Beitrag zur Darstellung und Kenntnis des Thrombins.

Von

Max Bleibtreu und Edgar Atzler.

(Aus dem physiologischen Institut in Greifswald.)

(Eingegangen am 21. Januar 1920.)

Wenn auch seit den klassischen Untersuchungen Alexander Schmidts und Olof Hammarstens über die Blutgerinnung äußerst wertvolle Beiträge zu dieser Frage geliefert worden sind, so setzen die bisher gemachten Entdeckungen uns noch keineswegs in den Stand, den Vorgang der Gerinnung restlos zu erklären. Bei dem Gerinnungsvorgang spielen offenbar so viele durch- und nebeneinanderlaufende Prozesse eine Rolle, daß es Morawitz als ein besonderes Verdienst anzurechnen ist, wenigstens die Hauptphasen der Gerinnung klar erkannt und in einem übersichtlichen, wenn auch unverbindlichen Schema festgelegt zu haben. Der Weg für die weitere Erforschung war also genau vorgezeichnet, und viele Untersucher beschritten ihn. Aber trotz emsigster Arbeit herrschen unter den auf diesem Gebiete arbeitenden Forschern noch viele bisher unüberbrückbare Gegensätze in grundlegenden Fragen. Hier sei speziell an das Thrombin erinnert, dessen Unentbehrlichkeit für das Zustandekommen einer typischen Blutfaserstoffgerinnung wohl von niemanden mehr bestritten, über dessen Wirkung, Natur und Herkunft aber die Meinungen immer noch sehr geteilt sind. Wenn wir im folgenden das Thrombin, entsprechend der von Al. Schmidt begründeten Auffassung, auch als Fibrinferment bezeichnen, so wollen wir damit der ebenfalls umstrittenen Frage, ob überhaupt dieser Substanz die Fermentnatur zukommt, nicht vorgreifen.

Um aber der Frage über die Natur des Thrombins näher zu kommen, erscheint es uns wichtig, für die Darstellung des Thrombins bzw. für die Herstellung wirksamer Thrombinlösungen bequemere und reichlichere Ausbeute versprechende Methoden, als die bisher üblichen, ausfindig zu machen; auch ist ja zu erwarten, daß jede neue Darstellungsmethode brauchbare Anhaltspunkte für die Beurteilung dieser Substanz und damit auch des Gerinnungsproblems liefern kann.

Am meisten angewandt wird wohl die Methode von Al. Schmidt: Fällung des Serums mit dem 15—20fachen Volumen Alkohol, einige

Monate stehenlassen, Niederschlag abfiltrieren und trocknen; Extraktion des Fermentes aus dem getrockneten Pulver mit Wasser.

Die auf diese Weise gewonnenen Fermentlösungen haben den Vorzug, daß sie nur wenig fremde Beimengungen enthalten, weil durch das lange Stehen unter Alkohol die gefällten Eiweißsubstanzen in Wasser immer unlöslicher werden. Das Verfahren hat aber den Nachteil, daß es sehr zeitraubend und wegen der großen Alkoholmenge sehr kostspielig ist.

Schon seit längerer Zeit versuchte der eine von uns (B.) eine Abtrennung des Thrombins, welches — was es auch immer sei — jedenfalls Kolloidcharakter besitzt, dadurch zu erzielen, daß es, an andere Kolloide gebunden, ausgeflockt wurde, worauf, wenn es gelang, allerdings noch die weitere Aufgabe folgte, es nach Möglichkeit aus der Adsorptionsverbindung mit dem fremden Kolloid wieder zu lösen.

Nach mehreren fruchtlosen Versuchen mit Eisenhydroxyd, Aluminiumhydroxyd und anderen, wurde festgestellt, daß eine Bindung des Fermentes an kolloidale Kieselsäure stattfindet, und daß dasselbe mit dieser ausgeflockt werden kann.

Die Lösung der kolloidalen Kieselsäure wurde auf folgende Weise hergestellt: Käuflisches Wasserglas wurde auf das 10–20fache mit Wasser verdünnt, mit Salzsäure bis zu saurer Reaktion auf Kongopapier versetzt und dann längere Zeit gegen Wasser dialysiert.

