XV.

Arbeiten aus dem pharmakologischen Institut zu Göttingen.

Beiträge zur Frage der Blutgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Hirudinwirkung.

Von

Privatdoz. Dr. A. Schittenhelm und Dr. A. Bodong.

Nachdem die Darstellung des von Prof. Jacobj zuerst isolierten und näher untersuchten Hirudins, des wirksamen Prinzips vom Blutegel, durch die unter seiner Leitung von Franz und Bodong weiter ausgearbeiteten Verfahren jetzt ohne Schwierigkeit fabrikmäßig erfolgt, konnte man der Frage näher treten, wie sich das reine Präparat in seiner Wirkung auf das Blut verhielt. Nachdem die letzten Jahre auf dem Gebiet der Blutgerinnung zahlreiche neue Tatsachen, vor allem einen genaueren Einblick in die bei der Gerinnung mitwirkenden einzelnen Faktoren gebracht hatten, ergab sich von selbst der Versuch, die Beziehungen zu den einzelnen Komponenten der Blutgerinnung zu studieren. Auf Anregung des Herrn Prof. Jacobj beschäftigten wir uns mit dieser Frage unter Berücksichtigung der bereits anderweitig vorliegenden Arbeiten. Es erwies sich dabei sehr bald als notwendig, die ganze Frage der Blutgerinnung aufzurollen und die komplizierten Faktoren zueinander einem eingehenden Studium zu unterziehen. In Folgendem geben wir unter Anführung einzelner instruktiver Versuche die Resultate unserer Untersuchungen wieder.

I.

Technisches.

Zu unseren Versuchen haben wir fast durchweg Pferdeblut verwandt, welches stets frisch vom Schlachthof bezogen wurde. Einemal wurde zu vergleichenden Versuchen mit Rinder-, Hunde- und einmal mit Menschenblut gearbeitet. Im allgemeinen aber legten

wir Wert darauf, alles Versuchsmaterial von einer Tierart (Pferd) zu entnehmen und herzustellen, um die Resultate möglichst einwandfrei und einheitlich zu gestalten. Um störende Verzögerungen zu vermeiden, nahmen wir aber doch einigemale, nachdem wir uns vorher durch entsprechende Vorversuche überzeugt hatten, daß auch bei Verwendung von artverschiedenem Versuchsmaterial keine Änderungen in den Resultaten eintraten, ausnahmsweise Bestandteile einer anderen Tierart, welche momentan schneller zu beschaffen waren. Derartige kleine Variationen finden sich bei den einzelnen Versuchen besonders vermerkt.

Im allgemeinen hielten wir uns an die zuletzt von Morawitz¹⁾ ausführlich beschriebene Technik und verweisen auf dessen genaue Beschreibung. Wir halten es aber doch für angebracht, einige Punkte hier näher auszuführen.

1. Fibrinogen.

Abgesehen von einem Versuch haben wir durchweg Pferdefibrinogen, das wir uns aus 0,25proz. Oxalatplasma darstellten, verwandt. Im allgemeinen gelang es leicht, eine gut wirksame Lösung zu erhalten. Um dieselbe möglichst rein zu gewinnen, wurde stets dreimal umgefällt. Verschiedentlich kam es vor, daß beim erstmaligen Aussalzen die Flocken in dem dickflüssigen Plasma suspendiert blieben oder sich sogar zum Teil zu Boden senkten. Es gelang dann meist durch Verdünnen des Plasmas auf das doppelte Volumen und weitere Kochsalzzugabe ein Absitzen der Flocken an der Oberfläche zu erreichen. Die abgeschöpften Fibrinogenflocken wurden stets in destilliertem Wasser gelöst, was immer ohne weiteres gelang.

Die so gewonnenen, mehr oder weniger dickflüssigen, opaleszierenden Lösungen hielten sich im Eisschrank leicht 8 Tage und darüber und setzten höchstens einzelne ganz feine Flöckchen am Boden ab, nach deren Entfernung durch Filtration keine Beeinträchtigung der Brauchbarkeit konstatiert werden konnte. Eine vollkommene Gerinnung der ganzen Lösung, wie Morawitz angibt, haben wir nie beobachtet. Wohl aber sahen wir dieselbe bei Fibrinogenlösungen, welche wir aus dem Fluoridplasma von Rinder- und Hundeblut dargestellt hatten, was uns einen weiteren Grund abgab, die Fibrinogenlösung nur aus Pferdeblut zu verfertigen. Zur

1) Hofm. Beiträge. Bd. 4, S. 381 und Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 79, S. 1.

Konservierung der Lösung, wie auch des Serums, Gewebssäfte etc. erwies sich neben der Eiskühlung Zusatz eines kleinen Thymolkrystalls als vorteilhaft.

Da wir, wie gesagt, zur Fibrinogendarstellung stets Pferdeoxalatplasma nahmen, aus dem, wie auch Huiskamp und Morawitz bestätigen, das Fibrinogen ohne weiteres ausfällt, so hatten wir die genaue Befolgung der Heubner'schen Angaben nicht notwendig. Es genügte uns eine durch Fermente leicht zur exakten Gerinnung zu bringende Fibrinogenlösung, welche, vor allem infolge möglichst gleichartiger Darstellung, einen Vergleich der Resultate mit denen von Morawitz, Fuld u. a. einfach gestaltete. Es liegt daher außer dem Bereich unserer Untersuchungen, zur Frage der Darstellung reinsten Fibrinogens¹⁾ Stellung zu nehmen.

2. Serum.

Zu den meisten Versuchen, vor allem zu allen orientierenden Hauptversuchen, verwandten wir Pferdeserum, das filtriert und, wenn nicht ganz klar, zentrifugiert wurde. Einigemale wurde Serum vom Mensch, Rind und Hund verwandt.

Das möglichst eiweißfreie Fibrinferment von A. Schmidt aus unter Alkohol erhärtetem Blute haben wir nicht angewandt. Es wäre vielleicht von Interesse auch damit Versuche anzustellen. Immerhin scheint Morawitz, welcher mit Fibrinferment in konservierter Form und im frischen Serum arbeitete, keine erheblichen Unterschiede gefunden zu haben.

3. Gewebssäfte.

Die Organextrakte stellten wir uns aus Leber und Niere vom Pferd und Hund und von Kalbsthymus her. Leber und Niere wurden direkt nach Tötung des Tieres im Wärmekasten des Durchblutungsapparates mit warmer physiologischer Kochsalzlösung bis zur Blutleere durchspült, zerkleinert und 12–20 Stunden mit ungefähr demselben Volum physiologischer Kochsalzlösung extrahiert. Die Thymusdrüse wurde, ohne vorherige Durchblutung, ebenso zerkleinert, aber wegen

1) Vergl. hierzu: Heubner, W., Arch. f. exper. Path. u. Pharmak. Bd. 49, S. 229. — Huiskamp, W., Zeitschrift für physiol. Chemie. Bd. 44, S. 182. — Heubner, W., Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 45, S. 355. — Huiskamp, W., Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 46, S. 273.

der speziell bei ihr rasch einsetzenden Fäulnisvorgänge nur wenige Stunden extrahiert; die Extrakte wurden koliert und zentrifugiert.

4. Blutplättchen.

Für Blutplättchengewinnung diente uns Pferde- und Hundeblut. Vorbildlich war uns dabei die von Morawitz angegebene Methode des fraktionierten Zentrifugierens.

