

Über den Einfluß von Phosphatiden auf die Blutgerinnung.

Von

C. A. Pökelharing.

(Der Redaktion zugegangen am 30. November 1913.)

Die von A. Schmidt zymoplastische Substanzen genannten alkohollöslichen Bestandteile von Blut und Organen sind in der letzten Zeit bei Untersuchungen über die Gerinnung des Blutes wieder in den Vordergrund gebracht.

In der Sitzung des Physiologenkongresses in Wien (1910) teilte Freund mit, daß Lecithin bei Anwesenheit von CaCl_2 und ebenso das Kalksalz von Dioleinglycerinphosphorsäure als zymoplastische Substanz wirkt und in fermentarmem Plasma Gerinnung hervorruft. Zak¹⁾ fand, daß eine Emulsion von mit Aceton aus dem Petroleumätherextrakt von Gehirnschubstanz gefällten Phosphatiden die Gerinnung von Citratplasma, nach Zusatz von Kalksalz, fördert und daß mit Petroleumäther extrahiertes Citrat- oder Oxalatplasma mit CaCl_2 nicht mehr gerinnt, wohl aber wenn außerdem einige Tropfen einer Emulsion von Phosphatiden zugesetzt werden. Zak schließt hieraus, daß die Annahme einer Kinase nach Morawitz überflüssig erscheint, oder aber, daß die Phosphatide die Rolle einer Kinase spielen.

Bald darauf bemerkten Bordet und Delange, daß sie die Rolle der Lipide bei der Gerinnung schon ganz genau angegeben hatten.²⁾ «Wir haben», so drücken diese Autoren sich aus, «erwiesen, daß man diese Lipide eigentlich als die unter dem Namen von Thrombokinase oder Cytosym bezeichnete Vorstufe des Fibrinferments betrachten muß.» Sie

¹⁾ Archiv f. exp. Path. und Pharm.. Bd. 70, S. 27.

²⁾ Ibidem, Bd. 71, S. 293.

verweisen nach einer Mitteilung,¹⁾ in welcher sie beschrieben haben, daß durch Ausziehen von sorgfältig mit Kochsalz ausgewaschenen Blutplättchen mit Alkohol eine in Toluol, Petroleumäther, Chloroform lösliche, in Aceton aber sehr wenig lösliche Substanz erhalten wird, welche, bei Anwesenheit von löslichen Kalksalzen, die Gerinnung von Oxalatplasma stark fördert. Diese Substanz nennen sie Cytozym. Den Sachverhalt bei der Bildung des Fibrinferments beschreiben sie in diesen Worten: «l'Agent de la coagulation, le fibrin ferment ou thrombine, est considéré actuellement comme résultant de la réaction de deux substances mères, l'une existant en abondance dans de nombreuses cellules, l'autre provenant selon toute vraisemblance du plasma sanguin lui-même et que l'on retrouve dans le sérum. La première c'est le cytozyme; la seconde c'est le thrombogène, ou suivant notre terminologie, le sérozyme.»

Auch aus Muskeln und aus Fleischpepton erhielten Bordet und Delange, durch Extraktion mit Alkohol, Stoffe, welche in derselben Weise wie das Cytozym aus Blutplättchen auf die Gerinnung wirkten. Sie nehmen also an, daß diese Stoffe die von Morawitz der Thrombokinase zugewiesene Rolle spielen, obgleich es einen wichtigen Unterschied gibt, in dieser Hinsicht, daß die mit Wasser bereiteten Gewebsextrakte ihre Fähigkeit, die Gerinnung zu fördern, durch Erhitzen verlieren, während die Lipide, in Wasser suspendiert und gekocht, ihre Wirksamkeit behalten.

Gegen die Gleichstellung von Thrombokinase mit Lipoiden hat Rumpf Einspruch erhoben.²⁾ Er vermischte Oxalatplasma einerseits mit aus Gehirn bereiteten, in Kochsalz aufgenommenen Phosphatiden, andererseits mit mittels Kochsalzlösung bereitetem Leberextrakt und setzte dann CaCl_2 hinzu. In unter sich gut vergleichbaren Versuchen fand er die Wirkung der Thrombokinase viel kräftiger als diejenige der Phosphatide. Auch wenn eine reine Fibrinogenlösung mit Serum vermischt wurde, fand

¹⁾ Annales et Bulletin de la Soc. Royale d. Sc. méd. et natur. de Bruxelles, 70^e Année, p. 404.

²⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 55, S. 101.

er nach Zusatz von Leberextrakt eine starke Förderung der Gerinnung, während Zusatz von Lipoiden zwar einigen, aber doch nur einen sehr geringen Einfluß hatte. Ebenso wie Zak fand Rumpf, daß Oxalatplasma die Fähigkeit, mit CaCl_2 zu gerinnen, durch Extraktion mit Petroläther einbüßt, dieselbe aber wieder erhält durch Zusatz von Lipoiden. Jetzt aber blieb das Plasma nach Zusatz von Leberextrakt und CaCl_2 flüssig. Dennoch hat man, nach Rumpf, noch nicht das Recht, daraus zu schließen, daß Lipide für die Thrombinbildung notwendig sind. Er bemerkt, daß bei einem so komplizierten Gemenge, wie es das Plasma ist, entschieden auch an andere Möglichkeiten gedacht werden muß.