Wird Blutserum mit dem vierten Teil seines Volumens dieser Lösung versetzt, so tritt eine starke Flockung ein, die oft (wenn auch nicht immer) bald filtrierbar wird. Man erhält dabei ein klares Filtrat. Wenn man dieses Filtrat auf seine „fermentative“ Wirksamkeit untersucht, so findet man, daß dieselbe gegenüber der des ursprünglichen Serums stark herabgesetzt oder sogar ganz verschwunden ist.

Nun ist bekanntlich der Gehalt des Blutserums an wirksamem Thrombin überhaupt nicht sehr groß, und er nimmt beim Stehen des Serum schnell weiter ab. Es verwandelt sich in das unwirksame Metathrombin (Morawitz), ist vielleicht auch schon in dem ganz frischen Serum zum Teil in dieser Form vorhanden. Durch Alkalischemachen und darauf folgende Neutralisation kann das Metathrombin leicht wieder in wirksames Thrombin umgewandelt werden.

Es war daher das Filtrat nicht nur in dem ursprünglichen, sondern auch in dem aktivierten Zustande zu untersuchen und mit dem ebenfalls aktivierten Serum zu vergleichen. Dabei zeigte sich, daß auch das aktivierte Filtrat seine fermentative Wirksamkeit verloren hatte.

Als Beispiel möge folgender Versuch angeführt sein:

200 ccm Rinderblutserum.

50 ccm der genannten kolloidalen Kieselsäurelösung. Von der Flockung abfiltriert. Proben des Filtrates mit gleichen Teilen Oxalatplasma versetzt, gerinnen nicht. Das Filtrat durch Alkalisäurebehandlung aktiviert gibt mit Oxalatplasma ebensowenig Gerinnung.

20 ccm desselben Rinderblutserums.

5 ccm Wasser, davon einige Kubikzentimeter mit der gleichen Menge desselben Oxalatplasmas versetzt. Beginn der Gerinnung nach 29 Minuten. Dasselbe durch Alkalisäurebehandlung aktiviert, mit gleichen Mengen Oxalatplasma versetzt, gibt Gerinnung nach $6\frac{1}{2}$ Minuten.

Die Vermutung lag nahe, daß durch die Ausflockung mit Kieselsäure die wirksame Substanz ausgeschieden worden sei. Notwendig ist diese Annahme nicht; denn es konnte ja die Behandlung auch in anderer Weise störend eingewirkt haben. Es war also noch zu beweisen, daß das Gerinnungsferment in der Ausfällung noch vorhanden war. Nun gelingt es tatsächlich, aus der Fällung wirksame Fermentlösungen zu erhalten. Wird die Fällung im Vakuum getrocknet, gepulvert und alsdann mit verdünnter Sodalösung oder verdünnter Natronlauge ($\frac{1}{10}$) verrieben, wobei der größte Teil in Lösung geht, und gleich darauf wieder neutralisiert bis zu Beginn einer aufs neue entstehenden Ausfällung, so gibt das Filtrat mit Oxalatplasma Gerinnung. Das getrocknete Pulver gibt auch nach $1\frac{1}{2}$ jähriger Aufbewahrung noch dasselbe Resultat.

Ohne Zweifel wird also ein Teil des Thrombins bzw. Metathrombins an die Kieselsäure adsorbiert und kann in wirksamer Form aus dieser Adsorptionsbindung wieder in Lösung gebracht werden.

Jedoch war die Wirksamkeit dieser Fermentlösungen meistens nicht sehr groß und die Resultate ungleich. Deshalb wurde dieser Weg vorläufig verlassen und nach einem geeigneteren Mittel gesucht.