Das Pferdeblut wurde, wie üblich, in Oxalatlösung auffangen; nach 3—4 stündigem Stehen hatte sich der größte Teil der roten und weißen Blutkörperchen zu Boden gesetzt. Das blutkörperchenarme, aber blutplättchenreiche Plasma (500—600 ccm) wurde vorsichtig abgehebert und auf die Zentrifuge gebracht. Die elektrisch betriebene Zentrifuge ¹⁾ war so eingerichtet, daß ihre Tourenzahl jederzeit genau festgestellt und beliebig variiert werden konnte. Das Plasma wurde darin zuerst bei 1600 Umdrehungen 15 Minuten ausgeschleudert, wobei sich die roten und weißen Blutkörperchen vollkommen absetzten. Die vorsichtig von den Körperchen abgossene, leicht getrübe Flüssigkeit zentrifugierten wir 15—20 Minuten bei 3200 Umdrehungen. Nach dieser Zeit war die Flüssigkeit vollkommen klar und die Blutplättchen hafteten als zäher, weißgrauer Belag am Boden des Gefäßes fest an, so daß sie mit Leichtigkeit mit physiologischer Kochsalzlösung mehreremale, mindestens dreimal, abgespült werden konnten. Darnach wurden sie in wenigen Kubikzentimetern (ca. 5 ccm) destillierten Wassers gelöst.

Zweimal wurden die Pferdeplättchen aus Fluoridplasma gewonnen, um die Wirksamkeit der aus beiden verschiedenen Plasmaflüssigkeiten gewonnenen Plättchen zu vergleichen. Die Darstellung war dieselbe; die Ausbeute erwies sich jedoch bei Anwendung von Fluoridplasma geringer, was, wie das mikroskopische Bild zeigte, offenbar darin seinen Grund hatte, daß die Plättchen in Fluoridblut sich zu kleinen Klümpchen zusammenballten und so zum Teil bereits mit den Blutkörperchen ausgeschleudert wurden.

Das Hundeblut (ca. 300—400 ccm) wurde durch eine in die Carotis eingebundene Kanüle in Fluornatriumlösung aufgefangen, so daß seine Konzentration 0,3 Proz. betrug. Sofort wurde bei 1600 Umdrehungen die Hauptmenge der roten und weißen Blutkörperchen 40 Minuten lang abgeschleudert, das überstehende Plasma

¹⁾ Diese Zentrifuge wurde nach Angaben von Prof. Jacoby durch die Firma Spindler und Heuer in Göttingen gebaut und liefert bei relativ geringem Preise und Stromverbrauch bis 3500 Umdrehungen in der Minute.

abgehebert und noch 10 Minuten bei 1600, sodann noch 3 Minuten bei 2100 Umdrehungen zentrifugiert. Aus dem nun restierenden milchigen Serum gewannen wir durch erneutes Zentrifugieren bei 3200 Umdrehungen, 20—30 Minuten lang, die Plättchen. Die weitere Behandlung war dieselbe, wie bei den Pferdeplättchen.

Ein Versuch, die Plättchen durch Ausschwemmen in physiologischer Kochsalzlösung und nochmaliges Auszentrifugieren von dem anhaftenden Plasma zu trennen, ergab, daß durch diese Prozedur die Blutplättchen ihre Wirkung verloren. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Erfahrung von Morawitz¹⁾, daß die Blutplättchen, welche in physiologischer Kochsalzlösung gelöst werden, wirkungslos sind.

Es bedarf wohl kaum der Erwähnung, daß wir jedesmal die Blutplättchen auf ihre Reinheit mikroskopisch untersuchten.

II.

Über die Komponenten der Blutgerinnung.

Zunächst machten wir einige orientierende Versuche über den Ablauf der normalen Blutgerinnung mit und ohne Aktivierung des Serums. Dieselben bestätigten in jeder Hinsicht die Morawitzschen Angaben. Vor allem fanden auch wir, daß eine Aktivierung des Serums mit Alkali ($\frac{1}{10}$ Normalnatronlauge) die Gerinnung enorm beschleunigt, vielmehr als die Aktivierung mit Säure oder Kalk. Im ersten Fall dauert die Gerinnung 5—10 Minuten, im anderen eine Stunde und mehr. Wo wir mit aktiviertem Serum experimentierten, wandten wir in der Folge die Alkaliaktivierung an.

1. Fibrinogenlösung.

Was die Fibrinogenlösung anbelangt, so zeigte sich, daß deren Verdünnung auf das dreifache mit destilliertem Wasser keinerlei Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Gerinnung hatte, was uns insofern von Wichtigkeit zu sein scheint, als die Verluste bei der jedesmaligen Darstellung der Lösung in ziemlich weiten Grenzen variieren.

In jüngster Zeit hat Bürker²⁾ auf Grund von Berechnungen und der mehrfach bestätigten Beobachtung, daß die Blutgerinnung an den typischen Zerfall der Blutplättchen geknüpft sei, auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Fibrinbildung auf Kosten der zer-

1) Arch. f. klin. Mediz. 1904. Bd. 79, S. 225.

2) Arch. f. ges. Physiol. 1904. Bd. 102, S. 88 f.

fallenden Blutplättchen zu Stande käme. Er betont unter anderem, daß der Ammoniumoxalatlösung besondere Beachtung zukommt, weil in ihr zwar rote und weiße Blutkörperchen zu Grunde gehen, das Blut aber trotzdem tagelang keine Spur von Gerinnung zeigt, da die Blutplättchen aufs Schönste erhalten bleiben. Sofern Bürkers Schluß, daß die Intaktheit der Plättchen in diesem Falle dadurch die Gerinnung hintanhalt, weil es nunmehr an freiem Fibrinogen mangelt, richtig ist, so dürfte es u. E. nicht gelingen, aus plättchenfreiem Plasma eine wirksame Fibrinogenlösung zu erhalten.

Von dieser Ansicht ausgehend, haben wir von demselben Pferdeoxalatplasma die eine Hälfte, wie gewöhnlich, auf Fibrinogen verarbeitet, die andere dagegen zuvor durch sofortiges andauerndes Zentrifugieren plättchenfrei gemacht. Es zeigte sich, daß die aus den beiden Portionen gewonnenen Fibrinogenlösungen sich in keiner Weise von einander unterschieden, weder was die Ausbeute, noch was die Art und den zeitlichen Ablauf der Gerinnung anbelangt.

2. Blutplättchen und Gewebsextrakte.

Alexander Schmidt¹⁾ hat bekanntlich gefunden, daß Serum in Kombination mit wässrigen und alkoholischen Gewebsextrakten schneller Gerinnung erzeugt, als wenn es allein einwirkt; er erklärte diese gerinnungsbeschleunigende Wirkung damit, daß die Gewebssäfte ein im Serum vorhandenes Prothrombin in Thrombin umwandeln. Morawitz²⁾ und Fuld³⁾ kamen auf Grund ihrer Versuche auch zu der Ansicht, daß die Gewebssäfte auf eine im Serum enthaltene Substanz aktivierenden Einfluß ausüben. Morawitz benannte die letztere, im Hinblick auf die Bezeichnung anderer aktivierender Substanzen (Enterokinase), als Thrombokinase, während sie Fuld Cytosym heißt. Löb⁴⁾ hat neuerdings dagegen Einwände erhoben, daß die Gewebsextrakte nur eine ein Proferment in ein Ferment umwandelnde Bedeutung haben, ohne jedoch zu bestreiten, daß diese Erklärung eine der vorhandenen Möglichkeiten sei; er stellt dagegen die Ansicht auf, daß die Gewebsextrakte direkt das Fibrinogen des Blutplasmas angreifen und in Fibrin umwandeln können.

Die Substanz, welche nach Schmidt, Morawitz und Fuld vom Gewebssaft aus dem inaktiven in den aktiven Zustand über-

1) Zur Blutlehre. 1902.

2) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 79. H. 3 u. 4.

3) Centralbl. f. Physiol. 1903. Bd. 17, Nr. 19.

4) Hofmeist. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1905. Bd. 6, S. 260.

geführt wird, nennt Morawitz Thrombogen, Fuld und Spiro ¹⁾ Plasmozym.