Von der Richtigkeit dieser Bemerkung habe ich mich überzeugen können. Es ist nicht die Entfernung von Lipoiden, welche die Gerinnungsfähigkeit des mit Petroläther extrahierten Plasmas ganz oder nahezu aufhebt.

In meinen Versuchen fand die Behandlung des Plasmas mit Petroläther in der Weise statt, daß eine gut verschlossene Flasche mit 50 ccm Oxalatplasma vom Pferd oder vom Rind und 30 ccm Petroläther vertikal in einem Ring befestigt und um eine horizontale Axe langsam gedreht wurde. Der Inhalt der Flasche wurde so etwa 10 Stunden lang vorsichtig geschüttelt und dann in den Scheidetrichter gebracht. Das abgelassene, ein wenig trübe gewordene Plasma gerann nach Zusatz von CaCl_2 , entweder gar nicht oder sehr langsam und unvollständig, schnell und vollkommen aber, wenn außerdem auch noch einige Tropfen einer Emulsion von Phosphatiden in 0,9% igem NaCl hinzugesetzt wurden. Als Phosphatide verwendete ich aus Alkoholextrakt von Eidotter mittels Aceton hergestelltes Lecithin, oder die Acetonfällung aus Chloroformextrakt von vorher mit wasserfreiem Natriumsulfat getrockneter und zerriebener Rindsleber. In beiden Fällen war das Lecithin durch Auflösen in Petroläther und nochmalige Fällung mit Aceton gereinigt worden. In der Wirkung der beiden Präparate habe ich keinen Unterschied bemerken können.

Das Plasma konnte aber auch durch Chlorcalciumzusatz zur Gerinnung gebracht werden ohne jede Mithilfe von Phos-

phatiden, wenn nämlich durch das Plasma während einiger Zeit Luft und dann während einzelner Minuten Kohlensäure hindurchgeführt wurde. Das Plasma war dann wieder ebenso klar wie vor der Behandlung mit Petroläther und gerann jetzt schnell und vollkommen nach Chlorcalciumzusatz, während Zusatz von Phosphatiden keinen Einfluß mehr zeigte.

Hier folgen ein paar Beispiele.

Oxalatplasma Pferd, 10 Stunden mit Petroläther geschüttelt.

Unverändertes Plasma	CaCl ₂ 1%	Lecithin	Geronnen
5 ccm	5 Tropfen	—	in 5 Minuten
5 „	5 „	5 Tropfen	„ 4 „
Petrol. Plasma	CaCl ₂ 1%	Lecithin	Geronnen
5 ccm	5 Tropfen	—	nach 4 Std. sehr unvollständig
5 „	5 „	5 Tropfen	5 Minuten
Luftstrom 20 Stunden.			
5 ccm	5 Tropfen	—	langsam und unvollständig
5 „	5 „	5 Tropfen	desgl.
CO ₂ 5 Minuten.			
5 ccm	5 Tropfen	—	10 Minuten
5 „	5 „	5 Tropfen	10 „

Oxalatplasma Rind, 9 Stunden mit Petroläther.

Plasma	CaCl ₂ 1%	Lecithin	Geronnen
5 ccm	5 Tropfen	—	gerinnt nicht
5 „	5 „	3 Tropfen	in 5 Minuten

Luftstrom hindurchgeführt 20 Stunden.

Gerinnt nicht mit CaCl₂, auch nicht nach Zusatz von Lecithin.

CO₂ hindurchgeleitet 5 Minuten.

Plasma	CaCl ₂ 1%	Lecithin	Geronnen
5 ccm	5 Tropfen	—	in 6 Minuten
5 „	5 „	3 Tropfen	„ 6 „

Die Unfähigkeit des mit Petroläther geschüttelten Oxalatplasmas, auf Zusatz von CaCl₂ allein zu gerinnen, ist also nicht, wie Zak und Bordet und Delange ohne weiteres annehmen, dem Verlust an Lipoiden zuzuschreiben. Beim anhaltenden Schütteln mit Petroläther (beim ruhigen Stehen unter Petroläther ändert sich die Gerinnungsfähigkeit des Plasma nicht) wird ein Teil desselben als sehr feine Emulsion in das Plasma aufgenommen. Die Veränderung, welche dadurch im Plasma hervorgerufen wird, kann wieder rückgängig gemacht werden

durch das Vertreiben des Äthers mittels eines Luftstromes. Nur muß dann der damit einhergehende Verlust an Kohlensäure wieder kompensiert werden. Man könnte zur Erklärung der Wirkung von Phosphatiden auf das Petroläther enthaltende Plasma Hypothesen aufstellen; ich glaube aber nicht, daß man einstweilen damit weiter kommen kann. Dazu ist die Kenntnis des Blutplasmas, mit allen seinen colloiden und anderen schlecht oder gar nicht bekannten Bestandteilen, noch zu dürftig. Eben- sowenig scheint es mir jetzt möglich, eine genügende Erklärung zu finden für die öfters beobachtete Förderung der Gerinnung durch Zusatz von Lipoiden zu Plasma, das gar nicht mit Petroläther in Berührung gekommen ist.

