

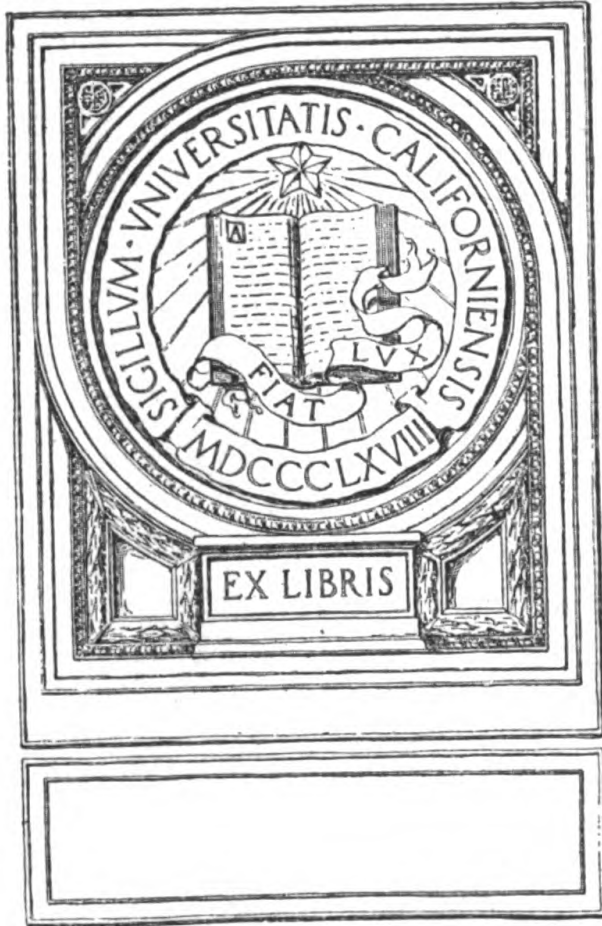
UC-NRLF



B 3 208 393



MEDICAL SCHOOL
LIBRARY



EX LIBRIS

175

Zeitschrift
für
Immunitätsforschung
und experimentelle Therapie
I. Teil: Originale

unter Mitwirkung von

H. Apolant, Frankfurt a. M., **M. Ascoli**, Catania, **V. Babes**, Bukarest, **O. Ball**, Prag, **E. F. Bashford**, London, **E. v. Behring**, Marburg, **S. Belfanti**, Mailand, **A. Besredka**, Paris, **J. Bordet**, Brüssel, **A. Breinl**, Liverpool, **L. Brieger**, Berlin, **A. Calmette**, Lille, **A. Dieudonné**, München, **R. Doerr**, Wien, **M. Dorset**, Washington, **E. v. Dungern**, Hamburg, **P. Ehrlich**, Frankfurt a. M., **S. Flexner**, New York, **U. Friedemann**, Berlin, **P. Frosch**, Berlin, **G. Gaffky**, Hannover, **M. von Gruber**, München, **M. Hahn**, Freiburg i. B., **A. Heffer**, Berlin, **L. Hektoen**, Chicago, **M. Jacoby**, Berlin, **C. O. Jensen**, Kopenhagen, **S. Kitasato**, Tokio, **W. Kolle**, Bern, **W. Kruse**, Leipzig, **K. Landsteiner**, Wien, **C. Levaditi**, Paris, **L. von Liebermann**, Budapest, **F. Loeffler**, Berlin, **Th. Madsen**, Kopenhagen, **C. J. Martin**, London, **E. Metschnikoff**, Paris, **L. Michaelis**, Berlin, **R. Muir**, Glasgow, **C. Moreschi**, Pavia, **P. Th. Müller**, Graz, **M. Neisser**, Frankfurt a. M., **F. Neufeld**, Berlin, **F. Nuttall**, Cambridge, **R. von OSTERtag**, Berlin, **R. Paltauf**, Wien, **A. Pettersson**, Stockholm, **R. Pfeiffer**, Breslau, **E. P. Plek**, Wien, **P. H. Römer**, Greifswald, **C. J. Salomonsen**, Kopenhagen, **A. Schattensfroh**, Wien, **Cl. Schilling**, Berlin, **Th. Smith**, Boston, **G. Sobernheim**, Berlin, **V. C. Vaughan**, Ann Arbor, **A. v. Wassermann**, Berlin, **W. Welchardt**, Erlangen, **A. Wladimiroff**, St. Petersburg, **A. E. Wright**, London, **D. Zabolotny**, St. Petersburg

herausgegeben von

E. FRIEDBERGER
(Berlin.)

R. KRAUS
(Buenos Aires.)

H. SACHS
(Frankfurt a. M.)

P. UHLENHUTH
(Straßburg i. E.)

Zwanzigster Band.

Mit 1 Tafel, 38 Figuren und 26 Kurven im Text.



Jena
Verlag von **Gustav Fischer**
1914

Alle Rechte vorbehalten.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA
LIBRARY

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
Heft 1 und 2. (Ausgegeben am 24. November 1913.)	
Thiele, F. H., and Embleton, Dennis, The Evolution of the Antibody. [From the Bacteriological Laboratory, University College Hospital, Medical School, London (Dr. F. H. Thiele)]	1
Hirschfeld, L., und Klinger, R., Immunitätsprobleme und Gerinnungsvorgänge. Mitteilung I. [Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. Silberschmidt)]	51
Hirschfeld, L., und Klinger, R., Immunitätsprobleme und Gerinnungsvorgänge. Mitteilung II. [Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich (Direktor: Prof. Dr. Silberschmidt)]	81
Wieland, Hermann, Warum wirken aromatische Arsenverbindungen stärker auf Protozoen ein als aliphatische und anorganische? [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie an der Universität Straßburg (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	131
Landsteiner, Karl, und Präsek, Emil, Ueber Säureflockung der Blutstromata. III. Mitteilung über Blutantigene. [Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien]	137
Präsek, Emil, Ueber die Wärmeresistenz von normalen und Immunagglutininen. [Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien (Vorstand: Prof. Dr. Landsteiner).] Mit 21 Kurven im Text	146
Thiele, F. H., and Embleton, Dennis, The nature of the anaphylactic reaction. [From the Bacteriological Laboratory, University College Hospital, Medical School, London (Dr. F. H. Thiele).] With 3 charts in text	159
Caronia, G., Spezifische Agglutinine und Präzipitine bei der infantilen Leishmaniosis. [Aus der Kgl. Universitätskinderklinik zu Palermo (Direktor: Prof. R. Jemma)]	174
Gasbarrini, Antonio, Das Bordet-Gengousche Phänomen (Komplementablenkung) bei Malaria. [Istituto di Patologia e Clinica Medica der Universität Sassari (Direktor: Professor L. Zoja)]	178

5555

	Seite
Fukuhara, Y. , Nachtrag zu unserer Arbeit „Ueber die Bakterien- gifte, insbesondere die Bakterienleibesgifte“. II. Mitteilung, Bd. 19, Heft 2 dieser Zeitschrift	198
Heft 3. (Ausgegeben am 12. Dezember 1913.)	
Well, Richard , On Antisensitisation, with Observations on Non- specificity in Anaphylaxis. [From the Department of Experimental Therapeutics of the Cornell University Medical School, New York City]	199
Landsteiner, Karl , und Prášek, Emil , Ueber die Aufhebung der Art- spezifität von Serumeiweiß. IV. Mitteilung über Antigene. [Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien]	211
Kritschewsky, J. L. , Ueber die Fähigkeit des Serums normaler Ka- ninchen, das Komplement mit bakteriellen Antigenen zu binden. [Aus dem Bakteriolog. Institut von Gabritschewsky an der Uni- versität zu Moskau (Direktor: Priv.-Dozent W. J. Kedrowsky)]	238
Abramow, S. , und Mischennikow, S. , Ueber die Entgiftung bakterieller Toxine durch Adrenalin. [Aus dem Institut des Dr. Ph. Blumen- thal in Moskau]	253
Arima, R. , Passive Uebertragbarkeit der Diphtherietoxinüberempfind- lichkeit durch Diphtherieserum, mit besonderer Berücksichtigung des fermentativen Giftabbaus. [Aus der Spezialklinik für Lungentuberkulose der medizinischen Akademie zu Osaka, Japan (Direktor: Prof. A. Sata)]	260
Dold, H. , und Rados, A. , Versuche über sympathische spezifische und unspezifische Sensibilisierung. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheim- rat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	272
Fraser, Elizabeth T. , The Complement-Fixation Test in Tuberculosis	291
Fränkel, Ernst , Beiträge zum Studium der Hämolysine. [Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Institutes für Krebsforschung in Heidelberg (Direktor: Exzellenz Czerny)]	299
Elschnig , Ueber die Grundlagen der anaphylaktischen Theorie der sym- pathischen Ophthalmie. [Aus dem Hygienischen Institute (Prof. Bail) und der Augenklinik der deutschen Universität Prag] . .	305
Heft 4. (Ausgegeben am 31. Dezember 1913.)	
Franceschelli, Donato , Ueber das Verhalten des Kochschen Altuber- kulins bei gesunden Tieren. [Aus dem Hygienischen Institut der Kgl. Universität zu Neapel (Direktor: Prof. Vincenzo De Giaxa)]	309

	Seite
Kudleke, R., und Sachs, H., Ueber das biologische Verhalten roher und gekochter Milch. (Immunisierungs- und Komplementbindungsversuche.) [Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich)]	316
Schiff, Friedrich, Weitere Beiträge zur Frage der heterogenetischen Antikörper. [Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof. Dr. E. Friedberger)]	336
Seng, Herbert, Untersuchungen mit Hühnereigelb-Antiserum. [Aus der serologischen Abteilung (Dr. Emmerich) des Heidelberger Pathologischen Instituts (Direktor: Professor Dr. Ernst)] . . .	355
Meyer, Kurt, Ueber Antikörperbildung gegen Bandwurmlipoide. Ueber antigene Eigenschaften von Lipoiden. VIII. Mitteilung. [Aus dem Serobakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin].	367
Yamanouchi, T., et Lytechkowsky, M., Séro-diagnostic du cancer. [Laboratoire de M. Metschnikoff à l'Institut Pasteur]	374
Blumenthal, Franz, Chemotherapeutische Versuche mit Quecksilberpräparaten bei experimenteller Kaninchensyphilis. [Aus der Poliklinik für Hautkrankheiten der Universität Berlin (Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. E. Lesser)]	378
Friedberger, E., und Tsuneoka, Ryoza, Weitere Beiträge zur Wirkungsweise des Kaolins und anderer chemisch indifferenten und unlöslicher anorganischer kolloidaler Substanzen. [Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof. Dr. E. Friedberger)]	405
Rados, Andreas, Ueber die Grundlagen der anaphylaktischen Theorie der sympathischen Ophthalmie. Erwiderung. [Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth) und aus der Universitäts-Augenklinik No. I zu Budapest (Direktor: Hofrat Prof. Dr. Emil von Grósz)]	41

Heft 5. (Ausgegeben am 22. Januar 1914.)

Baeslack, F. W., Numerical Variations of the White Blood Cells in Mice Inoculated with Transplantable Adenocarcinoma. [Research Laboratory, Parke, Davis & Co., Detroit, Michigan.] With 19 figures in text	421
--	-----

	Seite
Kolle, W., Hartoch, O., und Schürmann, W., Chemotherapeutische Experimentalstudien bei Trypanosomeninfektionen. II. Mitteilung. [Aus dem Universitäts-Institut für Hygiene und Bakteriologie in Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle)]	436
Fröhlich, Arthur, Ueber lokale gewebliche Anaphylaxie. [Aus dem Pathologischen Institut der Universität Jena (Direktor: Prof. Rössle).] Mit 1 Tafel, 2 Kurven und 3 Figuren im Text . . .	476
Denecke, Gerhard, Ueber die Bedeutung der Leber für die anaphylaktische Reaktion beim Hunde. [Aus der medizinischen Klinik der Universität Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. L. Krehl)] . .	501
Dold, H., und Rhein, M., Ueber den Einfluß von Galle und Cholesterin auf die Bildung und Wirkung des sogenannten Anaphylatoxins. [Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth)]	520
Köhne, W., Beitrag zur Kenntnis arzneifester Bakterienstämme. [Aus dem Königlichen Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin (Direktor: Geheimer Ober-Medizinalrat Prof. Dr. Gaffky; Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Neufeld)]	531

Heft 6. (Ausgegeben am 10. März 1914.)

Syrenskij, N. N., Ueber die primäre Toxizität des Blutserums des Menschen im Verlaufe von Infektionskrankheiten. [Aus dem Kaiserlichen Institut für experimentelle Medizin in St. Petersburg (Abteilung von A. A. Wiadimiroff) und aus dem Krankenhaus der St. Georgs-Gemeinde]	543
Rosenthal, Eugen, und Takeoka, Minokichi, Ueber die quantitativen Verhältnisse der Antikörperproduktion bei Immunisierung mit zwei Antigenen. [Aus dem chemisch-biologischen Laboratorium der IV. Abteilung des St. Rochusspitals der Haupt- und Residenzstadt Budapest (Oberarzt: Prof. Stephan von Tóth)] . .	559
Rosenthal, F., und Stein, E., Zur experimentellen Chemotherapie der Pneumokokkeninfektion. [Aus der medizinischen Klinik der Universität Breslau (Direktor: Geh. Rat Prof. Dr. Minkowski).] Mit 15 Figuren im Text	572
Stiner, O., und Abelln, S., Ueber den Einfluß des ultravioletten Lichtes auf hämolytische Ambozeptoren. [Aus dem Universitäts-Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle)].	598
Tillgren, J., und Brun, G., Ueber die Bedeutung der im Menschenserum enthaltenen Normalambozeptoren gegen Hammelblut bei der Wassermannschen Reaktion. [Aus dem klinischen Laboratorium des Königl. Serafimerlazarets, Stockholm)]	606

Inhaltsverzeichnis.

VII

	Seite
Landsteiner, K., und Jablons, B., Ueber die Beiträge von Antikörpern gegen verändertes arteigenes Serumeiweiß. V. Mitteilung über Antigene. [Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitals in Wien]	618
Coca, Arthur F., The Site of Reaction in Anaphylactic Shock. [From the Department of Experimental Pathology in the Medical College of Cernell University, New York City.] With 1 figure in text	622
Rotky, Karl, Immunisierungsversuche gegen den Vibrio El Tor. [Aus dem Hygienischen Institute der Deutschen Universität in Prag (Vorstand: Prof. O. Bail)]	644
Haren, P., Ueber die Giftigkeit arteigenen Serums und die Anaphylatoxinbildung aus Agar und Gelatine. [Aus dem Laboratorium der inneren Abteilung des Krankenhauses Magdeburg-Sudenburg (Direktor: Dr. Schreiber)]	673

Autorenverzeichnis.

- Abramow, S., und Mischennikow, S. 253.
Arima, R. 260.
Baeslack, F. W. 421.
Blumenthal, F. 378.
Caronia, G. 174.
Coca, A. F. 622.
Denecke, G. 501.
Dold, H., und Rados, A. 272.
Dold, H., und Rhein, M. 520.
Elschnig 305.
Franceschelli, D. 309.
Fränkel, E. 299.
Fraser, E. T. 291.
Friedberger E., und Tsuneoka 405.
Fröhlich, A. 476.
Fukuhara, Y. 198.
Gasbarrini, A. 178.
Haren, P. 673.
Hirschfeld, L., und Klinger 51, 81.
Köhne, W. 531.
Kolle, Hartoch, und Schürmann 436.
Kritschewsky, J. L. 238.
Kudicke, R., und Sachs, H. 316.
Landsteiner, K., und Jablons, B. 618.
Landsteiner, K., und Prásek, E. 137, 211.
Meyer, K. 367.
Prásek, E. 146.
Rados 416.
Rosenthal, E., und Takeoka, M. 559.
Rosenthal F., und Stein, E. 572.
Rotky, K. 644.
Schiff, F. 336.
Seng, H. 355.
Stiner, O., und Abelin S. 598.
Syrenskij, N. N. 543.
Thiele, F. H., und Embleton, D. 1. 159.
Tillgren J., und Brun, G. 606.
Weil, R. 199.
Wieland, H. 131.
Yamanouchi, T., et Lytchkowsky, M. 374.
-

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XX. No. 1/2.

Nachdruck verboten.

[From the Bacteriological Laboratory University College Hospital
Medical School, London (Dr. F. H. Thiele).]

The Evolution of the Antibody.

By **F. H. Thiele** and **Dennis Embleton.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. September 1913.)

The Evolution of the Antibody.

Since the first discovery of antibodies it has been held that Complement and Amboceptor or Substance sensibilisatrice are two separate bodies, and that the former originates quite independently of the latter. In this paper we propose to bring forward our experiments which show that the so-called amboceptor is a development of the complement, the evolution being gradually traceable from the one to the other.

We first noticed the fact that sera which were markedly haemolytic in the fresh state, not only lost this property on inactivation, but that this power was not restored or only incompletely by the addition of Complement. This occurred with the normally present, as well as with the acquired haemolytic power. The above fact can easily be seen from the following experiments with the normally present haemolytic antibody.

All the red cells used in the experiments quoted in this paper were washed six times with five times their bulk of normal saline. Red cell suspension. 10% of 6 times washed sheep red cells suspended in normal saline. 100 cmm used in each test. Complement, fresh guinea-pigs serum. Unit = the smallest quantity which with 1 unit of amboceptor will cause complete haemolysis of 100 cmm of 10% red cells in a test tube containing 2 c.c. of the mixture in normal saline, in $\frac{1}{2}$ hour at 37° C in the water bath.

Each tube in the following experiments was made up to 2 c.c. with normal saline.

Inactivation was always performed by exposing the serum to a temperature of 55° C in the water bath for $\frac{1}{2}$ hour.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XX.

1

Expt. I. Young brown rabbit.

	Normal rabbit's serum in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Rabbit serum alone	H	H	H	MH	0	—	—	—	—	—
" " + complement 2 units	H	H	H	H	0	—	—	—	—	—
" " inactive + complement 2 units	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—

Expt. II. Young wild coloured rabbit.

	Normal rabbit's serum in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Rabbit serum alone	H	H	H	SH	0	—	—	—	—	—
" " + comp. 2 units	H	H	H	H	MH	0	—	—	—	—
" " inactive + comp. 2 units	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—

Expt. III. Large wild coloured rabbit.

	Normal rabbit's serum in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Rabbit's serum alone	H	VMH	MH	0	—	—	—	—	—	—
" " + comp. 2 units	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—	—
" " inactive + comp. 2 units	SH	0	—	—	—	—	—	—	—	—

Expt. IV. Very old black rabbit.

	Normal rabbit's serum in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Rabbit serum alone	H	H	MH	0	—	—	—	—	—	—
" " + comp. 2 units	H	H	H	VMH	SH	0	—	—	—	—
" " inactive + comp. 2 units	H	H	VMH	MH	SH	0	—	—	—	—

Expt. V. Large brown rabbit.

	Normal rabbit's serum in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Rabbit serum alone	MH	SH	SH	0	—	—	—	—	—	—
" " + comp. 2 units	MH	SH	SH	0	—	—	—	—	—	—
" " inactive + comp. 2 units	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—

H = Complete haemolysis; VMH = Very marked haemolysis; nH = Almost complete haemolysis; MH = Marked Haemolysis; VSH = Very slight haemolysis; 0 = no haemolysis; — = not done

Expt. VI.

	Normal human serum in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Human serum alone	H	H	H	H	MH	MH	SH	0	—
” ” + comp. 2 units	H	H	H	H	MH	MH	”	0	—
2” units ” inactive + comp.	0	0	—	—	—	—	—	—	—

Expt. VII.

	Normal human serum in cmm							
	400	300	200	100	80	60	40	20
Human serum alone	H	H	H	H	MH	MH	SH	0
” ” + comp. 2 units	H	H	H	H	H	MH	SH	0
2” units ” inactive + comp.	MH	SH	0	—	—	—	—	—

From these experiments it will be seen that the haemolytic power of the serum is chiefly thermolabile and only in some cases and to a certain extent thermostable. The relative proportion of the two varies to some extent with the age of the animal, the older the animal usually the greater the amount of thermostable haemolytic antibody. Another point brought out is that the addition of complement in the form of normal guinea-pig serum in some cases increases the haemolytic power of the serum. This may be due to an insufficiency of complement in the haemolytic serum itself or that the excess of complement increases the potency of an already present amboceptor. That excess of complement increases the potency of an amboceptor is well known. The fact that the thermolabile haemolytic power of the serum in these cases was increased by the addition of complement leads to the idea of the presence of a thermolabile amboceptor. The nature of the thermolabile haemolytic substance was next investigated.

The sera from the above experiments were exposed in the ice-chest at 0° C to 6 times carefully washed sheep's red cells in excess. The constituents after cooling separately, in tubes placed in powdered ice and kept in the ice-chest at 0° C were then mixed together and kept in the powdered ice in the ice-chest for two hours, and were repeatedly shaken. The supernatant fluid was removed by centrifugation and the corpuscles were then washed twice with iced normal saline at 0° C. The supernatant fluid was tested for the presence of complement and haemolytic substance.

1*

The corpuscles were tested to see if they would haemolyse directly or after the addition of guinea-pigs serum.

(Amboceptor used = 2 units. Complement = 2 units.)

Expt. Ia. serum from Expt. I (rabbit).

	cmm	500	400	300	200	100
Serum before saturation		H	H	H	MH	0
" after "		0	—	—	—	—
" " " + amboceptor		0	—	—	—	—
" " " + complement		0	—	—	—	—
Exposed washed corpuscles in saline					Considerable haemolysis	
" " " " " + comp.					Increased	"

This experiment shows that not only is the haemolytic substance removed from the serum by exposure to the red cells in the cold, but the complement is also extracted. Further the sensitised red cells were capable of undergoing a certain degree of haemolysis independently of the subsequent addition of complement which increased it to some extent.

Expt. IIa. Serum from Expt. II (rabbit).

	cmm	500	400	300	200	100
Serum before saturation		H	H	H	SH	0
" after "		0	—	—	—	—
" " " + amboceptor		H	SH	0	—	—
" " " + complement		0	—	—	—	—
Exposed washed corpuscles in saline					Very slight haemolysis	
" " " " " + comp.					" marked	"

This experiment shows that after saturation the haemolytic power is gone from the serum, the complement is, however only diminished.

The sensitised red cells showed only very slight haemolysis independently of the addition of Complement, which subsequently caused very marked haemolysis.

Expt. IIIa. Serum from Expt. III (rabbit).

	cmm	500	400	300	200	100
Serum before saturation		H	VMH	MH	0	—
" after "		0	—	—	—	—
" " " + amboceptor		H	MH	SH	0	—
" " " + complement		0	—	—	—	—
Exposed washed corpuscles in saline					? Slight haemolysis	
" " " " " + comp.					Nearly complete haemolysis	

This experiment is very similar to the previous, there is less complement absorbed by the exposure to the red cells.

Expt. VIa. Serum from Expt. VI (human).

	cmm	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum before saturation		H	H	H	H	MH	MH	SH	0	0
" after "		0	0	—	—	—	—	—	—	—
" " " + amboceptor		H	H	MH	MH	SH	SH	SH	0	0
" " " + complement		0	0	—	—	—	—	—	—	—
Exposed washed corpuscles in saline										Moderate haemolysis
" " " " " + complement										Increased "

This experiment is similar to the previous one.

Expt. VIIa. Serum from Expt. VII (human).

	cmm	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum before saturation		H	H	H	H	H	MH	MH	SH	0
" after "		0	0	—	—	—	—	—	—	—
" " " + amboceptor		H	H	H	MH	SH	SH	SH	0	0
" " " + complement		0	0	—	—	—	—	—	—	—
Exposed washed corpuscles in saline										No haemolysis
" " " " " + Comp.										Very marked haemolysis

This experiment is similar to the previous ones.

If the experiment VIIa be considered it is obvious that there must be present a thermolabile amboceptor, since the haemolytic power is thermolabile, saturation removes the antibody, but leaves the complement only somewhat diminished. The antibody sensitises the red corpuscles, which then do not haemolyse by themselves, but on the addition of complement. Similar conclusions can be drawn from VIa, IIIa, and IIa. In the case of Expt. Ia however, the conditions are somewhat different. Complement was in this case wholly removed by saturation and the saturated cells underwent haemolysis independently of the subsequent addition of complement, which, however, increased the degree of haemolysis. Here in addition to a possible thermolabile amboceptor, there is a haemolytic substance, which combines directly in the cold with the red cells and during the combination, complement is removed,

hence the haemolytic substance appears to be complement so modified that it can combine directly with the red cells in the cold and directly cause haemolysis. Evidence of a similar substance can be traced in varying degree in the other experiments. The question as to these results being due to persensitisation will be discussed later.

In order to further elucidate these points a series of rabbits was inoculated with human red cells or sheep's red cells washed 6 times.

In no case have we discovered a rabbit, in over a 100 examined, the serum of which in quantities up to 500 cmm could cause haemolysis of human red cells in a space of 2 hours in the 37° C bath.

Expt. VIII a. Large black rabbit inoculated intraperitoneally with 5 c.c. of 6 times washed human red cells.

	Serum 2 days after inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—
„ + complement	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—
„ inactive + complement	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ after saturat. with human red cells	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ after saturation + compl.	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ (at 50% ¹)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
„ + amboceptor	—	—	—	—	H	H	MH	SH	0
„ fresh (at 50% ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	H	H

Exposed corpuscles direct in saline Moderate haemolysis
 „ „ + complement Marked „

(Human haemolytic system.)

This experiment demonstrates the haemolysin as thermostable in the early stages of its development and is not improved by the addition of complement. Saturation removes the haemolytic power and to a certain extent the complement.

The exposed corpuscles, after washing as before, undergo considerable haemolysis independently of complement, which subsequently increases it.

1) 50% = Serum diluted with equal quantity of normal saline.

Expt. VIII b.

	Serum 5 days after 1st inoculation in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Serum alone	H	H	H	H	SH	0	—	—	—	
„ + complement	H	H	H	H	H	MH	0	—	—	
„ inactive + complement	VSH	0	—	—	—	—	—	—	—	
„ after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
„ „ „ + compl.	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
„ „ „ (at 50% ¹)										
„ + amboceptor	—	—	—	—	—	H	H	MH	SH	
„ fresh (at 50% ¹) + amboc.	—	—	—	—	—	H	H	H	H	
Exposed corpuscles direct in saline						Slight haemolysis				
„ „ „ + complement						Very marked haemolysis				
(Human haemolytic system.)										

It is now seen that later (i. e. 5 days after injection) some thermostable haemolysin develops in addition to the above-mentioned. The haemolytic power is considerably improved by the addition of complement.

Saturation removes the haemolytic power and some complement, but less than above (VIII a).

The sensitised corpuscles undergo only slight lysis direct, complement causes a marked increase.

Expt. VIII c. Injected on 5th day with 8 c. c. washed human red cells.

	Serum taken 3 days after the second injection in cmm									
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	
Serum alone	H	H	H	VMH	VMH	MH	SH	0	0	
„ + complement	H	H	H	H	H	H	MH	SH	0	
„ inactive + complement	H	MH	SH	0	—	—	—	—	—	
„ after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
„ „ „ + complement	0	0	—	—	—	—	—	—	—	
„ after saturation (at 50% ¹) + amboceptor	—	—	—	—	H	H	H	H	SH	
„ fresh (at 50% ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	H	MH	
Exposed corpuscles in saline						Very slight haemolysis				
„ „ „ „ + complement						„ marked				
(Human haemolytic system.)										

The haemolytic substance has become still more thermostable. Complement increases its activity.

Saturation causes very slight absorption of complement.

1) See Expt. VIII a.

The sensitised red cells only haemolyse on the addition of complement.

Expt. VIII d. Re-injected on 8th day after the first inoculation, with 10 c. c. of human red corpuscles.

	Serum examined three days after the third injection in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	H	H	H	MH	SH	0	0
" + complement	H	H	H	H	H	MH	SH	0	0
" inactive + complement	H	H	H	VMH	SH	0	0	0	0
" after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—
" " " + compl. (at 50% ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
" + amboceptor	—	—	—	—	H	H	H	MH	SH
" fresh (at 50% ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	H	MH
Exposed corpuscles in saline	Haemolysis ?								
" " " " + complement (Human haemolytic system.)	Very marked haemolysis								

The same as VIII c, the antibody more thermostable.

Expt. IX a. Large wild marked rabbit inoculated intraperitoneally with 5 c. c. of washed human red cells.

	Serum taken 2 days after inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	MH	SH	0	—	—	—	—	—	—
" + complement	MH	SH	0	—	—	—	—	—	—
" inactive + complement	0	0	—	—	—	—	—	—	—
" after 1st saturation	MH	VSH	0	—	—	—	—	—	—
" " " " + compl.	MH	VSH	0	—	—	—	—	—	—
" " 2nd " +	MH	VSH	0	—	—	—	—	—	—
" " 1st " (at 50% ¹)	MH	VSH	0	—	—	—	—	—	—
" " 2nd " + amboceptor (at 50% ¹)	—	—	—	—	H	H	H	H	MH
" " 2nd " + amboceptor (at 50% ¹)	—	—	—	—	H	H	H	H	SH
" fresh (at 50%) + amboceptor	—	—	—	—	H	H	H	H	MH
Exposed corpuscles in saline	Practically no haemolysis								
" " " " + complement (Human haemolytic system.)	" " "								

This experiment demonstrates the presence of a thermostable haemolysin not improved by the addition of complement. Saturation does not remove the haemolysin or the complement.

The exposed corpuscles do not become sensitised.

The supernatant fluid is nearly as haemolytic as before saturation.

1) See Expt. VIII a.

This result was not due to faulty exposure, as can be seen from the results of the second saturation.

Expt. IX b.

	Serum taken 5 days after the inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	H	MH	0	—	—	—	—
„ + complement	H	H	H	H	VMH	MH	SH	0	—
„ inactive + complement	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl. (at 50% ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ + amboceptor	—	—	—	—	H	H	MH	SH	0
„ fresh (at 50% ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	H	MH
Exposed corpuscles in saline	Moderate haemolysis								
„ „ „ „ + complement	Marked „								
	(Human haemolytic system.)								

There is still no thermostable haemolysin (5th day).

The haemolytic power is increased by the addition of complement.

Saturation with red cells removes the haemolytic power and the complement markedly.

The sensitised red cells undergo some haemolysis independently of the addition of complement.

Expt. IX c. Rabbit had 2nd inoculation I.P. of 8 c.c. of washed human red cells on the 5th day after the first inoculation.

	Serum taken 3 days after the 2nd inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	VMH	VMH	VMH	VMH	VMH	VMH	VMH	VMH	0
„ + compl.	H	H	H	H	H	H	H	MH	SH
„ inactive + complement	H	H	H	H	H	MH	0	—	—
„ after satur.	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl. satur. (at 50% ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	MH	SH
„ fresh (at 50% ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	H	MH
Exposed corpuscles in saline	Practically no haemolysis								
„ „ „ „ + complement	Very marked „								
	(Human haemolytic system.)								

1) See Expt. VIII a.

The haemolysin is now partly thermolabile and thermostable, the latter part is considerable.

Exposure to red cells removes the haemolytic power, but not much complement.

The sensitised red cells only haemolyse on the addition of complement.

Expt. X a. Medium rabbit (White and Brown) inoculated with 5 c. c. of washed sheep's red cells.

	Serum before injection in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	MH	SH	SH	0	—	—	—	—	—
„ + complement	MH	SH	SH	0	—	—	—	—	—
„ inactive + complement	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ after saturation	0	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl.	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ (at 50 % ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
+ amboceptor	0	0	—	—	—	—	—	—	—
Fresh serum (at 50 % ¹) + amboc.	H	H	nH	SH	0	—	—	—	—
Exposed corpuscles in saline					Moderate haemolysis				
„ „ „ „ + complement					Marked „				
	(Sheep's haemolytic system.)								

This serum before injection contains no thermostable haemolysin, its activity is not increased by the addition of complement. The serum loses its haemolytic power on exposure to corpuscles — the complement is also absorbed in the cold. The sensitised corpuscles haemolyse well without the addition of complement.

Expt. X b.

	Serum taken 4 days after the inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	H	H	MH	0	—	—	—
„ + complement	H	H	H	H	H	H	H	H	H
„ inactive + complement	H	H	H	H	H	H	MH	0	—
„ after saturation	0	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl.	0	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ (at 50 % ¹)	0	—	—	—	—	—	—	—	—
+ amboceptor	H	H	H	H	MH	SH	—	—	—
Fresh serum (at 50 % ¹) + amboc.	H	H	H	H	MH	SH	—	—	—
Exposed corpuscles in saline					Practically no haemolysis				
„ „ „ „ + complement					Very marked „				
	(Sheep haemolytic system.)								

1) See Exp. VIII a.

The serum now has developed marked thermostable haemolytic properties, but there is a moderate amount of thermostable haemolysin left. Exposure to red cells removes its haemolytic power, but the complement is not removed. The sensitised red cells undergo no haemolysis until complement is added.

Expt. XIa. Brown Rabbit inoculation I.P. of 5 c.c. with washed sheep's red cells.

	Serum before inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—
„ + complement	H	H	VMH	MH	MH	MH	SH	SH	0
„ inactive + complement	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl.	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ (at 50 % ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
+ amboceptor	H	H	H	VMH	SH	0	—	—	—
Fresh serum (at 50 % ¹) + amboc.	H	H	H	H	MH	0	—	—	—
Exposed corpuscles in saline	Practically no haemolysis								
„ „ „ „ + complement	Very marked „								
	(Sheep haemolytic system.)								

The haemolysin here is completely thermolabile, its activity is greatly increased by the addition of complement. Exposure to red cells removes the haemolytic power, the complement is scarcely affected. The sensitised cells show no haemolysis until the addition of complement.

Expt. IX b.

	Serum 5 days after inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	H	H	H	H	MH	SH	0
„ + complement	H	H	H	H	H	H	H	H	H
„ inactive + complement	H	H	H	H	H	H	H	H	H
„ after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl.	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ (at 50 % ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
+ amboceptor	H	H	H	H	MH	0	—	—	—
Fresh serum (at 50 % ¹) + amboc.	H	H	H	H	MH	0	—	—	—
Exposed corpuscles in saline	No haemolysis								
„ „ „ „ + complement	Very marked haemolysis								
	(Sheep's haemolytic system.)								

1) See Expt. VIII a.

There is still no thermostable haemolysin, but the haemolytic power is greatly increased; complement has the same effect as before. Exposure to red cells removes the haemolytic power, but not the complement. The sensitised cells only haemolyse on exposure to complement.

Expt. XIII. Large rabbit injected I.P. at intervals of 5 days with 5 c. c., 8 c. c., and 10 c. c., of washed human red cells.

	Serum 3 days after 3rd injection in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	H	H	H	H	H	MH	0
„ + complement	H	H	H	H	H	H	H	MH	0
„ inactive + complement	H	H	H	H	H	H	MH	SH	0
„ after saturation	0	—	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl. (at 50 % ¹)	0	—	—	—	—	—	—	—	—
+ amboceptor	—	—	—	—	H	H	H	MH	SH
Fresh serum (at 50 % ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	MH	SH
Exposed corpuscles in saline	Practically no haemolysis								
„ „ „ „ + complement	Marked haemolysis								
	(Human haemolytic system.)								

The haemolytic power is mostly thermostable, is not increased by the addition of complement. The haemolytic power is removed by saturation, but the complement is not.

Expt. XIV. Medium-sized brown rabbit: inoculated I.P. at intervals of 5 days with 5 c. c., 8 c. c., and 10 c. c. of washed human red cells.

	Serum 3 days after 3rd inoculation in cmm								
	500	400	300	200	100	80	60	40	20
Serum alone	H	H	H	H	H	H	H	MH	SH
„ + complement	H	H	H	H	H	H	H	VMH	MH
„ inactive + complement	H	H	H	H	MH	SH	SH	SH	0
„ after saturation	0	0	—	—	—	—	—	—	—
„ „ „ + compl. (at 50 % ¹)	0	0	—	—	—	—	—	—	—
+ amboceptor	—	—	—	—	H	H	H	H	SH
Fresh serum (at 50 % ¹) + amboc.	—	—	—	—	H	H	H	H	MH
Exposed corpuscle in saline	Slight haemolysis								
„ „ „ „ + complement	Marked „								
	(Human haemolytic system.)								

This serum contains less thermostable antibody than the previous one, but otherwise is the same. There is evidence of thermolabile antibody.

1) See Expt. VIIIa.

These experiments again bring out the presence of thermolabile and thermostable haemolysin, and that as the number of inoculations is increased, i. e. as the activity of the antibody is increased it loses its thermolabile character and becomes more and more thermostable.

This is well seen in the experiments where the animals have been inoculated with human red cells. The rate of appearance of the stable antibody varying, however, considerably in different animals.

Thus in experiment VIII, two days after the inoculation the antibody is thermolabile, by the fifth day some thermostable has developed and this increases by the eighth and eleventh days. In experiment IX the thermostable antibody has only appeared on the eighth day, and in experiment XII it has not appeared on the fourth day after inoculation. In the case of the inoculation with sheep's red cells the thermostable antibody is developed much more rapidly, thus in experiment XI on the fifth day the only haemolysin present is a thermostable one, this is probably due to the fact that the serum at the start contains a normal haemolysin. From a further study of the above results it is obvious that the thermolabile haemolysin is not the same in all cases or at different periods in the same animal.

In the case of experiment XI a the serum contains against sheep's red cells a normal thermolabile haemolysin, and this appears to be wholly due to the presence of a thermoceptor, which can be activated by complement. The reasons for regarding it as such are:

1. It is thermolabile.
2. Exposure to sheep's red cells removes the haemolytic power, but not the complement.
3. The sensitised red cells only haemolyse in the presence of complement.

The whole experiment thus bringing out an absolute parallelism, putting the thermostable and thermolabile haemolytic power on the same basis, viz. both are due to an thermoceptor which combines with the antigen in the cold and are activated by complement, the sole difference is in the degree of thermo resistance.

In experiment XIIb there is a further example of the undoubted and uncomplicated presence of a thermolabile amboceptor developing four days after inoculation with human red cells.

Here again

1. the lysin is thermolabile,
2. the lytic power is removed by exposure to human red cells,
3. complement is not absorbed,
4. the sensitised cells do not haemolyse except in the presence of added complement.

Thus the conditions are quite the same as in experiment XIa. In the other experiments this thermolabile amboceptor can be traced, thus in VIIIc, d, it is definite, but the thermostable antibody is also present and in IXc, the condition of things is similar. In experiment XIII very little thermolabile amboceptor is present, in experiment XIV still less, the amboceptor being chiefly thermostable. There remains for discussion the results of experiments VIIIa, b, IXa, b, X and XIIa.

In all these except IXa, the haemolysin besides being thermolabile is removed by the antigen in the cold. Further examination, however, reveals the possibility of there being two varieties of haemolysin in all these.

In addition to the thermolabile amboceptor there can be definitely traced a variety of haemolysin, which is a differentiated complement, differing from the ordinary recognised complement in that it is capable of:

1) combining with the antigen in the cold as will be seen from experiment VIIIa, and b, and IXb, where there is a marked loss of complement after exposure to the homologous red cells, and Xa, and XIIa, where the complement loss is more marked still.

2) The red cells exposed to the sera after careful washing are capable of undergoing a marked degree of haemolysis without the presence of added complement being necessary.

From this we conclude that, after inoculation or at times present in the normal serum, there is a haemolytic power which is due to a modified complement, which is capable of direct combination with the red cells in the cold and is

capable of causing lysis without the intermediation of an amboceptor.

In the sera examined above this was not present by itself, the thermolabile amboceptor was probably present as well, since the addition of complement in the form of normal guinea-pig's serum markedly increased the lysis of the cells after exposure to the sera.

In experiment IX a, there is a different variety of lysin present. The lysin is thermolabile, but it is not removed by the homologous antigen in the cold, as is seen by the fact that the serum has not lost its lytic properties and that the exposed cells do not lyse when suspended subsequently in saline, either directly or after the addition of complement.

Further the lytic action unlike that of most of the other sera is not increased by the addition of fresh complement.

We have thus a lytic body which cannot combine in the cold, and apparently is not composed of amboceptor and complement, so that we are forced to regard it as a variety of complement, so differentiated that it is directly lytic to the homologous antigen, but cannot combine in the cold. This would appear to be the earliest form of lysin to occur.

From a consideration of these results we would conclude that the lysin passes through the following stages from ordinary complement:

1. a variety capable of combining only in the hot and causing lysis and not having the character of amboceptor.
2. a variety capable of combining in the cold, and causing lysis independently of added complement.
3. a variety in which a thermolabile amboceptor is present, which combines in the cold with the antigen and is activated by complement.
4. the ordinary accepted thermostable amboceptor activated by complement.

These can be traced in the successive stages after inoculation thus

- in expt. IX a. 1 is present only
 - b. 2 and 3 are present
 - c. 3 and 4 are present
- in expt. VIII a. 2 and 3 are present
 - b. 2, 3 and 4 are present
 - c. 3 and 4 are present
 - d. 3 and 4 are present
- in expt. X a. 2 and 3 are present
 - b. 3 and 4 are present

- in expt. XI a. 3 are present
 b. 4 are present
 in expt. XII a. 2 and 3 are present
 b. 3 are present
-

The following cross saturation experiments were devised in order to investigate more fully the behaviour of the complement, particularly with reference to the complement which combines in the cold and also the undifferentiated complement. (See Expt. XV p. 18.)

Dealing with the human system first we note:

1. That there is no haemolysin against the human red cells (H. 1: H. 2: H. 3).
2. The complement titre is four times greater for the human system than for the sheep's (H. 10: S. 10).
3. Exposure to human red cells does not diminish the complement titre to the human system (H. 10: H. 11).
4. Exposure to sheep's red cells also does not diminish the complement to the human system (H. 10: H. 12).

In the sheep's system we note:

1. The haemolysin is thermolabile and thermostable (S. 2: S. 3).
2. Is improved by the addition of complement (S. 2: S. 1).
3. Exposure to sheep's red cells removes the lytic power (S. 7: S. 8), and the complement (S. 10: S. 12).
4. Exposure to human red cells removes lytic power to sheep (S. 4) and this is restored by addition of complement (S. 5). The complement to the sheep's system is completely removed by this exposure (S. 10: S. 11).

H. = human system; S. = sheep system.

There is thus present in the serum for the sheep's haemolytic system, thermolabile and thermostable haemolysin (S. 2: S. 3). The lytic power appears to be wholly due to these two varieties of amboceptor activated by complement, since human saturation, which removes the lytic power (S. 4) and the complement (S. 11), does not remove the amboceptors, but the addition of complement (S. 5) brings back the lytic titre to its original S. 2.

The complement is wholly removed by saturation with sheep's red cells (S. 10: S. 12), so that the complement combines directly in the cold, so that there is no undifferentiated or ordinary sheep's complement. Whether this cold combining complement is lytic by itself cannot be determined.

Expt. XV. Normal rabbit not injected.

Serum	System										cm
	500	400	300	200	100	80	60	40	20	cm	
1. Serum alone	Sh.	H	H	MH	SH	SH	0	0	0		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
2. Serum + complement. 100 ccm of 50% guinea-pigs serum	Sh.	H	H	H	H	nH	0	MH	SH		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
3. Serum inactive + complement (100 ccm of 50%)	Sh.	H	H	H	H	VMH	VMH	-	-		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
4. Serum after human saturation; alone	Sh.	0	0	0	0	0	-	-	-		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
5. do. serum + complement (100 ccm of 50%)	Sh.	H	H	H	H	H	VMH	MH	SH		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
6. do. Serum inactive + complement (100 ccm of 50%)	Sh.	H	nH	nH	nH	VMH	MH	SH	VSH		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
7. Serum after sheep's saturation, alone	Sh.	0	0	0	-	-	-	-	-		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
8. do. serum + complement (100 ccm of 50%)	Sh.	0	0	0	-	-	-	-	-		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
9. do. serum inactive + complement (100 ccm of 50%)	Sh.	0	0	0	-	-	-	-	-		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	0	0	-	-	-	-	-	-		
10. Serum + 2 units of amboc.	Sh.	H	H	H	H	MH	SH	0	0		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	-	-	-	-	-	-	0	0		
11. Serum after human saturation + 2 units amboc.	Sh.	0	0	0	0	0	0	0	0		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	-	-	-	-	-	-	-	-		
12. Serum after sheep's saturation + 2 units of amboceptor	Sh.	0	0	0	0	0	0	0	0		Serum pure Serum 1 in 4
	Hu.	-	-	-	-	-	-	-	-		

Human saturation removes the complement to the sheep's system in the cold (S.10, S.11). Now this takes place without any amboceptor for the red cells and also without removal of the sheep's amboceptor (S.2, S.5) so that the complement can combine directly with the human red cells and is not lytic to them. This removal is therefore certainly not due to persensitisation.

Next we would draw attention to the fact that saturation with human red cells although it removes the sheep complement (S. 10, S. 11), does not affect the human titre (H. 10, H. 11), this must mean that the sheep complement which can combine with the human red cells in the cold cannot activate the human haemolytic system, and the complement to the human system is ordinary complement.

System	Thermo-stable amboceptor	Thermo-labile amboceptor	Cold specific complement ¹⁾	Cold non-specific complement ²⁾	Hot specific complement	Undifferentiated complement
Sheep	+	+?	—	+	—	—
Human	—	—	—	—	—	+

See Expt. XVI p. 20.

Dealing with the human system first we note:

1. The haemolysin is wholly thermolabile (H. 3).
2. Is not increased in power by addition of complement (H.1 : H.2).
3. The haemolytic power is not affected by exposure to human red cells in the cold (H.4).
4. The complement titre is not affected by this exposure (H.10 : H.11).
5. Exposure to sheep's cells does not affect the haemolytic power or complement (H. 7 : H. 8 : H. 12).

With the sheep's system :

1. There is thermolabile as well as thermostable haemolysin present (S.2 : S.3).
2. The haemolytic power is completely removed by saturation with sheep's red cells (S.7).
3. The complement is markedly diminished by the same procedure (S.12 : S.10).

1) Cold specific complement = complement which will combine with only its special antigen in the cold.

2) Cold non specific complement = is one which can combine with either in the cold.

2*

Expt. XVI. Normal rabbit injected I. P. with 5 c. c. of 6 times washed human red cells. Blood taken 60 hours later.

	Haemol. system	500	400	300	200	100	80	60	40	20	60 hours later.
1. Serum alone	Sh. Hu.	H H	nH H	nH H	MH H	SH SH	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
2. Serum + complement 100 cmm of 50% (guinea-pig's serum)	Sh. Hu.	H H	H H	H H	nH H	MH nH	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
3. Serum inactive + compl. (100 cmm 50%)	Sh. Hu.	— —	H H	H H	nH H	VMH VMH	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
4. Serum after human saturation, alone	Hu. Sh. Hu.	0 SH H	— SH H	— SH H	— 0 H	— 0 nH	— — —	— — —	— — —	— — —	Before injection After injection
5. Serum do. + complement (100 cmm 50%)	Sh. Hu.	— —	H H	H H	MH H	0 nH	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
6. Serum do. inact. + compl. (100 cmm 50%)	Sh. Hu.	nH 0	nH —	MH —	SH —	0 —	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
7. Serum after sheep saturation, alone	Sh. Hu.	0 H	0 H	— H	— H	— MH	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
8. Serum do. + complement (100 cmm 50%)	Sh. Hu.	0 H	0 H	— H	— H	nH —	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
9. Serum do. inact. + compl. (100 cmm 50%)	Sh. Hu.	0 0	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
10. Serum + 2 units amboceptor	Sh. Hu.	— H	— H	— H	— H	VMH H	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
11. Serum after human saturation + 2 units amboceptor	Sh. Hu.	H H	H H	H H	MH H	SH H	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection
12. Serum after sheep saturation + 2 units amboceptor	Sh. Hu.	H H	SH H	0 H	0 H	— —	— —	— —	— —	— —	Before injection After injection

4. Exposure to human red cells diminishes the lytic power to sheep's red cells (S.4) and the complement titre against the sheep's system (S.11), but not so much as sheep's saturation does (S.12).

There is thus present in this serum a haemolysin against human red cells, which contains no amboceptor (H.4) and has no complement so differentiated that it can combine directly in the cold (H.10:H.11).

The lytic power of the serum is unimpaired by previous exposure to human red cells in the cold (H.4) and the complement titre is also unaffected (H.10:H.11).

The lytic power, therefore, appears to be wholly due to some alteration in the complement, whereby it has become lytic independently of the presence of any amboceptor, but can only combine with the antigen in the warm.

It thus corresponds to Group 1 of haemolytic substances under our previous discussion. The lytic power and complement titre are also unaffected by previously exposing the serum to sheep's red cells in the cold (H.7:H.8:H.12) so that no complement which can activate the human system is absorbed by sheep's cells and none of the differentiated complement, which can only bind in the warm and independently of an amboceptor.

The haemolysin to sheep's red cells is only partially thermostable (S.2:S.3) the greater part is thermolabile.

The evidence that there is an amboceptor present is seen in S.4 and S.5, where after human saturation the lytic power against sheep's red cells is greatly diminished, but is increased by the addition of complement (S.5) the loss being partially due to the loss of complement. Now S.6 shows that after inactivation of the serum treated in this way (S.4), that the addition of complement does not bring back the lytic power to its former titre (S.5), hence there must be a thermolabile amboceptor present for sheep's red corpuscles.

Now we have already seen that saturation of the serum with human red cells diminishes the lytic power to sheep's red cells (S.1:S.4), and that there is loss of complement (S.10:S.11). The addition of complement does not bring back the lytic titre to its original S.5:S.4:S.2, hence, that

part of the complement which can be absorbed in the cold by human red cells is lytic to sheep's red cells, and this is absorbed by human red cells without the intermediation of an amboceptor; since there is none present for the human system in the serum.

The point that remains for discussion is that human red cells absorb in the cold something which has lytic powers against sheep's red cells (S. 4 : S.5) and also some complement which can activate sheep's lytic system (S.11).

The amount absorbed is not so great as that removed by saturation with sheep's red cells (S. 12). There thus appears to be for the sheep's system the following varieties of complement:

- a) undifferentiated complement, which does not combine with the red cells in the cold (S. 12);
- b) differentiated complement combining with the red cells in the cold (S. 12 : S.10).

This further can be subdivided into two:

1. a part which will only combine with sheep's red cells;
2. a part which combines with both human and sheep's red cells (S.11) and is lytic (vide supra) to sheep's red cells.

The latter, although it combines with the human red cells does not seem to be able to lyse them to any appreciable degree, since the haemolytic power to human red cells is practically unaffected by its removal (H.4, H.1).

The human complement from these experiments appears to be:

1. The hot combining differentiated lytic complement,
2. perhaps undifferentiated complement.

Thus there is:

System	1 Thermo- stable ambo- ceptor	2 Thermo- labile ambo- ceptor	3 Cold specific com- plement	4 Cold non- specific com- plement	5 Hot specific com- plement	6 Undiffer- entiated com- plement
Sheep	+	+	+	+	-	+
Human	-	-	-	-	+	(+ ?)

Expt. XVII. Normal Siberian rabbit. Prick ear. Injected I.P. with 5 c. c. of 6 times washed human red cells. Blood taken 36 hours later.

	Haemol. system	500	400	300	200	100	80	60	40	20	cmm
1. Serum alone	Sh. Hu.	— MH	— MH	H MH	MH MH	VSH SH	0 0	— —	— —	— —	— —
2. Serum + complement (100 cmm of 50% guinea-pig's serum)	Sh. Hu.	— MH	— MH	H MH	H MH	MH 0	SH 0	— —	— —	— —	— —
3. Serum inactive + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	SH 0	0 0	0 —	0 —	0 —	— —	— —	— —	— —	— —
4. Serum after human saturation, alone	Sh. Hu.	H MH	nH MH	MH MH	MH MH	— SH	— 0	— —	— —	— —	— —
5. Serum do. + complement (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	— MH	— MH	H MH	nH MH	MH SH	SH 0	— —	— —	— —	— —
6. Serum do. inact. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	SH 0	0 0	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
7. Serum after sheep saturation, alone	Sh. Hu.	0 MH	0 MH	— MH	— MH	— 0	— —	— —	— —	— —	— —
8. Serum do. + complement (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0 MH	0 MH	— MH	— MH	— 0	— —	— —	— —	— —	— —
9. Serum do. inact. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0 0	0 0	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
10. Serum + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	H —	H —	H —	H —	MH MH	— MH	— MH	— SH	— 0	Serum pure Serum I in 10
11. Serum after human saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	nH —	nH —	SH —	0 H	0 MH	— MH	— MH	— SH	— 0	Serum pure Serum I in 10
12. Serum after sheep saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	nH —	nH —	nH —	nH —	nH MH	— SH	— 0	— 0	— 0	Serum pure Serum I in 10

In this serum we have as regards the human haemolytic system :

1. A thermolabile haemolysin (H.1 : H.3).
2. Not improved by complement (H.1 : H.2).
3. Saturation with human red cells does not remove the haemolytic power of the serum (H.4 : H.5) and it is not improved by the addition of complement H.5. The complement titre against the human system is not affected (H.10 : H.11).
4. Saturation with sheep's red cells does not affect the human lytic titre of the serum H. 7, and slightly the complement titre (H. 10 : H. 12).

On the sheep's system we find :

1. The haemolysin is only partially thermostable, chiefly labile (S. 1 : S. 2 : S. 3).
2. It is improved by the addition of complement (S.1 : S.2).
3. Saturation with sheep's red cells removes the lytic power (S.7 : S.8, S. 9). The complement titre is affected (S. 10 : S. 12).
4. Saturation with human red cells removes some of the lytic power due to absorption of complement (S.4 : S.5). The complement titre to the sheep's system is diminished (S.10 : S.11).

The haemolysin on the human system is wholly thermolabile H. 3 and would appear to be almost wholly due to the presence of a differentiated complement which cannot combine in the cold with the antigen (H.10 : H.11), but which can act as a lysin in the warm (H.4 : H.5), so that the lytic power is due chiefly to this, i. e. hot combining lytic complement.

The presence of ordinary undifferentiated complement to the human system cannot be ascertained, but is probably present since the complementing power of the serum H.10 is much greater than its lytic power H. 2.

There does not appear to be any specific cold combining complement, or any appreciable degree of non-specific cold combining complement H. 4 : H. 12, but on the sheep system we see that human saturation absorbs complement to the sheep's system in the cold S.11, this is not lytic for sheep since addition of complement brings back the titre to its original S. 4 : S. 5 : S. 2.

With regard to the sheep system.

There is a small amount of thermostable amboceptor S. 3 and also some thermolabile amboceptor, as is seen after human saturation S. 4, where the lytic power is diminished owing to

the absorption of complement. This lytic power is increased to the original by the addition of complement S.5 so that the complement absorbed does not appear to be lytic by itself since the titre S.5 is equal to titre S.2.

There is undifferentiated complement present against the sheep's system S.10:S.12, which cannot be hot lytic S.7. Sheep's saturation only removes some small amount of complement in the cold to the sheep system (S.10:S.12), but human saturation removes a fair amount S.11, hence there is some complement which is absorbed by the human red cells in the cold, which can complement the sheep's system and is practically unabsorbable by the sheep cells and amboceptor in the cold and is not lytic to the human cells (H.4:H.5:H.2).

This condition is peculiar, and we put forward the suggestion that owing to the human red cell inoculation the undifferentiated complement of the sheep's system may have become modified so as to combine with human red cells in the process of education to effect lysis of the inoculated cells. Thus we have:

System	1 Thermo- stable ambo- ceptor	2 Thermo- labile ambo- ceptor	3 Cold specific com- plement	4 Cold non- specific com- plement	5 Hot specific com- plement	6 Undiffe- rentiated com- plement
Human	—	—	—	+	+	+
Sheep	+	+	—	?+	—	+

See Expt. XVIII p. 26.

In this experiment we have for the human system:

1. A thermolabile haemolysin (H.3).
2. Which is only slightly increased in potency by the addition of complement (H.1 and H.2).
3. The lytic power is almost completely removed by exposure to human red cells in the cold (H.4).
4. Similar exposure affects the complement titre markedly on the human system (H.11).
5. Sheep's red cells do not remove any lytic power or complement to the human system (H.7:H.8:H.12).

On the sheep's side we have further that:

1. The lysis is almost wholly thermostable (S.3).
2. It is improved by the addition of complement (S.2 and S.1).

Expt. XVIII. Normal rabbit injected I.P. with 5 c. c. of 6 times washed human red cells. Blood taken 120 hours later.

	Haemol. system	500	400	300	200	100	80	60	40	20	emm
1. Serum alone	Sh. Hu.	H H	H H	H H	MH VMH	0 MH	0 SH	— SH	— 0	— SH	
2. Serum + compl. (100 cmm of 50% guinea-pig's serum)	Sh. Hu.	H H	H H	H H	H H	MH MH	MH MH	— SH	— SH	— SH	Serum pure Serum 50%
3. Serum inactive + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	H H	H H	H H	VMH 0	VMH 0	VMH 0	VMH 0	VMH 0	—	Serum pure 10 cmm SH Serum 50%
4. Serum after human saturation, alone	Sh. Hu.	0	0	0	0	0	0	—	—	—	
5. Serum do. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	VSH	0	0	0	0	0	—	—	—	
6. Serum do. inact. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	nH VSH	nH 0	nH 0	MH 0	MH —	MH —	MH —	SH —	—	
7. Serum after sheep saturation, alone	Sh. Hu.	0	—	—	—	—	—	—	—	—	
8. Serum do. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0 H	— H	— H	— H	— MH	— —	— VSH	— 0	— —	
9. Serum do. inact. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0	0	0	0	—	—	—	—	—	
10. Serum + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	—	—	—	—	SH H	SH H	— 0	— 0	— nH	Serum pure 10 cmm SH Serum 50%
11. Serum after human saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	0	0	0	— H	— H	— H	— H	— MH	— SH	Serum pure Serum 50%
12. Serum after sheep saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	— nH	Serum pure 10 cmm SH Serum 50%

3. Exposure to sheep's red cells in the cold removes the haemolytic power (S.7 and S.8),
4. also removes the complement for the sheep's system (S.10:S.12).
5. Exposure to human red cells removes the lytic power (S.4) as well as all the complement to the sheep's system (S.11).

4 and 5 of this show that the loss of complement in S.12 cannot be due to experimental error, i. e. not keeping the saturation mixture cold enough, so that the complement might have been absorbed with the sheep's amboceptor, because in H.12 the complement to the human system is not affected and is the same mixture as S.12.

Dealing with the human system first, there appears to be present

- a) hot combining differentiated complement. The evidence is (H.4 and H.5) that the whole of the lytic power of the serum, is not lost by previous exposure in the cold to human red cells, which was thorough and complete.
- b) Cold combining complement to human red corpuscles. The exposure to human red cells removes a large amount of the complement to the human system (H.11) so that the unit is contained in 60 cmm instead of 20 cmm, i. e. in thrice the bulk. This is specific since it is not removed by saturation with the sheep's red cells (H.10, H.12).
- c) The presence of a thermolabile amboceptor cannot be definitely proved or disproved. In H.7 we note that the lysis is as great as in H.1 and this is due to the fact that sheep's cells do not absorb the human amboceptor and we know that complement is not absorbed (H.10:H.12), so that lysis may occur here from amboceptor and complement or there may be no amboceptor but cold combining specific lytic complement.
- d) Undifferentiated complement which does not combine in the cold and cannot cause haemolysis direct H.10 and H.11. Further after saturation with human red cells the addition of more amboceptor greatly increases the lytic power of the serum (H.4 and H.11).

On the sheep's system there is:

1. Thermostable amboceptor. This accounts for the greater part of the lytic power against sheep's red cells (S.2 and S.3).
2. Very little evidence of any thermolabile lytic power.
3. A variety of complement which can combine in the cold, but owing to the large amount of amboceptor, evidence of its lytic power cannot be brought out.
S.7 shows loss of lytic power which may be due to loss of amboceptor or complement or both.

- S. 8 that there is loss of amboceptor.
 S. 12 that there is loss of complement.
 4. There is no undifferentiated complement (S. 12).

There remains for discussion the fact that human red cells remove the lytic power against the sheep's system (S. 4). The loss is due to absorption of sheep's complement in the cold since the addition of guinea-pig's complement restores it (S. 5), and that it is really due to this is further shown in (S. 11); S. 6 shows that it is not due to the absorption of stable sheep amboceptor by the human cells.

The only variety of complement that can be proved to be present to the sheep's system is one which can combine with both human and sheep's red cells. Now since the saturation with sheep's red cells does not in any way affect the complement titre to the human system, it follows that the complement absorbed by human red cells is not lytic to them, but may be so to the sheep's.

Hence in this serum we have:

System	1 Thermo- stable ambo- ceptor	2 Thermo- labile ambo- ceptor	3 Cold specific com- plement	4 Cold non- specific com- plement	5 Hot specific com- plement	6 Undiffer- entiated com- plement
Human	—	?	+	—	+ trace	+
Sheep	+	?	?	+	—	—

See Expt. XIX p. 29.

In this serum there is in the human haemolytic system:

1. A thermolabile haemolysin (H. 1 : H. 3).
2. Its power is not improved on the addition of complement (H. 2).
3. Saturation with human red cells completely removes the lytic power against human red cells (H. 4) and the complement titre is reduced from 40 to 80 cmm (H. 10 : H. 11).
4. Saturation with sheep's red cells removes the lytic power to human red cells completely H. 7, and is not brought back by the addition of complement H. 8. The complement titre is diminished practically as much as with human saturation (H. 10 : H. 11 : H. 12).

Against the sheep's system there are:

1. A haemolysin which is partially stable (S. 3 : S. 1).
2. Its power is slightly improved by the addition of complement (S. 2 : S. 1).

Expt. XIX. Normal rabbit injected I.P. with 5 c.c. of 6 times washed human red cells. Blood taken 48 hours later.

	Haemol. system	500	400	300	200	100	80	60	40	20	cm
1. Serum alone	Sh. Hu.	H MH	H MH	H MH	H SH	MH SH	SH 0	SH 0	0 0	0 0	
2. Serum + complement (100 cm ^m of 50% guinea-pig's serum)	Sh. Hu.	MH	MH	H MH	H SH	VMH SH	SH 0	SH	SH	SH	
3. Serum inactive + compl. (100 cm ^m of 50%)	Sh. Hu.	H 0	MH 0	MH	SH	0	—	—	—	—	
4. Serum after human saturation, alone	Sh. Hu.	H 0	H 0	H	VMH	MH	SH	0	—	—	
5. Serum do. + complement (100 cm ^m of 50%)	Sh. Hu.	H 0	H 0	H	H	VMH	SH	—	SH	—	
6. Serum do. inact. + compl. (100 cm ^m of 50%)	Sh. Hu.	H 0	MH 0	SH	0	—	—	—	—	—	
7. Serum after sheep saturation, alone	Sh. Hu.	0 0	0 0	—	—	—	—	—	—	—	
8. Serum do. + complement (100 cm ^m of 50%)	Sh. Hu.	0 0	0 0	—	—	—	—	—	—	—	
9. Serum do. inact. + compl. (100 cm ^m of 50%)	Sh. Hu.	0 0	0 0	—	—	—	—	—	—	—	
10. Serum + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	—	—	H	H	MH H	SH H	0 H	H	MH	Serum pure Serum at 50%
11. Serum after human saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	H	H	H	H	MH H	SH H	0 VMH	SH	0	Serum pure Serum 50% ¹⁾
12. Serum after sheep saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	0	—	—	—	H	H	nH	MH	0	Serum pure Serum 50% ¹⁾

1) See Expt. VIIIa.

3. Sheep's saturation completely removes the lytic power (S. 7) and the complement (S. 12).
4. Human saturation practically removes no lytic power to sheep's red cells S. 4. The complement titre is practically unchanged (S. 11).

The experiments show that the haemolysin against human red cells is thermolabile (H. 3 and H. 1).

Then the haemolysin is not composed of a thermolabile amboceptor and complement since saturation with sheep's red cells removes the lytic power (H. 7) and this is not brought back by the addition of complement (H. 8) which is should be if there were a human thermolabile amboceptor present.

Further there is no haemolytic power due to the variety of complement which will not combine in the cold, but yet has haemolytic powers independently of the presence of an amboceptor (H. 4).

The evidence thus points to the haemolytic power being thermolabile (H. 3), attachable to the antigen in the cold (H. 4), and since we have disproved the presence of an amboceptor and hot lytic complement it must follow that this complement which is attachable in the cold is also lytic.

There is also undifferentiated complement present, which will not combine in the cold and which is not lytic (H. 4) and will activate human amboceptor (H. 11 : H. 10).

Against the sheep's red cells this serum contains a haemolysin which is chiefly thermolabile — only slightly thermostable (S. 3 : S. 1). The power is only slightly improved by the addition of complement (S. 2 : S. 1).

Saturation with sheep's red cells removes the lytic power and complement completely for the sheep system (S. 7 : S. 12).

These results lead to the conclusion :

1. That there is no undifferentiated complement to the sheep's system.
2. The complement present is therefore one which combines in the cold.

There still remains for discussion the fact that saturation with sheep's red cells entirely removes the lytic power to human red cells (H. 7) and this is not brought back by addition of complement (H. 8) and the complement titre is diminished practically as much as by human saturation.

This points to the lytic power against human red cells not being due to an amboceptor, since if it were so it would

not be absorbed by sheep's red cells and the addition of complement should restore the power.

The lytic power is due to complement which can combine with both human and sheep's red cells. There is very little, if any, which cannot combine with sheep's red cells since the complement titre is practically equally affected by human and sheep's saturation.

Thus we have:

System	1 Thermo- stable ambo- ceptor	2 Thermo- labile ambo- ceptor	3 Cold differ- entiated specific complem.	4 Cold combin- ing non- specific complem.	5 Hot differ- entiated com- plement	6 Undiffer- entiated com- plement
Human	—	—	trace	+	—	+
Sheep	+	+	+	? trace	—	—

See Expt. XX p. 32.

In this serum we have on the human system:

1. A thermolabile haemolysin which is not improved by the addition of complement (H. 1 and H. 2).
2. Saturation with human red cells entirely removes the lytic power H. 4 and greatly diminishes the complement titre (H. 10 : H. 11).
3. Saturation with sheep's red cells diminishes the lytic power against the human system (H. 7 and H. 8) and decreases the complement titre H. 12, but less than human saturation (H. 11).

On the sheep's system there is:

1. A haemolysin which is chiefly thermolabile, only a small part is thermostable (S. 1 and S. 3). Complement improves the lytic power S. 2 : S. 1).
2. Saturation with sheep's cells entirely removes the lytic power to sheep's red cells (S. 7) and this is not brought back by addition of complement (S. 8). The complement titre is diminished (S. 12 : S. 10).
3. Saturation with human red cells diminishes the lytic power to sheep's cells (S. 4) and is not increased by addition of complement (S. 5). The complement titre is diminished to the same degree to sheep's red cells as after sheep cell saturation (S. 10 : S. 11 : S. 12).

The lytic power of this serum against human red cells is wholly thermolabile and is not improved by complement addition.

There is undifferentiated complement present which does not combine in the cold with human red cells (H. 11), there

is no complement present which does not combine in the cold but acts as a lysin in the warm (H. 4). There is however evidence of a variety of complement which combines directly in the cold with human red cells (H. 11). Now saturation with sheep's red cells removes some of the complement in the cold to human red cells (H. 12) but not so much by far as saturation with human red cells (H. 11 : H. 12). Hence the complement which combines with human red cells is composed of

- a) a part which only combines with human cells,
- b) a part which can combine with both human and sheep's red cells.

There is definite evidence that the latter is lytic to human red cells (H. 8 and H. 2), where the removal of this complement by sheep's saturation (H. 8) greatly diminishes the haemolytic power to the human red cells (H. 8 : H. 2) in spite of the fact of the addition of excess of guinea-pig's complement.

There is not much thermolabile amboceptor present since the lytic power of the serum, which is greatly diminished, by removal of some of the lytic complement to the human red cells by saturation with sheep's red cells, is not perceptibly improved by the addition of complement (H. 7 : H. 8 : H. 2). This may indicate that the cold combining specific human complement is lytic or that there is thermolabile amboceptor and sufficient complement to cause haemolysis.

To the sheep's system :

The lysin is chiefly thermolabile, there is only a small amount of thermostable amboceptor (S. 3).

There is undifferentiated complement not combining in the cold with sheep's red cells (S. 12), and there is no hot lytic complement (S. 7).

There is some complement present which can combine in the cold with sheep's red cells (S. 10 : S. 12), and it combines equally well with human red cells is shown by (S. 11 and S. 12) there is thus no specific cold combining complement for the sheep's red cells.

This is lytic as can be shown by the examination of the following:

S. 4 shows loss of lytic power and since this cannot be due to loss of sheep's amboceptor, the alteration must be due to absorption of the complement. Now the addition of more complement (2 units of guinea-pig's) does not increase the lytic power S. 5, hence the amboceptors left in the serum have been fully activated by the complement already present which had not been absorbed, the difference between the S. 5 and S. 2 must be due to the absorption of the complement in the cold by human red cells and it must be directly lytic to the sheep's red cells:

System	1 Thermo- stable ambo- ceptor	2 Thermo- labile ambo- ceptor	3 Cold specific differentiated complement	4 Cold non- specific differentiated complement	5 Hot diffe- rentiated com- plement	6 Undiffe- rentiated com- plement
Human	—	?	+	+	—	+
Sheep	+	+	—	+	—	+

See Expt. XXI p. 35.

Dealing with the human haemolytic power we note:

1. The haemolysin is wholly thermolabile (H. 3).
2. It is not improved on addition of complement (H. 2 and H. 1).
3. It is removed by saturation with human red cells in the cold (H. 4).
4. The complement is also diminished by this procedure (H. 11).
5. Sheep's saturation removes very little of the lytic power (H. 7) and practically no complement (H. 12) to the human system.

On the sheep's system we note:

1. The haemolysin is largely thermolabile (S. 3) and is improved by complement (S. 2 and S. 1).
2. Saturation with sheep's cells removes the lytic power (S. 7) and complement (S. 12) completely.
3. Human saturation diminishes the lytic power (S. 5) and the complement (S. 11).

The lytic power of the serum against human red cells is wholly thermolabile and is completely removed by saturation with the homologous antigen in the cold, so that in this case there is no complement, which is lytic and can combine only in the warm (H. 3 : H. 4).

Expt. XXI. Normal rabbit injected I.P. with 5 c. c. of 6 times washed human red cells. Blood taken 96 hours later.

	Haemol. system	500	400	300	200	100	80	60	40	20	cmm
1. Serum alone	Sh. Hu.	— VMH	— MH	— MH	H SH	VMH SH	MH SH	SH 0	0 0	0 0	
2. Serum + compl. (100 cmm of 50 % guinea-pig's serum)	Sh. Hu.	— VMH	— MH	— MH	H SH	H SH	H SH	H 0	MH 0	SH 0	
3. Serum inactive + compl. (100 cmm of 50 %)	Sh. Hu.	MH 0	SH —	0 —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
4. Serum after human saturation, alone	Sh. Hu.	H 0	H —	H —	SH —	— —	0 —	0 —	0 —	0 —	
5. Serum do. + compl. (100 cmm of 50 %)	Sh. Hu.	— 0	— —	— —	H —	MH —	SH —	0 —	— —	— —	
6. Serum do. inact. + compl. (100 cmm of 50 %)	Sh. Hu.	MH 0	SH —	0 —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
7. Serum after sheep saturation, alone	Sh. Hu.	0 MH	— MH	— SH	— VSH	— 0	— —	— —	— —	— —	
8. Serum do. + compl. (100 cmm of 50 %)	Sh. Hu.	0 MH	— MH	— SH	— VSH	— 0	— —	— —	— —	— —	
9. Serum do. inact. + compl. (100 cmm of 50 %)	Sh. Hu.	0 0	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	
10. Serum + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	— —	H —	H —	nH —	MH H	SH H	0 H	0 H	— SH	Serum pure Serum 50 %
11. Serum after human saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	H —	H —	H —	SH —	0 H	— H	— H	— SH	— 0	Serum pure Serum 50 %
12. Serum after sheep saturation + 2 units of amboceptor	Sh. Hu.	0 —	0 —	0 —	— —	— H	— H	— H	— H	— 0	Serum pure Serum 50 %

3*

This serum contains, however, against the human system a large amount of complement which does not combine with the human or sheep's red cells in the cold (H. 10:H. 11:H. 12) and so must be regarded as ordinary undifferentiated complement.

Exposure to human red cells, however, causes the complete loss of lytic power for the human system and also some loss of complement for the same, the unit now being contained in 60 cmm, instead of 40 cmm (of the 50 % serum). The loss in lytic power might be due to removal of a possible thermolabile amboceptor or specific complement. The possibility of the presence of a thermolabile amboceptor is given H. 10: H. 11, where after human saturation the addition of the amboceptor brings back the lytic titre, but not completely, so that in addition there would appear to be some complement which can combine directly with the human cells in the cold and which is lytic. No information can be obtained by the examination of H. 10, H. 12, where after sheep's saturation the lytic titre of the human system is unaffected. This may mean that there is sufficient ordinary undifferentiated complement left to completely activate the amboceptor or that haemolysis is all due to specific cold combining human complement.

Now saturation with sheep's red cells removes only a trace of lytic power from the human system H. 7 and this is not improved by the addition of complement H. 8, and the complement titre H. 10:H. 12 is practically unaffected, so that there appears to be no human complement which can combine with the sheep's haemolytic system.

Thus we conclude that there is present for the human haemolytic system:

- A. Undifferentiated complement.
- B. Cold combining complement which can only combine with the human red cells.
- C. Nothing can be said definitely regarding the presence or not of a thermolabile amboceptor.

On the sheep side the lytic power is chiefly thermolabile, the amount of thermostable is small (S. 2 : S. 3).

The lytic power is improved by the addition of complement S. 2 and is completely removed by saturation with

sheep's red cells in the cold S. 7, as is the complement S. 12.

The loss of lytic power by exposure to sheep's red cells in this case is due to loss of complement (S. 12) and loss of amboceptor (S. 8). There appears to be no undifferentiated complement present to the sheep's system (S. 10 : S. 12).

Finally there remains for discussion the fact that human saturation diminishes the lytic power to the sheep's system (S. 4) and also the complement (S. 11).

The addition of complement to this saturated serum (S. 4, S. 5) improves the lytic power, but does not bring it back to its original titre (S. 2). (S. 2 is 60 : S. 4 300 : S. 5 200 cmm.)

Now since amboceptors to the sheep's system are not removed by human saturation, the addition of complement should bring the titre back to the original S. 2 if the haemolytic power were solely due to complement and amboceptor, but since this is not so, it follows that the absorbed complement is also haemolytic to the sheep's cells, i. e. there is a variety of complement which can combine with the human cells in the cold and lyse sheep's cells in the warm. Now human saturation does not remove the sheep's complement so much as sheep's saturation, which completely removes it, hence there is a variety of complement which combines in the cold only with sheep's red cells. So for the sheep's system there are:

- a) cold combining specific complement,
- b) cold combining complement which will also combine with human red cells.

There is thus distinct evidence of complement combining directly in the cold (S. 12) with its homologous antigen.

There is no undifferentiated complement (S. 12).

System	1 Thermo- stable ambo- ceptor	2 Thermo- labile ambo- ceptor	3 Cold specifying com- plement	4 Cold com- bining com- plement	5 Hot diffe- rentiated com- plement	6 Undiffe- rentiated com- plement
Human	—	?	+	trace	—	+
Sheep	+	?	+	+	—	—

Expt. XXII. Normal rabbit inoculated with 5, 8, 12 ccm of 6 times washed sheep's red cells at intervals of three days. Blood examined one week after the last injection.

Quantity ccm	Haem. system	Dil. 1-10										Dil. 1-100						
		500	400	300	200	100	80	60	40	20	100	80	60	40	20			
1. Serum alone	Sh. Hu.	0	—	—	—	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—
2. Ser. + compl. (100 cmm 50% guinea-pigs serum)	Sh. Hu.	0	—	—	—	—	—	—	—	H	H	H	H	H	H	H	H	MH
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3. Serum inactive + compl. (100 cmm 50%)	Sh. Hu.	0	—	—	—	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	MH
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4. Serum after human saturation. Serum alone	Sh. Hu.	0	—	—	—	H	nH	SH	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5. Serum after human saturation. Ser. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0	0	—	—	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	SH
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6. Ser. do. inact. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0	0	—	—	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	SH
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7. Serum after sheep saturation. Serum alone	Sh. Hu.	0	H	H	—	MH	SH	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8. Serum do. + compl. (100 cmm of 50%)	Sh. Hu.	0	0	—	—	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	SH
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9. Ser. do. inact. + compl. (100 ccm of 50%)	Sh. Hu.	0	0	—	—	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	MH	SH
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10. Serum + 2 units of amoceptor	Sh. Hu.	—	—	—	—	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11. Serum after human saturation + 2 units amoceptor	Sh. Hu.	—	—	—	—	H	H	MH	SH	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12. Serum after sheep saturation + 2 units amoceptor	Sh. Hu.	H	H	H	MH	SH	MH	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hu.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Serum pure
Serum 1 in 4

Serum pure
Serum 1 in 4

Serum pure
Serum 1 in 4

The results obtained from this experiment show that for the sheep's system:

1. The haemolytic power is wholly due to a thermostable amboceptor and complement S. 2 : S. 3.
2. The amount of complement present is not sufficient to completely activate the amboceptor S. 1 : S. 2.
3. Treatment with sheep's red cells in the cold removes some amboceptor, S. 2 : S. 8 and some complement S. 10 : S. 12.
4. Saturation with human red cells scarcely affects the lytic power in the sheep's system S. 1 : S. 4, the complement is practically unaffected S. 10 : S. 11.

On the human system neither human or sheep saturation affects the complement titre much H. 10 : H. 11 : H. 12.

Thus for the human system there is only undifferentiated complement which cannot combine with either sheep's or human red cells in the cold.

On the sheep's system we have the fact that human red cells do not affect the lytic S. 1 : S. 4 or complement titre S. 10 : S. 11, so that there is no complement for the sheep's system, which can combine with the human cells in the cold.

There remains for discussion the fact that sheep's red cells do remove complement power from the serum in the cold against the sheep's system S. 10 : S. 12.

Here the question of persensitisation comes in markedly. The sheep's red cells were exposed to a huge excess of combining units of amboceptor, so that persensitisation could easily occur. The result S. 7 : S. 12 may be therefore be due to this.

The interesting and important point is that the titre to the human system is unaffected, so that if the result is due to persensitisation, there must be specific sheep mid pieces which have no effect on the human system at all. So that again if this phenomenon is persensitisation, it only affects specifically differentiated complement so that we have:

System	Thermo-stable ambo-ceptor	Thermo-labile ambo-ceptor	Cold specific complement	Cold non-specific complement	Hot differ-entiated complement	Non differ-entiated complem.
Human	—	—	—	—	—	+
Sheep	+	—	+ ?	—	—	+

In this experiment we note the following:

On the human system:

1. The lytic power is wholly thermolabile (H. 1 : H. 3) and is improved by the addition of complement H. 1 : H. 2.
2. After saturation with human red cells the lytic power of the serum is completely lost H. 1 : H. 4 and the complement titre is also diminished H. 10 : H. 11.
3. After saturation with sheep's red cells the lytic power is diminished H. 1 : H. 7 and it is not brought back to the original by the addition of complement H. 2 : H. 8.

On the sheep's system:

In addition to the facts noted in the previous experiment we have:

1. Human red cell saturation does not affect the lytic power on the sheep's system S. 1 : S. 4.
2. Human red cell saturation does not affect the complement titre S. 10 : S. 11.

Now dealing first with the human system there is evidence of non-differentiated complement H. 10 : H. 11. On comparing H. 7 : H. 8 : H. 2 it is seen that sheep's saturation removes the lytic power of the serum against human red cells H. 1 : H. 7, and this is not brought back to the original by the addition of complement H. 8 : H. 2. Now since the sheep's cells cannot absorb the human amboceptors, the fact that the addition of complement although it improves the lytic power (H. 7 : H. 8), does not bring it back to the original by far (H. 8 : H. 2) must mean that the sheep's red cells can remove in the cold some lytic substance which is not an amboceptor, but must be a variety of complement, which can lyse human red cells. There is loss of complement after such treatment H. 10 : H. 12. The fact that the addition of complement improves the lytic titre H. 7 : H. 8, shows the evidence of some thermolabile amboceptor. H. 10 : H. 11 : H. 12 show that the human saturation removes more complement to the human system than sheep's red cells do, hence there is a small amount of complement which can combine only with human red cells in the cold. On the sheep's system little need be said except that human saturation does not affect the lytic or complementing power of the serum on this system.

Sheep's red cells however, remove some of the complement to the sheep's system. This may be either due to persensitisation or a variety of complement which can combine in the cold with sheep's red cells only.

We have thus:

System	Thermo-stable ambo-ceptor	Thermo-labile ambo-ceptor	Cold specific complement	Cold non-specific complement	Undifferentiated complement
Human	—	+	+	+	+
Sheep	+	—	+ ?	—	+

The main interest is to compare the previous experiment with this. On the sheep's system we note a slight increase in lytic power since haemolysis now goes down to 100 cmm of a thousand dilution. Otherwise there is practically no difference.

On the human system in addition to the development of the lytic power there is an alteration in the complement. Besides the ordinary undifferentiated complement there is now complement which is lytic and can combine in the cold. Some is not absolutely specific since it can combine with sheep's red cells, the rest is specific since the absorption of human system complement is greater with the human red cells. Human saturation removes complement now when it did not do so in the previous experiment. Sheep saturation had practically no result in the human complement titre on either occasion. Hence there must be specific complements for both systems, since they are affected independently. It would appear that in this case the lytic human complement is not developed from the sheep complement since human saturation does not affect the sheep's complement titre. It, however, appears, that as the complement differentiates it may combine not quite specifically but yet have a lytic effect only on its homologous antigen.

General discussion.

In any group of experiments of this type the greatest caution must be used in interpreting the results and basing an argument upon them. Numerous experimental errors may occur, which if not noted and accounted for bring in all sorts

of fallacies. In the experiments quoted above we have not recorded by any means the whole of our experimental work on this subject, but have simply given the full protocols of those which appeared to us to bring out some special points. The unrecorded experiments are confirmatory of those quoted and are simply omitted so as not to overburden the paper.

We shall now proceed to discuss the various errors which can arise during the process of saturation.

They are:

- a) saturation carried on at too high a temperature,
- b) imperfect saturation.

Now in all our experiments the materials used were placed in long narrow tubes completely surrounded by powdered ice in the ice-chest for 15 minutes before mixing.

Then after mixing they were kept in the powdered ice in the ice-chest as before for 2 hours being shaken up every half hour to ensure complete and thorough contact.

The mixtures were rapidly centrifuged in a high speed centrifuge in iced tubes, and the supernatant fluid was kept in ice till used. This disposes completely of any error due to absorption of complement occurring after union of amboceptors, because of the temperature being too high.

To show that the saturation was not imperfect we performed the following series of experiments in which the supernatant fluid after an exposure was saturated again, and this process repeated again. The experiments quoted below show that the saturation was perfect in the first two hours. In some cases there was a very slight loss with the repeated saturations, this, however, was quite small and possibly due to a slight dilution.

That possible dilution does not account to any perceptible degree for the differences noted can be seen from the above quoted experiments. Further the corpuscles were always centrifuged at a high speed till their bulk remained constant.

That the differences are not due to experimental error, dilution etc., is best seen from the results of the cross saturations, for example see expt. XVI:

- c. f. H. 10 : H. 11 : H. 12 where the complement titre is not altered either by human or sheep's saturation to the human system

whereas S. 10 : S. 11 shows how human saturation affects the complement titre to the sheep's system,

S. 10 : S. 12 where sheep's saturation does the same only more markedly.

Again expt. XXI:

c. f. H. 10 : H. 12 sheep saturation does not alter the complement titre to the human system,

whereas S. 10 : S. 12 the same saturation causes the complete absorption of the complement to the sheep's system.

These examples can easily be multiplied, but the above are sufficient to indicate that there is no experimental error due to dilution.

The question of persensitisation remains to be discussed.

Sachs and Bolkowska¹⁾ have shown when guinea-pigs complement is exposed in the cold at 0° C for 1½ hours to amboceptor laden corpuscles that according to the amount of amboceptor used, a fraction of the complement may or may not become attached. Thus where small doses of amboceptor were used (1—3 units for each unit of corpuscle) no part of the complement became bound, where over this, the mid piece alone or mid piece and some of the end piece became bound. Now it might be argued that the same has occurred in the above experiments. Now the conditions of exposure in our experiments are different, viz, the corpuscles were not previously sensitised, so that the possible absorption of complement could not occur so rapidly as in Sachs's experiments, and further auto-genous complement was used.

Now referring to experiment XXI in S. 2, the haemolytic titre to the sheep's system is such that one unit is contained in 60 cmm. On exposure of the serum to red cells for the purposes of our experiment 5 c. c. were exposed to 2 c. c. of red cells, so that the corpuscles were practically only half saturated or to be accurate $\frac{5}{12}$ ths. saturated, so that, according to Sachs and Bolkowska, complement should not be absorbed; but the complement was absorbed by the sheep's system S. 12. Further this exposure did not appreciably affect the titre to the human system H. 12. If it is supposed, however, for the sake of argument, that the loss of complement is due to the absorption of mid piece by sheep's red cells and amboceptors, it ought to follow that the complementing power to the human haemolytic system must also be diminished, but it is not so H. 10 : H. 12.

1) Sachs and Bolkowska, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910, p. 778.

Therefore an undifferentiated mid piece which can affect the human lytic system has not been absorbed by the sheep cells. This then leads to the conclusion that there are specific mid pieces which can only combine with the homologous amboceptors. If this is so it is merely putting our argument for specific lytic bodies in other words, i. e. saying there are specific mid pieces instead of specific lytic bodies.

Again experiment XVIII: S. 4 : S. 5 : S. 11 might be accounted for by persensitisation, the lytic power of the serum being brought back by the addition of new complement with mid pieces. The human cells remove as much complement power as the sheep's cells (S. 11 : S. 12) to the sheep's system ; which therefore should point to the presence of undifferentiated mid pieces, equally absorbable by either system, but if the saturation is reversed, the sheep's cells remove the power to their own system S. 12, but not to the human H. 12. Thus human and sheep's cells remove all the mid pieces to the sheep's system, but sheep's cells remove none to the human. Again the lytic titre of the serum on the two systems is equal hence absorption of non-differentiated mid pieces should be equal, but it is not.

In expt. XVI: Here we have the facts that neither sheep nor human saturation affects the complementing power to the human system (H. 10 : H. 11 : H. 12). Human saturation, however, diminishes the complementing power to the sheep's system and the lytic power S. 11 : S. 4, which lytic power is not brought back completely by the addition of complement in excess S. 5, in fact only partially brought back (S. 5 : S. 2). Hence the amboceptor and complement do not account for the whole lytic power on the sheep's side; and the loss, after human saturation, is not wholly due to loss of undifferentiated mid pieces. There must be a variety of complement, which combines in the cold with human red cells and is lytic to sheep's red cells S. 5 : S. 2. Further this combines with the human cells without the intermediation of an homologous amboceptor H. 2 : H. 4 : H. 5, as there is no amboceptor which can combine with the human red cells in the cold. Therefore this alteration in the complement titre is not a persensitisation phenomenon.

In expt. XVII we might draw attention to the following: There is no amboceptor on the human side H. 4 : H. 5 : H. 2, but there is a fair amount to the sheep system S. 2 : S. 4 : S. 5, but human saturation markedly diminishes the sheep's complement titre S. 11 whereas sheep saturation does not. Now on the principle found by Sachs and Bolkowska the sheep saturation ought to remove more mid pieces than the human, because there is no human amboceptor; so that persensitisation cannot occur. Here the reverse is the case, the human removing more than the sheep red cells even without an amboceptor. Hence the alteration in titre cannot be due to persensitisation.

In expt. XIX we have the following, sheep saturation removes the lytic power to the human system H. 7 and this is not brought back by the addition of complement H. 8. Hence the human lytic system is not due to an amboceptor and complement, from the latter of which mid pieces can have been removed by the sheep's cells and amboceptor, but must be due to a variety of complement, which can combine in the cold directly with the human cells H. 4 and is lytic H. 1 : H. 2, and the absorption by human red cells is not due to persensitisation.

Finally on referring to expt. XX, it will be seen that human saturation nearly removes the lytic power to the sheep's system S. 4, and this loss cannot be wholly accounted for by removal of mid pieces, since (S. 5) 100 cmm of 50% guinea-pig's complement does not bring back the titre to the original S. 2 and not even to titre S. 1, so that the loss of lytic power cannot be by any means wholly explained by loss of mid pieces, so that the amboceptor cannot be activated, but there must be a variety of complement which can combine with the human and sheep cells and is directly lytic for sheep cells. The same can be shown for human cells.

Numerous other instances might be quoted to show that the absorption of complement in the various ways mentioned above cannot be due to removal of mid pieces simply by persensitisation in the ordinary sense.

The following experiment also shows that persensitisation has nothing to do with the result obtained in our previous experiment:

1. Rabbit's serum haemolytic to sheep's red cells was inactivated and its amboceptor titre determined.
2. Rabbit's serum haemolytic to human red cells was similarly treated.
3. Guinea-pig's complement was used for activation in both cases and its titre determined on the human system and sheep's system.

The first point that was brought out was a fact that we have previously repeatedly observed, — viz, that the complement titre is the same on the two systems, thus being very different from what is the case in the rabbit's serum.

In the experiments above the titre was 20 cmm¹).

The titre of the amboceptor to the sheep's system was 20 cmm
 " " " " " " " human " " 40 "

Six times carefully washed human and sheep's red cells were separately iced as in the previous experiment and the amboceptor sera and complement were similarly iced. After complete cooling they were mixed in combining proportions and kept in the ice for 2 hours, being shaken up every half hour.

So that to every c.c. of human red cells, 4 c.c. of amboceptor serum and 2 c.c. of complement were added; to the sheep's system to every c.c. were added 2 c.c. of complement and 2 c.c. of amboceptor.

After saturation.

The sera were titrated for complement on the two systems.

		Quantity in cmm	500	400	300	200	100	80	60	40	20
1. Human lytic serum After exposure to human red cells	Human system	H	H	H	H	H	H	H	H	SH	0
	Sheep system	H	H	H	H	H	H	H	H	SH	0
2. Sheep lytic serum After exposure to sheep's red cells	Human system	H	H	H	H	H	H	H	H	H	SH
	Sheep system	H	H	H	H	H	H	H	H	H	MH

Thus it is seen that the complement titre is the same for the two systems after each saturation with either homologous antigen. So that

1. Persensitisation has not occurred.
2. There are no specific complements for the sheep and human system in the guinea-pig's serum.

The titre has been unaffected. The complement was diluted 1 in 3 in the human exposure, hence the unit is in 60 cmm.

1) Determined as in all the previous experiments.

The complement was diluted 1 in 2 in the sheep exposure so that the unit is in 40 cmm and these are what is found.

Now in our experiments with the exception of the last (XXII a, b) the conditions were such that persensitisation could not occur, the quantities were combining units of amboceptor and antigen or even less amboceptor than the combining unit.

Zusammenfassung.

In dieser Arbeit wird über Experimente über die Evolution des hämolytischen Antikörpers berichtet.

Kaninchen wurden mit sorgfältigst gewaschenen Erythrocyten (Hammel- oder menschlichen) behandelt und das Serum nach verschiedenen Intervallen auf hämolytisches Vermögen untersucht, direkt oder nach Behandlung in der Kälte mit den homologen oder heterologen Blutkörperchen.

Die Resultate dieser Experimente zeigen:

1) daß die Bildung des Hämolysins allmählich geschieht und daß die folgenden Stadien deutlich erkannt werden können:

a) das, in dem das Hämolysin thermolabil ist und nicht in der Kälte mit dem Antigen in Verbindung treten kann, aber in der Wärme lytisch wirkt und noch die anderen Eigenschaften des Komplements hat;

b) das, in dem es noch immer thermolabil ist, aber jetzt in der Kälte (0°C) mit dem Antigen in Verbindung treten kann, in der Wärme lytisch ist und doch die Eigenschaften des Komplements beibehalten hat;

c) das, in dem das Hämolysin wie vorher noch thermolabil ist und sich mit dem Antigen in der Kälte verbinden kann; aber das so behandelte Serum hat hierdurch die hämolytische Kraft verloren, enthält aber noch Komplement. Das so gesättigte Antigen kann jetzt durch den Zusatz von Komplement vom Meerschweinchen hämolysiert werden. Das hämolytische Vermögen ist jetzt durch einen thermolabilen Ambozeptor und Komplement verursacht.

d) das, in dem man die altbekannten thermostabilen Ambozeptoren und Komplement erkennen kann.

Die obengenannten Faktoren können einzeln vorhanden sein, öfter sind aber zwei oder mehrere zu gleicher Zeit zu erkennen.

Wenn man ein Tier mit einem Antigen injiziert, gegen das dessen Serum kein Lysin besitzt, so kommt zuerst ein lytisches Vermögen zustande, das thermolabil ist, und das Lysin verankert sich nicht mit dem homologen Antigen in der Kälte.

Die späteren Stadien sind der Reihe nach:

a) ein Lysin, das in der Kälte mit dem homologen Antigen in Verbindung treten kann und in der Wärme ohne den Zusatz von Komplement lytisch wirken kann;

b) wo das Vermögen durch thermolabile Ambozeptoren und Komplement verursacht ist,

c) und zuletzt durch thermostabile Ambozeptoren und Komplement.

2) Das in Kaninchenserum normale lytische Vermögen gegen Hammelerythrocyten ist durch die folgenden Faktoren verursacht:

a) ein Lysin, das mit dem Antigen in der Kälte sich verbinden kann, aber ohne Zusatz von Komplement lytisch wirken kann;

b) einen thermolabilen Ambozeptor;

c) einen thermostabilen Ambozeptor.

3) Das Komplement ist sehr komplex und enthält verschiedene Komponenten, die auch verschiedene Affinitäten besitzen. In dieser Arbeit wurden die folgenden Komponenten erkannt:

a) Undifferenziertes Komplement, d. h. Komplement, das allein nicht lytisch wirken kann und auch nicht direkt mit Antigen in Verbindung treten kann.

b) Komplement, das in der Wärme spezifisch lytisch wirkt und in der Kälte mit dem homologen Antigen sich nicht verbinden kann.

c) Komplement, das in der Kälte direkt mit verschiedenen Antigenen sich verbinden kann, d. i. nicht spezifisches, kalt kombinierendes Komplement. Dieses kann lytisch wirken oder nicht (man kann die lytische Kraft nicht immer beweisen).

d) Komplement, das wie c) in der Kälte sich verbinden kann, aber nur mit dem homologen Antigen, d. h. kalt kombinierendes, spezifisches Komplement. Dieses wirkt direkt lytisch in der Wärme.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich (Direktor:
Prof. Dr. Silberschmidt).]

Immunitätsprobleme und Gerinnungsvorgänge.

Mitteilung I.

Von **L. Hirschfeld** und **R. Klinger**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. September 1913.)

Wir haben untersucht, in welchen Beziehungen einige Probleme der Immunitätsforschung zu den Gerinnungsvorgängen stehen. Die speziellen Fragestellungen, welche sich aus dem Studium der Gerinnungsphysiologie ergeben haben, sollen bei den betreffenden Abschnitten besprochen werden.