Morawitz ²⁾ hat nun weiter festgestellt, daß das Trombogen, außer im Serum, in den Blutplättchen neben Thrombokinase zu finden sei; es unterscheiden sich dadurch die Plättchen von allen bisher untersuchten Zellen, welche nach Morawitz zwar Thrombokinase, aber kein Thrombogen enthalten.

Daß die Plättchen in enger Beziehung zum Gerinnungsvorgang stehen, ist seit ihrer Entdeckung durch Hayem ³⁾ und Bizzozero ⁴⁾ häufig behauptet worden (Bizzozero, Lilienfeld ⁵⁾, Hauser ⁶⁾, Mosso ⁷⁾, Schwalbe ⁸⁾ u. a.) und erst jüngst ist Bürker (l. c.) auf Grund von mikroskopischen Untersuchungen wieder dafür eingetreten. Welcher Art aber ihre Beziehungen sind, konnte bis jetzt nicht mit Sicherheit festgestellt werden. Morawitz hat nun dadurch, daß er die Blutplättchen durch fraktioniertes Zentrifugieren isolierte, zum erstenmale mit diesen selbst Versuche angestellt und den strikten Beweis erbracht, daß die Plättchen tatsächlich, wie bereits ausgeführt, bei der Gerinnung wesentlich beteiligt sind. Durch diese Darstellung isolierter Blutplättchen ist ein neues Moment in die Gerinnungsversuche hineingebracht, dessen weitere Erforschung großes Interesse beansprucht.

Wie wir in vorstehender technischer Einleitung beschrieben, haben auch wir nach Morawitz' Vorgang Blutplättchen in größerer Menge rein dargestellt. Zu unserer Überraschung passierte es uns, daß die Plättchenemulsion nach kurzer Zeit spontan zu einer gelatinösen Masse gerann. Diese Gerinnung trat jedesmal ein, wenn wir die Blutplättchen bei Zimmertemperatur einige Zeit stehen ließen; dagegen konnte dieselbe durch dauernde Eiskühlung leicht verhindert werden. Verrieben wir die geronnenen Massen tüchtig mit einem Glasstab in wenig Wasser, so erwies sich der auf diese Weise erhaltene Extrakt beim Versuch, eine Fibrinogenlösung damit zur Gerinnung zu bringen, immer noch als gut wirksam.

1) Hofmeist. Beiträge. 1904. Bd. 5. S. 171.

2) Arch. f. klin. Med. 1904. Bd. 79, S. 215.

3) C. r. soc. biol. 1877 und arch. de physiol. norm. et pathol. 1878. Bd. X. S. 694.

4) Virch. Arch. 1882. Bd. 90, S. 261.

5) Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 20.

6) Centralbl. f. Pathol. 1899.

7) Virch. Arch. Bd. 109.

8) Untersuchungen zur Blutgerinnung. Braunschweig 1900.

Zusatz kleiner Mengen Chlorealciumlösung mit oder ohne Gewebssaft beschleunigte die Plättchengerinnung. Am besten werden die Verhältnisse durch folgende Tabelle illustriert:

Temp. ° C	Fluorid-Hunde- Plättchen	1 prozentige CaCl ₂ -Lösung	Zeit	
35	0,4 cem	0	15 Min.	fest
35	0,4 "	0	10 "	"
20	0,4 "	1 Tropf.	4 "	"
20	0,4 "	1 "	5 "	flockig

Zu diesen Versuchen waren Plättchen verwandt worden, welche aus dem Fluoridplasma des Hundes gewonnen waren; genau so verhielten sich aber auch die aus Oxalatplasma des Pferdeblutes gewonnenen Plättchen, nur daß sie weniger schnell spontan zur Gerinnung kamen und Kalkzusatz nicht deutlich beschleunigend wirkte.

Temp. ° C	Oxalat- Pferde- Plättchen	Pferde- lebersaft	10 proz. CaCl ₂ -Lösung	Zeit	
36,5	0,4 cem	—	1 Tropf.	über Nacht	fest
"	0,4 "	2 Tr.	1 "	4 Min.	"
"	0,4 "	2 "	1 "	3 "	"
"	2 Tropfen	0,4 cem	1 "	nicht geronnen	

Es bedarf besonderer Erwähnung, daß die Versuche mit Blutplättchen nicht immer, was ihre Spontangerinnung und den Einfluß von Kalk und Gewebssaft darauf anbelangt, zeitlich ganz denselben Verlauf nehmen. Wir haben oben nur die durchsichtigsten Versuche angeführt.

Was die Rolle anlangt, welche den Kalksalzen bei dem Gerinnungsvorgange zukommt, so darf man vielleicht annehmen, daß es sich hier um eine Wirkung der Ca.-Ionen handelt, durch welche, wie man das ja auch bei den Metallionen annimmt, eine Verdichtung colloider Moleküle durch Aneinanderlagerung und Vergrößerung derselben bewirkt werden kann, welche den Übergang des Eiweißes aus dem Sol- in den Gel-Zustand sei es begünstigt oder direkt bedingt und so in unserem Falle die Ausscheidung des Fibrins, d. h. die Gerinnung befördert.

Die nächste Aufgabe war, den Einfluß der offenbar vorhandenen Wechselwirkung zwischen Blutplättchen und Gewebssaft auf eine Fibrinogenlösung zu studieren. Ehe wir jedoch dazu übergingen, stellten wir zunächst fest, inwiefern unsere Gewebssäfte die Fermentkraft des Serums beeinflussen.¹⁾

Temp.	Fibrinogen	Nicht aktiv. Pferdeserum 4 Tage alt	10 Tropfen	10 proz. CaCl ₂	Zeit
35 °	5 ccm	10 Tropf.	Pferdelebersaft	1 Tropf.	15 Min.
"	5 "	10 "	Pferdenierensaft	1 "	25 "
"	2 "	10 "	Kalbsthymussaft	3 "	15 "
Zimmer	2 "	10 "	Pferdenierensaft	1 "	14 "
35 °	2 "	10 "	0	3 "	75 "

Ließen wir Gewebssaft und Kalk zusammen, ohne Serum, auf Fibrinogen einwirken, so erhielten wir keine oder eine höchst verspätete Gerinnung. Auch unsere Versuche kamen zu dem Resultat, daß der Gewebssaft einen aktivierenden Einfluß auf das Serum ausübt, wenn wir auch die dadurch bedingte Gerinnungsbeschleunigung nie in dem Grade erhielten, wie sie Morawitz anführt (2 Minuten Gerinnungszeit).

Nachdem wir uns so von der Wirksamkeit unserer Gewebssäfte überzeugt hatten, konnten wir zu kombinierter Versuchsanordnung übergehen.

a) Hundeplättchen.

Temp.	2 ccm Fibrinogen	Hundeplättchen	3 Tropfen Gewebssaft	10 proz. CaCl ₂	Zeit	Bemerkungen
37 °	Pferd	0,5 ccm	Kalbsthymus	2 Tr.	5 Min.	Vers. angest. am 3. VII. 05
"	"	0,5 "	Pferdeleber	2 "	5 "	
"	Rind	0,5 "	Kalbsthymus	2 "	5 "	
"	"	0,5 "	Pferdeleber	2 "	5 "	
"	Pferd	0,4 "	Kalbsthymus	1 "	15 "	Vers. angest. am 19. V. 05
"	"	0,4 "	Pferdeleber	1 "	20 "	
"	"	0,4 "	Pferdeniere	1 "	20 "	

1) Bei allen derartigen Versuchen haben wir zunächst das Fibrinogen für sich und die vereinigten Komponenten des Fermentes für sich einige Minuten vorgewärmt und dann erst zusammengegossen.

b) Pferdeplättchen; das Resultat bleibt dasselbe.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Pferde- plättchen	Thymussaft	10proz. CaCl ₂	Zeit	Bemerkungen
37 °	2 cem	0,4 cem	2 Tropfen	1 Tr.	15 Min.	Vers. angest. am 19. V. 05

c) Die Plättchen dieses Versuches sind einmal aus Oxalat-, das andere Mal aus Fluoridblut vom Pferde dargestellt; wir prüften gleichzeitig ihre Einwirkung auf Rinder- und Pferdefibrinogen.