Ich habe aber nachzuforschen versucht, ob diejenigen Bestandteile des Plasmas, welche nachgewiesenermaßen bei der Gerinnung eine Rolle spielen, durch Berührung mit Petroläther beeinflußt werden.

Eine reine Fibrinogenlösung, welche nach Zusatz von CaCl_2 in 24 Stunden keine Spur von Fibrin ausschied, wurde, in derselben Weise wie das Plasma, mit Petroläther geschüttelt. Ein beträchtlicher Teil des Fibrinogens setzte sich dabei als eine gallertige Masse in dem Petroläther ab. Es blieb aber in der untenstehenden Flüssigkeit noch genug für die weitere Untersuchung gelöst. Diese Flüssigkeit gerann nach Zusatz von nach Schmidt bereitetem Fibrinferment vollkommen. Zusatz von Phosphatidenemulsion hatte auf die Gerinnung nicht den geringsten Einfluß.

Bei der weiteren Arbeit bin ich von der schon vor mehr als 20 Jahren von mir ausgeführten Auffassung¹⁾ ausgegangen, welche darauf herauskommt, daß Nucleoproteide verschiedener Herkunft durch Berührung mit löslichen Kalksalzen derartig verändert werden, daß sie die Wirkung des von A. Schmidt entdeckten Fibrinferments ausüben können. Bei dieser Auffassung wird die Gerinnung des Blutes so erklärt, daß, wenn z. B. das Blut in einer Schale aufgefangen wird, von den geformten Elementen des Blutes, in erster Linie wohl von den

¹⁾ Untersuchungen über das Fibrinferment. Kon. Akad. v. wetensch. Amsterdam. 2. Sectie, Deel I. Nr. 3, 1892.

Blutplättchen, herkommende Nucleoproteide in Lösung kommen und, mit Hilfe der im Blut vorhandenen Kalksalze, Fibrin-ferment liefern. Daß die zwei von Morawitz gegen diese Auffassung gemachten Einwände nicht unwiderleglich sind, glaube ich früher schon nachgewiesen zu haben.¹⁾

Ich hatte mir also jetzt die Frage vorzulegen, ob, da es sich herausgestellt hatte, daß das Fibrinogen von Petroläther nicht gerinnungsunfähig gemacht wird, die Nucleoproteide des Plasmas, wenn Petroläther in die Lösung, in welcher sie sich befinden, in feiner Emulsion aufgenommen wird, in der Fermentbildung gehindert werden und ob vielleicht das schon gebildete Ferment dadurch in seiner Wirksamkeit geschädigt wird.

Die Nucleoproteide wurden, in der früher von mir beschriebenen Weise, durch Ausfällen von verdünntem Oxalatplasma mit Essigsäure bereitet. Der möglichst gut gereinigte Niederschlag wurde teilweise in Wasser mit so wenig Natriumcarbonat, daß die Reaktion neutral wurde, gelöst, teilweise in 1%iger Kochsalzlösung mit Kalkwasser und nachfolgender Durchleitung erst von Kohlensäure, dann von atmosphärischer Luft. Die mit Kalkwasser hergestellte Lösung («Ca-Nucleoproteid») wirkte genau wie Fibrinferment, die mit Soda hergestellte Lösung («Na-Nucleoproteid») machte Fibrinogen nur dann gerinnen, wenn zu gleicher Zeit Kalksalz in der Lösung vorhanden war.

Von solchen Lösungen wurden wieder je 50 ccm mit 30 ccm Petroläther 9 bis 10 Stunden lang vorsichtig geschüttelt. Dann wurde die Fähigkeit, Gerinnung hervorzurufen, untersucht. Als Reagens verwendete ich Fibrinogenlösungen, welche mit CaCl_2 allein in 24 Stunden nicht die geringste Gerinnung zeigten.

Es stellte sich heraus, daß die Wirkung des Petroläthers auf das Na-Nucleoproteid von derselben Art war, wie diejenige auf das Oxalatplasma.

Von einer mit Petroläther behandelten Na-Nucleoproteidlösung wurden in 3 Röhrchen, A, B und C, je 2 ccm gebracht. An B wurden 4 Tropfen Lecithinemulsion zugesetzt, durch C

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 11, S. 1 u. Diese Zeitschr., Bd. 85, S. 34.

wurde während 2 Minuten ein CO_2 -Strom, dann während 5 Minuten ein Luftstrom hindurchgeführt. Schließlich wurden jedem Röhrchen 2 Tropfen 1%ige CaCl_2 - und 5 ccm Fibrinogenlösung hinzugesetzt.

A fängt nach 1 Stunde zu gerinnen an und ist nach 75 Min. ganz fest.
B ist in 2 Minuten vollständig geronnen.