Die Kieselsäure ist ein negatives Kolloid, und es war deshalb daran zu denken, daß vielleicht die elektrische Ladung der beiden in Betracht kommenden Kolloide bei dem Ausflockungsvorgange eine Rolle spiele. Das war der Grund, weshalb ebenfalls mit einem ausgesprochen negativen Kolloid, nämlich dem Casein, die Abscheidung des Fermentes versucht wurde. Es war aber von vornherein klar, daß, wenn die Ausflockung mit diesen Kolloiden gelang, dies nicht notwendig damit zusammenzuhängen brauchte, daß das Ferment eine entgegengesetzte elektrische Ladung besitzt. Die Flockung konnte ja auch durch Adsorptionsvorgänge anderer Art zustande kommen. In Versuchen, in welchen der eine von uns (A) das Fibrinferment sowohl im Blutserum, als auch in den von uns hergestellten Fermentlösungen im elektrischen Potentialgefälle untersuchte und die am Schlusse dieser Arbeit mitgeteilt werden sollen, stellte sich denn auch tatsächlich heraus, daß das Ferment nicht kathodisch, sondern anodisch wandert. Mit der elektrischen Ladung dürfte der Ausflockungsvorgang wahrscheinlich nichts zu tun haben.

Die Versuche zur Abscheidung des Fermentes mit Casein gaben ein viel erfreulicherer Resultat, und der Ausarbeitung dieser Methode wandten wir deshalb unsere gemeinsame Arbeit zu.

Bindung des Fermentes an Kaseinniederschlag.**Vorversuche.**

Als Ausgangsmaterial verwandten wir frisches Rinderserum. Zu 100 ccm desselben wurde je 1 g trockenes Casein zugesetzt. Das Casein wurde nach Hammarsten aus Kuhmilch frisch bereitet. Das Casein löst sich in dem Serum bei heftigem Schütteln meist vollständig auf.

Das so zubereitete Serum ließen wir zuerst 12—24 Stunden stehen, im Verlauf der weiteren Untersuchungen stellte sich aber heraus, daß die Weiterverarbeitung auch sofort erfolgen kann. Durch vorsichtigen Zusatz von 30proz. Essigsäure wurde das Casein gefällt und mit Hilfe der Zentrifuge oder durch Filtration von dem Serum getrennt. Die Fällung trocknete im Exsikkator zu einer glasigen Masse ein, die im Mörtel fein zerrieben wurde. Dieses Pulver wird im folgenden kurz als „Serumcasein“ bezeichnet.

Es war nun die Frage, ob an das ausfallende Casein sich das Thrombin bzw. das Metathrombin gebunden hatte. Es wurde daher zunächst wieder das Filtrat untersucht und mit dem ursprünglichen Serum verglichen, beide, nachdem sie durch Zusatz von Normalnatronlauge bis zu einem Gehalt von $\frac{1}{10}$ normal alkalisch gemacht, nach ein bis zwei Minuten mit $\frac{1}{10}$ Salzsäure neutralisiert (bis zur neutralen Reaktion auf Lackmuspapier) und dadurch aktiviert worden waren. Als Substrat für die Wirkung des Fibrinfermentes diente Oxalatplasma. Die Zeit, die bis zum Beginn der Gerinnung verstrich, wurde mit der Stoppuhr gemessen. Diese, wie alle folgenden Gerinnungsversuche, wurden bei Zimmertemperatur vorgenommen.

Bei diesen Versuchen ergab sich folgendes:

2 ccm des aktivierten Ausgangsserums zeigten mit 2 ccm Oxalatplasma versetzt den Anfang der Gerinnung nach 2—6 Minuten, das aktivierte Filtrat von der Caseinfällung nach $\frac{1}{2}$ — $1\frac{1}{2}$ Stunden.

Durch die Caseinfällung hat also die gerinnungsfördernde Wirkung des Serums bedeutend abgenommen. Es lag demnach nahe anzunehmen, daß das Casein das Metathrombin adsorbiert hätte; in der Tat bestätigte sich diese Annahme.

