

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg/Lahn  
[Direktor: Prof. Dr. M. Versé].)

## Die Beeinflussung der Gewebsthrombokinase durch verschiedene Gase ( $O_2$ , N, CO und $CO_2$ ) und ihr Wirkungsmechanismus.

Von

Prof. Dr. Erich Rix und Dr. Lothar Ehrhardt.

Mit 7 Kurven und 1 Tabelle im Text.

(Eingegangen am 12. Mai 1939.)

Daß das Leichenblut unter bestimmten Bedingungen, so bei Erstickten, mit Kohlenoxyd Vergifteten, nicht minder bei schnellst Verstorbenen gewöhnlich flüssig bleibt, dagegen bei länger dauerndem Todeskampf, nach fieberhaften Zuständen (*Crusta phlogistica*!) besonders gut gerinnt, ist eine alltäglich neu zu beobachtende Tatsache, auf die auch in vielen Lehrbüchern immer wieder hingewiesen wird. Trotzdem ist es nicht angängig, darin eine unbedingte, etwa forensisch eindeutig verwendbare Gesetzmäßigkeit zu sehen, da unzweifelhaft auch einmal ein entgegengesetztes Verhalten auftreten kann. Durchaus nicht besser gesichert sind die Erkenntnisse über die diesen Erscheinungen zugrunde liegenden Vorgänge. So ist, um nur ein Beispiel herauszugreifen, von *Oki* wie *Judine* behauptet worden, daß die Gerinnbarkeit des Blutes von erstickten Hunden bis zu 3 Stunden nach dem Tode im allgemeinen überhaupt keine Abweichungen von der Norm zeigt, vielmehr, wenn überhaupt ein unterschiedliches Verhalten vorliegt, sogar erhöht ist. Erst später nimmt die Gerinnbarkeit ab und geht schließlich ganz verloren. Es wird das von *Oki* auf eine Auflösung des Fibrinogens bzw. Fibrins durch ein trypsinähnliches Ferment zurückgeführt, das nach ihm wahrscheinlich im Gefäßendothel entsteht.

Die Versuche sind natürlich nicht neu, durch Anwendung verschiedener Gase am lebenden Tier die Einwirkung auf die Blutgerinnung unmittelbar zu studieren. Auf diese Weise sind aber kaum die Einflüsse auf die einzelnen Phasen der Blutgerinnung (Bildung des Thrombins, Entstehung des unlöslichen Fibrins) mit allen ihren Komponenten voneinander zu trennen. Man ist also auch hier auf den Versuch *in vitro* angewiesen, der bei den verschiedenen Autoren unterschiedlich, teilweise sogar gegensätzlich ausfiel. Vor allem waren diese Experimente fast ausschließlich auf das Blut selbst gerichtet, während die Bedeutung des Gewebes kaum berücksichtigt wurde. Es liegt aber auf der Hand, daß dieses bei der Gerinnung an der Leiche eine ganz besondere Rolle spielt,

da hier sicherlich ein lebhafter Übertritt sonst gewebegebundener Bestandteile infolge der bald einsetzenden postmortalen Vorgänge stattfindet. Das trifft unseres Erachtens vor allem für die Kohlensäure zu, die z. B. nachgewiesenermaßen (*Irwing, Ferguson und Plewes*) bei der Atmung  $\text{CO}_2$ -reicher Luftgemische in erheblichem Umtage in der Muskulatur, depotmäßig wohl im Knochen retiniert wird. Wir müssen uns daher wohl abgewöhnen, die Ursache für die verschieden starke und schnelle Blutgerinnung an der Leiche immer nur im Blut und in den Gefäßen zu suchen. Immerhin liegen natürlich die Verhältnisse im absterbenden Gewebe sehr kompliziert, da sich hier während und nach dem Tode Vorgänge abspielen, die sehr unterschiedlich und der Beobachtung nur schwer zugänglich sind.

Bei rein theoretischer Betrachtung ist es die Gewebsthrombokinase, die naturgemäß zuerst den Einflüssen dieser höchst verschiedenartigen postmortalen Veränderungen zum Opfer fällt, während die im Blut selbst befindlichen Faktoren, mögen sie nun Thrombokinase, Thrombokinin oder Cytosyn heißen, wenigstens durch die im Gewebe lokalisierten Vorgänge erst später berührt werden, wenn wir dabei einmal ganz absehen von den nach dem Tode natürlich auch alsbald einsetzenden Absterbeerscheinungen im Blute selbst.

Wir richteten daher im Laufe unserer Untersuchungen unser Augenmerk in erster Linie auf die in Form von Organextrakten gewonnene Gewebsthrombokinase und durchströmten diese mit verschiedenen reinen Gasen ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{N}$ ,  $\text{O}_2$ ), bevor ihr Einfluß auf die Blutgerinnung studiert wurde. Hierzu wurde Heparinplasma benutzt, das zum größten Teil vom Kaninchen, zum geringeren vom Menschen stammte. Bekanntlich stellt das Heparin ein Antiprothrombin dar, ist in seiner chemischen Zusammensetzung eine Mucotinpolyschwefelsäure und hemmt durch Salzbildung mit freien aktiven Aminogruppen einen der gerinnungsfördernden Eiweißstoffe (*Bersin*). Durch Mischung des so ungerinnbar gewordenen Gesamtblutes oder Blutplasmas mit reichlich Gewebsextrakt (Thrombokinase) wird diese hemmende Wirkung wieder aufgehoben, so daß man gerade am Heparinblut sehr schön und isoliert die unterschiedliche Wirkung der letzteren beobachten kann.