C „ „ 15 „ „ „ „

In einem anderen Fall wurde gefunden:

Fibrinogen	Na-Nucl.-Petr.	CaCl_2	Lecithin	Gerinnung
4 ccm	3 ccm	3 Tropfen	—	gerinnt nicht
4 „	3 „	3 „	4 Tropfen	in 27 Minuten.

Eine halbe Stunde Luft hindurchgeleitet. Jetzt bei Mischung in denselben Verhältnissen, ohne Lecithin Gerinnung in 15, mit Lecithin in 5 Minuten.

Weiter wurden Versuche mit Nucleoproteiden aus der Milz des Rindes angestellt. Das Wasserextrakt des Organs wurde in derselben Weise behandelt wie das Blutplasma. Die Nucleoproteide wurden mit Essigsäure gefällt, in sehr verdünntem Alkali gelöst, nochmals mit Essigsäure gefällt und dann nach wiederholtem Auswaschen mit Wasser entweder in Soda oder in Kochsalz und Kalkwasser gelöst. In beiden Fällen reagierte die Lösung neutral.

5 ccm Fibrinogen mit 1 ccm unverändertem Na-Nucleoproteid und 2 Tropfen 1%iger CaCl_2 gerinnt in 65 Minuten. Nach Schütteln mit Petroläther in demselben Verhältnis gemischt, gerinnt nicht.

Durch die Lösung 5 Minuten CO_2 , dann 15 Minuten Luft geleitet. Dann in demselben Verhältnis mit Fibrinogen und CaCl_2 vermischt, gerinnt in 60 Minuten.

In einem anderen Fall:

Na-Nucleopr. (Milz)	Fibrinogen	CaCl_2	Lecithin	Gerinnt
4 ccm	4 ccm	2 Tropfen	—	in 19 Minuten
4 „	4 „	2 „	4 Tropfen	„ 13 „
Mit Petroläther geschüttelt.				
4 ccm	4 ccm	4 Tropfen	—	in 43 Minuten
4 „	4 „	4 „	4 Tropfen	„ 13 „
Luftstrom 5 Stunden.				
4 ccm	4 ccm	4 Tropfen	—	in 7 Minuten
4 „	4 „	4 „	4 Tropfen	„ 7 „

Anders ist es, wenn das Nucleoproteid schon vor dem Schütteln mit Petroläther mit Kalk behandelt worden ist, wie aus den folgenden Beispielen hervorgeht.

In 4 Röhren wurden je 8 ccm Fibrinogenlösung vermischt mit 1 ccm Lösung von Ca-Nucleoproteid aus Plasma, A unverändert, B mit Petroläther geschüttelt, mit oder ohne Lecithin.

A ohne Lecithin	gerinnt in 15 Minuten
mit 4 Tropfen Lecithin	» » 15 »
B ohne Lecithin	» » 60 »
mit 4 Tropfen Lecithin	» » 60 »

Nachdem durch die mit Petroläther geschüttelte Lösung während 7 Stunden ein Luftstrom hindurchgeführt worden war, zeigte sich die Wirkung ein wenig kräftiger, Lecithin hatte aber auch jetzt keinen Einfluß auf die Gerinnung. 1 ccm der Lösung mit 8 ccm Fibrinogen:

ohne Lecithin	in 45 Minuten geronnen
mit 4 Tropfen Lecithin	» 45 »

In einem anderen Fall, beim Gebrauch einer sehr wirksamen Ca-Nucleoproteidlösung aus Plasma, wurde sogar die Gerinnung unter dem Einfluß der mit Petroläther geschüttelten Lösung bei Lecithinzusatz ein wenig verzögert gefunden.

Ca-Nucleoproteid unverändert	Fibrinogen	Lecithin	Gerinnt
0,5 ccm	4 ccm	—	in 2 Minuten
0,5 »	4 »	4 Tropfen	» 2 »
Mit Petroläther.			
0,5 ccm	4 ccm	—	in 2 Minuten
0,5 »	4 »	4 Tropfen	» 3 »

Ist also das Nucleoproteid einmal der Kalkwirkung unterworfen gewesen, so übt Lecithinzusatz nicht den geringsten fördernden Einfluß auf die Gerinnung einer reinen Fibrinogenlösung mehr aus. Das tritt aber nicht hervor, wenn man als Reagens, statt Fibrinogen, Plasma verwendet, in welchem sich so viele andere Bestandteile vorfinden.

Von derselben Ca-Nucleoproteidlösung, welche im letzt-erwähnten Versuch gebraucht wurde, je 2 ccm vermischt mit dem Oxalatplasma (Pferd), welches teilweise für die Bereitung der Nucleoproteide gebraucht war.

Mit 3 ccm Plasma	in 5 Minuten geronnen
" 3 " " und 4 Tropfen Lecithin	" 3 " "
" 4 " "	" 9 " "
" 4 " " und 4 Tropfen Lecithin	" 4 " "

Die Bestandteile des Plasmas, deren gerinnungshemmende Wirkung durch Lecithinzusatz neutralisiert wird, sind mittels Dialyse nicht, oder wenigstens nicht leicht, zu beseitigen.