Die getrocknete und gepulverte Caseinfällung wurde in Wasser verrieben; das Wasser zeigte dabei saure Reaktion (von noch anhaftender Essigsäure). Es wurde zunächst n-Natronlauge bis zu neutraler Reaktion auf Lackmuspapier zugesetzt, wobei das Casein beim Verreiben sich größtenteils auflöst, dann weiter n-Natronlauge zum Zweck des Aktivierens bis zu $\frac{1}{10}$ n zugesetzt und nach 1—2 Minuten mit $\frac{1}{1}$ -Salzsäure unter fortwährendem Verreiben soweit neutralisiert, daß das Casein noch gerade in Lösung blieb. Mit gleichen Teilen Oxalatplasma versetzt, erfolgte die Gerinnung nach 3—5 Minuten. Ohne die Aktivierung durch Alkali-Säurewirkung gab die Lösung des Serumcaseins

mit Oxalatplasma im allgemeinen keine Gerinnung; nur in einzelnen Fällen kam nach 3—4 Stunden eine Gerinnung zur Beobachtung.

Das getrocknete und gepulverte Serumcasein verliert beim Aufbewahren seine Wirksamkeit nicht; selbst nach 1 Jahr war das Präparat imstande, nach dem Aktivierungsprozeß Plasma in 3—5 Minuten zu koagulieren.

Man könnte einwenden, daß die Wirksamkeit dieser Lösungen nicht auf einer Adsorption des im Serum vorhandenen Metathrombins beruhten, sondern daß das Casein selbst ein gerinnungsförderndes Moment hineingebracht habe; dieser Einwand ist um so berechtigter, als Magermilch, in gleicher Weise aktiviert wie das Serum, ebenfalls imstande ist, nach $\frac{1}{2}$ Stunde Oxalatplasma zu koagulieren. Die Abnahme der Wirksamkeit des Restserums hätte dann allerdings auf andere Weise erklärt werden müssen.

Es war daher nötig, mit dem von uns benutzten Casein Kontrollversuche zu unternehmen, wobei das Caseinpulver in genau derselben Weise behandelt wurde, wie das Serumcaseinpulver. Diese Versuche fielen negativ aus: nach $1\frac{1}{4}$ Stunde war noch keine Gerinnung eingetreten.

Diese Versuchsergebnisse berechtigten also zu dem Schlusse, daß das ausfallende Casein imstande ist, sich im Serum mit einem Stoff — Metathrombin — zu beladen, der nach dem Aktivieren eine rasche Gerinnung des Oxalatplasmas bewirkt.

Bisher war es wohl gelungen, aus der Caseinfällung wirksame Fermentlösungen zu bekommen. Aber die wirksame Substanz war auf diese Weise nur vermischt mit dem Casein zu erhalten. Wir bemühten uns zunächst, in dem gewonnenen Serumcaseinpulver das Metathrombin vom Casein zu trennen. Wir versuchten dies zunächst durch stundenlanges Schütteln des Pulvers mit Wasser im Schüttelapparat zu erreichen. Das durch Abzentrifugieren erhaltene, schwach opalisierende Waschwasser wurde aktiviert, bewirkte aber erst nach $\frac{3}{4}$ — $1\frac{1}{2}$ Stunden Gerinnung.

Wir mußten also kompliziertere Methoden anwenden, um zu unserem Ziele zu gelangen. Man muß ja wohl annehmen, daß durch die Alkali-Säureeinwirkung das Thrombin vom Casein abgespalten wird. Es müßte also dafür gesorgt werden, daß, sobald durch den Aktivierungsprozeß das Thrombin freigemacht ist, die Adsorbentien aus der Lösung entfernt werden. Wir gingen zunächst so vor, daß wir das „Serumcasein“ in der bekannten Weise aktivierten und dann so viel Salzsäure oder Essigsäure hinzufügten, daß das Casein gerade anfang auszufallen. Durch rasch darauf folgendes Zentrifugieren wurde das Casein von der Lösung abgetrennt; die Aktivität der Lösung war sehr schwankend; die Gerinnungszeiten betrugen 10 Minuten bis 1 Stunde. Weit bessere

