wechselwirkung zwischen A- und B-Fibrinogen beruhen. Dabei soll eine Abgabe von Lecithin von dem A-Fibrinogen und eine Aufnahme desselben durch das B-Fibri-

nogen stattfinden. Ausser den beiden Stoffen, die Wooldridge als A- und B-Fibrinogen bezeichnet und die er aus dem Blutplasma erhielt, stellte er aus Hoden, Lymphdrüsen, Thymus, rothen Blutkörperchen, Gehirn, Chylus Stoffe dar, welche er als Gewebsfibrinogene bezeichnet, welche in verdünnten Säuren unlöslich sind. Diese Stoffe bewirken nicht nur Gerinnung in extravasculären Peptonplasma, sondern sie rufen auch, in den Kreislauf eingespritzt, ausgedehnte intravasculäre Gerinnungen hervor. Bei diesen Gerinnungen verschwinden die Stoffe als solche. Da diese Stoffe auf Salzplasma und reine Fibrinogenlösung unwirksam sind, so enthalten sie kein Fibrinferment. Sie enthalten aber Lecithin, welches ihre Wirkungsweise bedingt. Das Fibrinferment ist ein Gerinnungsproduct, aber kein Gerinnungserzeuger.

Die Resultate der intravasculären Injection der Leukocyten, welche die Schmidt'sche Schule erhielt, muss man dem Gewebssaft zuschreiben, mit welchem sie verunreinigt waren; denn gewaschene Leukocyten sind ganz wirkungslos.

Die Gewebsfibrinogene sind keine Zellenbestandtheile, sondern Bestandtheile der Inter-cellularflüssigkeit — also ist ihre Einwirkung nicht auf die Lymphocyten oder andere Zellen zu beziehen.

Einen wichtigen Fortschritt in der Blutgerinnungsforschung bilden die Untersuchungen, welche eine Beziehung der Blutgerinnung zu den Kalksalzen zu Tage förderten. Schon Virchow¹⁾ hat im Jahre 1846 darauf hingewiesen, dass der Faserstoff regelmässig phosphorsauren Kalk neben phosphorsaurer Magnesia enthält. Virchow nimmt an — merkwürdigerweise ist diese historische Thatsache von allen Forschern unberücksichtigt —, dass der Kalk in einer bestimmten chemischen Verbindung mit dem Faserstoff steht. «Kalkerde und Magnesia kommen im Blut nicht frei vor, sondern sind an die Proteïnsubstanzen (Faserstoff, Eiweiss, Käsestoff) che-

¹⁾ Virchow: Ueber die chemischen Eigenschaften des Faserstoffs. Zeitschr. f. ration. Medicin., 1846, S. 262 ff.

misch gebunden »¹⁾). Auch Brücke²⁾ hat gefunden, dass die Asche des Fibrins immer kalkhaltig ist.

Im Jahre 1875 fand nun Hammarsten³⁾, dass ein Zusatz von Calciumchlorid zu einem Gemenge von Fibrinogen und Fibrinferment die Gerinnung in hohem Maasse beschleunigt und die Fibrinziffer beträchtlich erhöht.

Freund⁴⁾ findet die ganze Ursache der Gerinnung darin, dass sich unlöslicher phosphorsaurer Kalk abscheidet, wobei ein Theil der vorher in der Blutflüssigkeit gelösten Eiweisskörper unlöslich wird und sich als Fibrin abscheidet. Es soll durch Adhäsion der Blutflüssigkeit an die Wand des Gefässes, in welchem das Blut aufgefangen wird, aus den Formelementen phosphorsaures Alkali in das kalksalzhaltige Plasma übergehen und darin soll nun Calciumphosphat gebildet werden. Wenn nun so viel Calciumphosphat entsteht, dass das Medium (Plasma oder ein Transsudat oder eine andere gerinnbare Flüssigkeit) nicht mehr im Stande ist, die ganze Menge Calciumphosphat aufzulösen, so wird nach der Theorie von Freund die Ausscheidung des Ueberschusses einen Anstoss geben zum Unlöslichwerden eines Theils der Eiweisskörper, d. h. sie wird die Gerinnung hervorrufen.

Green⁵⁾ fand, dass in Bittersalzplasma die Gerinnung auch ohne Zusatz von Fibrinferment, durch eine Calciumsulfatlösung — und wie Ringer und Sainsbury⁶⁾ fanden auch durch eine Lösung von CaCl_2 , SrCl_2 und BaCl_2 — hervorgerufen werden kann.

Ein ganz besonderes Verdienst um diese Frage erwarben sich Arthus und Pagés⁷⁾, welche den Nachweis führten, dass die Anwesenheit der Kalksalze für das Zustandekommen der Blutgerinnung ein unbedingtes Erforderniss ist. Sie

¹⁾ L. c., S. 272.

²⁾ L. c.

³⁾ L. c.

⁴⁾ Freund: Med. Jahrb., Jahrg. 1888, S. 289—302.

⁵⁾ Green: Journ. of physiol. Vol. VIII, S. 354.

⁶⁾ Ringer und Sainsbury: Ebendasselbst. Vol. XI, S. 369.

⁷⁾ Arthus und Pagés:

tingen das aus der Ader fließende Blut in einer 1proc. Lösung von Kaliumoxalat — sie verwendeten auch andere Kalksalze fallende Substanzen, wie Fluoride und Seifen — (1 Theil 1proc. Kaliumoxalatlösung auf 10 Theile Blut) und fanden dabei, dass dadurch das Blut seine Gerinnbarkeit verliert, ohne dass ein gesteigerter Gehalt an Neutralsalzen als gerinnungsverhinderndes Moment in Rechenschaft kommt. Setzten sie nun zum Blut, welches auf diese Weise flüssig gemacht wurde, eine entsprechende Menge CaCl_2 hinzu, so gerann es binnen kurzer Zeit zu einem derben Kuchen. Sie ziehen daraus den Schluss: Die Fibrinbildung erfordert das Zusammenwirken dreier Substanzen: einer fibrinogenen Substanz, einer fibrinoplastischen Substanz und des Fibrinfermentes; die fibrinoplastische Substanz ist jedoch nicht das Serunglobulin, sondern eine Kalkverbindung. Sie vergleichen die Fibrinbildung mit der Caseïngerinnung. «La coagulation du sang est une caséification; La fibrine est un caséum».

Ueber die Einwirkung der von mir aus den Leukocyten dargestellten Substanzen auf die Blutgerinnung im extravasculären Blute.

A. Die Zellkernsubstanz, das Nucleohiston.

Die citirten Untersuchungen Rauschenbach's haben biologisch der Lehre von der Blutgerinnung einen weiten Gesichtskreis verliehen. Indem er bewies, dass nicht nur die Leukocyten, sondern überhaupt alle protoplasmatischen Gebilde Träger von Substanzen sind, die die Fähigkeit besitzen, in kalt filtrirtem Pferdeblutplasma und proplastischen Flüssigkeiten Faserstoff zu erzeugen, verlieh er der Blutgerinnungstrage eine viel allgemeinere Bedeutung. Er constatirte, dass Zellen jeder Art kalt filtrirtes Pferdeblutplasma zum Gerinnen bringen, dass ihr Wasserextract auch proplastische Flüssigkeiten zum Gerinnen bringt.

Unbeantwortet blieb die Frage: welcher Stoff der Zelle führt das Fibrinogen in Fibrin über?

Einen Anhaltspunkt für meine Untersuchungen auf diesen Gebiete glaube ich in der Rauschenbach'schen Arbeit selbst gefunden zu haben. Rauschenbach erhielt einen die Gerinnung hervorrufenden Körper, indem er die rothen Blutkörperchen des Huhnes mit kohlenensäurehaltigem Wasser behandelte und den hierbei resultirenden, in Wasser unlöslichen Stoff sammelte. Er glaubte, Stromata der rothen Blutkörperchen in der Hand zu haben; in der That aber hatte er fast nur die Kerne derselben in der Hand, welchen noch ein «faseriges Gebilde»¹⁾ anhängt. Ich habe mich bei der Wiederholung dieses Versuches von der Richtigkeit meiner Anschauung überzeugt.

Immerhin hatte Rauschenbach in allen als Gerinnungserreger benutzten Körpern sehr nucleinreiche Gebilde vor sich und besonders beachtenswerth erschien mir die Thatsache, dass es unter allen von ihm untersuchten Cellulargebildern kein einziges gab, «welches in seiner Wirkung auf das Blutplasma den Spermatozoen gleichgekommen wäre»²⁾. In der Thatsache, dass die Spermatozoen in nicht vollen zwei Minuten, als die Temperatur des Plasmas sich erst wenige Grade über den Nullpunkt erhoben hatte, eine Gerinnung erzeugten, fand ich schon gleich zu Anfang einen Rückhalt für die Vermuthung, dass mit dem Nucleinreichtum der protoplasmatischen Gebilde ihr coagulatives Vermögen wächst. Es ist ja bekannt, wie ausserordentlich reich an Nuclein die männlichen Sexualzellen sind. Miescher³⁾ fand, dass der Gehalt der Lachspermatozoen an Nucleinsäure-Protamin mehr als 75% der Gesamtmenge der Spermatozoen beträgt. Sonst enthalten die Spermatozoen — wie bis jetzt angenommen wird — keine einzige Substanz, welche sie von anderen Zell-

¹⁾ Kossel, Ueber einen peptonartigen Bestandtheil des Zellkerns. Diese Zeitschrift 1877, S. 511.

²⁾ L. c., S. 67.

³⁾ Miescher: Die Spermatozoen einiger Wirbelthiere. Ein Beitrag zur Histochemie. Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel, VI. Heft, 1874.

arten unterscheidet und auch keine weder primäre noch secundäre Bestandtheile in grösserer Menge als andere Zellen aufzuweisen. Ich war also gezwungen, schon von vornherein die Vermuthung zu hegen, dass dieses starke coagulative Vermögen der Spermatozoen, welches sogar dasjenige der Leukocyten in erheblichem Maasse übertraf, auf ihrem hohen Nuclein-gehalte beruht.

Ob eine Beziehung der Nucleinsubstanzen der Leukocyten zu der Blutgerinnung thatsächlich besteht, darüber konnte nur die Reindarstellung derselben aus den Leukocyten und Prüfung derselben auf ihr coagulatives Vermögen entscheiden.

Zu diesem Ende unternahm ich eine chemische Analyse der Lymphocyten aus der Thymusdrüse und den Lymphdrüsen, deren Ergebnisse in einer Arbeit in derselben Zeitschrift niedergelegt sind¹⁾. Da wir zur Zeit über keine brauchbare Methode zur Isolirung der Leukocyten direct aus dem Blut verfügten, musste ich mich mit den leicht zu beschaffenden Lymphocyten begnügen, umsomehr, als zu erwarten war, dass sie chemisch ähnlich oder gleich zusammengesetzt sind wie die Blutleukocyten.

Bei meinen mit den nach einer anderen Ortes²⁾ angegebenen Methode isolirten Lymphocyten angestellten Untersuchungen stellte sich heraus, dass der Zellkern derselben aus einer Substanz besteht, welche der Repräsentant einer vollständig neuen Gruppe von Substanzen im Thierkörper ist. Dieser Körper, das Nucleohiston, ist — wie schon der Name besagt — eine Verbindung eines basischen Eiweisskörpers, des Histons mit einem sauren Nucleoproteid, dem Leukonuclein. Da es für das Verständniss der folgenden Versuche und Schlüsse eine grosse Erleichterung darstellt, erlaube ich mir, an der Hand des folgenden, gemäss den neuesten Untersuchungen A. Kossel's und A. Neumann's³⁾ etwas modi-

¹⁾ Leon Lilienfeld: Zur Chemie der Leukocyten, Bd. XVIII, Heft 5 und 6, S. 473 ff.

²⁾ Lilienfeld, l. c., S. 474.

³⁾ Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, XXVII, S. 2215.

ficirten Schemas¹⁾ den Abbau des Nucleohistons zu seinen Bestandtheilen ins Gedächtniss zu rufen:

Nucleohiston

in Wasser löslich, zerfällt bei
Behandlung mit Salzsäure
oder Ba(OH)₂ oder Ca(OH)₂
in

Histon
eine Eiweissbase

Leukonuclein
eine Säure, in Mineralsäuren
löslich, zerfällt bei der Be-
handlung mit starken Al-
kalien

in

Eiweiss

Adenylsäure (Nucleinsäure)
zerfällt beim Erhitzen mit Mi-
neralsäuren unter Bildung von
organischen Substanzen (Ade-
nin, Thymin, Lävulinsäure) und
Phosphorsäure.

Um ganz kurz darauf hinzuweisen, wird das Nucleohiston durch Extraction der betreffenden Zellen mit Wasser, Fällen mit Essigsäure und weitere Reinigung durch mehrfaches Lösen in verdünntem Alkali und Wiederausfällen dargestellt. Seine Zusammensetzung ist C = 48,46%, H = 7%, N = 16,86%, P = 3,025%, S = 0,701%.

Das Nucleohiston ist eine sehr verbreitete Substanz. Ich habe sie in den Lymphocyten der Thymus- und der Lymphdrüsen, in den Milzzellen, den Hodenzellen, den unreifen Karpfenspermatozoen, dem Dünndarmepithel nachgewiesen.

Zur Klarstellung der Blutgerinnungsversuche ist es von Wichtigkeit, dass schon Rauschenbach²⁾ und Wooldridge³⁾ durch Extraction vieler Organe mit Wasser und Säurefällung Substanzen gewannen, über deren Eigenschaften sie jedoch gar keine Angaben machen und deren chemische Natur ihnen

¹⁾ L. c., S. 483.

²⁾ L. c.

³⁾ Du Bois Reym. Arch.

unbekannt ist. Wooldridge erklärt sein «Gewebsfibrinogen» für ein Gemenge von Lecithin mit Eiweiss. Es unterliegt keinem Zweifel und ich habe mich zu wiederholten Malen überzeugt, dass der grösste Theil des sogen. «Gewebsfibrinogens» von Wooldridge aus Nucleohiston besteht, was — wie wir sehen werden — zur Richtigstellung seiner Versuche und Schlussfolgerungen von eminenter Bedeutung ist.

Ich übergehe nunmehr zu den Versuchen über die Einwirkung des Nucleohistons auf das extravasculäre Blut und die aus demselben gewonnenen, hier in Betracht kommenden Eiweissstoffe. Ich untersuchte die Einwirkung des Nucleohistons: 1. auf kalt filtrirtes Pferdeblutplasma, 2. auf Schmidt's Reactionsflüssigkeit, 3. auf Höhlenflüssigkeiten des Pferdes, 4. auf nach Hammarsten bereitete reine Fibrinogenlösung, 5. auf Peptonplasma.

Bei all' diesen Versuchen zog ich ausser der Controllprobe als solchen noch immer diejenigen Gerinnungserreger in das Experiment, welches bekanntermaassen die betreffende Reactionsflüssigkeit am schnellsten zur Gerinnung bringt.

I. Nucleohiston und kalt filtrirtes Pferdeblutplasma.

- Versuch I. a) 1 ccm. einer 3,75 proc. Nucleohistonlösung von neutraler Reaction (aus Thymus) mit 8 ccm. kalt filtrirtem Pferdeblutplasma von 0° vermischt. Es entsteht ein Niederschlag. In 1 Minute tritt vollständige Gerinnung ein; die Temperatur hat noch keine 4° C. erreicht.
- b) Controllprobe. 8 ccm. kalt filtrirtes Pferdeblutplasma sich allein bei Zimmertemperatur überlassen. Gerinnt erst nach 4 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Quantitative Fibrinbestimmung in beiden Proben.

Plasma, rein	0,44 % Fibrin.
Plasma mit Nucleohiston	0,73 % Fibrin.

- Versuch II. a) 5 ccm. einer 3,75 proc. Nucleohistonlösung von neutraler Reaction werden mit 8 ccm. kalt filtrirtem Pferdeblutplasma von 0° vermischt und in Zimmertemperatur gestellt. Es bildet sich ein massiger Niederschlag, der sich gut zu Boden setzt. Die Gerinnung bleibt ganz aus.
- b) Controllprobe. 8 ccm. desselben Plasmas sich allein bei Zimmertemperatur überlassen. Beginn der Gerinnung nach 1 Stunde.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass das Nucleohiston für sich in hohem Maasse die Gerinnung des kaltfiltrirten Pferdeblutplasmas beschleunigt und die Fibrinmenge um ein Beträchtliches erhöht, wenn es in kleinen Mengen zum Plasma gefügt wird. In grösseren Mengen dagegen wirkt es **direct gerinnungswidrig**.

II. Nucleohiston und proplastische Flüssigkeiten.

Bei den Versuchen mit Nucleohiston und proplastischen Flüssigkeiten stellte es sich heraus, dass das ganz reine Nucleohiston: 1. keine Gerinnung hervorruft, 2. die mit einem anderen Erreger eingeleitete Gerinnung um ein Beträchtliches verzögert. Hierbei beobachtete ich die wichtige Thatsache, dass der Zusatz des Nucleohistons zu Salzplasma (Schmidt's Reactionsflüssigkeit) und zur Peritoneal- und Pericardialflüssigkeit des Pferdes immer die Bildung eines massigen Niederschlages veranlasst, welcher sich gut zu Boden setzt.

- Versuch I. a) 3 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit, [bereitet (Salzplasma) durch Auflösen des Trockenrückstandes von $MgSO_4$ -Plasma in Wasser (1:7,5)] werden mit 20 ccm. einer kräftigen Fibrin fermentlösung versetzt. Gerinnung in 25 Minuten.
- Temperatur 16°. b) 3 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. einer 1 proc. Nucleohistonlösung versetzt. Bildung eines Niederschlages. Keine Gerinnung.
- c) 3 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. der erwähnten Fibrin fermentlösung und 6 ccm. einer 4 proc. Nucleohistonlösung. Niederschlagbildung. Gerinnung nach 5 Stunden. — Die Mischung enthält 0,8% Nucleohiston.
- Versuch II. a) 10 ccm. klare, von deren Zellen durch die Centrifuge (Peritonealflüssigkeit.) befreite Peritonealflüssigkeit vom Pferde mit 5 ccm. Rinderserum. Gerinnung nach 35 Minuten.
- Temperatur 15°. b) 10 ccm. desselben Liquor peritonei mit 5 ccm. einer 1 proc. Nucleohistonlösung. Keine Gerinnung. — Niederschlagbildung.
- c) 10 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit mit 5 ccm. einer 2 proc. Nucleohistonlösung und 5 ccm. desselben Rinderserums. Gerinnung nach 6 Stunden.

- Versuch III. a) 50 ccm. Liquor pericardii vom Pferde mit 25 ccm. einer kräftigen Fibrin fermentlösung aus Rinderserum versetzt. Gerinnung nach 40 Minuten.
(Liquor pericardii.)
- b) 50 ccm. derselben Pericardialflüssigkeit mit 25 ccm. einer 1 proc. Nucleohistonlösung versetzt. Niederschlagbildung. Keine Gerinnung.
- c) 50 ccm. derselben Pericardialflüssigkeit mit 10 ccm. einer 5 proc. Nucleohistonlösung und 25 ccm. derselben Fibrin fermentlösung. Nach 6 Stunden noch keine Gerinnung. Die Gerinnung trat während der Nacht ein.