Eine kurze Uebersicht über das auf diesem Gebiete bereits Bekannte sowie über die allgemeine, dabei befolgte Technik möchten wir den weiteren Ausführungen vorausschicken.

Nach den Arbeiten von Arthus und Paget sind für die Blutgerinnung Ca-Salze notwendig. Nicht dissoziierte Ca-Salze, wie Ca-Citrat, ermöglichen die Gerinnung nicht. Hammarsten fand, daß die Ca-Ionen nur für die Bildung einer das Plasma fällenden Substanz, des Thrombins, erforderlich sind, die eigentliche Fällung, d. h. die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin, auch in einem Ca-freien Medium vor sich geht.

Al. Schmidt stellte fest, daß die Gerinnung des Plasmas durch alkoholische Organextrakte beschleunigt wird und nannte diese gerinnungsfördernden Stoffe zymoplastische Substanzen.

Ein näheres Eindringen in diese Vorgänge ermöglichten dann die bekannten Arbeiten von Morawitz, Fuld und Spiro. Morawitz konnte die Angabe von Schmidt nicht bestätigen, daß aus Organen mit heißem Alkohol Substanzen extrahiert werden, welche gerinnungsbeschleunigend wirken. Dagegen waren wässrige Organextrakte, die eine Fibrinogenlösung allein nicht koagulieren konnten, in Verbindung mit frischem Serum (das an sich auch unwirksam war) imstande, das Fibrinogen zu fällen. Morawitz stellte demnach fest, daß die Bildung des Thrombins (oder Fibrinfermentes) ein komplexer Vorgang ist, und daß dazu, abgesehen von Ca-Ionen, eine im Serum gelöste und eine in den Zellen vorhandene Komponente nötig ist. Die letztere ging nach Morawitz in heißen Alkohol nicht über; bei 56° verloren die Organextrakte ihre Wirkung.

Im Anschluß an die früheren Untersuchungen von Al. Schmidt nahm Morawitz an, daß die in den Organen vorhandene Substanz den

4*

im Serum gelösten Bestandteil aktiviert, faßte sie als Kinase auf und nannte sie Thrombokinase. Die eigentliche Vorstufe des Fibrinfermentes, welche im Serum enthalten ist und ebenfalls thermolabil ist, nannte Morawitz Thrombogen. Diese Bezeichnungen hätten bloß dann ihre Berechtigung, wenn die von Morawitz gemachten Annahmen von der Wirksamkeit der einzelnen Komponenten zu Recht bestünden. Uns schienen die folgenden von Fuld und Spiro eingeführten Bezeichnungen empfehlenswerter, weil ihnen lediglich der Ursprung der betreffenden Substanzen zugrunde liegt, ohne daß eine bestimmte Erklärung ihrer Wirkung darin zum Ausdruck kommt. Diese Autoren nennen den in den Zellen enthaltenen Bestandteil des Thrombins das Cytozym, den im Serum vorhandenen das Serozym.

Nolf benutzt ebenfalls für die im Serum gelöste Komponente den Namen Thrombogen, während er den aus den Zellen stammenden Thrombozym nennt, da es sich nach seiner Ansicht hierbei nicht um einen Stoff handelt, der lediglich in den Zellen angetroffen wird und weil andererseits Organextrakte Substanzen enthalten, die noch auf andere Weise gerinnungsbefördernd wirken (thromboplastisch, d. h. indem sie die Gerinnung beschleunigen, ohne für deren Zustandekommen unbedingt notwendig zu sein).

Jedenfalls sind die Begriffe des Thrombogens (Morawitz, Nolf) und des Serozyms bzw. Plasmozyms (Fuld und Spiro, Bordet und Delange) identisch, ebenso die Begriffe Cytozym, Thrombozym und Thrombokinase. Wir behalten die Bezeichnungen Serozym und Cytozym bei, da sie den bekannten Tatsachen Rechnung tragen, ohne eine bestimmte theoretische Voraussetzung einzuschließen.

Für die Bildung des Thrombins sind demnach drei Substanzen notwendig: das Serozym, das Cytozym und die Ca-Ionen. Hat sich einmal Thrombin gebildet, so bewirkt es auch in Ca-freiem Medium die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin.

Inwieweit es sich bei der Gerinnung um eine Fermentwirkung handelt, ist noch nicht sicher entschieden. Die Art der Beeinflussbarkeit der Gerinnung durch Temperaturen (s. Lansberg) spricht nicht für einen fermentativen Vorgang.

Morawitz erklärt solche Befunde durch eine gleichzeitige Beeinflussung von antagonistischen Faktoren und hält an der Fermentnatur des Thrombins fest¹⁾. Nolf sieht die Gerinnung dagegen mehr als physikalischen Vorgang an und lehnt die Auffassung derselben als fermentativer Prozeß ab. Wir haben auch den Ausdruck „Fibrinferment“ gemieden und das indifferentere Wort „Thrombin“ bevorzugt.

Nach Nolf enthält das Plasma drei Kolloide: Thrombozym, Thrombogen und Fibrinogen, welche durch einen nicht näher bekannten Mechanismus (nach Nolf wahrscheinlich das Antithrombin der Leber) im Gleichgewicht gehalten werden. Wird dieses Gleichgewicht gestört, so

1) Siehe Lansberg.

reagieren diese drei Substanzen **direkt** miteinander, wobei als Folge Fibrin und eventuell Thrombin auftritt. Je nach dem Mischungsverhältnis dieser drei Stoffe enthält das Serum nach der Gerinnung noch freies Thrombin oder nicht. Die Bildung des Thrombins wird als eine der Fibrinentstehung analoge Erscheinung aufgefaßt: beide entstehen durch Verbindung des Thrombozyms, des Thrombogens und des Fibrinogens. Der Unterschied zwischen Thrombin und Fibrin wird von einem verschiedenen Gehalt der Moleküle dieser Substanzen an Fibrinogen abgeleitet. Das Fibrin ist nichts anderes als ein mit Fibrinogen gesättigtes Thrombin, das Thrombin ein mit Fibrinogen nicht gesättigtes Fibrin. Das Thrombin ist nach Nolf ein lösliches Fibrin.

Die Nolf'sche Definition bereitet unserer Ansicht nach dem Verständnis des Gerinnungsvorganges große Schwierigkeiten. Nolf leugnet nicht, daß das Thrombin plasmafällende Eigenschaften hat¹⁾. Es ist uns daher nicht recht verständlich, warum er das Thrombozym und das Thrombogen mit dem Fibrinogen **direkt** reagieren läßt; es scheint uns nicht wahrscheinlich, daß eine Substanz (Thrombin), welche befähigt ist, eine bestimmte Funktion zu erfüllen, nämlich das Plasma zur Gerinnung zu bringen, gerade dort nebensächlich sein sollte, wo es auf diese Funktion ankommt, nämlich bei der Blutgerinnung. Es hat mehr Wahrscheinlichkeit, wie Morawitz und andere Autoren annehmen, daß das durch Verbindung des Thrombozyms (Cytosym) und Thrombogens (Serozym) gebildete Thrombin das Fibrinogen (Plasma) fällt. Faßt man das Thrombin aber nicht als Folge²⁾, sondern als Ursache der Gerinnung auf, so hat die von Nolf gegebene Definition wenig Wert. Man könnte mit demselben Rechte das Präzipitin als ein mit der präzipitablen Substanz nicht gesättigtes Präzipitat auffassen und das Präzipitat als ein mit der präzipitablen Substanz gesättigtes Präzipitin. Wir können uns aber von der Zweckmäßigkeit derartiger Definitionen nicht überzeugen und haben daher unseren weiteren Fragestellungen die Vorstellungen von Morawitz, Fuld und Spiro, Bordet etc. zugrunde gelegt.

An der Nolf'schen Theorie scheint uns die starke Betonung der Tatsache, daß alle Vorstufen des Thrombins im Plasma vorhanden sind und durch einen Hemmungsmechanismus im Gleichgewicht gehalten werden, richtig; diese Möglichkeit wird auch von Morawitz zugegeben.

Wie oben erwähnt, enthalten wässrige Extrakte der Organe wirksames Cytosym. Von den im Kreislauf sich befindenden geformten Elementen sind die Blutplättchen die hauptsächlichsten Cytosymbildner (Bordet und Delange). Fängt man Blut in Oxalat auf und zentrifugiert die Blutkörperchen ab, so ist das Plasma von den noch suspendierten Blutplättchen

1) Erg. d. inn. Med., Bd. 10, p. 293.

2) Daß bei der Gerinnung gleichzeitig eine Neubildung von Thrombin auftritt (Wooldrige, Bordet und Gengou), wollen wir nicht leugnen; dies ließe sich aber durch einen partiellen Wegfall ähnlicher Hemmungsmechanismen erklären, wie wir sie im Serum nachweisen konnten (siehe später).

trübe. Pipettiert man dasselbe ab und zentrifugiert bei hoher Tourenzahl weiter, so erzielt man einen nahezu reinen Bodensatz von Blutplättchen. Diese erweisen sich als vorzügliches Cytozym. Die Leukocyten sind nach Bordet und Delange bei der Gerinnung nur unwesentlich beteiligt. Das von Meerschweinchen gewonnene leukocytenreiche Exsudat gerinnt spontan nur langsam. Blutplättchenzusatz bewirkt eine starke Beschleunigung. Serozym ist daher im Exsudat vorhanden, lediglich die Unwirksamkeit der Leukocyten als Cytozym bedingt die schwache Gerinnbarkeit. Vogelblut enthält keine Blutplättchen und ist daher ungerinnbar, solange es nicht mit Wundflächen (Cytozym aus Muskel etc.) in Berührung kommt. Die Blutplättchen geben in Wasser, besser in konzentrierter Salzlösung ihr Cytozym ab; Bordet und Delange nehmen an, daß dieselben erst bei ihrem Zerfall das Cytozym liefern, das Plasma aber keine gelösten Cytozyme enthält. Oxalatplasma, welches nach ganz sorgfältigem Zentrifugieren rekalkifiziert wird, gerinnt nämlich immer noch, wenn auch merklich langsamer. Die Autoren führen dies auf sehr schwer abzentrifugierbare Blutplättchenreste zurück und stützen diese Erklärung durch folgenden Versuch: Wird das scharf zentrifugierte Plasma mit Aqua 1:10 verdünnt und CO₂ durchgeleitet, so tritt eine Agglutination der Plättchen ein, welche die letzten Reste derselben durch neuerliches Zentrifugieren zu entfernen gestattet. Das auf diese Weise vollständig von Blutplättchen freigemachte Plasma gerinnt spontan nicht mehr, wohl aber auf Zusatz von neuem Cytozym. Die Bordetsche Erklärung, daß die Entfernung der letzten Blutplättchen als Cytozymquelle diese Ungerinnbarkeit erklärt, ist, wie wir später zeigen werden, nicht zwingend; die Versuchsanordnung gestattet nicht zu entscheiden, ob im Plasma gelöstes Cytozym vorhanden ist oder nicht.

Die Frage nach der Natur des Cytozyms scheint sich nach den letzten Arbeiten von Bordet und Delange sowie den gleichzeitig veröffentlichten Untersuchungen von Zack zu klären. Die Angabe von Morawitz, daß das Organcytozym thermolabil ist, wurde von Bordet und Delange nicht bestätigt. Sowohl die aus den Organen wie die aus den Blutplättchen extrahierbaren Cytozyme sind nach Bordet und Delange thermo- und sogar koktostabil. Wir können diese Angaben durchaus bestätigen und haben manchmal sogar gesehen, daß Organextrakte nach dem Kochen wirksamer geworden sind. Die Extrakte dürfen allerdings nicht in konzentrierter Lösung gekocht werden¹⁾. Die erwähnten Autoren stellten außerdem fest, daß das Cytozym ein Lipoid (nach Bordet aus der Gruppe der Lecithine) sei.

Das Cytozym der Blutplättchen ist nach Bordet und Delange mit dem aus Organextrakten darstellbaren identisch.

1) Vielleicht erklären sich dadurch manche widersprechende Befunde über die Koktostabilität der Extrakte. Die Frage nach der Ursache der Toxizität der gekochten Organextrakte bleibt durch diese Feststellung unberührt, da die meisten Autoren wohl ein und denselben Extrakt auf Toxizität und Gerinnungsbeschleunigung geprüft haben.

Man hat noch eine andere Art von gerinnungsbeschleunigenden Substanzen nachgewiesen. Gewinnt man Pferdeplasma bei niedriger Temperatur, läßt die zelligen Elemente in der Kälte sich absetzen und pipettiert das Plasma ab, so gerinnt es spontan erst nach Stunden oder Tagen; setzt man aber diesem so gewonnenen Plasma pulverige Substanzen (Glaspulver, Kaolin) zu, so gerinnt es sehr schnell. Der nähere Mechanismus dieser Wirkung war bis jetzt noch nicht geklärt.

Daß die Unebenheit der Oberfläche bei der Gerinnung eine große Rolle spielt, war schon seit den ersten Untersuchungen von Bordet und Gengou bekannt: Das in paraffinierten Gefäßen aufgefangene Blut gerinnt außerordentlich langsam im Vergleich zu dem in einfachen Glasgefäßen aufgenommenen.

Einzelne Autoren (Hower und Bettger) gingen so weit, daß sie den spezifischen, gerinnungsfördernden Einfluß der Organextrakte überhaupt leugneten und mit der Wirkung der Pulver identifizierten. Nolf faßt die gesamten Faktoren, welche eine Gerinnung beschleunigen, ohne für deren Eintreten unbedingt notwendig zu sein, als thromboplastische Substanzen zusammen und nimmt an, daß auch in Organextrakten derartig wirkende Stoffe ebenfalls enthalten sind.

Das durch gewöhnliche Gerinnung des Säugetierblutes enthaltene Serum enthält relativ viel Thrombin, während Serum aus dem durch Zentrifugieren zellfrei gemachten Plasma arm an Thrombin ist.

Das Thrombin schwächt sich außerordentlich schnell ab. Ein Teil desselben geht in eine unwirksame Modifikation über, in das Metathrombin, aus welcher es, wie A. I. Schmidt fand, wieder in Freiheit gesetzt werden kann. Das von Schmidt benutzte Verfahren beruht darauf, daß das Pferdeserum mit gleichem Volumen einer n. NaOH versetzt und nach $\frac{1}{2}$ Stunde neutralisiert wird.

Die Gerinnung beruht demnach auf zwei Vorgängen:

- A. der Thrombinbildung (Fibrinfermentbildung),
- B. der Fibrinogenfällung, d. h. der eigentlichen Gerinnung.

A. Das Thrombin wird unter Mitwirkung folgender Substanzen gebildet:

- I. Das Cytozym [Cytozym (Fuld und Spiro), Thrombokinese (Morawitz), Thrombozym (Nolf) sind identische Begriffe] ist eine hauptsächlich in den Zellen vorhandene thermostabile Substanz. Es handelt sich wahrscheinlich um ein Lipoid aus der Gruppe der Lecithine (Bordet und Delange, Zack).
- II. Das Serozym [Serozym (Fuld und Spiro), Thrombogen (Morawitz, Nolf) sind identische Be-

griffe] ist eine im Serum vorhandene thermolabile Substanz.

III. Die Ca-Ionen.

B. Das Thrombin (Fibrinferment) fällt das Plasma (Fibrinogen) auch im Ca-freien (Oxalat-)Medium.

Diese kurze historische Einleitung dürfte für das Verständnis der Technik und der im folgenden genauer zu besprechenden Fragestellungen genügen.

Technik.

Soll eine Substanz auf die Eigenschaft, als Cytosym zu wirken, untersucht werden, so ist eine möglichst reine (cytozymarme) Serozymlösung erforderlich; umgekehrt wird die Prüfung eines Serums, Plasmas etc., auf Serozymgehalt durch Zusatz einer reinen Cytosymlösung oder Suspension vorgenommen. Der Ca-Gehalt des Milieus, in welchem die Reaktionen vorgenommen werden, ist dabei von größter Bedeutung.

Wir haben im Laufe unserer Arbeit für die Gewinnung der soeben angeführten Stoffe gewisse technische Details ausgebildet. Wir geben im folgenden unser Vorgehen genau wieder:

1) Fibrinogenlösung. Als Fibrinogenquelle haben wir ausschließlich das auch von Bordet und Delange empfohlene Oxalatplasma benutzt, welches wir der reinen Fibrinogenlösung nach Hammarsten vorziehen. Blut irgendeiner Tierart wird in 1-proz. Na-Oxalatlösung im Verhältnis von 9:1 aufgefangen (so daß der schließliche Gehalt des Blutes an Oxalat 1 pro Mille beträgt). Bei der Entnahme des Blutes muß so vorgegangen werden, daß die Thrombinentstehung möglichst vermieden wird. Man muß darauf achten, daß das Blut nicht am Glas fließt, sondern direkt im Oxalat aufgefangen wird. Eine Paraffinierung des Glases ist meist unnötig. Ist das Blut einmal mit dem Oxalat vermischt, so hindert die Abwesenheit der Ca-Ionen jede weitere Bildung von Thrombin. Das durch Abzentrifugieren der Blutkörperchen erhaltene „Oxalatplasma“ stellt eine stabile fibrinogenreiche Flüssigkeit dar, die vor Gebrauch mit dem 4-fachen Volumen einer 2 pro Mille Oxalat enthaltenden physiologischen Kochsalzlösung verdünnt wird (32,0 ccm physiologischer NaCl-Lösung mit 8,0 ccm einer 1-proz. Na-Oxalatlösung gemischt und hierzu 10 ccm Oxalatplasma gegeben). In der Regel haben wir 1 ccm dieser Verdünnung zu der auf Thrombin zu prüfenden Lösung zugesetzt. Wir benutzten Plasma von einer Ziege. Doch sind Plasmen anderer Tiere (Kaninchen, Hund, Mensch etc.) ebenso brauchbar. Setzt man solches Plasma zu einer thrombinhaltigen Lösung, so tritt je nach der vorhandenen Thrombinmenge nach einigen Minuten bis Stunden eine Gerinnung und führt entweder zu einem Erstarren der Gesamtmasse oder zu minder vollkommener Koagulation; geringe Mengen von Thrombin bringen bloß fädig-netzige Gerinnung oder bloß einige Fibrinfetzen zustande. Der leichteste Grad der Gerinnung

ist eine Agglutination der in der Flüssigkeit eventuell vorhandenen festen Teilchen (Oxalatkristalle u. dgl.). Ist kein Thrombin in der zu prüfenden Lösung vorhanden, so bleibt das Oxalatplasma vollkommen ungeronnen. Die Schnelligkeit und Stärke der beobachteten Gerinnung ist der Maßstab für die Menge des an der Reaktion beteiligten Thrombins. Bei den Versuchen ist danach zu trachten, daß die erhaltenen Gerinnungszeiten weder zu klein noch zu groß sind. Erfolgt die Gerinnung in einer Versuchsserie sehr schnell (1–5 Minuten), so treten eventuell vorhandene Unterschiede im Thrombingehalt einzelner Röhrchen nicht deutlich zutage; bei zu langsamer Gerinnung (1–3 Stunden) kann umgekehrt eine nur unbedeutende Differenz im Thrombingehalt größere Gerinnungsintervalle bedingen und muß daher vorsichtiger bewertet werden. Im allgemeinen hat eine beobachtete Gerinnungsdifferenz zwischen zwei Röhrchen um so mehr Bedeutung, je rascher nach dem Zusatz des Oxalatplasmas die Gerinnung auftrat. Die günstigsten Versuchszeiten liegen zwischen 5 und 60 Minuten.

2) Serozym. Zur Gewinnung guten Serozyms benutzten wir hauptsächlich Hammelblut, welches mit dickerer Kanüle aus der gestauten Halsvene im Strahl entnommen und ebenso wie Oxalatplasma in 1-proz. Na-Oxalatlösung im Verhältnis 9:1 aufgefangen wird. Das Gefäß braucht nicht paraffiniert zu werden¹⁾, wofür durch die Art der Entnahme (schnelles Fließen des Blutes, Auffangen direkt im Oxalat unter Vermeidung der Glaswand, Nichtbenutzung des ersten Blutstrahles, leichtes Schütteln des weithalsigen Gefäßes, um eine rasche Entkalkung des Blutes zu erzielen etc.) dafür gesorgt wird, daß Fibrinferment nicht vor der Mischung des Blutes mit dem Oxalat entstehen kann. Das so erhaltene ungerinnbare Blut wird gut (am besten 2mal) zentrifugiert, das Plasma, welches Oxalat im Ueberschuß enthält, sauber abpipettiert und steril im Eisschrank aufbewahrt.

Um daraus das Serozym zu gewinnen, wird mit $\frac{1}{10}$ – $\frac{1}{8}$ Volumen einer 1-proz. CaCl-Lösung versetzt und durchmischt. Das Oxalat fällt als starke Trübung aus und das Plasma erhält seinen Ueberschuß von Ca-Ionen wieder; es wird in den Brutschrank gestellt, wo es je nach der Art und Frische des Plasmas nach 5–30 Minuten gerinnt. Ist die ganze Masse fest koaguliert, so wird mit einer langen Pinzette das elastische Koagulum gefaßt und durch Drehen und Pressen das Serum ausgedrückt und das Fibringerinnsel entfernt. Der ganze Ca-Niederschlag ist im Fibrin eingeschlossen, das Serum muß vollständig klar sein. Manchmal tritt nach einiger Zeit eine Nachgerinnung auf, namentlich dann, wenn zu früh defibriniert wurde oder wenn das Plasma nach der Rekalzifizierung nur wenig Fibrinferment bildete (längere Zeit aufbewahrtes Plasma) und daher nur langsam geronnen ist. Gelegentlich können derartige Nachgerinnungen sich fünf- und mehrmal wiederholen; die späteren Gerinnungen sind zarter als

1) Bei Verwendung von Kaninchen-(Carotis-)blut empfiehlt es sich, paraffinierte Gefäße zu benutzen. — Bei Benützung von Hammelblut können die abzentrifugierten Blutkörperchen nach Waschen zu hämolytischen Versuchen (Wassermannsche Reaktion etc.) verwendet werden. Dem ersten Waschwasser muß etwas Na-Oxalat zugesetzt werden.

die vorhergehenden, aber doch fast immer totale. Auch diese werden mit der Pinzette entfernt; Plasmen, welche wiederholt nachgerinnen, liefern in der Regel kein brauchbares Serozym mehr. Unmittelbar nach dem Auspressen enthält das Serum noch größere Mengen Thrombin und wird daher zweckmäßig mindestens $\frac{1}{2}$ Stunde in den Brutschrank gestellt, wodurch der Thrombiningehalt rasch abnimmt. So gewonnenes Hammelserum enthält nur Spuren von Cytozym. es darf kein Fibrinogen mehr enthalten (bei Cytozymzusatz spontan gerinnen), es ist daher eine vom praktischen Standpunkte aus reine Serozymlösung und wird in unserer Arbeit stets einfach als „Serozym“ bezeichnet. „Serozym“ ist demnach ein aus Oxalatplasma des Hammels gewonnenes Serum.

Der Serozymgehalt des Blutes ist bei verschiedenen Tieren ungleich groß. Als wir unsere Untersuchungen begannen, hatten wir zufällig ein Schaf, welches so reichlich Serozym in seinem Blut enthielt, daß das nach Defibrinieren mit Stahlspänen gewonnene Serum stets noch gut als Serozym verwendet werden konnte. Als wir dieses Tier gegen zwei neue umtauschten, mußten wir die oben geschilderte Technik der reinen Serozymdarstellung anwenden, da das aus Blut direkt gewonnene Serum unbrauchbar war. Das nicht im Ueberschuß vorhandene Serozym dieser Tiere wurde bei der spontanen Gerinnung unter Thrombinbildung verbraucht; erst wenn durch Auffangen in Oxalat und gutes Abzentrifugieren der Zellen eine stärkere Cytozyymbildung im Plasma vermieden wird, bleibt nach der Gerinnung noch genug Serozym unverbraucht, um eine Verwendung des Serums zu gestatten.

Neben Hammel lieferte uns auch eine Ziege gutes Serozym. Kaninchenseroyum ist ebenfalls brauchbar, hält sich aber schlechter und ist natürlich teurer.

Die Haltbarkeit des als Serozymquelle dienenden Hammeloxalatplasmas ist eine begrenzte; sie schwankt von einer Entnahme zur anderen und ist auch individuell verschieden. Der erste serozyymreiche Hammel lieferte uns ein Serum, das öfters noch nach 14-tägigem Verweilen im Eisschrank gut verwendbar war. Bei den späteren Tieren war die Haltbarkeit des unter allen Kautelen gewonnenen Plasmas viel geringer; häufig zeigte sich schon nach 2—3 Tagen eine so starke Abnahme des Serozymgehaltes, daß die Versuche unscharf werden, weshalb wir frisches Serozym bevorzugten.

3) Cytozym. Wir haben zuerst wässrige Extrakte fein zerriebener Meerschweinchenleber benutzt, wie man sie nach kurzem Digerieren und folgendem scharfen Zentrifugieren gewinnen kann. Auch die von Bordet angegebenen Blutplättchenextrakte erwiesen sich als gut brauchbares, starkes Cytozym. Später stellten wir uns alkoholische und Acetonextrakte aus Hundeleber her, welche in 20-facher Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung ein vorzügliches Cytozym geben.

Darstellung der Blutplättchen: Kaninchenblut wird in Oxalat und paraffinierten Gefäßen aus der Carotis aufgefangen (Bordet), zuerst kurz 5—10 Minuten zentrifugiert, das trübe (aber erythrocytenfreie) Plasma noch 2—3 Stunden bei 3000 Umdrehungen oder 1 Stunde bei 8000 Umdrehungen

weiter zentrifugieren. Bodensatz besteht fast nur aus Blutplättchen. Aufschwemmen in einigen Kubikzentimetern hypertonischer NaCl-Lösung (Bordet) oder Aq. dest. Nach einigen Stunden wird abermals scharf zentrifugiert. Der klare Abguß kann durch Hitze sterilisiert werden.

Darstellung des alkoholischen Extraktes: 1 Gewichtsteil fein zeriebener frischer Leber (wir benutzten Hundeleber), 4 Volumteile Alkohol (96-proz.) oder Aceton ca. 10 Tage digerieren. Filtrieren. Vor dem Gebrauch wird der Extrakt 1:20 mit physiol. NaCl verdünnt.

4) Ca-Salze. Ein geringer Zusatz von CaCl_2 zu der für die Aufschwemmung. Verdünnung etc. verwendeten physiologischen NaCl-Lösung fördert deutlich die Bildung von Thrombin in einer Mischung von Serozym und Cytozym, und trägt dazu bei, daß die Versuchsergebnisse klarer und präziser werden. Wir haben in der Regel eine Salzlösung verwendet, welche neben 0,9 Proz. Kochsalz 0,05 Proz. CaCl_2 enthält, also 5 ccm einer 1-proz. CaCl_2 -Lösung auf 100 physiologischer NaCl-Lösung. Mit dem Ca-Gehalt höher zu gehen, ist unratsam, da die Endreaktion (Fibrinogenzusatz) stets im Ueberschuß von Oxalat vor sich gehen muß; es darf das dazu verwendete Oxalatplasma nicht durch zu viel Ca-Salze zur spontanen Gerinnung kommen.

In der Literatur findet man manchmal die Angabe, daß das Blut der Säugetiere meist unter einem Ueberschuß von Serozym gerinnt, so daß das gesamte im Blute vorhandene Cytozym verbraucht wurde und das Serum noch als Serozym zu wirken imstande ist. Wir haben im Verlaufe unserer Untersuchungen eine große Anzahl von Seren quantitativ untersucht und können mit Sicherheit sagen, daß der Gehalt an diesen Bestandteilen bei verschiedenen Seren zwar stark schwankt, daß aber die meisten durch spontane Gerinnung gewonnenen Sera einen Ueberschuß an Cytozym enthalten. Am regelmäßigsten fanden wir unter den von uns untersuchten Seren das Hammelserum cytozymarm oder -frei, und wir haben deshalb für unsere sämtlichen Versuche Hammelserum als Serozymquelle benutzt. Im allgemeinen kann man aber sagen, daß die Eigenschaft der Sera, mit Serozym- oder Cytozymüberschuß zu gerinnen, nicht an die Art, nicht einmal an das Individuum gebunden ist; untersucht man wiederholt das Blut desselben Individuums, so enthält das Serum bald viel, bald wenig Cytozym resp. Serozym. Auch das sorgfältig aus der Carotis entnommene Blut liefert nach spontaner Gerinnung oft cytozymhaltiges Serum.

Das aus Oxalatplasma gewonnene Serum (Oxalatserum) ist, wie erwähnt, fast immer serozymreicher und cytozymärmer.

Wird der Zellzerfall gesteigert, indem man das Blut in destilliertem Wasser oder in konzentrierter Salzlösung aufhängt (das Blut gibt in konzentrierter Salzlösung stets etwas rotgefärbtes Serum), so ist natürlich auch der Cytozymcharakter des Serums verstärkt.

Wir sprechen von „Serum“, wenn es sich um das bei gewöhnlicher Gerinnung abgesetzte Serum handelt. Unter „Oxalatserum“ verstehen wir das aus dem Oxalatplasma durch Rekalzifizieren gewonnene Serum, unter „NaCl-Serum“ ein Serum, welches aus einem mit konzentrierter NaCl-Lösung aufgefangenen Plasma durch Verdünnung mit Aqua dest. gewonnen wurde etc.

Wir haben uns gefragt, ob analog der Komplementtätigkeit auch die Gerinnungsvorgänge an die beiden Komponenten des Serums — an die Globuline und Albumine — gebunden sind. Diese Frage drängte sich namentlich in Rücksicht auf die Analogien zwischen Komplement und Serozym auf.

Die Spaltung wurde teils durch Dialyse bewerkstelligt, teils nach Liefmann (Verdünnung des Serums in Aq. dest. 1 : 10, Durchleiten [10 Minuten lang] von CO_2), sowie nach Sachs-Altmann (Verdünnung des Serums mit $n/_{100}$ HCl, nach 1 Stunde werden die Globuline abzentrifugiert und in NaCl aufgeschwemmt, die Albumine neutralisiert und isotonisch gemacht). Die Albumine haben wir vor der Prüfung gewöhnlich noch mit CaCl_2 versetzt (auf 10 ccm 0,5 einer 1-proz. Lösung). Die Globuline wurden in einer dem Serumvolum entsprechenden physiol. NaCl-Menge aufgeschwemmt, davon 0,2 ccm geprüft. Ergänzt wurden die Röhrchen auf 2 ccm mit unserer CaCl_2 NaCl-Lösung (100 Teile 0,85-proz. NaCl + 5 Teile 1-proz. CaCl_2).

Als Serozym verwendeten wir Hammelserum, als Plasma meistens Ziege. Die übrige Technik geht aus unserer Einleitung hervor. Einzelheiten sind in den Protokollen berücksichtigt.

Wir haben die Globuline, die Albumine, sowie die Mischung derselben auf ihren Cytozym- bzw. Serozymcharakter geprüft und mit demjenigen des ungespaltenen Serums verglichen.

Die Versuche zeigten, daß das Cytozym in der Regel mit den Globulinen gefällt wird. Der Cytozymcharakter der Globuline ist dabei meist stärker als derjenige des zugehörigen ungespaltenen Serums. Die Differenzen sind manchmal recht beträchtlich, manchmal geringer.

Im Protokoll 1 fällt das Serum mit Serozym nach 22 Minuten, die Globuline nach 5 Minuten.

Im Versuch 2 fällt das Serum ungespalten nach 75 Minuten, die Globuline nach 10 Minuten. Aehnlich in Versuch 3 etc.

Bei genauerer Durchsicht unserer Protokolle ergeben sich alle möglichen Abstufungen.

Die Albumine enthalten ein viel schwächeres, meist sogar überhaupt kein Cytozym (Protokoll 1: Globuline bewirken Gerinnung in 5 Minuten, Albumine in 75 Minuten; Protokoll 2: Globuline 10—30 Minuten, Albumine flüssig etc.).

Bloß in einzelnen Fällen haben sich auch die Albumine als wirksam erwiesen.

Interessant ist es nun, daß die Albumine den Cytozymcharakter der Globuline oft hemmen.

In Versuch 5b fällt die Globulin-Serozymmischung nach 7 Minuten, die Mischung der Albumine + Globuline + Serozym erst nach 40 Minuten. In Versuch 1 bringen 0.1 ccm Globuline aus gewöhnlichem Serum mit Serozym das Plasma in 5 Minuten zur Gerinnung. Dieselben Globuline mit 1 ccm Albumine (= 0,1 Serum) nach 15 Minuten. Aehnliches ergeben die Versuche 6, 8, 9, 10, 13. Diese gerinnungshemmende Eigenschaft der Albumine ist in anderen Fällen nicht ausgesprochen, ja man findet manchmal eine stark beschleunigte Gerinnung durch Albuminzusatz. So zeigen in den Versuchen 1, 4, 14 die Oxalatseren, daß der Albuminteil die Bildung des Thrombins beschleunigen kann.

Wir haben nicht auffinden können, warum die Albumine bald fördernd, bald hemmend auf die Globuline wirken. Es scheint sich jedenfalls um eine Wirkung zu handeln, die je nach den quantitativen Spaltungsverhältnissen einmal von den Albuminen ausgeübt wird, das andere Mal nicht. Wir möchten diesbezüglich auf Protokoll 8 hinweisen:

Oxalatserum vom Mensch, je $1\frac{1}{2}$ ccm, wurde mit 10,0, 12,5, 15,0 ccm n_{300} HCl versetzt, die Globuline gefällt und nach Trennung auf Cytozym und Serozym geprüft.

Wurde mit 10,0 und 12,5 ccm HCl gespalten, so haben die Albumine gehemmt, bei 15 ccm Spaltung haben sie ihre hemmende Funktion ganz eingebüßt.

Die Trennung der fördernden von den hemmenden Faktoren hängt somit, abgesehen von dem jeweiligen Zustand (Alter des Serums, seiner Menge an Cytozym etc.), hauptsächlich von den bei der Spaltung angewandten Mengenverhältnissen ab.

Setzt man zum Plasma Blutplättchenextrakte, die sicher zellfrei sind (Digerieren der Blutplättchen durch einige Stunden in Wasser, Kochen einige Minuten und Zentrifugieren längere Zeit bei 8000 Umdrehungen), so tritt die Gerinnung des Plasmas schneller ein. Das erhaltene Serum ist cytozymreicher als das ohne Zusatz erhaltene.

So fällt das ungespaltene Oxalatserum mit Hammelserozym in Versuch 7 nach 35 Minuten, das gleiche nach Blutplättchenzusatz geronnene Plasma gab ein (mit Hammelserozym) nach 4 Minuten fällendes Serum. Die Globulinröhrchen aus den betreffenden Seren sind nach 10 Minuten resp. $1\frac{1}{2}$ Minuten geronnen. Während die Albumine des Oxalatserums immerhin noch so viel Cytozym enthielten, daß auf Serozymzusatz nach 45 Minuten Gerinnung eintrat, haben die Albumine des mit Blutplättchen versetzten Serums erst über Nacht koaguliert. Die Blutplättchenextraktivstoffe sind nicht nur quantitativ in die Globuline übergegangen, sie haben auch die Fällbarkeit des Serums so verändert, daß die Trennung in cytozymhaltige Globuline und cytozymfreie Albumine eine vollständigere geworden ist.

Die Befunde, daß das Cytozym mit den Globulinen gefällt wird, erklären die von uns vorhin (p. 54) erwähnte Beobachtung von Bordet und Delange. Die Autoren haben die Blutplättchen dadurch eliminiert, daß sie durch das 10-fach verdünnte Plasma CO_2 leiteten und den Niederschlag abzentrifugierten. Durch diese CO_2 -Durchleitung werden aber auch die Globuline gefällt. Wir konnten zeigen (s. oben), daß auch sicher zellfreie Plättchenextrakte mit den Globulinen gefällt werden. Es darf die Deutung erlaubt sein, daß auch der Versuch von Bordet und Delange auf Entfernung von (gelöstem) Cytozym mit den Globulinen zurückzuführen ist. Das Versuchsergebnis beweist somit nicht, daß nur korpuskuläre Elemente als Cytozymquelle in Betracht kommen. (Wir wollen damit natürlich nicht die Frage entscheiden, ob im zirkulierenden Plasma genügend Cytozym in Lösung vorhanden ist, um die Gerinnung unabhängig vom Plättchenzerfall zu bewirken.)

Von Interesse ist folgende Beobachtung, welche sich bei diesen Versuchen ergab. Es stellte sich heraus, daß man durch Spaltung im Serum eine Neubildung von Thrombin veranlassen kann. Auch hier erweisen sich die Albumine einmal verstärkend, einmal hemmend. Die

einzelnen Protokolle illustrieren diese Verhältnisse. Wir haben eine Anzahl von Seren und Oxalatseren gespalten, zum Teil mit verschiedenen Salzsäuremengen, die betreffenden Albumine, Globuline und ihre Mischung mit und ohne Serozym auf Thrombinbildung untersucht.

Das Serum wurde in der Menge von 1,5 mit den in den einzelnen Protokollen angegebenen Mengen von $n/_{100}$ HCl versetzt, die Spaltung bei Zimmertemperatur vor sich gehen gelassen, die Globuline nach 1 Stunde abzentrifugiert, in physiologischer NaCl-Lösung (1,5 ccm) gelöst und davon 0,2 = 0,2 Serum verwendet. Die Albumine wurden mit einer 10-proz. NaCl-Lösung mit $n/_{30}$ NaOH-Gehalt isotonisch gemacht und neutralisiert und durch Ca-Zusatz auf 0,5 Prom. CaCl_2 gebracht. Falls wir Sera durch verschiedene Salzsäuremengen gespalten hatten, wurden die Albumine auf das gleiche Volumen von 15 ccm aufgefüllt. Die Globuline (0,2 ccm) wurden mit Albuminen (1,5 ccm) versetzt, alle Röhrchen mit Ca-NaCl-Lösung auf 2 ccm Gesamtvolumen gebracht. Die Mischung der Albumine und Globuline blieb vor dem Serozymzusatz noch 15 Minuten stehen. In Versuchen, wo Albumine oder Globuline ohne Serozym auf Thrombinbildung geprüft wurden, haben wir meist 20 Minuten bis zum Oxalatsplasmazusatz gewartet. Die Prüfung des entsprechenden ungespaltenen Serums geschah stets gleichzeitig unter den gleichen Versuchsbedingungen.

Die Protokolle 4, 5, 5a, 7, 8, 9, 10, 14 zeigen dieses Verhalten in sehr deutlicher Weise. In Versuch 5a enthielt weder das Serum noch das Oxalatserum Thrombin. Nach der Spaltung haben die aus Oxalatserum gewonnenen Globuline schon nach $6\frac{1}{2}$ Minuten ohne Serozymzusatz das Fibrinogen zur Gerinnung gebracht. Die Albumine bildeten allein kein Thrombin, hemmten aber stark die Thrombinbildung der Globuline (die Mischung gerinnt nach 120 Minuten). Aehnliches demonstrieren die Versuche 8, 9, 14.

Wir haben eine große Anzahl ähnlicher Versuche angesetzt und den gleichen Befund sehr oft festgestellt. Auch hierbei ergab sich die Wichtigkeit bestimmter quantitativer Verhältnisse bei der Spaltung.

Der Versuch 9 demonstriert die hier obwaltenden Beziehungen. Das Oxalatserum wurde in 10, 12,5, 15 ccm $n/_{300}$ HCl gespalten. Ungespalten enthielt es kein Thrombin. Die mit 10 ccm $n/_{100}$ HCl gewonnenen Globuline fällten nach 240 Minuten, die mit 12,5 ccm nach 90 Minuten, die mit 15 ccm nach 30 Minuten. Das zugehörige „Serum“ zeigte ähnliche, wenn auch weniger ausgesprochene Verhältnisse.

Aehnliches ergibt Protokoll 10: Serum wird mit 10 ccm gespalten — die Albumine hemmen. In 15 ccm gespalten — deutliche Beschleunigung.

Ein anderes Menschenserum Ha. in Versuch 8 zeigt die gleiche Abhängigkeit von den Mengenverhältnissen, nur in anderer Richtung. Die in 10 und 12,5 ccm gewonnenen Globuline fällen nach 22 Minuten, die

in 15 ccm nach 30 Minuten. Die hemmende Eigenschaft der Albumine nahm mit steigender Verdünnung zu: 10 ccm 120 Minuten, 12,5 ccm 180 Minuten, 15 ccm 250 Minuten netzig.

Die Protokolle zeigen, daß durch die Spaltung des Serums die in demselben nachweisbaren Thrombinmengen meistens zunehmen. Manchmal bedingte das Serum selbst (ungespalten) keine Gerinnung, während die Globuline oder Globuline + Albumine ein starkes Thrombin enthalten.

Eine Beschleunigung der Fällung durch Albumine zeigen die Protokolle 4, 5, 7 (mit Plättchen), 10, 11, 15. Von Interesse ist der Versuch 5. Am Vormittag haben die Albumine des Serums die Gerinnung beschleunigt, ein 3 Stunden später angesetzter Versuch ergab eine Hemmung. Die hemmende Eigenschaft der Albumine scheint demnach beim Stehen des Serums zuzunehmen.

Es fragt sich, ob die Globuline ein fertiges Thrombin absorbieren, dessen Wirkung durch die Spaltung verstärkt resp. erst ermöglicht wird, oder ob die Globuline aus sich heraus Thrombin gebildet haben. Ob es sich um die Wirkung eines fertigen Thrombins oder um seine Entstehung handelt, läßt sich auf folgende Weise prüfen: ist fertiges Thrombin vorhanden, so ist die Ca-Entziehung (Oxalatzusatz) für die Gerinnung ohne Bedeutung. Bleibt dagegen die Gerinnung des zugesetzten Plasmas nach Ca-Entziehung aus, so ist zu schließen, daß nur die beiden Komponenten — das Serozym und Cytoszym — vorhanden waren, die das Thrombin erst (unter Mitwirkung der Ca-Ionen) bilden. Wir haben daher die Globuline sowohl in CaNaCl-Lösung wie im Oxalatmedium auf Thrombingehalt geprüft. Die Versuche ergaben, daß im Oxalatmedium in den Globulinen kein Thrombin nachweisbar war. Das Thrombin wird demnach nicht mit den Globulinen mitgerissen, sondern durch die Globuline gebildet, auch wenn das Serum vor der Spaltung kein Thrombin mehr enthielt.

Die Tatsache, daß durch bestimmte Mittel das im Serum nachweisbare Thrombin vermehrt resp. erst zum Vorschein gebracht werden kann, ist an sich nicht neu. A. Schmidt gelang es, das Thrombin aus einem unwirksamen Serum dadurch zu restituieren, daß er das Serum mit NaOH versetzte und nach $\frac{1}{2}$ -stündiger Einwirkung wieder neutralisierte.

Morawitz glaubt, daß das Thrombin in eine unwirksame Modifikation, das Metathrombin, dadurch übergeht, daß es an die Eiweißkörper des Serums gebunden wird, und daß das Thrombin durch den erwähnten Eingriff daraus wiedergewonnen werden kann. Pekelharing teilte Versuche mit, wonach älteres Serum die Thrombinwirkung eines frischen hemmt; er nimmt an, daß es sich nicht um eine Umwandlung des Thrombins, sondern um eine gegen dessen fallende Wirkung gerichtete hemmende Substanz handelt. Er stützte noch diese Annahme durch die Beobachtung, daß ein unwirksames Serum durch Dialyse seine Thrombinwirkung wieder partiell erlangen kann. Die hemmenden Substanzen wären demnach nach Pekelharing dialysabel.

Wir sind bei den von uns beobachteten Phänomenen zu einer anderen Anschauung gekommen. Zunächst stellen wir fest, daß es sich bei der von uns beobachteten Zunahme der Thrombinwirkung eines Serums nach Spaltung nicht um die Entfernung einer hemmenden Substanz durch Dialyse handeln kann. Wir haben die Globuline nicht nur durch Dialyse, sondern auch durch Verdünnung mit angesäuertem Wasser dargestellt, dieselben nach der Lösung mit den so verdünnten und aufgesalzenen Albuminen wieder zusammengemischt und haben bei geeigneten Spaltungs- und Mischungsverhältnissen gesehen, daß die Mischung mehr Thrombin enthielt als das ungespaltene Serum, obwohl wir weder etwas Neues hinzugesetzt noch hinausdialysiert hatten. Es kann sich auch nicht um Hemmungen gegenüber fertigem Thrombin handeln. In Fällen, wo die Globuline allein sich als thrombinhaltig erweisen, genügt es, wie erwähnt, dieselben im Oxalat aufzuschwemmen, um den Thrombinnachweis zu verhindern. Da nur die Thrombinentstehung der Ca-Ionen bedarf, nicht aber die Thrombinwirkung, so muß aus diesen wiederholt gemachten Versuchen geschlossen werden, daß eine Thrombinneubildung vorliegt, welche im Serum gehemmt worden war; der hierbei wirksame Hemmungsmechanismus wird durch Spaltung aufgehoben. Unsere Protokolle zeigen, daß diese Neubildung durch die Albumine manchmal gehemmt, manchmal beschleunigt, in anderen Fällen auch nicht beeinflußt wird.

In der Immunitätsforschung sind solche Tatsachen nicht neu. Auf sie hat unseres Wissens zuerst Friedemann in einer grundlegenden Arbeit aufmerksam gemacht.

Friedemann fand bei seinen Untersuchungen über die antikomplementäre Wirkung, welche Globulin- und Albuminfraktion verschiedener Sera einzeln oder gemischt aufweisen, daß die zur Fällung angewandte Salzkonzentration eine große Rolle spielt. Je nachdem die Globuline durch $\frac{1}{2}$ oder $\frac{1}{3}$ Sättigung mit NH_4SO_4 von den Albuminen getrennt wurden, waren die Eigenschaften der Spaltungsprodukte des Serums in bezug auf Komplementbindung wesentlich andere. So gaben die Globuline vieler Sera ohne Leberextrakt eine Komplementbindung nur dann, wenn sie durch $\frac{1}{3}$, nicht wenn sie durch $\frac{1}{2}$ Sättigung ausgefällt worden waren („Euglobuline“); ganz ähnlich zeigten sich die Albumine, welche die antikomplementäre Wirkung der Globuline mehr oder weniger aufzuheben vermögen, hierzu weit geeigneter, wenn sie durch $\frac{1}{3}$ Sättigung dargestellt waren („Pseudoalbumine“).

Die von Friedemann beobachtete, so auffallende Beeinflussung der Globuline durch die Albumine desselben oder eines anderen Serums hat mit den von uns beschriebenen, auf Cytozym- und Serozymgehalt der Fraktionen zurückgeführten Beziehungen weitgehende Aehnlichkeiten. Hier wie dort entfalten die Globuline Wirkungen, die dem ungespaltenen Serum nicht zukommen, während die Albumine antagonistisch wirken können. Die Verschiedenheit im Verhalten der einzelnen Komponenten je nach der Menge des Fällungsmittels ist auch bei unseren Untersuchungen deutlich. Die Trennung in zwei entgegengesetzt reagierende Teile gelang Friedemann nicht bei allen Seren, was er darauf zurückführte, daß ein Teil der antagonistischen Albumine in solchen Fällen auch bei $\frac{1}{3}$ Sättigung bereits mit den Globulinen ausfalle.

Es besteht ein physiologischer Antagonismus zwischen den Albuminen und Globulinen des Serums; dieser Antagonismus hängt auch davon ab, in welcher Konzentration die Substanzen aufeinander einwirken. So geben nach Friedemann die Globuline mancher negativer Menschensera oft eine positive Wassermannsche Reaktion, welche durch Zusatz unverdünnter Albumine aufgehoben wird. Verdünnt man dagegen die Substanzen und läßt sie in verdünntem Zustande aufeinander einwirken, so bleibt die posi-

tive Reaktion der Globuline erhalten; das so restituierte Serum reagiert positiv.

Inwieweit in jedem einzelnen Falle die antikomplementären Wirkungen mit solchen, die bei der Thrombinbildung in Betracht kommen, identisch sind, können wir noch nicht sagen. Hierzu sind gleichzeitige Untersuchungen desselben Serums nach beiden Richtungen hin erforderlich, die wir in Angriff genommen haben. (Wie aus den Protokollen ersichtlich, sind Oxalatseren für die Thrombinneubildung besonders geeignet.)

Wir möchten auf Grund dieser Analogien annehmen, daß die Thrombinneubildung, welche durch die mit den Globulinen fällbaren Substanzen bewirkt werden kann, durch einen ähnlichen Antagonismus der Albumine gehemmt wird. Die durch Spaltung gewonnenen, in verdünntem Zustande zugesetzten Albumine können die Thrombinbildung der Globuline nicht in dem Maße abschwächen, wie sie es unverdünnt im Serum vermögen¹⁾.

Die erwähnten Analogien deuten zweifellos auf einen inneren Zusammenhang zwischen den Gerinnungs- und Immunitätsreaktionen. Von besonderem Interesse dürften solche Untersuchungen bei Patienten mit positiver Wassermannscher Reaktion sein, bei welchen der Antagonismus zwischen Albuminen und Globulinen gestört ist. Wir behalten uns diese Untersuchungen vor.

Es war naheliegend, die Verschiedenheit der Albuminfraktion darin zu suchen, daß die beschleunigenden Albumine Serozym enthalten, die hemmenden nicht.

Wir haben daher mehrere Male auch die Albumine auf ihren Serozymcharakter geprüft und dabei festgestellt, daß dieselben oft ein stärkeres Serozym enthalten als das ungespaltene Serum.

In Versuch 12 zeigte z. B. das Oxalatserum in der Menge von 0,1 eine ganz schwache Serozymwirkung: Gerinnung erst über Nacht. Die mit 15 ccm $n/_{300}$ HCl gewonnenen Albumine waren ebenso schwach wie

1) Wir können allerdings eine durch die Spaltung bewirkte Zerstörung einer hemmenden Substanz vorderhand nicht ausschließen. Durch Verdünnung eines Serums 1:10 mit NaCl-Lösung kommt es manchmal auch zu Thrombinbildung, wenn auch selten (siehe Versuch 15).

das Oxalatserum, die mit 10 ccm gewonnenen fällten, mit Cytozym gemischt, nach 2 Minuten, die zweimal kleinere Dose nach $4\frac{1}{2}$ Minuten, die $\frac{1}{4}$ Dose in 1 Stunde.

Also auch hier ergibt sich, daß das Serum noch große Mengen von Serozym enthalten kann, welche vor der Spaltung durch unbekannte Hemmungssubstanzen verdeckt werden.

Bei serozyzmarmen Seren können wir daher nie sicher sagen, ob das Serozym tatsächlich fehlt oder ob es nicht nur larviert ist und durch geeignete Spaltung zum Vorschein gebracht werden könnte.

Die gerinnungsbefördernde Wirkung der Albuminfraktion hängt jedoch nicht mit dem Serozymgehalt derselben zusammen.

Im Versuch 10 enthielten die mit 10 ccm HCl gewonnenen Albumine ein starkes Serozym: Fällung mit 1 Tropfen Blutplättchenextrakt trat nach 10 Minuten ein, die mit 15 ccm gespaltenen erst nach 100 Minuten teilweise.

Gleichwohl hemmten die serozyzmreicheren Albumine die Thrombinbildung der Globuline, während die serozyzmärmeren Albumine sie im Gegenteil förderten.

Der Serozymcharakter der Albumine ist demnach allein nicht ausschlaggebend, und doch ist ein gewisses Verhältnis zwischen Cytozym- und Serozymmengen des Serums notwendig, damit das von uns beobachtete Phänomen der Thrombinbildung aus den Globulinen reproduziert werden kann. Wir können dasselbe, wie die Versuche zeigten, mit gewöhnlich gewonnenen Seren nur in schwächerem Grade hervorbringen. Globuline, welche in einem Spaltungsversuche mit Hammelserozym unter starker Thrombinbildung reagieren, können meistens ohne Serozymzusatz aus sich selbst bloß schwaches Thrombin bilden. Umgekehrt kann man bei Oxalatseren oft aus den Globulinen allein wirksames Thrombin gewinnen; solche Globuline reagieren aber relativ schwächer mit dem zugesetzten Hammelserozym. Man gewinnt den Eindruck, daß die geringen Mengen Cytozym solcher Globuline wohl mit dem arteigenen, nicht aber mit dem artfremden Serozym zu reagieren imstande sind.

Inaktiviert man das Serum, so geht sein Cytozymcharakter meistens verloren. Eine gewisse Ausnahme bilden sehr stark

cytozymhaltige Sera. Dieser Befund widerspricht der Tatsache, daß die Blutplättchen, deren Zerfall dem Serum hauptsächlich den Cytozymcharakter verleiht, thermostabil sind.

Die aus inaktivem Serum gewonnenen Globuline erweisen sich meist in ihrem Cytozymcharakter mehr oder weniger abgeschwächt (Versuch 17). Ungleiche Resultate erzielt man, wenn die ausgefällten und wieder gelösten Globuline auf 56° resp. 100° erhitzt werden: manchmal wirken sie nach Kochen besser, manchmal schlechter, die Differenzen sind dabei nicht selten so groß, daß Zufälligkeiten nicht als Ursache angenommen werden können.

In Versuch 17 ergaben die aus frischem Hammelserum gewonnenen Globuline schwache Gerinnung nach 40 Minuten, dieselben Globuline gekocht feste Gerinnung nach 15 Minuten.

Auffallend ist, daß die aus inaktivem Serum gewonnenen Globuline beim Kochen manchmal an Wirksamkeit einbüßen, während die aus dem aktiven Serum dargestellten zunehmen. Solche Befunde ließen sich am einfachsten durch die Annahme erklären, daß die Begünstigung durch Kochen auf Zerstörung einer hemmenden Substanz beruhe. Wenn diese bei 56° zerstört wurde, kann das Kochen nur noch die gerinnungsfördernden Momente schädigen, wodurch die Abnahme der Gerinnung erklärt würde. Wir können aber nicht ausschließen, daß die Globuline bei einem ganz bestimmten Dispersitätsgrad eine optimale Wirksamkeit entfalten. Durch die Koagulation bei bestimmten Temperaturen ist vielleicht gerade der günstigste Dispersitätsgrad erreicht.

Die Lösung dieser Frage wird noch dadurch sehr erschwert, daß wir manchmal auf Erscheinungen gestoßen sind, die eine gewisse Komplexität der hemmenden Faktoren nahelegen.

So erweisen sich in Versuch 15 die Globuline mit Hammelerozym geprüft, die Albumine mit Lebercytozym, als wirksam (die einen als Cytozym, die anderen als Serozym), untereinander reagieren sie jedoch fast gar nicht; es wäre denkbar, daß durch Zusammenbringen der beiden Teile (Albumin + Globulin) eine hemmende Substanz verstärkt oder restituiert wird. (Der Versuch zeigt auch sehr schön die große Bedeutung der quantitativen Spaltungsverhältnisse.)

Die Widersprüche, welchen wir bei der Untersuchung der Thermostabilität der Globuline begegnet sind, finden wir auch

bei den Organextrakten, und dies war wohl die Ursache, warum Morawitz eine Thermolabilität der Extrakte angenommen hat. Wir geben einige Protokolle an, bei welchen eine deutliche Abschwächung der Organextrakte bei der Erhitzung zu konstatieren ist und stellen denselben andere Versuchsergebnisse gegenüber, welche keine Abnahme, manchmal eine deutliche Zunahme der Wirksamkeit ergaben.

Nun enthalten die Organe sowohl gerinnungsfördernde wie gerinnungshemmende Substanzen, so daß auch hier eine doppelte Erklärung möglich ist. Man kann auch hier an die Herstellung eines optimalen Dispersitätsgrades denken, der sowohl von der Konzentration der Eiweißlösung, den gelösten Salzen, dem Grade der Erhitzung etc. abhängig ist, andererseits wäre eine ungleichmäßige Beeinflussung der fördernden und hemmenden Faktoren zu diskutieren. Bei solchen Extrakten, wo hemmende Substanzen reichlich vorhanden sind, könnte die Erhitzung begünstigend wirken. Wir begegnen bei diesen Untersuchungen ähnlichen Schwierigkeiten, wie sie bei den Untersuchungen des Einflusses der Temperatur auf den Gerinnungsprozeß selbst beobachtet wurden. Auch bei der Gerinnung entspricht die durch die Temperaturerhöhung erzielte Kurve nicht einer solchen, die wir bei Fermenten gewohnt sind, und Landsberg, ein Schüler von Morawitz, führt dies auf eine gleichzeitige Beeinflussung von hemmenden Faktoren zurück (namentlich Absorption des Fermentes an Eiweiß). Es handelt sich hierbei vermutlich um Zustände, die durch antagonistisch wirkende Substanzen im Gleichgewicht gehalten werden. Die Substanzen scheinen sich in ihrer Thermostabilität nicht wesentlich voneinander zu unterscheiden. Davon, welche Substanz relativ mehr durch einen Eingriff gelitten hat, hängt vielleicht der begünstigende oder schädigende Einfluß der Erhitzung etc. ab.

Protokolle.

Die Technik ergibt sich aus der Einleitung sowie aus p. 63. Wir geben im folgenden nur ganz kurze technische Bemerkungen und im übrigen nur die Gerinnungszeiten ¹⁾).

1) \pm bedeutet unvollständig, netzige Gerinnung.

Versuch 1.

Aktives und inaktives Serum und Oxalatserum vom Menschen werden in Globuline und Albumine nach Liefmann (15' lang CO₂) gespalten. Der Albuminteil ist bei inaktiven Seren schwach opaleszierend.

	Serum aktiv	Oxalatserum aktiv	Serum inaktiv	Oxalatserum inaktiv
Globuline 0,2	2 $\frac{1}{4}$ '	32' ±	5'	55'
Globuline 0,1	5'	64'	24'	75'
Alb. 1,0 + Globuline 0,2	2'	7'	8 $\frac{1}{2}$ '	26'
Alb. 1,0 + Globuline 0,1	15'	17'	20'	55' ±
Albumine allein 1,0	75'	40'	40'	75'
Serum 0,1 ungespalten + Serozym			22'	
Oxalatserum 0,1 ungespalten + Serozym			120'	
Serozym allein			120'	

Versuch 2.

Menschenblut wurde in Oxalat („Oxalatserum“), in 20-proz. NaCl („NaCl-Serum“) (9 : 1) und wie gewöhnlich, d. h. ohne Zusätze, aufgefangen und das Serum gewonnen. Das NaCl-Serum ist stark rot. Spaltung nach Liefmann mit CO₂ (NaCl-Plasma durch Verdünnung 1:4 mit Aqua vorher zur Gerinnung gebracht). Die Globuline und Albumine etc. wurden daher hier immer im doppelten Volumen angewendet. Globuline etc. aus aktivem und inaktivem Serum gewonnen. Prüfung auf Cytozym wie üblich.

	Serum		NaCl-Serum		Oxalatserum	
	aktiv	inaktiv	aktiv	inaktiv	aktiv	inaktiv
Globuline 0,2	10'	13'	1 $\frac{1}{2}$ '	1 $\frac{1}{2}$ '	flüssig	flüssig
Globuline 0,1	30'	35'	2 $\frac{1}{2}$ '	2 $\frac{1}{2}$ '	flüssig	flüssig
Alb. 1,0, Glob. 0,2	9'	5 $\frac{1}{2}$ '	2 $\frac{1}{2}$ '	2 $\frac{1}{2}$ '	90' fädig	flüssig
Albumine 1,0	flüssig	flüssig	32'	flüssig	flüssig	flüssig
Die betreffenden Sera ungespalten	75' fädig	flüssig	2'	2'	flüssig	flüssig

Versuch 3.

Globuline aus Serum und Oxalatserum vom Hund, aktiv und inaktiv. Spaltung nach Sachs. Sonstige Technik wie gewöhnlich. Spaltung offenbar unvollkommen, da Albuminfraktion leicht trübe; die Trübung verschwindet beim Aufsätzen. Prüfung auf Cytozym wie üblich.

	Serum		Oxalatserum	
	aktiv	inaktiv	aktiv	inaktiv
Globuline 0,2	5'	16'	7'	30'
Glob. 0,2 + Alb. 1,0	5'	14'	7'	17'
Albumine 1,0	9'	17'	14'	19'
Serum 0,2 ungespalten	15'	40' ±	35'	40' ±

Serozym allein 37'.

Versuch 4.

Serum und Oxalatserum vom Kaninchen (aus der Carotis gewonnen). Gespalten nach Sachs und Altmann (1,5 g + n/300 HCl etc.). Sonstige Technik wie gewöhnlich. Globuline 0,2; Albumine 2,0 etc. Prüfung auf Cytozym mit Hammelserozym sowie auf Thrombin mit Oxalatplasma ohne vorherigen Serozymzusatz.

Oxalatserum			Serum			
Glob.	Alb.	Glob. + Alb.	Glob.	Alb.	Glob. + Alb.	
8'	7'	6'	4'	25'	5'	mit Serozym ohne Serozym
fl.	25'	12'	fl.	25'	25'	

Serozym allein 30'.

Versuch 5a.

Menschenserum H. frisch. Gespalten nach Sachs und Altmann (1,5 ccm + 10 ccm n/300 HCl).

Oxalatserum			Serum			
Glob.	Alb.	Glob. + Alb.	Glob.	Alb.	Glob. + Alb.	
6 1/3'	10'	5 1/3'	2'	13'	1 1/2'	mit Serozym ohne Serozym
4 1/3'	60' ±	4'	10'	2'	3 1/2'	

Beide Sera wurden in einem gleichzeitig angesetzten Versuch mit Na-Oxalat versetzt (0,2 ccm einer 1-proz. Lösung auf 1 ccm) und dann nach Sachs und Altmann gespalten. In den aus dem Oxalatserum gewonnenen Globulinen war kein Thrombin mehr nachweisbar.

Die Oxalatserum-Globuline bildeten mit den eigenen rekalkifizierten Albuminen noch etwas Thrombin (20' netzig), mit Hammelserum nicht. Diese größere Affinität zum eigenen Serozym haben wir öfters beobachtet.

Versuch 5b.

Dasselbe Serum, einige Stunden später. Gespalten nach Sachs (1,5 + 10 n/300 HCl).

Oxalatserum			Serum			
Glob.	Alb.	Glob. + Alb.	Glob.	Alb.	Glob. + Alb.	
7'	120'	40'	2'	120'	3'	mit Serozym ohne Serozym
6 1/2'	fl.	120'	120' ±	fl.	fl.	

Serozym allein 120'.
Serum + Hammelserozym 4'.
Oxalatserum + Hammelserozym 70'.

Weder Serum noch Oxalatserum enthalten Thrombin.

Der Versuch wurde mit demselben Serum zum 3. Male erst nach 2 Stunden wiederholt.

Die Globuline allein aus dem Oxalatserum fallen erst nach 25', mit Hammelserozym sind sie unwirksam (Schwund des Cytozyms). Oxaliert fallen die Globuline überhaupt nicht.

Versuch 6.

Oxalatserum und Serum vom Kaninchen (Carotis).

Das Oxalatserum verhält sich wie gewöhnliches Serum, d. h. es enthält viel Cytozym und bildet wenig Thrombin.

Spaltung nach Sachs.

Oxalatserum			Serum			
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
4 $\frac{1}{2}$ ' flüssig	flüssig "	35' flüssig	3' flüssig	flüssig "	40' flüssig	mit Serozym ohne "

Oxalatserum 0,2 + Hammelserozym 10'
Serum 0,2 + Hammelserozym 12'

Versuch 7.

Kaninchenoxalatserum:

a) 2 ccm mit 1 ccm Plättchenextrakt.

b) 2 ccm mit 1 ccm NaCl.

Gespalten nach Sachs-Altman.

Oxalatserum			Oxalatserum + Blutplättchen			
0,2 Glob.	2,0 Alb.	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
10' 20'	45' üb. Nacht	10' 45 ±	1 $\frac{1}{2}$ ' 10'	üb. Nacht flüssig	2' 2'	mit Serozym ohne "

Oxalatserum + Serozym 35'
Oxalatserum + Plättchen + Serozym 4 $\frac{1}{2}$ '
Plättchen + Serozym 1 $\frac{1}{2}$ '

Wurden die Globuline bzw. Globuline + Albumine statt in CaCl₂-NaCl mit Oxalat-NaCl verdünnt, so brachten sie das Plasma erst über Nacht zur Gerinnung. Die Albumine enthielten Serozym, wie folgender Versuch zeigt:

Albumine aus Oxalatserum + Cytozym 4'
Albumine allein 30'

Versuch 8.

Oxalatserum vom Menschen.

1,5 Oxalatserum gespalten in 10, 12,5, 15, 17,5 ccm n/300 HCl.

Albumine wie gewöhnlich neutralisiert, rekalkifiziert etc. Von dem mit 10 ccm gespaltenen Serum wird 1 ccm Albumine, von mit 12,5 1,25 ccm, von mit 15 ccm gespaltenen Serum 1,5 ccm Albumine benutzt. Globuline 0,2 ccm. Aufgefüllt immer auf das Gesamtvolumen 2 ccm.

In 10 ccm HCl			12,5 ccm HCl			15 ccm HCl			17,5 HCl		
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	
50'	135'	80'	45'	210' schw.	135'	80'	180' schw.	80'	140'	fl.	mit Serozym
22'	fl.	120'	22'	fl.	180'	30'	fl.	240' netzig	fl.	fl.	ohne „
Oxalatserum + Hammelserozym									110'		
Oxalatserum allein									180'		
Hammelserozym allein									210' ±		

Versuch 9.

Serum und Oxalatserum vom Menschen.

(Plasma gerinnt langsam.) Mit 10, 12,5, 15, 17,5 ccm $n_{/300}$ HCl gespalten. Sonstige Technik wie üblich.

Oxalatserum.

10 ccm HCl			12,5 ccm HCl			15 ccm HCl			
Gl.	Alb.	Gl. + Alb.	Gl.	Alb.	Gl. + Alb.	Gl.	Alb.	Gl. + Alb.	
25'	220'	65'	20'	220'	55'	28'	220'	55'	mit Serozym
240'	fl.	270' ±	90'	fl.	270' ±	30'	fl.	300' ±	ohne „

Das zugehörige Serum.

10 ccm HCl			15 ccm HCl			
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
10'	120'	10'	10'	165'	10'	mit Serozym
52'	flüssig	60'	35'	flüssig	60'	ohne „
Serum allein fällt				47'		
Serum + Hammelserozym				18'		
Oxalatserum allein				bleibt flüssig		
Oxalatserum + Serozym				105'		
Hammelserozym allein				220'		

Die Albumine enthielten kein Serozym.

Versuch 10.

Hundeserum. 1,5 ccm in 10 und 15 ccm $n_{/300}$ HCl.

Sonstige Technik wie vorher.

10 ccm $n_{/300}$ HCl			15 ccm $n_{/300}$ HCl			
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
6'	70'	14'	6'	2 ^b ±	8'	mit Serozym
10'	2 ^{1/2} ^b	50'	55'	6 ^b	30'	ohne „
Albumine (mit 10 ccm HCl gewonnen) + Blutplättchen						10'
Albumine (mit 15 ccm $n_{/300}$ HCl gewonnen) + Blutplättchen						100' fädig.

Versuch 11.

Serum und Oxalatserum vom Menschen.

Gespalten nach Sachs-Altman. 1,5 ccm in 10 ccm und 15 ccm.

Sonstige Technik wie vorher.

Oxalatserum						Serum						
10 ccm HCl			15 ccm HCl			10 ccm HCl			15 ccm HCl			
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
6'	15'	6'	6'	28'	5'	2'	18'	2'	2'	36'	2'	mit Serozym ohne „
14'	23'	5'	14'	fl.	8'	23'	55'	4'	16'	fl.	4'	
Ungespaltenes Serum + Hammelserozym											6'	
Ungespaltenes Serum allein											16'	
Oxalatserum, unzerlegt + Hammelserozym											7 1/2'	
Oxalatserum allein											14'	

Versuch 12.

Vergleichende Serozytitrierung der Albumine und des Serums mit 1 Tropfen Plättchenextrakt.

	1 ccm	0,5 ccm	0,25 ccm
Oxalatserum (verdünnt 1:10)	über Nacht ger.	flüssig	flüssig
Albumine von 1,0:10 ccm n/300 HCl	2'	4 1/2'	60'
Albumine von 1,0:15 ccm n/300 HCl	über Nacht	flüssig	flüssig

Das Serum enthielt kein Serozym. Die zugehörigen Albumine (1,0) füllten über Nacht.

Versuch 13.

Ziegen-Oxalatserum.

Gespalten nach Sachs. 1,5 ccm in 10 ccm und 15 ccm.

Technik wie gewöhnlich.

In 10 ccm			In 15 ccm			
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
100' ± flüssig	180' 60'	100' ± 75'	20' 90'	flüssig „	35' 50'	mit Serozym ohne „

Serozytitrierung des Oxalatserums + 1 Tropfen Plättchenextr. 2 1/2'
 der Albumine (1,5:10) 1 1/2'
 der Albumine (1,5:15) 1 1/2'

Versuch 14.

Oxalatserum vom Menschen.

Gespalten nach Sachs. 1,5:10 und 1,5:15.

Sonst Technik wie gewöhnlich.

In 10 ccm			In 15 ccm			
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	
8'	6'	5'	13'	8'	5'	ohne Serozym

Oxalatserum allein 23'. Nach 5^b Stehen bei Zimmertemperatur das Oxalatserum und Serum gespalten.

Oxalatserum						Serum					
in 10 ccm			in 15 ccm			in 10 ccm			in 15 ccm		
Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.	Globuline	Albumine	Gl. + Alb.
fl.	fl.	fl.	fl.	fl.	fl.	15'	fl.	45'	über Nacht	fl.	17'

Versuch 15.

No. 335. Oxalatserum und Serum vom Menschen.

0,2 ccm steht 1 $\frac{1}{2}$ ^b bei 37° verdünnt mit 2,0 physiol. NaCl-Lösung bzw. Aqua dest. Als Kontrolle 0,2 Serum unverdünnt bei 37° stehen gelassen, wird erst unmittelbar vor dem Versuch mit 2,0 ccm NaCl-Lösung vermischt.

Das Serum, welches in NaCl gestanden hat, fällt Plasma in 10' das in Aqua dest. stehende bzw. das unverdünnte Serum ist unwirksam.

Versuch 16.

Hammelserozym, 20 Stunden alt, wird mit n $\frac{1}{300}$ HCl gespalten, wobei auf 10,0 HCl steigende Mengen Serum kommen: 0,9, 1,1, 1,3, 1,5 ccm; der kleinsten Serumdosis entspricht mäßige Trübung, den größeren steigende Fällung der Globuline. Der Bodensatz von 0,9:10 ist eine käsige, schwer lösliche Haut, die Lösung der Globuline gelingt um so schneller, je mehr Serum zu 10 ccm zugegeben war, die Konsistenz des Bodensatzes wird im gleichen Maße lockerer, breiiger. Alle Globuline werden in 1 ccm CaCl₂-NaCl-Lösung aufgenommen und jeweils die Hälfte $\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° gehalten. Die Albuminfraktionen werden mit alkalischer NaCl-CaCl₂-Lösung auf normalen Salzgehalt gebracht und auf gleiche Serumkonzentrationen verdünnt. Eine je 0,15 Serum entsprechende Menge dieser Albumine wird mit 1 Tropfen einer Cytozymsuspension (Leberextrakt) versetzt und auf Serozymgehalt geprüft. — Die Globuline werden teils aktiv, teils inaktiv

mit frischem Hammelserozym oder mit den zugehörigen Albuminen auf Cytozymcharakter untersucht. Schließlich wird ein Gemisch beider Anteile des Serums, Globuline + Albumine (0,15 Serum entsprechend) mit einem Tropfen Cytozymsuspension digeriert, um zu sehen, ob ein komplexer Bau des Serozyms, ähnlich wie er für das Komplement angenommen wird, feststellbar ist.

	Verdünnung			
	0,9 : 10	1,1 : 10	1,3 : 10	1,5 : 10
Albumine 0,15 + Lebercytozym	fl	75' ger.	6'	2'
Globuline aktiv + Serozym	50'	75' ger.	75' ger.	75' Aggl.
Globuline inaktiv + Serozym	20'	7'	7'	10'
Globuline aktiv + Albumine	fl.	fl.	fl.	fl.
Globuline inaktiv + Albumine	fl.	fl.	fl.	20' schw.
Globul. aktiv + Album. + Lebercytozym	fl.	55' ger.	5'	2'
Globul. inakt. + Album. + Lebercytozym	fl.	fl.	15'	3'

Versuch 17.

a) Einfluß der Erhitzung.

	Kaninchenserum aktiv	Kaninchenserum inaktiv	Hammelserum aktiv
Globulin frisch	20'	23'	24'
Globulin gekocht (durch Dialyse gewonnen)	15'	fl.	18'

Serozym allein 29' ±

b) Globuline von Kaninchenserum, 1/2 Stunde inaktiviert, sowie 2 Minuten gekocht.

	Akt. Globulin	56°-Globulin	100°-Globulin
0,5 ccm	10'	25'	50'

c) Aktive und inaktive Sera wurden 20 Stunden dialysiert, die Globuline in NaCl gelöst und frisch und nach der Erhitzung (3 Minuten im kochenden Wasserbad) geprüft.

d) Menschenserum.

	Akt. Ser.	Inakt. Ser.
Globulin frisch	5'	14'
Globul. gekocht	2'	15'

e) Hammelserum.

	Aktiv	Inaktiv
Globulin frisch	40' ±	57' ±
Globul. gekocht	15'	60' ±

Serozym allein 57' ±

f) Kaninchenserum.

	Aktives Serum	Inaktives Serum
Globulin frisch	8'	9'
Globulin gekocht	7'	22' ±

Serozym allein 22'.

Versuch 18.

Einfluß der Erhitzung auf den Cytozymgehalt der Organextrakte (geprüft wie üblich mit Hammelserozym).

I. Extrakt aus Meerschweinchenleber.

	0,5 ccm	0,25 ccm	0,1 ccm
Aktiv	4'	6'	8'
Inakt. $\frac{1}{2}$ ^b bei 56°	6'	7'	8'

II. Extrakt aus Meerschweinchenleber. Verdünnt 1:10.

Aktiv	4'
Erhitzt $\frac{1}{2}$ ^b auf 56°	2'
Gekocht $\frac{2}{2}$ Minuten	4'

III. Leberextrakt von Meerschweinchen, unverdünnt erhitzt, wobei eine massige Koagulation auftritt. Untersuchung des Filtrats.

	0,5 ccm	0,2 ccm
Aktiv	4'	3'
56°	30'	30'
Gekocht 2 Minuten	60'	45'

IV. Spermatozoen aus dem Nebenhoden einer Ratte.

Spermatozoen aktiv	6'
Spermat. gekocht 2'	15'

V. Organzellen von Meerschweinchen in Hackmaschine zermalmt. Brei mit NaCl in der Zentrifuge gewaschen. 0,5 ccm des Organbreies + 3 ccm NaCl (Standardlösung), davon 0,25 + 0,75 NaCl 2 Minuten gekocht bzw. frisch verwandt.

	Leber	Milz	Niere	Lunge	Herz
Frisch	13'	60' ±	22'	60' ±	7'
Gekocht	3'	6'	4'	4'	3 $\frac{1}{2}$ '

VI. Meer-schweinchen-hoden.

Frisch	40'
Gekocht	11'

Zusammenfassung.

Die durch gewöhnliche Gerinnung gewonnenen Sera enthalten in der Regel eine gewisse Menge Cytozym, welches mit den Globulinen gefällt wird. Die Globuline wirken nach ihrer Lösung in der Regel stärker als Cytozym als die ihnen entsprechende Menge ungespaltenen Serums. In der Albuminfraktion lassen sich meistens keine größeren Mengen Cytozym nachweisen.

Die im Oxalatmedium aufgefangenen Sera enthalten kein oder nur spärliches, mit Hammelerozym nachweisbares Cytozym. Die Globuline solcher Oxalatsera sind ebenfalls, mit Hammelerozym geprüft, an Cytozym ärmer als die Globuline, welche vom gewöhnlichen Serum des gleichen Blutes stammen. Die Globuline der Oxalatsera haben dagegen oft die Eigenschaft, aus sich selbst Thrombin zu bilden, und zwar auch dann, wenn im ungespaltenen Serum Thrombin nicht nachweisbar ist. Die Albumine bilden an sich meistens kein oder nur wenig Thrombin; zu den Globulinen zugesetzt wirken sie bald beschleunigend, bald hemmend. Diese verschiedene Wirkung der Albumine hängt von den bei der Spaltung angewandten Mengenverhältnissen ab.

Das in den Globulinen nachweisbare Thrombin wird neugebildet. Dies läßt sich daraus schließen, daß Thrombin in den Globulinen nicht nachgewiesen werden kann, wenn dieselben nach ihrer Fällung im Oxalatmedium gelöst werden.

Sera, deren Globuline aus sich selbst Thrombin produzieren, enthalten somit alle Bestandteile, welche zur Thrombinbildung notwendig sind; gleichwohl ist Thrombin in ihnen oft nicht nachweisbar. Diese Tatsache beruht darauf, daß die Thrombinentstehung durch antagonistische Mechanismen verhindert wird; diese werden durch die Spaltung des Serums aufgehoben.

Solche durch Spaltung aufhebbare Hemmungen sind für die antikomplementäre Wirkung der Globuline und für die Wassermannsche Reaktion durch Friedemann aufgedeckt worden. Wahrscheinlich liegen bei der Thrombinbildung ähn-

liche Wechselbeziehungen zwischen Globulinen und Albuminen vor.

Die Albumine haben oft eine stärkere Serozymwirkung als das ungespaltene Serum. Da die Globuline aus sich selbst Thrombin bilden, müssen sie ebenfalls Serozym enthalten. Man muß somit annehmen, daß sowohl in den Albuminen wie in den Globulinen Serozym vorhanden sein kann.

Wir finden somit keine Trennbarkeit des Serozyms in Mittel- und Endstück, sondern nur eine Abhängigkeit seiner Funktion von dem gegenseitigen Mischungsverhältnis der Albumine und Globuline.

Das Serum verliert bei der Inaktivierung seinen Cytozymcharakter. Die aus inaktivem Serum gewonnenen Globuline wirken in der Regel schwächer als die aus aktivem Serum dargestellten. Inaktiviert oder kocht man die Globuline eines Serums nach der Wiederlösung derselben, so erzielt man manchmal eine Abschwächung, manchmal eine Verstärkung ihrer Cytozymwirkung. In dieser Beziehung verhalten sich die Globuline ähnlich den Organextrakten, die ebenfalls durch Erhitzen bald verbessert, bald verschlechtert werden.

Reines Cytozym (Blutplättchen) haben wir in Uebereinstimmung mit Bordet und Delange koktostabil gefunden. Die aus einer Hundeleber gewonnenen alkoholischen Extrakte konnten ohne Schädigung ihres Cytozymcharakters inaktiviert werden.

Literatur.

- Referat über die Blutgerinnung: Morawitz in Handb. der biochem. Arbeitsmethoden von Abderhalden, Bd. 5, II; daselbst ausführliche Literaturangaben.
- Nolf, *Ergebn. der inn. Med.*, Bd. 10, 1913, p. 275 ff.
- Bordet et Delange, *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1912; daselbst ausgezeichnete technische Angaben.
- — *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1913.
- Zack, *Arch. f. Pharmak.*, 1913.
- Lansberg, *Biochem. Zeitschr.*, 1913.
- Pekelharing, *Biochem. Zeitschr.*, 1913.
- Friedemann, *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 67, p. 279.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich
(Direktor: Prof. Silberschmidt).]

Immunitätsprobleme und Gerinnungsvorgänge¹⁾.

Mitteilung II.

Von **L. Hirschfeld** und **R. Klinger**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. September 1913.)

I. Ueber das Wesen der Cytozymierung und ihre Beziehungen zu den thromboplastischen Substanzen.

Wie wir in der ersten Mitteilung ausgeführt haben, ist zur Entstehung von Thrombin ein thermolabiler Bestandteil des Serums, das Serozym, erforderlich, welcher bei Anwesenheit von Ca-Ionen mit einer thermostabilen, in den Zellen enthaltenen, lipoidartigen Substanz, dem Cytozym, reagiert. Da auch das Anaphylatoxin regelmäßig nur aus aktivem Serum dargestellt werden kann, zu seiner Bildung somit gleichfalls ein bei 56° zerstörbarer oder doch irreversibel veränderter Bestandteil des Serums nötig ist, lag es nahe zu untersuchen, ob die beiden Prozesse miteinander in Beziehung stehen; es drängte sich uns speziell die Frage auf, ob nicht die Giftigkeit des Anaphylatoxins auf die Entstehung von Thrombin zurückzuführen sei.

A. Ueber den Vorgang der Cytozymierung.

Wir haben zunächst untersucht, ob die Bakterien, ähnlich wie die Organe, als Cytozym zu wirken vermögen. Nach den ersten orientierenden Versuchen schien dies in der Tat der Fall zu sein, wie folgendes Protokoll zeigt:

Protokoll 1: Kaninchenserum wird in verschiedener Menge mit fallenden Dosen einer kurz gekochten, dichten Aufschwemmung von *Bact. prodigiosum* versetzt und 1 Stunde bei 37° gehalten. (Alle Röhrchen sind auf 2 ccm mit NaCl-Lösung ergänzt.) Hierauf wird jedem Röhrchen 1 ccm Oxalatplasma zugesetzt; die Gerinnungszeiten desselben sind in der folgenden Tabelle angegeben:

1) Teilweise mitgeteilt auf dem Mikrobiologentag 1913 in Berlin.

Menge des Serums	Menge der Bakteriensuspension				Kontrolle: Serum ohne Bakterien
	0,5	0,2	0,1	0,05	
1,0	—	3'	5'	10'	15'
0,5	5'	8'	20'	26'	30'
0,25	20'	26'	30'	35'	45' ± *)

*) ± bedeutet nur schwache, unvollständige Gerinnung.

Es gelang jedoch nicht regelmäßig, auf die angegebene Weise aus Bakterien und frischem Serum Thrombin zu erzeugen. Wurde statt des durch spontane Koagulation des Blutes erhaltenen Serums ein aus Oxalatplasma gewonnenes Serum (Oxalatserum) verwendet, so war die Thrombinbildung häufig nur undeutlich zu beobachten, obwohl das Serum genügend Serozym enthielt, wie dies mit Organextrakten nachweisbar war.

Die weiteren Versuche führten zur Aufklärung dieser Unregelmäßigkeiten.

Es stellte sich heraus, daß die Bakterien an sich nicht oder nur sehr schwach als Cytozym wirken, daß sie aber durch Vorbehandlung mit frischen, cytozymhaltigen Seren zu starkem Cytozym werden. Wenn man die Bakterien statt in Oxalatserum, in welchem sie meistens kein Thrombin bilden, in gewöhnlichem Serum digeriert, so erzielt man zwar manchmal bessere Gerinnung, häufig gerinnt das zugesetzte Plasma dennoch nicht, weil derartige Sera in der Regel arm an Serozym sind. Wir mußten daher die Technik ändern und haben später immer die Bakterien in Serum einige Zeit digeriert, dann abzentrifugiert, neu aufgeschwemmt und mit gutem Hammelserozym auf Cytozymcharakter geprüft.

Wir geben als Beispiele für das am geeignetsten befundene Vorgehen einige Protokolle:

Protokoll 2: Eine 24-stündige Agarkultur von *Bact. prodigiosum* wird in 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, 1 Minute im Wasserbad gekocht, davon 0,2 ccm zu 0,5 ccm frischem¹⁾ Kaninchen-

1) Das Serum muß sehr sorgfältig zentrifugiert sein. Benutzt man ein älteres Serum, so muß dasselbe vorher nochmals zentrifugiert werden. Die leichten Trübungen, welche durch Blutplättchen oder ausgefallene Globuline etc. bedingt sind, enthalten wirksames Cytozym und würden Versuchsfehler veranlassen, wenn sie mit den Bakterien abzentrifugiert würden.

serum¹⁾ zugesetzt und 1 Stunde bei 37° gehalten. Die Bakterien werden hierauf abzentrifugiert, in 1 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt, davon in fallenden Mengen mit 1 ccm CaNaCl²⁾ und 0,4 ccm Serozym digeriert: nach 10 Minuten wird Oxalatplasma zugegeben. Als Kontrolle dient dieselbe Menge der Bakterienaufschwemmung, die nicht mit Kaninchenserum vorbehandelt wurde.

Die Zahlen der Tabelle bedeuten die Gerinnungszeiten des Oxalatplasmas:

	Menge der Bakterienaufschwemmung			
	0,5	0,3	0,1	0,05
Bakterien, behandelt	2'	3'	8'	60' ±
Bakterien, unbehandelt	50' ±	65' ±	65' ±	65' ±

Kontrolle: Serozym allein: 65' ±.

Wird die gleiche Menge Bakterien (je 5 Tropfen) mit fallenden Serumdosen behandelt, so erhält man folgende Gerinnungszeiten:

	Zur Behandlung verwendete Serumdose			
	0,5	0,25	0,1	0,0
Bakterien, behandelt, 0,1	9'	19'	26' ±	
Bakterien, unbehandelt				65' ±

Die meisten der folgenden Versuche wurden so gemacht, daß die wie oben aufgeschwemmten und gekochten Bakterien in der Dose von 0,2 bis 0,3 ccm zu 0,3—0,5 Serum zugesetzt, nach dem Abzentrifugieren zunächst in 1,0 physiologischer NaCl-Lösung aufgeschwemmt und davon 0,2—0,3 ccm zum Versuch verwendet wurde. Diese Dose wurde auf 1 ccm mit CaCl₂-NaCl-Lösung ergänzt.

Als Serozymdase diente meist 0,3—0,4 Hammeloxalatserum.

Das Oxalatplasma wurde in der Menge von 1,0 ccm (meist nach 10 bis 15 Minuten langem Digerieren der Bakterien mit dem Serozym) zugefügt, so daß die Gerinnung in einem Gesamtvolum von 2,3—2,5 ccm stattfindet. Als Kontrollen wurde stets die gleiche Menge unbehauelter Bakterien mit Serozym, ferner die verwendete Serozymdase allein mit Oxalatplasma angesetzt.

Neben dem zu den meisten Versuchen verwendeten *Bact. prodigiosum* haben wir auch eine Reihe anderer Bakterien auf die Fähigkeit, als Cytozym zu wirken, untersucht. Es ergab

1) Blut aus der Ohrvene gewonnen.

2) 100 Teile 0,9-proz. NaCl-Lösung + 5 Teile 1-proz. CaCl₂-Lösung. Bezüglich aller technischen Einzelheiten siehe unsere Mitteilung I. Der Ca-Zusatz ist unbedingt nötig, wenn man gute Gerinnungen erzielen will.

6*

sich, daß die gramnegativen Bakterien sowie Tuberkelbacillen im allgemeinen besser geeignet sind als grampositive. Doch besteht hier kein durchgehender Unterschied, auch verhalten sich die gleichen Bakterienarten öfters ungleich, indem z. B. von Typhus und Prodigiosum einmal die eine, ein anderes Mal die andere Bakterienart besser wirkt; vermutlich sind Unterschiede im Wachstum der Kulturen etc. hierbei entscheidend.

Protokoll 3: 24-stündige Agarkulturen von verschiedenen Bakterien (Tuberkelbacillenkultur, 8 Wochen) werden feucht gewogen und je 0,025 ccm in 1,0 NaCl-Lösung aufgeschwemmt, dann kurz im Wasserbad gekocht und gleiche Mengen in Meerschweinchenserum digeriert (1,0 auf 1,0 Serum).

Kolonie II entspricht einem ähnlichen, zu anderer Zeit gemachten Versuch (0,5 Bakterien in 0,25 Serum); die Bakterien wurden aber in der eben geschilderten Weise behandelt, während Versuchskolonie I noch in der Technik des Prot. 1 ausgeführt wurde.

Behandelte Bakterien	I	II
Cholera vibrionen	6'	—
Bact. dysenteriae	8 ¹ / ₂ '	—
Bact. pneum. Friedländer	9 ¹ / ₂ '	—
B. paratyphi B	—	1 ^h Aggl.
B. typhi	—	18'
Staphylococcus aureus	30'	30'
Streptococcus pyog.	10'	—
Diphtheriebacillus	30'	—
Schimmelpilz (Penicillium)	9'	—
Tuberkelbacillus	8'	30'
Kontrolle: Serozym allein	40' ±	flüssig, über Nacht Gerinnsel

Zu II. Die gleichen Bakterien, als Kontrollen unbehandelt gelassen und auf Cytozym geprüft, blieben einige Stunden flüssig; über Nacht gerannen sie unvollkommen und nur wenig stärker als die Serozymkontrolle, nur die Tuberkelbacillen bildeten ein festes Koagulum, sind also unter den 4 Arten die an eigenem Cytozym reichsten (Lipoidhülle?).

Nicht nur Bakterien, auch Suspensionen anorganischer Pulver etc. lassen sich durch Behandlung mit geeigneten Seren so beeinflussen, daß sie zu Cytozym werden.

Protokoll 4: 0,5 g Kaolin wird in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt; davon 0,1 ccm mit 0,5 Kaninchenserum öfterem Aufschütteln ¹/₂ Stunde digeriert. Dann wird zentrifugiert, das Kaolin in 1 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. 0,1 ccm dieser Suspension in 1 ccm CaNaCl-Lösung gibt mit 0,4 ccm Serozym Gerinnung in 4 Minuten. Serozym allein sowie Serozym mit unbehandeltem Kaolin bewirkt überhaupt keine Gerinnung.

Die unvorbehandelten Bakterien beschleunigen die Gerinnung nur wenig oder gar nicht; meist ist eine gewisse, geringfügige Cytozymwirkung der einfach in NaCl-Lösung aufgeschwemmten und gekochten Bakterien vorhanden; sie ist bei bestimmten Arten, wie Tuberkelbacillen, relativ stärker nachweisbar (s. Protokoll 3) als bei anderen. Immer aber hält sie sich in bescheidenen Grenzen und spielt im Vergleich zu der Gerinnung, die durch vorbehandelte Bakterien bewirkt wird, eine nur ganz untergeordnete Rolle. Kaolin, das ohne Vorbehandlung zu Serozym zugesetzt wird, hemmt nicht selten die Gerinnung. wirkt jedenfalls an sich ganz selten beschleunigend.

Auch spezifische Serumpräzipitate lassen sich durch Behandlung mit Serum so verändern, daß sie zu Cytozym werden.

Protokoll 5: 4 ccm Rinderserum 1:100 werden mit 1 ccm inaktivem Kaninchenpräzipitin (Titer 1:10 000) versetzt, das Präzipitat abzentrifugiert und in 1 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Es werden hierauf folgende Mischungen angesetzt:

0,5 Meersch.-Serum + 0,5 NaCl-Lösung + 0,25 Präzipitat	} 1 ^h bei 37° } digeriert
1,0 NaCl + 0,25 Präzipitat	

dann zentrifugiert und in 1 ccm NaCl-Lösung aufgeschwemmt. Davon wird 0,4 ccm mit 1 ccm CaCl₂-NaCl-Lösung verdünnt, mit 0,3 Hammelserozym versetzt und nach 10 Minuten Oxalatplasma zugegeben. Das mit Serum behandelte Präzipitat gerinnt nach 8 Minuten, das unbehandelte Präzipitat wie die Kontrolle (Serozym allein) nach 120 Minuten ±.

Nicht nur verschiedene Sera, sondern auch andere cytozymhaltige Flüssigkeiten, wie Emulsion von Lipoidextrakten, Blutplättchenextrakte, vermögen den Suspensionen Cytozymcharakter zu verleihen. Auf einen Unterschied, welchen die Bakterien gegenüber dem Kaolin bei der Cytozymierung durch derartige künstliche Cytozymbösungen aufweisen, gehen wir später ein.

Wir nennen die so behandelten Bakterien, Kaolin etc. **cytozymierte** Bakterien, cytozymiertes Kaolin, um auszudrücken, daß dieselben eine neue Eigenschaft gewonnen haben, nämlich als Cytozym mit einem jedem serozymhaltigen Serum Thrombin zu bilden.

Die Eigenschaft des Serums (und anderer Substanzen, wie Organextrakte etc.), die erwähnten Suspensionen so zu verändern, daß sie Cytozymcharakter erhalten, nennen wir die cytozymierende.

Unbehandelte Bakterien, Kaolin etc. haben unter den gewählten Versuchsbedingungen nur eine ganz geringfügige oder gar keine gerinnungsbefördernde Wirkung.

B. Beziehungen des Cytozymgehaltes des Serums zu dessen cytozymierender Fähigkeit.

Wir haben eine große Anzahl verschiedener Seren auf ihre cytozymierende Fähigkeit gegenüber Bakterien und Kaolin geprüft; gleichzeitig wurde meist der Cytozymgehalt der betreffenden Seren bzw. der zugehörigen Globuline untersucht, indem entsprechende Mengen derselben direkt mit Serozym versetzt und die Menge des gebildeten Thrombins aus der Gerinnungszeit des Plasmas bestimmt wurde.

Es ist möglich, den Cytozymgehalt des Serums eines und desselben Individuums je nach der Art, wie das Blut entnommen und aufgefangen wird, bis zu einem gewissen Grade zu regulieren. Ein vorsichtig aus der Carotis im Oxalatmedium und in paraffinierten Gefäßen aufgefangenes Blut, bei welchem die Blutkörperchen, Blutplättchen etc. abzentrifugiert wurden, bevor das Plasma durch Rekalzifizieren zur Gerinnung gebracht wird, gibt ein Serum, welches fast kein Cytozym enthält. Das in gewöhnlicher Weise aufgefangene Blut liefert ein Serum, welches, wie erwähnt, meistens eine deutlich nachweisbare Menge Cytozym enthält (ein mit Wundsekret vermisches Serum natürlich mehr). Man kann den Cytozymgehalt des Serums steigern, wenn man das Blut in destilliertem Wasser oder in 20-proz. NaCl-Lösung auffängt. Durch Begünstigung des Zellzerfalls erzielt man auf diese Weise sehr cytozymreiche Sera.

Wir haben Sera von verschiedenem Cytozymgehalt auf ihre cytozymierenden Fähigkeiten geprüft und gefunden, daß die Cytozymierung der Bakterien und des Kaolins um so stärker ist, je mehr Cytozym im Serum enthalten ist. Der Cytozymgehalt und die cyto-

zymierende Fähigkeit eines Serums gehen in der Regel parallel¹⁾.

Wir teilen einige diesbezügliche Protokolle mit.

Die Technik der Cytozymierung bzw. der Cytozymprüfung war durchgehend dieselbe (s. Prot. 2). Wir geben daher im folgenden nur die Gerinnungszeiten des zugesetzten Plasmas an. Die Dosen waren ebenfalls die gleichen; wurden mehrere oder andere Dosen geprüft, so sind sie aus den Protokollen zu ersehen. Das aus Oxalatplasma, Citratplasma etc. gewonnene Serum bezeichnen wir als Oxalatserum, Citratserum, das mit Aqua als „Aquaserum“, das mit 20-proz. NaCl aufgefangene als „NaCl-Serum“ etc. im Gegensatz zu dem aus dem Blutkuchen erhaltenen Serum, das wir einfach als „Serum“ bezeichnen. Die in der gleichen Tabelle mitgeteilten Versuche wurden jeweils mit denselben Reagentien (Serozym, Plasma etc.) vorgenommen. Zum Verständnis der Tabellen sei noch bemerkt, daß die Cytozymierung jeweils mit dem in der ersten Kolonne der gleichen Zeile genannten Serum vorgenommen wurde.