Resultate erhielten wir aber, als wir das Michaelis-Ronasche Verfahren¹⁾ der Enteiweißung von Serum in einer für unsere Zwecke geeignet erscheinenden Abänderung anwandten. Wir verrieben 5 g „Serumcasein“ in 25 ccm Wasser, fügten Normalnatronlauge bis zur Neutralisation hinzu, aktivierten mit 2,5 ccm n-Natronlauge, verdünnten mit 25 ccm Wasser und neutralisierten nach 2 Minuten mit n-Salzsäure. Alsdann wurden 8 ccm aufs 3fache verdünnte kolloidale Eisenhydroxydlösung (Liqu. Ferri oxyd. dialys. Kahlbaum) zugesetzt, geschüttelt und weiter 1 ccm gesättigte Magnesiumsulfatlösung zugefügt. Es trat eine Flockung ein; der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren entfernt; das so gewonnene trübe Filtrat bewirkte nach 1—5 Minuten im Oxalatplasma Gerinnung.

Diese Reihenfolge der einzelnen Prozeduren mußte innegehalten werden. So erhält man nach unseren Erfahrungen ein unwirksames Präparat, wenn die Fällung mit dem kolloidalen Eisen direkt nach dem Aktivieren mit Natronlauge und vor dem Neutralisieren mit Salzsäure vorgenommen wurde. Auch spielte bei diesen Versuchen die Menge der zugesetzten Eisenlösung eine große Rolle. Fügte man dem nach der Eisenfällung gewonnenen trüben Filtrat wiederum einige Kubikzentimeter Eisenlösung zu, so erhielten wir durch Filtration eine wesentlich geringer getrübbte Lösung, die sich aber als weniger aktiv erwies. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Eisenbehandlung konnten wir schließlich ein absolut klares, aber völlig unwirksames Filtrat erhalten.

Es erwies sich also eine teilweise Ausfällung der Serumcaseinlösung am vorteilhaftesten. Bei der Eisenfällung in dieser dosierten Form wird nun zwar ein Teil der in dem „Serumcasein“ enthaltenen, dem Ferment anhaftenden Substanzen beseitigt, ein großer, sogar der größte Teil derselben bleibt aber noch darin. Die so gewonnenen Fermentlösungen waren also noch mit einer großen Menge fremder Stoffe behaftet. Auch hatten sie den Übelstand, daß sie, frisch bereitet, zwar ziemlich wirksam waren, nach einigen Tagen aber an Aktivität einbüßten.

Es handelte sich also weiter darum, von den durch das beschriebene Verfahren erhaltenen Lösungen die anhaftenden Eiweißsubstanzen möglichst zu entfernen. Dies gelingt bis zu einem gewissen Grade durch fraktionierte Ausfällung mit Alkohol. Wir fügten zu den Lösungen $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol. Das gibt in der (magnesiumsulfathaltigen) Lösung aufs neue eine starke Fällung, von der abfiltriert wurde.

Diese Filtrate waren nur schwach getrübt. Um die Konzentration des Alkohols herabzusetzen, wird das Filtrat noch mit dem gleichen Volumen destillierten Wassers versetzt und so schließlich eine Fermentlösung erhalten, welche, mit gleichem Volumen Oxalatplasma versetzt, in 35—60 Sekunden Gerinnung hervorruft.

¹⁾ Biochem. Zeitschr. 7, 329. 1908; 13, 122. 1908.

Die so gewonnenen Präparate wurden im Eisschrank aufbewahrt und verloren während der Beobachtungszeit (bis 8 Wochen) nichts an Wirksamkeit. Das Ziel, eine gut wirksame und, wie es scheint, dauernd haltbare Fermentlösung zu erhalten, war also erreicht. Allerdings ist die Fermentlösung auch jetzt noch mit anderen Substanzen vermischt, wahrscheinlich haftet noch ein Teil des Caseins neben Serumeiweißsubstanzen dem Ferment an, abgesehen von den anorganischen Beimengungen. Ob eine weitere Reinigung gelingt, müssen spätere Versuche lehren.

Definitives Verfahren.

Wir fassen noch einmal kurz den Gang der Darstellung unserer Fermentlösung zusammen.

Zusatz von Caseinpulver zu dem Serum, 1 g auf 100 ccm.

Auflösen des Caseins im Schüttelapparat.

Ausfällen des Caseins mit Essigsäure.

Trocknen der Fällung im Vakuum. Pulverisieren.