Zu demselben Ergebniss führte ein Versuch mit einer reinen Fibrinogenlösung.

- Versuch IV. a) 10 ccm. einer reinen nach Hammarsten bereiteten Fibrinogenlösung mit 10 ccm. Fibrin fermentlösung. Gerinnung nach 5 Stunden.
(Reine Fibrinogenlösung.)
- b) 10 ccm. der reinen Fibrinogenlösung mit 10 ccm. einer 1 proc. Nucleohistonlösung. Bildung eines massigen Niederschlages. Keine Gerinnung.
- c) 10 ccm. der reinen Fibrinogenlösung mit 10 ccm. Fibrin ferment und 2 ccm. einer 5 proc. Nucleohistonlösung. Gerinnung nach 5 Stunden.

Zu einem vollständig entgegengesetzten Resultate führten nun die Versuche mit Peptonplasma. Hierbei nämlich stellte es sich heraus, dass das Peptonplasma mit Fibrin ferment nicht gerinnt, dass dagegen Nucleohiston nicht nur die Gerinnung nicht verzögert, sondern sie selbst einleitet.

- Versuch V. a) 15 ccm. Peptonplasma — (gewonnen durch Injection einer 10 proc. Lösung von Grübler'schem Pepton im Verhältniss 0,3 gr. Pepton zu 1000 gr. Körpergewicht in die Jugularis, Verblutung des Thieres aus der Carotis und Abschleuderung der Formelemente durch die Centrifuge) — mit 15 ccm. einer kräftigen Fibrin fermentlösung. Keine Gerinnung.
(Peptonplasma.)
- b) 15 ccm. desselben Peptonplasmas mit 15 ccm. Nucleohistonlösung (Procentgehalt nicht genau bestimmt). Entstehung eines grossen Niederschlages. Gerinnung nach 10 Minuten.

Dass das zu diesem Versuche benutzte Fibrinferment wirklich wirksam war, erhellt aus folgendem Experiment:

- c) 3,5 ccm. Schmidt's Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. derselben Fibrinfermentlösung. **Gerinnung nach 15 Minuten.**

Aus diesen Versuchen ergibt sich: Das reine Nucleohiston besitzt die ausgesprochene Fähigkeit, den proplastischen Flüssigkeiten ihre Proplasticität zu wahren, d. h. die Gerinnung in den proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten stark zu verzögern. Dagegen ruft das Nucleohiston in kalt filtrirtem Pferdeblutplasma und Peptonplasma unweigerlich Gerinnung hervor — in Ersterem nur bei richtig getroffenem Mengenverhältniss.

Schon dieses merkwürdige Verhalten legte den Gedanken nahe, dass im Nucleohiston eventuell zwei Stoffe vorhanden sind, von welchen der eine die Gerinnung verhindert resp. verzögert, der andere die Gerinnung hervorruft resp. beschleunigt. Die darauf angelegten Versuche bestätigten es und gaben auch Aufklärung darüber, warum das eine Mal die eine, das andere die andere Wirkungsweise zur Geltung kommt.

Die Versuche, welche eine Etappe zur Aufklärung dieser Verhältnisse vorstellen, sollen jetzt folgen.

Dieselben Versuche mit Nucleohiston, welches mit Kalkhydrat oder Baryumhydrat behandelt war.

Nucleohiston in $Ba(OH)_2$ gelöst und kalt filtrirtes Pferdeblutplasma.

Versuch I. a) 10 ccm. kalt filtrirtes Pferdeblutplasma und 3 ccm. einer 2proc. Nucleohistonlösung in $Ba(OH)_2$ gelöst und mit Essigsäure neutralisirt. In 3 Minuten vollständige Gerinnung.

b) Controllprobe. 10 ccm. desselben Plasmas sich allein bei Zimmertemperatur überlassen. Gerinnung nach 2 Stunden.

Versuch II. a) 10 ccm. kalt filtrirtes Pferdeblutplasma und 6 ccm. einer 5proc. Nucleohistonlösung in $Ba(OH)_2$ gelöst. Gerinnung nach 4 Minuten.

b) Controllprobe. 10 ccm. desselben Plasmas sich allein überlassen. Gerinnung nach $1\frac{1}{2}$ Stunden.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Behandlung des Nucleohistons mit Baryumhydrat seine Eigenschaften dem kaltfiltrirten Pferdeblutplasma gegenüber verändert. Dieselbe Menge, welche früher genügte, um dem Plasma seine spontane Gerinnbarkeit zu rauben, rufen jetzt selbst in dem Plasma intensiv Gerinnung hervor. Noch deutlicher wird diese Einwirkung des Baryumhydrats und Aetzkalks bei folgenden Versuchen mit proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten.

Die Nucleohistonlösungen wurden folgendermaassen vorbehandelt. Zu der Lösung des Nucleohistons wird Kalkwasser zugesetzt, sehr vorsichtig, so lange ein Niederschlag entsteht. Ein Ueberschuss und ein zu Wenig sind strengstens zu vermeiden. Der entstandene Niederschlag setzt sich gut zu Boden. In die überstehende Flüssigkeit wird Kohlensäure eingeleitet, vom CaCO_3 abfiltrirt und das Filtrat zu den nun folgenden Versuchen verwendet. Der Procentgehalt des gelösten Stoffes wurde durch Eindunsten in gewogener Platinschale und Wägen bestimmt.

Mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ behandeltes Nucleohiston und proplastische Flüssigkeiten.

- Versuch I. a) 4 cbcm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 cbcm. (Salzplasma.) einer ungefähr 1 proc. Lösung der Substanz, welche aus dem Nucleohiston durch Behandlung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ entstand. Gerinnt nach 40 Minuten. Keine Niederschlagbildung.
- b) Controllprobe I. 4 cbcm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 cbcm. destill. Wassers. Keine Gerinnung.
- c) Controllprobe II. 4 cbcm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 cbcm. einer ungefähr gleich concentrirten Lösung von CaSO_4 wie bei a) in Bezug auf den Ca-Gehalt. (Bestimmt durch Titration mit H_3PO_4 und Phenolphthalein. Die Bestimmungsmethode ist zwar ungenau — aber für vorliegende Zwecke ungenügend). Gerinnung nach 5 Stunden.
- d) Controllprobe III. 4 cbcm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit und 30 cbcm. Fibrinfermentlösung. Gerinnung nach 30 Minuten.
- Versuch II. a) 50 cbcm. klare Peritonealflüssigkeit und 20 cbcm. einer (Liquor peritonei.) 1 proc. Lösung der bei der Behandlung des Nucleohistons mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ entstandenen Substanz. Gerinnung nach 1 Stunde 30 Minuten.

- b) Controllprobe I. 50 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit mit 20 ccm. Wasser. Keine Gerinnung.
- c) Controllprobe III. 50 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit mit 20 ccm. Wasser und einigen Tropfen 2 proc. CaCl_2 -Lösung. Keine Gerinnung.
- d) Controllprobe IV. 50 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit und 20 ccm. Fermentlösung. Gerinnung nach 30 Minuten.

Versuch III. a) 10 ccm. Pericardialflüssigkeit vom Pferde mit 5 ccm. (Liquor pericardii) der im I. und II. Versuch benutzten durch Ca(OH)_2 aus Nucleohiston gewonnenen Lösung. Gerinnung nach 2 Stunden,

- b) Controllprobe I. 10 ccm. derselben Pericardealflüssigkeit und 5 ccm. dest. Wasser. Keine Gerinnung.
- c) Controllprobe III. 10 ccm. Liquor pericardii und 5 ccm. Wasser, dem einige Tropfen 2 proc. CaCl_2 -Lösung zugesetzt wurden. Keine Gerinnung.
- d) Controllprobe IV. 10 ccm. Liquor pericardii und 5 ccm. Fibrinfermentlösung. Gerinnung nach 1 Stunde.

Mit Ca(OH)_2 behandeltes Nucleohiston und reine Fibrinogenlösung.

- Versuch. a) 30 ccm. reiner Fibrinogenlösung mit 15 ccm. der 1 proc. Lösung der Substanz, welche aus dem Nucleohiston durch Ca(OH)_2 gewonnen wurde, vermischt. Gerinnung nach 1 Stunde.
- b) Controllprobe I. 30 ccm. einer Fibrinogenlösung mit 15 ccm. Wasser, welchem einige Tropfen einer 1 proc. CaCl_2 -Lösung zugesetzt wurden. Keine Gerinnung
 - c) Controllprobe II. 30 ccm. reiner Fibrinogenlösung und 15 ccm. Fibrinfermentlösung. Gerinnung nach 35 Minuten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die Thatsache, dass Ca(OH)_2 und Ba(OH)_2 , mit welchem ich dieselben Resultate erzielt habe, das Nucleohiston, welches für sich die Gerinnung in den proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten bedeutend verzögert, geschweige denn hervorruft, in einen Körper verwandeln, der in denselben Reactionsflüssigkeiten unweigerlich Faserstoffgerinnung hervorruft.

Worin besteht nun die durch Aetzbaryt oder Aetzkalk in dem Nucleohiston gesetzte Veränderung? Folgende That-

sache schien auf den ersten Blick eine Antwort auf diese Frage zu liefern.

Wenn man zu einer Nucleohistonlösung Kalkwasser zusetzt, so entsteht ein Niederschlag, welcher bei weiterem Zusatz von Kalkwasser theilweise verschwindet, um dann bei noch weiterem Zusatz wieder zu erscheinen. Wenn man nun den zuerst gebildeten Niederschlag auf einem Filter sammelt und untersucht; so ist es ein Leichtes, sich zu überzeugen, dass er aus Histon besteht — d. h. aus einer Kalkverbindung des Histons. Löst man den Kalkniederschlag in Salzsäure und fügt Ammoniak hinzu, so entsteht eine flockige Fällung, der Körper gibt in der Kälte Biuretreaction, ist nach stattgehabter Reinigung phosphorfrei, kurzum das Kalkwasser hat von Nucleohiston das Histon abgespalten. Das Histon geht nun bei weiterem Zusatz von Kalkwasser in Lösung und der bei noch weiterem Zusatz von Kalkwasser auftretende Niederschlag ist kein Histon mehr, sondern das Kalksalz des zweiten Spaltungsproductes, des Nucleins, welches in grossen Kalkwassermengen unlöslich ist.

Auch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ spaltet das Nucleohiston, aber in äusserlich anderer Weise. Es entsteht bei Zusatz von Barytwasser zu gelöstem Nucleohiston ein Niederschlag, der jedoch nicht aus Histon, sondern dem Barytsalz des Nucleins besteht. Das Histon geht bei der Spaltung durch $\text{Ba}(\text{OH})_2$ sofort in's Filtrat, aus welchem es als Baryumverbindung durch Alkohol ausgefällt werden kann.

Nach diesem Befunde lag es nahe, daran zu denken, dass die Einwirkung des Aetzkalks und Aetzbaryts auf das Nucleohiston, welche demselben gerinnungserregende Eigenschaften verleihen, darauf beruht, dass das Nucleohiston gespalten wird und so die gerinnungserregende Componente — Nuclein oder Histon — seine Wirksamkeit frei entfalten kann.

Es trat also die Nothwendigkeit an mich heran, die beiden Spaltungscomponenten des Nucleohistons — das Leukonuclein und das Histon — jede für sich auf ihre gerinnungserzeugenden Eigenschaften zu prüfen. Ich begann mit dem Nuclein.

II. Leukonuclein und Gerinnung.

Das Leukonuclein lässt sich auf vielfache Weise vom Nucleohiston abspalten.

1. Durch Behandlung des Nucleohistons mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ oder $\text{Ca}(\text{OH})_2$, was ich oben beschrieben habe.
2. Durch verdünnte Salzsäure. Behandelt man Nucleohiston mit verdünnter Salzsäure (8 ccm. rauchender HCl auf 1000 ccm. H_2O), so bleibt das Leukonuclein ungelöst zurück, während das Histon in Lösung geht. Durch mehrmalige Extraction mit 0,8% HCl , Lösung in verdünntem Alkali und Wiederausfällung mit Säure. Behandeln mit Alkohol und Aether kann man das Leukonuclein rein gewinnen. Dieses ist löslich im Ueberschuss von HCl , unlöslich, oder schwer löslich in Wasser.
3. Durch Behandeln des Nucleohistons mit kochendem Wasser. Hierbei geht das Nuclein in Lösung und kann, nach Concentration derselben auf dem Wasserbade durch Alkohol oder verdünnte Salzsäure ausgefällt werden. Dieses Nuclein ist löslich in Wasser und überschüssiger Salzsäure.
4. Durch Behandeln des Nucleohistons mit Alkalien. Lässt man Nucleohiston in mässig starker (10%) Natronlauge einige Stunden stehen und fällt dann mit Säure, so bekommt man ebenfalls ein Nuclein, welches in überschüssiger HCl , nicht aber in Wasser löslich ist.
5. Durch künstlichen Magensaft. Behandelt man Nucleohiston längere Zeit mit Pepsin-Chlorwasserstoffsäure im Brütoven bei $37-40^\circ$, so bleibt ein ungelöster Rückstand zurück, welcher ebenfalls aus Nuclein besteht. Dieses ist jedoch weder in Wasser noch überschüssiger Salzsäure löslich.

Obzwar nun die nach verschiedenen Methoden aus dem Nucleohiston gewonnenen Nucleine verschiedene Löslichkeitsverhältnisse zeigen, so stimmen sie alle in ihrer Elementarzusammensetzung genau miteinander überein. Ihr Phosphorgehalt schwankt zwischen 4,7 und 4,99%.

Zu den gleich zu besprechenden Gerinnungsversuchen benutzte ich das Leukonuclein 2, welches aus dem Nucleohiston durch verdünnte Salzsäure gewonnen wird. In Anwendung kamen neutrale Lösung ganz reiner, zuvor analysirter Präparate.

Leukonuclein und kalt filtrirtes Pferdeblutplasma.

- Versuch. a) 7 ccm. kalt filtrirtes Pferdeblutplasma mit 1 ccm. einer 2proc. Leukonucleinlösung versetzt. Gerinnt nach 8 Minuten. — Die Temperatur hat noch keine 10° erreicht.
- b) Controllprobe. 7 ccm. kalt filtrirtes Pferdeblutplasma für sich allein bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Gerinnung nach 1½ Stunden.

Schon dieser Versuch lehrt, dass das gerinnungserregende, coagulative Vermögen des Nucleohistons durch die Abspaltung des Histons nicht verloren gegangen ist. Dass es aber die Spaltung allein nicht ist, welche bei der Behandlung des Nucleohistons mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und $\text{Ba}(\text{OH})_2$ aus einer gerinnungswidrigen eine gerinnungseinleitende Substanz erzeugte, lehrten folgende Versuche.

Leukonuclein und proplastische Flüssigkeiten.

- Versuch I. a) 3 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit werden mit (Salzplasma.) 20 ccm. einer 1proc. Leukonucleinlösung versetzt. Entstehung eines massigen, sich gut zu Boden setzenden Niederschlages. Keine Gerinnung.
- b) 3 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. einer kräftigen Fibrinfermentlösung. Gerinnung in 25 Minuten.
- c) 3 ccm. derselben Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. derselben Fermentlösung und 5 ccm. einer 3proc. Leukonucleinlösung. Gerinnung in 25 Minuten.
- Versuch II. a) 25 ccm. klare Peritonealflüssigkeit mit 12 ccm. einer (Peritoneal- flüssigkeit.) 1proc. Leukonucleinlösung. Massiger Niederschlag. Keine Gerinnung.
- b) 25 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit mit 12 ccm. einer Fibrinfermentlösung. Gerinnt nach 1 Stunde.
- c) 25 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit mit 12 ccm. Fibrinfermentlösung und 5 ccm. einer 3proc. Leukonucleinlösung. Gerinnt nach 55 Minuten.

- Versuch III. a) 10 ccm. Liquor pericardii vom Pferde und 5 ccm. der (Liquor pericardii.) 1 proc. Leukonucleinlösung. Entstehung eines Niederschlages. Keine Gerinnung.
- b) 10 ccm. derselben Pericardialflüssigkeit vom Pferde mit 5 ccm. der Fibrinfermentlösung. Gerinnung nach 50 Minuten.
- c) 10 ccm. Liquor pericardii mit 5 ccm. Fibrinferment und 2 ccm. 3 proc. Leukonucleinlösung. Gerinnung nach 50 Minuten.

Zu dem gleichen Resultate führte ein Versuch mit reiner Fibrinogenlösung.

- Versuch. a) 20 ccm. einer reinen nach Hammarsten dargestellten Fibrinogenlösung und 10 ccm. einer 1 proc. Leukonucleinlösung. Bildung eines Niederschlages. Keine Gerinnung.
- b) 20 ccm. der reinen Fibrinogenlösung und 10 ccm. Fibrinferment. Gerinnung nach 20 Minuten.
- c) 20 ccm. der reinen Fibrinogenlösung, 10 ccm. Fibrinferment und 3 ccm. 3 proc. Leukonucleinlösung. Entstehung eines Niederschlages. Gerinnung nach 20 Minuten.

Zu einem anderen Ergebniss leitete ein Versuch mit Leukonuclein und Peptonplasma.

- Versuch. 10 ccm. Peptonplasma vom Hunde mit 5 ccm. einer 10 proc. Leukonucleinlösung. Gerinnung nach 10 Minuten. — Vorherige Bildung eines Niederschlages.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass es nicht die Spaltung des Nucleohistons ist, welche bei der Behandlung desselben mit Kalkwasser oder Barytwasser ihm coagulatives Vermögen verleiht. Dass aber die Abspaltung des Histons einen ausserordentlich wichtigen Einfluss ausübt, das beweisen die Versuche, in welchen das Leukonuclein zu spontan gerinnenden Mischungen von proplastischen oder fibrinogenen Flüssigkeiten zugesetzt worden ist. Während nämlich das Nucleohiston die Gerinnung derselben deutlich verzögerte, übte das Leukonuclein gar keinen qualitativen Einfluss auf die Gerinnung aus.

Durch die Abspaltung des Histons verliert also das Nucleohiston seine gerinnungshemmende

Eigenschaft — es entsteht aber ein Nuclein, welches für sich keine coagulatives Vermögen besitzt.

Es liegt selbstverständlich nach diesen Experimenten nahe, die gerinnungshemmenden Eigenschaften des Nucleohistons seiner Componente dem Histon zuzuschreiben. Wir werden später sehen, dass sich diese Annahme durch das Experiment bestätigt.

Wenn also die Versuche mit freiem Leukonuclein auch einen wichtigen Schritt in der Erklärung der gerinnungshemmenden Eigenschaften des Nucleohistons bedeuten, so erklären sie dennoch die Thatsache nicht, dass Aetzkalk und Aetzbaryt aus dem Nucleohiston einen Gerinnungserreger machen. Die zunächst in Erwägung zu ziehende Erklärung wäre also diejenige, dass das Nucleohiston resp. seine Componente das Leukonuclein als solches unwirksam, als Kalkverbindung dagegen wirksam ist — eine Annahme, welche von Pikelharing gemacht worden ist. Diese Annahme erwies sich als völlig unhaltbar, wie folgende Versuche zeigen.

