

# Ueber die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung.

Von

Olof Hammarsten.

(Der Redaction zugegangen am 17. September 1896.)

Als ich vor etwas mehr als 20 Jahren an meine Untersuchungen über die Faserstoffgerinnung ging, hatte ich eben meine Untersuchungen über die Gerinnung des Caseïns mit Lab und die Bedeutung der Kalksalze für diesen Vorgang beendet. Die grosse Uebereinstimmung, die in gewissen Hinsichten zwischen der Gerinnung von Milch und von Blut zu bestehen schien, legte die Vermuthung nahe, dass die Kalksalze auch für die Faserstoffgerinnung eine grosse Bedeutung haben würden, und ich ging in der That auch an meine neue Arbeit mit der vorausgefassten Meinung, dass bezüglich der Wirkung der Kalksalze eine bestimmte Analogie zwischen diesen zwei Gerinnungsvorgängen sich herausstellen würde. Die Resultate meiner Untersuchungen entsprachen indessen meinen Erwartungen nicht. Ich beobachtete allerdings einen unzweifelhaften Einfluss von löslichem Kalksalz ( $\text{CaCl}_2$ ) auf die Fibrinbildung<sup>1)</sup>; dagegen konnte ich ebensowenig die Nothwendigkeit des Kalkes für diesen Vorgang überhaupt wie eine besondere Uebereinstimmung in der Wirkung der Kalksalze auf Käse- und Fibrinbildung nachweisen. Die von mir beobachteten Verhältnisse gaben vielmehr meiner Arbeit nach und nach eine andere Richtung,

<sup>1)</sup> Vergl. Nova act. reg. soc. scient., Upsal., Ser. 3, Vol. 10, 1876.  
Zeitschrift für physiologische Chemie. XXII.

so dass ich die Frage von der Bedeutung der Kalksalze für die Fibrinbildung keiner weiteren Prüfung unterwarf.

Wie eben bemerkt, hatte ich indessen einen Einfluss von  $\text{CaCl}_2$  auf die Fibrinbildung nachweisen können, und dieser Einfluss ist von doppelter Art. Einerseits kann nämlich dieses Salz den Gerinnungsvorgang beschleunigen und andererseits kann es auch die Menge des ausgeschiedenen Faserstoffes wesentlich vermehren. In diesen beiden Hinsichten verhält sich also dieses Salz wie das unreine Paraglobulin, und ich führte deshalb auch dieses Verhalten als einen Beweis, unter anderen solchen, gegen die damals herrschende Lehre von der specifisch fibrinoplastischen Wirkung des Paraglobulins an.

Ein unverkennbarer Einfluss von Kalksalzen auf die Fibrinbildung ist dann später auch von anderen Forschern beobachtet worden. So fand Green<sup>1)</sup>, dass man in einem verdünnten Magnesiumsulfatplasma durch Zusatz von Gipslösung allein, ohne Hinzufügung von sog. Fibrinferment, eine Fibrinbildung hervorrufen kann. Die Richtigkeit dieser Beobachtung wurde dann von Ringer und Sainsbury<sup>2)</sup> bestätigt, und diese Forscher fanden ausserdem, dass dasselbe Resultat auch mit einer Lösung von  $\text{CaCl}_2$  oder, obzwar in geringerem Maasse, mit Lösungen von Strontium- oder Baryumchlorid zu erhalten ist. Von grösserer Bedeutung als alle frühere Beobachtungen über den Einfluss der Kalksalze auf die Fibrinbildung sind indessen die wichtigen Untersuchungen von Arthus und Pagès<sup>3)</sup>, die so allgemein bekannt sind, dass ein besonderes Referat derselben hier ganz überflüssig sein dürfte. Aus diesen, wie auch aus den später von ihm allein ausgeführten Untersuchungen über denselben Gegenstand hat Arthus den Schluss gezogen, dass die Kalksalze für die Fibrinbildung unbedingt nothwendig sind. Er findet auch

<sup>1)</sup> Journal of physiol., Vol. 8.

<sup>2)</sup> Ebend., Vol. 11.

<sup>3)</sup> Archives de physiologie (Ser. V), Tom. 2 und: M. Arthus. Recherches sur la coagulation du sang. Theses présentées à la Faculté des sciences à Paris, 1890.

eine sehr grosse Aehnlichkeit zwischen der Käsebildung durch Lab und der Blutgerinnung, welche letztere er sogar eine Caseification nennt. Er hat ferner eine zum Theil neue Gerinnungstheorie aufgestellt, zu der ich weiter unten zurückkommen werde.

Namentlich auf Grund dieser Untersuchungen von Arthus und Pagès ist man wohl nunmehr auch fast allgemein zu der Ansicht gelangt, dass die löslichen Kalksalze für die Fibrinbildung oder — vielleicht richtiger — für die Gerinnung des Blutplasmas, bezw. der Transsudate unbedingt nothwendig sind.

In welcher Weise stellt man sich aber diese Wirkung der Kalksalze vor?

Der Faserstoff, wie man ihn aus Blut oder Transsudaten gewinnt, enthält immer auch Mineralstoffe, unter denen man, wie Brücke zuerst gezeigt hat, regelmässig Kalk und Phosphorsäure nachweisen kann. Von diesem Verhalten ausgehend, hat Freund<sup>1)</sup> für die Betheiligung des Kalkes und der Phosphorsäure eine besondere Theorie aufgestellt, auf die es doch kaum nöthig sein dürfte, hier des Näheren einzugehen, da sie schon von anderen Forschern, namentlich von Latschenberger<sup>2)</sup> und Strauch<sup>3)</sup>, ausführlich besprochen und kritisirt worden ist und da sie von den hier unten mitzutheilenden Untersuchungen nicht besonders berührt wird.

Von grösserer Bedeutung für meine Aufgabe sind die Theorien von der Wirkungsweise der Kalksalze, die von Arthus<sup>4)</sup> und von Pekelharing<sup>5)</sup> aufgestellt worden sind.

Arthus ist mit mir darin einig, dass die Gegenwart von Paraglobulin für die Gerinnung nicht nothwendig ist.

<sup>1)</sup> Wien. Med. Jahrb., 1888.

<sup>2)</sup> Ebend., S. 479 und Wien Med. Wochenschrift, 1887.

<sup>3)</sup> Citirt nach Maly, Jahresber., Bd. 19.

<sup>4)</sup> L. c.

<sup>5)</sup> Ueber die Bedeutung der Kalksalze für die Gerinnung des Plutes. Verchow, Festschrift, Bd. I, 1891 und Untersuchungen über das Fibrin-ferment. (Verhandelingen der kon. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam, Tweede Sectie, Vol. 1, No. 3, 1892.

Die fibrinoplastische Wirkung dieses Stoffes rührt nach ihm nur von einer Verunreinigung mit Kalksalz her. Die Gegenwart von einem löslichen Kalksalz ist nach ihm ein notwendiges Bedingniss für das Zustandekommen der Fibrinbildung, und, wie der Käse, so soll auch der Faserstoff eine Eiweisskalkverbindung sein. Das Wesen des Gerinnungsvorganges besteht nach Arthus darin, dass unter dem Einflusse des Fibrinfermentes das Fibrinogen des Blutes eine chemische Veränderung erfährt, die zu der Entstehung einer kalkhaltigen Verbindung, des Faserstoffes, Veranlassung giebt. Diese chemische Umwandlung, die Arthus als eine Spaltung auffasst, soll indessen nur bei Gegenwart von löslichen Kalksalzen von Statten gehen können, denn das Fibrinferment kann nur bei Gegenwart von solchen wirksam sein. Hierin liegt auch nach Arthus ein wesentlicher Unterschied zwischen der Gerinnung des Caseïns und des Fibrinogens, denn das Caseïn wird, wie längst bekannt ist, auch bei Abwesenheit von Kalksalzen durch das Labferment umgewandelt, bezw. gespalten.

Der Grund, warum das Oxalatplasma nicht gerinnt, ist nach Arthus nicht der, dass es kein Fibrinferment enthält; er liegt darin, dass das im Plasma vorhandene Fibrinferment wegen Mangels an löslichen Kalksalzen ohne Einwirkung auf das Fibrinogen bleibt. Eine Beziehung der löslichen Kalksalze zu der Entstehung des Fibrinfermentes wird dagegen, so weit ich ersehen kann, von Arthus nicht angenommen.

Von diesen Anschauungen über den Gerinnungsvorgang weicht in gewissen Hinsichten die Theorie von Pikelharing ab. Dieser Forscher behauptet nämlich, im Gegensatz zu Arthus, dass in dem Oxalatplasma kein Fibrinferment enthalten ist. Er hat ferner aus dem Plasma eine Substanz isoliren können, die wie eine Vorstufe des Fibrinfermentes, des Thrombins, sich verhält und also als ein Prothrombin aufzufassen ist. Dieses Prothrombin soll unter dem Einflusse der löslichen Kalksalze Thrombin liefern. Die Kalksalze sollen aber nach Pikelharing auch in anderer Hinsicht von Bedeutung für die Gerinnung sein. Der Faserstoff ist

nämlich auch nach **Pekelharig** eine Eiweisskalkverbindung, und die Fibrinbildung besteht nach ihm darin, dass das Thrombin Kalk an das Fibrinogen abgibt, wodurch dieses letztere in die unlösliche Eiweisskalkverbindung, das Fibrin, übergeht. Das Ferment, welches seinen Kalk abgegeben hat, soll nun aus der Flüssigkeit neuen Kalk aufnehmen, diesen auf eine neue Portion Fibrinogen übertragen u. s. w. Nach **Pekelharig** haben also die Kalksalze bei der Blutgerinnung eine doppelte Aufgabe zu erfüllen. Sie bewirken einerseits die Entstehung des Thrombins aus dem Prothrombin und sie bewirken in zweiter Linie auch die Umwandlung des Fibrinogens in die Eiweisskalkverbindung, das Fibrin.

Die Ansicht, dass der Faserstoff eine Kalkverbindung sei und dass die löslichen Kalksalze folglich für die Fibrinbildung nothwendig seien, hat ferner auch in **Lilienfeld**<sup>1)</sup> einen Vertreter gefunden. Nach ihm ist die Fibrinbildung ebenfalls ein Spaltungsprocess, bei dem aus dem Fibrinogen zwei neue Eiweissstoffe entstehen. Der eine ist eine Albumose-substanz, die, nur in geringer Menge gebildet, in dem Serum gelöst zurückbleibt. Der andere dagegen, der in grösserer Menge gebildet wird, ist zwar als Alkaliverbindung in Wasser löslich, scheidet sich aber nach Zusatz von löslichem Kalksalz ohne weiteres nach kurzer Zeit als typisches Fibrin aus. Dieses zweite Spaltungsproduct hat **Lilienfeld** «Thrombosin» (nicht mit Thrombin zu verwechseln) genannt. Bei der Gerinnung des Blutes spaltet sich also nach **Lilienfeld** das Fibrinogen in Thrombosin und Albumosesubstanz, und der Faserstoff soll die Kalkverbindung des Thrombosins sein. Diese Spaltung wird nach ihm durch die Einwirkung von aus den Leukocyten stammender Nucleinsubstanz zu Stande gebracht, in derselben Weise wirkt aber auch Zusatz von Essigsäure. Wenn man eine Fibrinogenlösung mit Essigsäure fällt, den Niederschlag in Wasser unter Zusatz von möglichst wenig Soda löst und darauf ein lösliches Kalksalz zusetzt, so erhält man nämlich ebenfalls im Verlauf eines kurzen Zeitraumes

<sup>1)</sup> Ueber Blutgerinnung. Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. 20.

eine Ausscheidung von einem Eiweissstoff, der wie Fibrin sich verhält.

Wenn man die Angaben von Liliensfeld auf der einen Seite mit denjenigen von Arthus und Pekelharing auf der anderen vergleicht, so findet man in gewissen Punkten eine sehr wesentliche Differenz. Während nach den zwei letztgenannten Forschern das Fibrinferment der Gerinnungserreger ist, kommt dagegen nach Liliensfeld diese Wirkung nicht dem Fibrinfermente (welches nach ihm ein Globulin ist), sondern den Nucleinsubstanzen zu. Hierin liegt nun allerdings kein Widerspruch gegen Pekelharing, insofern als dieser ebenfalls das Fibrinferment als ein Nucleoalbumin oder ein Nucleoproteid bezeichnet; aber der Widerspruch liegt darin, dass Liliensfeld nicht das Fibrinferment als einen Gerinnungsvorläufer — wenigstens nicht unter normalen Verhältnissen — sondern als ein Gerinnungsproduct ansieht. Ein anderer, sehr wesentlicher Gegensatz liegt in der ungleichen Auffassung dieser Forscher von der Rolle der Kalksalze bei der Gerinnung. Nach Arthus, dem Pekelharing in diesem Punkte sich anschliesst, besteht wie oben gesagt zwischen Casein- und Fibringerinnung der Unterschied, dass beim letzteren Prozesse das Ferment oder jedenfalls die gerinnungserregende Substanz bei Abwesenheit von Kalksalz unwirksam ist, während das Casein auch bei Abwesenheit von solchen Salzen von dem Labfermente gespalten wird. Nach Liliensfeld dagegen wird das Fibrinogen ebenso wie das Casein auch bei Abwesenheit von Kalksalzen gespalten, und die Kalksalze sind nur für die Ausfällung des einen Spaltungsproductes, also für das Auftreten einer Gerinnung erforderlich. Nach Liliensfeld lässt sich also die Analogie zwischen Käse- und Fibrinbildung hinsichtlich der Rolle der Kalksalze in allen Phasen der beiden Prozesse durchführen.

Wie man aus dieser kurzen Uebersicht ersieht, herrscht auf diesem Gebiete noch grosse Unklarheit, und die Ansichten über die Wirkungsweise der Kalksalze bei der Fibrinbildung gehen noch sehr auseinander. In folgenden Punkten scheinen jedoch die eben genannten drei Forscher einig zu sein. Sie

betrachten alle das Fibrin als eine Eiweisskalkverbindung und sie betrachten die Gegenwart von Kalksalzen<sup>1)</sup> als ein für das Zustandekommen der Gerinnung nothwendiges Bedingniss.

Wenn man bedauern muss, dass die Ansichten über die Wirkungsweise der Kalksalze so stark divergiren, so muss man jedoch gewiss noch mehr bedauern, dass nicht alle Forscher auf diesem Gebiete von der Nothwendigkeit der Kalksalze für den Gerinnungsvorgang überhaupt sich haben überzeugen können. Namentlich muss es schwer ins Gewicht fallen, dass der bedeutendste Forscher auf dem Gebiete der Gerinnungslehre, Alex. Schmidt, jede spezifische Wirkung der Kalksalze bei der Faserstoffgerinnung entschieden geleugnet hat<sup>2)</sup>.

Schmidt hat bekanntlich schon längst die Ansicht ausgesprochen, dass Neutralsalze überhaupt für die Fibrinbildung nothwendig sind, und seiner Meinung nach machen die Kalksalze hiervon keine Ausnahme. Sie haben nach ihm keine spezifische Einwirkung auf diesen Process, sie wirken quantitativ wie andere Neutralsalze, von denen sie sich nur durch eine kräftigere Wirkung unterscheiden. «Die Kalksalze leisten» — so schrieb Alex. Schmidt — «unter Brüdern wesentlich das Gleiche wie die übrigen Glieder der Gesellschaft, sie sind nur die stärksten und die schnellsten unter ihnen und dadurch auch für den Experimentator, mich selbst mit eingerechnet, die angenehmsten und bequemsten». Alex. Schmidt läugnet ganz bestimmt, dass der Faserstoff eine Eiweisskalkverbindung ist und die gerinnungshemmende Wirkung der Oxalate erklärt er in ganz anderer Weise als Arthus. Das Oxalat wirkt nämlich nach Schmidt nicht dadurch, dass es die Kalksalze ausfällt, sondern wesentlich dadurch, dass es die Entstehung des Fibrinfermentes in dem Plasma verhindert. In mehr untergeordnetem Grade wirkt es auch dadurch störend, dass es die Einwirkung des Fibrinfermentes auf das Fibrinogen erschwert.

<sup>1)</sup> Ich sehe hier natürlich von der Wirkung der Strontiumsalze ab.

<sup>2)</sup> Alex. Schmidt: Weitere Beiträge zur Blutlehre. Wiesbaden 1895 (Bergmann's Verlag).

Um diese Anschauung zu stützen, hat Schmidt mehrere neue Beobachtungen und Erfahrungen mitgetheilt, von denen einige zwar wenig beweisend sind, während andere dagegen, so weit ich verstehe, in hohem Grade der Beachtung werth erscheinen. In einer neuen Arbeit hat nun Arthus<sup>1)</sup> einige dieser Untersuchungen einer experimentellen Prüfung unterworfen, die wohl kaum den Leser in Zweifel darüber lassen kann, dass die Kalksalze, der Ansicht von Alex. Schmidt entgegen, in etwas anderer, mehr specifischer Weise als die anderen Neutralsalze, z. B. das NaCl, bei der Faserstoffgerinnung betheilig sind; aber leider hat Arthus nicht alle die verschiedenen Versuchsanordnungen von Schmidt nachgeprüft. Dies ist um so mehr zu bedauern, als — wenn ich die Sache richtig beurtheilt habe — gerade die Versuche, welche Arthus nicht nachgeprüft hat, diejenigen sind, die am schwersten mit der Theorie von Arthus zu vereinbaren sind. Zu diesen Beobachtungen, deren Nachprüfung Arthus als überflüssig erachtet hat, rechne ich diejenigen Versuche, die von Schmidt mit Transsudaten oder Blutserum angestellt wurden. Schmidt hat einerseits aus einem Transsudat und andererseits aus Blutserum die löslichen Kalksalze mit überschüssigem Oxalat entfernt und er hat dann durch Zusammenmischen von diesen zwei Flüssigkeiten — wenn nöthig nach dem Entfernen des überschüssigen Oxalates durch Dialyse — eine ebenso gute Fibrinbildung wie bei Gegenwart von Kalksalz erhalten. Ich behaupte nun zwar nicht, dass ein solcher Versuch mit der Annahme von einer specifischen Wirkung der Kalksalze bei der Gerinnung des Blutes oder Plasmas im Widerspruche sich befindet; aber dagegen verstehe ich nicht, wie ein solches Versuchsergebniss mit der Theorie von Arthus über die Nothwendigkeit der löslichen Kalksalze für die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin zu vereinbaren ist.

Die Lehre von der Rolle der Kalksalze bei der Blutgerinnung ist also reich an Widersprüchen, und es dürfte gewiss nicht leicht zu sagen sein, in wie weit die eine oder

<sup>1)</sup> La Coagulation du sang et les sels de chaux. Archives de Physiologie (Ser. V), Tom. 8.

die andere Ansicht begründet sein kann. Mir ist es wenigstens nicht gelungen, durch das Studium der hierher gehörenden Litteratur auf's Klare mit dieser Frage zu kommen. Es scheint mir allerdings ausser Zweifel gestellt zu sein, dass die Kalksalze in irgend einer noch nicht aufgeklärten Weise bei der Gerinnung betheiligt sind; die gang und gäbe Ansicht von der Nothwendigkeit der Kalksalze für die Entstehung des Fibrins aus dem Fibrinogen kann ich aber gar nicht als genügend begründet betrachten. Bei dieser Sachlage entschloss ich mich, diese Frage zum Gegenstand einer besonderen Untersuchung zu machen.