Da unsere Zielrichtung ausschließlich auf die unterschiedliche Beeinflussung der Thrombokinase des Gewebes eingestellt war, erschien es unzweckmäßig, das mit Heparin versetzte Gesamtblut zu den Gerinnungsversuchen heranzuziehen. Die jeweiligen Versuchsreihen erstreckten sich mindestens über Stunden, wenn nicht sogar über mehrere Tage, so daß die Gefahr der Zustandsänderung im Blut selbst z. B. durch Zerfall der roten Blutkörperchen sehr nahe lag. Das Blutplasma dagegen ist, mit Heparin versetzt, einmal sehr konstant und wenigstens während der für die vorliegenden Versuche in Frage kommenden Zeiten von praktisch gleichbleibender Beschaffenheit.

Von Durchströmungen des Plasmas wie des Gesamtblutes in einer Anordnung, die den Gewebsextraktversuchen analog war, mußte ebenfalls Abstand genommen werden, da durch diese doch immerhin recht eingreifende Beeinflussung, nach unseren Versuchen zu urteilen, auch ohne Zufügung des Gewebsextraktes, also der Gewebsthrombokinase, gewisse Gerinnungserscheinungen auftraten. Diese waren naturgemäß nicht komplett, aber immerhin fielen doch unter Umständen mehr oder minder reichlich Gerinnungsfäden aus, die einen Vergleich des verschiedenen beeinflussten Plasmas oder Gesamtblutes unmöglich machten. Ganz abgesehen davon sind ähnliche Versuche zwar nicht in der Form von Durchströmungen, so aber doch durch Änderung der Umgebungsumsphäre z. B. von *von Dungern* und *Nelz* unter Benutzung des *Bürker*-schen Gerinnungsapparates mit dem Ergebnis angestellt worden, daß die Kohlensäure ebenso wie der Stickstoff die Blutgerinnung leicht verzögerte, während Sauerstoff, Stickoxydul und Leuchtgas keinen Einfluß auf die Gerinnung hatten. Eine Luftverdünnung unter der Glasglocke des Gerinnungsapparates und dadurch naturgemäß gleichzeitig erfolgende partielle Entgasung des Blutropfens beschleunigte die Gerinnung. In ähnlicher Weise hatte schon *Gibbs* Änderungen des Luftgemisches um einen einzelnen Blutropfen vorgenommen. Er konnte dabei keinerlei Einfluß konstatieren. Die von *von Dungern* erhobenen Befunde finden eine gewisse Bestätigung durch *Baunberger*, *Deetjen* und *Hamarsten*, die eine Verzögerung der Gerinnung durch Kohlensäure, die bis zur völligen Verhinderung gehen kann, behaupten. Dieser Auffassung steht die Ansicht von *Stuber* und *Lang* wie *Marx* diametral gegenüber, daß die Kohlensäure das beste Stimulans für die Blutgerinnung sei. Aus diesen wenigen Hinweisen dürfte schon zur Genüge hervorgehen, daß von einer eindeutigen Klärung der Frage nach der Bedeutung und dem Mechanismus der verschiedenen Gase, von denen naturgemäß die Kohlensäure bei den als Ausgangspunkt unserer Betrachtung dienenden Leichenerscheinungen (Flüssigbleiben des Blutes unter bestimmten Umständen) die Hauptrolle spielt, nicht die Rede sein kann.

Noch eine weitere Vorbemerkung sei gestattet. Wir sind uns natürlich durchaus bewußt, daß wir bei Verwendung einfacher Gewebsextrakte als Träger der Thrombokinase gewiß auch mit komplexen Verhältnissen zu rechnen haben. Aber diese liegen ja auch im Organismus wie an der Leiche vor und auf eine nähere Analyse und Begriffsbestimmung der Thrombokinase kommt es uns dabei, wenigstens vorläufig, gar nicht an. Immerhin sei der Vollständigkeit halber darauf hingewiesen, daß auch hinsichtlich des chemischen Charakters dieser Gerinnungskomponente — der Thrombokinase — die verschiedensten, zum Teil einander widersprechenden Anschauungen bestehen. So sei nur in Erinnerung gebracht, daß die einen neuerlich darin einen ätherlöslichen Stoff im Sinne eines Cerebrosids sehen wollen, während *Lenggenhager*

ihn als einen hitzebeständigen eiweißähnlichen Stoff ohne Lipoidkomponente auffaßt. Ein weiterer Hinweis auf die neueren Untersuchungen von *Grunke* über die Blutgerinnung mit besonderer Berücksichtigung der Hämophilie mag diese Betrachtung abschließen, da eine nähere Erörterung die langatmige Aufrollung eines Komplexes zur Folge haben würde, der für unsere Frage nach der Beeinflussung der Gewebsthrombokinasen durch verschiedene Gase ohne Bedeutung ist. Aus demselben Grunde sind wir mit Absicht auf das Problem der Thrombose in diesem Zusammenhang nicht eingegangen.