Wie schon erwähnt, fiel es mir auf, dass wohl das Nucleohiston, als das Leukonuclein in allen Reactionsflüssigkeiten, die in Verwendung kamen — also im kalt filtrirten Pferdeblutplasma, in proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten, und im Peptonplasma massige, sich gut zu Boden setzende Niederschläge erzeugte. Diese meine Beobachtung hat mich zu einer Reihe von Experimenten veranlasst, welche die Sachlage aufgeklärt haben.

Es hat sich nämlich ergeben, dass die durch die Nucleinsubstanzen in allen Fibrinogen enthaltenden Flüssigkeiten, ohne Rücksicht auf ihre sonstige Beschaffenheit erzeugten und gewaschenen Niederschläge einen Körper darstellen, welcher die Eigenschaft besitzt, mit Kalk- oder Barytsalzen ohne anderen Zusatz allein zu gerinnen.

Experimentelle Belege:

I. Nucleohiston.

I. Salzplasma. Zu 15 cem. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit wird eine 5proc. Nucleohistonlösung so lange zugesetzt, bis noch Niederschlag entsteht. Derselbe wird schnell auf einem Filter ge-

sammelt, mit kaltem Wasser gewaschen, vom Filter genommen in verdünnter Sodalösung gelöst und 2 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung zugesetzt. Gerinnung nach 20 Minuten.

II. Kaliumoxalatplasma. Aus 150 ccm. Kaliumoxalatplasma vom Hunde wird durch Nucleohistonlösung der betreffende Niederschlag erzeugt, gesammelt, gewaschen, in verdünntem Na_2CO_3 gelöst und zu 3 ccm. der Lösung 2 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung zugefügt. Gerinnung nach 45 Minuten.

III. Peritonealflüssigkeit, ebenso behandelt. 4 ccm. der Lösung des Nucleohistonniederschlages mit einigen Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung versetzt. Gerinnung nach 40 Minuten.

IV. Liquor pericardii ebenso behandelt. 2 ccm. der Lösung des Nucleohistonniederschlages mit 3 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung. Gerinnung nach einer halben Stunde.

V. a) Reine Fibrinogenlösung. 20 ccm. einer reinen Fibrinogenlösung mit einer 3–4proc. Nucleohistonlösung ausgefällt, Niederschlag gesammelt, gewaschen, in Na_2CO_3 gelöst. Zu 3 ccm. der Lösung 3 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung. Gerinnung nach einer halben Stunde.

b) Controllprobe. 10 ccm. derselben Fibrinogenlösung mit 3 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung. Keine Gerinnung.

Das selbe Resultat, nur mit viel kürzerer Gerinnungszeit, ergaben die Versuche mit Leukonuclein. Da die Experimente mit der reinen Fibrinogenlösung die weitestwichtigsten sind, beschränke ich mich auf die Anführung der Letzteren:

Versuch. a) 30 ccm. reiner Fibrinogenlösung aus Hundeblut werden mit einer schwach sauer reagirenden Lösung von Leukonuclein gefällt, der entstandene Niederschlag auf einem Filter gesammelt und schnell mit kaltem Wasser ausgewaschen. Der Niederschlag wird vom Filter genommen und in 12 ccm. verdünnter Sodalösung gelöst. 4 ccm. dieser Lösung mit 3 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung. Gerinnung nach 5 Minuten.

b) Controllprobe. 10 ccm. reiner Fibrinogenlösung mit 3 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung versetzt. Keine Gerinnung.

Wichtig war nun die Frage, ob auch beim Abbau des Nucleins zur Nucleinsäure, also zum eiweissfreien Spaltungsproduct des Nucleohistons, diese merkwürdige Eigenschaft nicht verloren geht, d. h. ob auch die eiweissfreie Nucleinsäure aus dem Fibrinogen einen Körper herausfällt, welcher

schon für sich ohne Zuhülfenahme irgend einer anderen Substanz mit Kalksalzen gerinnt. Die daraufhin gerichteten Versuche haben ergeben, dass die Nucleinsäure ebenso und noch intensiver wirkt wie die vorher erwähnten Nucleoproteide, d. h. die Nucleinsäure fällt aus Fibrinogenlösungen eine Substanz, welche noch schneller mit Kalksalzen gerinnt, wie die vorausgegangenen durch Fällung mit Nucleohiston und Leukonuclein erhalten. Die zu diesen Versuchen verwendete Säure verdanke ich der grossen Güte des Herrn Prof. Kossel. Sie stammte aus den Thymuslymphocyten.

Versuch. a) 30 ccm. reiner Fibrinogenlösung werden mit Nucleinsäure versetzt, so lange ein Niederschlag entsteht. Der Niederschlag wird gesammelt, schnell gewaschen und in verdünnter Na_2CO_3 gelöst. Zu 5 ccm. der Lösung werden 4 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung zugesetzt. Gerinnt nach 1 Minute zu einem festen Kuchen.

b) 5 ccm. der ursprünglichen Fibrinogenlösung und 4 Tropfen 6proc. CaCl_2 -Lösung. Keine Gerinnung.

Diesen Versuch habe ich viele Male wiederholt und jedes Mal setzte mich die schnelle, fast momentane Gerinnung des Nucleinsäureniederschlages, den man aus Fibrinogen gewinnt mit Kalksalzen, in Erstaunen.

Bei der Ausführung dieser Versuche muss man jedoch auf einige Einzelheiten Rücksicht nehmen, welche ihr Gelingen bedingen. Diese sind: 1. schnelle Operation, 2. der entstandene Körper darf nicht zu lange mit Na_2CO_3 in Berührung bleiben, denn in alkalischer Lösung aufbewahrt, verliert er schon nach 12 Stunden seine Fähigkeit, mit Kalksalzen Fibrin zu geben.

Wenn ich nun das wichtige Ergebniss dieser Versuche resumire:

Der Hauptbestandtheil des Leukocytenkerns, das Nucleohiston, besitzt zwei entgegengesetzte Eigenschaften: 1. eine gerinnungshemmende, 2. eine gerinnungserregende, die zweite nur unter ganz bestimmten Bedingungen.

Durch Abspaltung des Histons geht die gerinnungshemmende Eigenschaft des Nucleohistons verloren.

Kalkhydrat und Baryumhydrat spalten das Histon ab und bewirken, dass das zweite Spaltungsproduct Leukonuclein bei Gegenwart von Aetzkalk und Aetzbaryt in Fibrinogenlösungen Gerinnung erzeugt.

Das freie Leukonuclein ruft keine Gerinnungen in Fibrinogenlösungen hervor.

Aus einer reinen, weder für sich allein, noch auf Zusatz von Kalksalzen gerinnenden Fibrinogenlösung fällen Nucleohiston, Leukonuclein und Nucleinsäure eine Substanz aus, welche mit Zuhilfenahme von Soda in Wasser gelöst, bei Zusatz einiger Tropfen von Calciumchloridlösung im Verlauf eines kurzen Zeitraumes, zu einem festen Faserstoffkuchen gerinnt.

Diese ganz merkwürdige Thatsache, dass das nach der Hammarsten'schen Methode gewonnene, durch gesättigte Kochsalzlösung gefällte Fibrinogen mit Kalksalzen vollständig ungerinnbar, während der aus demselben Fibrinogen mit Hilfe der Nucleinsubstanzen gewonnene Körper durch ein wenig Calciumchlorid oder Calciumsulfat sofort zum Gerinnen gebracht werden kann, erklärt nun die vorangegangenen Experimente, bei welchen das Leukonuclein für sich keine Gerinnung erzeugte, in Kalkwasser oder Barytwasser gelöst die Gerinnung einleitete.

Die Nucleinkörper erzeugen aus dem Hammarsten'schen Fibrinogen eben einen Körper, welcher für sich nicht gerinnt, dagegen mit Kalksalzen vermengt typischen Faserstoff liefert. Die Intensität der diesbezüglichen Einwirkung der Nucleinstoffe ist direct abhängig von der Abbaustufe des Nucleohistons d. h. die Intensität wächst mit dem Reichthum der Abbauproducte an Nucleinsäure und erreicht ihr Maximum bei der Nucleinsäure selbst. Damit will ich sagen, dass der Nucleohistonniederschlag, den man aus Fibrinogen erhält, mit CaCl_2 langsamer gerinnt als der Leukonucleinniederschlag und dieser wieder langsamer als der Nucleinsäureniederschlag, welcher

schon im Verlauf eines Sekunden zählenden Zeitraumes mit CaCl_2 typischen Faserstoff liefert. Wir werden bald sehen, worauf diese Verhältnisse beruhen.

Das Thrombosin und die Gerinnung.

Es tritt also die wichtige Frage heran: Worin besteht die Einwirkung der Nucleinsubstanzen auf das Fibrinogen? Es sind, sofern ich ersehe, drei Möglichkeiten in Betracht zu ziehen. 1. Entweder existirt das Fibrinogen in zwei Modificationen, einer durch Kochsalz und einer durch Nucleinstoffe gefällten, von welchen die erstere zur Umwandlung in Faserstoff ausser des Kalksalzes noch des Fibrinfermentes bedarf, während die letztere schon mit Kalksalzen allein gerinnt, oder 2. es entsteht eine Verbindung von Nuclein resp. Nucleinsäure mit Fibrinogen, welcher die Eigenschaft der Gerinnbarkeit mit Kalksalzen zukommt oder 3. es wird durch die Nucleinkörper ein die Gerinnbarkeit des Fibrinogens mit Kalkverbindungen verhindernder Körper abgespalten.

Die Entscheidung dieser Frage ermöglichte mir folgenden Befund:

Dieselbe Umwandlung wie mit Nucleinsubstanzen erleidet das Fibrinogen auch bei Behandlung mit Essigsäure. Ich erhielt aus reinen Fibrinogenlösungen, welche weder für sich noch durch Zusatz von Kalksalzen gerannen, mittelst Essigsäurefällung immer einen Niederschlag, welcher in verdünnter Sodalösung gelöst, nach Hinzufügung einiger Tropfen einer 5 proc. Chlorcalciumlösung im Verlauf eines ausserordentlich kurzen Zeitraumes, beinahe explosionsartig gerann. Diesen, mit Essigsäure gefällten Körper, welcher sich als identisch mit dem durch Nucleinkörper gefällten erwies, will ich fortan als Thrombosin bezeichnen.

Diese Thatsache, welche ich schon früher publicirt habe¹⁾, ist mittlerweile von J. J. Frederikse²⁾ vollkommen bestätigt worden.

¹⁾ Leon Liliensfeld: Weitere Beiträge zur Kenntniss der Blutgerinnung. Verhandl. d. physiol. Gesellschaft, Sitzung vom 21. Juli 1893.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XIX, Heft 2, S. 159.

Schon damals, als ich diesen Befund publicirte, bemerkte ich ausdrücklich, dass ich nach einigen vorläufigen Versuchen, bei welchen ich fand, dass nach Abfiltriren des Thrombosins im Filtrat immer kleine Mengen von Eiweiss nachzuweisen waren, zu der Annahme neige, das Fibrinogen werde durch die Essigsäure gespalten in eine Substanz, welche mit Ca-Salzen Faserstoff liefert und eine andere Substanz, welche die Gerinnung verhindert.

Thatsächlich konnte ich diese Annahme bestätigen. Ich fand, dass die vom Thrombosin abfiltrirte Flüssigkeit noch geringe Mengen eines Eiweisskörpers in Lösung hält, welchen ich nach folgender Methode isolirt habe. 100 cbcm. reiner nach Hammarsten bereiteter Fibrinogenlösung werden mit $\frac{1}{5}$ Normaleessigsäure versetzt, so lange ein Niederschlag entsteht. Das ausgefällte Thrombosin wird auf einem Filter gesammelt, und mit kaltem Wasser zweimal nachgewaschen. Das sauer reagirende Filtrat wird durch Zusatz der berechneten Menge Natronlauge neutralisirt und nachher auf dem Wasserbade auf die Hälfte seines Volumens eingeeengt. Jetzt setze ich zu der concentrirten Flüssigkeit das 4fache Volumen Alkohol hinzu, wobei das in Lösung gewesene Kochsalz und Natriumacetat zum grössten Theil herausfällt. Der Kochsalz- und Natriumacetat-Niederschlag wird nun abgesaugt und das Filtrat wieder eingeeengt. Nachdem der Alkohol vollständig verschwunden, wird die wässrige Flüssigkeit noch weiter bis auf ein ganz kleines Volumen abgedunstet und durch Zusatz des vierfachen Volumens Alkohol und Aether gefällt. Es entsteht ein Niederschlag, welcher auf einen Filter gesammelt, mit Alkohol und Aether nachgewaschen und getrocknet sich als eine mit Kochsalz verunreinigte Albumose erweist. Die Substanz ist in Wasser löslich und gibt in der Kälte Biuretreaction mit violettrother Farbe. Es ist ja freilich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dass die auf diese Weise erhaltene Substanz nichts Anderes als ein Umwandlungsproduct des ursprünglichen Fibrinogens, das durch Essigsäure nicht vollkommen ausgefällt wurde, ist. Es ist noch eine Möglichkeit vorhanden. Bekanntlich hat Hammarsten die Beobach-

tung gemacht, dass sowohl bei der Hitzecoagulation, als bei der Faserstoffgerinnung sich vom Fibrinogen ein globulinartiger Körper abspaltet, das sogenannte Fibringlobulin, welches bei 65° coagulirt. Nun hat J. J. Frederikse in seiner oben-erwähnten Arbeit auf der von mir gemachten Entdeckung des Thrombosins und meiner Annahme, das Fibrinogen werde bei der Essigsäureeinwirkung in Thrombosin und einen gerinnungswidrigen Körper gespalten, fussend in der Richtung meines Gedankenganges Experimente angestellt und hierbei gefunden¹⁾, dass die von dem durch Essigsäure ausgefällten Thrombosin abfiltrirte Flüssigkeit neben Spuren von unveränderten Fibrinogen noch eine Substanz enthält, welche bei 65° coagulirt. Es liegt nahe, daraus den Schluss zu ziehen, dass die Essigsäureeinwirkung darauf beruht, dass das Fibrinogen in das Thrombosin einerseits und das Fibringlobulin andererseits gespalten wird. Es wäre also noch möglich, dass der von mir erhaltene albumoseartige Körper ein Umwandlungs- resp. Zersetzungsproduct des gebildeten Fibringlobulins darstellt.

Die Frage konnte ich nur insoferne entscheiden, dass der von mir erhaltene albumoseartige Körper kein von der Essigsäure unausgefälltes Fibrinogen ist. Zu diesem Behufe erhitze ich das Filtrat, bevor ich die weiteren Operationen damit ausführte, längere Zeit auf 60° , und filtrirte nachher von dem entstandenen minimalen Niederschlage ab. Zu Anfang geht der Niederschlag, wenn man eine opalescirende Trübung so nennen darf, mit durchs Filter; durch mehrmaliges Zurückgiessen des Filtrats auf's Filter bekommt man schliesslich doch ein annehmbar klares Filtrat. Dieses in der oben beschriebenen Weise weiter behandelt, gab auch den erwähnten wasserlöslichen Körper.

Ich wollte noch entscheiden, ob — wie Frederikse angibt — im Filtrat vom ausgefällten Thrombosin Fibringlobulin nachweisbar ist. Zu diesem Ende erhitze ich wieder das essigsäure genau neutralisirte Filtrat längere Zeit auf 60° , filtrirte von den jetzt ausgeschiedenen Resten unveränderten

¹⁾ L. c., S. 161.

Fibrinogens ab und erwärmte das Filtrat auf 65°. Hierbei erhielt ich Resultate, welche mir keine sicheren Schlüsse zu ziehen erlauben. Das eine Mal nämlich erhielt ich thatsächlich bei 65° eine deutliche Trübung, das andere Mal blieb die Flüssigkeit bei 65° ganz klar, wieder ein Mal bekam sie bei 65° nur eine ganz zarte Opalescenz. Wenn man in Betracht zieht, dass nach Hammarsten das bei 65° coagulirende Fibringlobulin ein Drittel seiner Muttersubstanz des Fibrinogens ausmachen soll, so muss man zugestehen, dass die Ergebnisse meiner Experimente eher negativ als positiv zu deuten sind.

In Folge dieser zweifelhaften Resultate bin ich absolut nicht im Stande, eine reife Entscheidung zu treffen, ob der von mir im essigsäuren Filtrate nachgewiesene albumoseartige Stoff ein Derivat des Fibringlobulins ist, oder eine selbstständige Substanz. Die Thatsache steht aber fest, dass nach Ausfällung des Thrombosins ins Filtrat ein eiweissartiger, in Wasser löslicher Körper übergeht. Allerdings sind die Mengen dieser Substanz ausserordentlich gering.

Es handelte sich zunächst darum, zu entscheiden, ob diese Substanz thatsächlich die Eigenschaft besitzt, die Gerinnbarkeit des Thrombosins mit Kalksalzen zu verhindern. Bei der geringen Ausbeute an dieser Substanz und der nicht unbeträchtlichen Schwierigkeit, sich grosse Mengen von reiner Fibrinogenlösung zu verschaffen, musste ich mich auf zwei Versuche beschränken. Die albumoseähnliche Substanz wurde in diesen Versuchen aus 400 ccm. einer ziemlich concentrirten Fibrinogenlösung gewonnen. Der getrocknete Alkohol-Aetherniederschlag wurde in Wasser gelöst.

Versuch I. a) 3 ccm. Thrombosinlösung mit 1 ccm. der Lösung des albumoseartigen Körpers und 3 Tropfen 5 proc. CaCl₂-Lösung vermischt. Keine Gerinnung.

b) Controlprobe. 3 ccm. derselben Thrombosinlösung mit 1 ccm. dest. H₂O und 3 Tropfen 5 proc. CaCl₂-Lösung. Gerinnung nach 5 Minuten.

Versuch II. a) 2 ccm. Thrombosinlösung mit 1 ccm. der Lösung der albumoseartigen Substanz und 2 Tropfen 5 proc. CaCl₂-Lösung. Keine Gerinnung.

- b) Controllprobe. 2 ccm. derselben Thrombosinlösung mit 1 ccm. destill. Wassers und 2 Tropfen 5 proc. CaCl_2 -Lösung. Gerinnt nach 6 Minuten.

Es stellte sich bei einem dritten Versuch, den ich leider aus Mangel an Substanz nicht in der Lage war, zu wiederholen, dass die albumoseartige Substanz auch die Fähigkeit besitzt, der Gerinnung der proplastischen Flüssigkeiten mit anderen Gerinnungserregern z. B. dem Fibrinferment entgegenzuwirken, d. h. sie beträchtlich zu verzögern.

Versuch III. a) 2 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 15 ccm. Fibrinfermentlösung vermischt. Gerinnt nach 20 Minuten.

- b) 2 ccm. derselben Reactionsflüssigkeit mit 15 ccm. derselben Fibrinfermentlösung und 1,5 ccm. der albumoseartigen Substanz. Beginn der Gerinnung nach 6 Stunden.

Wir gelangen demnach zu dem wichtigen Ergebniss: Durch die Essigsäure wird aus der reinen Fibrinogenlösung, die mit Kalksalzen ungerinnbar ist, eine Substanz, das Thrombosin ausgefällt, welche mit Kalksalzen in kürzester Zeit typischen Faserstoff liefert. Ins Filtrat geht eine eiweissartige, in Wasser lösliche, die Biuretreaction in der Kälte gebende Substanz, welche die Gerinnbarkeit des Thrombosins mit Kalksalzen verhindert und auch überhaupt gerinnungshemmende Eigenschaften besitzt.

