

Zur Frage » Ueber das krystallinische Fibrin .

Von

S. Dzierzowski.

Aus dem Laboratorium für Darstellung der Heilsera am Institute für experimentelle
Medicin in Peter-burg.

(Der Redaction zugegangen am 25. Juni 1899.)

Jedem, der sich mit der Darstellung der Heilsera beschäftigt, ist es bekannt, dass steriles, namentlich phenolisirtes Serum von Pferden oder Rindern nach mehrwöchentlichem Stehen einen geringen Niederschlag absetzt, der mit der Zeit sich noch vergrössert. Diesen Niederschlag habe ich vor drei Jahren untersucht¹⁾ und constatirt, dass er aus Eiweissstoffen, vermuthlich Fibrin, Fetten und Cholesterin, besteht. In Nr. 5, Bd. XXI—XXII, p. 239 des «Bulletin de la société chimique de Paris» hat Herr L. Maillard eine Arbeit über das krystallinische Fibrin (sur une fibrine cristallisée) veröffentlicht, worin er mittheilt, dass der Niederschlag, der beim längeren Stehen des Diphtherieheilserums entsteht, theilweise aus krystallinischem Eiweiss resp. krystallinischem Fibrin besteht. Dabei bemerkt er, dass ich bei meiner Untersuchung dieser Niederschläge das krystallinische Fibrin übersehen habe. Der Mangel genauer Daten in der Arbeit des Herrn Maillard über die Zusammensetzung und die näheren Eigenschaften dieses krystallinischen Fibrins war für mich Veranlassung, meinen vermeintlichen Fehler zu verbessern und den Niederschlag genauer zu untersuchen. Ich habe den Niederschlag von circa 100 Liter

¹⁾ Wratsch, 1896, N. 51, russisch.

verschiedener Portionen des auf Lager stehenden Diphtherieheilserums gesammelt und dieses Material zur Untersuchung verwendet. Die mikroskopische Untersuchung aller gesammelten Portionen des Serumniederschlages hat vollständig das von Herrn Maillard beschriebene Bild bestätigt. Unter dem Mikroskop waren leicht zu unterscheiden: erstens amorphe, globoide Gebilde, zweitens kugelförmige Körner, die das Licht ziemlich schwach, doch deutlich polarisirten, drittens nadel-förmige und blättrige Krystalle, die das Licht stark polarisirten. Die Hauptmasse des Niederschlages bestand aus den globoiden, amorphen — und kugelförmigen krystallinischen Gebilden: das Verhältniss der einen zu den anderen variirte in verschiedenen Portionen. Das Verhalten gegen verschiedene Lösungsmittel, gegen Säuren und Alkalien, stimmte im Allgemeinen mit dem Befund von Herrn Maillard überein und deshalb habe ich mir als erste Aufgabe die Trennung der krystallinischen von den amorphen Bestandtheilen gestellt. Zuerst glaubte ich diese Trennung auf Grund der Verschiedenheit des specifischen Gewichtes der krystallinischen und amorphen Niederschläge zu erlangen und versuchte das Centrifugiren. — Die Methode gab wenig befriedigende Resultate, da die Trennung zu unvollständig war, dabei aber habe ich constatiren können, dass entgegen meiner Erwartung die Schichtenbildung in umgekehrter Reihenfolge erfolgte, d. h. die oberen Schichten waren mehr krystallinisch, die untere mehr amorph. Eine zweite Methode, die ich zur Trennung angewendet habe, war das Auflösen des Niederschlages in den Verdauungssäften, dem Magen- und Pankreassaft, beide nach der Methode von Pawlow gewonnen. Merkwürdig war es, dass nach längerer Einwirkung der beiden Verdauungssäfte auf den Niederschlag sein Bild unter dem Mikroskop unverändert blieb, nur etwas grössere Polarisationsfähigkeit der krystallinischen Aggregate war zu beobachten. Obwohl nun scheinbar der Serumniederschlag unter der Einwirkung der Verdauungssäfte keine Veränderung erlitten hat, so ist in der That seine Natur ganz verändert worden, indem etwa 25—50% der nach der Verdauung zurückgebliebenen Substanz in Alkohol und Aether löslich