Protokoll 6. Menschenblut (Venenpunktion am Arm).

Cytozymiert mit	Bakterien	Kaolin
Serum	2'	1½'
Citratserum	10'	20'
unvorbehandelt	35' ±	60'

Serozym allein 60'.

Protokoll 7. Menschenblut G. (durch Venenpunktion gewonnen).

Cytozymiert mit	Sera als Cytozym		Bakterien		Kaolin	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	0,05
NaCl-Serum ²⁾	1½'	3'	5'	32' Aggl.	5'	22'
Oxalatserum	75'	80'	75' ±	—	—	—
Serum	32'	40' ±	12'	40' Aggl.	30'	75' ±
Unvorbehandelt	—	—	40' Aggl.	—	75' ±	—

Serozym allein 90'.

Aggl. bedeutet: Agglutination der Bakterien, ein Phänomen, welches häufig bei ausbleibender Gerinnung eine ganz geringe Thrombinanwesenheit verrät.

1) Diese Gesetzmäßigkeit kommt deutlich nur dann zum Ausdruck, wenn Serumproben des gleichen Individuums, deren Cytozymgehalt in der oben angegebenen Weise variiert wurde, verwendet werden. Benutzt man Seren verschiedener Herkunft, so erhält man mit Bakterien manchmal ungleiche Resultate. Auf die Erklärung dieser Befunde gehen wir später ein.

2) Das Blut wird im Verhältnis 9:1 mit 20-proz. NaCl-Lösung aufgefangen. Das Plasma durch Verdünnung 1:4 mit Aqua zur Gerinnung gebracht.

Protokoll 8. Hundeblut (Carotisblut).

Cytozymiert mit	Serum als Cytozym		Bakterien		Kaolin	
	0,3	0,1	0,5	0,2	0,2	0,1
Serum	7'	11'	2'	3'	2'	3 1/2'
Oxalatserum	75'	flüssig	24'	90'	26' ±	40'
Aquaserum	3'	3 1/2'	3'	4 1/2'	1 1/3'	4 1/2'
Unvorbehandelt	—	—	—	40' ±	—	60' ±

Serozym allein 90'.

Protokoll 9.

Cytozymiert mit	Kaolin	Globuline des Serums (Dialyse)
Kaninchenserum I (Carotis)	4'	2'
Kaninchenserum II (Carotis)	2'	—
Kaninchen-Oxalatserum II (Carotis)	14'	—
Menschenserum (Vene)	1 1/2'	—
Hammelserum (Vene)	50' ±	40'
Unvorbehandelt	flüssig	—

Serozym allein 60'. Unvorbehandeltes Kaolin hemmt somit in diesem Fall (s. auch Protokoll 4).

Protokoll 10. Mit Hirudinplasma gelang die Cytozymierung nicht, die damit vorbehandelten Bakterien hemmen die Gerinnung, wohl durch Absorption geringer Hirudinmengen:

Cytocymiert mit	Serum als Cytozym		Bakterien	Kaolin
	0,2	0,1		
Kan.-Serum XII (Carotis)	10'	22'	1 1/2'	5'
Kan.-Hirudinplasma XII	flüssig	flüssig	40'	10'
Unvorbehandelt	—	—	12'	flüssig

Bevor wir die Abhängigkeit der cytozymierenden Funktion des Serums von seinem Cytozymgehalt erkannten, haben wir eine größere Anzahl Tier- und Menschensera (letztere zum Teil bei verschiedenen Krankheiten) auf ihre cytozymierende Fähigkeit gegenüber Bakterien quantitativ untersucht. Da wir jetzt wissen, daß dieselbe durch den Cytozymgehalt des Serums bestimmt wird und somit von der Art der Serumgewinnung abhängt, möchten wir solchen Bestimmungen vorläufig keinen Wert beimessen und verzichten deshalb auf die Mitteilung der diesbezüglichen Protokolle¹⁾.

1) Wir werden in einer späteren Mitteilung zeigen, daß bei Berücksichtigung der Art der Blutentnahme und der Gerinnungsverhältnisse die von uns benutzte Methode der Cytozymierung gestattet, den Cytozymgehalt des Blutplasmas zu bestimmen.

Die Beziehung zwischen Cytozymgehalt des Serums und seiner cytozymierenden Funktion erhellt noch weiter aus folgenden Versuchen, in welchen durch Zusatz von Cytozym-extrakten das Cytozym im Serum vermehrt wurde.

Protokoll 11. Kaninchenblut (Carotis).

Bakterien und Kaolin werden mit folgenden Seren resp. Plasmen digeriert (Probe I—V): Zu 2 ccm Oxalatplasma wurde vor der Rekalzifizierung 0,4 ccm Blutplättchenextrakt¹⁾ zugesetzt (Probe I). Die gleiche Menge Oxalatplasma wurde ohne Zusatz zur Gerinnung gebracht, 0,4 ccm Plättchenextrakt aber nachträglich zum ausgepressten Serum zugesetzt (Probe II). Eine dritte Probe mit 0,4 NaCl diente als Kontrolle (Probe III). Ein vom gleichen Tier stammendes, gewöhnlich erhaltenes Serum wurde ebenfalls mit und ohne Plättchenextrakt geprüft (Probe IV und V). Schließlich wurden Bakterien und Kaolin direkt (ohne Serum) mit Plättchenextrakt cytozymiert.

Cytozymiert mit	Direkt auf Cytozym geprüft		Bakterien	Kaolin
	0,2	0,1		
Oxalat- serum { Probe I	5'	5 $\frac{1}{2}$ '	55'	50'
{ Probe II	2 $\frac{1}{2}$ '	4 $\frac{1}{2}$ '	50'	40'
{ Probe III	7 $\frac{1}{2}$ '	8'	70'	70'
Serum { allein IV	2 $\frac{1}{2}$ '	4'	7'	15'
{ mit Blutplättchen V	1 $\frac{1}{2}$ '	2'	—	—
Blutplättchen allein	—	—	20'	6'
Unvorbehandelt	—	—	155'	165'

Serozym allein 170'.

Protokoll 12. Menschenblut H. (Venenpunktion am Arm). Technik und Bezeichnungen wie im vorigen Versuch.

Vorbehandelt mit	0,2 Serum direkt auf Cytozym geprüft	Bakterien	Kaolin
Oxalat- serum { Probe I	4'	17'	17'
{ Probe II	3'	4'	4'
{ Probe III	70'	70'	70'
Serum { allein	70'	70'	70'
{ mit Plättchen	3'	4'	4'
{ Plättchen allein	3'	8'	4'

Serozym allein: 2^h flüssig.

1) Hergestellt nach Bordet-Delange: Die durch fraktioniertes Zentrifugieren erhaltenen Blutplättchen werden in Aqua (Bordet empfiehlt konzentrierte NaCl-Lösung) aufgeschwemmt, einige Stunden digeriert, einige Minuten im Wasserbad gekocht und gut zentrifugiert.

Protokoll 13. Oxalatserum (Kaninchen, Carotis) wird mit 0,5 Alkohol-Hundeleberextrakt¹⁾ als Cytozym versetzt. Kontrolle: Oxalatserum + 0,5 NaCl; Hundeleberextrakt 0,5 + 0,5 NaCl. Cytozymierung wie gewöhnlich. Die Bakterien werden 1mal gewaschen.

Vorbehandelt mit	Bakterien
Oxalatserum + Leberextrakt	3'
Oxalatserum allein	fl. *
Leberextrakt allein	fl. *

* beobachtet 30'.

Protokoll 14. Kaninchenblut (Carotis). Technik wie vorher (ohne Waschen der Suspension).

Vorbehandelt mit	Bakterien	Kaolin
Oxalatserum + Leberextrakt	6'	17'
Oxalatserum allein	120' ±	120' ±
Leberextrakt	120' +	5'

Protokoll 15. Meerschweinchenblut (Carotis). Technik wie Versuch 14. Als Cytozym wässriger Blutplättchenextrakt.

Vorbehandelt mit	Bakterien
Oxalatserum + Blutplättchenextrakt	8'
Oxalatozym allein	50'
Blutplättchenextrakt allein	30'

Diese Versuche zeigen, daß die cytozymierende Funktion *ceteris paribus* von der Cytozymmenge des Serums abhängig ist.

Setzt man das Cytozym in Form von Extrakten dem Plasma vor der Gerinnung zu, so verschwindet davon ein Teil bei der Gerinnung. Der Cytozymgehalt und die cytozymierende Fähigkeit des Serums sind dann geringer, als wenn die gleiche Menge Cytozym nach der Gerinnung zugesetzt wird, aber immer stärker als bei Oxalatserum ohne Zusatz.

Die Abnahme des Cytozyms bei der Gerinnung könnte zum Teil auch auf Adsorption desselben an dem Oxalatniederschlag beruhen, welcher beim Rekalzifizieren auftritt und mit dem Koagulum entfernt wird. Wird dieser Niederschlag abzentrifugiert, so kann man an ihm Cytozymcharakter nachweisen. Dies geht auch aus folgendem Protokoll hervor:

1) Der aus frisch zerriebener Leber dargestellte Extrakt (s. Mitt. I) wird vor Gebrauch im Verhältnis 1:20 mit phys. Kochsalzlösung versetzt. Die leicht opaleszierende Mischung stellt ein vorzügliches Cytozym dar.

1,5 ccm Kaninchenserum + 0,1 ccm 1 Proz. Na-Oxalat + 0,1 ccm 1 Proz. CaCl₂. Nach kurzem Stehen abzentrifugiert. Der Bodensatz, in CaCl₂-NaCl-Lösung aufgeschwemmt, macht Gerinnung nach 2', eine Kontrolle mit dem gleichen aber in phys. NaCl-Lösung erzeugten Niederschlag ist ohne Einfluß. Der Cytozymcharakter des Serums zeigt eine Abnahme; unbehandeltes Serum 0,2 bringt nach Serozymzusatz das Plasma nach 5', das behandelte Serum nach 8' zur Gerinnung.

Die Cytozymierung wird auch dann nicht verhindert, durch Oxalatzusatz die Ionisierung der Ca-Salze aufgehoben ist. Oxalatplasmen können die Suspensionen ebenfalls cytozymieren (s. Prot. 16). Da der Grad der Cytozymierung von der Cytozymmenge abhängt, haben wir dadurch ein Mittel gewonnen, um den Cytozymgehalt indirekt schon im Plasma zu bestimmen. (Eine direkte Messung des Cytozyms im Oxalatmedium ist unmöglich, da in demselben die Verbindung des Cytozyms mit einem aus-titrierten Serozym verhindert ist. Die Gerinnungszeit des Plasmas nach seiner Rekalzifizierung würde ebenfalls kein brauchbares Maß geben, da sie sowohl vom Cytozym wie vom Serozymgehalt des Plasmas abhängig ist)¹⁾.

Protokoll 16.

a) Menschenblut G.

Vorbehandelt mit	Bakterien	Kaolin
Serum	5 $\frac{1}{2}$ '	2 $\frac{1}{2}$ '
Oxalatplasma	10'	28'
Oxalatserum	fl.	50'

b) Menschenserum I und II (je 0,5 ccm + 0,2 Bakteriensuspension + 0,1 Oxalatlösung). Kontrolle: dto., statt Oxalatlösung aber NaCl-Lösung.

Vorbehandelt mit	Bakterien	
	in Oxalat	in NaCl
Menschenserum I	2 $\frac{1}{2}$ '	2'
Menschenserum II	2 $\frac{1}{2}$ '	2'

1) Wir haben die Methode der indirekten Cytozymbestimmung angewendet, um die Veränderung des Cytozymgehaltes im Plasma bei Anaphylaxie zu untersuchen. Bei 2 daraufhin geprüften Hunden war die Cytozymmenge im Shock bei vollkommenen ungerinnbarem Blut deutlich erhöht. Bei Meerschweinchen waren keine Differenzen zu konstatieren. Herabsetzung der Blutgerinnbarkeit im Shock haben wir bei Meerschweinchen allerdings nicht gefunden. Die von anderen Autoren beschriebene Herabsetzung ist vielleicht doch auf Dyspnoë zurückzuführen. Ueber die Versuche wird bald berichtet werden.

Wir sehen, daß das Oxalatplasma besser cytozymiert als das zugehörige Oxalatserum. Das entspricht dem oben erwähnten Befund, daß bei der Gerinnung ein Teil des Cytozims verschwindet, wodurch die cytozymierende Eigenschaft des Serums abnimmt.

Cytozymiert man Bakterien oder Kaolin mit frischem Serum und prüft die Abgüsse nach dem Abzentrifugieren der Bakterien, so findet man in der Regel eine Abnahme der cytozymierenden Fähigkeit. Ein bereits mit Bakterien digeriertes Serum cytozymiert schlechter sowohl Bakterien wie Kaolin und umgekehrt. Bei Digerierung des Serums mit einer Bakterienart (z. B. prodigiosus) nimmt die cytozymierende Fähigkeit auch gegen andere Bakterien (z. B. Paratyphus) sowie für Kaolin ab. Hierzu parallel geht eine Verminderung des Cytozymgehaltes des Serums selbst (direkt mit Serozym gemessen).

Protokoll 17. 1 ccm Hundeserum wird mit 0,2 ccm Aufschwemmung von *Bact. prodigiosus* digeriert. Die Bakterien wurden nach einer Stunde abzentrifugiert (= Bact. I). Der Abguß wird wieder mit 0,2 ccm Bakterienaufschwemmung versetzt, nach einer Stunde die Bakterien abzentrifugiert (= cytozymierte Bakterien II) etc.

Die Bakterienbodensätze werden in 1,5 ccm Ca-NaCl aufgenommen, davon 0,5 als Cytozym geprüft.

Cytozymierte Bakterien		
I	II	III
2 $\frac{1}{2}$ '	18' Aggl. 25' \pm	28' \pm

Unbehandelte Bakterien + Serozym 35' \pm .

Protokoll 18. 3,0 ccm Kaninchenserum mit 3 Tropfen einer dichten Bakterienaufschwemmung. Nach einer Stunde abzentrifugiert. (Cytozymierte Bakterien I). Abguß wieder mit 3 Tropfen versetzt etc. wie Versuch 17.

Cytozymierte Bakterien			
I	II	III	IV
7'	18' \pm	15' \pm	15'

Nicht vorbehandelte Bakterien 30' \pm .

Protokoll 19. Hundeserum 2,0 4mal mit je 2 Tropfen einer dichten Bakterienaufschwemmung $\frac{1}{2}$, Stunde digeriert. Abzentrifugiert etc. wie Versuch 17.

Cytozymierte Bakterien			
I	II	III	IV
7'	14'	7'	17'

Unvorbehandelte Bakterien + Serozym 17'.

Protokoll 20. Je 1,0 Kaninchenserum wird versetzt mit 4 Tropfen Bakterien suspension von *B. paratyphi B* bzw. *B. prodigiosus*; abzentrifugiert. Von den Abgüssen wird je 0,5 auf cytozymierende Fähigkeit gegenüber der jeweils anderen Bakterienart geprüft.

	Prodigiosus	Paratyphus
cytozymiert mit nativem Serum	2'	2'
cytozymiert mit Abguß von Paratyphus	9'	9'
cytozymiert mit Abguß von Prodigiosus	16'	16'

Protokoll 21. Je 1 ccm Meerschweinchenserum wird versetzt mit 2 Tropfen Bakterien bzw. Kaolinaufschwemmung. Nach $\frac{1}{2}$, Stunde wird abzentrifugiert. Die Abgüsse werden auf Cytozymierung gegen Kaolin und Bakterien geprüft (je 0,5 mit einem Tropfen der Suspension).

	Bakterien	Kaolin
cytozymiert mit nativem Serum	15'	8'
cytozymiert mit Bakterienabguß	flüssig *	flüssig *
cytozymiert mit Kaolinabguß	flüssig *	flüssig *

* Beobachtet 1 Stunde.

Protokoll 22.

a) 1,5 ccm Meerschweinchenserum sowie aus demselben Serum dargestelltes Anaphylatoxin werden durch Dialyse gespalten. Globuline in 2 ccm Ca-NaCl aufgenommen und auf Cytozym geprüft.

Globuline aus nativem Serum	2'
aus Anaphylatoxin dargestellte Globuline	8'

Serozym nach 30' noch flüssig.

b) Menschenblut.

Cytozym der nativen Globuline	10'
Cytozym aus dem Bakterienabguß dargestellter Globuline	35'

Serozym allein nach 30' noch flüssig.

Protoll 23. Kaninchenblut (Carotis). Teils als Serum, teils als Oxalatserum aufgefangen; davon je 2,0 ccm mit 2 Tropfen Bakterien bzw. Kaolinsuspension versetzt. Nach $\frac{1}{2}$, Stunde abzentrifugiert. Von Abguß 0,2 und 0,1 auf 1,0 ccm mit Ca-NaCl-Lösung aufgefüllt und auf Cytozymgehalt direkt geprüft (Abg. Bakterium I bzw. Kaolin I). Der Rest wird

mit einem Tropfen Bakterien $\frac{1}{2}$ Stunde digeriert, abzentrifugiert (Abg. Bakt. II) etc.

	Vor der Behdlg.		Abg. Kaolin I		Abg. Kaolin II	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Serum als Cytozym	1 $\frac{1}{2}$ '	2 $\frac{1}{2}$ '	3 $\frac{1}{2}$ '	6 $\frac{1}{2}$ '	3 $\frac{1}{2}$ '	3 $\frac{1}{2}$ '
Oxalatserum als Cytozym	9'	18'	11'	18'	16'	18'

Serozym allein 18'.

Das Kaolin wurde in diesem Falle durch Kaolinabguß I ebenso stark cytozymiert wie durch unvorbehandeltes Serum (3').

Protokoll 24. Kaninchenblut (Carotis). Technik und Bezeichnung wie in vorhergehendem Versuch.

	Vor der Behandlg.		Bakt.-Abguß I		Kaolinabguß I	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Carotisserum	10'	22'	23'	35'	11'	29'
NaCl-Serum	11'	19'	14'	—	16'	15'
Hirudinplasma	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig

Serozym allein 40'.

Protokoll 25.

a) Menschenblut, Technik wie Versuch 23.

	Vor der Behandlg.		Bakt.-Abguß I		Kaolinabguß I	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Serum	2'	2 $\frac{1}{2}$ '	2'	3 $\frac{1}{2}$ '	3 $\frac{1}{2}$ '	5'

b) Menschenblut.

	Vor der Behandlg.		Bakt.-Abguß I		Kaolinabguß I	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Citratserum	4 $\frac{1}{2}$ '	7'	4 $\frac{1}{2}$ '	12'	5'	—
Oxalatserum	39'	39'	15'	17'	30'	39'
Serum	4'	4'	4'	7'	4'	11'

Protokoll 26. Menschenblut.

	Vor der Behandlg.		Bakt.-Abguß I		Kaolinabguß	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2
Serum	32'	40'	35'	50'	50'	90'
NaCl-Serum	1 $\frac{1}{2}$ '	3'	1 $\frac{1}{2}$ '	3'	1 $\frac{1}{2}$ '	3'
Citratserum	10'	25'	21'	27'	21'	65'
Oxalatserum	75'	80'	45'	65'	100'	100'

Serozym allein 90'.

Die mit NaCl-Serum cytozymierten Bakterien bzw. Kaoline bewirken Gerinnung nach 5', die mit anderen Seren behandelten wirken entsprechend dem geringeren Cytozymgehalt der Sera schwächer (20' und 70').

Protokoll 27. Hundeblut (Carotis).

	Vor der Behandlung		Bakterien-Abguß I		Kaolin-abguß I		Cytozymierte Bakterien		Cytozymiertes Kaolin	
	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
Serum	4'	8½'	14'	15'	7'	10'	1½'	2¼'	1½'	2'
Oxalatser.	85'	fl.	fl.	fl.	fl.	fl.	24' ±	90'	26' ±	40'
Aquaser.	3'	3½'	3'	6'	1½'	4'	3'	4½'	1½'	4½'

Serozym allein 45' ±.

Es ergibt sich somit, daß bei fortgesetzter Cytozymierung die cytozymierende Fähigkeit eines Serums abnimmt. Es fällt allerdings auf, daß manchmal wieder eine gewisse Steigerung bei der zweiten oder dritten Absorption zu konstatieren ist. Diese Steigerung könnte vielleicht dadurch bedingt sein, daß die zuerst zugesetzten Bakterien auch hemmende Substanzen absorbieren.

Die Versuche zeigen außerdem, daß der direkt meßbare Cytozymgehalt eines Serums bei der Cytozymierung in der Regel abnimmt. Diese Abnahme ist oft gering und manchmal nur bei schwächeren Dosen sichtbar. Bei sehr cytozymhaltigen Seren ist diese Verminderung oft kaum bemerkbar, trotzdem gerade solche Sera die Bakterien, Kaolin etc. stark cytozymieren (Protokoll 25 a, 27 Aquaserum). Bei Oxalatseren tritt, wenn auch selten, eine Zunahme des Cytozymcharakters auf (25 b). Es ist möglich, daß ein Teil der Bakterien oder des Kaolins im Serum bleibt, wofern nicht eine Absorption von hemmenden Stoffen stattfindet. Diese Fälle gehören aber zu den Ausnahmen. Meistens sind die Abgüsse ärmer an Cytozym als das ursprüngliche Serum.

Wir konstatieren somit folgendes:

a) Cytozymarme oder cytozymfreie Sera cytozymieren schlecht oder gar nicht.

b) Ein Serum cytozymiert um so besser, je mehr Cytozym es enthält.

c) Durch Zusatz von Cytozym in Form eines wässrigen Blutplättchen- oder alkoholischen Leberextraktes lassen sich schlecht cytozymierende Sera so verändern, daß sie nachträglich gut cytozymieren.

d) Bei der Cytozymierung findet in der Regel eine Abnahme des Cytozyms im Serum statt.

Diese Tatsachen lassen sich nicht anders deuten, als daß die Bakterien und das Kaolin das im Serum vorhandene Cytozym an sich reißen und dadurch in seiner Wirkung verstärken.

Die Suspensionen bewirken an sich keine beschleunigte Gerinnung, erst infolge ihrer Cytozymierung rufen sie verstärkte Thrombinbildung hervor.

C. Ueber die Cytozymierung von Organzellen und über das Wesen der thromboplastischen Substanzen.

In den folgenden Versuchen wurde das Verhalten verschiedener Zellemlusionen gegenüber cytozymiefenden Flüssigkeiten untersucht.

Protokoll 28: Ein Meerschweinchen bekommt eine Aufschwemmung von Aleuronatbouillon intraperitoneal. 6 Stunden später wird das Exsudat gewonnen, die Leukocyten gewaschen.

Hodenaufschwemmung von Meerschweinchen, fein zerrieben, durch Gaze filtriert.

Cytozymierung mit Menschenserum 0,5 ccm.

Leukocytenaufschwemmung bzw. Hodenbrei 0,4 ccm.

Leukocyten		Hodenaufschwemmung	
cytozymiert	ohne Vorbehandlung	cytozymiert	ohne Vorbehandlung
12'	23' ±	3'	4 ¹ / ₂ '

Serozym allein 100' ±.

Das von den Zellen befreite Exsudat cytozymiert nicht.

Protokoll 29: Leukocyten gewonnen wie im vorigen Versuch. Spermatozoen aus Nebenhoden von Ratten, gewaschen.

Die Zellen wurden 2 Minuten lang im kochenden Wasser gehalten (Sperma koagulierte dabei).

Cytozymierung mit Menschenserum nach der üblichen Technik.

	Frisch und unbehandelt	Frisch und cytozymiert	Gekocht und unbehandelt	Gekocht und cytozymiert
Leukocyten	60' ±	45'		8'
Spermatozoen ¹⁾	6'	5'	15'	5'

Cytozymierte Leukocyten, 2 Minuten gekocht, werden in ihrem Cytozymcharakter nur unwesentlich abgeschwächt.

1) Nach Nolf sind isolierte Zellen, wie Spermatozoen, nicht wirksam. Wir können, wie aus dem Protokoll hervorgeht, diese Angabe nicht bestätigen.

Protokoll 30: Meerschweinchenorgane, zerkleinert in Hackmaschine, Brei zweimal gewaschen. 0,5 g des betreffenden Organbreies mit 3 ccm NaCl. Davon 0,25 Teile + 0,75 Teile frisch bzw. gekocht verwendet.

Cytozymiert mit Kaninchenserum (0,5 Serum, 0,25 Organbrei, 0,75 NaCl).

	Frische Zellen		Gekochte Zellen		Abguß aus Serum	
	ohne Behandlung	cytozymiert	ohne Behandlung	cytozymiert	mit frischen Zellen	mit gekocht. Zellen
Leber	13'	4'	3'	2'	30'	5'
Milz	60' ±	4'	6'	2'	5'	5'
Niere	22'	4 ^{1/2} '	4'	3'	120'	5'
Lunge	60' ±	6'	4'	3'	120'	120'
Herz	7'	4'	3 ^{1/2} '	3'	120'	100'

Kaninchenserum 0,5 + Serozym 100'.

Protokoll 31: Meerschweinchenorgane. Technik wie vorher.

	Frische		Gekochte	
	ohne Vorbehandl.	cytozymiert	ohne Vorbehandl.	cytozymiert
Hoden	40' ±	35'	11'	5'
Leber	60' ±	8'	60'	5'
Lunge	60' ±	40' ±	60'	8'
Muskel	60'		60'	18' ±
Milz	60' ±	60' ±	6'	15'
Niere	60' ±	30'	60' ±	18'
Sperma	45' ±	35' ±	45'	30' ±

Wie aus den vorhergehenden Protokollen 28—31 zu ersehen, lassen sich auch Organzellen cytozymieren. Die Cytozymierung ist um so deutlicher erkennbar, je weniger Cytozym die betreffenden Organzellen an sich selbst enthalten. So koagulieren die Milz- und Lungenzellen in Protokoll 30 erst in 60 Minuten, nach der Cytozymierung aber in 4 resp. 6 Minuten. Wir haben bei fast allen Zellarten eine mehr oder weniger ausgesprochene Cytozymierung erhalten. Von einem gewissen Interesse für die Gerinnungsphysiologie sind Versuche, welche mit solchen Zellen vorgenommen wurden, die im Kreislaufe vorhanden sind, wie z. B. Leukocyten¹⁾. Sie ergaben, daß die Leukocyten sich cytozymieren lassen, daß sie demnach bei der

1) Die roten Blutkörperchen erwiesen sich zu Cytozymierungsversuchen wenig geeignet, da sie auch nach wiederholtem Waschen als starkes Cytozym wirkten; ob ihnen diese Wirkung an sich (dank ihrer Lipoidhülle?) oder infolge von beigemischten Zerfallsprodukten der Blutplättchen zukommt, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Gerinnung eine Rolle spielen könnten. Bordet und Delange haben festgestellt, daß die aus der Peritonealhöhle gewonnenen Leukocyten nur ein schwaches Cytozym sind und leugnen daher eine wesentliche Rolle derselben bei der Gerinnung. Trotzdem die Leukocyten sich in bezug auf ihren Cytozymgehalt mit Blutplättchen nicht vergleichen können, ist ihnen eine gewisse Bedeutung in dem Sinne nicht abzusprechen, daß sie während der Gerinnung das im Blut in Freiheit gesetzte Cytozym aufnehmen und dadurch zu Cytozym werden können. Aehnliche Resultate mit anderen Zellen zeigen, daß die Zellen ganz allgemein die Fähigkeit besitzen, cytozymiert zu werden; sobald genügende Mengen von Zerfallsprodukten in ihrer Umgebung vorhanden sind, reichern sie diese an ihrer Oberfläche an und können so zu einem Gerinnungszentrum werden.

Wir haben somit festgestellt, daß Suspensionen, wie Pulver, Orgazellen, Bakterien, Präzipitate, durch Behandlung mit cytozymhaltigen Seren Cytozymcharakter erwerben resp. den ihnen an sich zukommenden Cytozymcharakter verstärken. Dies geschieht dadurch, daß sie sich mit dem Cytozym verbinden bzw. es an ihrer Oberfläche adsorbieren, wodurch eine stärkere Wirksamkeit desselben bedingt ist. Die größere Wirksamkeit des an Suspensionen gebundenen Cytozyms ergibt sich auch daraus, daß die relative Abnahme an Cytozym in solchen Seren, die man mit Suspensionen behandelt hat, geringer ist, als man nach der starken Wirksamkeit der cytozymierten Suspensionen anzunehmen geneigt wäre.

Daß Suspensionen tatsächlich sich mit dem Cytozym verbinden und dadurch zum Cytozym werden, folgt daraus:

1) daß sie um so stärker cytozymiert werden, je cytozymreicher das zur Behandlung gewählte Substrat ist. Cytozymfreie Substrate, z. B. die meisten Oxalatsera, cytozymieren nicht.

2) Daß die Substrate nach der Behandlung mit Suspensionen cytozymärmer sind, sobald die Suspensionen durch Zentrifugieren entfernt werden.

3) Daß die cytozymierten Suspensionen nur unter solchen Bedingungen zu Thrombinbildung Veranlassung geben, unter welchen das Cytozym wirken kann, also nur im Ca-haltigen, nicht im Oxalatmedium.

Wir sehen somit, daß die Suspensionen nur dadurch wirken, daß sie zu Cytozym werden. Wo die Verhältnisse so liegen, daß sie nicht cytozymiert werden oder nicht als Cytozym wirken können, läßt sich eine gerinnungsbeschleunigende Wirkung der Pulver nicht feststellen. Nicht selten konnten wir im Gegenteil unter solchen Verhältnissen durch Kaolinzusatz eine Hemmung der Gerinnung beobachten.

Nolf bezeichnet im allgemeinen diejenigen Substanzen als thromboplastisch, welche die Gerinnung wesentlich beschleunigen, ohne für dieselbe absolut notwendig zu sein. Die Pulver gehören nach Nolf zu den thromboplastischen Substanzen; nach unseren Versuchen beruht die ihnen zukommende gerinnungsfördernde Eigenschaft nur darauf, daß sie Cytozym an ihrer Oberfläche anreichern und so selbst zu Cytozym werden. Der Begriff der thromboplastischen Substanzen deckt sich im zellfreien Plasma nach unserer Ueberzeugung mit dem Begriffe der cytozymierbaren Substanzen¹⁾.

Die thromboplastischen Substanzen lassen sich prinzipiell von Cytozym dadurch unterscheiden, daß das letztere mit Oxalatserozym immer Thrombin bildet, die thromboplastischen Substanzen aber nur dann, wenn das betreffende als Serozym verwendete Serum noch Cytozym enthält, durch welches sie selbst zum Cytozym werden. So erklären sich die Befunde, warum manche Substanzen das Vogel- oder das rekalkifizierte Fluor- oder Oxalatplasma nicht beeinflussen, während sie das stabile Pferdeplasma zur Gerinnung bringen. Im ersten Falle fehlt das Cytozym, welches das an sich indifferente Pulver erst wirksam macht.

Die gewöhnlichen Organzellen enthalten in verschiedener Menge Cytozym, das mit Serozym unter Thrombinbildung reagiert. Außerdem haben sie die Eigenschaft, cytozymiert zu werden, d. h. durch Anreicherung des Cytozyms gerinnungs-

1) Im gesamten Blut oder in einem zellhaltigen (plättchenhaltigen etc.) Plasma können verschiedene Substanzen auch dadurch die Gerinnung beschleunigen, daß sie eine stärkere Abgabe von Cytozym (durch Sekretion oder Zerfall der Zellen) veranlassen.

beschleunigend zu wirken. In dieser Beziehung stimmen wir der Ansicht Nolf's zu, daß den Organzellen auch thromboplastische Wirkungen zukommen. Hower und Böttger glaubten die gerinnungsbeschleunigende Wirkung der Organe mit derjenigen der Pulver vollständig identifizieren zu können, was aber nach dem Gesagten nicht angeht. Ein cytozymfreies Oxalatserum bildet unter dem Zusatz von reinen thromboplastischen Substanzen kein Thrombin, wohl aber nach Zusatz einer Zellenemulsion. Diese enthält eben an sich Cytozym, wodurch sie mit dem Serum unter Thrombinbildung reagieren kann. Cytozymfreies Oxalatserum eignet sich somit zur Differenzierung der spezifischen Wirkung eines Cytozyms von der bloß indirekten Wirkung der thromboplastischen Substanzen. Unter Cytozym verstehen wir daher ganz allgemein solche Substanzen, die mit einem (rekalzierten) cytozymfreien Oxalatserum, z. B. Hammelserum etc., Thrombin bilden. Wenn wir den Ausdruck „Cytozym“ beibehalten, so geschieht es, weil diese Substanzen hauptsächlich in den Zellen vorhanden sind. Das Cytozym wird aber auch im Serum angetroffen und stammt von dem die Blutgerinnung begleitenden Zellzerfall her. Ob Cytozym im Plasma des strömenden Blutes vorhanden ist, ist noch strittig. Nolf nimmt an, daß es sich auch im Kreislauf findet, unserer Ansicht nach mit Recht, da die Hauptlieferanten des Cytozyms im Blut, die Blutplättchen, auch in vivo andauernd zerfallen. Der Versuch von Bordet und Delange, daß Plasmen, bei welchen die Blutplättchen durch Durchleiten von Kohlensäure agglutiniert und entfernt werden, kein Cytozym enthalten, woraus die Autoren schließen, daß im Plasma gelöstes Cytozym nicht vorkommt, läßt sich nach den in der I. Mitteilung niedergelegten Beobachtungen auch so erklären, daß gelöstes Cytozym mit den durch die Kohlensäure ausgefällten Globulinen mitgerissen wird.

Wir haben auf Grund der Tatsache, daß Kaolin auch im Oxalatmedium cytozymiert wird, die Anwesenheit von Cytozym im Oxalatplasma nachweisen können. Dies erlaubt aber keine Schlüsse auf den Cytozymcharakter des zirkulierenden Plasmas, da auch bei der schonendsten Blutgewinnung ein Plättchenzerfall eingetreten sein kann.



II. Ueber die Gesetzmäßigkeiten der Cytozymierung der Suspensionen.

A. Einfluß der Inaktivierung etc.

Inaktiviert man das Serum, so verschwindet das Cytozym desselben, gleichzeitig verliert das Serum ganz oder teilweise die Eigenschaft, die Bakterien zu cytozymieren. Die Abnahme der cytozymierenden Fähigkeiten gegenüber Kaolin tritt zwar oft ein, manchmal wird sie aber vermißt.

Protokoll 32. a) Bakterien- und Kaolinaufschwemmung mit aktivem und inaktivem Serum cytozymiert.

Vorbehandelt mit	Bakterien	Kaolin	0,2 ccm des betr. Serums
mit akt. Kaninchenserum	4'	8'	—
mit inakt. Kaninchenserum	40' ±	60' ±	—
mit akt. Meerschweinchenserum	5'	10'	10'
mit inakt. Meerschweinchenserum	flüssig	flüssig	flüssig

b) Eine Bakterien- und Kaolinsuspension wird mit aktivem und inaktivem Meerschweinchenserum in gewöhnlicher Weise cytozymiert. Als Vergleich dient wässriger Leberextrakt sowie unbehandelte Bakterien und Kaolin.

Vorbehandelt mit	Bakterien	Kaolin	Einmal in NaCl-Lösung gewaschen	
			Bakterien	Kaolin
Serum aktiv	3'	3'	12'	14'
Serum inaktiv	12'	3'	30'	12'
Leberextrakt	10'	1'	30'	1'
Unbehandelt	80' ±	80' ±	—	—

Cytozymgehalt des aktiven Serums: 5'
 „ „ inaktiven Serums: 80'

Die Tatsache, daß das Cytozym des Serums thermolabil ist, schließt einen Widerspruch in sich, da das Serum den Cytozymcharakter hauptsächlich den Blutplättchen verdankt, die thermostabil sind. Der Vorgang der Reaktivierung zerstört aber unserer Ansicht nach nicht das Cytozym, sondern verdeckt es nur. Setzt man nämlich zum inaktiven Serum frische Blutplättchenextrakte und behandelt damit Kaolinsuspensionen, so nimmt das Kaolin die dargebotenen Plättchenextrakte nicht mehr auf. Das zeigt, daß hemmende Vorgänge bei der Inaktivierung auftreten, die die Wirksamkeit des Cytozyms verdecken. Andererseits haben wir oft Sera gesehen — Versuch 32b demonstriert einen solchen Fall — wo das Cytozym bei der Inaktivierung anscheinend verloren gegangen ist, und wo wir trotzdem durch die Cytozymierung des Kaolins seine Anwesenheit zeigen konnten.

während die cytozymierende Fähigkeit gegenüber Bakterien gelitten hat. Wir werden nächstens darauf genauer eingehen.

Auch in anderer Weise unterscheidet sich das Kaolin hinsichtlich seiner Cytozymierung von den Bakterien. In Versuch 32 sowie in mehreren der früher abgedruckten Protokolle ist erkennbar, daß Kaolin durch künstlich dargestellte Cytozymemulsionen sehr stark, Bakterien hingegen nur wenig cytozymiert werden.

So hat in Vers. 14 der Leberextrakt die Bakterien fast nicht beeinflußt und erst in Anwesenheit von Serum auf dieselben gewirkt. Bei Kaolin ist das Gegenteil der Fall, hier hat der Serumzusatz die Cytozymadsorption sogar gehemmt. Auch in Prot. 11 zeigen sich die Bakterien durch Blutplättchenextrakt (ohne Serum) weniger beeinflußt als dies bei Kaolin der Fall ist¹⁾.

Kaolin vermag somit Cytozym direkt an sich zu reißen. Die Bakterien werden hingegen in Abwesenheit von Serum nur schlecht cytozymiert.

Ein cytozymfreies Oxalatserum cytozymiert Bakterien und Kaolin, wie erwähnt, nicht; Cytozymextrakte wirken auf Bakterien ebenfalls nur schwach. Mischt man aber einen solchen Extrakt mit einem allein nicht cytozymierenden Serum, so wird eine starke Cytozymierung der Bakterien erzielt (Prot. 13, 14, 15, 33, 34). Daraus folgt, daß die Cytozymierung der Bakterien ein Vorgang ist, zu welchem sowohl die Mitwirkung eines frischen Serums wie Anwesenheit von Cytozym gehört.

Protokoll 33. Menschenblut H.

Vorbehandelt mit	Bakterien
Oxalatserum 0,5 + 0,5 NaCl	35' ±
Oxalatserum 0,5 + Leberextrakt 0,5	12'
NaCl 0,5 + Leberextrakt 0,5	27' ±

Protokoll 34. 0,2 einer Suspension von Bact. prodig. werden mit je 0,5 ccm verschiedener Cytozymemulsionen versetzt, und zwar mit alkohol. Leberextrakt (1 : 20 NaCl), wässrigen Blutplättchen und wässrigem Leberextrakt.

1) Betonen möchten wir, daß diese Gesetzmäßigkeit bloß bei genauem quantitativen Arbeiten zum Ausdruck kommt. Benutzt man z. B. zu starke Cytozymlösungen, so wird der Unterschied weniger deutlich.

Gleichzeitig werden die Bakterien mit einer Mischung der betreffenden Cytozymextrakte mit Oxalatserum cytozymiert.

Behandelt mit	Bakterien
Oxalatserum allein	180'
do. + alk. Leberextrakt	7'
do. + Blutplättchenextrakt	15'
do. + wässer. Leberextrakt	165' ±
alk. Leberextrakt allein	13'
Plättchenextrakt allein	120'
wässer. Leberextrakt allein	165' ±

Es zeigt sich somit, daß bei gleichzeitiger Einwirkung von frischen Serums mit alkoholischen Leber- oder Plättchenextrakt eine stärkere Cytozymierung erreicht wird als durch die Extrakte allein; der wässrige Leberextrakt erwies sich als unbrauchbar.

B. Einfluß hypertotonischer Kochsalz- und physiologischer BaCl₂-Lösung auf die Cytozymierung der Suspensionen.

Da höherer Salzgehalt (2 Proz. NaCl) sowie Ba-Salze die thermolabilen Funktionen des Serums (Komplementtätigkeit, Anaphylatoxinbildung) herabsetzen oder aufheben, haben wir untersucht, ob auch die cytozymierende Funktion unter diesen Umständen paralysiert wird und welche Beziehungen überhaupt zwischen den erwähnten Salzhemmungen und der Cytozymierung bestehen.

Es ergab sich, daß 2-proz. Kochsalzgehalt und physiologische BaCl₂-Lösung die Cytozymierung der Bakterien in hohem Maße herabsetzen, während die Cytozymierung des Kaolins dadurch nicht beeinflußt wird.

Protokoll 35. Aufschwemmung von *B. prodig.* in physiologischer bzw. 4-proz. NaCl-Lösung wird mit frischem Meerschweinchenserum zu gleichen Teilen vermischt. Nach einer Stunde wird abzentrifugiert und in physiologischer bzw. 2-proz. NaCl-Lösung auf Cytozymierung geprüft.

Vorbehandelt in	Aufgeschwemmt in	Gerinnungszeit
physiol. NaCl-Lösung	physiol. NaCl	6 $\frac{1}{2}$ '
do.	2-proz. NaCl	flüssig
2-proz. NaCl-Lösung	physiol. NaCl	145'
do.	2-proz. NaCl	flüssig
unbehandelt	physiol. NaCl	145'

Serozym allein 145'.

Dieser Versuch zeigt neben der Verhinderung der Cytozymierung durch 2-proz. NaCl auch die bereits bekannte Hemmung der Serozymtätigkeit durch höhere Salzkonzentration: in 2-proz. NaCl blieb jede Thrombinbildung, auch aus cytozymierten Bakterien, aus.

Versuche über Cytozymierung von Kaolin in 2-proz. NaCl sowie über die Wirkung von Ba-Salzen auf Bakterien und Kaolin sind in Protokoll 35, 38, 39 mitgeteilt.

Auch bei der Cytozymierung spezifischer Präzipitate wurde die Salzhemmung untersucht, und zwar mit 2-proz. NaCl-Lösung, da diese die Cytozymierung in der Regel stärker verhindert als Baryum. Es zeigt sich, daß die Präzipitate sich manchmal wie Kaolin, manchmal wie Bakterien verhalten. Die Einzelheiten sind aus den Protokollen ersichtlich.

Besonders auffallend ist Versuch 37d, bei welchem das mit 1:1000 Rinderserum hergestellte Präzipitat sich wie Kaolin, das mit 1:10 und 1:100 Rinderserum erhaltene sich wie Bakterien verhielten. Dieser Befund war aber nicht durchgehend; in Versuch 37a haben wir Rinderserum ebenfalls in der Verdünnung 1:100 verwandt, die Cytozymierung verhielt sich aber diesmal ähnlich der des Kaolins, d. h. sie wurde durch 2-proz. NaCl nicht deutlich verhindert, während z. B. in Versuch 37c die Verhinderung eine ausgesprochene war.

Im selben Versuch wurde auch das Präzipitat ähnlich dem Kaolin durch eine reine Leberlipidemulsion stark cytozymiert.

Die Präzipitate scheinen somit eine Mittelstellung zwischen den beiden Gruppen einzunehmen, indem sie sich bald mehr wie Bakterien, bald mehr wie Kaolin verhalten.

Protokoll 37.

a) 20 ccm Rinderserum (1:100) + 5 ccm inaktives Kaninchenpräzipitin gegen Rinderserum (Titer 1:10 000). Das Präzipitat wird in 5 ccm NaCl aufgeschwemmt.

- I. 0,5 Meerschweinchenserum + 0,5 phys. NaCl + 0,25 Präzipitat
 II. 0,5 " " + 0,5 5-proz. " + 0,25 "
 III. 0,5 alk. Leberlipoidlös. (1:20) + 0,5 phys. " + 0,25 "

Cytozymiert 1 Stunde, abzentrifugiert und aufgeschwemmt in 1 ccm NaCl. Davon 0,4 ccm mit Serozym.

I	II	III	Präzipitat allein	Serozym allein
5'	8'	1'	120' ±	120' ±

b)

	Gerinnungszeiten
I. 0,5 Meersch.-Ser. + 0,1 ccm 20-proz. NaCl + 0,5 Präzipitat	25'
II. 0,5 " + 0,1 " phys. " + 0,5 "	8'
III. 0,6 NaCl " + 0,5 "	180'

c) Kaninchenserum (mit einigen Tropfen Lipoidextrakt).

I. 0,5 Serum + 0,1 20-proz. NaCl + 0,5 Präzipitat
II. 0,5 " + 0,1 phys. " + 0,5 "
III. 0,5 " + 0,1 20-proz. " + 0,5 Bakterienaufschwemmung
IV. 0,5 " + 0,1 phys. " + 0,5 "

I	II	III	IV
* über Nacht geronnen	12'	* über Nacht	10'

* Nach 3¹/₂ h noch flüssig.

Präzipitate ohne Vorbehandlung mit Plasma erst über Nacht geronnen.

d) Mit verschiedenen Mengen Antigen gewonnene Präzipitate werden auf ihre Cytozymierbarkeit verglichen.

Je 3 ccm Rinderserum (1:10, 1:100, 1:1000 mit Kochsalzlösung verdünnt) werden mit je 1,0 Präzipitin versetzt. Die Präzipitate abzentrifugiert* und in 1 ccm NaCl aufgeschwemmt.

0,5 Meersch.-Ser. + 0,1 20-proz. NaCl + 0,4 Präzipit.	1:10, 1:100, 1:1000
0,5 " + 0,1 phys. " + 0,4 " " "	" " " "

Mit Serum behandelt in	1:10	1:100	1:1000
physiologischer NaCl	6'	4'	4'
hypertonischer NaCl-Lös.	30'	60' ±	5 ¹ / ₂ '

* Nach 6^h langem Stehen im Eisschrank.

Wir haben außer Bakterien und Kaolin noch einige andere Suspensionen auf Cytozymierbarkeit und deren Beeinflussung durch 2-proz. NaCl oder physiologische BaCl₂ geprüft. Während ZnO, Kohle, Dextrin, Lycopodium, Talk etc. sich gleich dem Kaolin verhalten, müssen verschiedene Stärkemehlsuspensionen nach der Wirkung der erwähnten Salzhemmungen auf ihre Cytozymierung zu den Bakterien gestellt werden.

Protokoll 38. Von Kaolin und Reisstärkemehl wird je eine Aufschwemmung von 1:60 physiologischer Kochsalzlösung gemacht: außerdem wird eine dichte Aufschwemmung von Bact. prodigiosum hergestellt und 1' gekocht.

Gleiche Mengen dieser Suspension werden in physiologischer und in 2-proz. NaCl-Lösung sowie in physiologischer BaCl₂-Lösung durch frisches

Kaninchenserum (0,5 ccm) während $\frac{1}{3}$ bei 37° cytozymiert (wiederholtes Aufschütteln der Röhren mit Kaolin und Stärke). Hierauf wird zentrifugiert, der Bodensatz in 1,0 ccm CaCl₂-NaCl-Lösung aufgeschwemmt und davon je 0,2 ccm mit Serozym geprüft.

	Cytozymierung in		
	phys. NaCl-Lösung	2-proz. NaCl-Lösung	phys. BaCl ₂ -Lösung
Bakterien	7'	30' schwach	12'
Stärke	5'	30'	12'
Kaolin	4'	4'	4'

Während Kaolin durch die hemmenden Salze in seiner Cytozymierung unbeeinflusst ist, hat Stärkemehl sich ganz wie Bakterien verhalten.

Protokoll 39. 10-proz. Aufschwemmungen von Reisstärke [gewöhnlich und nach Entfettung in Aether (Soxleth)], ferner von Kaolin, und ZnO, sowie eine dichte Aufschwemmung von Bakterien (*B. paratyphi* B) werden in der Menge 0,5 ccm mit Meerschweinchenkomplement 0,5 ccm versetzt, zum Teil unter Zusatz von so viel einer 20-proz. NaCl-Lösung, daß eine 3,5-proz. Salzkonzentration resultiert. Aus der Tabelle ist in Kolonne 3 auch der Einfluß kurzen Kochens auf die in phys. NaCl-Lösung cytozymierten Suspensionen zu ersehen. Die Pulver wurden hierbei nach dem Abzentrifugieren aus dem Serum in CaCl₂-NaCl-Lösung aufgeschwemmt und gleiche Mengen 2' im Wasserbad gekocht (die Stärke ging dabei in Lösung).

Cytozymierte Suspension	Cytozymiert in		
	phys. NaCl-Lösung	3,5-proz. NaCl-Lösung	wie in Kolonne I aber 2' gekocht
Reisstärkemehl	8'	flüssig	flüssig
dto., entfettet	5'	"	"
Kaolin	2'	4'	7'
ZnO	35' ±	42' ±	—
Bakterien	3 1/2'	30'	4 1/2'

Da Stärke und Bakterien im Gegensatz zu den anorganischen Pulvern einen bestimmten Gehalt an Fetten und Eiweiß haben, welcher vielleicht für das eigenartige Verhalten dieser Gruppe bei der Cytozymierung eine Rolle spielen könnte, haben wir Reisstärke nach Entfettung sowie nach Enteiweißung geprüft.

Für die Herstellung eines eiweißfreien Stärkepräparates sind wir Herrn Prof. Dr. Winterstein zu großem Dank verpflichtet. Die Stärke wurde zuerst mit Aether entfettet,

hierauf durch Pepsin-HCl enteiweißt und schließlich mehrere Tage im strömenden Wasser gewaschen.

Protokoll 40. Reismehl, gewöhnlich, sowie nach Aetherentfettung und nach Enteiweißung wird als 10-proz. Suspension mit Meerschweinchen-serum cytozymiert¹⁾).

	In phys. NaCl-Lösung	In 2-proz. NaCl-Lösung
Stärke	17' ±	flüssig
dto. entfettet	6'	25' ±
dto. entfettet u. enteiweißt	21' ±	flüssig

Protokoll 41. Die gleichen Stärkepräparate und Bakterien wurden zuerst mit Kaninchenoxalatserum (1,0 auf 0,4 der Suspension) vorbehandelt, und zwar sowohl in phys. wie in 4-proz. NaCl. Nach Abzentrifugieren wird ein Teil der Bodensätze auf seinen Cytozymcharakter geprüft. Der Rest wird in einer Leberextraktemulsion (1:20) cytozymiert, davon wieder abzentrifugiert und wieder die gleiche Dose auf Cytozym geprüft. Als Kontrolle dienen gleiche Mengen der Suspensionen, welche ohne Serumvorbehandlung nur mit Leberextrakt cytozymiert sind.

Suspension	Nur mit Oxalatserum behandelt		Mit Oxalatserum vorbehandelt, mit Leberextrakt nachbehandelt		Kontrolle nur mit Leberextrakt behandelt
	in 1-proz. NaCl	in 4-proz. NaCl	vorbehand. in 1-proz. NaCl	vorbehand. in 4-proz. NaCl	
Bakterien	10'	60'	3'	14'	30'
Stärke	20'	25'	2'	6 1/2'	5'
dto. enteiweißt	flüssig	flüssig	3'	6'	7 1/2'

Auch bei getrennter Einwirkung des frischen Serums und des Cytozyms ist somit der Einfluß der Salzhemmung deutlich, wie ein Vergleich der Gerinnungszeiten von Kolonne 1 und 2, 3 und 4 zeigt.

Die Fett- oder Eiweißentziehung hat somit die Cytozymaffinität unseres Stärkepräparates nicht wesentlich verändert.

a) Einfluß von Lauge.

Gonzenbach und Hirschfeld fanden, daß durch Säuren und Laugen in starken Konzentrationen die Anaphylatoxinbildung verhindert werden kann. Der Säurezusatz bewirkt eine Fällung des Serums, wobei die gefällten Eiweiß-

1) Wir stellen uns eine Standardsuspension in 4-proz. NaCl her, welche vor Gebrauch mit Aqua oder mit 4-proz. NaCl-Lösung auf die gewünschte Salzkonzentration gebracht wird. Will man mit hypertonen Lösungen arbeiten, so versetzt man die in 4-proz. NaCl aufgeschwemmte Stärkesuspension $\bar{a}\bar{a}$ mit Serum, so daß eine Konzentration von 2,5 Proz. resultiert.

teilchen das Cytosym adsorbieren. Eine Prüfung auf Bakterien-cytosymierung wird dadurch unmöglich, da diese Teilchen mit den Bakterien abzentrifugiert werden und so eine Cytosymierung vortäuschen. Der Laugenzusatz setzt die Cytosymierung herab.

Protokoll 42.

	Bakterien cytosymiert
0,5 Hundeserum + 1,0 NaCl + 0,4 n/10 NaOH	16'
0,5 " + 1,0 " + 0,04 " "	15'
0,5 " + 1,0 " + 0,01 " "	10'
0,5 " + 1,0 " + 0,4 NaCl	10'
unbehandelte Bakterien + Serozym	45'
Serozym allein	55'

b) Einfluß der Spaltung des Serums.

Nach Friedberger und Vallardi, sowie Seitz entsteht das Gift nur unter gemeinsamer Mitwirkung der Albumin- und Globulinfraction des Serums. Wir haben den Einfluß der beiden Fractionen auf die Cytosymierung gegenüber Bakterien geprüft.

Protokoll 43. 6 ccm Kaninchenserum werden 24^h dialysiert, die Globuline abzentrifugiert und in 3,0 ccm NaCl-Lösung aufgenommen.

1) 1,0 ccm Albumine	+ 0,2 Bakteriensuspension	}	1/2 ^h cytosymiert
2) 0,5 " Globuline	+ 0,2 "		
3) 1,0 " Alb. + 0,5 Glob.	+ 0,2 "		
4) 1,0 " ungespaltenes Serum	+ 0,2 "		

Vorbehandelt mit	Bakterien
Albumine	35'
Globuline	35'
Albumine + Globuline	6 1/2'
ungespaltenes Serum	4'

Serozym allein 35'.

Protokoll 44. Serum vom Menschen.

Serum gespalten nach Sachs und Altmann (1,5 ccm auf 15,0 ccm HCl n/300) Globuline gelöst in 1,5 ccm NaCl. Albumine neutralisiert und isotonisch gemacht (unter CaCl₂-Zusatz).

Vorbehandelt mit	Bakterien
Albumine 1,0	flüssig *
Globuline 0,4	40'
Alb. 0,1 + Glob. 0,4	6'
Serum ungeteilt	6'

Serozym allein flüssig *.

* 2^h beobachtet.

Wir haben neben solchen gelungenen Cytozymierungsversuchen in anderen Fällen Mißerfolge gehabt. Entweder cytozymierten schon Globuline oder Albumine allein, oder es war auch ihre Mischung unwirksam etc. Wahrscheinlich handelt es sich um die gleichen Verhältnisse, welche wir bei der spontanen Thrombinentstehung aus Albuminen und Globulinen beobachtet haben¹⁾, daß nämlich die Albumine manchmal beschleunigen, manchmal hemmen. Es ist notwendig, diese beiden Funktionen am gleichen Serum vergleichend zu studieren. Wir haben solche Versuche im Gange.

III. Gerinnungsvorgänge und Anaphylatoxinbildung.

Ueber die thermolabilen Substanzen des Serums.

Wir möchten, bevor wir auf unsere Befunde und ihre Beziehungen zur Giftentstehung eingehen, eine allgemeine Betrachtung der thermolabilen Substanzen des Serums vorausschicken. Das Komplement charakterisiert sich, abgesehen von seiner Funktion, mit sensibilisierten Antigenen zu reagieren, durch seine Thermolabilität, ferner dadurch, daß seine Wirkung in einer 2-proz. Kochsalz- sowie in physiologischer Lösung der Erdalkalien aufgehoben wird. Seine Tätigkeit ist an das Zusammenwirken von Albuminen und Globulinen gebunden, wobei die einzelnen Fraktionen sich gegenseitig bis zu einem gewissen Grade vertreten können.

In der Immunitätsforschung wird leider der Begriff des aktiven Serums oft mit demjenigen des Komplementes identifiziert²⁾. Demgegenüber möchten wir noch auf folgende andere Wirkungen aufmerksam machen, welche ebenfalls nur das aktive Serum zu entfalten vermag.

Auch das Serozym ist eine Substanz des Serums, welche bei der Erhitzung auf 56° ihre Wirksamkeit verliert; es wird durch 2-proz. Kochsalzlösungen gehemmt: bekanntlich gerinnt das Blut in konzentrierten Salzlösungen nicht. Die

1) Siehe unsere Mitteilung I.

2) Friedberger hat noch auf der Mikrobiologenversammlung 1912 auf Grund seiner Befunde über die hemmende Wirkung 2-proz. NaCl Lösungen die Meinung geäußert, daß dadurch die Beteiligung des Komplementes bei der Entstehung des Anaphylatoxins bewiesen sei.

physiologischen Lösungen der Erdalkalien heben die Tätigkeit des Serozylms vollständig auf, wie aus Protokoll 57 hervorgeht¹⁾.

Das Serozym läßt sich ähnlich wie das Komplement durch Baryumsulfat absorbieren (Bordet). Gewisse Lipide und Zellen reagieren mit dem Serozym unter Thrombinbildung, mit anderen Worten, sie verbrauchen es; von den gleichen Substanzen ist auch ihre komplementabsorbierende Eigenschaft bekannt. Wir haben in unserer ersten Mitteilung über Versuche berichtet, in welchen der Einfluß der Spaltung des Serums in die beiden Fraktionen der Albumine und Globuline auf die Thrombinbildung untersucht wurde; sie ergaben, daß in den Albuminen häufig mehr Serozym nachweisbar ist als im ungespaltenen Serum, daß ferner die Globuline aus Oxalatsäuren oft allein befähigt sind, in Calciumanwesenheit Thrombin zu bilden. Daraus folgt, daß das Serozym in beiden Fraktionen des Serums in wirksamem Zustande vorhanden sein kann. Ein Aufbau aus End- und Mittelstück ist demnach beim Serozym nicht nachweisbar. Die Thrombinbildung der Globuline wird durch die Albuminfraktion bald beschleunigt, bald gehemmt, andererseits ist der Serozymcharakter der Albumine im ungespaltenen Serum oft nicht nachweisbar. Daraus ergibt sich, daß die Globuline und Albumine sich in bezug auf Thrombinbildung gegenseitig beeinflussen können.

Andererseits wissen wir vom Komplement, daß sich die beiden Serumfraktionen bei seiner Tätigkeit bis zu einem gewissen Grade vertreten können, daß das Endstück bei einer bestimmten Dose das gesamte Komplement ersetzen kann, sowie daß die ursprünglich die Hämolyse beschleunigenden Globuline diese Eigenschaft verlieren und hemmende Eigenschaften gewinnen können. Wir halten es daher vorderhand nicht für möglich zu entscheiden, ob die Spaltung des Serums in Albumine und Globuline die Tätigkeit des Komplementes und des Serozylms in gleicher oder in entgegengesetzter Richtung beeinflußt. Weitere Untersuchungen an einem und demselben Serum werden hierüber ein Urteil gestatten.

1) Siehe auch Prot. 35.

Ein Unterschied zwischen Komplement und Serozym besteht darin, daß die Komplementtätigkeit in Ca-freiem Medium vor sich gehen kann, die Thrombinbildung aber nur bei Anwesenheit von Ca-Ionen stattfindet. Ferner bestehen Differenzen im relativen Gehalt einzelner Seren an Komplement und Serozym. So enthält Serum, welches beim Meerschweinchen durch Kopfab schneiden gewonnen wurde, fast kein Serozym, wohl aber reichlich Komplement. Durch Auffangen des Blutes im Oxalatmedium erhält man hingegen nach Rekalzifizieren ein Serum, das reich an Serozym ist; sein Gehalt an Komplement ist zwar etwas größer als in gewöhnlich gewonnenen Seren, doch sind die Differenzen zu gering, um in Betracht zu kommen. Auch die relative Menge von Komplement und Serozym ist im Serum verschiedener Tierarten eine verschiedene¹⁾.

Wir finden bei Komplement und Serozym als gemeinsame Merkmale: die Thermolabilität, die Beeinflußbarkeit durch 2-proz. Kochsalzlösung und physiologische Erdalkalienlösungen eventuell eine bis jetzt nicht näher geklärte Abhängigkeit von dem gegenseitigen Verhältnis der Albumine und Globuline.

Zu diesen zwei bekannten Eigenschaften des frischen Serums haben wir noch eine dritte gefunden, welche wir die cytozymierende genannt haben. Das aktive cytozymhaltige Serum verändert die Bakterien so, daß sie als Cytozym zu wirken imstande sind. Die Erhitzung des Serums sowie Zusatz von 2-proz. Kochsalzlösung oder physiologischer Baryumlösung hebt diese Wirkung auf oder setzt sie wenigstens herab. Auch hier konnte in einigen Fällen gezeigt werden, daß die Mischung von Albuminen und Globulinen cytozymiert, während die einzelnen Komponenten dies nicht tun (s. Prot. 43 u. 44).

Wir übergehen die Frage, ob die normalen Opsonine, das Konglutinin etc., zu diesen Substanzen zu zählen sind, weil Untersuchungen über die Beeinflussung derselben durch Salze unseres Wissens nicht vorliegen.

Somit charakterisiert sich eine jede der drei erwähnten Funktionen des Serums durch die gleiche Thermolabilität, die gleiche Beeinflußbarkeit durch 2-proz. Kochsalzlösung und physiologische Lösungen der Erdalkalien, ferne

1) Wir verzichten auf die Wiedergabe diesbezüglicher Protokolle.

durch eine Abhängigkeit von dem gegenseitigen Verhältnis der Albumine und Globuline.

Es besteht zweifellos die Möglichkeit, daß alle diese von uns aufgezählten Wirkungen des frischen Serums auf eine und dieselbe Substanz zurückzuführen sind. Die Differenzen, welche bei den verschiedenen Wirkungen zutage treten, könnten in der Eigenart der antagonistischen Faktoren begründet sein. So wäre es denkbar, daß die Calciumionen einen gerinnungshemmenden Faktor eliminieren, welcher bei der an Ambozeptoren gebundenen cytolytischen Funktion der betreffenden Substanz keine Rolle spielt, wodurch die Komplementtätigkeit vom Calciumgehalt unabhängig wäre. Die Tatsache, daß das Serozym manchmal im Serum fehlt, während das Komplement vorhanden ist, möchten wir, so paradox das klingen mag, nicht als Beweis ansehen, daß diese Substanzen absolut verschieden sind. Wir haben in unserer I. Mitteilung zeigen können, daß die Albuminfraktion oft Serozym enthält, wenn solches im gesamten Serum nicht nachweisbar ist.

Andererseits könnte man annehmen, daß die erwähnten Wirkungen nicht von einer, sondern von verschiedenen Substanzen ausgehen; die bei allen gleiche Thermolabilität und Beeinflußbarkeit durch Salze könnte darauf beruhen, daß sie einen gleichen, für ihre Wirkung unerläßlichen Bestandteil enthalten, welcher diese allen gemeinsamen Eigenschaften aufweist. Es könnten schließlich auch ganz verschiedene Substanzen den betreffenden Funktionen zugrunde liegen und die gleiche Beeinflußbarkeit derselben dadurch erklärt werden, daß ihre Wirksamkeit an einen und denselben Zustand des Serums gebunden ist.

Wir können uns für keine dieser Möglichkeiten entscheiden; was wir mit diesen Ausführungen zeigen wollen, ist nur, daß nicht jede Wirkung des Serums, welche an dessen aktiven Zustand gebunden ist, auf das Komplement zurückgeführt werden darf. Auch Uebereinstimmung in Thermolabilität, in gewissen Beziehungen zu den Globulinen und Albuminen, sowie in der Beeinflußbarkeit durch 2-proz. Kochsalz- oder physiologische Erdalkalienlösung gestattet nicht, irgendeine bloß vom aktivem Serum ausgeübte

Wirkung mit dem Komplement zu identifizieren, da diese Eigenschaften, wie wir gezeigt haben, auch den anderen an den aktiven Zustand des Serums gebundenen Wirkungen in gleicher Weise zukommen. Diese Eigenschaften sind ungeeignet, die von uns aufgezählten Wirkungen voneinander zu differenzieren. Wir können die letzteren vorläufig nicht auf bestimmte, untereinander charakterisierbare Substanzen beziehen und halten es für notwendig, anstatt von Substanzen nur von einzelnen Funktionen des aktiven Serums zu sprechen. Unter Komplement müssen wir die Funktion des frischen Serums mit sensibilisierten Antigenen zu reagieren verstehen, unter Serozym die Funktion, in calciumhaltigem Medium mit Cytozym Thrombin zu bilden etc. Gerade in der letzten Zeit werden dem Komplement noch weitere, vom Antikörper unabhängige Wirkungen zugeschrieben [z. B. proteolytische¹⁾]. Das ist nach dem oben Gesagten unzulässig,

1) Wie wir in unserem Vortrag mitgeteilt haben, haben auch wir untersucht, ob sich nicht ein Abbau der Bakterien durch das frische Serum nachweisen läßt. Wir benutzten die von Abderhalden angegebene Dialysiermethode und auch die bei der Schwangerschaftsdiagnose üblichen Mengen (1 $\frac{1}{2}$, ccm). Eine Biuretreaktion konnten wir in der Außenflüssigkeit nicht nachweisen, möchten aber betonen, daß uns die Erkennung dieser Reaktion auch bei der Schwangerschaft Schwierigkeiten bereitet. Ueber die Ninhydrinreaktion haben wir dagegen im Institut eine gewisse Erfahrung (unsere Ergebnisse bei der Schwangerschaft waren nicht ungünstig). Wir konnten in der Tat mit Ninhydrin bei verschiedenen Anaphylatoxinen einige Male eine positive Reaktion erzielen. In solchen Fällen trat die Reaktion aber regelmäßig, manchmal sogar in verstärktem Maße auch dann auf, wenn inaktives Serum mit den Bakterien digeriert wurde. Diese Beobachtung scheint uns gerade in Rücksicht auf die so stark interessierende Frage des Abbaues durch Fermente von Bedeutung. Wir sehen, daß die Ninhydrinreaktion auch unabhängig von fermentativem Abbau zustande kommen kann. Wir möchten auch erwähnen, daß wir zuweilen beim Dialysieren des Serums im Wasserbad bei 56° ohne einen Zusatz positive Reaktion erhalten haben.

Friedberger und Mita geben an, unter den Bedingungen der Anaphylatoxinentstehung regelmäßig biurete Produkte nachgewiesen zu haben. Vielleicht erklärt sich diese Differenz dadurch, daß diese Autoren mit der Enteiweißungsmethode gearbeitet haben; wir werden auf diese Frage später zurückkommen.

da das Komplement als Substanz gegenüber anderen thermolabilen Substanzen des Serums nicht genügend charakterisiert ist. Die gleiche Art der Fragestellung ist auch für das Anaphylaxieproblem unzweckmäßig; denn will man die Entstehung des Anaphylatoxins mit der Anaphylaxie in Beziehung bringen, so wäre zu verlangen, daß gerade eine an Antikörper gebundene Wirkung des aktiven Serums nachgewiesen wird, während alle anderen Wirkungen außer Betracht bleiben müßten.

Wir möchten im folgenden untersuchen, welche von den bekannten Funktionen des frischen Serums für die Anaphylatoxinentstehung in Betracht kommen könnte.

Mit der Komplementfunktion dürften wir dieselbe nur dann in Zusammenhang bringen, wenn die Notwendigkeit des Immunkörpers erwiesen ist. Die Entbehrlichkeit des Immunambozeptors wurde bereits von Friedberger und seiner Schule gezeigt. Friedberger nahm nun an, daß die normalen Ambozeptoren bei der Giftbildung tätig sind. Demgegenüber zeigten Moreschi und Vallardi, daß das giftbildende Vermögen der Sera nach der Absorption der Ambozeptoren in der Kälte erhalten bleibt. Gonzenbach und Hirschfeld konnten dieselben Resultate auch nach der Absorption der Ambozeptoren in Baryumlösung erhalten. Friedberger wandte demgegenüber ein, daß für die vollständige Entfernung der normalen Ambozeptoren eine wiederholte Absorption notwendig sei, wobei das Gift bereits in der Kälte entsteht. Die Versuche von Friedberger beweisen natürlich nur, daß die von Moreschi und Vallardi angewandte Kältemethode die Giftbildung nicht quantitativ verhindert, nicht aber, daß die normalen Ambozeptoren notwendig sind. Diese Annahme ist hypothetisch und durch die weitgehende Unabhängigkeit der bei der Giftentstehung notwendigen Serummengen von dem Zusatz eines Immunkörpers unwahrscheinlich.

Das Anaphylatoxin ist komplementfrei. Es wäre aber unrichtig, in diesem Komplementschwund den Beweis zu erblicken, daß das Komplement spezifisch tätig gewesen ist. Gonzenbach und Hirschfeld zeigten, daß auch ambozeptorfremde Sera ihr Komplement nach Digerieren mit Bakterien verlieren. Digeriert man das frische Serum mit Bak-

terien in einer 2-proz. Kochsalzlösung oder physiologischen Baryumlösung, so ist die Giftbildung meistens abgeschwächt oder bleibt ganz aus; gleichzeitig bleibt das Komplement mehr oder weniger erhalten. Ganz läßt sich ein Komplementschwund schwer vermeiden. Das dürfte wohl darauf beruhen, daß nicht alle Vorgänge, die zur Absorption des Komplementes an Bakterien führen, durch 2-proz. Kochsalz bzw. Baryum verhindert werden können. Trotzdem ergibt die Titrierung nach dem Digerieren in 2-proz. NaCl-Lösung (Friedberger), sowie in Baryumlösung (Gonzenbach und Hirschfeld) genügende Komplementmengen, um zu behaupten, daß diese Eingriffe die Komplementbindung an Bakterien hemmend beeinflussen. Gonzenbach und Hirschfeld fanden, daß das in Baryum dargestellte Anaphylatoxin meistens abgeschwächt oder ganz unwirksam, manchmal aber doch erhalten ist. Sie nahmen damals hypothetisch an, daß das Baryum die Entgiftung des Anaphylatoxins begünstigt. Da wir jetzt erkannt haben, daß die anderen uns bekannten, an den aktiven Zustand gebundenen Funktionen des Serums durch Baryum mehr oder weniger abgeschwächt werden, so möchten wir auch diese geringere Wirkung des Baryumanaphylatoxins dadurch erklären, daß weniger Gift entsteht, nicht aber dadurch, daß das entstandene Gift sekundär abgeschwächt wird.

Friedberger konnte die Tatsache, daß das Baryum die Komplementbindung an Bakterien verhindert, nur teilweise bestätigen. Nach seinen Versuchen wird manchmal in Ba-Lösung bis zu 100 Proz. des Komplements gebunden. Wenn dem so wäre, so wäre das Problem, ob das Komplement dadurch verschwindet, daß es spezifisch gewirkt hat, im negativen Sinne entschieden, da die spezifische Komplementtätigkeit durch Baryum quantitativ aufgehoben wird. Doch beruhen solche ganz negative Resultate sicherlich auf einem Zufall. Wir besitzen keine bessere Methode, das Komplement vor der Absorption an Bakterien zu schützen, als Baryumlösung; auch mit hypertonischer NaCl-Lösung können wir die Bindung nicht besser verhindern.

Daß tatsächlich nicht jede Komplementabsorption durch Baryum beeinflussbar ist, konnten Gonzenbach und Hirschfeld an dem Beispiel des Kaolins zeigen. Das Kaolin absorbiert das Komplement auch dann, wenn es in Baryumlösung aufgeschwemmt wird. Aehnlich wirken viele andere Suspensionen (s. Prot. 48).

Wir sehen somit, daß unter den Bedingungen der Giftentstehung das Komplement gebunden wird; diese Bindung ist aber von Antikörpern unabhängig und muß daher von der spezifischen, an die Funktion des Komplementes geknüpften Bindung getrennt werden. Diejenigen Faktoren, welche die Tätigkeit der thermolabilen Substanzen aufheben, verhindern auch diese Bindung; Hand in Hand geht damit eine Abschwächung oder Aufhebung der Giftbildung des Serums, trotzdem in der Menge des gebundenen Komplementes und der entstandenen Giftmenge kein Parallelismus besteht¹⁾. Die Hypothese, daß die Wegnahme des Komplementes auch unabhängig von der spezifischen Tätigkeit desselben die Giftentstehung verursacht, wurde zuerst von Ritz und Sachs (dann auch von Bauer, Doerr, Mutermilch etc.) diskutiert. Die Komplementabsorption an Kaolin wurde dabei als gleichwertig mit der Komplementabsorption an Bakterien angesehen. Unsere Versuche (zum Teil mit Gonzenbach) zeigen jedoch, daß diese beiden Vorgänge manche Unterscheidungsmerkmale aufweisen. Andererseits darf die Komplementabsorption an Bakterien mit der spezifischen Tätigkeit des Komplementes nicht identifiziert werden.

Wir möchten noch die zweite Funktion des frischen Serums, nämlich die Eigenschaft als Serozym zu wirken, in ihrem Zusammenhange mit der Giftbildung besprechen. Die Hypothese, daß die Giftigkeit des Serums mit der Aktivierung von Gerinnungsfermenten in Zusammenhang steht, wurde (wenigstens für den anaphylaktischen Shock) von Nolf ausgesprochen und von Doerr übernommen. Blaizot hat ebenfalls die Vermutung geäußert, wie wir nach Abschluß dieser Arbeit bemerkten, daß die Bakterien dank ihrer Eigenschaft, als Cytozym zu wirken, das Anaphylatoxin bilden, daß also das Anaphylatoxin durch seinen Gehalt an Thrombin

1) Baryum hebt die spezifische Komplementtätigkeit vollkommen auf, die Cytozymierung sowie die Giftbildung nur partiell. Wir bevorzugen jetzt überhaupt die von Friedberger für das Komplement und Anaphylatoxin angewandte Methode mit hypertotonischer (2-proz.) NaCl-Lösung, da sie technisch einfacher ist und namentlich in Anaphylatoxinversuchen eindeutigere Resultate liefert.

toxisch wirkt. Wir gingen von der gleichen Voraussetzung aus, haben uns aber von der Unrichtigkeit dieser Annahme überzeugt. Dies geht aus folgenden Tatsachen hervor.

Die Bakterien enthalten, wie wir ausgeführt haben, an sich keine wesentlichen Mengen von Cytozym. Das Anaphylatoxin entsteht auch dann, wenn die Bakterien in nicht cytozymierenden Seren, in welchen sie nicht zu Cytozym werden, somit kein Thrombin bilden können, digeriert werden. Die Bildung des Giftes geht, nach unseren Versuchen, auch im Oxalatmedium vor sich, trotzdem hierbei jede Thrombinbildung ausbleibt. Im Anaphylatoxin findet man nach einigen Stunden gewöhnlich so wenig wirksames Thrombin, daß die Erklärung des plötzlichen Todes durch die injizierten Thrombinmengen ausgeschlossen erscheint¹⁾ (siehe Prot. 54). Während Anaphylatoxin nach Friedberger in saurer Lösung thermoresistent ist, ist dies, wie aus Protokoll 55 hervorgeht, bei Thrombin nicht der Fall. Die Organzellen, welche sehr befähigt sind, Thrombin zu bilden, machen, wie Protokolle 50—52 zeigen, kein Anaphylatoxin. Wir haben daran gedacht, daß ein während der Digerierung des Serums eventuell gebildetes Thrombin in eine unwirksame Modifikation übergehen könnte, welche im Tierkörper aktiviert wird, oder daß das Thrombin neben seiner koagulierenden auch zelldestruierende (hämolytische) Funktion besitzt etc. Doch führten alle in dieser Richtung gemachten Versuche zu negativen Ergebnissen. Wir konnten wirksames Anaphylatoxin auch in solchen Seren herstellen, bei welchen wir mit cytozymhaltigen Organextrakten keine Serozymfunktion nachweisen konnten, bei welchen also eine Thrombinbildung überhaupt ausgeschlossen war. Die Giftigkeit des Anaphylatoxins läßt sich somit in keiner Weise auf Thrombingehalt zurückführen.

Wir möchten im Anschluß daran die Frage erörtern, ob die Wirkung der Organextrakte in einem Zusammenhang mit derjenigen des Anaphylatoxins steht. Ein solcher wird von Friedberger, Dold etc. abgelehnt.

1) Die Meerschweinchen sind gegen Injektionen von frischem Thrombin sehr resistent (s. Protokoll 53).

Die Organextrakte können die bei der Injektion beobachteten Gerinnungen auf dreierlei Weise bewirken:

- a) als Cytozym,
- b) als thromboplastische Substanz, d. h. entweder dank der Eigenschaft, das in Lösung vorhandene Cytozym zu adsorbieren und so zu verstärken,
- c) oder durch eine besondere Wirkung, Cytozym aus den Blutzellen (durch Sekretion oder Zerfall der Blutplättchen etc.) erst in Freiheit zu setzen.

Die bisherigen Untersuchungen gestatten unserer Ansicht nach nicht, zu entscheiden, welche von diesen drei Wirkungen die Toxizität der Extrakte bedingt, da die meisten Autoren die Gerinnungsversuche am gesamten Blut vorgenommen haben; im gesamten Blut ist es aber nicht möglich, die drei erwähnten Wirkungsarten voneinander zu trennen.

Als wir z. B. die cytozymierten Pulver als Blutstillungsmittel versuchen wollten und daher mit Blut Versuche anstellten, war wider unser Erwarten das nicht cytozymierte Kaolin ebenfalls wirksam, während es im Gerinnungsversuch mit Oxalatplasma keinen Einfluß auf die Reaktion hat. Dies erklärt sich dadurch, daß das Kaolin dank seiner zelldestruierenden Eigenschaft Cytozym in Freiheit setzt.

Für das Anaphylatoxin können wir jedenfalls alle drei angeführten Möglichkeiten ausschließen. Das Anaphylatoxin wirkt nicht als Cytozym, da, wie wir gezeigt haben, der Cytozymgehalt desselben im Vergleich zu dem des verwendeten unbehandelten Serums abgenommen hat. Ebenso können die unter b und c erwähnten Wirkungen nicht in Betracht kommen; dies geht aus Versuchen hervor, in welchen wir Blut direkt aus der Kanüle in paraffinierte Schälchen fließen ließen, worin sich Anaphylatoxin oder entsprechendes Kontrollserum befand. Dabei konnte keine gerinnungsbeschleunigende Wirkung des Anaphylatoxins gegenüber der gleichen Menge unbehandelten Serums beobachtet werden.

In vitro ließ sich somit weder eine Wirkung als Cytozym, noch eine thromboplastische oder zelldestruierende Eigenschaft des Anaphyla-

toxins erweisen; ob eine solche in vivo stattfindet, können wir nicht entscheiden¹⁾.

Wir möchten jetzt noch auf die dritte Funktion des frischen Serums, auf die von uns aufgedeckte Cytozymierung der Bakterien, näher eingehen. Die Cytozymierung beruht darauf, daß Cytozym an die Bakterien bzw. andere Suspensionen übergeht. Es besteht eine Differenz zwischen Cytozymierung der Bakterien und des Kaolins. Das Kaolin vermag das Cytozym aus reinen Cytozymlösungen zu absorbieren, die Bakterien vermögen das nur in geringerem Grade. 2-proz. NaCl sowie physiologische BaCl₂-Lösungen verhindern oder schwächen die Cytozymierung der Bakterien, sie beeinflussen aber nur wenig die Cytozymierung des Kaolins. Die Cytozymierung der Bakterien unterliegt somit den Regeln, die die Wirksamkeit der thermolabilen Substanzen überhaupt beherrschen, die Cytozymierung des Kaolins scheint vielmehr ein einfacher Absorptionsvorgang zu sein.

Das Cytozym ist nach den Untersuchungen von Bordet und Delange sowie Zack ein Lipoid aus der Gruppe der Lecithine. Wir können daher sagen, daß die Bakterien eine Lipoidaffinität besitzen oder unter dem Einfluß des frischen Serums erwerben, wodurch die Möglichkeit entsteht, daß durch die Bakterien dem Serum Lipide entzogen werden.

Wir konstatieren somit, daß durch Zusatz von Bakterien dem Serum das Cytozymlipoid entzogen wird. Gleichwohl

1) Die von Dold nachgewiesene entgiftende Wirkung frischer Sera muß unerklärt bleiben, solange es nicht entschieden ist, welchen der angeführten Momente bei den durch Injektion von Organextrakten bedingten intravitalen Gerinnungen die Hauptrolle zufällt. Sollte es sich um Cytozymwirkung handeln, was natürlich am nächsten liegt, so scheint uns der Verbrauch des stabilen Cytozyms bei der Bildung des labileren, sich leicht spontan abschwächenden Thrombins als Ursache der Entgiftung wahrscheinlich. Das frische Serum würde also dank seinem Serozymgehalt entgiftend wirken. Was speziell die von Dold gemachte Hypothese anlangt, daß die Organextrakte sich an einem etwa noch im Serum vorhandenen Fibrinogen verbrauchen, sei bemerkt, daß Organextrakte mit Fibrinogen ohne Serozym nicht reagieren.

hängt die Giftigkeit des Serums sicherlich nicht mit einem bestimmten Gehalt an Cytozym zusammen. Durch vorsichtiges Auffangen von Blut im Oxalatmedium lassen sich Sera gewinnen, die weniger Cytozym enthalten als das wirksamste Anaphylatoxin. Solche cytozymarme Oxalatsera sind nach unserer Erfahrung nicht giftig. Wir haben noch auf andere Weise den Einfluß des Cytozymgehaltes auf die Giftigkeit des Serums untersucht. Das Cytozym wird gewöhnlich mit den Globulinen gefällt. Die Globuline aus dem Anaphylatoxin sind demnach cytozymärmer als die Globuline aus dem nativen Serum. Wir haben nun normale Albumine mit den aus Anaphylatoxin gewonnenen Globulinen gemischt und intravenös injiziert, die Mischung war nicht giftig¹⁾. Außerdem wurde versucht, durch Zusatz eines Cytozymextraktes die Giftigkeit des Anaphylatoxins aufzuheben; das Ergebnis war ebenfalls negativ. Diese Versuche dürfen freilich nicht als Beweis betrachtet werden, daß die Entziehung eines Lipoids mit der Giftigkeit des Serums in keinem Zusammenhange stehe; denn es könnte die besondere Art der Entziehung einer Substanz für die Giftbildung entscheidend, und gerade die Eigenart der Entziehung durch andere Eingriffe nicht reproduzierbar sein. Was die Unmöglichkeit anbetrifft, durch Cytozymzusatz die Giftigkeit des Anaphylatoxins aufzuheben, so wäre es möglich, daß die die Entziehung einer Substanz begleitenden Veränderungen irreversibel sind. Wir möchten dies gegenüber den Diskussionsbemerkungen auf der Mikrobiologentagung 1913 von Friedberger auch an dieser Stelle wiederholen. Friedberger machte darauf aufmerksam, daß unter der Voraussetzung, daß die Entziehung einer Substanz sowohl durch Kaolin wie durch Bakterien zustande kommt, logischerweise auch der Abguß von Kaolin giftig sein müßte. Unsere Entgegnung, daß es sich vielleicht bei Kaolin um sekundäre Entgiftungsvorgänge handelt²⁾, ließ Friedberger nicht gelten, da auch bei der Verminderung der verwandten Kaolinmenge kein Gift entsteht. Diese Beweisführung ist nicht zwingend, da es dabei nur auf das rela-

1) In bezug auf die Giftigkeit der einzelnen Fraktionen des Anaphylatoxins s. Prot. 58—61.

2) Siehe auch Ritz und Sachs.

tive Verhältnis zwischen den giftbildenden und entgiftenden Eigenschaften des Kaolins ankommt und dieses Verhältnis sich bei der absoluten Verminderung der Kaolindose nicht zu verändern braucht. Wir haben aber schon in unserem Vortrag betont, daß es nicht so sehr darauf ankommt, daß eine Substanz dem Serum entzogen wird, sondern wie diese Entziehung zustande kommt. Es gelang uns dann in der Tat im Verlaufe der Untersuchungen, weitgehende Differenzen zwischen der Cytozymierung des Kaolins und der Bakterien aufzufinden. Auffallend ist es, daß die Komplementabsorption der Bakterien durch ganz ähnliche Momente charakterisiert ist wie die Cytozymierung derselben. Es scheint, daß wir in der Tat in der Beeinflußbarkeit der Cytozymierung sowie der Komplementbindung durch 2-proz. NaCl- und physiologische BaCl₂-Lösung eine Methode besitzen, um solche Suspensionen, welche befähigt sind, Anaphylatoxin zu bilden, von solchen zu unterscheiden, die das nicht tun. Wir haben nämlich verschiedene Suspensionen auf die Beeinflußbarkeit ihrer Cytozymierung durch 2-proz. Kochsalz und Baryum geprüft und, abgesehen von Bakterien, nur in der Stärke einen Stoff gefunden, bei welchem die Cytozymierung gleich wie bei Bakterien verläuft. Ganz analog wird auch die Komplementbindung bei Stärke und Bakterien beeinflußt (s. Prot. 48). Die Präzipitate verhalten sich, wie die Protokolle zeigen, verschieden, wobei quantitative Fällungsverhältnisse eine Rolle zu spielen scheinen, ohne daß wir eine genaue Gesetzmäßigkeit feststellen konnten. Auch die Komplementbindung läßt sich bei Präzipitaten durch hypertonische Salzlösung nicht in dem Maße verhindern wie die Komplementbindung an Bakterien (s. Prot. 49).

Da sich nun Stärke in bezug auf Cytozymierung und Komplementbindung ähnlich wie Bakterien verhielt, haben wir versucht, ob es nicht gelingt, aus Stärke Anaphylatoxin herzustellen. Die folgenden Protokolle zeigen, daß es in der Tat möglich ist, durch Behandlung des Serums mit Stärkepulver Gift zu erzeugen. Es bedarf jedoch beträchtlicher Mengen Stärke und meist längerer Einwirkung derselben; auffallend war bei

der Mehrzahl der Versuche, daß die Tiere sich oft nach sehr schweren Erscheinungen doch wieder erholten und am Leben blieben. Wir haben auch einige Anaphylatoxinversuche mit Reisstärke gemacht, welche eiweißfrei gemacht war¹⁾; auch dieses Präparat erwies sich als wirksam. Die inzwischen von Nathan²⁾ veröffentlichten Versuche, in welchen es ihm bei Anwendung von Stärkekleister regelmäßig gelang, Anaphylatoxin zu erhalten, waren uns eine willkommene Bestätigung unserer in der gleichen Richtung unternommenen Experimente.

Protokoll 45. 3 ccm Meerschweinchenserum werden mit 1 ccm einer dichten Aufschwemmung von Reisstärkemehl versetzt und 1 Stunde bei 37° gehalten (öfteres Aufschütteln). Nach Abzentrifugieren wird das Serum intravenös einem Meerschweinchen von 190 g injiziert: Tod unter Krämpfen nach 2 Minuten. Sektionsbefund typisch.

Protokoll 46. 3 ccm Meerschweinchenserum + 1 ccm 10-proz. Aufschwemmung eiweißfreier Stärke 2 Stunden bei 37°, hierauf 2 Stunden bei Zimmertemperatur unter öfterem Aufschütteln stehen gelassen. Zentrifugiert, Injektion intravenös. Meerschweinchen, 195 g, nach 3 Minuten Sprünge, schwere Krämpfe, liegt einige Minuten wie tot unter ganz vereinzelten Atemzügen, erholt sich aber schließlich und lebt.

Protokoll 47. 3 ccm Meerschweinchenserum + 1,5 ccm 10-proz. Suspension eiweißfreier Stärke. Technik wie Prot. 46. Injektion in Meerschweinchen von 190 g: Verlauf wie bei Versuch 46.

Von 3 weiteren Tieren einer anderen Serie waren zwei Versuche positiv (Tod im Shock), ein Versuch gab nur undeutliche Symptome.

Versuche über Komplementbindung der Suspensionen.

Protokoll 48. Kaolin bzw. Stärke aufgeschwemmt. 1 g auf 10 ccm einer physiologischen bzw. 4-proz. NaCl-Lösung. Bakterienaufschwemmung: eine Agarkultur auf 1 ccm. 0,5 ccm des Komplementes + 0,5 der betreffenden Suspension (bei Verwendung von 4-proz. NaCl resultierte demnach eine etwa 2,5-proz. NaCl-Lösung). Nach einer Stunde werden die

1) Wir gingen hierbei von der Absicht aus, die Frage nach dem Abbau von Eiweißkörpern, der von verschiedenen Forschern als Ursache des Giftigwerdens des Serums angesehen wurde, zu entscheiden, da bei einem eiweißfreien Kohlehydrat an Abbau unter Bildung giftiger Spaltungsprodukte wohl nicht gedacht werden könnte. Da aber eine bakteriologische Prüfung unseres Präparates ergab, daß in demselben doch eine gewisse Anzahl Bakterien sich vorfand, wollen wir diese Versuche in dem ange deuteten Sinne nicht verwerten.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18.

Abgüsse mit 1,5 NaCl bzw. Aqua (bei hypertotonischer Lösung) verdünnt und abgestuft auf Komplement geprüft¹⁾.

	0,8	0,4	0,2	0,1
Bakterien in physiol. NaCl-Lös.	0	0	0	0
Bakterien in hyperton. NaCl-Lös.	k.	k.	f. k.	f. k.
Kaolin in physiol. NaCl-Lösung	0	0	0	0
Kaolin in hyperton. NaCl-Lösung	0	0	0	0
Stärke in physiol. NaCl-Lösung	0	0	0	0
Stärke in hyperton. NaCl-Lösung	k.	k.	k.	f. k.
Kontrolle in physiol. NaCl-Lös.	k.	k.	k.	f. k.
Kontrolle in hyperton. NaCl-Lös.	k.	k.	k.	f. k.

Komplementbindung durch Präzipitate.

Protokoll 49. 3 ccm Rinderserum (1:10 bis 1:10000) mit 1 ccm Rinderantiserum (Titer 1:1000 stark, 1:10000 Rind nur schwach präzipitiert) präzipitiert, abzentrifugiert.

A. 0,5 Meerschweinchenserum + 0,1 0,9-proz. NaCl + 0,25 Präzipitat
 B. 0,5 „ „ + 0,1 20-proz. „ + 0,25 „

Nach 1 Stunde abzentrifugiert. Abguß von A in 1,5 Aqua, Abguß von B in 1,5 NaCl.

Davon	0,8	0,4	0,2
1:10	A	0	0
	B	k.	k. stark
1:100	A	0	0
	B	f. k.	mäßig schwach
1:1000	A	0	0
	B	f. k.	stark mäßig
1:10000	A	k.	schwach Sp.
	B	k.	k. k.
Kontrolle	A	k.	k. k.
	B	k.	k. k.

Die Komplementbindung bei Präzipitaten ist somit in viel geringerem Grade durch hypertoneales NaCl zu beeinflussen als bei Bakterien.

Wir müssen es vorderhand noch offen lassen, welche Faktoren diese eigentümliche Differenz bei den verschiedenen Suspensionen bedingen, und ob Kaolin schon primär kein Gift bildet oder ob es dank seinem besonderen chemischen und physikalischen Zustand zur Entgiftung besonders geeignet ist.

Nach den vorliegenden Untersuchungen ist die Möglichkeit zu diskutieren, daß dem Serum durch die Bakterien gewisse

1) Es empfiehlt sich nicht, stärkere Salzkonzentrationen zu verwenden, da der Komplementgehalt eines Serums, welches einige Zeit mit konzentriertem Kochsalz stand und nachträglich verdünnt wurde, auffallenderweise zunimmt, was den Vergleich der beiden Reihen erschwert.

Lipoide entzogen werden können. Da die Giftigkeit des Serums von der absoluten Menge an Cytozym unabhängig ist, so müßte man an eine ganz bestimmte Art der Entziehung denken oder auch annehmen, daß es sich um Entziehung von gewissen spezifischen Lipoiden handelt, die wir im Gerinnungsversuch vom Cytozym nicht unterscheiden können, die sogar mit der Gerinnung an sich nichts zu tun haben könnten. Der Gerinnungsversuch wäre dann bloß ein Indikator, um die an den Serumlipoiden stattfindenden Vorgänge zu erkennen. Vielleicht würden diese Befunde auch den Komplementschwund beim Anaphylatoxin erklären, da nach den Versuchen von Ritz gerade die dritte Komponente des Komplementes dem Serum entzogen wird, bei welcher wir dank ihrer Cobragiftempfindlichkeit eine Lipoidnatur vermuten dürfen. Für die Lipoidnatur derjenigen Substanz, deren Entziehung oder Zerstörung die Giftigkeit des Serums bedingen könnte, ließen sich wohl auch die Versuche von Friedberger und Kumagai verwerten, wonach das Serum durch Behandlung mit Cobragift (Lipase) giftige Eigenschaften gewinnt¹⁾.

Wir konstatieren jedenfalls, daß durch die Bakterien eine Störung im Lipoidbestand des Serums bewirkt werden kann. Es wäre möglich, daß ähnliche Veränderungen des Serums beim anaphylaktischen Shock auftreten, ebenso bei den spezifischen Reaktionen *in vitro*. Vorderhand sollte aber das Anaphylatoxin mit Seren, welche unter dem Einfluß spezifischer Vorgänge giftig geworden sind nicht identifiziert werden.

Wir haben erkannt, daß eine Reihe von Funktionen des Serums, welche an dessen aktiven Zustand geknüpft sind, gewisse gemeinsame Merkmale tragen. Diese sind die eigentümliche Abhängigkeit von dem relativen Verhältnis der

1) Friedberger selbst nimmt zwar einen Abbau des Cobragiftes an; daß es ihm gelang, auch mit Bakterientoxinen Gift zu erzeugen, bei welchen eine Lipasenatur bis jetzt nicht nachgewiesen ist, kann unsere Vermutung nicht widerlegen, da zellfreie Bakterienextrakte zur Bildung von Anaphylatoxin Veranlassung geben.

Es erscheint uns jedenfalls gewagt, aus der Tatsache, daß gewisse Toxine Anaphylatoxin bilden, ohne weiteres zu schließen, daß der Mechanismus der antitoxischen Immunität auf einem durch Komplement bewirkten Abbau beruhe.

Globuline und Albumine, die gleiche Beeinflußbarkeit durch die 2-proz. Kochsalz- und physiologische Erdalkalienlösung. Diese Kriterien sind somit zur Differenzierung der thermolabilen Substanzen untereinander ungeeignet. Entweder sind diese Substanzen oder wenigstens einzelne Bestandteile derselben identisch, oder ist ihre Funktion an den gleichen Zustand des Serums gebunden. Gerade deswegen ist es unbedingt notwendig, daß man sich nicht an die Begriffe der Substanzen selbst, sondern an die von ihnen ausgeübten Funktionen hält. Die Funktion des Komplementes (Aktivierung eines Antikörpers) sowie des Serozyms (Thrombinbildung) hat mit der Giftigkeit des Bakterianaphylatoxins nichts zu tun. Die von uns gefundene Tatsache der Cytozymierung der Bakterien läßt eine durch die Bakterien bewirkte Störung im Bestand der Lipoide des Serums vermuten. Es ist naheliegend, diese Veränderung in Zusammenhang mit der Giftigkeit zu bringen. Wir sind uns aber bewußt, daß wir nur eine weitere Differenz in der Zusammensetzung des Serums und des Anaphylatoxins gefunden haben und daß die die Giftigkeit bedingende Veränderung in anderen Momenten liegen kann. Die Gerinnungsphysiologie ließ uns jedenfalls neue Fragestellungen gewinnen, die der experimentellen Forschung zugänglich sind.