Es tritt nun die Frage an uns heran, ob die Essigsäureeinwirkung auf das Fibrinogen in ihrem Verlauf und ihrem Ergebniss identisch ist mit derjenigen Einwirkung, welche man durch Fällung der reinen Fibrinogenlösungen mit den Nucleinsubstanzen aus Leukocyten, also Nucleohiston, Leukonuclein, Nucleinsäure erzielt. Wir haben gesehen, dass, wenn man zu einer Fibrinogenlösung eine resp. Nucleinsubstanz zusetzt, ein Niederschlag entsteht, welcher in verdünntem Alkali gelöst durch Zusatz eines Kalksalzes in kurzer Zeit Faserstoff liefert. Es fragt sich also, ob auch hierbei aus der

Fibrinogenlösung Thrombosin ausgefällt wird und ins Filtrat die oben beschriebene albumoseartige Substanz übergeht? Es könnte ja, und das ist nach allem bisher bekannten das Wahrscheinlichste, beim Zusatz von Nucleinsäure, welche ja doch das wirksame Princip der Nucleinsubstanzen darstellt, wie wir gesehen haben, zur Fibrinogenlösung eine Verbindung des Fibrinogens oder Thrombosins mit Nucleinsäure, ausfallen, nicht aber das freie Thrombosin. Es ist ja aus den Untersuchungen Altmann's und Kossel's zur Genüge bekannt, dass Nucleinsäure in saurer Lösung Eiweiss fällt, nicht aber als solches, sondern als Verbindung mit Nucleinsäure, also als eine Art Nuclein.

Erstaunlicherweise liegt die Sache beim Fibrinogen anders. Die Nucleinsäure resp. die Nucleinsubstanzen fallen aus dem Fibrinogen keine nucleinsauren Eiweissverbindungen, sondern das freie Thrombosin — verhält sich also ganz wie die Essigsäure. Es kommen hier also nur die sauren Eigenschaften der Nucleinsäure zur Geltung.

Folgender Versuch möge dies illustriren:

Zu 150 ccm. reiner mit Kalksalzen ungerinnbarer Fibrinogenlösung aus Hundeblood wird Nucleinsäure aus Thymus, die ich der Güte des Herrn Professors Kossel verdanke, in Wasser mit stark saurer Reaction gelöst solange zugesetzt, als noch ein Niederschlag entsteht. Der entstandene Niederschlag wird auf einem Filter gesammelt und mehrere Male mit kaltem Wasser nachgewaschen, nachher wird der Niederschlag vom Filter genommen und zwischen Filtrirpapier gut abgepresst. Der Niederschlag wird in mehrere Theile getheilt.

- a) Theil I wird in verdünntem Natriumcarbonat aufgelöst und zu der Lösung werden ein Paar Tropfen 5proc. CaCl_2 -Lösung zugefügt. Die Mischung gerinnt nach 2 Minuten zu einem derben Fibrinkuchen.
- b) Theil II wird in ganz verdünnter, etwa 0,4proc. Salzsäure aufgelöst und dazu das doppelte Volumen Pepsinsalzsäure aus Schweinemagen zugesetzt und in den Brütschrank gestellt. Bis zur beginnenden Fäulniss, also etwa 14 Tage nach dem Beginne des Versuchs, bleibt die Flüssigkeit klar.
- c) Theil III wird zur Phosphorreaction verwendet, also mit Soda und Salpeter verascht. Schmelze in Salpetersäure gelöst und Ammoniummolybdat zugesetzt und erwärmt. Es entsteht absolut kein Niederschlag von Phosphormolybdänsäure.

Daraus ergibt sich also, dass die Nucleinsäure aus der Fibrinogenlösung weder nucleinsaures Fibrinogen noch nucleinsaures Thrombosin fällt. Abgesehen von der Wichtigkeit dieser Thatsache für die Blutgerinnungslehre ist das, meines Wissens, der erste bis jetzt bekannte Fall, in welchem Nucleinsäure aus einer Eiweisslösung kein nucleinsaures Eiweiss, sondern freies Eiweiss fällt.

Es fragt sich noch, ob auch in das Filtrat, welches nach der Ausfällung des Thrombosins mit Nucleinsäure erhalten wird, der albumosearsige Körper übergeht. Um diese Frage zu entscheiden, dampfte ich das Filtrat auf die Hälfte ein, fällte die überschüssige Nucleinsäure und das gelöste Kochsalz durch Zusatz von HCl^2 und viel Alkohol, filtrirte, dampfte das Filtrat weiter ein und fällte nun die eingeeengte Flüssigkeit mit Alkohol und Aether. Wieder bekam ich eine Substanz, welche in Wasser leicht löslich war und die Biuretreaction in der Kälte gab.

Bevor ich weiter gehe, will ich noch auf einen Schluss hinweisen, zu welchem die soeben beschriebenen Versuche direct führen. Wie ich schon in der Einleitung erwähnt habe, war Hammarsten der erste, welcher durch exacte Versuche nachwies, dass das Serumglobulin kein absolut notwendiger Begleiter der Gerinnungserscheinungen ist, d. h. dass auch eine reine Fibrinogenlösung, welche kein Serumglobulin enthält, mit einer reinen serumglobulinfreien Fibrinfermentlösung Fibrin liefert. Alexander Schmidt leugnet jedoch in seiner letzten Arbeit die Beweiskräftigkeit der Hammarsten'schen Versuche, indem er behauptet, dass die Methode der Fällung des Fibrinogens durch das gleiche Volumen kalt gesättigter Kochsalzlösung keine scharfe und zuverlässige Trennungsmethode der beiden Blutglobuline darstellt. Durch die Ausfällung des Thrombosins mit Essigsäure, die ich angewendet habe, kommt man aber sicher zu einem serumglobulinfreien Präparat; ich habe mich durch eine ganze Reihe von Versuchen überzeugt, dass die zur Ausfällung des Thrombosins nöthige Menge von Essigsäure genügen würde, um

viel grössere Serumglobulinmengen in Lösung zu erhalten, als die ganze Blutmenge, aus der das Fibrinogen gewonnen wurde, enthält. Zur Illustration diene folgender Versuch:

Aus 750 ccm. Oxalatplasma vom Hunde wird nach der Hammarsten'schen Methode das reine Fibrinogen dargestellt. Aus 100 ccm. der reinen Fibrinogenlösung wird das Thrombosin mit Normalesigsäure ausgefällt und der Essigsäuregehalt auf die ganze Flüssigkeitsmenge umgerechnet. Die Flüssigkeit (das Filtrat) aus ca. 100 ccm. bestehend, enthält 0,5 gr. Eisessig. In das Filtrat bringe ich 38 gr. Serumglobulin, welches aus Rinderblutserum nach der Hammarsten'schen Methode dargestellt habe, also eine Menge, welche nach Hammarsten's quantitativen Bestimmungen 1000 ccm. Plasma entspricht. Das Serumglobulin löst sich vollständig klar auf.

Nachdem nun, wie wir gesehen haben, das Thrombosin mit Kalksalzen typischen Faserstoff liefert, so berechtigt mich dieser Versuch zu einer Bestätigung der Hammarsten'schen diesbezüglichen Versuche im vollen Umfange, also zu dem Schlusse: Das Serumglobulin ist bei der Faserstoffbildung entbehrlich.

Bevor ich nun weiter gehe, fasse ich der Uebersicht halber die Ergebnisse der bisher angeführten Versuche kurz zusammen.

Die Nucleinsubstanzen der Leukocyten spalten vermöge ihres Nucleinsäuregehaltes das Fibrinogen, welches allein weder für sich noch mit Kalksalzen gerinnt, in das Thrombosin, welches mit einem Kalksalz in kürzester Zeit typischen Faserstoff bildet einerseits und eine wasserlösliche, die Biuretreaction in der Kälte gebende Eiweisssubstanz, welche die Gerinnung des Thrombosins mit Kalksalzen zu verhindern vermag, andererseits.

Wie ist die Einwirkung der Kalksalze auf das Thrombosin zu erklären?

Aus der Lösung des Thrombosins fallen also lösliche Kalksalze Faserstoff. Für die Erklärung der Faserstoffbildung aus Thrombosin durch Kalksalze sind zwei Möglichkeiten

denkbar. Entweder handelt es sich hier um eine einfache physikalische Ausfällung oder es geht der Kalk eine chemische Verbindung mit dem Thrombosin ein. Diese Thrombosin-Kalkverbindung wäre dann das Fibrin. Diese Frage konnte nur auf diese Weise entschieden werden, dass ich das aus dem Thrombosin durch Zusatz von Kalksalzen erhaltene Fibrin sorgfältig wusch und nachher zusah, ob es bei der Veraschung Kalk enthält oder nicht.

Wie ich schon eben hervorgehoben habe, hat schon Brücke nachgewiesen, dass gut ausgewaschenes Fibrin an Mineralsäuren Kalk abgibt. Auch Kistiakowsky¹⁾ und Freund fanden in der Asche des sorgfältigst gewaschenen Fibrins immer Kalk. Zu demselben Resultate kamen bei ihren Untersuchungen auch Arthus und Pagés²⁾, welche in der Asche des Fibrins immer Kalk nachweisen konnten.

Hammarsten, welcher der erste Fibrin, welches aus reinen Fibrinogenlösungen erhalten wurde, in dieser Richtung untersucht hat, behauptet, dass er in seinem Fibrin mit Sicherheit keinen Kalk hat nachweisen können, wobei er sich aber gegen die Ausnutzung seiner Versuche für die endgültige Entscheidung dieser Frage verwahrt, weil die von ihm benutzten Mengen Fibrin sehr klein waren. Dagegen hat Pekelharing in Fibrin, welches aus reinem Fibrinogen erhalten wurde, Kalk qualitativ nachweisen können. In neuester Zeit hat J. J. Frederikse diese Frage in Angriff genommen und im gereinigten Fibrin, welches aus reinem Fibrinogen dargestellt wurde, den Kalkgehalt quantitativ bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass das Fibrin thatsächlich Kalk enthält.

Wenn es also nach allen diesen Untersuchungen mit Sicherheit anzunehmen ist, dass das Fibrin chemisch gebundenen Kalk enthält, war es doch der Mühe werth, das aus dem Thrombosin erhaltene Fibrin auf Kalk zu prüfen, da wir es hier wohl mit dem reinsten der bis jetzt benutzten Ausgangsmateriale zu thun haben.

¹⁾ Kistiakowsky: Virchow's Archiv, Bd. XII.

²⁾ L. c.

Versuch. a) 1.5 gr. durch Essigsäure gefälltes Thrombosin werden in dem Platintiegel verascht und die Asche mit Salzsäure ausgezogen. Die salzsaure Lösung gibt mit Ammoniumoxalat keinen Niederschlag.

b) 1.4 gr. aus Thrombosin erhaltenen Fibrins werden mit heissem Wasser ausgekocht. Das letzte Waschwasser gibt keine Kalkreaction. Das Fibrin wird nun in der gewöhnlichen Weise verascht. Das salzsaure Extract der Asche gibt mit Ammoniumoxalat einen Niederschlag von Calciumoxalat.

In diesem Versuche sehe ich einen Rückhalt für die Annahme, dass das Fibrin chemisch gebundenen Kalk enthält, dass also die Fibrinbildung aus Thrombosin durch Kalksalze darauf beruht, dass das lösliche Kalksalz eine unlösliche Kalkthrombosinverbindung herausfällt.

Darnach ist Faserstoff eine Kalkverbindung des Thrombosins.

Dass mit dem Thrombosin bei der Fibrinbildung keine tiefgreifende Veränderung vor sich geht, folgt aus der Thatsache, dass bei der Fibrinbildung durch Kalk die ganze Menge des gelösten Thrombosins in Fibrin übergeht, und man nach vollständig stattgehabter Gerinnung im sorgfältig ausgepressten und filtrirten Serum, weder durch die Biuretreaction noch durch Erhitzen auf 100°, kein Eiweiss nachweisen kann.

Ueber die Faserstoffbildung im extravasculären Blute.

In Folgendem will ich die Ergebnisse der bisher angeführten Versuche kurz zusammenfassen, bevor ich in der Mittheilung der Weiteren vorwärts gehe.

Die Leukocyten enthalten in ihrem Zellkern eine deutlich saure Substanz, das Nucleohiston, welches zu spontan gerinnenden Flüssigkeiten, also kalt filtrirtem Pferdeblutplasma oder proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten, denen Fibrin-ferment zugesetzt wurde, hinzugefügt, die Gerinnung derselben in hohem Maasse verzögert.

Aetzkalk und Aetzbaryt spalten das Nucleohiston in Leukonuclein und Histon.

Nucleohiston in Kalkwasser oder Barytwasser gelöst, ruft in proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten Faserstoffgerinnung hervor.

Daraus könnte der Schluss gezogen werden, dass 1. das Histon die gerinnungshemmende Componente des Nucleohistons ist; 2. das Leukonuclein resp. die Nucleinsäure die gerinnungserregende Componente des Nucleohistons ist.

Thatsächlich verliert das Nucleohiston nach Abspalten des Histons durch beliebige Mittel seine gerinnungshemmenden Eigenschaften.

Das Leukonuclein und die Nucleinsäure sind für sich allein nicht im Stande, aus Fibrinogen Faserstoff zu produciren. Sie spalten blos vom Fibrinogen das Thrombosin, die letzte Vorstufe des Fibrins, ab und es bedarf jetzt nur noch des Zusatzes eines löslichen Kalksalzes, um das Thrombosin in kürzester Zeit in Faserstoff überzuführen. Durch Lösung der Nucleinstoffe in Kalkwasser oder Barytwasser vereinigt man beide Wirkungen; die Nucleinsubstanz spaltet das Thrombosin ab, welches in der Lösung auf Kalk stossend sofort in Faserstoff übergeht.

Die klare Erkenntniss dieses Vorganges gelang mir erst durch die Zerlegung des Processes der Fibrinentstehung in seine beiden Phasen: also Ausfällung des Thrombosins aus reinen Fibrinogenlösungen durch Nucleinsubstanzen, Lösung des Thrombosins und Faserstoffbildung durch Kalksalze.

Es steigert sich die Intensität der Wirksamkeit der Nucleoproteide mit der in ihrem Atomcomplexe enthaltenen Menge von Nucleinsäure und erreicht ihr Maximum bei der Nucleinsäure selbst.

Dieselbe Wirkung, d. h. die Abspaltung des Thrombosins, lässt sich auch durch Essigsäure erzielen. Es besteht aber ein principieller Unterschied zwischen der Essigsäurewirkung und derjenigen der Nucleinstoffe, der darin besteht, dass die Nucleinstoffe auch in alkalischer Lösung das Thrombosin abspalten, während es die Essigsäure nur in saurer Lösung thut.

Das Fibrin ist eine Kalkverbindung des Thrombosins.

Wir haben es also hier mit einem Vorgange zu thun, welcher ausserordentlich lebhaft an die Caseïngerinnung der Milch erinnert. Der Vergleich der Fibrinbildung mit der Käsebildung wurde zuerst von Arthus und Pagès¹⁾ angestellt. Sie gingen von dem Gesichtspunkte aus, das Tertium comparationis liege in der Mitarbeiterschaft der löslichen Kalksalze an beiden Processen. Auf Grund meiner hier angeführten Versuche kann man aber in dem Vergleich der beiden Prozesse viel weiter gehen. Der chemische Verlauf bei der Labgerinnung ist zwar noch nicht genügend erforscht; es wird aber heutzutage allgemein angenommen, dass sich das Caseïn dabei in einen schwer löslichen Stoff, den Käse, und eine leicht lösliche albumoseartige Substanz, das Molken-eiweiss, spaltet. Diese Spaltung findet, wie Hammarsten gezeigt hat, auch bei Abwesenheit von Kalksalzen statt und Letztere sind bloß zur Ausfällung des Paracaseïns nothwendig. Aus meinen Untersuchungen geht nun hervor, dass sich die Analogie in allen Phasen der beiden Prozesse durchführen lässt. Auch bei der Faserstoffbildung ist der fundamentale Process nichts weiter als die Spaltung des Fibrinogens in Thrombosin und eine wasserlösliche die Biuretreaction in der Kälte gebende Substanz. Auch hier erfolgt diese Spaltung bei Abwesenheit von Kalksalzen; letztere sind bloß zur Ausfällung des Fibrins als Thrombosin-Kalkverbindung erforderlich.

Zunächst handelt es sich um die Frage, warum die verschiedenen von uns erhaltenen Plasmaarten mehr oder weniger leicht mit Kalksalzen gerinnen, während das aus ihnen nach der Hammarsten'schen Methode dargestellte Fibrinogen mit Kalksalzen nicht gerinnt? Zur Beantwortung dieser Frage kann man in Berücksichtigung der von mir aufgefundenen Thatsachen zwei Möglichkeiten verwerthen. Entweder enthält das Plasma Nucleïnsubstanzen oder es enthält von vornherein freies Thrombosin. Die in dieser Richtung von mir angestellten Versuche haben ergeben, dass beide Möglichkeiten zutreffen, d. h. Peptonplasma, Bittersalzplasma, Oxalatplasma enthalten sowohl Nucleïnsubstanzen als freies Thrombosin, letzteres allerdings in

¹⁾ L. c., S. 744.

geringer Menge. Die Nucleinsubstanzen aus dem Blutplasma darzustellen ist eine ziemlich schwer zu bewältigende Aufgabe. In Anbetracht nämlich des Umstandes, dass, wie Hammarsten für das Casein, Alexander Schmidt für Nucleinkörper gefunden haben, die Nucleinsubstanzen in Blutplasma und Blutserum globulinähnliche Löslichkeitseigenschaften annehmen, ist es absolut unmöglich, eine die Nucleinsubstanzen von den Eiweisskörpern vorwurfsfrei trennende Fällungsreaction ausfindig zu machen. In Folge dessen musste ich zu der allergröbsten und ältesten Methode der Nucleindarstellung greifen, nämlich zu der Abscheidung des Nucleins durch künstlichen Magensaft.

Versuch I. Vollkommen klar centrifugirtes und filtrirtes Oxalatplasma vom Hunde wird mit ganz verdünnter Salzsäure versetzt, der Anfangs auftretende Niederschlag verschwindet bei weiterem Zusatz der Salzsäure. Zu der nun klaren Lösung wird nun das gleiche Volumen Pepsinsalzsäure aus Schweinemagen hinzugefügt. Nach 12stündigem Stehen im Brutschrank ist die Flüssigkeit milchig getrübt und undurchsichtig geworden und nach mehrstündigem Stehen scheidet sich ein flockiger, gut filtrirbarer Niederschlag ab. Aus 500 cem. Oxalatplasma bekam ich auf dieselbe Weise 5 gr. mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschenen und getrockneten Niederschlag. Der Niederschlag zeigt folgende Eigenschaften: er ist unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether und fetten Oelen, löslich in verdünnten Alkalien und daraus durch Säuren fällbar. Er enthält Phosphor und eine quantitative Bestimmung ergab folgendes Resultat:

P-Bestimmung: 0,5270 gr. trockene Substanz gaben mit Soda und Salpeter verascht 0,0901 gr. $Mg_2P_2O_7 = 4,72\%$ P.