Die Technik unserer Extrakt-durchströmung bestand darin, daß zunächst aus Milz, Nieren und Lungen von Mäusen und Ratten nach gehöriger Zerkleinerung wässrige Auszüge mit physiologischer Ringer- oder Kochsalzlösung in einer Konzentration hergestellt wurden, die nach dem Zufügen zum Heparinplasma dieses innerhalb weniger Minuten zur Gerinnung brachten. Lungenextrakte erwiesen sich dabei als am wirksamsten, konnten daher größere Verdünnungen als die von den anderen Organen gewonnenen vertragen. Die Durchströmung selbst wurde in kleinen, am besten spitz zulaufenden Gefäßen vorgenommen, in die ein das betreffende Gas zuleitendes Glasröhrchen bis einige Millimeter über den Boden hineinreichte. Durch eine oder mehrere möglichst enge Öffnungen wurde bewirkt, daß die durchperlenden Gasblasen minimal klein waren und somit in eine innige Berührung mit der zu durchströmenden, durch scharfes Abzentrifugieren von allen Gewebspartikeln befreiten Flüssigkeit traten. Um wirkliche Vergleichswerte zu erhalten, wurde die Menge der verschiedenen Gase mit einer Gasuhr abgemessen und im übrigen auf eine möglichst gleichbleibende Folgegeschwindigkeit der kleinen durchperlenden Blasen geachtet. Gerade die Berücksichtigung dieser letzteren Besonderheit war aus später ersichtlichen Gründen unter Umständen von ausschlaggebender Bedeutung für den Versuchsausgang.

Was die Anordnung des eigentlichen Gerinnungsversuches anging, so nahmen wir diese auf hohl geschliffenen und paraffinierten Objektträgern vor, über die noch ein größerer Glasdeckel gestellt wurde; darüber hinaus befand sich unter dem letzteren ein kleines Gefäß mit Wasser, um ein Austrocknen der Versuchsmischung auch in geringem Ausmaß zu verhindern. Im Hinblick auf die ja hinreichend bekannte Bedeutung der Temperatur für die Gerinnung befanden sich die Objektträger auf einer konstant mit 25° C beheizten Platte. Diese Temperatur wurde in Vorversuchen als die zweckmäßigste ermittelt, da sie eine Gerinnung gewährleistete, die einmal innerhalb einer im Hinblick auf die mögliche Verdunstung nicht allzu langen, nur wenige Minuten währenden Zeitspanne lag, andererseits auch nicht zu schnell eintrat, wodurch die Gerinnungsunterschiede zu kurz und nicht genügend eindrucksvoll gewesen wären.

Als Maßstab der Gerinnung können zwei verschiedene Zeitpunkte gewählt werden: zunächst einmal das Auftreten des ersten Gerinnungs-

fädchens, dann weiterhin der Augenblick der kompletten Gerinnung. Nach vielen Vorversuchen erwies sich der erstgenannte als am zweckmäßigsten und wohl auch am genauesten, wenigstens bei der Berücksichtigung der Vorsichtsmaßnahme, daß nicht allzu häufig und nur in gewissen Abständen mit einem Glasfaden durch das Gerinnungsgemisch gefahren wurde. Wird dieser Gesichtspunkt vernachlässigt, so kann es, auch nach der Mitteilung anderer Beurteiler, sehr wohl zu einem völligen Ausbleiben der Gerinnung kommen.

Die Mischungen bestanden bei der Verwendung von Blutplasma aus diesem und einer jeweils in Vorversuchen für den Einzelfall zu ermittelnden, für eine Gerinnung in erträglicher Zeit genügenden Menge Gewebsextrakt, deren Stammlösung in einem Teil der Fälle beispielsweise noch zu gleicher Menge mit physiologischer Kochsalzlösung oder Ringerlösung verdünnt wurde. Es lag also gewöhnlich ein Verhältnis von 1 Teil = 1 Tropfen Plasma, 1 Teil Ringer- oder Kochsalzlösung und 1 Teil Gewebsextrakt (als Träger der Thrombokinas) vor. Die zu seiner Bereitung benutzte Flüssigkeitsmenge war naturgemäß nach dem verwendeten Organ unterschiedlich und ebenfalls in Vorversuchen genau ermittelt.

Es ist zweckmäßig, die Extrakte erst eine Weile, also etwa 2 Stunden nach Fertigstellung, am besten im Eisschrank, zur Ruhe kommen zu lassen, da während dieser Zeit die Wirkung noch merklich nachläßt, so daß keine wirklichen Vergleichswerte bei den immerhin einige Stunden währenden Versuchen resultieren. Nach dieser Zeit sind die Extrakte dann immerhin so konstant, so langsam und allmählich in ihrer Wirkung nachlassend, daß eine merkliche Störung nicht zu befürchten ist.

