

Zur Frage nach dem glykolytischen Prinzip des Blutfibrins.

Von
N. Sieber.

Aus dem chemischen Laboratorium des Instituts für experimentelle Medizin
zu St. Petersburg).

(Der Redaktion zugegangen am 22. April 1905.)

In der Abhandlung¹⁾ über Glykolyse durch Oxydationsfermente sind Tatsachen und Beobachtungen mitgeteilt worden, welche beweisen, daß dem Fibrin und dessen Auszüge eine glykolytische Wirkung zukommt, das heißt, daß sie ein Prinzip, welches Zucker zu zersetzen imstande ist, enthalten. Den Eigenschaften nach zu urteilen, welche dieses Prinzip besitzt, muß es zu den Fermenten gehören. Darauf fußend, daß bei der Glykolyse durch Einwirkung der aus Fibrin erhaltenen Auszüge, resp. der in diesen enthaltenen Stoffe Sauerstoffverbrauch und Kohlensäurebildung zu konstatieren war, sowie darauf, daß im Fibrin selbst und auch in dessen Auszügen verschiedene Oxydationsfermente, resp. Oxydasen gefunden worden sind, welchen die Fähigkeit, Zucker im Blut zu zersetzen, durch einige Forscher zugehört wurde, ist die Glykolyse als Oxydationsprozeß aufgefaßt worden. Weitere Untersuchungen sollten aber entscheiden, inwieweit die Zuckerzersetzung ein rein oxydativer Prozeß ist und inwieweit an derselben auch andere, vielleicht noch nicht aufgeklärte Vorgänge mitbeteiligt sind. Wegen der Kompliziertheit des glykolytischen Prozesses einerseits und der verschiedenartigen Zusammensetzung des Fibrins selbst und seiner Extrakte andererseits mußte in erster Linie festgestellt werden, welche Stoffe und Funktionen außer der uns interessierenden glykolytischen Wirkung dem Fibrin zukommen, es mußte weiter ver-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXIX, S. 484.

sucht werden, ob es nicht gelänge, die betreffenden Stoffe und die ihnen zukommenden Funktionen zu isolieren resp. zu differenzieren, und schließlich mußte klar gelegt werden, welche Funktionen den verschiedenen Stoffen eigen sind. Es ist jedoch zur Genüge bekannt, daß man gerade in dieser Richtung, d. h. bei der Isolierung und Reinigung von labilen Gruppierungen, resp. Fermenten und ihnen nahe stehenden Stoffen auf nicht geringe, manchmal sogar schwer zu überwindende Schwierigkeiten stößt. Bei der Untersuchung über die in verschiedenen Blutfibrinen enthaltenen Stoffe und speziell über die diesen Stoffen zukommende Eigenschaft, Zucker zu zersetzen, mußten vor allem die Bedingungen und die Gesetze, welche diese Funktion beeinflussen, ausfindig gemacht werden.

Ehe ich jedoch zur Besprechung derselben übergehe, will ich über die Gewinnung des uns interessierenden Prinzips kurz referieren. Die Methodik, welche befolgt wurde, um das glykolytische Prinzip aus dem Fibrin zu isolieren, war eine von den früher angewandten¹⁾ etwas verschiedene.

Das durch eine Presse ausgedrückte und wiederholt mit kleinen Portionen Wasser ausgewaschene Fibrin, welches hierbei von dem Serum und den darin enthaltenen Stoffe befreit war, wurde während längerer Zeit zu wiederholten Malen mit Wasser extrahiert. Die erhaltenen Auszüge sowie das Waschwasser wurden nicht, wie früher, zusammengossen, sondern jedes für sich untersucht. Mittels einer derartigen fraktionierten Extraktion des Fibrins mit destilliertem Wasser versuchte ich, vor allem die Frage zu lösen, welchem Bestandteile des Fibrins die glykolytische Funktion angehört und ob dieses Prinzip in freiem oder gebundenem Zustande im Fibrin enthalten ist: andererseits suchte ich dabei das quantitative Verhalten des glykolytischen Fibrinprinzips festzustellen. Endlich wurde, ebenfalls durch fraktionierte Extraktion, der Versuch gemacht, die im Fibrin anwesenden verschiedenen Stoffe wenigstens bis zu einem gewissen Grade von einander zu trennen: letzteres war aus dem Grunde erwünscht, weil dadurch die störende Wirkung der eventuell anwesenden Antagonisten, resp. Antikörper aus-

¹⁾ l. c.

geschlossen wird. Durch Trennung der verschiedenen Substanzen aber werden Bedingungen für die Äußerung entgegengesetzter Funktionen geschaffen, woraus sich die Möglichkeit ergibt, diejenigen Momente aufzuklären, welche die uns interessierende glykolytische Funktion hemmen und begünstigen.

Durch fraktionierte Extraktion des Fibrins mit Wasser konnte ermittelt werden, daß das glykolytische Prinzip sich in Wasser löst und daß es nicht nur im ersten, sondern manchmal auch bis zum vierten und seltener bis zum fünften Auszuge enthalten ist. Außerdem stellte sich heraus, daß man, um eine vollkommene Extraktion dieses Prinzips zu erzielen, den Kontakt zwischen Fibrin und Wasser möglichst lange fortsetzen muß. Die Zeit, welche erforderlich ist, um das glykolytische Prinzip möglichst vollständig zu extrahieren und in Lösung überzuführen, betrifft 5 bis 10 oder sogar mehr Tage. Um zu bestimmen, wie vollständig und rasch das glykolytische Prinzip aus dem Fibrin extrahiert wird, wurden die wässerigen Auszüge, welche bei verschieden langer Extraktion sukzessiv erhalten waren, jeder für sich auf ihr glykolytisches Vermögen geprüft und hierbei folgende Resultate erzielt:

3 Tage lang fortgesetzte Extraktion mit der dem Gewichte nach gleichen Menge Wassers liefert bei Zimmertemperatur eine Lösung, welche imstande ist, 20 bis 35^o/_o, manchmal auch mehr von dem zugesetzten Zucker zu zersetzen.

6 Tage lang fortgesetzte Extraktion des gleichen Fibrins ergibt ein Extrakt, welches 25 bis 45^o/_o des angewandten Zuckers zersetzen kann.