Aus diesen Eigenschaften und der Phosphorbestimmung ergibt sich, dass der von mir erhaltene Körper ein typisches Nuclein darstellt.

Zu demselben Resultate führten Versuche, welche ich in derselben Weise mit Magnesiumsulfatplasma und dem später zu beschreibenden Histonplasma angestellt habe. Aus beiden Plasmaarten erhielt ich bei der Verdauung mit Pepsinsalzsäure einen in diesem Medium unlöslichen, in Alkalien löslichen und daraus durch Säure fällbaren Rückstand, welcher mit Soda und Salpeter verascht, deutliche Phosphorreaction gab. Daraus ergibt sich, dass im Blutplasma Nucleinstoffe vorhanden sind. Ob diese Nucleinstoffe an grössere Mengen von Eiweiss ge-

bunden sind, das lässt sich mit Zuhilfenahme der bisher bekannten Methoden nicht ohne Weiteres entscheiden, ist aber auch für die Blutgerinnungslehre ziemlich gleichgiltig. Wir haben gesehen, dass auch ziemlich eiweissreiche Nucleinsäureverbindungen, wie das Nucleohiston, im Stande sind, aus dem Fibrinogen Thrombosin abzuspalten.

Es erübrigt nun den Nachweis zu führen, dass im Blutplasma freies Thrombosin vorhanden ist. Wooldridge hat eine Substanz beschrieben, welche er aus Peptonplasma durch Abkühlungen auf 0° erhalten hat und welche er A-Fibrinogen nennt. Halliburton hat aber bestritten, dass dieses A-Fibrinogen ein normaler Bestandtheil des Blutplasmas ist, weil es ihm nicht gelungen ist, dasselbe aus Bittersalzplasma, Glaubersalzplasma oder Kochsalzplasma zu erhalten und betrachtet das A-Fibrinogen als eine spezifische Eigenthümlichkeit des Peptonplasmas, hervorgerufen durch die Anwesenheit von Pepton. Halliburton ist es nämlich gelungen, aus Witte's und Grübler's Pepton durch Abkühlung ebenfalls einen Körper zu erhalten, welcher ähnliche Eigenschaften zeigt wie Wooldridge's A-Fibrinogen.

Pekelharing behauptet, dass das A-Fibrinogen ein Nucleoalbumin sei. Es ist Pekelharing nicht gelungen, dieses A-Fibrinogen aus anderem Plasma als Peptonplasma zu erhalten, wenn er nicht das Plasma vorher angesäuert hat. Pekelharing behauptet, dass dieser in der Kälte entstehende Niederschlag mit Pepsinsalzsäure einen unlöslichen Rückstand bildet, welcher Phosphor enthält.

Ich muss diesen Behauptungen Pekelharing's direct widersprechen. Vor allen Dingen ist es mir mehrere Male gelungen, aus Oxalatplasma des Hundes durch genügend starke und schnelle Abkühlung einen sich in runden Kugeln oder Scheibchen abscheidenden Niederschlag zu erhalten. Sowohl diesen als den nach derselben Methode erhaltenen Körper aus Peptonplasma und Histonplasma, habe ich mehrere Male untersucht. Es hat sich dabei herausgestellt, dass dieser Körper immer ohne Ausnahme in Pepsinsalzsäure, auch bei langem Stehen im Brütöfen klar löslich ist und mit Soda und Sal-

peter geschmolzen gab diese Substanz keine Spur von Phosphorreaction.

Dagegen hat sich gezeigt, dass dieser Körper Thrombosin ist. Durch mehrmaliges Lösen in verdünntem Natriumcarbonat und Wiederausfällen durch Essigsäure gereinigt, gab der durch Kälte ausgeschiedene Körper in Natriumcarbonat gelöst und mit einigen Tropfen Chlorcalciumlösung versetzt einen derben Fibrinkuchen. Aus einer ganzen Reihe diesbezüglicher Versuche excerpire ich folgende:

Versuch I. 200 ccm. Histonplasma werden auf 0° schnell abgekühlt.
(Histon- Es scheidet sich dabei ein den Wandungen des Gefässes
plasma.) anhaftender Niederschlag ab, so dass sich die überstehende Flüssigkeit, ohne grosse Verluste am ausgeschiedenen Körper zu erleiden, leicht abgiessen lässt. Der ausgeschiedene Körper wird durch mehrmaliges Lösen in verdünnter Sodalösung und Ausfällen mit verdünnter Essigsäure gereinigt und schliesslich in 10 ccm. Wasser, dem einige Tropfen Sodalösung zugesetzt sind, aufgelöst. Zu dieser Lösung werden einige Tropfen 5proc. Calciumchloridlösung zugesetzt. Das Gemisch gerinnt nach 5 Minuten zu einem festen Kuchen.

Versuch II. 150 ccm. Oxalatplasma geben bei rascher Abkühlung einen
(Oxalat- Niederschlag, der durch Auflösen in Natroncarbonat und Aus-
plasma.) fällen in Essigsäure gereinigt wird. Zum Schluss wird der Niederschlag in 5 ccm. verdünnter Sodalösung aufgelöst und der Lösung einige Tropfen 5proc. Chlorcalciumlösung zugesetzt. Gerinnung nach 10 Minuten.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass sowohl Oxalatplasma als Histonplasma freies Thrombosin enthalten. Ich muss aber ausdrücklich bemerken, damit mich nicht der Vorwurf trifft, die zur Reinigung benutzte Essigsäure hätte irgendwelche Veränderungen in der ursprünglichen Substanz gesetzt, dass der ursprüngliche Kälteniederschlag in verdünnter Sodalösung und mit einigen Tropfen 5proc. Chlorcalciumlösung versetzt unweigerlich Fibringerinnung gibt.

Nachdem also das Blutplasma sowohl Nucleinkörper als freies Thrombosin enthält, so ist nach den vorangegangenen Experimenten und Schlussfolgerungen seine Gerinnbarkeit mit gelösten Kalksalzen als vollständig aufgeklärt zu betrachten.

Die zweite Componente des Nucleohistons, das Histon und die Faserstoffgerinnung.

Die beschriebenen Versuche haben es sehr wahrscheinlich gemacht, dass das Nucleohiston der Träger sowohl des gerinnungserregenden als des gerinnungshemmenden Factors der Leukocyten ist. Dass die eine Componente desselben, das Leukonuclein resp. die Nucleinsäure von dem im Plasma gelösten Fibrinogen das Thrombosin abspaltet und so die Faserstoffbildung durch die gelösten Kalksalze ermöglicht, habe ich, wie es mir scheint, bewiesen. Es handelt sich also vorläufig darum, den Nachweis zu führen, dass dem Nucleohiston eine gerinnungswidrige Eigenschaft von seiner zweiten Componente dem Histon verliehen wird.

Das zu folgenden Versuchen in Verwendung gekommene Histon stammt aus den Lymphocyten der Thymusdrüse. Es wurde folgendermaassen dargestellt: Das mit Alkohol und Aether erschöpfte nach meiner Methode dargestellte Nucleohiston wird mit 0,8proc. Salzsäure gut verrieben und einige Stunden stehen gelassen. Die Salzsäure wird abfiltrirt und aus derselben die salzsaure Verbindung des Histons durch Zusatz des vierfachen Volumens absoluten Alkohols und Aethers ausgefällt. Der entstandene weisse und flockige Niederschlag setzt sich nach gutem Umschütteln der Flüssigkeit sehr gut zu Boden. Die darüber stehende Flüssigkeit wird abgehebert und der Bodensatz auf einen Filter gesammelt mit Alkohol und Aether nachgewaschen. Durch mehrmaliges Lösen in Wasser und Wiederausfällen mit Alkohol und Aether kommt man zu einem reinen, in Wasser leicht löslichen Präparate des salzsauren Histons. Zu den folgenden Versuchen wurde das salzsaure Histon in Wasser gelöst und die saure Reaction der Lösung mit Soda genau neutralisirt.

- Versuch I. Aus der freigelegten Carotis fließen 50 ccm. Blut in
(Aderlassblut. 10 ccm. einer 1 proc. Histonlösung. Das Blut bleibt
Hund.) permanent flüssig bis zur beginnenden
Fäulniss.
- Versuch II. 20 ccm. Blut aus der Carotis eines Kaninchens werden
(Aderlassblut. unter gutem Umrühren in 3 ccm. einer 5proc. Histon-
Kaninchen). lösung aufgefangen. Das Blut ist permanent flüssig.

- Versuch III. a) 50 ccm. Peritonealflüssigkeit vom Pferde mit 25 ccm. (Liquor peritonei.) Fibrin fermentlösung und 10 ccm. 1 proc. Histonlösung vermengt. Keine Gerinnung.
- b) 50 ccm. derselben Peritonealflüssigkeit mit 25 ccm. Fibrin fermentlösung und 10 ccm. physiologischer Kochsalzlösung. Gerinnung nach 2 Stunden.
- Versuch IV. a) 20 ccm. Pericardialflüssigkeit vom Pferde mit 10 ccm. (Liquor pericardii.) Fibrin ferment und 5 ccm. 1 proc. Histonlösung. Keine Gerinnung.
- b) 20 ccm. derselben Pericardialflüssigkeit mit 10 ccm. derselben Fibrin fermentlösung und 5 ccm. physiol. Kochsalzlösung. Gerinnung nach einer Stunde.
- Versuch V. a) 3 ccm. Schmidt'scher Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. (Salzplasma.) Fibrin fermentlösung und 5 ccm. 1 proc. Histonlösung. Keine Gerinnung.
- b) 3 ccm. derselben Reactionsflüssigkeit mit 20 ccm. Fibrin fermentlösung und 5 ccm. physiol. Kochsalzlösung. Gerinnung nach einer halben Stunde.
- Versuch VI. a) 10 ccm. reiner Fibrinogenlösung aus Hundeblood mit (Reines Fibrinogen.) 10 ccm. Fibrin ferment und 2 ccm. 1 proc. Histonlösung. Keine Gerinnung.
- b) 10 ccm. derselben Fibrinogenlösung mit 10 ccm. Fibrin ferment und 2 ccm. physiol. Kochsalzlösung. Gerinnung nach 30 Minuten.
- Versuch VII. a) 3 ccm. einer aus reiner Fibrinogenlösung durch Essigsäurefällung und Wiedêrlösung in Natriumcarbonat erhaltenen Thrombosinlösung mit 1 ccm. 1 proc. Histonlösung und 3 Tropfen 5 proc. Chlorcalciumlösung. Keine Gerinnung.
- b) 3 ccm. derselben Thrombosinlösung mit 1 ccm. physiol. Kochsalzlösung und 3 Tropfen 5 proc. Chlorcalciumlösung. Gerinnung nach 5 Minuten.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass das Histon sowohl im Aderlassblut als in proplastischen und fibrinogenen Flüssigkeiten, denen Fibrin ferment zugesetzt wird, als auch in Thrombosinlösungen, denen Kalk zugesetzt wird, die Gerinnung verhindert.

Wir sehen also, dass die eine Componente des Nucleohistons, das Leukonuclein, die Umwandlung des Fibrinogens in Thrombosin verursacht, also der Gerinnungserreger im vollsten

Sinne des Wortes ist, während die andere Componente, das Histon, die Gerinnung spontan gerinnender Flüssigkeiten hemmt.

Ueber die Einwirkung der aus dem Zellkern der Leukocyten gewonnenen Substanzen auf das intravasculäre Blut.

Otto Groth¹⁾ hat gefunden, dass, wenn man in das kreisende Blut Zellen injicirt, intravasculäre ausgedehnte Gerinnungen entstehen, während das nach der Injection aus der Ader gelassene Blut seine Gerinnbarkeit verliert. Als Injectionsmaterial benützte er Lymphzellen, Eiterzellen und Leukocyten aus den Höhlenflüssigkeiten des Pferdes. Groth fand also, dass nach seinen Injectionen das Blut eine plötzlich ungeheuer gesteigerte Gerinnungstendenz bekam und in Folge dessen zu ausgedehnten, manchmal tödtlichen Thrombosen führte, um dann aber in das Gegentheil dieser Erscheinung, also einen Zustand herabgesetzter oder ganz aufgehobener Gerinnungsfähigkeit, umzuschlagen.

Wooldridge²⁾ hat denselben Effect beobachtet, als er in das Blutgefässsystem von Thieren Lösungen seines Gewebefibrinogens einspritzte. Er fand, dass beim Hunde speciell im Gebiete der Pfortader ausgedehnte Thrombosen entstehen, während das aus der Ader gelassene Blut äusserst schwer oder gar nicht gerinnt. Nach der Entdeckung des Nucleohistons und der von mir mit demselben im extravasculären Blut ausgeführten Untersuchungen war es schon ein Leichtes, sich eine Vermuthung über die Ursachen dieser merkwürdigen Erscheinungen zu bilden. Die von Groth zu seinen Injectionsversuchen angewendeten Zellenarten enthalten alle Nucleohiston und auch das Gewebefibrinogen von Wooldridge besteht, wie ich mich durch zahlreiche Versuche überzeugt habe, seiner Hauptmasse nach aus Nucleohiston. Nachdem es sich nun bei meinen Versuchen herausgestellt hat, dass das

¹⁾ Otto Groth: Ueber die Schicksale der farblosen Elemente im kreisenden Blut. Inaug.-Diss. Dorpat 1884.

²⁾ Proceedings of the Royal Society 1886; On haemorrhage of the liver. Lancet Nov. 5, 1887 und British medical Journal Nov. 8, 1887.

Nucleohiston der Träger einer gerinnungserregenden und einer gerinnungshemmenden Substanz ist, so lag der Gedanke nahe, dass das Nucleohiston das wirksame Princip bei den Zellinjectionen Groth's und bei den Gewebsfibrinogeninjectionen Wooldridge's ist. Es würde dann anzunehmen sein, dass sich das Nucleohiston in das kreisende Blut injicirt, darin in seine beiden Componenten spaltet, und dass dann zuerst das Nuclein seine Wirksamkeit dahin entfaltet, dass es vom Fibrinogen das Thrombosin abspaltet, welches in Berührung mit den in Plasma gelösten Kalksalzen Fibrinthromben bildet. Nachher würde das Histon wirken und den Rest des Blutes ungerinnbar machen. Das Experiment hat meine Annahme vollauf bestätigt. Folgende zwei Versuche wähle ich, um zu zeigen, dass es thatsächlich das Nucleohiston ist, welches das wirksame Princip bei den erwähnten Injectionen darstellt.

Versuch I. Ein Hund von 7600 gr. Körpergewicht wird durch eine subcutane Morphiumeinspritzung und nachherige Chloroformnarkose anaesthesirt, und auf dem Operationsstische immobilisirt. Linkerseits wird die Carotis, rechterseits die Jugularis freigelegt und in beide Canülen mit Gummischläuchen eingebunden. In die Jugularis werden nun 100 ccm. einer 5proc. Lösung von Nucleohiston eingespritzt. Nach kurzer Zeit nach der Injection, also etwa 1 Minute, hört die regelmässige Athmung auf und es werden schnell aus der Carotis etwa 100 ccm. Blut gelassen. Das Thier verendet bald. Bei der Section fand ich ausgedehnte Thrombosen im ganzen Pfordadersystem, in der Milzvene und in den Lungengefässen. Das aus der Carotis gelassene Blut bleibt permanent flüssig; es wird centrifugirt und das Plasma auf seine Gerinnungsfähigkeit geprüft. Es gerinnt nicht mit Fibrinferment, dagegen leicht mit Nuclein. Dieses Plasma wird verwendet, um freies Histon in demselben nachzuweisen. Zu diesem Zwecke werden ca. 100 ccm. mit dem 4fachen Volumen Alkohol gefällt. Der Alkohol wird abfiltrirt und zum alkoholischen Filtrat das 4fache Volumen Aether gesetzt. Es entsteht ein Niederschlag, welcher auf dem Filter gesammelt und daraufhin geprüft alle Reactionen des Histons ergibt.

Versuch II. Einem 1600 gr. wiegenden, auf dem Operationsbrett immobilisirten Kaninchen wird in die Inguinalis eine neutrale Nucleohistonlösung eingespritzt. Die Menge des eingespritzten

Nucleohistons kann ich leider bei diesem Versuche nicht angeben. Das Thier bekommt während der Injection Zuckungen; infolgedessen wird die Einspritzung unterbrochen und aus der Carotis schnell Blut gelassen. Das Blut fliesst in Tropfen aus und das Thier verendet. Die 5 ccm. Blut, die aufgefangen werden konnten, bleiben permanent flüssig. Bei der Section findet man zahlreiche und ausgedehnte Thrombosen.

Aus diesem Versuche geht also hervor, dass das Nucleohiston ins kreisende Blut eingespritzt in Nuclein und Histon zerfällt. Wie wir aber aus meinen vorhergegangenen Versuchen wissen, spaltet das Nuclein das Fibrinogen des Blutplasmas in Thrombosin und die wasserlösliche eiweissartige Substanz. Das freigewordene Thrombosin begegnet Kalksalzen im Blutplasma und vereinigt sich mit diesen zu Fibrin. So entstehen die Thrombosen. Der Rest des Blutes wird durch die zweite Componente, das Histon, flüssig erhalten.

Wenn dieser Schluss richtig ist, dann müssen die beiden Componenten des Nucleohistons, jede für sich ins circulirende Blut eingespritzt, zwei entgegengesetzte Erscheinungen hervorrufen: das Nuclein müsste Thrombosen herbeiführen, das Histon dagegen das Blut in den Zustand permanenter Flüssigkeit versetzen. Folgende Versuche mögen den Beweis liefern, dass diese Annahme durch das Experiment bestätigt ist.

Einwirkung des Leukonucleins auf das kreisende Blut.

Versuch. Einem anaesthetisch gemachten und immobilisirten Hunde von 8 Kilo Körpergewicht wird auf einer Seite die Jugularis, auf der anderen die Carotis freigelegt und in beide Gefässe werden mit Gummischläuchen versehene Canülen eingebunden. Vor der Injection wird eine kleine Probe Blut entnommen. Es gerinnt nach 5 Minuten. In die Jugularis wird nun mittels einer Spritze vorsichtig eine 5 proc. neutrale Leukonucleinlösung — zu diesem Versuche wurde ein Leukonuclein verwendet, welches durch Salzsäurebehandlung des Nucleohistons erhalten wurde — eingespritzt. Nach Einspritzung von etwa 55 ccm. der Leukonucleinlösung hört die regelmässige Athmung des Thieres auf und nach einigen Zuckungen

ist das Thier verendet. Es gelingt noch, vor dem Tode des Thieres eine kleine Menge Blutes aus der Carotis zu erhalten. Das Blut gerinnt nach 50 Secunden. Bei der Section finde ich das Gebiet der vena portae und der vena lienalis thrombosirt.

Dieser Versuch, der aus einer ähnlichen Reihe von drei Versuchen mit demselben Resultat excerpirt ist, zeigt also mit voller Bestimmtheit, dass es die Nucleincomponente des Nucleohistons ist, welche auch intravasculär dem Blute die erhöhte Gerinnungstendenz verleiht und so plötzliche Thrombosen hervorruft.

Einwirkung des Histons auf das kreisende Blut.