Ein Teil desselben Oxalatplasmas wurde während 20 Stunden gegen eine reichliche Menge kalkfreier, 0,9%iger Kochsalzlösung dialysiert. Das überschüssige Oxalat war jetzt entfernt. 5 ccm des dialysierten Plasmas war, nach Zusatz von 1 Tropfen 1%iger Chlorcalciumlösung, in 4 Minuten fest geronnen. Das Ca-Nucleoproteid, welches, mit reinem Fibrinogen als Reagens, mit Lecithin gar nicht kräftiger wirkte als ohne dasselbe, machte auch dieses Plasma schneller gerinnen, wenn ein wenig Lecithin zugesetzt wurde. 1 ccm mit 4 ccm dialysiertem Plasma gerann in 7 Minuten, nach Zusatz von 4 Tropfen Lecithin dagegen in 3 Minuten.

Solchen Plasmabestandteilen wird es auch wohl zuzuschreiben sein, daß das mit Natriumcarbonat bereitete und mit Petroläther geschüttelte Nucleoproteid nach der Durchlüftung noch einigen Einfluß von Lecithin auf die Gerinnung nachweisen läßt. Es ist nämlich nicht wohl möglich, das mit Soda gelöste so gut wie das mit Hilfe von Kalkwasser gelöste Nucleoproteid zu reinigen. Meistens ist das Nucleoproteid, auch nach zweimaliger Fällung mit Essigsäure, mit ein wenig Fibrinogen verunreinigt. Infolgedessen bildet sich in der mit Kochsalz und Kalkwasser und dann mit Kohlensäure behandelten Lösung, beim Hindurchleiten von Luft, ein zwar kleines Fibringerinnsel, das aber genügt, um allerhand in der Flüssigkeit schwebende — und auch wohl gelöste kolloide und nicht-kolloide Stoffe einzuschließen. Schon im Jahre 1892 habe ich darauf aufmerksam gemacht und zu gleicher Zeit nachgewiesen, daß bei der Behandlung des verdünnten Plasmas mit Essigsäure mit den Nucleoproteiden Stoffe gefällt werden, welche die Gerinnung zu hemmen imstande sind.¹⁾

¹⁾ Unters. usw., S. 7.

Auch in Organextrakten kommen, wie ich früher nachgewiesen habe,¹⁾ Stoffe vor, welche die Gerinnung hindern können. So stellte es sich jetzt auch heraus, daß die Wirksamkeit von Nucleoproteiden aus der Milz, nicht nur wenn sie mit Soda gelöst waren und dann mit CaCl₂ und Fibrinogen vermischt wurden, sondern auch, wenn die Lösung mittels Kochsalz und Kalkwasser stattgefunden hatte, durch Lecithinzusatz verstärkt wird.

4 ccm Ca-Nucleoprotein aus Milz, vermischt mit 4 ccm Fibrinogen, A ohne, B mit 4 Tropfen Lecithinemulsion. A wurde erst am folgenden Morgen geronnen gefunden, während B nach 125 Minuten ganz fest war.

Die Nucleinproteide aus der Milz sind immer, auch nach wiederholtem Fällen mit Essigsäure und Auswaschen mit Wasser, stark mit Farbstoff und also auch wohl mit anderen Bestandteilen des Extraktes verunreinigt. Hier fällt aber die reinigende Wirkung eines sich gallertig ausscheidenden Fibringerinnsels fort.

Aus diesen Befunden geht, wie ich glaube, aufs neue hervor, wie groß die Gefahr ist für Fehlschlüsse, wenn man bei der Bearbeitung der Gerinnungsfrage als Reagenzien hauptsächlich Flüssigkeiten von so äußerst verwickelter Zusammensetzung verwendet wie Plasma, Serum, Preßsäfte und Organextrakte, in welchen sich neben gerinnungserregenden auch Stoffe vorfinden, welche die Gerinnung verzögern oder sogar ganz verhindern können. Wenn man beobachtet, daß ein Serum die Fähigkeit, Gerinnung hervorzurufen, in geringerem Maß besitzt als einige Tage zuvor, so hat man noch nicht das Recht, daraus mit Morawitz, mit Bordet und Delange zu schließen, daß dieses Serum Thrombin verloren hat. Es kann auch sein, daß im Serum Veränderungen stattgefunden haben, infolge deren die Thrombinwirkung erschwert wird. Daß diese Möglichkeit tatsächlich verwirklicht werden kann, habe ich in bezug auf das sogenannte Aktivieren des Blutserums nachgewiesen.

Ganz unbegreiflich scheint es mir, daß Bordet und Delange für den Nachweis von Fibrinferment Oxalatplasma

¹⁾ Biochem. Zeitschr., Bd. 11, S. 10.

weit vorziehen über «la solution dite pure de fibrinogène.»¹⁾ «Il serait étonnant», sagen diese Forscher, «que le fibrinogène ainsi (nach der Methode von Hammarsten) obtenu n'eût pas entraîné avec lui certaines matières capables, en présence de chaux, d'intervenir dans la coagulation.» Nun hat aber eine reichliche Erfahrung gezeigt, daß es sehr gut möglich ist, Fibrinogenlösungen zu bereiten, welche, auch nachdem sie mit Kalksalz vermischt sind, keine Spur von Gerinnung zeigen.