Ein 10tägiges Extrakt zersetzte den Zucker noch intensiver, nämlich in der Menge von 32 bis 55^o/_o und mehr.

Durch fraktionierte, gleich lange Zeit (3 Tage) fortgesetzte Extraktion des Fibrins von gegen Diphtherie immunisierten Pferden mit einer dem Gewichte nach gleichen Menge Wasser erhielt ich Extrakte, welche sich Zucker gegenüber in folgender Weise verhielten:

Das 1. Extrakt zersetzte, unter den für seine Wirkung günstigen Bedingungen, worüber später die Rede sein wird, mit Zucker vermengt 20 bis 40^o/_o desselben.

Das 2. Extrakt zersetzte hierbei	25—45%	Zucker.
3. „ „ „	30—45—50%	„
4. „ „ „	20—40%	„
5. „ „ „	10—15—20%	„

Sehr selten konnten weitere Extrakte gewonnen werden, welche noch nennenswerte Mengen des glykolytischen Prinzips enthielten. Es stellte sich außerdem heraus, daß die Menge des glykolytischen Prinzips in verschiedenen Fibrinsorten nicht die gleiche ist. Die früheren Beobachtungen, nach denen dieses Prinzip in normalem Fibrin, sowie auch im Fibrin von gegen verschiedene Erkrankungen immunisierten Tieren (Pferden) enthalten ist, konnten vollauf bestätigt werden.

Beim Beginn meiner Untersuchungen über die im Fibrin enthaltenen Stoffe und die ihnen zukommenden Eigenschaften wurden verschiedene Fibrinsorten auf das ihnen speziell zukommende Vermögen, Zucker zu zersetzen, untersucht. Hierbei kam es vor allem darauf an, das Fibrin in sterilem Zustande aus dem Blute zu erhalten. Es gelingt schließlich unter Einhaltung streng aseptischer Kautelen (Arbeiten mit sterilen Apparaten und Utensilien, sowie sterilen Lösungen), sowie bei Anwendung gewisser Antiseptica, wie Chloroform, Toluol, Thymol, sowie auch Aceton, steriles Fibrin, sowie Extrakte aus ihm zu gewinnen. Bei der Anwendung von Fibrin selbst und nicht von wässerigen Auszügen aus demselben und bei Beobachtung der Zuckerzersetzung nach Zusatz desselben konnte festgestellt werden, daß die Zersetzung des Zuckers allmählich vor sich geht: daß z. B. am dritten Tage eine im Vergleich zum ersten Tage doppelte Menge Zucker zerstört wurde. An wässerigen Fibrinextrakten dagegen wird solches Fortschreiten der Zersetzung des Zuckers nicht beobachtet. Das Gesagte ist übrigens am besten aus folgenden Versuchen mit Rinder- und Kalbsfibrin zu ersehen. In mehreren Parallelversuchen wurden etwa 2 g trockenen Kalbsfibrins von verschiedenen Tieren gewonnen, welche in 50 ccm sterilen Wassers suspendiert waren, mit 2 ccm = 0,438 g Traubenzucker (unter Einhaltung streng aseptischer Kautelen), sowie mit etwas Thymol vermischt und das Gemisch in den Brutschrank gestellt. Die ersten, nach Verlauf

von 24 Stunden, nach Enteiweißen mittels Sublimat und ClH mit dem Polarisationsapparat ausgeführten Bestimmungen ergaben, daß vom Zucker im ersten Fall 0,067 g, im zweiten 0,1042 g oder **15,3%** und **23,8%** zersetzt waren.

Nach weiterem 72stündigen Verbleiben des Gemisches im Thermostaten wurden 0,2113—0,2415 g = 48,3—55% des Zuckers zersetzt gefunden. In entsprechenden Parallelversuchen mit Rinderfibrin (von verschiedenen Tieren erhalten), in welchem das Verhältnis zwischen Zucker, Fibrin und Wasser das nämliche war, fand man nach den ersten 24 Stunden 0,083—0,11 g oder von **18,9%** bis **25,4%** des Zuckers zersetzt: nach 3×24 Stunden aber waren 0,2118—0,243 g = 48,3—**55,4%** des Zuckers zerlegt worden. Bei länger fortgesetzter Beobachtung und nach dem dritten Tage wurde sowohl bei Untersuchung mit dem Polarisationsapparat, wie auch durch Titrierung, eine geringe Zersetzung des Zuckers gefunden, doch war hierbei der Zucker nie bis auf die letzten Spuren verschwunden.

Im Gegensatz dazu war in den Versuchen mit wässerigen Fibrinextrakten der Unterschied in der Zersetzung des Zuckers zwischen dem ersten, zweiten und dritten Tag sehr gering.

Ich glaube das ebenangeführte ungleiche Verhalten des Fibrins selbst und seiner Extrakte ist nicht anders zu deuten als durch die Annahme, daß das glykolytische Prinzip nicht frei in Lösung vorhanden ist, sondern erst aus dem Fibrin ausgezogen wird, um dann seine Wirkung auf den in Lösung vorhandenen Zucker zu entfalten.

Um sich einen annähernden Begriff von der Zusammensetzung der sukzessiv gewonnenen wässerigen Auszüge zu erhalten, wurden die letzteren nach Kjeldahl auf ihren Stickstoffgehalt untersucht. Die hierbei erhaltenen Zahlen beweisen, wie zu erwarten ist, daß die ersten Extrakte viel stickstoffreicher sind, wie die späteren und zwar im Vergleich zu dem 6.—7. Auszüge sogar um das 10fache. Von 12 verschiedenen Fibrinsorten, welche von normalen Tieren (Pferden) und ebenso von solchen, die gegen verschiedene Erkrankungen immunisiert waren, stammten, wurden Extrakte bereitet, bei deren Untersuchung sich ergab, daß im 1. Extrakte der Stickstoffgehalt

zwischen 1,2538 und 1,059^o/_o schwankt: im 2. und 3. Auszuge zwischen 0,8675 und 6579^o/_o, im 4. zwischen 0,5374 und 0,3725^o/_o: im 5. zwischen 0,3057 und 0,1873^o/_o; im 6. zwischen 0,1856 und 0,1235^o/_o: im 7. und 8. zwischen 0,1100 und 0,0853^o/_o: im 9. und 10. zwischen 0,075 und 0,0385^o/_o. Auf Eiweiß umgerechnet (d. h. mit 6,23 multipliziert), entspricht der 1. Auszug = 7,8237^o/_o und der letzte = 0,24024^o/_o Eiweiß.