Die gegenwärtig von den meisten Forschern acceptirte Ansicht über das Wesen des Gerinnungsvorganges dürfte wohl, wenn man vorläufig von der Wirkung der Kalksalze absieht, die sein, dass unter dem Einflusse eines Enzyms, des sog. Fibrinfermentes oder Thrombins, das Fibrinogen in irgend einer Weise in Faserstoff umgesetzt wird. Diese fermentative Umwandlung des Fibrinogens ist also eine Phase des Gerinnungsvorganges. Das Thrombin soll aber, wie man annimmt, nicht in nennenswerther Menge in dem circulirenden Plasma enthalten sein, sondern es geht erst nach dem Aderlasse aus einem Zymogen, dem Prothrombin, hervor. Diese Entstehung des Thrombins aus dem Prothrombin ist also eine andere Phase des Gerinnungsvorganges, die der Umwandlung des Fibrinogens, d. h. der eigentlichen Gerinnung des Plasmas, vorangehen muss. Wirken nun die Kalksalze auf die erste dieser Phasen (die Fermentbildung) oder auf die zweite (die Umwandlung des Fibrinogens) oder auf beide? Die Antwort auf diese Frage lautet, wie oben bemerkt, sehr verschieden. Nach Arthus sind die Kalksalze für die zweite, nach Pekelharing für beide und nach Alex. Schmidt weder für die eine noch die andere dieser zwei Phasen nothwendig. Dass die Antwort so verschieden ausgefallen ist, rührt nach meiner Ansicht zum Theil daher, dass man bei der experimentellen Untersuchung nicht immer scharf genug zwischen diesen zwei

Phasen trennte und folglich nicht jede derselben für sich zum Gegenstand einer besonders eingehenden Prüfung machte. Zum Theil rührt es jedoch wohl auch daher, dass man mit Vorliebe, statt Lösungen der isolirten, so weit möglich gereinigten Substanzen, das Blutplasma als Versuchsobject angewendet hat. Ich will hiermit natürlich gar nicht die Brauchbarkeit des Blutplasmas für gewisse Versuchsanordnungen in Abrede gestellt haben, — zu den meisten der von mir in diesem Aufsätze als Beispiele mitzutheilenden Versuchen ist ja Blutplasma benutzt worden — aber die Versuche mit einer so complicirten Flüssigkeit wie Blutplasma können und müssen in vielen Fällen zu unsicheren und vieldeutigen Resultaten führen.

Dem nun Gesagten entsprechend, schien es mir nothwendig zu sein, meine Arbeit in erster Linie nur auf die eine dieser zwei Phasen zu concentriren und dabei der vorliegenden Aufgabe eine scharfe Formulirung zu geben. Die erste Frage, deren Beantwortung auf experimentellem Wege ich versuchen wollte, formulirte ich desshalb folgendermaassen. Sind die löslichen Kalksalze oder, noch schärfer formulirt, die aus dem Blutplasma bzw. Blutserum mit Alkalioxalat fällbaren Kalksalze ein nothwendiges Bedingniss für die Einwirkung des sogen. Fibrinfermentes auf das Fibrinogen und die Umsetzung des letzteren in typisches Fibrin? Die Frage von der Bedeutung der Kalksalze für die Entstehung des Fibrinfermentes aus dem Prothrombin lasse ich also bis auf Weiteres bei Seite und ich will ebensowenig die Frage von der Natur des sog. Fibrinfermentes berühren. Ich gehe nur von der gewiss unbestrittenen Thatsache aus, dass in dem Blutserum ein Stoff von noch nicht genügend ertorschter Natur vorkommt, den man Fibrinferment genannt hat und der die Fähigkeit besitzt, unter günstigen äusseren Bedingungen das Fibrinogen in Faserstoff umzuwandeln; und ich frage mich nur: ist die Gegenwart von löslichem, d. h. mit Oxalat fällbarem, Kalksalz ein nothwendiges Bedingniss für die Entstehung von typischem Faserstoff in einer Flüssigkeit, die gleichzeitig Fibrinogen und Fibrinferment enthält?

Man wird es vielleicht etwas befremdend finden, dass ich von «mit Oxalat fällbarem» Kalksalz und nicht schlechthin von Kalk spreche; aber dies hat einen besonderen Grund, und zwar den, dass man in solchen Flüssigkeiten wie Blutplasma oder Blutserum nicht den Kalk ganz vollständig mit Oxalat ausfällen kann. Zum Theil rührt dies vielleicht daher, dass eine Spur Calciumoxalat in diesen eiweissreichen Flüssigkeiten in Lösung bleibt, zum Theil und vor Allem dürfte es aber daher rühren, dass ein Theil des Kalkes mit den Protein-substanzen in solcher Bindung sich vorfindet, dass er durch Oxalat nicht gefällt wird. Ein Blutplasma, welches durch Oxalat entkalkt (decalcificié nach Arthus) ist, kann also gar nicht als kalkfrei angesehen werden. Es ist nur in dem Sinne kalkfrei, dass es von dem durch Oxalat fällbarem Kalke befreit worden ist. Wenn es sich nun herausstellen würde, dass die Fibrinbildung in einer in diesem Sinne kalkfreien Flüssigkeit noch möglich ist, so wäre damit also noch nicht bewiesen, dass nicht die Gegenwart von Kalk in anderer Form etwas für die Fibrinbildung Nothwendiges sein könnte. Es wäre nämlich sehr wohl möglich, dass gerade der durch Oxalat nicht fällbare Kalk bei der Entstehung oder Ausscheidung des Faserstoffes eine wichtige Rolle spiele, und die obige scharfe Formulirung, die ich meiner Aufgabe gegeben habe, dürfte also völlig berechtigt sein.

Es handelte sich also bei meinen Untersuchungen in erster Linie darum, die Bedeutung des durch Oxalat fällbaren Kalkes für die Fibrinbildung festzustellen, und diese Aufgabe ist, wie leicht ersichtlich, mit einer Prüfung der Theorie von Arthus gleichbedeutend. Arthus spricht nämlich überhaupt nicht von anderem Kalk als von dem durch Oxalat fällbaren, und seine Erklärung der gerinnungshemmenden Wirkung der Oxalate basirt bekanntlich auf der Annahme, dass diese Salze nur durch Ausfällung des Kalkes wirksam sind. Auch mit Rücksicht auf die Theorie von Liliensfeld ist diese Aufgabe von grosser Wichtigkeit, indem nämlich nach ihm die Umsetzung des Thrombosins in unlösliches, kalkhaltiges Fibrin die Gegenwart von löslichem Kalksalz in der Flüssigkeit voraussetzt.

Zur experimentellen Prüfung der vorliegenden Aufgabe sind erforderlich: auf der einen Seite Fibrinogenlösungen, die durch überschüssiges Oxalat von allem fällbaren Kalksalz befreit worden sind, und auf der anderen, in derselben Weise behandelte Lösungen von Fibrinferment.

Als fibrinogenhaltige Versuchsflüssigkeiten benutzte ich theils Pferdeblutplasma und theils aus solchem nach einem etwas abgeänderten Verfahren dargestellte Lösungen von reinem Fibrinogen.

### Das Blutplasma.

Um das Plasma zu gewinnen, liess ich das Blut beim Schlachten der Pferde in ein Gefäss aufsammeln, welches eine wässrige Lösung von 5–6% Kaliumoxalat enthielt; und das Blut stürzte dabei aus der Stichwunde in dickem Strahle und in solcher Menge hervor, dass in wenigen Sekunden mehrere Liter davon aufgesammelt und mit der Oxalatlösung genau gemischt werden konnten. Das Verhältniss zwischen Blut und Oxalatlösung wurde derart gewählt, dass das Gemenge 0,25–0,3% Oxalat enthielt. Ich benutzte also eine grössere Menge Oxalat als Arthus, wodurch also noch sicherer sowohl für das Ausbleiben der Gerinnung wie für ein vollständiges Ausfällen des Kalkes gesorgt wurde. Das Plasma wurde dann durch anhaltendes und starkes Centrifugiren von den Formelementen und festen Partikelchen überhaupt befreit. Nach beendetem Centrifugiren wurde es indessen nicht sogleich zu den Versuchen verwendet, sondern es blieb immer (mit Ausnahme von den ersten Versuchen) mindestens 20 Stunden bei 0° C. oder etwas unter 0° C. stehen. Dies geschah hauptsächlich aus dem Grunde, dass in dem stark abgekühlten, centrifugirten Plasma nach einiger Zeit ein amorpher Niederschlag sich absetzt. Das von diesem Niederschlage abfiltrirte Plasma ist vollkommen klar, während das centrifugirte, nicht abgekühlte Plasma in grösserer Menge gesehen immer opalisirend war. Auf die Natur dieses Niederschlages will ich hier nicht des Näheren eingehen, ich bemerke nur, dass der Niederschlag unter Anderem auch eine Substanz enthält, die mit

dem sog. Prothrombin identisch zu sein scheint. Das Auftreten eines solchen Niederschlages in Peptonplasma ist schon längst bekannt, aber auch im entkalkten Plasma ist es regelmässig von Wright<sup>1)</sup> beobachtet worden.

Ich wich also in folgenden drei Punkten von dem Verfahren von Arthus und Pagès ab. Ich nahm eine grössere Menge Oxalat. Ich centrifugirte das Plasma und ich entfernte vor der Verwendung desselben das beim Abkühlen ausfallende Substanzgemenge. Namentlich auf diese letztere Abweichung muss ich hier ganz besonders die Aufmerksamkeit lenken, weil sie gewisse Widersprüche in unseren Versuchsergebnissen zum Theil erklären kann. Die fundamentale Beobachtung von Arthus und Pagès, dass ein Oxalatplasma nie spontan gerinnt, habe ich zwar in meinen Versuchen ohne Ausnahme bestätigt gefunden, und ebenso habe ich wiederholt gesehen, wie ein solches Plasma nach Zusatz von überschüssigem Kalksalz wieder gerinnt. Daneben habe ich aber auch Fälle beobachtet, wo ein Zusatz von Kalksalz unwirksam war oder nur eine schwache Wirkung zeigte. Dieses wechselnde Verhalten steht, wie mir scheint, in unzweifelhafter Beziehung zu dem Gehalte des Plasmas an einer Substanz, die in dem ebenerwähnten, beim Abkühlen auftretenden Niederschlage sich vorfindet und die wie das sog. Zymogen des Fibrinfermentes, das Prothrombin, sich verhält.

Auch in einer anderen Hinsicht weichen meine Erfahrungen über das Oxalatplasma von denjenigen von Arthus ab. Ich habe nämlich in dem Oxalatplasma kein Fibrinferment finden können, und ich befinde mich also in diesem Punkte in vollständiger Uebereinstimmung mit Pikelharing. Wie die entgegengesetzte Erfahrung von Arthus zu erklären ist, lasse ich vorläufig dahin; aber es scheint mir, als ob das Auftreten bzw. Nichtauftreten von Fibrinferment in dem Oxalatplasma von Verhältnissen abhängig sei, die wir nicht kennen oder jedenfalls noch nicht beherrschen können. Ich folgere dies daraus, dass Arthus in einer späteren Ar-

<sup>1)</sup> The Lancet, 1892.

beit<sup>1)</sup> mehrere Versuche mitgeteilt hat, in denen unzweifelhaft das Oxalatplasma ganz oder fast ganz fermentfrei war, während auf der anderen Seite Alex. Schmidt<sup>2)</sup> mehrere Versuche mit unzweifelhaft fermenthaltigem Oxalatplasma angestellt hat. Ich werde das nun Gesagte weiter unten des Näheren begründen.

Das in obiger Weise gewonnene entkalkte und filtrirte Plasma konnte nunmehr tagelang stehen, ohne einen Niederschlag zu geben oder im geringsten Grade sich zu trüben. Solches Plasma, welches ich in der Folge der Kürze halber Oxalatplasma nenne, weil es überschüssiges Oxalat enthält, wurde nun in verschiedener Weise zu den Versuchen verwendet. In einigen kam es schon ohne Weiteres zur Verwendung; in anderen wurde es, um den Procentgehalt an Alkalioxalat herabzusetzen, mit 1—2 Volumina Wasser verdünnt und von dem nach einiger Zeit auftretenden Globulin-niederschlag durch Filtration getrennt. In anderen Versuchen wurde es durch Dialyse gegen Wasser von dem Oxalate befreit, und dabei verfuhr ich dann weiter so, dass ich in einigen Fällen das infolge der Dialyse ausgefällte Globulingemenge durch Filtration entfernte und nur das filtrirte Plasma verwendete, in anderen Fällen dagegen dieses Gemenge in dem Plasma durch Zusatz von 0,7—1% reinen NaCl<sup>3)</sup> löste und von dem etwa Ungelösten abfiltrirte. In anderen Fällen end-

<sup>1)</sup> La coagulation du sang et les sels de chaux. Archives de Physiologie (Ser. V), Tom. 8.

<sup>2)</sup> Weitere Beiträge zur Blutlehre.

<sup>3)</sup> Das gereinigte NaCl stellte ich aus gewöhnlichem Kochsalz in folgender Weise dar. Zuerst wurde aus der Lösung alle Schwefelsäure durch Zusatz von BaCl<sub>2</sub> entfernt, dann fällte ich in dem Filtrate den überschüssigen Baryt und die Erden mit reiner Soda im Sieden aus, übersättigte das alkalische Filtrat mit Salzsäure, trocknete ein und glühte. Das Salz wurde nun in Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniumoxalat versetzt und mehrere Tage stehen gelassen. Hierbei entstand kein sichtbarer Niederschlag, aber trotzdem wurde von Neuem filtrirt, eingetrocknet und geglüht. Das Salz wurde in Wasser gelöst, filtrirt und zur Krystallisation gebracht. Die Mutterlauge wurde eingetrocknet. Weder in dem krystallisirten noch in dem eingetrockneten Salze konnten Spuren von Kalk oder Baryt nachgewiesen werden.

lich wurde gegen Wasser, welches etwa 0,004% kalkfreies NaOH enthielt, dialysirt, um einer Ausfällung des Fibrinogens entgegenzuwirken. Endlich wurde auch das bei der Dialyse gegen Wasser ausgeschiedene Globulingemenge in einigen Fällen abfiltrirt, in Wasser mit Hilfe von reinem NaCl gelöst und zu den Versuchen verwendet. Das Nähere soll übrigens bei den unten als Beispiele angeführten Versuchen angegeben werden und ich will hier nur ein für alle Mal bemerken, dass in den von mir zu meinen Versuchen benutzten Plasmapräparaten nie eine Spur von Fällung oder Trübung nach Zusatz von überschüssigem Oxalat zum Vorschein kam.

### Die Fibrinogenlösungen.

Diese Lösungen wurden nach der von mir früher angegebenen Methode aber mit Hilfe von entkalktem Kochsalz gewonnen. Da es zu umständlich war, das hierzu in sehr grossen Mengen erforderliche Kochsalz ganz rein darzustellen, benutzte ich gesättigte Lösungen von Kochsalz, welches vorher durch Fällung mit überschüssigem Kaliumoxalat so weit möglich von dem Kalke befreit worden war. Die gesättigten Kochsalzlösungen enthielten 0,5—1% Kaliumoxalat. Mit solchen Kochsalzlösungen wurde nun das klar filtrirte Oxalatplasma gefällt, und zwar so, dass ich erst das halbe Volumen Kochsalzlösung zufügte. Der hierdurch erzeugte, verhältnissmässig geringfügige Niederschlag wurde abfiltrirt und nicht weiter verwendet. Das neue Filtrat wurde nun mit so viel gesättigter Kochsalzlösung versetzt, dass auf je 1 Liter filtrirtes Oxalatplasma insgesamt 1½—2 Liter Kochsalzlösung kamen. Ich setzte also dem Oxalatplasma mehr Kochsalzlösung als früher dem Magnesiumsulfatplasma hinzu, was nicht nur ohne Gefahr für eine Verunreinigung mit Paraglobulin geschehen kann, sondern auch im Interesse einer nicht zu kleinen Ausbeute an Fibrinogen aus dem salzarmen Oxalatplasma nothwendig ist. Der Fibrinogenniederschlag wurde nun in einer kaliumoxalathaltigen Kochsalzlösung von 6—8% NaCl gelöst, mit dem gleichen Volumen gesättigter oxalathaltiger Kochsalzlösung gefällt und dieses Verfahren wiederholt, so dass das

Fibrinogen im Ganzen 3 Mal mit Kochsalz ausgefällt wurde. Zuletzt wurde es nach starkem Auspressen in destillirtem Wasser gelöst und die Lösung filtrirt. Ob man hierbei aschefreies oder gewöhnliches Filtrirpapier benutzt, ist ganz gleichgültig, denn die zuletzt erhaltene Fibrinogenlösung giebt in beiden Fällen mit Oxalatlösung keine Spur einer Reaction auf Kalk. Dagegen enthält die Lösung regelmässig eine Spur Alkalioxalat, so dass sie mit der Lösung eines Kalksalzes eine deutliche, wenn auch schwache Reaction giebt. Diese Fibrinogenlösungen sind also kalkfrei (im Sinne Arthus').

Die nach diesem abgeänderten Verfahren dargestellten Fibrinogenlösungen verhalten sich in derselben Weise wie die mit gewöhnlichem, kalkhaltigem Kochsalz gewonnenen. Sie gerinnen nie spontan oder nach Zusatz von einem Kalksalz allein. Dagegen gerinnen sie nach Zusatz von einer fibrinfermenthaltigen Flüssigkeit. Mit Ausnahme von der Abwesenheit von fällbarem Kalk finde ich keinen Unterschied zwischen diesen Fibrinogenlösungen und den nach dem älteren Verfahren gewonnenen, und die Einwendungen, die gegen dieses Verfahren gemacht werden können, treffen also in fast gleich hohem Grade das neue. Dies veranlasst mich, ein wenig bei diesen Einwendungen zu verweilen.

In einer nach seinem Tode erschienenen Arbeit hat Alex. Schmidt<sup>1)</sup> die Einwendung gemacht, dass man nach meiner Methode Fibrinogenlösungen erhält, die sehr arm an Fibrinogen, aber dagegen unverhältnissmässig reich an Kochsalz sind. Dementsprechend soll auch nach ihm die Unfähigkeit dieser Lösungen spontan zu gerinnen nicht in ihrer Reinheit begründet sein, sondern nur von der gerinnungshemmenden Wirkung der unverhältnissmässig grossen Kochsalzmengen herrühren. Als Beleg hierfür hat er einen Versuch mitgetheilt, in dem er nach meiner Methode eine Fibrinogenlösung darstellte, die nur 0,342% organische Substanz neben 5,80% Salz enthielt.

Hierzu will ich sogleich bemerken, dass, wenn ich ebenso schlechte Resultate erhalten hätte, dies für mich natürlich ein

<sup>1)</sup> Weitere Beiträge etc.

dringender Grund gewesen wäre, die Methode zu verbessern oder, wenn dies unmöglich war, als unbrauchbar zu verlassen. Meine Erfahrungen sind nun aber glücklicher Weise ganz anderer Art, und in dieser Hinsicht mag es genügen, auf meinen im Jahre 1880 veröffentlichten Aufsatz über das Fibrinogen hinzuweisen<sup>1)</sup>. Es werden dort wiederholt Fibrinogenlösungen erwähnt, die 0,8—1 bis gegen 2% Fibrinogen bei einem Gehalte von 1—2% NaCl enthielten. Als Beispiele hierfür findet man S. 437 eine Lösung, die 1,36% Fibrinogen und 1,01% NaCl, und S. 438 eine andere, die 1,675% Fibrinogen und 0,965% NaCl enthielt. Diese als Beispiele gewählten Lösungen enthielten eine Kochsalzmenge, die nach der Erfahrung von Alex. Schmidt und Anderen die Gerinnung gar nicht verhindert, sondern im Gegentheil dem von Schmidt für die gerinnungsbefördernde Wirkung des Kochsalzes gefundenen Optimum sehr nahe liegt. Dass solche Lösungen sämtliche Gerinnungsbedingungen enthalten und ihre Gerinnungsunfähigkeit nur dem hemmenden Einflusse des überschüssigen Kochsalzes zu verdanken haben, davon kann natürlich nicht die Rede sein.