Auflösen des Pulvers in Wasser unter Zusatz von Normalnatronlauge bis zur neutralen Reaktion (ungefähr 100 ccm Wasser auf 10 g des Pulvers).

Weiterer Zusatz von Normalnatronlauge: 1 Volumen Normalnatronlauge auf 10 Volumen der Lösung.

Neutralisieren mit n-Salzsäure.

Zusatz von kolloidaler Eisenhydroxydlösung (liqu. Ferri oxyd. dialys. Kahlbaum), (ungefähr 10—15 ccm der aufs 3fache verdünnten käuflichen Lösung auf 100 ccm) Zusatz von Magnesiumsulfatlösung (ungefähr 2,5 ccm gesättigte Lösung auf 100 ccm).

Trennen des Eisenniederschlags durch Zentrifugieren (Filtrieren geht meist zu langsam).

Versetzen der Lösung mit $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ Volumen Alkohol.

Abtrennen der entstandenen Fällung durch Filtration.

Aufbewahren des Filtrates im Eisschrank.

Beim Gebrauch Zusatz des gleichen Volumen destillierten Wassers.

Der Gang der Darstellung ist etwas umständlich. Wir fragten uns daher, ob sich derselbe nicht vereinfachen läßt.

Zunächst könnte das Trocknen des Caseinniederschlags überflüssig erscheinen, da man ihn doch nachher wieder auflösen muß. Wir haben uns aber wiederholt davon überzeugt, daß, wenn man den noch feuchten Niederschlag verwendet und in genau gleicher Weise behandelt, die Präparate weniger wirksam werden. Es durfte also auf das Trocknen nicht verzichtet werden. Das Trocknen hat auch den Vorteil, daß man

in Gestalt des trockenen Pulvers das Ausgangsmaterial („Serumcasein“) dauernd aufbewahren kann.

Es war ferner zu erwägen, ob die zwischengeschobene Eisenfällung nicht entbehrt werden kann. Wenn man dieselbe wegläßt, d. h. die Lösung nach der Aktivierung direkt mit Alkohol unter Zusatz von etwas Magnesiumsulfatlösung fällt, bekommt man auch brauchbare Präparate, aber die Wirksamkeit war doch viel geringer als nach der vorangegangenen Eisenbehandlung. Wir nehmen an, daß eine die Gerinnung verzögernde Substanz mit der Eisenfällung beseitigt wird.

Praktische Anwendungen der Fermentlösungen.

Wir benutzten unsere Fermentlösungen zu einigen praktischen Versuchen am Tier. Es ließ sich zunächst in vitro zeigen, daß durch Zusatz unserer Thrombinlösung zu frisch entnommenem Kaninchenblut die Gerinnungszeit deutlich verkürzt wurde. Vergleich man den natürlichen Thrombus mit dem durch das Thrombin bewirkten künstlichen, so war der letztere viel kompakter.

Hiernach versuchten wir die blutstillende Wirkung des Mittels am Kaninchenohr. Beide Ohren wurden mit Xylol stark hyperämisiert und durch je zwei identisch gelegte Schnitte in die Randvene verletzt, so daß eine starke Blutung eintrat. Beide Wunden wurden mit je einem Tupfer komprimiert. Der auf der schwächer blutenden Wunde befindliche Tupfer war mit 33proz. Alkohol getränkt, der andere Tupfer enthielt unsere Thrombinlösung (unverdünnt, also ebenfalls 33% Alkohol enthaltend). Während die stärker blutende Wunde nach 30 Sekunden vollkommen stand, ließ sich am anderen Ohr erst nach 2 Minuten ein Nachlassen der Blutung beobachten.

Leicht gelang auch die Stillung von parenchymatösen Blutungen. Einem Kaninchen wurde in Äthernarkose durch einen Medianschnitt das Abdomen eröffnet und ein 3 g schweres Leberläppchen entfernt; mit der Hand wurden die zentralwärts gelegenen Leberpartieen komprimiert, so daß aus der Schnittwunde kein Blut austrat; nun wurde durch vorsichtiges Lüften der komprimierenden Finger eine dünne Blutsicht auf der Schnittwunde erzeugt, die mit dem Thrombin betropft wurde. Nach zwei Minuten war die Gerinnung so weit gediehen, daß die Kompression nicht mehr nötig war. Die Leber wurde versenkt, die Bauchwunde geschlossen und das Tier erholte sich von dem Eingriff.

