

144. Über die Kinetik der Blutgerinnung I

von Richard G. Legler.

(4. VI. 43.)

Einleitung.

Die Zahl der am Blutgerinnungsvorgang beteiligten Stoffe ist beträchtlich, zudem gliedert sich der ganze Prozess in einzelne, teils ineinander übergreifende, teils nebeneinander ablaufende Vorgänge, welche sowohl kolloidaler als auch enzymatischer Natur sind (vgl. Gerinnungsschema). Dadurch werden die Verhältnisse ausserordentlich kompliziert; einen Beweis dafür bilden die grosse Zahl der voneinander abweichenden Gerinnungstheorien (vgl. die Übersichten von *Oppenheimer*¹⁾ und *Wöhlisch*²⁾).

In den letzten Jahren ist besonders die eng mit dem Vitamin-K-Problem zusammenhängende Beziehung zwischen Prothrombin-konzentration und Gerinnungszeit untersucht worden. Bei der Durchsicht der diesbezüglichen Literatur konnten wir feststellen, dass die meisten die obige Beziehung wiedergebenden Versuchsdaten mancher Autoren durch eine mathematische Gleichung ausgedrückt werden können, welche über erhebliche Zeit- und Konzentrationsbereiche hinweg gut den beobachteten Werten entspricht.

In der Folge ergab eine eingehendere Durchsicht der Literatur die formale Übereinstimmung obiger Gleichung mit einer von verschiedenen Autoren für die Beziehung zwischen Gerinnungszeit und Thrombin-, bzw. Thrombokinasekonzentration gefundenen Gesetzmässigkeit, welche allerdings in den neuesten Übersichten nicht die ihr gebührende Beachtung gefunden hatte. Die Gültigkeit dieser beiden Gleichungen kann jedoch auch durch unsere Untersuchungen bestätigt werden.

Wir fanden weiter, dass auch für eine Anzahl weiterer Beziehungen zwischen den die Blutgerinnung bestimmenden Faktoren die formal gleiche Gesetzmässigkeit besteht. Die Prüfung der Gültigkeit der Gleichungen erfolgt fast durchwegs an den Versuchsdaten verschiedener Autoren. Da diese meist unter voneinander abweichenden Versuchsbedingungen arbeiteten, dürften die gefundenen mathematischen Gleichungen eine weitergehende Gültigkeit besitzen als

¹⁾ *Oppenheimer, C.*, Die Fermente, 5. Aufl. 1925, Supplement 1939.

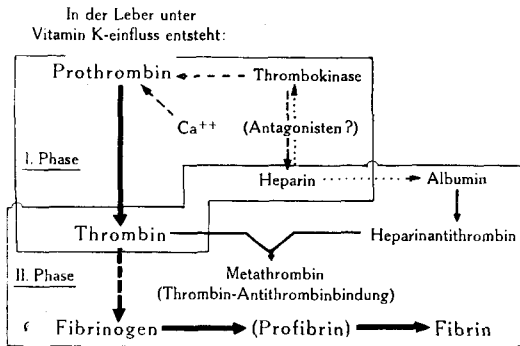
²⁾ *Wöhlisch, E.*, Ergebnisse Physiol. **28**, 443 (1929); **43**, 174 (1940); von zusammenfassenden Darstellungen seien noch erwähnt *v. Euler, H.*, Chemie der Enzyme II, München 1927; *Fuchs, H. J.*, Ergebnisse Enzymforschung **2**, 282 (1933).

diejenigen, welche nur unter einer ganz bestimmten Konstellation von Bedingungen abgeleitet wurden¹⁾.

Die praktische Anwendbarkeit der mathematischen Gleichungen ist besonders aus den Abschnitten über Prothrombin und II—IV ersichtlich, während ihre mehr theoretische Bedeutung hauptsächlich aus den Abschnitten V, VI und den Schlussfolgerungen hervorgeht (vgl. den zweiten Teil).

Gerinnungsschema.

Der schematischen Übersicht liegt das klassische Blutgerinnungsschema zugrunde. Wir lehnen uns an die Darstellung von *Wöhlisch*²⁾, führen jedoch nur die für die folgende Arbeit wichtigen Gerinnungsfaktoren auf. Wir versuchen, auch Heparin in das Schema einzuordnen.



Erklärung:

- Übergang von \longrightarrow in.
- Übergang von \dashrightarrow in. (Nebenvorgang)
- Einwirkung von $\cdots\cdots\cdots\rightarrow$ auf. (Wirkt sich in einer G.Z.-Beschleunigung aus.)
- Einwirkung von $\cdots\cdots\cdots\rightarrow$ auf. (Wirkt sich in einer G.Z.-Verzögerung aus.) (Teilweise nach *Wöhlisch*²⁾).

Prothrombin wird sehr wahrscheinlich in der Leber unter Einfluss von Vitamin K-Wirkung entfaltenden Substanzen gebildet. Bei Gegenwart von Thrombokinase und Calciumionen wandelt sich Prothrombin in Thrombin um (I. Phase der Blutgerinnung). Das entstandene Thrombin wirkt fermentkatalytisch auf Fibrinogen ein, dadurch entsteht aus letzterem Profibrin, welches schliesslich als Fibrin ausflockt (II. Phase der Blutgerinnung). Diese Flockung kann unter anderem durch Elektrolytzusatz be-

¹⁾ Wie wenig abgeklärt die heutigen Auffassungen auf diesem Gebiete sind, zeigt treffend die Geschichte der Beziehung zwischen Thrombokinanzentration und Gerinnungszeit (s. S. 1540 ff.). Selbst in den neuesten Übersichten (1940) von *Wöhlisch* (loc. cit.) und *Quick*; Am. J. Med. Sc., **199**, 118 (1940) sind die allgemein gültigen mathematischen Gleichungen nicht aufgeführt, trotzdem *Astrup*, Enzymologia **5**, 119 (1938/39) zeigte, wie ein schon 1922 von *Kugelmass*, Arch. intern. Physiol. **21**, 139 (1923), gefundenes Gesetz die richtige Beziehung darstellt. (Die sich *Wöhlisch* daraus ergebenden Unklarheiten und Widersprüche werden auf den Seiten 1542 ff. geklärt.)

²⁾ Ergebnisse Physiol. **43**, 174 (1940).

schleunigt werden. Gehemmt wird die Thrombinwirkung durch Albumingegenwart, da letzteres Thrombin bindet. Doch ist normalerweise die Affinität des Albumins zum Thrombin klein, deshalb geht Thrombin grösstenteils in eine Zwischenverbindung mit Fibrinogen ein, aus welcher dann die weitere Umwandlung des Fibrinogens resultiert. Ist jedoch Heparin zugegen, so wird nach *Quick*¹⁾ die Affinität des Albumins zum Thrombin sehr stark gesteigert und wächst sogar über diejenige des Fibrinogens hinaus. Thrombin wird dadurch fortschreitend in Metathrombin umgebildet, welches nicht mehr auf Fibrinogen einzuwirken vermag. (Thrombin-Inaktivierung.) Es tritt eine Gerinnungsverzögerung der II. Phase auf. Manche Autoren (vgl. *Jores* und *Detzel*²⁾) nehmen auch eine antagonistische Einwirkung von Heparin auf die Thrombokinase (also auf die I. Phase) an, welche sich ebenfalls in einer Gerinnungszeitverlängerung auswirkt.

Weiter ist die Gerinnungszeit von folgenden Faktoren abhängig: Temperatur, Neutralsalzkonzentration, Wasserstoff-Ionenkonzentration der Lösung, Wandbeschaffenheit.

Die Gesetzmässigkeit.

Wie wir sehen werden, ist die in der Blutgerinnung weitgehend anwendbare empirische Gesetzmässigkeit von folgender allgemeiner Form:

$$y = k \cdot x^{\pm a} \dots \dots \dots \text{I}$$

Durch Logarithmieren von Gleichung I erhalten wir die Gleichung einer Geraden:

$$\log y = \log k \pm a \log x \dots \dots \dots \text{Ia}$$

Tragen wir also den Logarithmus von y gegen den Logarithmus von x auf (am einfachsten bei Verwendung von Koordinatenpapier mit logarithmischer (nicht halblogarithmischer) Teilung) so muss — falls die beobachteten Werte einer Gesetzmässigkeit nach Gleichung I gehorchen — eine gerade Linie entstehen. (Vgl. Fig. 10.)

Im folgenden wird für den Beweis der Gültigkeit der Gleichungen die graphische Darstellung angewandt, da die Verhältnisse dadurch rascher und eindrucklicher überblickt werden können, als es durch eine Wiedergabe in Tabellenform möglich ist, und die Werte der Konstanten k und a leicht ermittelt werden können³⁾.

¹⁾ Am. J. Physiol. **123**, 712 (1938). ²⁾ Klin. W'schrift **19**, 641 (1940).

³⁾ Berechnung von a : a ist der Richtungskoeffizient der Geraden, wird also am einfachsten bestimmt durch Messen des Winkels, den die Gerade mit der Abszissenachse bildet. tg dieses Winkels ist dann $= a$.

Berechnung von k : Für $x = 1$ ist $\log x = 0$, so dass Gleichung II heisst:

$$\log y = \log k \text{ (für } x = 1) \dots \dots \dots \text{IIa}$$

Bei Verwendung des logarithmischen Koordinatensystems ist k also direkt ablesbar als das y des Schnittpunktes der Geraden mit der Ordinate über $x = 1$.

Entsprechend ist für $x = 10$ $\log k = \log y + a$
und für $x = 100$ $\log k = \log y + 2a$.

Zur genaueren Charakterisierung des Vorganges und Vermeidung unnötiger Wiederholungen wenden wir in unseren Gleichungen folgende Abkürzungen an:

Abkürzungen:

(Diese Abkürzungen gelten nicht für die Gleichungen III und V.)

- y = Variable.
- x = Variable.
- k = Konstante.
- a = Exponentialkonstante.
- c_p = Prothrombinkonzentration.
- c_{pn} = Prothrombinkonzentration von normalem Blut.
- c_{pp} = Prothrombinkonzentration von pathologischem Blut.
- c_k = Thrombokinasekonzentration.
- c_h = Heparin- (bzw. Hirudin-)konzentration.
- c_t = Thrombinkonzentration.
- c_{pf} = Profibrinkonzentration (= gebildete Profibrinmenge = [x]).
- c_{ns} = Neutralsalzkonzentration (in den Grenzen 1,5—2,5-n.).
- c_f = Menge gebildeten Fibrins = [x].
- [x] = Umgesetzte Substratmenge (entspricht z. B. c_{pf} oder c_f).
- t_p = Prothrombingerinnungszeit. (I. und II. Phase der Blutgerinnung).
- t_{pu} = Prothrombingerinnungszeit von normalem Blut.
- t_{pp} = Prothrombingerinnungszeit von pathologischem Blut.
- t_k = Gerinnungszeit (in Abhängigkeit von der c_k).
- t_h = Gerinnungszeit (in Abhängigkeit von der c_h).
- t_t = Thrombingerinnungszeit (G.Z. der II. Phase der Blutgerinnung).
- t_{tw} = Dauer der Thrombineinwirkung.
- t = Dauer der Wirkung (I. und II. Phase der Blutgerinnung).
- F.Z. = Flockungszeit.
- t⁰ = Temperatur in Grad Celsius (in den Grenzen + 1 bis ca. 35°).
- Q₁₀ = Temperaturquotient.
- K = Reaktionskonstante chemischer Prozesse.
- G.Z. = Gerinnungszeit.

I. Prothrombin.

1. Das Zeitgesetz.

Die Kenntnis des Prothrombingehaltes des Blutes ist zur exakten Indikationsstellung der Vitamin-K-Therapie klinisch wichtig, weil das antihaemorrhagische Vitamin K im Falle intakter Leberfunktion einen eventuellen Prothrombinmangel prompt zu normalisieren vermag. Es wurden mehrere Methoden zur Bestimmung des Prothrombingehaltes ausgearbeitet. Heute wird hauptsächlich die *Quick'sche* Methode klinisch angewandt.

Das Prinzip dieser Methode ist darauf begründet, dass die Gerinnungszeit von Plasma (oder auch Vollblut) bei optimaler Ca⁺⁺-Konzentration und Thrombokinaseüberschuss eine Funktion des Prothrombingehaltes ist, falls alle andern Versuchsbedingungen (wie Salzkonzentration, Temperatur usw.) konstant gehalten werden. Durch Verdünnung von gesundem Plasma mit normalem Prothrombin Gehalt mit prothrombinfreiem Plasma (oder physiologischer Kochsalzlösung) wird eine Verdünnungsreihe von Plasma mit bekanntem

relativem Gehalt an Prothrombin erhalten. Unter diesen Bedingungen ist die Gerinnungszeit des Plasmas (auch „spezielle Quick“-sehe Gerinnungszeit“ oder „Prothrombinzeit“ genannt) lediglich eine Funktion der Prothrombinkonzentration. Je geringer der Gehalt an Prothrombin ist, desto länger ist diese Prothrombingerinnungszeit (t_p). Anhand dieser Bestimmungen ist es nun möglich, die Beziehung zwischen Prothrombinkonzentration und Gerinnungszeit in Form einer Wirkungskurve zu zeichnen. Mittels dieser Kurve kann von Plasma mit unbekanntem Prothrombingehalt (c_p) auf Grund dessen Prothrombingerinnungszeit der zum normalen Testplasma relative Gehalt an Prothrombin in % der Norm angegeben werden.

Quick¹⁾ sowie Koller²⁾ stellen nun übereinstimmend fest, dass die Beziehung zwischen t_p und c_p durchaus nicht linear sei.

„Bei Verdünnung des Normalplasmas auf die Hälfte steigt die Prothrombinzeit nicht auf das Doppelte an, sondern zeigt nur eine geringfügige Verlängerung. Erst eine Verdünnung auf $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{5}$ äussert sich in einer deutlichen Zunahme dieser speziellen Gerinnungszeit.“ (Koller, S. 41.)

Auch Wöhlisch³⁾ erwähnt in seiner neuesten umfassenden Übersicht diese Verhältnisse (S. 218):

„Es ist sehr auffallend und nicht ohne weiteres verständlich, dass erst bei Prothrombinkonzentrationen unterhalb von 40% der Norm ein merklicher Anstieg der Gerinnungszeit festzustellen ist.“

Die Kurve von Koller (S. 42) — unsere Fig. 1 — veranschaulicht diese Beziehung. Ihre Regelmässigkeit ist auffallend. Dies veranlasste uns, sie auf die Gültigkeit einer mathematischen Gesetz-

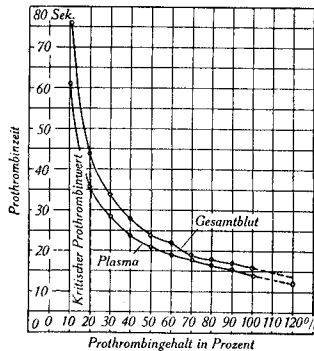


Fig. 1.

Die Beziehung zwischen Prothrombinzeit (t_p) und Prothrombinkonzentration (c_p).

Die Beziehung sowohl für Plasma, wie Gesamtblut für die von Koller verwendete Thrombokinase dargestellt im gewöhnlichen Koordinatennetz. 100% Prothrombin — Normalwert. (Abb. 1 der Monographie von Koller²⁾.)

¹⁾ J. Biol. Chem. **109**, 1xiii (1935).

²⁾ Das Vitamin K und seine klinische Bedeutung, G. Thieme, Leipzig (1941).

³⁾ Ergebnisse Physiol. **43**, 174 (1940).

⁴⁾ Das Vitamin K und seine klinische Bedeutung, G. Thieme, Leipzig 1941.

mässigkeit zu untersuchen. Es zeigte sich, dass in der Tat sowohl für die Versuchsdaten der Plasma- als auch der Gesamtblut-kurve eine empirische Gesetzmässigkeit analog Gleichung I gilt.

Setzt man $y = t_p$ und $x = c_p$ so lautet somit die Gleichung für die Beziehung zwischen Prothrombingerinnungszeit und Prothrombinkonzentration

$$t_p = k \cdot c_p^{-a} \quad \dots \dots \dots \quad \text{II}$$

Auch weitere Daten von *Koller* erfüllen Gleichung II ausgezeichnet. (Siehe weiter unten.) Wir prüften nun die Versuchsergebnisse anderer Autoren, um festzustellen ob die Gültigkeit der Gesetzmässigkeit nur das Resultat bestimmter Versuchsbedingungen ist oder ob sie weitgehend davon unabhängig sei. Wie wir sehen werden, erfüllen die überwiegende Mehrzahl aller Versuchsdaten Gleichung II.

Nun stellten aber *Quick* und *Leu*¹⁾ eine mathematische Beziehung zwischen Gerinnungszeit und Prothrombinkonzentration fest, die sich von Gleichung II unterscheidet:

$$c. t. = a + \frac{k}{c} \quad \dots \dots \dots \quad \text{III}$$

(c. t. = spezielle Gerinnungszeit nach *Quick*; c = Prothrombinkonzentration in % der Norm; a und k = Konstante.)