Versuche, mit Organzellen Anaphylatoxin zu erzeugen.

(Ergebnis negativ.)

Protokoll 50. Meerschweinchenorganzellen 3 Stunden lang mit Meerschweinchenserum digeriert (3 ccm Serum + 1 ccm dünne Zellaufschwemmung).

Meerschw.,	200 g,	bekommt	Leberabguß.	O. B.
„	180 g,	„	Milzabguß.	O. B.
„	160 g,	„	Abguß von gekochten Leberzellen.	O. B.
„	220 g,	„	„ „ gekochter Milz.	O. B. † am anderen Morgen.

Eine Abspaltung von Anaphylatoxin aus arteigenen Zellen gelingt somit nicht.

Protokoll 51. Rattenorganzellen. Leberzellen, gewaschen, 2 Minuten gekocht. 2 ccm Serum + 1 ccm Leberaufschwemmung.

Meerschw.,	205 g,	bekommt	2,5 ccm.	Ohne Erscheinung.
„	200 g,	„	aus demselben Serum mit Bakterien dargestelltes Anaphylatoxin.	† nach 1 Minute. Befund typisch.

Rattenspermatozoen gewaschen und gekocht. Mit Meerschweinchenserum 3 Stunden digeriert. 3 ccm des Abgusses intravenös Meerschweinchen von 200 g. Bleibt munter.

Protokoll 52. 3 ccm Meerschweinchenserum mit Blutplättchen 1 Stunde digeriert, intravenös in Meerschweinchen von 215 g. Keine Erscheinungen.

2 ccm Leberextrakt in 180 g kleines Meerschweinchen. $\frac{1}{2}$ Min. tot. Lunge wässrig gebläht, Herz erweitert, flimmert, voll Koagula.

0,05 des Extraktes wirkungslos.

7 ccm Meerschweinchenserum + 3 ccm NaCl + 0,15 des betreffenden Extraktes 4 Stunden bei 37°.

3 ccm intravenös. Tier wohl etwas krank, sträubt die Haare und atmet etwas erschwert, erholt sich bald.

Protokoll 53. Das Thrombin ist für Meerschweinchen nur schwach giftig. Von 2 großen Meerschweinchen wird Blut als Oxalatplasma aufgefangen. Blutplättchen durch 3-stündiges Zentrifugieren entfernt. Das Oxalatplasma wurde zuerst mit Blutplättchenaufschwemmung bei 37° 40' gehalten, dann rekalkifiziert, 1 Teil (3 ccm) sofort noch vor der Gerinnung intravenös einem Meerschweinchen injiziert (das rekalkifizierte Plasma gerinnt nach 3'). Ein anderer Teil nach der Gerinnung 10' stehen gelassen, defibriniert und erst dann injiziert. Die Tiere zeigen keine wesentlichen Krankheitserscheinungen.

Protokoll 54. Bestimmung des Thrombingehaltes eines wirksamen Anaphylatoxins. Meerschweinchenserum durch Kopfabschneiden gewonnen, mit gekochten Cholerabacillen versetzt. Von Zeit zu Zeit 0,5 ccm entnommen und mit Oxalatplasma auf Thrombin geprüft.

Entnahme der Probe nach	Anaphylatoxin	Kontrollserum allein
11'	5'	5 $\frac{1}{2}$ '
25'	5'	8'
50'	17'	10'
85'	50'	38'
130'	bleibt flüssig über 2 $\frac{1}{2}$ h	bleibt flüssig über $\frac{1}{2}$ h

Serozymgehalt des Serums äußerst gering; 0,25 Serum + 0,3 Leberextrakt erst nach einigen Stunden geringe Flockung.

Nach 4 Stunden keine Spur von Thrombin nachweisbar. 3 ccm injiziert intravenös einem ca. 200 g Meerschweinchen: sofort Krämpfe, Tod mit typischem Befund.

Protokoll 55. Das Thrombin ist sowohl in salzsaurer wie in alkalischer Lösung thermolabil.

3,0 ccm Lebercytozym }
 5 „ Ziegenserum } 10' stehen gelassen, dann verteilt in Röhreh. à 2 ccm.
 12 „ NaCl }

- I. Reihe vermischt mit HCl 0,1 0,05 0,01
 II. „ „ „ NaOH 0,1 0,00 0,01

Die Röhrcchen werden 25' inaktiviert, dann neutralisiert.

Gerinnung bei der nicht inaktivierten Kontrolle nach 7'; bei der inaktivierten keine Gerinnung Also schützt Säurezusatz das Thrombin bei der Inaktivierung nicht.

Protokoll 56. Bestimmung des Cytozymcharakters des Kaolins am gesamten Blut. Die Differenz zwischen unbehandelten und cytozymierten Kaolin ist geringer im Blut als im Oxalatplasma. Kaolin trocken sowiein NaCl aufgeschwemmt in kleine paraffinierte Uhrschildchen. Darauf Menschenblut direkt aus der Vene.

		Gerinnungszeit des Blutes
trocken	{ cytozymiert	7'
	{ nicht cytozymiert	7'
aufgeschwemmt	{ cytozymiert	12'
	{ nicht cytozymiert	35'
Blut allein		75'.

Das trockene Pulver wirkt somit besser als das aufgeschwemmte und cytozymierte.

Protokoll 57. Beeinflussung der Serozymtätigkeit durch Erdalkalien. Bei Ba und Ca muß Salzplasma verwendet werden, da das Oxalat niedergeschlagen wird.

Ziegenblut aa mit 10-proz. NaCl-Lösung aufgefangen. Das abzentrifugierte Plasma aa mit 5-proz. NaCl verdünnt, statt des Oxalatplasmas benutzt.

Phys. BaCl₂ mit und ohne 0,05-proz. CaCl₂ } in einer Menge
 Phys. NaCl mit und ohne CaCl₂ } von 1 ccm

Dazu 0,25 Hammelserozym, 0,2 bzw. 0,1 Lipidleberextrakt.

	+ CaCl ₂		ohne CaCl ₂	
	0,2 Extr.	0,1 Extr.	0,2 Extr.	0,1 Extr.
BaCl ₂	flüssig	flüssig	flüssig	flüssig
NaCl	8'	20'	25'	50'

Serozym allein + CaCl 120'.

Dialyseversuche mit Anaphylatoxin in peptondurchlässigen Hülsen

Die Giftigkeit ist an die Albumine gebunden, Globulin-zusatz erhöht die Giftigkeit.

Protokoll 58. 9 ccm Meerschweinchenserum mit einigen Tropfen einer dichten Prodigiosumaufschwemmung 1^b im Brutschrank Bakterien abzentrifugiert. Anaphylatoxin gegen Wasser im Eisschrank dialysiert.

Gesamtflüssigkeit der Albumine (nach Durchspülung der Hülsen und Neutralisierung) 11 ccm.

Globuline in 2 ccm NaCl aufgenommen.

- I. Meerschweinchen, 220 g, bekommt Mischung von 3,5 Albumine und 0,7 Globuline. † nach 2'. Befund typisch.
 II. Meerschweinchen, 220 g, bekommt 4,0 Albumine. Sträubt etwas die Haare. Sonst munter.
 III. Meerschweinchen, 230 g, bekommt 1 ccm Globuline + 3 NaCl. Etwas Frieren. Sonst ohne Befund.
 IV. Meerschweinchen, 205 g, 2,0 Albumine + 0,3 Globuline. Keine Erscheinungen, † am andern Morgen.

Protokoll 59. Technik wie vorher.

	Gewicht	Bekommt	Ergebnis
Meerschw.	205 g	3,0 Alb. + 0,5 Glob.	† nach 2' Befund typisch
	220 g	4,0 Alb.	† nach 3' Befund typisch
	210 g	3,0 Alb.	Zittern, † am andern Morgen
	170 g	1,4 Glob. in 3 ccm NaCl	Leichtes Frieren, sonst munter

Protokoll 60. 8 ccm Serum + 4 ccm Bakterien 1^h Wasserbad 37°. Zentrifugiert und dialysiert im Eisschrank 24^h.

Globuline = 4 ccm
 Albumine = 13,5 ccm

	Gewicht	Bekommt	Ergebnis
Meerschw.	205 g	3,2 Albumine	Schwer krank, springt, erh. sich
Meerschw.	175 g	2,2 Albumine	Etwas müde, am and. Morgen †
Meerschw.	200 g	2,5 Alb. + 0,8 Glob.	Ohne Erscheinung
Meerschw.	200 g	2,5 Alb. + 1 ^h stehen 0,8 Glob. jgelassen	Tod nach 4'. Befund typisch
Meerschw.	205 g	Anaphyl. Alb. 2,0 + normale Glob. 0,8 (= 1,6 Serum)	Munter, am anderen Morgen †
Meerschw.	175 g	normale Alb. 2,5 + Anaphyl. Glob. 0,8	Munter

Protokoll 61. 8 ccm Serum + einige Tropfen lebende Prodigiosus 1^h 37°. Abzentrifugiert, dialysiert. Nach Neutralisierung etc. betragen die Albumine 12 ccm.

Meerschw.	220 g	bekommt 3,3 Albumine	Etwas schwach, sonst munter
Meerschw.	180 g	bekommt 3,5 Albumine	†, Befund typisch
Meerschw.	150 g	bekommt 2,0 Globuline	Krämpfe, Erholung
Meerschw.	250 g	bekommt 3,3 Alb. + 1/2 bei 1,0 Glob. 137°	†, Befund typisch

Die Versuche ergeben in Uebereinstimmung mit Friedberger und Jerusalem, daß das Gift hauptsächlich in den Albuminen vorhanden ist. Die Globuline verstärkten in einigen Versuchen die Giftigkeit der Albumine, die Differenz ist aber nicht so groß, daß man einen komplexen Bau mit Sicherheit annehmen könnte.

Zusammenfassung.

1) Werden gewisse Suspensionen (Bakterien, Kaolin etc.) in cytozymhaltigen Seren digeriert und abzentrifugiert, so haben sie Cytozymcharakter erworben, während der Cytozymgehalt des betreffenden Serums in der Regel abnimmt. Der Cytozymcharakter der betreffenden Suspension ergibt sich daraus, daß sie, und zwar nur in Anwesenheit von Ca-Ionen, mit einem serozymhaltigen Serum Thrombin bilden. Wir nennen die Funktion des Serums, die Suspensionen in dieser Weise zu beeinflussen, die cytozymierende Funktion und eine so behandelte Suspension cytozymiert.

Die gerinnungsbeschleunigende (thromboplastische) Wirkung der Suspensionen wird auf diese Fähigkeit, zum Cytozym zu werden, zurückgeführt. Der Begriff der thromboplastischen Substanzen wird für zellfreie Plasmen mit demjenigen der cytozymierbaren Substanzen identifiziert.

Der Grad, in welchem ein bestimmtes Serum Suspensionen zu cytozymieren vermag, geht dem Cytozymgehalt des Serums parallel. Dieses Verhalten ermöglicht eine indirekte Bestimmung des Cytozymgehaltes eines Serums. Die Cytozymierung geht im Oxalatmedium ebenso gut vor sich wie im Ca-haltigen Medium; wir können daher den Cytozymgehalt von Oxalatplasma durch den Grad der bewirkten Cytozymierung bestimmen. Durch diese Eigenschaft werden wir in den Stand gesetzt, eine Vermehrung oder Verminderung dieses einen zur Thrombinbildung führenden Faktors unabhängig von der Gerinnung des zu untersuchenden Blutes zu bestimmen.

2) Inaktives Serum cytozymiert Bakterien nicht oder schlechter als aktives; 2-proz. NaCl und physiologische BaCl₂ setzen die Cytozymierung der Bakterien herab oder heben sie ganz auf.

Die Cytozymierung des Kaolins wird durch hyper-tonische Kochsalzlösung und durch Ba-Salze wenig beeinflußt. Reine Cytozymextrakte cytozymieren stark das Kaolin, Bakterien dagegen nur in untergeordnetem Grade; werden Cytozymextrakte zu an sich nicht cytozymierenden aktiven Seren

zugesetzt, so wirkt die Mischung deutlich cytozymierend auf Bakterien.

Die Cytozymierung der Bakterien ist ein Vorgang, welcher denselben Regeln unterliegt wie die anderen an den aktiven Zustand gebundenen Funktionen des Serums. Hingegen beruht die Cytozymierung des Kaolins eher auf einfacher Absorption von Cytozym.

Die Komplementabsorption an Bakterien wird in der gleichen Weise durch 2-proz. NaCl und Ba-Salze gehemmt, während die Komplementbindung an Kaolin auch in Anwesenheit dieser Salze vor sich geht.

Aehnlich den Bakterien verhält sich Stärkemehl, gleich dem Kaolin eine Anzahl anorganischer Pulver, während die spezifischen Präzipitate eine Mittelstellung einzunehmen scheinen. Mit Stärke ist eine Giftbildung aus frischem Serum bis zu einem gewissen Grade gelungen, während mit Kaolin in Bestätigung der Angaben Friedbergers keine regelmäßige Giftbildung erzeugt werden konnte. Solche Suspensionen, deren Cytozymierung und Komplementabsorption durch die oben erwähnten Agentien (hypertonische NaCl- und physiologische BaCl₂-Lösung) verhindert oder geschwächt wird, scheinen somit zur Giftbildung geeignet zu sein.

3) Die thermolabilen Substanzen des Serums (das Komplement, das Serozym und die der Bakterien- und Cytozymierung zugrunde liegende Substanz) sind dadurch charakterisiert, daß sie durch hypertonische physiologische Kochsalz- und durch physiologische Erdalkalienlösung in ihrer Wirksamkeit mehr oder weniger gehemmt werden, sowie daß sie in einer noch nicht ganz geklärten Weise von dem Verhältnis der Globuline und Albumine des Serums abhängig sind. Da diese Merkmale zur Differenzierung dieser Substanzen somit ungeeignet sind, sollte nur von verschiedenen Funktionen des aktiven Serums gesprochen werden.

Die Giftentstehung kann nicht auf Komplementfunktion zurückgeführt werden, da die Notwendigkeit eines Ambozeptors nicht erwiesen ist. Die bis jetzt als Beweis einer Komplementfunktion angeführten Merkmale kommen in gleicher Weise den anderen Funktionen des aktiven Serums zu.

Ebensowenig läßt sich die Giftentstehung auf Serozymtätigkeit zurückführen (Thrombinbildung).

Als dritte uns bekannte Funktion des aktiven Serums gegenüber Bakterien kommt die cytozymierende in Betracht. Die Cytozymierung beruht darauf, daß die Bakterien auf Grund einer vorhandenen oder erworbenen Affinität dem Serum gewisse Lipoide entziehen. Wir vermuten deshalb, daß die Giftbildung auf einer durch die Bakterien bewirkten Störung im Lipoidbestand des Serums beruhe.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie an der Universität Straßburg (Direktor: Geh.-Rat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Warum wirken aromatische Arsenverbindungen stärker auf Protozoen ein als aliphatische und anorganische?

Von **Hermann Wieland**,
früherem Assistenten am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. September 1913.)

Die Arsentherapie der Protozoenkrankheiten beginnt eigentlich erst mit der Anwendung aromatischer Arsenverbindungen. Die anorganischen Arsenikalien und die Salze der Kakodylsäure und Methylarsinsäure (Arrhenal) haben unter Umständen auch einen günstigen Einfluß auf den Verlauf dieser Krankheiten, doch scheint ihre Wirkung mehr eine indirekte zu sein, indem sie den Ernährungszustand des erkrankten Organismus heben; im Tierexperiment zeigen sie jedenfalls nicht die zauberhafte Wirkung wie die Benzolderivate des Arsens oder sind überhaupt unwirksam [Moore, Nierenstein und Todd (1); Löffler und Rühls (2, 3, 4); dagegen Uhlenhuth und Woithe (5)].

Es besteht also in der parasitentötenden Kraft ein wesentlicher Unterschied zwischen den anorganischen und aliphatischen Verbindungen des Arsens einerseits und seinen aromatischen Abkömmlingen andererseits, eine Tatsache, deren Erklärung noch aussteht.

9*

Nach Ehrlich (6) wird durch die Einführung des Arsens in den Benzolkern seine Verteilung zwischen Wirt und Eindringling verschoben: die „Organotropie“ wird herabgesetzt, die „Parasitotropie“ erhöht, und zwar dadurch, daß die aromatische Arsenverbindung eine gesteigerte Affinität zu den „Chemorezeptoren“ der Trypanosomenzelle besitzt. An Stelle dieser chemischen Verwandtschaft könnte man in Anlehnung an die Meyersche Narkosentheorie auch an eine solche mehr physikalisch-chemischer Natur denken, etwa derart, daß eine Aenderung der Löslichkeitsverhältnisse oder anderer physikalisch-chemischer Konstanten eine andere Verteilung des Mittels zur Folge hat. In jüngster Zeit hat Luithlen (7) auf Grund umfassender pharmakologischer Untersuchungen über das Salvarsan die Meinung ausgesprochen, daß es sich bei der akuten Wirkung dieses Mittels auf den Organismus höherer Tiere überhaupt nicht um eine Arsenikwirkung, sondern um den Effekt des Gesamtmoleküls handle. Luithlen spricht sich nicht darüber aus, ob die parasitentötende Fähigkeit des Salvarsans ebenfalls Molekülwirkung ist; diese Möglichkeit wäre immerhin ins Auge zu fassen.

Die aromatischen Arsenverbindungen sind Derivate des Benzols, von denen eine ganze Reihe als gute Desinfektionsmittel bekannt sind und angewendet werden. Ich erwog nun die Möglichkeit, daß dieser Teil des Moleküls bei der parasitentötenden Wirkung beteiligt sei, daß diese Mittel deshalb wirksamer sind als die anorganischen und aliphatischen Verbindungen des Arsens, weil sie außer Arsenikwirkung auch Wirkungen substituierter Benzole entfalten.

Zur Prüfung dieser Annahme habe ich nun mit einer Reihe von arsenfreien Benzolderivaten Heilversuche bei Trypanosomenerkrankungen angestellt, und zwar benutzte ich dazu weiße Mäuse, die mit Dourinetrypanosomen (*Tr. equiperdum*) infiziert wurden.

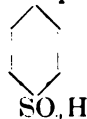
Folgende Substanzen wurden geprüft:

1) Phenol, OH

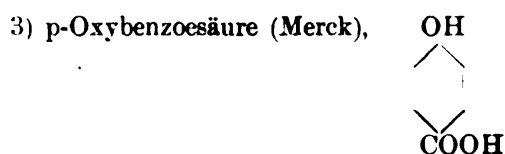


zu 0,5 Proz. in 0,85-proz. Kochsalzlösung gelöst.

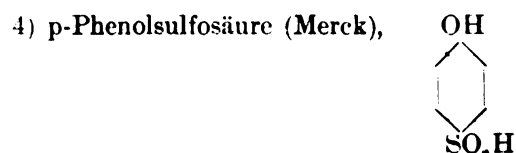
2) Sulfanilsäure, NH₂



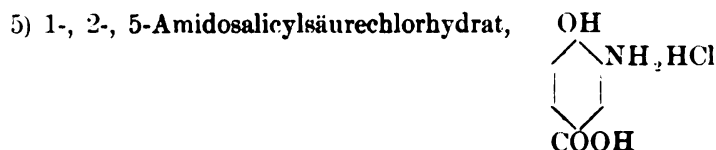
kam in Form ihres Natriumsalzes zur Anwendung; davon wurde eine 20-proz. wässrige Lösung hergestellt.



wurde mit der berechneten Menge Natronlauge in Lösung gebracht und so weit mit Wasser verdünnt, daß eine 10-proz. Lösung resultierte.



Diese Säure stellt einen dicken, mit Wasser mischbaren Syrup dar; durch Zufügen von Natronlauge und Wasser wurde eine lackmusneutrale 20-proz. Lösung bereitet.



Das Chlorhydrat der Amidosalicylsäure ist in Wasser bei gewöhnlicher Temperatur schlecht löslich; alkalische Lösungen zersetzen sich augenblicklich unter Braunfärbung, Suspensionen in Oel entmischen sich sehr rasch. Durch Erwärmen mit etwas Salzsäure gelang es, eine bei Körpertemperatur gesättigte, 10-proz. Lösung zu erhalten, die zu den vorliegenden Versuchen verwendet wurde.

Phenol wurde als der einfachste Vertreter der aromatischen Desinfektionsmittel gewählt. Die drei nächsten Präparate sind in Parastellung mit NH_2 oder OH besetzte aromatische Säuren, also Körper, die dem Atoxyl bzw. der p-Oxyphenylarsinsäure nahestehen. Zur Wahl der p-Oxyphenylsulfosäure bestimmte mich noch besonders die Angabe von Messerschmidt (8), der bei der Hühnerspirillose mit Sozodolnatrium (Natriumsalz der Dijod-p-Phenolsulfosäure) eine gewisse Schutzwirkung beobachtet hat. Das Jod ist in diesem Mittel festgebunden und daher irrelevant [vgl. dazu die Kritik dieses Präparates bei Fränkel (9)]. No. 5 endlich wurde wegen seiner strukturellen Beziehungen zum Salvarsan geprüft; das entsprechende Dioxydiamidoazobenzol war mir leider nicht zugänglich.

Nach Vorversuchen beträgt für eine ca. 20 g schwere Maus bei subkutaner Injektion die geringste tödliche Dosis von :

- 1) Phenol 0,003 g
- 2) Sulfanilsäure 0,2 "
- 3) p-Oxybenzoesäure 0,08 "
- 4) p-Phenolsulfosäure 0,12 "
- 5) Amidosalicylsäure, nicht bestimmbar, weil die schlechte Löslichkeit der Substanz eine Steigerung der Dosis über 0,1 g verbietet.

Im einzelnen gestaltete sich der Versuch folgendermaßen: Am Vormittag des 10. März 1913 wurden 17 Mäuse mit dem Blut einer schwer dourinekranken Maus intraperitoneal infiziert, und zwar erhielt jedes Tier $\frac{1}{2}$ ccm einer Blutaufschwemmung in 0,85-proz. Kochsalzlösung, die ca. 20–30 Trypanosomen im Gesichtsfeld¹⁾ zeigte.

Sobald sich im Blut dieser Mäuse Trypanosomen nachweisen ließen, wurde die Behandlung eingeleitet. Alle Substanzen wurden in Lösungen, deren Zusammensetzung oben angegeben ist, unter die Rückenhaut gespritzt. Die einzelnen Dosen betragen für:

Maus No. 1	Phenol	0,4 ccm = 0,002 g
" " 2	"	0,45 " = 0,002 ²⁵ "
" " 3	"	0,5 " = 0,002 ⁵ "
" " 4	Sulfanils. Natrium je	0,5 ccm = 0,1 g
" " 5		
" " 6		
" " 7	Oxybenzoesäure je	0,5 ccm = 0,05 g
" " 8		
" " 9		
" " 10	Phenolsulfosäure	0,3 ccm = 0,06 g
" " 11	"	0,35 " = 0,07 "
" " 12	"	0,4 " = 0,08 "
" " 13	Amidosalicylsäurechlorhydrat je	1 ccm = 0,1 g
" " 14		
" " 15		

Bei den ersten 4 Präparaten wurden die angeführten Dosen zweimal, am Abend des 11. und 12. März, also ca. 32 und 56 Stunden nach der Infektion gegeben, Amidosalicylsäure nur einmal, am Abend des 13., d. h. ca. 80 Stunden nach der Infektion. Die beiden Mäuse No. 16 und 17 dienen als Kontrollen: No. 17 zeigt, daß die Infektion an sich zum Tode führt, was uns übrigens aus vielen anderen Versuchen bekannt war; No. 16 wurde auf der Höhe der Infektion mit 0,005 g Atoxyl eingespritzt, um die Beeinflussbarkeit der Trypanosomen durch chemische Mittel zu demonstrieren. Auf der untenstehenden Tabelle ist der Zeitpunkt der Behandlung jeweils durch eine senkrechte Doppellinie angedeutet.

Die Zahl der Trypanosomen im Blut habe ich nicht in der üblichen Weise nach Graden (wenig, viel etc. oder +, ++ etc.) ausgedrückt, sondern versucht, sie zahlenmäßig

1) Unter „Gesichtsfeld“ ist hier, wie auch weiterhin, der Raum zu verstehen, den man bei 525-facher Vergrößerung mit Oelimmersion übersieht.

festzulegen. Es wurden die Trypanosomen in einer Anzahl von Gesichtsfeldern ausgezählt und dabei darauf geachtet, immer Stellen von derselben Schichtdicke unter das Objektiv zu bekommen; ich habe die Dichte gewählt, wie man sie in guten Blutausschstrichpräparaten gewohnt ist, nämlich so, daß die Blutkörperchen ohne größere Lücken bequem nebeneinander liegen. Die Eigenbewegung der Trypanosomen hat auf das Resultat der Zählung keinen Einfluß, wie ich mich durch Kontrolluntersuchungen an fixierten und gefärbten Präparaten überzeugt habe. Die Brüche in der Tabelle bedeuten die Anzahl der Trypanosomen pro Gesichtsfeld. Diese Registrierungsmethode ist natürlich nicht exakt, aber sie gibt doch einen besseren Maßstab für den Blutbefund als die stets subjektiv gefärbte Bezeichnung nach Graden. Wenn man die Werte als Ordinaten in ein System einträgt, auf dessen Abszisse die zugehörigen Zeiten abgetragen sind, so erhält man eine sehr anschauliche Kurve von dem Verlauf der Infektion, d. h. von der Vermehrung der Erreger und von einer etwaigen Beeinflussung durch irgendwelche Agentien.

Tabelle.

Maus No.	10. III.		11. III.		12. III.		13. III.		14. III.		15. III.	
	a. m.	a. m. p. m.	a. m.	p. m.	a. m.	p. m.	a. m.	p. m.	a. m.	p. m.	a. m.	p. m.
Phenol	1	In- fektion dgl.	—	5/1	10/1	20/1	†					
	2		—	1/2	3/1	5/1	30/1	60/1	†			
	3		—	1/5	6/1	10/1	40/1	†				
Sulfanil- säure	4	—	5/1	40/1	20/1	†						
	5	—	3/1	30/1	30/1	†						
	6	—	1/4	6/1	8/1	40/1	†					
Oxybenzoe- säure	7	—	2/1	20/1	15/1	40/1	†					
	8	—	1/8	1/1	3/1	15/1	20/1	60/1	†			
	9	—	3/1	15/1	15/1	30/1	40/1	†				
Phenol- sulfo- säure	10	—	2/1	10/1	12/1	60/1	†					
	11	—	2/1	20/1	25/1	†						
	12	—	2/1	10/1	20/1	†						
Amidosali- cylsäure	13	—	—	—	—	1/8	2/1	15/1	30/1	†		
	14	—	—	—	—	1/20	1/8	†				
	15	—	—	—	—	1/8	1/1	5/1	10/1	40/1	†	
Kontrollen	16	—	—	—	—	1/20	1/5	6/1	16/1	—	†	
	17	—	—	—	—	12/1	20/1	†			bleibt leben	

Zwei andere Versuchsreihen mit denselben Substanzen, die ich der Kürze halber nicht mitteilen will, führten zu demselben eindeutigen Ergebnis: Keines der Präparate hatte irgendeinen Einfluß auf die Infektionserreger; nicht einmal der Verlauf der Erkrankung wurde gegenüber den Kontrolltieren verzögert.

Zusammenfassung.

Wie aus den mitgeteilten Versuchen hervorgeht, ist keines der geprüften Benzolderivate imstande, die Trypanosomen im Tierkörper abzutöten; ob sie imstande sind, die Wirkung anorganischer Arsenverbindungen zu fördern, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Literatur.

- 1) Moore, B., Nierenstein, M. und Todd, J. L., Ann. trop. medic., Vol. 2, 1908, p. 269; zit. nach Nierenstein, M., Organische Arsenverbindungen und ihre therapeutische Bedeutung. Stuttgart (Ferd. Enke) 1912.
- 2) Loeffler, F. und Rühls, K., Deutsche med. Wochenschr., 33. Jahrg., 1907, No. 34, p. 1361.
- 3) — — ebenda, 34. Jahrg., 1908, No. 1, p. 5.
- 4) — — ebenda, No. 34, p. 1457.
- 5) Uhlenhuth und Woithe, Arb. a. d. Kais. Ges.-Amt, Bd. 29, 1908, H. 2, p. 403.
- 6) Ehrlich, P., Beitr. z. experim. Pathol. u. Chemother., 1909.
- 7) Luithlen, F., Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther., Bd. 13, 1913, p. 1.
- 8) Messerschmidt, Th., Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 15, 1912, p. 293.
- 9) Fränkel, S., Arzneimittel-Synthese, 2. Aufl., 1906.

Nachdruck verboten.

[Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien.]

Ueber Säureflockung der Blutstromata.

III. Mitteilung über Blutantigene.

Von **Karl Landsteiner** und **Emil Prášek**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. September 1913.)

Einer der Wege zur Aufklärung der Spezifitätserscheinungen besteht in der Aufsuchung chemischer oder physikalisch-chemischer Unterschiede bei Antigenen verwandter Natur. Von diesem Gesichtspunkte ausgehend, haben schon vor längerer Zeit Landsteiner und Jagić¹⁾ die Beobachtung gemacht, daß die Blutkörperchen mancher Tierarten bei der Hämolyse durch Säure und Lauge gewisse Unterschiede zeigen. Aehnliches gibt Hirschfeld²⁾ für die Ausflockung von Blutstromata durch Metallsalze an. Michaelis, der allerdings — mit Davidsohn³⁾ — einen Zusammenhang der spezifischen Immunitätsreaktionen mit elektrochemischen Fällungen nicht anerkennt, fand, daß sich eine Anzahl von Bakterienarten durch den Säuregrad, der zur Flockung ihrer Emulsionen notwendig ist, unterscheiden. Obermayer und Wilhelm⁴⁾ haben, vermutlich auch durch die Ergebnisse der spezifischen Serumreaktionen angeregt, Serumeiweiß verschiedener Tierarten mit Hilfe der Formoltitration nach Sørensen untersucht und Unterschiede zwischen artverschiedenen, sonst homologen Eiweißstoffen (Serumeiweiß von Säugern und Vögeln) gefunden.

Vor kurzem haben wir unsere Versuche mit Blutkörperchen wieder aufgenommen, um an ihnen die von Michaelis benützte Methode der Säureflockung zu verwenden. Es wurde darüber schon kurz berichtet⁵⁾. Da wir die Erscheinungen

1) Münch. med. Wochenschr., 1904, No. 27. — Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1913, p. 176.

2) Arch. f. Hyg., Bd. 63, p. 237.

3) Biochem. Zeitschr., Bd. 47, 1912, p. 59.

4) Biochem. Zeitschr., Bd. 38, 1912, p. 331; Bd. 50, 1913, p. 369.

5) l. c. Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1913, p. 176. An dieser Stelle sind auch einige hierher gehörende Beobachtungen über Eiweißfällung mitgeteilt.

noch etwas ausführlicher beschreiben wollen, lassen wir hier die Mitteilung einiger neuer Versuche folgen.

In der folgenden Tabelle führen wir zum Vergleich mit unserem schon mitgeteilten Versuch eine neue Reihe von Flockungen der Stromata verschiedener Blutarten an.

1 ccm der Säurelösungen + 1 Tropfen nach Sachs¹⁾ hergestellter, mit 1-proz. Kochsalzlösung auf das ursprüngliche Volumen gebrachter Stromata. Der Gleichheit halber wurde bei der Herstellung der Stromata nicht die minimale, zur Lösung führende Temperatur verwendet, sondern bei allen Blutarten $\frac{1}{2}$ Stunde auf 60° erhitzt.

Für diese und unsere früheren Versuche mit Stromata²⁾ haben wir es für besser gefunden, die Auflösung des dreimal gewaschenen Blutes in einer auf das Doppelte des ursprünglichen Volumens gebrachten Aufschwemmung vorzunehmen.

Die Säurelösungen sind dieselben, wie wir sie vorher verwendet haben.

Zur Feststellung der Resultate wurde die Sedimentierung beobachtet, dann aufgeschüttelt und nach kurzem Zuwarten die Flockung abgelesen.

Wie schon erwähnt wurde, treten die Flockungen sehr rasch ein.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n/10 Natriumacetat	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
n/100 Essigsäure	0,5	1,5	4,5						
n/10 Essigsäure	.	.	.	1,4	4,1				
n Essigsäure						1,2	3,6	10,9	21,9
Wasser	24,5	23,5	20,5	23,6	20,9	23,8	21,4	14,1	3,1
Annähernde H-Konzentration *)	$1,8 \cdot 10^{-7}$	$5,4 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$8 \cdot 10^{-4}$

*) Ohne Rücksicht auf den Dissoziationsgrad des Salzes berechnet.

Die Tabelle gibt die Ablesung eines Versuches nach 5 Stunden wieder. Die Intensität der Flockung ist durch die Zeichen \pm , +, $+\pm$, ++, $++\pm$, $+++$ angegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Hund	+	+	+	$+\pm$	++	++	++	++	++
Mensch	0	0	Spur	\pm	++	++	++	++	++
Pferd	0	0	Spur	+	++	$++\pm$	+++	+++	+++
Rind	0	0	0	0	0	\pm	++	++	++
Schwein	0	0	Spur	\pm	$+\pm$	++	++	++	$+\pm$
Taube	\pm	\pm	+	+	++	++	$+\pm$	+	\pm
Katze	0	\pm	+	+	++	++	++	++	++
Ratte	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	$+\pm$
Huhn	0	0	\pm	+	++	++	$+\pm$	+	+
Gans	\pm	\pm	+	$+\pm$	$++\pm$	+++	+++	+++	$++\pm$
Ziege	0	0	0	0	\pm	+++	+++	++	+
Kaninchen	\pm	\pm	$+\pm$	++	++	$+\pm$	+	\pm	0
Hammel	0	0	0	Spur	+	+++	+++	+++	+++
Maus	Spur	+	+++	+++	+++	+++	$+\pm$	\pm	0

1) Hofmeisters Beitr., Bd. 2, 1902, p. 125.

2) l. c. und Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 13, p. 403; Bd. 17, p. 363.

Es zeigt sich, wenn auch einige Differenzen bestehen, im wesentlichen eine Uebereinstimmung mit dem früheren Versuch, und zwar sowohl was die Grenzen und die Breite der Flockungszone, als auch das Maximum der Flockung betrifft. Einzelne der Blutarten verhalten sich auffallend verschieden, z. B. Kaninchen- und Mausblut einerseits, die das Maximum der Flockung bei niedrigem Säuregrad haben, Rinder-, Ziegen- und Hammelblut andererseits, wo die Flockung erst bei relativ hoher H⁺-Konzentration beginnt. Wir haben schon früher erwähnt, daß in dieser Beziehung möglicherweise eine gewisse Analogie zu dem verschiedenen Verhalten dieser Blutarten bei gewissen serologischen Reaktionen zu sehen ist. Um die Grenze der Schwankungen zu bestimmen, die entweder durch individuelle Unterschiede oder infolge von Differenzen in der Darstellung der Stromata bestehen, haben wir Bestimmungen der Flockung von Stromata verschiedener Individuen einer Tierart vorgenommen, und zwar wurden solche Stromata gewählt, die auffallende Artunterschiede in bezug auf die Flockung besitzen. Es zeigte sich, daß zwar keine vollkommene Uebereinstimmung vorhanden ist, aber die individuellen Unterschiede doch gegenüber der Artverschiedenheit zurücktreten.

Ablesung nach 1/4 Stunde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kaninchen I	±	±	++	++	+±	+±	+	±	0
" II	0	+	+±	++	++	++	+	±	0
" III	Spur	±	+	++	++	++	+	±	0
" IV	0	±	+	++	++	++	+	±	0
Rind I	0	0	0	0	0	Spur	±	+	+
" II	0	0	0	0	0	Spur	+	+±	+±
" III	0	0	0	0	0	Spur	+	++	++
" IV	0	0	0	0	0	0	±	+	+
Pferd I	0	±	+	++	++	++	++	+±	+
" II	0	±	+	+±	++	++	++	++	++
" III	0	0	±	+	+±	++	++	++	+
" IV	0	0	±	+	+±	++	++	++	+±

Eine zunächst zu beantwortende Frage ist es, ob ebenso, wie es bei der Säureflockung der Bakterien von Michaelis und seinen Mitarbeitern festgestellt wurde, die Flockung auch bei den Blutstromata von der H⁺-Konzentration und nicht von der Besonderheit der verwendeten Säuren abhängig ist. Wir haben zu diesem Zwecke Versuche mit einer zweiten organischen Säure (Milchsäure) und einer sehr starken Säure (HCl) angestellt.

Wie aus den Tabellen zu entnehmen ist, stimmen die Resultate bei Anwendung von Milchsäure und Essigsäure ganz befriedigend überein.

Auch bei der Flockung mit HCl ergeben sich ungleiche Flockungszonen. Einen direkten Vergleich in bezug auf die H-Konzentration können wir hier nicht machen, da die Berechnung wegen des geringen Säuregehaltes der eiweißhaltigen Proben keine brauchbaren Resultate geben würde und wir Bestimmungen nicht ausgeführt haben. Doch genügen die Daten, um zu erkennen, daß die Flockungsunterschiede bei Verwendung starker Säuren nicht aufgehoben sind.

Es wurde die folgende Reihe von Milchsäurelösungen verwendet (Beniasch):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
n/10 milchsaures Natron	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
n/10 Milchsäure	0,6	1,2	2,5	5,0	10,0				
n Milchsäure						2,0	4,0	8,0	16,0
Wasser	15,4	14,8	13,5	11,0	6,0	14,0	12,0	8,0	0
Annähernde H-Konzentration	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$0,7 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$5,5 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$4,4 \cdot 10^{-3}$

Ablesung nach 1/4 Stunde.

Milchsäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kaninchen	+++	++	+	+	±	0	.	.	.
Rind	0	0	±	+	++	++	+±	+	±
Hammel	0	±	+	++	++	++	+	±	±
Taube	+	++	+++	++++	++	+	±	Spur	θ

Ablesung nach 20 Minuten.

HCl	n/8400	n/3200	n/1600	n/800	n/400	n/200	n/100	n/50
Kaninchen	+±	++	++	+	±	0	0	0
Rind	0	0	+	++	++	+±	±	0
Hammel	0	Spur	++	++	+±	+	±	Spur
Ziege	0	0	++	++	++	+±	+	±
Maus	±	+	++	++	+	0	0	0

In unseren vorhergehenden Mitteilungen¹⁾ wurde mitgeteilt, welchen Einfluß eine Reihe von Veränderungen auf das Bindungsvermögen der Stromata für verschiedene Agglutinine und Lysine hat. Es stellte sich heraus, daß die einzelnen Veränderungen eine ungleiche Wirkung in bezug auf die Bindung verschiedener Stoffe haben, so daß z. B. nach einem

1) l. c. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 13, p. 403; Bd. 17, p. 363.

bestimmten Eingriff das Bindungsvermögen für Pflanzenagglutinine erhalten blieb, für normale Serumagglutinine aufgehoben wurde. Wir haben diese Untersuchungen jetzt auch auf den Fall der Säureflockung ausgedehnt. Es wurden zu diesem Zwecke einige der Veränderungen mit den Stromata so wie früher¹⁾ vorgenommen, und um klare Resultate zu bekommen, wieder solche Blutarten gewählt, die weit differente Flockungspunkte besitzen.

Wir fanden, daß durch Kochen der Stromata²⁾ und wahrscheinlich bei Behandlung mit kaltem Alkohol³⁾ [nach einem Versuche möglicherweise auch bei Behandlung mit HNO₃⁴⁾] die Artunterschiede in bezug auf die Säureflockung nicht aufgehoben werden, doch erscheinen sie weniger scharf ausgeprägt. Nach Behandlung mit 20-proz. Formaldehyd oder mit salpetriger Säure waren die Flockungsunterschiede nicht mehr deutlich oder die Ergebnisse wechselnd. Bis zu einem gewissen Grade erinnern diese Erscheinungen an die Abschwächung der spezifischen Bindungsfähigkeit, wie wir sie unter bestimmten Bedingungen früher sahen, doch liegen die Verhältnisse, wie schon erwähnt, nicht einfach.

Acetatgemische wie oben. Ablesung nach 1 Stunde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Kaninchenstromata	±	±	+	++	++	+±	+	±	0
dgl. 1 Std. gekocht	0	0	+	++	++	++	+	±	0
dgl. 1 Std. gekocht	0	±	+	++	++	++	++	+	±
Kaninchenstromata, behandelt mit	Formol	0	0	0	±	+	+	+	+
	„ Alkohol ⁵⁾	0	0	0	±	+	++	++	+
	HNO ₂	0	+	+	+	+	+	0	0
	5 „ HNO ₃	0	±	±	+	+	+	±	0
	5 „ HNO ₃	0	0	0	0	±	+	+	+
5 „ HNO ₃	0	±	+	++	++	++	±	0	0

1) Bezüglich der Einzelheiten s. die zitierten Mitteilungen.

2) Die gekochten Stromata müssen, falls sie verklumpt sind, um eine feine Verteilung zu erzielen, kräftig zerschüttelt werden.

3) Durch sehr langsamen Zusatz des Alkohols in kleinen Portionen ließ sich die Bildung grober Flocken teilweise vermeiden.

4) l. c. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, p. 365 unten sub 1.

5) Von den mit Alkohol behandelten Stromata wurden statt eines 3 Tropfen der Aufschwemmung genommen und die Ablesung konnte wegen der wenig feinen Verteilung nicht nach der Flockenbildung, sondern nur auf Grund der Sedimentierung und Klärung vorgenommen werden (+ = Klärung).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Rinderstromata	0	0	0	0	0	±	+	++	++
dgl. 1 Std. gekocht	0	0	±	+	++	++	++	++	++
dgl. 1 Std. gekocht	0	0	0	±	+	+	+±	+±	++
Rinder- stromata, be- handelt mit	Formol	0	0	0	0	±	+++	+++	+++
	"	0	0	0	0	±	+	++	++
	Alkohol ¹⁾	0	0	+	+	+	+	+	+
	HNO ₃	0	0	0	0	±	++	++	++
	5 " HNO ₃	0	0	0	0	±	±	±	±

Um zu ermitteln, ob die Lipide für die charakteristischen Unterschiede der Flockung von ausschließlicher Bedeutung sind (vgl. die Untersuchungen von Feinschmidt²⁾ über die Säureflockung von Lipiden), haben wir alkoholische Extrakte aus Kaninchen-, Rinder- und Hammelblut geprüft. Die Versuche sprachen aber nicht für diese Annahme.

Das dreimal gewaschene Blut wurde mit dem 10-fachen Volumen 95-proz. Alkohols 24 Stunden bei 37° resp. 14 Stunden bei 60° digeriert, filtriert, der Alkohol abgedampft, der Rückstand in absolutem Alkohol aufgenommen, auf $\frac{1}{10}$ des Blutvolumens eingedampft, filtriert. Zu der Flockung wurden die oben angeführten Milchsäurelösungen verwendet. Zu je 1 ccm kamen 2 Tropfen der Lipoidlösungen.

Es ergaben sich Trübungen in den Röhrchen 6—9, ohne daß konstante Unterschiede zwischen den Blutarten festgestellt werden konnten.

Von Wichtigkeit, besonders mit Rücksicht auf abweichende Angaben von Michaelis und Takahasi³⁾, erscheint die Frage, ob die Flockungsdifferenzen wirklich den unveränderten Blutstromata selbst zukommen oder ob sie durch ein verschiedenes Verhalten der Blutkörperchen bei der Herstellung der Stromata nach der Sachsschen Methode — Erhitzung auf 60° — bedingt werden.

Um Stromata ohne viel beigemengten Farbstoff und in möglichst unverändertem Zustande zu gewinnen, haben wir 5 ccm dreimal mit 1-proz. Kochsalzlösung gewaschenes Blut in 50 ccm destilliertem Wasser gelöst, nach 45 Minuten durch

- 1) Siehe Anmerkung 5 p. 141.
- 2) Biochem. Zeitschr., Bd. 38, 1912, p. 244.
- 3) Biochem. Zeitschr., Bd. 29, 1910, p. 439.

Zusatz von 10-proz. Kochsalzlösung auf 1 Proz. NaCl-Gehalt gebracht, auf einer sehr kräftig wirkenden Zentrifuge ausgeschleudert, mit 50 ccm 1-proz. Kochsalzlösung auf der Zentrifuge gewaschen. Der Bodensatz wurde in 2,5 ccm 1-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und geschüttelt. Man erhält so eine feine stabile Emulsion, die sich zur Ablesung der Flockung gut eignet. Auch hier traten die Flockungen bei den von uns untersuchten Blutarten rasch ein, nur beim Kaninchenblut sehr langsam, so daß die Ablesung erst nach mehreren Stunden erfolgen konnte.

	1	2	3	4	5	6
n/10 Natriumacetat	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
n/10 Essigsäure	0,5	1,0	2,0	4,0		
n Essigsäure					0,8	1,6
Wasser	24,5	24,0	23,0	21,0	24,2	23,4
Annäh.H.-Konzentr.	$1,8 \cdot 10^{-6}$	$3,6 \cdot 10^{-6}$	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$

	7	8	9	10	11
n/10 Natriumacetat	5,0	5,0	5,0	5,0	2,5
n/10 Essigsäure					
n Essigsäure	3,2	6,4	12,8	25,0	25,0
Wasser	21,8	18,6	12,2	—	2,5
Annäh. H.-Konzentrat.	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$	$4,6 \cdot 10^{-4}$	$9,2 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-3}$

Bei Kaninchenstromata konnte nicht, wie bei den anderen Blutarten, nach Umschütteln und kurzem Abwarten die Intensität der Flockung geschätzt und durch die Zahl der + graduell ausgedrückt werden, sondern wir stellten, da nach dem Aufschütteln die Klumpen sich nicht rasch wieder bildeten, die partielle oder vollständige Klärung und Sedimentierung der Emulsion, die übrigens sehr scharf erkennbar war, fest. Die Röhrchen, in denen Sedimentierung eintrat, sind mit + bezeichnet.

Ablesung nach 6 Stunden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Rind I	0	0	0	0	0	+	++±	+++	+++	+++	+++
Rind II	0	0	0	0	0	+	++	+++	+++	+++	+++
Hammel	0	0	0	0	±	+	++	+++	+++	+++	++
Maus	0	0	0	+	++	++	+++	+++	++	+	±
Kaninchen I	0	+	++	+	+	+	+	0	0	0	0
Kaninch. II	0	0	++	+	+	+	+	0	0	0	0
Pferd I	0	0	±	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
Pferd II	0	Spur	±	+	+++±	+++±	+++±	+++	+++	++	++
Meerschw.	0	0	0	±	+	++	++	+++	+++	++	+

Die Versuche zeigen, daß die Flockungen der unveränderten, d. h. nur mit Wasser hergestellten und der durch Erhitzung nach dem Sachsschen Verfahren gewonnenen Stromata, was die Breite und Lage der Flockungszonen betrifft, nicht gleich sind. Es scheint, daß die Zustandsänderung, die die Stromata bei der Erwärmung erfahren (vielleicht ist auch an eine dabei stattfindende Absorption, z. B. von Hämoglobin, zu denken), Differenzen in der Stabilität der Suspensionen bewirken, wodurch die Breite der Flockungszonen beeinflußt wird. Dieser Umstand tritt bei den Kaninchenstromata auffallend hervor, da die Sachs-Stromata sehr leicht, die nativen schwer flocken. So weit es bisher den Anschein hat, werden ferner durch die Behandlung nach Sachs die Flockungszonen der Stromata nach der Richtung geringerer Azidität hin verschoben.

Das Wichtigste aber ist, daß auch die bloß durch Wasserauflösung des Blutes hergestellten, also möglichst unveränderten Stromata ausgesprochene Unterschiede in der Flockung zeigen. Diese Unterschiede sind sehr ähnlich jenen, die bei erwärmten Stromata zu finden sind, und daraus ergibt sich, daß auch diese letzteren Ergebnisse wesentlich und nicht auf akzesorische Umstände zurückzuführen sind. In physiologischer Beziehung wichtiger sind wohl die Werte der möglichst unveränderten Stromata.

Wie wir schon a. a. O. erwähnten, sehen wir die Bedeutung solcher Befunde wie der hier beschriebenen und der oben zitierten darin, daß sie Unterschiede verwandter Antigene erkennen lassen, die das Bestehen eines spezifischen Verhaltens bei den Immunreaktionen dem Verständnis näher rücken. Gewiß sind die durch Säureflockung nachweisbaren Artunterschiede der Blutkörperchen bei weitem nicht so mannigfaltig als die Spezifität ihrer serologischen Reaktionen. Aber es darf nicht vergessen werden, daß die Flockungspunkte in jedem einzelnen Fall wahrscheinlich nur die Resultierenden aus einer größeren Zahl von differenten Eigenschaften darstellen und daß durch Anwendung anderer Methoden neue Momente der Differenzierung zu gewinnen sein werden, so daß vielleicht die einzelnen Antigene durch eine Anzahl solcher Merkmale zu definieren sein können (vgl. die Bemerkungen

von Liefmann¹⁾. Es ist auch daran zu erinnern, daß, was die Flockungspunkte selbst anbelangt, die angewendete Methode nur große Differenzen zu erkennen gestattet, während die kleinen Unterschiede nicht sicher nachweisbar sind.

Als Stütze unserer öfters geäußerten Hypothese²⁾ der elektrochemischen Natur der immunchemischen Reaktionen scheint es uns von Wichtigkeit zu sein, daß gerade auffallende elektrochemische Differenzen zwischen artverschiedenen Antigenen sich auffinden lassen, und zwar vermutlich leichter als etwa grobe Unterschiede der chemischen Zusammensetzung, z. B. der Spaltprodukte.

Zusammenfassung.

Wie schon kurz mitgeteilt wurde, lassen sich zwischen den Stromata verschiedener Blutarten zum Teil beträchtliche Unterschiede in der Säureflockung auffinden. Die Differenzen liegen außerhalb der Breite der individuellen Unterschiede. Sie bleiben bestehen, wenn verschiedenartige Säuren angewendet werden. Die Flockung durch Erwärmung dargestellter und nativer Stromata ist etwas verschieden, doch sind auch bei den nicht erhitzten Stromata ganz ähnliche Artunterschiede nachweisbar wie im ersten Fall. Auch durch Kochen der Stromata werden die Unterschiede nicht aufgehoben.

Es wird auf die Bedeutung der nachgewiesenen Artunterschiede bei der Säureflockung von Antigenen für die elektrochemische Hypothese der Immunreaktionen hingewiesen.

1) Münch. med. Wochenschr., 1913, No. 26.

2) S. z. B. Landsteiner, Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 47 (Literatur).

Nachdruck verboten.

[Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien
(Vorstand: Prof. Dr. Landsteiner).]

Ueber die Wärmeresistenz von normalen und Immun- agglutininen.

Von Dr. **Emil Prášek.**

Mit 21 Kurven im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. September 1913.)

Für das Verständnis des Immunisierungsprozesses ist offenbar das Verhältnis zwischen den im normalen Serum vorhandenen und den bei der Immunisierung entstehenden Immunkörpern von besonderer Wichtigkeit.

Bekanntlich wird diese Frage von der Ehrlichschen Theorie im Sinne einer prinzipiellen Identität dieser Stoffe beantwortet, während andererseits in einzelnen Fällen Differenzen beobachtet wurden (Gruber, Shibayama, Landsteiner und Calvo, Eisenberg und Volk, Kraus, Heyrovsky und Landsteiner u. a.).

Die Identität der Körper glaubte auf Grund von Versuchen mit Antiimmunkörpern Ford¹⁾ (s. Pfeiffer) bewiesen zu haben, seine Schlußfolgerung beruht aber auf ungenügender Grundlage.

Zu dem Ergebnis, daß, wenn auch die Art ihrer Entstehung eine verwandte ist, normale und Immunantikörper nicht als identisch betrachtet werden können, vielmehr wesentliche Unterschiede zeigen, kam Landsteiner²⁾ auf Grund von Untersuchungen über Hämagglutinine, die er gemeinsam mit Reich anstellte. Es ließ sich hier feststellen, daß zwischen den beiden Arten von Antikörpern durchgreifende Unterschiede bestehen, nämlich eine größere Absorbierbarkeit durch Eiweißstoffe (Casein), geringere Hitzebeständigkeit, Avidität, Spezifität der normalen im Vergleiche zu Immunantistoffen. Diesen Untersuchungen zufolge kann der Immunisierungseffekt nicht mehr in einer bloßen Vermehrung normaler Antikörper gesehen werden, sondern muß auf der Bildung neuartiger Stoffe beruhen.

Die folgende Untersuchung beschäftigt sich nochmals mit der Frage der Thermoresistenz der Agglutinine, und zwar,

1) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 40, 1912, p. 363.

2) Centralbl. f. Bakt., Bd. 39, 1905, p. 712. Tag. d. Ver. f. Mikrobiol. 1906. Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 38, Beiheft. Zeitschr. f. Hyg., Bd. 58, 1907, p. 213. Wien. klin. Wochenschr., 1909, No. 47.

um zu einer Aufklärung der vorliegenden widersprechenden Angaben zu gelangen.

Ueber diesen Punkt liegt eine Anzahl von Angaben vor, und zwar von Rodet, Eisenberg und Lüdke, und, wie erwähnt, von Landsteiner und Reich.

Nach Versuchen von Rodet¹⁾ haben Normalagglutinine (Typhusagglutinine) eine geringere Resistenz gegen Erwärmen als Immunagglutinine.

Eisenberg²⁾ bemängelt das Ergebnis von Rodet, weil die Normal- und die Immunsera nicht auf gleichen Wirkungsgrad gebracht und die quantitativen Verhältnisse nicht hinreichend berücksichtigt wurden. Er selbst findet, daß verschiedene Immunagglutinine von Seren der gleichen Tierart ungleiche Resistenz haben können und ebenso gleichartig wirkende Agglutinine von Seren verschiedener Tierarten. Bei normalen Agglutininen der gleichen Tierart können beträchtliche Differenzen der Hitzeempfindlichkeit vorkommen. Bezüglich der Immunagglutinine gegen Bakterien findet auch Eisenberg, daß sie eine geringere Empfindlichkeit gegen Erhitzung haben können als die Normalagglutinine. Ein derartiges Ergebnis teilt auch Lüdke³⁾ mit, und ähnliche, aber nicht konstante Resultate hat Lüdke bei Hämagglutininen.

Landsteiner und Reich beobachteten bei Anwendung gleich stark wirkender Verdünnungen von Hämagglutininen aus normalen und Immunseren, daß zwar die Resistenz in den einzelnen Serumproben schwankte, aber doch die Immunagglutinine beträchtlich hitzebeständiger waren als die Normalagglutinine, ein Umstand, der, wie gesagt, neben anderen gegen die Gleichstellung dieser Substanzen spricht.

Bei Anwendung eines anderen Untersuchungsmaterials kam in einer sehr ausführlichen und sorgfältigen Arbeit Osw. Streng⁴⁾ zu abweichenden Resultaten.

Streng fand folgendes, was für die hier erörterte Frage in Betracht kommt:

Die Hitzeempfindlichkeit von Coliimmunagglutininen in Seren von verschiedenen Tieren derselben Species ist eine sehr verschiedene. „Die Unterschiede können so groß sein, daß Serum von einem Tier bei 64° C schneller inaktiviert wird als Serum von einem anderen bei 74° C.“

Sowohl bei Ziegen als bei Kaninchen können thermostabile und thermolabile Immunagglutinine für Colibacillen gefunden werden, aber ein konstanter Artunterschied in dieser Beziehung besteht nicht. Durch Verdünnen des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung wird die Inaktivierungsgeschwindigkeit vermindert. Die Inaktivierung erfolgt bei den verschiedenen Seren nach zwei verschiedenen Typen, entweder mit konstant abnehmender Geschwindigkeit oder so, daß die Abnahme der Geschwindig-

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 37, 1907, p. 714.

2) Centralbl. f. Bakt., Bd. 41.

3) Centralbl. f. Bakt., Bd. 42, 1906, p. 260, 262.

4) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 62, 1909, p. 281.

keit immer größer wird. Zwischen Coli- und Typhusimmunagglutininen besteht in bezug auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit nur dann ein konstanter Unterschied, wenn zur Immunisierung bestimmte Stämme verwendet werden. Coli- und Typhusagglutinine können beim gleichen Kaninchen verschiedene Inaktivierbarkeit haben.

Auch die Normalagglutinine haben bei verschiedenen Tieren derselben Species ungleiche Resistenz, aber die Unterschiede sind nicht so groß wie bei den Immunagglutininen. Bei einem und demselben Tier blieb die Empfindlichkeit zu verschiedenen Zeiten konstant. Normalagglutinine und Serumagglutinine gegen *B. coli*, die vom selben Tiere herstammten, wurden mit derselben Geschwindigkeit inaktiviert. Durch Verdünnen von Typhusimmunserum mit normalem Serum verschiedener Tierarten wurde die Inaktivierungsgeschwindigkeit nicht in hohem Grade geändert. Auch geringe Variationen des Salzgehaltes hatten keinen großen Einfluß.

Streng nimmt an, daß die von ihm gefundenen Unterschiede der Empfindlichkeit durch die Verschiedenheit der Agglutinine selbst zu erklären sind, nicht durch Differenzen des Milieus. Die erwähnten verschiedenen Inaktivierungstypen erklärt Streng durch die Annahme, daß das Agglutinin eines Serums aus einer Reihe von Partialagglutininen mit verschiedener Resistenz besteht.

Auf Grund seiner Untersuchung bezweifelt Streng die Richtigkeit der Angaben und Schlußfolgerungen von Landsteiner und Reich, was darum nicht ganz begründet ist, weil die Untersuchungen Strengs an einem anderen Substrat, nämlich an Bakterienagglutininen, ausgeführt wurden. Es ist aber wohl möglich, daß hier nicht die gleichen Verhältnisse vorliegen wie bei Blutagglutininen. Richtig ist, daß gewisse Schwierigkeiten bestehen, normale und Immunsera zu vergleichen, weil die letzteren viel stärker wirksam sind, also nur durch Verdünnung auf gleichen Wert gebracht werden können wie die ersten. Geht man aber so vor, so tritt natürlich wieder eine andere Ungleichheit dadurch ein, daß die stärker verdünnten Lösungen weniger von den Serumbestandteilen überhaupt enthalten. Nach Eisenberg und Streng kann aber durch Verdünnung des Serums mit physiologischer Kochsalzlösung die Inaktivierungsgeschwindigkeit von Agglutininen verringert werden.

Es ist also nicht leicht möglich, Lösungen herzustellen, die einander, abgesehen von einem eventuellen qualitativen Unterschied der Immunsbstanzten, in jeder Hinsicht entsprechen

würden. Auch eine Verdünnung mit großen Mengen von Normalserum kann z. B. wegen der darin enthaltenen Agglutinine zu Fehlern Veranlassung geben.

Landsteiner und Reich haben aus diesen Gründen neben verdünntem Serum auch gereinigte Agglutininlösungen verwendet, die nur sehr wenig Eiweiß enthielten, um so die Bedingungen einander gleich zu machen.

Trotzdem ist es aber wünschenswert, auch nach dem von Streng angewendeten Verfahren vorzugehen, nämlich die Sera in gleichen Konzentrationen (bezogen auf den Eiweißgehalt) anzuwenden, da ein Vergleich der verschiedenen Methoden ein um so sichereres Ergebnis liefern wird.

Besonders berücksichtigungswert erscheinen die Resultate von Streng, denen zufolge die Bakterienagglutinine bei verschiedenen Individuen einer Species ungleiche Resistenz gegen Erwärmung haben. Es könnte demnach, worauf Streng hinweist, geschehen, daß durch individuelle Unterschiede der untersuchten Sera prinzipielle Differenzen vorgetäuscht werden.

Mit Rücksicht darauf, ging ich wie Streng so vor, daß ich das Serum einzelner Tiere vor und nach der Immunisierung prüfte, wobei solche Kaninchen verwendet werden mußten, die für das zu injizierende Blut genügend starke Agglutinine enthielten. Das Serum wurde also den gleichen Tieren vor, während und nach der Immunisierung (aus dem Ohr) entnommen, immer auf das Fünffache mit 1-proz. Kochsalzlösung verdünnt und auf seine Hitzeresistenz geprüft.

Während bei den Untersuchungen von Landsteiner und Reich auf genaue Temperaturmessung kein Gewicht gelegt zu werden brauchte, weil dort die Sera verschiedener Tiere gleichzeitig erwärmt werden konnten, so daß der Einfluß von Temperaturschwankungen vollkommen ausgeschaltet war, ist im Gegenteil bei der von Streng und hier verwendeten Methode auf eine genaue Einstellung der Temperatur das größte Gewicht zu legen, denn es ist bekannt und wurde von Streng neuerdings hervorgehoben, daß schon geringe Diffe-

renzen, z. B. $0,5^{\circ}$, innerhalb der in Betracht kommenden Temperaturzone einen merklichen Einfluß auf die Inaktivierungsgeschwindigkeit haben.

Die Erwärmung wurde daher, wie bei Streng, in einem mit Toluolregulator und Rührwerk versehenen Ostwaldschen Thermostaten vorgenommen, wobei die Schwankungen $0,1^{\circ}$ nicht überstiegen, und zur Temperaturmessung diente ein genaues, in $\frac{1}{10}^{\circ}$ geteiltes Thermometer. Um jeden Einfluß vom Gefäß abgegebener Stoffe auszuschalten, vermied ich bei der Erhitzung Glasgefäße und verwendete Eprouvetten aus durchsichtigem geschmolzenen Quarz, die mit Kautschukstopfen verschlossen wurden.

Im folgenden teile ich die von mir ausgeführten Resultate mit.

Die Titrationsen wurden nach entsprechender Verdünnung der Sera durch Aufstellung von Reihen mit den Verdünnungen 1, 2, 4 etc. ausgeführt. In jedes Röhrchen kam $0,5$ ccm der Lösungen und 2 Tropfen einer 2-proz. Blutaufschwemmung. Ablesung bei schwacher Mikroskopvergrößerung nach Aufbewahrung durch 1 Stunde bei Zimmertemperatur, bis zum nächsten Tage im Eiskasten. Die angegebenen Zahlen bedeuten die letzte wirksame Verdünnung. Zur besseren Uebersicht habe ich die Ergebnisse auch in Kurvenform dargestellt. Die Agglutininwerte sind als Ordinaten genommen. Der Ausgangspunkt der Kurven wurde der Uebersichtlichkeit halber gleich angesetzt (bei 16) und die Titerwerte entsprechend umgerechnet. Die Zeit ist durch die Abszisse dargestellt, bei den länger dauernden Versuchen (Erhitzung auf 60°) ist die Stunde gleich einem Teilstrich, bei den kürzeren Versuchen (Erhitzung auf 69°) gleich zwei Teilstrichen.

Die Kurven der Immunsera zeigen bei der Erhitzung auf 60° häufig zunächst einen horizontalen Verlauf und dann erst eine Neigung¹⁾. Diese Form ist wohl nicht auf ein Ansteigen der Inaktivierungsgeschwindigkeit, sondern darauf zurückzuführen, daß bei der benutzten Methode der Titration geringere Abnahmen als um die Hälfte des Wertes untermerklich sind.

Wie schon erwähnt, wurde die Erwärmung immer in der Verdünnung der Sera 1:5 vorgenommen, mit einzelnen Ausnahmen, die besonders vermerkt sind (Kan. VI). Die in den Tabellen angegebenen Verhältniszahlen geben die Verdünnung an, die zur Titration verwendet wurde und damit zugleich den Wirkungswert der Sera.

1) Die erste Ablesung ist nicht eingezeichnet.

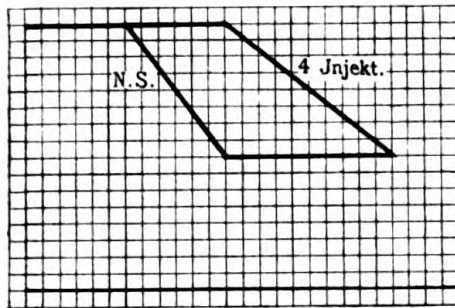
Kaninchen I. Immunisierung mit Taubenblut.

Erwärmung auf 60,2° C	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
27. I. normal 1 : 5	4	4	4	2	2
7. III. nach 4 Injektionen 1 : 500	4	8	8	8	4
18. III. nach 5 Injektionen 1 : 1000	16	16	16	16	

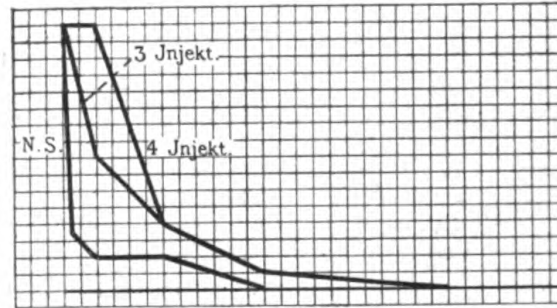
Siehe hierzu Kurve 1.

Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
6. I. normal 1 : 5	8	2	1	1	0	0	0
14. II. nach 3 Injektionen 1 : 500	8	8	4	2	1	0	
4. III. nach 4 Injektionen 1 : 5000	8	8	8	2	1	1	0
17. III. nach 5 Injekt. in 1/5 Verdünnung vorher 1/2 ^h bei 58° inaktiviert 1 : 1000	16		8	8	4	4	0

Siehe hierzu Kurve 2.



Kurve 1.



Kurve 2.

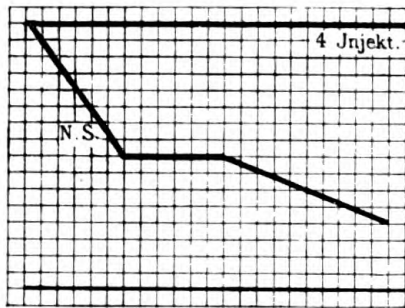
Kaninchen II. Immunisierung mit Meerschweinchenblut.

Erwärmung auf 60,3° durch	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
28. I. normal 1 : 5	16	16	8	8	4
12. IV. nach 4 Injektionen 1 : 200	8	8	8	8	8

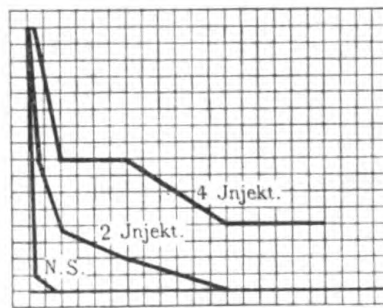
Siehe hierzu Kurve 3.

Erwärmung auf 69,6° durch	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h
30. I. normal 1 : 5	16	1	0			
30. I. normal 1 : 5 (vorher in 1/5 Verdünnung 1/2 ^h bei 60° inaktiviert)	16	0	0			
4. III. nach 2 Injektionen 1 : 250	8	4	2	1	0	
7. IV. nach 4 Injektionen 1 : 200	4	4	2	2	1	1

Siehe hierzu Kurve 4.



Kurve 3.



Kurve 4.

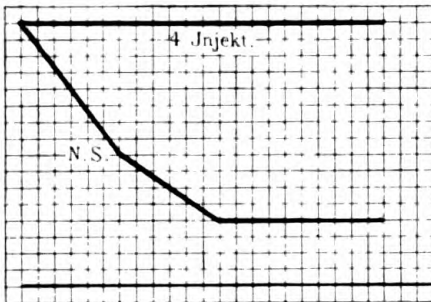
Kaninchen III. Immunisierung mit Meerschweinchenblut.

Erwärmung auf 60,2°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
2. II. normal 1:5	Lyse	16	8	4	4
20. IV. nach 4 Injektionen 1:250	4	4	4	4	4

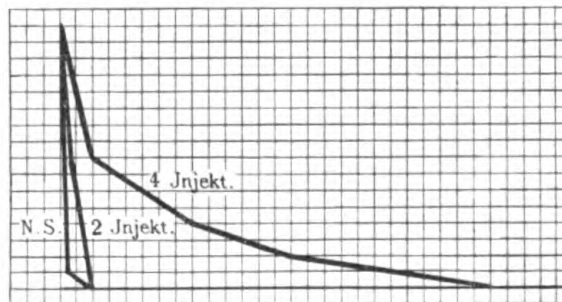
Siehe hierzu Kurve 5.

Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
2. II. normal 1:5	32	2	0				
normal (vorher in 1/5 Verdünnung 1/2 ^h bei 60° inaktiviert 1:5	16	1	0				
8 III. nach 2 Injektionen 1:250	4	2	0				
8. IV. nach 4 Injektionen vorher in 1/5 Verd. bei 58° 1/2 ^h inaktiviert 1:250	8	8	4	2	1	0	

Siehe hierzu Kurve 6.



Kurve 5.



Kurve 6.

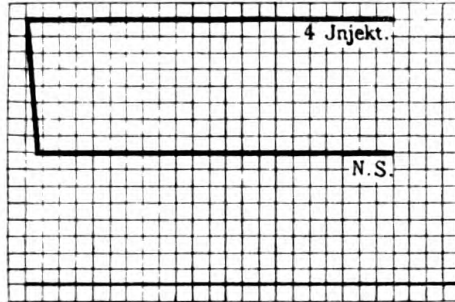
Kaninchen IV. Immunisierung mit Taubenblut.

Erwärmung auf 60,2°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
6. II. normal 1:5	8	4	4	4	4
28. IV. nach Injektionen 1:300	4	4	4	4	4

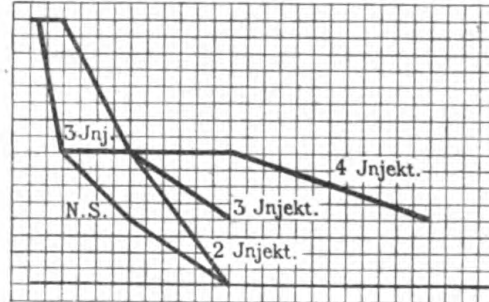
Siehe hierzu Kurve 7.

Erwärmung auf 69,5°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
8. II. normal 1:5	4	4	2	1	0		
19. III. nach 2 Injektionen 1:250	2	2	2	1	0		
5. IV. nach 3 Injektionen 1:100	8	8	4	4	2		
27. IV. nach 4 Injektionen 1:200	8	8	4	4	4	2	1

Siehe hierzu Kurve 8.



Kurve 7.



Kurve 8.

Kaninchen V. Immunisierung mit Taubenblut.

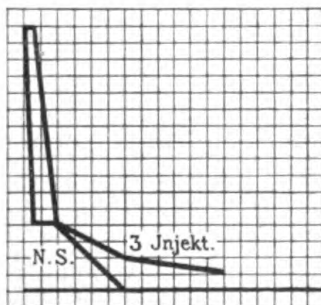
Erwärmung auf 69,2°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
10. II. normal 1:5	8	1	1	0			
12. II. normal, vorher in 1/5 Verdünnung. 1/2 ^h bei 58° inaktiviert. 1:5	8	2	2	0			
6. IV. nach 3 Injektionen, vorher in 1/5 Verdünn. 1/2 ^h bei 58° inakt. 1:200	16	16	4	2	1		

Siehe hierzu Kurve 9.

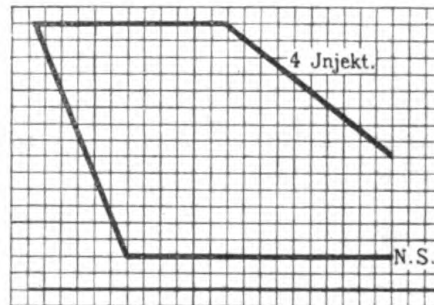
Kaninchen VI. Immunisierung mit Pferdeblut.

Erwärmung auf 60,2°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
12. II. normal 1:5	32	32	4	4	4
10. V. nach 4 Injektionen 1:500	16	16	16	16	8

Siehe hierzu Kurve 10.



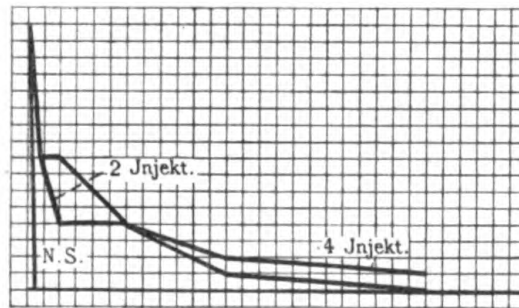
Kurve 9.



Kurve 10.

Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h
13. II. normal 1:5	32	0				
13. II. dgl., vorher in $\frac{1}{5}$ Verdünnung $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° inaktiviert	32	0				
24. III. nach 2 Injektionen, vorher in $\frac{1}{5}$ Verdünnung $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° inaktiviert 1:1000	16	8	4	4	1	0
10. V. nach 4 Injektionen, vorher in $\frac{1}{5}$ Verdünnung $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° inaktiviert 1:500	16	8	8	4	2	1
27. III. nach 2 Injektionen, vorher in $\frac{1}{5}$ Verdünnung $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° inaktiviert, die Erwärmung in der Verdünnung 1:1000 vorgenommen ¹⁾	8	8	8	4	4	
29. III. dgl. ¹⁾	8	8	8	4	4	
28. III. mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt, $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° inaktiviert, dann auf 69,6° erwärmt. Titriert 1:1000	4	2	2	2	0	

Siehe hierzu Kurve 11.



Kurve 11.

Kaninchen VII. Immunisierung mit Pferdeblut.

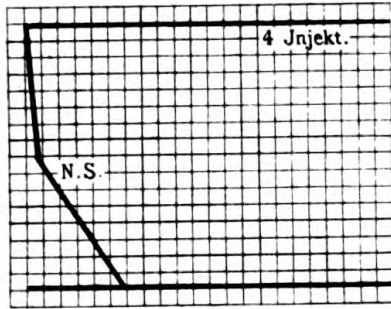
Erwärmung auf 60,2°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
20. II. normal 1:5	8	4	0		
28. IV. nach 4 Injektionen 1:300	16	16	16	16	16

Siehe hierzu Kurve 12.

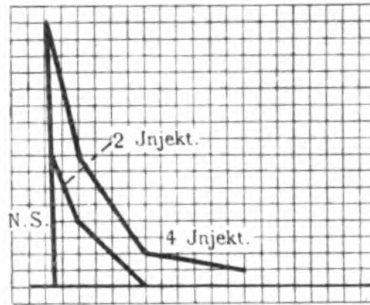
Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
18. II. normal 1:5	8	0					
18. II. dgl., vorher $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° in $\frac{1}{5}$ Verdünnung inaktiviert	2	0					
23. III. nach 2 Injektionen, vorher $\frac{1}{2}$ ^h bei 58° in $\frac{1}{5}$ Verdünnung inaktiviert 1:500	8	4	2	0			
29. IV. nach 4 Injektionen 1:300	16	16	8	2	1		

Siehe hierzu Kurve 13.

1) In diesen Versuchen wurde die Erwärmung in stark verdünnter Lösung vorgenommen, um den Einfluß der Verdünnung zu prüfen. Die Resistenz scheint hier erhöht (cf. Streng).



Kurve 12.



Kurve 13.

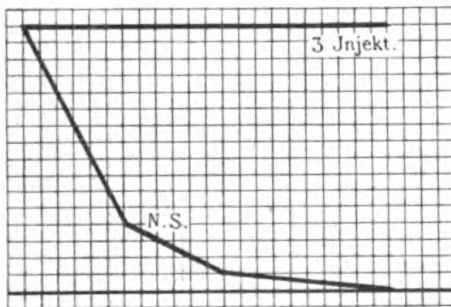
Kaninchen VIII. Immunisierung mit Pferdeblut.

Erwärmung auf 60,2°	0'	20'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
23. II. normal 1:5	8	8	2	1	0
14. IV. nach 3 Injektionen 1:500	8	8	8	8	8

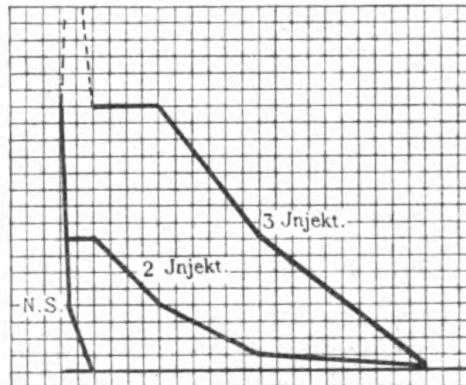
Siehe hierzu Kurve 14.

Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
25. II. normal 1:5, vorher 1/2 ^h bei 58° in 1/5 Verdünnung inaktiviert	4	1	0				
22. III. nach 2 Injektionen, vorher 1/2 ^h bei 58° in 1/5 Verdünnung inaktiviert 1:100	16	8	8	4	1	0	
11. IV. nach 3 Injektionen, vorher 1/2 ^h bei 58° in 1/5 Verdünnung inaktiviert 1:500	4	8	4	4	2	0	

Siehe hierzu Kurve 15.



Kurve 14.



Kurve 15.

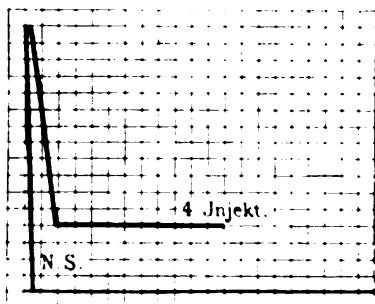
Kaninchen IX. Immunisierung mit Pferdeblut.

Erwärmung auf 60,2°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
3. III. normal 1:5	8	4	2	1	0
22. V. nach 4 Injektionen 1:1000	16	16	16	16	8

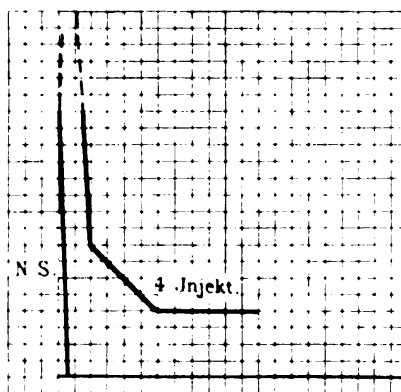
Siehe hierzu Kurve 16.

Erwärmung auf 69,55°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
9. III. normal 1:5	8	0					
9. III. normal 1:5, vorher $\frac{1}{2}^h$ bei 58° in $\frac{1}{6}$ Ver- dünnung inaktiviert	4	0					
18. V. nach 4 Inj. 1:1000	8	16	4	2	2		

Siehe hierzu Kurve 17.



Kurve 16.



Kurve 17.

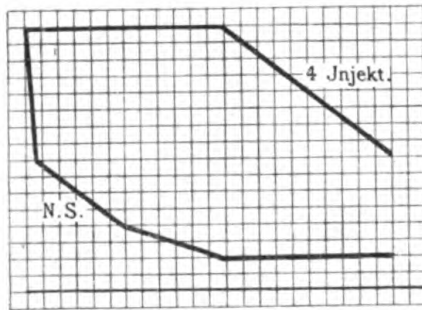
Kaninchen X. Immunisierung mit Pferdeblut.

Erwärmung auf 60,2°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
14. III. normal 1:5	16	8	4	2	2
20. V. nach 4 Injektionen 1:100	8	8	8	8	4

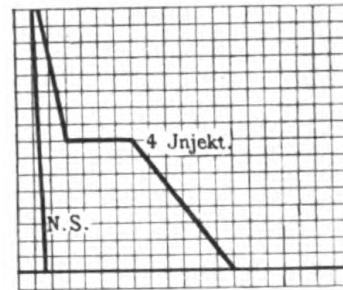
Siehe hierzu Kurve 18.

Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
18. III. normal 1:5, vorher $\frac{1}{2}^h$ bei 58° in $\frac{1}{6}$ Verdünnung in- aktiviert	4	0					
17. V. nach 4 Injektionen 1:100, vorher $\frac{1}{2}^h$ bei 58° in $\frac{1}{6}$ Ver- dünnung inaktiviert	4	4	2	2	0		

Siehe hierzu Kurve 19.



Kurve 18.



Kurve 19.

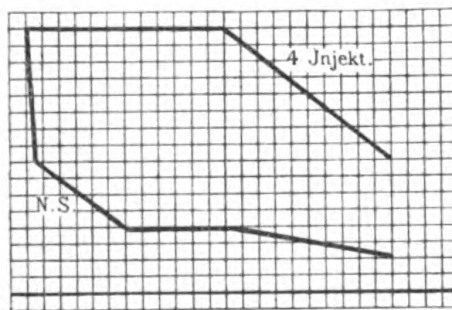
Kaninchen XI. Immunisierung mit Pferdeblut.

Erwärmung auf 60,3°	0'	30'	6 ^h	12 ^h	22 ^h
20. III. normal 1 : 5	32	16	8	8	4
21. V. nach 4 Injektionen 1 : 5000	8	8	8	8	4

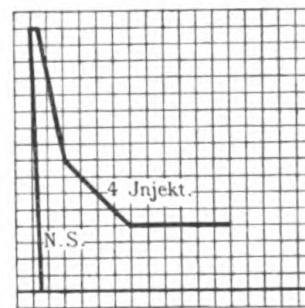
Siehe hierzu Kurve 20.

Erwärmung auf 69,6°	0'	15'	1 ^h	3 ^h	6 ^h	12 ^h	22 ^h
21. III. normal 1 : 5, vorher 1/2 ^h bei 58° in 1/5 Verdünnung inaktiviert	2	0					
16. V. nach 4 Injektionen 1 : 5000, vorher 1/2 ^h bei 58° in 1/5 Verdünnung inaktiviert	8	8	4	2	2		

Siehe hierzu Kurve 21.



Kurve 20.



Kurve 21.

Die im Vorstehenden wiedergegebenen Bestimmungen liefern gut übereinstimmende Resultate. Ebenso wie in den Versuchen von Streng zeigte es sich, daß die Inaktivierung mit abnehmender Geschwindigkeit vor sich geht, die Neigung

der Kurven also im Verlaufe im allgemeinen geringer wird¹⁾, woraus auf eine Zusammensetzung der Immunkörper aus einer Schar von Partialkörpern zu schließen ist.

Das wichtigste Ergebnis ist die Feststellung, daß bei den hier untersuchten Hämagglutininen in bezug auf die Hitze-resistenz wirklich ein konstanter und sehr beträchtlicher Unterschied besteht. In der Regel läßt sich auch deutlich erkennen, daß mit der Zahl der immunisierenden Injektionen die Resistenz weiter zunimmt. Die abweichenden Resultate Strengs sind, wie schon angedeutet wurde, wahrscheinlich durch das verschiedene Material zu erklären, mit dem dieser Autor seine Versuche vornahm. Ich muß mich daher, im Gegensatz zu der Kritik von Streng, den Schlußfolgerungen von Landsteiner und Reich durchaus anschließen. Da kein Grund vorhanden ist, die tatsächlichen Angaben von Streng zu bezweifeln, so ist wohl anzunehmen, daß die Unterschiede zwischen normalen und Immunantikörpern des Serums bei verschiedenen Gruppen derselben (oder vielleicht auch bei verschiedenen Serumarten) nicht immer gleich sind. Jedenfalls wäre es von Interesse, die Versuche von Streng mit anderen Bakterien und andersartigen Seren zu wiederholen. Bei den Hämagglutininen des Kaninchens scheint die aufgefundene Regel recht allgemein gültig zu sein.

Für das Prinzipielle der Frage, nämlich die Nichtidentität der normalen und der Immunantikörper ist natürlich nur der Nachweis sicherer Differenzen maßgebend und nicht die Uebereinstimmung in einzelnen Punkten, und es läßt sich auch vermuten, daß den Unterschieden der Thermoresistenz keine so wesentliche Bedeutung zukommen muß als den von Landsteiner und Reich nachgewiesenen Differenzen der Avidität und namentlich der Spezifität, die für die Funktion der Antikörper voraussichtlich von besonderer Wichtigkeit sind.

Da mir geeignetes Material zur Verfügung stand, benutzte ich es auch zu einer Wiederholung der Versuche von Landsteiner und Reich über die Adsorption von Agglutininen durch Casein, wobei meine Versuche das Neue bieten, daß sie mit dem Serum derselben Tiere vor und nach der Immunisierung angestellt wurden. Auch unter diesen Umständen bestätigte sich die leichtere Absorbierbarkeit der Normalagglutinine.

1) Vgl. die Bemerkung p. 150.

Zusammenfassung.

Die Tatsache der verschiedenen Hitzeresistenz von Normal- und Immunhämagglutininen wird unter allen Kautelen neuerdings festgestellt.

Die Differenz ist auch dann regelmäßig nachweisbar, wenn man das Serum derselben Tiere vor und nach der Immunisierung untersucht, wodurch die Einwände von Streng wegfallen.

Bei fortschreitender Immunisierung durch wiederholte Blutinjektionen ist öfters ein graduelles Steigen der Resistenz bemerkbar.

Die Ergebnisse stützen die Theorie Landsteiners, daß beim Immunisierungsvorgang eine qualitative Neubildung stattfindet.

Nachdruck verboten.

[From the Bacteriological Laboratory, University College Hospital, Medical School, London (Dr. F. H. Thiele).]

The nature of the anaphylactic reaction.

By **F. H. Thiele** and **Dennis Embleton**.

With 3 charts in text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 17. September 1913.)

In the experiments which we are recording in this paper, we endeavoured to establish the identity of the anaphylactic antibody and the nature of the reaction.

I. Experiments demonstrating the relationship between the amboceptor and the anaphylactic "antibody".

A. Passive sensitisation with heterogenous serum.

A series of guinea-pigs was inoculated intraperitoneally with accurately measured doses of inactivated rabbit's serum, highly haemolytic to sheep's red corpuscles. The rabbit had had previous numerous injections of 6 times carefully washed sheep's red cells and with the last dose showed no symptoms, which could be ascribed to anaphylaxis. The titre of the serum was measured by determining the least quantity of serum which

would, in the presence of 20 cmm of fresh guinea-pig's serum, cause complete haemolysis of 100 cmm of a 10% homologous red corpuscle suspension, the whole being made up to 1 c.c. with normal saline. This quantity of haemolytic serum we designate as the unit.

Series a. Guinea-pigs of nearly equal weight (average 250 gr.) inoculated i.p. with graded doses of haemolytic serum. 48 hours afterwards inoculated i.v. with 0.6 c.c. of a 10% suspension of the homologous red cells.

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c.c.	No. of units	Result
1	0.02	84	Nil
2	0.04	168	Nil
3	0.08	336	Nil
4	0.1	420	Nil
5	0.2	840	Respiratory rapidity, slight convulsions. Recovery
6	0.3	1260	Respiratory rapidity, paresis of posterior extremities, rigors, recovery
7	0.4	1680	Acute death 3 mins. P.m. typical
8	0.5	2100	Acute death on removal of needle. P.m. typical
9	0.6	2520	Idem
10	1.0	4200	Idem
11	2.0	8400	Idem 5 mins. P.m. typical

Series a'. Same treatment as above, only new haemolytic serum.

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c.c.	No. of units	Result
1	0.1	625	Nil
2	0.2	1250	Anaphylact. symptoms. Recovery
3	0.3	1875	Acute death. P.m. typical
4	0.4	2500	Idem
5	0.5	3125	Idem
6	0.6	3750	Idem
7	0.8	5000	Idem
8	1.0	6250	Idem

B. Passive sensitisation with isogenous serum haemolytic to sheep's red corpuscles.

A series of guinea-pigs which had three weeks previously been inoculated with 20 mgr. dry weight of sheep's red corpuscles was killed and the haemolytic activity of the combined serum was determined. The unit was contained in 100 cmm of a 1 in 10 dilution of the serum.

Series b. Guinea-pigs of nearly equal weight, about 250 gr., were inoculated i.p. with varying quantities of the serum. After 48 hours,

inoculation was made with 0.6 c.c. of a 10% suspension of sheep's red cells i.v.

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c.c.	No. of units	Result
1	10	1000	Nil
2	12	1200	Slight anaphylactic symptoms. Recovery
3	15	1500	Very ill, recovery
4	18	1800	Acute death. P.m. typical
5	20	2000	Idem

Series c. Guinea-pigs were inoculated i.p. with the mixed serum of a series of guinea-pigs which had been inoculated two weeks previously. The titre of this serum was active 10 cmm, inactive 40 cmm.

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c.c.	No. of units	Result
1	12	1200	Nil
2	15	1500	Animal very ill, recovery
3	20	2000	Acute death. P.m. typical
4	The same serum inactivated 20	500	Nil

Series d. Guinea-pigs were inoculated i.p. with the mixed serum of a group of guinea-pigs inoculated 3 weeks previously with 20 mgr. dry weight of sheep's red cells. The titre of the mixed serum inactivated was 20 cmm.

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c.c.	No. of units	Result
1	12	600	Nil
2	15	750	Nil
3	20	1000	Nil

Series d¹. Guinea-pigs were inoculated with whipped blood from the same series. The titre of the serum active was 20 cmm (being the same as the serum inactive).

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c.c.	No. of units	Result
1	10	500	Nil
2	15	750	Nil
3	20	1000	Nil

Series e. Guinea-pigs inoculated i.p. with the mixed serum of a group of guinea-pigs inoculated two weeks previously with 20 mgr. dry weight of sheep's red corpuscles. The titre of the serum was active 90 cmm of a 1 in 10 dilution, inactive 40 cmm pure serum.

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c. c.	No. of units	Result
1	15 active	1665	Very ill, convulsions, recovery
2	20 „	2200	Acute death. P. m. typical
3	20 inactive	500	Nil

Series f. Guinea-pigs were inoculated i.p. with the mixed serum of guinea-pigs whose haemolytic titre was 60 cmm of a 1 in 10 dilution of the serum (after several injections).

Guinea-pig	Dose of haemolytic serum in c. c.	No. of units	Result
1	8 active	1328	Ill, recovery
2	10 „	1660	Idem

It will thus be seen that in passive sensitisation (a, a¹), with heterogenous haemolytic serum the sensitising properties depend not upon the quantity of serum inoculated, but upon the number of antibody units contained in the serum.

Further, attention must be drawn to the fact that the sera were derived from animals that showed no anaphylactic symptoms with their last injection. Thus showing that there was not a special anaphylactic antibody present in the rabbits apart from the haemolytic antibody.

Passive sensitisation with isogenous serum brings out the same points, namely, that the sensitising power depends entirely on the number of antibody units present.

These antibody units may be thermostable or thermolabile thus accounting for the facts previously noted that the sensitising power of a serum or tissue is diminished or destroyed by heating (Thiele and Embleton)¹). This can be seen in series c, where with 20 c. c. of the active serum typical anaphylactic death was produced, whereas the same quantity of inactive serum produced no effect.

The reason for this is that the active serum contains thermolabile and thermostable antibody together in such

1) Temperature variation. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, Heft 2.

amount that the necessary total number of haemolytic units is present, whereas on heating, the thermolabile ones are destroyed and so the number of units is insufficient to produce the necessary degree of sensitisation (see also series e).

The whole blood has no greater sensitising power than the serum, so that the red cells do not apparently contain any appreciable amount of antibody (d, d¹).

We would also draw attention to the fact that there is no difference in the sensitising power between the sera obtained from animals, which have been sensitised two weeks and those which have been sensitised three weeks, that is, there is no qualitative difference between the sera of animals, which are not yet in the hypersensitive phase (that is two weeks after the inoculation) from those which are hypersensitive (three weeks after the inoculation). Passive sensitisation shows that the sera of animals which have only been sensitised two weeks previously will act as well as the others, provided a sufficient quantity be inoculated, i. e. a sufficient number of haemolytic units. From our experiments this appears to depend entirely on the quantity of haemolytic antibody, so that the sensitising properties of a serum are absolutely parallel to the antibody content. The number of units necessary as determined by the above experiments is somewhere about 1600 to 1700 for guinea-pigs of 250 to 300 gr.

We have observed that the antibody titre in the second week can be as high as in the third week and yet hypersensitiveness is only constantly manifest in the third week. Having seen that the reaction depends on the total number of haemolytic units present in the animal, it must follow in dealing with actively sensitised animals, that, in the second week, although the titre of the serum may be as great as it is in the third week, yet the total number of units in the animal is less, so that we would conclude that in the third week there is much more antibody present in the tissues of the animal than in the second week.

It is generally stated that after passive sensitisation an interval must be allowed to elapse before inoculation of the

homologous antigen, else the reaction does not occur, i. e. 4 hours for intravenous, 24 for intraperitoneal and 48 for subcutaneous. The idea being that the antibody must combine with the tissue of the animal before the reaction can occur. With intravenous sensitisation, however, we have been able to confirm the observations of several other observers that, if the inoculation of the antigen shortly follows that of the sensitising homologous serum, the reaction will take place without any latent period, i. e. that the antibody can react directly in the blood.

Guinea-pig	Weight grms.	Sensitising dose i.v. in c. c.	Haemolytic units	Interval between sensitising of reacting dose	Result
1	320	0.4	2500	1 min.	Acute death 3 mins.
2	275	0.4	2500	5 mins.	" " 3 "
3	260	0.6	3750	5 "	" " 3 "
4	280	0.6	3750	10 "	" " 5 "
*5	265	0.4	2500	1 min.	" " 3 "
*6	300	0.6	3750	5 mins.	" " 3 "
7	312	0.6	3750	15 "	Slight respiratory difficulty, recovery
8	296	0.6	3750	20 "	Nil

* Reacting dose given first.

Reacting dose 0.6 c. c. of a 10% red cell suspension.

II. The effect of the inoculation of sensitised red corpuscles into actively and passively sensitised animals.

Six times washed sheep's red cells were exposed to an excess of inactivated high titre homologous haemolytic serum for 1 hour, at room temperature. The mixture was then centrifuged and the corpuscles three times washed with normal saline. The residue was made up to 10%.

	Guinea-pig	Weight in gr.	Dose of sensitised corpuscles at 10% i.v.	Result
Normal	1	280	1.0 c. c.	Nil
	2	265	2.0 c. c.	Nil
	3	300	5.0 c. c.	Animal died in 14 hours, fall of temperature, paresis etc. P. M. some effusion into cavities; bacteriologically sterile

	Guinea-pig	Weight in gr.	Dose of sensitised corpuscles at 10% i.v.	Result
Sensitised 1 week previously with 20 mgr. dry weight of corpuscles.	1	252	1.0 c. c.	Nil
	2	268	2.0 c. c.	Nil
	3	295	5.0 c. c.	Animal very ill, convulsions, recovery
Sensitised 2 weeks previously with 20 mgrs. dry weight of red cells.	1	260	0.1 c. c.	Nil
	2	274	0.2 c. c.	Very ill, recovery
	3	268	0.4 c. c.	Marked respiratory spasm, convulsions, died next day
	4	270	0.5 c. c.	Acute death. P. m. typical
	5	266	1.0 c. c.	Acute death. P. m. typical
Sensitised 3 weeks previously with 20 mgr. dry weight of red cells.		304	0.6 c. c.	Acute death. P. m. typical
Sensitised 2 weeks previously with 20 mgr. Same series as above.		320	0.6 c. c. unsensitised corpuscles at 10%	Nil
Sensitised 2 weeks previously with 20 mgr. Same series as above.		316	0.6 c. c. unsensitised red cells.	Nil
Sensitised 3 weeks previously with 20 mgr. Same series as above.		294	0.6 c. c. unsensitised red cells.	Acute death

Several further series of a similar type to the above were performed with similar results.

From these experiments it will be seen:

1. That only in doses as large as 5 c. c. (10%) do sensitised corpuscles produce a fatal result in a normal animal and this is not a constant phenomenon and we have never been able to produce acute death in this way.