Nach einem Monat wurde bei dem gleichen Tier wiederum das Abdomen eröffnet; diesmal gestaltete sich die Operation infolge der vielen Verwachsungen schwieriger; die Adhäsionen wurden stumpf gelöst; dabei wurde das brüchige Lebergewebe vielfach zerfetzt und es entstand in der wenig übersichtlichen Wundhöhle eine starke, parenchymatöse

Blutung, die durch reichliches Berieseln mit der Thrombinlösung ohne Schwierigkeiten zum Stehen gebracht wurde. Wir hatten dem Tier in dieser Sitzung 11 g Lebergewebe entfernt. Auch diese Operation überstand das Tier ganz ausgezeichnet, und es befindet sich noch heute — 8 Wochen nach dem Eingriffe — in ausgezeichnetem Zustande.

Für chirurgische Zwecke scheint sich das Präparat nicht recht zu eignen, da die moderne Technik unseres Wissens einen besonderen Wert darauf legt, durch öfteres Abtupfen klare Wundverhältnisse zu schaffen. Durch dieses häufige Betupfen wird aber das Gerinnsel auf der Wundfläche zerstört, die zarten Thromben werden aus den Gefäßlumina herausgerissen und die Blutung beginnt von neuem.

Erwähnt sei nur nebenbei, daß das Präparat auch Ascitesflüssigkeit nach 15 Minuten zur Gerinnung brachte.

Elektrische Überführungsversuche.

Um einen tieferen Einblick in die physikalisch-chemischen Verhältnisse zu gewinnen, wurden elektrische Überführungsversuche angestellt. Wir bedienten uns hierfür des von Michaelis¹⁾ angegebenen Überführungsapparates und verfahren genau nach den Vorschriften des Autors. In die Mitte des Apparates brachten wir die zu untersuchende Flüssigkeit — im folgenden kurz als Mittelflüssigkeit bezeichnet — und in die Seitenteile wurden Puffer eingeschaltet. Wir verwandten nach dem Vorschlage von Michaelis eine Mischung von primärem und sekundärem Natriumphosphat. Mit Hilfe von Gasketten wurde die $[H^+]$ des Serums bestimmt; dann stellten wir Puffer nach den Michaelis'schen Tabellen von gleicher $[H^+]$ her, die ebenfalls nach der elektrometrischen Methode nachgeprüft wurden. Resch²⁾, der kataphoretische Versuche mit Thrombin angestellt hat, gibt an, daß der von Michaelis empfohlene Puffer in der von ihm als Testobjekt angewandten reinen Fibrinogenlösung Gerinnung schon von sich aus hervorruft; wir arbeiteten mit Plasma und konnten nicht finden, daß der Puffer allein schon genügt, um im Plasma Koagulation zu bewirken.

Der Überführungsapparat wurde an das Stadtstromnetz (220 Volt), unter Vorschaltung eines Kohle-Alkoholwiderstandes, angeschlossen; die Stromstärke betrug 0,6—1 Milliampere, die Überführungsdauer währte 8—24 Stunden.

Als Mittelflüssigkeit verwandten wir für die erste Versuchsreihe frisches Pferdeserum. Nach der Überführung wurde die kathodische, anodische und die Mittelflüssigkeit in der bekannten Weise mit Alkali-Säure aktiviert; zu den Lösungen wurde dann das gleiche Volumen Oxalatplasma zugesetzt und die Gerinnungszeit bestimmt.

¹⁾ Michaelis, Die Wasserstoffionenkonzentration, S. 192.

²⁾ Resch, Biochem. Zeitschr. 78, 297, 5/6.