Die Bestimmungen des spezifischen Gewichts der verschiedenen Fibrinextrakte ergaben Schwankungen zwischen 1005—1025. Die Mitteilung der an diesen Lösungen beobachteten Gefrierpunktserniedrigungen und anderweitiges in der gleichen Richtung gesammeltes Material behalte ich für eine spätere Publikation vor. Das fraktionierte Extraktionsverfahren hat sich für die Erforschung der die Glykolyse beherrschenden Bedingungen als sehr wertvoll erwiesen, denn nur auf diese Weise wurde es ermöglicht, die verschiedenen hier in Betracht kommenden Stoffe auseinander zu halten.

In großer Anzahl angestellte Versuche haben gezeigt, daß in erster Linie ein strenges quantitatives Verhältnis zwischen der Menge des glykolytischen Prinzips und derjenigen des der Zersetzung unterliegenden Objektes, d. h. dem Zucker, bestehen muß, wenn die Glykolyse zustande kommen soll. Ist die Zuckermenge im Verhältnis zur Menge des glykolytischen Prinzips unverhältnismäßig groß, so erfolgt keine Glykolyse, wie wenn diese Funktion durch das Übermaß an Zucker paralytisch wäre. Nimmt man aber auf die gleiche Menge des glykolytischen Prinzips nur die Hälfte der verwendeten Zuckermenge, oder auch noch weniger, so tritt die Zersetzung des Zuckers ein.

Zur Bestätigung des Gesagten will ich diesbezügliche Versuche, welche zu gleicher Zeit und unter vollkommen identischen Verhältnissen vorgenommen wurden, anführen. In diesen Versuchen war die Menge des Traubenzuckers eine wechselnde, die Menge des glykolytischen Prinzips aber die gleiche. Zu diesen Versuchen diente speziell ein und dasselbe Fibrinextrakt, nämlich der 3. Auszug aus dem Blutfibrin von gegen Diphtherie immunisierten Pferden. Bevor ich aber diese Versuche beschreibe, will ich, um im weiteren Wiederholungen und Miß-

verständnisse zu vermeiden, bemerken, daß nicht nur diese, sondern überhaupt alle, die Glykolyse betreffenden Versuche stets in sterilen Gefäßen und Apparaten mit sterilisierten Utensilien (Kautschukröhren, Pfropfen usw., sowie unter Einhaltung streng aseptischer Kautelen z. B. Benutzung sterilisierter Pipetten) vorgenommen wurden. Die Zuckerlösung wurde gleichfalls sterilisiert und enthielt außerdem Thymol oder Chloroform. Trotz aller dieser Maßregeln wurde am Anfang und am Ende eines jeden Versuches der Kontrolle halber auf sterile Nährboden abgeimpft. Dieselben blieben in allen Fällen mit Ausnahme von zweien steril, in diesen letzteren, welche von mir nicht weiter berücksichtigt worden sind, waren aus Versehen nichtsterilisierte Gefäße zu dem Versuche verwandt worden. Die Versuche, welche die Bedeutung der quantitativen Verhältnisse zwischen dem glykolytischen Prinzip und dem Zucker erwiesen, waren in folgender Weise angeordnet worden.

In 5 sterilisierte Kölbchen von 100 ccm Inhalt, welche einige Stückchen Thymol enthielten, wurden mittels steriler Pipette je 25 ccm vom 3. Fibrinauszuge hineingebracht. Mit einer anderen ebenfalls sterilen Pipette wurde sodann von der 23,676% Traubenzucker enthaltenden Lösung in das 1. Kölbchen 5 ccm, welche also 1,1868 g Zucker entsprachen, in das 2. Kölbchen 4 ccm = 0,9504 g Zucker; in das 3. Kölbchen 3 ccm = 0,7102 g; in das 4. 2 ccm = 0,4735 g Zucker und in das 5. Kölbchen 1 ccm = 0,23676 g Zucker gebracht. Alle 5 Kölbchen wurden sodann in den Thermostaten gestellt und von Zeit zu Zeit geschüttelt. Nach Ablauf von 24 Stunden wurde sodann der Inhalt der 5 Kölbchen auf seinen Zuckergehalt untersucht und zwar einerseits mit dem Polarisationsapparat von Franz Schmidt und Haensch, sowie andererseits durch Titrieren mit Fehlingscher Lösung. Zu diesem Zweck wurde der Inhalt eines jeden Kölbchens in zwei Hälften geteilt. In der ersten Hälfte wurde das Enteiweißen mittels Sublimat und Salzsäure, in der anderen mit Essigsäure in Gegenwart von ClNa bewirkt. Die erste Portion diente zur Bestimmung des Zuckers mittels Polarisationsapparat, die zweite zur Bestimmung des Zuckers mittels Titrierverfahrens.

I. Versuch.

Im ersten Kölbchen, in welchem auf 25 ccm Fibrinauszug 5 ccm oder 1,1868 g Traubenzucker kamen, wurde durch das Titrierverfahren 1,1 g und mittels des Polaristrobometers 1,12 g Zucker nachgewiesen: folglich waren nach der einen Bestimmung 0,0868 g, nach der anderen aber 0,0668 g zersetzt worden, was im ersten Falle 7,3% und im zweiten 5,5% des verwendeten Zuckers ausmacht.

II. Versuch.

Im 2. Kölbchen, in dem auf 25 ccm Fibrinauszug 4 ccm oder 0,9504 g Traubenzucker enthalten waren, entsprach nach Ablauf von 24 Stunden der Zuckergehalt nach dem Titrierverfahren bestimmt 0,846 g, nach dem Polarisationsverfahren 0,840 g. Folglich waren im ersten Falle 0,1041 g, im zweiten aber 0,1101 g oder 11,48% und 10,09% Zucker zersetzt worden.