In Fig. 2 ist die Kurve von *Quick* und *Leu*¹⁾ eingezeichnet (Kurve C: a = 10,29; k = 353,72).

Die meisten Versuchsdaten von *Quick* (mit Ausnahme von *Quick*²⁾) stimmen jedoch mit Gleichung II überein.

Es sei hier kurz auf einige Fehlerquellen hingewiesen, welche einen Verlauf der Kurve vortäuschen können, wie er in Gleichung III zum Ausdruck kommt:

1. Fehler in der Zeitmessung. Bei hohen Konzentrationen und den sehr kurzen Gerinnungszeiten wirkt sich schon ein Fehler von einer Sekunde stark aus. Dies ist aus der Darstellung im doppeltlogarithmischen Koordinatensystem deutlich ersichtlich. Die Gerinnungszeiten unterhalb ca. 15 Sekunden sind deshalb mit einigem Vorbehalt zu betrachten.

2. Fehler, entstanden durch den grossen Einfluss, den die Temperatur auf die Gerinnungszeit hat. Die Temperatur hat einen sehr grossen und, wie später ausführlich gezeigt werden wird, gesetzmässigen Einfluss auf die t_p . Die Bestimmungen der t_p werden deshalb im Thermostaten bei einer konstanten Temperatur von meist 37° durchgeführt. Befindet sich z. B. das zu untersuchende Plasma im Thermostat, so muss dazu eine gemessene Menge Thrombokinase, sowie Calciumchlorid-Lösung gegeben werden. Trotzdem sich auch die Vorratslösungen im Wasserbad befinden, kann während des Abpipettierens der gerinnungsbeschleunigenden Lösungen doch — z. B. durch eine Pipette, welche nicht 37° warm ist — eine Abkühlung eintreten, welche bei der Zugabe zum Plasma dessen Temperatur kurzzeitig erniedrigt und auf diese Weise anfänglich die Gerinnung verzögert. Da diese Verzögerung nur bei kurzen Gerinnungszeiten (hohen Konzentrationen) sich relativ stark im Resultat bemerkbar machen wird, können sich solchermassen Abweichungen von Gesetzmässigkeit II ergeben und eine Gesetzmässigkeit entsprechend Gleichung III vortäuschen.

¹⁾ *Quick*, A. J. und *Leu*, M., J. Biol. Chem. **119**, 1xxxix (1937).

²⁾ J. Am. Med. Ass. **110**, 1658 (1938).

3. Fehler, entstanden durch die Inaktivierung der Thrombokinase. Die Hauptursache für eine Abweichung der Verdünnungskurve von Gleichung II dürfte die Abnahme der Aktivität der Thrombokinase während des Versuches sein. So schreibt Koller¹⁾ (S. 47):

„Wenig befriedigt hat uns die 1935 von Quick²⁾ angegebene Thrombokinase-darstellung. Die Kaninchenhirn-Aufschwemmung zeigt, je nach den verschiedenen Tieren, nicht unerhebliche Schwankungen der Aktivität, was einen direkten Vergleich der Resultate erschwert. Zudem ändert sich die Aktivität sehr rasch im Laufe des Versuches. Schon nach 15 bis 30 Minuten werden andere Werte erhalten als zu Beginn desselben.“

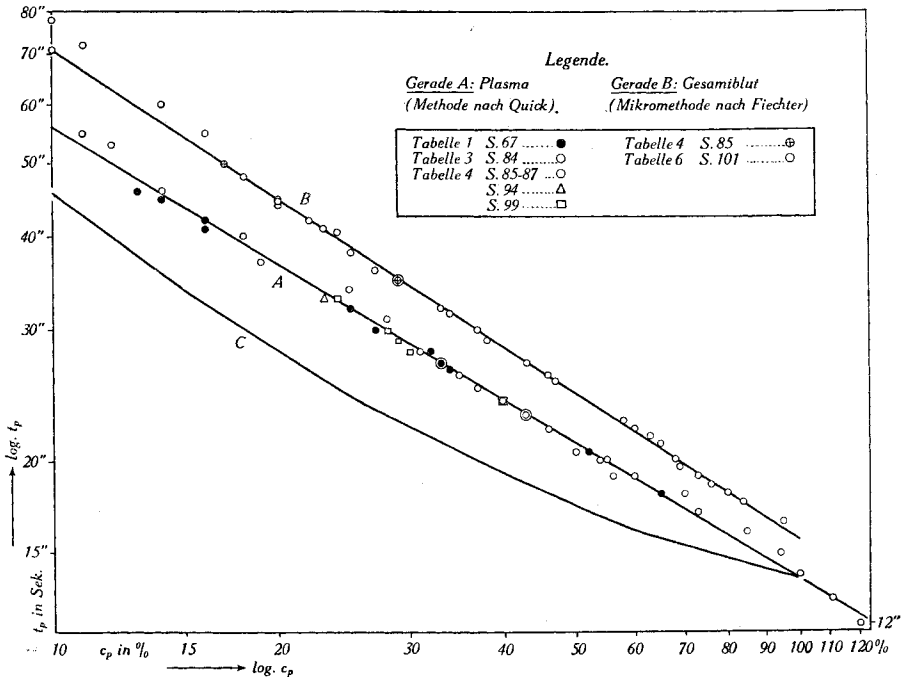


Fig. 2.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Die der Monographie von Koller entnommenen Daten im logarithmischen Koordinatennetz aufgetragen, bestätigen die Gültigkeit unserer Gleichung II.

Die Kurve C stellt die von Quick für die obige Beziehung gegebene Gleichung III dar. (Vgl. auch Fig. 4.)

Koller bemerkt weiterhin, die von Quick später (1940)³⁾ angegebene Methode der Thrombokinase-Herstellung, sowie diejenige nach Dam und Glavind⁴⁾, habe sich ausgezeichnet bewährt.

Koller führte seine Prothrombinbestimmungen mit dieser verbesserten Thrombokinase durch. Die Prüfung seiner Resultate ergibt nun aber auch tatsächlich ein Übereinstimmen mit Gleichung II; sie sind offenbar frei von einem „Thrombokinaseaktivitäts-

1) Das Vitamin K und seine klinische Bedeutung, G. Thieme, Leipzig 1941.

2) J. Biol. Chem. **109**, 1xiii (1935).

3) Am. J. Med. Sc. **199**, 118 (1940).

4) Dam, H. und Glavind, J., Acta med. Scand. **96**, 108 (1938).

verminderungsfehler“, der somit sehr wahrscheinlich der Grund ist, dass frühere *Quick*-sche und andere Veröffentlichungen Gleichung II nicht erfüllen und so zur Formulierung einer irrümlichen mathematischen Beziehung führten.

Es ist bezeichnend, dass die neuern Arbeiten von *Quick* diesen Fehler nicht mehr aufweisen. 1941 bemerkt *Quick*¹⁾ sogar, die entstehende Kurve sei ein Segment einer Hyperbel, deren theoretische Asymptoten durch die Koordinatenachsen gebildet werden, gibt jedoch keine mathematische Beziehung an und widerrufen Gleichung III nicht.

Besonders hervorzuheben ist, wie alle mit der offensichtlich sehr stabilen Schlangengift-Thrombokinase erhaltenen Resultate (s. Fig. 7 und 8) ebenfalls frei sind von einem solchen Fehler.

Einen guten Beweis der Abweichung von Gleichung II durch Verwendung instabiler, nicht frischer Thrombokinase zeigen die Versuchsdaten von *Souter* und *Kark*²⁾. Das Ziel ihrer Arbeit bildete die Herstellung eines stabilen, konservierbaren Thrombokinase-Präparates. Sie gewannen solche Thrombokinase durch einen „Lyophilisations“-Prozess (nach *Flosdorf* und *Mudd*³⁾). Zur Prüfung verglichen sie ihr Präparat mit *Quick*'scher Thrombokinase aus getrocknetem Kaninchenhirn (*Quick*, *Stanley-Brown* und *Bancroft*⁴⁾), indem sie mit diesem Material Vergleichsbestimmungen machten (s. Fig. 9). Von einem Teil dieses Trockenpulvers wurden nun Thrombokinase-Präparate nach der Lyophilisations-Methode hergestellt und mit dem *Quick*'schen Trockenpulver im Eisschrank aufbewahrt. Nach 1, 2, 3, 4 und 10 Wochen wurden die Prothrombinzeiten, die sich unter Verwendung dieser Thrombokinase-Präparate ergaben, ermittelt (ausgezogene Linien: lyophilisierte, gestrichelte Linien: *Quick*'sche Thrombokinase, Fig. 3). Daraus ist ersichtlich: Obschon die *Souter* und *Kark*'sche und die *Quick*'sche Thrombokinase nach längerem Aufbewahren sich nicht wesentlich voneinander in ihrer Wirkung unterscheiden, verändern sich beide nach längerer Zeit derart, dass Gleichung II nicht mehr erfüllt ist, während dies bei der frischen Thrombokinase (s. Fig. 3, Kontrolle nach 0 Wochen) der Fall ist.

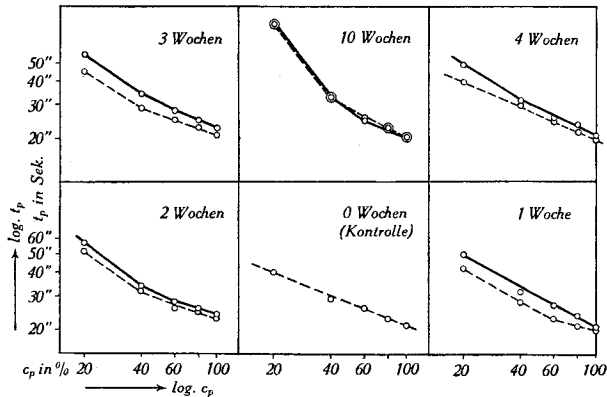


Fig. 3.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Diese Darstellung zeigt, wie die Wirksamkeit sowohl der *Quick*'schen (gestrichelte Linien), wie auch der lyophilisierten Thrombokinase beim längeren Aufbewahren sich ändert (abnimmt), und zwar wahrscheinlich während des Versuches. Die Kontrolle befolgt Gesetzmässigkeit II. (Versuchsdaten: *Souter* und *Kark*.)

1) Am. J. Physiol. **132**, 238 (1941).

2) *Souter*, A. W. und *Kark*, R., Am. J. Med. Sc. **200**, 603 (1940).

3) *Flosdorf*, E. W. und *Mudd*, S., J. Immunol. **29**, 389 (1935).

4) *Quick*, A. J. *Stanley-Brown*, M., *Bancroft*, F. W., Am. J. Med. Sc. **190**, 501 (1935).

Auch *Franke* und *Hörenz*¹⁾ weisen auf die Veränderlichkeit der Thrombokinase sowie des Plasmas hin und empfehlen deren Prüfung vor der diagnostischen Verwendung.

4. Fehler, entstanden durch Veränderung des Plasmas. *Witts* und *Hobson*²⁾ erwähnen, dass Plasma bei Zimmertemperatur sich nicht länger als 1 Stunde unverändert erhält. Nach Veröffentlichungen der *Link*-Gruppe ist besonders Dicumarinplasma sehr empfindlich (s. S. 1529). Die Substratkonzentration hat keinen erheblichen Einfluss auf die t_p . Dadurch ist innerhalb des Plasmakonzentrationsbereiches von 1:10 meist nur eine geringe Abweichung der Versuchsdaten von Gleichung II zu bemerken, falls statt mit prothrombinfreiem Plasma mit physiologischen Kochsalzlösungen verdünnt wird.

5. Heparineinfluss. Vergleiche Seite 1528.

Die Gültigkeit von Gleichung II bestätigende Versuchsdaten.

Aus der überwiegenden Mehrzahl aller Publikationen kann festgestellt werden, dass die Beziehung zwischen t_p und c_p gut durch Gleichung II ausgedrückt werden kann.

Wie Fig. 2 zeigt, gehorcht sowohl die Plasma- als auch die Gesamtblutverdünnungskurve von *Koller* Gleichung II. Weitere Beweise hierfür ergeben sich aus Fig. 4, da selbst *Quick's* Daten Gleichung II erfüllen (*Quick, Stanley-Brown* und *Bancroft*³⁾). Ausser bei unverdünntem Plasma, wo der Fehler jedoch auch nur ca. 5% beträgt, liegen alle andern Punkte gut auf einer Geraden.

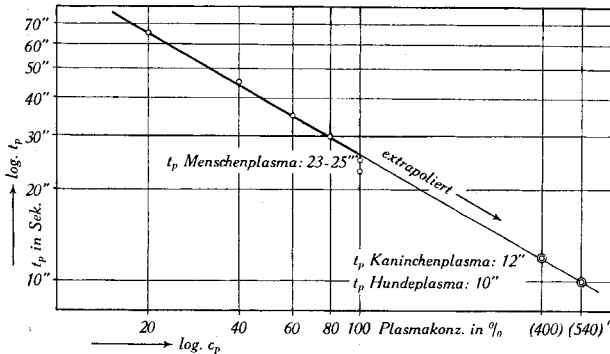


Fig. 4.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Gleichung II ist erfüllt. Beim Extrapolieren wird gefunden: Die t_p des Kaninchenplasmas von 12 Sekunden und die t_p des Hundeplasmas von 10 Sekunden entspricht einer 400-proz., resp. 540-proz. c_p (bezogen auf Menschenplasma), während *Quick* experimentell 900% fand. Dieser Widerspruch ist jedoch nur ein scheinbarer; in späteren Veröffentlichungen gibt *Quick* wiederholt ein experimentell bestimmtes Verhältnis der c_p von Menschenplasma verglichen mit derjenigen von Hunde- oder Kaninchenplasma von ebenfalls 1:5 an. — (Versuchsdaten: *Quick, Stanley-Brown* und *Bancroft*.)

In dieser Arbeit wird erstmals der Prothrombingehalt von Menschenblutplasma mit demjenigen von Kaninchen- und Hundeblood verglichen. Menschenblutplasma zeigt eine t_p von 23 bis 25 Sekunden, Kaninchenblutplasma jedoch von 12 und Hundeblood-

¹⁾ *Franke, H.* und *Hörenz, S.*, *Klin. W'schrift* **20**, 978 (1941).

²⁾ *Witts, L. J.* und *Hobson, F. C. G.*, *Brit. Med. J.* **1**, 575 (1942).

³⁾ *Am. J. Med. Sc.* **190**, 501 (1935).

plasma von 10 Sekunden. Obige Autoren fanden nun, dass sie das Plasma dieser Tiere zirka neunmal verdünnen konnten, bis es die gleiche t_p wie unverdünntes Menschenblutplasma zeige. Daraus schlossen sie auf einen neunmal höheren Prothrombingehalt. Durch Extrapolation der Verdünnungsgeraden in Fig. 4 findet man aber, dass einer t_p von 10 Sekunden eine c_p von 540% entspricht. Diese Resultate stehen also in scheinbarem Widerspruch zu den experimentellen Befunden. Jedoch fand *Quick*¹⁾ in späteren Untersuchungen wiederholt ein Verhältnis von 1:5 und nicht 1:9. So führt tatsächlich der durch Extrapolation gefundene Wert zum richtigen Resultat und somit ebenfalls zur Bestätigung von Gleichung II.

In Fig. 5 sind die neuen Versuchsdaten von *Quick* (1941)²⁾ (Gerade A und B), die theoretischen Daten von *Quick* und *Leu*³⁾ und die Versuchsdaten von *Koller*⁴⁾ einander gegenübergestellt. Zu ihren theoretischen Gleichungen (III) geben diese Autoren folgende Konstante:

Menschenplasma: $a = 10,29$, $k = 353,72$
 Kaninchenplasma: $a = 5,13$, $k = 139,4$

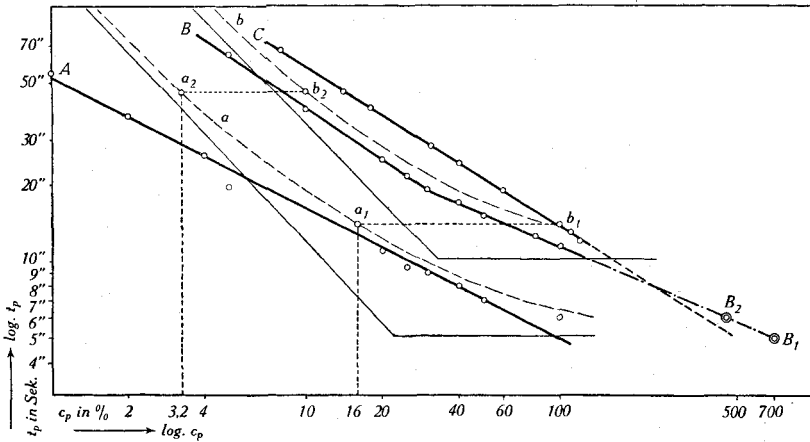


Fig. 5.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

- A: Kaninchenplasma. (Versuchsdaten: *Quick*, Am. J. Physiol. **132**, 238 (1941)).
- B: Menschenplasma. (Versuchsdaten: *Quick*, Am. J. Physiol. **132**, 238 (1941)).
- C: Menschenplasma. (Versuchsdaten: *Koller*.)
- a: Kaninchenplasma. Theoretische Kurve nach Gleichung III (*Quick* und *Leu*).
- b: Menschenplasma. Theoretische Kurve nach Gleichung III.