2. That animals in the first week of sensitisation behave in practically the same way as normal animals.

3. That animals in the second week of sensitisation are not hypersensitive enough to respond acutely to a dose of unsensitised red cells, but develop acute anaphylaxis when amboceptor laden cells are exhibited.

III. Does excess of antibody protect against anaphylactic shock?

We have already shown under section I. that a large excess of amboceptor units do not prevent anaphylactic shock in passively sensitised animals.

In immunising guinea-pigs to sheep's red cells we have always found it very difficult to get a high haemolytic titre by repeated inoculations, the animals usually dying at the third or fourth injection from acute anaphylaxis. We have, however, succeeded in obtaining several of high titre and have been able to show that they can all be made to die of acute anaphylaxis, provided a suitable reacting dose be given.

A suspension of 50% corpuscles was made and was inoculated into the following series of guinea-pigs i.v.

Guinea-pig	Weight in gr.	Haemolytic titre	Dose of red cells at 50%	Result
1	326	4 cmm	0.1 c. c.	Temporary spasm, paresis, recovery
2	350	2 "	0.2 "	Idem
3	318	4 "	0.6 "	Acute death
4	296	4 "	1.0 "	" "
5	334	2 "	1.0 "	Respiratory spasm, convulsions, death in 5 minutes
6	286	4 "	0.6 of a 10% suspension	Temporary spasm, paresis, rigors, recovery
1	—	not taken	one week later 1.0 c.c. of 50%	Acute death
2	—	not taken	idem	" "
3	—	not taken	"	" "

In guinea-pigs 1, 2 and 6 it will be seen that the dose of antigen on the first occasion did not produce acute death, but after the antianaphylactic period was over a larger dose was given, which on this occasion was sufficient.

IIIa. Experiment showing the effect of the inoculation of sensitised corpuscles into actively sensitised animals.

Guinea-pigs 3 weeks after sensitising dose	Weight in gr.	Dose of 10% corpuscle suspension	Result
1	282	0.6 c. c. unsensitised	Acute death
2	290	0.6 " "	" "
3	286	0.6 " sensitised	" "
4	300	0.6 " "	" "
5	310	0.6 " "	" "

From these experiments we conclude that no matter how great the amount of antibody present in an animal, acute

anaphylaxis can always be produced providing a suitable dose of the homologous antigen be injected. Also that sensitised antigens do not prevent the occurrence of anaphylactic shock in fully or partially sensitised animals.

General conclusions.

The above experiments all tend to show that there is no difference between the anaphylactic antibody and the well-known antibodies (cf. Friedberger). That hypersensitiveness depends upon the presence of just that amount of antibody, which will act up on the second dose of antigen inoculated at such a rate that toxic substances accumulate in sufficient quantity to cause acute death. That hypersensitiveness is only a stage in the process of immunity and is relative, so that with the more immune animals acute death can always be produced if the amount of antigen inoculated is sufficient.

Sensitised antigen does not protect, but will accelerate anaphylactic shock in a partially sensitised animal.

The bearing of this on the cellular theory of anaphylaxis has to be discussed. This theory is based upon the fact that in passive sensitisation an interval must be allowed to elapse before the reacting dose is given else the anaphylactic shock cannot be obtained. It is held that the antibody must combine with the tissues before the reaction can occur, and that the antibody circulating in the blood tends to prevent anaphylactic shock and that it is due to this that immunity occurs. The antibody in the blood is supposed to act upon the antigen and prevent the antigen from attaching itself to the tissues and being acted upon by the antibodies in the tissues.

The above experiments, however, show that:

1. Anaphylaxis can be brought about by circulating amboceptor.
2. In passive sensitisation the antibody is rapidly absorbed by the tissues, but cannot act, when it has once become so absorbed, until some change has occurred in the tissue so that it can act. The amount of antibody left circulating is too small by itself to effect the reaction.
3. Absolute immunity is not conferred by the circulating antibody protecting the tissue cells. This can be seen from the fact that however much antibody is circulating, absolute immunity is never produced. By this we do not mean to say that relative immunity

is not produced, for we consider that it is by this means that all immunity that can be obtained is produced. Furthermore by inoculating fully sensitised corpuscles there is no protection conferred against anaphylactic shock.

4. The hypersensitiveness in the third week is due to the total antibody content, and as the amount in the serum is practically the same during the second and third weeks (after a single injection of antigen) it follows that there is more antibody in the tissues in the third week, and the shock is due to the combined action of the free and fixed antibody.

From the above points we conclude that anaphylaxis in the guinea-pig is cellulo-humoral.

IV. The action of certain colloidal substances.

It has been stated by various observers, Wassermann, etc. that the injection of colloidal substances produces in guinea-pigs the symptoms and post-mortem appearances of acute anaphylactic death. In addition to these, suspensions of Kaolin, Kieselgur in normal saline produce a similar result. In order to retest these results we obtained preparations of colloidal silica, mercury, calomel, iron and silver. These were all made up in 1% and 5% suspensions in normal saline and injected into guinea-pigs.

A. Colloidal silica (neutral, perfectly clear, not viscid).

Guinea-pig (a), 300 gr., 1 c. c. of 5% suspension i.v. Before the completion of the inoculation the animal developed respiratory spasm, convulsive movements and died in 3 minutes. P. m. lungs somewhat distended, haemorrhagic, numerous areas of collapse. Right side of heart and veins distended. In the heart the blood was found to be in a state of commencing coagulation; there were numerous masses of black clot. The veins on immediate examination showed well formed black clot, which could be pulled out in strings. After removal of the lungs they did not remain distended, but commenced to collapse. Microscopically the lung showed emphysematous areas, the alveolar vessels were dilated, there were haemorrhages in the alveolar walls and lumen. The red corpuscles showed commencing cytolysis. In numerous small vessels adherent clot was seen. In other parts the lung was collapsed.

Guinea-pig (b), 250 gr., 1 c. c. of a 1% suspension i.v. The animal died in 5 minutes. Convulsions, rapid breathing at first, becoming shallow and spasmodic later. P. m. The appearances very much like those in the previous experiment. The lungs were somewhat distended and haemorrhagic.

The appearances in the heart and veins were the same, but the clot was less coherent.

Other experiments showed similar results.

B. Colloidal iron (dialysed hydrate).

Guinea-pig (a), 320 gr., 1 c. c. of a 5 % suspension i.v. The animal died while the needle was still in the vein, with marked respiratory spasm and convulsions. P. m. The lungs were distended and hyperaemic. There was extensive clotting in the right side of the heart and veins.

Guinea-pig (b), 280 gr., 1 c. c. of a 1 % suspension i.v. The animal died shortly after completion of the inoculation. The p. m. appearances were the same as in the previous case, the clotting being very marked.

C. Neither colloidal calomel nor mercury produce any immediate results either in 5 % or 1 % suspensions as regards anaphylactic symptoms and sudden death.

D. Kaolin.

Guinea-pig, 310 gr., 1 c. c. of a 1 % suspension i.v. The animal died in 3 minutes. Slight convulsions, respiratory spasm. P. m. The lungs were not distended, areas of collapse were frequent, and there was compensatory emphysema. The right side of the heart was distended, there were numerous small masses of clot present. There was marked intravascular clotting.

Other experiments gave similar results.

E. Kieselgur inoculated in the same way gave similar results.

F. Carmine. A 5 % suspension of carmine was made in normal saline.

Guinea-pig, 260 gr. Before 1 c. c. of this suspension was all inoculated the animal developed convulsions, respiratory spasm and died in 3 minutes. P. m. lungs somewhat distended, but collapsed after removal. Red from carmine. Heart, right side distended and full of clot. Veins similarly showed intravascular clotting.

Other experiments gave similar results.

V. The action of substances which lower surface tension.

Some observers consider that the anaphylactic reaction is too rapid to be explained by the liberation of a toxic substance from the inoculated antigen by the action of the body ferments. They account for the rapidity of the action by a rapid alteration

in surface tension due to a beginning precipitation, following the combination of the antigen and antibody, and that this combination can occur practically instantaneously. The alteration in surface tension produces mechanical irritation of the bronchial musculature (Dale).

In order to see whether alteration in surface tension can produce typical anaphylactic death, we made use of a substance which is known to cause rapid lowering of surface tension. We accordingly made a 5 % solution of sodium taurocholate (pur.) in normal saline.

Guinea-pig	Weight	Dose i.v.	Result
1	280 gr.	1 c. c.	Nil
2	295 gr.	2 c. c.	Respiratory rapidity, shallow breathing occasional cessation, recovery
3	285 gr.	3 c. c.	On completion of inoculation temporary cessation followed by prolonged shallow breathing, weakness in posterior extremities, no rigors, recovery
4	306 gr.	5 c. c.	On completion of inoculation animal stopped breathing. Irregular and spasmodic breathing, slight convulsions, death. P. m. Lungs large, intensely hyperaemic, haemorrhagic, patches of emphysema. Right heart distended, no clotting of blood. Microscopically the alveolar walls show great thickening due to dilation of the capillaries. Haemorrhages into alveolar wall and alveoli. Folding of bronchial mucous membrane

The above experiments show that substances which produce a great alteration in surface tension even when they cause death, do not produce the anaphylactic syndrome. In order to see whether rapid alteration in surface tension is produced by the interaction of antigen and antibody the following experiments were kindly performed for us by Dr. Lovell.

The surface tension was determined in normal and immune sera before and after adding the antigen homologous to the immune serum. Constant quantities were used in all the controls. It was found that no appreciable difference in surface tension followed the addition of the antigen to either the

normal or immune sera. Any differences produced by the addition of the antigen in the two cases occurred equally with both varieties of sera, and could be explained by the presence

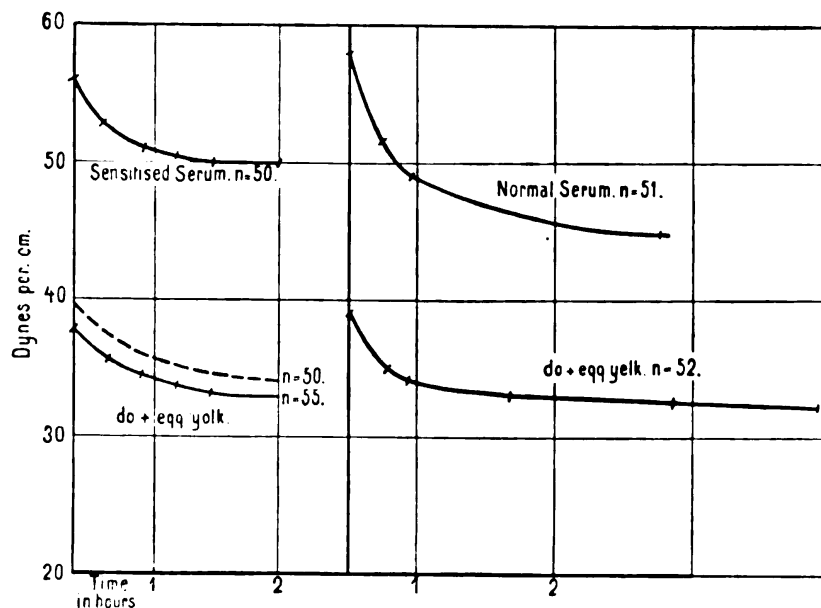


Chart I.

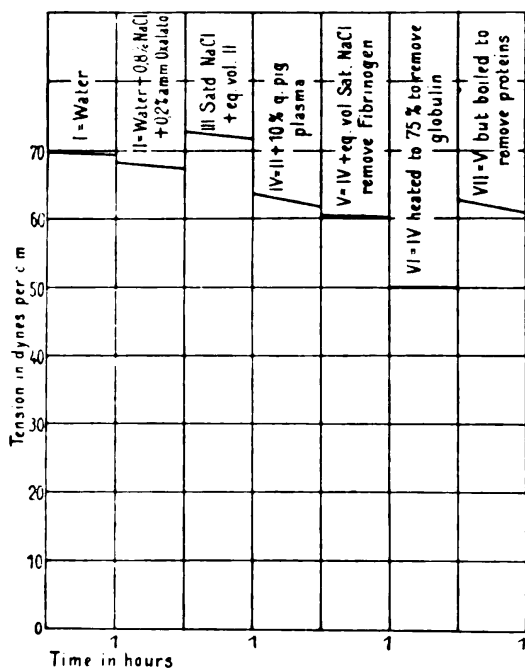


Chart II.

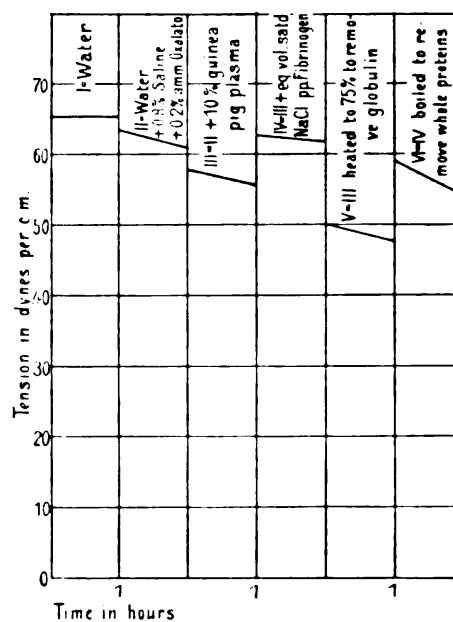


Chart III.

of surface tension lowering bodies in the antigen. This is seen in chart I, where the experiment has been performed with normal serum and serum of a guinea-pig hypersensitive to egg yolk albumen. So that the precipitation that occurs on mixing precipitin and precipitinogen does not cause an appreciable alteration in surface tension. Further in order to show that removal of the whole native protein content from a serum does not appreciably alter the surface tension we would refer to chart II, where the complete removal of all the albuminous material from a 10 % saline suspension of oxalated guinea-pigs plasma does not produce any alteration in surface tension.

Although the possible objection to these results is that they measure the alteration of surface tension with regard to the air, they are no measure of what occurs under similar circumstances, in the body. We would point out that in these experiments the results are relative, the air being a constant factor, so that the results are comparative.

Zusammenfassung.

Diese Arbeit gibt die Ergebnisse der Experimente über den Zustand der Ueberempfindlichkeit und ihre Beziehungen zur Immunität. Die Resultate sind:

1) Der anaphylaktische Antikörper ist mit den wohlbekannteren gewöhnlichen Antikörpern identisch, i. e. mit den Ambozeptoren usw.

2) Der Zustand der Ueberempfindlichkeit hängt völlig von der Quantität der im Tierkörper vorhandenen Antikörper ab, gleichgültig ob sie gänzlich thermostabil oder thermolabil oder gemischt sind.

3) Ueberschuß an Antikörpern schützt nicht völlig gegen den anaphylaktischen Shock. Der hierdurch scheinbar verliehene Schutz ist nur relativ, da akuter anaphylaktischer Shock immer erzeugt werden kann, wenn genügende Quantitäten des homologen Antigens eingespritzt werden.

4) Akuter anaphylaktischer Shock kann immer produziert werden, wenn im Tierkörper eine genügende Menge der

Antikörper existiert, und diese dazu notwendige Quantität kann

- a) gänzlich im Blute sein,
- b) gänzlich in den Geweben gebunden
- c) oder teilweise in den Geweben gebunden und teilweise frei im Blutstrom zirkulieren.

5) Das vorher mit seinem homologen Antikörper beladene Antigen schützt nicht gegen den akuten anaphylaktischen Shock, und in partiell sensibilisierten Tieren kann man den Shock mit solchem Antigen erzeugen zu der Zeit, in der es mit nicht beladenem Antigen unmöglich ist. Man kann nicht behaupten, daß der im Blute zirkulierende Antikörper das Tier gegen den Shock schützt, daß er absolute Immunität verleihen kann.

6) Immunität ist nicht absolut, sondern relativ. Bei einem Tier, das einen sehr hohen Grad der Antikörperbildung besitzt, kann man immer den akuten anaphylaktischen Shock erzeugen, wenn die reagierende Dosis des homologen Antigens groß genug ist.

7) Alle kolloidalen Substanzen sind nicht fähig, akut zu töten. Diejenigen, die es überhaupt tun können, töten durch intravaskuläre Gerinnung des Blutes.

Dasselbe ist auch der Fall für Kieselgur, Kaolin und Karmin.

8) Man kann nicht beweisen, daß der anaphylaktische Shock durch eine rapide Veränderung der Oberflächenspannung verursacht ist.

Part of the expenses of this research were defrayed by grants from the Government Grant Committee of the Royal Society.

Nachdruck verboten.

[Aus der Kgl. Universitätskinderklinik zu Palermo (Direktor:
Prof. R. Jemma).]

Spezifische Agglutinine und Präzipitine bei der infantilen Leishmaniosis.

Von Dr. G. Caronia, Assistenten.

(Eingegangen bei der Redaktion am 26. September 1913.)

Es ist schon hinreichend betont worden, daß im allgemeinen bei an Leishmaniosis leidenden Kindern im Kreislauf keine spezifischen Immunkörper vorhanden sind (Jemma, Di Cristina, Longo u. a.).

Eine solche Erscheinung ist (Di Cristina und Caronia) mit dem besonderen Verhalten des kindlichen Organismus in Zusammenhang gebracht worden, der meist gegen die Infektionen wegen des schwereren Verlaufes derselben nicht oder nur spärlich reagiert.

Die Immunkörper jedoch, die bei den Leishmaniosiskranken spontan nicht gefunden werden, konnten bei Tieren (Di Cristina) und beim gesunden Kind (Caronia) durch Einspritzungen mit lebenden oder abgetöteten Leishmaniakulturen hervorgerufen werden.

Späterhin wurde auch bei an Leishmaniosis leidenden Kindern die Bildung spezifischer Immunkörper durch Injektionen mit abgestorbenen Kulturen erzielt (Di Cristina und Caronia). Bei diesen Kranken ist jedoch nur der spezifische Ambozeptor in Betracht gezogen worden, und zwar nicht weil auf die anderen Immunkörper nicht untersucht worden wäre, sondern weil die Bildung der Agglutinine und Präzipitine sich nicht so prompt und konstant erwiesen hat wie die des Ambozeptors.

Seit mehr als einem Jahr, d. h. seitdem von mir und Prof. Di Cristina die Untersuchungen über die Vaccination mit abgestorbenen Kulturen eingeleitet wurden, beschäftige ich mich mit dem Gegenstand, indem ich einerseits Untersuchungen auf das Vorhandensein spontaner Agglutinine und Präzipitine bei möglichst vielen Leishmaniosiskranken anstelle und andererseits versuche, sie durch Injektionen mit abgestorbenen Kulturen oder mit aus den Kulturen extrahiertem Nukleoproteid hervorzurufen.

Bevor ich die Ergebnisse bespreche, zu denen ich gelangt bin, möchte ich vorausschicken, daß die von mir befolgte Technik für die Agglutinationsreaktion stets die von Di Cristina angegebene gewesen ist, d. h. Verdünnen der Kondensationsflüssigkeit des an Parasiten reichen Bodens von Novy-Néal mit gleichen Teilen physiologischer Kochsalzlösung zur Vermeidung der Autoagglutinationserscheinungen. Was die Präzipitine anbelangt, so ist zur Vermeidung möglicher Fehlerquellen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Präzipitinen durch das in der Kondensationsflüssigkeit des Kulturbodens enthaltene Kaninchenblutserum, bei mit Kulturen in Novy-Néalschem Boden geimpften Individuen die Kondensationsflüssigkeit eines anderen von uns mit Hundeblood hergestellten Bodens verwendet worden.

Die Beobachtung in den Reagenzröhren, die zuerst 1 Stunde lang bei 37° und dann bei Zimmertemperatur gehalten wurden, geschah nach 2—4—6—8—10—12 Stunden. In den Kontrollversuchen, die mit Kulturen und normalem Serum oder mit Kulturen allein angestellt wurden, wurde bis zu 12 Stunden und darüber bemerkt, daß die Parasiten sich beweglich und frei erhielten; dasselbe war bei den Fällen mit negativem Ausgang der Fall. In den positiv ausfallenden Fällen dagegen wurde bemerkt, daß die Parasiten von der 2. Stunde an anfangen, ihre Bewegungen zu verlieren und sich zusammenzuhäufen; weiterhin verloren sie ihre längliche Form, um eine rundliche Form anzunehmen und sich in fast gänzlich bewegungslosen Gruppen anzusammeln; und schließlich begann, während mikroskopisch große amorphe körnige Haufen wahrgenommen wurden, auf dem Boden des Reagenzglases sich ein mehr oder weniger reichliches Präzipitat zu bilden. Das Auftreten dieses Präzipitates war jedoch nicht konstant, auch wenn partielle Agglutination und Disgregation der Parasiten vorlag.

Die Untersuchung auf das Vorhandensein von spontanen spezifischen Agglutininen und Präzipitinen bei den Leishmaniosiskranken beläuft sich auf ca. 30 Fälle. Nur in 5 Fällen ist es mir möglich gewesen, Agglutination und Präzipitation oder Agglutination allein wahrzunehmen, stets aber nur bei einem sehr niedrigen Titer.

In nachstehender Tabelle stelle ich diese Fälle mit den betreffenden Resultaten unter Berücksichtigung der Dauer der Erkrankung und der Komplementablenkung zusammen:

Vor- und Zuname	Dauer der Erkrankung	Komplementablenkung	Titer der Agglutination	Titer der Präzipitation
Vincenz Speciale	1 Jahr	partiell	1 : 20	1 : 30
Martin Buongiorno	1 Jahr	negativ	1 : 20	1 : 10
Franz Portera	16 Monate	partiell	1 : 20	1 : 10
Joseph Nicolosi	$\frac{1}{2}$ Jahr	partiell	1 : 20	—
Maria Sanfilippo	1 Monat	positiv	1 : 20	1 : 10

Die provozierte Bildung von spezifischen Agglutininen und Präzipitinen ist von mir in 6 Fällen durch Injektionen mit abgestorbenen Kulturen menschlicher *Leishmania*, in 2 Fällen durch Injektionen mit aus den Leishmaniakulturen extrahiertem Nukleoproteid versucht worden.

Was die Vaccinationsmethode mit den Kulturen anbelangt, so habe ich nichts zu dem in früheren Arbeiten von mir und Prof. Di Cristina Mitgeteilten hinzuzufügen. Dagegen muß ich kurz auf die andere Methode der aktiven Immunisierung eingehen, die neuerdings von mir zur Anwendung gebracht wurde. Sie besteht in der täglichen Injektion mit progressiven Dosen des nach den Angaben von Lustig und Galeotti aus menschlichen Leishmaniakulturen extrahierten Nukleoproteids. Es ist dies eine Methode, die viele Vorzüge gegen die der Vaccination mit abgestorbenen Kulturen aufweist, da sie eine genauere Dosierung ermöglicht, promptere Immunitätsreaktion gibt und nicht die Uebelstände zeigt, zu denen das Kaninchenblutserum des Novy-Néalschen Bodens Anlaß gibt¹⁾.

Nachstehende Tabelle gibt eine Zusammenstellung der untersuchten Fälle, der benutzten Methoden und der erzielten Resultate:

Vor- und Zuname	Dauer der Erkrankung	Vor der Behandlg.			Methode der Immuni- sierung	Nach der Behandlg.		
		Komplement- ablenkung	Agglutinations- titer	Präzipitations- titer		Komplement- ablenkung	Agglutinations- titer	Präzipitations- titer
M. Costantino	1 Mon.	—	—	—	Kulturen	+	1 : 25	1 : 25
P. Buscemi	40 Tg.	—	—	—	„	+	1 : 50	1 : 50
C. Oliveri	2 Mon.	—	—	—	„	+	1 : 100	1 : 50
M. Giambanco	2 Mon.	—	—	—	„	+	1 : 25	1 : 25
G. Gianferrara	5 Mon.	—	—	—	„	+	1 : 50	1 : 50
G. Meli	2 Mon.	partiell	—	—	„	+	1 : 50	1 : 50
J. Di Salvo	1 Mon.	—	—	—	Nukleo- proteid	+	1 : 25	1 : 25
V. Presti	1 Mon.	partiell	—	—	Nukleo- proteid	+	1 : 100	1 : 50

1) Nichts kann ich bei der noch geringen Anzahl der Versuche und der kurzen Zeit ihrer Anwendung über den Heilwert dieser Immunisierungs-

Zusammenfassung.

1) Es ergibt sich, daß einige seltene Male bei an Leishmaniosis leidenden Kindern spontan spezifische Agglutinine und Präzipitine im Kreislauf vorhanden sind, aber in derartig minimalen Quantitäten, daß sie für die Diagnose nicht verwertet werden können;

2) daß es möglich ist, spezifische Agglutinine und Präzipitine bei den Patienten, die sie nicht spontan aufweisen, in derselben Weise wie beim Ambozeptor zu provozieren;

3) daß die Tatsache, daß die Bildung dieser anderen Immunkörper provoziert werden kann, der Hypothese neue Kraft verleiht, die die Vaccination für ein vorzügliches Heilmittel hält, insofern sie die Immunitätsvorgänge beschleunigt oder geradezu auslöst.

Literatur.

Jemma e Di Cristina, *Annali di clinica medica*. Palermo 1910.

Di Cristina, *Pathologica*, agosto 1911.

— *La Pediatria*, 1911.

Longo, *Rivista di Clinica Pediatrica*, 1911.

Di Cristina, *Pathologica*, 1912.

Caronia, *Pathologica*, 1912.

Di Cristina e Caronia, *Pathologica*, 1912.

Longo, *Policlinico*, 1912.

methode aussagen; ich beabsichtige aber, sie weiter zur Anwendung zu bringen, in der Hoffnung, auch unter dem Gesichtspunkt der Therapie gute Resultate zu erzielen.

Nachdruck verboten.

[Istituto di Patologia e Clinica Medica der Universität Sassari
(Direktor: Professor L. Zoja).]

Das Bordet-Gengousche Phänomen (Komplementablenkung) bei Malaria¹⁾.

Von Dr. Antonio Gasbarrini,
Oberarzt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. Oktober 1913.)

Casagranti hat in der Absicht, ein Diagnostikum für die latente Malaria zu finden, Malariaserum auf einen hemmenden Stoff gegen die eigenen Blutkörperchen nach dem Verfahren von Bordet und Gengou untersucht. Er konnte das Phänomen bei zwei Tertianakranken nachweisen, die lange Zeit rezidiert hatten, seit dem letzten Fieberanfall aber kein Rezidiv gehabt hatten. Casagranti will außerdem gefunden haben, daß im Latenzstadium entnommenes Serum, das mit dem Serum von mit Malariablut vorbehandelten Tieren versetzt wird, das Komplement fixiert, während Serum von Gesunden oder Geheilten in Verbindung mit Serum von Tieren, die mit dem Serum gesunder Personen vorbehandelt sind, keine Ablenkung bewirkt. Frongia hat die Beobachtungen Casagrandis nachgeprüft und bestätigt, da er fand, daß das Serum von latenten Rezidivkranken das Komplement ablenkt, d. h. sich wie Serum von Gesunden verhält. Aber da diese Probe nach Frongia auch ohne Benutzung irgendeines Antigens (Blutkörperchen, Cruorextrakt) eintritt, entspricht sie eigentlich nicht dem Komplementablenkungsverfahren.

Versuche zum Nachweise spezifischer Antikörper bei Malariakranken sind auch von De Blasi, Mircoli, Ferrannini, Valerio angestellt worden, von denen die beiden ersten rote Blutkörperchen mit Hämamöben, die anderen wässerige und alkoholische Extrakte aus Malariamilz verwendeten²⁾. Alle erhielten ein negatives Bordet-Gengousches Phänomen.

1) Diese Arbeit wurde vom Direktor des Instituts Professor Luigi Zoja auf dem Pathologenkongreß in Pisa (April 1913) vorgetragen und bildet einen Teil einer Gruppe von Versuchen, die zurzeit in der Klinik ausgeführt werden.

2) Bei der Malaria ist das Verhalten der Wassermannschen Reaktion unter Benutzung von wässerigen und alkoholischen Luesleber- und normalen Meerschweinchenherzextrakten studiert worden. Giemsa und Werner haben die Wassermannsche Reaktion bei einer erheblichen Zahl akut Kranker positiv gefunden. Nach Ferrari und Gioseffi trifft dies in 16 Proz., nach Böhm in 35 Proz., nach De Blasi in 51 Proz., nach Meier und Bonfiglio in 79 Proz. der Fälle zu. Nach längstens 3 Wochen wird die Reaktion negativ.

Obwohl diese Resultate besagen, daß die Komplementablenkungsmethode bei der Malaria zu diagnostischen Zwecken nicht in Betracht kommen kann, so sind doch die Versuche fast immer an aktiven oder vor kurzem rückfällig gewordenen Malariakranken angestellt worden, bei denen die Diagnose immer mikroskopisch bestätigt wurde. Es schien mir deshalb der Mühe wert, die Versuche der verschiedenen Forscher an einer größeren Zahl rückfälliger Malariakranker aus den verschiedenen Krankheitsperioden zu wiederholen.

Es ist in der Tat bekannt, daß wenige andere Infektionen eine ähnlich erhebliche Rückwirkung auf den Allgemeinzustand des Kranken entfalten wie die Malaria: Von dem Malariakranken, der nur selten rezidiviert hat, und ein leidliches Blutbild und mäßigen Milztumor bietet, kommt man zu dem seit vielen Jahren rezidivierenden, bei dem sich neben ausgesprochener Anämisierung erhebliche Organläsionen finden und schließlich zu dem Rückfälligen oder Latenten, der zwar nicht mehr an Fieberanfällen leidet, aber Symptome der Malariakachexie bietet.

Hieraus folgt, daß man sich ein richtiges Urteil über den Wert einer biologischen Reaktion nur durch Prüfungen in den verschiedenen Perioden der Krankheit bilden kann, in denen der Allgemeinzustand des Patienten mitbetroffen ist. Ich habe die Untersuchungen daher ohne anderen Anspruch wiederholt, als um mir eine persönliche Meinung über diese Frage zu bilden.

Es sei vorausgeschickt, daß die Bordet-Gengousche Probe, die ich orientierungshalber an zwei Kranken während des Fieberanfalls und einem seit langer Zeit Fieberfreien anstellte, in den beiden ersteren negativ, in letztem Falle positiv war. Ich vermutete daher, daß diese verschiedenen Ergebnisse auf Verschiedenheiten in der Menge natürlicher Hämolytine gegen Hammelerythrocyten in den einzelnen Seren beruhen können, die die Reaktion beeinträchtigen mußten. Daher wurden in allen folgenden Fällen Parallelversuche teils mit ganz unbehandeltem, teils mit Serum durchgeführt, das von eventuellen Hämolytinen befreit war. Die letzteren wurden natürlich vor allem im Serum aufgesucht und ferner, soweit es möglich war, auch sein heterolytisches Vermögen bestimmt.

In einigen Fällen habe ich nicht unterlassen, zur Kontrolle auf Autolysine (endo- und extraglobuläre) nach dem Verfahren von De Blasi zu prüfen.

Die Bordet-Gengousche Probe wurde an 24 durchweg rückfälligen Malariakranken geprüft. Nur in einem Falle erfolgte die Blutentnahme einige Stunden vor dem Schüttelfrost, in 2 Fällen während des Frostes, in 2 anderen während des Fieberanfalles und in den Rest nach einer wechselnden Pause seit dem letzten Rückfalle. Diese schwankte zwischen einigen Tagen bis zu Jahren. An einzelnen Kranken wurde die Probe in verschiedenen Zwischenräumen wiederholt.

Kontrollversuche habe ich auch mit derselben Technik in 4 zweifelhaften Malariafällen, bei 2 zweifellos gesunden und bei 14 Personen angestellt, die nach der Anamnese niemals Malaria gehabt hatten, aber verschiedene fieberhafte Affektionen boten, unter denen sich hochfieberhafte, wie Typhus, Pneumonie, Influenza, befanden.

Der Gang der Untersuchung in den einzelnen Fällen sei kurz geschildert.

A. Antigene.

Ein gutes Malariaantigen ist sehr schwer zu erhalten. Da ich noch nicht über Plasmodienkulturen verfügte, habe ich als Antigen Blutkörperchen verwendet, die reichlich Parasiten enthielten und sie nach De Blasi dreimal in steriler 0,9-proz. Kochsalzlösung gewaschen, in sterilem destillierten Wasser gelöst, zunächst im Wasserbade bei 37°, dann im Exsikkator getrocknet, schließlich gepulvert. Die Lösung des Antigens war 1:30 (gelegentlich 1:40), von der zum Versuch etwa 0,2 ccm nach 2-stündigem Aufenthalt bei 37° und nach Zentrifugierung und Dekantierung benutzt wurden. In Vorversuchen wurde das Fehlen von Ablenkungswirkung und Hämolysierung durch das Antigen allein festgestellt.

Trotz des Reichtums an Malariaparasiten erwiesen sich nicht alle so bereiteten Antigene brauchbar. Aktiv waren im allgemeinen die aus alten und schweren Malariaformen (Quartana triplex, schwere Tertian) erhaltenen.

Als Kontrollantigen benutzte ich im ganzen getrocknetes Malariablut, Blutkörperchen von Nichtmalariakranken nach gleicher Behandlung wie oben, Blutkörperchen von Gesunden in 10-proz. Suspension in isotonischer Salzlösung und nur in einem Falle wässrigen Malariamilzextrakt.

B. Zu prüfendes Serum.

a) Bestimmung des Heterolysiervermögens.

Hierbei habe ich mich an die klassische Technik von Ehrlich und Morgenroth gehalten. Das Serum, das so früh wie möglich, jedenfalls nicht später als 24 Stunden nach dem Aderlaß, verwendet wurde, wurde in steigenden Mengen in die Reihe steriler Röhrchen mit 1 ccm 5-proz.

Hammelblutkörperchensuspension in isotonischer Lösung, die vorher sorgfältig in 0,9-proz. Kochsalz gewaschen war, zugefügt¹⁾).

Nachdem alle Röhrchen mit isotonischer Lösung auf gleiches Volumen gebracht waren, wurden die Resultate nach 2- und nach 12- bis 24-stündigem Aufenthalt bei 37°, andere nach 12—24 Stunden Eisschrank abgelesen. Das heterolytische Vermögen des Serums wurde nach der zur totalen Lösung des Kubikzentimeters Hammelsuspension nötigen Menge geschätzt (n. l. D. = normal lösende Dosis).

b) Nachweis hämolytischer Ambozeptoren für Hammelblut.

Zur Prüfung auf solche Ambozeptoren wurden bei jedem Serum den Kontrollen ein Röhrchen mit 0,2 ccm inaktiviertem Serum + 1 ccm 10-fach verdünnten frischen Meerschweinchenserums + 1 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen + 2,8 ccm Kochsalz angereicht und das Resultat nach 2 Stunden bei 37° angelesen.

c) Reinigung des Serums von hämolytischen Ambozeptoren.

Herzu bediente ich mich der Adsorptionsmethode von Jacobäus und Mintz und des neuen Verfahrens von Rossi. Das Verfahren von Jacobäus und Mintz benutzt 2 ccm des bei 56° eine halbe Stunde inaktivierten Untersuchungsserums, die dann eine halbe Stunde bei 37° mit 8,9 ccm einer 10-proz. Hammelblutaufschwemmung in Berührung gelassen werden. Das Verhältnis zwischen Serum und Suspension ist derart, daß 1 ccm der durch Zentrifugieren erhaltenen Flüssigkeit des Gemisches 0,2 ccm Serum enthält, die für die Bordet-Gengousche Probe ausreichen.

Nach der Methode von O. Rossi mischt man 1,5 ccm Serum mit 0,5 ccm wiederholt gewaschenen und gut zentrifugierten Hammelerythrocyten, wobei die Flüssigkeitsmenge zwischen ihnen äußerst gering sein muß. Das Röhrchen mit Serum und Blutkörperchen kommt 20—30 Minuten auf Eis und wird dann in Eis schnell zentrifugiert.

Die Rossische Methode habe ich in jedem Falle, die von Jacobäus und Mintz nicht immer benutzt.

d) Prüfung auf eventuelle antihämolytische Eigenschaften des behandelten Serums.

In Bezug auf die Versuche von Friedberger und Sachs, welche klargelegt haben, daß normale Sera, ihrer hämolytischen Ambozeptoren befreit, antihämolytische Eigenschaften ausüben können, reihte ich in meine Versuchsanordnung Proben ein, um zu sehen, ob auch die mit oben er-

1) Wo es möglich war, habe ich auch das Serum auf Lösungsvermögen für Kaninchen, Meerschweinchen- und Hundebloodkörperchen geprüft.

wähnten Methoden behandelten Sera von Malariakranken solche Eigenschaften erworben hätten.

In diesen Proben ließ ich die Sera in Gegenwart des Komplementes und des hämolytischen Gemisches 2 Stunden bei 37° einwirken.

e) Zufügung von Komplement zu den mit dem Untersuchungsserum versetzten Hammelblutkörperchen.

Durch diese Untersuchung sollte festgestellt werden, ob die Hammelblutkörperchen wirklich die hämolytischen Serumambozeptoren adsorbiert hatten, was sich daran zeigen mußte, daß nach Zufügung von 0,1 cem Meerschweinchenkomplement zu dieser 5-proz. Blutkörperchenemulsion nach 2 Stunden 37° Hämolyse eintrat.

C. Ausführung der Bordet-Gengouschen Probe.

Ich befolgte die klassische Methode und verzichte daher auf eine Schilderung der technischen Einzelheiten, die jetzt allgemein bekannt sind.

In den folgenden Tabellen (p. 184—195) sind die Resultate verzeichnet. Aus ihnen ergibt sich:

1) Das Serum Malariakranker im Schüttelfrost, im Fieberanfall und sehr wenige Tage nach dem letzten Rezidiv verursachte keine Komplementablenkung. Dagegen lenkte es ab, wenn es nach c) behandelt war.

2) Das unvorbehandelte Serum chronischer Malariakranken, die seit verschieden langer Zeit rezidivfrei waren, ergab eine mehr oder weniger starke Bordet-Gengousche Reaktion. Die Vorbehandlung des Serums nach c) hat das Resultat fast immer deutlicher gemacht.

3) Das Serum nichtmalariakranker aber an verschiedenen anderen Krankheiten leidenden und das Serum von gesunden Personen haben niemals, auch nicht nach Vorbehandlung, das Bordetsche Phänomen ergeben.

4) Das Serum rezidivierender aktiver Malaria hat ein größeres Lösungsvermögen als das latenter Malaria.

Die mit dem Bordet-Gengouschen Phänomen erhaltenen Resultate beziehen sich auf plasmodienhaltige Blutkörperchen als Antigen, die nach De Blasi behandelt waren.

Mit den anderen Kontrollantigenen, die in einigen Fällen benutzt wurden, war das Resultat fast konstant negativ, sowohl mit vorbehandelten als nicht vorbehandelten Seren. Von hämolytischen Ambozeptoren befreite Malariasera haben niemals das Sachs-Friedbergersche Phänomen ergeben.

Die Hammelblutkörperchen, die mit dem Untersuchungsserum versetzt worden waren, wurden nach Zufügung des Meerschweinchenkomplementes in allen denjenigen Fällen hämolytisch, in denen die Bordetsche Probe positiv ausfiel.

Eine genauere Betrachtung der Resultate ergibt nun, daß die Komplementablenkung in den Fällen 26 und 36 ausblieb.

Fall 26 (siehe Tabelle) bezieht sich auf eine Frau von 50 Jahren, bei der 40 Tage vorher durch wenige Chininjektionen eine rezidivierende Quartana triplex mit verzögerten Anfällen unterbrochen worden war. Die rasche allgemeine Besserung der Kranken und ihrer Blutzusammensetzung sowie die Abnahme des Milzvolumens und das Verschwinden der Malaria-Parasiten aus dem Blute bezeugten den Eintritt der Genesung. Die Kranke hat sich uns tatsächlich nach 4 Monaten in vollem Wohlbefinden und ohne wieder Fieberanfälle gehabt zu haben, vorgestellt. In derselben Weise kann das negative Bordet-Phänomen bei dem asthmatischen Malariakranken 36 erklärt werden, bei dem seit 24 Jahren Rückfälle fehlten und klinisch keine Anzeichen für das Fortbestehen der Infektion nachweisbar waren.

Bemerkenswert erscheint Fall 20. Bei ihm wurde die Bordet-Gengousche Probe, die das erste Mal am 12. II. 1913 auch mit dem unbehandelten Serum positiv gewesen war, innerhalb 3 Monaten glatt negativ, während der der Kranke eine intensive Behandlung mit Chinin, Eisen und Arsen durchgemacht hatte, unter der die Zeichen der aktiven Infektion zurückgegangen waren (Hämoglobinzunahme von 35 auf 60 Proz., kleinere Milz, erhebliche Abnahme der endoglobulären Autolysine).

Nach der Blutentnahme haben 3 Malariakranke (Fälle 2, 6 und 9) rezidiviert, bei denen nur mit vorbehandeltem Serum Komplementablenkung zu erhalten gewesen war, und der Fall 20, der auch mit unbehandeltem Serum reagiert hatte. Dies letztere Resultat paßt allerdings nicht zu der von mancher Seite gemachten Hypothese, daß der positive Ausfall der Bordetschen Reaktion mit dem Serum von Malariakranken die Heilung des infektiösen Prozesses beweise.

Fälle	Datum des ersten Fieberanfalls	Datum des letzten Fieberanfalls	Datum der Blutentnahme
1. S. R., 43 J., Schneider aus Sassari. Diagnose: Doppeltes Tertianafieber. Rezidiv. Leber vergrößert. Milz hart, unempfindlich (17×10 cm). Urobilin im Urin sichtbar bei Verdünnung 1:100, im Stühle bei 1:2300. Viele endoglobuläre Tertiana-parasiten	August 1912	23. XI. 1912	23. XI. 1912 (während des Schüttelfrostes)
2. M. R., 42 J., Tischler aus Sassari. Diagnose: Doppeltes malignes Tertianafieber. Leichte Lebervergrößerung. Milz vergrößert, hart, unempfindlich. Hb 70 Proz. Reichlich Parasiten im Blute	1897	17. XII. 1912	18. XII. 1912 (einige Stunden vor dem Schüttelfrost)
3. S. G., 21 J., Bauer aus Sassari. Diagnose: Malaria-infektion (maligne Tertiana). Leber vergrößert, ihr unterer Rand glatt, abgerundet. Milz 25×15 cm, hart, schmerzhaft. Harnurobin 1:5, Hb 65 Proz., R. Blutk. 3,5 Mill. Im Blute Parasiten mit zahlreichen Halbmonden	Juni 1899	22. XII. 1912	22. XII. 1912 (während des Fieberanfalls)
4. C. F., 14 J., Haustochter aus Bonorva. Leber in normalen Grenzen. Milz (10×7 cm) beweglich, hart, unempfindlich. Im Blut keine Malariaparasiten zur Zeit des Aderlasses	Dez. 1911	2. I. 1913	15. I. 1913
5. S. P., 26 J., Eigentümer aus Sedini. Malariafieber seit Kindheit. Leichte Lebervergrößerung. Splenomegalie. Hb 75 Proz. Keine Parasiten im Blute	nicht feststellbar	vor einigen Tagen	16. I. 1913
6. P. G., 15 J., Schmied aus Sorso. Diagnose: Benignes doppeltes Tertianafieber. Lebervergrößerung, der untere Rand überragt in der Hemiclavicularis den Rippenbogen um 3 cm, ist unempfindlich. Milz 18×11 cm, hart. Harnurobin 1:10. Hb 60 Proz. R. Blutk. 4,5 Mill. Leukocyten 11 000. Vermehrte Blutplättchen. Spärliche Normoblasten. Zahlreiche Polychromatophilen und Poikilocyten; einzelne basophil granuliert Erythrocyten; ausgesprochene Anisocytose. Sehr reichliche granulofilamentöse Substanz. Viele Erythrocyten mit voll entwickelten Tertianaparasiten	Oktober 1912	13. I. 1913	24. I. 1913
7. M. A. G., 19 J., Landmann aus Portotorres. Diagnose: Malariafieber (Tertiana). Leber- und Milzvergrößerung. Milzränder rund, hart, schmerzhaft. Harnurobin sichtbar bei 1:5. Hb. 70 Proz. R. Blutk. 4,64 Mill.	1910	23. I. 1913	24. I. 1913

Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen n. l. D.	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endoglobuläre Autolysine	Extraglobuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
.	fehlen ---- (während des Schüttelfrostes) fehlen ---- (während des Anfalls)	0,05	negativ ----	positiv +++	Wurde nach der Blutentnahme mit Chinin behandelt. Rezidiv nach ca. 1 Monat. Bordet-Phänomen nur mit unbehandeltem Serum und Antigen aus Malariamilz ebenfalls negativ ausgefallen
vorhanden ++	fehlen ----	0,05	negativ ----	positiv +++	Erhielt nach der Blutentnahme Chinin. Rezidiv am 2. I. 1913
vorhanden ++	fehlen ----	0,05	negativ ----	positiv +++	Hat früher Chinin genommen. Nimmt seit einiger Zeit keines mehr
.	.	.	negativ --	positiv +++	Hat 1 Woche vor Anstellung der Bordet-Gengouschen Probe subkutan Chinin bekommen
vorhanden ++	fehlen ----	.	negativ ----	positiv +++	
vorhanden +++	fehlen ----	0,02	negativ ----	positiv +++	Chinin seit längerem ausgesetzt. Während des Klinikaufenthalts wurde fast konstant jeden zweiten Tag T. = 37,2—37,3 ° ohne Frostanfälle gemessen. Nach der Rückkehr ins eigene Haus sofort wieder Fieberanfälle
.	.	0,06	negativ --	positiv +++	Einige Zeit Chininbehandlung (letzte Chinineinspritzung am 31. XII. 1912)

Fälle	Datum des ersten Fieberanfalls	Datum des letzten Fieberanfalls	Datum der Blutentnahme
8. A. G. M., 17 J., Hirt aus der Nurra. Diagnose: Malariarezidiv. Seit vielen Jahren wiederholte Malariaanfalle vom Tertianatyp. Leber groß, Rand dünn, ziemlich hart. Milz vergrößert, hart. Im strömenden Blute keine Parasiten gefunden. Hb 50 Proz.	August 1912	18. XII. 1912 (?)	24. I. 1913
9. M. A., 28 J., Schuhmacher aus Sassari. Diagnose: Doppelte Tertiana. Leber dick. Milz 19×11 cm, hart, schmerzhaft. Im Blute werden spärliche Parasiten der schwereren Tertiana gefunden	Juli 1912	11. I. 1913 12. II. 1913 19. II. 1913	24. I. 1913 12. II. 1913 (im Anfall) 19. II. 1913 (im Anfall)
10. A. P., 42 J., Hirt aus Osilo. Hustet seit 7—8 Jahren mit gelblichem, zuweilen blutigem Auswurf. Fieberanfälle in wechselnden Pausen. Linke Spitzenläsion. Leber dick. Erhebliche Milzvergrößerung. Keine Malariaparasiten bei wiederholten Blutuntersuchungen (Fingereinstich)	nicht feststellbar	Oktober 1912	24. II. 1913
11. R. M., 40 J., Hausfrau aus Sorso. Diagnose: Chronische Malaria. Wandermilz. Seit dem 15. Lebensjahre Fieberanfälle. Leber groß, hart, unempfindlich. Milz im Beckeneingang, vergrößert (auf Kindskopfgröße), hart, unempfindlich. Hb 80 Proz.	vor 25 Jahren	Juli 1912 (?)	24. VI. 1913
12. R. G., 7 J., aus Putifigari. Diagnose: Malariafieber (Quartana). Fieberanfälle alle 2 Tage, mit voraufgehendem Schüttelfrost und folgendem Schweißausbruch. Blässe, Abmagerung. Milz fühlbar, empfindlich. Harnurobin (Spektroskop) bei 1:6. Zahlreiche Gänseblümchenformen im peripheren Blut	Sept. 1912	13. IV. 1913	15. IV. 1913
13. R. A., 28 J., Kaufmann aus Portotorres. Diagnose: Malariainfektion (?). Seit ca. 4 Monaten Klagen über Uebelbefinden, Ermüdung, Abmagerung. Alle 4—5 Tage 2 Tage lang fiebernd, teils mit, teils ohne Schüttelfrost gegen Abend, Kopfschmerz. Das Fieber hält bis zum Morgen an und endet mit Schweißausbruch. Nie geschlechtskrank gewesen, raucht viel, trinkt nichts. Stuhl regelmäßig. Thorax ohne Besonderheiten. Leber und Milz tastbar, hart, unempfindlich. Keine Malariaparasiten bei der Blutuntersuchung	Januar 1913	vor wenigen Tagen	16. IV. 1913
14. A. A., 16 J., Landmann aus Sorso. Seit einiger Zeit Fieberanfälle mit Tertianatypus. Milz groß, hart, druckempfindlich. Hb 65 Proz. In einer durch Fingerstich gewonnenen Blutprobe finden sich keine Malariaparasiten	nicht feststellbar	18. IV. 1913	20. IV. 1913 (im Frost)

Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen des Serums (n. l. D.)	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endoglobuläre Autolysine	Extraglobuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
.	.	0,04	negativ ---	positiv +++	Nur im August 1912 Chinin genommen
vorhanden ++	fehlen ---	0,06	negativ ---	positiv +++	Hat Chinin bekommen. Nach dem Austritt aus der Klinik Rezidiv
.	.	.	negativ ---	positiv +++	
vorhanden +++	fehlen ---	0,04	negativ ---	positiv +++	28. IV. 1913. Der Patient kehrt mit den gewohnten Klagen in die Klinik zurück. Auch jetzt finden sich keine Malariaparasiten im peripheren Blute. 8. V. 1913. In dem durch Milzstich erhaltenen Blute einige Makrogameten
vorhanden +++	fehlen ---	0,08	negativ ---	positiv +++	
vorhanden ++	fehlen ---	.	negativ ---	positiv +++	Erhielt Chinin
.	.	0,1	negativ ---	positiv +++	Hat Chinin genommen
.	.	0,15	negativ ---	positiv +++	
vorhanden ++	fehlen ---	0,04	negativ ---	positiv +++	Erhielt Chinin

Fälle	Datum des ersten Fieberanfalls	Datum des letzten Fieberanfalls	Datum der Blutentnahme
15. F. S., 24 J., Tagelöhner aus der Gegend von Sassari. Diagnose: Chronische Malaria. Chronischer Ikterus mit Milzschwellung. Lebervergrößerung. Die Milz reicht oben von der mittleren Axillarlinie bis zur 7. Rippe, unten, auf derselben Linie, 6 cm über den Rippenbogen, wo sie in den Leberrand übergeht. Sie ist beweglich, hart, druckempfindlich, Ränder glatt, abgerundet, Harnurobinin vorhanden. Faecesurobinin sichtbar bis 1:150. Blut-Hb 70 Proz. R. Blutk. 4,8 Mill., w. Blutk. 9000. Blutkörperchenwert 0,74. Neutrophile Polynukleäre 55,8 Proz., Eosinophile 4,7 Proz.; große Mononukleäre 13,4 Proz., kleine 16 Proz.; leukocytoide Lymphocyten 8,6 Proz. Mastzellen 1,3 Proz. Vereinzelt Normoblasten. Vermehrte granulofilamentöse Substanz. Ausgesprochene Polychromatophilie und metachromatische Granulationen. Blutresistenz $R_1 = 0,51$, $R_2 = 0,43$ (mit Erythrocyten ohne Plasma); $R_1 = 0,50$, $R_2 = 0,41$ (mit ganzem Blute). Keine Malariaparasiten im Blute. Wassermann negativ	1909	Dezember 1912	24. I. 1913
16. V. G., 47 J., Angestellter aus Osilo. Ascites bei wahrscheinlich tuberkulöser Peritonitis und Alkoholismus (Laparotomie am 6. III. 1913). Myocarditis. Pleuritische Veränderungen. Leber dick, hart. Milz bleibt vergrößert (15×11 cm)	1896	1905 (?)	24. I. 1913
17. C. B., 61 J., Bauer aus Sorso. Diagnose: Chronische Malaria. Vermutlich peritonitischer Ascites. Malariafieberanfälle seit Kindheit. Leber groß, hart. Milz etwa 3mal größer als normal. Hb 75 Proz. Harnurobinin sichtbar bei 1:10. Keine Malariaparasiten im Blute	nicht zu ermitteln	vor 6—8 Jahren (?)	24. I. 1913
18. S. D., 39 J., Landmann aus Osilo. Diagnose: Malariarezidiv. Hat in wechselnden Pausen wiederholt Fieberanfälle gehabt. Chronischer Milztumor. Deutliche Anämisierung	1908	Oktober 1912	30. I. 1913
19. D. V., 48 J., Bäuerin aus Sennori. Seit langen Jahren Malariafieber mit vielen Rückfällen. Seit mehreren Monaten kein Rezidiv. Milz 18×10 cm, hart, druckempfindlich. Hb 65 Proz. R. Blutk. 3,7 Mill. Im periph. Blut keine Malariaparasiten	vor 30 Jahren	vor mehreren Monaten	1. II. 1913
20. S. A., 45 J., Bauer aus Sorso. Milztumor durch chronische Malariainfektion. Hatte zahlreiche Fieberanfälle; oft aller 2—3 Tage. Leber normal groß. Milz enorm vergrößert, nimmt die ganze linke Seite des Abdomens ein und reicht bis in die rechte Seite 8 cm vom Rippenbogen. Konsistenz hart, Ränder abgerundet. Inzisionen scharf. Adrenalinglykosurie negativ. Cutireaktion nach Wassermann negativ. Urobilin im Urin sichtbar bei 13-facher Verdünnung. Hb 35 Proz. R. Blutk. 3,4 Mill., w. Blutk. 5600; Blutkörperchenwert 0,5. Keine Malariaparasiten im Blut	vor 10 Jahren	nicht zu ermitteln 17. II. 1913	11. II. 1913 12. V. 1913

Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen des Serums n. l. D.	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endoglobuläre Autolysine	Extraglobuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
vorhanden ++	fehlen ---	0,1	positiv ++	positiv +++	Hat seit dem letzten Fieberanfall kein Chinin mehr genommen
.	.	0,2	positiv +	positiv ++	
vorhanden +++	fehlen ---	0,1	positiv ++	positiv +++	Erhielt Chinin
.	.	0,2	positiv ++	positiv +++	Nahm Chinin während der Latenzperiode
vorhanden ++	fehlen ---	0,1	positiv ++	positiv +++	Mit Chinin behandelt
vorhanden ++++ vorhanden +	fehlen --- fehlen ---	.	positiv ++ negativ ---	positiv +++ negativ ---	Mehrere Jahre mit Chinin behandelt. Rezidiv vor einigen Tagen nach der Blutentnahme. 12. V. 1913. Patient scheint bedeutend weniger anämisch. Hb 60 Proz. Milz stark verkleinert. Leber normal begrenzt. Hat intravenöse Chinin-, Eisen- u. Arsenkur durchgemacht

Fälle	Datum des ersten Fieberanfalls	Datum des letzten Fieberanfalls	Datum der Blutentnahme
21. S. G., 34 J., Bauer aus Ossi. Diagnose: Ascites mit Polyserositis. Malariamilz und -leber. Hat an Malariafieber und Tertianatyphus gelitten. Herzdämpfung etwas vergrößert; 1. Ton an der Mitralis unrein, 2. Ton verdoppelt. Pulsus paradox. Leber groß, vorderer Rand scharf, hart, empfindlich. Milz vergrößert, sehr hart. Ascitesflüssigkeit durch Paraknese erhalten): zitronengelb, bildet im Stehen grobe Fibringerinnsel; D = 1015 bei 15°. Reaktion sauer. Albumen 25 Prom. Rivalta +. Urobilinurie. Leichte Leukocytose (10 000). Keine Malariaparasiten im Blute. Cutireaktion negativ	nicht zu ermitteln	vor 17 Jahren (?)	19. II. 1913
22. P. F., 14 Jahre aus Sorso. Diagnose: Einfache Tertiana. Seit etwa 5 Mon. häufig Fieber mit vorangehendem Schüttelfrost und folgendem Schweiß. Milz leicht vergrößert, ziemlich hart und empfindlich. Leber überragt kaum die Rippenbogen. Hb 80 Proz., r. Blutk. 4 Mill.	vor 5 Monaten	15. II. 1913	20. II. 1913
23. B. A., 53 J., Bäuerin aus Muros. Malaria seit nicht feststellbarer Zeit. Große Milz	unbestimmt	unbestimmt	18. IV. 1913
24. D. E., 19 J., Bauer aus Sorso. Chronische Malaria	unbestimmt	unbestimmt	20. IV. 1913
Fälle	Frühere Malariainfektion	Datum der Blutentnahme	
25. C. G. M., 28 J., Hausfrau aus Chiaramonti. Diagnose: Gastroptose	nein	15. I. 1913	
26. P. A. M., 50 J., Hausfrau aus Osilo. Diagnose: Malariainfektion (triplex Quartana). Seit 2 Jahren unregelmäß. Fieber mit Frost und Schweiß. Große Leber mit glattem Rande, der leicht druckempfindlich ist. Milz 21 × 8, unterer Pol rundlich glatt, hart, sehr empfindlich. Urobilin im Harn bei 40-facher Verdünnung sichtbar; im Stuhl bei 200-facher Hb 35 Proz. R. Blutk. 2,8 Mill. Leukocyten 3400; Blutkörperchenwert 0,9. Ausgesprochene Anisocytose. Einige Polychromatophilen. Keine Basophilen. Granulärfilamentöse Substanz stark vermehrt. $R_1 = 0,49$; $R_2 = 0,40$. Zahlreiche Malaria-Parasiten im Blute (Quartana v. 3 Generationen)	ja letzter Fieberanfall 19. XII. 1912	30. I. 1913	

Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen des Serums n. l. D.	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endo-globuläre Autolysine	Extra-globuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
.	.	.	positiv ++	positiv +++	Erhielt wiederholt Chinin
vorhanden +	fehlen ---	.	positiv ++	.	Hat nie Chinin bekommen
.	.	.	positiv ++	positiv ++	
.	.	0,1	positiv +	positiv ++	
Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen des Serums n. l. D.	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endo-globuläre Autolysine	Extra-globuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
.	.	.	negativ ---	negativ ---	
.	.	0,08	negativ ---	negativ ---	Die Bordet - Gengousche Probe wurde nach einigen Chinininjektionen angestellt. Apyrexie. Erhebliche Besserung des Allgemeinzustandes. 29. V. 1913. Patient stellt sich wieder vor. Keine Fieberanfalle mehr. Milz nicht tastbar

Fälle	Frühere Malaria- infektion	Datum der Blut- entnahme
27. S. P. P., 73 J., Steinmetz aus Sassari. Diagnose: Arteriosklerose. Geschlängelte, starre Arterien. Leichte Vergrößerung der Herzdämpfung. Systolisches Geräusch an der Mitralis. Cheyne-Stokessche Atmung. Leber etwas groß. Milz normal. Indikanurie	nein	1. II. 1913
28. P. L., 25 J., Diener aus Sassari, kräftig und gesund. Milz normal. Vor 8 Jahren 8 Tage lang Malaria	ja	1. II. 1913
29. N. N. aus Parma. Gesund	nein	?
30. P. G., 16 J., Fuhrmann aus Sassari. Influenza. Leber leicht vergrößert. Milz 21×11 cm, empfindlich, nicht hart. Urobilinurie. Diazo-reaktion positiv, Widal negativ. Temperatur zwischen $40,1^{\circ}$ und $37,5^{\circ}$ schwankend. Hb 75 Proz. Rote Blutk. 3,1 Mill. W. Blutk. 4400. Blutk.-W. 0,82. Fieberfrei am 15. Tage	nein	10. II. 1913
31. S. P., 45 J., Dr. jur. aus Castelsardo. Wiederholt malaria-krank bis Oktober 1912. Seit 2–3 Monaten Fieberanfälle mit Schüttelfrost und Schweiß. Schwere beiderseitige tuberkulöse Infiltration. Leber dick, fest. Leichte Milzvergrößerung. Albuminurie. Keine Malariaparasiten im strömenden Blute	ja	11. II. 1913
32. B. V., 59 J., Hausfrau aus Sassari. Diagnose: Chronischer Rheumatismus. Arteriosklerose. Bronchopneumonie. Arterieller Blutdruck 155 mm Hg. Albuminurie (4 Prom.) mit leichter Cylindrurie. Urobilinurie. Indikanurie. Leber groß, druckempfindlich. Milz normal	nein	19. II. 1913
33. A. Fr., 33 J., Händler aus Buddusi. Diagnose: Syphilitische Infektion. Wassermann stark positiv	nein	24. II. 1913
34. C. G., 11 J., aus Sassari. Diagnose: Ileotyphus. Roseolen. Milz 10×6 cm, schmerzhaft. Urobilinurie. Indikanurie. Hb 70 Proz. R. Blutk. 3,5 Mill. W. Blutk. 5600. Blutk.-Wert 1. Verhalten der weißen zu den roten Blutk. 1:160. Diazo-reaktion +, Widal +	nein	24. II. 1913
35. N. N. aus Parma. Fibrinöse Pneumonie	nein	?
36. M. S., 46 J., Tagelöhner aus Florinas. Diagnose: Asthma bronch. Vom 18. bis 19. Jahre Malariafieber mit Tertiantypus. Leber groß, schmerzhaft. Milz fühlbar ($12 \times 10,5$ cm), etwas hart	vor 24 Jahren	24. II. 1913
37. D. P., 45 J., Hausfrau aus Sassari. Diagnose: Ovarialtumor	nein	25. II. 1913
38. N. N. aus Parma. Tuberkulöse Lymphdrüsen	nein	?

Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen des Serums n. l. D.	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endo-globuläre Autolysine	Extra-globuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
.	.	0,1	negativ	negativ	
fehlen	fehlen	0,15	negativ	negativ	Wurde mit Chinin behandelt
.	.	.	negativ	negativ	
fehlen	fehlen	0,04	negativ	negativ	Das Blut zur Bordet-Gengouschen Probe wird am 12. Krankheitstage (Temp. 39,1°) entnommen
fehlen	fehlen	0,1	negativ	negativ	Hat einige Zeit Chinin genommen. 16. VI. 1913 Tod an Lungentuberkulose
.	.	.	negativ	negativ	
.	.	.	negativ	negativ	
.	.	0,06	negativ	negativ	Die Bordet-Gengousche Probe wurde am 11. Krankheitstage angestellt (Temp. 38,8°)
.	.	.	negativ	negativ	
.	.	0,15	negativ	negativ	Hat Chinin bekommen
.	.	.	negativ	negativ	
.	.	.	negativ	negativ	

Fälle	Frühere Malaria- infektion	Datum der Blut- entnahme
39. S. R., 21 J., Hausfrau aus Sassari. Diagnose: Rechtsseitige krupöse Pneumonie. Milz nicht vergrößert. Blutentnahme am 1. Tage der Resolution (Temp. 36,4°)	nein	17. IV. 1913
40. P. G., 32 J., Bauer aus Ittiri. Diagnose: Malariafieber (?). Seit einiger Zeit hohes remittierendes Fieber mit Schweißen. Milz groß, empfindlich an umschriebener Stelle. Operation wegen Verdachts auf Milzeiterung. Laparotomiebefund: Milz groß, hart, mit multiplen Verwachsungen. Keine Eiterung. Nach der Operation Fortbestehen des Fiebers. Widal negativ. Agglutininierung des Melitensis durch Patientenserum negativ	?	12. V. 1913
41. S. G. A., 42 J., Bauer aus Ossi. Diagnose: Fabismus. Will nie an Malariafieber gelitten haben. Geruch und Genuß von Bohnen, besonders in rohem Zustande, machen schon in kleinen Mengen Schwindel, Schwäche, Schmerz im Epigastrium, starke Anämie, leicht ikterische Färbung, zuweilen Hämoglobinurie. Diese Erscheinungen traten vor 8 Tagen nach Genuß weniger roher und gekochter Bohnen wieder auf. Leber normal begrenzt. Keine Malariaparasiten im Blut aus Fingerstich	nein	16. V. 1913
42. L. A., 53 J., Bauer aus Ossi. Diagnose: Fabismus. Dionysinkrasie gegen Bohnenblütenduft. Vor 18 Jahren infolge Genuß von wenigen Bohnen schwere Anämie, Ikterus, Hämoglobinurie. Vor 9 Tagen nach Genuß von Bohnen (nur einzelne Schoten) allgemeine Schwäche, Kopfschmerz, hohes Fieber. Gleichzeitig wurde er sehr anämisch, ikterisch, der Urin blut- haltig. Leber nicht vergrößert. Milz fühlbar, überragt den Rippenbogen zwei Finger breit. Blut-Hb 20 Proz. R. Blutk. 1 028 000, weiße 4320. Blutk.-Wert 0,9. Urin: Eiweiß (Spur); viel Indikan; Urobilin kaum sichtbar bei Verd. 1:4. Im Stuhl Urobilin bestimmbar bis zur Verdünnung 1:9. Wassermann negativ	nein	16. V. 1913
43. P. G., 59 J., Eigentümer aus Oschiri. Diagnose: Pylorus-carcinom mit mesenterialen und retroperitonealen Metastasen	nein	24. V. 1913
44. G. L., 27 J., Handelsgehilfe aus Sassari. Diagnose: Epileptische Anfälle. Will nie Malaria gehabt haben. Vor 3 Jahren Ulcus molle und Bubo. Seit 2 Jahren epileptische Krämpfe. Alkoholist. Wassermann negativ (1. VI. 1913)	nein	1. VI. 1913

Autolytisches Vermögen		Heterolyt. Vermögen des Serums n. l. D.	Resultat der Bordet-Gengouschen Probe		Bemerkungen
Endoglobuläre Autolysine	Extraglobuläre Autolysine		Ohne besondere Vorbehandlung des Serums	Nach Adsorption der hämolytisch. Ambozeptor. des Serums	
.	.	0,04	negativ ---	negativ ---	
.	.	.	negativ ---	negativ ---	Fieber schwindet nach einem Monat langer Behandlung mit 2 × tgl. 1 Eßlöffel Baccellischer Lösung
.	.	.	negativ ---	negativ ---	Patient wurde in der Rekonvaleszenz beobachtet
.	.	.	negativ ---	negativ ---	Patient wurde in der Rekonvaleszenz beobachtet
.	.	.	negativ ---	negativ ---	Operiert 27. V. 1913
.	.	.	negativ ---	negativ ---	Quecksilberbehandlung

Nicht weniger wichtig erscheint vom diagnostischen Gesichtspunkt das Verhalten des Bordetschen Phänomens in einigen Fällen zweifelhafter Malaria. So ergab sich Komplementablenkung mit nach Rossi behandeltem Serum im Falle 10, bei dem abgesehen von den nachweisbaren endoglobulären Autolysinen Anhaltspunkte für eine aktive Malariainfektion fehlten. Allerdings fanden sich später durch Milzpunktion einige Makrogameten.

Gar kein Bindungsvermögen zeigte das Serum eines Mannes von 45 Jahren (Fall 31), der bis zum vorausgegangenen Sommer malariakrank gewesen war, und bei dem eine Quotidianaform des Fiebers, die seit 2—3 Monaten bestand, den Gedanken an Malaria nahelegte, Parasiten im Blut, Melanämie, Mononukleose aber fehlten, und der später an doppelseitiger Lungentuberkulose starb. Durchaus negativ war die Bordet-Gengousche Probe bei einem 32-jährigen Manne (Fall 40), dessen seit einiger Zeit wiederkehrende Fieberanfälle durch eine intensive Behandlung mit Baccellischer Lösung in einem Monat beseitigt worden waren. Dieser Fall berechtigte jedoch nicht zur Malariadiagnose, da niemals das Blut oder der Milzsaft auf den Parasiten noch das Serum und die Blutkörperchen auf autolytisches Vermögen untersucht worden waren.

Immerhin kann man an der Hand der bisher gesammelten Daten schließen, daß das Bordet-Gengousche Phänomen zu diagnostischen Zwecken sowohl bei der latenten wie bei der aktiven rezidivierenden Malaria versucht werden kann; bei der letzteren wird, wie auseinandergesetzt ist, die Reaktion nach Vorbehandlung des Serums nach Rossi ebenfalls positiv. Die Kontrolluntersuchungen scheinen eine Beziehung zwischen dem Ausfall der Reaktion und dem im Vergleich zur latenten Malaria hohen heterolytischen Vermögen des Serums der aktiven Malariarezidive aufzudecken.

Was schließlich das Wesen des Phänomens betrifft, d. h. ob sich wirklich bei der Malaria Gegenkörper bilden, oder nicht vielmehr infolge der Infektion selbst spezifische Substanzen, kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Es ist ferner auch nicht möglich, die Veränderungen zu würdigen, die das sogenannte Adsorptionsverfahren im Serum hervorruft.

Die Erklärung, daß dieser Kunstgriff das Serum von den natürlichen hämolytischen Ambozeptoren für Hammelblutkörperchen befreit, darf nur als Hypothese und nicht einmal als die wahrscheinlichste angesprochen werden.

Das Bordet-Gengousche Phänomen bei Malaria bedarf weiterer Durchforschung, und es sind noch zahlreiche Fragen zu lösen. Vor allen Dingen wird die Darstellungsweise des Antigens zu verbessern sein, von dessen Güte meistens der Ausfall der Probe abhängt. Es ist zu prüfen, ob sich auch bei primären Malariakranken Komplementablenkung findet, wie der Gang des Phänomens während der verschiedenen Etappen der Infektion ist, ob es von der Chininbehandlung beeinflussbar ist usw. Die Prüfung dieser Fragen ist heute um so wichtiger, als die Beobachtungen sehr zahlreicher Autoren unbestreitbar die Möglichkeit ergeben, daß die Malaria wie andere Krankheiten eine Immunität verleihen kann, von der die wechselnden Milderungen und Verschärfungen der Malariaepidemien abhängen.

Zusammenfassung.

Die Resultate sind auf p. 182 zusammengestellt.

Dem Direktor Herrn Prof. L. Zoja spreche ich für die Uebertragung dieser Untersuchungen und für die mir gewährten Ratschläge meinen ergebenden Dank aus.

Literatur.

- 1) Casagrandi, Bollettino della Società fra i cultori delle Scienze mediche e naturali in Cagliari, 1907, No. 4.
- 2) De Blasi, Annali d'Igiene sperimentale, 1907, p. 677.
- 3) De Blasi, Atti della Soc. p. Studi della Malaria, 1910.
- 4) Ferrari und Gioseffi, Biochimica e Terapia sperimentale, 1911.
- 5) Ferrannini, Riforma Medica, 1911, p. 177.
- 6) Frongia, Boll. d. Soc. fra cult. della Sc. med. e nat. in Cagliari, 1908.
- 7) Giemsa, Abderhaldens Handbuch, Bd. 6.
- 8) Jacobaeus, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther., Bd. 8, p. 615.
- 9) Mintz, ibid., Bd. 9.
- 10) Mircoli, Il Tommasi, 1908, p. 252.
- 11) Pfeiffer und Friedberger, Deutsche med. Wochenschr., 1905, No. 1 u. 29.
- 12) Rossi, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther., Bd. 10, p. 321.
- 13) Sachs, H., Deutsche med. Wochenschr., 1905, No. 18; Centralbl. f. Bakt., Bd. 40, 1906, Heft 3.
- 14) Valerio, Riforma Medica, 1911, p. 118.

Nachdruck verboten.

**Nachtrag zu unserer Arbeit „Ueber die Bakteriengifte,
insbesondere die Bakterienleibbesgifte“.**

II. Mitteilung, Bd. 19, Heft 2 dieser Zeitschrift.

Von Prof. Dr. Y. Fukuhara.

In unserer Darstellung haben wir die früheren Arbeiten von Friedberger, welche sich mit unserer Arbeit berühren, übersehen. Wir möchten nun einiges hier zitieren.

1) Die Anwendung der kleinsten Bakteriodosen zur Feststellung der immunisierenden Fähigkeit von Bakteriensubstanz hat Friedberger bereits im Jahre 1902 in der Festschrift für E. v. Leiden mitgeteilt.

2) Unsere vergleichenden Immunisierungsversuche über die Lysinogene und Agglutinogene mit Typhus und Cholera-bacillen bestätigen die von Friedberger und Moreschi gefundenen Ergebnisse (Centralbl. f. Bakt., 1905, Bd. 39).

3) Die Anschauung, daß die Antisera entgiftend wirken, ist zuerst von Friedberger bei seinen Anaphylaxiestudien entwickelt worden.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XX. No. 3.

Nachdruck verboten.

[From the Department of Experimental Therapeutics of the
Cornell University Medical School, New York City.]

On Antisensitisation, with Observations on Non-specificity in Anaphylaxis.

By **Richard Weil.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 29. September 1913.)

Before proceeding to the experimental data, a word is necessary in explanation of the term "Antisensitisation" used in the title of this paper. In a number of earlier publications (11, 12, 13), it has been shown that the previous injection of normal rabbit serum into a normal guinea-pig prevents the subsequent passive sensitisation of that guinea-pig by means of the injection of the serum of a rabbit immunized against a foreign proteid. For purposes of discussion, it seems advisable, or even necessary, to describe this phenomenon by means of a single expression, and for that purpose the word "Anti-sensitisation" has been coined. The word in itself is intended to indicate nothing further than the simple fact that the animals treated as above described, have become resistant to passive sensitisation. The word, anti-anaphylaxis, which has already been used to describe an altogether different phenomenon, is by common consent regarded as a misnomer. Besredka (1), who originated the term, has himself suggested that it be replaced by the word "desensitisation", which is, as has been amply shown in a recent analysis of the nature of antianaphylaxis, by Weil and Coca (10), a very much more accurate description of that condition. As used in the present paper, therefore, desensitisation is the equivalent of the older expression, anti-anaphylaxis; anti-sensitisation is used to describe a new phenomenon, the essence of which consists in an actively induced resistance against passive sensitisation by heterologous immune serum.

Zettschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XX.

14

The nature of anti-sensitisation is a problem which has not been definitely settled. In the first paper (11) in which it was described, the induced resistance was ascribed to saturation of the cellular receptors of the guinea-pig by normal rabbit serum, in such wise that they were no longer competent to take up the subsequently introduced rabbit antibodies. In two subsequent papers, it was shown that this explanation was untenable, and the writer leaned strongly to the belief that anti-sensitisation depends upon the development of anti-antibodies. In other words, the preliminary injection of normal rabbit serum was supposed to have induced the production of anti-rabbit-serum antibodies by the guinea-pig, which then neutralized the rabbit anti-horse antibodies which were introduced at the second injection. Aside from the fact that the action of anti-antibodies, although upheld by Bordet (2), and by Ehrlich and Sachs (5), in test-tube experiments, has not previously been demonstrated to occur in vivo, there are certain features of anti-sensitisation which do not seem to correspond with those established for immunisation in general. With the purposes of making a further analysis of the phenomenon, therefore, the following experiments have been performed.

The two most striking features in which anti-sensitisation differs from the usual processes of immunity are:

- 1) the rapidity with which it is produced;
- 2) its lack of specificity.

As regards the rapidity with which anti-sensitisation may be induced, certain data have been advanced in previous papers. It has been shown that the injection of one cubic centimeter of normal rabbit's serum may occasionally protect a guinea-pig, after the lapse of only three days, against sensitisation by means of a very large dose of immune rabbit serum. After the lapse of seven or more days, this protection becomes almost a certainty. If, however, the preliminary injection consists of amounts of rabbit serum greater than one cubic centimeter, the resistance of the guinea-pig to subsequent sensitisation is generally quite perfectly developed by the third day following. These facts are illustrated in table I.

Table I.

G.-p.	Preliminary injection	Sensitising dose	Intoxicating dose	Result
1	1 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 155, i.p., 4th day	0.5 c. c. h.s., i.v., 6th day	† 20 minutes
2	1 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 155, i.p., 2nd day	0.5 c. c. h.s., i.v., 4th day	† 3 minutes
3	4 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 155, i.p., 4th day	0.5 c. c. h.s., i.v., 6th day	No symptoms
4	4 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 155, i.p., 2nd day	0.5 c. c. h.s., i.v., 4th day	Very mild symptoms
5	4 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 204, i.p., 3rd day	0.3 c. c. h.s., i.v., 4th day	No symptoms
6	5 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 204, i.p., 3rd day	0.3 c. c. h.s., i.v., 4th day	Mild symptoms
7	6 c. c. n.r.s., s.c., 1st day	0.5 c. c. S. 204, i.p., 3rd day	0.3 c. c. h.s., i.v., 4th day	No symptoms

In this, and subsequent tables, the following abbreviations are used: n.r.s. for normal rabbit serum; h.s. horse serum; s.c. subcutaneously; i.p. intraperitoneally; i.v. intravenously. The preliminary, or "anti-sensitising", dose has invariably been given subcutaneously; the sensitising dose has been given intraperitoneally; and the intoxicating dose intravenously. S. 155, and S. 204, were sera derived from rabbits immunized by repeated intravenous injections of horse serum. The controls to the above series, made on identical days, showed that both of these sera sensitised normal guinea-pigs in amounts of 0.2 c. c., while the subsequent fatal dose of horse serum did not exceed 0.01 c. c.

The table demonstrates that, on the third day following the administration of large doses of normal rabbit serum, a guinea-pig can no longer be sensitized by immune rabbit serum, even though amounts of the latter are used which are two and a half times as great as are found necessary to sensitise the normal control guinea-pigs. When only one cubic centimeter of normal rabbit serum is used, a three-day interval does not suffice to afford protection; it is necessary, in order to be sure of the result, to wait at least seven days. If now, these data be compared with those which are at hand concerning other forms of immunity, it will be evident that they present a rather striking abbreviation of the intervals usually observed. In active anaphylaxis, for example, it is never possible to kill an animal with an intoxicating injection within three days after sensitisation. Indeed, in the experience of the writer, an interval of two weeks is the latent period which generally follows a preliminary injection ranging in

14*

amount from 0.01 to 1.0 c. c., although after a large sensitising dose, as, for example, three cubic centimeters, the latent period is often abbreviated to about seven days.

On the other hand, Friedberger has stated that by means of temperature measurements it is possible to demonstrate a beginning hypersensitiveness in a much shorter time after the preliminary injection of antigen than is required to elicit typical anaphylactic symptoms. Unfortunately, however, there is not complete unanimity of opinion concerning the significance of this hypothermia.

The second feature of anti-sensitisation, which seems to differentiate it in a certain degree, is the lack of specificity. In a previous paper, it was shown that a preliminary injection of normal sheep serum very frequently served to protect a guinea-pig against the sensitising effect of a subsequent injection of immune rabbit serum. Further experiments have shown that this protection is afforded by a variety of sera, as may be seen by the following experiments, in which the relative effectiveness of milk, egg white, human serum, dog serum, and sheep serum, is illustrated.

Table II.

G.-p.	Preliminary injection	Sensitising dose	Intoxicating dose	Result
1	1st day 2 c. c. sterile milk, s.c.	9th day 0.5 c. c. S. 204, i.p.	10th day 0.3 c. c. h.s., i.v.	†
2	1st day 3 c. c. sterile milk, s.c.	Idem	Idem	†
3	1st day 1 c. c. egg white, s.c.	„	„	†
4	1st day 3 c. c. egg white, s.c.	„	„	†
5	1st day 2 c. c. sheep serum s.c.	„	„	†
6	1st day 3 c. c. sheep serum, s.c.	„	„	†
7	1st day 2 c. c. dog serum, s.c.	„	„	† 15 minutes
8	1st day 3 c. c. dog serum, s.c.	„	„	†
9	1st day 2 c. c. human serum, s.c.	„	„	Mild sympt.
10	1st day 3 c. c. human serum, s.c.	„	„	No symptoms
11	1st day 1 c. c. normal rabbit serum, s.c.	„	„	No symptoms

S. 204 at this time sensitised guinea-pigs in amounts of 0.2 c. c., so that the subsequent injection of 0.01 c. c. of horse serum proved fatal.

Table II shows that, in the amounts tested, human serum is alone effective in inducing resistance to sensitisation by rabbit serum. In table III these results are submitted to further analysis.

Table III.

G.-p.	Preliminary treatment	Sensitising injection	Intoxicating dose	Result
1	1st day 2 c. c. hu.s., s.c. 31st day 2 c. c. hu.s. s.c.	40th day 0.5 c. c. S. 155 i.p.	42nd day 0.5 c. c. h.s. i.v.	Mild symptoms
2	Same treatment	Idem	Idem	No symptoms
3	1st, 3rd, 5th, 31st days, each, 2 c. c. dog ser. s.c.	"	"	Idem
4	Same treatment	"	"	"
5	1st, 3rd, 5th, 43rd day, each, 2 c. c. egg white s.c.	60th day 0.5 c. c. S. 155 i.p.	62nd day 0.5 c. c. h.s. i.v.	†
6	Same treatment	Idem	Idem	†

hu.s. stands for human serum; other abbreviations as before.

Table III demonstrates that when repeated large doses are used in the preliminary treatment, guinea-pigs may be protected against sensitisation with immune rabbit serum, either by means of human serum, or of dog serum. In a previous paper the same effect had been shown to occur with sheep serum. With egg white, this resistance failed to be induced. It is clear, therefore, that a wide variety of sera are effective in inducing anti-sensitisation. These sera, moreover, are derived from species which present only the most distant phylogenetic relationship. In view of these facts, it seems reasonable to inquire whether anti-sensitisation is in reality a form of immunisation, as has been previously suggested, or is not rather a phenomenon of an entirely different character.

In order to test this alternative possibility, two main paths of experimentation have been pursued. In the first place, it seemed justifiable to argue that there might be some constitutional alteration in a guinea-pig treated by previous injections, either of rabbit or of other serum, not "specific" in character, but of such a kind as to prevent the occurrence of an anaphylactic reaction. Without entering into further discussion as to the probable nature of such an hypothetical

alteration, the problem is directly susceptible of an experimental solution. If guinea-pigs are prepared by preliminary treatments either of rabbit serum, or of other sera, in sufficient amounts to produce a condition of antisensitiveness towards immune rabbit serum, and are then given the same dose of immune rabbit serum as was used in the animals tabulated in the tables already included, namely, 0.5 c. c., such guinea-pigs may be regarded strictly as controls to those animals. Instead of being tested out with horse serum, they now receive an intravenous injection of the serum used to induce anti-sensitisation, either horse, dog, or sheep. If they react in the typical anaphylactic manner, it becomes clear that the previous treatment has not produced any such constitutional alteration as would inhibit anaphylaxis in general, but that there is a relatively specific resistance to passive sensitisation by the immune rabbit serum. The following experiments are typical of a large number which have been performed on these lines.

Table IV.

G.-p.	Preliminary treatment	Intoxicating dose	Result
1	1st day, 3rd, 5th days, each 2 c. c. sheep serum s.c. 15th day, rabbit serum 0.5 c. c. i.p.	16th day 0.4 c. c. sheep serum i.v.	+
2	1st day, 3rd, 5th days each 2 c. c. dog serum s.c. 15th day rabbit serum 0.5 c. c. i.p.	16th day 0.4 c. c. dog serum i.v.	+

It seems evident from the table that the preliminary treatment was not such as to interfere with an anaphylactic response. The same conclusion is indicated even more forcibly by the following experiment. The guinea-pig receives preliminary anti-sensitisation injections; after the requisite interval, it is given an injection of several sensitizing doses of rabbit serum immune to horse serum; and next, an intravenous injection of horse serum. Having withstood this latter injection by virtue of anti-sensitisation, it receives an intravenous injection of the serum which was used to induce anti-sensitisation. If it presents the typical picture of anaphylaxis, it is clear that the hypothesis under discussion, namely, a general constitutional alteration of such nature as to exclude an ana-

phylactic reaction, becomes untenable. These experiments are illustrated in table V.

Table V.

G.-p.	Preliminary treatment	Sensitizing injection	Intoxicating injection	Final injection	Result
1	1st day 2 c. c. human serum s.c. 30th day 2 c. c. human serum s.c.	39th day 0.5 c. c. S. 155 i.p.	41st day 0.5 c. c. horse S. i.v. No symptoms	42nd day 0.5 c. c. human ascitic fluid i.v.	† 25'
2	1st day, 3rd, 5th days each 2 c. c. dog serum s.c. 30th day 2 c. c. dog serum s.c.	Idem	Idem	42nd day 0.3 c. c. dog serum i.v.	† 2'

The same fact has been illustrated by a variety of other procedures, which need not be illustrated in detail. If a guinea-pig be actively sensitized by the injection of 0.01 c. c. of sheep serum, and be subsequently anti-sensitized by normal rabbit serum, then sensitized with rabbit vs. horse serum, and finally, injected intravenously with horse serum, it shows no symptoms upon the last injection. On the following day, an intravenous injection of sheep serum produces typical anaphylactic death.

As a result of these various modes of approaching the problem, it seems quite certain that anti-sensitisation is not a process in which the animal has been rendered incapable of an anaphylactic reaction. Instead of this, it has simply acquired an apparently specific resistance to passive sensitisation by means of that immune serum (rabbit), against which the anti-sensitisation was directed.

Such being the case, it seems reasonable to inquire, in view of the fact that the sera of widely different families of the animal kingdom are effective in this respect, even though not to the same degree, whether or not this resistance can be attributed to the production of anti-antibodies. It is, of course, now well understood that specificity in antibody production is a very relative expression. The precipitin reaction [Nuttall (8)], the studies in the primary toxicity of immune sera [Doerr and Pick (3)], and the development of active hemolysins by means of the injection of entirely unrelated

proteins [Forssman (6)], all give evidence that antibodies are, in a large number of cases, unspecific in the highest degree. In connection with the problem of "crossed" anti-sensitisation, however, it seemed unjustifiable to accept this explanation of the phenomenon without further experimentation. In order, therefore, to determine whether the antibodies developed in guinea-pigs by means of the previous injection of dog, sheep, or human serum, were also in part antibodies to rabbit serum, the following procedures were employed. Two series of guinea-pigs were actively sensitized by means of injections of sheep serum, and of human serum, respectively. When these animals had become highly anaphylactic, they received intravenous injections of normal rabbit serum. If they reacted in a manner typical of anaphylaxis, the conclusion was drawn that they were also sensitised to rabbit serum. If they recovered, they received on the following day an intravenous injection of the antigen against which they had originally been sensitised. If they now failed to react in a typical manner, it is clear that the intervening injection of rabbit serum had desensitised them. This desensitisation, as has been demonstrated in a previous paper by Weil and Coca (10), can only be attributed to saturation of the specific antibodies. These two methods may be described as "crossed hypersensitiveness" and "crossed desensitisation", and their results may be taken as affording evidence for, or against, the belief that the sensitisation of guinea-pigs by means of sheep serum, or of human serum, produces antibodies which can also be saturated in part by rabbit serum.

Table VI.

All of the guinea-pigs in this series were sensitised by a subcutaneous dose of 0.01 c. c. sheep serum.

G.-p.	Intermediate injection	Result	Intoxicating injection	Result
1	—	—	26th day 0.01 c. c. S.S. i.v.	Mild symptoms
2	—	—	26th day 0.05 c. c. S.S. i.v.	†
3	—	—	26th day 0.1 c. c. S.S. i.v.	†

G.-p.	Intermediate injection	Result	Intoxicating injection	Result
4	26th day 1.0 c. c. r.s. i.v.	†	—	—
5	26th day 2.0 c. c. r.s. i.v.	†	—	—
6	26th day 0.5 c. c. r.s. i.v.	No symptoms	27th day 0.5 c. c. S.S. i.v.	†
7	26th day 0.9 c. c. r.s. i.v.	Mild symptoms	Idem	†
8	26th day 1.0 c. c. r.s. i.v.	Idem	”	†
9	26th day 1.5 c. c. r.s. i.v.	Severe symptoms	”	†
10	30th day 3 c. c. r.s. s.c.	No symptoms	37th day 0.5 c. c. S.S. i.v.	†

S.S. means normal sheep serum. r.s. means normal rabbit serum.

Table VII.

All of the guinea-pigs in this series were sensitised by a subcutaneous dose of 0.01 c. c. of human ascitic fluid.

G.-p.	Intermediate injection	Result	Intoxicating injection	Result
1	—	—	20th day 0.01 c. c. a.f. i.v.	Mild symptoms
2	—	—	20th day 0.05 c. c. a.f. i.v.	†
3	—	—	20th day 0.1 c. c. a.f. i.v.	†
4	—	—	20th day 0.2 c. c. a.f. i.v.	†
5	20th day 0.5 c. c. r.s. i.v.	No symptoms	21st day 0.4 c. c. a.f. i.v.	Convulsions, re- covered
6	20th day 1.0 c. c. r.s. i.v.	Mild symptoms	21st day 0.5 c. c. a.f. i.v.	Very mild sym- ptoms
7	21st day 1.0 c. c. r.s. i.v.	Moderate sym- ptoms	24th day 0.5 c. c. a.f. i.v.	No symptoms
8	22nd day 2.0 c. c. r.s. s.c.	No symptoms	25th day 0.75 c. c. a.f. i.v.	Mild symptoms
9	22nd day 2.0 c. c. r.s. s.c.	No symptoms	28th day 0.6 c. c. a.f. i.v.	Severe sympt.

a.f. ascitic fluid. Human ascitic fluid was found to be more convenient to work with than human blood serum, for two reasons. First, it provides a large stock of material permanently the same. In the second place, it was found to be very much less toxic than human serum, while for anaphylactic experiments it seems equally effective.

A study of tables VI and VII reveals certain relationships of interest. Guinea-pigs actively sensitised against sheep serum only exceptionally present very severe anaphylactic symptoms upon the intravenous injection of normal rabbit serum, even when the latter is employed in very large doses (nos. 4 and 5 table VI). Those animals which survive this treatment fail to become desensitised thereby, but succumb in typical fashion to a subsequent injection of sheep serum. Guinea-pigs actively sensitised against human ascitic fluid have in no instance in this series presented violent anaphylactic symptoms upon the intravenous injection of rabbit serum (although in other experiments, in which the guinea-pigs were sensitized by 0.1 c. c. of ascitic fluid, this result was obtained). It is, on the other hand, a very simple matter to desensitise such animals by the injection of rabbit serum, which may be practised either intravenously or subcutaneously. That this desensitisation is "specific" in character, is demonstrated by the fact that it fails to occur when animals are sensitised against sheep serum as in table VI, as also by the very important fact that it persists for three day or more (7, 8 and 9, table VII), after the administration of the rabbit serum.

These data are of general interest in connection with the problems of crossed hypersensitiveness and crossed desensitisation, as well as for their bearing on the problem which dictated these experiments. It has been shown by Doerr and Russ (4), and by Pobielski (9), that crossed sensitisation may occur. The former authors used passive sensitisation, the latter active sensitisation, in demonstrating this fact. The crossed sensitisation revealed by their experiments, however, involved only fairly closely related species of the animal kingdom. A crossed process which embraces two such different species as man and rabbit, is I believe without precedent in anaphylaxis. Again, the fact that a serum which induces marked symptoms of anaphylactic shock, may not necessarily desensitise, has been previously shown, notably in the above cited paper of Doerr and Russ. The opposite condition, illustrated in table VII, which reveals the fact that desensitisation may easily be induced by a serum which fails to produce the shock, is the reverse of that picture.

The anaphylactic experiment, therefore, reveals unquestionable relationships between rabbit serum, on the one hand, and sheep or human serum, on the other. Thus, it appears that the antisensitisation produced by the previous administration of sheep serum or of human serum, which protects guinea-

pigs against subsequent passive sensitisation by means of immune rabbit serum, finds a close analogy in the relationships revealed by the experiments of tables VI and VII. In fact, the analogy appears to be even quantitative. Just as antisensitisation is very easily accomplished when human serum is injected previously to immune rabbit serum, so desensitisation is very easily accomplished when rabbit serum is injected after human serum. When sheep and rabbit serum are used either for crossed antisensitisation or crossed desensitisation, the effect is by no means so striking.

If, therefore, the anaphylactic phenomena described in tables VI and VII warrant the belief that the antibodies produced by actively sensitising guinea-pigs towards either sheep serum or human serum are also, in part, antibodies against rabbit serum, there is equally valid ground for ascribing the same basis to the antisensitisation experiments. The hypothesis is therefore strengthened that antisensitisation may well be due to the production by the guinea-pig of antibodies, which then destroy the antibodies subsequently introduced in the immune serum. If antisensitisation is induced by serum of the same species as that which supplies the immune serum (homologous antisensitisation) the antibodies produced would be considered specific; if induced by a different serum (heterologous antisensitisation), the antibodies would be described as unspecific or crossed.

It only remains to point out a further application of the phenomenon of antisensitisation. As has been indicated in a previous paper (13), it affords an explanation of the fact that heterologous passive sensitisation lasts for only a limited period, averaging seven to ten days. When a guinea-pig is passively sensitised by means of the injection of immune rabbit serum, the sensitisation lasts only until the guinea-pig has had time to produce antibodies to the introduced rabbit serum. As soon as this has occurred, the introduced antibodies are destroyed, and the passive sensitisation is terminated.

In the second place, it seems permissible to conclude that the introduction of immune sera for therapeutic purposes, might stimulate the production of antibodies, and that these

latter would largely neutralize the effects of subsequent applications of the same therapeutic sera. This idea led Lewis (7) to perform certain experiments, with a view to determine the effectiveness of anti-diphtheritic serum in rabbits immunized against horse serum. The results which he obtained were positive, though not very striking. Nevertheless, it is conceivable that a different mode of procedure might serve to bring out such an effect with the same unmistakable sharpness as in the case of the experiments in antisensitisation.

Zusammenfassung.

1) Es wird gezeigt, daß Meerschweinchen, welche eine vorhergehende Einspritzung von normalem Kaninchenserum gehabt haben, sich nicht mittels immunisiertem Kaninchenserum passiv sensibilisieren lassen. Dieses Phänomen wird als Antisensitisation bezeichnet.

2) Die Antisensitisation läßt sich innerhalb 3 Tagen demonstrieren, wenn größere Quantitäten normales Kaninchenserum vorher injiziert worden sind, aber erst nach einer Woche, wenn kleinere Quantitäten gebraucht worden sind.

3) Die Antisensitisation läßt sich nicht nur mit Kaninchenserum ausführen, sondern, wenn genügend große Quantitäten angewendet werden, kann man mit Menschenserum, Hundeserum oder Hammelserum gegen Immunkaninchenserum antisensibilisieren.

4) Es wird bewiesen, daß diese Antisensitisation nicht auf einem allgemeinen refraktären Zustand gegen die Induktion des anaphylaktischen Shocks beruht.

5) Es wird fernerhin bewiesen, daß durch die Methode der Desensitisation (Antianaphylaxie) sich ein ähnliches Verhältnis zwischen Kaninchenserum und Menschenserum, und durch die Methode der Anaphylaxie zwischen Hammelserum und Kaninchenserum nachweisen läßt.

Im speziellen wird nachgewiesen, daß Meerschweinchen, welche aktiv gegen Menschenserum (ascitische Flüssigkeit) sensibilisiert worden sind, mit voller Sicherheit mittels Kaninchenserum zu desensibilisieren sind.

6) Die Hypothese wird aufgestellt, daß die Antisensitisation einen immunologischen Vorgang darstellt, und daß in-

folgedessen Meerschweinchen durch die Antisensitisation zur Produktion von Antikörpern (entweder spezifischen oder unspezifischen) angeregt werden, welche fähig sind, die später eingebrachten Kaninchenantikörper zu vernichten.

Bibliography.