Auch nach dem neuen modificirten Verfahren ist es mir nie schwierig gewesen, Fibrinogenlösungen von 1—2% Fibrinogen mit nur 1—2% NaCl darzustellen, und ausserdem habe ich ja schon längst ein Verfahren beschrieben, welches die Wegschaffung des überschüssigen Kochsalzes ermöglicht. Hiermit will ich jedoch gar nicht leugnen, dass die Fibrinogendarstellung nach dieser Methode mit bedeutenden Verlusten an Material verbunden ist, wesshalb ich auch regelmässig jedesmal mehrere Liter Plasma in Arbeit nehme. Dies ist allerdings — das gebe ich gern zu — ein Mangel meiner Methode, der indessen wohl kaum schwer in's Gewicht fällt, wenn man nur zuletzt ein wirklich reines Product erhält.

In wie weit das letztere der Fall ist, dürfte gegenwärtig nicht leicht zu ermitteln sein. Nach Alex. Schmidt sollen meine Fibrinogenlösungen dermassen unrein sein, dass sie

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. 22.

alle nothwendige Bedingungen für die Gerinnung enthalten und nur durch das Missverhältniss zwischen Fibrinogen und Kochsalz vor der Gerinnung geschützt werden. Als Beweis hierfür theilt er die Beobachtung mit, dass eine solche Fibrinogenlösung, wenn man sie gegen Wasser dialysirt, im Dialysator zu einer Zeit gerinnt, wo das überschüssige NaCl durch die Dialyse entfernt worden ist.

Ich kann nun selbstverständlich nicht die Möglichkeit in Abrede stellen, dass Schmidt bei seinen Dialyseversuchen mit unreinen Fibrinogenlösungen gearbeitet und infolge davon in ihnen eine wahre Fibrinbildung beobachtet hat; aber mir ist dies nicht begegnet. Dagegen habe ich regelmässig, wie ich schon vor 16 Jahren zeigte, eine andere Erscheinung beobachtet, nämlich eine scheinbare Gerinnung, die, wenn man nicht genauer untersucht, zur Verwechslung mit einer echten Fibringerinnung führen kann.

Das reine Fibrinogen wird, wenn man es aus seiner Lösung fällt und unter Wasser gefällt stehen lässt, nach einiger Zeit unlöslich und kann nunmehr kaum vom Fibrin unterschieden werden. Fällt man das reine Fibrinogen mit sehr wenig einer verdünnten Säure und lässt den Niederschlag unter Wasser stehen, so wird er immer schwerlöslicher und nach einiger Zeit fast so unlöslich wie Fibrin. Verdünnt man eine kochsalzhaltige Fibrinogenlösung mit Wasser, so trübt sie sich rasch; ein Theil des Fibrinogens scheidet sich aus und wird unter Wasser nach einiger Zeit ebenso unlöslich wie Fibrin. In diesen Fällen handelt es sich aber nicht um eine Fibrinbildung durch die Einwirkung eines Enzyms, sondern um eine allmälige Veränderung des Fibrinogens, der Veränderung analog, die auch mehrere andere gefällte Eiweisskörper unter Wasser durchmachen.

Wenn man sich nun erinnert, dass das nach meiner Methode dargestellte Fibrinogen mit Hilfe von NaCl in Lösung gehalten ist, so muss selbstverständlich dieses Fibrinogen, wenn man das Lösungsmittel desselben durch Dialyse entfernt, allmählich sich ausscheiden. Infolge der physikalischen Eigenschaften des Fibrinogens und der Neigung desselben, in

zähen Massen sich auszuschcheiden, kann diese Ausscheidung im Dialysator leicht mit einer Gerinnung verwechselt werden, ist aber wie gesagt etwas davon ganz Verschiedenes. Bei der wahren Gerinnung hat nämlich das Gerinnsel, unmittelbar nachdem es entstanden ist, die typische Unlöslichkeit des Fibrins. Bei der Dialyse dagegen wird das ausgeschiedene Fibrinogen erst nach und nach mehr schwerlöslich bezw. unlöslich, und es sind mir Fälle vorgekommen, in welchen das Fibrinogen, nachdem es über eine Nacht im Dialysator ausgefällt gestanden hatte, in Kochsalzlösung noch nicht unlöslich und in verdünntem Alkali noch ziemlich leichtlöslich war.

Aus dem nun Gesagten folgt also, dass eine Ausscheidung von Substanz im Dialysator, wenn man eine Lösung von Fibrinogen in salzhaltigem Wasser gegen destillirtes Wasser dialysirt, eine natürliche und nicht zu vermeidende Erscheinung ist, die mit der Reinheit der Lösungen nichts zu thun hat. Nur wenn eine wahre Gerinnung im Dialysator auftritt, kann man auf eine Verunreinigung der Lösung mit Fibrinferment oder Prothrombin schliessen; eine solche Gerinnung findet aber, wenn die Lösungen richtig bereitet sind, nicht statt.

Die Reinheit der nach meiner Methode dargestellten Fibrinogenlösungen — insofern als es um eine Verunreinigung mit dem Fibrinfermente oder mit dessen Zymogen sich handelt — lässt sich indessen leicht controliren, wenn man die Wegschaffung des Kochsalzes durch Dialyse ohne Ausscheidung des Fibrinogens im Dialysator bewirkt. Dies gelingt leicht, wenn man die Fibrinogenlösung nicht gegen destillirtes Wasser, sondern gegen Wasser, welches sehr wenig Alkali enthält, dialysirt. Diese Versuchsanordnung, die ich schon in meinem Aufsätze über das Fibrinogen<sup>1)</sup> beschrieben habe, wurde ebenfalls von Alex. Schmidt ziemlich scharf getadelt, indem er sagte, dass ich als äussere Flüssigkeit eine äusserst schwache Natronlösung benutzt habe und dass folglich von einer Abmessung der zur Auflösung der Substanz erforderlichen Natronmenge nicht die Rede sein kann. Er citirte hierbei nur

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. 22.

mein Lehrbuch, in dem allerdings keine detaillirten Angaben über die Alkaleszenz der Aussenflüssigkeit sich vorfinden, und nicht die Originalabhandlung. In dieser findet man indessen die ganz bestimmte Angabe, dass ich die Fibrinogenlösung mit 0,006%  $\text{Na}_2\text{O}$  versetzte und dann gegen Wasser von ganz demselben Alkaligehalte dialysiren liess. In derselben Weise bin ich nun auch mit den kalkfreien<sup>1)</sup> Fibrinogenlösungen verfahren, nur mit dem Unterschiede, dass ich den Alkaligehalt regelmässig noch niedriger nahm. Der letztere entsprach in den meisten Fällen 0,004%  $\text{NaOH}$  oder  $\text{KOH}$ . Wenn die Lösungen sehr reich an Fibrinogen sind, ereignet es sich bei so niedrigem oder einem noch niedrigeren Alkaligehalte bisweilen, dass ein kleiner Theil des Fibrinogens wegen Mangels an Lösungsmittel sich ausscheidet, was natürlich nicht schadet, da der Niederschlag leicht abfiltrirt werden kann. In dieser Weise erhält man leicht salzfreie oder fast ganz salzfreie Fibrinogenlösungen, die neutral oder fast neutral reagiren. Diese Lösungen gerinnen nie spontan. Ebenso wenig gerinnen sie, wenn man das von Alex. Schmidt gefundene Optimum an  $\text{NaCl}$ , allein oder zusammen mit  $\text{CaCl}_2$ , zusetzt. Dagegen gerinnen sie leicht und rasch mit einer Fibrinfermentlösung. Das Gerinnsel ist typisches Fibrin.

Hieraus kann man also den Schluss ziehen, dass diese Fibrinogenlösungen, die kein Paraglobulin enthalten, weder von dem Fibrinfermente noch von der Vorstufe desselben, dem Prothrombin, verunreinigt sind.

Eine andere Verunreinigung meiner Fibrinogenlösungen, die nach Alex. Schmidt ebenfalls in Betracht kommt, sind die sog. zymoplastischen Substanzen. In wieweit solche Substanzen in meinen Fibrinogenlösungen vorhanden sind, darüber kann ich natürlich nichts sagen, denn man ist bekanntlich noch nicht darüber einig, ob es überhaupt besondere zymo-

<sup>1)</sup> Wenn ich hier und in der Folge der Kürze halber von kalkfreien Fibrinogenlösungen oder Fermentlösungen oder von kalkfreiem Plasma spreche, so dürfte dies wohl kaum zu Missverständnissen führen können. Es handelt sich überall nur um solche Flüssigkeiten, die keine mit Oxalat direct nachweisbaren Kalk enthalten.

plastische Substanzen giebt oder nicht. In dem Maasse, wie ich Zeit zu fortgesetzten Untersuchungen über die Fibrinfrage finden werde, will ich in erster Linie meine Arbeit auf die sichere Reindarstellung des Fibrinogens und der anderen hier in Frage kommenden Substanzen concentriren, weil man nur auf diesem Wege eine Lösung dieses sehr verwickelten Problems erreichen kann. Vielleicht werde ich dann auch etwas mehr Bestimmtes über diese Substanzen sagen können, für diesmal aber will ich nicht die Möglichkeit einer Verunreinigung mit den noch unbekanntem fibrinoplastischen Substanzen in Abrede stellen.

Wenn dieses letztere nun auch der Fall sein würde, so ist dies glücklicherweise ohne Bedeutung für die jetzt vorliegende Aufgabe; denn es handelt sich hier nur um die Nothwendigkeit bezw. die Entbehrlichkeit des mit Oxalat fällbaren Kalkes, wenn alle sonstigen Gerinnungsbedingungen erfüllt sind.

Ausser den salzhaltigen und den durch Dialyse gegen alkalihaltiges Wasser salzfrei gemachten Fibrinogenlösungen habe ich zu vielen Versuchen auch solche Fibrinogenlösungen benutzt, die durch Ausfällen des Fibrinogens mit Essigsäure und Auflösung des gefällten Fibrinogens in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali gewonnen wurden. Ich verstehe wohl, dass man diese letztere Angabe mit Misstrauen aufnehmen oder mindestens sehr befremdend finden wird, denn sie steht in schroffem Widerspruch zu den Angaben von Lilienfeld, denen zufolge das Fibrinogen bei der Fällung mit Essigsäure in Thrombosin und Albumosesubstanz sich spalten soll. Es ist nicht nöthig, auf die Erklärung dieses Widerspruches schon hier des Näheren einzugehen, denn die hierher gehörenden Versuche sollen unten in einem anderen Abschnitte besprochen werden. Hier bemerke ich nur, dass ich, wie der Leser unten finden wird, aus solchem, mit Essigsäure gefälltem Fibrinogen, das mit Kalksalz allein nicht gerinnt, durch Zusatz von Fermentlösungen reichliche Mengen von typischem Faserstoff dargestellt und auf den Gehalt an Calcium analysirt habe.

Zu meinen Versuchen mit Fibrinogen habe ich also theils kochsalzhaltige, theils dialysirte und theils solche Fibrinogenlösungen verwendet, die mit Essigsäure gefälltes, in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali gelöstes Fibrinogen enthielten.

### Die Fibrinfermentlösungen.

Zu meinen Untersuchungen konnte ich nicht mit Vortheil Lösungen des sog. reinen Fibrinfermentes benutzen, und zwar aus Gründen, die ich schon hier anführen muss, obzwar ich dadurch dem Berichte über die Versuchsergebnisse ein wenig vorgreifen muss.

Ich fand schon nach einigen Versuchen, dass das Alkalioxalat an und für sich hemmend auf die Fibrinbildung einwirken kann, und diese hemmende Wirkung macht sich in dem Maasse stärker geltend, wie die Fermentlösung schwächer wirkt. Wenn man eine schwach wirkende Fermentlösung verwendet, so kann es sich ereignen, dass die Gerinnung in einem stark oxalathaltigen Plasma ganz ausbleibt oder so langsam von Statten geht, dass man sie übersieht, während dasselbe Plasma mit einer fermentreicheren Flüssigkeit eine ganz typische Fibrinbildung giebt. Im ersteren Falle kann man also leicht zu der Ansicht gelangen, dass die Nichtgerinnbarkeit des Oxalatplasmas von dem Mangel an Kalksalzen herrührt, während sie in der That in der hemmenden Wirkung des Oxalates und der Fermentarmuth begründet ist. Arbeitet man dagegen mit einer kräftig wirkenden Fermentflüssigkeit, so ist die hemmende Wirkung des Oxalates von nur geringem Belang und in diesem Falle kann man leicht die Gerinnbarkeit des Oxalatplasmas trotz der Abwesenheit von Kalksalzen zeigen.

Aber auch für die Versuchsanordnung überhaupt schien es mir wichtig zu sein, mit möglichst kräftigen Fermentflüssigkeiten zu arbeiten, denn wenn die Fibrinbildung erst spät auftritt und sehr langsam verläuft, können die Versuchsergebnisse oft etwas unsicher oder zweideutig werden. Oft

tritt in solchen Fällen beginnende Fäulniss vor der beendeten Gerinnung auf.

Zur Gewinnung von entkalkten und gleichzeitig kräftig wirkenden Fermentlösungen waren indessen die bisher gebräuchtesten Methoden nicht gut geeignet. Meine Methode zur Ausfällung des Fermentes mit Alkali und Magnesiumsalz konnte nicht zur Verwendung kommen, weil die so gewonnenen Fermentlösungen nicht ohne grosse Einbusse an Wirksamkeit durch Dialyse von den Mineralsalzen befreit werden können. Fast ebenso schwer ist es aber, kräftig wirkende entkalkte Lösungen von Fibrinferment nach der Methode von Alex. Schmidt darzustellen. Lässt man den Alkohol sehr lange auf den Serumniederschlag einwirken, so bekommt man zwar verhältnissmässig reine, d. h. sehr eiweissarme Fermentlösungen, die kaum mit Oxalat auf Kalk reagiren; aber diese Lösungen wirken auch nicht gerade stark und kräftig. Lässt man den Alkohol dagegen kürzere Zeit einwirken, so erhält man zwar kräftiger wirkende Fermentlösungen, aber diese enthalten auch ein wenig fällbaren Kalk, der mit überschüssigem Oxalat entfernt werden muss. Während der darauf folgenden anhaltenden Dialyse wird wiederum die Wirkung des Fermentes sehr abgeschwächt.

Aus diesen Gründen stand ich von der Anwendung sogenannter reiner Fermentlösungen ab und verfuhr in viel einfacherer Weise. Als Fermentlösungen habe ich nämlich theils mit Oxalat entkalktes Serum und theils Lösungen von aus dem letzteren isolirtem, fermentreichem Globulin verwendet.

Zur Gewinnung des Oxalatserums wurde centrifugirtes Pferdeblutserum mit 0,3% Kaliumoxalat versetzt. Zur Entfernung des Calciumoxalates wurde theils centrifugirt und theils durch doppelte Filter aus sehr dickem Papier filtrirt. In dieser Weise wurde leicht ein entkalktes, wenigstens anscheinend von Calciumoxalat ganz freies und klares Serum gewonnen. Da es indessen möglich war, dass solches Serum, mit dem blossen Auge zwar nicht sichtbares, in der Flüssigkeit jedoch sehr fein vertheiltes Calciumoxalat enthalten könnte, habe ich das Serum nachher oft mit 2–3 Vol. destil-

lirtem Wasser verdünnt. Es entsteht dann nach einiger Zeit ein flockiger Niederschlag von Globulinen, der in der Flüssigkeit etwa vorhandene feste Partikelchen mit niederreisst und von dem die Flüssigkeit nach 24 Stunden oder noch längerer Zeit ganz wasserhell abfiltrirt wurde. Das so vorbereitete Serum habe ich mehrmals zu den Versuchen direct verwendet, namentlich wenn es sich um die Darstellung von grösseren Mengen Fibrin aus verdünntem Oxalatplasma handelte.

Aus dem so vorbereiteten Serum habe ich auch durch noch stärkere Verdünnung mit Wasser und Zusatz von Essigsäure das fermenthaltige Globulin ausgefällt. Das letztere wurde dann durch Auflösung in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali und neue Ausfällung mit Essigsäure — ein Verfahren, das am öftersten 2, nur selten 3 Mal wiederholt wurde — weiter gereinigt. Zuletzt wurde das Globulin in Wasser mit Hilfe von ein wenig reinem NaCl gelöst. Die so gewonnenen Globulinlösungen, die keine nachweisbare Spur von direct fällbarem Kalk enthielten, waren gewöhnlich sehr reich an Fibrinferment und wirkten viel rascher und kräftiger als das Serum selbst.

Eine dritte Verfahrensweise war die, dass ich das entkalkte, centrifugirte oder filtrirte, aber mit Wasser nicht verdünnte Serum zur Entfernung des überschüssigen Oxalates der Dialyse gegen Wasser unterwarf. Das hierbei sich ausscheidende Globulin, welches ebenfalls in der Flüssigkeit etwa suspendirtes Calciumoxalat oder feste Partikelchen überhaupt mit niederreisst, wurde abfiltrirt und das klare Filtrat zu den Versuchen verwendet. Infolge der Dialyse wird hierbei indessen die fermentative Wirksamkeit des Serums oft nicht unbedeutend abgeschwächt, und aus diesem Grunde habe ich auch in mehreren Fällen nach dem Vorgange von Alex. Schmidt<sup>1)</sup>, durch schwache Alkalieinwirkung während einer halben Stunde und nachträgliche Neutralisation, den Fermentgehalt zu erhöhen versucht.

Dass ich zu meinen Versuchen nicht sog. reine Fermentlösungen, sondern entweder Blutserum oder fermentreiche

<sup>1)</sup> Weitere Beiträge etc., S. 62 u. folg.

Globulinlösungen verwendet habe, vermindert natürlich gar nicht die Beweiskraft der Versuche. Abgesehen davon, dass eine sog. reine Fermentlösung wohl kaum das sog. Fibrin-ferment in reinem Zustande enthält, ist es nämlich für die hier vorliegende Frage ganz gleichgültig, ob in der Fermentlösung auch andere Serumbestandtheile vorhanden sind oder nicht, wenn die Lösung nur keinen durch Oxalat direct fällbaren Kalk enthält. Die Frage ist nämlich nur die, ob der durch Oxalat fällbare Kalk ein nothwendiges Bedingniss für die Fibrinbildung ist, wenn sämtliche andere Gerinnungsbedingungen vorhanden sind.

Nach diesen ziemlich detaillirten Angaben über die Beschaffenheit der verschiedenen Versuchsflüssigkeiten, welche Angaben indessen für die Beurtheilung der Beweiskraft der Versuche nothwendig waren, kann ich zu den Versuchsergebnissen selbst übergehen. Es dürfte dabei genügend sein, nur einige wenige Versuche als Beispiele anzuführen.