Zu den Kurven a und b sind die dazugehörigen Asymptoten eingezeichnet.

Aus dieser Zusammenstellung ist die Unhaltbarkeit der von *Quick* gefundenen Gleichung III klar ersichtlich:

1. Gemäss der theoretischen Kurven von *Quick* enthält Plasma a sechsmal mehr Prothrombin wie Plasma b, da eine 16-proz. Lösung von Plasma a die gleiche t_p (14 Sekunden) wie unverdünntes Plasma b zeigt. (Siehe Fig. 5, Punkte a_1 und b_1 .) Werden

1) Am. J. Physiol. **118**, 260 (1937); **132**, 238 (1941); J. Am. Med. Ass. **110**, 1658 (1938); J. Biol. Chem. **119**, lxxxii (1937).

2) Am. J. Physiol. **132**, 238 (1941).

3) J. Biol. Chem. **119**, lxxxii (1937).

4) loc. cit.

jedoch beide Plasma auf 10% verdünnt, so kann Plasma a nur noch auf 3,2% weiter verdünnt werden, um gleiche t_p wie Plasma b zu zeigen (a_2, b_2). Dies würde einem Verhältnis von nun nur noch 3:1, verglichen mit vorhin 6:1 entsprechen. Schon daraus geht die Ungültigkeit der Gleichung von Quick hervor, ist es doch sehr unwahrscheinlich, dass das Prothrombingehaltsverhältnis sich durch blosse Plasmaverdünnung verändert hat!¹⁾

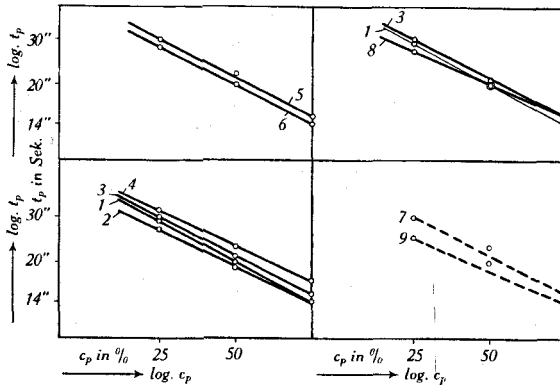


Fig. 6.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Die individuellen Werte der Nüchternblutuntersuchungen von neun Gesunden. Bis auf zwei Fälle (7 und 9) ist die Gesetzmässigkeit entsprechend Gleichung II sehr gut erfüllt. Die verschiedene Steigung der Geraden hat vielleicht ihre Ursache im wechselnden Hemmungsstoff-(Heparin-)gehalt des Plasmas. Siehe Text.

(Daten: Koller, S. 53.)

2. Mittels Gleichung III kann nur durch Interpolation die c_p des Menschenplasmas mit derjenigen von Kaninchenplasma verglichen werden. Bei Extrapolation der theoretischen Kurven a und b würden wir ein sinnloses Resultat erhalten: Jedes Plasma mit einer t_p unterhalb 10,29 Sekunden müsste ja einen unendlich höheren Prothrombingehalt als Menschenplasma haben! Gleichung II hingegen ergibt auch bei Extrapolation richtige Werte (s. Fig. 4 und 5). Extrapoliert hat unverdünntes Kaninchenplasma (Fig. 5, Gerade A) eine t_p von 5 Sekunden (Punkt B_1), woraus ein Verhältnis von ca. 1:7 hervorgeht, gemessen wurde für dieses Plasma experimentell eine t_p von 6 Sekunden (Punkt B_2), woraus sich ein Verhältnis von 1:5 ergibt. In Anbetracht der relativ grossen Zeitbestimmungsfehler, welche bei so kurzen Gerinnungszeiten entstehen können, stehen beide

¹⁾ Diese Verhältnisse wurden zwar tatsächlich konstatiert, haben aber ihren Grund in einem offenbar nicht gesetzmässigen Verlauf der Wirkungskurve. Die Link-Gruppe (Overman, R. S., Stahmann, M. A., Sullivan, W. R., Huebner, C. F., Campbell, H. A. und Link, K. P., J. Biol. Chem. 142, 941 (1942) erwähnt: — "the vexing question of translating plasma clotting times into percentage prothrombin on the basis of the dilution curve principle." (S. 943.) „Wird der Prothrombingehalt mittels dem Plasmaverdünnungskurvenprinzip bestimmt, so findet man, dass die Plasmakonzentration, bei welcher die Gerinnungszeit gemessen wurde, das Resultat beeinflusst“ (S. 951). Wir stellten beim Untersuchen dieser Verdünnungskurven fest, dass sie nicht Gleichung II gehorchen, sondern in logarithmischer Darstellung eine gebogene Linie ergeben. Auch hier wird die Ursache der Abweichung sehr wahrscheinlich teils in der Zersetzlichkeit der Thrombokinase, teils in der Veränderung des untersuchten Plasmas und eventuell auch in der Vernachlässigung der Substratkonzentration (Fibrinogen) begründet sein; die daraus hervorgehenden fehlerhaften Kurven ergaben deshalb eine unbefriedigende Genauigkeit der Resultate.

Resultate in sehr guter Übereinstimmung mit dem von *Quick* auf anderem Wege experimentell gefundenen Wert von 1:5¹⁾.

Fig. 6 fusst auf Daten von *Koller*²⁾. Er untersuchte die t_p des Nüchternblutes von 9 Gesunden an unverdünntem, auf die Hälfte und auf ein Viertel verdünntem Plasma. Bis auf zwei Fälle (7 und 9) gilt Gleichung II ganz ausgezeichnet (grösster Fehler höchstens + 3%). Auch die Mittelwerte dieser 9 Untersuchungen zeigen sehr gute Übereinstimmung mit Gleichung II.

Daten von *Kato* und *Poncher*³⁾ sowie *Edsall*⁴⁾ (Fig. 7) bestätigen ebenfalls Gleichung II.

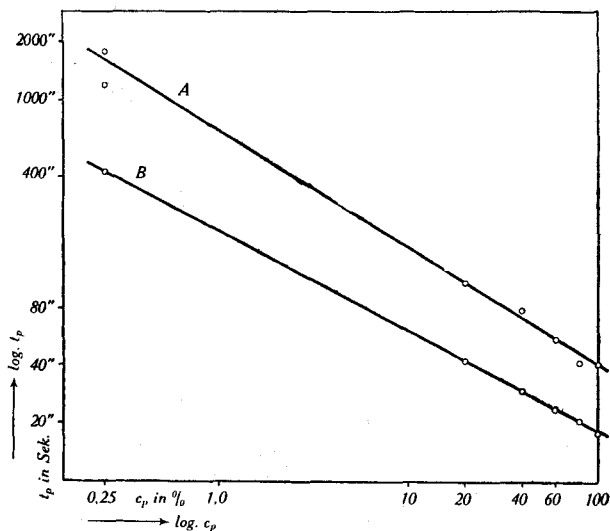


Fig. 7.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Gerade A: Plasmaverdünnungen werden mit prothrombinfreiem Plasma vorgenommen, Gerinnung wird durch Zusatz von optimalen Mengen CaCl_2 und Gewebsextrakt bewirkt. Gerade B: Wie bei A, aber als zusätzliche gerinnungsaktive Substanz wurde noch 0,01 mg Daboiagift (= Russelviperngift) beigefügt. (Versuchsdaten: *Edsall*.)

Auch hier ist die Gesetzmässigkeit gemäss Gleichung II erfüllt. (Konzentrationsbereich: 1 : 400!)

In Fig. 8 sind die neueren Versuchsdaten von *Witts* und *Hobson*⁵⁾ wiedergegeben, welche ebenfalls Prothrombingehaltsbestimmungen mit einer der *Quick*'schen ähnlichen Methode durchführten, aber als Thrombokinasen verschiedene Schlangengifte verwendeten.

¹⁾ Der Knick in der Geraden B ist auch in einer anderen Untersuchung von *Quick* (s. Die Beziehung zwischen c_t und t_t) anzutreffen, während alle anderen diesbezüglichen Veröffentlichungen diese Abweichung nicht zeigen. Vergleichsweise ist in Fig. 4 die Menschenplasma-Verdünnungsgerade C (Daten von *Koller*) eingezeichnet, welche diese Abweichung nicht zeigt. ²⁾ loc. cit., S. 53.

³⁾ *Kato, K. und Poncher, H. G.*, J. Am. Med. Ass. **114**, 749 (1940).

⁴⁾ *Edsall, G.*, Am. J. Physiol. **134**, 609 (1941).

⁵⁾ *Witts, L. J. und Hobson, F. C. G.*, Brit. Med. J. I, **1**, 575 (1942).

Diese Arbeit interessiert aus verschiedenen Gründen:

1. Die Autoren bemerken: „*Jaques*¹⁾ fand, es entstehe eine Gerade, falls der Logarithmus der Thrombinkonzentration gegen den Logarithmus der Gerinnungszeit aufgetragen wird, und wir fanden annähernd dasselbe zutreffend bei unsern Verdünnungsexperimenten die Prothrombinkonzentration betreffend.“ Ausser der Bestimmung der Steigung der Geraden (im Mittel wurde für tg des Steigungswinkels -1 gefunden, siehe jedoch weiter unten) wurden diese Verhältnisse jedoch nicht näher untersucht und es wurde auch keine mathematische Formulierung gegeben, denn sonst hätten die Autoren noch viel klarer die besondere Eignung ihrer Thrombokinasen bestätigen können. So ist ihre Fig. 1 in linearem Koordinatensystem aufgezeichnet und es wird einzig aus der „ähnlichen Form“ der unter Verwendung von Schlangengiftthrombokinasen entstandenen Kurven mit den aus Kaninchenhirntrockenpulver erhaltenen auf die Gleichartigkeit der Resultate geschlossen. Doch gerade hier ist zu erkennen, wie — offenbar wegen der instabilen *Quick*'schen Thrombokinasen — die Gerinnungszeit eine zusätzliche Verlängerung erfährt, wodurch Gleichung II nicht erfüllt wird (Fig. 8, dünne Kurven). Bei Verwendung der Schlangengiftthrombokinasen als stabile gerinnungsbeschleunigende Substanzen werden jedoch wiederholt Resultate erhalten, welche die Gültigkeit von Gleichung II bestätigen. (Vergleiche die aus Tabelle II von *Witts* und *Hobson* entstandenen Kurven in Fig. 8.)

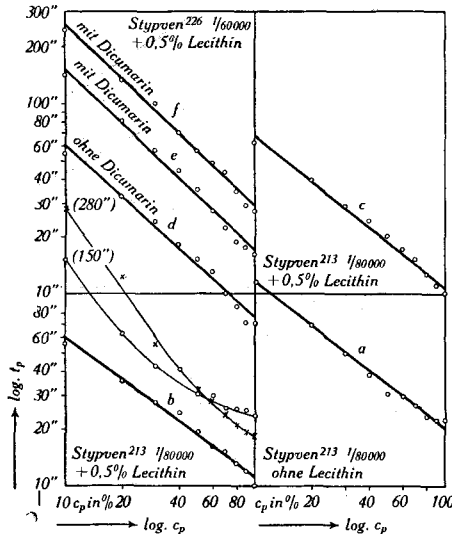


Fig. 8.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Bei Verwendung einer speziellen Schlangengiftthrombokinasen ohne — (Gerade a) — sowie mit Lecithinzusatz (Gerade b, c, d, e, f) ist die Gesetzmässigkeit gemäss Gleichung II erfüllt; nicht aber bei Verwendung der offenbar weniger stabilen Kaninchenhirn-Trockenpulver-Thrombokinasen. (Gebogene Linien.) Gerade d zeigt Plasmapverdünnungsdaten vor, Gerade e die Daten desselben Patienten nach, Gerade f Daten desselben Patienten nach erneuter Dicumarininjektion. Die Werte der Exponentialkonstanten betragen: Gerade a: $a = 0,765$; Gerade b: $a = 0,735$; Gerade c: $a = 0,81$; Gerade d: $a = 0,91$; Gerade e: $a = 0,95$; Gerade f: $a = 0,965$.

Versuchsdaten: *Witts* und *Hobson*.)

¹⁾ *Jaques*, L. B., *Biochem. J.* **32**, 1181 (1938); *J. Physiol.* **100**, 275 (1941); siehe unter: „Thrombin“.

2. Die Autoren bemerken, es könne zur Berechnung des Prothrombingehaltes die von *Quick* angegebene Gleichung benutzt werden (Gleichung III). Dies ist unverständlich, bestätigen doch ihre eigenen experimentellen Daten die Ungültigkeit dieser Gleichung.

3. Ebenso unerklärlich ist, wie die Gleichung von *Illingworth*¹⁾ gelten soll (s. weiter unten Gleichung V), wenn Gleichung III gelten soll.

4. Die Autoren kommen zum Schluss, es bestehe eine Beziehung der indirekten Proportionalität zwischen t_p und der Konzentration des menschlichen Plasmas an Prothrombin, und glauben deshalb einen Prothrombin-Prozentgehalt gemäss der folgenden einfachen Gleichung

$$\% \text{ Prothrombin} = 100 \frac{\text{Mittel von } (10^3 / \text{G.Z.})}{\text{Mittel der Plasma verdünnung}} \dots \text{Va}$$

berechnen zu können, was jedoch in Widerspruch steht zu den von ihnen selbst gegebenen Daten (Fig. 8, Gerade a—b—c), welche zeigen, dass bei Verwendung von Stypven 213 der Wert von a zwischen 0,735 und 0,795 sich bewegt, statt 1 zu sein, wie es eine Beziehung der indirekten Proportionalität erfordern würde (diesbezüglich s. auch unter: „Fehlerhafte Berechnung des Prothrombingehaltes“).

5. Das aufschlussreiche Verhalten der Konstanten a und k bei einer Dicumarin-Injektion wurde nicht untersucht. Diesbezüglich siehe unter „Prothrombingerinnungszeitbestimmung und Hemmungsstoffe“.

Auch die Versuchsdaten von *Plum*²⁾ (Fig. 9) erfüllen über einen Konzentrationsbereich von 1—20 % Gleichung II. (Vgl. auch S. 1528.)

In neuerer Zeit stellten *Campbell, Smith, Roberts* und *Link*³⁾ bei ihren Untersuchungen über die Süsskleekrankheit fest, dass innerhalb der engen Konzentrationsgrenzen von 8—25 % Prothrombin eine Gerade entstehe, falls t_p gegen c_p im doppellogarithmischen Koordinatennetz aufgezeichnet werde.

Diese Autoren verliessen jedoch in den folgenden Publikationen diese Darstellung wieder, und stellten keine mathematische Gesetzmässigkeit fest. (Vgl. auch S. 1522 und 1529.)

Auch die Daten von *Quick* und *Grossman*⁴⁾ (siehe S. 1527) bestätigen die Gültigkeit von Gleichung II.

In neuester Zeit stellten *Jansen* und *Jensen*⁵⁾ nach Angaben von *Larsen* und *Plum*⁶⁾ fest,

„dass das Verhältnis zwischen Prothrombinzeit und Prothrombingehalt in einem doppellogarithmischen System durch eine einigermassen gerade Linie dargestellt werden kann.“

Die Autoren leiten keine weitere Gesetzmässigkeit ab.

¹⁾ *Illingworth, C. F. W.*, Edinburgh Med. J. **46**, 762 (1939), zitiert nach *Witts* und *Hobson*.

²⁾ Dtsch. med. W'schrift **66**, 1389 (1940).

³⁾ *Campbell, H. A., Smith, W. K., Roberts, W. L., Link, K. P.*, J. Biol. Chem. **138**, 1 (1941).

⁴⁾ *Quick, A. J. und Grossman, A. M.*, Am. J. Med. Sc. **199**, 1 (1940).

⁵⁾ Z. physiol. Ch. **277**, 66 (1942).

⁶⁾ Ugeskr. Laeg. (Dän.) **103**, 1273 (1941).

Zusammenfassend dürfen wir aus letztern und den vielen von uns untersuchten Daten auf die Gültigkeit der Gleichung II schliessen.

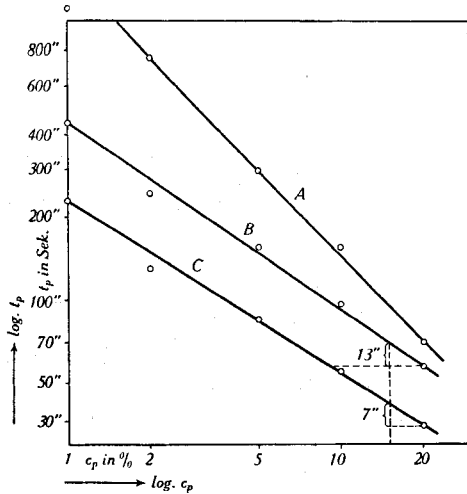


Fig. 9.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Mikromethode nach Plum und Dam. Diese Darstellung zeigt den Einfluss der Verdünnung sowie des Heparinzusatzes in vitro auf die Konstanten k und a . (Gesamtblut.)