III. Versuch.

Im 3. Kölbchen, wo auf die gleiche Menge von dem glykolytischen Prinzip, d. h. dem Fibrinextrakt 3,0 ccm oder = 0,71026 g Zucker zugesetzt worden waren, wurden durch Polarisation 0,567 g, durch das Titrierverfahren 0,572 g Zucker zurückerhalten. Hier waren also nach der ersten Bestimmung 0,14326 g oder 20,1%, nach der zweiten Bestimmung 0,1373 g oder 19,4% Zucker zersetzt worden.

IV. Versuch.

Im 4. Kölbchen wurden zur gleichen Menge des glykolytischen Prinzips 2 ccm oder 0,47352 g Zucker zugesetzt und dann durch das Titrierverfahren 0,310 g: durch Polarisation 0,3184 g Zucker festgestellt, woraus folgt, daß im ersten Falle 0,1635 g oder 34,5%, im zweiten Falle 0,155 g oder 32,70% des angewandten Zuckers zersetzt worden waren.

V. Versuch.

Im 5. Kölbchen kamen auf die gleiche Menge des Fibrinextraktes 1,0 ccm, dem 0,2367 g Traubenzucker entsprach. Nach

24 Stunden zeigte das Titrierverfahren einen Zuckergehalt von 0,1204 g, durch Polarisationsbestimmung einen solchen von 0,1184 g. Folglich waren im ersten Falle 0,1163 g oder 49,4%, im zweiten Falle 0,1183 g oder 49,90% vom angewandten Zucker zersetzt worden.

Zur bequemeren Orientierung fasse ich die durch eben angeführte Versuche gewonnenen Zahlen in der folgenden Tabelle zusammen.

Tabelle I.

Zersetzung verschiedener Traubenzuckermengen durch 25 ccm wässrigen Fibrinauszuges im Laufe von 24 Stunden bei Bruttemperatur.

5 ccm = 1,1868 g Trauben- zucker		4 ccm = 0,9504 g Trauben- zucker		3 ccm = 0,7102 g Trauben- zucker		2 ccm = 0,4752 g Trauben- zucker		1 ccm = 0,2367 g Trauben- zucker	
zersetzt in g in %		zersetzt in g in %		zersetzt in g in %		zersetzt in g in %		zersetzt in g in %	
1) 0,0668	5,5	0,1101	11,05	0,1373	19,3	0,1635	34,5	0,1163	49,4
2) 0,0868	7,3	0,1041	10,95	0,14026	20,1	0,155	32,6	0,1183	49,9

Beim umgekehrten Verfahren, d. h. wenn man nicht die Zuckermenge, sondern die Menge des Fibrinauszuges, resp. des darin enthaltenen glykolytischen Prinzips variieren läßt, erhält man den eben wieder gegebenen Versuchen entsprechende Resultate.

VI. Versuch.

Es wurden auf 5 ccm der gleichen Zuckerlösung, d. h. auf 1,1868 g Traubenzucker nicht 25 ccm, sondern 50 ccm des gleichen (3.) Fibrinauszuges unter Berücksichtigung der nämlichen aseptischen Maßregeln (in sterilen Kölbchen, Fibrinauszug und Zuckerlösung mit sterilen Pipetten abgemessen) hinzugesetzt. Nach Ablauf von 24 Stunden wurden durch Be-

1) Zuckerbestimmung nach der Titriermethode ausgeführt.

2) Zuckerbestimmung mit dem Polaristrobometer von Schmidt und Haensch ausgeführt.

stimmung mit dem Polarisationsapparat 0,870 g unzersetzt zurückerhalten: es waren dementsprechend also 0,3168 g oder 26,7% des Zuckers zersetzt worden.

VII. Versuch.

Zu 5 ccm der gleichen Zuckerlösung = 1,1868 g wurde in diesem Falle nicht die doppelte, sondern die vierfache Menge, d. h. 100 ccm des wässerigen Fibrinextraktes hinzugesetzt. Die mittels Polarisationsapparat nach 24 Stunden ausgeführte Bestimmung ergab 0,3308 g unzersetzten Zuckers: es waren also 0,856 g oder 72,1% des angewandten Zuckers zersetzt worden.

Aus den eben angeführten, sowie entsprechenden anderen Versuchen, welche, um Wiederholungen zu vermeiden, nicht wiedergegeben werden sollen, ist zu ersehen, daß durch die doppelte Quantität des glykolytischen Prinzips nicht die doppelte, sondern die fünffache Menge, durch die vierfache Quantität des gleichen Prinzips sogar die 12—14fache Zuckermenge zersetzt wird. Bei weiteren, in dieser Richtung angestellten Versuchen verwandte ich verschiedene Auszüge des nämlichen Fibrins, fernerhin Auszüge von verschiedenen Fibrinsorten, hierbei wurden verschiedene Modifikationen der Versuche, welche das Verhältnis zwischen dem glykolytischen Prinzip und der Menge des angewandten Zuckers betrafen, vorgenommen, stets war das Resultat dieser Versuche den oben mitgeteilten Ergebnissen entsprechend. Einige von diesen Versuchen, welche noch nicht abgeschlossen sind und welche uns die genauen quantitativen Verhältnisse, sowie die den glykolytischen Vorgang beherrschenden Gesetze aufklären sollen, können in dieser Mitteilung noch nicht Platz finden.

Die Ergebnisse der eben geschilderten Versuche sind nicht nur an und für sich interessant, weil sie uns zeigen, daß die glykolytische Funktion von gewissen Gesetzmäßigkeiten beherrscht wird, sondern auch, weil sie beweisen, daß die glykolytische Funktion unter anderen dem Fibrin, resp. dem im Fibrin enthaltenen wasserlöslichen Prinzip, sowohl normaler, als auch immunisierter Tiere (Pferde) zukommt. Für das Zustandekommen der Glykolyse ist aber weiterhin von Bedeutung,

daß zwischen dem glykolytischen Prinzip und dem dieser Wirkung unterliegendem Objekte, dem Zucker, ein quantitatives Verhältnis vorhanden sei. Weiterhin muß betont werden, daß die Möglichkeit der Mitwirkung der Bakterien bei der Glykolyse bei meinen Versuchen vollständig ausgeschlossen gewesen ist.