#### **Versuche mit Blutplasma.**

In den ersten orientirenden Versuchen verfuhr ich einfach so, dass ich Oxalatplasma und Oxalatserum zu gleichen Mengen mit einander vermischte und dieses Gemenge der Dialyse gegen Wasser unterwarf. Es trat dabei nach und nach im Dialysator eine reichliche, grobflockige Fällung neben grösseren fibrinähnlichen Massen auf. Die letzteren, wie auch der grösste Theil des Niederschlages, waren in Kochsalzlösung, in verdünnter Säure und in verdünntem Alkali unlöslich und verhielten sich also in diesen Hinsichten wie Faserstoff. Es war also kaum zu bezweifeln, dass im Dialysator trotz der Abwesenheit von löslichem Kalksalz eine Fibrinbildung stattgefunden hatte. Viel bemerkenswerther erschien es mir jedoch schon im ersten Versuche, dass ein anderer Theil eines solchen Gemenges, der nicht dialysirt wurde und den ich an einem kühlen Orte hatte stehen lassen, nach etwa 3 Tagen zu einer durchsichtigen gallerartigen Fibrinmasse geronnen war.

Nach diesen Vorversuchen, die, wie man sieht, mit der Theorie von Arthus im Widerspruche standen, ging ich zu mehr planmässigen Untersuchungen über, und die Versuche wurden dabei regelmässig in der Weise angeordnet, dass sie nicht nur Antwort auf die Hauptfrage gaben, sondern gleichzeitig auch Aufschlüsse über andere Fragen, wie z. B. über die Einwirkung der Kalksalze oder Alkalioxalate auf die Geschwindigkeit der Gerinnung und dergleichen, lieferten. Zu dem Ende musste der zeitliche Verlauf der Gerinnung in den verschiedenen Proben so weit möglich genau beobachtet werden, was indessen sehr schwierig ist und zu den folgenden, vorausgeschickten Bemerkungen mich nöthigt.

Es dürfte wohl ziemlich allgemein bekannt sein, dass die Fibrinbildung in Gemengen von Plasma und Blutserum ebenso wie in Gemengen von Fibrinogenlösungen mit Serum oder Fermentlösungen, in der Regel weder so früh auftritt noch so rasch beendet ist wie in dem natürlichen Plasma oder im Blute. Die Versuche müssen in jenen Fällen oft über eine sehr lange Beobachtungszeit ausgedehnt werden und das namentlich in solchen Fällen, wo besondere gerinnungshemmende Substanzen zugesetzt worden sind. In solchen Fällen dauert der Gerinnungsvorgang oft mehrere Tage. Es finden wiederholt neue Gerinnungen statt, und es ist nicht möglich, jedesmal die Zeit, wo solche auftreten, genau anzugeben. Dies ist aber auch nicht nothwendig, wenn man des Vergleiches halber nur gewisse Stadien der Fibrinbildung annotirt.

Als erstes Stadium oder als Anfang der Fibrinbildung habe ich den Zeitpunkt annotirt, wo zum ersten Male beim Umrühren der Flüssigkeit mit einem Glasstabe ganz typische Fibrinfasern oder ein kleines, um den Stab faserig sich herumwindendes Coagel beobachtet werden konnten. Dann liess ich die Probe ganz ruhig stehen, bis der Inhalt der Röhre in ein gallertiges, lockeres Gerinnsel verwandelt worden war; das zwar die Röhre vollständig erfüllte, das aber nicht so fest war, dass es die Umstülpung derselben gestattete. Das in diesem zweiten Stadium entstandene Coagel wurde mit dem

Glasstabe zusammengespreßt und herausgenommen. Als drittes Stadium bezeichnete ich den Zeitpunkt, wo die Flüssigkeit von Neuem geronnen war, und zwar so fest, dass die Röhre umgestülpt werden konnte ohne dass das Gerinnsel herausfiel oder von der Wand der Röhre sich trennte. Auch dieses Coagel wurde stark zusammengespreßt und herausgenommen, und nunmehr wurde das Aussehen der Probe nur alle 12 Stunden annotirt, wobei ein etwa vorhandenes Gerinnsel jedesmal entfernt wurde. Uebrigens ist es wohl kaum nöthig zu bemerken, dass nicht immer diese verschiedenen Stadien sicher beobachtet oder von einander genau getrennt werden konnten. Sämmtliche Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Ich theile nun hier einige wenige Versuche als Beispiele mit:

Versuch I. Oxalatserum und Oxalatplasma wurden gesondert dialysirt. Nach 48 Stunden war das Oxalat so weit entfernt worden, dass nur Spuren davon nachzuweisen waren. In den Diffusaten konnte kein Oxalat direkt, d. h. ohne vorheriges Concentriren, nachgewiesen werden. Sowohl im Serum wie im Plasma fand sich ein ziemlich reichlicher Niederschlag vor, der durch Zusatz von reinem NaCl (bis zu 1,2%) gelöst wurde.

a) 5 ccm. Plasma + 5 ccm. Serum + 2 ccm. Wasser.

Der Anfang der Gerinnung konnte nicht sicher beobachtet werden. Nach 4 St. 55 Min. war das zweite Stadium eingetreten, aber erst nach 7 Stunden war der Inhalt so fest geronnen, dass die Röhre ohne sichtbare Veränderung des Inhaltes umgestülpt und geschüttelt werden konnte.

b) 5 ccm. Plasma + 5 ccm. Serum + 2 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von 1% = 0,167%  $\text{CaCl}_2$  in der Versuchsflüssigkeit.

Nach etwa 1 Stunde trat das erste Stadium auf. Die Zeit, wo das zweite Stadium auftrat, konnte nicht sicher beobachtet werden, nach 2 Stunden hatte aber der Inhalt der Röhre dieselbe feste Beschaffenheit wie in der Probe a) nach 7 Stunden.

c) 5 ccm. Plasma + 5 ccm. Serum + 1 ccm. Wasser + 1 ccm. Kaliumoxalatlösung von 5% = 0,45% Kaliumoxalat in der Versuchsflüssigkeit.

Erst nach 12 Stunden war das erste Stadium angedeutet, obzwar so schwach, dass eine Fibrinbildung nicht sicher anzunehmen war. Im Laufe der nächsten 10 Stunden (Nacht) fand nur eine sehr unbedeutende Fibrinbildung statt und erst nach 44 Stunden war das zweite Stadium

eingetreten. Das Gerinnsel konnte indessen nicht gut zusammengepresst werden und aus diesem Grunde wurde es auch nicht herausgenommen. Nach 64 Stunden war der Inhalt der Röhre fest und hart, aber erst nach 72 Stunden hatte es dasselbe Aussehen und dieselbe Festigkeit wie in den Proben a) und b) nach 7 bzw. 2 Stunden.

d) 5 ccm. Plasma + 1 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von 1% = 0,167%  $\text{CaCl}_2$  in der Versuchsflüssigkeit.

Nach 5 Stunden enthielt die Probe einige gröbere, fibrinähnliche Flöckchen, nach 8 Stunden war das zweite Stadium eingetreten. 4 Stunden später (also nach insgesamt 12 Stunden) keine sichtbare Veränderung. Am folgenden Morgen (nach 22 Stunden) war der Inhalt ebenso fest wie in den Proben a) und b) nach 7 bzw. 2 Stunden.

Das übrig gebliebene Plasma (mit 1,2%  $\text{NaCl}$ ) liess ich bei Zimmertemperatur stehen, und zwar theils ohne weiteres, theils nach Zusatz von 2 ccm. Wasser auf je 10 ccm. Plasma, damit der Procentgehalt an  $\text{NaCl}$  derselbe wie in den übrigen Versuchsflüssigkeiten sein würde. Nach 96 Stunden war noch keine Gerinnung sichtbar. Die Beobachtung wurde nicht länger fortgesetzt.

Versuch 2. Um eine Ausfällung der Globuline infolge der Dialyse zu verhindern, wurde in diesem Versuche das Oxalatplasma und Oxalatsérum nicht wie in dem Vorigen gegen destillirtes Wasser, sondern gegen Wasser, welches 0,004%  $\text{NaOH}$  (kalkfrei) enthielt, dialysirt. Die geringfügige Menge der trotzdem ausgefällten Globuline wurde abfiltrirt. Ein Zusatz von  $\text{NaCl}$  fand also in diesem Versuche nicht statt.

a) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Sérum + 1 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von 3,6%  $\text{CaCl}_2$  = 0,171%  $\text{CaCl}_2$  in der Versuchsflüssigkeit.

Innerhalb 15 Minuten ein grobflockiger, fibrinähnlicher Niederschlag; nach 40 Min. ein neuer Niederschlag von derselben Beschaffenheit. Dieser Niederschlag konnte nicht als eine zusammenhängende Fibrinmasse, sondern nur als gröbere Flöckchen herausgenommen werden. Ein zweites Stadium war nicht sicher zu sehen; nach 2 Stunden aber war das dritte Stadium ganz typisch eingetreten. Das Coagel, welches ganz typisch war, wurde herausgenommen. Es traten darauf neue Gerinnsel auf, die alle 12 Stunden entfernt wurden. Nach 72 Stunden wurden die Beobachtungen unterbrochen.

b) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Serum + 1 ccm. Wasser.

Das erste Stadium trat nach etwa 1 St. 20 Min., das zweite nach etwa 3 Stunden auf. Erst nach 9 Stunden enthielt diese Probe ein typisches Fibrincoagel von derselben Beschaffenheit wie in a) nach 2 Stunden. Es wurden dann wiederholt neue Gerinnsel gebildet, die alle 12 Stunden herausgenommen wurden. Nach 72 Stunden wurde der Versuch unterbrochen.

c) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Serum + 0,5 ccm. Wasser + 0,5 ccm. Kaliumoxalatlösung von 6 % = 0,143 % Alkalioxalat in der Versuchsflüssigkeit.

Nach etwa 2 St. 30 Min. erstes Stadium, nach 5 Stunden das zweite. Nach 9 Stunden ein neues, lockeres, aber nicht festes Coagel. Im Laufe der Nacht gerann die Probe zu einem ebenso festen, typischen Coagel wie in a) nach 2 Stunden. Dann wurde wiederholt neues, ziemlich festes Fibrin gebildet, das alle 12 Stunden herausgenommen wurde. Nach 72 Stunden keine weiteren Beobachtungen.

d) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Serum + 1 ccm. Oxalatlösung von 6 % Kaliumoxalat = 0,286 % Oxalat in der Versuchsflüssigkeit.

Erst nach 9 Stunden war das erste Stadium sichtbar. Am folgenden Morgen, nach insgesamt 22 Stunden, war das zweite Stadium eingetreten. Das Coagel war sehr locker, konnte aber um den Glasstab herumgewunden werden. Nach 36 Stunden ein grosses, nicht ganz festes Coagulum, welches herausgenommen wurde. Nach 48 Stunden ein neues, ähnliches Coagulum, das ich indessen nicht herausnahm. Nach 72 Stunden war der Inhalt ebenso fest wie in a) nach 2 Stunden. Die Beobachtung konnte wegen beginnender Fäulniss nicht länger fortgesetzt werden.

Der Rest des Plasmas wurde als Controlle verwendet, theils als solches und theils nach Zusatz von 1 % NaCl. Es trat keine Spur einer Gerinnung auf.

Versuch 3. Oxalatplasma und Oxalatserum wurden gegen destillirtes Wasser 60 Stunden dialysirt, wie gewöhnlich unter fleissigem Wechseln des Wassers. Das Plasma wurde durch Filtration von dem Niederschlage getrennt, das Serum dagegen nicht. Dieses letztere wurde statt dessen nach den Vorschriften von Alex. Schmidt mit Alkali versetzt und nach  $\frac{1}{2}$  Stunde wieder neutralisirt, um den Gehalt an Fibrinferment zu erhöhen. Das filtrirte Plasma wurde mit kalkfreiem NaCl — 1,59 % NaCl — versetzt, das Serum dagegen nicht.

a) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Serum + 2 ccm. CaCl<sub>2</sub>-Lösung von 1 % CaCl<sub>2</sub> = 0,72 % NaCl und 0,090 % CaCl<sub>2</sub> in der Versuchsflüssigkeit.

Nach 1 St. 30 Min. das erste, nach etwa 4 Stunden das zweite und nach 6 Stunden das dritte Stadium. Dann traten wie gewöhnlich wiederholt neue Gerinnsel auf.

b) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Serum + 2 ccm. Wasser = 0,72 % NaCl in der Versuchsflüssigkeit. Nach 1 St. 45 Min. das erste, nach etwa 4 Stunden das zweite und nach 6 Stunden das dritte Stadium. Auch nach dieser Zeit verhielt sich diese Probe etwa wie a).

c) 10 ccm. Plasma + 10 ccm. Wasser + 2 ccm. CaCl<sub>2</sub>-Lösung von 1 % CaCl<sub>2</sub> = 0,72 % NaCl und 0,090 % CaCl<sub>2</sub> in der Versuchsflüssigkeit.

Nach 24 Stunden war keine Veränderung sichtbar und erst nach 5 Tagen enthielt diese Probe ein kleines lockeres Coagel.

Auch in diesem Versuche blieb der als Controle dienende Theil des Plasmas sowohl direct wie nach Verdünnung mit Wasser zu 0.72 NaCl tagelang flüssig ohne die Spur einer Gerinnung.

Zu in der Hauptsache ähnlichen Resultaten wie in den hier als Beispiele mitgetheilten Versuchen haben sämmtliche von mir mit entkalktem Plasma und entkalktem Serum angestellte Versuche geführt. Vorausgesetzt, dass ich nicht mit gar zu fermentarmem Serum arbeitete, ist es mir nämlich ohne Ausnahme stets gelungen in einem Gemenge von entkalktem Plasma und entkalktem Serum eine reichliche, ganz typische Fibrinbildung zu erhalten und, wie der Leser unten finden wird, habe ich auch behufs der Aschenanalyse grosse Mengen von Fibrin aus solchen Gemengen dargestellt. Zu ähnlichen Resultaten führten auch meine Versuche mit entkalktem Plasma und Lösungen von aus entkalktem Serum gefälltem fermenthaltigem Globulin, wie auch die Versuche mit den aus dialysirtem Plasma und Serum ausgeschiedenen, abfiltrirten und in Wasser mit Hülfe von reinem NaCl gelösten Globulinen. Da diese Versuche indessen von keinem besonderen Interesse sind und da ich in diesem Aufsätze auch andere Beweise für die Entbehrlichkeit der löslichen Kalksalze bei der Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin liefern werde, dürfte es wohl nicht nothwendig sein, einige dieser Versuche als besondere Beispiele hier anzuführen.

Als hauptsächliches Resultat dieser Versuche mit entkalktem Plasma und entkalktem Serum findet man also in erster Linie die Thatsache, dass auch bei Abwesenheit von fällbarem Kalksalz eine ganz typische Fibrinbildung stattfinden kann. Und es handelt sich, wie die Versuche lehren, hierbei nicht um eine spärliche und geringfügige Fibrinbildung, sondern um eine massenhafte, wobei die Flüssigkeit wiederholt zu einem festen Kuchen geseht. Ich kann also der Theorie von Arthus gar nicht beitreten, und in diesem Punkte — d. h. mit Rücksicht auf die Entbehrlichkeit des fällbaren Kalkes für die Umwandlung des Fibrinogens in

Fibrin — stelle ich mich unbedingt auf die Seite von Alex. Schmidt, aber auch nur in diesem Punkte. Die Angabe von Arthus, dass die Kalksalze in spezifischer Weise bei der Gerinnung des Blutes oder Plasmas betheiligt sind, ist nämlich weder durch meine Versuche noch durch die Arbeit von Alex. Schmidt widerlegt, wenn man auch die Wirkungsweise der Kalksalze in anderer als der von Arthus versuchten Weise erklären muss.

In dem Punkte, dass die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin durch das sog. Fibrinferment auch bei Abwesenheit von fällbarem Kalksalz geschehen kann, befinde ich mich in Uebereinstimmung nicht nur mit Alex. Schmidt, sondern auch mit Pikelharing. In dieser Hinsicht erlaube ich mir aus dem Aufsätze von Pikelharing (Virchow-Festschrift, Bd. I, S. 13) den folgenden Passus anzuführen: « Wird zu Oxalatplasma, das noch freies Kaliumoxalat enthält, Fibrinferment gefügt, dann gerinnt es, und dann kann imr ausgepressten Serum durch Hinzufügung eines Kalksalzes das Vorhandensein von gelöstem Oxalat noch nachgewiesen werden. » In einer solchen Flüssigkeit kann natürlich nicht von der Anwesenheit von fällbarem Kalksalz die Rede sein, und trotzdem findet die Gerinnung statt. Nach diesen übereinstimmenden Beobachtungen von Pikelharing, Alex. Schmidt und mir ist es wohl nicht mehr möglich daran zu zweifeln, dass, entgegen der Ansicht von Arthus, eine Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin durch das Fibrinferment auch bei Abwesenheit von löslichem oder richtiger durch Oxalat fällbarem Kalksalz möglich ist. Ich werde unten auch zeigen, dass die Beobachtungen von Arthus zu der von ihm gezogenen, entgegengesetzten Schlussfolgerung weder nöthigen noch berechtigen.

In seiner späteren, gegen die Einwendungen von Alex. Schmidt gerichteten Publikation hat Arthus<sup>1)</sup> über Versuchsreihen berichtet, in denen er die von Schmidt be-

<sup>1)</sup> La Coagulation du sang et les sels de chaux. Archives de Physiologie (Bd. V). Tom. 8.

hauptete Fähigkeit des Kochsalzes, das durch Dialyse von Oxalat befreite Plasma zum Gerinnen zu bringen, prüfte. Im Gegensatz zu Alex. Schmidt erhielt Arthus hierbei ohne Ausnahme negative Resultate und zu ganz demselben Ergebnisse bin ich ebenfalls gelangt, indem ich nämlich nie ein dialysirtes Oxalatplasma durch Zusatz von NaCl allein zum Gerinnen bringen konnte. Ich befinde mich in diesem Punkte in der allerbesten Uebereinstimmung mit Arthus, glaube aber die abweichenden Resultate von Alex. Schmidt in anderer Weise als Arthus erklären zu können. Arthus erklärt die Resultate Schmidt's durch die Annahme, dass der letztere mit einem nicht genügend reinen Kochsalz gearbeitet habe; aber eine solche Annahme scheint mir weder berechtigt noch nöthig zu sein. Seitdem wir nunmehr wissen, dass das Fibrinferment auch bei Abwesenheit von fällbarem Kalksalz das Fibrinogen in Fibrin umsetzt, ist die einfachste Erklärung die, dass Schmidt mit einem fermenthaltigen Oxalatplasma gearbeitet hat, während in diesen neueren Versuchen von Arthus wie in den meinigen das Oxalatplasma fermentfrei oder jedenfalls so arm an Ferment war, dass eine Gerinnung nicht zu Stande kommen konnte. Dass ein derartiges, mit NaCl allein nicht gerinnendes Plasma nach Zusatz von Kalksalz gerinnt, widerspricht nämlich einer solchen Annahme nicht, denn wenn das Oxalatplasma in Uebereinstimmung mit der Ansicht von Pekelharing ein Zymogen enthält, welches durch die Einwirkung von Kalksalz in Fibrinferment übergeht, muss natürlich auch das ursprünglich fermentfreie Plasma nach Kalkzusatz gerinnen. Woran es liegt, dass Schmidt mit fermentreichem, Pekelharing und ich dagegen mit fermentfreiem oder sehr fermentarmem Plasma gearbeitet haben, kann ich natürlich nicht sagen. Wahrscheinlich liegt es in der Art und Weise, wie man bei dem Aufsammeln des Blutes verfährt, und aus diesem Grunde habe ich schon oben bemerkt, dass ich stets mit grosser Geschwindigkeit das Blut aufsammele. Ein anderer Umstand, der vielleicht nicht ausser Acht gelassen werden darf, ist der, dass ich immer nur bei Winterkälte meine Untersuchungen über die Gerinnung aus-

geführt habe. Vielleicht liegt es auch an anderen Verhältnissen, die wir noch nicht kennen oder jedenfalls nicht beherrschen können. Wie schon oben bemerkt, gibt Arthus in seinen ersten Aufsätzen ganz bestimmt an, dass das Oxalatplasma fermenthaltig ist, während Pekelharing dagegen kein Fibrinferment in dem Oxalatplasma fand. Meine Erfahrung stimmt, wie gesagt, ganz mit der von Pekelharing überein.