Was nun das eigentliche Problem selbst angeht, so hatte sich uns bei früheren Untersuchungen über den Einfluß des Kohlenoxydes und Leuchtgases auf die Gewebekulturen sehr einprägsam dargetan, daß eine Durchströmung des Gewebsextraktes mit diesen Gasen schon nach verhältnismäßig kurzer Zeit zu völliger Unwirksamkeit in bezug auf die Gerinnung führte. Diese Beobachtung fanden wir naturgemäß zunächst aufs neue bestätigt. Wir richteten daher unser Augenmerk insbesondere auf die Frage, ob ein unterschiedlicher Einfluß der verschiedenen Gase ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{N}$ ) in Erscheinung trat. Des weiteren lag uns die Klärung des Wirkungsmechanismus besonders am Herzen. Zu unserer Überraschung konnten wir schon bald beobachten, daß neben der Art des Gases die Länge der Durchströmungsdauer auch über die Sättigung hinaus von ausschlaggebender Bedeutung war. So konnte sich — das sei vorausgeschickt — die Wirkung der Kohlensäure von einer anfänglichen Beschleunigung der Gerinnung über eine steigende Verlangsamung bis zu völliger Unwirksamkeit umkehren. Es wurden daher in der ersten hier ausgewählten und graphisch wiedergegebenen Versuchsserie während der Durchströmung zu verschiedenen Zeiten Extraktproben entnommen und

Gerinnungsversuche angestellt. Wie ebenfalls später eindeutig ersichtlich sein wird, bedeutete dabei die auf der Durchperlung beruhende rein mechanische Beeinflussung einen wesentlichen Faktor bei dem zur Unwirksamkeit führenden Vorgang. In einer weiteren Serie durchströmten wir daher zur Abtrennung des rein chemischen Geschehens nicht den

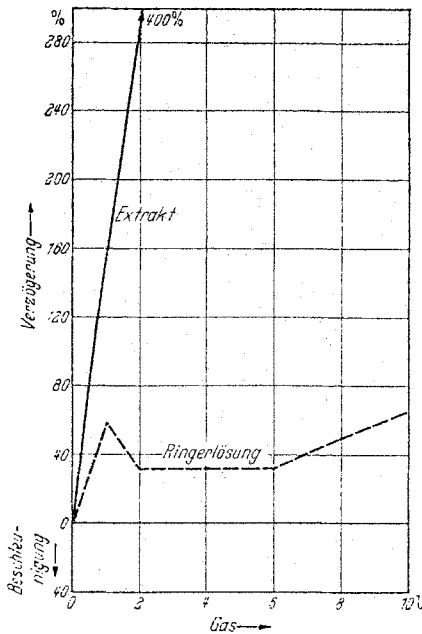


Abb. 1. Durchströmung des Gewebeertraktes und der zur Verdünnung benutzten Ringerlösung mit Kohlenoxyd. Prozentuale Beschleunigung oder Verzögerung der Gerinnung.

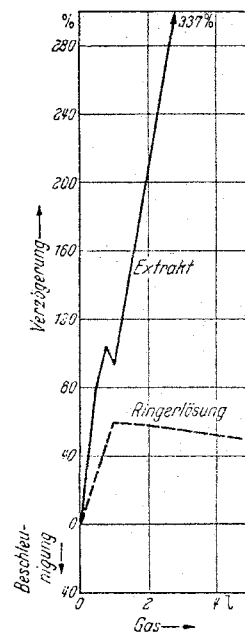


Abb. 2. Durchströmung des Extraktes und der zur Verdünnung benutzten Ringerlösung mit Sauerstoff. Prozentuale Beschleunigung oder Verzögerung der Gerinnung.

Extrakt selbst, sondern die zu weiterer Verdünnung des Gemisches benutzte Ringerlösung. Beide Serien sind wegen der in ihrer Gegenüberstellung begründeten, besonders guten Anschaulichkeit kurvenmäßig in den Abb. 1—4 zusammengezeichnet wiedergegeben. Welche Gase im Einzelfall verwandt wurden, ist aus den Abbildungen selbst ersichtlich. Die jeweilige Verzögerung oder Beschleunigung der Gerinnung wurde in ihrem prozentualen Verhältnis zu der normalen Kontrolle errechnet und kurvenmäßig dargestellt.

Zusammenfassend läßt sich über das Ergebnis dieser zwei grundsätzlich bedeutsamen Serien zunächst einmal bemerken, daß in Abb. 1—3, also bei Durchströmung mit Kohlenoxyd, Sauerstoff und Stickstoff ein ganz gleichartiges Verhalten in Erscheinung tritt. Es besteht bei Durchströmung des *Extraktes* selbst in einer relativ schnell zunehmenden

Verminderung der Wirksamkeit, die schließlich praktisch gesehen völlig erlischt. Bei alleiniger Durchströmung der zur Verdünnung benutzten Ringerlösung dagegen zeigt sich in Abb. 1 und 2 ( $\text{CO}$  und  $\text{O}_2$ ) ein geringes

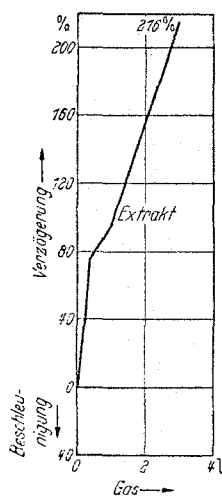


Abb. 3. Durchströmung des Extraktes mit Stickstoff. Prozentuale Beschleunigung oder Verzögerung der Gerinnung.