Die dem tierischen Organismus zukommende glykolytische Wirkung hat seit langer Zeit das Interesse der Forscher in Anspruch genommen, aber trotzdem konnte ihr Wesen bis jetzt nicht aufgeklärt werden, unter anderem auch wegen der Schwierigkeit, das Auftreten von Mikroorganismen bei derartigen Versuchen zu vermeiden. Einige Forscher sind sogar der Meinung, daß es gegenwärtig fast unmöglich ist, die Bakterien auszuschließen. Weiter wird aus diesem Grunde behauptet, daß die Frage, ob das glykolytische Prinzip in den Geweben und Organen des tierischen Organismus enthalten sei, zur Zeit nicht lösbar ist. Meiner Meinung nach ist jedoch ein derartiger Standpunkt wenig begründet: Einerseits sind auf dem Gebiete der bakteriologischen Untersuchungen in den letzten Jahren im allgemeinen große Erfolge zu verzeichnen und andererseits hat unsere Methodik bezüglich der Vernichtung und der Entwicklungshemmung der Bakterien große Fortschritte gemacht. Zu diesem Zwecke stehen uns nicht nur Produkte der chemischen Industrie, welche immer neue, höchst wirksamen Antiseptica auf den Markt bringt, sondern auch Substanzen biologischen Ursprungs, welche bakterienfeindliche Eigenschaften besitzen, zur Verfügung. Meiner Meinung nach überschätzt man die Rolle und die Bedeutung der Bakterien, überhaupt und speziell, wenn man alle in betreff der Glykolyse erzielten positiven Resultate auf die Teilnahme von Bakterien beziehen will. Eine dieser ähnliche Überschätzung der Bedeutung von Bakterien gegenüber der Enzym- oder Fermentwirkung herrschte seiner Zeit in der Lehre von den Verdauungsvorgängen. Erst die weitergehenden Untersuchungen über die Verdauungsprodukte, hauptsächlich aber der Vergleich der Verdauungsprodukte mit denjenigen, welche durch bakterielle Zersetzung gebildet werden, fernerhin die experimentelle Erörterung der Frage, welche Bedeutung die bakteriellen Zersetzungsprodukte einerseits, die Ver-

dauungsprodukte andererseits für das Leben der tierischen Organismen besitzen, haben den Fermenten oder Enzymen wieder zu ihrem Rechte verholfen. Dabei stellte sich heraus, daß die bakteriellen Produkte im großen und ganzen eine mehr schädliche, wie nützliche Wirkung auf die Lebensäußerungen und das Leben selbst ausüben. (*Opera omnia*, M. Nencki, Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig 1905. Bd. I f., S. 836, Bd. II f., S. 101, 183, 578 und andere.) Die Lehre von den Fermenten, welche sich mit den wichtigsten Lebensäußerungen und Funktionen des Organismus befaßt, fesselt naturgemäß die Aufmerksamkeit der Forscher immer mehr an sich. Die Arbeiten der letzten Jahre haben trotz aller Schwierigkeiten, mit welchen die Forschungen auf diesem Gebiet verknüpft sind, gezeigt, daß die Mannigfaltigkeit und Verbreitung, sowie die sich hieraus ergehende Bedeutung der Fermente sehr groß sind. Verschiedene Funktionen und Produkte des tierischen Organismus, welche vor kurzem noch nicht mit Fermentwirkungen in Zusammenhang gebracht wurden, gehören, wie die Untersuchungen der letzten Jahre von A. Kossel, A. Schittenhelm und von anderen gezeigt haben, in das Bereich desselben. Wir werden nicht übertreiben, wenn wir behaupten, daß wir in der Zeit des Aufblühens der Fermentlehre leben.

Bei unseren Untersuchungen sind wir zu der Überzeugung gekommen, daß in Fibrin, resp. in seinen wässerigen Auszügen außer dem glykolytischen Prinzip auch verschiedene andere Stoffe vorhanden sind, unter ihnen solche, die bakterienfeindliche Eigenschaften besitzen und die zum Teil die Entwicklung der Bakterien hemmen, zum Teil aber die deletäre Wirkung der pathogenen Mikroben paralisieren. Auf Grund dieser Beobachtungen, so zu sagen, dank dem glücklichen Zufall, daß das glykolytische und das baktericide Prinzip hier neben einander vorkommen, kann die Frage nach der Mitwirkung der Bakterien speziell bei der durch Fibrin, so wie dessen wässerige Auszüge bewirkten Glykolyse definitiv in negativem Sinne entschieden werden. Für die Nichtbeteiligung der Bakterien an einer derartigen Glykolyse spricht einmal der Umstand, daß für die Zersetzung des Zuckers ein bestimmtes, relatives Verhältnis, wie wir sahen, zwischen diesem und dem glykolytischen

Prinzip erforderlich ist, andererseits der direkte Nachweis von bakterienfeindlichen Stoffen in Fibrinauszügen.

Die Beobachtungen über die bakterienfeindlichen Eigenschaften des Fibrins und seiner Extrakte sind an anderem Orte¹⁾ ausführlicher mitgeteilt worden und können deswegen hier nur kurz Erwähnung finden.

Bei den Untersuchungen über Fibrine verschiedener Provenienz wurde meine Aufmerksamkeit auf die Erscheinung gerichtet, welche unter gewissen Umständen zu beobachten war und welche darin bestand, daß die wässerigen Fibrinauszüge steril blieben und nicht selten bei längerem Stehenbleiben in offenen Gefäßen sich nicht zersetzten.