Hinsichtlich der Wirkung der Oxalate hat Alex. Schmidt die Ansicht ausgesprochen, dass diese Salze theils den Gerinnungsvorgang bei Gegenwart von Fibrinferment etwas verlangsamen, theils und besonders aber die Entstehung des Fibrinfermentes verhindern. Pekelharing behauptet ebenfalls, dass die Oxalate die Entstehung des Fermentes verhindern, während sie dagegen nicht im Stande sind, das einmal gebildete Fibrinferment zu zerstören oder dessen Wirkung zu verhindern. Meine Beobachtungen, die allerdings nur auf die Wirkung des Oxalates auf die Gerinnung bei Gegenwart von Ferment und nicht auf dessen Einwirkung auf die Fermentbildung sich beziehen, stehen im besten Einklange mit den Erfahrungen der obigen Forscher. Sie zeigen nämlich, dass mässige Mengen von Alkalioxalat die Gerinnung zwar verzögern aber nicht verhindern können. Diese verzögernde Wirkung kommt in verschiedenen Versuchen in ungleich hohem Grade zur Geltung, was vielleicht in naher Beziehung zu einem verschiedenen Fermentgehalte steht. Ich habe sogar auch Fälle beobachtet, in denen bei nicht sehr hohem Oxalatgehalt (etwa 1‰) kein wesentlicher Unterschied in der Gerinnungsgeschwindigkeit der oxalathaltigen und der oxalatfreien Proben zu beobachten war. Hier wie in so vielen anderen Versuchen an Plasma kann man etwas wechselnde Resultate erhalten, und für ein exaktes Studium der Wirkung der Oxalate dürfte es nothwendig sein, mit Lösungen der isolirten, reinen Substanzen zu arbeiten. Jedenfalls steht es fest, dass diejenigen Oxalaten Mengen, die hinreichend sind, um die Gerinnung des Blutes ganz sicher zu verhindern, die Gerinnung eines nicht zu fermentarmen Plasmas nicht verhindern können.

Die wesentlichste Wirkung einer Beimengung von Oxalat zu dem Blute muss also darin bestehen, dass dieses Salz die Entstehung des Fibrinfermentes in irgend einer Weise verhindert. Nach Pekelharing wirkt das Oxalat durch Ausfällung des Kalkes, indem nach ihm das Fibrinferment nur bei Gegenwart von Kalksalz aus dem Prothrombin entstehen kann. Nach Alex. Schmidt dagegen haben die Kalksalze nichts mit der Fermentbildung zu thun, und die Oxalate sollen nach ihm ganz unabhängig von ihrer kalkfällenden Eigenschaft die Fermentbildung verhindern können. Meine Versuche sprechen ganz entschieden gegen diese letztere Ansicht. Wenn nämlich das Oxalat an und für sich die Fermentbildung im Plasma verhindert, muss diese Fermentbildung nach dem Entfernen des Oxalates durch Dialyse wieder zu Stande kommen; aber dies ist nicht der Fall. Ein Oxalatplasma, welches nicht von Anfang an fermenthaltig ist, wird durch das Entfernen des Oxalates nicht fermenthaltig, und man kann hier nicht die Annahme machen, dass das etwa gebildete Ferment durch die Dialyse zerstört worden ist, denn dies widerspricht allen Erfahrungen. Man kann ebensowenig sagen, dass das Zymogen während der Dialyse vernichtet worden, denn durch Zusatz von Kalksalz kann man in dem dialysirten Plasma eine rasche und schöne Gerinnung erhalten. Wie man nun auch diese Wirkung des Kalksalzes sich erklären will, so geht also unter allen Umständen aus diesen Verhältnissen klar hervor, dass die Oxalate, wie Arthus und wohl die meisten anderen Forscher annehmen, die Gerinnung des Blutes dadurch verhindern, dass sie die Kalksalze desselben ausfällen.

Hinsichtlich der Wirkung der Kalksalze in einer Flüssigkeit, die neben dem Fibrinogen auch Fibrinferment enthält, bestätigen die zwei ersten Versuche die an Plasma und Transsudaten wiederholt beobachtete gerinnungsbeschleunigende Wirkung solcher Salze. In dem Versuche 3 kam dagegen eine solche Wirkung nicht deutlich zum Vorschein, ein Verhalten, das später seine Erklärung finden wird und welches ein neues Beispiel liefert von den unsicheren und schwanken-

den Resultaten, die man mit einer so complicirten Versuchsflüssigkeit wie dem Blutplasma erhalten kann.

Abgesehen von diesem etwas unerwarteten Resultate von dem Zusatze eines Kalksalzes, bietet ein Vergleich der Resultate von den Versuchen 1 und 3 ein noch grösseres Interesse dadurch, dass in dem Versuche 1 ein Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  ohne besonderen Fermentzusatz eine ganz typische Gerinnung des Plasmas erzeugte, während in dem Versuche 3 nach Zusatz von  $\text{CaCl}_2$ , ebenfalls ohne Fermentzusatz, erst nach 5 Tagen eine unbedeutende Gerinnung stattgefunden hatte. In diesem Versuche hatte also das Kalksalz nur einen sehr unbedeutenden Einfluss auf die Gerinnung, und dies trotzdem der Gehalt an Kalk ( $0,0909\% \text{CaCl}_2 = 0,046\% \text{CaO}$ ) bedeutend höher als in gewöhnlichem Plasma oder Serum war. Dieser Versuch widerspricht also der gewöhnlichen Angabe, dass man einem entkalkten Plasma die Gerinnungsfähigkeit durch Zusatz von einem Kalksalz leicht und sicher wiedergeben kann, und dieser Versuch steht nicht einzeln da. Im Gegentheil würde ich über recht viele Versuche berichten können, in denen ein Zusatz von Kalksalz zu dialysirtem Oxalatplasma dieses letztere nur sehr langsam und nur in geringem Grade wieder gerinnungsfähig machte.

Aehnliche Beobachtungen hat übrigens schon Arthus<sup>1)</sup> gemacht, aber unter anderen Verhältnissen. Er hat nämlich gefunden, dass wenn man eine grössere Menge Oxalat —  $0,25$  à  $0,5\%$  — zur Verhinderung der Gerinnung verwendet und darauf das Plasma mit überschüssigem Kalksalz versetzt, die Gerinnung ausbleiben kann. Er erklärt dies durch die Annahme, dass die beim Zusatz des Kalksalzes auftretende reichliche Fällung das Fibrinferment mit niederreisst und die Gerinnung hierdurch verhindert. Es ist sogleich einleuchtend, dass eine solche Erklärung nicht für meine Versuche passen kann, denn meine Beobachtungen beziehen sich auf solches Plasma, aus welchem das Oxalat durch Dialyse vollständig oder bis auf Spuren entfernt worden ist und in welchem also

<sup>1)</sup> Recherches sur la Coagulation du sang. Theses présentées etc. Paris. 1890.

bei Zusatz von Kalksalz kein Niederschlag entsteht<sup>1)</sup>). Uebrigens enthielt das Oxalatplasma in meinen Versuchen, wie schon bemerkt, kein Fibrinferment, und es kann also von einer Ausfällung desselben nicht die Rede sein.

Ich musste also nach einer anderen Erklärung mich umsehen und ich glaube dieselbe in dem in verschiedenen Fällen wechselnden Gehalte des Plasmas an Prothrombin gefunden zu haben. Ich habe schon oben (S. 344) bemerkt, dass in dem centrifugirten Oxalatplasma beim Abkühlen desselben nach einiger Zeit ein eiweisshaltiger Niederschlag entsteht. Dieser Niederschlag enthält eine Substanz, die nicht Fibrinferment ist, die aber bei Gegenwart von Kalksalz eine mächtige Gerinnung in dem Plasma bewirkt. Diese Substanz verhält sich also wie das Prothrombin von Pikelharing, und aus diesem Grunde nenne ich sie auch der Kürze halber Prothrombin. Hiermit habe ich jedoch keine ganz bestimmte Stellung zu der Lehre von dem Prothrombin eingenommen, denn ich habe noch keine mehr eingehenden Untersuchungen über diese Substanz gemacht. Diese Lehre scheint mir auch fortgesetzter Untersuchungen sehr bedürftig zu sein, namentlich weil sie die von Schmidt behauptete Wirkung der zymoplastischen Substanzen ganz ausser Acht lässt.

Ein näheres Eingehen auf die Prothrombinfrage widerspricht übrigens dem oben angedeuteten Plane dieses Aufsatzes, und wenn ich nun trotzdem der Inconsequenz mich schuldig mache, einige Experimente mit dem Prothrombin hier mitzutheilen, dürfte dies seine Entschuldigung finden können, theils darin, dass ich sonst die Wirkung der Kalksalze in den schon mitgetheilten Versuchen nicht discutiren kann, und theils darin, dass das reichlichere oder spärlichere Vorkommen, bezw. das gänzliche Fehlen, dieser Substanz in den Versuchsflüssigkeiten einige sonst schwer zu erklärende

---

<sup>1)</sup> Dies gilt wenigstens unbedingt für solches Plasma, welches mit NaCl versetzt worden ist. In NaCl-freiem, dialysirtem Plasma kann dagegen bei Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  ein aus gefälltem Eiweiss bestehender Niederschlag auftreten.

oder scheinbar einander widersprechende Beobachtungen verschiedener Forscher zu erklären geeignet erscheint.

Um die Wirkung der als Prothrombin bezeichneten Substanz zu zeigen, führe ich als Beispiele die zwei folgenden Versuche an.

**Versuch 4.** Der im Laufe von einer Nacht in dem stark abgekühlten Plasma entstandene Niederschlag wurde durch Centrifugieren von dem Plasma getrennt, mit Wasser durch Decantation rasch gewaschen und dann mit einer 1 procentigen Lösung von reinem NaCl behandelt. Das 24 Stunden später von dem Ungelösten getrennte, völlig klare Filtrat, welches hier der Kürze halber als Prothrombinlösung bezeichnet wird, wurde zu dem Versuche verwendet. Das Oxalatplasma war gegen Wasser, welches 0,004% NaOH enthielt, bis zu vollständiger Entfernung des Oxalates dialysirt worden. Die hierbei sich ausscheidende geringfügige Globulinmenge wurde abfiltrirt.

- a) 10 cbcm. Plasma + 10 cbcm. Wasser + 0,5 cbcm. gesättigter NaCl-Lösung + 0,5 cbcm. CaCl<sub>2</sub>-Lösung von 7,2% = 0,757% NaCl und 0,171% CaCl<sub>2</sub> in der Versuchsflüssigkeit.

Nach 6 Stunden trat das erste Stadium auf und nach 9 Stunden das zweite. Das 3. Stadium trat im Laufe der Nacht auf, denn am folgenden Morgen war der Inhalt der Röhre ganz hart und fest. Im Laufe der folgenden 3 Tage traten neue Gerinnsel auf, die alle 12 Stunden herausgenommen wurden.

- b) 10 cbcm. Plasma + 9,2 cbcm. Wasser + 0,8 cbcm. Prothrombinlösung + 0,5 cbcm. gesättigter NaCl-Lösung + 0,5 cbcm. CaCl<sub>2</sub>-Lösung von 7,2% = 0,795% NaCl und 0,171% CaCl<sub>2</sub> in der Versuchsflüssigkeit.

Nach 1 St. 15 Minuten das erste, nach 1 St. 30 Min. das zweite und nach 1 St. 50 Min. das dritte Stadium. Das Gerinnsel wurde herausgenommen, aber nach 2 St. 25 Min. war der Inhalt wieder so hart und fest, dass das Gerinnsel sehr schwer zusammendrücken und herauszunehmen war. Im Laufe desselben Tages traten wieder neue Gerinnungen auf, und ebenso war im Laufe der Nacht ein wenig Faserstoff neugebildet worden. Von nun ab schien indessen die Fibrinbildung beendet zu sein, denn es traten keine weiteren Gerinnsel auf.

- c) 10 cbcm. Plasma + 9,7 cbcm. Wasser + 0,8 cbcm. Prothrombinlösung + 0,5 cbcm. gesättigter NaCl-Lösung = 0,795% NaCl und 0,0% CaCl<sub>2</sub> in der Versuchsflüssigkeit.

Im Laufe von 72 Stunden war kein Fibrin gebildet worden. Der Versuch wurde jetzt unterbrochen.

Der geringfügige Unterschied in dem NaCl-Gehalte, nämlich 0,757% in *a* und 0,795% in *b* und *c*, welcher Unter-

schied von dem Zusatze der kochsalzhaltigen Prothrombinlösung zu den zwei letztgenannten Proben herrührt, ist natürlich ohne Einwirkung auf die Versuchsergebnisse. Die drei Proben können also als ganz gleich betrachtet werden. Es zeigt sich nun, dass die sog. Prothrombinlösung einen Stoff enthält, der bei Gegenwart von Kalksalz einen sehr bemerkenswerthen Einfluss auf die Gerinnung ausübt, während er bei Abwesenheit von Kalksalz dagegen in dieser Hinsicht ganz unwirksam ist. Dass dieser Stoff nicht das Fibrinferment ist, geht aus der Probe *c* hervor, und auf dem gegenwärtigen Standpunkte der Fibrinfrage kann wohl dieser Stoff nicht anders als wie ein Prothrombin aufgefasst werden, aus dem unter dem Einflusse des Kalksalzes das Fibrinferment entstanden ist. Dass in der Probe *a* ebenfalls eine, wenn auch im Verhältniss zu derjenigen in *b* langsame Fibrinbildung ohne besonderen Fermentzusatz zu Stande kam, erklärt sich leicht dadurch, dass das zu dem Versuche verwendete Plasma nicht ganz frei von Prothrombin war, welches unter dem Einflusse des zugesetzten Kalksalzes Fibrinferment lieferte.

Der folgende Versuch zeigt ebenfalls in schlagender Weise die Fähigkeit der Kalksalze, bei Gegenwart von Prothrombin eine Gerinnung zu erzeugen.

Versuch 5. Das Oxalatplasma war nach der Abkühlung und darauffolgendem Centrifugiren nicht frei von Prothrombin. Es wurde mit dem gleichen Volumen destillirten Wassers verdünnt und blieb bis zum folgenden Tage stehen. Der neue Niederschlag, der prothrombinhaltig war, wurde durch Centrifugiren von der Flüssigkeit getrennt, mit Wasser gewaschen und mit einer NaCl-Lösung von 1% behandelt. Der ziemlich bedeutende, ungelöste Theil wurde abfiltrirt und das Filtrat als Prothrombinlösung verwendet.

In diesem Versuche wurde das Plasma nicht dialysirt, sondern es wurde einfach das obige, mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnte, centrifugirte und filtrirte Plasma (dessen Gehalt an Oxalat also etwa 0,125% war) verwendet. Dies geschah, um die Wirkung der Kalksalze auf ein oxalathaltiges Plasma wie in den Versuchen von Arthus zu prüfen. In diesem Versuche wurde auch mehr  $\text{CaCl}_2$  als sonst zugesetzt, und die hierbei entstehende Fällung von Calciumoxalat störte in keiner Weise den Versuch. Dass  $\text{CaCl}_2$  in der That in den Proben im Ueberschuss vorhanden war, wurde durch besondere Prüfung festgestellt, geht aber auch aus einer einfachen Berechnung hervor.

a) 20 ccm. Plasma + 9,6 ccm. Wasser + 0,4 ccm.  $\text{CaCl}_2$  von 18%  
= einem Zusatz von 0,26%  $\text{CaCl}_2$  zu der Versuchsflüssigkeit.

Erst nach 22 Stunden waren einzelne feinfaserige Flöckchen zu sehen. In den nächsten 12 Stunden vermehrten sich diese ein wenig und vielleicht noch ein wenig im Laufe der nächsten 12 Stunden. Eine ganz unzweifelhafte und typische Fibrinbildung fand jedoch innerhalb 60 Stunden nicht statt. Nach dieser Zeit wurde der Versuch unterbrochen.

b) 20 ccm. Plasma + 2 ccm. Prothrombinlösung + 7,6 ccm. Wasser + 0,4 ccm.  $\text{CaCl}_2$ -Lösung von 18% = einem Zusatz von 0,26%  $\text{CaCl}_2$  zu der Versuchsflüssigkeit.

Innerhalb 35 Minuten war der Inhalt der Röhre so hart und fest geronnen, dass das Coagel nicht als Ganzes zusammengepresst, sondern nur zerstückelt werden konnte. Das Gerinnsel war ebenso fest wie je in einem vollständig geronnenen Plasma, und in dem von dem Faserstoffe getrennten Serum war keine Fibrinbildung mehr zu sehen. Der ganze Gerinnungsvorgang war also wie in einem typischen Plasma auf eine kurze Zeit zusammengedrängt worden.

c) 20 ccm. Plasma + 2 ccm. Prothrombinlösung + 8 ccm. Wasser.

Innerhalb 60 Stunden keine Spur einer Fibrinbildung. Der Versuch wurde jetzt unterbrochen.

Dass es in diesem Versuche nicht um ein im Plasma präformiertes Ferment sich gehandelt hat, welches erst durch Zusatz von Kalksalz zur Wirkung kam, ist offenbar; denn sonst wird die Nichtgerinnung oder sehr schlechte Gerinnung der Probe *a* unverständlich. Die Probe *c* zeigt, dass mit der sog. Prothrombinsubstanz nicht das fertige Ferment der Versuchsflüssigkeit zugeführt wurde, denn in dem Falle würde auch diese Probe geronnen sein. Es muss also in der sog. Prothrombinlösung ein Stoff vorhanden gewesen sein, der nicht selbst Ferment ist und der bei Gegenwart von Kalksalzen, aber nicht ohne solche, die Gerinnung hervorruft. Auf dem gegenwärtigen Standpunkte der Fibrinfrage würde wohl ein solcher Stoff allgemein als Prothrombin bezeichnet werden, und es dürfte deshalb auch berechtigt sein, wenn ich diesen Stoff der Kürze halber auch Prothrombin nenne.

Nachdem ich die zwei letzten Versuche mitgeteilt habe, kann ich zu der Besprechung der Wirkungsweise des Kalkes in meinen obigen Versuchen zurückkehren.

Dass die Kalksalze nicht, wie Schmidt angenommen hatte, qualitativ in derselben Weise wie das Kochsalz wirken,

geht aus den zwei letzten Versuchen zur vollen Evidenz hervor; und diese Versuche bestätigen also die Ansicht von Arthus und Anderen, dass die Kalksalze in mehr specifischer Weise bei der Gerinnung betheiligte sind.

Die von Arthus für die Wirkungsweise der Kalksalze gemachte Annahme, dass die Einwirkung des Fibrinfermentes auf das Fibrinogen nur bei Gegenwart von Kalksalz möglich ist, hat sich als unrichtig erwiesen. Durch die Einwirkung der Kalksalze auf das Prothrombin lassen sich dagegen nicht nur mehrere einander widersprechende Beobachtungen, sondern auch mehrere der von Arthus gemachten Beobachtungen erklären.