Gerade C: 0,2 cm³ Blut + 0,1 cm³ Ringerlösung

Gerade B: 0,1 cm³ Blut + 0,2 cm³ Ringerlösung

Gerade A: 0,1 cm³ Blut + 0,2 cm³ Ringerlösung + Heparin.

(Versuchsdaten: Plum¹.)

2. Folgerungen und praktische Anwendungen.

a) Einfachere Ermittlung der Standardplasma-Verdünnungslinie (Eichkurve).

Die Beziehung zwischen c_p und t_p wird durch die verwendete Thrombokinase charakterisiert, jedes Thrombokinasepräparat ist nun nicht von genau gleicher Aktivität, hat also seine besondere Standardkurve. Zur Aufzeichnung einer solchen Kurve waren bisher ca. 8—10 Prothrombinbestimmungen bei verschiedenen Konzentrationen notwendig (Fig. 1). Bei Kenntnis der Gesetzmässigkeit entsprechend Gleichung II sind nun nur noch 2 c_p -Bestimmungen bei verschiedenen Konzentrationen (z. B. 100 % und 25 %) erforderlich.

b) Die Abhängigkeit der Konstanten k von der Verdünnung.

Innerhalb des Konzentrationsbereiches, für welchen Gültigkeit von Gleichung II besteht, ist k als Parametergrösse von der Verdünnung abhängig, a jedoch davon unabhängig:

¹) Dtsch. Med. W'schrift. 66, 1389 (1940).

Gilt die Gleichung

$$t_p = k \cdot c^{-a}$$

für normales unverdünntes Plasma, so heisst die Gleichung für v-mal verdünntes Plasma:

$$t'_p = k \cdot \left(\frac{100}{v}\right)^{-a}$$

Wie im nächsten Abschnitt ausgeführt wird, besteht manchmal das Bedürfnis, die neue Wirkungskurve des verdünnten Plasmas zu kennen, indem 100/v als Ausgangskonzentration der neuen Eichkurve betrachtet wird und wir schreiben können:

$$t_p = k' \cdot 100^{-a}$$

Der Wert von k' ist:

$$k \cdot \left(\frac{100}{v}\right)^{-a} = k' \cdot 100^{-a}$$

oder

$$k' = \frac{k}{v^{-a}} = k \cdot v^a \dots \dots \dots \text{IV}$$

Diese Gleichung zeigt die Abhängigkeit der Konstanten k' von der Verdünnung v. Qualitativ ist daraus zu ersehen, dass k' mit zunehmender Verdünnung grösser wird. (Vgl. auch S. 1529.)

c) Ermittlung des Prothrombingehaltes bei hohen Konzentrationen.

Da bei der Quick'schen Methode einer Senkung des Prothrombinspiegels von 100 % bis auf ca. 50 % nur eine geringfügige t_p-Verlängerung entspricht, verdünnten manche Autoren ihr Standardplasma auf die Hälfte mit physiologischer Kochsalzlösung und bestimmten experimentell die Eichkurve dieses verdünnten Plasmas.

Die Daten von Plum¹⁾ (Fig. 9) und besonders von Quick und Grossman²⁾ (Fig. 10) zeigen dies deutlich. Beim unverdünnten Plasma von Fig. 10 entspricht der 50 %-proz. c_p-Senkung eine t_p-Verlängerung von nur 3—4 Sek., während diese beim verdünnten Plasma 7 Sek. beträgt.

Durch die Gesetzmässigkeit der Beziehung zwischen c_p und t_p können wir nun bei bekannter Eichkurve des normalen Plasmas diejenige des verdünnten Plasmas in einfacher Weise ohne weitere Prothrombinbestimmungen ermitteln, wie dies aus Fig. 10 hervorgeht. Wir ziehen eine Parallele (gestrichelte Linie) zur Abszissenachse durch den Schnittpunkt der Geraden a mit der Ordinate über 50 %. Durch den Schnittpunkt dieser gestrichelten Linie mit der Ordinate über 100 % ziehen wir eine Parallele zur Geraden a. Diese Gerade b ist die Eichkurve des 50-proz. Plasmas.

¹⁾ Dtsch. Med. W'schrift **66**, 1389 (1940).

²⁾ Am. J. Med. Sc. **199**, 1 (1940).

(Aus Fig. 9 ist dasselbe ersichtlich, die Genauigkeit dieser Mikromethode ist allerdings nicht ganz so gross wie diejenige der *Quick'schen* und deshalb ist die Übereinstimmung etwas weniger gut.)

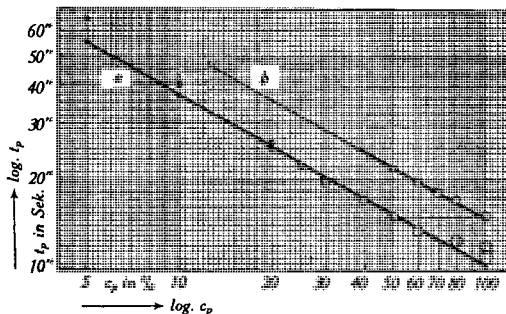


Fig. 10.

Die Beziehung zwischen t_p und c_p .

Plasma a: Unverdünnt.

Plasma b: Auf die Hälfte verdünnt.

Die Darstellung zeigt, wie bei bekannter Normplasmaverdünnungslinie a die Linie des auf die Hälfte verdünnten Plasmas b in einfacher Weise ohne weitere Prothrombinbestimmungen aufzuzeichnen möglich ist. Aus der Darstellung im logarithmischen Koordinatennetz geht auch hervor, welch grossen Einfluss ein Zeitmessungsfehler von nur $\pm \frac{1}{2}$ Sek. (Radius der Kreise) auf die Genauigkeit der Resultate bei hohen Prothrombinkonzentrationen hat.

(Versuchsdaten: *Quick* und *Grossman*.)

3. Prothrombingerinnungszeit und Hemmungsstoffe.

Wie aus dem Gerinnungsschema ersichtlich ist, hemmt Heparin die Blutgerinnung. Bei der Prothrombingehaltsbestimmung nach *Quick* wird dieser Faktor nicht berücksichtigt, bzw. als konstant angenommen; dass hierdurch aber manchmal Fehler entstehen können, indem eine Gerinnungszeitverlängerung nicht unbedingt das Resultat einer c_p -Verringerung ist, sondern durch einen eventuell höheren Heparin Gehalt hervorgerufen werden kann, ist schon von mehreren Autoren erwähnt worden (z. B. *Aggeler* und *Lucia*¹⁾ sowie *J. H. Ferguson* und *A. J. Glazko*²⁾).

Im Folgenden werden diese Verhältnisse in bezug auf Gleichung II näher untersucht. Das experimentelle Tatsachenmaterial ist zwar wenig umfangreich, immerhin erscheint es möglich, eine sehr einfache klinische Heparinbestimmung im Blut nach folgenden Grundsätzen durchführen zu können:

Aus den Versuchsdaten von *Plum* (Fig. 9) ist ersichtlich, welche Rolle der Heparin Gehalt im Plasma bei Prothrombinbestimmungen spielt: Zum Plasma, welches die Verdünnungsgerade B ergab, wurde Heparin zugesetzt. Die t_p dieses 20-proz. heparinhaltigen Plasmas, dessen c_p konstant blieb, ist nun 70 Sekunden statt 57, woraus man ohne Kenntnis des Heparinzusatzes schliessen würde, dass Plasma C nur 0,75-mal so viel Prothrombin

¹⁾ *Aggeler, P. M.* und *Lucia, S. P.*, Proc. Soc. exptl. Biol. Med. **38**, 11 (1938).

²⁾ *Am. J. Physiol.* **134**, 47 (1941).

enthalte wie Plasma B. Zu einem zunächst unerklärlichen Ergebnis kommt man beim Vergleich der obigen Daten mit denjenigen, welche beim Verdünnen der beiden Plasma auf 5% sich ergeben. Das Heparinplasma C gerinnt hierbei in 295 Sekunden, dies würde, entsprechend Verdünnungsgeraden B, einem Prothrombingehalt von nur 1,8% entsprechen, so dass das Plasma C bei dieser Verdünnung nur noch 0,28-mal so viel Prothrombin wie Plasma B enthalten würde, während doch beim Vergleich der 20-proz. Plasma dieses Verhältnis 0,75 betrug!

Durch Anwendung der Beziehung gemäss Gleichung II können die Verhältnisse geklärt werden. Fig. 9 nämlich zeigt deutlich, dass im Falle eines Heparinzusatzes sowohl die Konstante k als aber auch die Exponentialkonstante a grösser geworden sind. (Vgl. auch unter Thrombokinase.) Dadurch ist es möglich zu unterscheiden, ob bei Heparinzusatz (in vitro) eine verlängerte Gerinnungszeit durch eine Prothrombingehalts-Verminderung oder durch einen Heparinzusatz verursacht worden ist.

a) Ermittlung, ob eine t_p -Verlängerung durch ein Prothrombindefizit oder einen Hemmungsstoffüberschuss verursacht wurde.

Von dem zu untersuchenden Plasma wird die Verdünnungsgerade ermittelt und mit derjenigen des Norm-Plasmas verglichen:

Fall a: Liegt die Gerade parallel aber höher als diejenige des Norm-Plasmas, so wurde die t_p -Verlängerung durch eine c_p -Erniedrigung verursacht. (Der Wert der Konstanten k ist grösser geworden, derjenige der Konstanten a gleich geblieben.) (Vgl. Fig. 10, Gerade a und b, sowie S. 1526ff.)

Fall b: Liegt die Gerade höher und zeigt sie grössere Steigung (höhere Werte sowohl der Konstanten k wie a), so ist das betreffende Plasma heparinhaltiger als das Norm-Plasma. (Vgl. Gerade B und A, Fig. 9.)

Eine anschauliche Bestätigung dieses Verhältnisses fanden wir in den Versuchsergebnissen von *Witts* und *Hobson*¹⁾ sowie der *Link*-Gruppe (*Overman, Stahmann, Sullivan, Huebner, Campbell* und *Link*²⁾). Diese Forscher untersuchten den Einfluss von Dicumarinen auf die Blutgerinnung, da diese Verbindungen eine gerinnungshemmende, prothrombinzeitverlängernde Wirkung haben, welche jedoch von der Heparinwirkung verschieden ist. Heparin hat sowohl in vitro als auch in vivo eine koagulationshemmende Wirkung, während die aktiven Dicumarinverbindungen nur in vivo wirksam sind. Letztere Verbindungen ermöglichen nämlich den Prothrombingehalt herabzusetzen. Entsprechend dem auf dieser Seite unter a Gesagten sollte somit nach erfolgter Dicumarininjektion dieses Dicumarin-Plasma eine Verdünnungsgerade ergeben, die parallel aber höher als die Standardverdünnungsgerade des Norm-Plasmas liegt.

Es ist dies tatsächlich der Fall, wie bei Verwendung der Versuchsdaten von *Witts* und *Hobson* gezeigt werden kann (Fig. 8). Gerade d zeigt das Plasma eines Patienten vor, Gerade e das Plasma desselben Patienten nach, Gerade f das Plasma desselben Patienten nach einer wiederholten Dicumarininjektion.

Es ist besonders darauf hinzuweisen, dass auch die Versuchsdaten der *Link*-Gruppe das hier oben (unter a) Gesagte bestätigen. Die Autoren stellten zwar fest:

¹⁾ Brit. Med. J. 1, 575 (1942).

²⁾ J. Biol. Chem. 142, 941 (1942).

„However, it is to be noted, that the curve obtained by diluting the pathic (Dicumarin-) plasmas is not superimposable on the normal plasma curve by a shift of the axis“,

und glaubten deshalb, Dicumarin habe noch eine zusätzliche, ungeklärte Wirkung¹⁾.

Gemäss Gleichung II und dem auf S. 1526 Gesagten kann dies aber gar nicht der Fall sein, da sich ja nur bei logarithmischer Darstellung die Geraden durch Verschiebung der Achsen überdecken können. Dies trifft auch über den Konzentrationsbereich von 100—25% zu (Fig. 11). a ist bei beiden Geraden = 0,22²⁾.

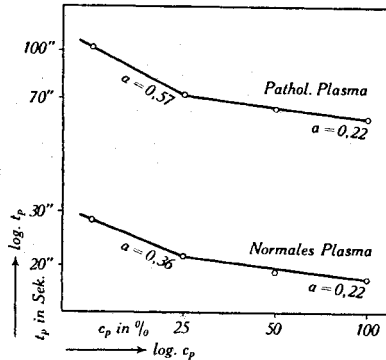


Fig. 11.

Im logarithmischen Koordinatensystem zeigen die Daten der *Link*-Gruppe, dass Dicumarin tatsächlich eine Prothrombingehaltsherabsetzende Wirkung hat, da die Verdünnungsgeraden über den Konzentrationsbereich von 100—25% zueinander parallel sind (vgl. S. 1529 und Fig. 8). Ferner kommt die raschere Inaktivierung des pathologischen Plasmas verglichen mit dem normalen auch im höheren Wert der Exponentialkonstante a (bei c_p -Werten über 5% des pathologischen Plasmas zum Ausdruck.

Hiermit kann somit bewiesen werden, dass Dicumarinverbindungen effektiv den Prothrombinspiegel senken und der Mechanismus der Gerinnungszeitverlängerung sich von demjenigen der Heparinwirkung klar unterscheidet. Dadurch kann also allein anhand von Plasmaverdünnungsbestimmungen festgestellt werden, ob Heparin- oder Dicumarinwirkung vorliegt.

Sind nun diese Verhältnisse in der menschlichen Pathologie überhaupt von Bedeutung? *Fanconi*³⁾ (S. 32) schreibt darüber:

„Überproduktion an Heparin (Antithrombin). Schon 1913 schrieb *Whipple*⁴⁾, dass das Prothrombin und das Antithrombin in einem labilen Gleichgewicht (delicate equilibrium) stehen und dass bei Antithrombinüberschuss Blutungen zu erwarten seien. In einer Arbeit von 1935 verneinen *Quick, Stanley und Bancroft*⁵⁾, dass das Antithrombin

¹⁾ Die graphische Darstellung der Autoren weist offenbar einen Fehler auf: Bei der Plasmakonzentration 100% beträgt die t_p des Dicumarinplasmas (pathic plasma) 60 Sekunden, wie dies auf S. 952 der Originalarbeit ausdrücklich bemerkt wird, und nicht 70 Sekunden.

²⁾ Die Gesetzmässigkeit nach Gleichung II gilt hier nicht bis herab zu 12,5% (s. S. 1520 und Fig. 11).

³⁾ Die Blutgerinnung beim Kinde mit besonderer Berücksichtigung des K-Vitamins und der Neugeborenen-Pathologie. *G. Thiem e*, Leipzig 1941.

⁴⁾ *Whipple, G. H.*, Arch. Internal Med. **12**, 637 (1913), zitiert nach *Fanconi*.

⁵⁾ Am. J. Med. Sc. **190**, 501 (1935).

in der menschlichen Pathologie von Bedeutung sei. *Koller* und *Schloss*¹⁾ konnten demgegenüber an der Zürcher Medizinischen Klinik zeigen, dass in gewissen Fällen, die mit einer Vermehrung der basophilen Leukocyten im Blut einhergehen, Antithrombin im Blut nachweisbar ist. Hier wird die klinische Forschung der nächsten Jahre kräftig einsetzen müssen.“

Vermittels obiger Beziehung lässt sich vielleicht zeigen, dass auch das Blut verschiedener gesunder Individuen nicht einen gleich hohen Gehalt an Hemmungsstoff hat:

Koller (S. 53) untersuchte die t_p des Nüchternblutes von 9 Gesunden bei den Plasmaverdünnungen 1, $\frac{1}{2}$ und $\frac{1}{4}$. Seine Daten sind in Fig. 6 dargestellt und erfüllen Gleichung II gut (mit zwei Ausnahmen, bei welchen jedoch der Fehler auch nicht mehr als +1,5 Sekunden beträgt.) Die Steigungen dieser Geraden sind verschieden und dafür ist — ein konstantes Thrombokinase-Präparat vorausgesetzt — der Hemmungsstoffgehalt verantwortlich. Recht deutlich geht aus dieser Darstellung aber auch hervor, welcher fälschenden Einfluss dies auf die c_p -Bestimmung haben kann. Das Plasma von Fall 3 und von Fall 8 hat unverdünnt eine Gerinnungszeit von 14 Sekunden, also ist anscheinend der Prothrombingehalt gleich hoch. Wird es jedoch auf $\frac{1}{4}$ verdünnt, so gerinnt Plasma 8 in 27 Sekunden, Plasma 3 hingegen erst in 30 Sekunden. Diese Resultate ergaben also, dass Plasma 3 verglichen mit Plasma 8 einen geringeren Prothrombingehalt hat. Wahrscheinlich ist aber das Umgekehrte der Fall. Denn, entsprechend der grösseren Steigung der Geraden 3, enthält Plasma 3 nur mehr Hemmungsstoff. Würde man nämlich Gerade 8 durch Zusatz von Hemmungsstoff auf die gleiche Steigung wie Gerade 3 bringen, so würde — da beide Konstanten k und a anwachsen — daraus eine längere Gerinnungszeit des Plasma 8 verglichen mit 3 resultieren, woraus nun eindeutig auf die geringere c_p des Plasmas 8 geschlossen werden kann.