geworden ist. Der in Alkohol lösliche Theil sind die Krystallconglomerate, der unlösliche die globoidamorphen Gebilde gewesen. Der aus dem Alkoholextract auskrystallisirte und gereinigte Körper schmolz zwischen 63 und 63,5°, war stickstoff-, schwefel- und phosphorfrei und stellte sich, seiner Zusammensetzung und Eigenschaften nach, als ein Gemisch von Palmitin- und Stearinsäure heraus. Die Elementaranalyse ergab: 0,2520 g der Substanz lieferten 0,6966 g CO_2 und 0,2862 g H_2O , was 75,4% C und 12,61% H entspricht. Der unverdaute Theil löste sich in verdünnten Alkalien und wurde daraus durch verdünnte Säuren wieder gefällt. Der Körper enthielt Phosphor und Stickstoff und kann mit ziemlich grosser Wahrscheinlichkeit als ein Nuclein angesehen werden. Um eine Vorstellung von der Zusammensetzung des Serumniederschlages zu erhalten, habe ich eine Portion des centrifugirten Niederschlages mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, im Vacuum über SO_4H_2 getrocknet, abgewogen und mit Magensaft der Verdauung unterworfen. Es wurden 2,1340 g Substanz und 100 ccm. Magensaft von der Stärke 3 mm. nach Mette genommen. Nach 24stündigem Stehen im Thermostaten bei 37,5° C. wurde der unverdaute Theil auf gewogenem Filter gesammelt, zuerst mit Wasser, dann mit Alkohol und Aether ausgewaschen, im Vacuum über SO_4H_2 getrocknet und gewogen. Der Verlust an Gewicht betrug 0,6950 g, d. h. 32,56% des Niederschlages sind durch Magensaft resp. Alkohol und Aether gelöst worden. Die Alkohol- und Aetherextracte wurden gesammelt, auf einer gewogenen Schale mit geschliffenem Deckel verdampft, getrocknet und gewogen. Der Rückstand wog 0,5345 g und zeigte die Menge der in Alkohol und Aether löslichen Stoffe an. Es wurden mithin bei der Verdauung nur 0,1605 g ($0,6950 - 0,5345 = 0,1605$) Substanz peptonisirt. Demnach bestanden 25,04% aus in Alkohol und Aether löslichen Stoffen und 7,52% sind bei der Verdauung gelöst worden. Eine zweite, auf ähnliche Weise verarbeitete Portion ergab einen Gehalt an 52,4% in Alkohol und Aether löslicher und 18,1 bei der Verdauung peptonisirter Substanzen.

Das auffallende Verhalten des Serumniederschlages gegen

Pankreas und Magensaft liess mich vermuthen, dass wir es hier mit einer Substanz zu thun haben, die ähnlich den Lecithalbuminen von Hoppe-Seyler constituirt ist, mit dem Unterschiede, dass nicht Lecithin, sondern einzig höhere Fettsäuren mit dem Eiweissstoff verbunden sind. Ich habe daher eine abgewogene Menge der auf die oben beschriebene Weise gereinigten und getrockneten Substanz mit 5% Schwefelsäure $\frac{1}{4}$ Stunde lang gekocht. Die nach dem Kochen ungelöst zurückgebliebene Substanz wurde auf gewogenes Filter gebracht, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen, getrocknet und gewogen. Ich erhielt 52,7% in Alkohol und Aether löslicher und 10,7% der nach Abspaltung der Fettgruppen zurückgebliebenen Substanz. Das saure, wässrige Filtrat, neutralisirt und mit Fehling'scher Lösung geprüft, ergab volle Abwesenheit reducirender Substanzen. Die abgespaltenen Fettsäuren erwiesen sich mit den früher durch die Verdauung erhaltenen identisch. 0,2023 g Substanz gaben beim Verbrennen 0,2252 g H_2O und 0,5609 g CO_2 , was 12,42% H und 75,75% C entspricht. Die Formel der Margarinsäure: $C_{17}H_{34}O_2$ verlangt: C 75,55% H 12,58%.

Das Aussehen des nach der Verdauung unverändert gebliebenen Serumniederschlages einerseits und das Zurückbleiben der globoiden, amorphen Körper nach der nachfolgenden Extraction mit Alkohol andererseits zeigten, dass bei der Verdauung nur der krystallinische Theil der Substanz verändert wurde. Dieser Befund brachte mich auf die Vermuthung, dass der krystallinische, leicht zersetzbare Bestandtheil des Serumniederschlages entweder ein Ester oder ein Salz höherer Fettsäure ist. Der Annahme eines Esters widersprach die Unlöslichkeit der Krystalle in Alkohol und Aether, indessen fand doch vor Kurzem Hürthle¹⁾ im Blutserum solche in Alkohol schwer lösliche Ester der Fettsäuren. 10 g des durch Centrifugiren von Serum befreiten und mit Wasser gewaschenen Niederschlages wurden 14 Tage lang mit kochendem Alkohol extrahirt, wodurch ich etwa 1,5 g des weissen, krystallinischen Körpers