Die fundamentale Thatsache, dass ein Oxalatplasma nach Zusatz von löslichem Kalksalz regelmässig gerinnt, und dies gleichgiltig, ob es, wie in den Versuchen von Alex. Schmidt und zum Theil in denjenigen von Arthus fermenthaltig oder, wie in den Versuchen von Pekelharing und mir, fermentfrei ist, erklärt sich leicht durch den Gehalt des Plasmas an Prothrombin, aus welchem nach Zusatz von Kalksalz das Ferment entsteht.

Dass das Oxalatplasma in meinen Versuchen verhältnissmässig oft nach Zusatz von Kalksalz nur schwach oder langsam, in einzelnen Fällen sogar fast gar nicht gerann, während andere Forscher regelmässig eine sehr prompte und rasche Gerinnung nach Zusatz von Kalksalz beobachteten, erklärt sich leicht daraus, dass ich in meinen Versuchen das Prothrombin mehr oder weniger vollständig aus dem Plasma entfernt hatte. In dem einen Falle gelang dies besser als in dem anderen infolge von Verhältnissen, die ich noch nicht kenne, aus welchem Grunde ich auch noch keine Methode zu vollständigem und sicherem Entfernen des Prothrombins aus dem Plasma angeben kann. Aus dem oben Gesagten wie aus den eben mitgetheilten Versuchen folgt aber, dass die Wirkung eines Kalksalzes auf das Plasma in dem Maasse schwächer sein muss, wie der Gehalt an Prothrombin kleiner ist.

Die so oft constatirte gerinnungsbeschleunigende Wirkung der Kalksalze kann ebenfalls in naher Beziehung zu dem

Gehalte des Plasmas oder eines Transsudates an Prothrombin stehen, denn in dem Maasse wie dieser Gehalt grösser ist, muss unter dem Einflusse des zugesetzten Kalkes eine grössere Fermentmenge gebildet und infolge hiervon die Gerinnung beschleunigt werden. In dieser Weise erklärt sich auch der obige Versuch Nr. 3, welcher der gewöhnlichen Erfahrung insofern widerspricht, als in diesem Versuche der Zusatz von Kalksalz keine gerinnungsbeschleunigende Wirkung erzeugte. In diesem Versuche enthielt nämlich das Plasma, wie die Probe c zeigte, fast gar kein Prothrombin, und es konnte folglich der Zusatz von Kalksalz keine Fermentbildung hervorrufen. Diese indirekte Wirkung der Kalksalze auf die Geschwindigkeit der Gerinnung zeigt wiederum, wie schwierig es ist, aus den an Plasma oder Transsudaten gewonnenen Resultaten ganz sichere Schlüsse zu ziehen. Die Frage, ob oder in wie weit die Kalksalze auf den Gerinnungsvorgang selbst, d. h. auf die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin durch das Fibrinferment beschleunigend einwirken, kann also nur durch Versuche mit den isolirten reinen Substanzen entschieden werden.

Hält man an der Thatsache fest, dass in dem Plasma eine Substanz (Prothrombin) enthalten ist, die selbst nicht wie Fibrinferment wirkt, die aber bei Gegenwart von Kalksalz eine kräftige Gerinnung bewirkt, so wird man leicht finden, dass viele der von Arthus und Pagès oder von Arthus allein mitgetheilten Versuche an Blutplasma keine ganz sicheren Schlüsse über die Wirkungsweise der Kalksalze ermöglichen. Diese Versuche zeigen nämlich nur, dass die Kalksalze in spezifischer Weise bei der Gerinnung betheiligte sind; ob die letzteren aber auf die fermentative Umwandlung des Fibrinogens oder auf das Prothrombin eingewirkt haben, das lässt sich in vielen Fällen infolge der gewählten Versuchsanordnung nicht ermitteln.

Dagegen gibt es mehrere Beobachtungen, die, wie es auf den ersten Blick scheint, mehr bestimmt für die Richtigkeit der Theorie von Arthus sprechen, und auf diese Beobachtungen muss ich hier ein wenig eingehen, bevor ich diesen Abschnitt (über die Versuche an Blutplasma) verlasse.

Eine solche Beobachtung ist die, dass in vielen Fällen ein Oxalatplasma, trotzdem es Ferment enthält, erst nach Zusatz von Kalksalz gerinnt. Diese Beobachtung beweist aber nicht, dass die Gegenwart von Kalksalz etwas für die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin durch das Ferment nothwendiges ist. Das Ausbleiben der Gerinnung kann nämlich sehr wohl daher rühren, dass der Fermentgehalt des Plasmas zu gering war, um den Widerstand des Oxalates zu überwinden. Nach Zusatz von Kalksalz werden nun aus dem Prothrombin neue Fermentmengen gebildet und das Eintreten der Gerinnung wird also ermöglicht. Für diese Auffassung spricht meine Erfahrung, dass ein fermentfreies Oxalatplasma<sup>1)</sup>, wenn man es mit einer kleinen Fermentmenge versetzt, tagelang flüssig bleiben kann, während es nach Zusatz von einer grösseren Fermentmenge dagegen ziemlich rasch gerinnt.

Hier könnte man vielleicht geneigt sein, die Einwendung zu machen, dass nach Arthus schon einige Tropfen eines Oxalatblutes genügen, um in einem Transsudate eine Gerinnung zu erzeugen, was gewiss nicht für die Fermentarmuth des fraglichen Blutes spricht. Hier ist aber zu bedenken, dass selbst wenn das Oxalatblut absolut fermentfrei gewesen wäre, es immer Prothrombin enthält, aus welchem in dem kalkhaltigen Transsudate Fibrinferment entstehen muss. Diese Einwendung ist also hinfällig.

Eine andere Beobachtung von Arthus, die leicht in der Weise gedeutet werden könnte, dass die Kalksalze nur für die fermentative Umwandlung des Fibrinogens von Bedeutung seien, ist die, dass, wenn man eine grössere Menge Oxalat, etwa 0,5 %, verwendet, ein Zusatz von überschüssigem Kalksalz keine Gerinnung des Plasmas bewirkt. Arthus erklärt dies durch die Annahme, dass der hierbei entstehende gelatinöse Niederschlag das Fibrinferment vollständig mit niederreisst. Schon die gelatinöse Beschaffenheit des Niederschlages zeigt, dass er zum grossen Theil aus etwas anderem

<sup>1)</sup> Ein « fermentfreies » Oxalatplasma ist allerdings nicht immer ganz frei von Fibrinferment, wenn es aber nur gar nicht in Betracht kommende Fermentmengen enthält, nenne ich es der Kürze halber fermentfrei.

als Calciumoxalat und niedergedrissenem Fibrinferment bestehen muss. Dem ist auch so, denn der Niederschlag enthält auch das Prothrombin. Einen solchen Niederschlag kann man übrigens, wie ich vielleicht ein anderes Mal näher zeigen werde, unter geeigneten Verhältnissen durch Zusatz von Kalksalz zu dem Plasma auch bei Abwesenheit von Alkalioxalat erhalten, und ich bin sogar mit Untersuchungen darüber beschäftigt, ob nicht in dieser Weise das Prothrombin sicher und vollständig aus dem Plasma zu entfernen ist. Wenn aber das Prothrombin bei der obigen Versuchsanordnung von Arthus ausgefällt wird, so ist es leicht verständlich, wenn ein Zusatz von Kalksalz ohne Wirkung bleibt. Auch diese Versuchsanordnung beweist also nichts zu Gunsten der Theorie von Arthus.

Der wichtigste Beweis für die Unwirksamkeit des Fibrinfermentes bei Abwesenheit von Kalksalzen würde wohl der sein, dass nach Arthus Zusatz von Fibrinferment zu Oxalatblut keine Gerinnung desselben bewirkt. Die Beweiskraft der hierher gehörenden Versuche von Arthus kann man indessen nicht beurtheilen, da er nämlich keine genügend detaillirten Versuche mitgetheilt hat. Man weiss also weder wie viel Fermentlösung zugesetzt worden ist, noch wie kräftig die Lösung wirkte, noch wie lange die Beobachtungen fortgesetzt wurden. Da sein Versuchsergebniss, wenn eine zu geringe Menge Fermentlösung zugesetzt wurde oder die Beobachtungszeit nicht eine hinreichend lange war, ganz ohne Beweiskraft ist, so dürfte wohl diese Beobachtung von Arthus kaum schwer ins Gewicht fallen gegenüber den entgegengesetzten, übereinstimmenden Beobachtungen von Pekelharing, Alex. Schmidt und mir.

Als eine wichtige Stütze für die Theorie von Arthus könnte man ferner die Beobachtung anführen, dass nach Arthus die Menge des ausgeschiedenen Fibrins wenigstens bis zu einer gewissen Grenze von der Menge des zugesetzten Kalksalzes abhängig ist. Dem gegenüber ist indessen zu bemerken, dass Alex. Schmidt zu ganz entgegengesetzten Resultaten gelangt ist, indem er in Versuchen an dialysirtem

Oxalatplasma keine Vermehrung der Faserstoffmenge in der mit Kalksalz versetzten Probe fand. Noch auffallender ist es, dass er in einem und demselben dialysirten Oxalatplasma fast ganz dieselbe Fibrinmenge in einer Probe, die mit 0,2% NaCl, wie in einer anderen, die mit 0,2% CaCl<sub>2</sub> versetzt worden war, erhielt. Da niemand daran zweifeln kann, dass die einander widersprechenden Beobachtungen der beiden Forscher richtig sind, zeigt dies wiederum, wie unsicher und schwankend die am Blutplasma erhaltenen Resultate sein können. Die Frage, ob und in wie weit die Kalksalze die Menge des gebildeten Fibrins beeinflussen, kann nach meiner Ansicht nur durch Versuche mit den isolirten reinen Substanzen erledigt werden. Aus diesem Grunde habe ich auch noch keine solche ganz exacte Versuche angestellt; sicher ist es indessen, dass man bisweilen in entkalkten Flüssigkeiten ebenso reichliche und massenhafte Gerinnungen wie in den entsprechenden kalkhaltigen Lösungen erhalten kann. Dass die Verhältnisse in dem Blutplasma mehr complizirt als in den reinen Lösungen sind, dürfte übrigens nicht zu bezweifeln sein. Wenn, was nicht unwahrscheinlich ist, die Menge des aus dem Prothrombin entstandenen Fermentes innerhalb gewisser Grenzen mit der Menge des zugesetzten Kalkes wächst, können hieraus vielleicht auch Einflüsse auf die Fibrinmenge entstehen, die wir noch nicht klar beurtheilen können. Jedenfalls findet man aus dem Gesagten, dass auch die Beobachtungen über die Einwirkung der Kalksalze auf die Menge des Fibrins nicht als Stütze für die Theorie von Arthus verwerthet werden können.

Andere Beobachtungen am Plasma (die Beobachtungen von Arthus an Fibrinogenlösungen werde ich in dem folgenden Abschnitte besprechen), die in demselben Sinne verwerthet werden könnten, habe ich in den Aufsätzen von Arthus nicht gefunden. Ich kenne also keine Beobachtung an Blut, Plasma oder Transsudaten, die mit den von Pekelharing, Schmidt und mir gemachten Erfahrungen über die Wirksamkeit des Fibrinfermentes auf das Fibrinogen bei Abwesenheit von fällbarem Kalksalz nicht zu vereinbaren ist. Unter solchen Um-

ständen kann ich zu den Untersuchungen an Fibrinogenlösungen übergehen.

### Versuche mit Fibrinogenlösungen.

Nachdem in dem vorigen Abschnitte schon mehrere Versuche mitgetheilt worden sind, die zeigen, dass entkalktes Plasma mit entkalktem Serum eine typische und reichliche Fibrinbildung gibt, dürfte es wohl genügend sein, nur einen Versuch mit kalkfreier Fibrinogenlösung anzuführen, indem nämlich alle mit Fibrinogenlösung ausgeführten Versuche zu übereinstimmenden Resultaten geführt haben.

Versuch 6. Die nach dem neuen Verfahren gewonnene Fibrinogenlösung wurde, zur Entfernung des Kochsalzes, zwei Tage bei nahe an 0° C. gegen häufig gewechseltes Wasser dialysirt, welches 0,004 % KOH enthielt. Diese Lösung enthielt dann 0,90 % Fibrinogen. Als Fermentlösung wurde dialysirtes Oxalatserum verwendet. Da dialysirtes Serum mit einer salzfreien Fibrinogenlösung eine sehr reichliche Fällung gibt (bezüglich deren Natur ich noch nicht im Klaren bin) und da das Versuchsergebniss hierdurch leicht etwas zweideutig werden könnte, versetzte ich erst das dialysirte Serum mit reinem NaCl bis zu 1,2 % wodurch das Auftreten des Niederschlages verhindert wurde — und mischte erst dann gleiche Volumina von dem Plasma und dem Serum mit einander. Das Gemenge enthielt also 0,6 % NaCl.

Nach 1 Stunde trat das erste, nach 3 Stunden das zweite und nach 5 Stunden das dritte Stadium auf. Der Inhalt der Röhre war jetzt so fest und hart wie je ein vollständig geronnenes Plasma.

Ein anderer Theil derselben, mit Serum nicht vermischten Fibrinogenlösung wurde mit NaCl bis zu 0,6 % versetzt und dann in zwei gleich grosse Portionen getheilt. Die eine Portion wurde mit 0,2 % CaCl<sub>2</sub> versetzt, die andere nicht. Beide Proben liess ich fast eine Woche bei Zimmertemperatur stehen. Es trat in keiner die Spur einer Gerinnung auf.

Ich finde es, wie oben gesagt, nicht nöthig, mehrere mit Fibrinogenlösung nach diesem Muster ausgeführte Versuche hier anzuführen. Die Hauptsache, dass auch Fibrinogenlösungen bei Abwesenheit von fällbaren Kalksalzen ebenso gut wie bei Gegenwart von solchen gerinnen, wird nämlich in schlagendster Weise aus den bald anzuführenden, nach einem ganz anderen Plane ausgeführten Versuchen hervorgehen. Ich will statt dessen hier nur daran erinnern, dass Pekkelharing vor mir zu ähnlichen Resultaten gelangt ist. In einer vor

nicht sehr langer Zeit erschienenen Mittheilung<sup>1)</sup> hebt er nämlich gegen die Theorie von Liliensfeld ausdrücklich hervor, dass das Fibrinferment auch bei Anwesenheit von freiem Kalium- oder Ammoniumoxalat Fibrinogenlösungen zum Gerinnen bringt.

Zu anderen Resultaten kam Arthus bei seinen Untersuchungen. Er fand, dass eine, mit einem kleinen Ueberschuss von Oxalat versetzte Fibrinogenlösung nach Zusatz von einer Schmidt'schen Fermentlösung nicht gerann. Dieselbe Fibrinogenlösung wurde dagegen nach Zusatz von einem Calcium- oder Strontiumsalz wieder gerinnungsfähig. Die Beweiskraft dieses Versuches lässt sich nicht beurtheilen, da alle Detailangaben fehlen. Der Widerspruch gegen seine Resultate und diejenigen von Pikelharing und mir lässt sich jedoch sehr leicht durch die Annahme erklären, dass die Fermentmenge eine zur Ueberwindung des hemmenden Einflusses des Oxalates ungenügende war und dass die Gerinnung folglich erst nach dem Entfernen des Oxalates durch Zusatz von einem Kalksalz wieder möglich würde. Diese Versuche von Arthus können jedenfalls nicht den Werth der von Pikelharing und mir wiederholt gemachten entgegengesetzten positiven Erfahrungen entkräftigen, denn wenn man nur hinreichend viel Ferment zusetzt, bleibt die Gerinnung in einem entkalkten Gemenge von Fibrinogen und Fermentlösung, selbst wenn dieses Gemenge ein wenig überschüssiges Oxalat enthält, niemals aus.

Dass die Gegenwart von löslichem, mit Oxalat fällbarem Kalksalz gar kein nothwendiges Bedingniss für die fermentative Umwandlung des Fibrinogens ist, lässt sich indessen noch schöner in anderer Weise durch Versuche mit Fibrinogen zeigen. Zu dem Ende habe ich das schon oben (S. 353) angedeutete Verfahren, welches in dem Ausfällen des Fibrinogens mit Essigsäure besteht, verwendet. Dieses Verfahren steht in schroffem Widerspruch zu der Angabe von Liliensfeld über das Verhalten des Fibrinogens zu Essigsäure, und da

<sup>1)</sup> Centralblatt für Physiologie, 1895, Heft 3.

die Versuche dieses Forschers ganz entschieden für die Nothwendigkeit der Kalksalze bei dem Gerinnungsvorgange sprechen, muss ich jetzt auf diese Versuche von Liliensfeld des Näheren eingehen.

Nach Liliensfeld<sup>1)</sup> soll das Fibrinogen, wenn man zu seiner Lösung Essigsäure setzt, in zwei neue Substanzen, Thrombosin und Albumosesubstanz sich spalten, von denen jene sich ausscheidet. Löst man das Thrombosin in Wasser mit Hilfe von möglichst wenig Alkali, so erhält man eine Lösung, die durch Zusatz von einem löslichen Kalksalz gefällt wird. Der Niederschlag wird nach kurzer Zeit ebenso unlöslich wie Fibrin, und das letztere ist nach Liliensfeld die Kalkverbindung des Thrombosins.

Diese Angabe von Liliensfeld fand ich sehr auffallend. Es ist nämlich schon seit lange bekannt, dass man aus Plasma oder Transsudaten das Fibrinogen ebenso wie das Paraglobulin durch Ausfällung mit Essigsäure darstellen kann; wie wäre dies aber möglich, wenn das Fibrinogen durch die Essigsäure in Thrombosin und Albumosesubstanz gespalten würde? Da ich nun wusste, dass man das Fibrinogen mit unveränderten Eigenschaften auch aus einer sog. reinen Fibrinogenlösung mit Essigsäure ausfällen kann, fand ich es nothwendig, da ich selbstverständlich die Richtigkeit der Beobachtungen von Liliensfeld nicht im Geringsten bezweifelte, diesen Widerspruch wenn möglich aufzuklären. Dies war umsomehr nothwendig, als die Beobachtungen von Liliensfeld von Frederikse<sup>2)</sup> bestätigt worden sind.

Zu dem Ende habe ich die Versuche von Liliensfeld wiederholt und dabei wich ich nur in folgendem Punkte von seinem Verfahren ab. Liliensfeld schlägt das Fibrinogen direct aus der Fibrinogenlösung mit Essigsäure nieder. Dies habe ich auch in vielen Fällen gemacht, um mich davon zu überzeugen, dass die Resultate (vorsichtige Arbeit vorausgesetzt) nach diesem Verfahren dieselben wie nach der von mir verwendeten Modification sind. In den meisten Fällen

<sup>1)</sup> L. c.