Ich habe Histon 26 Hunden und 3 Kaninchen in das kreisende Blut eingespritzt. Hierbei stellte es sich heraus, dass, wenn man eine wässerige, neutrale Histonlösung in das circulirende Blut einführt, das aus der Ader gelassene Blut permanent flüssig bleibt. Bei Ausführung dieser Versuche muss man jedoch einige Vorsichtsmassregeln einhalten, von denen das Gelingen abhängig ist: 1. die Histonlösung muss neutral reagiren, sonst tödtet die saure Reaction das Thier während der Einspritzung; 2. der Aderlass muss sofort nach beendeter Injection gemacht werden; 3. zum Flüssigerhalten des Blutes ist eine Histonmenge nöthig, welche 0,3 gr. trockenes Histon(chlorhydrat) auf 1000 gr. Körpergewicht des Thieres entspricht.

Als Beispiele führe ich folgende Versuche an:

Versuch I. Einem Hunde von 23500 gr. Körpergewicht, der durch eine (Hund.) subcutane Injection von 5 cbcm. einer 2proc. Morphinchlorhydratlösung anaesthetisch gemacht worden ist, wird auf der einen Seite die Vena jugularis, auf der anderen die Carotis freigelegt und in Beiden werden in der bekannten Weise mit Gummischläuchen versehene Canülen eingebunden. Nachher werden in die Jugularis dem Herzen zu 8 gr. Histonchlorhydrat aus Thymuslymphocyten in 80 cbcm. dest. Wasser gelöst und mit Na_2CO_3 genau neutralisirt, injicirt. Die Injection dauert eine Minute. In demselben Momente, wo der Stempel der Spritze die Ausgangsöffnung erreicht, wird die

an der Carotis sitzende Klemme geöffnet und das Blut aufgefangen. Das Thier stirbt durch Verblutung ganz ruhig und ohne Krämpfe. Das gelassene Blut bleibt bis zur beginnenden Fäulniss permanent flüssig.

Bei der mikroskopischen Untersuchung des Histonblutes tritt die merkwürdige Erscheinung zu Tage, dass die Leukocyten noch **24 Stunden** nach dem Aderlass wohl erhalten sind und bei Zimmertemperatur lebhaft amöboide Bewegungen ausführen, dass ferner die Plättchen besser erhalten sind als durch irgend ein anderes Conservierungsmittel. Sie sind rund, vollkommen homogen und nicht im Mindesten klebrig. Ich habe mich mit der Untersuchung der Plättchen lange Zeit beschäftigt und kann meinen Erfahrungen zufolge wohl behaupten, dass man solche Plättchen bloß im kreisenden Blute sehen kann. Die rothen Blutkörperchen sind ebenfalls gut erhalten. Wenn man in Betracht zieht, dass in allen anderen Blutarten und Plasmaarten — wie die Dorpater Schule festgestellt hat — die Leukocyten sehr schnell und hochgradig zerfallen, — ich weise hier auf die Untersuchungen von Schmidt¹⁾, Heyl, Birk, Hoffmann, von Samson-Himmelstjerna hin, welche gezeigt haben, dass im abgekühlten Pferdeblute, im Magnesiumsulfatblute (in 24 St. um 8/9.), im Peptonblute ein hochgradiger Zerfall weisser Blutkörperchen stattfindet — ferner wenn man in Betracht zieht, dass in allen anderen Blutarten die Blutplättchen schon nach kürzester Zeit klebrig werden und sich sternförmig defiguriren und schliesslich auch zerfallen und wenn man dem entgegenstellt, dass im Histonblut alle Leukocyten ausserhalb des Organismus im Becherglase 24—36 Stunden nicht nur nicht zerfallen, sondern noch leben und die Blutplättchen eben so lange ihre — nur im circulirenden Blute an ihnen sicher beobachtete — Form behalten, dann muss man behaupten, dass das Histonblut das einzige künstlich erhaltene Aderlassblut ist, welches in allen Einzeltheiten das Bild des normalen, lebenden Blutes liefert.

¹⁾ Pflüger's Archiv, Bd. IX, XI.

Das Histonblut zeigt die Eigenschaft, dass sich die rothen Blutkörperchen ausserordentlich schnell absetzen. Schon während des Ausfliessens des Blutes aus der Carotis bemerkt man, dass sich die rothen Blutkörperchen abzusetzen beginnen. Centrifugirt man Histonblut, so kommt man zu einem ungefärbten, ungerinnbaren Histonplasma. Auf der Säule der rothen Blutkörperchen bemerkt man in der Centrifugenröhre eine dünne weisse Scheibe, auf welcher dann die Plasmasäule ruht. Nachdem das Plasma vorsichtig abgehoben worden ist, kann man mit einer Platinoese die ganze weisse Scheibe aus dem Centrifugirgefäss herausziehen. Untersucht man sie mikroskopisch, so stellt sich heraus, dass diese Scheibe nur aus verfilzten Leukocyten besteht. Erwärmt man sie auf 37° , so zerfällt der Filz und alle diese Blutkörperchen beginnen sich nach allen Richtungen hin zu bewegen.

Da sich auf diese Weise die erste Möglichkeit ergab, in den Besitz von wägbaren Mengen von unveränderten Blutleukocyten zu gelangen, habe ich mir die Gelegenheit nicht entgehen lassen, die Hauptergebnisse meiner an Lymphocyten der Lymph- und Thymusdrüse angestellten chemischen Untersuchungen wenigstens qualitativ nachzuprüfen.

Ich sammelte mir in der angegebenen Weise die Leukocyten aus vier Histonversuchen unter Alkohol aufbewahrt. Das Gewicht der feuchten Leukocyten aus diesen vier Hunderversuchen betrug 8,35 gr. Die Menge des Alkohols, in welchem sie aufbewahrt waren, betrug 150 ccm. Nach etwa dreiwöchentlichem Stehen wurde der Alkohol abgossen und erneuert. Nach weiteren zwei Wochen goss ich den Alkohol wieder ab und ersetzte ihn durch Aether, welcher nach 24 Stunden abgossen wurde. Die Leukocyten wurden nun im Vacuum über H_2SO_4 getrocknet.

Die vereinten alkoholischen und ätherischen Auszüge wurden bei etwa 70° ausgedunstet und im Rückstand konnte ich nach den üblichen Methoden Cholesterin und Lecithin nachweisen.

Die getrockneten Leukocyten, deren Gewicht 2,5 gr. betrug, wurden nun mit 50 ccm. Wasser fein verrieben und

24 Stunden stehen gelassen, nachher das wässrige Extract filtrirt. In Filtrat erhielt ich mit Essigsäure eine flockige Fällung, welche sich mit dem Nucleohiston leicht identificiren liess. Die Substanz zeigte alle Löslichkeitsverhältnisse des Nucleohistons, gab mit Soda und Salpeter geschmolzen P-Reaction und zerfiel bei Behandlung mit 0,8% HCl in Nuclein und Histon, welches sich durch die Ammoniakfällung und Biuret-reaction leicht als solches erkennen liess.

Wenn dieser Versuch aus Rücksicht auf die geringe Menge der in Prüfung gekommenen Leukocyten keinen Anspruch auf den Namen einer Analyse der Blutleukocyten machen kann, so hat er doch gelehrt, dass auch der Zellkern der Blutleukocyten, ebenso wie derjenige der Lymphocyten aus Nucleohiston besteht, eine für die Blutgerinnungslehre nicht unwichtige Thatsache.

Ich kehre zum Histonplasma zurück. Dasselbe bietet in seinem Verhalten gegen Gerinnungserreger merkwürdige Eigenschaften. Es ist weder durch Verdünnen mit Wasser, noch CO_2 noch Essigsäure noch Fibrinferment zur Gerinnung zu bringen. Nur Nuclein aus den Leukocyten oder einer anderen Quelle ruft unweigerlich Fibringerinnung in dem Histonplasma hervor. Folgende Versuchsreihe diene als Illustration:

- a) 3,5 ccm. Histonplasma werden mit 17,5 ccm. dest. Wasser verdünnt. Das Gemisch trübt sich stark. Bald nachher entsteht ein flockiger, in verdünnter Essigsäure löslicher Niederschlag. Das Gemisch bleibt flüssig.
- b) In 10 ccm. Histonplasma wird eine Stunde lang Kohlensäure eingeleitet. Trotzdem bleibt das Plasma permanent flüssig.
- c) 10 ccm. Histonplasma werden mit $\frac{1}{5}$ N.-Essigsäure genau neutralisirt. Auch diese Portion zeigt absolut keine Gerinnungstendenz.
- d) 1. 15 ccm. Histonplasma werden mit 15 ccm. Bittersalzplasma versetzt. Keine Gerinnung.
2. 10 ccm. Histonplasma mit 10 ccm. Peritonealflüssigkeit vom Pferde. Keine Gerinnung.
- e) 1. 10 ccm. Histonplasma werden mit 20 ccm. einer — wie er 2. zeigt — auf Fibrinogenlösungen und Salzplasma ausserordentlich

wirksamen, nach Schmidt bereiteten Fibrin fermentlösung versetzt. Das Gemisch gerinnt absolut nicht.

2. Controllprobe: 10 ccm. derselben Fibrin fermentlösung mit 15 ccm. reiner Fibrinogenlösung. Gerinnung nach 20 Minuten.
3. 10 ccm. Histonplasma werden mit 10 ccm. einer neutralen Leukonucleinlösung aus Thymus-Leukocyten versetzt. Nach 5 Minuten gerinnt das Gemisch zu einem festen Kuchen, so dass man das Glas umkehren kann, ohne dass etwas herausfließt.

Es braucht kaum wohl bemerkt zu werden, dass Histonplasma sich von dem von Schmidt-Mühlheim und Fano beschriebenen Peptonplasma vollkommen unterscheidet. Es könnte auf den ersten Blick scheinen, dass, nachdem das Histon trotz seiner Coagulierbarkeit in der Wärme in alkalischer Lösung manche den Albumosen zukommende Eigenschaften, also z. B. Biuretreaction in der Kälte, zeigt, die Einwirkung des Histons auf das kreisende Blut mit derjenigen der Peptone identisch ist. Dass dem nicht so ist, erhellt aus folgenden Thatsachen:

1. Das Histon erhält im Gegensatze zu dem Pepton auch ausserhalb der Gefässe zum Aderlassblut zugesetzt dasselbe im permanent flüssigen Zustande.
2. Das Histon macht auch in's kreisende Blut des Kaninchens gespritzt das Blut ungerinnbar, während es nach den Beobachtungen genannter Forscher das Pepton nicht macht.

Letzteres möge folgender Versuch stützen:

Einem Kaninchen von 2000 gr. Körpergewicht werden 0,6 gr. Histonchlorhydrat aus Kalbsthymus in 6 ccm. Wasser gelöst und mit Soda genau neutralisirt in die Vena Jugularis injicirt. Das gleich nach der Einspritzung aus der Carotis gelassene Blut bleibt flüssig und ist nur durch Nuclein zum Gerinnen zu bringen.

3. Das Histonplasma ist weder durch Kohlensäure noch durch Neutralisation mit Essigsäure, noch durch Verdünnen mit Wasser, noch durch Filtriren durch eine Thonzelle zur Gerinnung zu bringen, während genannte Mittel im Peptonplasma Gerinnung erzeugen.

4. Im Peptonblute gehen die Leukocyten durch Zerfall schnell zu Grunde, wie aus den Untersuchungen von v. Samson-Himmelstjerna hervorgeht — im Histonblute dagegen bleiben die Leukocyten ausserhalb des Thierkörpers tagelang am Leben.

Wir kommen jetzt zu der wichtigen Frage, worauf denn die gerinnungshemmende Einwirkung des Histons auf das intra- und extravasculäre Blut beruht? Nachdem das Histon einerseits eine Substanz von ausgesprochenen basischen Eigenschaften ist, und andererseits, wie ich früher gezeigt habe, mit alkalischen Erden Verbindungen eingeht, so wären gleich in erster Linie zwei Möglichkeiten zu discutiren: Entweder bindet das Histon das zur Abspaltung des Thrombosins vom Fibrinogen notwendige Nuclein, oder es reisst das zur Ausfällung des Fibrins oder Thrombosinkalks nothwendige Kalksalz an sich. Auch die Möglichkeit wäre zu erwägen, dass, nachdem das Histon die Leukocyten in wohl erhaltenem und lebendem Zustande erhält und so ihren Zerfall verhindert, ein Austritt der zur Thrombosinbildung nothwendigen Nucleinsubstanzen aus den Leukocyten nicht stattfindet.

Die zweite Möglichkeit lässt sich sehr leicht ausschalten, indem man sich sehr leicht davon überzeugen kann, dass das Histonplasma mit Kalksalzen nicht gerinnt. Ich habe Histonplasma mit mannigfaltig variirten Mengen von Calciumchlorid versetzt und habe, wenn das Histonplasma für sich absolut ungerinnbar, was von oben angegebenen Versuchsbedingungen abhängt, dadurch nie eine Gerinnung hervorrufen können.

Es bleiben also nur die anderen zwei Möglichkeiten. Nachdem, wie oben gezeigt wurde, dass mit anderen Stoffen ungerinnbare Histonplasma mit Nuclein unweigerlich Gerinnung gibt, so muss ich mich für eine dieser beiden Möglichkeiten entscheiden.

Welche von beiden es ist, d. h. ob das Histon den Austritt der Nucleinstoffe aus den Leukocyten verhindert, oder ob es gelöste Nucleinkörper an sich reisst, diese Frage habe ich nicht experimentell zu entscheiden gesucht, weil beide Eventua-

litäten auf Eines herauskommen, d. h. die Lähmung oder Verhinderung der Einwirkung der Nucleinstoffe auf das Fibrinogen.

Folgender Versuch, am Histonplasma angestellt, sei — seines merkwürdigen Resultates halber — angeführt. Wenn man einem Hunde Histon injicirt, so gelingt es manchmal, ein Plasma zu bekommen, welches weder mit dem gleichen Volumen kalt gesättigter Kochsalzlösung, noch mit Essigsäure einen deutlichen Niederschlag gibt, — und zwar ist es gewöhnlich Plasma eines solchen Histonblutes, in welchem die Leukocyten und die Plättchen am besten erhalten sind und die ersteren am längsten amoeboiden Bewegungen ausführen. Um die Sachlage aufzuklären, stellte ich folgendes Experiment an:

Versuch. Einem Hunde von 25,000 gr. Körpergewicht werden 7,5 gr. Histon in ganz neutraler wässriger 10proc. Lösung in die Jugularis eingespritzt und in demselben Moment, wo der Stempel der Spritze auf den Boden stösst, eine Portion Blutes aufgefangen. Nachher wird die Klemme an der Carotis geschlossen, 15 Minuten gewartet und wieder Blut aufgefangen, die Klemme wieder geschlossen, wieder 15 Minuten gewartet, Blut gelassen und so fort 4 oder 5 Mal hintereinander. Nachdem nun alle Blutportionen centrifugirt wurden, erhält man mehrere Plasmaportionen, welche sich sowohl in ihrer Gerinnungstendenz als in ihrem Verhalten Reagentien gegenüber wesentlich von einander unterscheiden. Die erste, zweite und manchmal auch dritte Portion gerinnen überhaupt nicht, die vierte nach Ablauf von 12—24 Stunden, die fünfte schon nach 3—4—5 Stunden. Untersucht man nun die erste Portion, so findet man, dass sie weder mit gesättigter Kochsalzlösung, noch mit Essigsäure einen deutlichen Niederschlag gibt. Die zweite gibt mit Kochsalz eine ziemlich geringe Trübung, welche sich erst nach stundenlangen Stehen zu Flöckchen zusammenballt, die dritte gibt schon einen stärkeren Niederschlag, die vierte einen der Menge, Aussehen und Löslichkeit nach normalen Fibrinogen-niederschlag, die fünfte dagegen gibt mit dem gleichen Volumen einer gesättigten Kochsalzlösung eine gleichmässige Gallerte, die sich in ganz verdünnter Salzsäure nur theil-

weise löst und sehr an denjenigen Körper erinnert, welchen Hammarsten als lösliches Fibrin bezeichnet. Untersucht man die fünf Blutportionen reihenweise mikroskopisch, indem man sich von jeder mehrere Präparate anfertigt, so findet man, dass in der ersten alle Leukocyten, auf welche man im Gesichtsfelde stößt, vollständig gut erhalten sind und lebhaft amöboide Bewegungen ausführen. Die Blutplättchen sind ebenfalls durchweg in ihrer ursprünglichen Form wohl erhalten: rund, homogen und nicht klebrig. In der zweiten Blutportion findet man die Zahl der Leukocyten um ein Geringes vermindert und man sieht vereinzelte Leukocyten im Zerfall begriffen. In der dritten und vierten Blutportion ist die Zahl schon um ein Bedeutendes verringert, ebenso und noch bedeutender in der fünften Blutportion. Eine vergleichende Zählung — deren Einzelheiten hier anzuführen ich unterlasse — ergab, dass die Zahl der Leukocyten in der ersten, zweiten, dritten und vierten Portion sich verhält wie 10:9:5:4:3,5. Es fand also der Fibrinogenmengezunahme entsprechend ein Schwund um etwa 60% der farblosen Elemente des Blutes statt.

Die Deutung dieses Versuches ist nicht leicht. Auf den ersten Blick hin könnte man annehmen, dass das Fibrinogen als ein im Plasma gelöster Stoff im kreisenden Blute resp. im Histonblute in merklichen Mengen nicht vorhanden ist — eine Anschauung, welcher sich, von ganz anderen Gesichtspunkten ausgehend, Al. Schmidt in seiner letzten Publication zuneigt. Es könnte aber auch sein, dass das Histon die Reactionen des Fibrinogens beeinflusst. Ich will die Entscheidung dieser Frage vorläufig noch offen lassen und hoffe, ein ander Mal darauf zurückkommen zu können.

Zum Schluss will ich noch einen sehr instructiven Versuch anführen, welcher es gestattet, in sehr überzeugender Weise an einem Versuchsthier die sich entgegengesetzte Wirkung der beiden Spaltungsproducte des Nucleohistons — des Nucleïns und Histons — zu demonstrieren.

Versuch. Ein 6700 gr. wiegender Hund wird durch eine subcutane Morphininjection anaesthetisch gemacht und immobilisirt. Linkerseits wird die Vena Jugularis, rechterseits die Vena Jugularis und Arteria carotis freigelegt. In alle drei Gefäße werden nach der üblichen Methode Canülen, welche mit

Gummischläuchen versehen sind, eingebunden. Der Schlauch der rechten Jugularis ist mit einer mit einer 5proc. Nucleinlösung, derjenige der linken Jugularis mit einer mit 10proc. neutraler Histonlösung gefüllten Spritze in Verbindung. 11 Uhr 15 Min. Es wird normales Blut entnommen. Gerinnung nach 5 Minuten.

11 Uhr 20 Minuten werden in die linke Jugularis 15 ccm. der neutralen Histonlösung gespritzt und sofort nach der Einspritzung wird aus der Carotis eine Blutprobe entnommen. Das Blut bleibt permanent flüssig.

Beinahe zu gleicher Zeit mit der Blutentnahme werden in die rechte Jugularis 25 ccm. der 5proc. Nucleinlösung eingespritzt. Eine Minute nach der Injection wird Blut entnommen. Gerinnung nach 12 Minuten.