Noch unerklärlicher ohne Kenntnis der obigen Verhältnisse wäre ein Vergleich von Plasma 1 mit Plasma 8: Das unverdünnte Plasma 1 hat eine kürzere t_p als Plasma 8. Nachdem beide Plasma auf $\frac{1}{4}$ verdünnt worden sind, resultiert das Gegenteil!

Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob bei genauen Prothrombingehaltsbestimmungen dieser „Hemmungsstoff- (bzw. Heparin-) fehler“ auf folgende Weise ausgeschaltet werden kann:

b) Prothrombingehaltsbestimmungen, welche von einem „Heparinfehler“ frei sind.

Dies wäre auf folgende Weise möglich: Beim Bestimmen der c_p nach der Methode von *Quick* wird die t_p bei 2 verschiedenen Plasmaverdünnungen gemessen. Es wird dann festgestellt, ob die Verdünnungsgerade des untersuchten Plasmas die gleiche Steigung wie diejenige des Normalplasmas hat. Ist dies der Fall, darf in bekannter Weise direkt auf die c_p geschlossen werden.

Zeigt jedoch die Verdünnungsgerade eine grössere Steigung oder geht sie bei tieferen c_p -Werten in eine gebogene Linie über²⁾, so enthält das betreffende Plasma mehr Hemmungsstoff und ist erst mit dem Normalplasma vergleichbar, wenn dessen Verdünnungskurve ebenso grosse Steigung hat, bzw. durch axiale Verschiebungen der Abszissenachse die beiden Kurven zur Deckung gebracht werden können. Zu diesem Zwecke wird dem Normalplasma so viel Heparin

¹⁾ *Schloss*, A., Diss. Med. Zürich 1939.

²⁾ Bei höheren Heparinkonzentrationen ist die Verdünnungslinie nicht mehr über ihrem ganzen Bereich eine Gerade (dieselben Verhältnisse treffen anscheinend auch für die Beziehung zwischen c_k und t_k zu. Vgl. unter Thrombokinase).

zugesetzt, bis dies der Fall ist. Die Heparinhalte beider Plasma sind nun gleich und dadurch können anhand dieser neuen „Heparin-Normplasmakurve“ in gewohnter Weise die c_p -Werte ermittelt werden, welche von einem Heparinfehler frei sind.

c) Bestimmung der Grösse des Heparin- (bzw. Hemmungsstoff-)überschusses.

1. Qualitativ.

Die Anwesenheit, sowie die ungefähre Konzentration an Hemmungsstoff kann somit aus dem Verlauf der Verdünnungskurve des untersuchten Plasmas in bezug auf die Normplasmakurve erkannt werden. Je steiler, bzw. je stärker gebogen erstere ist, desto grösser ist die Konzentration an Hemmungsstoffen¹⁾.

2. Quantitativ.

Die unter b) erwähnte Methode zur Korrektur der c_p -Bestimmungen von etwaigen Hemmungsstofffehlern ermöglicht gleichzeitig die quantitative Erfassung des Hemmungsstoffgehaltes des betreffenden Plasmas. Dieser wäre z. B. ausdrückbar in γ Heparin, welche pro cm^3 Normplasma zugefügt werden müssen, um die Verdünnungskurve des letzteren der Verdünnungskurve des an Hemmungsstoff übernormalen Plasmas anzugleichen. Wir befassen uns gegenwärtig mit der experimentellen Überprüfung dieser Verhältnisse und werden in einem späteren Zeitpunkt darüber berichten.

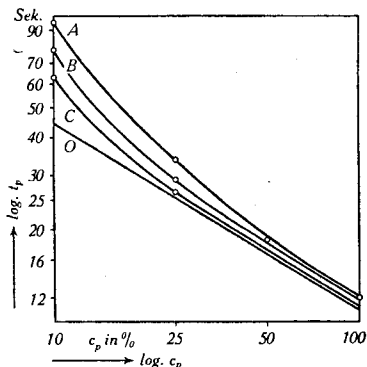


Fig. 11a.

Der Einfluss von Hemmungsstoffen auf die Beziehung zwischen c_p und t_p

Es bot sich uns in letzter Zeit Gelegenheit zu einer experimentellen Überprüfung dieser Verhältnisse²⁾:

¹⁾ Vgl. Figur 11a.

²⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle Herrn P.-D. Dr. F. Koller, der im Medizinisch-Chemischen Institut des Kantonsspitals Zürich diese Bestimmungen durchführen liess, für sein Interesse und Entgegenkommen bestens danken.

Kurve O = Norm-plasmaverdünnungslinie.

Kurve A = Verdünnungslinie eines pathologischen Plasmas, welches spontanes Antithrombin enthält, wie dies *Koller* mit der *Quick*'schen Bestimmungsmethode erstmals nachweisen konnte (S. 1531).

Kurve B = Verdünnungslinie eines Plasmas nach einer Liquemininjektion.

Kurve C = Verdünnungslinie eines gesunden Plasmas.

Wir ersehen aus obiger graphischer Darstellung, dass entsprechend dem auf S. 1531 gesagten, Plasma A am meisten, Plasma B etwas weniger, aber auch Plasma C einen geringen Gehalt an Hemmungsstoffen besitzen.

Der Prothrombingehalt von Plasma A und B wurde auch nach der *Quick*'schen Methode bestimmt und zeigte Übereinstimmung mit den obigen Resultaten. Nach diesen vorläufigen Ergebnissen zu schliessen, scheint die angegebene Methode zur Antithrombinbestimmung geeignet zu sein. Der Hauptvorteil gegenüber der *Quick*'schen Methode dürfte sein, dass auf die Verwendung von Thrombinlösung verzichtet werden kann.

Weiter ist aus obiger Figur gut ersichtlich, wie offenbar nur bei starken Plasmaverdünnungen der „Heparinfehler“ bei c_p -Bestimmungen bedeutend ist (t_p -Verlängerung gegenüber dem Normplasma: für das 10-proz. Plasma A ca. 50 Sek., bzw. beim Plasma B 32 Sek., bzw. beim Plasma C 18 Sek.), während er bei kurzen t_p -en vernachlässigt werden kann (vgl. auch Figur 9).

4. Fehlerhafte Berechnung des Prothrombingehaltes.

*Dam*¹⁾ schreibt 1940 anlässlich eines Überblickes über die Prothrombinbestimmungsmethoden:

„There is reason to believe that the values for prothrombin found by different methods do not agree very well. Thus the Iowa workers²⁾ indicate that the danger zone (the limit for occurrence of bleeding) is reached when the prothrombin level has fallen below 50 per cent of normal. The Copenhagen workers have never observed a bleeding tendency with a reduction of prothrombin to 50 or 30 per cent of normal“³⁾.

Wir glauben, dass der Hauptgrund dieser Unstimmigkeiten in einer fehlerhaften Berechnung des Prothrombingehaltes liegt. Statt mittels einer Eichkurve nach *Quick* auf Grund der speziellen Prothrombingerinnungszeit (t_p) den Prothrombingehalt (c_p) in Prozenten der Norm anzugeben, berechneten nämlich *Ziffren*, *Owen*, *Hoffmann* und *Smith*²⁾ mit ihrem vereinfachten, jedoch prinzipiell dem *Quick*'schen ähnlichen „Bedside-Test“ eine Prothrombin-„Aktivität“ nach folgender Formel:

$$\text{Gerinnungsaktivität (in \% der Norm)} = \frac{t_{pn} \text{ (normal)}}{t_{pp} \text{ (pathol.)}} \cdot 100 \quad V$$

(t_{pn} = Prothrombinzeit von normalem Plasma,
 t_{pp} = Prothrombinzeit von pathologischem Plasma.)

Schon *Quick*⁴⁾ erwähnte auf obige Veröffentlichung, Gleichung V beruhe auf der Annahme, die Gerinnungszeit sei eine lineare Funktion der Prothrombinkonzentration, er selbst habe jedoch gezeigt, dass die Beziehung zwischen t_p und c_p nicht linear sei (s. Gleichung III).

1) *Dam*, H., Ann. Review Biochem. 9, 375 (1940).

2) *Ziffren*, S. E., *Owen*, C. A., *Hoffmann*, G. R. und *Smith*, H. P., Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 40, 595 (1939).

3) Siehe S. 1524, sowie Fig. 8.

4) Proc. Soc. exptl. Biol. Med. 42, 788 (1939).

Da verschiedene Autoren einen Prothrombinindex, teils sogar eine „Prothrombinkonzentration“ auf obige Art berechnen, ohne den Nachweis der Gültigkeit dieser Beziehung erbracht zu haben (z. B. *Kato* und *Poncher*¹⁾, *Řeřábek*²⁾, *Norcross* und *Mc. Farland*³⁾, *Witts* und *Hobson*⁴⁾, *Illingworth*⁵⁾, *Freudenberg*⁶⁾, *Adams*⁷⁾), sei nachstehend gezeigt, wie bei Gültigkeit von Gleichung II — falls die Exponentialkonstante nicht = 1 oder fast = 1 ist — sich bedeutende Fehler ergeben können:

Entsprechend Gleichung II ist die t_p normalen Blutes mit einer Prothrombinkonzentration von 100 %

$$t_{pn} = k \cdot 100^{-a}$$

Diese wird mit der t_{pp} pathologischen Blutes verglichen, dessen Prothrombingehalt unbekannt ist:

$$t_{pp} = k \cdot c_{pp}^{-a}$$

somit

$$\frac{t_{pn}}{t_{pp}} = \frac{k \cdot 100^{-a}}{k \cdot c_{pp}^{-a}}$$

oder, da nach dem *Quick*'schen Prinzip die Prothrombinkonzentration als alleinige Variable betrachtet wird (also alle andern Versuchsbedingungen gleichbleiben), sind in beiden Fällen die Konstanten k und a gleich gross, woraus folgt:

$$\frac{t_{pn}}{t_{pp}} = \frac{100^{-a}}{c_{pp}^{-a}} = \frac{c_{pp}^a}{100^a}$$

und

$$c_{pp}^a = \frac{t_{pn}}{t_{pp}} \cdot 100^a$$

Besser noch ist die Abhängigkeit von c_{pp} vom Exponenten a folgendermassen zu überblicken:

$$a \cdot \log c_{pp} = \log t_{pn} - \log t_{pp} + a \cdot 2$$

oder

$$\log c_{pp} = \frac{\log t_{pn} - \log t_{pp}}{a} + 2 \quad \dots \dots \dots \text{VIa}$$

oder

$$c_{pp} = 100 \cdot \left(\frac{t_{pn}}{t_{pp}} \right)^{\frac{1}{a}} \quad \dots \dots \dots \text{VI}$$

Es ist daraus deutlich zu erkennen, dass nur wenn $a = 1$ oder nahezu gleich 1 ist, Gleichung V angewandt werden darf; ist jedoch a nicht gleich 1, so kann damit höchstens ein Prothrombinindex

1) J. Am. Med. Ass. 114, 749 (1940). 3) J. Am. Med. Ass. 115, 2156 (1940).
2) Klin. W'schrift 20, 368 (1940). 4) Siehe S. 1524, sowie Fig. 8.
5) Edinburgh med. J. 46, 762 (1939), zitiert nach Witts und Hobson.
6) Schweiz. Med. W'schrift 43, 1256 (1941).
7) Arch. Gynäkol. 172, II, 93 (1941).

berechnet werden, für welchen jedoch der Wert von a angegeben werden sollte, damit die Resultate verschiedener Autoren vergleichbar bleiben; den Prothrombiningehalt in Prozenten der Norm anzugeben ist jedoch unzulässig.

Wie wir zeigten, ist a kleiner als 1, falls nach der *Quick'schen* Methode mittels Thrombokinase aus Kaninchenhirn der Prothrombiningehalt bestimmt wird. Der Wert von a bewegt sich zwischen den Grenzen 0,5 und 0,7.

(Nur in einigen Fällen bei Verwendung von Viperngift (Stypven) von bestimmter Konzentration in Verbindung mit Lecithin erhielten *Witts* und *Hobson*¹⁾ indirekte Proportionalität zwischen t_p und c_p (Fig. 8, Gerade (d), (e), (f)). In anderen Fällen jedoch waren die a -Werte auch dieser Autoren nicht gleich 1; s. z. B. die Geraden (a), (b), (c). a beträgt hier im Durchschnitt 0,75.)

Wie gross die Fehler in bestimmten Fällen werden können, geht aus Tabelle I hervor.

Tabelle I.

$\frac{t_{pn}}{t_{pp}}$	Richtiger Prothrombiningehalt nach Gleichung II (Fehlerhafter Prothrombiningehalt nach Gleichung V)	
	für $a = 0,7$	für $a = 0,5$
$\frac{10}{40} = 0,25$	13,9% (25%)	6% (25%)
$\frac{10}{6} = 1,67$	207% (167%)	280% (167%)

Bei Prothrombinkonzentrationen, welche geringer als normal sind, werden die nach Gleichung V berechneten Resultate somit zu hoch, während bei übernormalen Konzentrationen zu tiefe Werte erhalten werden. Somit kann Gleichung V nur im Falle geringfügiger Gerinnungszeit-Unterschiede gegenüber der Norm sowie, wenn a fast gleich 1 ist, angewandt werden.

Wird hingegen der Prothrombiningehalt nach der Methode von *Dam* und *Glavind*²⁾ bestimmt, erhält man bei Hypoprothrombinämien zu tiefe c_p -Werte. (Vgl. Diss. *R. Legler*³⁾).

II. Thrombokinase.

*Mills*⁴⁾ (1921) fand folgende Beziehung zwischen der Verdünnung von Thrombokinasewirkung entfaltendem Lungenextrakt (x) und der Gerinnungszeit (y):

$$\log x = 3,4 \log y + 3,4$$

1) Brit. Med. J. **1**, 575 (1942).

2) Acta med. Scand. **96**, 108 (1938).

3) Diss. Univ. Zürich, im Druck.

4) *Mills, C. A.*, J. Biol. Chem. **46**, 16 (1921).

Diese Gleichung ist von der Form Ia; nur sind die Werte der Konstanten den Versuchsbedingungen entsprechend festgelegt.

*Fischer*¹⁾ gibt 1935 eine Gesetzmässigkeit zwischen Gerinnungsgeschwindigkeit (v) = reziproke Gerinnungszeit (t) und der Konzentration des Gerinnungsstoffes (c):

$$v = \frac{1}{t} = k \cdot c^a$$

(k und a sind Konstante.)

Fischer gebrauchte den Ausdruck „Gerinnungsstoff“ im allgemeinen für Organextrakte. Diese entfalten hauptsächlich Thrombokinasewirkung²⁾, weshalb wir die *Fischer*'sche Gesetzmässigkeit an dieser Stelle erwähnen.

(In einem Falle experimentierte dieser Autor auch mit „dem sogenannten Thrombin“ — („Organextrakt, der zusammen mit Serum bebrütet ist“) und konnte die Gültigkeit der obigen Gesetzmässigkeit auch für dieses Gerinnungsgemisch feststellen. (Vgl. unter: Thrombin.)

Fischer vermied es, die Werte der Konstanten festzulegen und erhielt deshalb gute Übereinstimmung zwischen beobachteten und berechneten Werten auch bei verschiedenen Gerinnungsgemischen. Weiter untersuchte dieser Autor den Einfluss der Versuchsbedingungen auf die Zahlenwerte der Konstanten a und k :

„ k hat je nach den Versuchsbedingungen sehr verschiedene Zahlenwerte und ist von der Konzentration des Gerinnungsstoffes abhängig.“

(Vgl. unsere Gleichung IV, welche die Abhängigkeit von k von der Prothrombin-konzentration quantitativ wiedergibt.)

Weiter fand *Fischer*, dass der Wert der Exponentialkonstanten a (welcher normalerweise ca. 0,5 sei) von der Heparinkonzentration abhängig ist und mit zunehmender Heparinkonzentration grösser wird³⁾. Bei grossen Heparinmengen bleibe jedoch die logarithmische Kurve nicht mehr eine Gerade. *Fischer* glaubt, letzteres sei durch die starke Dissoziation zwischen Heparin und Gerinnungsstoff verursacht. (Vgl. auch die ausführlichen Untersuchungen von *Astrup* und *Astrup*⁴⁾.)

Wir fanden — vorerst unabhängig von *Fischer* — dass diese Beziehung auch für die meisten Versuchsdaten von *Eagle*⁵⁾ und besonders⁶⁾ gut gilt. Als Thrombokinase benutzte dieser Autor Plätt-

¹⁾ *Fischer, A.*, Bioch. Z. **278**, 320 (1935).