Bei $P_H = 8$ trat in der anodischen Seitenflüssigkeit nach 8, 12 und 14 Minuten Gerinnung ein; das Serum der Mittelflüssigkeit wirkte nach 3,1 und 3 Minuten. Die kathodische Seitenflüssigkeit erwies sich als vollkommen unwirksam. (3 Versuche).

Um im Bereich $P_H = 6$ arbeiten zu können, wurde das Serum der Mittelflüssigkeit mit Salzsäure angesäuert. Nach Herstellung von Puffern gleicher $[H^+]$, wurde die Überführung versucht. Es konnte aber keine Überführung des Ferments beobachtet werden. Die mit Salzsäure angesetzte Mittelflüssigkeit bewirkte nach $1\frac{1}{4}$ Stunde und in einem zweiten Falle nach 6 Minuten Gerinnung.

Wurde das Serum der Mittelflüssigkeit durch Zusatz von Natronlauge alkalisch gemacht und auf eine $P_H = 9,5$ gebracht, so trat ebenfalls keine Kataphorese ein; berücksichtigt man aber, daß auch das Serum der Mittelflüssigkeit erst nach 20 Stunden Gerinnung auslöste, so ist wohl anzunehmen, daß das Metathrombin den Laugenzusatz nicht verträgt.

Aus diesen Versuchen kann man also den Schluß ziehen, daß bei einer $[H^+]$ von $P_H = 8$ der Komplex Eiweiß + Metathrombin dissoziiert und daß die Thrombinkomponente eine negative Ladung trägt. Ob bei $P_H = 6$ eine Umladung erfolgt, kann aus den wenigen bisher angestellten Versuchen noch nicht geschlossen werden.

Nun wissen wir aber¹⁾, daß der isoelektrische Punkt für Casein bei $2,5 \times 10^{-5}$ liegt und daß die Kieselsäure ebenfalls anodisch wandert. Daraus folgt, daß wir nicht berechtigt sind anzunehmen, daß beim Lösen des Caseins im Serum die Thrombinkomponente vermöge ihrer entgegengesetzten Ladung an Casein adsorbiert wird; ob die Adsorption erst beim Ausfällen des Caseins mit Essigsäure stattfindet und ob dabei die elektrische Ladung eine Rolle spielt, mag dahingestellt bleiben.

Wir untersuchten nun weiterhin das Verhalten einer nach unserer Methode gewonnenen Thrombinlösung im elektrischen Potentialgefälle. Leider stellte sich bei der elektrometrischen Bestimmung der $[H^+]$ der Fermentlösung die Wasserstoffelektrode auf kein genügend konstantes Potential ein. Wir mußten infolgedessen auf die Einschaltung von Puffern verzichten und begnügten uns mit destilliertem Wasser als Seitenflüssigkeit. Das spezifische Gewicht der Thrombinlösung wurde durch Beimengung von Traubenzucker — den wir als indifferent erkannt hatten — größer als 1 gemacht.

Wir brauchten nach der Überführung natürlich nicht erst zu aktivieren, sondern konnten die verschiedenen Flüssigkeiten zu gleichen Teilen Plasma direkt zusetzen. Die kathodische Seitenflüssigkeit ergab keine Gerinnung, in der anodischen Seitenflüssigkeit trat nach 20 Minuten, in der Mittelflüssigkeit (Thrombinlösung) nach 7 Minuten Ge-

¹⁾ L. Michaelis und H. Pechstein, Biochem. Zeitschr. 47, 260, 3/4.

rinnung ein. Diese Versuche mit Thrombin stehen also im Einklang mit den Resultaten Reschs.

Zusammenfassung.

1. Beim Auflösen von Casein in Blutserum und nachfolgender Fällung des Caseins mit Essigsäure wird mit dem Casein das Thrombin bzw. Metathrombin als Adsorptionsverbindung ausgeschieden. (Serum-Casein!)

2. Aus dem Serum-Casein lassen sich sehr wirksame und haltbare Thrombinlösungen herstellen, die sich im Tierversuch zur Stillung parenchymatöser Blutungen auch als praktisch brauchbar erwiesen.

3. Im elektrischen Potentialgefälle wandert Thrombin und Metathrombin anodisch.