Bordet und Delange bemerken, daß es nicht immer gelingt, solche Lösungen zu erhalten. Man kann aber kaum eine Bereitungsmethode verwerfen, weil sie nicht ausnahmslos die gewünschten Ergebnisse liefert. Wenn man aber von durch kräftiges Zentrifugieren möglichst von geformten Elementen befreitem Plasma ausgeht, kommt es wohl sehr selten vor, daß, bei sorgfältiger Ausführung der Hammarstenschens Methode, dreimal gefälltes Fibrinogen noch mit Kalksalz allein Gerinnung zeigt. Was Bordet und Delange «étonnant» nennen, ist die Regel, was sie wahrscheinlich achten, die Ausnahme. Diese Autoren haben aber noch einen anderen Einwand. Auch wenn eine Fibrinogenlösung mit Kalk allein nicht gerinnt, dann kann dieselbe, ihrer Meinung nach, noch wohl mit etwas anderem verunreinigt sein, das, mit Kalk und einem zweiten Stoff, Thrombin bilden könnte. Deshalb erachten sie es «beaucoup plus prudent, pour déceler uniquement une thrombine déjà toute formée, d'opérer en milieu décalcifié. Tout en satisfaisant à cette condition, le plasma oxalaté, d'autre part, se rapproche autant qu'il est possible, par sa composition, du liquide sanguin normal.»

Dabei wird ganz außer acht gelassen, daß eben eine Hammarstenschensche Fibrinogenlösung der Forderung eines «milieu décalcifié» vorzüglich genügt, und daß man ohne Nachteil, wenn man das wünscht, ein wenig Oxalat daran hinzufügen kann. Weshalb es als ein Vorteil betrachtet wird, als Reagens auf Thrombin eine Flüssigkeit, welche dem normalen Blutplasma in Zusammensetzung möglichst gleich ist, zu verwenden, geht aus den Mitteilungen von Bordet und Delange nicht

¹⁾ Ann. d. l'Inst. Pasteur, Bd. 26, S. 658.

hervor. Hätten sie, statt Oxalatplasma, eine reine Fibrinogenlösung als Reagens auf Thrombin gebraucht, so würden sie wohl nicht zu dem Schluß gekommen sein, daß das alkohollösliche Cytosym für die Thrombinbildung unentbehrlich ist.

Daß Phosphatide die Gerinnung fördern können, ist nicht zu bezweifeln. Es gibt aber keinen einzigen guten Grund für die Annahme, daß dabei «la thrombine naît de la réaction du sérozyme avec le cytozyme».¹⁾ Im Gegenteil, das Thrombin kann ganz gut gebildet werden in einem, durch Extraktion mit Petroläther, möglichst von Phosphatiden befreiten Plasma, wenn nur dafür gesorgt wird, daß der Äther aus dem Plasma entfernt und der dabei entstehende Kohlensäureverlust wieder ausgeglichen wird.

Auf die Wirkung des einmal gebildeten Fibrinferments haben die Phosphatide keinen Einfluß. Das ist aus den Beobachtungen hervorgegangen, in welchen reines Fibrinogen als Reagens und möglichst gut gereinigte Nucleoproteide als Fermentquelle gebraucht wurden. Auch auf das aus Blutserum nach Schmidt bereitete Ferment hat Lecithin keinen Einfluß.

6 ccm Schmidtches Ferment wurden gemischt mit 4 ccm Fibrinogen. Das Gemisch wurde sogleich in zwei gleiche Hälften verteilt. Dann wurden der einen Hälfte 4 Tropfen Lecithin-Emulsion zugefügt. Beide Hälften waren zu gleicher Zeit, nach 90 Minuten, geronnen.

Das tritt aber, wie oben erwähnt worden ist, nicht klar zutage, wenn als Reagens Plasma, oder als Ferment eine unreine Lösung von mit Kalk behandelten Nucleoproteiden gebraucht wird. Blutplasma, zumal wenn es einige Tage gestanden hat, und Organextrakte enthalten offenbar Stoffe, welche der Bildung oder der Ausscheidung des Fibrins entgegenwirken und durch Phosphatide unschädlich gemacht werden. Ob das dieselben Stoffe sind, oder andere als diejenigen, welche die Thrombinbildung unter dem Einfluß von Kalksalzen hindern, ist augenblicklich gar nicht zu sagen.

Es kommt auch vor, daß Lecithin die Gerinnung verzögert.

¹⁾ Ann. et Bull. de la Soc. Royale, l. c.

Ein deutliches Beispiel sah ich davon bei der Untersuchung von Nucleoproteiden aus der Submaxillardrüse des Rindes.