²⁾ Nach *Wöhlisch* (Ergebnisse Physiol. **43**, 174 (1940), S. 189—90, Terminologiefragen, sowie S. 241, 253 und 320) ist unter dem von *Fischer* gebrauchten Ausdruck „Gerinnungsstoff“ ein Thrombokinasewirkung entfaltender Faktor zu verstehen.

³⁾ Es treten somit dieselben Verhältnisse auf wie wir bei der Beziehung zwischen c_p und t_p feststellten. (S. 1528 ff.)

⁴⁾ *Astrup, T.* und *Astrup, J.*, Enzymologia **6**, 64 (1939).

⁵⁾ *J. Gen. Physiol.* **18**, 531 (1935).

⁶⁾ *J. Gen. Physiol.* **18**, 813 (1935).

chenemulsionen. (S. z. B. Fig. 12.) Aus Analogiegründen schreiben wir die Gleichung in der folgenden Form:

$$t_k = k \cdot c_k^{-a} \dots \dots \dots \text{VII}$$

t_k = Gerinnungszeit, die I. und II. Gerinnungsphase umfassend.

c_k = Thrombokinasenkonzentration.

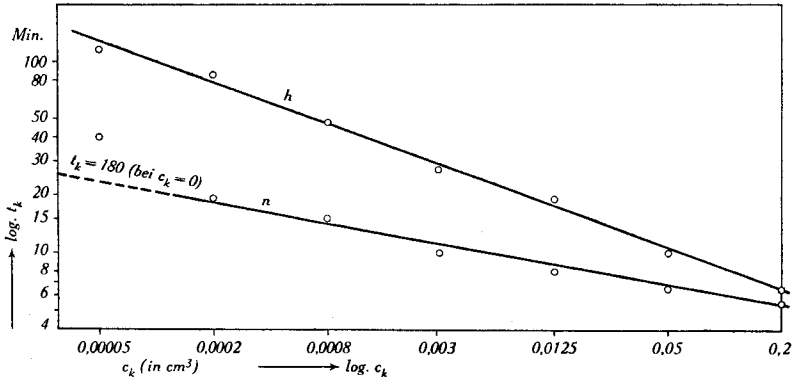


Fig. 12.

Die Beziehung zwischen t_k und c_k .

Die Abhängigkeit der Gerinnungszeit von der Konzentration der Thrombokinasewirkung entfaltenden Plättchensuspensionen wurde von *Eagle* untersucht. Die Gleichung von *Fischer* lässt sich gut auch auf diese Versuchsdaten anwenden, wie unsere Darstellung einer Versuchsreihe von *Eagle*¹⁾ (Tabelle II) zeigt. (Konzentrationsbereich über 1 : 1000!) n: Normalplasma. h: Plasma eines Hämophilen.

III. Heparin.

A. Fischer und *A. Schmitz*²⁾ drückten die Beziehung zwischen Gerinnungszeit und Heparinkonzentration durch folgende empirische Gleichung aus:

$$\log Z_1 - \log Z_2 = k_2 (c_1 - c_2)$$

in der Z_1 und Z_2 die Gerinnungszeiten sind, die bei der Heparinkonzentration c_1 bzw. c_2 gefunden werden, während k_2 eine Konstante ist. (Gerinnungssystem: Hühnerplasma mit so viel Gewebesaftezusatz, dass die Gerinnungszeit dieses Gerinnungsgemisches ca. 1—2 Minuten beträgt.)

Diese Gesetzmässigkeit wurde durch *T. Astrup*³⁾ besonders in Hinsicht auf deren Gültigkeit für andere koagulationshemmende Stoffe geprüft. *Astrup* fand, dass nicht alle Stoffe die obige Gleichung erfüllen (z. B. Germanin, Trypanblau, Cadmiumsulfat),

„... während die mit Liquoid-Roche, Chlorazol fast pink (Benzochtrosa), Methylenblau, Krystallviolett, Janusgrün und Kupfersulfat gewonnenen Kurven innerhalb der Versuchsgenauigkeit einen gesetzmässigen Verlauf haben. Im Beginn der Kurven zeigen sich vereinzelt Abweichungen, die darauf hindeuten, dass die Bindungs-

¹⁾ J. Gen. Physiol. **18**, 813 1935).

²⁾ Z. physiol. Ch. **210**, 129 (1932).

³⁾ Enzymologia **5**, 12 (1938/39).

verhältnisse bei niedrigen Konzentrationen des hemmenden Stoffes komplizierter sind; dieses Verhalten soll nicht näher berücksichtigt werden.“ (S. 13 der Originalarbeit.)

In einer späteren Veröffentlichung stellten *T. Astrup* und *J. Astrup*¹⁾ fest, dass Gleichung I nur für hemmende Stoffe gelte, welche stark dissozierende Verbindungen bilden, während die Autoren für undissoziierte Verbindungen eine andere kompliziertere empirische Gleichung mit vier Konstanten angaben.

Aus den Abbildungen 1 und 2 von *Fischer* und *Schmitz*²⁾ ist ersichtlich, dass die von diesen Autoren gegebene Gleichung nur über ein kleines Konzentrationsintervall von 2—6 mg Heparin gut mit den beobachteten Werten übereinstimmt.

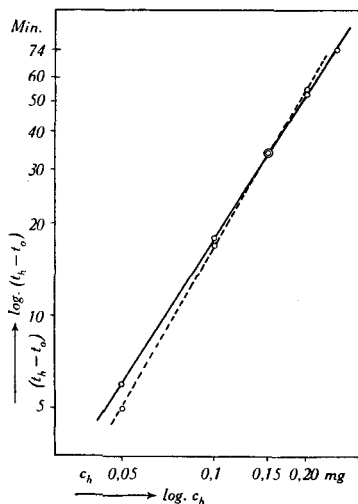


Fig. 13.

Die Beziehung zwischen Hemmung und Hemmungsstoffkonzentration. Ausgezogene Gerade: Gereinigte Hirudinlösung in 0,9% NaCl. Gestrichelte Gerade: Gereinigte Heparinlösung in 0,9% NaCl, in beiden Versuchen zu 4,0 cm³ Gesamtblut (Ziege) gegeben.

Die Übereinstimmung mit Gleichung VIII ist ausgezeichnet.
(Versuchsdaten: *Waldschmidt-Leitz*, *Stadler* und *Steigerwaldt*³⁾.)

Waldschmidt-Leitz, *Stadler* und *Steigerwaldt*⁴⁾ geben in ihren Untersuchungen über Hemmung und Beschleunigung der Blutgerinnung Daten, welche die Beziehung zwischen der Heparin-, sowie der Hirudinkonzentration und der Gerinnungszeit von Gesamtblut darstellen. Wir untersuchten, ob Gleichung I der richtige Ausdruck für diese Versuchsdaten sei. Es ist dies nicht der Fall, hingegen fanden wir, dass nachstehende Gleichung ausgezeichnet die

¹⁾ *Enzymologia* **6**, 64 (1939).

²⁾ *Z. physiol. Ch.* **210**, 129 (1932).

³⁾ *Z. physiol. Ch.* **183**, 39 (1929).

⁴⁾ *Waldschmidt-Leitz*, *E.*, *Stadler*, *P.* und *Steigerwaldt*, *F.*, *Z. physiol. Ch.* **183**, 39 (1929).

Beziehung zwischen Hemmungsstoffkonzentration und Gerinnungszeit wiedergibt (vgl. Fig. 13):

$$t_h - t_0 = k \cdot c_h^a \dots \dots \dots \text{VIIIa}$$

(t_h = Gerinnungszeit beim Zusatz von Heparin oder Hirudin der Konzentration c_h ; t_0 = Gerinnungszeit ohne Hemmungsstoffzusatz, k und a sind Konstante.)

Bemerkenswerterweise gehorchen auch die Versuchsdaten von *Fischer* und *Schmitz* von der Heparinkonzentration 8 mg % an der nachstehenden Gesetzmässigkeit (Fig. 14):

$$t_{h_2} - t_{h_1} = k \cdot (c_{h_2} - c_{h_1})^a \dots \dots \dots \text{VIII}$$

(t_{h_2} = Gerinnungszeit beim Zusatz von Heparin der Konzentration c_{h_2} ; t_{h_1} = Gerinnungszeit beim Zusatz von Heparin der Konzentration c_{h_1} , k und a sind Konstante.) Wird $c_{h_1} = 0$, so geht die Gleichung VIII in Gleichung VIIIa über.

Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob die von *Fischer* und *Schmitz* gefundene Beziehung durch die übernormalen Thrombokinasekonzentrationen verursacht wurden — denn die beiden Gerinnungssysteme unterscheiden sich voneinander hauptsächlich in dieser Hinsicht. Auch wäre zu prüfen, ob nicht Gleichung VIII, bzw. VIIIa sich besser zur Standardisierung des Heparins eignet, da die Versuchsbedingungen der *Waldschmidt-Leitz*-Gruppe eher den Verhältnissen in vivo entsprechen.

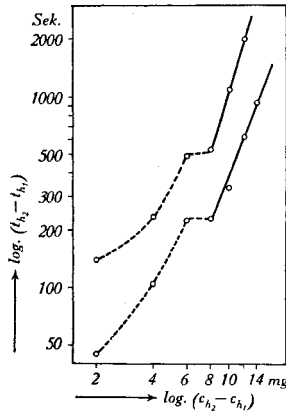


Fig. 14.

Die Beziehung zwischen Hemmung und der Konzentration des Hemmungsstoffes.

Die Gleichung von *Fischer* und *Schmitz* gilt nur bei tiefen Heparinkonzentrationen und kurzen Gerinnungszeiten, bei höheren gilt Gleichung VIII (ausgezogene Linien). Eigenartig ist der Knick beider Kurven.

(Versuchsdaten: *Fischer* und *Schmitz*.)

Der durch die Gleichungen VIII und VIIIa beschriebene Vorgang könnte als Adsorptionsvorgang gedeutet werden. Es sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass die Vergiftung der Saccharase sowie der Pankreaslipase durch Chinin der gleichen Gesetz-

mässigkeit zu gehorchen scheint. Denn nach Arbeiten von *Rona* schreibt *Oppenheimer*¹⁾:

„Trägt man die Logarithmen der Chininkonzentration auf der Abszisse, die Logarithmen der Hemmungen als Ordinate auf, so erhält man eine gerade Linie.“

IV. Thrombin.

(Isolierte 2. Phase der Blutgerinnung.)

1. Das Zeitgesetz.

Im Gegensatz zur Beziehung zwischen Prothrombinkonzentration und Gerinnungszeit ist die Beziehung zwischen Thrombinkonzentration (c_t) und Gerinnungszeit (t_t) schon früh eingehend untersucht und auf die Gültigkeit einer empirischen Gesetzmässigkeit geprüft worden.

Letzteres vor allem, um eventuelle Ähnlichkeiten mit den gesetzmässigen Beziehungen nachweisen zu können, wie sie zwischen der Konzentration des Fermentes und dessen Reaktionsgeschwindigkeit bestehen, um also womöglich auf reaktionskinetischem Wege Aufschluss zu erhalten über die immer noch nicht eindeutig gelöste Frage, ob das Thrombin ein Ferment sei oder nicht²⁾. Aber auch zur Ermittlung der relativen Thrombinkonzentration einer Thrombinlösung unbekanntes Gehalts ist die Kenntnis dieser Beziehung wichtig, indem — analog der Prothrombingehaltsbestimmung — die Thrombinkonzentration durch Ermittlung der Gerinnungszeit bestimmt wird; anhand einer Standard-Thrombin-Verdünnungskurve kann dann, falls alle übrigen Versuchsbedingungen identisch sind, auf den relativen Thrombingehalt zurückgeschlossen werden.

Es hat sich jedoch auch in der neuesten Zeit noch nicht die richtige mathematische Beziehung durchgesetzt, wie aus den Übersichten von *Quick*³⁾ und *Wöhlisch*⁴⁾ aus dem Jahre 1940 hervorgeht, obschon *Astrup*⁵⁾ 1938 diese Verhältnisse für die Thrombingerinnung richtig beschrieben hatte.

Astrup zeigte in seiner zusammenfassenden Darstellung, wie alle für die Beziehung zwischen Thrombinkonzentration und Gerinnungszeit früher gefundenen Gleichungen sich auf die Form bringen lassen:

$$t = \frac{1}{k} \cdot c^{-a}$$

(t = Gerinnungszeit eines Gerinnungsgemisches der Thrombinkonzentration c ; k und a sind Konstante.)

falls es vermieden werde, dem Exponenten a einen bestimmten Wert zu erteilen. Es sei verständlich, dass der Wert der Exponentialkonstanten nicht fixiert werden könne, da die Versuchsbedingungen, unter welchen die verschiedenen Autoren arbeiten, grösstenteils recht ungleichartig seien.

¹⁾ Die Fermente, 5. Auflage, Band I, S. 241 resp. 274.

²⁾ S. Übersichten: *Oppenheimer, C.*, Die Fermente, 5. Aufl. 1925; Supplement 1939; *Wöhlisch, E.*, Ergebnisse Physiol. **28**, 443 (1929); **43**, 174 (1940).

³⁾ Am. J. Med. Sc. **199**, 118 (1940).

⁴⁾ Ergebnisse Physiol. **43**, 320—23 (1940).

⁵⁾ *Astrup, T.*, Enzymologia **5**, 119 (1938/39).

Eine Reihe von Autoren fand indirekte Proportionalität zwischen Gerinnungszeit und Thrombinkonzentration (z. B. *Duclaux*¹⁾ und *Arthus*²⁾, *Loeb*³⁾, *Martin*⁴⁾, *Retzger*⁵⁾, *Mellanby*⁶⁾, *Bleibtreu*⁷⁾ und *Quick*⁸⁾. *Fuld*⁹⁾ (1902) fand jedoch, dass folgende Gleichung besser mit seinen Versuchsergebnissen übereinstimmte:

$$t = \text{konst.} \cdot c^{-0,585}$$

($t = t_t$; $c = c_t$),

und auch *Madsen* und *Walbum*¹⁰⁾ gaben eine formell gleiche Beziehung, die sich von der *Fuld*'schen nur im Werte des Exponenten, der bei ihnen $-\frac{2}{3}$ beträgt, unterscheidet.

*Kugelmass*¹¹⁾ (1921) gab als erster dem Exponenten keinen festen Wert mehr und setzte:

$$ck \cdot t = \text{konst.}$$

($c = c_t$; $t = t_t$; $k = \text{Konstante}$.)

und erhielt auf diese Weise bessere Übereinstimmung mit seinen Versuchsergebnissen.

Eine formell gleiche Beziehung gab auch *Barratt*¹²⁾ (1934) an:

$$t = \frac{b}{y^q}$$

($t = t_t$; $y = c_t$; b und q sind Konstante).

Die von *Fischer*¹³⁾ (1935) gefundene, unter „Thrombokinas“ erwähnte Gleichung gilt ebenfalls für Thrombin und ist von der gleichen Form wie die Gleichungen von *Kugelmass* und *Barratt*, wie dies *Astrup* (1938) zeigte.

Es ist gut zu erkennen, dass obige Gleichungen formal gleich sind mit unserer für die Beziehung zwischen Prothrombinzeit und Prothrombinkonzentration gefundenen Gleichung II. Aus Analogiegründen schreiben wir deshalb für die Beziehung zwischen Thrombinkonzentrationen und der (Thrombin)-Gerinnungszeit (II. Phase der Blutgerinnung):

$$t_t = k \cdot c_t^{-a} \dots \dots \dots \text{IX}$$

Wie erwähnt, ist diese Beziehung jedoch auch heute noch anscheinend nicht genügend bekannt, obschon ihre praktische Anwendung (besonders bei Verwendung des logarithmischen Koordinatennetzes) ebenso einfach ist, wie die Beziehung der indirekten Proportionalität.

Nachfolgend wollen wir zeigen, wie Gleichung IX tatsächlich der richtige Ausdruck ist auch für manche Versuchsreihen verschiedener Autoren, welche in Hinsicht auf eine Gesetzmässigkeit noch nicht untersucht wurden.

1) *Traité de Microbiol.*, Kap. 17 und 39, zitiert nach *Landsberg*.
2) *Arthus, M.*, *Soc. Biol.* **53**, 1024 (1901), zitiert nach *Oppenheimer*.
3) *Loeb, L.*, *Biochem. Zbl.* **6**, 829, 889 (1907).
4) *Martin, C. J.*, *J. Physiol.* **32**, 207 (1905).
5) *Retzger, L. J.*, *Am. J. Physiol.* **24**, 406 (1909); s. jedoch Fig. 17.
6) *Mellanby, J.*, *J. Physiol.* **38**, 28, (1909).
7) *Bleibtreu, M.*, *Pflüger's Archiv* **213**, 642 (1926).
8) S. jedoch Fig. 18, 19.
9) *Fuld, E.*, *Hofmeister's Beitr. chem. Physiol.* **2**, 514 (1902).
10) *Immunochemistry*, S. 94, New York 1907, zitiert nach *Wöhlisch*.
11) *Kugelmass, J. M.*, *Arch. intern. Physiol.* **21**, 139 (1923).
12) *Barratt, J. O. W.*, *J. Physiol.* **80**, 422 (1934).
13) *Fischer, A.*, *Bioch. Z.* **278**, 320 (1935).