¹⁾ K. Hürthle, Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. XXI. S. 331.

gesammelt und zur Elementaranalyse und Charakterisirung des Körpers benutzt habe. Die auf dem Filter gesammelten Krystalle wurden vielfach mit Aether gewaschen, um den Rest des Fettes zu entfernen, in Vacuo über SO_4H_2 getrocknet und analysirt. Die Vorprüfung zeigte, dass die Substanz keinen Stickstoff, Phosphor und Schwefel enthält, dagegen auf Platinblech verbrannt ziemlich viel Asche, die aus reinem Kalkoxyd bestand, hinterliess. Die Elementaranalyse wurde in offenem Rohre ausgeführt, um das im Platinschiffchen zurückbleibende Calciumoxyd quantitativ zu bestimmen. 0,2014 g Substanz verbrannt gaben 0,2040 g H_2O und 0,5113 g CO_2 , was 11,25% H und 69,23% CO_2 entspricht. Die in dem Schiffchen zurückgebliebene Asche wurde in verdünnter Salpetersäure gelöst und zur Bestimmung des Kalkes benutzt. Erhalten wurde 0,0204 g CaO , was 7,19% Ca entspricht. Wenn man annehmen würde, dass der analysirte Körper ein Kalksalz der Margarinsäure von der Formel $(\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{O}_2)_2\text{Ca}$ sei, so sollte er theoretisch folgende Zusammensetzung haben: C 70,58%, H 11,44%, Ca 6,92%. Der erhaltene procentische Gehalt an Wasserstoff und Calcium entspricht dem erwähnten Salze. Der gefundene Kohlenstoffgehalt ist zu niedrig gefunden worden, was leicht dadurch zu erklären ist, dass das im Schiffchen zurückgebliebene Calciumoxyd etwas Kohlensäure zurückgehalten hat. 0,2246 g im Platintiegel verbrannt hinterliessen 0,0223 g CaO , was 7,12% Ca entspricht. 0,3256 g Substanz wurden in einem Becherglase mit verdünnter Salzsäure versetzt, abfiltrirt, auf dem Filter ausgewaschen und im Filtrate Kalk als Oxalat bestimmt. Erhalten wurde 0,0323 g CaO , was 7,08% Ca entspricht. Der auf dem Filter zurückgebliebene Körper wurde aus Alkohol umkrystallisirt, getrocknet und darin der Schmelzpunkt bestimmt. Der Schmelzpunkt war 62,2° d. h. stimmte fast vollkommen mit dem der Palmitinsäure überein. Da der palmitinsäure Kalk $(\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2)_2\text{Ca}$ C 69,81%, H 11,27%, Ca 7,27% verlangt und der Schmelzpunkt der nach dem Zerlegen des Kalksalzes erhaltenen Säure mit dem der Palmitinsäure übereinstimmt, so ist es sicher, dass das erhaltene Kalksalz palmitinsaurer Kalk war. Die früher ange-

fürten Analysen der freien Säure stimmen besser für Margarinsäure und nicht für Palmitinsäure, wie aus folgender Zusammenstellung ersichtlich:

	Gefunden		Berechnet für	
	1. Analyse	2. Analyse	Margarinsäure $C_{17}H_{33}O_2$	Palmitinsäure $C_{16}H_{32}O_2$
C %	75.4	75.75	75.55	75.00
H %	12.61	12.42	12.58	12.50