Nachlassen der gerinnungsfördernden Kraft (bis zu 60 %), um dann auf dieser Stufe trotz anhaltender Durchströmung stehen zu bleiben. Mit Stickstoff (Abb. 3) wurde aus äußeren Gründen ein ähnlicher Versuch nicht angestellt, so wichtig das bei seiner Eigenschaft als indifferentes Gas eigentlich gewesen wäre. Das, was aber aus diesem Experiment hätte herausgelesen werden können, haben wir bei späterer andersartiger Anordnung in einem noch zu erörternden Sinn sowieso feststellen können.

Ganz anders liegen die Verhältnisse bei der Kohlensäure (Abb. 4). Hier tritt bei entsprechender Behandlung des Extraktes selbst zunächst eine mäßige Beschleunigung auf, die nach weiterer Durchströmung einer Wirkungsverminderung Platz macht. Bei entsprechender Vorbehandlung der Ringerlösung mit  $\text{CO}_2$  bleibt eine ebenfalls zu beobachtende Beschleunigung demgegenüber auf einem wahrscheinlich mit der Sättigung an Kohlensäure zusammenfallenden Prozentsatz konstant.

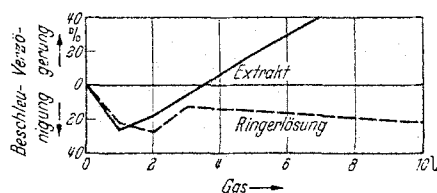


Abb. 4. Durchströmung des Extraktes und der zur Verdünnung benutzten Ringerlösung mit Kohlensäure. Prozentuale Beschleunigung oder Verzögerung der Gerinnung.

schließlich wirkungsbeschleunigendem Effekt (Abb. 4). Darauf weist weiterhin die bei Durchströmung der Ringerlösung mit Sauerstoff und Kohlenoxyd zu beobachtende, zwar mäßige Gerinnungsverlangsamung hin. Auch diese ist wahrscheinlich so zu verstehen, daß es in diesem Fall zu einer Austreibung der Kohlensäure mit nunmehr eintretendem Ausschlag nach der entgegengesetzten Seite gekommen ist. Wie ist nun aber bei

Vorgang bestehen. Es schien uns zunächst einmal durch die bisherigen Versuche sichergestellt, daß sich die Kohlensäure im rein chemischen Sinn auswirkt. In dieser Richtung sprachen vor allem die Durchströmungsergebnisse an der zur Verdünnung benutzten Ringerlösung mit Kohlensäure bei aus-

Vorbehandlung des Extraktes selbst mit  $\text{CO}_2$  die anfängliche Beschleunigung und nachherige Umkehrung zum Gegenteil zu verstehen (Abb. 4). Hier muß ein zweites, völlig entgegengesetzt beeinflussendes Moment hinzukommen, das erst später, dann aber eindrucksvoller und das andere überlagernd angreift. Wie wir schon erwähnten, ist diese Wirkung nach unserer später noch zu beweisenden Ansicht im rein Mechanischen zu suchen und lediglich auf die Durchperlung der eiweißhaltigen kolloidalen Lösung zurückzuführen. Daß dem so ist, kann man auch aus dem so eindrucksvollen und gleichsinnigen negativen Einfluß von Stickstoff, Sauerstoff und Kohlenoxyd ableiten, bei denen ja, wenn wirklich ein rein mechanischer Faktor wesentlich mitspielt, die gleiche Erscheinung zutage treten mußte. Ob sich dahinter — speziell beim Sauerstoff — nicht außerdem noch ein chemischer Prozeß verbirgt, muß im Augenblick noch dahingestellt bleiben.

Zur Stützung und Bestätigung dieser Auffassung waren weitere und andersartige Anordnungen erforderlich. Was zunächst den rein mechanischen, bei Durchströmung des Extraktes ganz generell zu einem Wirksamkeitsverlust führenden Effekt angeht, so schien uns nach mannigfacher theoretischer Überlegung die Möglichkeit zu bestehen, daß dieser Vorgang in der sog. *Thixotropie* (*Freundlich*) seine Ursache hat. Dieses Phänomen der Kolloidchemie besteht darin, daß beispielsweise Gelatine durch Schütteln flüssig wird, um nach einiger Zeit der Ruhe wieder in ihren früheren Zustand zurückzukehren. Das kann natürlich auch Wirksamkeitsänderungen zur Folge haben (s. *Freundlich*). Da in unseren Gewebsextrakten mit Wahrscheinlichkeit kolloidale Verhältnisse vorlagen, war mit einer Thixotropie bei den von uns beobachteten Vorgängen sehr wohl zu rechnen. Traf diese Auffassung zu, so müßte einmal ein ähnlicher Effekt durch einfaches Schütteln der Gewebsextrakte zu erzielen sein. Weiter wäre es notwendig, daß dieser zu partieller oder totaler Unwirksamkeit führende Vorgang reversibel ist, daß also die gerinnungsfördernde Kraft nach einiger Zeit wieder in Erscheinung tritt. Zu diesem Zwecke brachten wir Extrakte in den Schüttelapparat, wobei wir den Flüssigkeiten kleine Glasperlen beifügten, um eine möglichst intensive und den früheren Anordnungen mit der Durchperlung annähernd gleichkommende Einwirkung herbeizuführen. In der Tat zeigte sich nach etwa 30 Min. währendem kontinuierlichen Schütteln eine merkliche Verlagerung der Gerinnungsdauer von beispielsweise  $4\frac{1}{2}$  auf 10 Min. Nach 90 Min. Schütteln ist keine Gerinnung mehr festzustellen. Zur Klärung der Frage, ob das Erlöschen der gerinnungsfördernden Kraft wirklich ein reversibler Vorgang ist, wurde die Wirkung von Gewebeanszügen, die mit  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}$  wie  $\text{N}$  vorbehandelt waren, sofort nach der Durchströmung und 1 Stunde später beobachtet. Von der Verwendung von  $\text{CO}_2$  wurde hier wegen des gleichzeitigen rein chemischen Einflusses Abstand genommen. Das Ergebnis ist aus Abb. 5 ersichtlich. Sehr anschaulich dürfte daraus