<sup>2)</sup> Zeitschrift f. physiol. Chem., Bd. 19.

habe ich aber die kleine Abänderung gemacht, dass ich die Fibrinogenlösung vor dem Essigsäurezusatz durch Dialyse gegen alkalihaltiges Wasser (vergl. oben S. 352) von dem Kochsalze befreite. Ich machte diese Abänderung aus folgendem Grunde. Wenn man das Fibrinogen aus der kochsalzhaltigen Lösung mit Essigsäure fällt, enthält der Niederschlag, ganz so wie viele andere Eiweissniederschläge, die man mit Säure in einer salzhaltigen Lösung erzeugt, eine Verbindung von Eiweiss mit der Säure. Versucht man diesen Niederschlag sogleich, nachdem er sich abgesetzt hat, mit Wasser zu waschen, so löst sich ein grösserer Theil desselben zu einer sauer reagirenden Flüssigkeit, aus der man das Fibrinogen durch Zusatz von sehr wenig Alkali wieder wenigstens zum Theil ausscheiden kann. Lässt man dagegen das Fibrinogen einige Zeit ausgefällt stehen, so kann man es zwar leichter ohne Verluste auswaschen, aber man läuft hierbei die Gefahr, dass das leicht veränderliche Fibrinogen sich verändert und schwerlöslich oder sogar zum Theil unlöslich wird. In den Fällen, wo ich das Fibrinogen aus der salzhaltigen Lösung mit Essigsäure fällte, habe ich deshalb auch trotz der hierbei stattfindenden grossen Verluste das Fibrinogen möglichst bald nach dem Ausfällen rasch mit Wasser gewaschen und dann mit Hilfe von möglichst wenig Alkali gelöst. Da es indessen hierbei kaum möglich ist, das Fibrinogen genau zu waschen, habe ich, wie oben gesagt, das Fibrinogen in den meisten Fällen aus der dialysirten Lösung gefällt.

Wenn man aus salzfreier, dialysirter Lösung das Fibrinogen mit Essigsäure fällt, so muss die Säure sehr vorsichtig zugesetzt werden, weil das Fibrinogen ausserordentlich leicht von einem Ueberschuss der Säure gelöst wird. Das Fibrinogen scheidet sich erst feinflockig aus; der Niederschlag setzt sich aber bald als zähe, klebrige Massen an den Boden wie an die Wand des Gefässes ab. Das Fibrinogen wusch ich rasch mit Wasser und löste es dann mit Hilfe von einer Lauge, die N/200 war, in Wasser auf. Bei genügender Vorsicht kann man in dieser Weise allmählig das Fibrinogen im Wasser zu einer neutral

reagirenden Flüssigkeit lösen, in der keine Spur von Kalksalz nachzuweisen ist. In dieser Weise habe ich in den allermeisten Fällen die Lösungen von mit Essigsäure gefälltem Fibrinogen gewonnen.

Nimmt man nun eine derartige kalkfreie Lösung von Fibrinogen und mischt zu ihr eine passende Menge, z. B.  $\frac{1}{4}$ , oder  $\frac{1}{2}$  Volumen, einer mit reinem NaCl bereiteten Lösung von aus entkalktem Serum gefälltem und gereinigtem fermenthaltigem Serumglobulin, so tritt die Gerinnung gewöhnlich nach 15–30 Minuten ein und nach 30–45 Minuten ist der Inhalt des Becherglases so fest geronnen wie je ein normales Blutplasma. In den ersten  $1\frac{1}{2}$ –2 Stunden treten wiederholt neue feste Gerinnsel auf, und die Gerinnung ist nach dieser Zeit oft so weit beendet, dass dann nur spärliche Gerinnsel mit langen Zwischenzeiten auftreten. Das Fibrin ist ganz typisch und unterscheidet sich gar nicht von dem, welches man aus geronnenem Plasma erhält. Ich finde es nicht nöthig, dies durch einen besonderen Versuch zu zeigen, denn diese Versuche gelingen ohne Ausnahme sehr schön; und da ich einen grossen Theil des unten erwähnten Fibrins, dessen Kalkgehalt ich bestimmte, nach dieser Methode gewonnen habe, dürfte dies ein genügender Beleg für das eben Gesagte sein.

Es steht also fest, und hiervon kann Jedermann, der vorsichtig arbeitet, sich leicht überzeugen, dass man durch Fällung von einer Fibrinogenlösung mit Essigsäure unverändertes Fibrinogen erhalten kann, welches ohne Zusatz von irgend einem Kalksalz mit dem Fibrinfermente reichlich und typisch gerinnt. Hierin liegt also wiederum ein schlagender Beweis gegen die Angabe, dass die Umwandlung des Fibrinogens durch das Fibrinferment nur bei Gegenwart von fällbarem Kalksalz möglich ist. Gleichzeitig stehen aber diese Versuche in schroffem Gegensatz zu der Theorie wie zu den Beobachtungen von Lilienfeld. Nach ihm soll nämlich zwar die Spaltung des Fibrinogens ohne Gegenwart von Kalksalz möglich sein, dagegen sind die Kalksalze nach ihm für die Ausfällung des Thrombosins, d. h. also für die Gerinnung selbst, nothwendig. Dass diese Theorie nicht richtig sein

kann, geht aus den zuletzt angeführten Versuchen zur Evidenz hervor. Die Unrichtigkeit derselben ist übrigens schon vorher von Pekelharing gezeigt worden, und sie folgt ebenfalls aus den oben von mir mitgetheilten Versuchen mit entkalktem Plasma und entkalktem Serum.

Wie soll man nun aber diesen schroffen Widerspruch erklären? Dies ist nicht schwer. Aus den ganz richtigen Beobachtungen hat Liliensfeld einen unrichtigen Schluss gezogen, und dies, weil er die nöthigen Controlversuche nicht in richtiger Weise angestellt hat. Liliensfeld hat mit seinen, nach meiner alten Methode dargestellten Fibrinogenlösungen, die also kochsalzhaltig sind, gearbeitet; und diese Lösungen wurden durch Zusatz von Kalksalz nicht gefällt. Da nun die aus solchen Lösungen mit Essigsäure gefällte, mit Wasser gewaschene Substanz in Wasser, mit möglichst wenig Soda gelöst, eine durch Kalksalz fällbare Lösung gab, so lag gewiss die Annahme nahe zur Hand, dass der Essigsäureniederschlag etwas anderes als Fibrinogen sei. Hier fehlt indessen der nothwendige Controlversuch, denn die sog. Thrombosinlösung ist frei von NaCl; die ursprüngliche Fibrinogenlösung ist dagegen NaCl-haltig. Es musste also eine NaCl-freie Fibrinogenlösung mit der Thrombosinlösung bezüglich der Einwirkung von Kalksalzen verglichen werden, aber einen solchen vergleichenden Versuch hat Liliensfeld nicht gemacht. Aus diesem Grunde hat er auch die sehr wichtige Thatsache übersehen, dass eine kochsalzfreie oder kochsalzarme Fibrinogenlösung ganz in derselben Weise wie eine sog. Thrombosinlösung zu löslichem Kalksalz sich verhält.

Man kann dies in der allereinfachsten Weise zeigen. Wenn man eine Fibrinogenlösung durch rasche Dialyse gegen möglichst schwach alkalihaltiges Wasser von dem NaCl vollständig oder fast vollständig befreit, so giebt diese Lösung mit einer verdünnten  $\text{CaCl}_2$ -Lösung eine reichliche Fällung, die, wenn sie nicht augenblicklich entsteht und deshalb sogleich als flockige Massen auftritt, ganz das Aussehen eines Fibringerinnsels annehmen kann. Dieser Niederschlag wird nach kurzer Zeit unlöslich und verhält sich wie Faserstoff.

Diese Lösung verhält sich also wie eine Thrombosinlösung. Setzt man nun zu einer anderen Portion derselben dialysirten Fibrinogenlösung NaCl bis zu etwa 1% hinzu und fügt dann ebensoviel CaCl<sub>2</sub> wie in der ersten Probe hinzu, so bleibt diese Flüssigkeit klar und das NaCl hindert also die Ausfällung der Fibrinogenkalkverbindung.

Nun kann man auch den entsprechenden Versuch mit einer Thrombosinlösung machen. Man theilt dieselbe in zwei Proben, von denen die eine mit NaCl-Lösung bis zu 1% und die andere mit der entsprechenden Menge Wasser versetzt wird. Fügt man nun zu den zwei Proben dieselbe Menge CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzu, so verhält sich die kochsalzfreie Thrombosinlösung wie gewöhnlich, die kochsalzhaltige wird dagegen im Laufe von vielen Tagen nicht gefällt. Die Kalkverbindung des Fibrinogens ist also, gleichgültig ob man das Fibrinogen mit Essigsäure ausgefällt hat oder nicht, in Kochsalz leicht löslich und sie ist sogar unter Umständen löslich in einem Ueberschuss von CaCl<sub>2</sub>. Setzt man die CaCl<sub>2</sub>-Lösung in geringer Menge einer dialysirten Fibrinogenlösung hinzu, so wird die entstandene Fibrinogenkalkfällung fast sogleich so schwerlöslich, dass man sie durch Zusatz von überschüssigem CaCl<sub>2</sub> nicht auflösen kann. Setzt man aber der Fibrinogenlösung auf einmal die überschüssige Menge CaCl<sub>2</sub>-Lösung hinzu, so kann die Ausfällung ganz ausbleiben.

Ein schlagendes Argument gegen die Theorie von Lilienfeld dürfte wohl auch folgende Versuchsanordnung sein. Man bestimmt zuerst in einer kleinen Portion der salzfreien Thrombosinlösung die zur Erzeugung einer möglichst reichlichen Thrombosinkalkfällung erforderliche Menge Chlorecalciumlösung. Darauf versetzt man den Rest der Thrombosinlösung mit NaCl bis zu etwa 1%. Diese kochsalzhaltige Thrombosinlösung wird darauf in zwei Theile getheilt. Zu dem einen setzt man das Optimum an Kalksalz, zu dem anderen eine kalkfreie Fermentlösung hinzu. Die kalkhaltige Probe kann tagelang stehen, ohne zu gerinnen; die kalkfreie, fermenthaltige ist in einer halben oder ganzen Stunde so fest geronnen, dass man das Coagel kaum zusammenpressen kann.

Zu diesen Versuchen will ich nur Folgendes bemerken: Wenn man mit einer Fibrinogenlösung, die kochsalzhaltig ist, oder mit einer ebenfalls mit NaCl versetzten, sog. Thrombosinlösung arbeitet, kann es sich ereignen, dass man nach Zusatz von CaCl<sub>2</sub> nach einiger Zeit eine geringfügige, körnige oder feinflockige Fällung in der Versuchsflüssigkeit beobachtet. Wahrscheinlich handelt es sich hier um eine in geringfügiger Menge vorhandene Verunreinigung, deren Natur ich noch nicht kenne, die aber gar nicht zur Verwechslung mit der in einer kochsalzfreien Fibrinogenlösung auftretenden reichlichen fibrinähnlichen Fällung führen kann. Ferner will ich bemerken, dass in meinen Versuchen die sog. Thrombosinkalkverbindung nicht so rasch unlöslich wie in den Versuchen von Lilienfeld wurde. Wahrscheinlich rührt dies daher, dass das mit Essigsäure ausgefällte Fibrinogen, das nach der Ausfällung rasch sich verändert, in meinen Versuchen etwas schneller von der Flüssigkeit getrennt, gewaschen und wieder gelöst wurde. Diese mehr nebensächlichen Unterschiede, die man in verschiedenen Versuchen beobachten kann, ändern jedoch an der Hauptsache nichts.

Es steht also fest, dass eine NaCl-freie Fibrinogenlösung von einem löslichen Kalksalz ganz so wie eine sog. Thrombosinlösung gefällt wird. In beiden Fällen kann der Niederschlag das Aussehen eines Fibringerinnsels haben und bekommt auch bald die Unlöslichkeit desselben. Bei Gegenwart von NaCl in passender Menge wird weder die eine noch die andere Lösung durch Kalksalz gefällt. Eine kochsalzhaltige Thrombosinlösung, die mit CaCl<sub>2</sub> nicht gerinnt, liefert dagegen mit einer entkalkten Fermentlösung in kurzer Zeit reichliche Mengen von typischem Fibrin.

Es ist also offenbar, dass das Lilienfeld'sche Thrombosin nichts anderes als (infolge der chemischen Prozeduren bisweilen vielleicht etwas verändertes) Fibrinogen ist, welches in kochsalzfreier Lösung mit CaCl<sub>2</sub> eine Fällung von Fibrinogenkalk gibt. Mit der typischen Fibrinbildung darf dies aber ebensowenig verwechselt werden wie man das Unlöslichwerden des aus einer kochsalzhaltigen Lösung einfach durch Ver-

dünnung mit Wasser gefällten Fibrinogens mit der Fibrinbildung verwechseln darf. Sonst könnte man ganz einfach behaupten, dass zur Fibrinbildung nichts anderes als Fibrinogen, Kochsalz und Wasser nothwendig sei.

Lilienfeld hat gezeigt, dass die Nucleinsäure in ganz derselben Weise wie die Essigsäure auf eine Fibrinogenlösung wirkt. Die Nucleinsäure erzeugt ebenfalls einen Niederschlag, der indessen keine Nucleinsäure, sondern nur Fibrinogen (Thrombosin) enthält. Dieser Niederschlag verhält sich in ganz derselben Weise wie die mit Essigsäure erzeugte Fällung, und es ist also offenbar, dass man bei der Einwirkung von Nucleinsäure auf eine Fibrinogenlösung, ebensowenig wie bei der Einwirkung von Essigsäure, eine Spaltung unter Bildung von Thrombosin anzunehmen berechtigt ist. Die Theorie von Lilienfeld ist also ganz unbegründet. Das Thrombosin ist nichts anderes als Fibrinogen. Die Beobachtungen von Lilienfeld sind ganz richtig, aber die von ihm aus diesen Beobachtungen gezogenen Schlüsse sind unrichtig infolge davon, dass das verschiedene Verhalten der kochsalzhaltigen und kochsalzfreien Fibrinogenlösungen zu Kalksalz ihm unbekannt gewesen ist.

Man könnte hiergegen vielleicht noch einwenden, dass Lilienfeld in dem Filtrate von der Essigsäurefällung eine Albumosesubstanz von gerinnungshemmender Wirkung gefunden hat. Hierbei ist aber zu bemerken, dass Lilienfeld selbst es dahingestellt sein lässt, ob die Albumosesubstanz eine selbstständige Substanz oder ein Umwandlungsprodukt des sog. Fibringlobulins ist. Nach meiner Erfahrung kann man bei der von Lilienfeld befolgten Versuchsanordnung nicht verhindern, dass in dem essigsauren Filtrate etwas Fibrinogen (allerdings infolge der Säurewirkung etwas verändert) in Lösung bleibt, und aus diesem Reste könnte die Albumosesubstanz entstanden sein. Uebrigens ist es, trotz der älteren Untersuchungen von mir und den neueren von Frederikse, noch nicht sicher entschieden, ob das sog. Fibringlobulin ein Spaltungsprodukt oder ein Umwandlungsprodukt des Fibrinogens oder eine Verunreinigung desselben ist, und bei dieser Sachlage beweist der Nachweis von einer Albumose-

substanz in dem Verdunstungsrückstande des von Essigsäure-sauerem Filtrates natürlich gar nicht, dass eine Spaltung stattgefunden hat.

Auch die gerinnungshemmende Wirkung dieser Albumose scheint nicht hinreichend sicher festgestellt zu sein. Die gerinnungshemmende Substanz ist nämlich, wie Liliensfeld selbst bemerkt, eine mit Kochsalz verunreinigte Albumose. Da nun das Kochsalz die Entstehung eines Fibrinogenkalk-(Thrombosinkalk-)Niederschlags gänzlich verhindern kann, ist es leicht verständlich, wenn Liliensfeld in seinen Thrombosinlösungen, die mit 25—33% (kochsalzhaltiger) Albumoselösung versetzt wurden, nach Zusatz von Kalksalz keine Fällung oder sog. Gerinnung erhielt, während dieselben Lösungen ohne Zusatz von Albumoselösung wie gewöhnlich von Kalksalz gefällt wurden. Es ist also sehr fraglich, ob die Albumosesubstanz überhaupt irgend eine Wirkung auf die Gerinnung ausübt.

Diese Wirkung des Kochsalzes auf den Fibrinogen-(Thrombosin-)Kalk ist übrigens recht lehrreich, denn sie zeigt, wie auf diesem schwierigen Forschungsgebiete die scheinbar unbedeutendsten Nebenumstände die Versuche compliziren und eine richtige Deutung der Versuchsergebnisse erschweren können.

Die Theorie von Liliensfeld ist also zwar unhaltbar, aber seine Beobachtungen sind richtig und leicht zu vereinbaren mit der Erfahrung, dass die Fibrinbildung auch bei Abwesenheit von fällbaren Kalksalzen von Statten gehen kann. Die Versuche mit reinen Fibrinogenlösungen haben also in diesem Punkte zu denselben Resultaten wie die obigen Versuche mit Blutplasma geführt.

Nachdem ich in dem Vorigen die Möglichkeit einer Fibrinbildung bei Abwesenheit von fällbarem Kalksalz gezeigt und die scheinbaren Widersprüche zwischen den Beobachtungen von mir und anderen Forschern hinreichend aufgeklärt habe, könnte ich eigentlich mit meiner Aufgabe fertig sein. Es gibt aber noch eine dritte Theorie für die Wirkung des Kalkes, nämlich die Theorie von Pökelharing, und da ich nebenbei auch gewisse Erfahrungen gemacht habe, die für die Beurthei-

lung dieser Theorie nicht ohne Wichtigkeit sein dürften, muss ich ein wenig auf diese Theorie eingehen. Hierbei muss ich jedoch zuerst bemerken, dass ich diese Theorie nicht ganz klar verstehen kann. Nach Pikelharing ist das Fibrin-ferment eine Kalkverbindung. Bei der Fibrinbildung überträgt das Ferment den Kalk auf das Fibrinogen, welches dabei in Fibrin übergeht. Nach Abgabe von Kalk an das Fibrinogen nimmt das Prothrombin neuen Kalk aus der Flüssigkeit auf, geht dadurch in Fibrinferment über, welches seinen Kalk an eine neue Portion Fibrinogen abgibt; das kalkfreie Prothrombin nimmt wieder aus der Flüssigkeit Kalk auf, gibt ihn an das Fibrinogen ab u. s. w. Nun geht die Fibrinbildung, wie Pikelharing ausdrücklich hervorhebt, auch in solchen Flüssigkeiten von Statten, die keinen durch Oxalat fällbaren Kalk, wohl aber etwas überschüssiges Alkalioxalat enthalten (eine, wie oben gezeigt, ganz richtige Angabe), und nach Pikelharing ist es also nur der durch Oxalat nicht fällbare Kalk, der bei der Gerinnung betheiligt ist. Wie soll man aber dies verstehen? Wenn das Ferment einmal seinen Kalk an das Fibrinogen abgegeben hat, woher nimmt es denn die wiederholt erforderlichen neuen Kalkmengen, wenn keine Kalksalze in der Lösung vorhanden sind? Enthalten die Fermentlösungen ausser dem Fermente (dem Thrombinkalke) als Verunreinigung noch andere Kalkverbindungen, die den Kalk in solcher Bindung enthalten, dass er durch Alkalioxalat nicht gefällt werden kann? Man muss diese Fragen machen, wenn das sog. Fibrinferment wirklich ein Enzym ist und wenn dementsprechend dieselbe kleine Fermentmenge wiederholt neue Mengen Fibrinogen unter Kalkaufnahme in Fibrin umsetzt.