- 1) Besredka, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1907, April, p. 386.
- 2) Bordet, Ann. de l'Inst. Pasteur, 1904, No. 10, p. 593.
- 3) Doerr und Pick, Biochem. Zeitschr., 1913, p. 129.
- 4) Doerr und Russ, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909.
- 5) Ehrlich und Sachs, Berl. klin. Wochenschr., 1905, No. 19, p. 557.
- 6) Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, 1911, p. 78.
- 7) Lewis, Journal of exp. Med., Vol. 16, 1912, p. 216.
- 8) Nuttall, Blood immunity and relationships, 1904.
- 9) Pobielski, Russky Vratch, 1912.
- 10) Weil and Coca, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1913.
- 11) Weil, Journal Med. Research, Vol. 27, 1913, No. 4, p. 497.
- 12) Weil, Journal Med. Research, Vol. 28, 1913, No. 2, p. 243.
- 13) Weil, Proc. Soc. for exp. Biol. and Med., Vol. 10, 1913, Feb., p. 110.

Nachdruck verboten.

[Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitals in Wien.]

Ueber die Aufhebung der Artspezifität von Serumweiß.

IV. Mitteilung über Antigene.

Von **Karl Landsteiner** und **Emil Prášek**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Oktober 1913.)

Unter den Methoden, die zur Bearbeitung des Spezifitätsproblems bisher verwendet wurden, ist eine der aussichtsvollsten die künstliche Abänderung von Antigenen und die Untersuchung der Eigenschaften jener Immunsera, die nach Injektion der veränderten Antigene entstehen.

Die Methode, die sich vorher auf ein enges Gebiet beschränkte, gewann größere Bedeutung, als Obermayer und Pick¹⁾ daran gingen, Eiweiß verschiedenen chemischen Ein-

1) Wien. klin. Rundschau, 1902, No. 15. Wien. klin. Wochenschr., 1902, No. 22; 1904, No. 10; 1906, No. 12. E. P. Pick, Biochemie der Antigene. Sonderabdruck a. d. Handb. d. pathog. Mikroorg. v. Kolle-Wassermann, 2. Aufl., Bd. 1, Jena, G. Fischer, 1912.

griffen zu unterziehen und zur Immunisierung zu verwenden. Zusammengenommen mit den Untersuchungen über gereinigte, kristallisierte und farbige Eiweißkörper, waren diese sehr wichtigen Arbeiten die Grundlage für die Erkenntnis der Eiweißnatur mindestens einer großen Reihe von Antigenen. Obermayer und Pick untersuchten so auf ihre Antigenwirkung erhitztes Eiweiß, Alkali- und Acidalbumin, Formaldehydeiweiß und andere Albuminderivate.

Die wichtigsten unter ihren Untersuchungen sind jene, die mit nitriertem, diazotiertem und jodiertem Eiweiß ausgeführt wurden. Es ergab sich das sehr bemerkenswerte Resultat, daß durch diese Eingriffe die Artspezifität des verwendeten Serumeiweißes aufgehoben wurde, so daß z. B. ein mit Nitroserumeiweiß (Xanthoprotein) hergestelltes Immunsorum mit Nitroeiweiß der verschiedensten Tierarten reagierte, ja sogar mit Nitropflanzeneiweiß.

Die drei Reaktionen, die im Gegensatz zu allen anderen bis dahin geprüften diesen Effekt hervorbrachten, stimmen, wie Obermayer und Pick hervorheben, darin überein, daß sie zu einer Substitution im aromatischen Kerne führen, und so kamen die Autoren zu dem Schluß, daß die Aufhebung der Artspezifität gerade durch solche Substitutionen bewirkt werde. Sie nehmen ferner an, daß die artspezifische Gruppierung im Eiweißmolekül in der Hauptsache von Gruppen beeinflußt wird, welche mit den aromatischen Kernen des Eiweißes zusammenhängen.

Andere Arbeiten, die sich mit der von Obermayer und Pick beobachteten Erscheinung beschäftigten, und zwar zu meist mit Hilfe der anaphylaktischen Reaktion, sind die von H. Freund¹⁾, G. Wells²⁾, Pick und Yamanouchi³⁾, Schittenhelm und Ströbel⁴⁾. Die Ergebnisse waren im allgemeinen bestätigend.

Wir selbst haben in einer früheren Arbeit⁵⁾ die Antigenwirkung mit salpetriger und Salpetersäure behandelter Blut-

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 20, 1909, p. 503.

2) Journ. infect. Dis., Vol. 5, 1908, p. 449.

3) Wien. klin. Wochenschr., 1909, No. 44. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1, 1909, p. 676.

4) Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther., Bd. 11, 1912.

5) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, 1913, p. 363.

stromata untersucht und gefunden, daß sich bei den komplexbindenden Antikörper die artunspezifische Wirkung entsprechend den Befunden von Obermayer und Pick nachweisen läßt, während für Hämolyse und Agglutinine ein analoges Verhalten nicht zu finden war. Es scheinen bei diesen Stoffen also andere Regeln zu gelten.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit finden v. Knaffl-Lenz und Pick¹⁾, daß auch Immunsere, die durch Injektion von Plastein gebildet werden, auf verschiedene Plasteine ohne Unterschied ihrer Abstammung wirken. Sie vermuten, daß die Fermente aus Eiweißspaltungsprodukten einen Komplex aufbauen, der „groß genug ist, antigen zu wirken, aber nicht differenziert genug, um irgendwelche Konstitutionsunterschiede auszudrücken“. Diese Sera wirkten merkwürdigerweise auch auf gekochtes Serumeiweiß verschiedener Abstammung. Hier ist an die älteren Versuche von Fleischmann²⁾ zu erinnern, der eine beträchtliche Abnahme der Artspezifität nach langdauernder Trypsinverdauung fand, wie Pick³⁾ meint, weil „durch die Trypsinverdauung eine Abspaltung von aromatischen Gruppen in Form von Tyrosin sehr bald eintritt“. Eine Anzahl anderer Versuche über verdautes Eiweiß hatte abweichende Resultate (vgl. Pick). In Beziehung zu der Frage des nicht artspezifischen Eiweißes stehen auch die bekannten Beobachtungen über natürlich vorkommende derartige Substanzen von Uhlenhuth (Linsensubstanz), Krusius⁴⁾ (Keratinstoffe), Raubitschek⁵⁾ (Amyloid) und vielleicht die neuerdings aufgefundene Tatsache, daß sehr verschiedene Zellarten die immunisatorische Bildung von Hammelhämolyse anregen [Forssman⁶⁾].

Um die Untersuchung der Antigenwirkung veränderter Eiweißkörper weiterzuführen, trachteten wir festzustellen, ob nicht auch andere als die angeführten Reaktionen (Nitrierung, Diazotierung, Jodierung) zum Verluste der Artspezifität führen können, eine Frage, die, wie wir vorausschicken, bejahend zu beantworten ist. Bevor wir an diese Aufgabe gingen, haben wir einige der Grundversuche von Obermayer und Pick wiederholt. Obwohl dies nur zu unserer eigenen Information geschah, glauben wir doch die Resultate mitteilen zu sollen, da sie einige Ergänzungen zu den in der Literatur enthaltenen Angaben liefern.

- 1) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 71, 1913, p. 407.
- 2) Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 59, 1906, p. 514.
- 3) l. c. Biochem. d. Antigene, p. 30.
- 4) Arch. f. Augenheilk., Bd. 67, 1910, Heft 1 u. Ergänzungsheft.
- 5) 14. Tagung der Deutschen Pathol. Gesellsch., 1910, p. 273.
- 6) Biochem. Zeitschr., Bd. 37, 1911, p. 78.

I.

Um die Spezifitätseigenschaften der nach Obermayer und Pick hergestellten Immunsera genau kennen zu lernen, wurde, da quantitative Bestimmungen nicht vorliegen, die Wirkung der Nitro- und Diazoimmunsera auf verschiedene Antigene durch Titration bestimmt.

Darstellung der Antigene¹⁾.

Coctoeiweiß. Pferdeserum wurde auf das 4-fache mit destilliertem Wasser verdünnt, 4–5mal aufgeköcht, auf 1 Proz. NaCl gebracht.

Nitroeiweiß. 30 ccm natives Pferdeserum wurden in 180 ccm konzentrierter HNO_3 (10,5 normal), der eine kleine Menge Harnstoff zugesetzt war, unter Umschütteln eingetropt. Nach $\frac{1}{4}$ -stündigem Stehen bei Zimmertemperatur (ca. 20°) wurde in 1000 ccm eisgekühltes destilliertes Wasser eingegossen, im Eiskasten über Nacht absetzen gelassen, vorsichtig abgegossen, der Bodensatz abzentrifugiert, in einem Ueberschuß von Lauge klar gelöst, vorsichtig mit HCl neutralisiert, eventuell wieder mit Na_2CO_3 gelöst. (Für die Immunisierung von Kaninchen No. 460 wurde ein Nitroeiweiß verwendet, das im übrigen gleich hergestellt war, nur daß die Einwirkung von HNO_3 durch 1 Stunde bei 25° erfolgte.)

Diazoeiweiß²⁾. In 20 ccm Serum wurden 5 g NaNO_2 gelöst, unter Umrühren 20 ccm 20-proz. H_2SO_4 zugesetzt, im Dunkeln 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, mit 1000 ccm destillierten Wassers verdünnt, durch ein Tuch filtriert, der Niederschlag in destilliertem Wasser zerschüttelt, in einem kleinen Ueberschuß von Lauge gelöst, annähernd neutralisiert, kleine Reste des Niederschlages durch Filtrieren durch Gaze entfernt.

Mit Salzsäure gefälltes Eiweiß. 20 ccm Pferdeserum wurden in 20 ccm rauchende HCl (spezifisches Gewicht 1,19) langsam unter Umrühren eingetragen, $\frac{1}{4}$ Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann 20 ccm, in kurzer Zeit nochmals 20 ccm H_2O zugesetzt, mit H_2O auf 400 ccm aufgefüllt, über Nacht im Eiskasten absetzen gelassen, abgegossen der Niederschlag abzentrifugiert, in Lauge gelöst. Die Lösung muß schwach alkalisch reagieren, um klar zu bleiben.

Kuppelung des Diazoeiweißes mit Resorcin und α -Naphthol³⁾. Rinderserum wurde wie früher diazotiert, der Niederschlag im 4-fachen Volumen (auf das ursprüngliche Serumvolumen bezogen) Wasser aufgeschwemmt und zu einer 7 ccm Serum entsprechenden Menge 0,5 g α -Naphthol,

1) Zur Gewinnung des Immunisierungsmaterials wurden die Antigene gewöhnlich in größeren Mengen auf einmal dargestellt. Sie wurden zur Injektion, wenn nötig, mit 1-proz. NaCl-Lösung verdünnt.

2) Vgl. Landsteiner, Centralbl. f. Physiol., Bd. 8, p. 773; Bd. 9, p. 433 (1905); Biochem. Handlex., Bd. 4, p. 57.

3) Nach einer uns gemachten Angabe von Pick.

das in 5 ccm 3-fach normaler NaOH gelöst war, zugefügt. Die Diazo-eiweißaufschwemmung wurde vorher ganz leicht erwärmt, die Mischung noch einige Minuten auf 55° gehalten, 3-fach mit Wasser verdünnt, mit Essigsäure ausgefällt, durch Zusatz von Lauge gelöst, dann von dem geringen, noch unlöslichen Niederschlag abfiltriert. Ebenso wurde mit Resorcin gekuppelt, nur wurde bei der gleichen Menge Serum 1 g Resorcin genommen.

Jodeiweiß. 20 ccm Serum wurden mit 20 ccm H₂O versetzt, 1 g Jodkalium, 0,5 g jodsaures Kalium und 0,4 ccm H₂SO₄ zugesetzt, die Lösung unter Rückfluß 4 Stunden am Wasserbad erhitzt, abzentrifugiert, der Bodensatz in 1-proz. Kochsalzlösung suspendiert, in Soda gelöst, wobei ein Teil ungelöst bleibt.

Immunsera.

Mit je einem Antigen wurden gewöhnlich mehrere Tiere immunisiert¹⁾. Zu den hier wiedergegebenen Versuchen wurden die wirksamsten Sera ausgewählt, und zwar von folgenden Kaninchen:

No. 413, 417 erhielten natives Pferdeserum, je 3 ccm intravenös in 7—10-tägigen Intervallen. Entnahme 10 Tage nach der 4. Injektion.

No. 434, 449 erhielten Coctopferdeeiweiß intravenös in einer Menge, die 3 ccm nativem Serum entsprach, in 7—10-tägigen Intervallen. Entnahme 10 Tage nach der 5. Injektion.

No. 490, 492 erhielten Nitropferdeeiweiß intravenös in einer Menge, die 3 ccm nativem Serum entsprach (die verwendete Lösung hatte das 2—4-fache des Serumvolumens), in 6—8-tägigen Intervallen. No. 492 getötet nach der 3. Injektion, 490 nach der 4. Injektion.

No. 460 (s. Bemerkung bei der Herstellung des Nitroeiweißes). Entnahme 10 Tage nach der 5. Injektion.

No. 57 erhielt intraperitoneale Injektionen von Rinderdiazoeiweiß in 4—7-tägigen Intervallen. Die injizierte Menge entsprach 5—7 ccm Serum (die injizierte Lösung hatte das 3—4-fache des ursprünglichen Serumvolumens). Entnahme 10 Tage nach der 3. Injektion. Ähnlich werden die Tiere No. 10 und 12 behandelt.

No. 32, 34 erhielten ein mit HCl gefälltes Pferdeeiweiß intravenös, jedesmal in einer Menge, die 6—10 ccm nativem Serum entsprach (die verwendete Lösung war 2—3mal verdünnt). Entnahme 10 Tage nach der 4. Injektion.

Methode der Auswertung. Das Antigen wurde, von einer bestimmten Konzentration angefangen, in eine Reihe von Röhrchen mit um das Doppelte zunehmender Verdünnung (in 1-proz. NaCl) in der Menge von 0,2 ccm eingefüllt, und dann in jedes der Röhrchen eine gleiche Quantität — 1—2 Kapillartropfen = 0,025—0,05 ccm — der Immunsera zugefügt. Abgelesen wurde nach 1 Stunde Stehen bei Zimmertemperatur

1) Es wurde für alle zur Immunisierung verwendeten Antigene vom Pferdeserum ausgegangen, nur das Diazoeiweiß wurde mit Rinderserum hergestellt.

und Aufbewahrung im Eiskasten bis zum folgenden Tag. Als Wirkungsgrenze wurde die Verdünnung jenes Röhrchens angewiesen, in dem nach dem Aufschütteln ein deutlicher Unterschied gegen Kontrollproben mit Antigen und Immuns Serum bei der Betrachtung gegen einen dunklen Hintergrund zu erkennen war. In anderen Fällen haben wir uns darauf beschränkt, Reaktionen in $\frac{1}{100}$ Verdünnungen vorzunehmen und die Intensität der Präzipitinreaktion mit sehr stark (s.st.), stark (st.), deutlich (deutl.), schwach (schw.), Spur (Sp.) und 0 zu bezeichnen.

Die Titrations der Immunsera hatten folgende Ergebnisse¹⁾:

(Wo keine Reaktion eintrat, ist dies durch das Zeichen < und die geringste geprüfte Verdünnung angezeigt.)

Eiweiß	nativ	Cocto-	Nitro-	
Pferd	6400	8000	8000	} Nitropferdeantiserum No. 490
Rind	< 10	2000	6400	
Mensch	< 10	800	1600	
Huhn	< 10	< 10	3200	
Kaninchen	< 10	< 10	1600	

Eiweiß	nativ	Cocto-	Nitro-	Diazo-	
Pferd	3200	4000	8000	9200	} Nitropferdeantiserum No. 492
Rind	< 10	2000	4000	1600	
Mensch	< 10	400	800	800	
Huhn	< 10	< 10	320	200	
Kaninchen	< 10	< 10	400	< 20	

Eiweiß	nativ	Cocto-	Nitro-	Diazo-	
Pferd	< 20	< 10	3200	800	} Diazorinderantiserum No. 57
Rind	< 20	< 10	6400	1600	
Mensch	< 20	< 10	3200	800	
Huhn	< 20	< 10	1200	1600	
Kaninchen	< 20	< 10	1600	640	

Eiweiß	Nitro-	Diazo-	
Rind	8000	6400	} Diazorinderantiserum No. 10
Kaninchen	1600	1600	

1) Das zu den Versuchen verwendete Menschenserum (Ascites) hatte einen etwa um $\frac{1}{8}$ niedrigeren Eiweißgehalt als die anderen Sera, und auch die Diazopräparate enthielten etwa $\frac{1}{3}$ weniger Eiweiß als die anderen Antigene. Hier und auch bezüglich der übrigen nicht sehr beträchtlichen Differenzen im Eiweißgehalt der Präparate wurde keine Korrektur der Zahlen vorgenommen.

Eiweiß	Nitro-	Diazo-	
Rind	16 000	6400	} Diazorinderantiserum No. 12
Kaninchen	3 200	3200	

Bei den folgenden Versuchen wurden die Reaktionen nur mit $\frac{1}{100}$ Verdünnungen der Antigene angestellt.

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-	Nitro-	
Pferd	st.	0	schw.	0	} Antipferdeserum (nativ) No. 413
Rind	0	0	0	0	

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-	Nitro-	
Pferd	s. st.	0	st.	0	} Antipferdeserum (nativ) No. 417
Rind	0	0	schw.	0	

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-	Diazo-	
Pferd	st.	st.	st.	deutl.	} Coctopferdeantiserum No. 434
Rind	schw.	0	deutl.	0	
Mensch	0	0	schw.	0	
Huhn	0	0	0	0	
Kaninchen	0	0	0	0	

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-	Nitro-	Diazo-	
Pferd	st.	st.	st.	deutl.	schw.	} Coctopferdeantiserum No. 449
Rind	schw.	0	schw.	Sp.	0	
Mensch	0	0	schw.	0	0	
Huhn	0	0	0	0	0	
Kaninchen	0	0	0	0	0	

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-	Nitro-	
Pferd	schw.	schw.	st.	0	} Salzsäurepferdeanti- serum No. 32
Rind	0	0	deutl.	0	
Mensch	0	0	deutl.	0	
Huhn	0	0	0	0	
Kaninchen	0	0	0	0	

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-		
Pferd	schw.	Sp.	st.	} Salzsäurepferdeanti- serum No. 34	
Rind	0	0	deutl.		
Mensch	0	0	schw.		
Huhn	0	0	0		
Kaninchen	0	0	0		

Eiweiß	nativ	Cocto-	HCl-	Nitro-	Diazo-	
Pferd	schw.	Sp.	deutl. st.	st.	deutl.	Nitropferdeantiserum No. 460
Rind	0	0	0	schw.	schw.	
Mensch	0	0	deutl.	schw.	schw.	
Huhn	0	0	0	deutl.	deutl.	
Kaninchen	0	0	0	Sp.	Sp.	

Eiweiß	HCl-		HCl-
Pferd	st.	Nitropferdeantiserum No. 490	st.
Rind	schw.		schw.
Mensch	schw.		schw.
Huhn	0		0
Kaninchen	0		0

Die verzeichneten Resultate geben eine Bestätigung der Untersuchungen von Obermayer und Pick, insofern sie zeigen, daß Sera, die nach Injektion von nitriertem und diazotiertem Serumeiweiß entstehen, mit gleichartig verändertem Serumeiweiß anderer Tierarten reagieren. Ein vollständiger Verlust der Arteigenheit besteht bei mehreren Seren nicht, da das homologe Eiweiß (Pferd bzw. Rind) im Vergleich zu den Antigenen von Huhn und Kaninchen doch beträchtlich stärker präzipitiert wird und die drei Nitropferdeantiseren auch noch auf natives Pferdeeiweiß, und zwar zum Teil sehr stark wirken, nicht aber auf die anderen nativen Eiweiße. Der Grad des Verlustes der Artspezifität ist bei den einzelnen ausgewerteten Seren ein verschiedener, am geringsten bei Serum 492, am stärksten bei Serum 57, bei dem zwischen den einzelnen Reaktionen nur geringe Unterschiede bestehen, obwohl auch hier die Menge des Niederschlages bei der Präzipitinreaktion auf Nitro- und Diazokanincheneiweiß relativ gering war. Es fällt dabei auf, daß gerade bei diesem Diazoantiserum gleichzeitig mit der stärksten Reaktion auf artungleiches Nitroeiweiß die Präzipitation von nativen, gekochtem, oder durch HCl verändertem Eiweiß am schwächsten oder vielleicht aufgehoben ist.

Ein anderer Umstand, der aus den gegebenen Tabellen entnommen werden kann, ist der, daß eine Abschwächung der Artspezifität auch bei anderen Eingriffen als den von Obermayer und Pick angeführten eintritt, wenn auch in weit geringerem Grade. So sieht man, daß Antisera gegen

Salzsäureeiweiß ebenso wie Coctoantiserum — beide mit Pferdeeiweiß dargestellt — auf Salzsäureeiweiß nicht nur von Pferd, sondern auch von Rind und Mensch ziemlich gut reagieren, im Gegensatz zu dem artspezifischen Verhalten der hier untersuchten Immunsera gegen natives oder gekochtes Serumeiweiß (wenn auch bekanntlich bei gewöhnlichen Präzipitinseren Nebenreaktionen zu beobachten sein können). Ferner wird in ähnlicher Weise durch Nitropferdeantisera gekochtes Rinder- und Menscheneiweiß, ebenso Salzsäure-Rinder- und Menscheneiweiß im Gegensatz zu den nativen deutlich beeinflusst. Dabei scheint kein einfach reziprokes Verhältnis zwischen HCl- und Coctoeiweiß und den zugehörigen Immunseren zu bestehen, insofern HCl-Eiweiß mit Coctoantiserum beträchtlich stärker reagiert als die umgekehrte Kombination, und ähnliche Diskongruenzen zeigen sich beim Vergleich der Reaktionen der nativen, Cocto-, HCl- und Nitroantigene und ihrer Antikörper.

In einem Versuche haben wir festzustellen getrachtet, ob bei einem Nitroantiserum, das zugleich artverschiedenes Nitroeiweiß und artgleiches natives Eiweiß fällt, diese beiden Reaktionen durch gleiche oder verschiedene Antikörper bewirkt werden. Der Versuch fiel so aus, als ob es ein und derselbe Antikörper wäre, der die beiden Reaktionen bewirkt.

A. 0,1 ccm $\frac{1}{100}$ Pferdenormalserum + 4 Tropfen Immunserum 490.

B. 0,1 ccm 1-proz. Kochsalzlösung + 4 Tropfen Immunserum 490.

Nach 24 Stunden wird vom entstandenen Präzipitat abzentrifugiert und zu der Probe A nochmals 0,1 ccm $\frac{1}{100}$ Pferdeserum, zur Probe B 0,1 ccm Kochsalzlösung zugesetzt. Nach 24 Stunden entsteht in der Probe A kein Niederschlag mehr. Beide Proben werden in 2 Teile geteilt.

1) A + 0,1 ccm $\frac{1}{50}$ Pferdenitroeiweiß.

2) A + 0,1 ccm $\frac{1}{25}$ Kaninchennitroeiweiß.

3) B + 0,1 ccm $\frac{1}{50}$ Pferdenitroeiweiß.

4) B + 0,1 ccm $\frac{1}{25}$ Kaninchennitroeiweiß.

Die entstandenen Reaktionen waren folgende:

1) keine Präzipitation,

2) keine Präzipitation,

3) starke Präzipitation,

4) schwache Präzipitation.

Bei der Komplementbindung bestehen nach einem von uns angeführten Versuche ähnliche Verhältnisse bezüglich des Verlustes der Artspezifität wie bei der Präzipitation¹⁾.

1) Siehe die Beobachtungen an Stromata in unserer zit. Mitteilung.

Zu je 0,5 ccm der Antigenverdünnungen kamen 2 Kapillartropfen (= 0,025 ccm) vom Diazoelweißantiserum No. 57 und 1 Tropfen (= 0,075 ccm) eines auf das 3-fache verdünnten Meerschweinchenserums. Nach 1 Stunde 37° wurden zu jedem Röhrchen 0,5 ccm $\frac{1}{500}$ Hammelhämolsin vom Kaninchen und 5 Tropfen (= 0,25 ccm) 5-proz. Hammelblut zugesetzt. Ablesung nach 1 Stunde bei 37°, Nacht Eiskasten.

		Antigenkontrolle
Nitropferdeeiweiß $\frac{1}{100}$	k.	k.
Nitrorindereeiweiß $\frac{1}{1000}$	ø	k.
Nitrohühnereiweiß $\frac{1}{100}$	k.	k.
Nitrokanincheneiweiß $\frac{1}{1000}$	ø	k.
Immunserum 57 allein $\frac{1}{100}$	k.	
Komplement allein $\frac{1}{1000}$	ø	
	k.	

Mit Hilfe der Komplementbindung ließ sich auch eine Reaktion des Nitroantiserum mit nitrierter Seide erhalten.

0,05 g Seide + 6 ccm konzentrierter HNO_3 + einer kleinen Menge Harnstoff; nach $2\frac{1}{2}$ Stunden Digestion bei Zimmertemperatur wird auf ca. 40 ccm mit H_2O verdünnt, mit Lauge bis zu stark alkalischer Reaktion versetzt, durch Glaswolle filtriert, mit Alkohol (5-faches Volumen) gefällt; es entsteht ein schwacher Niederschlag, der abzentrifugiert, in 10 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, neutralisiert wird. Von dieser Aufschwemmung werden 2 Tropfen zu je 0,5 ccm Kochsalzlösung zugefügt. Zusatz von 1 Kapillartropfen der Immunsere und 0,025 ccm Meerschweinchenkomplement. Nach 1 Stunde bei 37° in jedes Röhrchen 0,5 ccm $\frac{1}{500}$ Hammelhämolsin vom Kaninchen und 5 Tropfen 5-proz. Hammelblut. Ablesung nach 1 Stunde 20 Minuten bei 37°.

	Nitropferde- antiserum No. 460	Nitropferde- antiserum No. 490	Nitropferde- antiserum No. 492	Coctopferde- antiserum No. 434	Coctopferde- antiserum No. 449	Diazorinder- antiserum No. 57	Normales Kaninchen- serum
Nitroseide	ø	ø	schw.	k.	k.	ø	k.
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Den chemischen Unterschied zwischen Nitro- und Diazoelweiß waren wir, wie die Tabellen zeigen, nicht in der Lage mit Sicherheit serologisch nachzuweisen. Diese beiden Antigene verhielten sich sehr ähnlich, so daß man den Schluß ziehen kann, daß ziemlich beträchtliche Verschiedenheiten der in dem aromatischen Kern vorhandenen Gruppen nicht not-

wendigerweise in den Eigenschaften der Immunsera zum Ausdruck kommen müssen. Dieser Umstand veranlaßte uns nachzusehen, ob wir Diazoeiweiß, das mit Phenolen gekuppelt ist, von einfachem Nitro- oder Diazoeiweiß durch die Serumreaktion unterscheiden können. In unseren Versuchen reagierten aber Nitroantiseren mit gekuppeltem Diazoeiweiß gerade so wie mit nicht gekuppeltem oder mit Nitroeiweiß [vgl. hingegen Pick¹⁾].

0,2 ccm der Lösungen + 2 Kapillartropfen Diazorinderantiserum No. 57. Ablesung nach 1 Stunde Zimmertemperatur. Nacht Eiskasten.

Verdünnung	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$
Diazorindereiweiß	st.	deutl.	schw.	Sp.	θ
Diazorindereiweiß, gekuppelt mit α-Naphtol	st.	deutl.	schw.	Sp.	

Verdünnung	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$
Diazorindereiweiß	deutl.	deutl.	schw.	Sp.	θ
Diazorindereiweiß, gekuppelt mit Resorcin	deutl.	deutl.	schw.	Sp.	Sp.

Verdünnung	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$
Diazokanincheneiweiß	deutl.	deutl.	schw.	Sp.
Diazokanincheneiweiß, gekuppelt mit Resorcin	deutl.	deutl.	schw.	Sp.

Wir haben ähnliche Versuche mit sogenanntem Desamidoalbumin [s. Pick²⁾] gemacht und bei der Prüfung mit Antinitroserum eine starke Abschwächung der Reaktion im Vergleich zu Nitroeiweiß gefunden, doch scheint auch bei der Behandlung mit Ammoniak eine wenn auch geringere Abschwächung der Reaktion stattzufinden. Die Versuche über das Verhalten des sogenannten Desamidoalbumins haben wir nicht zu Ende geführt.

Bei der Einwirkung von Nitro- und Diazoantiseren auf Jodeiweiß, das nach dem oben angegebenen Verfahren hergestellt war, und auch mit anderen, bei niedrigerer Temperatur (ca. 50°) hergestellten Proben wurden entsprechend den Resultaten von Obermayer und Pick keine Präzipitinreaktionen erhalten.

1) l. c. Biochem. d. Antigene, p. 26.

2) l. c. Biochem. d. Antigene, p. 22. Dies Präparat war aus Nitroeiweiß durch Behandeln mit einer beträchtlichen Menge von Schwefelammon bei Zimmertemperatur dargestellt (nach einer uns gemachten Angabe von Pick).

II.

Eine ganze Reihe von Eiweißveränderungen, die Obermayer und Pick vornahmen, wie Erhitzung, Bildung von Acidalbumin oder Alkalbumin, Einwirkung von Formaldehyd, oxydative Spaltung, Toluol- oder Chloroformeinwirkung ließen die Artspezifität unberührt, und darum stellten die Autoren, wie schon angeführt wurde, diese Eingriffe in Gegensatz zu den die serologische Arteigenheit aufhebenden Reaktionen der Nitrierung, Diazotierung und Jodierung. In der Absicht, andere Verfahren zur Beeinflussung der Artspezifität zu suchen, richteten wir auf Grund unserer Hypothese des elektrochemischen Charakters der Immunreaktionen unsere Aufmerksamkeit in erster Linie auf Reaktionen, die das Salzbildungsvermögen des Eiweißes möglicherweise stark verändern.

In einer früheren Arbeit¹⁾ haben wir die Agglutininbindung in dieser Richtung untersucht und mitgeteilt, daß Blutstromata durch Behandeln mit alkoholischen Säuren oder Acetanhydrid ihr Bindungsvermögen für Agglutinine einbüßen. Dabei waren die Effekte der beiden Reaktionen nicht identisch, da die Behandlung mit Acetanhydrid auch die Bindung von Pflanzenagglutininen aufhob, die Einwirkung von sauerem Alkohol nur die Bindung der Serumagglutinine. Als wir nun in ähnlicher Weise Serumeiweiß mit alkoholischen Säuren behandelten und zur Immunisierung benutzten, wurde der beabsichtigte Effekt erzielt, daß das veränderte Eiweiß seine Artspezifität ganz ebenso wie bei dem besprochenen Verfahren von Obermayer und Pick einbüßte.

Darstellung der Antigene²⁾.

Mit Alkohol gefälltes Eiweiß. 5 ccm Pferdeserum wurden mit 15 ccm 1-proz. NaCl-Lösung verdünnt, dann 95-proz. Alkohol bis zum Volumen von 100 ccm in kleinen Mengen in einem Zeitraume von 1—2 Stunden unter Umschütteln zugefügt, filtriert, mit absolutem Alkohol zweimal gewaschen, abgepreßt, vom Filter abgenommen, in einer Reibschale verrieben, allmählich absoluter Alkohol bis zu einem Volumen von 25 ccm

1) l. c. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, p. 363. Vgl. die dort zitierten Arbeiten von Suida über die Färbung veränderter Wolle und Seide.

2) Auch hier wurde das Immunisierungsmaterial gewöhnlich in beträchtlich größerem Maßstabe als angegeben dargestellt.

zugefügt, 48 Stunden bei 62—63° unter gelegentlichem Umschütteln in einem verschlossenen Gefäß digeriert, abzentrifugiert, in ca. 25 ccm Kochsalzlösung aufgenommen, zentrifugiert und schließlich in 5 oder 10 ccm 1-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Dieses Präparat wird im folgenden als „Alkoholeiweiß“ bezeichnet.

Mit alkoholischer Schwefelsäure behandeltes Eiweiß. Ausfällung gleichartig wie bei Alkoholeiweiß. Nach dem zweimaligen Waschen mit absolutem Alkohol wird in 20 ccm absolutem Alkohol aufgenommen, dann 5 ccm 5-volumprozentige H_2SO_4 -Lösung in absolutem Alkohol zugefügt, 48 Stunden bei 62—63° digeriert, öfters umgeschüttelt, abzentrifugiert, einmal auf der Zentrifuge mit 95-proz. Alkohol gewaschen, in Kochsalzlösung aufgenommen, neutralisiert (etwas alkalisch gemacht bis zu blauer Lackmusreaktion, dann zurücktitriert), auf 25 ccm mit NaCl-Lösung aufgefüllt, lange zentrifugiert, abgegossen, der Niederschlag in 5 oder 10 ccm Kochsalzlösung aufgenommen. Dieses Präparat wird in Unkenntnis der chemischen Struktur als „S. Eiweiß“ bezeichnet.

Behandlung des S. Eiweißes mit Ammoniumkarbonat. Das neutralisierte und gewaschene Säurealkoholeiweiß wurde in der 5-fachen (auf das ursprüngliche Serumvolumen bezogen) Menge einer 1-proz. wässrigen Ammoniumkarbonatlösung unter Rückfluß 4 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt, abzentrifugiert, in Kochsalzlösung aufgenommen, neutralisiert, mit NaCl-Lösung auf das ursprüngliche Serumvolumen gebracht. Das Präparat wird als „S. Eiweiß A.“ bezeichnet.

Behandlung mit salzsauerem Alkohol. Das mit Alkohol gefällte, zweimal mit absolutem Alkohol gewaschene, Eiweiß wurde unter Verreiben langsam mit dem doppelten (auf das ursprüngliche Serumvolumen bezogen) Volumen absolutem, mit HCl gesättigtem Alkohol versetzt. Einwirkung 24 Stunden bei Zimmertemperatur. Dann wird mit absolutem Alkohol verdünnt, abzentrifugiert, einmal mit 95-proz. Alkohol gewaschen, in Kochsalzlösung aufgenommen, neutralisiert, auf ein entsprechendes Volumen gebracht.

Das mit alkoholischer Schwefelsäure behandelte Eiweiß ist rein weiß, in wässriger Suspension sehr fein verteilt, so daß es sich schwer absetzt und nicht leicht zentrifugieren läßt. Bei der Reaktion nimmt das Eiweiß vielleicht ein wenig an Gewicht zu; jedenfalls tritt kein erheblicher Gewichtsverlust ein.

Die zur Bestimmung verwendete Suspension von mit Alkohol gefälltem Eiweiß enthielt in der 1 ccm des ursprünglichen Serums entsprechenden Menge 0,0649 g organischen Trockenrückstand. Eine entsprechende Menge der Suspension des mit alkoholischer H_2SO_4 behandelten Präparates wurde abzentrifugiert, mit Alkohol gewaschen, in Kochsalzlösung suspendiert, neutralisiert. Der organische Trockenrückstand betrug jetzt 0,0659 g.

Nach der Behandlung mit einer Lösung von Ammoniumkarbonat sieht die Substanz ebenso aus wie vorher, nur ist sie etwas gröber verteilt.

Beim Zusatz von Farbstoffen zeigte es sich, daß das (mit Alkohol koagulierte) Eiweiß nach der Behandlung mit sauerem Alkohol durch (basisches) Safranin schwächer gefärbt wurde, hingegen das saure Bordeauxrot viel stärker aufnahm als vorher ¹⁾).

Nach der Behandlung mit Ammoniumkarbonat verminderte sich die Färbbarkeit mit Bordeauxrot wieder, so daß das ursprüngliche Verhalten des nur mit Alkohol koagulierten Eiweißes fast wiederhergestellt war.

Das Verhalten entspricht ungefähr dem von Suida bei Schafwolle beobachteten ²⁾. Suida nahm auf Grund seiner Beobachtung an, daß durch die Behandlung mit Ammoniumkarbonat die mit alkoholischer Säure behandelte Wolle wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückgeführt werde. Unsere noch anzuführenden serologischen Ergebnisse zeigen, daß dies beim Eiweiß nicht der Fall ist, sondern daß hier nach Behandlung mit Ammoniumkarbonat eine Substanz vorliegt, die zwar ihrer Färbbarkeit nach dem ursprünglichen Eiweiß nahe steht, aber nach der Reaktion mit Immunsereen von demselben sehr verschieden ist ³⁾).

Derselbe Schluß ergibt sich auch aus dem Verhalten der Produkte gegen Säuren Laugen und Fermente. So wird die Substanz A durch n Essigsäure (1 Tropfen der Aufschwemmung + 1 ccm n Essigsäure oder $n/50$ HCl) nicht merklich verändert, während bei Alkoholeiweiß und Säurealkoholeiweiß bald starke Aufhellung der trüben Suspension eintritt. Auch in Lauge (1 Tropfen der Aufschwemmung + 1 ccm $n/10$ NaOH) ist das Präparat A schwerer löslich als die beiden anderen. In 1-proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt geht

1) Die Menge der zu den Vergleichsversuchen verwendeten Farbstoffe ist entsprechend zu bemessen, um die Unterschiede hervortreten zu lassen.

2) Sitzungsberichte d. Akad. d. Wissensch. in Wien, Math.-naturwiss. Klasse, Bd. 114, 2b, Januar 1905.

3) Es ist demnach möglich, daß auch bei der Schafwolle eine wirkliche Restitution nicht eintritt, wie es nach dem Verhalten gegen Farbstoffe den Anschein hat.

vom Alkoholeiweiß ziemlich viel in Lösung, wovon man sich durch Fällen z. B. mit dem Esbachschen Reagenz überzeugen kann, beträchtlich weniger von S. Eiweiß, noch weniger vom Präparat A.

Gegen Pepsin ist das S. Eiweiß resistenter als das sehr leicht verdauliche Alkoholeiweiß; A ist noch schwerer angreifbar. Trypsin verdaut das Alkoholeiweiß sehr leicht, Alkoholsäureeiweiß ist sehr widerstandsfähig, A noch resistenter.

5 ccm 1-proz. Pepsin-(Fairchild-)Lösung + 1 ccm der Eiweißaufschwemmungen + 1 ccm 1-proz. HCl + einige Tropfen Toluol.

	15' Zimmer, 15' 37°	2 ^b 30' 37°	24 ^b 37°
Alkoholeiweiß	völlige Lösung	völlige Lösung	völlige Lösung
S. Eiweiß	leichte Aufhellung	sehr starke Aufhellung	sehr starke Aufhellung
S. Eiweiß A.	nicht verändert	nicht verändert	sehr starke Aufhellung

5 ccm 1-proz. Pankreatin-(Rhenania-)Lösung + 0,5 der Eiweißaufschwemmungen + 2 Tropfen 1/2-proz. Sodalösung + einige Tropfen Toluol.

	15' Zimmer, 15' 37°	2 ^b 30' 37°	24 ^b 37°
Alkoholeiweiß	völlige Lösung	völlige Lösung	völlige Lösung
S. Eiweiß	nicht verändert	nicht verändert	deutliche Aufhellung
S. Eiweiß A.	nicht verändert	nicht verändert	sedimentiert, nicht verändert

Die vorgenommenen Eiweißreaktionen (Biuret, Xanthoprotein, Millon, Molisch, p-Dimethylaminobenzaldehyd, Diazobenzolsulfonsäure, Ninhydrin, Schwefelblei) waren bei allen drei Präparaten positiv. Die Reaktionen von Millon, Pauly und Molisch schienen bei den zwei Derivaten schwächer zu sein als bei dem Ausgangsmaterial.

Die Immunisierung mit den Eiweißpräparaten gelang ohne Schwierigkeit.

Zur Gewinnung brauchbarer Sera waren gewöhnlich bei Alkoholeiweiß 3—5, beim S. Eiweiß 5—7 Injektionen nötig. Das Präparat A scheint nach einem Versuch schwieriger Immunprodukte zu liefern, vielleicht wegen seiner noch geringeren Löslichkeit.

Herstellung der Sera. Es wurden ausschließlich aus Pferdeserum hergestellte Präparate verwendet. Kaninchen No. 23, 24, 27, 94, 95, 96 erhielten 5—7mal je 10 ccm des S. Eiweißes intraperitoneal. Die Aufschwemmung war auf ein dem des ursprünglichen Serums gleiches Volumen gebracht. So erhielt z. B. Kan. No. 23 Injektionen am 19. IV., 24. IV., 29. IV., 9. V., 14. V., 21. V.

In ähnlichen Intervallen injizierten wir die anderen Tiere.

Vier von den sechs Seren waren gut brauchbar. Von anderen 3 Tieren, die nur drei Injektionen erhalten hatten, gaben 2 schwache Sera.

Mit Alkoholeiweiß wurden die Tiere 65, 69, 71, 58, 59, in der gleichen Weise immunisiert (meistens nur durch 5 Injektionen).

Die Sera wurden zum Teil (nach Uhlenhuth) filtriert verwendet.

Die erhaltenen Immunsera gegen Alkoholeiweiß geben eine gute Flockungs- oder Präzipitinreaktion mit einer durch Zentrifugieren von gröberen Teilchen befreiten Aufschwemmung oder Lösung des Antigens. Bei dem S. Eiweiß ist, wenn man in gleicher Weise vorgeht, eine Fällungsreaktion mit den entsprechenden Immunseren dadurch bemerkbar, daß sich die durch das Antigen getrübten Flüssigkeiten vollständiger klären und gröber geflockte Sedimente entstehen. Diese Reaktionen sind aber nicht leicht erkennbar, und wir verwendeten deshalb die sehr präzise Resultate liefernde Komplementbindungsmethode.

Der Titer der Sera ist ein nicht hoher, wenn auch zur Untersuchung vollkommen ausreichender. Doch erklärt sich dieser Umstand aus der sehr geringen Löslichkeit der Präparate, so daß von den zugesetzten, die Flüssigkeit trübenden Antigenen offenbar nur ein Teil tatsächlich zur Wirkung kommt. Der Titer müßte also, wenn man ihn mit den Verhältnissen bei gelösten Antigenen vergleichen will, höher geschätzt werden.

Die Stärke des hämolytischen Systems und die Ablesungszeit wurden, um eindeutige Resultate zu erhalten, so gewählt, daß geringfügige Reaktionen außer Betracht blieben.

Technik der Komplementbindungsversuche. In jedes Röhrchen kamen 0,5 ccm der Antigenverdünnung, nur in die Kontrollen ebensoviel 1-proz. Kochsalzlösung. Das Immunserum wurde mit Kappillarpipetten tropfenweise zugesetzt (1 Tropfen = 0,025 ccm). In jedes Röhrchen kam ein großer Tropfen = 0,075 ccm eines auf das 3-fache verdünnten Meerschweinchenkomplementes. Nach 1 Stunde Stehen im Brutofen wurden 0,5 ccm einer $\frac{1}{500}$ — $\frac{1}{700}$ Verdünnung eines Hammelhämolysins vom Kaninchen zugefügt, eine Menge, die nach dem jedesmal gemachten Vorversuch der doppelten, in 1 Stunde komplett lösenden Dosis oder etwas

mehr entsprach. Blutzusatz 5 Tropfen = 0,25 ccm einer 5-proz. Hammelblutaufschwemmung.

Ablesung gewöhnlich nach 1 Stunde bei 37°.

Bezeichnung des Grades der Hämolyse 0, Spur (Sp.), schwach (schw.), deutlich (d.), stark (st.) sehr stark (s. st.), komplett (k).

Die angegebenen Verdünnungszahlen der Antigene beziehen sich auf das ursprüngliche Volumen des Serums, aus dem die Präparate hergestellt wurden.

Die folgenden Versuche zeigen die Reaktion von Alkohol-eiweiß und S. Eiweiß verschiedener Serumarten mit den durch Injektion von Pferdeeiweiß hergestellten Immunsereen.

Von den Suspensionen enthielt 1,0 ccm der Stammlösung von S. Eiweiß Pferd: 0,0504, Rind: 0,0644, Mensch: 0,0568, Huhn: 0,030, Kaninchen: 0,0416 g organischen Trockenrückstand.

2 Kapillartropfen der Immunsereen. Ablesung nach 1 Stunde 37°. Nacht Eiskasten.

Immunsereen gegen Pferde-		Alkohol-eiweiß	Alkohol-eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	Antigenkontrolle
Nummer der Immunsereen		65	71	24	27	
Antigene	Alkoholeiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	0	0	k.	k.	f.
	" " $\frac{1}{1000}$	k.	k.	k.	k.	k.
	Rind $\frac{1}{100}$	f. k.	k.	k.	k.	f.
	" " $\frac{1}{1000}$	k.	k.	k.	k.	k.
	Mensch $\frac{1}{100}$	f. k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{1000}$	k.	k.	k.	k.	k.
	Huhn $\frac{1}{100}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{1000}$	k.	k.	k.	k.	k.
	Kaninchen $\frac{1}{100}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{1000}$	k.	k.	k.	k.	k.
	S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	Sp.	f. k.	k.
	Rind $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	Sp.	f. k.	k.
	Mensch $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	schw.	k.	k.
Huhn $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.	
" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	schw.	k.	k.	
Kaninchen $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.	
" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	d.	k.	k.	
Kochsalzlösung	k.	k.	.	k.	k. ¹⁾	

(Hämolyse: $\frac{1}{500}$)

1) Komplementkontrolle.

Immunsere gegen Pferde-		Alko- hol- eiweiß	Alko- hol- eiweiß	S. Ei- weiß	S. Ei- weiß	Antigen- kontrolle
Nummer der Immunsere		53	58	23	94	
Antigene	Alkoholeiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	0	0	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" Rind $\frac{1}{100}$	0	0	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" Mensch $\frac{1}{100}$	schw.	st.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" Huhn $\frac{1}{100}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" Kaninchen $\frac{1}{100}$	k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.	k.	k.
	S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	0	0	k.
	" Rind $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	Sp.	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	0	Sp.	k.
	" Mensch $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	Sp.	schw.	k.
	" Huhn $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	Sp.	Sp.	k.
	" Kaninchen $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	schw.	st.	k.
Kochsalzlösung		k.	k.	k.	k.	k.

(Hämolyse: $\frac{1}{700}$)

In den zwei folgenden Versuchen wurde die Menge der Immunsere und der Antigene vermindert.

0,006 ccm Immunsere. Hämolyse: $\frac{1}{500}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Immunsere gegen Pferde-		S. Eiweiß	S. Eiweiß
Nummer der Immunsere		23	24
Antigene	S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	0	st.
	" " $\frac{1}{200}$	schw.	st.
	" " $\frac{1}{400}$	s. st.	f. k.
	" Rind $\frac{1}{100}$	st.	st.
	" " $\frac{1}{200}$	st.	f. k.
	" " $\frac{1}{400}$	f. k.	k.
	" Mensch $\frac{1}{100}$	st.	st.
	" " $\frac{1}{200}$	s. st.	f. k.
	" " $\frac{1}{400}$	k.	k.
	" Huhn $\frac{1}{100}$	0	st.
	" " $\frac{1}{200}$	schw.	f. k.
	" " $\frac{1}{400}$	s. st.	k.
	" Kaninchen $\frac{1}{100}$	0	deutl.
	" " $\frac{1}{200}$	st.	f. k.
" " $\frac{1}{400}$	f. k.	f. k.	

Für den folgenden Versuch wurden neue Antigene verwendet. 1 ccm der Stammlösungen enthielt bei Pferd 0,0374 g, bei Kaninchen 0,0426 g organischen Trockenrückstand.

Immunsrum: Antiserum No. 24 gegen S. Eiweiß (Pferd). Hämolyain: $\frac{1}{500}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Menge des Immunsrum	0,05	0,025	0,0125
S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	0	0	0
" " $\frac{1}{200}$	0	0	0
" " $\frac{1}{400}$	schw.	schw.	st.
" " $\frac{1}{800}$	k.	k.	k.
" " $\frac{1}{1600}$	k.	k.	k.
" Kaninchen $\frac{1}{100}$	0	0	schw.
" " $\frac{1}{200}$	st.	schw.	k.
" " $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.
" " $\frac{1}{800}$	k.	k.	k.

Die Versuche ergeben, daß die beiden Arten von Immunsrum nur auf das der Darstellung nach homologe Antigen wirken. Die Antiseren gegen Alkoholeiweiß zeigen entweder volle Artspezifität oder eine gewisse Abschwächung der Spezifität, insofern sie außer auf Pferde- auch auf Rinder- und Menschenantigen einwirken. Das Alkoholantigen hat demnach kein auffallendes Verhalten, es reagiert ähnlich wie z. B. in den oben mitgeteilten Präzipitinversuchen das durch HCl gefällte Eiweiß. Die Reaktion auf artverschiedenes Eiweiß erstreckt sich wie dort nur auf solches der gleichen Tierklasse; Eiweiß einer anderen Tierklasse (Vogelserum), sowie das Eiweiß des immunsrumspendenden Tieres werden nicht beeinflusst.

Viel ausgesprochener ist die Veränderung der Artspezifität beim S. Eiweiß. Hier erstreckt sich die heterologe Wirkung auf alle fünf geprüften Serumarten; das vom Kaninchen stammende Pferdeantiserum wirkt auf Hühner-eiweiß und Kanincheneiweiß, wenn auch (s. z. B. den letzten Versuch) nicht auf alle Arten gleich stark (ähnlich den Immunsrumen gegen Nitro- und Diazoeiweiß).

Die Zerstörung der Artspezifität durch die Behandlung des Eiweißes mit alkoholischer Säure ist also eine sehr weitgehende. Das wird noch dadurch bestätigt, daß auch mit alkoholischer Säure behandeltes Pflanzeneiweiß (Edestin) mit den Immunsrumen positiv reagiert.

Herstellung des Edestins und des S. Edestins. 100 g gestoßener Hanfsamen werden in 400 ccm 10-proz. Kochsalzlösung $\frac{1}{2}$ Stunde bei 57–60° digeriert, warm filtriert, langsam abgekühlt, mit destilliertem Wasser ca. 4-fach verdünnt, absetzen gelassen, der Niederschlag nochmals in 10-proz. Kochsalzlösung warm gelöst, nach dem Abkühlen mit destilliertem Wasser wie oben verdünnt; der Niederschlag wird in einer kleinen Menge 10-proz. Kochsalzlösung gelöst und mit dem 5-fachen Volumen 95-proz. Alkohol ausgefällt.

Der Niederschlag wurde nach 2-maligem Waschen mit absolutem Alkohol, in 60 ccm 1-volumproz. Lösung von H_2SO_4 in absolutem Alkohol eingetragen, 48 Stunden bei 62–63° digeriert und weiter wie S. Eiweiß behandelt. Die Stammlösung wurde so hergestellt, daß sie dem Eiweißgehalt des Pferde-S. Eiweißes entsprach.

1 Kapillartropfen der Immunsere. Hämolyse: $\frac{1}{500}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Immunsere gegen Pferde-		Alkohol-eiweiß	Alkohol-eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	Antigenkontrolle
Nummer der Immunsere		58	65	23	24	27	94	
Antigene	S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	0	0	k.
	„ „ $\frac{1}{400}$	k.	k.	st.	d.	st.	s. st.	k.
	S. Edestin $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	st.	k.	k.
	„ $\frac{1}{400}$	k.	k.	f. k.	d.	st.	k.	k.
Kochsalzlösung		k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

$\frac{1}{2}$ Kapillartropfen der Immunsere.

Immunsere gegen Pferde-		Alkohol-eiweiß	Alkohol-eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	Antigenkontrolle
Nummer der Immunsere		58	65	23	24	27	94	
Antigene	S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	k.	k.	0	0	0	k.	k.
	„ „ $\frac{1}{400}$	k.	k.	st.	d.	s. st.	k.	k.
	S. Edestin $\frac{1}{100}$	k.	k.	f. k.	d.	k.	k.	k.
	„ $\frac{1}{400}$	k.	k.	k.	s. st.	k.	k.	k.

Die Reaktion mit Edestin erscheint hier, wenn man kräftig wirkende Sera benutzt, sehr deutlich, wenn auch schwächer als mit Serumeiweiß.

Im weiteren prüften wir das Verhalten verschiedener Immunsere gegen mehrere Antigene im Komplementbindungsversuch.

2 Kapillartropfen der Immunsere. Hämolysin: $\frac{1}{500}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Immunsere gegen Pferde-	natives Eiweiß	Coctoeiweiß	durch HCl gefälltes Eiweiß	Nitroeiweiß	Alkoholeiweiß	Antigenkontrolle	
Nummer der Immunsere	418	449	34	60	65		
Antigene (Pferd)	Natives Eiweiß $\frac{1}{100}$	0	st.	f. k.	f. k.	k.	
	" " $\frac{1}{500}$	0	0	f. k.	s. st.	0	
	Coctoeiweiß $\frac{1}{100}$	0	0	k.	k.	st.	
	" " $\frac{1}{500}$	Sp.	0	k.	k.	f. k.	
	Durch HCl gefälltes Eiweiß $\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{100} \\ \frac{1}{500} \end{array} \right.$	0	0	d.	s. st.	0	k.
		0	0	schw.	f. k.	0	
	Nitroeiweiß $\frac{1}{100}$	k.	f. k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{500}$	k.	schw.	k.	0	k.	
Alkoholeiweiß $\frac{1}{100}$	0	0	schw.	.	0	k.	
	0	0	f. k.	.	0		
Durch Wärme koaguliertes Eiweiß $\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{100} \\ \frac{1}{500} \end{array} \right.$	0	0	s. st.	s. st.	0	k.	
	st.	0	f. k.	f. k.	st.		
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.		

1 Kapillartropfen der Immunsere.

Immunsere gegen	natives Eiweiß (Pferd)	Coctoeiweiß (Pferd)	durch HCl gefälltes Eiweiß (Pferd)	Diazoieiweiß (Rind)	Alkoholeiweiß (Pferd)	Antigenkontrolle	
Nummer der Immunsere	450	434	32	57	58		
Antigene (Pferd)	Natives Eiweiß $\frac{1}{100}$	0	f. k.	k.	k.	schw.	
	" " $\frac{1}{500}$	0	s. st.	k.	k.	0	
	Coctoeiweiß $\frac{1}{100}$	0	f. k.	k.	k.	st.	
	" " $\frac{1}{500}$	0	0	k.	k.	0	
	Durch HCl gefälltes Eiweiß $\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{100} \\ \frac{1}{500} \end{array} \right.$	0	0	s. st.	k.	0	k.
		0	s. st.	st.	k.	0	
	Nitroeiweiß $\frac{1}{100}$	k.	k.	k.	k.	k.	k.
	" " $\frac{1}{500}$	f. k.	k.	k.	0	s. st.	
Alkoholeiweiß $\frac{1}{100}$	0	schw.	Sp.	k.	0	k.	
	0	f. k.	k.	k.	0		
Durch Wärme koaguliertes Eiweiß $\left\{ \begin{array}{l} \frac{1}{100} \\ \frac{1}{500} \end{array} \right.$	0	0	k.	k.	0	k.	
	f. k.	k.	k.	k.	st.		
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.		

1) 5 ccm Serum + 45 ccm 1-proz. Kochsalzlösung + 2 ccm 2-proz. Essigsäure wurden im Wasserbad unter Umschwenken bis zur Koagulation erhitzt,

Nach diesen Ergebnissen erstreckt sich die Wirkung der Immunsera gegen natives und Coctoserum auf mehrere Antigene, und dies gilt ebenso für das Alkoholeiweiß-Antiserum. Auch wird andererseits das Alkoholeiweiß von mehreren Antiseren beeinflusst. Das Serum gegen HCl-Eiweiß und das Nitroeiweiß-Antiserum No. 460 haben eine schärfer umschriebene Wirkung; das Diazoeiweiß-Antiserum mit dem ausgesprochensten Verluste der Artspezifität reagiert in bezug auf die chemische Beschaffenheit der Antigene sehr spezifisch.

Anders als das Alkoholeiweiß-Antiserum verhält sich das Immunsrum gegen S. Eiweiß. Wir führen in dieser Beziehung die nachstehenden Versuchsprotokolle an.

2 Kapillartropfen der Immunsera: Hämolytin $\frac{1}{500}$ — $\frac{1}{500}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Immunsera gegen Pferde-	S. Eiweiß	natives Eiweiß	natives Eiweiß	natives Eiweiß	Cocto-eiweiß	durch HCl gefälltes Eiweiß	durch HCl gefälltes Eiweiß	Antigenkontrolle
Nummer der Immunsera	23	412	419	450	434	32	34	
Antigene (Pferd)	S. Eiweiß $\frac{1}{100}$	0	f. k.	k.	s. st.	k.	k.	k.
	" $\frac{1}{400}$	0	f. k.	k.	s. st.	k.	k.	k.
	" $\frac{1}{1000}$	st.	k.	k.	s. st.	k.	k.	k.
	Natives Eiweiß $\frac{1}{100}$	k.	0	0	0	.	.	k.
	" $\frac{1}{1000}$	k.	0	0	0	.	.	k.
	" $\frac{1}{8000}$	k.	0	0	0	.	.	k.
	Coctoeiweiß $\frac{1}{100}$	k.	.	.	.	0	.	k.
	" $\frac{1}{1000}$	k.	.	.	.	0	.	k.
	" $\frac{1}{8000}$	k.	.	.	.	0	.	k.
	Durch HCl gefälltes Eiweiß $\frac{1}{100}$	k.	0	schw.
dgl. $\frac{1}{1000}$	k.	0	0	k.
" $\frac{1}{5000}$	k.	d.	st.	k.
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k. 1)	k.	k.	k.	k.

neutralisiert, zentrifugiert, einmal mit NaCl-Lösung gewaschen, in NaCl-Lösung aufgeschwemmt (ziemlich feine Verteilung).

1) Bleibt anfänglich stark in der Hämolyse zurück.

Immunsera gegen	S. Eiweiß (Pferd)	Nitro-eiweiß (Pferd)	Nitro-eiweiß (Pferd)	Diazo-eiweiß (Pferd)	Diazo-eiweiß (Pferd)	Antigen-kontrolle	
Nummer der Immunsera	23	460	490	12	57		
Antigene (Pferd)	S. Eiweiß $\frac{1}{100}$	0	k.	k.	k.	k.	
	" $\frac{1}{400}$	Sp.	k.	k.	k.	k.	
	" $\frac{1}{1000}$	s. st.	k.	k.	k.	k.	
	Nitroeiweiß $\frac{1}{100}$	k.	0	0	.	.	k.
	" $\frac{1}{1000}$	k.	0	0			
	" $\frac{1}{5000}$	k.	0	0			
Diazoeiweiß	$\frac{1}{100}$	k.	.	.	0	0	k.
	$\frac{1}{1000}$	k.	.	.	0	0	
	$\frac{1}{5000}$	k.	.	.	0	0	
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.	k.	

Antigene (Pferd)	Immunsera gegen S. Eiweiß (Pferd)			Antigen-kontrolle	
	Nummer der Immunsera	24	27		94
S. Eiweiß $\frac{1}{100}$		0	0	0	k.
Natives Eiweiß $\frac{1}{100}$		k.	k.	k.	k.
" " $\frac{1}{1000}$		k.	k.	k.	
Durch HCl gefälltes Eiweiß $\frac{1}{100}$		k.	k.	k.	k.
" " " " $\frac{1}{1000}$		k.	k.	k.	
Nitroeiweiß $\frac{1}{100}$		k.	k.	k.	k.
" $\frac{1}{1000}$		k.	k.	k.	
Diazoeiweiß $\frac{1}{100}$		k.	k.	k.	k.
" $\frac{1}{1000}$		k.	k.	k.	
Kochsalzlösung		k.	k.	k.	k.

Immunsera gegen Pferde	S. Eiweiß	S. Eiweiß	nativ. Eiweiß	nativ. Eiweiß	nativ. Eiweiß	Coctoeiweiß	Coctoeiweiß	durch HCl gef. Eiweiß	durch HCl gef. Eiweiß	Nitroeiweiß	Nitroeiweiß	Antigen-kontrolle
Nummer der Immunsera	24	94	412	419	450	434	449	32	34	460	490	
S. Eiweiß Kaninchen	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Wie die Tabellen zeigen, sind die Antisera gegen Säurealkoholeiweiß in beträchtlichem Grade konstitutions- oder

strukturspezifisch¹⁾, worunter wir im Anschluß an Obermayer und Pick eine Spezifität verstehen, die von der besonderen, in unserem Falle künstlich modifizierten, chemischen oder physikalischen Struktur der Antigene abhängt, aber nicht von jener Struktur, die durch die Abstammung bedingt ist²⁾. Es ist bemerkenswert, daß demnach Art- und Strukturspezifität hier ein entgegengesetztes Verhalten zeigen, indem gleichzeitig der Artcharakter des Eiweißes fast verschwindet und die Strukturspezifität sehr ausgeprägt wird. Eine ähnliche Erscheinung zeigt sich in den oben angeführten Beobachtungen über Nitroeiweiß.

Die mit S. Eiweiß hergestellten Sera reagieren andererseits auf das Präparat A und ferner auf das mit konzentrierter alkoholischer Salzsäure behandelte Eiweiß, weshalb man wohl annehmen kann, daß diese beiden Präparate eine verwandte chemische Beschaffenheit haben, wie das mit alkoholischer Schwefelsäure hergestellte.

Immunsereen gegen S. Eiweiß (Pferd). Hämolyse: $\frac{1}{500}$. Ablesung 1 Stunde 30 Minuten 37°. Nacht Eiskasten.

Pferdeeiweiß behandelt mit alkoholischer	Menge der Immunsereen in Kapillar- tropfen	Nummer der Immunsereen		Kaninchen- eiweiß be- handelt mit alkoholischer	Menge der Immunsereen in Kapillar- tropfen	Nummer der Immunsereen	
		23	94			23	94
H ₂ SO ₄	2	0	0	H ₂ SO ₄	2	0	0
"	1	0	0	"	1	0	0
"	0,5	0	0	"	0,5	0	d.
"	0,25	0	st.	"	0,25	Sp.	k.
HCl	2	0	0	HCl	2	0	0
"	1	0	0	"	1	0	0
"	0,5	0	s. st.	"	0,5	0	Sp.
"	0,25	st.	k.	"	0,25	st.	k.

1) Wir sahen nur neuerdings bei zwei derartigen Seren eine nicht geringe Mitreaktion auf Alkoholeiweiß.

2) Wir beschränken uns hier auf die Begriffe Artspezifität und Strukturspezifität und unterscheiden nicht zwischen dieser und der sogenannten Zustandsspezifität, da uns diese Differenzierung für die hier vorliegenden Antigene nicht durchführbar erscheint (vgl. Pick, Biochemie der Antigene, p. 20 u. ff.).

Immunserum gegen S. Eiweiß No. 24. Hämolysin: $\frac{1}{500}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Menge des Immunserums	0,025	0,005	0,0025	Antigenkontrolle
S. Eiweiß Pferd $\frac{1}{100}$	0	0	schw.	k.
" " $\frac{1}{200}$	0	0	d.	
" " $\frac{1}{400}$	d.	st.		
" " $\frac{1}{800}$	k.			
S. Eiweiß A Pferd $\frac{1}{100}$	0	.	d.	k.
" " " $\frac{1}{200}$	0	0	st.	
" " " $\frac{1}{400}$	d.	0		
" " " $\frac{1}{800}$	f. k.	s. st.		
S. Eiweiß Kaninchen $\frac{1}{100}$	0	0	s. st.	k.
S. Eiweiß A Kaninchen $\frac{1}{100}$	schw.	s. st.	k.	k.

Das hier beschriebene Verfahren, den Artcharakter des Eiweißes bei erhaltener Antigenwirkung aufzuheben, ist insofern neuartig, als die Reaktion mit alkoholischen Säuren den Bau des ganzen Eiweißmoleküls vermutlich nur wenig verändert, während die schon bekannten, zum gleichen Effekt führenden Reaktionen eingreifendere Prozesse sind, z. B. mit der Nitrierung gleichzeitig Spaltungen und Oxydationen vor sich gehen [Fürth¹⁾]. Es würde nun von Wichtigkeit sein, zu eruieren, welches das gemeinsame Moment ist, das die zum Verlust des Artcharakters führenden Eingriffe auszeichnet, und welcher Unterschied gegenüber den anderen schon geprüften Reaktionen besteht, die zwar auch merkliche Antigenveränderungen bewirken, aber die Artspezifizität wenig beeinflussen. Dabei erscheint es möglich, daß nicht ganz scharfe Grenzen bestehen, wie es in unseren Versuchen z. B. durch das Verhalten des mit Salzsäure gefällten Eiweißes angedeutet wird. Immerhin ist auch der quantitative Unterschied groß genug, um eine Sonderung der Reaktionen mit Zerstörung des Artcharakters zu begründen.

Wie schon erwähnt wurde, haben wir in der Absicht, eine ausgiebige Aenderung des serologischen Verhaltens zu bewirken, solche Eingriffe gewählt, von denen eine Beeinflussung des Salzbildungsvermögens der Eiweißkörper zu erwarten war. Bei der Einwirkung alkoholischer Säuren konnte das der Fall sein, da diese Reaktion zur Veresterung von Säuren zu führen pflegt, und außerdem in Anbetracht der Färbungsergebnisse von

1) Habilitationsschrift, Straßburg 1899.

Suida¹⁾. Der Erfolg des Versuches scheint unsere Ueberlegung zu rechtfertigen, doch besteht andererseits eine Schwierigkeit darin, daß der Vorgang, der bei der Einwirkung von alkoholischen Säuren auf Eiweiß stattfindet, nicht genügend studiert und daher in chemischer Beziehung nicht aufgeklärt ist. Eine einfache Säurewirkung kann in unserem Falle deshalb nicht vorliegen, weil wir durch wässerige Säuren eine ähnliche Veränderung wie durch alkoholische nicht erzielen konnten (vgl. Suida). Der Beweis für das nach der Art der Reaktion wahrscheinliche Stattfinden einer Esterbildung oder Alkoxylierung überhaupt ist aber nicht geliefert, und Suida hält es für möglich, da durch die Behandlung der Schafwolle mit alkoholischer Säure eine Anhydrisierung eintrete. Auch ein solcher Vorgang könnte übrigens zur Inaktivierung salzbildender Gruppen führen.

Jedenfalls wird bei der Reaktion Säure fest gebunden, und wir fanden, daß auch nach der Behandlung mit einer warmen Lösung von Ammoniumkarbonat das Präparat (A) noch mehr Schwefelsäure enthält als das unveränderte Serumeiweiß. Ob eine nach vorläufigen Analysen eintretende geringe Abnahme (1—2 Proz.) des C- und N-Gehaltes der Aufnahme von Säure quantitativ entspricht, bleibt noch sicherzustellen.

Abgesehen von der noch unentschiedenen Frage der chemischen Beschaffenheit des mit alkoholischer Säure behandelten Eiweißes lehren unsere Versuche, daß eine sehr hochgradige Zerstörung der Artspezifität durch eine Reaktion erfolgen kann, die keinen Abbau bedingt und wahrscheinlich nur einzelne Gruppen des Moleküls modifiziert.

Daß bei dieser Reaktion aromatische Kerne des Eiweißes substituiert werden, wie in den Versuchen von Obermayer und Pick, ist nicht anzunehmen, so daß in einer derartigen Substitution nicht mehr eine notwendige Bedingung für die Aufhebung der Artspezifität des Eiweißes zu sehen sein wird. Eine besondere Bedeutung der aromatischen Kerne für die Antigeneigenschaft ist dessenungeachtet sehr wohl möglich²⁾.

Aehnlich wie aus den Versuchen von Obermayer und Pick geht aus unseren Resultaten hervor, daß Antigene bei

1) Sitzungsber. k. k. Akad. d. Wissensch. in Wien, Bd. 114 II b, Januar, Mai 1905; Bd. 115, Januar, Oktober 1906.

2) Vgl. Landsteiner, Wiener klin. Wochenschr., 1909, No. 47; Wells (cf. Vaughan).

offenbar gleicher oder sehr nahestehender Beschaffenheit ihrer Spaltprodukte serologisch ganz verschieden reagieren (natives Pferdeeiweiß und mit alkoholischer Säure behandeltes Eiweiß vom Pferd) und trotz eines differenten Aufbaues aus Amidosäuren ein ähnliches Verhalten haben können (S. Eiweiß aus Pferdeserum und aus Edestin). Zu einer ähnlichen Folgerung kamen vor kurzem bei einer sorgfältigen Untersuchung verschiedener Pflanzeneiweißkörper mit Hilfe der Anaphylaxie-reaktion Wells und Osborne¹⁾.

Wie schon Pick erwähnt, lassen die Ergebnisse der künstlichen Beeinflussung der Artspezifität daran denken, daß auch im Tierkörper die Aufhebung der Arteigenschaft eingeführten fremdartigen Eiweißes auf andere Weise herbeigeführt werden könnte, als durch vollständige Zerlegung desselben in seine Spaltprodukte und darauf folgende Synthese. Für das Verständnis des Vorkommens artunspezifischer Substanzen (Linse, Keratin) im tierischen Organismus ist durch die mitgeteilten Resultate vielleicht ein Anhaltspunkt gegeben.

Zusammenfassung.

1) Es werden quantitative Ergebnisse über die Spezifität von Präzipitinreaktionen mit verschiedenartig veränderten Eiweißkörpern (Xanthoprotein, Diazoeiweiß etc.) mitgeteilt.

2) Es wird ein neues, einfaches Verfahren (Behandlung mit alkoholischen Säuren) angegeben, wodurch es gelingt, einen weitgehenden Verlust der Artspezifität des Eiweißes herbeizuführen. Ein mit derart verändertem Pferdeeiweiß hergestelltes Kaninchenimmunserum reagiert mit analog modifiziertem Serumeiweiß verschiedener Tierarten (Rind, Mensch, Huhn, Kaninchen) und selbst mit Pflanzeneiweiß, aber nicht mit unverändertem Pferdeeiweiß unter Komplementbindung. Es gibt demnach und nach früheren Ergebnissen serologische Eiweißreaktionen, deren Spezifität von der Beschaffenheit der Spaltprodukte des Eiweißes bemerkenswert unabhängig ist.

Bei künstlich herbeigeführter Strukturspezifität zeigt sich in den bisher untersuchten Fällen ein entgegengesetztes Verhalten der Struktur- und der Artspezifität, indem diese um so mehr abnimmt, je ausgeprägter die andere ist.

1) Journ. of infect. Dis., Vol. 12, 1913, p. 341.

Nachdruck verboten.

[Aus dem bakt. Institut von Gabritschewsky an der Universität zu Moskau (Direktor: Priv.-Dozent W. J. Kedrowsky).]

Ueber die Fähigkeit des Serums normaler Kaninchen, das Komplement mit bakteriellen Antigenen zu binden.

Von Dr. med. u. phil. J. L. Kritschewsky,
Assistenten am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. Oktober 1913.)

In unserer gemeinsamen Arbeit mit Dr. O. G. Birger (7) haben wir darauf hingewiesen, daß es gelingt, bei der Anwendung steigender Serummengen bei Leprakranken bakterielle Antikörper mit Hilfe der Reaktion der Komplementablenkung in denjenigen Fällen zu konstatieren, wo deren Menge eine so geringe ist, daß sie in den gewöhnlich zur Anwendung kommenden Serummengen nicht entdeckt werden können. In Anbetracht der großen praktischen Bedeutung der uns interessierenden Frage haben wir uns zur Aufgabe gestellt, auf experimentellem Wege die Methodik der Anwendung großer Serumdosen für die Reaktion von Bordet-Gengou auszuarbeiten.

Es sollten zu diesem Zweck Kaninchen mit so geringen Bakterienmengen immunisiert werden, daß es möglich wäre, die Antikörper nur in großen Serumdosen zu entdecken (nicht mehr als 1 ccm) oder bei der Immunisierung mit großen Mengen der bakteriellen Masse die Immunkörper in großen Serumquanten zu konstatieren, und zwar zu einer Zeit, wo es noch unmöglich ist, die Anwesenheit derselben in kleinen Serummengen festzustellen.

Bevor wir zu unseren Versuchen in der oben genannten Richtung schritten, war es unumgänglich, notwendig aufzuklären, ob das Kaninchenserum bei denjenigen Individuen und in denjenigen Dosen, mit denen man voraussichtlich experimentieren wollte, die Fähigkeit besitzt, auch ohne vorausgegangene Immunisation das Komplement in Gegenwart dieser oder jener bakterieller Antigene zu binden.

Eine ganze Reihe von Autoren konstatierten, daß das Serum verschiedener Tiere und besonders das Kaninchenserum eine positive Wassermannsche Reaktion gibt.

L. Michaelis [1907] (10) weist darauf hin, daß eins seiner normalen Kaninchen eine Wassermannsche Reaktion ergeben hatte. Ueber denselben Befund berichten Landsteiner, Müller und Pätzl [1907] (8); bei diesen Autoren fiel die Wassermannsche Reaktion von 23 normalen Kaninchen in 13 Fällen negativ, in 8 schwach und in 2 stark positiv aus. Fleischmann [1908] (3) benutzte als Antigene wässrige und Alkohol-extrakte aus syphilitischer Leber, Alkoholextrakte aus der Leber gesunder Menschen, sowie auch Lecithine, Cholesterine und Vaseline und erhielt bei 7 Kaninchen einen positiven Wassermann. Drei mit Sera immunisierte Kaninchen des Autors ergaben ebenfalls positive Wassermannsche Reaktion, und Fleischmann ist der Meinung, daß die Immunisation einen günstigen Einfluß auf die nicht spezifische Reaktion ausübt. Blumenthal [1908 und 1911] (1) bestätigt die oben angeführten Befunde und weist darauf hin, daß die Fähigkeit des Serums eines und desselben Kaninchens das Komplement mit den Antigenen, die für die Wassermannsche Reaktion benutzt werden, zu binden, eine nicht beständige ist; bei der einen Untersuchung erhält man positive Wassermannsche Reaktion, die zweite Untersuchung einer anderen von demselben Tier stammenden Dosis, kann schon ein negatives Resultat ergeben. Den positiven Ausfall der Wassermannschen Reaktion bei normalen Kaninchen erklärt Blumenthal durch die Coccidiosis derselben, was auch durch die Sektion der Tiere, bei welchen eine positive Wassermannsche Reaktion erhalten wurde, bestätigt werden konnte. Auf Grund seiner Versuche hält der Autor die Wassermannsche Reaktion bei spezifizierten Kaninchen nur dann für spezifisch, wenn das Serum in einer Menge genommen wird, welche dem $\frac{1}{4}$ der gewöhnlichen Dosis entspricht, das Antigen aber nur der Hälfte des Titers, da bei derartigen Bedingungen die Wassermannsche Reaktion bei normalen Kaninchen ausbleibt; bei gewöhnlichen Bedingungen der Aufstellung der Wassermannschen Reaktion fiel letztere bei normalen Kaninchen sogar mit 0,005 Serum positiv aus. Schilling und v. Hoesslin [1908] (11) erhielten die Wassermannsche Reaktion bei 5 normalen Kaninchen mit 0,2 und 0,3 Serum, bei einem derselben sogar mit 0,1. Als Antigene kamen Alkoholextrakte aus Lebern verschiedenen Ursprungs zur Anwendung. Levaditi und Yamanouchi (zit. nach Schilling und v. Hoesslin) fanden ebenfalls, daß das Kaninchenserum sogar in Dosen von 0,05 eine positive Wassermannsche Reaktion ergibt. Manwaring [1909] (9) erhielt Komplementablenkung mit dem aktiven Serum normaler Kaninchen, Pferde und Ziegen; als Antigene dienten ihm das Lecithin, Leberextrakte, Glykokol, Malzextrakt, Milch, Zymase von Buchner, Pepsin, Labferment, Agar, Pepton, Speichel, Tuberkulin. Was die inaktivierten Sera anbelangt, so erhielt man Komplementablenkung nur mit dem Ziegenserum, das Pferde- und Rinderserum verloren nach der Inaktivierung ihre Fähigkeit, das Komplement mit den oben angeführten Antigenen zu binden. In Anbetracht dieser Befunde spricht sich der Autor dahin aus, daß die Fähigkeit des Serums, das Komplement abzulenken oder das Fehlen dieser Fähigkeit mit der Anwesenheit oder dem Fehlen des Komplements in dem betreffenden Serum nicht assoziiert werden darf.

Friedemann [1910] (4) konnte auch die Komplementbindungsfähigkeit bei der Wassermannschen Reaktion beim Hammel, bei der Ziege und beim Hunde konstatieren, obgleich nicht in dem Grade, wie bei Kaninchen; als Antigen benutzte er das Alkoholextrakt aus syphilitischer Leber und das Antigen von Sachs-Rondoni. Indem der Autor auf die Ursachen der erwähnten Fähigkeit der Sera näher eingeht, spricht er sich dahin aus, daß alle Sera Reagine enthalten, welche die Eigenschaft besitzen, das Komplement in Gegenwart der bei der Wassermannschen Reaktion zur Anwendung kommenden Antigene zu binden; in den Sera anderer Tiere werden sie durch Substanzen paralysiert, die die Wassermannsche Reaktion hemmen. Browning und M'Kenzie [1911] (2) bestätigen die von den zitierten Autoren beschriebene Fähigkeit normaler Kaninchen, die Wassermannsche Reaktion zu geben; um diese Reaktion bei infizierten Kaninchen als spezifisch anzuerkennen, halten die Autoren das negative Resultat bei vorläufiger (vor der Infektion) Prüfung des Kaninchenserums, auf dessen Fähigkeit das Komplement zu binden, für genügend. Halberstaedter [1911] (5) aber, sich auf die Tatsache stützend, daß die aktiven Kaninchensera seinen Untersuchungen nach die Wassermannsche Reaktion, im Gegensatz zu den inaktivierten Sera, sehr selten geben, hält bei den infizierten Tieren nur diejenige Reaktion für spezifisch, die mit dem aktiven Serum ausgeführt wurde. v. Hellens [1913] (6) bestätigt in seiner auf verhältnismäßig großem Material basierenden, ausführlichen Arbeit das Faktum, daß die normalen Kaninchensera die Wassermannsche Reaktion geben; diese Fähigkeit besitzen sowohl die aktiven als auch die inaktivierten Sera der Tiere. Dabei spricht Verfasser mit Browning und M'Kenzie die Vermutung aus und liefert für dieselbe auf experimentellem Wege den Beweis, daß die verhältnismäßig seltene Eigenschaft aktiver Sera die Hämolyse in Gegenwart der Antigene, die bei der Wassermannschen Reaktion benutzt werden, zu hemmen, durch die Anwesenheit des Komplements in solchen Sera, oder besser gesagt, durch denjenigen Ueberschuß an Komplement bedingt wird, welcher zustande kommt infolge der Anwesenheit sowohl des Komplementes des Meerschweinchens als auch des Komplements im Serum desjenigen Tieres, welches für den Versuch genommen wird. Auf Grund von zwei Versuchen weist Verfasser darauf hin, daß bei wiederholter Untersuchung eines und desselben Serums zu verschiedener Zeit verschiedene Resultate erhalten werden.

Schon unsere ersten Versuche ergaben, daß die Kaninchensera die Fähigkeit besitzen, das Komplement auch in Gegenwart wässriger bakterieller Antigene zu binden, und zwar nicht nur in denjenigen Mengen, die für die Aufklärung der gestellten Frage benutzt werden mußten, sondern auch in den Serumdosen, welche gewöhnlich bei der Reaktion der Komplementablenkung zur Anwendung kommen. Im Hinblick auf diese Befunde war es klar, daß wir bei unserer Arbeit Kaninchen nicht benutzen konnten; nichtsdestoweniger bot

die Frage genügendes Interesse, um weiter ausgearbeitet zu werden.

Wir blieben bei der Herstellung der Antigene auf vier bakteriellen Formen stehen: Gonococcus, Bac. typhi abdominalis, Vibrio cholerae asiatica und das säurefeste Bakterium, das von Kedrowsky bei einem Leprafall isoliert worden war¹⁾. Alle Antigene wurden folgendermaßen gewonnen:

Die Kulturen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen (zu 2,5 ccm auf jedes Reagenzglas) und die von einer gewissen Anzahl von Reagenzgläschen erhaltene Aufschwemmung einem 5-fachen Gefrieren und Auftauen (bei 37°) unterzogen; darauf folgte eine 24-stündige Einwirkung der Temperatur von 60° und Bearbeitung im Schüttelapparat im Laufe von 2mal 24 Stunden; nach dem Zentrifugieren wurde die klare Flüssigkeit abgesogen und im dunklen Eiskeller aufbewahrt. Als Titer des Antigens diente dieselbe Dosis, deren doppelte Menge schon an und für sich keine Spur von Hemmung gab; der Titer wurde periodisch bei jedem Versuch kontrolliert.

Das Kaninchenserum wurde auf dem Wege der Blutgewinnung aus der Ohrvene erhalten; jeder Versuch wurde sowohl mit dem aktiven als auch inaktiviertem Serum des Tieres ausgeführt, wobei dasselbe in Dosen von 0,01, 0,02, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6 und 0,8 zur Anwendung kam. In denjenigen Fällen, wo das Serum nicht in großen Mengen gewonnen werden konnte, wurde der Versuch mit großen Dosen nicht angestellt. Die Menge des Komplements war stets um 0,01 größer als diejenige Dosis desselben, welche bei der vor dem Versuch selbst angestellten Prüfung für die Lösung eines Kubikzentimeters einer 5-proz. Aufschwemmung von roten Hammelblutkörperchen in Gegenwart einer im Vergleich zum Titer 3-fachen Menge des hämolytischen Serums nötig war. Sowohl der Versuch als auch die Titrierung des Komplements des Meerschweinchens wurde in 5 ccm der Gesamtmenge der Flüssigkeit ausgeführt. Vor und nach dem Zusatz des hämolytischen Systems befanden sich die Reagenzgläschen bei 37° im Laufe 1 Stunde. Die Resultate des Versuches wurden nach 18—20-stündiger Aufbewahrung der Gläschen im Eiskeller abgelesen.

In den nächstfolgenden Tabellen sind die Versuche nur mit denjenigen Sera angegeben, die an und für sich keine Hemmung der Hämolyse hervorriefen; zur Aufklärung dieser Eigenschaft benutzten wir drei Dosen (0,02, 0,2 und eine maximale Dosis) des Serums aus den beim betreffenden Versuche gewonnenen.

Für die Bezeichnung des Hemmungsgrades bei der Hämolyse bedienten wir uns folgender Zeichen: ###, +++, ++ und +; vollkommene Hämolyse wurde mit — notiert.

1) Nur ein von Dr. Birger mitgeteilter Versuch wurde mit dem Antigen aus dem B. tuberculosis hominis ausgeführt.

Tabelle
Versuche mit

No. des Kaninchens	Zeit des Versuches	Gonococcusantigen							Typhusantigen						
		Serummengenge							Serummengenge						
		0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
66	7. XII.	—	+	###	###	###	###	+++
65	11. XII.	—	—	+++	+++	+++	++	+
65	12. XII.	—	—	—	—	—	—	—
65	17. XII.	—	—	+++	+++	+++	++	—
29	11. XII.	—	—	##	###	###	###	###	—	—	###	###	###	###	.
29	12. XII.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.
88	12. XII.	—	—	++	++	++	+	—
50	17. XII.	—	—	###	###	###	+++	+++
50	11. III.	—	—	—	—	—	—	—
50	27. III.
95	18. I.	—	—	++	++	++	++	++
95	21. II.	—	—	+	+	+	+	+
95	24. II.	—	—	+	+	—	—	—
68	18. I.	—	+	+++	+++	+++	+++	+++	—	+	+++	+++	+++	+++	+++
47	1. II.	—	—	###	###	###	###	###	—	—	###	###	###	###	###
14	7. II.	—	—	###	###	###	###	###	—	—	###	###	###	###	###
30 ¹⁾	8. XI.	+++	###	—	—	—
31 ¹⁾	8. XI.
16	14. II.	—	—	+	+	++	++	++
16	19. II.
26	21. II.	—	—	+	+	—	—	—
2	19. III.	—	—	—	—	—	—	—
2	27. III.
3	12. III.	—	—	—	—
3	27. III.
9	14. III.
9	27. III.
33	14. III.
33	27. III.
82	14. III.
82	27. III.
11	29. III.	—	—	+++	+++	++	++	+
13	2. VI.
13	8. VI.	—	—	+	++	.	.	.
28	3. VI.	—	—	+	++
28	8. IV.	—	—	—	—	.	.	.
7	28. VI.	—	—	—	—	.	.	.	—	—	—	—	.	.	.
21	28. VI.	—	—	—	—	.	.	.	—	—	—	—	.	.	.
38	2. V.	—	—	—	—
48	8. V.	—	—	++	++	.	.	.	—	—	++	++	.	.	.
15	8. V.	—	—	—	—	.	.	.	—	—	—	—	.	.	.
4	9. V.	—	—	++	+++	+++	++	+

1) Die Versuche sind von Dr. Birger mitgeteilt. — 2) Indem wir von einer neuen Rubrik Protokoll desselben in der letzten Rubrik wieder.

Tabelle II.

No. des Kaninchens	Zeit des Versuches	Gonococcusantigen							Typhusantigen						
		Serummenge							Serummenge						
		0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
95	21. II.	—	—	+	—	—	—	—
68	18. I.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
47	1. II.
14	7. II.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
16	14. II.
16	19. II.
26	21. II.
2	11. III.	—	—	—	—	—	—	—
2	27. III.
3	12. III.
3	27. III.
9	14. III.
9	27. III.
33	14. III.
33	27. III.
82	14. III.
82	27. III.
11	29. III.	—	—	—	—	—	—
13	2. IV.
13	8. IV.	—	—	+	++
28	3. IV.	—	—	—	—	—	—
28	8. IV.
7	28. V.	—	—	—	—	.	.	.	—	—	—	—	.	.	.
21	28. IV.	—	—	—	—	.	.	.	—	—	—	—	.	.	.
10	2. V.	—	—	—	—
48	8. V.	—	—	+	—
15	8. V.	—	—	—	—	.	.	.	—	—	—	—	.	.	.
4	9. V.	—	—	—	—	—	—	—

Kaninchen No. 66 (7. XII.), 65 (11. XII.), 65 (12. XII.), 65 (17. XII.), 50 (27. III.), 95 (18. I.) negativ.

Die Versuche mit inaktivierten Sera waren bei 27 Kaninchen (Tabelle I) angestellt, wobei bei 12 Tieren das Serum mehr wie einmal genommen wurde, so daß im ganzen 42 Versuche ausgeführt wurden.

Mit aktiven Sera sind 39 Versuche bei 25 Tieren (Tabelle II) angestellt worden. Bei jedem Kaninchen (mit Ausnahme des Kaninchens No. 95 vom 24. II.) wurde die Reaktion der Komplementablenkung gleichzeitig mit inaktiviertem und aktivem Serum, und zwar nicht weniger als mit zwei Antigenen aufgestellt (mit Ausnahme von No. 30, 31 und 16 vom 19. II. mit inaktivierten Sera und No. 2 vom 27. III., No. 9 vom

Versuche mit aktiven Sera.

Choleraantigen							Antigen aus säurefesten Bakterien von Kedrowsky						
Serummeng							Serummeng						
0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
-	-	+	-	-	-	-
.
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.	.	+	+	++	++	++	-	-	+	+	++	++	++
-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
.	-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	-	++	+	-	.	.	-	-	++	+	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	-	-	-	.	.	-	-	-	-	-	.	.
-	-	+	-	.	.	.	-	-	.	.	-	.	.
-	-	++	++	.	.	.	-	-	++	++	.	.	.
-	-	+	++
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	-	-
-	-	+	-
.

29 (11. XII.), 29 (12. XII.), 88 (12. XII.), 50 (17. XII.), 50 (11. III.),

27. III., No. 82, 11 und 4 mit aktiven Sera, wo die Versuche nur mit einem Antigen ausgeführt wurden).

Bei der Durchsicht der Tabellen I und II können wir die Tatsache konstatieren, daß die Reaktion der Komplementablenkung mit dem Serum normaler Kaninchen in jedem einzelnen Fall in Gegenwart verschiedener bakterieller Antigene vollkommen gleich verläuft.

Was den Einfluß der Serummengen auf die Resultate der Reaktion von Bordet-Gengou anbelangt, so geht aus unseren Versuchen hervor, daß die Dosis von 0,01 ccm Serum in keinem einzigen Falle die Hemmung der Hämolyse hervor-

Generated on 2019-01-12 23:54 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uc1.b3208393 Public Domain in the United States; Google-digitized / http://www.hathitrust.org/access_use#pd-us-google

gerufen hatte, während 0,02 ccm die Hemmung derselben nur in 2 Fällen bedingt hatte (Tabelle I, No. 66 und 68). Die Steigerung des Hemmungsgrades der Hämolyse mit der Vergrößerung der Serummenge konnte unter den inaktivierten Sera in 6 Fällen konstatiert werden (No. 30, 31 und 16 vom 14. II., No. 13 vom 8. IV., No. 28 vom 3. IV. und No. 4), wobei als Grenze dieser Steigerung am häufigsten die Dosis von 0,2 diente und in keinem Fall eine höhere als 0,4 ccm. Wenn man diejenigen Versuche ausschaltet, wo die Reaktion der Komplementablenkung mit höheren Dosen des inaktivierten Serums nicht ausgeführt wurde, so erweist es sich, daß das Maximum von 0,2 oder 0,4 sich noch in bestimmten Dosen aufrecht erhält; in größeren Mengen desselben Serums aber konstatiert man schon häufig eine Verringerung des Hemmungsgrades der Hämolyse. Beim Studium der Versuche mit aktiven Sera normaler Kaninchen (Tabelle II) sieht man, daß mit der Steigerung der Serummenge sich in der Mehrzahl der Fälle die beobachtete Hemmung der Hämolyse verringerte oder durch vollständige Hämolyse ersetzt wurde (No. 95 vom 21. II., No. 16 vom 19. II., No. 26 und 3 vom 27. III und No. 48). In zwei Sera (No. 16 vom 14. II. und No. 13 vom 8. IV.) verstärkte sich die Intensität der Hemmung mit der Steigerung der Dosis.

Wie aus den Tabellen I und II zu ersehen ist, rufen die inaktivierten Sera normaler Kaninchen in Gegenwart von wässerigen bakteriellen Antigenen eine Hemmung der Hämolyse bei weitem häufiger hervor als die aktiven Sera; diese Befunde sind in der Tabelle III rubriziert.

Tabelle III.

	Inaktiviertes Serum		Aktiviertes Serum	
	Anzahl der Versuche	Prozentsatz der Versuche	Anzahl der Versuche	Prozentsatz der Versuche
Hemmung der Hämolyse	27	64,29 Proz.	8	20,51 Proz.
Fehlen der Hemmung der Hämolyse	15	35,71 Proz.	31	79,49 Proz.

Wie aus der Tabelle I hervorgeht, wurde das Blut bei 12 Tieren wiederholt zwecks Aufklärung der Frage entnommen,

wie die Reaktion der Komplementablenkung mit den Sera desselben Tieres, aber zu verschiedenen Zeiten gewonnenen verläuft. Eine vollkommene Identität der Versuche mit dem Serum eines und desselben Tieres konnte in einem Falle (No. 2) beobachtet werden, und zwar dort, wo weder beim ersten noch beim zweiten Mal die Hemmung der Hämolyse konstatiert wurde; in den Fällen aber, wo die Hemmung auftrat, kam bei wiederholten Versuchen ein gleicher Intensitätsgrad desselben kein einziges Mal zur Beobachtung. Bei 7 Tieren wechselte die Hemmung der Hämolyse bei wiederholter Untersuchung mit einer vollständigen Hämolyse ab (No. 65, 29, 50, 9, 33 und 28) oder umgekehrt (No. 3). Mit den Sera von 3 Tieren wurde eine dreifache Untersuchung ausgeführt, wobei das Serum No. 95 jedesmal eine Hemmung der Hämolyse verschiedenen Grades ergab; beim Serum No. 65 wurde die Hemmung durch eine vollständige Hämolyse ersetzt, bei der dritten Untersuchung aber trat die Hemmung wieder auf; das Serum des Kaninchens No. 50 rief einmal die Hemmung hervor, bei den zwei nächstfolgenden Untersuchungen trat vollständige Hämolyse auf.

Mit aktiven Sera beobachtete man in zwei Fällen eine Inkongruenz der Resultate bei wiederholter Untersuchung, wobei die Hämolyse mit deren Hemmung (No. 95) abwechselte oder umgekehrt (No. 3). In den übrigen 10 Fällen bestand eine vollkommene Identität der Resultate, sowohl in den Versuchen, wo es immer zur Hämolyse kam (No. 65, 29, 50, 2, 9, 33, 82, 28), als auch dort, wo eine Hemmung derselben auftrat (No. 16 und 13).

Die Anwesenheit der Hemmung der Hämolyse mit aktiven Sera entspricht immer den Versuchen mit inaktivierten Sera; in 5 Fällen ist diese Kongruenz eine vollständige (No. 16 vom 14. II., No. 16 vom 19. II., No. 3 und 13 vom 2. IV. und No. 13 vom 8. IV.); in 3 Versuchen hörte die Hemmung der Hämolyse mit aktiven Sera mit der Dosis 0,1 auf, während sie bei den inaktivierten Sera weiter bestand, und zwar mit höheren Dosen (No. 95, 26 und 48).

Die von uns erhaltenen Resultate berechtigen zu der Annahme, daß die Kaninchensera die Fähigkeit besitzen, das

Komplement nicht nur mit Antigenen zu binden, die bei der Wassermannschen Reaktion angewandt werden, worauf die oben zitierten Autoren hinweisen, sondern auch mit wässerigen Antigenen bakterieller Natur; diese Tatsache bestätigen auch die Befunde von Manwaring hinsichtlich der Fähigkeit der Tiersera, das Komplement mit dem Tuberkulin und der Zymase zu binden. Dabei beobachtet man die Fähigkeit, das Komplement zu binden, bei inaktivierten Sera bei weitem häufiger als bei den aktiven; unsere Befunde über die Fähigkeit aktiver Sera, das Komplement zu binden, decken sich mit denjenigen von Manwaring und v. Hellens. Wie aus dem oben Erwähnten hervorgeht, ist die Fähigkeit der Kaninchensera, das Komplement mit bakteriellen Antigenen zu binden, ebenso unbeständig wie auch deren Eigenschaft, die Wassermannsche Reaktion zu geben (Blumenthal, v. Hellens). Auf Grund des oben Gesagten wird es klar, daß es absolut unmöglich ist, für die Anerkennung der Spezifität sowohl der Reaktion von Bordet-Gengou als der Wassermannschen Reaktion bei immunisierten oder infizierten Kaninchen das aktive Serum anzuwenden, wie es Halberstaedter vorschlägt, oder das negative Resultat der Reaktion der Komplementablenkung vor dem Versuch für genügend zu halten, wie dies Browning und M'Kenzie tun. In unseren Versuchen ergab das inaktivierte Serum in der Menge von 0,01 niemals Komplementbindung, und falls diese Befunde sich an einem größeren Material bestätigen würden, hätten wir es für möglich gehalten, die Reaktion mit 0,01 Serum sogar in Gegenwart eines vollen Titors des Antigens für spezifisch anzuerkennen.