die Tatsache erhellen, daß die gerinnungsbefördernde Kraft nach anfänglicher Verminderung wenigstens bei Kohlenoxyd und Stickstoff wieder zu dem Anfangswert zurückkehrt. Das spricht im Zusammenhang mit dem Schüttelungsversuch eindeutig für die Annahme einer Thixotropie. Demgegenüber ist unter Sauerstoffeinfluß eine weitere Steigerung zum Negativen eingetreten. Das dürfte wohl ebenfalls in einem rein chemischen, eben oxydativen Vorgang seine Ursache haben, was ja bei reinem Sauerstoff nicht erstaunlich ist.

Nachdem wir so die thixotrope Wirkung der Durchströmung mit Stickstoff und Kohlenoxyd wohl genügend unter Beweis gestellt haben,

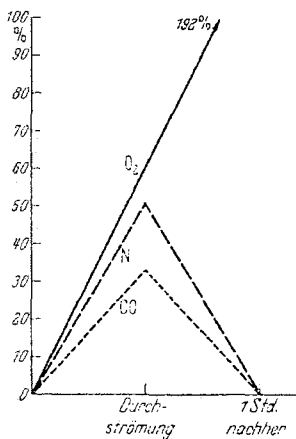


Abb. 5. Gerinnungsversuche unmittelbar nach der Durchströmung der Extrakte mit den verschiedenen Gasen (O<sub>2</sub>, N, CO) und 1 Stunde nach Durchströmung.

gehen wir zu weiteren Versuchen über, die zur Sicherung unserer Auffassung von dem positiven Einfluß der Kohlensäure auf die Gewebsthrombokinas angestellt wurden. Unsere bisherigen Versuchsanordnungen basierten ja größtenteils auf der direkten Durchströmung der Gewebsextrakte mit den in Frage kommenden Gasen, wobei wir in der Beurteilung des so erzielten Effektes durch die rein mechanische Erfolgswirkung (s. Abb. 4) wesentlich behindert wurden. Trifft unsere Auffassung von dem wirkungsverstärkenden Einfluß des CO<sub>2</sub> zu, so müßte ein gleicher Effekt, wenn auch nicht in dem Ausmaße, eintreten, wenn die Extrakte in weniger grob mechanischer Weise mit Kohlensäure angereichert würden. Das geschah so, daß kleine Gefäße, in denen sich etwas Extrakt befand, im Überdruck mit CO<sub>2</sub>, N, CO oder O<sub>2</sub> gefüllt wurden. Durch vorsichtiges

Hin- und Herbewegen wurde eine möglichst eingehende Einwirkung und Bindung an die Flüssigkeit herbeigeführt. Das Ergebnis veranschaulicht Abb. 6. Ganz unserer Erwartung entsprechend trat bei Verwendung von Kohlensäure eine Verstärkung der Thrombokinasewirkung um 30% auf. Die aus dieser Abbildung ebenfalls ersichtlichen geringen Schwankungen bei den anderen Gasen liegen innerhalb der methodischen Fehlergrenzen. Immerhin ist auch hier vielleicht nicht unwesentlich, daß die Sauerstoffkurve entgegengesetzt derjenigen des CO<sub>2</sub> verläuft, was mit unseren früheren Durchströmungsversuchen ebenfalls im Einklang steht.