Es werden wieder 15 ccm. der Histonlösung eingespritzt und Blut gelassen. Das Blut hat keine Gerinnungstendenz.

Bald nach der Blutentnahme verendet das Thier.

Dieser Versuch zeigt an einem und demselben Versuchsthier in sehr überzeugender Weise, dass die doppelsinnige Einwirkung der Leukocyten und ihres Hauptbestandtheiles des Nucleohistons auf das kreisende Blut darauf beruht, dass die beiden Spaltungscomponenten dieser Substanz eine sich entgegengesetzte Einwirkung auf die Gerinnungstendenz des Blutes ausüben. — An diesem Versuche sehen wir, dass das eingespritzte Histon das Blut vollständig ungerinnbar macht, dass aber dem Blute seine Gerinnungsfähigkeit durch eine Einspritzung von Nuclein wieder gegeben werden kann. Die Gerinnungsfähigkeit des Blutes kann durch eine nachträgliche Histoneinspritzung wieder aufgehoben werden u. s. w.

Bevor ich nun meine chemische Theorie der Blutgerinnung aus den bisher beschriebenen Resultaten aufbaue, will ich, um in der Theorie auch die Herkunft der am Gerinnungsprocesse beteiligten Substanzen präzise berücksichtigen zu können, über einige mikroskopische Versuche, die ich vor längerer Zeit angestellt habe, referiren.

Mikrophysiologische Beobachtungen über die Betheiligung des Zellkerns der Leukocyten an der Blutgerinnung.

Die vorausgegangenen Untersuchungen haben mit der denkbar grössten Sicherheit die Betheiligung des Zellkerns der Leukocyten an der Blutgerinnung bewiesen und die von mir gelieferten exacten chemischen Beweise machen eigentlich die bei weitem unsicherere und in der Deutung dieser Resultate viel labilere Methode der mikroskopischen Untersuchung der Blutgerinnungserscheinungen vollständig entbehrlich. Die Thatsache, dass die Einwirkung der Nucleïnsubstanzen auf das Fibrinogen auf ihrem Gehalt an Nucleïnsäure, also dem Zellkernstoff par excellence beruht, hat die von mir vor etwa drei Jahren publicirte Vermuthung, dass sich der Zellkern der Leukocyten activ an der Fibrinbildung betheilige, in das Reich der exacten Thatsachen erhoben. Wenn ich also in Folgendem über meine diesbezüglichen mikroskopischen Untersuchungen berichte, so geschieht dies, weil diese Versuche zum grossen Theil als Orientirungsversuche, noch bevor ich die Rolle des Nucleohistons festgestellt habe, ausgeführt worden sind und weil sie immerhin als Erhärtung der chemischen Beweise nicht allen Interesses entbehren.

Eine Reihe von Präparaten wurde von mir in folgender Weise angefertigt. Ich liess einen mit einem Deckgläschen aufgefangenen Blutstropfen durch verschiedene Zeiträume auf einem Objectträger gerinnen, wobei der Verdunstung durch einen Wachsring vorgebeugt war. Nachher wusch ich das nunmehr entstandene Ranvier'sche Fibrinnetz mit einem Wasserstrahl von den rothen Blutkörperchen vollständig frei, fixirte es längere Zeit mit Herrmann'scher Lösung oder Osmiumsäure, tingirte, wusch den überschüssigen Farbstoff mit Wasser aus, trocknete das Präparat an der Luft und schloss in Canada-Xylol ein. Als Farbstoffe benützte ich: die Griesbach'sche Doppelfärbung mit Rhodamin und Methylgrün oder die Flemming'sche Färbung mit Saffranin in Gentianaviolett und nachheriger Extraction von Gentiana in Orange. Bei Anwendung der ersten Färbungsmethode erscheinen die Zellkerne der Leukocyten und die Nucleïnplättchen intensiv grün oder

blau, das Cytoplasma und das Fibrinnetz dagegen roth resp. violettroth. Die auf diese Weise erhaltenen Bilder ergeben in erster Linie, dass sich die Fibrinfäden ausser, wie bekannt, an den Plättchen, an den Zellkernen der Leukocyten festsetzen. Man kann deutlich beobachten, wie die Fibrinfäden durch das Cytoplasma an den Kern heranreichen. Der Einwand, den ich mir zu Anfang selbst machte, dass nämlich die Fäden über den Kernen hinwegziehen, lässt sich leicht durch eine genaue Durchmusterung der Präparate stürzen. Die Fibrinfäden werden im Gegensatze zu den grünen oder blauen Kernen violettroth gefärbt; es müsste also bei der verhältnissmässig grossen Dünnhheit der Präparate wenigstens einmal ein Faden als rother Strich oder Linie im Zellkern selbst sichtbar sein. Diese Erscheinung habe ich aber nie — und ich habe über 100 Präparate angefertigt und genau untersucht — beobachten können. Andererseits sieht man beinahe immer die Fibrinfäden sich an einer Seite des Zellkerns ansetzen, ohne dass sie, vermittelt einer geraden Linie bis auf die andere Seite, verfolgbar wären. Sie setzen sich auf der anderen Seite derart an, dass keine Beziehung zwischen beiden Seiten aufzufinden ist und bei der ziemlich straffen Spannung der Fibrinfäden müssten sie, falls sie über den Zellkern hinwegziehen sollten, sich in irgend einer geraden Linie verfolgen lassen.

Noch belehrender als die Centralisation der Fibrinfäden in dem Zellkern ist die Thatsache, dass gleich im Anfang der Gerinnung die Zellkerne der Leukocyten in der Regel eine wandständige Lagerung einnehmen. Dieser Befund gewinnt an Bedeutung bei Heranziehung der bekannten biologischen Thatsache, nach welcher Zellkerne, zur Zeit wo sie an die Zellwand oder nach aussen Stoffe abgeben, aus der Mitte der Zelle, nach der Wand hinwandern.

Während der Gerinnung tritt auch folgende merkwürdige Erscheinung zu Tage: Sehr viele von den mit den Fibrinfäden verknüpften Kernen der Leukocyten treten vermittels eines von dem Cytoplasma gebildeten schlauchartigen Fortsatzes aus dem Cytoplasma heraus. Ich habe diesen Vorgang

Karyoschise genannt. Man gewinnt den Eindruck, als ob die Faserstoffäden die Kerne gewaltsam an die Wand und aus dem Cytoplasma herausziehen. Im weiteren Verlaufe der Gerinnung zerfällt das Cytoplasma und man bekommt schliesslich viele nackte Leukocytenkerne zu Gesicht. Die Karyoschise erinnert lebhaft an die interessanten Beobachtungen Loewit's, welcher im Krebsblute vor der Gerinnung einen Austritt von Kügelchen und Körnchen aus den Krebsblutzellen in das Blutplasma sah. Loewit nennt diesen Vorgang Plasmoschise, weil er die Kügelchen als Zerfallsproducte oder Derivate des Zellenleibs ansieht. Fasst man ins Auge, dass die Blutplättchen, wie ich vor langer Zeit bewiesen habe¹⁾, Nuclein enthalten, so liefert der Befund, dass die Fibrinfäden einerseits an den Leukocytenkernen, andererseits an den Nucleinplättchen, ihre Insertionsstellen finden, sowie die Thatsache der wandständigen Lagerung der Kerne und die Karyoschise nicht uninteressante sinnfällige Bilder, wie sich der Zellkern der Leukocyten bei der Gerinnung verhält.

Herr H. Griesbach²⁾ hat es unternommen, an den soeben citirten Versuchen und Präparaten Kritik zu üben. Er behauptet, dass es wünschenswerth gewesen wäre, dass ich, bevor ich meine Arbeiten publicirt habe, vorher seine Versuche über die Plasmoschise zu wiederholen hätte. Bis jetzt kann ich noch nicht bedauern, dies nicht gethan zu haben, umsomehr, da in den Versuchen von Herrn Griesbach wohl schwerlich jemand irgend einen neuen Gesichtspunkt für die Klärung der Blutgerinnungsfrage finden wird. Dass eine Plasmoschise stattfindet und dass dabei die contractile Zellsubstanz und deren Pseudopodien in erster Linie hochgradigen Veränderungen unterliegen, das will ich gar nicht bezweifeln, — aber dass diese hochgradigen Veränderungen irgend etwas mit der Blutgerinnung zu thun haben, das muss der Herr Gries-

¹⁾ Leon Lilienfeld: Hämatologische Untersuchungen. Du Bois-Reym. Archiv. 1892.

²⁾ H. Griesbach. Zur Frage nach der Blutgerinnung. Centralblatt für die medicinischen Wissenschaften, 1892. Seite 499.

bach erst chemisch beweisen und das wird ihm wohl schwerlich gelingen. Eine Stütze für seine Kritik findet Herr Griesbach darin, dass sich die Fibrinfäden ebenso tingiren wie die Zellsubstanz. Ich glaube, diese Schlussfolgerung widerlegt sich von selbst.

Oder glaubt Herr Griesbach, dass sich das Nuclein oder die Nucleinsäure bloß deswegen, weil sie vom Fibrinogen das Thrombosin abspaltet und so das Fundament für die Gerinnung liefert, ebenso wie das Fibrin färben wird? Würde Herr Griesbach auch z. B. die Betheiligung der Schwefelsäure an der Bildung von Aether, aus Alkohol bloß deswegen bezweifeln, weil die Schwefelsäure nicht so leicht flüchtig ist, wie das Reactionsproduct der Aether? Uebrigens ist Herr Griesbach selbst der Meinung, dass im Krebsblute durch Plasmoschise und Zerfall der amöboiden Zellen kein Globulin, sondern eine «phosphorreiche nucleinführende Substanz» in das Blutplasma gelangt. Er muss also erst beweisen, dass das Cytoplasma der Krebsblutzellen phosphorreiche Nucleinsubstanzen enthält, ehe er sie aus demselben heraustreten lässt.

Die Thatsache, dass der Zellenleib während der Blutgerinnung zu Grunde geht, während der Kern intact zu bleiben scheint, ist auch von Loewit¹⁾ gegen meine Theorie ins Feld geführt worden. Ich kann mich wohl auf die Entgegnung beschränken, welche seitens von A. Kossel, welcher meine Theorie vertheidigt, Loewit zu Theil wurde. Kossel²⁾ sagt: «Ich kann diesen Einwand nicht anerkennen, denn es ist nicht möglich, durch mikroskopische Beobachtungen zu entscheiden, ob aus einem Kern, dessen Structur sichtbar bleibt, gewisse lösliche Bestandtheile in das umgebende Plasma übergehen oder nicht. Das Verschwinden des Cytoplasmas scheint mir eher für eine Betheiligung des Kerns als gegen dieselbe zu sprechen. Denn erst nach dem Wegfall der Hülle, die dem

¹⁾ Loewit, Studien zur Physiologie und Pathologie des Blutes und der Lymphe. Jena 1892, S. 106, 107.

²⁾ A. Kossel, Neuere Untersuchungen über die Blutgerinnung. Berliner klinische Wochenschrift 1893, Nr. 21. S. 6 des Separat-Abzuges.

Leukocytenkern von dem umgebenden Plasma trennt, ist ein Contact der Kernsubstanzen mit dem Blutplasma hergestellt, erst dann ist eine directe Einwirkung möglich».

Ich habe die mikroskopische Untersuchung der Blutgerinnung noch nach einer Methode verfolgt, welche schon von Jaroslav Hlava¹⁾ im Jahre 1893 mit dem gleichen Erfolge benutzt wurde. Ich habe bloß die Färbungs- und Fixirungsmethoden modificirt. Blut aus der Carotis wird in kleinen Glasschalen aufgefangen und mit feinen Fäden geschlagen, und zwar durch 10, 15, 20, 25, 30 u. s. w. Sekunden. Die Fäden werden in Hermann'scher Lösung oder Osmiumsäure fixirt, mit Ehrlich-Biondi'schem Triacidgemisch gefärbt und entweder in Wasser oder Canada-Xylol mikroskopisch untersucht. Diese Versuche ergaben fast immer das gleiche Resultat. Nach 10—15 Sekunden dauerndem Schlagen findet man am Faden gar keine Formelemente, nur manchmal 1 oder 2 gut erhaltene Leukocyten. Nach 25—30 Sekunden sieht man, dass der Faden von einer feingekörnten Masse eingehüllt ist, in welcher ganz nackte Leukocytenkerne liegen. Je mehr man sich vom Faden nach der Peripherie zu nähert, umsomehr gut erhaltene Leukocyten findet man. Schlägt man das Blut 35 Sekunden, so sieht man, dass die Leukocyten vollständig zu einer granulirten Masse und nackten Kernen zerfallen sind. Je länger man das Blut schlägt, umsomehr nimmt die körnige Masse zu, umsomehr nimmt die Zahl der Kerne ab. Nach 60 Sekunden, also einer Minute, ist das Bild ganz frappant, indem die Mehrzahl der Kerne verschwunden ist. Die gekörnte Masse hat sich stark verdichtet und nach 65 Sekunden hat sich die granulirte Masse in eine beinahe ganz homogene, hie und da kleine Körnchen aufweisende verändert. Man kann also mit dieser Methode den directen Uebergang der Zellkerne der Leukocyten in Fibrinsubstanz beobachten. Was dabei auch sofort auffällt, ist der Umstand, auf welche auch schon Hlava aufmerksam macht, dass die Zellkerne mit dem Fortschreiten des Gerinn-

¹⁾ Hlava, Die Beziehung der Blutplättchen Bizzozero's zur Blutgerinnung und Thrombose. Ein Beitrag zur Histogenese des Fibrins. Archiv für experimentelle Pathol. u. Pharmakol., Bd. 17, S. 392 ff.

nungsprocesses ihre Tinctionsfähigkeit in erheblichem Maasse verlieren. Nachdem es mir in meiner Arbeit über die Wahlverwandtschaft der Zellenelemente zu verschiedenen Farbstoffen gelungen ist, zu zeigen, dass die Zellkerne ihr Färbungsvermögen den in ihnen enthaltenen Nucleinsubstanzen verdanken, so ist diese Thatsache dahin zu deuten, dass der Verlust der Tinctionsfähigkeit der Leukocytenkerne während der Gerinnung eine Abgabe der Nucleoproteide an das umgebende Plasma bedeutet.

Zum Schluss dieses Kapitels muss ich, um ferneren Polemik mit Herrn Griesbach und anderen vorzubeugen, mich mit aller Entschiedenheit dagegen verwahren, dass ich auf Grund der mikroskopischen Untersuchungen einen Schluss auf die Betheiligung oder Nichtbetheiligung des Zellkerns der Leukocyten an der Blutgerinnung ziehen will. Die Resultate meiner chemischen Untersuchungen beweisen die active Mitarbeiterschaft des Zellkerns an der Faserstoffbildung derart sicher, dass daran gar keine mikroskopischen Untersuchungen rütteln können. Sie bedürfen also gar keiner Unterstützung durch mikroskopische Beobachtungen umsomehr, als sich aus letzteren, insoferne sie nicht auf exacten, mikrochemischen Methoden basiren, auf diesem Gebiete Resultate ergeben, welche mehrfacher Deutung fähig sind.

Ueber die Plättchen und ihre Betheiligung am Gerinnungsprocess.

Bizzozero¹⁾, welchem das Verdienst zukommt, als der Erste die Blutplättchen genau beschrieben und im strömenden Blute der Säugethiere gesehen zu haben, war auch der Erste, welcher die Plättchen in nahe Beziehung zur Fibringerinnung und Thrombose brachte; allerdings mit dem grossen Fehler, dass er zu gleicher Zeit die Betheiligung der Leukocyten an der Fibrinbildung vollständig läugnet. «Die Hauptrolle bei der Blutgerinnung fällt den Blutplättchen und nicht den Leukocyten zu²⁾».

Die Thatsache, dass Bizzozero den Zusammenhang der Faserstoffgerinnung mit einem massenhaften Zerfall der Leuko-

¹⁾ Bizzozero: Virchow's Archiv, Bd. XI, S. 261—332.

²⁾ L. c., S. 324.

cyten, also die Schmidt'sche Theorie in Abrede stellt, zog ihm mannigfache Gegner zu, unter denen Fano¹⁾, Heyl²⁾, Slevogt³⁾, Feiertag⁴⁾, Weigert⁵⁾, Hlava⁶⁾ u. A. genannt sein mögen.

Einer sachlichen Kritik unterzog diese Streitfrage Rauschenbach⁷⁾. Für die Gerinnungsfrage ist es — nach Rauschenbach — vollkommen gleichgiltig, ob die Plättchen selbstständige Formelemente darstellen oder ob sie Leukocytenabkömmlinge sind. Die Hauptfrage ist, ob die Plättchen protoplasmatische Gebilde sind. Bizzozero's Versuchen kann Rauschenbach keine Beweiskraft zuerkennen — er bestreitet aber das coagulative Vermögen der Blutplättchen vorläufig nicht, weil es sich immerhin herausstellen könnte, dass die Blutplättchen neben den Leukocyten, denen Rauschenbach jedenfalls die Hauptrolle bei der Gerinnung vindicirt, Träger von gerinnungserregenden Substanzen sind.

Eberth und Schimmelbusch⁸⁾ sprechen den Plättchen eine active Rolle bei der Faserstoffgerinnung ab; nach diesen Forschern scheidet sich das Fibrin aus dem Blutplasma in Form von krystallartigen Nadeln ab.

Von einer Einigung über die Betheiligung der Plättchen an der Fibrinbildung ist demnach keine Rede.

In einer vor etwa 3 Jahren ausgeführten Untersuchung⁹⁾ habe ich den Beweis erbracht, dass die Plättchen neben

1) Fano: Centralbl. f. d. med. Wiss. 1882, S. 210.

2) L. c.

3) Fed. Slevogt: Ueber die im Blute der Säugethiere vorkommenden Körnchen. Inaug.-Diss., Dorpat 1883.

4) Feiertag: Beobachtungen über die sog. Blutplättchen. Inaug.-Diss., Dorpat 1883.

5) Weigert: Die neuesten Arbeiten über die Blutgerinnung. Fortschritte der Medicin, 1883.

6) L. c.

7) L. c.

8) G. G. Eberth und C. Schimmelbusch: Die Thrombose nach Versuchen und Leichenbefunden. Stuttgart 1888.

9) Leon Lilienfeld: Hämatologische Untersuchungen, Du Bois' Archiv, 1892, S. 115 ff.

Eiweiss unzweifelhaft Nuclein enthalten. Es hat sich nämlich herausgestellt, dass die Plättchen bei ihrer Behandlung mit Pepsin-Salzsäure zu Anfang sich in einen gekörnten und einen homogenen Antheil differenziren: bei weiterer Einwirkung des künstlichen Magensaftes löst sich der homogene Antheil auf, während der gekörnte ungelöst zurückbleibt und sich sogar nach 24stündiger Einwirkung von Pepsin-Salzsäure nicht auflöst. Da nun dieser gekörnte Antheil neben der Unlöslichkeit in künstlichem Magensaft, noch alle anderen Reactionen von Nucleinen — also Löslichkeit in verdünnten Alkalien, conc. HCl, conc. HNO₃, Quellbarkeit mit Kochsalzlösungen u. s. w. — gab, habe ich den wohlberechtigten Schluss gezogen, dass der gekörnte Antheil der Plättchen aus Nuclein, der homogene aus Eiweiss bestehe.