Temp.	2 cem Fibri- nogen	0,5 cem Plättchen	3 Tropfen Gewebssaft	10proz. CaCl ₂	Zeit	Bemerkungen
37 °	Pferd	Fluorid	Kalbsthymus	2 Tr.	90 Min.	Angestellt am 4. VII. 05
"	"	"	Pferdeleber	2 "	60 "	
"	Rind	"	Thymus	2 "	8 "	
"	"	"	Leber	2 "	8 "	
"	Pferd	Oxalat	Thymus	2 "	90 "	
"	"	"	Leber	2 "	26 "	
"	Rind	"	Thymus	2 "	8 "	
"	"	"	Leber	2 "	8 "	

Wir glauben hiermit genügend Versuche angeführt zu haben, um zu beweisen, daß unsere Versuche so ziemlich genau denselben Verlauf nahmen, wie die von Morawitz ausgeführten und daß durch Zusammenwirken von Plättchen, Gewebssaft und Kalk eine Fibrinfermentwirkung erzielt werden kann, welche auf eine Fibrinogenlösung intensiver wirkt, wie normales nicht aktiviertes Serum. Allerdings schwankt die Wirksamkeit in ziemlich weiten Grenzen, indem zeitlich in den einzelnen Versuchen relativ große Differenzen gefunden werden konnten.

Es hat sich als scheinbar gleichwertig herausgestellt, ob die Blutplättchen vom Hund oder Pferd, aus Fluorid- oder Oxalatplasma gewonnen werden und nur dann zeigten sich auffallende Unterschiede, wenn man zu den Versuchen artverschiedenes Material nahm (Rinderfibrinogen—Pferdeplättchen, Pferdefibrinogen—Pferdeplättchen, Versuch c.) Da, wie gesagt, auch sonst erhebliche Differenzen bei den Versuchen sich einstellten, so glauben wir uns vor-

derhand nicht für berechtigt zu halten, bindende Schlüsse aus dieser letzten Beobachtung ziehen zu dürfen.

Besonders auffallend war uns die Erscheinung, daß in einigen Versuchen auch die Plättchen für sich allein ebenso schnell Gerinnung erzeugten, wie wenn sie mit Gewebs-saft zusammen verwandt werden.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Hunde- plättchen	Hundeleber- saft	10proz. CaCl ₂	Zeit	Bemerkungen
35 °	2 cem	0,4 cem	4 Tr.	1 Tr.	15 Min.	
"	2 "	0,4 "	—	1 "	15 "	

Noch bemerkenswerter scheint uns das Resultat eines Versuchs, auf den wir später noch zurückkommen, zu sein, in welchen wir Plättchen verwandten, welche aus hirudinisiertem Pferdeblut dargestellt waren und ohne Zugabe von Gewebsextrakt nur mit 5 Tropfen 10proz. CaCl₂ lösung 5 cem Pferdefibrinogen in 5 Minuten zur Gerinnung brachten.

Es lassen sich diese Beobachtungen nur erklären, wenn man annimmt, daß die Blutplättchen für sich allein schon alle Komponenten enthalten, welche ein hochwirksames Fibrinferment ausmachen. Es geht dieser Umstand auch mit Sicherheit aus der Erfahrung hervor, daß die Plättchen spontan gerinnen. Es handelt sich hierbei nicht etwa um eine Gelatinisierung oder um einen Zustand, wie sie z. B. das α -thymonukleinsäure Natrium¹⁾ in konzentrierten Lösungen bietet, sondern um eine typische Gerinnung. Es geht dies daraus hervor, daß Hirudinzusatz dieselbe dauernd zu verhindern vermag, während es auf die vorerwähnten Eigenschaften der Nukleinsäure etc. keinerlei Einfluß ausübt. Zur vollständigen Erklärung der Spontangerinnung muß man annehmen, daß die Blutplättchen auch gerinnungsfähige Substanz, Fibrinvorstufen, enthalten; es ist dies eine Beobachtung, welche mit der Bürkerschen Annahme insofern in Be-

1) Der Gedanke an Nukleinsäure ist naheliegend, da ja bekanntlich ein Teil der Blutplättchen für ausgestoßene Zellkerne weißer und roter Blutkörperchen angesehen wird. Es bedarf hier der Erwähnung, daß es uns gelang, in Blutplättchen, die, wie beschrieben, durch Zentrifugieren gewonnen waren, nach Aufschluß mit Schwefelsäure durch Fällung nach Krüger und Schittenhelm Purinkörper nachzuweisen.

ziehung steht, als auch er als Bestandteil der Blutplättchen Fibrinogen annimmt. Immerhin ist es klar, daß es sich hier nur um relativ kleine Mengen handeln kann, während die Hauptmenge im Plasma gelöst sein muß (vergl. unsere Versuche mit plättchenfreiem Plasma). Die Möglichkeit, daß den Blutplättchen soviel Plasma trotz des Abspülens anhaften bleibt, daß dieses die Wirkungen vor-
täuscht, kommt tatsächlich nicht in Betracht, wie schon Morawitz überzeugend betonte. Ich habe dessen Ausführungen nur hinzuzufügen, daß schon die Verdünnung eine derartig große ist, daß auch ein oder zwei Tropfen Plasma, wenn sie tatsächlich haften bleiben würden, und um mehr kann es sich nicht handeln, sicherlich keinerlei Wirkungen mehr entfalten könnten.

Wir müssen also auf Grund dieser Versuche als Bestandteile der Blutplättchen sämtliche Komponenten ansehen, welche zu einer exakten Gerinnung gehören.

Diese Gerinnung kann durch Zusatz von Kalk und vor allem Gewebssaft in beschleunigendem Sinn beeinflußt werden. Die Resultate sind dabei derartig eklatante, wie man sie niemals bei Verwendung von Serum und Aktivierung desselben mit Kalk oder Gewebssaft findet. Es muß also in den Blutplättchen jedenfalls ein Bestandteil sein, der besonders leicht und besonders intensiv zu aktivieren ist und damit kommen auch wir zu der Annahme, daß die Plättchen in reichlicher Menge Thrombogen enthalten.

Gewebssäfte allein oder in Verbindung mit Kalk können niemals ähnlich intensive Wirkungen entfalten, wie Blutplättchen oder auch nur wie Blutserum. Überhaupt scheint uns der Gehalt der Extrakte an Kinase ein überaus wechselnder zu sein. Dies geht daraus hervor, daß wir bei unseren Versuchen nahezu unwirksame Extrakte trotz Anwendung größter Vorsicht bei ihrer Bereitung erhielten. Ob dabei die mehr oder weniger intensive Durchspülung mit physiologischer Kochsalzlösung eine Rolle spielte, lassen wir dahingestellt.

Daß die Gewebssäfte Kinase enthalten, ist nach unseren Versuchen unzweifelhaft. Immerhin ist im Hinblick auf ihre Fähigkeit, manchmal auch allein ohne weitere Zusätze die Gerinnung einer Fibrinogenlösung zu erzeugen, die von Löb hervor-
gehobene Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß in den Gewebssäften auch eine Substanz enthalten ist, welche direkt das Fibrinogen anzugreifen vermag.