In 3 Fällen (vgl. Fig. 17, 18, 19) fanden wir, dass selbst bei Versuchsreihen, für welche die betreffenden Autoren eine Beziehung der indirekten Proportionalität feststellten, Gleichung IX einen viel besseren Ausdruck darstellt.

Wichtig ist die Kenntnis der richtigen Gesetzmässigkeit auch für die Antithrombin-Bestimmung im Blute nach der Methode von *Quick*. Wir glauben, dass dadurch noch geringere Heparin-Antithrombinschwankungen gegenüber der Norm erkannt werden können.

Wir geben zunächst die Ausführungen von *Wöhlisch* wieder, weil die von diesem Autor ausgewählten Beispiele sich gut zur Klärung der Verhältnisse eignen.

*Wöhlisch*¹⁾ bemerkt, dass ausser *Bleibtreu* in neuerer Zeit auch *Quick* umgekehrte Proportionalität zwischen c_t und t_t feststellte, und zwar sowohl bei Verwendung von gereinigten Fibrinogenlösungen als auch von Menschen-, Hunde- und Kaninchen-Oxalatplasma als Substrat, während Meerschweinchenplasma sich anders verhalte.

Wöhlisch untersucht auch eine Arbeit von *Eagle*²⁾ und erwähnt:

„*Eagle* findet bei einer Verwendung von gereinigten Thrombin- und Fibrinogen-Lösungen eine Beziehung zwischen Thrombinkonzentration und Gerinnungszeit, nach der die Gerinnungszeiten bei Abnahme der Thrombinkonzentrationen weniger stark zunehmen, als dies der umgekehrten Proportionalität entspricht.“

Wöhlisch berechnet aus den *Eagle*'schen Daten die Produkte $c_t \cdot t_t$ ³⁾, welche konstant sein sollten, falls das Gesetz der indirekten Proportionalität Gültigkeit hätte, und findet: „... dass diese Produkte nicht annähernd konstant sind, sondern einen starken Gang im Sinne einer Zunahme mit steigender Thrombinkonzentration zeigen.“

„Das Ergebnis steht in anscheinendem Widerspruch zu den Daten von *Quick*⁴⁾ und *Mellanby*⁵⁾. Die aus den Daten von *Mellanby* berechneten Produkte $c_t \cdot t_t$ werden gerade durch Abnahme der Thrombinkonzentration unter einen Grenzwert zu einer Zunahme gegenüber der bei mittleren Thrombinkonzentrationen herrschenden Konstanz von $c_t \cdot t_t$ veranlasst. Ich vermute auf Grund des Vergleiches der Daten von *Mellanby*, *Quick* und *Eagle*, dass die Angaben keiner dieser Autoren die ganze Wahrheit über diese Frage enthalten. Möglicherweise nimmt das Produkt $c_t \cdot t_t$ im Bereich sehr kleiner Thrombinkonzentrationen zunächst mit steigender Konzentration ab (*Mellanby*), wird dann in einem bestimmten Konzentrationsbereich annähernd konstant (*Mellanby*, *Quick*), um bei weiterer Steigerung der Konzentration schliesslich zuzunehmen (*Eagle*). Es erscheint lohnend, diese Frage eingehender zu untersuchen, um die Widersprüche aufzuklären und zu einer Deutung der Erscheinungen zu gelangen.“

Bei der Untersuchung dieser Arbeiten fanden wir, dass für alle Versuchsdaten über weite Konzentrationsbereiche einzig Gleichung IX der allgemein gültige richtige mathematische Ausdruck ist:

Die Daten von *Mellanby*⁵⁾ folgen dem Gesetz der indirekten Proportionalität (Gleichung IX: $a = 1$). Die von *Wöhlisch* bemerkte Abweichung ist sehr wahrscheinlich durch experimentelle Schwierigkeiten verursacht, da *Mellanby* ausdrücklich bemerkt, dass bei

1) Ergebnisse Physiol. **43**, 174 (1940).

2) J. Gen. Physiol. **18**, 531 (1935).

3) Wir wenden unsere Abkürzungen an.

4) Am. J. Physiol. **114**, 282 (1936).

5) J. Physiol. **38**, 28 (1909).

hohen Thrombinkonzentrationen nur eine grob angenäherte Ermittlung der Gerinnungszeit möglich ist (Fig. 15).

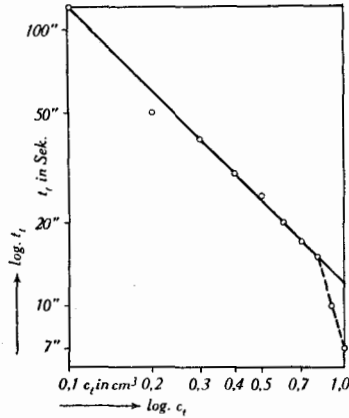


Fig. 15.

Die Beziehung zwischen t_t und c_t .

Die Versuchsdaten von Mellanby¹⁾ zeigen indirekte Proportionalität zwischen t_t und c_t . ($a = 1$) über einen Konzentrationsbereich von 1 : 8.)

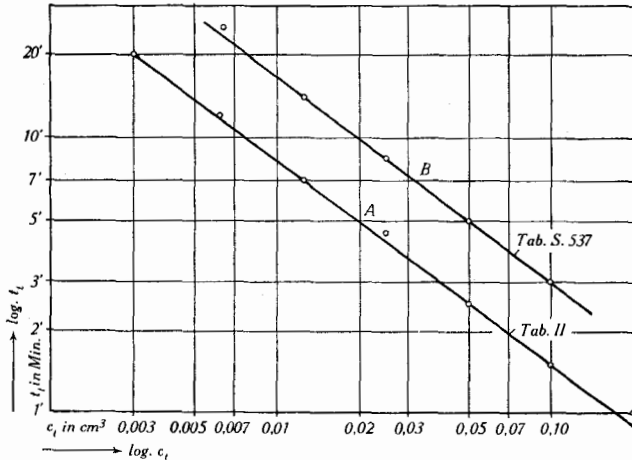


Fig. 16.

Die Beziehung zwischen t_t und c_t .

Die Versuchsdaten von Eagle²⁾ (Fig. 16) erfüllen Gleichung IX besonders gut über einen weiten Konzentrationsbereich (1:70). Die Versuche, welche Gerade B ergaben, unterscheiden sich von denjenigen, welche die Gerade A bilden, nur in der geringern Thrombinkonzentration. Deshalb ist die Exponentialkonstante in beiden Fällen gleich gross. Der Wert von a ist $= 0,75$, die Produkte $c_t \cdot t_t$ können somit nicht konstant sein. (Vgl. Tabelle II und III.) Die Konstante k zeigt hingegen die gleiche Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration, wie unter Thrombokinase und Prothrombin erwähnt wurde.

¹⁾ J. Physiol. **38**, 28 (1909).

²⁾ J. Gen. Physiol. **18**, 533 (1935).

Tabelle II.

Gerinnungsgemisch: Zu der Thrombinlösung so viel NaCl-Lösung, bis total 2 cm³ Lösung vorlagen.

(Daten: *Eagle*) Dazu dann 0,8 cm³ Fibrinogenlösung.

Thrombinmenge in cm ³	Gerinnungszeit (min.)	k (nach <i>Wöhlisch</i>)
0,003	20	0,060
0,0062	12	0,074
0,0125	7	0,087
0,025	4	0,10
0,05	2,5	0,125
0,1	1,5	0,15
0,2	1,0	0,2

Tabelle III.

Gerinnungsgemisch: wie bei Tabelle II, aber statt 0,8 cm³ werden 0,1 cm³ Fibrinogen- (Daten: *Eagle*) lösung zugesetzt.

Thrombinmenge in cm ³	Gerinnungszeit (min.)	k (von mir berechnet)
0,0062	25	0,125
0,0125	14	0,175
0,025	8 ½	0,212
0,05	5	0,25
0,1	3	0,3

Tabelle IV. (Daten: *Quick*¹⁾.)

Thrombinkonz.:	1	1/5	1/10	1/20	1/40	1/100
Substrat:	Gerinnungszeit (Sekunden) (bzw. von mir berechnete Werte von k)					
Fibrinogen (Mensch) in dest. Wasser	3,5 (3,5)	6 (1,2)	8 (0,8)	11 (0,55)	18 (0,45)	33 (0,33)
Fibrinogen (Meer- schwein) in Wasser	4 (4)	7 (1,4)	9 (0,9)	11 (0,55)	21 (0,525)	40 (0,40)
Fibrinogen (Hund) in ca. 0,85-proz. NaCl-Lösung	4,5 (4,5)	9 (1,8)	12 (1,2)	19 (0,95)	33 (0,826)	85 (0,85)
Fibrinogen (Hund) in ca. 1,2-proz. NaCl-Lösung	5 (5)	12 (2,4)	17 (1,7)	25 (1,25)	50 (1,25)	120 (1,20)
Plasma (Mensch)	4 (4)	7,5 (1,5)	11,5 (1,15)	18 (0,90)	33 (0,82)	77 (0,77)
Plasma (Meer- schwein)	5 (5)	8 (1,6)	19 (1,9)	27 (1,35)	105 (2,62)	—
Plasma (Hund)	4 (4)	8 (1,6)	13 (1,3)	17 (0,85)	33 (0,825)	80 (0,80)

¹⁾ Am. J. Physiol. 115, 317 (1936).

In Tabelle IV sind die von *Wöhlisch* erwähnten Daten von *Quick*¹⁾ aufgeführt, nach welchen letzterer Autor umgekehrte Proportionalität zwischen c_t und t_t feststellte. Wir berechneten nun die Werte von k (eingeklammerte Zahlen), welche konstant sein sollten, falls die obige Beziehung gilt. Das recht überraschende Ergebnis ist, dass hier k nicht konstant ist, sondern diese Werte vor allem bei den Thrombinverdünnungen von 1 bis $\frac{1}{20}$ einen Gang aufweisen, im gleichen Sinne wie ihn auch die aus den Daten von *Eagle* errechneten k -Werte zeigen. Die Unterschiede dieser Werte sind noch erheblich grösser als diejenigen der Daten von *Eagle*; denn die k -Werte sind bei der Thrombinkonzentration $\frac{1}{100}$ nur noch 10—25% so gross wie bei der Thrombinkonzentration 1. Somit besteht die von *Quick* festgestellte umgekehrte Proportionalität von Gerinnungszeit und Thrombinkonzentration nicht zu Recht.

Aus Fig. 18 ist hingegen zu ersehen, dass die *Quick*'schen Daten über den Konzentrationsbereich von 100—5% der empirischen Gesetzmässigkeit gemäss Gleichung IX gut entsprechen. In diesem Bereich ist aber a viel kleiner als 1. (Bei der Konzentration 5% erfolgt hingegen ein eigenartiger Knick aller Geraden, wie an andern *Quick*'schen Daten schon einmal festgestellt werden konnte, und einzig bei Hunde-Fibrinogen und -plasma ist im Konzentrationsbereich 5—1% $c_t \cdot t_t$ annähernd konstant.)

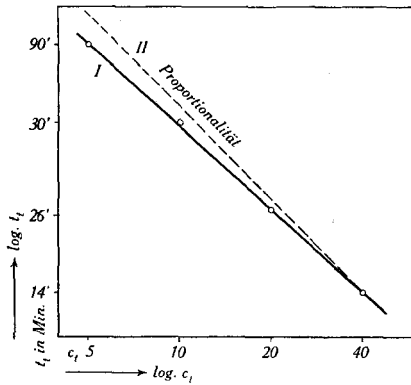


Fig. 17.

Die Beziehung Thrombingerinnungszeit — Thrombinkonzentration.

Es ist aus obiger Abbildung ersichtlich, dass die von *Rettger*²⁾ festgestellte Beziehung der direkten Proportionalität zwischen Gerinnungsgeschwindigkeit und Thrombinkonzentration nur angenähert richtig ist (Gerade II), während die nach Gleichung IX ($a = 0,9$) berechneten Werte ausgezeichnet mit den beobachteten Daten übereinstimmen (Gerade I).
(Versuchsdaten: *Rettger*, S. 411.)

¹⁾ Am. J. Physiol. **115**, 317 (1936).

²⁾ Am. J. Physiol. **24**, 406 (1909).

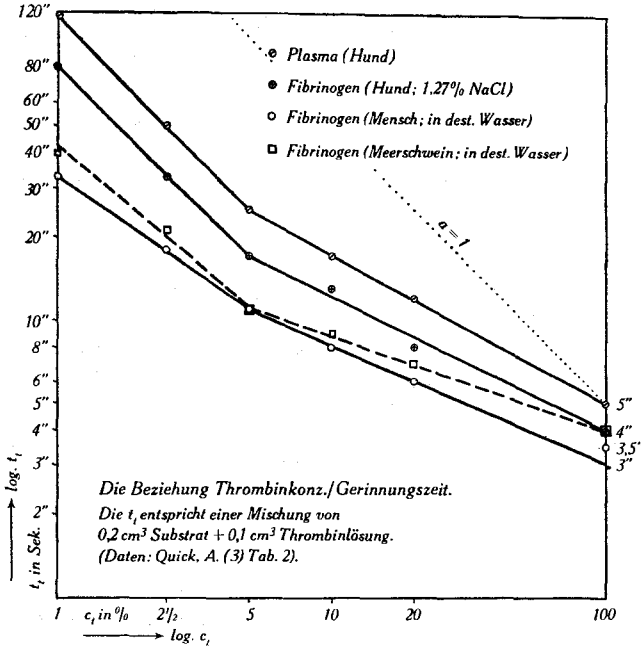


Fig. 18.

Die Beziehung zwischen t_t und c_t .

Über den Konzentrationsbereich von 100—5% folgen alle Daten von Quick, Gleichung IX (Werte von a : 0,35—0,55). Es besteht somit keine Beziehung der indirekten Proportionalität zwischen t_t und c_t . Dies ist angenähert einzig bei Hundeplasma und Fibrinogen innerhalb des Konzentrationsbereiches 5—1% der Fall. (Vergleichsweise ist die punktierte Linie eingezeichnet, welche die Beziehung der indirekten Proportionalität ($a = 1$) darstellt.)

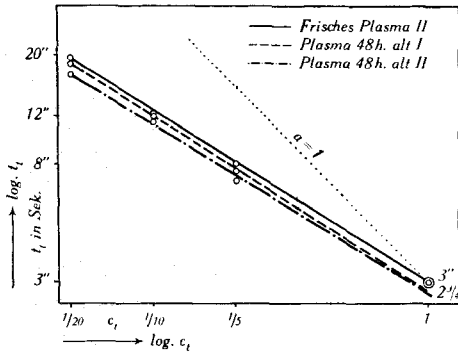


Fig. 19.

Die Beziehung zwischen Thrombingerinnungszeit und Thrombinkonzentration.

Untersuchung an frischem, sowie 48 h altem Plasma, welches bei 4° C . aufbewahrt worden war. Gerinnungsgemisch: $0,2 \text{ cm}^3$ Plasma mit $0,1 \text{ cm}^3$ Thrombin. (Thrombinverdünungen mit dest. Wasser.) $a = 0,63$ und nicht 1,0 (indirekte Proportionalität).

(Versuchsdaten: Quick¹⁾ (Tab. I).

¹⁾ J. Am. Med. Ass. 114, 1343 (1940).

Der Befund von *Quick* dürfte durch die besondere Art der graphischen Darstellung verursacht worden sein (vgl. *Wöhlisch*¹⁾, Abb. 31, sowie die Originalarbeit), aus welcher nur die bei hohen Verdünnungen auftretenden Verhältnisse klar ersichtlich sind.

*Quick*²⁾ gibt (1940) für kurze Gerinnungszeiten von 3'' auch noch eine andere, mit der von ihm für die Prothrombingerinnung gefundenen Gleichung III analoge Gleichung:

$$c. t. = a + \frac{k}{c}$$

(c. t. = Thrombingerinnungszeit, c = Thrombinkonzentration, a und k sind Konstante. Die Werte derselben sind: 2,38 resp. 88, falls die Thrombinlösung, welche das Plasma in 3'' zur Gerinnung bringt, als 100-proz. angenommen wird.) Diese Gleichung geht aber schon bei Gerinnungszeiten von über 12—15'' in die Beziehung der indirekten Proportionalität über. (Vgl. aber Fig. 19, wo auch für diese längern Gerinnungszeiten Gleichung IX viel besser mit den beobachteten Werten übereinstimmt.)

Die Festlegung der korrekten Gesetzmässigkeit ist besonders in bezug auf die *Quick*'sche Heparin-Antithrombinbestimmungsmethode wichtig, da diese auf dem Befund fusst, dass bei Heparinabwesenheit die Gerinnungszeit eine lineare Funktion der Thrombinverdünnungen darstelle, die graphische Darstellung somit eine Gerade ergebe, während bei Heparinzusatz zum Plasma die lineare Funktion gestört werde.