Das Organ wurde zerkleinert, erst zweimal mit Wasser, dann einmal mit 0,05%igem Na_2CO_3 , und darauf wiederholt mit Wasser ausgezogen und ausgepreßt, bis die Flüssigkeit den schleimigen Charakter ganz verloren hatte. Jetzt wurde die ausgepreßte Substanz über Nacht mit 0,05%igem Na_2CO_3 in Berührung gelassen. Obgleich durch die vorhergehende Behandlung schon ein beträchtlicher Teil der Nucleoproteide entfernt worden war, lieferte dennoch das letzte Extrakt mit Essigsäure einen reichlichen Niederschlag, welcher wenigstens größtenteils aus Nucleoproteiden bestand. Eine klare Lösung desselben in 0,2%igem HCl wurde, nach Digestion mit Pepsin, bald trübe und es bildete sich ein großes Sediment von Nuclein. Diese in der üblichen Weise gereinigten Nucleoproteide, mit Hilfe von ein wenig Soda in Wasser gelöst, riefen allein keine Gerinnung von Fibrinogen hervor, wohl aber mit Hilfe von CaCl_2 . Zusatz von Lecithin förderte die Gerinnung.

Die mit Kochsalz und Kalkwasser hergestellte und dann mit CO_2 und Luft behandelte Lösung der Nucleoproteide wirkte als Fibrinferment, jetzt aber verzögerte Lecithin, in der gewöhnlichen Menge zugesetzt, die Gerinnung.

In 5 Röhrchen wurden je 4 ccm dieser Ca-Nucleoproteidlösung und 4 ccm Fibrinogenlösung gebracht.

I. ohne weiteres	in 65 Minuten geronnen
II. mit 1 Tropfen Lecithin	› 60 › ›
III. › 2 › ›	› 89 › ›
IV. › 3 › ›	› 161 › ›
V. › 4 › ›	› 210 › ›

Die hier gebrauchten Nucleoproteide waren wohl mit mehr oder weniger verändertem, von der Essigsäure mitgefälltem Mucin verunreinigt. Diese und auch wohl andere Beimischungen waren wahrscheinlich die Ursache der ungewöhnlichen Lecithinwirkung. Ob die sehr geringfügige Vermehrung der Gerinnungsgeschwindigkeit — von 65 bis auf 60 Minuten — nach Zusatz von einem Tropfen der Lecithinemulsion der Wirkung der Phosphatide oder zufälligen Verhältnissen zuzu-

schreiben sei, wäre erst durch eine ausführliche darauf bezügliche Versuchsreihe zu entscheiden.

Neuerdings ist eine zweite Mitteilung von Zak erschienen,¹⁾ in welcher die Rolle der Phosphatide bei der Gerinnung weiter behandelt wird. Bekanntlich gerinnt Oxalatplasma, wenn es durch Sedimentieren im Eisschrank oder durch Filtration durch ein Berckefeld-Filter²⁾ möglichst gut von geformten Elementen befreit worden ist, nach Zusatz von Kalksalz sehr langsam oder gar nicht. Zak fand nun, daß so behandeltes Plasma wieder sehr schnell nach CaCl_2 -Zusatz gerann, wenn es mit ein wenig einer Emulsion von Gehirnphosphatiden versetzt wurde. Daraus darf aber nicht gefolgert werden, daß die Phosphatide als eine Thrombokinase, im Morawitzschen Sinne, wirken. Infolge der Entfernung der geformten Bestandteile kommen ja weniger Nucleoproteide im Plasma in Lösung. Die, wie oben nachgewiesen, im Plasma vorhandenen Stoffe, welche der Thrombinbildung und der Fibrinausscheidung entgegenwirken, haben selbstverständlich im nucleoproteidarmen Plasma eine größere Bedeutung als im normalen. Wird aber der entgegenwirkende Einfluß durch Zusatz von Phosphatiden aufgehoben, so kann die Thrombinbildung stattfinden, und gerinnt das Plasma.

Weiter wies Zak nach, daß nicht alle lipoiden Substanzen, sondern speziell die Phosphatide in der beschriebenen Weise wirksam sein können. Aus Erythrocyten erhielt er mit Petroläther ein Extrakt, welches der Gerinnung von Oxalatplasma entgegenwirkte. Die mit Petroläther ausgezogenen Blutkörperchen dagegen förderten die Gerinnung. Zak schreibt offenbar diese fördernde Wirkung Phosphatiden zu, welche durch die Extraktion nicht völlig entfernt sein würden. Dabei wird aber außer Betracht gelassen, daß, wie ich früher betont habe,³⁾ auch aus den Erythrocyten mit Kalk Fibrinferment liefernde Nucleoproteide zu erhalten sind. Hieraus war es möglich zu erklären, daß zwar in Hirudinblut, nicht aber in gut von geformten Be-

1) Archiv f. exp. Path. und Pharm., Bd. 74, S. 1.

2) Cramer and Pringle, Quart. Journ. of exp. Physiol, Vol. 6, p. 1.

3) Untersuchungen usw., S. 24.

standteilen befreitem Hirudinplasma durch Verdünnung mit Wasser Gerinnung hervorgerufen wird, und daß Fluorblut nach Zusatz einer sehr geringen Menge einer konzentrierten Chlorcalciumlösung nicht gerinnt, wohl aber wenn mit dem Kalksalz soviel Wasser zugesetzt wird, daß ein Anfang von Hämolyse stattfindet. Die von Zak, nach Vermischung von Plasma mit dem nach Ausziehen mit Petroläther und Entfernung desselben bei 32° C. unter vermindertem Druck übrig gebliebenen Rest der Blutkörperchen, beobachtete starke Förderung der Gerinnung darf, meiner Ansicht nach, in erster Linie der Anreicherung des Plasmas an Nucleoproteiden zugeschrieben werden, durch welche die Gelegenheit zur Thrombinbildung aus Nucleoproteid und dem von vornherein vorhandenen Kalk verbessert wurde.