3. Fluoridplasma.

Ehe wir zu unseren Hirudinversuchen übergehen, wollen wir kurz einige Versuche mit Fluoridplasma vom Hunde zur Mitteilung bringen:

2 ccm Fluoridplasma	+	2 ccm Wasser	ungeronnen	
2 "	"	+ 3 Tropfen 10 ⁰ / ₀ . Ca Cl ₂	ungeronnen	
2 "	"	+ 0	"	+ 10 Tropf. Lebersaft ungeronnen
2 "	"	+ 3	"	+ 10 " " nach 25 Min. fest
2 "	"	+ 0	"	+ 10 " Nierenextrakt ungeronnen
2 "	"	+ 3	"	+ 10 " " nach 25 Min. fest
2 "	"	+ 0	"	+ 10 " Pferdeserum nach 25 Min. fest
2 "	"	+ 3	"	+ 10 " Pferdeserum nach 30 Min. fet.

Die Versuche zeigen also gute Übereinstimmung mit Arthus¹⁾, Hewlett²⁾, Fuld und Spiro³⁾ und Morawitz⁴⁾ und wir können uns bei der Eindeutigkeit unserer Resultate der Ansicht der letzteren voll anschließen, daß das Fluoridplasma wohl Thrombogen, aber keine wirksame Thrombokinase enthält. Es macht offenbar das zugegebene Fluornatrium die Abgabe der in den Zellen festgelegten Kinase an das Plasma unmöglich, während es die freie Thrombokinase nicht in ihrer Wirkung beeinträchtigt.

III.

Einfluß des Hirudins auf die Blutgerinnung und die Gerinnungskomponenten.

Über den Einfluß des die Blutgerinnung aufhebenden Bestandteils vom Blutegel auf die Gerinnungskomponenten haben in jüngster Zeit vor allem Fuld und Spiro (l. c.) und Morawitz (l. c.) Versuche angestellt. Wie bei der Theorie der Blutgerinnung, so stimmen auch betreffs der Wirkung des Blutegelextraktes ihre Resultate gut miteinander überein. Darnach wirkt die gerinnungshemmende Substanz

1) Journ. de Physiol. et Pathol. gen. 1901. p. 387.

2) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmak. Bd. 49.

3) Hofm. Beiträge. 1904. Bd. 5, S. 171.

4) Deutsch. Arch. f. klin. Med. 1903. Bd. 79, S. 18.

unseren Gerinnungsproben zusetzten, war eine relativ genaue Dosierung durchzuführen.

Durch diese quantitative Bestimmung des verwandten Hirudins waren wir in den Stand gesetzt, genau die Grenzwerte festzustellen, bei welchen eine bestimmte Menge Fibrinogens etc. eben ungeronnen blieb.

Wie sich die Verhältnisse dabei gestalteten, zeigen die folgenden Tabellen:

a) alkaliaktiviertes Serum.¹⁾

Versuch: 8. II. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Pferdeserum	Hirudin	Zeit
Zimmer	2 cem	12 Tropf.	—	5 Min.
	2 "	12 "	0,0033	7 "
	2 "	12 "	0,0066	9 "
	2 "	12 "	0,0099	10 "
	2 "	12 "	0,013	15 "
	2 "	12 "	0,026	5 1/2 Stunden
	2 "	12 "	0,039	ungeronnen
	2 "	12 "	0,052	"
	2 "	12 "	0,065	"

b) nicht-aktiviertes Serum.

Versuch 8. II. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Pferdeserum	Hirudin	Zeit
37°	2 cem	4 Tropf.	—	1 1/2 Stund.
	2 "	4 "	0,013	5 3/4 "
	2 "	4 "	0,026	15 "
	2 "	4 "	0,039	ungeronnen
	2 "	4 "	0,052	"

1) Ein für allemale bemerken wir, daß 12 Tropfen alkaliaktiviertes Serum 4 Tropfen nicht aktiviertem entsprechen, da bei der Aktivierung bekanntlich eine Verdünnung auf das 3 fache stattfindet.

c) alkaliaktiviertes Serum.

Versuch 26. V. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Pferdeserum	Hirudin	Zeit
Zimmer	2 ccm	12 Tropf.	—	5 Min.
	2 "	12 "	0,0066	5 "
	2 "	12 "	0,0099	10 "
	2 "	12 "	0,0132	20 "
	2 "	12 "	0,026	20 "
	2 "	12 "	0,039	45 "
	2 "	12 "	0,052	2 1/2 Stunden
	2 "	12 "	0,065	ungeronnen
	2 "	12 "	0,078	"

d) alkaliaktiviertes Serum.

Versuch 26. V. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Pferdeserum	Hirudin	Zeit
37 °	2 ccm	12 Tropf.	—	4 Min.
	2 "	12 "	0,013	5 "
	2 "	12 "	0,026	10 "
	2 "	12 "	0,039	16 "
	2 "	12 "	0,052	40 "
	2 "	12 "	0,065	48 "
	2 "	12 "	0,078	ungeronnen
	2 "	12 "	0,104	"

Aus den angeführten Versuchen, welchen wir noch zahlreiche andere, ganz analog verlaufende anreihen könnten, geht hervor, daß die Menge Hirudins, welche 2 ccm Fibrinogenlösung bei Verwendung von 4 Tropfen Serum flüssig halten kann, eine minimale ist und zwischen 0,039 und 0,078 mgr liegt. Es ist dabei ganz egal, ob man aktiviertes oder nicht aktiviertes Serum nimmt. Die Temperatur scheint insofern einen Einfluß zu haben, als im Brutschrank der Grenzwert stets etwas höher gefunden wurde. Wir haben absichtlich zwei Versuche angeführt, welche zeitlich mehr wie drei Monate auseinander liegen, um zu zeigen, daß die Grenze langsam nach oben hin verschoben wird. Es hat dies seinen Grund darin, daß im Hirudin, welches ohne weitere Kautelen aufgehoben worden war, im Laufe der Zeit Zersetzungs Vorgänge statt hatten, welche zu einer veränderten Wirkungsfähigkeit führten.

Nachdem wir so die normale Grenze festgelegt hatten, konnten wir daran gehen, zu untersuchen, auf welchen Faktor der Blutgerinnung das Hirudin seinen Einfluß ausübt. Denn die gleichmäßig verlaufenden Versuche drängten zu der Annahme, daß eine quantitative Bindung zu der Aufhebung der Gerinnung Anlaß geben muß.

1. Fibrinogen.

Zunächst war es geboten, den Einfluß des Hirudins auf das Fibrinogen festzustellen.

Bei dem ersten Versuch hatte es in der Tat den Anschein, als ob eine Bindung des Hirudins an das Fibrinogen statt hätte.

Wir hatten 110 ccm einmal umgefällter Fibrinogenlösung mit 0,1 gr Hirudin versetzt und dann noch zweimal, wie gewöhnlich, umgefällt. Die nunmehr erhaltene Fibrinogenlösung war durch Serum nicht zum Gerinnen zu bringen.

Mehrere gleichartig ausgeführte Versuche, bei welchen wir den Grenzwert in Rechnung zogen und daher entsprechend weniger Hirudin verwandten, aber immer übergenug, um eine Spontan-gerinnung zu verhüten, hatten durchweg ein negatives Resultat, indem eine ganz normal gerinnende Fibrinogenlösung gewonnen wurde. Offenbar handelte es sich also im ersten Versuche nur um ein mechanisches Mitreißen von Hirudin, was bei der minimalen Menge, welche zur Aufhebung der Gerinnung notwendig ist, nicht auf-
fallen kann.

Einen weiteren Beweis dafür, daß das Hirudin nicht mit Fibrinogen zusammen reagiert, erbrachten wir durch einen Gerinnungsversuch, bei welchem wir eine konzentrierte Fibrinogenlösung unverdünnt und aufs dreifache mit Wasser verdünnt mit aktiviertem Serum und steigenden Hirudinmengen zusammenbrachten und bei beiden trotzdem ganz dieselben Grenzwerte fanden. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit der Erfahrung, daß die Grenzwerte bei Verwendung gleicher Serummengen stets dieselben blieben, obwohl die Fibrinogenlösungen bei den einzelnen Versuchen an Konzentration infolge der unberechenbaren und sehr wechselnden Verluste bei der Darstellung stark differierten.