Jedoch ist die Darstellung von sterilen wässerigen Auszügen aus dem Fibrin mit gewissen Schwierigkeiten verbunden. Es ist allgemein bekannt, wie leicht andererseits das Fibrin durch Bakterien zersetzt wird resp. fault. Trotz alledem kann bei Anwendung streng aseptischer Kautelen das aus Blutplasma gewonnene und vom Serum durch Auspressen befreite Fibrin steril erhalten bleiben: auch können aus ihm mit Chloroform oder mit thymolhaltigem Wasser sterile Auszüge gewonnen werden. Um die Extraktion des Fibrins nach Möglichkeit zu fördern, nimmt man sie bei 20—30° vor, wobei das Gemisch von Zeit zu Zeit umgerührt und geschüttelt wird. Das im Wasser suspendierte Fibrin muß namentlich während der ersten Tage vor Bakterien geschützt werden: nach Verlauf von einigen Tagen werden die wässerigen Fibrinlösungen nicht so leicht von Bakterien zersetzt, da sie mit jedem Tage mehr bakterienfeindliche Stoffe aus dem Fibrin in sich aufnehmen. Als antiseptica sind in dem Falle solche Stoffe anzuwenden, die später leicht entfernt werden können, wie Chloroform, Thymol, Aceton. Andere antiseptische Mittel können, obschon sie gegen die Zersetzung des Fibrins wirken, nicht angewandt werden, weil sie zu gleicher Zeit störend auf das glykolytische Prinzip einwirken. Hierher gehört z. B. das Phenol, welches in 0,5%iger Lösung auf einige Fermente wie z. B. die Lipase und andere keine schädigende Wirkung ausübt, die Tätig-

¹⁾ Zentralblatt f. Bakteriologie, Bd. XXXVIII, Heft 5, S. 571.

keit des glykolytischen Prinzips dagegen hemmt. — Sättigung der wässerigen Fibrinauszüge mit CO_2 steigert ebenfalls die bakterienfeindliche, sowie die glykolytische Wirkung derselben.

Dieser Befund bestätigt die früher von H. J. Hamburger¹⁾ gemachte Beobachtung, welcher ebenfalls eine die baktericiden Eigenschaften des Blutes und der zelligen Exsudate verstärkende Wirkung der CO_2 feststellen konnte. Nach Untersuchungen von Hamburger, Limbeck und anderen zeigen die Leukocyten unter Einwirkung von CO_2 nicht nur einen Gasaustausch, sondern auch eine Veränderung der festen und flüssigen Bestandteile. Die morphotischen Elemente quellen unter CO_2 -Einwirkung auf, und zwar infolge der Diffusion von Wasser, sowie von einigen festen Bestandteilen wie Chlor und dergleichen, sie werden aber ärmer an anderen Stoffen — wie Fett, Zucker und anderen. Möglicherweise muß die Wirkung des CO_2 auf wässrige Fibrinextrakte darauf bezogen werden, daß die CO_2 nicht nur die Leukocyten, sondern auch die in freiem oder gebundenem Zustande in der Lösung vorhandenen komplizierten Eiweißverbindungen beeinflusst, resp. auf bakterienfeindliche und glykolytische Substanzen aktivierend wirkt. Weitere Untersuchungen müssen in betreff der CO_2 -Wirkung Aufklärung schaffen. Hier aber will ich zur Bestätigung dessen, was ich bezüglich der Einwirkung der Kohlensäure auf das glykolytische Prinzip der wässerigen Fibrinauszüge gesagt habe, einige Versuche wiedergeben.

VIII. Versuch.

20 ccm von dem vierten wässerigen Auszuge, d. h. also einem Auszuge mit geringerem Gehalt an glykolytischem Prinzip wurden mit 2 ccm Zuckerlösung, welche 0,438 g Zucker entsprachen, vermennt. Vor Durchleitung von CO_2 durch dieses vierte Fibrinextrakt konnte kaum Glykolyse verzeichnet werden; es wurden nämlich im Laufe von 48 Stunden nicht mehr als 2% des angewandten Zuckers zersetzt. Das gleiche Fibrinextrakt zersetzte, nachdem die Kohlensäure darauf eingewirkt hatte, unter absolut identischen Verhältnissen (d. h. gleiche

¹⁾ Virchows Archiv, 1899, S. 56.

Mengen Zuckerlösung und Extrakt) im Laufe von 24 Stunden in einem Falle 9,4%, im anderen 11,6% des angewandten Zuckers.

IX. Versuch.

In einem Gemisch von 25 ccm des dritten wässerigen Fibrinauszuges und 2 ccm Zuckerlösung (oder 0,438 g Zucker) wurden nach 24 Stunden 0,082 g oder 18,9% des angewandten Zuckers zersetzt gefunden. Weiter wurde durch den nämlichen wässerigen Fibrinauszug, d. h. durch eine andere Portion CO_2 durchgeleitet und derselbe sodann auf sein Vermögen, Zucker zu zersetzen, wieder untersucht: hierbei stellte sich heraus, daß *ceteris paribus* jetzt 0,121 g oder 27,6% des verwandten Zuckers zersetzt worden waren.

Aus den eben angeführten Versuchen ist ohne weiteres zu ersehen, welche günstige Wirkung die Kohlensäure auf die glykolytische Funktion des Fibrinauszugs ausübt. In gleicher Weise wurden auch Untersuchungen angestellt, um den Einfluß der Temperatur auf diese glykolytische Funktion festzustellen. Es stellte sich dabei heraus, daß Erwärmen auf 100 und 120° das glykolytische Prinzip zerstört. Karbolsäure in 0,5%iger Konzentration, sowie Sublimat wirken störend auf die Glykolyse ein. Ebenso wirkt auch die Gegenwart von Chlornatrium, was aus folgendem Versuch zu ersehen ist.

X. Versuch.

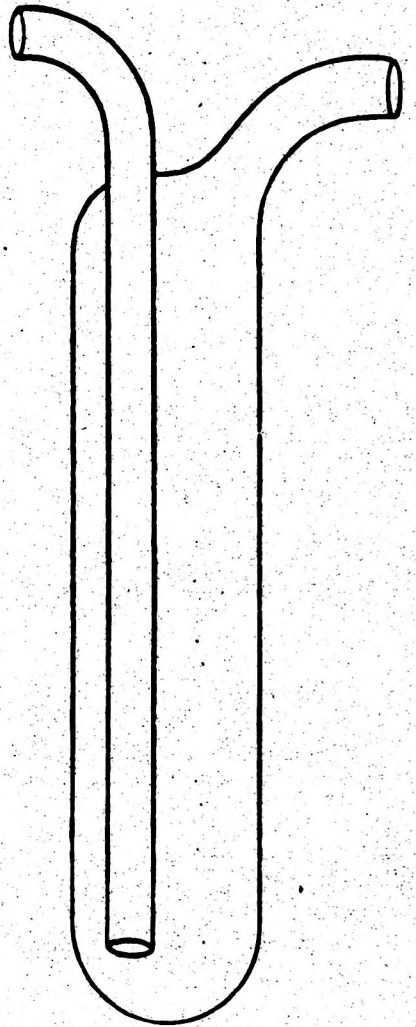
Es wurden 25 ccm des zweiten Fibrinauszuges mit 2 ccm Traubenzuckerlösung (= 0,4735 g Zucker) und 0,3 g ClNa vermengt. Nach Verlauf von 24 Stunden betrug der mit dem Polarisationsapparat bestimmte Zuckergehalt 0,3719 g, sodaß also 0,102 g oder 21,5% zersetzt worden waren.