Dieser Unterschied in der Zusammensetzung der freien Säure und ihres Kalksalzes kann dadurch erklärt werden, dass bei der Zerlegung der Salze mit Säuren Palmitin- und Stearinsäure frei werden, während bei der Extraction nur das etwas leichter lösliche Kalksalz der Palmitinsäure in Alkohol übergeht und der stearinsäure Kalk ungelöst zurückbleibt. Der sichere Beweis, dass das krystallinische Fibrin des Herrn Maillard ein Calciumsalz der Palmitin- resp. Stearinsäure sei, wäre dann geliefert, wenn nach dem Entfernen dieser Salze durch Extraction des Serumniederschlages mit kochendem Alkohol ein ganz amorpher Rückstand hinterbliebe. Zu diesem Zweck habe ich 0,9933 g Substanz im Extractionsapparate von Schaffner 14 Tage lang ununterbrochen mit kochendem Alkohol extrahirt. Dadurch wurde die Menge der Krystalle etwa auf ein Viertel reducirt. Den Niederschlag vollständig krystallfrei zu erhalten, gelang mir nicht, offenbar nur deshalb, weil stearinsäures Calcium in Alkohol unlöslich ist. Die Substanz hat an Gewicht 0,3699 g verloren. Die 0,3699 g bestehen aus Ester und dem Calciumsalz der Palmitin- resp. Stearinsäure. Die Ester wurden von den fettsauren Salzen durch Waschen mit Aether entfernt und das so gereinigte Kalksalz wieder gewogen. Die Gewichts-differenz vor und nach der Aetherextraction ergab den Gehalt an Kalksalz resp. der Ester. Gefunden wurde 0,1885 g Kalksalz und 0,1814 g Ester. Da aber Serumniederschlag nach 14-tägiger Extraction unter dem Mikroskop noch einen, wenn auch bedeutend verminderten Gehalt, an krystallinischen Gebilden zeigte, so habe ich ihn mit 5% iger Salzsäure ausgelaugt, den Säureüberschuss mit Wasser ausgewaschen und

die freigewordenen Fettsäuren wieder mit Alkohol und Aether extrahirt. Ich erhielt 0,0613 g freie Fettsäure, der Menge des nicht extrahirten Kalksalzes entsprechend. Der jetzt vollkommen krystallfreie Niederschlag = 0,5613 wurde mit 150 ccm. Magensaft 24 Stunden lang verdaut, hierauf von Neuem gewaschen, getrocknet und gewogen. Es ergab sich, dass der Magensaft 0,5050 g Substanz gelöst hat und nur 0,0563 g ungelöstes Nuclein zurückgeblieben sind. Folgende kleine Tabelle veranschaulicht die erhaltenen Resultate.

Portion	Menge der angewandten Substanz in Gramm	Die nach der Verdauung in Alkohol und Aether lösliche Substanzmenge in %	Die durch die Verdauung gelöste Eiweissmenge in %	Der ungelöste Rest in %
I.	2,1340	25,04	7,52	67,44
II.	1,4380	52,40	18,15	29,45
III.	0,7534	52,70	—	40,70
IV.	0,9933	42,89	51,45	5,66

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass der Serumniederschlag keine constante Zusammensetzung hat. Der Serumniederschlag besteht aus vier verschiedenen Körpern: 1. dem Kalksalz der höheren Fettsäuren, 2. Glycerin und Cholesterinester dieser Fettsäuren, 3. aus einem Körper, der in Wasser und Salzlösungen unlöslich, vom Magen- und Pankreassaft verdaut und durch Kochen mit verdünnten Säuren löslich wird — dieser Körper könnte das Fibrin sein — 4. aus einem Eiweissstoff, der bei der Verdauung intact bleibt, Phosphor und Stickstoff enthält und als ein Nuclein angesehen werden kann. Da der Serumniederschlag je nach der Dauer der Extraction mit kochendem Alkohol seine weisse Farbe, kalkartige Beschaffenheit und krystallinische Structur verliert, so ist es sicher, dass das krystallinische Fibrin des Herrn Maillard nichts anderes als Kalksalz der Fettsäuren ist. Die Frage, ob überhaupt in dem Serumniederschlag Fibrin vorhanden, betrachte ich als eine noch offene. In meiner vor 3 Jahren im *Wratsch* publicirten Arbeit habe ich die Vermuthung ausgesprochen, dass

die Eiweissstoffe des Serumniederschlages vielleicht langsam sich ausscheidendes Fibrin sein können. Aus Mangel an Material habe ich damals diese Eiweissstoffe nicht untersuchen können und nur deshalb Fibrin vermuthet, weil ich öfters aus dem Serum leukämischer Pferde nach mehrtägigem Stehen ziemlich grosse Fibrinmengen, immer von Neuem, sich ausscheiden sah. Schliesslich muss ich bemerken, dass die jetzt von mir erhaltenen Resultate nicht ganz mit den früher erhaltenen und im Wratsch publicirten übereinstimmen. Ich erhielt jetzt viel weniger Cholesterinester, was ich mir dadurch erkläre, dass die genannten Ester zuerst ausgefallen sind und schon früher, d. h. vor dem Aufbewahren in zugeschmolzenen Flacons, das auf seine Stärke geprüften Serums abfiltrirt wurden.