Während Morawitz seine Thrombokinase thermolabil fand, betrachten Zak und Bordet und Delange Phosphatide, welche, in Wasser suspendiert, gegen Kochen widerstandsfähig sind, als Thrombokinase oder Cytosym.

Der Widerspruch rührt davon her, daß verschiedene Wirkungen zusammengeworfen sind. Die Phosphatide wirken nur insoweit, als sie imstande sind, Hindernisse gegen die Bildung des Thrombins aus Nucleoproteiden und Kalksalzen und gegen die Bildung oder die Ausscheidung des Fibrins fortzuräumen. Sie sind also nicht als «Kinasen» im geläufigen Sinn des Wortes zu betrachten.

Morawitz gelangte zur Annahme einer Thrombokinase, erstens weil die gerinnungserregende Wirkung von Blutserum, welches schon Ferment enthält, durch verschiedene Behandlungsweisen verstärkt werden kann. So kam er zu der Auffassung, daß Serum, außer Thrombin, noch eine oder mehrere Muttersubstanzen davon enthält, welche in anderer Weise als durch Kalksalze in Thrombin umgesetzt werden können, — und zweitens, weil auch Organextrakte, auch bei Anwesenheit von löslichen Kalksalzen, nicht immer Gerinnung von Fibrinogenlösungen hervorrufen.

In beiden Fällen konnte aber nachgewiesen werden, daß gerinnungswidrige Stoffe eine Rolle spielen. Wenn Serum nicht von Kalksalzen, wohl aber durch Säure oder Alkali «aktiviert»

werden kann, so ist die Ursache der verstärkten Wirkung nicht in der Bildung von neuem Ferment zu suchen, sondern in Außer-Wirkung-stellen von Stoffen, welche das schon vorhandene Ferment hindern. Organextrakte enthalten auch, neben den Nucleoproteiden, gerinnungswidrige Stoffe. Werden die Nucleoproteide, soweit als das mit den jetzigen Methoden möglich ist, davon, in solcher Weise, daß sie nicht selbst geschädigt werden, befreit, dann kann ausnahmslos festgestellt werden, daß sie, mit Kalk, eine reine Fibrinogenlösung zur Gerinnung bringen. Morawitz hat bemerkt, daß Organextrakte, welche mit Kalk reines Fibrinogen nicht festlegen, Gerinnung von, in der von Delezenne angegebenen Weise, erhaltenem Vogelplasma hervorrufen können, und daß es also in diesem Plasma etwas geben muß, das die Wirkung des Extraktes ermöglicht und in der Fibrinogenlösung fehlt. Das ist vollkommen richtig. Das ist aber noch kein Grund zur Annahme einer «Kinase». Im frischen Plasma kommen gerinnungswidrige Stoffe wohl nicht, oder in sehr geringem Maß vor, wohl aber Phosphatide, welche die gerinnungswidrigen Bestandteile des Extraktes unschädlich machen können. Die Thrombokinase von Morawitz ist thermolabil: sie besteht, ebenso wie sein Thrombogen, aus Nucleoproteiden, welche unter dem Einflusse von Kalksalzen Thrombin liefern.

Ich glaube deshalb an der früher von mir verteidigten Auffassung festhalten zu dürfen. Für die Bildung des Fibrinferments, des Thrombins, ist nicht mehr nötig als ein Nucleoproteid, gleichgültig ob es aus den Formelementen des Blutes oder aus irgend einem Organ her stammt, und Kalk. Daß dabei eine Kalkverbindung des Nucleoproteids entsteht, scheint mir nicht zu bezweifeln. Früher habe ich angenommen, daß diese Verbindung dem Fibrinogen, zur Bildung des Fibrins, Kalk übertragen würde, mich bei dieser Annahme allererst auf Beobachtungen stützend, aus welchen hervorging, daß das Ferment bei der Überführung von Fibrinogen in Fibrin geschwächt wurde, durch Zusatz von ein wenig Kalksalz aber regeneriert werden konnte. Schon vor langer Zeit aber habe ich zugegeben, daß, nachdem Hammarsten nachgewiesen hat, daß

Fibrin keine Kalkverbindung ist, diese Meinung unhaltbar geworden ist¹⁾)

Hierdurch wird aber meine Auffassung bezüglich der Bildung und der Natur des Fibrinfermentes nicht berührt. Die Vermehrung der Kenntnisse in bezug auf die Bedeutung von Schmidts zymoplastischen Stoffen, welche die Untersuchungen von Zak und von Bordet und Delange gebracht haben, hat mich in meiner Auffassung nur befestigt.

¹⁾ Kon. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, 24. Nov. 1900.