Der gleiche zweite Auszug zersetzte ohne ClNa -Zusatz unter gleichen Verhältnissen 0,2078 g oder 43,8% Zucker.

Weiter wurden die früheren Beobachtungen bestätigt, nach denen Alkalien (nicht aber das Ammoniak) die Glykolyse fördern, Säuren dagegen störend auf dieselbe einwirken.

Sodann wurde der Verlauf der Glykolyse in Gegenwart verschiedener Gase, wie Wasserstoff, Kohlensäure und Sauerstoff, untersucht. — Die zu diesen Versuchen gebrauchten zu-

geschmolzenen Apparate waren mit zwei Röhren, einem Ableitungs- und einem Zuleitungsrohrchen, welche nach Durchleitung der entsprechenden Gase zugeschmolzen wurden, versehen. Jeder Versuch wurde mit dem betreffenden Gase zur Kontrolle doppelt ausgeführt. Die Gefäße, welche speziell zu diesen Versuchen dienten, waren von 2 Größen. In die kleineren (50 ccm Flüssigkeit fassenden) Gefäße wurden je 2 ccm Zuckerlösung und 20 ccm des vierten Fibrinextraktes (von gegen Diphtherie immunisierten Pferden gewonnen) samt Thymolstückchen hineingebracht. In die größeren (100 ccm fassenden) Gefäße kamen je 4 ccm Zuckerlösung und 50 ccm des vierten wässerigen Auszuges von normalem Fibrin. Die Gase passierten, ehe sie durch die Apparate geleitet wurden, konzentrierte H_2SO_4 . — Hier lasse ich die Versuche selbst folgen.



Zuckerzersetzung bei Gegenwart von CO_2 .

1. Bei einem Versuche mit 20 ccm des 4. Auszuges (aus Fibrin gegen Diphtherie immunisierter Pferde) und 2 ccm Zuckerlösung = 0,438 g Zucker waren nach 48 Stunden in einem Falle 0,295 g, im zweiten Falle 0,298 g unzersetzt zurückgeblieben: es waren folglich im ersten Falle 0,143 g oder 32,6%, im zweiten Falle 0,140 g oder 31,96% zersetzt worden.

2. Im Versuch mit 50 ccm des 4. Auszuges aus normalem Pferde-fibrin und 4 ccm Traubenzuckerlösung = 0,876 g Zucker wurden in einem Falle 0,219 g oder 25,1%, im zweiten Falle 0,226 g oder 25,8% zersetzt.

Zuckerzersetzung in einer Wasserstoffatmosphäre.

1. Bei einem Versuche mit 20 ccm des 4. (gegen Diphtherie immunisierter Pferde) Fibrinauszuges und 2 ccm Traubenzuckerlösung wurden während 48 Stunden in einem Falle 0,1639 g = 37,4%, im anderen Falle 0,152 g oder 34,7% des angewandten Zuckers zersetzt.

2. Im Versuch mit 50 ccm des 4. Auszuges des normalen Pferdefibrins und 4 ccm Traubenzuckerlösung waren in gleichem Zeitraume einmal 0,116 g = **13,2%**, das andere Mal 0,120 g = **13,8%** Zucker zersetzt worden.

Zuckerzersetzung in einer Sauerstoffatmosphäre.

1. Bei einem Versuche mit 20 ccm des gleichen 4. Fibrinauszuges (vom immunisierten Pferde) und 2 ccm Traubenzuckerlösung fanden sich nach 48 Stunden 0,201 g = **45,89%** in einem Falle und 0,220 = **50,2%** des verwandten Zuckers im zweiten Falle zersetzt.

2. Bei einem Versuch mit 50 ccm des 4. normalen Fibrinauszuges und 4 ccm Traubenzuckerlösung wurden in gleichem Zeitraume einmal 0,399 g oder **45,5%**, das andere Mal 0,412 g oder **47,0%** Zucker zersetzt.

Zuckerzersetzung bei Luftzutritt.

1. In einem Gemisch von 20 ccm des gleichen 4. Fibrinauszuges vom immunisierten Pferde und 2 ccm Traubenzuckerlösung waren im Laufe von 48 Stunden in einem Falle 0,079 g oder **18,04%**, im anderen Falle 0,084 g = **19,1%** zersetzt worden.

2. In dem Gemisch von 50 ccm des 4. Fibrinauszuges des normalen Pferdes und 4,0 ccm Traubenzuckerlösung fanden sich nach 48 Stunden einmal 0,219 g = **25,0%**, das andere Mal 0,208 g = **23,9%** des angewandten Zuckers zersetzt.

Alle gefundenen Zahlen stelle ich der besseren Übersicht wegen in nächstfolgender Tabelle zusammen.

Tabelle II.

Zuckerzersetzung in Gegenwart von			
Luft	CO ₂	H	O
und dem 2. Auszug von normalem Pferdefibrin			
in %	in %	in %	in %
23,9—25,0	25,1—25,8	13,2—13,8	45,5—47,0
und dem 4. Auszug des Fibrins von gegen Diphtherie immunisierten Pferden			
in %	in %	in %	in %
18,04—19,1	31,96—32,6	34,7—37,4	45,88—50,0