In Gemeinschaft mit Herrn Dr. Monti¹⁾ habe ich eine Methode ausgearbeitet, mittelst welcher man im Stande ist, in Geweben mikroskopisch Phosphor nachzuweisen. Wir haben diese Methode auch auf die Blutplättchen angewendet, wobei sich gezeigt hat — was ja schliesslich zu erwarten war — dass die Blutplättchen Phosphor enthalten²⁾.

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 17, S. 410.

²⁾ Trotz alledem vertheidigt Loewit (Studien zur Physiologie und Pathol. des Blutes und der Lymphe) seine Anschauung, welcher zufolge die Plättchen aus Globulin bestehen. Ich will mich mit Herrn Loewit in keine Polemik einlassen, da solche in diesem Falle, wo es streng chemisch bewiesen ist, dass die Plättchen Nuclein enthalten, gegenstandslos ist. Ich will blos Folgendes kurz bemerken:

1. Ich habe Loewit — wie derselbe behauptet — nicht falsch citirt. Ich hatte gar nicht die von Loewit gemeinte Stelle im Sinne, sondern diejenige auf S. 85 seiner Abhandlung.
2. Ich habe auch Plättchen in dem nach Loewit als einzig in dieser Frage anwendbarem « fermentfreiem » Peptonblute, Salzblute und Histonblute untersucht und habe gefunden, dass sie darin ebenso wie in Aderlassblut alle mikrochemische Nucleinreactionen geben.
3. Globulinreactionen, welche auf Löslichkeitsverhältnissen beruhen, sagen für Substanzen, welche im Blute befindlich sind, nichts aus, da auch phosphorreiche Nucleoproteide (von 4,5%) ins

Ich kehre jetzt zu der Frage nach der Beziehung der Plättchen zur Faserstoffbildung zurück. Diese Frage lässt sich, wie ich glaube, nach allem bis jetzt Gesagten in einigen Worten entscheiden. Nachdem es einerseits von mir bewiesen ist, dass die Nucleoproteide sich activ am Fibrinbildungsprocesse betheiligen, indem sie aus Fibrinogen Thrombosin bilden, andererseits auch endgiltig bewiesen ist, dass die Blutplättchen Nuclein enthalten, so liegt absolut kein Grund vor, den Blutplättchen einen activen Antheil an der Faserstoffbildung abzusprechen. Selbstverständlich ist die Ansicht von Bizzozero, welcher zufolge die Blutplättchen die Hauptrolle bei der Blutgerinnung spielen, nicht aufrecht zu erhalten. Die Hauptrolle kommt unbedingt den Leukocyten zu, weil sie in quantitativer Beziehung ihrem Nucleingehalte nach die Blutplättchen jedenfalls übertreffen.

Noch einmal die Faserstoffgerinnung. Ich versuche in Folgendem an der Hand meiner Experimente ein einheitliches Bild der extravasculären Faserstoffgerinnung zu entwerfen, und mit Hilfe desselben die Widersprüche in den Theorien anderer Forscher zu erklären. Das Blut fließt aus der Ader und es erfolgt ein Zerfallen der Leukocyten resp. eine Abgabe von Nuclein-substanzen an das umgebende Plasma. Die Nuclein-substanzen

Blut gebracht nach einigen Minuten alle Globulineigenschaften annehmen.

4. Der Versuch Loewit's, welcher das Gegentheil meiner Betrachtungen beweisen soll, in welchem Loewit einem mit Blutegeextract behandelten Thier Nuclein eingespritzt und kein früheres Wiedererscheinen der Plättchen beobachtet, beruht auf einer naiven Voraussetzung. Sollte Herr Loewit wirklich glauben: dass, wenn man einem Thiere ins kreisende Blut Hämoglobin injicirt und keine Vermehrung der Zahl der rothen Blutkörperchen stattfindet, dies ein Beweis wäre, dass die rothen Blutkörperchen kein Hämoglobin enthalten?

lösen sich in dem alkalisch reagirenden Plasma auf und begegnen hier dem gelösten Fibrinogen. Es erfolgt infolgedessen eine Spaltung des Fibrinogens in das Thrombosin und eine wasserlösliche, die Biuretreaction in der Kälte gebende Eiweiss-substanz.

Jetzt ist der Fundamentalact der Gerinnung fertig. Der Schlussact wird durch die im Plasma gelösten Kalksalze herbeigeführt, welche den Faserstoff als eine Thrombosinkalkverbindung ausfällen.

In erster Linie wäre hier die Frage zu erwägen, warum doch während des Lebens des Thieres, wo doch auch weisse Blutkörperchen im Blute zu Grunde gehen müssen und auf diese Weise Nucleoproteide in das Blut gelangen, keine Thrombosen in normalem Zustande entstehen? Diese Frage ist umsomehr plausibel, als, wie wir gesehen haben, Nucleohiston ins kreisende Blut eingespritzt, ausgedehnte Thrombosen bildet, indem es das Blut in Nuclein und Histospaltet. Leider wissen wir über die Art des Zugrundegehens der weissen Blutkörperchen im lebenden thierischen Organismus viel zu wenig, um eine spruchreife Antwort auf obige Frage zu ertheilen. Es könnte ja auch sein, dass die Leukocyten wenigstens zum grossen Theile nicht im Blut, sondern im Parenchym der Organe zu Grunde gehen; dann könnten allerdings die in ihnen enthaltenen Nucleoproteide nicht ins Blut gelangen und demgemäss auch keine Thrombosen herbeiführen. Aber auch im zweiten Falle, d. h. wenn die Leukocyten im Blute selbst zu Grunde gehen sollten, so kann man sich wohl denken, und das ist das Wahrscheinlichste, dass sie successive in ganz kleinen Mengen zerfallen, nicht aber massenhaft, wie während der Faserstoffgerinnung. Diese Annahme wird gestützt durch die Thatsache, dass, wie Michelson in Zuntz's Laboratorium und N. M. Josephus Jitta gezeigt haben, nach Injectionen von Substanzen, welche die weissen Blutkörperchen zerstören in das Blut, folgende Erscheinungen zu Tage treten. Injicirt man wenig der die Leukocyten zerstörenden Stoffe in das Kreislaufsystem, so dass ein zwar beträchtlicher aber nicht massenhafter Zerfall

der Leukocyten stattfindet, so entstehen keine Thrombosen. Injicirten aber die genannten Autoren so grosse Mengen der destruierenden Substanzen, dass ein massenhafter Zerfall der Leukocyten eintrat, dann entstanden intravasculäre Gerinnungen. Nachdem anzunehmen ist, dass es im Leben unter normalen Zuständen wohl nie zu massenhaftem Leukocytenzerfall kommt, so bietet sich keine Schwierigkeit mehr, die gestellte Frage als erledigt zu betrachten.

Die Streitfrage, welche zwischen Hammarsten und der Dorpater Schule schwebt, ob das Serumglobulin sich an der Faserstoffbildung betheiligt, und welche von Schmidt, der noch immer auf seinem Standpunkte geblieben ist, in seiner neuesten Arbeit wieder berührt wird, trotzdem die meisterhaften Untersuchungen Hammarsten's beinahe das letzte Wort in der Angelegenheit gesprochen haben, ist durch meine Untersuchungen zu Gunsten Hammarsten's Theorie endgiltig entschieden.

Der Widerspruch, welcher durch die Wooldridge'sche Auffassung in die Blutgerinnungslehre hereingetragen wurde, lässt sich an der Hand meiner experimentalen Thatsachen durch einige Worte klären. Wooldridge, welcher die Betheiligung der Leukocyten an dem Blutgerinnungsprocesse ableugnet, geht von der ganz falschen Voraussetzung aus, dass die Stoffe aus den wässerigen Drüsen-Extracten, mit denen er gearbeitet hat, also die Gewebsfibrinogene Bestandtheile des Intercellularsaftes sind. Ich habe gezeigt, dass sie Bestandtheile der Leukocyten sind und somit fällt die Voraussetzung von Wooldridge zusammen.

Die Theorie von Holzmann und Dogiel, welcher zufolge die Gerinnung eine Oxydation des Fibrinogens sein soll, kann keine Erklärung für die Gerinnungserscheinungen liefern, weil — wie bekannt — die Gerinnung des Blutes auch bei Abwesenheit des atmosphärischen Sauerstoffes stattfindet. Es kommt nun noch in Betracht die Erklärung der Einwirkung der Kalksalze durch andere Forscher. In neuerer Zeit hat Pekelharing eine Theorie aufgestellt, welcher zufolge die Einwirkung der Kalksalze auf die Blutgerinnung so

zu deuten ist, dass die Kalksalze sich mit dem Zymogen des Fibrinfermentes zum Fibrinferment vereinigen. Das Zymogen des Fibrinfermentes soll ein Nucleoalbumin sein. Die Wirkung des Fibrinfermentes, also der Nucleoalbuminkalkverbindung, soll darin bestehen, dass die Letztere Kalk auf das Fibrinogen überträgt und auf diese Weise Fibrin bildet. Die Untersuchungen von Pekelharing haben, indem sie die Fibringerinnung mit Nucleoproteiden in Beziehung setzen, für mich den Werth einer schönen Bestätigung meiner vor Pekelharing publicirten Experimente. Pekelharing gebührt auch das grosse Verdienst, zuerst gezeigt zu haben, dass Nucleoalbumin allein keine fibrinerzeugenden Eigenschaften besitzt und nur bei Gegenwart von Kalksalzen Fibrin zu bilden vermag. Leider hat Pekelharing in der Deutung seiner Versuche einen Fehlgriff gemacht, welcher aber bis zur Entdeckung des Thrombosins sehr erklärlich war. Wir sind gezwungen, die Einwirkung der Kalksalze und der Nucleoproteide jetzt anders zu deuten. Das Nucleoproteid spaltet vermöge seines sauren Charakters das Thrombosin von Fibrinogen ab und erst dann vollziehen die Kalksalze den Schlussact der Gerinnung, indem sie das Thrombosin in Faserstoff überführen.

Zum Schluss dieses Kapitels erübrigt noch, über das Fibrinferment einige Worte zu sagen. Vorerst die chemische Beschaffenheit des Fibrinfermentes. Pekelharing gibt an, dass nach der Schmidt'schen oder Hammarsten'schen Methode bereitete Fibrinfermentlösungen von Pepsinsalzsäure unter Abspaltung von Nuclein zersetzt werden. Es wäre ja selbstverständlich für mich von ausserordentlich erfreulicher Bedeutung gewesen, wenn ich diese Angabe bestätigen könnte. Denn, falls das Fibrinferment aus einem Nucleoproteid bestünde, dann würde seine Wirkungsweise auf das Fibrinogen mit einem Male nach meiner Theorie erklärt. Zu meinem grössten Bedauern konnte ich mit Pepsinsalzsäure weder aus der nach Schmidt'scher noch nach der nach Hammarsten'scher Methode bereiteten Fibrinfermentlösung, trotz vielfacher Versuche, Nuclein bekommen.

Bekanntlich ist Halliburton in einer sehr sorgfältigen und exact ausgeführten Untersuchung über das Fibrinferment zu dem Schluss gelangt, dass das Fibrinferment aus einer Globulinsubstanz, welche bei 75° coagulirt, dem sogenannten Zellglobulin besteht. Ich habe, nachdem ich das negative Resultat mit künstlichem Magensaft erhielt, die Untersuchungen von Halliburton nachgemacht, seine Resultate vollständig bestätigt, und gefunden, dass das Fibrinferment thatsächlich aus einem Globulin und keinem Nucleoproteid besteht. Ich habe nach Halliburton eine grössere Menge von Blutserum mit dem 15fachen Volumen starken Alkohol versetzt und damit 3 Monate stehen gelassen; dann wurde der Alkohol abfiltrirt, der Niederschlag mit Alkohol ausgewaschen, über H_2SO_4 getrocknet und pulverisirt. Das Pulver wurde mit Wasser extrahirt und das auf Fibrinogenlösungen sehr wirksame Extract bei 40° im Vacuum concentrirt. Die concentrirte Flüssigkeit wurde durch Sättigung mit Magnesiumsulfat gefällt, der Niederschlag gesammelt und mit gesättigter Bittersalzlösung ausgewaschen und in Wasser aufgelöst, in welchem er sich mittelst des anhaltenden Salzes löst. Diese Lösung hatte stark gerinnungserregende Eigenschaften, indem sie eine reine Fibrinogenlösung innerhalb 40 Minuten zum Gerinnen brachte. Sie wurde mit dem gleichen Volumen Pepsinchlorwasserstoffsäure versetzt und in den Brütöfen gestellt. Die Mischung blieb klar und auch nach 14tägigem Stehen in dem Brütschrank entstand kein merklicher Niederschlag. Ein Theil des Magnesiumsulfatniederschlages wurde mit Soda und Salpeter verascht und die salpetersaure Lösung der Schmelze mit Ammoniummolybdat auf Phosphor geprüft. Keine Phosphorreaction.

Infolgedessen muss ich mich ganz der Anschauung Halliburton's anschliessen, wonach das Fibrinferment aus einem Globulin besteht.

Dass sich aus dem Serum ein Stoff isoliren lässt, welcher die Eigenschaft besitzt, Fibrinogen in Fibrin überzuführen, darüber kann gar kein Zweifel bestehen. Anders liegt die Frage, ob es das Fibrinferment ist, welches bei der normalen

Fibringerinnung aus dem Fibrinogen Faserstoff erzeugt. Ich glaube Grund zu haben, diese Frage verneinen zu dürfen: Im Aderlassblut kann man — wie Jakowicki gezeigt hat — keine merklichen Fibrinfermentmengen nachweisen. Im Histonblut habe ich, trotz sehr sorgfältig ausgeführter Versuche, ebenfalls kein Fibrinferment nachweisen können. Die reine Fibrinogenlösung, welche mit sicher fermentfreier Nucleinlösung Thrombosin und dann mit Kalk Fibrin gibt, enthält auch kein Fibrinferment. In dem Serum aber, welches nach der Fibrinbildung aus Thrombosin und Kalk erhalten wird, ist Fibrinferment vorhanden. Daraus ist wohl der Schluss zu ziehen, dass das Fibrinferment unter normalen Zuständen kein Gerinnungsvorläufer, sondern ein Gerinnungsproduct ist. Jedenfalls kann man sich aber denken, dass, wenn man durch Säuren das Thrombosin vom Fibrinogen abspalten kann, dasselbe auch auf fermentativem Wege gelingen kann. Dass das Fibrinferment aus Fibrinogen gleich Fibrin erzeugt, beruht wohl darauf, dass die nach den bekannten Methoden erhaltenen Fibrinfermentlösungen immer gelöste Kalksalze enthalten. Es müsste in dieser Richtung folgender Versuch angestellt werden. Das Fibrinferment wird von den Kalksalzen befreit (z. B. durch oxalsaure Salze) und dann zur Fibrinogenlösung zugesetzt. Wenn meine Annahme richtig, müsste keine Gerinnung entstehen, welche erst durch Zusatz eines Kalksalzes hervorgerufen wird.

Ueber die zymoplastischen Substanzen.

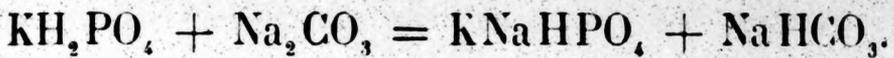
In seinem Buche unter dem Titel «Zur Blutlehre» zeigt Alexander Schmidt, dass sich aus zelligen Gebilden mittels Extraction durch Alkohol ein Gemenge von Substanzen gewinnen lässt, welche die Fähigkeit besitzen, Blutserum, das durch Stehen an der Luft oder Dialyse unwirksam gemacht worden ist, wieder wirksam zu machen. Er nennt diese Körper «zymoplastische Substanzen». Schmidt stellt sich vor, dass nach der Zerstörung des Fibrinferments in dem Blutserum noch ein Stoff zurückbleibt, das «Prothrombin», welcher die Muttersubstanz des Fibrinferments darstellt und

durch die zymoplastischen Substanzen in das Fibrinferment übergeführt wird. Bei meiner chemischen Untersuchung der Leukocyten habe ich mir die beiläufige Aufgabe gestellt, die wirksame Substanz aus dem Gemenge zu isoliren. Im Alkohol-extract der Leukocyten findet sich nun eine ganze Reihe von Stoffen. Es ist mir gelungen, neben Fetten Lecithin und Cholesterin in demselben Protagon und einen kephalinartigen Körper nachzuweisen. Ausserdem fand ich im Alkoholextract carbaminsaures Ammon, Amidovaleriansäure, Inosit und Monokaliumphosphat. Letzteres nach folgender Methode: das heisse Alkoholextract der Leukocyten wird kalt gestellt, worauf Protagon auskrystallisirt. Der nach dem Abfiltriren des Protagons bleibende Alkohol wird nun auf ein kleines Volumen abdestillirt und dann auf dem Wasserbade bis zur syrupösen Consistenz eingeeengt, der Syrup in heisses Wasser gegossen: hierbei geht eine grosse Menge der Bestandtheile in Lösung. Wenn man nun die wässrige Lösung, nachdem sie von den schleimigen ungelösten Bestandtheilen abfiltrirt worden ist, eindunstet, so bekommt man schliesslich einen Syrup, der beim Erkalten zu einer festen Krystallmasse erstarrt. Kocht man diese mit absolutem Alkohol aus, filtrirt ab und lässt den Alkohol erkalten, so krystallisirt aus demselben in atlasglänzenden Blättchen Amidovaleriansäure aus. Der in Alkohol ungelöste Rückstand wird mit wässrigem Alkohol ausgekocht und filtrirt; aus dem Filtrat scheidet sich beim Erkalten in prismatischen Spiessen Monokaliumphosphat ab.

Es stellte sich nun heraus, dass dem Monokaliumphosphat die sogenannten zymoplastischen Eigenschaften anhaften. Bringt man eine Spur davon in vollständig unwirksames Pferdeblutserum, so erlangt letzteres schon nach 10 bis 15 Minuten seine Wirksamkeit auf Fibrinogenlösungen wieder. Merkwürdiger Weise ist es mir nicht gelungen, dasselbe Resultat mit Mononatriumphosphat zu erzielen. Es ist natürlich gleichgiltig, ob das Monokaliumphosphat aus den Zellen stammt oder synthetisch dargestellt wird.

Da bei der Gerinnung immer Leukocyten zu Grunde gehen, so müssen auch kleine Mengen von Monokaliumphosphat

in das alkalische Plasma gelangen. Ich kann den Gedanken nicht zurückweisen, dass vielleicht diese Thatsache eine Erklärung für die von Zuntz aufgefundene interessante Erscheinung liefern könnte, welcher zufolge die natürliche alkalische Reaction des Blutes während des Gerinnungsprocesses abnimmt. Das aus den Leukocyten in das Plasma gelangende KH_2PO_4 muss sich naturgemäss mit den darin gelösten Carbonaten zu einem Dialkaliphosphat und Bicarbonat umsetzen, nach der Gleichung:



Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Albrecht Kossel, sage ich für die mir in reichem Maasse zu Theil gewordenen Rathschläge und die Bereitwilligkeit, mit der er mich bei meinen Untersuchungen unterstützt hat, meinen innigsten Dank.