Nun ist aber meistens a viel kleiner als 1. Wir glauben, dass auch für Thrombinlösungen der Wert von a grösser wird, falls Heparin dem Plasma beigemischt wurde (vgl. Thrombokinase sowie Prothrombin). Es können dadurch schon gewisse Heparinmengen in Plasma, dessen a-Wert = 1 ist, enthalten sein.

Es ist deshalb sehr fraglich, ob tatsächlich die indirekte Proportionalität zwischen c_t und t_t auf die Abwesenheit von Heparin im Plasma schliessen lässt.

Wir glauben aber, dass analog zu den Befunden bei Thrombokinase und Prothrombin gesagt werden kann: Thrombinverdünnungsreihen mit kleinen a-Werten (0,4—1) enthalten weniger Hemmungsstoffe als solche, in welchen die Exponentialkonstante grössere Werte annimmt.

Bestimmt können dadurch auf analogem Wege wie beim Prothrombin (S. 1529ff.) durch Verfolgen der a-Werte mengenmässig noch erheblich kleinere Schwankungen des Heparinspiegels erfasst werden.

a) Die Gültigkeit von Gleichung IX bestätigende Versuchsdaten.

Auch die nachfolgenden Thrombingerinnungsdaten verschiedener Autoren, welche mit einer Ausnahme noch nicht auf eine Gesetz-

¹⁾ Ergebnisse Physiol. **43**, 174 (1940).

²⁾ Am. J. Med. Sc. **199**, 118 (1940).

mässigkeit geprüft wurden, zeigen Übereinstimmung mit Gleichung IX:

Quick¹⁾ (1940) untersuchte, ob sich Plasma beim Aufbewahren bei 4° C verändere. Wie aus Fig. 19 zu ersehen ist, beweisen diese Daten Gleichung IX ausgezeichnet. Die Abweichungen betragen maximal ½ Sekunde.

Yamada's²⁾ (1918) Verdünnungsreihen dienen zur Prüfung seines aus Knochenmark gewonnenen Thrombins. Auch dessen Versuchsergebnisse erfüllen die empirische Gesetzmässigkeit (s. Fig. 20).

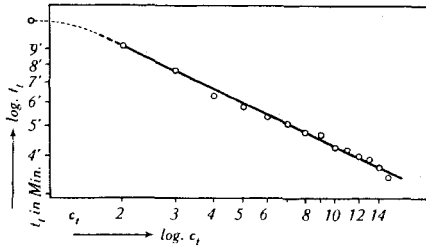


Fig. 20.

Die Beziehung zwischen Thrombingerinnungszeit und der Konzentration an Knochenmarkthrombin.

Knochenmarkthrombin nach Yamada in Ringerlösung auf Fibrinogen einwirkend (Temperatur: 20° C).

(Versuchsdaten: Yamada, Bioch. Z. **87**, 281 (1918), Tab. III.)

Fig. 21 liegen die Versuche von Stromberg³⁾ (1911) zugrunde. Dieser Autor prüfte, ob das Fuld'sche⁴⁾ Gesetz, die Schütz'sche Regel oder das Gesetz der indirekten Proportionalität gelte, stellte jedoch fest, es genüge keines dieser Gesetze über den ganzen Bereich. Für die Daten auf seiner Tabelle IV gilt aber die Gleichung IX sehr gut! Bei den andern Daten ist die Streuung etwas grösser, was offenbar den sehr verdünnten Thrombinlösungen zuzuschreiben ist, da hierbei Verunreinigungen, Erschütterungen usw. stark ins Gewicht fallen (bei der Konzentration 0,0156 fand der Autor z. B. bei Doppelbestimmungen Gerinnungszeiten, welche zwischen 7 und 24 Stunden schwankten). Für alle drei Geraden ist die Konstanz der Werte von a zu beachten, welche sich tatsächlich stark dem Fuld'schen Werte nähern, so ist z. B. für die Stromberg'sche Tabelle II $a = 0,57$, für diejenige von Tabelle IV $a = 0,59$ (Fuld: $a = 0,585$).

Hieraus ist demnach gut ersichtlich: selbst bei diesen kleinen Thrombinkonzentrationen wächst a nicht über 1, das Produkt aus c_t und t_p nimmt also mit grösser werdender Konzentration zu und nicht ab und weist auch hier den gleichen Gang auf, wie bei höheren Konzentrationen. Eine Abnahme von k ist sicher erst kurz vor dem Punkt der Fall, bei welchem die Thrombinkonzentration so weit abgesunken ist, dass keine Gerinnung mehr eintritt, weil das vorhandene wenige Thrombin wahrscheinlich zerstört oder sonstwie adsorptiv (z. B. durch Verunreinigungen etc.) gebunden wird, so dass keine Einwirkung auf Fibrinogen zustande kommt.

¹⁾ J. Am. Med. Ass. **114**, 1343 (1940).

²⁾ Yamada, M., Bioch. Z. **87**, 273 (1918).

³⁾ Stromberg, H., Bioch. Z. **37**, 177 (1911).

⁴⁾ Fuld, E., Hofmeister's Beitr. chem. Physiol. **2**, 514 (1902).

Die Daten von *Schmitz* (Fig. 22) bestätigen diese Vermutung. Dieser Autor untersuchte die Abhängigkeit der Gerinnungsgeschwindigkeit des Fibrinogens von der Konzentration an Gerinnungsglobulin¹⁾ und kam zum Schluss:

„Die Gerinnungsgeschwindigkeit steigt also nicht proportional dem Gehalt der Fibrinogenlösung an Gerinnungsglobulin an, sondern die Beziehung zwischen beiden ist von komplizierterer Form.“

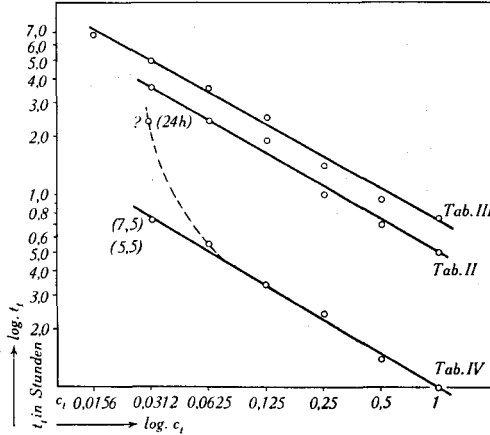


Fig. 21.

Die Beziehung zwischen Thrombingerinnungszeit und Thrombinkonzentration.

Thrombinlösung: Hauptsächlich Kaninchenserum, teilweise auch Thrombin nach *A. Schmidt*²⁾. Fibrinogenlösung: $MgSO_4$ -Plasma nach *A. Schmidt*. Die gestrichelte Linie zeigt die Unsicherheit bei Gerinnungszeitdoppelbestimmungen, falls die Gerinnungszeit länger als 4—5 Stunden dauert. In derselben Beobachtungsreihe wurden bei gleichen Thrombinkonzentrationen Gerinnungszeiten sowohl von 7 ½ Stunden (mit Gleichung IX übereinstimmend) als auch von 24 Stunden gefunden. —
(Versuchsdaten: *Stromberg*³⁾.)

Wie aus Fig. 22 hervorgeht, lässt sich diese Beziehung ebenfalls durch die Gesetzmässigkeit entsprechend Gleichung IX gut darstellen, und zwar bis zu der sehr geringen Globulinkonzentration von nur 0,008 %.

Wie schon erwähnt, hat *Jaques*⁴⁾ (1941) für seine Thrombinbestimmungen festgestellt, dass beim Auftragen des Logarithmus der Gerinnungszeit zum Logarithmus der Thrombinkonzentration eine Gerade entstehe.

¹⁾ *A. Schmitz*, Z. physiol. Ch. **222**, 155 (1933), konnte das *Mellanby*-Fibrinogen durch Aussalzen in zwei Fraktionen aufteilen, nämlich in das eigentliche Fibrinogen und in ein durch Halbsättigung mit Ammoniumsulfat fällbares „Gerinnungsglobulin“, einem gerinnungsfördernden Protein, das nach *Schmitz* mit der *Mellanby*-Prothrombase (*Mellanby*, Proc. Roy. Soc. [B] **107**, 271 (1930), zitiert nach *Schmitz*) identisch zu sein scheint. Durch Aktivierung mit Thrombokinase geht dieses Plasmaglobulin in ein hochwirksames Thrombinpräparat über (im vorliegenden Falle wurde das Globulin mit Nierenextrakt und Calciumchlorid aktiviert).

²⁾ Zur Blutlehre, Leipzig 1892, zitiert nach *Yamada*.

³⁾ Bioch. Z. **37**, 177 (1911).

⁴⁾ J. Physiol. **100**, 275 (1941).

Aus all' diesen Versuchsdaten, welche den sehr weiten Gerinnungszeitbereich von 3 Sekunden bis 7 Stunden umfassen, ist somit zu ersehen, dass die Beziehung der indirekten Proportionalität nur

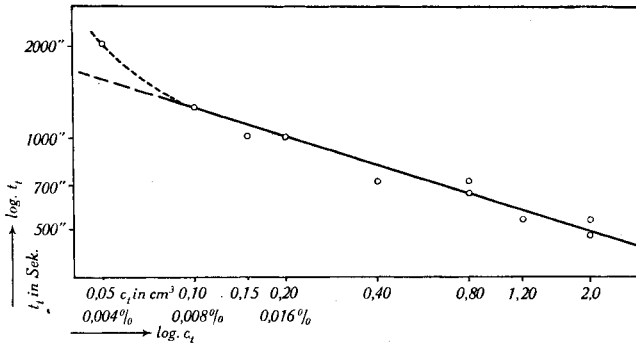


Fig. 22.

Die Beziehung zwischen Gerinnungszeit und der Plasmaglobulinkonzentration. (II. Phase.)

Das Schmitz'sche „Gerinnungsglobulin“ wurde durch eine Nierenextraktthrombokinasen in eine Thrombinwirkung entfaltende Form übergeführt. Substrat: Fibrinogen. (Versuchsdaten: Schmitz.)

selten gilt und mehr ein Spezialfall der schon von verschiedenen Autoren (siehe Astrup) gefundenen Gleichungen nach Form der Gleichung IX ist. Normalerweise (bei Heparinabwesenheit) sind die Werte der Exponentialkonstanten kleiner als -1 und wachsen bei Zugabe dieses Hemmungsstoffes. Wieweit Gleichung IX in diesem Falle noch erfüllt bleibt, muss noch untersucht werden.

Ninhydrin.

Abschliessend sei noch gezeigt, dass die Gesetzmässigkeit nicht nur für Thrombin als gerinnungsaktive Substanz, sondern auch für die interessante Koagulation von reinem Fibrinogen oder Plasma durch eine einfache, organische Substanz gilt. *Chargaff* und *Ziff*¹⁾ entdeckten vor nicht langer Zeit die eigentümliche Tatsache, dass Fibrinogen durch Ninhydrin (Triketohydrinden) koagulierbar sei. Die aus Pferdefibrinogen entstandenen Fibrinflocken wurden analysiert und mit solchen, die durch Thrombineinwirkung auf das gleiche Substrat entstanden waren, verglichen. Die Analysenergebnisse für N und S zeigten entweder keine, oder nur in ganz geringem Grade eine Verbindung zwischen Ninhydrin und dem Protein, es schein deshalb, Ninhydrin übe eine thrombinähnliche Wirkung aus. Aus den von den Autoren ermittelten Daten entstand Fig. 23, aus der hervorgeht: es gilt für diese Koagulation tatsächlich auch die gleiche Gesetzmässigkeit wie für die Thrombingerinnung.

¹⁾ *Chargaff, E. und Ziff, M., J. Biol. Chem. 138, 787 (1941).*

Wenn wirklich diese Verhältnisse gleich sind, so besteht offenbar die Möglichkeit, die Thrombinwirkung relativ der Ninhydrinwirkung zu vergleichen und Thrombin dadurch zu

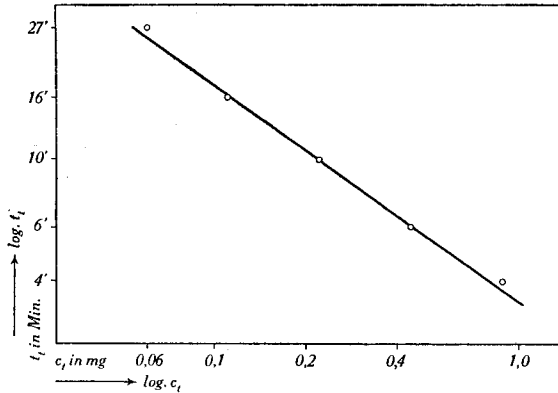


Fig. 23.

Die Beziehung zwischen der Koagulationszeit von Fibrinogenlösungen und der Ninhydrinkonzentration.
(Versuchsdaten: *Chargaff* und *Ziff*.)

standardisieren. Dasselbe wäre dann auch für Prothrombin möglich. (Indem dieses z. B. nach der Methode von *Warner*, *Brinkhouse* und *Smith*¹⁾ zuerst in Thrombin umgewandelt wird.)

Zusammenfassung des I. Teils.

I. a) Aus den Versuchsdaten verschiedener Autoren wird gezeigt, dass die Gleichung

$$t_p = k \cdot c_p^{-a}$$

ein guter Ausdruck der Beziehung zwischen Prothrombinkonzentration (c_p) und „Prothrombinzeit“ (t_p) ist. (k und a sind Konstante.) (Prothrombingehaltsbestimmungsmethode nach *Quick*.)

b) Da die logarithmierte Form der Gleichung graphisch dargestellt eine Gerade ergibt, eignet sich die Beziehung in dieser Form besonders gut zur Aufzeichnung der „Standardplasmaverdünnungskurven“ (Eichkurven), da lediglich zwei Prothrombinzeitsbestimmungen bei zwei verschiedenen Konzentrationen zur Festlegung der Kurve nötig sind. Dadurch sind auch Extrapolationen möglich.

c) Die Abhängigkeit der Konstanten k und der Exponentialkonstanten a von den Versuchsbedingungen wird untersucht: k ist als Parametergrösse eine relative Konstante, kann also je nach Masseinheit usw. sehr verschiedene Werte annehmen und ist deshalb

¹⁾ *Warner, E. D., Brinkhouse, K. M. und Smith, H. P., Am. J. Physiol. 114, 667 (1936).*

nur für bestimmte festgelegte Versuchsbedingungen konstant, und wird mit abnehmendem Prothrombiningehalt grösser. Es wird eine Gleichung für die Abhängigkeit von k von der Plasmaverdünnung gegeben.

Der Wert der Konstanten a hingegen ist vom Prothrombiningehalt des Plasmas sowie von andern Versuchsbedingungen weitgehend unabhängig, er bewegt sich in den Grenzen 0,4 bis 1 und ist normalerweise 0,6 bis 0,8. Durch Heparinzusatz wird a (sowie k) viel grösser. Es kann dadurch in einfacher Weise qualitativ entschieden werden, ob eine Prothrombinzeitverlängerung durch ein Prothrombindefizit oder durch einen Hemmungsstoffüberschuss verursacht wurde und ein eventueller „Heparin-Antithrombin-Fehler“ ausgeschaltet werden.

Ferner kann anschaulich die Verschiedenheit des Mechanismus einer Dicumarinhemmung von einer Heparinhemmung gezeigt werden.

Es wird das Prinzip einer einfachen, gleichzeitig mit den Prothrombinbestimmungen durchzuführenden klinischen Heparin gehaltsbestimmungsmethode angegeben.

d) Die bei der Deutung von Prothrombiningehaltsbestimmungen sich ergebenden Schwierigkeiten werden geklärt.

e) Es wird darauf aufmerksam gemacht, dass eine vielfach angewandte Gleichung zur Berechnung des Prothrombiningehaltes aus den Gerinnungszeiten in den meisten Fällen sehr ungenaue Resultate ergibt.

II. Die von *Fischer* gefundene Beziehung zwischen Thrombokinasekonzentration und Gerinnungszeit wird bestätigt.

III. Es wird eine Gleichung für die Beziehung zwischen Heparin- (bzw. Hirudin-)gehalt und Gerinnungszeit (von Gesamtblut) gegeben.

IV. a) Die von *Kugelmass*, *Barratt*, sowie *Fischer* gefundene Gleichung für die Beziehung zwischen Thrombin-Konzentration und Gerinnungszeit wird anhand weiterer Versuchsdaten in Übereinstimmung mit *Astrup* als bester Ausdruck bestätigt und neuere davon abweichende Befunde berichtet.

b) Eine Möglichkeit, mittels der *Quick*'schen Antithrombinbestimmung noch geringere Antithrombinmengen nachzuweisen, wird erörtert.

c) Die gleiche Beziehung wie zwischen Thrombinkonzentration und Gerinnungszeit gilt auch für die Beziehung zwischen Ninhydrinkonzentration und der Koagulationszeit von Fibrinogen.

Der II. Teil dieser Arbeit folgt in einem nächsten Faszikel.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.