Noch ein weiterer Beweis kann für unsere Erklärung der Kohlensäurewirkung erbracht werden, der gleichzeitig eine Ergänzung zu den früheren in Abb. 1—4 dargestellten Versuchen bedeutet. Wir hatten schon bei ihrer Besprechung darauf hingewiesen, daß die bei Durchströmung der Ringerlösung mit Sauerstoff und Kohlenoxyd auftretende geringgradige

Gerinnungsverlangsamung wahrscheinlich auf die rein mechanische Austreibung der Kohlensäure zurückzuführen ist. Aus rein äußeren Gründen war damals leider eine Durchströmung mit Stickstoff unterblieben, das als völlig indifferentes Gas wesentlich zur Bestätigung unserer Anschauung hätte beitragen können. Aber der Beweis ist sogar noch besser durch Evakuierung zu erbringen. Das Resultat ist in Abb. 7 dargestellt. Um die Wirkung noch anschaulicher zu gestalten, wurde zunächst eine Durchströmung mit Kohlensäure vorgenommen, die wir dann nachher wieder evakuierten. Sinngemäß durfte daher nicht der Extrakt selbst genommen werden (Thixotropie!), sondern die Durchführung erfolgte an der Ringerlösung, die nachher zur Verdünnung benutzt wurde. In klarer Bestätigung unserer theoretischen Erwägung trat zunächst nach der Durchströmung eine Wirkungssteigerung, nach dem darauffolgenden Evakuieren eine Verminderung in Erscheinung.

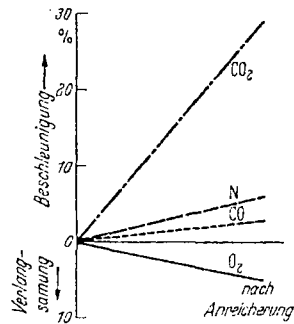


Abb. 6. Gerinnungsversuche vor und nach Anreicherung der Extrakte an den verschiedenen Gasen (CO<sub>2</sub>, N, CO, O<sub>2</sub>).

Im weiteren Teil unserer Untersuchungen waren wir bestrebt, durch chemische und physikalisch-chemische Untersuchungen unsere bisherigen mehr physiologischen Beobachtungen zu stützen. Zunächst einmal interessierte uns der Gehalt der verschiedenen durchströmten Gewebsextrakte an Kohlensäure vor und nach der Behandlung. Auf die Wiedergabe der Zahlenangaben können wir an dieser Stelle verzichten. Zusammenfassend möge der Hinweis genügen, daß, wie zu erwarten, nach Verwendung von Kohlensäure eine ganz erhebliche Anreicherung bis zu 66,8% in Erscheinung trat, während bei CO, N und O<sub>2</sub> keinerlei Differenz gegenüber den Anfangswerten festzustellen war. Es könnte das vielleicht im Hinblick auf unsere frühere Behauptung überraschen, die darin gipfelte, daß bei Durchströmung der Ringerlösung mit diesen Gasen und darauf beruhender mäßiger Wirkungsverminderung der Grund in der Austreibung von Kohlensäure zu suchen sei. Wir erklären uns diese Differenz so, daß bei einem so eiweißreichen Extrakt die Kohlensäure stärker und zwar größtenteils chemisch gebunden und daher nicht so leicht austreibbar ist wie bei der reinen Ringerlösung, ganz abgesehen davon, daß die Pufferung derartiger Lösungen eine bessere ist. In Übereinstimmung mit dem

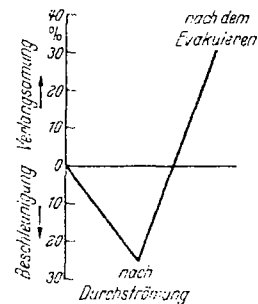


Abb. 7. Gerinnungsversuche vor der Durchströmung, nach der Durchströmung mit Kohlensäure und nach dem darauffolgenden Evakuieren der zur Verdünnung benutzten Ringerlösung.

chemischen, manometrisch im *Barkroft*-Apparat gewonnenen Befund war dann auch in der Tat nach dem Evakuieren des *Extraktes* kein Wirkungsunterschied gegenüber der Kontrolle im Gerinnungsversuch festzustellen. Früher war ja lediglich die zur Verdünnung benutzte *Ringerlösung* mit positivem Ergebnis evakuiert worden. Auf alle Fälle sei aber ausdrücklich betont, daß wir eine sichere Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten nach Evakuieren des *Extraktes* und der *Ringerlösung* nicht haben.

In diesem Zusammenhang ist weiterhin der  $p_H$ -Gehalt der Extrakte vor und nach der Gasbehandlung um so mehr von Interesse, als ganz allgemein von verschiedenen Autoren Beziehungen zwischen ihm und der Gerinnungsbereitschaft des Blutes behauptet wurden. So weist *Kugelmass* darauf hin, daß eine Gerinnung nur in einem Bereich von  $p_H$  5 bis  $p_H$  8 stattfindet. Sie steigt nach ihm von der sauren Seite bis zum Optimum bei etwa  $p_H$  7, um dann nach der alkalischen Seite rascher abzufallen. Weiterhin gibt *Tsunoo* den Bereich für die optimale Wirkung der Thrombinlösung bei  $p_H$  6,4—6,6 an. In Verfolg dieser Fragestellung bestimmten wir den  $p_H$ -Gehalt der Extrakte vor und nach der Durchströmung mit der Wasserstoffelektrode, wobei ganz besonders darauf geachtet wurde, daß nur völlig reine Gase zur Verwendung gelangten (eventuell Durchleitung durch konzentrierte Kalilauge zur Entfernung des  $CO_2$ , Überleitung über glühende Kupferspiralen zur restlosen Beseitigung des Sauerstoffs). Das Resultat dieser Untersuchungen zeigt die Tab. 1. Wie auch hier wieder zu erwarten war, verschiebt sich unter

Tabelle 1.  $p_H$ -Bestimmungen mittels der Wasserstoffelektrode. Meerschweinchenextrakt (Milz + Lungen). Durchströmt mit 3 Litern  $CO$ ,  $N$ ,  $O_2$  oder  $CO_2$ . Extrakt geschüttelt 195 Min.