Diese Theorie lässt sich indessen experimentell prüfen, wenn man nämlich den Kalkgehalt des Fibrinogens einerseits und des Fibrins andererseits quantitativ bestimmt. Da ich nun auch solche Bestimmungen gemacht habe, die nicht ohne Interesse für die Fibrinfrage sein dürften, will ich hier über diese Bestimmungen berichten, trotzdem sie strenge genommen zu der eigentlichen Aufgabe nicht gehören. Ich gehe also zur Besprechung der folgenden Frage über:

### Ist der Faserstoff eine Eiweisskalkverbindung?

Nach den Untersuchungen von mehreren Forschern, namentlich von Frederikse<sup>1)</sup>, scheint es festgestellt zu sein, dass der Faserstoff, wie er aus Plasma oder aus reinen, nicht entkalkten Fibrinogenlösungen gewonnen wird, kalkhaltig ist. Als Minimum fand Frederikse in dem aus reinen Fibrinogenlösungen dargestellten Fibrin 0,064% CaO. Es fragt sich nun, ob der aus entkalktem Plasma oder aus entkalkten Fibrinogenlösungen gewonnene Faserstoff ebenfalls kalkhaltig ist und wie viel in diesem Falle der Kalkgehalt beträgt.

Ich habe diese Frage in Angriff genommen, obzwar ich, wenigstens mit Rücksicht auf das Plasma, keine entscheidenden Resultate zu erhalten erwartete. Ich stellte mir also grössere Mengen von Fibrin aus Oxalatplasma und Oxalatserum dar. In den ersten Versuchen verdünnte ich das Serum und Plasma mit Wasser, um den störenden Einfluss des Alkalioxalates zu vermindern, und setzte darnach reines NaCl bis zu 0,8% hinzu, um eine Ausfällung von Fibrinogen zu verhindern. Da indessen der in diesem Kochsalzhaltigen Gemenge sich ausscheidende Faserstoff eine mehr gallertartige Beschaffenheit annahm und infolge dessen schwieriger auszuwaschen war, verfuhr ich in den folgenden Versuchen so, dass ich den infolge der Verdünnung auftretenden Niederschlag abfiltrirte. Die Ausbeute an Fibrin wurde in diesem Falle zwar klein, aber statt dessen konnte ich den Faserstoff besser auswaschen. Auf je 1 Volumen Plasma kamen regelmässig 2—3 Volumina Serum, weil sonst die Fibrinbildung so langsam geschah, dass die Gefahr einer beginnenden Fäulniss vorlag. Das Fibrin wurde erst mit einer Lösung von reinem NaCl in Wasser und dann mit destillirtem Wasser gewaschen. Zuletzt wurde es mit Alkohol und Aether behandelt und in einer Platinschale eingeäschert. Das mit *a* bezeichnete Fibrin wurde nach dem ersten Verfahren (also nach Zusatz von NaCl) dargestellt. Das Fibrin *b* stellte ich nach dem zweiten Verfahren dar.

<sup>1)</sup> L. c.

Die Asche reagirte in beiden Fällen alkalisch von Alkali-carbonat. Sie enthielt Spuren von Eisen und Phosphorsäure. Ausserdem konnte in ihr Kalk, Magnesia und Schwefelsäure nachgewiesen werden. Der Kalk wurde nach allgemein bekannten Regeln als Oxalat ausgefällt und darauf durch Titration mit einer Kaliumpermanganatlösung, N/100, bestimmt.

Fibrin *a*: 4,663 gr. Fibrin lieferten 0,023 gr. Asche = 0,493%. Die Asche enthielt 0,00504 gr. CaO = 0,108%.

Fibrin *b*: 6,562 gr. Fibrin lieferten 0,054 gr. Asche = 0,824%. Die Asche enthielt 0,00344 gr. CaO = 0,0524%.

In beiden Fällen enthielt also die Asche Kalk, deren Menge in Fibrin *b* nur halb so gross wie in *a* war. Aehnliche oder sogar noch grössere Schwankungen in dem Kalkgehalte findet man auch in den Analysen anderer Forscher; und sogar in den Analysen von Frederikse, zu denen Fibrin aus Fibrinogenlösungen verwendet wurde, schwankte der Gehalt an Kalk zwischen 0,064 und 0,1003%. Aus diesen schwankenden Werthen geht nun jedenfalls hervor, dass der Faserstoff leicht Kalkverbindungen mit niederreisst, die offenbar dem Fibrinmoleküle selbst nicht angehören. Wollte man die Annahme machen, dass das Fibrin *b* keine andere Kalkverbindung aus dem Plasma mit niedergerissen hätte, würde also der in dem Fibrinmoleküle enthaltene Kalk 0,052% betragen. Diese Menge ist aber gar nicht grösser als die, welche man in vielen anderen Eiweisskörpern findet, und trotzdem werden diese Eiweissstoffe nicht als Eiweisskalkverbindungen in besonderem Sinne bezeichnet. Wenn man, was viele Forscher gemacht haben, aus dem Kalkgehalte des Fibrins den Schluss zieht, dass das Fibrinogen bei der Gerinnung Kalk aufnimmt und in eine besondere Eiweisskalkverbindung übergeht, ist ein solcher Schluss also ganz unberechtigt.

Die obigen Bestimmungen beweisen indessen nichts sicheres, sei es für oder gegen die moderne Theorie, und ihr grösstes Interesse liegt wohl darin, dass die obigen grossen Fibrinmengen aus solchen Flüssigkeiten dargestellt worden sind, die überschüssiges Alkalioxalat enthielten und also entkalkt (in dem Sinne Arthus') waren.

Die Frage, ob das Fibrinogen bei seinem Uebergange in Fibrin Kalk aufnimmt oder nicht, kann nur durch vergleichende Bestimmung des Kalkes sowohl in dem Fibrinogen wie in dem Fibrin entschieden werden. Wenn das Fibrinogen kalkfrei ist, während das Fibrin regelmässig Kalk enthält, so scheint die Frage in positivem Sinne entschieden zu sein. Enthalten beide Stoffe dieselbe Menge Kalk, so kann natürlich von einer Kalkaufnahme bei der Gerinnung nicht die Rede sein. Sind dagegen beide Stoffe kalkhaltig, das Fibrin aber wesentlich reicher an Kalk als das Fibrinogen, so ist eine bestimmte Entscheidung etwas schwieriger oder vorläufig nicht möglich. Es kann nämlich in diesem Falle eine Kalkaufnahme stattgefunden haben, aber es wäre auch eine Spaltung denkbar, bei der das Fibrin als kalkreicheres Produkt sich ausscheidet, während das andere, kalkärmere oder kalkfreie Produkt in Lösung bleibt. Eine vergleichende Untersuchung von Fibrinogen und Fibrin rücksichtlich des Kalkgehaltes muss also unter allen Umständen von grossem Interesse sein.

Man könnte nun vielleicht meinen, dass diese Frage schon durch eine von Liliensfeld ausgeführte Untersuchung<sup>1)</sup> zu Gunsten der modernen Theorie entschieden worden ist. Er untersuchte nämlich die Asche einerseits von mit Essigsäure gefälltem Fibrinogen (Thrombosin) und andererseits von mit Kalksalz gefälltem Fibrinogen (Thrombosinkalk). Von dem Fibrinogen wurden 1,5 gr. und von dem Fibrinogenkalk 1,4 eingeäschert. In der Asche des Fibrinogens fand er keinen Kalk, in der des Fibrinogenkalkes fand er dagegen solchen. Wenn man nun aber diesen Versuch näher prüft, so findet man, dass er nicht beweisfähig ist. Nehmen wir an, dass das Fibrinogen etwa denselben Gehalt an Kalk wie das von mir analysirte kalkärmste Fibrin gehabt habe, so würde es in dem Versuche Liliensfeld's um den Nachweis von 0,00078 gr., also um etwa  $\frac{3}{4}$  mgr. CaO sich gehandelt haben. Nun hat aber Liliensfeld die Asche mit Salzsäure ausgezogen und die

<sup>1)</sup> L. c., S. 130.

«salzsaure Lösung» mit Ammoniumoxalat geprüft. Dass unter solchen Umständen ein Kalkgehalt des Fibrinogens ihm entgehen konnte, während er in der Asche des kalkreichen Fibrinogenkalkes (Thrombosinkalkes) nach demselben Verfahren Kalk fand, dürfte wohl kaum auffallend erscheinen. Dieser Versuch ist also gar nicht beweiskräftig.

Das zu meinen Bestimmungen verwendete Fibrinogen war mit Essigsäure ausgefällt worden. Das Fibrinogen  $\alpha$  fällte ich mit Essigsäure aus dialysirter, salzfreier Lösung, das Fibrinogen  $\beta$  dagegen aus salzhaltiger. In beiden Fällen wurde das Fibrinogen erst mit Wasser gewaschen und dann mit Alkohol und Aether behandelt. Das Fibrin wurde aus eben solchem, mit Essigsäure gefälltem Fibrinogen ( $a$  aus salzfreier,  $b$  aus salzhaltiger Lösung) in der Weise gewonnen, dass das in Wasser mit möglichst wenig Alkali gelöste Fibrinogen mit einer kalkfreien Lösung von fermenthaltigem Serumglobulin versetzt wurde. Das massenhaft gebildete, völlig typische Fibrin wurde erst mit verdünnter NaCl-Lösung und darauf mit Wasser gewaschen; dann wurde es mit Alkohol-Aether behandelt.

Fibrin  $a$ : 2,436 gr. lieferten 0,0105 gr. Asche = 0,432 ‰. Die Asche enthielt 0,001316 gr. CaO = 0,0544 ‰ CaO.

Fibrin  $b$ : 3,4525 gr. lieferten 0,020 gr. Asche = 0,579 ‰. Die Asche enthielt 0,00196 gr. CaO = 0,0567 ‰ CaO.

Das Mittel aus beiden Bestimmungen ist also 0,0555 ‰ CaO. Vielleicht ist es ein Zufall, dass das kalkärmste von mir analysirte Plasmafibrin etwa denselben Gehalt an Kalk = 0,0524 ‰ hatte.

Fibrinogen  $\alpha$ : 4,323 gr. lieferten 0,015 gr. Asche = 0,347 ‰. Die Asche enthielt 0,002772 gr. CaO = 0,064 ‰.

Fibrinogen  $\beta$ : 2,097 gr. lieferten 0,0065 gr. Asche = 0,31 ‰. Die Asche enthielt 0,000924 gr. CaO = 0,044 ‰.

Das Mittel der beiden Bestimmungen ist also 0,054 ‰ CaO.

Will man hier sagen, dass der etwas niedrigere Kalkgehalt des Fibrinogens  $\beta$  = 0,044 ‰, dem höheren Kalkgehalte des Fibrins  $\beta$  = 0,0567 ‰ gegenüber, für die Ansicht von einer Kalkaufnahme bei der Fibrinbildung spricht, so muss

man auf der anderen Seite zugeben, dass der höhere Kalkgehalt des Fibrinogens  $\alpha = 0,064\%$ , gegenüber dem niedrigeren Kalkgehalte des Fibrins  $\alpha = 0,0544\%$ , ebensowohl für eine Kalkabgabe des Fibrinogens bei der Gerinnung spricht. Das richtigste dürfte wohl sein, diese kleinen Unterschiede als von kaum zu vermeidenden Fehlern bei der Reinigung oder Einäscherung der fraglichen Stoffe herrührend zu betrachten und nur an die Mittelzahlen sich zu halten.

Diese Mittelzahlen sind folgende:

Das Fibrinogen =  $0,054\%$  Ca O,

Das Fibrin =  $0,0555\%$  Ca O

und die beiden Stoffe enthalten also ganz dieselbe Menge Kalk.

Diese Analysen sprechen also entschieden gegen die gang und gäbe Ansicht, dass das Fibrinogen bei der Gerinnung Kalk aufnimmt und in eine Eiweisskalkverbindung übergeht. Wenn man das Fibrin als eine Eiweisskalkverbindung bezeichnet, so muss dasselbe auch für das Fibrinogen gelten. Da man aber gute Gründe für die Annahme hat, dass Calcium in dem Moleküle der nativen Eiweisskörper überhaupt enthalten ist, liegt gar kein Grund vor, das Fibrin als eine Eiweisskalkverbindung in besonderem Sinne zu bezeichnen.

Gegen die nun mitgetheilten Kalkbestimmungen kann man mit Recht einwenden, dass sie zu wenig zahlreich sind, um eine so schwierige Frage wie die jetzt vorliegende zu entscheiden. In Anbetracht der geringen Kalkmenge in dem Fibrin bezw. Fibrinogen, ist es auch wünschenswerth, dass solche Analysen an noch grösseren Substanzmengen wiederholt werden. Ich muss überdies selbst die Einwendung machen, dass die analysirten Fibrinogen- und Fibrinproben einander nicht ganz entsprechen. Das Fibrinogen stammt nämlich nicht aus denselben Lösungen, die zur Darstellung des Faserstoffes verwendet wurden, sondern das Fibrinogen wurde, erst nachdem die Aschenanalysen des Faserstoffes schon abgeschlossen waren, aus anderen Fibrinogenlösungen gefällt. Richtiger wäre es gewesen, die Fibrinogenlösungen in je zwei Portionen zu theilen, von denen ich die eine zur Ausfällung des Fibrinogens und die andere zur Darstellung

von Fibrin verwendete, und es ist auch meine Absicht, neue Bestimmungen nach diesem Plane zu machen. Bevor ich zu dieser zeitraubenden und mühsamen Arbeit gehe, will ich jedoch erst meine Methode zur Darstellung des Fibrinogens einer Revision unterwerfen und wenn nöthig verbessern, denn es ist offenbar, dass die Fibrinfrage wie jede andere chemische Aufgabe erst nach der gelungenen Reindarstellung der dabei beteiligten Substanzen eine exacte Lösung erfahren kann. Ich will auch gern diese Versuche mit nach einem abgeänderten, noch nicht völlig ausgearbeiteten Verfahren dargestellten Lösungen des sog. Fibrinfermentes wiederholen. Aus allen diesen Gründen kann ich zwar noch nicht die vorliegende Frage als durch die eben mitgetheilten Kalkbestimmungen in exacter Weise erledigt betrachten; aber andererseits dürfte ich jedoch wohl keinen zu voreiligen Schluss ziehen, wenn ich auf Grund meiner Untersuchungen behaupte, dass die moderne Lehre von dem Fibrin als eine Eiweisskalkverbindung, die bei der Gerinnung unter Aufnahme von Kalk aus dem Fibrinogen entsteht, gar nicht durch exacte Versuche begründet ist.

Aus dem oben Mitgetheilten folgt ferner, dass ich hinsichtlich der behaupteten Analogie zwischen der Käsebildung und der Fibrinbildung in der Hauptsache denselben Standpunkt wie vor etwa 20 Jahren einnehmen muss. Es besteht allerdings eine Analogie zwischen diesen zwei Processen, aber entgegen der Ansicht von Arthus besteht sie nicht darin, dass die Kalksalze für beide Prozesse nothwendig sind, sondern vielmehr umgekehrt darin, dass die chemische Umwandlung des eiweissartigen Gerinnungssubstrates — des Caseïns und des Fibrinogens — in beiden Fällen bei Abwesenheit von Kalksalzen von Statten gehen kann. Hinsichtlich der Bedeutung der Kalksalze für die Gerinnung, d. h. für die Ausfällung des Umwandlungsproductes besteht aber ein fundamentaler Unterschied zwischen beiden Processen. Nach der gang und gäben Ansicht ist nämlich die Gegenwart von Kalksalz unbedingt nothwendig für die Gerinnung des Caseïns, d. h. für die Ausscheidung des Paracaseïns, während

die Gegenwart von solchem Salz gar nicht nothwendig für die Fibrinbildung ist. Die Art und Weise, wie die Kalksalze bei der Gerinnung des Plasmas oder des Blutes wirken, ist zwar noch nicht sicher aufgeklärt; sehr wahrscheinlich ist es aber, dass diese Salze für die Entstehung des Fibrinfermentes von hauptsächlichlicher Bedeutung sind, und in diesem Falle kann es wohl gegenwärtig nicht von einer Analogie zwischen der Rolle der Kalksalze für die Käsebildung und die Fibrinbildung die Rede sein. Es ist sehr wohl möglich, dass, wenn man einmal das Wesen dieser zwei Gerinnungsvorgänge näher kennen gelernt hat, eine solche Analogie in mehreren Punkten sich herausstellen wird; auf dem jetzigen Standpunkte der Forschung ist es aber gewiss ganz unberechtigt, von einer solchen durchgehenden Analogie zu sprechen.

Zuletzt will ich die wichtigsten meiner Versuchsergebnisse in folgenden Sätzen ganz kurz zusammenfassen.

Die Ansicht von Alex. Schmidt, dass die Kalksalze bei der Fibrinbildung qualitativ nicht anders, sondern nur quantitativ kräftiger als die Neutralsalze (das NaCl) wirken, ist — wenigstens insoferne als es um die Gerinnung von Blut oder Plasma sich handelt — nicht richtig. Die Ansicht von Arthus und Pagès, dass die Kalksalze bei der Gerinnung (von Blut oder Plasma) in spezifischer Weise wirksam sind, ist unzweifelhaft richtig. In Uebereinstimmung hiermit besteht die gerinnungshemmende Wirkung des Alkali-oxalates — entgegen der Behauptung von Alex. Schmidt — wenigstens hauptsächlich darin, dass es die Kalksalze fällt.

Die Theorie von Arthus über die Wirkungsweise der Kalksalze ist dagegen nicht richtig. Die Kalksalze sind nämlich nicht, wie er angenommen hat, für die fermentative Umwandlung des Fibrinogens nothwendig. Wenn nur eine genügende Menge Fibrinferment vorhanden ist, geht nämlich die Fibrinbildung reichlich und ebenso typisch in einer mit Oxalat entkalkten wie in einer kalksalzhaltigen Lösung von statten — was übrigens schon vorher von Alex. Schmidt und Pekelharing gezeigt worden ist.

Die Theorie von Liliensfeld ist zum Theil unrichtig, zum Theil nicht hinreichend begründet. Das sog. Thrombosin, welches ohne Weiteres mit Kalksalz Fibrin geben soll, ist kein Spaltungsproduct des Fibrinogens, sondern durch Essigsäure oder Nucleinsäure gefälltes Fibrinogen, welches, wenn nicht NaCl in genügender Menge zugegen ist, von Kalksalz gefällt wird. Das sog. Thrombosin giebt in kochsalzhaltiger Lösung mit Kalksalz keine Fällung oder Gerinnung; dagegen giebt es in derselben Lösung ohne Zusatz von Kalksalz eine massenhafte typische Gerinnung nach Zusatz von Fibrinferment.

Die von vielen Forschern (namentlich von Arthus, Pekelharing und Liliensfeld) vertretene Ansicht, derzufolge bei der Gerinnung das Fibrinogen unter Aufnahme von Kalk in eine kalkreichere Eiweisskalkverbindung übergehen soll, ist ganz unbegründet. Die bisher ausgeführten vergleichenden Kalkbestimmungen in dem Fibrinogen und dem Fibrin haben nämlich gezeigt, dass beide Stoffe Kalk enthalten und zwar in derselben Menge.

Die spezifische Einwirkung der Kalksalze auf die Gerinnung von Blut oder Plasma betrifft also nicht den chemischen Vorgang bei der Umwandlung des Fibrinogens. Es ist dagegen sehr wahrscheinlich, dass sie in naher Beziehung zu der Bildung des Fibrinfermentes steht. Die Beobachtung von Pekelharing, dass in dem Blutplasma ein Stoff sich vorfindet, der selbst kein Fibrinferment ist, der aber nach Zusatz von Kalksalz kräftig gerinnungserregend wirkt, ist nämlich leicht zu bestätigen.

Die von Arthus behauptete Analogie zwischen Käsebildung und Fibrinbildung ist nicht hinreichend begründet; zum Theil besteht sie gar nicht.