Die Hirudinwirkung hat also nichts mit dem Fibrinogen zu tun und wir können uns daher den Feststellungen von Morawitz und Fuld nach dieser Richtung anschließen.

2. Serum.

Schon der Umstand, daß das Fibrinogen mit dem Hirudin nicht reagierte, wies per exclusionem auf das Serum hin. Es stellte sich dann bei den weiteren Versuchen auch bald heraus, daß das Hirudin in der Tat auf das Serum einwirkte. Setzten wir nämlich zu den einzelnen Proben größere Mengen Serum zu, so stieg der Grenzwert proportional der zugesetzten Quantität Serum. Wir kamen also zu dem Resultate der früheren Untersucher.

Ehe wir nun zu den Details der Wechselwirkung zwischen Serum und Hirudin übergangen, wobei es sich vor allem um Untersuchungen mit verschiedenen isolierten Bestandteilen des Fibrinfermentes handelte, schien es uns von Interesse zu sein, vergleichende Bestimmungen des Grenzwertes bei Verwendung artverschiedener Sera anzustellen. Dieselben sind in folgenden Tabellen mitgeteilt:

a) aktiv. Pferdeserum bei Zimmertemperatur.

Temperatur	Pferde- fibrinogen	Aktiv. Pferdeserum	Hirudin	Zeit
Zimmertemp.	2 cem	12 Tr.	0	10 Min.
	2 "	12 "	0,013	22 "
	2 "	12 "	0,026	1 1/2 Std.
	2 "	12 "	0,039	9 "
	2 "	12 "	0,052	ungeronnen
	2 "	12 "	0,065	"

b) aktiv. Hundeserum bei Zimmertemperatur.

Temperatur	Pferde- fibrinogen	Aktiv. Hundeserum	Hirudin	Zeit
Zimmertemp.	2 cem	12 Tr.	0	14 Min.
	2 "	12 "	0,013	1 1/2 Stunden
	2 "	12 "	0,026	nach 24 Stunden fast fertig
	2 "	12 "	0,039	ungeronnen
	2 "	12 "	0,052	"

c) aktiv. Menschenserum.

Temperatur	Pferde- fibrinogen	Aktiv. Menschen- serum	Hirudin	Zeit
Zimmertemp.	2 cem	12 Tr.	0	45 Min.
	2 "	12 "	0,013	ungeronnen
	2 "	12 "	0,026	"

a) Pferdeserum bei Brutschranktemperatur.

Temperatur	Pferde- fibrinogen	Pferdeserum	Hirudin	Zeit
37°	2 cem	4 Tr.	0	1 Std.
	2 "	4 "	0,013	2 1/2 "
	2 "	4 "	0,026	8 1/2 "
	2 "	4 "	0,039	8 1/2 "
	2 "	4 "	0,052	19 "
	2 "	4 "	0,065	ungeronnen
	2 "	4 "	0,078	"

b) Hundeserum bei Brutschranktemperatur.

Temperatur	Pferde- fibrinogen	Hundeserum	Hirudin	Zeit
37°	2 cem	4 Tr.	0	3 1/2 Stunden
	2 "	4 "	0,013	8 1/2 "
	2 "	4 "	0,026	19 "
	2 "	4 "	0,039	19 "
	2 "	4 "	0,052	ungeronnen
	2 "	4 "	0,065	"

c) Menschenserum bei Brutschranktemperatur. ¹⁾

Temperatur	Pferde- fibrinogen	Menschen- serum	Hirudin	Zeit
37°	2 cem	4 Tr.	0	2 ³ / ₄ Stunden
	2 "	4 "	0,013	19 "
	2 "	4 "	0,026	ungeronnen
	2 "	4 "	0,039	"

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß in den artverschiedenen Seris die Hirudinwirkung verschieden stark zum Ausdruck kommt, was sich in den differierenden Grenzen deutlich genug ausprägt. Am intensivsten reagierte mit Hirudin das menschliche Serum, welches aus der Armvene eines an Urämie erkrankten Patienten stammte; dasselbe benötigte infolgedessen auch die geringsten Mengen zur Aufhebung der Gerinnung ²⁾, während das Pferdeserum die größte Menge braucht und das Hundeserum ungefähr in der Mitte zwischen beiden steht.

Interessant ist zudem noch die bei allen drei Seris deutlich hervortretende Tatsache, daß bei erhöhter Temperatur (37°) der Grenzwert sich regelmäßig nach oben verschiebt.

3. Kalkzusatz.

Da Kalkzusatz in den weiteren Versuchen zumeist notwendig war, so bedurfte es noch der Feststellung, ob und inwieweit derselbe einen Einfluß auf die Hirudinwirkung auszuüben vermag. Zu diesem Behufe stellten wir den Grenzwert bei Zusatz größerer Mengen von Chlorcalciumlösung fest. Wie zu erwarten war, ergab sich, daß der Kalkzusatz die Hirudinwirkung in keiner Weise beeinflußt.

1) Bei diesem Versuch wurde zu allen Proben je 1 Tropfen 10proz. CaCl₂ zugesetzt.

2) Zweifellos spielen hierbei vor allem quantitative Verschiedenheiten im Fermentgehalt des Blutes eine ursächliche Rolle, wie sie von Schittenhelm und Luther, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther., Bd. II, bei den verschiedensten Krankheitszuständen gefunden wurden.

4. Blutplättchen und Gewebssäfte.

Schon anderenorts haben wir erwähnt, daß die von uns gefundene Spontangerinnung der Blutplättchenaufschwemmung durch Zusatz von Hirudin aufgehoben werden kann. Es kann dies weiter nicht überraschen, nachdem wir festgestellt haben, daß in den Plättchen sämtliche zur typischen Gerinnung nötigen Bestandteile vorhanden sein müssen.

Diese Beobachtung legte aber die Frage nahe, ob Plättchen, welche aus hirudinisiertem Blut gewonnen wurden, ebenfalls ungeronnen bleiben und also Hirudin in sich aufzunehmen vermögen. In der Tat stellte sich heraus, daß derartige Plättchen genau so wenig spontan gerannen, wie eine Plättchenemulsion, der nachträglich Hirudin zugegeben wird.

Auffallenderweise erzeugten die aus dem Hirudinplasma gewonnenen Plättchen genau in derselben Weise mit Kalk und Gewebssaft zusammen in einer Fibrinogenlösung Gerinnung, wie normale Plättchen. Sodann zeigte sich, daß Zusatz von 1 Tropfen 0,1proz. Chlorecalciumlösung bereits imstande war, Spontangerinnung von 0,4 ccm Hirudinplättchenemulsion bei 20° herbeizuführen. Beide Beobachtungen legten es nahe, daß es sich in den aus Hirudinblut gewonnenen Plättchen nur um eine minimale Menge von Hirudin handeln kann, welche gerade hinreicht, das wenige, freie, fertige Ferment, welches die Plättchen enthielten, zu neutralisieren; sobald aber durch Aktivieren mit Kalk oder Gewebssaft und Kalk neue Mengen Fermentes in fertigen Zustand übergeführt werden, ist sofort so viel wirksames Ferment da, um das bisschen Hirudin bei weitem zu überbieten. Jedenfalls tritt keine Bindung von Hirudin mit in den Plättchen als inaktive Vorstufen enthaltenen Fibrinfermentbestandteilen (Kinase, Thrombogen etc.) ein. Es lassen sich also die an isolierten Plättchen gewonnenen Resultate nicht ohne weiteres zur Erklärung der Hirudinwirkung heranziehen.