Normalwert	Mit Kohlenoxyd durchströmt	Mit Stickstoff durchströmt	Mit Sauerstoff durchströmt	Geschüttelt	Mit $CO_2$ durchströmt
6,7 7,1	7,05	7,05	7,6	6,7	5,15

$CO_2$  der  $p_H$ -Gehalt ganz erheblich nach der sauren Seite, während bei Durchströmung mit  $CO$ ,  $N$  wie  $O_2$  der Wert eine — teilweise nur mäßige — Änderung nach der alkalischen Seite hin erfährt. Es erscheint uns aber wenig wahrscheinlich, daß die dabei ja konstatierte gleichzeitige Unwirksamkeit auf das Heparinplasma durch diese  $p_H$ -Verschiebung zu erklären ist. Dazu ist sie an sich viel zu geringgradig, ganz abgesehen davon, daß wir den thixotropen Charakter dieser Erscheinung ja schon unter Beweis gestellt haben.

Weiterhin stellten wir auch Untersuchungen über die Oberflächenspannung und innere Reibung (Viscosität) an. Danach tritt bei Durchströmung mit Stickstoff (als indifferentem Gas) eine Verschiebung der

Oberflächenspannung überhaupt nicht in Erscheinung, während die Viskosität immerhin eine wenn auch minimale Verminderung erfährt, so von 88 auf 85 Sek., die aber sicher bei der Beurteilung der Grundursachen unserer so prägnanten Beobachtungen ebenfalls völlig vernachlässigt werden kann.

Zum Schluß dieser Betrachtung sei nochmals mit aller Eindeutigkeit darauf hingewiesen, daß wir natürlich aus der Summe ineinander greifender und bei dem komplizierten Vorgang der Gerinnung wirksamer Faktoren nur einen einzigen (eben die Gewebsthrombokinese) herausgegriffen und isoliert unter dem Einfluß verschiedener Gase beobachtet haben. Unsere so eindeutigen Ergebnisse stellen somit zwar nur die Verbreiterung eines kleinen Ausschnittes der Gerinnungslehre dar, aber mehr als bei irgendwelchen anderen Problemen muß hier der Synthese eine sehr genaue Analyse vorausgehen.

#### Zusammenfassung.

1. Es wurde der Einfluß verschiedener Gase ( $\text{CO}_2$ , CO,  $\text{O}_2$ , N) auf die Gewebsthrombokinese beobachtet.
2. Die Kohlensäure übt auf chemischem Wege eine die Thrombokinese verstärkende und somit auf diesem Umwege letztlich eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung aus.
3. Reiner Sauerstoff zerstört demgegenüber durch oxydative Prozesse die gerinnungsbefördernde Kraft des Gewebsextraktes.
4. Stickstoff und reines Kohlenoxyd verhalten sich völlig indifferent.
5. Bei Durchströmung der Gewebsextrakte mit den verschiedenen Gasen tritt eine auf die Thixotropie zurückzuführende, reversible erhebliche Wirksamkeitsverminderung in Erscheinung.

#### Schrifttum.

*Baumberger*: C. r. Soc. Biol. Paris **95** (1926). — *Bersin*: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig 1938. — *Deetjen*: Z. physiol. Chem. **63**, 3 (1909). — *Dunger*, v. u. *Nelz*: Z. Biol. **97**, 277 (1936). — *Freundlich*: Chem. Weekbl. **32**, 739 (1935). — *Gibbs*: J. of Physiol. **59**, 426 (1925). — *Grunke*: Z. exper. Med. **96**, 512; **99**, 438; **101**, 585, 593. — *Hammarsten*: Pflügers Arch. **30**, 452 (1883). — *Herzfeld* u. *Klinger*: Biochem. Z. **71** (1915). — *Irving*, *Ferguson* and *Plewes*: J. of Physiol. **69**, 113. — *Judine*: Presse méd. **1936** I, 68. — *Kugelmass*: Arch. internat. Physiol. **21** (1923). — Ref. Ber. Physiol. **22** (1924). — *Lenggenhager*: Klin. Wschr. **1936** II, 1835. — *Marx*: Arch. klin. Chir. **178**, 170 (1933). — *Mills*, *Myrchenberg*, *Guest* and *Dorst*: Amer. J. Physiol. **61**, 1 (1922). — Ref. Ber. Physiol. **14**, 516 (1922). — *Oki*: Ber. Physiol. **82**, 454 (1935). — *Roulet*: Gerichtliche Medizin. Berlin-Wien 1933. — *Stuber* u. *Lang*: Die Physiologie und Pathologie der Blutgerinnung. Berlin u. Wien 1930. — *Tsunoo*: Pflügers Arch. **205**, 261 (1924).