Was ist die Ursache des positiven Resultats der Reaktion von Bordet-Gengou mit den Sera normaler Kaninchen? Vom Standpunkt der Ehrlichschen Theorie aus könnte man die Anwesenheit im Kaninchenserum normaler Antigene gegenüber denjenigen bakteriellen Organismen voraussetzen, die in der vorliegenden Untersuchung zur Anwendung kamen. Allein gegen diese Annahme spricht eine ganze Reihe von Tatsachen. In sämtlichen Fällen verlief die Reaktion der Komplementbindung in Gegenwart verschiedener bakterieller Antigene absolut gleich; das Fehlen der Hemmung der Hämolyse mit

irgendeinem Antigen wurde von demselben Effekt mit anderen Antigenen gefolgt; dasselbe wiederholte sich auch in Fällen mit der Hemmung der Hämolyse, wobei die Identität der Resultate sich bis zur vollkommenen Gleichheit im Grade der Hemmung erstreckte; es ist wohl kaum möglich, eine derartige Gleichmäßigkeit im Gehalt der Antikörper in bezug auf die verschiedensten bakteriellen Formen (Kokken, Bacillen, Vibrionen, säurefeste Bakterien) anzunehmen. Das beinahe vollständige Fehlen der Identität in den Resultaten bei der Reaktion von Bordet-Gengou bei wiederholten Untersuchungen eines und desselben Serums, obgleich auch der zweite Versuch am folgenden Tage ausgeführt wurde, spricht ebenfalls gegen die Anwesenheit von normalen Rezeptoren in bezug auf die Versuchsantigene, da man eine derartige Schwankung, bis zum Schwinden inklusive, von seiten normaler Rezeptoren wohl schwer annehmen kann, denen nach der Ehrlichschen Theorie eine so wichtige und beständige Rolle in der Oekonomie der Zelle zukommt. Hand in Hand mit der Steigerung der im Versuch Anteil nehmenden Serummenge muß auch eine Steigerung der in demselben enthaltenen Antikörper gehen, als auch der Intensitätsgrad der Hemmung der Hämolyse; in unseren Versuchen aber stieg die Intensität der Hemmung nur bis zur Dosis 0,2 oder 0,4 (inklusive); die weitere Vergrößerung der Serummenge konnte keinen Einfluß mehr auf die Steigerung der Hemmung ausüben, und dieselbe blieb im besten Falle konstant oder verringerte sich in ihrer Intensität — eine Tatsache, die in gleichem Maße gegen die Annahme der Anwesenheit normaler Antikörper gegenüber unseren Antigenen als eines Grundes des positiven Ausfalls der Reaktion der Komplementbindung mit den Sera normaler Kaninchen spricht. Neben diesen Erwägungen möchten wir noch ein Protokoll der Versuche mit zwei Sera der Kaninchen No. 13 und 48 anführen; sämtliche Versuche mit jedem einzelnen Serum wurden gleichzeitig ausgeführt; als Antigene dienten: *Vibrio cholerae asiaticae* und säurefeste Bakterien von Kedrowsky; dabei wurde neben der gewöhnlichen Versuchsanordnung die Reaktion der Komplementablenkung auch mit dem Serum ausgeführt, welches sich im Kontakt mit dem

dem Antigen entsprechenden Mikroorganismus befand¹⁾, zwecks Entfernung aus dem Serum der normalen Antikörper (in bezug auf denselben, falls sich solche darin finden sollten). Wie aus der Tabelle IV hervorgeht, beseitigt die Berührung des

Tabelle IV.

	Kaninchen No. 13 (2. IV.)				Kaninchen No. 48 (8. V.)			
	Antigen aus dem Cholera-vibrio		Antigen aus dem Bakter. Kedrowsky		Antigen aus dem Cholera-vibrio		Antigen aus dem Bakter. Kedrowsky	
	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2
Inakt. Serum	++	++	++	++	++	++	++	++
Inakt. Serum, das mit dem Cholera-vibrio in Berührung war	++	++	++	++	++	++	++	++
Inakt. Serum, das mit dem Bakter. von Kedrowsky in Berührung war	++	++	++	++	++	++	++	++

Serums mit dem Organismus die Hemmung der Hämolyse mit dem entsprechenden Antigen nicht und verändert die Intensität derselben ebenfalls nicht; derselbe Hemmungsgrad, welcher bei der gewöhnlichen Ausführung der Reaktion beobachtet wird, und zwar auch mit dem Antigen aus einem anderen Mikroorganismus als aus dem, welcher sich in Berührung mit dem Serum befand, findet auch mit dem Antigen aus demjenigen Mikroorganismus statt, welcher, sich in Berührung mit dem Serum befindend, die Antikörper binden mußte. Aus dieser Tatsache kann man den Schluß ziehen, daß normale Rezeptoren in bezug auf die betreffenden Bakterien im Kaninchenserum fehlen; die Anwesenheit des Phänomens der Komplementbindung aber kann nicht vom Standpunkte der Ehrlichschen Theorie aus erklärt werden.

1) Das Serum wurde entweder mit dem Cholera-vibrio oder mit dem Bakterium von Kedrowsky aufgeschüttelt (auf 1 ccm Serum kamen 5 Normalösen) und auf 1 Stunde in den Brutschrank bei 37° gestellt; darauf wurde die Aufschwemmung der Bakterien im Serum zentrifugiert und das klare Serum nach Wiederholung derselben Manipulation für den Versuch angewandt.

Das positive Resultat der Reaktion von Bordet-Gengou mit den Sera normaler Kaninchen mit den oben angeführten Befunden kann im Rahmen der physikalisch-chemischen Erscheinung der Adsorption erklärt werden; der Komplex des Antigens mit diesen oder jenen Substanzen des Serums adsorbiert das Komplement und ruft damit die Hemmung der Hämolyse hervor. Das oben erwähnte Optimum der Reaktion der Komplementablenkung für normale Kaninchensera wird ebenfalls erklärt dadurch, daß man das Phänomen der Hemmung der Hämolyse als eine physikalisch-chemische Reaktion zwischen kolloidalen Substanzen betrachtet.

Ueber die Ursachen des Faktums, daß die aktiven Kaninchensera in einem bedeutend geringeren Prozentsatz der Fälle Komplementablenkung mit bakteriellen Antigenen als die inaktivierten geben, können wir uns aus Mangel an entsprechenden Versuchen nicht definitiv aussprechen; in 5 Fällen (No. 95, 16, 26, 3 und 48) konnten wir eine Verringerung oder vollständiges Ausbleiben der Hemmung der Hämolyse mit der Steigerung der Serummenge beobachten, eine Tatsache, die dafür spricht, daß der gesteigerte Gehalt des Komplements bei der Vergrößerung der Serumdosis die Hemmung entweder ganz aufheben oder die Intensität derselben abschwächen kann. Es erscheint uns vollständig natürlich, daß der Komplex von kolloidalen Substanzen nur eine bestimmte Menge des Komplements adsorbieren kann; dessen Ueberschuß aber, welcher frei geblieben ist, muß in diesem oder jenem Grade die Hämolyse hervorrufen. Diejenigen Versuche, wo man dieselben Resultate sogar in bezug auf den Intensitätsgrad der Hemmung der Hämolyse bei aktiven und inaktivierten Sera erhalten hatte, können mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit durch das Fehlen oder die geringe Menge des Komplements im Kaninchenserum erklärt werden, bei denen, wie bekannt, der Gehalt an Komplement großen Schwankungen unterworfen ist. Die Versuche von v. Hellens, wo die Anzahl der aktiven Sera, welche die Wassermannsche Reaktion geben, größer wurde, wenn die Gesamtmenge sowohl des Kaninchens als auch des Schweinekomplements dem festgestellten Titer genau entsprach, verwirklichen die Wahrscheinlichkeit dieser Vermutung.

Zusammenfassung.

1) Die Sera normaler Kaninchen besitzen die Fähigkeit, das Komplement mit wässrigen bakteriellen Antigenen zu binden.

2) Die inaktivierten Kaninchensera geben die Reaktion von Bordet-Gengou in einer weit größeren Anzahl der Fälle als die aktiven.

3) Das Serum eines und desselben Kaninchens, zu verschiedener Zeit demselben entnommen, gibt bei der Ausführung der Reaktion von Bordet-Gengou verschiedene Resultate.

4) 0,01 des inaktivierten Kaninchenserums hatte in keinem einzigen Falle die Hemmung der Hämolyse ergeben.

5) Die Anwesenheit der Reaktion von Bordet-Gengou mit den Seris normaler Kaninchen kann nicht durch die Gegenwart normaler Antikörper im Serum erklärt werden. Die Auffassung der Hemmung der Hämolyse als eine Folgeerscheinung des physikalisch-chemischen Phänomens der Adsorption des Komplements von seiten des Komplexes kolloider Substanzen erklärt zur Genüge die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde.

Literatur.

- 1) Blumenthal, Berl. klin. Wochenschr., 1908 u. 1911.
- 2) Browning and M'Kenzie, Journ. of Pathol. and Bacteriol., Vol. 15.
- 3) Fleischmann, Berl. klin. Wochenschr., 1908.
- 4) Friedemann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 67.
- 5) Halberstaedter, Berl. klin. Wochenschr., 1912.
- 6) v. Hellens, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 17.
- 7) Kritschewsky und Birger, Zeitschr. f. Hyg., 1913.
- 8) Landsteiner, Müller und Pätzl, Wien. klin. Wochenschr., 1907.
- 9) Manwaring, Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 3.
- 10) Michaelis, Berl. klin. Wochenschr., 1907.
- 11) Schilling und v. Hoesslin, Deutsche med. Wochenschr., 1908.

Es ist uns eine angenehme Pflicht, dem Direktor des Instituts, Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Kedrowsky, unseren herzlichsten Dank auszusprechen für seine Unterstützung und sein wohlwollendes Entgegenkommen bei der Ausführung unserer Arbeit.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut des Dr. Ph. Blumenthal in Moskau.]

Ueber die Entgiftung bakterieller Toxine durch Adrenalin.

Von

Priv.-Doz. Dr. S. Abramow und Dr. S. Mischennikow,
Prosektor des Kais. Peter I-Militär- Stabsarzt des 12. Welikolutzky-
hospitals zu Moskau. Infanterie-Regiments.

(Eingegangen bei der Redaktion am 14. Oktober 1913.)

Im Jahre 1912 veröffentlichte der eine von uns (Abramow) in dieser Zeitschrift einen Aufsatz über die Pathogenese der Diphtherie, in welchem nachgewiesen wurde, daß das Diphtherietoxin hauptsächlich ein Gift für die chromaffinen Zellen der Nebennieren darstellt. Nach diesen Erfahrungen war es nun ganz natürlich, an Versuche über die Neutralisierung des Diphtherietoxins in vitro durch Adrenalin heranzutreten.

Die ersten in dieser Richtung ausgeführten Versuche ergaben widerspruchsvolle Resultate. Deshalb unternahmen wir es, das Toxin durch ein Gemisch aus Adrenalin und Cholesterin zu neutralisieren, in dem Wunsche, auf diese Weise eine Substanz zu dem Versuche heranzuziehen, welche dem Sekret der Rindenschicht der Nebennieren nahe steht, deren Tätigkeit, wie wir feststellen konnten, unter dem Einflusse des Diphtherietoxins ebenfalls gesteigert wird. Die ersten Experimente ergaben aufmunternde Resultate, wie aus der Tabelle I erhellt.

Tabelle I. (Versuch vom 27. VI. 1912.)

Das Cholesterin wurde in einem Mörser mit 0,8-proz. Chlornatriumlösung im Verhältnis von 1:100 zu einer gleichmäßigen Emulsion verrieben. Diese Emulsion wurde mit käuflicher Lösung (1:1000) von Adrenalin Takamine und mit Diphtherietoxin¹⁾ gemischt, die Gemische sowie auch die Kontrolllösung des Toxins bis zu 2,5 Gesamtvolumen mit 0,8 Proz.

1) Wir benutzten das Testtoxin aus dem Institut von Dr. Ph. Blumenthal, dessen Dosis letalis minima 0,005 beträgt.

NaCl aufgefüllt, 1 Stunde in dem Schüttelapparat gelassen und es subkutan Meerschweinchen injiziert.

No. des Meer-schweinchens	Injiziert	Versuchs-ergebnis
1	Diphtherietoxin 0,05	† 2 $\frac{1}{2}$
2	{ Cholesterinemulsion 1,0 Adrenalin 1,0 Diphtherietoxin 0,05 }	lebt
3	{ Cholesterinemulsion 0,1 Adrenalin 1,0 Diphtherietoxin 0,05 }	† 3 $\frac{1}{2}$
4	{ Cholesterinemulsion 1,0 Adrenalin 0,1 Diphtherietoxin 0,05 }	† 2

Diese Ergebnisse veranlaßten uns, dem obenerwähnten Artikel bei der Korrektur die Anmerkung hinzuzufügen, daß es möglich sei, daß Diphtherietoxin durch ein Gemisch aus Adrenalin und Lipoiden unschädlich zu machen. Durch weitere Versuche konnten wir uns doch davon überzeugen, daß eine Neutralisierung des Toxins auch durch Adrenalin allein zu erzielen ist. Uns gelang häufig eine solche Neutralisierung bei der eben beschriebenen Versuchsanordnung. Als wir nämlich begannen, die Gemische nach dem Verweilen im Schüttelapparat für 30 Minuten in den Brutschrank bei 37° zu stellen, so blieben die mit dem Toxin-Adrenalingemisch behandelten Tiere nunmehr in der Regel am Leben. Zur Illustration dieser Versuche führen wir die Tabelle II an.

Tabelle II.

No. des Meer-schweinchens	Injiziert	Ergebnis des Versuchs v. 4. VII. 1912 (Anordnung wie in Tab. I)	Ergebnis d. Versuchs vom 5. VII. 1912 (Gemisch nach dem Schüttelapparat im Brutschr. 30' bei 37°)
1	Diphtherietoxin 0,05	† 2	† 2 $\frac{1}{2}$
2	{ Diphtherietoxin 0,05 Cholesterinemulsion 1,0 Adrenalin 1,0 }	lebt	lebt
3	{ Diphtherietoxin 0,05 Cholesterinemulsion 1,0 }	† 2	† 2 $\frac{1}{2}$
4	{ Diphtherietoxin 0,05 Adrenalin 1,0 }	lebt	lebt

Bei der Bewertung der Versuchsergebnisse war die Frage zu entscheiden, ob es sich hier in der Tat um eine in vitro vor sich gehende Neutralisierung des Toxins durch das Adrenalin handelt oder aber nur um eine Aenderung der Resorptionsverhältnisse im Unterhautzellgewebe unter dem Einflusse des Adrenalins. Diese Frage war leicht zu entscheiden, sobald man die subkutane Applikation der Gemische mit der intravenösen vertauschte. Leider gingen dabei sämtliche Meerschweinchen sofort nach Ausführung des Versuchs an Adrenalinvergiftung zugrunde. Deshalb waren wir genötigt, zu Experimenten an Kaninchen überzugehen. Aber auch diese mußten 2—3 Wochen lang durch präventive intravenöse Injektionen von steigenden Adrenalindosen für die Versuche vorbereitet werden. Die Resultate erhellen aus der Tabelle III.

Tabelle III. (Versuch vom 5. IX. 1912.)

Es wurde eine Cholesterinemulsion 1:100, käufliche Adrenalinlösung und Diphtherietoxin gemischt. Zu den Gemischen und der Kontrolllösung des Toxins setzte man bis zum gleichen Volumen 0,8-proz. NaCl-Lösung hinzu, stellte sie für 30 Minuten in den Schüttelapparat, sodann für 30 Minuten in den Brutschrank bei 37° und injizierte sie Kaninchen intravenös.

No. des Kaninchens	Injiziert	Versuchsergebnis
1	Diphtherietoxin 0,05	† 3
2	{ Diphtherietoxin 0,05 Cholesterinemulsion 1,0 Adrenalin 1,0 }	† 5
3	{ Diphtherietoxin 0,05 Adrenalin 1,0 }	† 5
4	{ Diphtherietoxin 0,05 Cholesterinemulsion 1,0 }	† 2½

Somit war bei der intravenösen Applikation der Gemische nicht eine vollständige Entgiftung des Toxins, sondern nur eine Abschwächung desselben zu bemerken, die zur Folge hatte, daß die Versuchskaninchen 2 Tage später als die Kontrolltiere zugrunde gingen. Man konnte daher wohl hoffen, daß bei länger dauernder Anrührung des Toxins mit dem Adrenalin eine vollständige Unschädlichmachung des ersteren zu erreichen sein würde. In der bezeichneten Richtung setzten wir

nach einer kurzen Unterbrechung die Versuche unter Mitarbeiterschaft von Herrn Dr. S. Mischennikow fort.

Unterdessen erschien eine Arbeit von Marie¹⁾, die das gleiche Thema behandelte. Marie experimentierte mit Tetanus- und Diphtherietoxin, daß er in vitro mit Adrenalin mischte; die Gemische hielt er 24 Stunden lang bei 37° und injizierte sie sodann subkutan. Die Tiere, die die Gemische erhielten, blieben am Leben, während die mit dem Toxin allein behandelten Kontrolltiere zugrunde gingen. Demgemäß erzielte Marie die gleichen Resultate wie wir bei der subkutanen Applikation, als wir die Gemische eine kürzere Zeit bei 37° aufbewahrten.

Den Prozeß der Entgiftung des Toxins stellt sich Marie als eine Art chemische Reaktion zwischen dem Toxin und dem Adrenalin vor, und zwar aus dem Grunde, weil er in Gemischen, die 24 Stunden lang bei 37° standen, keine Farbenreaktionen auf das Adrenalin mehr erzielen konnte.

Da die Frage, ob das Ergebnis der Versuche von einer wirklichen Neutralisierung des Toxins in vitro oder nur von einer Aenderung der Resorptionsverhältnisse im Unterhautzellgewebe infolge der Adrenalineinführung abhängt, durch die Arbeit von Marie ebensowenig entschieden war wie durch unsere eben angeführten Versuche, so beschlossen wir, sie in der angedeuteten Richtung fortzusetzen. Die Resultate, zu denen wir dabei kamen, erhellen aus der Tabelle IV.

Tabelle IV. (Versuch vom 28. VI. 1913.)

2 Kaninchen wurden 3 Wochen lang mit intravenösen Injektionen ansteigender Adrenalindosen vorbehandelt. Es wurden zwei Lösungen hergestellt: eine von Adrenalin mit Diphtherietoxin und eine andere von Diphtherietoxin mit 0,8-proz. NaCl. Sie wurden bis zum gleichen Volumen mit 0,8 Proz. NaCl aufgefüllt, in Glasampullen zugeschmolzen, 24 Stunden lang bei 37° gehalten und sodann Kaninchen intravenös injiziert.

No. des Kaninchens	Injiziert	Versuchsergebnis
77	{ Diphtherietoxin 0,05 } { Adrenalin 1,0 }	lebt
78	Diphtherietoxin 0,05	† 3

Das Versuchsergebnis ist ganz klar: 1,0 Adrenalin ist bei länger dauernder Berührung in vitro (24 Stunden lang bei

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Orig., Bd. 17.

37°) imstande, eine 10-fache tödliche Dosis von Diphtherietoxin zu entgiften.

Außerdem stellten wir analoge Versuche mit dem Tetanustoxin¹⁾ an. Die Gemische spritzten wir sowohl subkutan als auch intravenös ein. Im letzteren Falle wurden die Mäuse 2 Wochen lang mit subkutanen Injektionen von ansteigenden Adrenalindosen vorbehandelt. Die Versuchsergebnisse erhellen aus den Tabellen V und VI.

Tabelle V. (Versuch vom 26. VI. 1913.)

Die Gemische wurden bis zu einem Volumen von 1 ccm mit 0,8-proz. NaCl-Lösung verdünnt, in Glasampullen zugeschmolzen, 24 Stunden lang bei 37° gehalten und Mäusen subkutan eingespritzt.

No. der Maus	Injiziert	Versuchsergebnis
1	Tetanustoxin 0,00005	† 2
2	{Tetanustoxin 0,00005} {Adrenalin 0,05 }	lebt

Tabelle VI. (Versuch vom 28. VI. 1913.)

Die Gemische wurden in der Weise hergestellt, daß die zur Injektion erforderlichen Dosen in je 0,2 des Gemisches enthalten waren. Sodann wurden sie in Glasampullen zugeschmolzen, für 24 Stunden bei 37° gestellt und Mäusen in die Schwanzvene injiziert.

No. der Maus	Injiziert	Versuchsergebnis
1	{Tetanustoxin 0,00005} {Adrenalin 0,05 }	lebt
2	Tetanustoxin 0,00005	† 1½
3	{Tetanustoxin 0,0001} {Adrenalin 0,1 }	† 4
4	Tetanustoxin 0,0001	† 1½

Wie aus den Tabellen V und VI zu ersehen ist, vermögen 0,05 Adrenalin die 10-fache letale Dosis von Tetanustoxin zu

1) Wir arbeiteten mit einem Toxin aus dem Königl. Institut für experimentelle Therapie zu Frankfurt a. M. Seine Dosis letalis minima (im Trockenzustand) wurde von uns zu 0,000005 festgestellt. Wir benutzen die Gelegenheit, um Herrn Prof. H. Sachs unseren aufrichtigen Dank für die liebenswürdige Zusendung des Toxins auszudrücken.

entgiften. Aber 0,1 Adrenalin entgiftet nicht die 20-fache Dosis, d. h. die Reaktion folgt nicht den multiplen Zahlen und darf daher trotz der Behauptung von Marie nicht zu den chemischen Reaktionen zugezählt werden.

Zum Beweise dessen, daß das Adrenalin mit den Toxinen in eine chemische Reaktion eintritt, führt Marie den Umstand an, daß die Adrenalin-Toxingemische keine Farbenreaktionen auf das Adrenalin ergeben. Aber ein überzeugender Gegenbeweis, der die Gründe Maries zu entkräften vermag, ist darin enthalten, daß beim Digerieren von Adrenalin mit Toxin ersteres seine physiologische Wirkung vollkommen bewahrt. Darauf wird auch in unserer oben zitierten Arbeit hingewiesen. Da wir früher das Digerieren bloß 30 Minuten lang vornahmen, so wiederholten wir die früheren Versuche, indem wir die Gemische bei 37° 24 Stunden stehen ließen. Wir experimentierten an Mäusen und führten zwei Versuchsreihen aus. Erstens nahmen wir eine tödliche Dosis von Adrenalin und mischten sie mit einer Toxinmenge, die von ihm auf Grund arithmetischer Berechnung hätte neutralisiert werden müssen. Zweitens mischten wir die letale Adrenalindosis mit willkürlich herausgegriffenen, sehr großen Toxindosen. Die Gemische wurden Mäusen, die mit Adrenalin nicht vorbehandelt waren, sowohl subkutan als auch in die Schwanzvene eingeführt. Dabei gelang es uns kein einziges Mal, den Untergang der Versuchstiere abzuwenden.

Zur Illustration führen wir die Tabellen VII und VIII an.

Tabelle VII. (Versuch vom 26. VI. 1913.)

Die Gemische wurden mit 0,8-proz. NaCl-Lösung bis zu 1 ccm verdünnt, zugeschmolzen, 24 Stunden lang bei 37° stehen gelassen und Mäusen subkutan injiziert.

No. der Maus	Injiziert	Versuchsergebnis
1	Adrenalin 0,3	† nach 30 Min.
2	{ Adrenalin 0,3 Diphtherietoxin 0,7 }	† nach 40 Min.
3	{ Adrenalin 0,3 Tetanustoxin 0,001 }	† nach 30 Min.

Tabelle VIII. (Versuch vom 28. VI. 1913.)

Die Gemische wurden 24 Stunden lang bei 37° digeriert (in zuge-
schmolzenen Ampullen) und in die Schwanzvene eingespritzt.

No. der Maus	Injiziert	Versuchsergebnis
1	{Adrenalin 0,1 {Tetanustoxin 0,0001}	† nach 40 Min.
2	Adrenalin 0,1	† nach 40 Min.

Somit ist von einer gegenseitigen Neutralisierung der Toxine und des Adrenalins gar keine Rede. Es findet nur eine Entgiftung der Toxine statt, während das Adrenalin seiner physiologischen Eigenschaften nicht verlustig geht. Außerdem folgt die Reaktion der Toxinentgiftung keineswegs den multiplen Proportionen, und deshalb ist der Vorgang nicht als ein chemischer aufzufassen, sondern eher als ein nach dem Typus der kolloidalen Reaktionen verlaufender, nämlich derart, daß die Toxinmolekeln unter dem Einflusse der Berührung mit einem anderen Kolloid — dem Adrenalin — ausfallen, welch letzteres dabei seine physiologischen Eigenschaften bewahrt.

Zusammenfassung.

1) Das Adrenalin besitzt das Vermögen, Diphtherie- und Tetanustoxin zu entgiften.

2) Der Grad der Entgiftung hängt von der Dauer der Berührung und von der Temperatur, bei der sie vor sich geht, ab. Bei 37° entgiftet 1,0 Adrenalin im Verlaufe von 24 Stunden vollkommen die 10-fache Dosis letalis Diphtherietoxin und 0,05 Adrenalin die gleiche Dosis Tetanustoxin. Die Entgiftung gelingt auch bei Zimmertemperatur (im Verlaufe 1 Stunde im Schüttelapparat), findet jedoch nicht immer regelmäßig statt.

3) Eine Entgiftung des Adrenalins durch Toxine findet auch bei langdauernder Berührung nicht statt.

Nachdruck verboten.

[Aus der Spezialklinik für Lungentuberkulose der medizinischen Akademie zu Osaka, Japan (Direktor: Prof. A. Sata).]

**Passive Uebertragbarkeit der Diphtherietoxin-
überempfindlichkeit durch Diphtherieserum, mit
besonderer Berücksichtigung des fermentativen Giftabbaus.**

Von Prof. extr. Dr. **B. Arima.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. Oktober 1913.)

Durch die großen Fortschritte auf dem Gebiete der Anaphylatoxinforschung in der neueren Zeit ist die Erklärung über die Entstehung der Krankheitserscheinungen äußerst einfach geworden. Selbst die geistvolle Seitenkettentheorie Ehrlichs hatte vielfach Erschütterungen erfahren. Ob eine dritte Komponente bei der sogenannten Toxin-Antitoxinneutralisierung nötig ist, war von vornherein nicht einwandfrei, solange eine sichere Beweisführung *ex vivo* noch fehlte.

Friedberger¹⁾, der vor einigen Jahren die „Anaphylaxie als eine akute Form der Infektion, die Infektion als eine protrahierte mildere Form der Anaphylaxie“ auffaßte und dennoch ausdrücklich die Toxikosen, Diphtherie und Tetanus für diese Betrachtungsweise auszuschließen glaubte, berichtete schon im folgenden Jahre²⁾, daß die früher gemachte Einschränkung nicht unbedingt notwendig ist. Neuerdings³⁾ glaubte er die Antitoxinwirkung befriedigend unter demselben Gesichtspunkte zu erklären, wie die Wirkung der Antieiweißera im allgemeinen, und nahm auf Grund der Versuche an, daß der Unterschied, den man bisher zwischen antitoxischen und antibakteriellen Seris gemacht hat und dementsprechend auch zwischen den homologen Antigenen nicht zu bestehen scheint.

Dazu genügten jedoch die früheren Untersuchungsergebnisse Friedbergers und Mitas nicht vollkommen. Dold und Ungermann⁴⁾ berichteten nämlich in demselben Jahre, daß das aktive Meerschweinchenkomplement zwar die Wirkung des Diphtherie-Tetanustoxins usw. beschleunigt, ohne aber den spezifischen Charakter der Gifte dabei zu verändern. Ueber den Grund einer solchen Meinungsverschiedenheit bei der Toxin-Antitoxinneutralisierung glaubte ich seit einigen Jahren annehmen zu sollen, daß die Toxinmenge, d. h. die Molekülzahl des giftigen Eiweißes,

1) Berl. klin. Wochenschr., 1910, No. 32.

2) Friedberger und Schütze, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 9.

3) Friedberger und Mita, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 42.

4) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 11, 1911, p. 86.

wenn man so sagen darf, bei den Toxikosen, Diphtherie und Tetanus viel geringer sein muß, um den Tod des Tieres im biologischen Versuch oder die klinischen Erscheinungen bei den natürlichen Infektionsverhältnissen hervorzurufen als die bei den endotoxischen Erkrankungen. Dies kann man unschwer ersehen aus den Unterschieden der biologischen Lebensbedingungen zwischen Diphtherie- und Tetanusbakterien einerseits und Typhus-, Dysenteriebacillen, Streptokokken usw. andererseits. Das gleiche nahm schon Friedberger¹⁾ auf Grund seiner Untersuchungen an. Ich machte noch dazu die Annahme²⁾, daß das giftige Element des echten Toxins eine einfachere, an und für sich aber verhältnismäßig haltbare, durch Antiserumwirkung leicht zersetzliche Struktur hätte³⁾. Und wegen solcher Leichtzersetzlichkeit, abgesehen von dem einfachen Molekülkomplexe, kann das Toxin bekannterweise sehr leicht einerseits mit Antiserum neutralisiert werden und die Anaphylatoxinabspaltung (2 Stunden bei 37° mit Komplement) in Friedbergers Sinne andererseits nicht ausgeprägt zutage treten.

Ueber die passive Uebertragbarkeit der Anaphylaxie sind seit mehreren Jahren von vielen Autoren zahlreiche, zuletzt von Sata eingehende wertvolle Mitteilungen gemacht worden. Die Versuche von Sata³⁾ und Tanaka⁴⁾ beziehen sich darauf, daß diese Wirkung des spezifischen Serums zur Wertbestimmung desselben angewandt werden kann (Sata über Tuberkulose-serum und Tanaka über Dysenterie-, Typhus- und Choleraserum).

Ich glaube, daß diese Versuchsanordnung bei der passiven Anaphylaxie am geeignetsten ist, um die stufenweise verlaufende Giftabspaltung beobachten zu können, insbesondere bei den leicht zersetzlichen Eiweißarten, wie ich sie bei den echten Toxinen annehme.

Tabelle I.

Die Bestimmung der Giftigkeit des Toxins (10. III. 1513).

Altes schwaches Toxin, Stamm „Test“ Wien, 18. I. 1913 hergestellt, karbolisiert, bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Subkutane Injektion.

No. des Tieres	Körpergewicht	Menge des Toxins	Reaktion
1	300	0,05	keine Reaktion
2	320	0,1	dgl.
3	270	0,2	„
4	280	0,4	Temperatursteigerung bis 40,2°
5	280	0,6	wie oben bis 40,3°

1) Friedberger, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 42. Friedberger, Mita und Kumagai, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, Heft 5.

2) Ein Vortrag in der Osakaer med. Gesellsch., April 1913.

3) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, Heft 1.

4) Verhandlung d. japan. patholog. Ges., 2. Tagung, April 1912.

Daraus ergibt es sich, daß die subreaktive Dosis dieses schwachen Toxins 0,2 ccm beträgt.

Versuch 1 (10.—12. III. 1913).

8^h 10. III. Ein Diphtherieserum (in 1,0 ccm 500 IE.) intrap., 8^h 11. III. Toxin subkutan. Temperaturmessung je 1/2 Stunde.

Tabelle II.

No des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge	Reaktion
A 1	280	0,1	0,02	keine Reaktion
A 2	280	„	„	dgl.
A 3	260	0,2	„	„
A 4	300	„	„	„
A 5	250	0,5	„	Temperatursteigerung von 38,1 bis 40,2° C
A 6	250	„	„	Temperatursteigerung von 38,2 bis 40,3° C
A 7	200	„	0,4) Glyzerin-	keine Reaktion
A 8	280	„	„ Jbouillon	dgl.

Aus diesem Versuche ergibt es sich, daß bei der subkutanen Einverleibung der subreaktiven Toxindosis keine Anaphylaktisierung zu konstatieren ist.

Versuch 2 (15.—17. III.).

8^h 15. III. Serum intraperitoneal, 8^h 16. III. Toxin intravenös. Temperaturmessung je 1/2 Stunde.

Tabelle III.

No. des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge		Reaktion
B 1	280	0,15	0,1	} subreaktive Dosis	erst Temperatursturz, dann -steigerung
B 2	250	„	„		dgl.
B 3	250	„	0,5	} Reaktionsdosis	„
B 4	280	„	„		„
B 5	200	„	1,0	} Glyzerinbouillon	leichter Temperaturabfall ohne spätere Steigerung
B 6	225	„	„		dgl.

Aus diesem Versuche geht hervor, daß die subreaktive oder reaktive Dosis des Diphtherietoxins bei den Tieren, die 24 Stunden vorher mit Diphtherieserum behandelt worden sind, eine Reaktion hervorruft, die zunächst mit Temperatursturz und später mit Temperatursteigerung einhergeht. Es gelingt deshalb, das gesunde Meerschweinchen mit dem Antitoxin passiv anaphylaktisch gegen Toxin zu machen.

Tabelle IV.

Die Bestimmung der Giftigkeit des neu hergestellten Toxins.

25. VII. Das Toxin durch Tonfilter filtriert, 0,3 Proz. Karbol zugesetzt, bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Jede Toxinmenge wird vor dem Gebrauch auf 0,5 ccm mit NaCl-Lösung aufgefüllt und intravenös eingespritzt.

No. des Tieres	Körpergewicht	Toxinmenge	Reaktion	Ausgang
1	160	0,2	Temperatursturz	tot nach 18 Std.
2	150	0,1	dgl.	tot nach 3 Tagen
3	160	0,05	Temperatursturz und dann Erhöhung	lebt
4	165	0,02	dgl.	„
5	180	0,01	„	„
6	145	0,005	„	„
7	140	0,002	leichte Temperaturerhöhg.	„
8	150	0,001	keine Reaktion	„

Wie man aus der Tabelle ersieht, ist die minimale Dosis, welche den Tod des Tieres in einem Tage hervorruft, 0,2 ccm; die reaktive 0,02 ccm (Mittelwert) und die ungiftige, subreaktive 0,001 ccm.

Versuch 3.

Diesmal wurde die vorbehandelnde Seruminjektion 24 Stunden vor der Toxininjektion vorgenommen, weil ich aus anderen Versuchen weiß, daß die Resorption des Peritonealexsudates durch das eingespritzte Serum wegen der Reaktionsentzündung verzögert wird und erst nach 24 Stunden vollkommen ist.

Das hier angewandte Serum ist ebenfalls dasselbe, welches in jedem Kubikzentimeter 500 IE. enthält.

Tabelle V.

Vor etwa 24 Stunden Serum intraperitoneal, dann Toxin intravenös.

No. des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge	Reaktion	Ausgang
C 1	185	0,5	0,001	erst Temperatursturz, dann Erhöhung	lebt
C 2	170	"	0,001	dgl.	"
C 3	200	"	0,02	"	"
C 4	170	"	mißlungen	"	—
C 5	180	"	0,2	keine ernste Reaktion	lebt
C 6	185	"	0,2	erst Temperatursturz, dann Erhöhung	"
C 7	200	"	0,5	fast keine Reaktion	"
C 8	190	"	0,5	erst leichter Sturz und dann Erhöhung der Temperatur	"
C 9	170	1,0	0,02	keine Reaktion	"
C 10	160	"	0,2	einige Zuckungen, Temperaturschwankung	"
C 11	205	"	0,5	Zuckungen der Extremitäten, unruhig, leichter Temperatursturz	"
C 12	210	0,5	0,02	erst leichter Temperatursturz, schnelle Erholung	"
C 13	190	"	0,2	dgl.	"
C 14	185	"	0,5	keine Reaktion	"
C 15	175	0,5	0,2	erst Sturz, dann Erhöhung der Temperatur	tot in der Nacht
C 16	190	0,5	0,5	dgl.	dgl.

Es ist zu beachten, daß die vorher injizierte Diphtherieserummengung von 0,5 ccm, d. h. 250 IE., schon zu groß ist, so daß die angewandten Toxinmengen allzu rasch in ungiftige Endprodukte abgespalten wurden und die Versuchstiere deshalb keine ernstesten Erscheinungen nach der Reinjektion zeigten.

Versuch 4.

Es wird hier aus den oben genannten Gründen der Versuch wiederholt, nur mit dem Unterschiede, daß die Vorbehandlung mit kleineren Serummengen erfolgt. Die einzelne Serumdosis wurde vor der Injektion mit Kochsalzlösung auf 1 ccm, das Toxin auf 0,5 ccm aufgefüllt.

Auswertung 18.—20. VIII. 1913.

Meerschweinchen D 1, 195 g.

12^a 18. VIII. 0,1 ccm Diphtherieserum ip. 10³⁰ 19. VIII. 0,001 ccm Toxin iv. Keine Reaktion. Temperaturmessung bis zum folgenden Tage ohne Besonderheiten.

Meerschweinchen D 2, 185 g.

12^a 18. VIII. ebenso behandelt. 10⁴⁰ 19. VIII. ebenfalls Toxin. Keine Reaktion.

Meerschweinchen D 3, 170 g.

12^b 18. VIII. 0,05 ccm Diphtherieserum ip. 10⁴⁵ 19. VIII. 0,001 ccm Toxin iv. Erst Temperatursturz, dann leichte Erhöhung, schon am selben Abend vollständig erholt.

Meerschweinchen D 4, 160 g.

18. VIII. ebenso behandelt. 10⁵⁵ 19. VIII. in der gleichen Weise. Keine Reaktion.

Meerschweinchen D 5, 205 g.

12^b 18. VIII. 0,1 ccm Diphtherieserum ip. 11³⁰ 19. VIII. 0,02 ccm Toxin iv. Krämpfe und starke Dyspnoë nach 3 Sekunden, Temperatursturz nach 1 Stunde, dann Erholung.

Meerschweinchen D 6, 180 g.

Ebenfalls vorbehandelt. 11³⁰ 19. VIII. 0,02 ccm Toxin iv. Krämpfe und Dyspnoë nach 20 Sekunden, dann schnelle Erholung. Keine Temperaturschwankung.

Meerschweinchen D 7, 155 g.

12^b 18. VIII. 0,95 ccm Diphtherieserum ip. 11³⁵ 19. VIII. Toxininjektion, mißlungen.

Meerschweinchen D 8, 190 g.

18. VIII. ebenso behandelt. 11⁴⁰ 19. VIII. 0,02 ccm Toxin iv. Keine ernste Erscheinung.

Meerschweinchen D 9, 195 g.

12^b 18. VIII. 0,1 ccm Diphtherieserum ip. 11⁵⁰ 19. VIII. 0,2 ccm Toxin iv. Sofort heftige Zuckungen, schwere Dyspnoë, einige Krämpfe, Temperatursturz nach 1 Stunde, dann schnell erholt.

Meerschweinchen D 10, 200 g.

Ebenso vorbehandelt. 12^b 19. VIII. 0,2 ccm Toxin iv. Krämpfe, schwere Dyspnoë und leichte Lähmung der Extremitäten, Temperatursturz, dann schnelle Erholung.

Meerschweinchen D 11, 165 g.

12^b 18. VIII. 0,05 ccm Diphtherieserum ip. 12¹⁵ 19. VIII. 0,2 ccm Toxin iv. Sofort Krämpfe, Dyspnoë, leichte Lähmung, Temperatursturz 1 Stunde nach der Injektion, Erholung.

Meerschweinchen D 12, 170 g.

Ebenso vorbehandelt. 12²⁵ 19. VIII. 0,2 ccm Toxin iv. Sofort einige Krämpfe, deutliche Lähmung, Temperatursturz nach 30 Minuten, dann schnelle Erholung.

Meerschweinchen D 13, 210 g.

12¹⁸ 18. VIII. 0,1 ccm Diphtherieserum ip. 12³⁰ 19. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Leichte Zuckung und Dyspnoë, Temperatursturz nach 30 Minuten, dann Erholung.

Meerschweinchen D 14, 165 g.

Ebenso vorbehandelt. 12³⁸ 19. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Heftige Krämpfe, deutliche Lähmung, schwere Dyspnoë, Temperatursturz nach 30 Minuten, dann Erholung.

Meerschweinchen D 15, 165 g.

12¹⁸ 18. VIII. 0,05 ccm Diphtherieserum ip. 12⁴⁵ 19. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Einige Krämpfe, Dyspnoë und deutliche Lähmung, Temperatursturz nach 1 Stunde, dann Erholung.

Meerschweinchen D 16, 170 g.

Wie oben vorbehandelt. 12⁵⁵ 19. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Leichte Krämpfe und Zuckungen, Dyspnoë, deutliche Lähmung, Temperatursturz nach 30 Minuten, dann Erholung.

Tabelle VI.

No. des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge	Reaktion	Ausgang
D 1	195	0,1	0,001	keine Reaktion	lebt
D 2	185	0,1	"	dgl.	"
D 3	170	0,05	"	Temperaturschwankg.	"
D 4	160	0,05	"	keine Reaktion	"
D 5	205	0,1	0,02	Krämpfe und Dyspnoë, Temperaturschwankg.	"
D 6	180	0,1	0,02	Krämpfe und Dyspnoë	"
D 7	155	0,05	—	—	mißlungen
D 8	190	0,05	0,02	keine Reaktion	lebt
D 9	195	0,1	0,2	Zuckungen u. Dyspnoë, einige Krämpfe, Temperaturschwankungen	"
D 10	200	0,1	0,2	Krämpfe, Dyspnoë, Lähmung, Temperaturschwankungen	"
D 11	165	0,05	0,2	dgl.	"
D 12	170	0,05	0,2	"	"
D 13	210	0,1	0,5	Zuckungen, Dyspnoë, Lähmung und Temperaturschwankung	"
D 14	165	0,1	0,5	Krämpfe, Dyspnoë, Lähmung, Temperaturschwankungen	"
D 15	165	0,05	0,5	dgl.	"
D 16	170	0,05	0,5	"	"

Hieraus ersieht man, daß die angewandten Serummengen noch zu groß sind, um den spezifischen Anaphylaxietod zu erzeugen, so daß die Versuchstiere sich alsbald erholen und am Leben bleiben können, wenn auch kurz nach der Toxininjektion die eigentümlichen anaphylaktischen Erscheinungen auftreten.

Zur Kontrolle wurde noch ein Versuch angestellt, bei welchem statt des Diphtherieserums ein Antityphusserum, welches mit einer Bouillonkultur als Antigen, wie Diphtherieserum, hergestellt war und statt des Toxins Glycerinbouillon angewandt wurde. Die Resultate sind folgende:

Kontrollversuch.

Tabelle VII.

No. des Tieres	Körpergewicht	Vorbehandlung	Reinjektion	Reaktion	Ausgang
1	160	0,1	0,001	keine Reaktion	lebt
2	180	"	0,02	leichte Temperaturschwankung	"
3	165	"	0,2	keine Reaktion	tot in 1 Tag
4	175	"	0,5	ganz leichte Zuckungen	dgl.
5	150	0,1	0,001	keine Reaktion	lebt
6	160	"	0,02	dgl.	"
7	180	"	0,2	"	"
8	170	"	0,5	ganz leichte Zuckungen	"

Versuch 5.

Hier habe ich wieder mit kleineren Serumdosen den Versuch wiederholt. Das Toxin wurde dabei ungefähr 23—24 Stunden nach der intraperitonealen Seruminjektion reinjiziert; Temperatur nicht gemessen.

Auswertung 19.—20. VIII.

Meerschweinchen E 1, 185 g.

0,01 ccm Serum ip., 1⁵⁶ 20. VIII. 0,001 ccm Toxin iv. Sofort Krämpfe, Dyspnoë und deutliche Lähmung, völlige Erholung nach 1 Stunde.

Meerschweinchen E 2, 185 g.

0,01 ccm Serum ip., 2⁵⁶ 20. VIII. 0,02 ccm Toxin iv. Sehr heftige Krämpfe, schwere Dyspnoe und dazu deutliche Lähmung. Cyanose. Erholung nach 1 Stunde.

Meerschweinchen E 3, 170 g.

0,01 ccm Serum ip., 2¹⁰ 0,02 ccm Toxin iv. Sofort sehr heftige Krämpfe, schwere Dyspnoë, deutliche Lähmung. Etwa 20 Minuten sitzt das Tier still. Völlige Erholung nach 1 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Meerschweinchen E 4, 100 g.

0,01 ccm Serum ip., 2⁵⁷ 0,2 ccm Toxin iv. Die sofort eintretende Reaktion etwas leichter wie oben. Etwa 30 Minuten sitzt das Tier still.

Meerschweinchen E 6, 165 g.

0,01 ccm Serum ip., 2¹⁰ 20. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Sehr heftige Krämpfe, sehr schwere Dyspnoë. Cyanose nach 2 Minuten, dann Erholung.

Meerschweinchen E 7, 180 g.

0,1 ccm Serum ip., 3²⁵ 20. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Die Reaktion wie oben, völlige Erholung nach 1 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Meerschweinchen E 8, 170 g.

0,005 ccm Serum ip., 2⁴ 20. VIII. 0,001 ccm Toxin iv. Leichte Zuckungen und deutliche Lähmung.

Meerschweinchen E 9, 155 g.

0,005 ccm Serum ip., 2¹⁵ 20. VIII. 0,001 ccm Toxin iv. Sofort Dyspnoë, einige Krämpfe, leichte Lähmung, mehrere Minuten danach unruhig.

Meerschweinchen E 10, 200 g.

0,005 Serum ip., 2²⁰ 20. VIII. 0,02 ccm Toxin iv. Zuckungen und Dyspnoë, kurz nach der Erholung.

Meerschweinchen E 11, 165 g.

0,005 ccm Serum ip., 2²⁷ 20. VIII. 0,02 ccm Toxin iv. Sehr heftige Krämpfe, schwere Dyspnoë, legt sich wie gelähmt, Cyanose, sitzt dann apathisch und still, völlige Erholung nach 1 Stunde.

Meerschweinchen E 12, 205 g.

0,005 ccm Serum ip., 2⁴⁷ 20. VIII. 0,2 ccm iv. Die Reaktion ganz ähnlich der obigen.

Meerschweinchen E 13, 200 g.

0,005 ccm Serum ip., 3⁵ 20. VIII. 0,2 ccm Toxin iv. Keine ernste Reaktion (?).

Meerschweinchen E 14, 205 g.

0,005 ccm Serum ip., 3¹⁷ 20. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Sofort schwere Dyspnoë, Cyanose, heftige Krämpfe, deutliche Lähmung, legt sich still wie tot mehrere Minuten.

Meerschweinchen E 15, 160 g.

0,005 ccm Serum ip., 3³⁰ 20. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Sofort Krämpfe, schwere Dyspnoë und Cyanose, legt sich wie tot, 3 Minuten danach erholt, allmählich leise atmend.

Tabelle VIII.

No. des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge	Reaktion	Ausgang
E 1	185	0,01	0,001	sofort Krämpfe, Dyspnoë und Lähmung	lebt
E 2	185	„	0,02	heftige Krämpfe, schwere Dyspnoë und deutliche Lähmung	„
E 3	170	„	0,02	wie oben, 20 Min., sitzt still	„
E 4	190	„	0,2	etwas leichter als die obige	„
E 5	180	„	—	—	mißlungen
E 6	165	„	0,5	sehr heftige Krämpfe, schwere Dyspnoë, Cyanose, deutl. Lähmung	lebt
E 7	180	„	0,5	wie oben	„
E 8	170	0,005	0,001	leichte Zuckungen, deutliche Lähmung	„
E 9	155	„	0,001	sofort Dyspnoë, einige Krämpfe, leichte Lähmung	„
E 10	200	„	0,02	Zuckungen u. Dyspnoë	„
E 11	165	„	0,02	sehr heftige Krämpfe, schwere Dyspnoë, Cyanose, legt sich, gelähmt	„
E 12	205	„	0,2	wie oben, nur etwas leichter	„
E 13	200	„	0,2	keine ernste Reaktion (?)	„
E 14	205	„	0,5	sofort schwere Dyspnoë, Cyanose, heft. Krämpfe, deutliche Lähmung	„
E 15	160	„	0,5	sofort Krämpfe, schwere Cyanose, legt wie tot, erholt sich allmählich	„

Versuch 6.

Auswertung 21.—22. VIII. 1913.

Meerschweinchen F 1, 160 g.

3^b 21. VIII. 0,001 ccm Serum ip. 2^b 22. VIII. 0,02 ccm Toxin iv.

Keine ernste Reaktion.

Meerschweinchen F 3, 180 g.

3^b 21. VIII. 0,001 ccm Serum ip. 2¹⁰ 22. VIII. 0,2 ccm Toxin iv.

Leichte Zuckungen und Dyspnoë.

Meerschweinchen F 5, 195 g.

3^b 21. VIII. 0,001 ccm Serum ip. 2³⁰ 22. VIII. 0,5 ccm Toxin iv.

Sehr heftige Krämpfe, sehr schwere Dyspnoë, Cyanose, deutliche Lähmung, legt sich lange danach. Tod nach Stunden. Sektionsbefund: Hochgradige Lungenblähung, Kontraktionsstillstand des Herzens, Blutgerinnung verzögert, hochgradige Blutung und Schwellung der Nebennieren.

Meerschweinchen F 6, 190 g.

3^a 21. VIII. 0,001 ccm Serum ip. 2⁵⁵ 22. VIII. 0,7 ccm Toxin iv. Sehr heftige Krämpfe, sehr schwere Dyspnoë, Cyanose, legt sich mehrere Minuten wie tot, erholt sich dann allmählich, leise atmend. Tod in der Nacht zum 23. VIII. Sektionsbefund: Leichte Lungenblähung, Ekchymosen und hier und da kleine Blutungen in den Lungen, Hyperämie und Blutungen einer Nebenniere.

Meerschweinchen F 7, 170 g.

3^a 21. VIII. 0,001 ccm Serum ip. 3² 22. VIII. 2,0 ccm Toxin iv. Sofort Tod, Harnlassen. Sektionsbefund: Hochgradige Blähung und Ekchymosen der Lungen, systolischer Stillstand des Herzens, gestörte Blutgerinnung, kleine Blutung der Nebennieren.

Meerschweinchen G 2, 205 g.

3^a 21. VIII. 0,0005 ccm Serum ip. 2¹³ 22. VIII. 0,2 ccm Toxin iv. Keine ernste Reaktion.

Meerschweinchen G 5, 175 g.

3^a 21. VIII. 0,0005 ccm Serum ip. 2²⁰ 22. VIII. 0,5 ccm Toxin iv. Heftige Krämpfe, dauernde Zuckungen, sehr schwere Dyspnoë, Cyanose, legt sich gelähmt in 15 Minuten, sitzt dann still. Tod nach 10 Stunden. Sektionsbefund: Deutliche Lungenblähung, Hyperämie der linken Nebenniere.

Meerschweinchen G 7, 200 g.

3^a 21. VIII. 0,0005 ccm Serum ip. 2⁵⁵ 22. VIII. 2,0 ccm Toxin iv. Sofort still, wie tot, dann leichte Zuckungen, Harnabgang, legt sich wieder still wie tot, von Zeit zu Zeit Zuckungen. Tod nach 25 Minuten. Sektionsbefund: Hochgradige Lungenblähung und Ekchymosen, systolischer Stillstand des Herzens.

Meerschweinchen G 9, 160 g.

3^a 21. VIII. 0,001 ccm Serum ip. 3²⁰ 22. VIII. 2,0 ccm Glycerinbouillon iv. Keine ernste Reaktion.

Meerschweinchen G 10, 155 g.

3^a 21. VIII. 0,0005 ccm Serum ip. 3³⁰ 22. VIII. 2,0 ccm Glycerinbouillon iv. Keine ernste Reaktion.

Tabelle IX.

No. des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge	Reaktion	Ausgang	Sektionsbefund
F 1	160	0,001	0,02	keine Reaktion	lebt	
F 3	180	"	0,2	leichte Zuckung und Dyspnoë	"	
F 5	195	"	0,5	sehr heftige Reaktion	tot n. 18 ^b	Hochgrad. Lungenblähung, Kontraktionsstillstand des Herzens, flüssiges Blut, Blutung und Schwellung der Nebennieren

No. des Tieres	Körpergewicht	Serummenge	Toxinmenge	Reaktion	Ausgang	Sektionsbefund
F 6	190	„	0,7	sehr schwere Reaktion	tot n. 16 ^h	Lungenblähung, Ekchym. und kleine Blutg., Hyperämie und Blutung einer Nebenniere
F 7	170	„	2,0	Harnabgang	tot sofort	Hochgrad. Blähung und Ekchym. der Lungen, systolisch. Stillst. d. Herzens, flüssiges Blut, Blutung der Nebennieren
G 2	205	0,0005	0,02	keine Reaktion	lebt	
G 3	155	„	0,2	dgl.	„	
G 5	175	„	0,5	heftige Reaktion	tot n. 10 ^h	Deutliche Lungenblähung, Hyperämie d. Nebenniere
G 7	200	„	2,0	heftigste Reakt., wie tot, Harnlassen, Zuckungen	tot n. 25'	Hochgrad. Lungenblähung, Ekchym., systol. Stillstand des Herzens
G 9	160	0,001	2,0	Glyzer. keine Reaktion	lebt	
G 10	155	0,0005	2,0	Bouill. dgl.	„	

Die Untersuchungsergebnisse sind eindeutig. Bei geeigneten Mengenverhältnissen, insbesondere bei größeren Toxin- und relativ kleineren Serummengen, kann das Diphtherietoxin bei den Tieren in ganz ausgeprägter Weise den typischen Anaphylaxietod hervorrufen.

Bezüglich der Tatsache, daß bei kleineren, eigentlich ungiftigen Toxindosen keine nennenswerten anaphylaktischen Erscheinungen auftreten, wie man es vielfach in meinen Versuchen konstatieren kann, teile ich mit Friedberger, Mita und Kumagai übereinstimmend dieselbe Ansicht. Es ist jetzt ohne weiteres klar, daß die Diphtherieeiweißmenge, die als tödliche Dosis im biologischen Versuch oder bei einer natürlichen Infektion in Frage kommt, eine sehr geringe ist. Ich will nicht unerwähnt lassen, daß das Toxineiweiß, hier besonders das Diphtherietoxineiweiß, nicht nur in seiner Menge, in der Zahl der Moleküle, wenn man so sagen darf, sehr gering sein kann, sondern auch der Struktur des einzelnen Toxineiweißes weniger kompliziert und leichter zerlegbar ist als die der anderen relativ ungiftigen Giftkomplexe. Das kann

ich auf Grund meiner Versuche mit Recht annehmen. In fast jedem, insbesondere im Versuch 5, kann man feststellen, daß die typisch anaphylaktische Erscheinung direkt nach der Reinjektion zwar in ausgeprägter Weise auftritt, aber nicht der Anaphylaxietod, und daß die Versuchstiere schon kurze Zeit danach sich ganz erholen und schließlich am Leben bleiben können. Diese leichte Zerlegbarkeit und die Zahlenverhältnisse des Eiweißmoleküls des sogenannten echten Toxins machen das Gesetz der multiplen Proportionen wahrscheinlich.

Zum Schlusse sei noch hinzugefügt, daß die Einwände von De Waele, Dold und Ungermann über die bekannten Versuchsanordnungen Friedbergers bei der Anaphylatoxindarstellung, daß Verunreinigung mit saprophytischen Bakterien vorkommen können, auch bei meinen immer steril ausgeführten Versuchen nicht zutreffend sind.

Zusammenfassung.

1) Die Diphtherietoxinanaphylaktisierung ist durch eine einmalige Uebertragung des Diphtherieserums auf das Meerschweinchen sicher möglich.

2) Die dadurch entstandene passive Ueberempfindlichkeit zeichnet sich nicht nur durch eine typische Temperaturschwankung gegen Diphtherietoxin bei Verwendung der subreaktiven resp. reaktiven Dosen aus, sondern es ist dazu auch ein typischer Anaphylaxietod durch eine Injektion größerer Toxindosen möglich.

3) Das bis jetzt wohlbekanntes Entgiftungsvermögen des Antitoxins ist deshalb nicht eine einfache chemische Neutralisierung, sondern, wie ich in Uebereinstimmung mit Friedberger, Mita und Kumagai annehme, ein mehr komplizierter, fermentativer Abbau, bei welchem sich noch andere lebenswichtige Komponenten, wie z. B. das Komplement, beteiligen.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Versuche über sympathische spezifische und unspezifische Sensibilisierung.

Von **H. Dold** und **A. Rados**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Oktober 1913.)

Versuche, vom Auge aus Tiere allgemein zu sensibilisieren, sind schon von verschiedenen Autoren mit positivem Erfolge gemacht worden (Krusius, Kümmell, Clough u. a.).

Auch das Umgekehrte ist versucht worden: Bei Tieren, welche von der Subcutis, dem Peritoneum oder der Blutbahn aus allgemein sensibilisiert worden waren, wurde die Reinjektion am Auge vorgenommen, und es erwies sich dabei das Auge — wie zu erwarten — als überempfindlich (Nicolle, Abt).

Eine andere Versuchsanordnung wählte Wessely:

Er sensibilisierte Tiere (Kaninchen) von dem einen Auge aus mit Pferdeserum und machte dann nach einem gewissen Zeitintervall mit derselben Dosis Pferdeserum die Reinjektion am andern Auge.

Es zeigte sich, daß das zweite Auge auf dieselbe Dosis Pferdeserum stärker entzündlich reagierte als das erste bei der sensibilisierenden Injektion. Das zweite Auge erwies sich also als überempfindlich. v. Szily und Arisawa haben bei einer Nachprüfung diese Befunde bestätigt.

Alle diese Versuche stellen nicht etwas prinzipiell Neues dar.

Es ist nicht zu verwundern, daß man vom Auge aus, ebenso wie von jeder anderen resorptionsfähigen Körperstelle, Tiere allgemein sensibilisieren kann, wie es auch ganz den Vorstellungen über Anaphylaxie entspricht, daß von irgendeiner Stelle aus allgemein sensibilisierte Tiere auch in ihren einzelnen Teilen, und darum auch am Auge, sensibilisiert sind. Die Versuche von Wessely stellen eine Kombination dieser beiden Versuchsanordnungen dar.

Wir haben uns die Frage vorgelegt, ob es bei symmetrisch angelegten Organen (z. B. bei den Augen) möglich ist, durch Sensibilisierung von dem einen Auge aus in dem anderen Auge eine Ueberempfindlichkeit zu erzeugen, welche

an Intensität die der übrigen Körpergewebe übertrifft und welche größer ist als diejenige, welche man durch Sensibilisierung von einer anderen Körperstelle aus (z. B. von der Subcutis aus) erzielen kann. Mit anderen Worten, wir untersuchten die Möglichkeit einer elektiven Sensibilisierung symmetrisch angelegter Organe, einer „sympathischen Anaphylaxie“ in dem oben definierten engeren Sinne.

Zum Studium dieser Frage wählten wir Kaninchen und sensibilisierten mit Pferdeserum, Alttuberkulin und filtriertem *Prodigiosusbacillen*extrakt.

Die Versuchsserie mit *Prodigiosus*extrakten ist durch interkurrente Todesfälle der Tiere während der Sensibilisierung gestört worden, so daß sie keine Berücksichtigung finden kann.

Wir gingen so vor, daß wir bei jedem der drei Agentien zunächst an Augen normaler Tiere den „normalen Entzündungstiter“ ermittelten, d. h. diejenige Verdünnung, von der 0,1 ccm intralamellär in die Hornhaut gespritzt, gerade noch deutliche Entzündung verursachte. Hierauf wurden Tiere sensibilisiert, und zwar teils vom Auge aus (linkes Auge), teils von der Subcutis aus.

Nach ca. 14 Tagen erfolgte die Prüfung auf Ueberempfindlichkeit, indem den Tieren in die Hornhaut des rechten Auges (bei den von der Subcutis aus sensibilisierten Tieren in beide Augen) je 0,1 ccm der 10- bis 100-fachen Verdünnung des normalen Entzündungstiter injiziert wurde.

Was die Technik der von uns angewandten intralamellären Injektion betrifft, so sei darüber folgendes bemerkt:

Zur Anästhesierung des Auges benutzten wir eine 1-proz. Lösung von *Cocainum hydrochloricum*. Eine stärkere Lösung dürfte wegen der Möglichkeit der Entstehung einer *Cocainkeratitis* sich nicht empfehlen.

Zum Zwecke der Fixierung des anästhesierten Augapfels bedienten wir uns einer gewöhnlichen chirurgischen Hakenpinzette.

Die Injektionen nahmen wir mit einer „Mikrospritze“ vor und bedienten uns dabei der dünnsten käuflichen Kanüle (Kanüle No. 20).

Zur intralamellären Injektion wird nach vorausgegangener Cocainisierung das Auge dadurch fixiert, daß man einige Millimeter über dem Limbus die bulbäre Bindehaut und den *Musculus rectus superior* mit einer Hakenpinzette

faßt. Die Kanüle wird sodann im oberen Drittel der Hornhaut eingestochen und langsam zwischen den Lamellen der Hornhaut flach und senkrecht nach dem Zentrum zu vorgeschoben.

Wenn die Kanüle ca. 0,5 mm tief in den Lamellen der Hornhaut steckt, wird die Flüssigkeit durch langsamen Druck auf den Stempel in die Hornhaut getrieben, was das Auftreten einer rundlichen grauweißen Abhebung zur Folge hat.

Dieses Flüssigkeitsdepot wird meist innerhalb der folgenden 8—24 Stunden spurlos resorbiert. In der Regel bereitet es keine Schwierigkeit, auf diese Weise 0,1 ccm Flüssigkeit zwischen die Lamellen der Hornhaut zu bringen.

Es folgen zunächst die Versuche zur Feststellung der normalen „Entzündungstiter“.

Versuche über die Wirkung von Pferdeserumverdünnungen.

Versuch 1.

Von frisch gewonnenem, durch eine halbstündige Erhitzung auf 56° C inaktiviertem Pferdeserum werden Verdünnungen 1:1000, 1:10 000, 1:100 000 und 1:1 000 000 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Von diesen Verdünnungen wird je 0,1 ccm intralamellär in die Hornhaut normaler Kaninchen eingespritzt. Und zwar erhält:

Kaninchen No. 1 am rechten Auge 1:1000, am linken Auge 1:10 000.

Kaninchen No. 2 am rechten Auge 1:100 000, am linken Auge 1:1 000 000.

Wirkung: Nach 20 Stunden:

Kaninchenauge (1:1000). Starke Chemosis, Rötung der Bindehaut, starke Keratitis.

Kaninchenauge (1:10 000). Conjunctivale Erscheinungen; feine oberflächliche Keratitis.

Kaninchenauge (1:100 000). Minimale Keratitis; geringes Exsudat im Pupillargebiet.

Kaninchenauge (1:1 000 000) normal.

Versuche über die Wirkung von Tuberkulinverdünnungen.

Versuch 2.

Von dem käuflichen Alt-Tuberkulin Koch werden Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000 mit steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Von diesen Verdünnungen wird je 0,1 ccm intra-

lamellär in die Hornhaut normaler Kaninchen eingespritzt. Und zwar erhält:

- Kaninchen No. 3 am linken Auge 1:10, am rechten 1:100.
 Kaninchen No. 4 am linken Auge 1:1000, am rechten 1:10 000.
 Kaninchen No. 5 am linken Auge 1:100 000.

Wirkung: Nach 24 Stunden:

- Kaninchenauge 1:10. Starke Conjunctivitis, leichte Reizung der Iris.
 Kaninchenauge 1:100. Leichte conjunctivale Reizung.
 Kaninchenauge 1:1000. Minimale conjunctivale Erscheinungen.
 Kaninchenauge 1:10 000 und 1:100 000 normal.

Nach 48 Stunden:

- Kaninchenauge 1:10. Keratoiritis. Exsudat in der Vorderkammer.
 Kaninchenauge 1:100. Dicke ulzeröse Infiltration des Stichkanals, feine diffuse Trübung der ganzen Hornhaut.
 Kaninchenauge 1:1000. Von oben breitet sich nach unten eine feine parenchymatöse Trübung aus.
 Kaninchenauge 1:10 000. Stichkanal ein wenig infiltriert. Keine conjunctivalen Reizerscheinungen.
 Kaninchenauge 1:100 000 nihil.

Der normale Entzündungstiter liegt also bei Kaninchen gegenüber Pferdeserum bei der Verdünnung 1:100 000 und gegenüber Alt tuberkulin zwischen 1:1000 und 1:10 000; bei dem ebenfalls geprüften filtrierten Prodigiosusextrakt lag er bei 1:10 000.

Es mögen nunmehr die eigentlichen Versuche über sympathische spezifische Sensibilisierung folgen. Zu den Einzelheiten, die aus den Protokollen hervorgehen, ist nichts weiter zu bemerken.

Versuche über sympathische spezifische Sensibilisierung.

A. Versuche mit Pferdeserum.

3 Kaninchen (Kaninchen No. 6, 7 und 8) werden an drei aufeinander folgenden Tagen vom linken Auge aus durch Injektion von 0,1 ccm 1:10 verdünnten inaktivierten Pferdeserums sensibilisiert.

Gleichzeitig werden 3 andere Kaninchen (Kaninchen No. 9, 10 und 11) von der Subcutis aus durch Injektion von 0,1 ccm eines 1:10 verdünnten inaktivierten Pferdeserums sensibilisiert.

Die Reinjektion erfolgt bei allen 6 Tieren 16 Tage nach der letzten sensibilisierenden Injektion, und zwar in der Weise, daß in die Lamellen der Hornhaut des rechten Auges 0,1 ccm von Pferdeserumverdünnungen, welche die beim normalen Tiere ermittelten, gerade noch Entzündung er-

zeugenden Verdünnungen um das 10- bzw. 100-fache übertrafen. Und zwar erhielten:

Kaninchen No. 6 und 7 am rechten Auge 0,1 ccm einer Verdünnung von 1:1 000 000;

Kaninchen No. 8 am rechten Auge 0,1 ccm einer Verdünnung von 1:10 000 000.

Wirkung: Nach 20 Stunden:

Kaninchen No. 6 und 7. Die Augen sind völlig reizlos; gleichfalls bei **Kaninchen No. 8.**

Auch nach 40 Stunden hat sich nichts geändert.

Bei den von der Subcutis aus sensibilisierten Tieren wurde ebenfalls 0,1 ccm einer Verdünnung 1:1 000 000 intralamellär gespritzt.

Bei keinem der 3 Tiere trat eine entzündliche Reaktion auf.

B. Versuche mit Tuberkulin.

I. Versuchsserie.

3 Kaninchen (Kaninchen No. 12, 13 und 14) werden an drei aufeinander folgenden Tagen vom linken Auge aus durch Injektion von 0,1 ccm einer 1:50 verdünnten Lösung von Alttuberkulin Koch in die Vorderkammer sensibilisiert.

Zur Kontrolle wurde ein anderes normales Kaninchen (Kaninchen No. 15) an drei aufeinander folgenden Tagen von der Subcutis aus durch Injektion von je 0,1 ccm 1:50 verdünnten Alttuberkulins Koch sensibilisiert.

Die Reinjektion erfolgte bei sämtlichen Tieren 16 Tage nach der letzten sensibilisierenden Injektion. Und zwar in der Weise, daß bei den vom linken Auge aus sensibilisierten Tieren in die Lamellen der Hornhaut des rechten Auges je 0,1 ccm einer Tuberkulinverdünnung 1:1 000 000 eingespritzt wurde. Bei dem von der Subcutis aus sensibilisierten Tiere wurde links 0,1 ccm einer Verdünnung 1:1 000 000 und rechts 0,1 ccm einer Verdünnung 1:100 000 intralamellär eingespritzt.

Vom Auge aus sensibilisierte Tiere.

Wirkung: Nach 20 Stunden:

Kaninchen No. 12. Deutliche conjunctivale Injektion, Iris etwas geschwollen, Pupille eng, reagiert träge.

Kaninchen No. 13. Hyperämie der Iris, Pupille eng und verzogen.

Kaninchen No. 14. Starke conjunctivale Injektion, deutliche Iritis.

Nach 40 Stunden:

Kaninchen No. 12. Stichkanal stark infiltriert, Hornhaut leicht trübe, Iris verschwommen, Pupille entrundet und zackig.

Kaninchen No. 13. Ausgesprochene Iritis, Pupille reagiert nicht. Typische Randvaskularisation. Stichkanal stark, Umgebung leicht infiltriert.

Kaninchen No. 14. Schwere Keratoiritis.

Von der Subcutis aus sensibilisiertes Tier.

Wirkung: Nach 20 Stunden:

Kaninchen No. 15. Linkes Auge. Keine vollständige Resorption der injizierten Flüssigkeit, keine entzündliche Reizung.

Rechtes Auge. Iriszeichnung etwas verschwommen, Pupille eng.

Nach 40 Stunden:

Linkes Auge. Keine entzündlichen Erscheinungen.

Rechtes Auge. Am oberen Rande des Limbus feine, senkrecht verlaufende Gefäßchen. Iris geschwollen, Pupille entrundet.

Nach 3 Tagen: Beiderseits normal.

Weiterhin wurden sowohl die von der Subcutis als auch die vom linken Auge aus sensibilisierten Tiere noch intrakutan reinjiziert (3 Tage später). Und zwar erhielt jedes Tier 0,1 ccm einer Verdünnung 1:1000000 und einer Verdünnung 1:10000.

Wirkung: In keinem Falle trat eine entzündliche Reaktion an der injizierten Hautstelle auf.

II. Versuchsserie.

4 normale Kaninchen (Kaninchen No. 16, 17, 18 und 19) werden an drei aufeinander folgenden Tagen vom linken Auge aus durch Injektion von 0,1 ccm einer 1:40 verdünnten Lösung von Alttuberkulin in die Vorderkammer sensibilisiert.

Zur Kontrolle werden 2 andere normale Kaninchen (Kaninchen No. 20 und 21) von der Subcutis aus durch Injektion von je 0,1 ccm einer 1:40 verdünnten Lösung von Alttuberkulin sensibilisiert.

15 Tage nach der letzten sensibilisierenden Injektion wurden 2 der von dem linken Auge aus sensibilisierten Tiere (Kaninchen No. 16 und 17), sowie die 2 Kontrolltiere reinjiziert. Und zwar erhielten die vom linken Auge aus sensibilisierten Tiere rechts, die von der Subcutis aus sensibilisierten Tiere beiderseits je 0,1 ccm einer Tuberkulinverdünnung 1:1000000 intralamellär.

Wirkung: Nach 24 Stunden: Bei sämtlichen Tieren normale Verhältnisse.

Nach 48 Stunden: Status idem.

Kaninchen No. 18 erhält am rechten Auge 0,1 ccm einer Verdünnung 1:100000 intralamellär injiziert.

Wirkung: Nach 16 Stunden:

Rechtes Auge leichte Chemose, beginnende Randvaskularisation.

Nach 24 Stunden:

Die ganze Hornhaut ist gräulich infiltriert, besonders stark die Umgebung des Stichkanals.

Kaninchen No. 19 erhält 3 Tage vor der Reinjektion nochmals in das linke Auge (Glaskörper) 0,2 ccm einer Tuberkulinverdünnung 1:3.

Am Tage der Reinjektion ist der Glaskörper des linken Auges mit

gräulichem Exsudat ausgefüllt, so daß der Augenhintergrund nicht sichtbar ist. Rechtes Auge erhält 0,1 ccm einer Tuberkulinverdünnung 1 : 1 000 000 intralamellär.

Wirkung nach 6 Stunden:

Leichte Chemose, conjunctivale Injektion und Sekretion. Lichtscheu.

Nach 48 Stunden:

Pupille eng, reagiert träge, Stichkanal stark infiltriert.

Die hier wiedergegebenen Experimente zeigen, daß nach einer allgemeinen Sensibilisierung in der Regel auch das Auge — wie das zu erwarten und schon von anderer Seite gezeigt worden ist — sensibilisiert ist. Unsere Verdünnungsmethode ermöglichte es, den Sensibilisationseffekt genauer zu messen. Er betrug bei den Tuberkulinversuchen 1mal 10 und 3mal unter 100; bei den Pferdeserumversuchen immer unter 10. Ob überhaupt eine Sensibilisierung des Auges bei den Pferdeserumversuchen stattgefunden hatte, vermögen wir nicht zu entscheiden. Wir können nur sagen, daß der Sensibilisationseffekt 10 nicht erreicht hat, d. h. daß das Auge nicht so überempfindlich war, daß es noch auf eine 10-fache Verdünnung des normalen Entzündungstiter reagiert.

Nach einer mit denselben oder kleineren Dosen ausgeführten Sensibilisierung von einem Auge aus erwies sich das andere ebenfalls sensibilisiert, und der Sensibilisationseffekt — gemessen mit unserer Verdünnungsmethode — war bei den Tuberkulinversuchen durchschnittlich beträchtlich größer als nach der Sensibilisierung von der Subcutis aus. Er betrug nämlich 1mal 10, 2mal unter 100 und 4mal 100 (eventuell mehr).

Bei den Pferdeserumversuchen lag allerdings auch hier der Sensibilisationseffekt wieder unter 100. Ueber die mutmaßlichen Gründe hierfür möchten wir uns weiter unten äußern.

Erwähnt seien hier aber noch kurz die Prodigiosusextraktversuche. Von den 3 vom linken Auge aus 3mal sensibilisierten Tieren ging 1 Tier interkurrent ein. Von den übrigen 2 Tieren zeigte eines einen Sensibilisierungseffekt von 100, das andere einen unter 100. Beide von der Subcutis aus ebenso sensibilisierten Kontrolltiere zeigten einen Sensibilisierungseffekt von unter 100.

Also auch dieser etwas verunglückte Versuch fiel einigermaßen im Sinne einer „sympathischen Sensibilisierung“, wie wir sie eingangs definiert haben, aus.

Da wir nun bei diesen Versuchen den Eindruck hatten, daß der Grad und die Dauer der durch die sensibilisierenden Injektionen an dem einen Auge gesetzten Entzündung einen Einfluß auf das Maß der als Entzündung sich äussernden Sensibilisierung ausübte, so untersuchten wir, welche Wirkung eine nicht durch Eiweiß verursachte Entzündung des einen Auges auf die Reaktionsfähigkeit des anderen Auges gegenüber entzündlichen Reizen ausübt. Speziell nach den sensibilisierenden Pferdeseruminjektionen war — im Gegensatz zu den Tuberkulin- und Prodigiosusversuchen — die folgende Entzündung am Auge nur gering und heilte bald wieder ab, und es erschien uns nicht unmöglich, daß der geringe Sensibilisierungseffekt darauf zurückgeführt werden konnte.

Um diesen Einfluß der Entzündung an sich zu studieren, erzeugten wir bei 2 völlig normalen Kaninchen je am linken Auge durch Injektion von Krotonöl in den Glaskörper eine schwere Entzündung des ganzen Auges und injizierten nach 15 Tagen in die Hornhautlamellen des anderen völlig normalen Auges 0,1 ccm einer Tuberkulinverdünnung von 1 : 1 000 000 (= dem 100-fachen des normalen Entzündungstiters für Tuberkulin).

Gleichzeitig erhielten mit derselben Spritze von derselben Tuberkulin-Verdünnung 3 normale Kaninchen beiderseits je 0,1 ccm intralamellär eingespritzt.

Versuche über sympathische unspezifische Umstimmung.

1. Versuchsreihe.

2 normale Kaninchen (Kaninchen No. 22 und 23) erhalten je 0,2 ccm Krotonöl in den Glaskörper des linken Auges injiziert. Es tritt eine schwerste Panophthalmie auf, die bei der 15 Tage später erfolgenden Behandlung des rechten Auges noch in voller Stärke besteht.

Nach 15 Tagen wird bei beiden Tieren in die Lamellen der Hornhaut des rechten Auges 0,1 ccm einer Tuberkulinverdünnung 1 : 1 000 000 intralamellär gespritzt.

Dieselbe Menge derselben Tuberkulinverdünnung erhalten 3 normale Kaninchen (No. 24, 25 und 26) intralamellär injiziert.

Wirkung: Nach 24 Stunden:

Kaninchen No. 22. Verklebung der Lider, starke conjunctivale Sekretion. Der Stichkanal zeigte eine mächtige Infiltration, die ganze Hornhaut diffus getrübt, in der Vorderkammer Exsudat.

Kaninchen No. 23. Starke Rötung der tarsalen und bulbären Bindehaut, Chemose, starke Tränensekretion. Leichte Hyperämie der Iris.

Nach 48 Stunden:

Kaninchen No. 22. Alle entzündlichen Erscheinungen haben noch weiter zugenommen. Typische Randvaskularisation.

Kaninchen No. 23. Starke eitrig-sekretorische Sekretion, Chemose. Die ganze Hornhaut ist matt und trübe, die Gegend des Stichkanals stark infiltriert, Iris nicht sichtbar, in der Vorderkammer massiges Exsudat.

Wirkung bei den Kontrollen:

Bei Kaninchen 24, 25 und 26 wurde die injizierte Flüssigkeit resorbiert, ohne irgendwelche Entzündungserscheinungen auszulösen.

Es hat demnach die vorausgegangene und zur Zeit der Prüfung noch bestehende Entzündung des linken Auges das andere (rechte) Auge so umgestimmt, daß es auf einen Reiz, der von normalen Augen reaktionslos vertragen wurde, mit einer starken Entzündung reagierte.

2. Versuchsreihe.

Um festzustellen, ob diese Erscheinung der entzündlichen Sensibilisierung an ein bestimmtes Zeitintervall gebunden ist, wurden neue Versuchsreihen angesetzt (Versuchsreihen 2, 3 und 4), indem die Tiere 7, 14, 20 und 35 Tage nach dem Eintritt der sensibilisierenden Entzündung auf dem einen Auge, auf dem anderen Auge reinjiziert wurden.

4 normale Kaninchen (No. 27, 28, 29 und 30) erhalten am 25. VIII. 1913 je 0,2 ccm Krotonöl in den Glaskörper des linken Auges injiziert. Es tritt eine schwere Panophthalmie ein.

Am 1. IX. 1913 erfolgt bei Tier 27 und 28 die Prüfung durch intralamelläre Injektion von 0,1 ccm Alttuberkulin 1:1000000 in das rechte Auge.

Ein normales unvorbehandeltes Kontrolltier (No. 31) erhält beiderseits dieselbe Menge der Tuberkulinverdünnung intralamellär injiziert.

Wirkung: Nach 24 Stunden:

Kaninchen No. 27. Stichkanal sichtbar. Leichte conjunctivale Reizerscheinungen, sonst nichts.

Kaninchen No. 28. Wie No. 27.

Kontrollkaninchen No. 31. Stichkanal sichtbar, sonst nichts.

Nach 48 Stunden:

Kaninchen No. 27. Leichte Infiltration des Stichkanals, sonst nichts.

Kaninchen No. 28. Wie No. 27.

Kontrollkaninchen No. 31. Stichkanal kaum sichtbar, alles normal.

Nach 72 Stunden:

Bei allen 3 Tieren sind fast normale Verhältnisse zurückgekehrt.

Am 30. IX. 1913 erfolgt bei Tier 29 und 30 die Prüfung durch intralamelläre Injektion von 0,1 ccm Alttuberkulin (1:1000000) in das rechte Auge. Gleichzeitig erhält ein normales unvorbehandeltes Tier No. 32 beiderseits je 0,1 ccm derselben Tuberkulinverdünnung intralamellär injiziert.

Wirkung: Nach 24 Stunden:

Kaninchen No. 29. Die injizierte Flüssigkeit noch nicht völlig resorbiert, leichte conjunctivale Reizung.

Kaninchen No. 30. Wie No. 29.

Kontrollkaninchen No. 32. Wie No. 29.

Nach 48 Stunden:

Kaninchen No. 29. Stichkanal sichtbar, sonst nichts.

Kaninchen No. 30. Infiltration des Stichkanals, entzündliche Gefäßinjektion der Conjunctiva.

Kaninchen No. 32. Stichkanal kaum mehr sichtbar. Ganz normale Verhältnisse.

Nach 72 Stunden:

Außer bei Kaninchen No. 30, wo der Stichkanal noch deutlich infiltriert ist, überall normale Verhältnisse.

Da die Versuche der 2. Versuchsreihe dafür sprechen, daß das Intervall von 7 bzw. 35 Tagen für den Nachweis einer entzündlichen Sensibilisierung zu kurz bzw. zu lang ist, wurden in der folgenden 3. Versuchsreihe die Intervalle von 14 und 20 Tagen gewählt.

3. Versuchsreihe.

Sensibilisierung am 9. IX. 1913.

Die Kaninchen No. 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 und 40 erhalten je 0,5 ccm Krotonöl in den Glaskörper des linken Auges. Es entwickelte sich eine hochgradige Entzündung aller Augenhäute mit Beteiligung der Orbitalgewebe.

Die Prüfungsinjektion wurde bei allen Tieren intralamellär ausgeführt. Es wurde von einer Lösung von Alttuberkulin Koch 1:1 000 000 je 0,1 ccm eingespritzt.

Bei den Kaninchen 35, 36, 37 und 39 wird die Prüfung am 24. IX. (also nach 14 Tagen) ausgeführt.

Kaninchen No. 35, 36 und 39 erhalten je 0,1 ccm der obigen Verdünnung rein intralamellär, Kaninchen No. 37 intralamellär, wobei jedoch ein Teil in die Vorderkammer hineingelangt. 2 unvorbehandelte Kaninchen (No. 37a und 37b) erhalten je 0,1 ccm von derselben Verdünnung (1:1 000 000) intralamellär.

Wirkung: Nach 20 Stunden:

Kaninchen No. 39. Starke Rötung der bulbären und dorsalen Bindehaut. Die Oberfläche der Hornhaut ist gestichelt. Stichkanal hebt sich deutlich hervor. Beginnende Randvaskularisation.

Kaninchen No. 37. Conjunctivale Injektion. Leichte, aber ausgeprägte Keratitis superficialis mit typischer Vaskularisation.

Kaninchen No. 35. Bindehaut ein wenig gerötet, die Hornhaut ist leicht getrübt, die Oberfläche ist matt.

Kaninchen No. 36. Starke conjunctivale Injektion. Die Iriszeichnung ist verschwommen, die Iris gequollen, die Pupille eng und reagiert kaum.

Kaninchen No. 37a und b. Stichkanal kaum sichtbar. Keinerlei entzündliche Reaktion.

Nach 48 Stunden:

Kaninchen No. 39. Status idem. Nur die Pupille ist eng geworden und entrundet, reagiert nicht.

Kaninchen No. 37. Die Iris ist geschwollen, Pupille reagiert nicht. Oberflächliche, beinahe vollständige Trübung der Hornhaut.

Kaninchen No. 35. Die Gegend des Stichkanals zeigt starke Infiltration. Lichtscheu.

Kaninchen No. 36. Die Bindehaut ist ein wenig gerötet, im übrigen wieder normale Verhältnisse.

Kaninchen No. 37a und b. Augen normal.

Bei den anderen 4 Tieren der I. Serie (Kaninchen No. 33, 34, 38 und 40) wurde die Prüfung mit derselben Verdünnung gleicherweise am 29. IX. 1910 (also nach 20 Tagen) vorgenommen.

Alle Tiere erhielten 0,1 ccm intralamellär. Zur Kontrolle erhielt Kaninchen No. 40a (unvorbehandelt) ebenfalls 0,1 ccm derselben Tuberkulinverdünnung intralamellär.

Wirkung: Nach 20 Stunden:

Kaninchen No. 33. Nihil.

Kaninchen No. 38. Stichkanal sichtbar.

Kaninchen No. 34. Stichkanal sichtbar.

Kaninchen No. 40. Stichkanal sichtbar.

Kaninchen No. 40a. Nihil.

Wirkung: Nach 48 Stunden:

Kaninchen No. 33. Nihil.

Kaninchen No. 38. Stichkanal sichtbar.

Kaninchen No. 34. Stichkanal sichtbar.

Kaninchen No. 40. Infiltration des Stichkanals, minimale Rötung der Bindehaut.

Kaninchen No. 40a. Nihil.

Wirkung: Nach 72 Stunden:

Kaninchen No. 33, 38, 34 und 40 zeigen am linken (reinjizierten) Auge keine wesentlichen pathologischen Veränderungen mehr. Kaninchen No. 40a ist reaktionslos geblieben.

Es sind also in der 3. Versuchsreihe zusammen 8 Tiere in gleicher Weise wie früher beschrieben, mit Krotonöl vom linken Auge aus entzündlich sensibilisiert worden. Bei 4 wurde die Prüfung auf entzündliche Reaktionsfähigkeit nach 14 Tagen, bei den übrigen 4 nach 20 Tagen vorgenommen. Die 4 nach 14 Tagen geprüften Tiere erwiesen sich, wie aus den Protokollen ersichtlich ist, alle mehr oder weniger „entzündlich sensibilisiert“, d. h. sie reagierten auf einen Reiz, der vom normalen Tier reaktionslos vertragen wird, mit Entzündungserscheinungen, die allerdings nicht so stark waren wie die in der 1. Versuchsreihe beobachteten.

20 Tage nach der am linken Auge gesetzten präparierenden Entzündung war dagegen die entzündliche Sensibilisierung des rechten Auges, wie die Protokolle zeigen, kaum mehr zu bemerken.

Es wurde darum nochmals eine Versuchsserie (4. Serie) mit 14-tägigem Intervall angesetzt.

4. Versuchsreihe.

Kaninchen No. 41, 42, 43, 44.

R. A. Glaskörper: 0,5 ccm Krotonöl nach vorheriger Punktion der Vorderkammer am 15. IX. 1913.

Reinjektion am 29. IX. 1913 (also nach 14 Tagen) von je 0,1 ccm Tuberkulin 1:1000000. Bei allen ging die Injektion glatt intralamellär, nur bei Kaninchen No. 43 ist etwas in die Vorderkammer gekommen.

Wirkung: Nach 16 Stunden:

Kaninchen No. 43. Starke Infiltration des Stichkanals und in deren Umgebung.

Kaninchen No. 42. Noch nicht völlig resorbiert.

Kaninchen No. 41. Stichkanal sichtbar.

Kaninchen No. 44. Normale Verhältnisse.

Wirkung: Nach 48 Stunden:

Kaninchen No. 43. Dicke mächtige Infiltration des Stichkanals. Deutliche Hyperämie der Iris.

Kaninchen No. 42. Conjunctivale Injektion, die Lider sind ein wenig zugekniffen. Die Oberfläche der Hornhaut ist gestichelt und es

ist eine leichte oberflächliche Trübung in der Hornhaut überall sichtbar.

Kaninchen No. 41. Feine punktförmige Infiltration in der Gegend des Stichkanals, sonst normale Verhältnisse.

Kaninchen No. 44. Stichkanal kaum sichtbar.

Der Kontrollversuch (Kan. 45) zeigte wieder, daß 0,1 ccm von derselben Tuberkulinverdünnung beim unvorbehandelten Tier reaktionslos vertragen wird.

Aus der 4. Versuchsreihe geht hervor, daß bei Kan. 41, 42 und 43 14 Tage nach der durch Krotonöl gesetzten Entzündung des linken Auges, das rechte Auge gegenüber Reizen, welche Augen unvorbehandelter Tiere reaktionslos vertragen „sensibilisiert“ war, indem es mit Entzündungserscheinungen reagierte.

Bei Kaninchen No. 44 trat keine Reaktion auf.

In Folgendem sind die Versuchsergebnisse der Uebersichtlichkeit halber tabellarisch zusammengestellt (Tabelle I, II, III, IV, V und VI).

Es ergibt sich aus einer Betrachtung der Tabelle I, daß sowohl bei der Sensibilisierung vom Auge wie bei der von der Subcutis aus der Sensibilisierungseffekt unter 10 blieb, d. h. daß es nicht möglich war, mit einer Verdünnung, die um das 10-fache schwächer war als der normale Entzündungstiter, noch eine Entzündung zu erzeugen.

Damit ist nicht gesagt, daß eine Sensibilisierung überhaupt ausblieb.

Da geringere Werte nicht geprüft wurden, so ließ sich auch ein etwaiger Unterschied zwischen den beiden Sensibilisierungsarten bezüglich des Sensibilisierungseffektes nicht ermitteln.

Tabelle II dagegen läßt deutliche Unterschiede im Sensibilisationseffekt erkennen und spricht entschieden für eine sympathische Sensibilisierung im Sinne unserer eingangs gegebenen Definition. Es erscheint aber fraglich, ob diese Sensibilisierung spezifisch ist, da, wie Tabelle III—VI zeigt, eine durch Krotonöl erzeugte Entzündung, welche sich an einem Auge abspielt, das andere Auge auch andersgearteten Entzündungsreizen gegenüber sensibilisiert.

Tabelle I.
Versuche mit Pferdeserum.
Entzündungstitergrenze für das normale Auge: 1:100 000.

Kan. No.	Ort der Sensibilisierung	Sensibilisierende Dosis	Ort der Reinjektion	Reinjizierte Dosis (0,1 ccm)	Wirkung	Sensibilisierungseffekt
6	Linkes Auge	3mal 0,1 ccm einer Verd. 1:10	Rechtes Auge intralamellär	1:1 000 000	0	unter 10
7	dgl.	dgl.	dgl.	1:1 000 000	0	dgl.
8	"	"	"	1:10 000 000	0	"
9	Subcutis	3mal 0,1 ccm einer Verd. 1:10	"	1:1 000 000	0	"
10	"	dgl.	"	1:1 000 000	0	"
11	"	"	"	1:1 000 000	0	"

Tabelle II.
Versuche mit Tuberkulin.
Entzündungstitergrenze für das normale Auge 1:1000—10 000.

Kan. No.	Ort der Sensibilisierung	Sensibilisierende Dosis	Ort der Reinjektion	Reinjizierte Dosis (0,1 ccm)	Wirkung ¹⁾	Sensibilisierungseffekt ²⁾
12	Linkes Auge	3mal 0,1 ccm einer Verd. 1:50	Rechtes Auge intralamellär	1:1 000 000	++	100
13	dgl.	dgl.	dgl.	1:1 000 000	++	100
14	"	"	"	1:1 000 000	++	100
16	"	3mal 0,1 ccm einer Verd. 1:40	"	1:1 000 000	0	unter 100
17	"	dgl.	"	1:1 000 000	0	unter 100
18	"	"	"	1:100 000	++	10
19 ⁵⁾	"	"	"	1:1 000 000	+	100
15	Subcutis	3mal 0,1 ccm einer Verd. 1:50	beiderseits	L. A. 1:1 000 000 R. A. 1:100 000	0 +	unter 100 10
20	"	3mal 0,1 ccm einer Verd. 1:40	"	L. A. } je R. A. } 1:1 000 000	0 0	unter 100 " 100
21	"	dgl.	"	L. A. } je R. A. } 1:1 000 000	0 0	" 100 " 100

1) 0 = keine Wirkung; + = deutliche Wirkung; ++ = starke Wirkung; +++ = sehr starke Wirkung.

2) Unter Zugrundelegung von 1:10 000 als normalem Entzündungstiter = 1.

3) Zwei Tage vor der Reinjektion eine Einspritzung von 0,2 ccm Tuberkulin einer Verdünnung 1:3 in den Glaskörper des linken Auges.

Tabelle III.

Versuche über unspezifische entzündliche Umstimmung.
(1. Versuchsreihe; 14-tägiges Intervall.)

Kan. No.	Ort der Sensibilisierung	Sensibilisierende Dosis	Ort der II. Injektion	Art der II. Injektion	Wirkung ¹⁾	Umstimmungseffekt
22	Linkes Auge (Glaskörper)	0,2 ccm Krotonöl	Rechtes Auge (intralamellär)	Tuberkulin (1 : 1 000 000)	++	100
23	dgl.	dgl.	dgl.	0,1 ccm dgl.	++	100
Kontrollen:						
24	—	—	L. A.) intra- R. A.) lamellär	dgl.	0 0	—
25	—	—	dgl.	„	0 0	—
26	—	—	„	„	0 0	—

Tabelle IV.

Versuche über unspezifische entzündliche Umstimmung.
(2. Versuchsreihe; 7- bzw. 35-tägiges Intervall.)

Kan. No.	Ort der Sensibilisierung	Sensibilisierende Dosis	Ort und Zeit der II. Injektion	Art der II. Injektion	Wirkung	Umstimmungseffekt
27	Linkes Auge (Glaskörper)	0,2 ccm Krotonöl	Rechtes Auge (intralamellär) nach 7 Tagen	Tuberkulin (1 : 1 000 000)	? (±)	100 ?
28	dgl.	dgl.	dgl.	0,1 ccm dgl.	? (±)	100 ?
29	„	„	dgl. (nach 35 Tagen)	„	0	0 (jedenfalls unter 100)
30	„	„	dgl.	„	?	100 ?
Kontrollen:						
31	—	—	L. A.) intra- R. A.) lamellär	„	0 0	0 (jedenfalls unter 100)
32	—	—	dgl.	„	0 0	0 (jedenfalls unter 100)

1) 0 = keine Wirkung; + = deutliche Wirkung; ++ = starke Wirkung; +++ = sehr starke Wirkung.

Tabelle V.

Versuche über unspezifische entzündliche Umstimmung.
(3. Versuchsreihe; 14- und 20-tägiges Intervall.)

Kan. No.	Ort der Sensibilisierung	Sensibilisierende Dosis	Ort und Zeit der Prüfungs-injektion	Art der Prüfungs-injektion	Wirkung	Umstimmungseffekt
35	Linkes Auge (Glaskörper)	0,5 ccm Krotonöl	Rechtes Auge (nach 14 Tagen)	0,1 ccm Tub. 1 : 1 000 000 intralamellär	+	100
36	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	+	100
37	"	"	"	"	+	100
39	"	"	"	"	+	100
33	"	"	Rechtes Auge (nach 20 Tagen)	"	0	0 (jedenfalls unter 100)
34	"	"	dgl.	"	0	0 (jedenfalls unter 100)
38	"	"	"	"	0	0 (jedenfalls unter 100)
40	"	"	"	"	±	100 ?
Kontrollen:						
37 a	—	—	L. A. (nach 14 Tagen)	"	0	0
37 b	—	—	R. A. (20 Tagen)	"	0	0
40 a	—	—	dgl.	"	0	0
			"	"	0	0

Tabelle VI.

Versuche über unspezifische entzündliche Umstimmung.
(4. Versuchsreihe; 14-tägiges Intervall.)

Kan. No.	Ort der Sensibilisierung	Sensibilisierende Dosis	Art der Prüfungs-injektion	Ort und Zeit der Prüfungs-injektion	Wirkung	Umstimmungseffekt
41	Linkes Auge (Glaskörper)	0,5 ccm Krotonöl	Tuberkulin (1 : 1 000 000) 0,1 ccm	Rechtes Auge (intralamellär)	±	100 ?
42	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	+	100
43	"	"	"	"	+	100
44	"	"	"	"	0	0 (jedenfalls unter 100)
Kontrollen:						
45	—	—	Tuberkulin (1 : 1 000 000) 0,1 ccm	L. A. (intralamellär) R. A. (intralamellär)	0	0
					0	0

Diese unspezifische, entzündliche Sensibilisierung gegenüber einem Entzündungsreiz, der für das Auge der unvorbehandelten Tiere regelmäßig unterschwellig war, d. h. von diesem reaktionslos vertragen wurde, konnte zwar nicht mit absoluter Regelmäßigkeit, aber doch so häufig beobachtet werden, daß die Annahme einer Zufälligkeit von der Hand zu weisen ist. Es scheint, daß diese entzündliche Umstimmung zeitlich begrenzt ist. Sie war am 8. Tage nach der artifiziellen Entzündung des einen Auges noch nicht zu beobachten, am 14. Tage dagegen mit ziemlicher Regelmäßigkeit, während sie am 20. und 35. Tage wieder nicht oder nicht deutlich nachweisbar war.

Unsere hier mitgeteilten Versuche dürften für das Verständnis der sympathisch auftretenden Entzündungen des Auges (inkl. der Ophthalmia sympathica) und vielleicht auch anderer symmetrisch angelegter Organe von Bedeutung sein, besonders wenn man sie zusammennimmt mit dem von uns in einer früheren Arbeit (Zeitschr. f. exper. Medizin) erbrachten Nachweis, daß im Falle einer allgemeinen oder lokalen Infektion mit Bakterien oder auch Bakterieneiweiß Entzündungsstoffe im Blute zirkulieren.