Aus den in die Tabelle aufgenommenen Zahlen, welche die Zersetzung des Zuckers bei Gegenwart von verschiedenen Gasen und in der gewöhnlichen Luft illustrieren sollen, ist zu

ersehen, daß in allen 4 Fällen Zuckerzersetzung stattgefunden hat. Diese Versuche beweisen zugleich, daß bei Abwesenheit des Sauerstoffs sich wohl Zucker zersetzen kann, jedoch weniger intensiv, als wie in Gegenwart dieses Gases. Jedenfalls begünstigt der Sauerstoff diese Zersetzung. Außerdem muß hervorgehoben werden, daß ein gewisser Unterschied besteht in der Wirkung der Auszüge von normalem Fibrin und von solchem Fibrin, welches von immunisierten Tieren stammt. Der bedeutendste Unterschied ist in diesen Fällen in der Wasserstoffatmosphäre zu verzeichnen. Daß dieses verschiedene Verhalten von Auszügen des normalen und des von immunisierten Tieren gewonnenen Fibrins nicht ausnahmslos in allen Fällen, wohl aber ziemlich oft zu beobachten war, so ist es nicht unmöglich, daß der Grund hierzu in dem komplizierten und zugleich variablen Bestand der wässerigen Auszüge dieser Fibrinsorten verschiedenen Ursprungs zu suchen ist. Ich habe auch Fälle beobachtet, in denen die Fibrinauszüge von immunisierten Tieren in reiner Sauerstoffatmosphäre geringere Glykolyse gezeigt haben als in der Luftatmosphäre. Der Umstand, daß die Glykolyse in Abwesenheit von Sauerstoff vor sich geht, kann in verschiedener Weise gedeutet werden. Man könnte annehmen 1. daß die Glykolyse kein Oxydationsprozeß ist, 2. daß die Zuckerzersetzung nicht nur durch gasförmigen, sondern ebensogut durch in Lösung befindlichen oder locker gebundenen Sauerstoff bewirkt werden kann und 3. daß der glykolytische Prozeß ein komplizierter Vorgang ist, welcher sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzt oder auch vielleicht aus verschiedenen Phasen, die ihre Entstehung verschiedenen Prinzipien verdanken, besteht. Gegen die erste Voraussetzung sprechen einerseits direkte Beobachtungen, welche gezeigt haben, daß bei der Glykolyse Sauerstoffverbrauch, sowie andererseits CO_2 -Bildung stattfindet, andererseits aber der Umstand, daß in Gegenwart von Sauerstoff beinahe die doppelte Menge Zucker zersetzt wird. Es ist allerdings wahr, daß die Mengen des bei der Glykolyse verbrauchten Sauerstoffs und der darauf ausgeschiedenen CO_2 der Menge des zersetzten Zuckers nicht entsprechen, was nicht zu bestreiten ist, wenn nur der gasförmige Aggregatzustand

des Sauerstoffes sowie der CO_2 in Betracht dabei gezogen wird, nicht aber derjenige Teil der Gase, welcher in der Lösung etwa an die Oxydasen gebunden enthalten sein kann.

Durch frühere Untersuchungen von verschiedenen Forschern und ebenso durch die unserigen ist festgestellt worden, daß im Fibrin, als solchem, sowie in seinen Auszügen verschiedene fermentartige oxydierende Substanzen resp. Oxydasen enthalten sind. Weitere Untersuchungen haben uns belehrt, daß die Zusammensetzung des Fibrins und seiner Auszüge eine höchst komplizierte und mannigfaltige ist. Es stellte sich heraus, daß nicht nur verschiedene Eiweißkörper, Oxydationsfermente, sondern auch andere zum Teil fermentartige, zum Teil ihnen nahe stehende Substanzen darin enthalten sind. Um hierüber Aufklärung zu verschaffen, war es in erster Linie nötig, die in Fibrin selbst und in seinen Auszügen vorhandenen verschiedenen Agentien, unter anderem auch die Oxydationsfermente, möglichst vollkommen von den anderen Prinzipien zu isolieren, um sie dann auf die ihnen zukommenden Eigenschaften prüfen zu können. Dabei muß hervorgehoben werden, daß das fraktionierte Extraktionsverfahren des Fibrins gerade von Nutzen war, um die Oxydasen in ziemlich gereinigtem Zustand und relativ frei von anderen Prinzipien zu erhalten.

Es ist mir dabei gelungen, durch mehrmals wiederholtes Ausfällen und darauf folgendes Auflösen die wasserlösliche Oxydase, welche mit Guajactinktur die charakteristische Blaufärbung ergibt und welche mittels Kohlensäure aus der Lösung abgeschieden werden kann, so weit zu reinigen, daß sie die glykolytische Wirksamkeit nicht mehr zu besitzen scheint. Diese Wirkung bleibt in diesem Falle der Lösung, resp. der von dem CO_2 -Niederschlag abfiltrierten Flüssigkeit erhalten. In derselben Lösung sind aber auch noch andere Oxydationsfermente zugegen, welche durch verschiedene Reaktionen nachgewiesen werden können: wie Superoxydasen, Oxydasen und indirekte Oxydasen, daneben auch andere Agentien und Substanzen. Weitere Untersuchungen müssen uns Aufklärung darüber verschaffen, inwiefern die glykolytische Funktion irgend einem der verschiedenen oxydierenden Agentien zukommt, oder ob

sie von einem mit-vorhandenem und niedergeschlagenen spezifischen Prinzip, welches nichts mit den Oxydationsfermenten zu tun hat, (abhängt, ob eventuell die Glykolyse ein komplizierter Vorgang ist, welcher durch Zusammenwirkung verschiedener Komponenten zustande kommt, und an welchem die Oxydasen auch ihren Anteil haben. Bevor wir zur Aufklärung der verschiedenen, noch nicht gelösten Fragen schreiten, können wir uns über die Frage, welchen Agentien die Glykolyse zukommt, nur mit Vorsicht äußern und aus dem gleichen Grund wollen wir auch die verschiedenen Theorien und Ansichten verschiedener Forscher, welche diese Frage betreffen, vorläufig ebenfalls unberührt lassen.

Zum Schluß will ich kurz die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung formulieren:

1. Das Zustandekommen der Glykolyse ist von einem strengen relativen Verhältnis zwischen dem glykolytischen Prinzip und dem Objekt, d. h. dem Zucker abhängig.

2. Dieses Ergebnis schließt die Mitwirkung der Bakterien bei der Glykolyse aus und rechtfertigt die Beobachtungen früherer Forscher.

3. Die Mitwirkung der Bakterien bei der Glykolyse ist außerdem durch direkten Nachweis der bakterienfeindlichen Stoffe im Fibrin definitiv ausgeschlossen.