Es ergab sich also die Notwendigkeit, mit den isolierten Komponenten zu arbeiten. Wenn nun die Folgerungen von Fuld, Spiro und Morawitz genau zutreffen, so mußte sich die Wirkung des Thrombogens und der Kinase bei der Grenzwertbestimmung deutlich veranschaulichen lassen. Wir suchten daher den genau festgestellten Grenzwert durch Zugabe dieser Komponenten des Fibrinfermentes zu beeinflussen:

a) Versuch: 23. II. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Akti- viertes Pferde- serum	10 Tropfen Gewebes- saft	10 proz. CaCl ₂	Hirudin	Zeit
Zimmer	2 cem	12 Tr.	Pferdeniere	3 Tr.	—	5 Min.
	2 "	12 "	"	3 "	0,013	nach 1½ Tagen
	2 "	12 "	"	3 "	0,026	ungeronnen
Zimmer	2 cem	12 Tr.	Pferdeleber	2 Tr.	—	8 Min.
	2 "	12 "	"	2 "	0,013	8 "
	2 "	12 "	"	2 "	0,039	ungeronnen

b) Versuch: 23. II. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Nicht aktiviertes Pferde- serum	Pferde- nieren- extrakt	10 proz. CaCl ₂	Hirudin	Zeit
Zimmer	2 cem	4 Tr.	10 Tr.	1 Tr.	—	14 Min.
	2 "	4 "	10 "	1 "	0,013	nach 4½ Stund.
	2 "	4 "	10 "	1 "	0,026	ungeronnen

c) Versuch: 19. V. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Akti- viertes Pferde- serum	Pferde- leber	10 proz. CaCl ₂	Hirudin	Zeit
Zimmer	2 cem	12 Tr.	5 Tr.	2 Tr.	0,0132	2 Stund.
	2 "	12 "	10 "	2 "	0,0132	"
	2 "	12 "	15 "	2 "	0,0132	"

Aus diesen Versuchen geht mit absoluter Sicherheit hervor, daß bei dieser Anordnung Zugabe von Kinase in Form von Pferdeleber- und -Nierenextrakt — denselben negativen Einfluß hatte auch Thymusextrakt — ohne jede Einwirkung auf den Grenzwert ist, denselben sogar vielleicht etwas herabsetzt (s. auch die folgenden Versuche). Jedenfalls scheint uns durch die Versuche die Annahme ausgeschlossen, daß die Hirudinwirkung an das Fehlen von freier Thrombokinase zurückzuführen sei.

Setzt man zu den Hirudinversuchen an Stelle des Gewebsextraktes hochwirksame Blutplättchenaufschwemmung, so ändert sich auch in diesem Fall an der Hirudinwirkung nichts Wesentliches. Zur Illustration der Verhältnisse dienen folgende Versuche¹⁾, bei welchen wir absichtlich dicht unter dem Grenzwert geblieben sind, um einen eventuellen Ausschlag in der Veränderung der Gerinnungszeit möglichst bemerkbar zu gestalten:

a) ohne Zusatz: 19. V. 05.

Temp.	Pferdefibrinogen	Aktiviertes Pferdeserum	10 proz. CaCl ₂	Hirudin	Zeit
37°	2 ccm	12 Tr.	—	—	9 Min.
	2 "	12 "	2 Tr.	0,0066	13 "
	2 "	12 "	2 "	0,0099	37 "
	2 "	12 "	2 "	0,0132	60 "

b) mit Kalbsthymusextrakt: 19. V. 05.

Temp.	Pferdefibrinogen	Aktiviertes Pferdeserum	10 proz. CaCl ₂	Hirudin	Thymus	Zeit
37°	2 ccm	12 Tr.	2 Tr.	0,0066	2 Tr.	13 Min.
	2 "	12 "	2 "	0,0099	2 "	37 "
	2 "	12 "	2 "	0,0132	2 "	50 "

1) Zu diesem Versuch wurde ein frisches Hirudinpräparat genommen, dessen Grenzwert an der oberen Grenze der für unsere Präparate festgestellten und vorne angegebenen Werte lag.

c) mit Pferdeleberextrakt: 19. V. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Akti- viertes Pferde- serum	10 proz. CaCl ₂	Hirudin	Leber	Zeit
37°	2 cem	12 Tr.	2 Tr.	0,0066	2 Tr.	13 Min.
	2 "	12 "	2 "	0,0099	2 "	13 "
	2 "	12 "	2 "	0,0132	2 "	60 "
	2 "	12 "	2 "	0,0132	5 "	} nach 10 Stunden
	2 "	12 "	2 "	"	10 "	
	2 "	12 "	2 "	"	15 "	

d) mit Pferdeblutplättchen: 19. V. 05.

Temp.	Pferde- fibrinogen	Akti- viertes Pferde- serum	10 proz CaCl ₂	Hirudin	Plättchen	Thymus	Zeit
37°	2 cem	—	1 Tr.	—	0,4 cem	2 Tr.	15 Min.
	2 "	12 Tr.	2 "	0,0066	0,4 "	—	13 "
	2 "	12 "	2 "	0,0099	0,4 "	—	37 "
	2 "	12 "	2 "	0,0132	0,4 "	—	50 "

Es ergibt sich darnach mit absoluter Sicherheit, daß bei dieser Versuchsanordnung Blutplättchen so wenig wie Gewebssaft der Hirudinwirkung entgegen treten. Es fällt dieser Befund umsomehr auf, als, wie wir früher sahen, in den Plättchen sämtliche zur Gerinnung nötigen Faktoren enthalten sind. Man muß darnach annehmen, daß der mit Hirudin reagierende Körper in den Plättchen nur in ganz geringer Menge vorhanden ist, sodaß er bei dieser Anordnung keine bemerkbare Wirkung ausübt. Es müssen jedoch kleinste Quantitäten davon in den Plättchen vorkommen, dafür spricht die Aufhebung der Spontangerinnung der Plättchen durch Hirudin. Ein anderer Versuch, bei welchem die Plättchenwirkung auf den Grenzwert mit und ohne Gewebssaft zunächst bei Abwesenheit von Kalk und dann bei nachträglicher Zugabe studiert wurde, ergab ebensowenig ein positives Resultat.

5. Hirudinplasma und Gesamtblut.

Nachdem es uns nicht gelungen war, bei Verwendung von Fibrinogenlösungen dem Wesen der Hirudinwirkung näher zu kommen, versuchten wir es nun zunächst mit dem Gesamtblut der Kaninchen. Es zeigte sich sofort ein sehr eklatanter Einfluß des Gewebssaftes (Kalbsthymus, Pferde- und Hundeorganextrakt), indem Zugabe geringer Mengen solche Proben, welchen eine Quantität Hirudin zugesetzt war, die sie noch tagelang flüssig erhielt, sehr schnell zur festen Gerinnung brachten, ein Verhalten, welches ja auch von anderen Autoren bereits konstatiert wurde.

Wir untersuchten nunmehr die Verhältnisse genauer am Hirudinplasma. Um dasselbe zu gewinnen, stellten wir uns eine Lösung von 40 mgr Hirudin in physiologischer Kochsalzlösung (5 bis 10 ccm) her und ließen in diese aus der in die Carotis eines Hundes eingebundenen Kanüle 400 ccm Blut zulaufen. Es enthält demnach 1 ccm Blut ungefähr 0,1 mgr Hirudin. Diese Blutmenge, welche, wie eine Probe zeigte, tagelang ungeronnen blieb, wurde sofort solange stark zentrifugiert, bis wir ein Hirudinplasma erhielten, welches frei von korpuskulären Elementen, vor allem auch frei von Plättchen war und mit Thymol aufbewahrt, absolut ungeronnen blieb. Es folgen die mit diesem Hundehirudinplasma angestellten Versuche:

Versuchsreihe A. 21. VII. 05.

a) Versuch: Hundelebersaft.

Temp.	Plasma	10 proz. CaCl ₂	Lebersaft	Zeit
Zimmer	2 ccm	1 Tr.	—	ungeronnen
	2 "	1 "	2 Tr.	20 Min.
	2 "	— 0	2 "	20 "
	2 "	1 Tr.	4 "	4 "
	2 "	— 0	4 "	4 "
	2 "	1 Tr.	6 "	3 "
	2 "	— 0	6 "	3 "
	2 "	1 Tr.	8 "	3 "
	2 "	— 0	8 "	3 "
	2 "	1 Tr.	20 "	3 "
	2 "	— 0	20 "	3 "
	2 "	1 Tr.	30 "	3 "
	2 "	— 0	30 "	3 "
	2 "	1 Tr.	40 "	3 "
	2 "	— 0	40 "	3 "

b) Versuch: Fluorid-Hundeplättchen-Aufschwemmung.
(Plättchen hochwirksam.)

Temp.	Plasma	10 proz. CaCl ₂	Plättchen	Zeit
Zimmer	2 ccm	1 Tr.	4 Tr.	7 Min.
	2 "	— 0	4 "	7 "
	2 "	1 Tr.	6 "	5 "

c) Versuch. Lebersaft + Plättchenaufschwemmung.

Temp.	Plasma	10 proz. CaCl ₂	Hunde- leber	Fluorid- Hunde- plättchen	Zeit
Zimmer	2 ccm	1 Tr.	2 Tr.	2 Tr.	7 Min.
	2 "	1 "	4 "	0,1 ccm	2 "
	2 "	1 "	10 "	0,4 "	2 "

Versuchsreihe B. 22. VII. 05.

a) Gewebssäfte (Hundeleber und Kalbsthymus).

Temp.	Plasma	Hunde- leber	Kalbs- thymus	Zeit
Zimmer	2 ccm	1 Tr.		ungeronnen
	2 "	2 "		nach 18 Min. flockige Ausfällung; keine typische Gerinnung
	2 "	3 "		nach 14 Min. fest geronnen
	2 "	4 "		" 10 " " "
	2 "	5 "		" 10 " " "
	2 "	6 "		" 7 " " "
	2 "	10 "		" 3 " " "
	2 "	20 "		" 2 " " "
	2 "	30 "		" 2 " " "
	2 "	—	1 Tr.	ungeronnen
	2 "	—	2 "	nach 3 Stunden flockig; keine typische Gerinnung
	2 "	—	3 "	} nach 45 Min. gelatinöse Flocken; nach 3 Stunden fest
	2 "	—	4 "	
	2 "	—	5 "	
	2 "	—	6 "	
	2 "	—	10 "	} nach 30 Min. kleine Flocken am Boden { nach 65 Min. fest
	2 "	—	20 "	
	2 "	—	30 "	

b) Fluorid-Hundeplättchen-Aufschwemmung.

Temp.	Plasma	Plättchen	Zeit
Zimmer	—	0,4 ccm	nach 45 Min. gelatinös geronnen
	2 ccm	1 Tr.	ungeronnen
	2 "	2 "	nach 23 Minuten flockig, nach 48 Minuten fest
	2 "	3 "	" 23 " fest
	2 "	4 "	} nach 10 Minuten Pfropf, nach 18 Minuten fest
	2 "	5 "	
	2 "	6 "	
	2 "	12 "	nach 10 Min. fest

c) Lebersaft + Plättchen.

Temp.	Plasma	Lebersaft	Plättchen	Zeit
Zimmer	2 ccm	1 Tr.	1 Tr.	nach 20 Min. flockig; keine feste Gerinnung
	2 "	2 "	2 "	nach 17 Min. fest
	2 "	3 "	3 "	" 10 " "
	2 "	4 "	4 "	" 9 " "
	2 "	2 "	12 "	" 10 " "

Kontrollversuche, in gleicher Weise mit Kalkzusatz angestellt, ergaben genau dasselbe Resultat.

Aus den Versuchen ergibt sich zunächst in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Morawitz, Fuld und Spiro, daß bei Zusatz von Gewebssaft zu Hirudinplasma eine gerinnungsfördernde Einwirkung statt hat. Aus unseren Versuchen geht aber ferner hervor, daß genaue quantitative Beziehungen bestehen zwischen der Menge des Hirudins und der Menge der zuzuführenden Kinase.

Setzt man an Stelle des Gewebssaftes Blutplättchen zu, so verläuft die Gerinnungsbeschleunigung ungefähr in demselben Sinne; nur bedarf es verhältnismäßig viel größerer Mengen Blutplättchenaufschwemmung, um die Hirudinwirkung zu paralysieren und auch dann verläuft die Reaktion langsamer.

Die an Hirudinplasma angestellten Versuche stehen scheinbar in direktem Gegensatz zu den Versuchen mit Fibrinogenlösungen, indem hier Zufuhr von Gewebssaft und Plättchenaufschwemmung die Hirudinwirkung aufhebt, während sie dort keinerlei Einfluß ausübt. Unsere Resultate führen daher zu dem zwingenden Schluß, daß weder der Kinase noch dem Thrombogen als solchem eine direkte Einwirkung auf das Hirudin zu-

kommt, daß vielmehr durch sie erst ein im Plasma vorrätiger, bis jetzt nicht bekannter Körper derart beeinflußt wird, daß er den Hirudinüberschuß neutralisieren kann. Diese Substanz findet sich im Blut, Plasma und Serum, aber nicht im Gewebssaft und in den Blutplättchen, wenigstens nicht in nennenswerter Menge.

Die Substanz kann im Serum nur in relativ geringen Quantitäten und in aktivem Zustand vorhanden sein, während eine Reserve in Form einer Vorstufe offenbar darin sich nicht findet. Das scheint uns daraus hervorzugehen, daß Aktivieren des Serums durch die üblichen Methoden offenbar keinen Einfluß auf den Hirudingrenzwert hat. Anders stehen die Verhältnisse im Plasma. Hier gibt es scheinbar eine inaktive Vorstufe neben der freien aktiven, sofort auf Hirudin reagierenden Form. Denn beim Plasma ist es ja möglich, durch Aktivieren mit Gewebssaft und Blutplättchen eine erhebliche Verschiebung des Grenzwertes herbeizuführen. Immerhin bedürfen die sehr komplizierten Verhältnisse noch weiterer Klärung.

Es scheint uns nicht wahrscheinlich, daß der angenommene Körper mit dem Thrombogen identisch ist, wie Fuld, Spiro und Morawitz wollen; denn Zusatz von Blutplättchen beeinflußt keineswegs die Gerinnung des Hirudinplasmas derart, wie es darnach zu erwarten wäre. Vor allem erzielt man durch Blutplättchenzusatz keine intensivere, vielmehr eher eine geringere Wirkung, wie durch Zusatz von Gewebsextrakt. Wir glauben daher, daß das wirksame Prinzip der Blutplättchenaufschwemmung in diesem Fall vornehmlich auf Rechnung der in ihr neben dem Thrombogen enthaltenen Kinase zu setzen ist, welche darnach nicht nur das Thrombogen, sondern auch noch die von uns im Blut und Plasma supponierte, auf Hirudin eingestellte Substanz in den aktiven Zustand überzuführen imstande ist. Über die Eigenschaften dieser Substanz können wir zunächst keine genaueren Angaben machen, als daß sie offenbar quantitativ mit Hirudin in Beziehung tritt.

Die Untersuchungen, welche sich als überaus langwierig und zeitraubend darstellten, wären noch mancher Erweiterung fähig gewesen. Leider mußten wir dieselben jedoch aus äußeren Gründen einstellen.

Zum Schlusse erlauben wir uns noch, Herrn Professor Jacoby unseren besten Dank auszusprechen für die Anregung zu dieser Arbeit, sein reges Interesse und die Bereitwilligkeit, mit der er uns die Hilfsmittel des Instituts zur Verfügung stellte.