Zusammenfassung.

Durch intralamelläre Einspritzungen in das Kaninchenauge konnte folgendes festgestellt werden:

1) Alttuberkulin wirkt bei intralamellärer Einspritzung in das Kaninchenauge noch in Verdünnungen von 1:1000 bis 1:10000 entzündungserregend.

2) Durch $\frac{1}{2}$ -stündige Erhitzung auf $56,0^{\circ}$ C inaktiviertes Pferdeserum wirkt in Verdünnungen bis 1:100000 entzündungserregend.

3) Es wurde versucht, ob sich nach Sensibilisierung von einem Auge aus eine „sympathische Anaphylaxie“ im anderen Auge nachweisen läßt. Wir verstehen unter sympathischer Anaphylaxie eine Sensibilisierung, welche von einem der symmetrisch angelegten Organe ausgeht, und das andere in einen Zustand von Ueberempfindlichkeit versetzt, der

an Intensität die der übrigen Körpergewebe (z. B. die der Haut) übertrifft.

a) Bei Versuchen mit Pferdeserum ließ sich eine solche sympathische Sensibilisierung in stärkerem Maße nicht nachweisen.

b) Bei Versuchen mit Tuberkulin ließ sich dagegen eine beträchtliche sympathische Sensibilisierung in dem obigen Sinne feststellen.

4) Bei Kaninchen, deren eines Auge durch Injektion von Krotonöl in einen Zustand stärkster Entzündung versetzt worden war, erwies sich das andere Auge häufig als sensibilisiert gegenüber einem Reiz, der vom Auge unvorbehandelter Tiere reaktionslos vertragen wurde (intralamelläre Injektion von 0,1 ccm einer Tuberkulinverdünnung 1:1 000 000).

5) Es ergibt sich daraus die Möglichkeit einer entzündlichen unspezifischen Sensibilisierung symmetrisch angelegter Organe, und es erscheint deshalb fraglich, ob die oben erwähnte sympathische Sensibilisierung nach Tuberkulininjektion, sowie die früher von anderen Autoren unter ähnlichen Bedingungen beobachtete Anaphylaxie am Auge rein spezifischer Natur ist.

6) Die unspezifische entzündliche Umstimmung oder Sensibilisierung des Auges war in unseren Versuchen zeitlich begrenzt; sie war am ausgesprochensten etwa 14 Tage nachdem das andere Auge in den Zustand der Entzündung versetzt worden war. Am 7. Tage war noch keine Sensibilisierung zu konstatieren, und vom 20. Tage ab war der Grad der Sensibilisierung wieder gering oder fehlte ganz.

7) Der von uns in einer früheren Arbeit geführte Nachweis, daß im Falle einer allgemeinen oder lokalen Infektion mit Bakterien oder Bakterieneiweiß entzündungserregende Stoffe zirkulieren, zusammen mit dem in dieser Arbeit erbrachten Nachweis spezifischer und unspezifischer entzündlicher Sensibilisierung symmetrischer Organe, bringt uns dem Verständnis der sympathisch auftretenden Entzündungen, besonders auch der Ophthalmia sympathica, wesentlich näher.

:

Nachdruck verboten.

The Complement-Fixation Test in Tuberculosis.

By **Elizabeth T. Fraser, M. D.,**

late Assistant Bacteriologist, Glasgow Royal Infirmary,
Beit Research Fellow.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. November 1913.)

The search for antibodies in the blood serum of tuberculous animals has occupied the attention of many Immunitists since the year 1890, when the discovery of antitoxins was announced by von Behring and Kitasato.

During the fifteen years that followed this announcement, discoveries of previously unknown antibodies came in rapid succession — agglutinins, precipitins, bacteriolysins, haemolysins, opsonins, etc. — and with each new discovery the hope arose that some light might be thrown on the obscure question of the Immunity reactions in Tuberculosis.

In tuberculous serum, agglutinins, precipitins, opsonins and amboceptors have been found, but the notable feature brought out by the research work on each one of these substances is its extraordinary inconstancy and variability.

The present research was undertaken with a two-fold object:

I. To determine, as a matter of scientific interest, the relative frequency of the occurrence of tuberculous complement-fixing antibodies in the blood serum of tuberculous and of normal persons.

II. To determine, as a matter of practical importance, the diagnostic significance of a positive tubercle complement-fixation reaction and the value, if any, of the complement-fixation test as a guide to Tuberculin treatment.

Many questions of great interest to the Immunitist hinge around this subject of anti-tuberculous amboceptors. The fact remains, however, that the frequency of occurrence and the amount of these antibodies in human serum has, so far, been very inadequately investigated. One reason for this has probably been the difficulty of obtaining serum in sufficient quantities from tuberculous patients, and the even greater difficulty of obtaining serum from normal persons.

For this reason it was thought well to make use of clinical opportunities to carry out a research on the content of complement-fixing antibodies in the serum of patients, tuberculous and non-tuberculous.

No "doubtful" or "suspected" cases were taken. In all the cases designated "tuberculous", the diagnosis had been confirmed either by operation (tuberculous glands, peritonitis, etc.) or by finding the tubercle bacillus in the sputum. The cases designated "non-tuberculous" were all persons who had been clinically diagnosed as free from Tuberculosis. With all other tests (Tuberculin reaction, agglutinin test, v. Pirquet reaction, etc.) this latter class has invariably yielded a large percentage of positive reactions; with the present experiments, however, this has not been the case.

Account of experiments performed. Sera of tuberculous and non-tuberculous persons were examined for antibodies capable of causing complement fixation in presence of a tuberculous antigen. The first step was to discover which was the most effective antigen; the following were tested:

- I. Old Tuberculin.
- II. Koch's Bacilli Emulsion (B.E.).
- III. An emulsion made from Koch's "zerriebene Tuberkelbacillen".
- IV. An extract of tuberculous spleen.
- V. An extract of tuberculous gland.
- VI. Albumose-free Tuberculin.
- VII. Various emulsions of tubercle bacilli:
 - a) Emulsion of glycerinated egg culture.
 - b) Emulsion of glycerine-glucose agar culture (dead).
 - c) Emulsion of glycerine-glucose agar culture (dead).
 - d) Emulsion of glycerine-glucose agar culture (dead).
 - e) Emulsion of glycerine-glucose agar culture (dead).
 - k) Emulsion of glycerinated potato culture (live).

The methods of preparing these will be described later.

The antigen must be titrated before each day's experiments as variations occur in all, and in some the change from one day to another may be quite considerable. This is especially the case with the emulsions of tubercle bacilli. If kept at room temperature, these gain in complement-fixing power for some weeks, the gain being specially marked during the first few days after the emulsion is made. If put in the ice-chest the emulsions quickly sustain a great loss of their complement-fixing power.

Old Tuberculin, on the other hand, does not vary greatly in titer; 0.25 c. c. generally gives no trace of spontaneous fixation, when tested with

corpuscles sensitised with at least three lysing doses of haemolytic serum. If the sensitisation of the corpuscles is less the Old Tuberculin may show inhibition in the dose of 0.15 c. c. or even 0.1 c. c.

The dose of Old Tuberculin used in the experiments was never more than half the non-fixing dose; generally 0.12 c. c. or 0.1 c. c. was, therefore, employed. The quantity of the tubercle bacilli emulsion used was likewise half the non-fixing dose.

The serum (inactivated) was tested in varying doses, e. g. 0.4, 0.2, 0.1 c. c., and a serum control put up for each patient. The serum itself rarely shows any spontaneous fixation, even in large doses, unless in the event of it being old or bacterially contaminated.

The complement used was 0.1 c. c. of fresh serum of a guinea-pig killed on the day of the experiment.

Sheep's corpuscles, sensitised with three or four times the lysing dose of rabbit-sheep amboceptor, were used as the "indicator".

Each ingredient was made up to 1 c. c. with sterile, normal saline solution, as in the original Wassermann reaction; each tube, therefore, contained 5 c. c.

At least one known negative and one positive serum were tested each day along with the others, as controls.

Results of experiments.

I. With Old Tuberculin as antigen.

Number of tuberculous sera tested	146
a) positive reactions	73
b) negative reactions	73

The number of tuberculous cases which give a positive reaction with Old Tuberculin — 50 %.

Number of non-tuberculous sera tested	119
a) positive reactions	21
b) negative reactions	98

The number of non-tuberculous cases which give a negative reaction with Old Tuberculin — 82 %.

Note. This number includes many old sera; if quite fresh sera are invariably used, the percentage of negatives will be still higher.

II. With Koch's tubercle bacilli emulsion as antigen.

This emulsion contains the entire substance of triturated tubercle bacilli. Most workers, including Wassermann and Bruck, and Morgenroth and Rabinowitsch, had

worked with this emulsion and found it as effective as Old Tuberculin. In the present experiments this was not the case and the use of B. E. as an antigen was soon abandoned. The non-fixing dose was generally about 0.2 c. c.; in the tests 0.1 c. c. was used.

Number of tuberculous sera tested	13
a) positive reactions	1
b) negative reactions	12

The number of tuberculous cases which gave a negative reaction with B.E. was 92 %.

Number of non-tuberculous sera tested	20
a) positive reactions	4
b) negative reactions	16

Note. The four cases which gave a positive reaction were syphilitics with positive Wassermann reaction; if these are excluded the number of non-tuberculous cases which gave a negative reaction was 100 %.

III. With an emulsion of Koch's „zerriebene Tuberkelbacillen“ as antigen.

0.1 gr. z. T.B. was rubbed down in an agate mortar with 10 c. c. normal saline. The emulsion was then shaken with glass beads, in a shaking machine at 37° C. for two consecutive days. It was centrifugalised for fifteen minutes and the supernatant fluid was decanted and used as antigen. The results with this antigen were very disappointing.

Number of tuberculous sera tested	17
a) positive reactions	2
b) negative reactions	15

The number of tuberculous sera which gave a negative reaction — 88 %.

Number of non-tuberculous sera tested	11
a) positive reactions	1
b) negative reactions	10

The number of non-tuberculous sera which gave negative reaction — 90 %.

IV. With an extract of tuberculous guinea-pig spleen as antigen.

This was found unsatisfactory and was soon discarded. The percentage of positive reactions was small — 39 % in tuberculous and non-tuberculous cases alike.

V. With an extract of tuberculous guinea-pig gland as antigen.

Like antigen IV, this was unsatisfactory.

VI. With Albumose-free Tuberculin as antigen.

It was thought that by using Tuberculin from which Albumose had been eliminated, a number of non-specific complement-fixations might be avoided. The results were very disappointing; 90 % of tuberculous cases gave a negative reaction.

VII. With various emulsions of tubercle bacilli as antigen.

Six different emulsions were employed. Of these, one was prepared from a culture on glycerinated egg, four were from glycerine-glucose-agar cultures, and one was from a culture on glycerinated potato. The bacilli were dead in all cases except in the emulsion from the potato culture. Tubercle bacilli of the "typus humanus" were invariably used. Attempts had been made to prepare an antigen from bacilli of the "typus bovinus", but this type never yielded such a homogenous emulsion or showed reliable antigenic powers. Each emulsion was titrated on the day on which it was prepared and also before each series of experiments. Kept at room temperature, these emulsions retain their antigenic properties for at least six to eight weeks; kept in the ice-chest, they rapidly lose these properties.

Number of tuberculous sera tested	111
Number of non-tuberculous sera tested	69
Total	180
Percentage of positive reactions in tuberculous cases	42,3
Percentage of negative reactions in non-tuberculous cases	96,6

The best emulsion was that prepared from the culture on glycerinated potato (antigen "K"). Live tubercle bacilli of the "typus humanus" were used. The emulsion was left at room temperature for three days before using. Gengou had shown that the slight traces of potato, which of necessity get scraped off and rubbed down in the emulsion, do not in any way affect the results. With this emulsion, the figures were as follows:

Number of tuberculous sera tested	13
a) positive reactions	8
b) negative reactions	5

The number of tuberculous cases which gave a positive reaction — 61%.

Number of non-tuberculous sera tested	8
a) positive reactions	0
b) negative reactions	8

The number of non-tuberculous sera which gave a negative reaction — 100%.

Sera, tuberculous and non-tuberculous, tested after preliminary saturation with sheep's corpuscles.

Holmgren explains the fact that positive reactions are obtained only in a certain percentage of all tuberculous cases, as due to the presence of lytic substances in the serum. If these substances are removed by saturation with sheep's blood corpuscles, a positive reaction is obtained in a much larger percentage of cases.

In order to test this, a number of tuberculous and non-tuberculous sera received a preliminary treatment with sheep's blood corpuscles and were then tested for antibodies.

To 1 c. c. of serum in a glass centrifuge tube, 0.2 c. c. of a 5% emulsion of sheep's washed corpuscles was added. After standing for one hour at 37 C., the mixture was centrifuged and the serum pipetted off and tested in the ordinary way with an emulsion of tubercle bacilli as antigen.

Number of tuberculous sera tested (after preliminary treatment with corpuscles)	22
a) positive reactions	15
b) negative reactions	7

The number of tuberculous cases which gave a positive reaction — 68 %.

Number of non-tuberculous sera tested	
(after preliminary treatment with corpuscles)	7
a) positive reactions	2
b) negative reactions	5

It is to be observed, however, that the two non-tuberculous sera which gave positive reactions were syphilitic; if these are excluded the number of non-tuberculous sera giving a negative reaction — 100 %.

Note. These tests were carried out with antigens "D" and "E". Antigen "D" is weak; therefore, this method promises well with a good antigen such as "K" and preliminary saturation with sheep's corpuscles.

Effect of Tuberculin treatment on the antibody content of the serum of tuberculous patients.

Wassermann and Bruck had found that, in the blood of patients treated with Old Tuberculin or Koch's bacilli emulsion, antibodies can generally be demonstrated. Their statistics, however, were not convincing and their technique was open to objections.

A number of sera were therefore examined of patients undergoing treatment with preparations of tubercle bacilli. The results confirmed those of Wassermann and Bruck.

Number of cases tested	18
a) positive reactions	15
b) negative reactions	3

The number of tuberculous cases, undergoing specific treatment, which gave a positive reaction — 83 %.

Note. Fifteen of the patients were being treated with P. T. O., one with B. E. and two with Beraneck's Tuberculin.

Zusammenfassung.

1) Mit Hilfe der Komplementablenkungsmethode kann man im Serum von Tuberculosekranken (Lungen-, Drüsen-, Knochen-, Bauchfelltuberkulose) spezifische Antikörper nachweisen.

2) Diese Antikörper kommen im Serum von tuberkulosefreien Individuen nicht vor. Bei diesen Fällen beträgt der

20*

Prozentsatz der negativen Reaktionen 96,6, bei Anwendung einer Emulsion aus Tuberkelbacillen als Antigen. Syphilitiker-sera zeigen in vielen Fällen mit einem Antigen aus Tuberkelbacillen positive Reaktion.

3) Die Technik ist zurzeit noch unvollkommen, um die Verhältnisse bei Tuberkulosefällen vollständig aufzuklären. Mit der angewandten Methode bekommt man in 50 Proz. der beginnenden und vorgeschrittenen Fälle positive Reaktion, wenn man Alttuberkulin als Antigen anwendet. Nimmt man Emulsionen aus Tuberkelbacillen als Antigen, so beträgt der Prozentsatz der positiven Reaktion 42,3.

4) Es ist zu hoffen, daß bei verbesserter Technik dieser Prozentsatz zunehmen wird. Dies wird ermöglicht durch Anwendung einerseits eines starken Antigens (z. B. Antigen K, das 61 Proz. positive Reaktionen gab) und andererseits der Absorptionsmethode von Holmgren. Diese letzte ergab mit einem schwachen Antigen (Antigen D) 68 Proz. positive Reaktionen.

5) Die Zahl der positiven Reaktionen bei Fällen von Tuberkulose, die mit Tuberkulin behandelt worden sind, ist beträchtlich höher (83 Proz.), als bei den nicht behandelten Fällen. Wegen der geringen Zahl der untersuchten Fälle ist es nicht möglich, daraus Folgerungen zu ziehen. Es kann sich um Zufälligkeiten handeln. Um in dieser Richtung eine definitive Entscheidung zu treffen, müßten viel mehr Sera von behandelten Fällen vor und nach der Behandlung geprüft werden.

6) Das zuverlässigste Antigen lieferten Emulsionen aus lebenden Menschentuberkelbacillen. Alttuberkulin ist wohl ein stärkeres Antigen dafür, es ist aber weniger spezifisch. Tuberkulosefreie Fälle geben mit Alttuberkulin 82 Proz., mit Emulsionen aus Tuberkelbacillen 96,6 Proz. negative Reaktionen. Es muß bemerkt werden, daß die Sera bei den ersten Versuchen mit Alttuberkulin nicht ganz frisch waren. Einige hatten 1—2 Wochen im Eisschrank gestanden. Solche Sera, obwohl sie frei von Bakterien sind, können eine positive Reaktion geben, die natürlich unspezifisch ist. Es ist wahrscheinlich, daß, falls ganz frische Sera verwendet werden, der Prozentsatz der negativen Reaktion bei tuberkulosefreien

Fällen höher wird. Trotzdem sind die Emulsionen von Tuberkelbacillen das beste Antigen. Die Tuberkelbacillen dürfen nur wenige Wochen alt sein und bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. Sie müssen frei von anderen Bakterien sein. Mit einem solchen Antigen bekommt man in 100 Proz. der tuberkulosefreien Fällen negative Reaktionen.

7) Der diagnostische Wert der Komplementablenkung, mit einer geeigneten Emulsion angestellt, ist wahrscheinlich größer als irgendeine andere Reaktion auf Tuberkulose, die man zurzeit kennt. Die Versuche zeigen, daß eine positive Reaktion für Tuberkulose beweisend ist, vorausgesetzt, daß man Syphilis ausschließen kann. Eine negative Reaktion beweist leider nicht das Fehlen von Tuberkulose, da man in 50 Proz. von Tuberkulosefällen negative Reaktion bekommt. Eine bessere Technik kann vielleicht diesen Nachteil beseitigen. Es ist auch möglich, daß eine große Anzahl von Tuberkulosefällen in ihren Seris keine Antikörper aufweisen — ein Umstand, der den diagnostischen Wert der Komplementablenkungsmethode einschränken muß.

Nachdruck verboten.

[Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Institutes für Krebsforschung in Heidelberg (Direktor: Exz. Czerny).]

Beiträge zum Studium der Hämolyse.

Von Dr. **Ernst Fränkel.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. November 1913.)

1. Einfluß von Narkoticois auf die Hämolyse¹⁾.

Von Wolfsohn und v. Dungern ist darauf hingewiesen worden, daß in der Narkose entnommene Sera eine positive Wassermannsche Reaktion geben können, die sich als unspezifisch erweist. Dies war die Veranlassung für uns, den Einfluß der Narkotika einerseits auf den Verlauf der

1) Nach einem Vortrag im Naturhistor.-mediz. Verein in Heidelberg am 20. Mai 1913. Ref. Münch. med. Wochenschr., 1913, No. 34, p. 1913.

Komplementhämolyse, andererseits auf das Verhalten des Serums zu untersuchen.

Chloroform und Aether haben, wohl durch Einwirkung auf die Lipide, die Fähigkeit, rote Blutkörperchen zu lösen.

a) Einwirkung auf das Komplement.

Läßt man dagegen Chloroform auf das hämolytische Komplement (Meerschweinchenserum) einwirken, so erhält man eine Aufhebung seiner Wirksamkeit. Verwendet wurde zunächst Hammelblut, ein Kaninchenambozeptor 1:5120 in 2-fach lösender Dosis bei 2,5 ccm Gesamtvolumen. In einer Reihe a wurde Komplement hinzugesetzt, das zur Kontrolle einige Minuten mit einem Glasstab verrührt und dann ebenfalls 1 Stunde bei 27° im Brutschrank aufbewahrt war.

In der 2. Reihe b wurde die gleiche Komplementmenge (10 ccm 1:20) mit 10 ccm Aether verrieben und dann offen in einer Schale zum Abdunsten des Aethers ebenso aufbewahrt. Eine 3. Reihe c wurde in gleicher Weise mit Chloroform behandelt.

Das Resultat ergab komplette Lösung:

(Protokoll vom 24. IV.)

Nach $\frac{1}{2}$ Stunde bei a) 0,4 (1:20), b) 0,5 (1:20); bei c) 2,0 (1:20) komplette Hemmung.

Nach 1 Stunde bei a) 0,3 (1:20), b) 0,3 (1:20); bei c) 2,0 (1:20) komplette Hemmung.

Wir sehen also eine geringe Schädigung der hämolytischen Kraft durch Aether nach $\frac{1}{2}$ Stunde und eine außerordentlich intensive Schädigung durch Chloroform, so daß mit den untersuchten Dosen keine Spur von Hämolyse erzielt wurde.

Dasselbe Komplement ergab am folgenden Tage mit 20-fach sensibilisierten Hammelblutkörperchen komplette Hämolyse in den Dosen 1,0, 0,8 und 0,5 (1:10) in $\frac{1}{2}$ Stunde, während es nach Chloroformierung in den gleichen Dosen auch nach 1 Stunde noch keine Spur von Hämolyse aufwies.

Dieselben Resultate erhielten wir bei 2-fach sensibilisiertem Rinderblut. Hierbei erwies es sich als gleichgültig, ob das Chloroform mit verdünntem oder mit unverdünntem Komplement zusammengebracht wurde. Wurden die sen-

sibilisierten Blutkörperchen vom Chloroformkomplement abzentrifugiert und die an sich wirksame Dosis frischen Komplementes von 0,8 und 0,5 (1:20) zu diesen hinzugefügt, so trat komplette Hämolyse nach 1 Stunde wie bei den Kontrollen ein. Dies beweist, daß die Chloroformwirkung lediglich das Komplement betraf und sich nicht den sensibilisierten Blutkörperchen mitteilte. In einem 2. Versuch mit 20-fach sensibilisierten Hammelblutkörperchen und 2-fach sensibilisiertem Rinderblut vom 26. IV. war gleichfalls durch Chloroformierung eine deutliche Hemmung in den Dosen 0,5 und 0,2 (1:20) mit Hammelblut und 0,2 (1:10) mit Rinderblut gegenüber dem gleichbehandelten nicht chloroformierten Komplement nachweisbar. Während bei schwach sensibilisierten Rinderblutkörperchen sowohl ein schwächer wirkendes älteres als ein frisches Komplement durch Zusatz von Chloroformkomplement deutlich geschädigt wurde (Protokoll vom 25. IV.), war bei 20-fach sensibilisiertem Hammelblut nur eine Hemmung des alten Komplementes durch die Dosen 0,2 und 0,1 des 1:10 verdünnten Chloroformkomplementes nachweisbar.

Auch ein an Normalambozeptoren reiches Komplement, das Rinderblutkörperchen löste, büßte diese Eigenschaft nach der Chloroformierung ein und löste weder allein noch mit 2-facher oder 10-facher Ambozeptordosis an demselben oder am folgenden Tage (28. IV.). Die Rolle, welche das relative Verhältnis von Komplement- und Chloroformmenge spielt, geht aus einem Versuch vom 29. IV. hervor. Während das Kontrollkomplement a nach $\frac{1}{2}$ Stunde bis 0,8 (1:10) nach 1 Stunde bis 0,5 (1:10) und nach 2 Stunden bis 0,3 (1:10) komplett löste, blieb bei 5 ccm Komplement 1:10 + 5 ccm Chloroform (b) die Hämolyse noch bei 1,0 (1:10) völlig aus. Natürlich wurde auch hier stets dasselbe Komplementgemisch verwendet und im übrigen durch Rühren mit dem Glasstab und 2-stündiges Verweilen im Brutschrank gleichmäßig behandelt. Untersucht wurde 2-fach sensibilisiertes Rinderblut.

Wurden vom Komplement 1:10 dagegen 25 ccm mit 5 ccm Chloroform behandelt (c), so löste nach $\frac{1}{2}$ Stunde 1,0 (1:10) nach 1 Stunde 0,6, nach 2 Stunden 0,4. Die Abschwächung war also auch hier viel schwächer als bei b, aber

doch so deutlich, daß auch bei 10-fach sensibilisiertem Rinderblut komplette Hämolyse in folgenden Dosen eintrat:

In	$\frac{1}{2}$	1	2 Stunden
von a	0,3	0,2	0,1
von c	0,4	0,3	0,2

Die Untersuchungen zeigen eine gute Uebereinstimmung mit ähnlichen Befunden von Kraus und Eisler.

Gleichsinnig fielen Versuche vom 30. IV. und 5. V. aus, bei denen sich zeigte, daß 10 ccm Komplement 1:10 weder durch 10 ccm Aether noch durch 2 ccm Chloroform geschädigt wurden, dagegen durch Chloroformdosen von 5—20 ccm. Die Grenze der Schädigung fand sich bei 3—4 ccm Chloroform auf 10 ccm Komplement 1:10. Um der irrtümlichen Deutung des infolge der Kürze vielleicht mißverständlichen Referates¹⁾ durch Bass und Klaussner zu entgegnen, sei betont, daß hier wie bei den späteren Serumversuchen das Chloroform ebenso wie sie es selbst taten, wieder entfernt wurde und die Wirkung auf eine durch das Zusammensein mit dem Narkotikum hervorgerufene Schädigung zurückgeführt wurde. Um einen Beweis für diese Auffassung zu erbringen, wurde das zur Verdünnung des Komplementes dienende NaCl 0,85 Proz. mit Chloroform geschüttelt. Doch war weder beim Schütteln mit 1 ccm Chloroform noch mit 10 ccm Chloroform auf 9 ccm NaCl-Lösung wobei Sättigung mit Chloroform anzunehmen ist, gegenüber dem ohne Chloroform zur Verdünnung des Komplementes verwendeten NaCl eine Einwirkung auf das Komplement nachweisbar. Es scheint also nicht das in Lösung gehende Chloroform die Schädigung zu verursachen (Protokoll vom 14. V.).

b) Einwirkung auf menschliche Sera.

Von Umkehrungen der Wassermannschen Reaktion durch Chemikalien (Kohlehydrate etc.) berichtet Rominger. Das gleiche Verhalten konnten wir bei einer Reihe von Seren nach der Vorbehandlung mit Chloroform beobachten (Protokolle April—Mai 1913). Die Sera wurden mit Chloroform in wechselnden Mengen in offenen Schalen im Brutschrank aufgestellt

1) Münch. med. Wochenschr., 1913, No. 34.

und das Chloroform durch Abdunsten entfernt. Ein Teil der Sera wurde erst inaktiviert, dann chloroformiert, der andere umgekehrt behandelt. Im ganzen zeigten von 6 positiven Sera 4 unveränderte Reaktion, 1 wurde selbsthemmend, 1 reagierte schwächer, von 18 negativen Sera zeigten 8 mehr oder weniger starke Hemmung nach der Chloroformbehandlung. Nach unseren Protokollen konnte die Umkehrung der Reaktion sowohl bei den vorher als auch bei den nachher inaktivierten Sera beobachtet werden [s. Bass und Klaussner¹⁾].

Die in vivo beobachtete Beeinflussung der Wassermannschen Reaktion war also auch durch Behandlung des Serums mit Chloroform in vitro nachzuahmen.

2. Untersuchungen bei der Seifen-Hämolyse.

Die interessanten Analogien, welche von Liebermann und Noguchi zwischen dem Verhalten hämolytischer Immunsera und Komplemente einerseits und Serumalbumin-Säure-Seifengemischen andererseits gefunden wurden, veranlaßten uns einige Versuche in dieser Richtung zu unternehmen. Besonders interessant war der Versuch von Noguchi, wonach ambozeptorbeladene Blutkörperchen von Seifengemischen besser gelöst wurden als ohne Ambozeptor. Diese Versuche waren von Hecker nicht bestätigt, v. Dungern und Coca als verstärkte Komplementwirkung des erwähnten Meerschweinchenserums gedeutet worden.

Wir verwandten Hammelblutkörperchen und einen hochwertigen (1:2400) Ambozeptor vom Kaninchen. Als Seifenlösung diente 0,1-prom. Natr. oleinic. (Sapo medicalis) in physiologischer Kochsalzlösung. Diese löste Hammelblut (1 ccm 5-proz.) in $\frac{1}{2}$ Stunde in der Menge von 0,2 komplett. 4-fach ($\frac{1}{600}$ ccm) sensibilisiertes Blut wurde dagegen in derselben Zeit von 0,1 derselben Seifenlösung komplett gelöst. In Uebereinstimmung mit Noguchi fanden wir bei Anwendung größerer Ambozeptordosen (12-fach $\frac{1}{200}$ ccm) wieder Lösung bis 0,2, bei 120-facher ($\frac{1}{20}$ ccm) nur bei 0,5 in derselben Zeit, also keine Wirkung oder sogar eine Hemmung bei Ambozeptorüberschuß.

1) Biochem. Zeitschr., Bd. 56, Oktober 1913.

Die in gleicher Weise angestellten Versuche unter Hinzufügen von $\frac{1}{600}$, $\frac{1}{200}$ und $\frac{1}{20}$ ccm von normalem und gegen Schweineblutkörperchen gerichteten hämolytischen Immunkaninchenserum ergaben in den Dosen $\frac{1}{600}$ und $\frac{1}{200}$ keine Beeinflussung der Seifenhämolyse, in der Dosis $\frac{1}{20}$ dagegen gleichfalls Hemmung derselben. Letztere wurde auch durch die gleiche Dosis anderer Normalsera erzielt (Liebermann).

Wir können also durch schwache Sensibilisierung eine Verstärkung der Seifenhämolyse erzielen, die wohl auf den Einfluß des Immunkörpers (Ambozeptor) zurückzuführen ist. Diese bleibt bei größeren Ambozeptormengen aus. Bei Verwendung größerer Serummengen tritt eine uncharakteristische, allen Sera eigene Hemmungswirkung der Seifenhämolyse ein, die vielleicht auf den Ca-Gehalt des Serums und der Bildung von Ca-Seifen beruht.

Zusammenfassung.

1) Chloroform und in viel schwächerem Grade auch Aether schädigt durch den bloßen Kontakt das hämolytische Komplement in seiner Wirksamkeit.

2) Die Chloroformwirkung ist von der Menge resp. dem Verhältnis des zugesetzten Chloroforms zum Serum abhängig, dagegen unabhängig von der Menge des absorbierten Chloroforms und der Konzentration des Komplementes. Die Wirkung teilt sich nicht den sensibilisierten Blutkörperchen mit.

3) Chloroformkomplement hat eine hemmende Wirkung auf intaktes Komplement.

4) Manche Sera erleiden nach Chloroformvorbehandlung eine Veränderung in ihrem Verhalten bei der Wassermannschen Reaktion, so daß Sera, die vorher negativ reagierten, nachher hemmen. Gelegentlich wurde auch Auftreten von Eigenhemmung bei vorher positiven Sera beobachtet.

5) Kleine Ambozeptordosen fördern die Wirkung der Seifenhämolyse, größere lassen sie unbeeinflusst.

6) Bei ganz großen Serummengen, $\frac{1}{20}$ ccm, tritt eine unspezifische, bei vielen Sera beobachtete Hemmung der Seifenhämolyse hervor.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygienischen Institute (Prof. Bail) und der Augenklinik der deutschen Universität Prag.]

Ueber die Grundlagen der anaphylaktischen Theorie der sympathischen Ophthalmie.

Von Prof. **Elschnig**, Prag.

(Eingegangen bei der Redaktion am 18. November 1913.)

Die Untersuchungen von Rados¹⁾ scheinen, wenn man nur die zusammenfassenden Bemerkungen berücksichtigt, die Feststellungen zu widerlegen, die ich bezüglich des Auftretens von komplementbindenden Antikörpern durch parenterale Einverleibung von Uvea + Pigmentepithel in zahlreichen Versuchen gemacht hatte. Rados kommt daher zu dem Schlusse, daß die von Bail und mir aufgestellte Hypothese der anaphylaktischen Entstehung der sympathischen Ophthalmie nicht zu Recht bestehen könne. Es ist hier keineswegs der Platz, in ausführlicher Weise auf die Theorien der sympathischen Ophthalmie, auch nicht auf die neueste derselben — die anaphylaktische — einzugehen. Es scheint mir aber doch gerechtfertigt, die nach der Zusammenfassung Rados' anscheinend große Diskrepanz zwischen seinen eben veröffentlichten Untersuchungsergebnissen und meinen Ergebnissen und einschlägigen Beobachtungen zu erklären, und bei dieser Gelegenheit einige kleine Irrtümer der erstgenannten Arbeit richtigzustellen.

Rados hat meine Untersuchungen nur insoweit nachgeprüft, als er Kaninchen mit arteigener und artfremder Uveaemulsion immunisiert hat und zwar durch intravenöse Injektion, und die auftretenden Antikörper durch die von mir angewandte Methode der Komplementablenkung ebenso untersucht hat, wie die nach Einverleibung von anderen Organen, bezüglich Organteilen entstehenden Immunreaktionen. Er bestätigt die mangelnde Artspezifität der durch Uveainjektionen erzeugten Antikörper, betont aber, daß er auch eine Organspezifität nicht finden konnte und glaubt daraus die Unrichtigkeit der von uns aufgestellten Theorie folgern zu können.

Ich muß zunächst feststellen, daß wir weder bei unseren einschlägigen Untersuchungen, noch bei unseren Schlußfolgerungen eine absolute Organspezifität als nachgewiesen angegeben haben. Aus den Tabellen XI,

1) Rados, Ueber das Auftreten von komplementbindenden Antikörpern nach Vorbehandlung mit arteigenen Gewebezellen, nebst Bemerkungen über die anaphylaktische Entstehung der sympathischen Ophthalmie. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Therapie, Bd. 19, 1913, Heft 5, p. 579 ff.

XII, XIV (p. 526) und aus der Zusammenfassung p. 546 meiner Arbeit¹⁾ ergibt sich doch mit voller Sicherheit die Richtigkeit unserer Schlußfolgerungen für die von uns gewonnenen Immunsera, dahingehend, daß die durch parenterale Einverleibung artfremder Uveaemulsion im Blute des Kaninchens entstehenden Antikörper „nicht streng organspezifisch und nicht artspezifisch“ sind, sowie daß den in analoger Weise erzeugten Isoantikörpern „keine Artspezifität“, wohl aber eine „gewisse“ Organspezifität zukommt. Es besteht also ein vollständig diametraler Gegensatz zwischen meinen und Rados' Resultaten nicht. Die scheinbaren Gegensätze verringern sich aber noch wesentlich, wenn wir die einzelnen Tabellen der Radosschen Arbeit eingehend studieren.

So ist aus Tabelle I zu ersehen, daß das durch Injektion arteigener Uvea gewonnene spezifische Immunsereum (0,20 ccm) mit 0,1 Aderhautemulsion so gut wie vollständig hemmt, dagegen mit derselben Dosis Hornhautemulsion und Nierenemulsion als Antigen komplette Hämolyse zeigt. Nur 0,5 aller dieser Antigene bewirkt eine gleichartige Hemmung.

In Tabelle II zeigt sich allerdings, daß 0,3 Nierenemulsion und 0,3 Hornhautemulsion ebenso komplett hemmen, wie 0,3 Aderhautemulsion, dagegen gibt 0,1 Aderhautemulsion als Antigen nur spurenweise Lösung — also auch noch starke Komplementbindung, aber diese Dosis wurde weder für Hornhautemulsion, noch für Nierenemulsion ausgeprüft. Der Versuch ist also nicht ganz austitriert und dürfte dann dasselbe Resultat gegeben haben wie Tabelle I.

Tabelle III läßt wahrnehmen, daß das Immunsereum mit nicht genügend variierten Antigenmengen austitriert wurde; denn 0,1 Nierenemulsion läßt sich natürlich nicht mit 0,3 Aderhautemulsion vergleichen. Dasselbe ergibt sich bei der Betrachtung der anderen, weniger interessierenden Tabellen (Versuche 3, 4, 5, 6 und 7), welche den hämolytischen Titer von Immunsereis zeigen, die durch Injektion von Kaninchen-Nierenemulsion und -Hornhautemulsion erzeugt wurden.

Ebenso gibt wieder speziell Tabelle VIII einen unvollständigen Versuch. 0,2 Aderhautimmunsereum gibt zwar in gleicher Weise mit 0,3 Hornhautemulsion und 0,3 Aderhautemulsion komplette Hemmung, aber auch ebenso mit 0,1 Aderhautemulsion, während mit 0,3 Nierenemulsion schon eine Spur Hämolyse auftritt. Die Vergleichszahl 0,1, die, wie gesagt, für Aderhautemulsion noch komplette Hemmung gibt, fehlt bei Nierenemulsion und Hornhautemulsion. Aus diesem Beispiele ersieht man, daß Rados bei genauer Austitrierung wohl zu denselben Resultaten wie wir gelangt wäre.

Dann müssen wir noch besonders betonen, daß reine Versuche, d. h. rein bezüglich des zur Immunisierung verwendeten Antigens, eigentlich nur

1) Elschnig, Studien zur sympathischen Ophthalmie. 2. Die antigene Wirkung des Augenpigmentes. v. Graefes Arch. f. Ophthalm., Bd. 76, 1910, Heft 3, p. 510 ff.

unsere Versuche¹⁾ genannt werden können, welche mit chemisch rein dargestellten Uvea-Netzhautpigment angestellt wurden. Denn der Uvea-emulsion ist nicht nur Blut, sondern auch Bindegewebe beigemischt, und gerade für Bindegewebe haben die neueren Untersuchungen gezeigt, daß es in hohem Grade zur Erzeugung von Organantikörpern jeder Art geeignet ist.

Ich muß hier besonders betonen, daß bei der Anwendung chemisch reinen Augenpigmentes zur Immunisierung die Organspezifität gegenüber der Artspezifität so sehr in den Vordergrund trat, daß ich in der Schlußfolgerung sagen konnte: „Das Augenpigment wirkt ausgesprochen organ- und nicht artspezifisch“ (l. c. p. 441). Diese ausschließlich allein maßgebenden Untersuchungen, die jedenfalls viel schwerer ins Gewicht fallen, als die zufolge der Beimischung von Blut und Bindegewebe bei der Uveaemulsion unreinen Versuche mit Uvea hat Rados nicht nachgeprüft.

Ferner vermissen wir in den Untersuchungen von Rados die Vermeidung jener Fehlerquelle, welche bei unseren ersten Experimenten eine vielwöchentliche Arbeit vollständig illusorisch gemacht hatte, d. i. die Beseitigung der in jedem Kaninchenimmunserum vorhandenen normalen Hämolyse für Hammelblut. Endlich würde doch auch, um so schwerwiegende Einwände gegen die Richtigkeit unserer Versuche zu rechtfertigen, vorausgesetzt werden müssen, daß eine genaue Austitrierung mit fallendem Antigen und fallenden Antikörpern hätte stattfinden müssen.

Berücksichtigt man diese Einwände gegen die Untersuchungstechnik und berücksichtigt man die allerdings lückenhaften Tabellen Rados (speziell Tabelle I und VIII), so ergibt sich eigentlich eine vollkommene Übereinstimmung mit unseren Uveaemulsion-Versuchen, um so mehr als wir da nie von einer strengen, sondern immer nur von einer „gewissen“ Organspezifität gesprochen und diese durch Tabellen erhärtet haben.

Schließlich bin ich Rados dafür außerordentlich dankbar, daß er die von mir begonnenen Versuche der Isoimmunisierung mit Uvea in so reicher Zahl und mit so besonders schönem Erfolge fortgesetzt hat. Denn es genügt wohl für die Annahme irgendeiner sensibilisierenden Wirkung antigen resorbierten Uveapigmentes für die Uvea, wenn überhaupt der Nachweis der Entstehung von Antikörpern durch die Injektion arteigener Uvea erbracht ist, wenn es auch ohne weiteres klar ist, daß diesen Antikörpern niemals absolute Spezifität innewohnt. Für die Pathogenität der Immunkörper für die Uvea bezüglich anaphylaktischer Wirkung kommt natürlich nur die für die Uvea spezifische Komponente in Betracht, während die für andere Organe wirksame Komponente überhaupt nicht in Erscheinung tritt. Es läßt sich eben nur an der Uvea im klinischen Bilde die anaphylaktische Reaktion greifbar demonstrieren, während eventuelle

1) Elsch nig-Salus, Studien zur sympathischen Ophthalmie. IV. Die antigene Wirkung der Augenpigmente. Arch. f. Ophthalm., Bd. 79, 1911, p. 428.

anaphylaktische Wirkungen an anderen Organen, wie Leber, Niere u. dgl. überhaupt nicht bemerkbar werden.

Es scheint mir nicht zutreffend, daß, wie Rados anführt, die Untersuchungen von Kümmell¹⁾ (ebensowenig aber auch die ersterem Autor noch unbekanntem Dialysierversuche der neuesten Zeit), welche in einem gewissen Prozentsatze von Fällen von sympathischer Ophthalmie, aber ebenso auch von anderen Uveaerkrankungen eine positive Reaktion im Sinne von Uveantikörpern ergaben, gegen unsere Theorie sprechen. Ich glaube in genügender Deutlichkeit ausgeführt zu haben, daß nicht nur die Grundlage für die Anaphylaxie, sondern auch ein auslösendes Moment zusammentreffen müssen, um die sympathische Ophthalmie zu erzeugen.

Da ich die von Rados zitierten Einwände E. v. Hippels gegen meine Theorie ausführlich widerlegt zu haben glaube, erübrigt mir hier ein Eingehen auf die diesbezüglichen Bemerkungen Rados. Gerade die so häufige Doppelseitigkeit aller Uveaerkrankungen, auch der Retinochorioiditis, spricht für die anaphylaktische Theorie.

Endlich muß ich richtigstellen, daß ich niemals versucht habe, „alle Fälle und Modifikationen der sympathischen Augenentzündung mit Hilfe meiner Anschauung zu erklären“ (Rados, p. 580). Ich habe es im Gegensatz klipp und klar ausgesprochen, daß diese Theorie nur für die Uveitis gelten kann, daß andererseits das Vorkommen von anderen sympathischen Affektionen des zweiten Auges, wie Papillo-Retinitis und Atrophia nervi optici mir nicht genügend bewiesen erscheint, daß sie aber, wenn sie primär (d. h. nicht etwa im Anschlusse an eine verborgene Uveitis) vorkommen, keinesfalls im Sinne unserer Theorie erklärt werden können.

So ergibt sich eigentlich durch Rados Untersuchungen eine vollständige Bestätigung der experimentellen Grundlagen der anaphylaktischen Theorie.

1) Kümmell, Nachtrag zu meiner Arbeit: Versuche einer Serumreaktion der sympathischen Ophthalmie. Graefes Arch. f. Ophthalm., Bd. 84, 1913, Heft 3, p. 440 ff.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygienischen Institut der Kgl. Universität zu Neapel
(Direktor: Prof. Vincenzo De Giaxa).]

**Ueber das Verhalten des Kochschen Alttuberkulins
bei gesunden Tieren.**

Von Dr. Donato Franceschelli, Assistenten.

(Eingegangen bei der Redaktion am 7. November 1913.)

Aus den Untersuchungen über das Verhalten des Tuberkulins bei tuberkulösen und gesunden Tieren darf man übereinstimmend mit einer größeren Anzahl von Forschern schließen, daß das Tuberkulin, während es für kranke Individuen sehr giftig ist, fast keine Giftigkeit zeigt, wenn man es gesunden Tieren einverleibt. Die experimentellen Forschungen von Ruppel und Rickmann (1) beweisen, daß das Tuberkulin nur auf tuberkulöse Tiere eine Wirkung ausübt. Beide Autoren fanden z. B., daß tuberkulöse Meerschweinchen binnem 24 Stunden sterben, wenn man ihnen 0,05—0,1 ccm Alttuberkulin einspritzt, während gesunde Meerschweinchen 8—10 ccm Alttuberkulin ohne allgemeine Reaktion vertragen und noch viel größere Mengen vertragen würden, wenn die gleichzeitige Anwesenheit von nicht-spezifischen Stoffen, wie Pepton, Glycerin, Albumose usw., welche im Tuberkulin enthalten sind, die Tiere schädigen würde. Ein Präparat von getrocknetem reinen Tuberkulin, welches in der Menge von 0,001 g mit Sicherheit tuberkulöse Meerschweinchen tötete, wird von gesunden Meerschweinchen in der Menge von 0,5 g, was 50 ccm Alttuberkulin entspricht, ohne Schaden vertragen.

Diese kleinste, vielfach abwechselnde Empfindlichkeit von normalen Individuen gegenüber Tuberkulin nimmt nach der wiederholten Behandlung mit derselben Substanz nicht zu; denn es scheint, daß das Tuberkulin keine immunisatorische Reaktion bei gesunden Tieren hervorruft. Man kann also sagen, daß das Tuberkulin für nicht tuberkulöse Tiere kein Antigen darstellt.

Auf Grund der von Pickert und Löwenstein (2) entdeckten spezifischen antitoxischen Antikörpern im Serum von tuberkulösen Individuen, die mit großen Tuberkulinmengen behandelt wurden, fanden Hamburger und Monti (3), daß den gänzlich tuberkulosefreien Individuen die Eigenschaft fehlt, nach Einspritzung von Tuberkulin solche Antikörper zu erzeugen. Vielmehr unterscheiden beide Forscher nach ihren Untersuchungen drei Fälle von Unempfindlichkeit gegenüber Tuberkulin, die sie

als Unempfindlichkeit gesunder Individuen, Antituberkulinimmunität tuberkulöser Individuen und antianaphylaktische Unempfindlichkeit tuberkulöser Individuen, bei welchen kein Antituberkulin vorkommt, bezeichnen.

Ich werde bei einer anderen Gelegenheit das Vorhandensein von zwei Antigenen im Tuberkulin erörtern, welches die beiden oben genannten Autoren übereinstimmend mit Doerr annehmen. Es handelt sich dabei um ein Antitoxin hervorrufendes Antigen, das Antituberkulin, und ein anaphylaktische Antikörper erzeugendes. Ich werde dann auch auf die bemerkenswerte Eigenschaft solcher Antigene, nämlich Antigenwirkungen nur bei tuberkulösen Tieren zu erzeugen, hinweisen. Für diese Arbeit genügt es, sich die Tatsache zu merken, daß bei Normaltieren keine Antikörper gegen Tuberkulin vorkommen, und daß, wie aus Laubs (4) Versuchen hervorgeht, nur tuberkulöse Meerschweinchen nach Einspritzung von Tuberkulin komplementbindende Substanzen bei Gegenwart von Tuberkulin liefern, während gesunde Meerschweinchen weder diese Fähigkeit besitzen, noch durch das anaphylaktische Phänomen zu reagieren vermögen. Kaninchen und Ziegen verhalten sich ebenso wie Meerschweinchen.

Ich möchte noch hinzufügen, daß Borissjak, Sieber und Metalnikow (5) aus experimentellen Untersuchungen bei Meerschweinchen, Ziegen und Schafen schließen, daß das Tuberkulin nicht nur keine Antikörper bei gesunden Tieren erzeugt, sondern auch die Bildung von anderen Antikörpern der tuberkulösen Substanzen verhindert, da die Substanz zu gleicher Zeit mit Tuberkelwachs oder entfetteten Tuberkelbacillen den Tieren injiziert, eine kleinere Menge spezifischer Antikörper hervorruft, als wenn man nur Tuberkelwachs oder entfettete Bacillen injiziert hätte.

Im Gegensatz zu den Versuchen der obengenannten Forscher nehmen Bertarelli und Data (6) an, daß Hunde und Kaninchen, mit sehr kleinen Tuberkulindosen behandelt, komplementablenkende Substanzen liefern. Man muß aber dabei berücksichtigen, daß in normalen Kaninchen-seris, welche in den Experimenten der oben erwähnten Autoren ein größeres Vermögen aufweisen, komplementbindende Substanzen in Gegenwart von Tuberkulin zu erzeugen, als Hundesera, das Vorkommen solcher Stoffe auch ohne vorherige Behandlung schon von anderen Autoren bewiesen worden ist. Gegen die Natur dieser Substanzen als Immunkörper spricht auch die Tatsache, daß sie schon nach 2—5 Einspritzungen erscheinen, was einen zu kleinen Zeitraum für einen immunisatorischen Vorgang darstellt. Beiden Forschern gelang es übrigens nicht, die Kutireaktion bei empfindlichen Tieren zu verhindern, wenn das angewandte Tuberkulin vorher mit solchen Seris behandelt wurde.

Durch die fehlende Reaktion des gesunden Organismus gegen Tuberkulin und durch die schon festgestellte Tatsache, daß Tuberkulin nur bei tuberkulösen Tieren giftig ist, wird es unsicher, auf welche Weise das so eigenartige Verhalten des Tuberkulins erklärt werden soll. In der Tat, man darf entweder annehmen, daß normale Individuen keinen Rezeptor für Tuberkulin besitzen, und daß sie empfindlich werden nur infolge der Infektion mit lebenden Tuberkelbacillen, indem die Mikroorganismen die Zellen so modifizieren, daß in letzteren die Bildung von Rezeptoren angeregt wird; oder es kann auch sein, daß das an und für sich ungiftige oder wenig giftige Tuberkulin bei tuberkulösen Tieren Bedingungen findet, die den Stoff in eine sehr giftige Substanz verwandeln. Je nach dem Sitze der Einspritzung und der Menge der injizierten Substanz können lokale und allgemeine wichtige Phänomene hervorgerufen werden. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten scheint mir keine andere wahrscheinliche zu existieren, besonders nach der großen Anzahl von Untersuchungen über die Tuberkulinreaktionen und nach den erfolglosen Versuchen der passiven Uebertragung der Tuberkulinüberempfindlichkeit. Ich werde später einige von mir unternommene Untersuchungen veröffentlichen, in welchen diese Frage experimentell behandelt wird, und dann werde ich auch Gelegenheit haben, die Ergebnisse der verschiedenen Autoren über diesen Gegenstand zu erörtern.

In dieser Arbeit möchte ich die interessante Frage behandeln, in welcher Weise das Tuberkulin aus dem normalen Organismus ausgeschieden wird.

Nimmt man die von mir aufgestellte Hypothese über die Wirkungsweise des Tuberkulins auf kranke Tiere an, so muß man entweder annehmen, daß die Ueberempfindlichkeit durch einen Mangel an cellulären Rezeptoren hervorgerufen wird, in diesem Falle muß das nicht assimilierbare Tuberkulin quantitativ ausgeschieden werden; oder das Tier zeigt keine Empfindlichkeit, weil das Tuberkulin ungiftig ist, wobei die injizierte Substanz, je nachdem spezifische Rezeptoren vorkommen oder nicht, assimiliert oder ausgeschieden wird. Die kleine oder fehlende Giftigkeit des Tuberkulins scheint mir, nach den oben erwähnten Versuchen von Ruppel und

Rickmann, nicht mehr zweifelhaft; es bleibt nur noch die Frage der Assimilierbarkeit des Tuberkulins übrig, welche durch die folgenden von mir angestellten Versuche erklärt wird. In dieser Arbeit habe ich folgende Ueberlegungen gemacht: gesunden Tieren große Mengen Alttuberkulins zu injizieren und quantitativ im Harn und qualitativ im Blut bis zum vollständigen Schwund des Toxins aus dem Kreislauf dasselbe zu bestimmen. Im Anfang erwies sich die Aufgabe als sehr schwer, besonders schwer war es, das Tuberkulin genau zu bestimmen. Ich glaube alles am besten gelöst zu haben, indem ich der von mir in einer anderen Arbeit (7) angegebenen Technik gefolgt bin, welche ich weiter unten kurz zu erwähnen Gelegenheit haben werde.

Es wurde Kaninchen und Meerschweinchen Kochsches Alttuberkulin eingespritzt, das ich im Institut bereitet hatte und dessen Giftigkeit auf tuberkulöse Meerschweinchen bestimmt wurde. Das Tuberkulin, in der Menge von 0,15 ccm subkutan eingespritzt, tötete sicher in 24 Stunden ein tuberkulöses Meerschweinchen von 360—400 g Körpergewicht in der 4.—5. Woche der Krankheit; ferner gab es positive Intradermoreaktion, wenn man den kranken Tieren 0,1 ccm einer 1:500 verdünnten Lösung, also 0,0002 g Tuberkulin injizierte. Die von mir angewandte Technik wurde schon in der oben zitierten Arbeit angegeben. Ich hielt es für notwendig, die kleinste Menge von Substanz zu bestimmen, welche noch die Intradermoreaktion auslöste, da ich annahm, daß das Tuberkulin quantitativ ausgeschieden wird. Verdünnt man also den Harn dem früheren Tuberkulininhalt entsprechend, so müßte man damit positive Intradermoreaktion bekommen. Waren konzentriertere Verdünnungen als 1:500 notwendig, um die Intradermoreaktion auszulösen, so zeigte diese Tatsache, daß ein Teil des Tuberkulins vom Blutkreislauf nicht eliminiert worden ist. Die Bestimmung des Tuberkulins im Harn wurde bei gesunden Kaninchen, welche vorher 2 ccm Tuberkulin pro 1 kg Gewicht in die Bauchhöhle bekommen hatten, vorgenommen. Ich injizierte 2 Kaninchen und sammelte den 24-stündigen Harn. Letzterer wurde auf das entsprechende Volumen des injizierten Tuberkulins eingeengt und davon folgende Verdünnungen bereitet: 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400 und 1:500. Mit jeder Verdünnung prüfte ich 4 tuberkulöse Meerschweinchen auf die Intradermoreaktion.

Alle Tiere gaben positive Reaktion, und daraus mußte ich schließen, daß das Tuberkulin in 24 Stunden quantitativ ausgeschieden wird. Tuberkulöse Meerschweinchen, bei welchen die Intradermoreaktion mit Harn von nicht behandelten Tieren ausgeführt wurde, zeigten keine lokale und allgemeine Reaktion.

Zwei andere Kaninchen wurden nach der obengenannten Weise behandelt, aber von diesen sammelte ich nur den 12-stündigen Harn; auch für diese Tiere zeigte die Intradermoreaktion, daß das eingespritzte Tuberkulin quantitativ ausgeschieden war. Endlich der Harn, welcher in den ersten 6 Stunden von zwei anderen mit Tuberkulin injizierten normalen Kaninchen gewonnen war, gab in den Verdünnungen des für die Einspritzungen angewandten Tuberkulins auch positive Intradermoreaktion. Im Gegensatz dazu zeigte der nach 3 Stunden nach der Einspritzung gesammelte Harn die Intradermoreaktion bis zur Verdünnung 1 : 400.

Aus meinen Experimenten darf man schließen, daß das Tuberkulin sehr rasch und quantitativ aus dem Blutkreislauf eliminiert wird: die Ausscheidung ist nach 3 Stunden fast vollständig, nach 6 Stunden vollständig.

Da die Ergebnisse, die ich mit Tuberkulin bekommen habe, mit denen von anderen Autoren mit verschiedenen Antigenen, wie Diphtherie- und Tetanustoxin, heterologen Seris und Bakterien nicht im Einklang waren, denn alle Forscher finden, daß die obengenannten Substanzen ziemlich lange im Blutstrom kreisen, so war ich genötigt, noch zu versuchen, ob minimale Tuberkulinmengen nach der Zeit meiner Beobachtungen im Blute vorkommen. Zu diesem Zwecke verwendete ich die Komplementbindungsmethode.

Um Tuberkulinantikörper zu bekommen, bediente ich mich der von Laub angegebenen Methode (s. oben) und injizierte tuberkulösen Meerschweinchen am 12. Tage der Infektion zunehmende Tuberkulinmengen. Am Anfang spritzte ich 1 ccm einer 1 : 100 000stel Tuberkulinlösung in die Bauchhöhle ein und während eines Monats wiederholte ich alle 8 Tage die Einspritzung mit steigenden Mengen, bis endlich das Tier 1 ccm einer 1 : 20 000 Tuberkulinlösung, also 0,00005 ccm Tuberkulin bekam. Es wurden 8 Meerschweinchen nach dieser Methode behandelt und 9 Tage nach der letzten Einspritzung wurden die Tiere entblutet und das Blut aseptisch aufgefangen. Das Serum wurde, nach Inaktivierung bei 56° C, in Gegenwart von Tuberkulin für die Komplementablenkung verwendet. Nur drei Seris waren reaktionsfähig und lenkten 0,2 ccm—0,1 ccm frisches Meerschweinchenkomplement ab, bei Gegenwart von 0,1 ccm einer 1-proz. Tuberkulinkochsalzlösung, also 0,001 ccm Tuberkulin. Für die Reaktion wurden sensibilisierte Rinderblutkörperchen verwendet.

Das bei 56° C inaktivierte Serum der gesunden, mit Tuberkulin behandelten Kaninchen, denen 6 Stunden nach der Injektion Blut entnommen wurde, gab in der Menge 0,2 ccm und in Gegenwart der drei Tuberkulinimmunseris keine Komplementbindungsreaktion.

Dieses Ergebnis zeigte, daß keine Spur des eingespritzten Tuberkulins im Blute des gesunden Organismus mehr vor-

handen war und daß die Nieren ganz durchlässig für diese Substanz sind.

Es blieb nur noch ein Zweifel. Wie ich schon früher erwähnt habe, nehmen einige Forscher, unter anderen Doerr, Hamburger und Monti an, daß im Tuberkulin zwei Antigene, nämlich ein Toxin und ein komplementbindendes, Ambozeptoren erzeugendes Antigen vorhanden sind. Die Tatsache, daß das Serum der mit Tuberkulin injizierten Tiere keine komplementbindende Substanz, in Gegenwart von Antituberkulinseris, enthält, konnte das Verschwinden des ambozeptorerzeugenden Antigens, nicht aber des das echte Toxin erzeugenden, beweisen. Um dies zu entscheiden, spritzte ich 4 gesunden Meerschweinchen eine nicht giftige Tuberkulinmenge subkutan ein, und nach 6 Stunden entblutete ich sie. Ich hatte schon beobachtet, daß das von mir angewandte Tuberkulin in der Menge von 2 ccm ohne Gefahr von Meerschweinchen von mittlerem Körpergewicht vertragen wird.

Dementsprechend injizierte ich 2 ccm Tuberkulin den zu untersuchenden 4 Meerschweinchen und 6 Stunden nach der Einspritzung entblutete ich sie und sammelte das sterile Blut, um nachher das Koagulum in einem Porzellanmörser mit sterilem Quarzsand zu zerreiben. Der Brei wurde in physiologischer Kochsalzlösung mit Chloroform aufgeschwemmt und während 24 Stunden im Brutschrank bei 37° C gehalten; dann wurde filtriert, im Wasserbade eingeengt, noch einmal filtriert und im Wasserbad getrocknet, und endlich der Rückstand in 1 ccm steriler, physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Mit 0,1 ccm einer solchen Lösung für jedes Meerschweinchen führte ich die Intradermoreaktion mit negativem Erfolge aus, so daß ich schließen mußte, daß das Tuberkulin aus dem Blutkreislaufe ganz verschwunden war.

Vergleichen wir die Tatsache, daß der nicht-tuberkulöse Organismus das Tuberkulin nicht assimilieren kan, mit der für diese Substanz außerordentlichen Empfindlichkeit von tuberkulösen Individuen, so dürfen wir annehmen, daß die für gesunde Tiere atoxische Tuberkulinwirkung dem Fehlen von spezifischen Tuberkulinrezeptoren in Normalseren zuzuschreiben ist. Für die Empfindlichkeit eines Tierorganismus gegen das Tuberkulin ist es erforderlich, daß die Körperbestandteile vorher von den lebenden Kochschen Bacillen modifiziert wurden, da nur die Keime dem Körper gestatten, gegen das gebildete oder künstlich eingeführte Tuberkulin zu reagieren. Wie bedeutend diese Tatsache für die Immunisierung gegen das

Tuberkulin ist, liegt auf der Hand. Eine Immunisierung gegen die einzelnen Bestandteile der Tuberkelbacillen ist heute zweifellos möglich, und es ist wahrscheinlich, daß in den immunisatorischen Prozessen auch die lebenden Tuberkelbacillen vom Tierorganismus vernichtet werden können. Es findet aber keine Immunisierung gegen das Tuberkulin statt, wenn der Organismus von den lebenden Tuberkelbacillen keine Veränderung erfahren hat. Nur wenn sich die Krankheit entwickelt, wird die Immunisierung mit sehr kleinen Tuberkulinmengen möglich, wie aus den Untersuchungen verschiedener Autoren hervorgeht. Die Sterilisierung der tuberkulösen Tiere gegen injizierende Keime ist durch die positive Schutzimpfung oder durch die Einführung von keimtötenden Substanzen zu versuchen. Die Zukunft wird diese Frage entscheiden und uns den Weg für den Kampf gegen die Tuberkulose zeigen.

Zusammenfassung.

- 1) Nicht-tuberkulöse Tiere assimilieren kein Tuberkulin.
- 2) Die Substanz wird sehr schnell eliminiert, und die Elimination ist nach 6 Stunden bei Meerschweinchen und Kaninchen vollständig.
- 3) Nach dieser Zeit kann man keine Spur der injizierten Substanz mit Hilfe der Komplementbindungsmethode (ambozeptorerzeugendes Antigen) oder der Intradermoreaktion (Toxinantigen) nachweisen.
- 4) Dementsprechend ist eine Immunisierung der gesunden Tiere gegen Tuberkulin nicht möglich, weil denselben die Zellen fehlen, die Tuberkulinrezeptoren besitzen.

Literatur.

- 1) Ruppel und Rickmann, *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Orig., Bd. 4, p. 344.
- 2) Pickert und Löwenstein, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1908, No. 52, p. 2262—2263.
- 3) Hamburger und Monti, *Münchener med. Wochenschr.*, No. 25, p. 1330, und *Beitr. z. Klin. d. Tuberkulose*, Bd. 16, Heft 3. p. 271.
- 4) Laub, *Wien. klin. Wochenschr.*, 1909, No. 31.
- 5) Borissjak, Sieber und Metalnikow, *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, Orig., Bd. 12, p. 65.
- 6) Bertarelli und Dold, *Centralbl. f. Bakt.*, Orig., Bd. 58, Heft 2, p. 1951.
- 7) Franceschelli, Die Arbeit ist noch nicht in *Annales de l'Institut Pasteur* erschienen.

Nachdruck verboten.

[Aus der experimentell-biologischen Abteilung (Prof. H. Sachs) des Königl. Institutes für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M. (Direktor: Wirklicher Geheimer Rat Prof. Dr. P. Ehrlich).]

Ueber das biologische Verhalten roher und gekochter Milch.

(Immunisierungs- und Komplementbindungsversuche.)

Von

Regierungsarzt Dr. **R. Kudicke** und Prof. Dr. **H. Sachs**,
Daressalam. Mitglied des Instituts.

(Eingegangen bei der Redaktion am 8. November 1913.)

Die Prüfung des Verhaltens verschiedenartiger Antigene gegenüber thermischen Einflüssen bei der Komplementbindung hat nicht zu einem einheitlichen Ergebnis geführt. Während man wohl zunächst auf Grund der Erfahrungen mit den Antigenen tierischer Blutsera verallgemeinernd auf eine Thermolabilität oder wenigstens auf die Coctolabilität der die Komplementbindung vermittelnden Antigene zu schließen geneigt war, zeigten die Erfahrungen mit Antigenen andersartiger Herkunft, daß die Resistenz der Antigene weitgehend variieren kann. Im Gegensatz zu der ausgesprochenen Coctolabilität des Blutserums besitzen z. B. bakterielle Antigene (Weil), sowie das Kasein (Bauer) eine sehr erhebliche Resistenz. Bei diesen Differenzen erschien die Analyse der Frage nicht ohne Interesse, ob die Verschiedenheiten des Verhaltens durch die eigentliche Konfiguration des als Antigen fungierenden Substrats bedingt sind, oder ob für eine mehr oder weniger erhebliche Thermoresistenz gewisser Antigene mehr die sekundären Faktoren des physikalischen Zustandes und der chemischen Zusammensetzung des Milieus maßgebend sind. Um in dieser Hinsicht einen näheren Einblick zu erlangen, mußte es zweckmäßig erscheinen, solche Substrate als Antigene zu verwenden, in denen mehrere Antigenkomponenten vorhanden und einer differenzierenden Analyse mittels der Komplementbindung zugänglich sind.

Es war von vornherein naheliegend, zu einer derartigen Untersuchung die Milch heranzuziehen. Durch die Untersuchungen von Bauer¹⁾ und Kollmeyer²⁾ wissen wir nämlich, daß die Milch bei der Komplementbindung durch unzweifelhafte Coctostabilität charakterisiert ist, wie das im übrigen älteren Angaben der Autoren (Schütze, Uhlenhuth, Müller, Moro, Fuld u. a.) über das präzipitinogene Verhalten der Milch entspricht³⁾. Während jedoch bei der Komplementbindung durch das Zusammenwirken von Milch und homologem Antiserum („Laktoserum“) der Kaseingehalt der Milch als Antigen dominiert, besitzt die Milch in dem Molkeneiweiß noch andere Antigenkomponenten, die zu den Eiweißantigenen des Blutserums in nächsten Beziehungen stehen. Nachdem bereits Gengou⁴⁾ über gewisse Unterschiede zwischen Kasein, Laktalbumin und Laktoglobulin bei der Komplementbindung berichtet hatte, wurde die Milch in ihrem Verhalten bei der Komplementbindung besonders von J. Bauer, der zuerst die Komplementbindung zur Differenzierung der Milcharten heranzog⁵⁾ und die Vorzüge dieser Methode gegenüber der Präzipitation scharf formulierte, eingehend analysiert.

Eine große Reihe von Untersuchungen galten der Beantwortung der Frage, ob sich die durch chemische Verfahren isolierten Eiweißstoffe der Milch auch biologisch differenzieren lassen. Wenn wir von einer Erörterung früherer Versuche von Hamburger, Schlossmann und Moro u. a. mittels der Präzipitationsmethode hier absehen zu dürfen glauben, so ergaben die Arbeiten Bauers⁶⁾, sowie diejenigen von Bauer und Engel⁷⁾, Kollmeyer⁸⁾, daß sich die Eiweißkörper der Milch durch Komplement-

1) J. Bauer, Berl. klin. Wochenschr., 1910, No. 18.

2) F. Kollmeyer, Zeitschr. f. Biol., Bd. 54, 1910, p. 64.

3) Bezüglich der in vorliegender Arbeit nicht angeführten Literatur über das präzipitinogene Verhalten der Milch und über Milchpräzipitine sei auf die Darstellung von Uhlenhuth und Steffenhagen „Die biologische Eiweißdifferenzierung mittels der Präzipitation“, Handbuch der pathog. Mikroorganismen, 2. Aufl., Bd. 3, 1913, p. 257, verwiesen.

4) O. Gengou, Ann. Inst. Pasteur, T. 16, 1902, p. 734.

5) J. Bauer, Münch. med. Wochenschr., 1908, No. 16.

6) J. Bauer, Zeitschr. f. exp. Path. u. Ther., Bd. 7, 1910, p. 417; vgl. auch Ergebnisse der inneren Med. u. Kinderheilk., Bd. 5, p. 183.

7) J. Bauer und St. Engel, Biochem. Zeitschr., Bd. 31, 1911, p. 46.

8) F. Kollmeyer, l. c.

bindung sehr wohl unterscheiden lassen. Zwar haben die nachweisbaren Differenzen, wie auch Graetz¹⁾ und Bauereisen²⁾ betonen, einen graduellen Charakter, jedoch lassen sich die drei Eiweißkörper der Milch, insbesondere Kasein auf der einen Seite, Albumin und Globulin auf der anderen Seite, bei quantitativer Versuchsanordnung hinreichend exakt biologisch differenzieren.

Was die mittels der Komplementbindungsmethode nachweisbaren Beziehungen zwischen Milch und Blutserum anlangt, so darf man zunächst annehmen, daß sich die Molken-Eiweißkörper von dem Serumalbumin und -globulin nicht unterscheiden lassen. Eine Sonderstellung nimmt das Kasein ein, und es reagieren daher die mit Milchkasein erzeugten Antisera nicht oder nur schwach mit homologem Bluserum, während die mit Milchalbumin gewonnenen Antisera auch mit Blutserum stärkere Komplementbindung ergeben. Durch Immunisieren mit den nativen Körperflüssigkeiten (Milch einerseits, Blutserum andererseits) werden Immunsera erhalten, welche, wie das zuerst die Arbeiten Bauers gezeigt haben, Milch und Blutserum durch die Komplementbindungsreaktion zu unterscheiden erlauben. Eine Ausnahme bildet das Colostrum³⁾, das durch seinen hohen Gehalt an Globulin und Albumin biologisch dem Blutserum nahe verwandt ist. Die Frage, ob die Differenzierung eine absolute ist, ist allerdings nicht ganz einheitlich beantwortet worden. Während nämlich von Bauer zuerst angegeben wurde, daß das Rinderlaktoserum mit Rinderserum überhaupt nicht reagiert, was Bauer auf das Zurücktreten des Albumins der Kuhmilch als Antikörperbildner gegenüber dem Kasein bezog, haben spätere Arbeiten Bauers und seines Mitarbeiters Kollmeyer sowie die Untersuchungen von Graetz, Bauereisen die Möglichkeit eines, wenn auch geringgradigen, Uebergreifens der Laktosera auf das homologe Blutserum demonstriert. Im Sinne einer vollkommenen Differenzierung und demgemäß einer Bestätigung der Angaben Bauers sprachen allerdings die von Graetz mit mehreren Antisera erhobenen Befunde, welche eine vollständige Differenzierung des Blutserums gegenüber der Milch dartun. Andererseits will aber auch Graetz hieraus keine verallgemeinernden Schlüsse ziehen, glaubt vielmehr der Tierindividualität eine besondere Bedeutung zusprechen zu sollen, und führt zum Beleg hierfür eine Reihe von Colostrum-Antisera an, welche bei der Komplementbindung zum Teil auf Rinderserum hochgradig übergriffen, zum Teil aber eine absolute Differenzierung von Milch und Colostrum gegenüber dem Serum ermöglichen. Die durch Blutserum-Immunisierung gewonnenen Antisera geben nach Bauer, soweit das Rinderserum-Antiserum in Betracht kommt, mit homologer Milch keine Komplementbindung, während Menschenserum-Antiserum mit Frauenmilch schwach reagiert. Im Gegensatz hierzu fand Graetz regelmäßig auch ein geringes, aber deutliches Uebergreifen der Rinderserum-Antisera auf Kuhmilch.

1) Fr. Graetz, diese Zeitschr., Bd. 9, 1911, p. 673.

2) A. Bauereisen, ebenda, Bd. 10, 1911, p. 306.

3) J. Bauer, l. c., und Deutsche med. Wochenschr., 1909, No. 38.

Die für unsere Untersuchungen besonders interessierende Frage, ob und wie sich die durch rohe und gekochte Milch erhaltenen Antisera bei der Komplementbindung unterscheiden, ist unseres Wissens bisher nicht wesentlich analysiert worden. Wir wissen zwar durch Bauer und Kollmeyer, daß derart gewonnene Laktosera mit gekochter und roher Milch ebenso Komplementbindung ergeben, außerdem finden wir in der Arbeit von Kollmeyer einen Versuch, in welchem ein durch Immunisieren mit gekochter Kuhmilch erhaltenes Antiserum mit Rinderserum eine geringe Reaktion gibt. Aber einmal war die hier notierte Komplementbindung nur von geringer Stärke, und dann war die zum Immunisieren benutzte Milch nur einmal im Reagenzglas aufgekocht worden. Auch in weiteren Versuchen Kollmeyers über das Verhalten der Milcheiweißkörper war die Milch nur einmal aufgekocht worden. Im allgemeinen ergab sich, daß derart kurz gekochte Milch mit den durch Injektion von Milch oder Milcheiweißkörpern erhaltenen Antisera reagierte und ebenso Antikörper bildet. Nur in einem Versuche schien die Reaktion eines Kuhmilch-Albuminantiserums mit aufgekochter Milch abgeschwächt zu sein.

Hingegen sind von Uhlenhuth und Haendel¹⁾ Versuche über das biologische Verhalten roher und $\frac{3}{4}$ Stunden lang gekochter Milch bei der Anaphylaxiereaktion (vgl. hierzu auch Besredka, Thomsen, Graetz, Heuner, Bauer, Kleinschmidt u. a.) mitgeteilt worden, deren Ergebnisse den von uns mittels Komplementbindung erhaltenen Befunden vielfach entsprechen, und auf welche wir nach Mitteilung unserer eigenen Untersuchungen näher eingehen werden.

I.

Da das Uebergreifen der Laktosera auf das homologe Blutserum bei der Komplementbindung, zumal bei Verwendung von Kuhmilch und Rinderserum nach den Angaben der Autoren, wenn überhaupt, so nur in sehr geringem Grade eintritt, waren freilich markant nachweisbare Differenzen zwischen den durch rohe und gekochte Milch gewonnenen Antisera kaum zu er-

1) Uhlenhuth und Haendel, diese Zeitschr., Bd. 4, 1910, p. 761.

warten. Jedoch zeigten bereits unsere orientierenden Versuche, daß nicht nur mit Menschenmilch-, sondern auch mit Kuhmilch-Antiseris unter geeigneten Bedingungen recht deutliche Komplementbindung im Verein mit homologem Blutserum erzielt werden kann.

Da man von vornherein der bereits von Bauer hervorgerufenen Annahme folgen durfte, daß die Antikörper der Albumin- und Globulinstoffe im Laktoserum, wenn überhaupt, so nur in relativ geringer Konzentration vorhanden sind, so mußten sich für die Demonstration eines Uebergreifens der Reaktion auf das homologe Blutserum bestimmte Forderungen für die Versuchsanordnung ergeben, für welche die bekannten Gesetze über die quantitativen Beziehungen bei der Komplementbindung maßgebend sind. Die letzteren bestehen ja im wesentlichen darin, daß sowohl ein Ueberschuß von Antigen als auch ein solcher von Antiserum das Zustandekommen der antikomplementären Wirkung hemmen kann. Da nun im Laktoserum nur relativ geringe Mengen der mit Serumeiweiß durch Komplementbindung reagierenden Antikörper zu erwarten waren, so mußte gerade hierbei das Maximum der Komplementbindung bei mittleren Serumantigendosen vermutet werden, deren Zone recht begrenzt sein konnte. Andererseits waren möglicherweise Vorteile durch Verwendung großer Antiserumdosen zu erzielen, während ja im Sinne strenger Differenzierungen und zur Ausschaltung von Partialantikörpern, zumal in der forensischen Praxis, gerade kleine Antiserumdosen zu verwenden sind. Schließlich erschien es geboten, damit geringe Komplementbindungsreaktionen des Laktoserums mit Serumeiweiß dem Nachweis nicht entgingen, den zeitlichen Verlauf der Hämolyse zu beobachten.

Die Laktosera wurden durch intravenöse Milchinjektion von Kaninchen gewonnen. Nach 3maliger Injektion von je 5 ccm Milch in Abständen von je 2 Tagen wurden die Tiere in der Regel am 7.—10. Tage nach der letzten Injektion zur Serumgewinnung entblutet.

Bei Ausführung der Komplementbindungsversuche wurde in üblicher Weise verfahren. Das hämolytische System bestand aus Hammelblut, inaktiviertem Immunserum vom Kaninchen und Meerschweinchenserum als Komplement. Als Ambozeptordosis dienten etwa $2\frac{1}{2}$ Ambozeptoreinheiten (für 1,0 ccm Hammelblut Aufschwemmung und 0,1 ccm Meerschweinchen-

serum im Gesamtvolumen von 2,1 ccm), als Komplementdosis zirka das doppelte Multiplum der an jedem Versuchstage bestimmten, im Verein mit $2\frac{1}{2}$ Ambozeptoreinheiten komplett lösenden Menge. Die Laktosera wurden zunächst mit und ohne Zusatz von je 0,001 ccm Milch in absteigenden Mengen auf antikomplementäre Wirkung geprüft (Intervall bis zum Zusatz von Blut und Ambozeptor: 1 Stunde im Blutschrank). In den Hauptversuchen wurden dann entweder — bei stark wirkenden Antiseris — das Doppelte der eben noch vollständige Komplementbindung bewirkenden Dosis oder möglichst hohe, aber in der Regel 0,1 ccm nicht überschreitende Antiserumdosen benutzt und mit absteigenden Mengen Milch resp. Blutserum digeriert.

Aus ökonomischen Gründen wurde in vielen Versuchen nur 0,5 ccm Blutaufschwemmung verwendet und dementsprechend auch mit allen anderen Reagentien in halben Dosen gearbeitet. Wir geben aber in den folgenden Tabellen durchweg auf das Arbeiten mit 1,0 ccm Hammelblut umgerechnete Zahlenangaben. Der Grad der Hämolyse ist, wenn nicht anders bemerkt, nach 2-stündigem Aufenthalt im Brutschrank notiert und nach folgender Skala bestimmt:

0 = keine, Spch. = Spürchen, Sp. = Spur, w. = wenig, m. = mäßige, st. = starke, f. k. = fast komplette, k. = komplette Hämolyse.

Die Untersuchungen über das Uebergreifen der Laktosera auf homologes Blutserum haben wir im wesentlichen auf Kuhmilch und Rinderserum beschränkt. Sie führten unter Berücksichtigung der oben erörterten Kautelen der Versuchsanordnung zu dem Resultat, daß die von uns untersuchten Laktosera, sofern ihr Titer gegenüber Kuhmilch nicht allzu gering war, auch mit Rinderserum in mehr oder weniger hohem Grade Komplementbindung ergaben, die sich allerdings meist im Endeffekt nur durch partielle Aufhebung der Hämolyse dokumentierte. Unter geeigneten Versuchsbedingungen kann man sogar das in Anbetracht der Angaben der Autoren immerhin überraschende, aber durchaus verständliche Phänomen erhalten, daß Kuhlaktosera mit Rinderserum empfindlicher als mit Kuhmilch reagieren, wie es folgendes Versuchsbeispiel zeigt.

Der Komplementbindungstiter des benutzten Kuhlaktoserums 64 b betrug gegenüber $\frac{1}{1000}$ ccm Kuhmilch: 0,01—0,015 ccm. Als Testdosen wurden für den Komplementbindungsversuch einerseits 0,02 ccm, andererseits 0,1 ccm Laktoserum gewählt. Als Antigen fungierte in den Reihen: M: Kuhmilch, S: inaktiviertes Rinderserum.

Das Ergebnis zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

Mengen der Kuhmilch resp. des Rinder- serums ccm	Grad der eingetretenen Hämolyse							
	nach 1 Stunde				nach 2 Stunden			
	0,02 ccm Laktoserum		0,1 ccm Laktoserum		0,02 ccm Laktoserum		0,1 ccm Laktoserum	
	M.	S.	M.	S.	M.	S.	M.	S.
0,1	0	st.	0	0	0	st.	0	m.
0,03	0	st.	0	0	0	st.	0	m.
0,01	0	st.	0	0	0	st.	0	m.
0,003	0	m.	0	0	0	st.	Sp.	w.
0,001	0	Sp.	0	0	0	m.	Sp.	Sp.
0,0003	0	Spch.	0	0	Spch.	m.	w.	m.
0,0001	w.	0	w.	0	m.	Sp.	m.	m.
0,00003	st.	st.	m.	Sp.	st.	f. k.	st.	m.
0,00001	f. k.	f. k.	st.	st.	f. k.	k.	f. k.	st.
0	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	k.	k.	k.	k.

Kontrolle der eigenhemmenden Wirkung von Milch und Rinderserum

Mengen von Kuhmilch resp. Rinderserum ccm	Grad der eingetretenen Hämolyse			
	nach 1 Stunde		nach 2 Stunden	
	M.	S.	M.	S.
0,1	0	st.	Sp.	st.
0,03	Sp.	st.	w.	st.
0,01	Sp.	st.	m.	st.
0,003	w.	st.	st.	f. k.
0,001	st.	st.	k.	k.
0,0003	st.	st.	k.	k.
0	f. k.	f. k.	k.	k.

Die Tabelle ist in mehrfacher Hinsicht von Interesse. Zunächst ergibt sich, zumal bei der frühzeitigen Beurteilung des Versuchsausfalls, eine starke Komplementbindung beim Zusammenwirken des Laktoserums mit Rinderserum. Dieselbe übertrifft sogar zunächst diejenige mit Milch, was bei Verwendung von 0,1 ccm Laktoserum sehr markant in Erscheinung tritt, bei Verwendung von 0,02 ccm Laktoserum in der Zone größerer Antigenmengen durch die Aufhebung der Komplementbindung infolge Serumüberschusses larviert wird. Gerade diese Hemmung der Komplementbindung durch Antigenüberschuß hat sich in unseren Versuchen für das Zusammenwirken von Kuhlaktoserum mit Rinderserum als charakteristisch erwiesen. Es erklärt sich dieses Verhalten offenbar aus dem relativ geringen Vorrat des Lakto-

serums an Antikörpern der dem Serum eigentümlichen Albumine und Globuline. Dadurch wird einerseits die starke Empfindlichkeit der Reaktion in bezug auf geringe Antigenmengen bedingt, andererseits aber die Unvollständigkeit des sich bei späterer Beurteilung dokumentierenden Komplementbindungseffektes. So ist es unter Berücksichtigung des Momentes der quantitativen Verhältnisse auch verständlich, daß die Komplementbindung beim Zusammenwirken kleiner Laktoserummengen mit Rinderserum den maximalen Grad bei geringeren Antigendosen erreicht als bei Verwendung höherer Antiserummengen, jedoch auf eine weit engere Zone beschränkt bleibt.

Im allgemeinen dürfte es sich daher im Interesse der größeren Sinnfälligkeit des Ergebnisses empfehlen, zum Nachweis geringer Mengen von Partialantikörpern mit großen Antiserumdosen zu arbeiten¹⁾. Unter diesen Bedingungen haben wir eine mehr oder weniger starke Komplementbindung beim Zusammenwirken einer Reihe von Kuhlaktoseris mit Rinderserum in keinem Falle vermißt. Daß bei einem Laktoserum, das die geringe eigenhemmende Wirkung der Milch nur wenig zu verstärken vermochte, die Reaktion mit Serum unterblieb, ist natürlich als eine durch zu geringe Antikörperproduktion bedingte Ausnahme anzusehen, die als solche die Regel nur bestätigt. Wenn auch die Verhältnisse nicht immer derart markant lagen, wie in dem geschilderten Versuchsbeispiel, und insbesondere kleine Antiserumdosen trotz starker Komplementbindung mit Milch nur geringe oder keine Reaktion mit Serum ergaben, so genügten sie doch zur Ableitung einer allgemeinen Gesetzmäßigkeit. Diese schließt aber keineswegs aus, daß unter anderen Versuchsbedingungen mit dem gleichen Laktoserum eine praktisch absolute Differenzierung zwischen Milch und Blutserum demonstrierbar ist, wie das die Unter-

1) Dieses Prinzip hat auch für andere Anwendungsformen der Komplementbindung Geltungsbereich, wie dies z. B. die Untersuchungen Deans (diese Zeitschr., Bd. 11, 1911, p. 58) besonders eklatant zeigen. Hier gelang mit kleinen Antiserumdosen eine scharfe Differenzierung zwischen den einzelnen Vertretern der Typhus- und Paratyphusgruppe, während größere Mengen der gleichen Antisera mehr oder weniger starke Gruppenreaktionen bewirkten.

suchungen J. Bauers zuerst gelehrt haben. Für uns war aber gerade der regelmäßige Nachweis des Uebergreifens der Laktoserumwirkung auf Blutserum maßgebend, und dieser erhielt eine weitere theoretische Bedeutung durch das wiederum gesetzmäßige, durchaus andersartige Verhalten der durch Immunisieren mit gekochter Milch gewonnenen Laktosera.

Die Immunisierung mit 30 Minuten lang gekochter Milch erfolgte in der nämlichen Weise, wie diejenige mit roher Milch. Wir unterscheiden im folgenden kurz „Rohlaktoserum“ und „Coctolaktoserum“.

Obwohl nämlich die Coctolaktosera keineswegs geringere Komplementbindungstiter aufwiesen als die Rohlaktosera, reagierten sie im Gegensatz zu dem Verhalten der Rohlaktosera nur mit Milch (gleichgiltig, ob roh oder gekocht), nicht mit Blutserum. Zur Illustration dieses Unterschiedes bei der Prüfung der Roh- und Coctolaktosera gegenüber Rinderserum geben wir in den folgenden Tabellen II und III eine Reihe von Versuchsbeispielen wieder.

Wir bemerken hierzu, daß die in jeder der beiden Tabellen notierten Protokolle die Ergebnisse gleichzeitig und unter gleichen Bedingungen ausgeführter Versuche darstellen. Ebenso sind die Laktosera-Serien 64 und 65 einerseits, 177 und 178 andererseits unter identischen Bedingungen, und zwar 64 und 177 mit roher Milch, 65 und 178 mit $\frac{1}{2}$ Stunde lang gekochter Milch gewonnen worden.

Tabelle II.

Laktoserum 0,1 ccm	Antigen	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Laktoserum, Meerschweinchen- serum und absteigenden Mengen von Kuhmilch (M.) resp. Rinderserum (S.) in den folgenden Dosen										
		0,1	0,03	0,01	0,003	0,001	0,0003	0,0001	0,00003	0,00001	0	0
Roh 64 a	M.	0	Sp.	w.	m.	f. k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
	S.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
„ 64 b	M.	0	0	0	Sp.	Sp.	w.	m.	st.	k.	k.	k.
	S.	m.	m.	w.	Sp.	w.	w.	m.	st.	k.	k.	k.
„ 64 c	M.	0	0	w.	m.	m.	m.	f. k.	k.	k.	k.	k.
	S.	k.	k.	f. k.	st.	m.	st.	f. k.	k.	k.	k.	k.
Cocto 65 a	M.	0	0	0	0	0	0	w.	f. k.	k.	k.	k.
	S.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
„ 65 b	M.	0	0	0	0	0	w.	m.	f. k.	k.	k.	k.
	S.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
„ 65 c (0,2 ccm)	M.	0	0	0	0	Sp.	w.	m.	st.	f. k.	k.	k.
	S.	k.	k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	k.	k.	k.
0 (Kontrolle)	M.	w.	m.	st.	f. k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
	S.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Tabelle III.

Laktoserum 0,1 ccm	Antigen	nach 7 Stdn.	Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und digerierte Gemische von Laktoserum, Meerschweinchenserum und absteigenden Mengen von Kuhmilch (M.), resp. Rinder Serum (S.) in folgenden Dosen										
			0.1	0,03	0,01	0,003	0,001	0,0003	0,0001	0,00003	0,00001	0	
Roh 177 a	M.	1	0	0	0	0	0	0	0	0	w.	st.	f. k.
		2	0	0	0	0	0	0	0	Spch.	w.	st.	k.
	S.	1	w.	Sp.	0	0	0	0	0	Sp.	m.	st.	f. k.
		2	m.	w.	Sp.	0	0	0	Spch.	w.	m.	f. k.	k.
177 b	M.	1	0	0	0	0	0	0	0	Spch.	w.	st.	f. k.
		2	0	0	0	0	0	0	0	Spch.	w.	f. k.	k.
	S.	1	w.	w.	w.	Sp.	0	0	Spch.	Sp.	w.	m.	f. k.
		2	f. k.	f. k.	st.	m.	Sp.	w.	w.	m.	st.	f. k.	k.
717 c	M.	1	0	0	0	0	0	Sp.	m.	f. k.	k.	k.	
		2	0	0	0	Spch.	Spch.	Sp.	m.	f. k.	k.	k.	
	S.	1	k.	f. k.	st.	m.	m.	w.	m.	f. k.	k.	k.	
		2	k.	f. k.	f. k.	f. k.	st.	st.	f. k.	k.	k.	k.	
177 d	M.	1	0	0	0	0	0	0	w.	m.	k. f.	k.	
		2	0	0	0	0	0	Spch.	w.	st.	f. k.	k.	
	S.	1	m.	m.	w.	w.	w.	w.	st.	f. k.	k.	k.	
		2	st.	st.	w.	w.	w.	w.	f. k.	k.	k.	k.	
177 e	M.	1	0	0	0	0	0	0	Sp.	f. k.	k.	k.	
		2	0	0	0	0	0	Spch.	Sp.	k.	k.	k.	
	S.	1	k.	st.	m.	w.	w.	Spch.	w.	m.	k.	k.	
		2	k.	k.	f. k.	m.	w.	w.	m.	f. k.	k.	k.	
Cocto 178 a	M.	2	0	0	0	0	0	0	0	w.	f. k.	k.	
		1	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
178 b	M.	2	0	0	0	0	0	Sp.	f. k.	k.	k.	k.	
		1	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
178 c	M.	2	0	0	0	0	0	0	Spch.	m.	f. k.	k.	
		1	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
178 d	M.	2	0	0	0	0	0	Spch.	w.	m.	st.	k.	
		1	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
178 e	M.	2	0	0	0	0	0	Spch.	w.	m.	f. k.	k.	
		1	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
0 (Kontrolle)	M.	2	w.	st.	st.	f. k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	
		1	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	

Aus beiden Tabellen ergibt sich übereinstimmend, daß die durch Immunisieren mit roher Milch gewonnenen Laktosera auch mit Rinder Serum mehr oder weniger deutlich reagieren, während die Antisera der gekochten Milch nur mit dem homologen

Antigen, aber nicht mit Blutserum Komplementbindung bewirken. Eine scheinbare Ausnahme macht das Rohlaktoserum 64a (Tabelle II). Die Komplementbindung ist hier aber auch mit Milch, zumal in Anbetracht der eigenhemmenden Wirkung der letzteren, so gering, daß man wohl eine schlechte Eignung dieses Kaninchens zur Antikörperbildung annehmen darf. Bei dem Coctolaktoserum 65c (Tabelle II) ist andererseits eine breite Zone sehr geringer Hemmung mit Rinderserum wahrzunehmen, die allerdings die Hämolyse nur auf „fast komplett“ reduziert. Es kam hierbei eine besonders hohe Antiserumdose (0,2 ccm) zur Verwendung, da in einem Vorversuch 0,1 ccm zur vollständigen Komplementbindung mit Milch nicht hingereicht hatte. Ob daher die geringgradige Hemmung beim Zusammenwirken des Coctolaktoserums 65c mit Rinderserum auf eine eigentliche Komplementbindung oder auf andersartige Momente zurückzuführen ist, soll dahingestellt bleiben. Im allgemeinen dürften aber die mitgeteilten Versuche in dem Sinne sprechen, daß durch den Eingriff des Kochens die Kaseinbestandteile der Milch biologisch isoliert werden, und in bezug auf die Differenzierung des Kaseins als Antigen von den Antigenen des Blutserums bestätigen also unsere Ergebnisse die Sonderstellung, welche dem Kasein nach den Untersuchungen J. Bauers zukommt. Sie zeigen gleichzeitig, daß die antigenen Eigenschaften der Albumin- und Globulinstoffe auch in der Milch coctolabil sind, und es darf in diesem Sinne vielleicht noch darauf hingewiesen werden, daß die Coctolaktosera trotz Fehlens der Serumeiweißantikörper keineswegs mit Milch in geringerem Maße reagieren, als die Rohlaktosera. Wir glauben also berechtigt zu sein, die ersteren praktisch als reine Kaseinantisera anzusprechen, während die Rohlaktosera mehr oder weniger Beimengungen von Antikörpern der Globuline und Albumine neben den Kaseinantikörpern enthalten. Ein gelegentliches Uebergreifen der Coctolaktosera auf Blutserum, wie es beim Antiserum 65c angedeutet ist, könnte gleichwohl vorkommen. Zur Erklärung müßte man entweder annehmen, daß durch das $\frac{1}{2}$ -stündige Kochen der Milch die Globulin-Albuminrezeptoren noch nicht völlig vernichtet sind und besonders disponierte Tiere noch

auf den Antigenrest reagieren, oder aber, daß eine geringe, freilich nur minimale Rezeptorengemeinschaft zwischen Kasein und Serumeiweißstoffen besteht.

Einige Präzipitationsversuche, die aber nur in geringer Anzahl ausgeführt wurden, gaben im Prinzip gleichsinnige Resultate. Die durch Immunisieren mit roher Milch gewonnenen Laktosera präzipitierten in Bestätigung der Angaben der Autoren Rinderserum mehr oder weniger stark, während die Coctolaktosera mit Rinderserum meist gar keine Reaktion ergaben und nur selten eine spät eintretende Präzipitatbildung bei hohen Serumkonzentrationen erkennen ließen.

Erinnert sei in diesem Zusammenhang an den schon von Meyer und Aschoff¹⁾ berichteten Befund, daß 20 Minuten lang auf 120° erhitze Milch im Gegensatz zur rohen Milch nicht mehr Hämolyse zu bilden imstande ist. Allerdings haben wir bei gelegentlicher Prüfung auch die Coctolaktosera nicht immer ganz frei von Rinderbluthämolyse gefunden.

II.

Während sich die bisher mitgeteilten Versuche über das Immunisierungsvermögen nur auf die Kuhmilch erstreckten, haben wir für die im folgenden mitzuteilende vergleichende Analyse der rohen und gekochten Milch im Komplementbindungsversuch auch Menschenmilch benutzt. Der weitgehende Parallelismus, welcher bei allen Antikörperreaktionen zwischen Immunisierungs- und Bindungsvermögen besteht, konnte auch hierbei nicht vermißt werden, und tatsächlich fand die sich ergebende Konsequenz, daß es mit geeigneten Serumantisera gelingen müßte, rohe und gekochte Milch zu unterscheiden, experimentelle Bestätigung. Freilich erwies sich nicht jedes Serumantiserum ohne weiteres geeignet; ein gewisser, nicht zu geringer Grad der Reaktionsfähigkeit mit dem homologen Serumantigen war erforderlich, um die Komplementbindung mit Milch in hinreichender Stärke in Erscheinung treten zu lassen. Wir lassen zunächst das Verhalten eines vom Sächsischen Serumwerk in Dresden bezogenen Menschenserumantisera (No. 64) als Versuchsbeispiel folgen.

1) F. Meyer und L. Aschoff, Berlin. klin. Wochenschr., 1902, No. 27.

Absteigende Mengen von

- a) roher Frauenmilch,
- b) 30 Minuten lang gekochter Frauenmilch,
- c) Menschenserum

wurden

I. unter Zusatz von je 0,1 ccm Menschenantiserums „Dresden No. 64“,

II. ohne weiteren Zusatz (Kontrollen)

mit Komplement digeriert. Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° erfolgte Zusatz von Blut und Ambozeptor.

Das Ergebnis nach 2 Stunden zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Verdünnungs- grad der Antigene ccm	Eingetretene Hämolyse					
	I. Menschenserum-Antiserum			II. Kontrollen		
	a Rohe Milch	b Gekochte Milch	c Blut- serum	a Rohe Milch	b Gekochte Milch	c Blut- serum
40	0	k.	Spch.	k.	k.	k.
80	0	k.	0	k.	k.	k.
160	0	k.	0	k.	k.	k.
320	0	k.	0	k.	k.	k.
640	Spch.	k.	0	k.	k.	k.
1 280	w.	k.	0	k.	k.	k.
2 560	f. k.	k.	0	k.	k.	k.
5 120	k.	k.	Spch.	k.	k.	k.
10 240	k.	k.	m.	k.	k.	k.
20 480	k.	k.	f. k.	k.	k.	k.
∞	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Wie die Tabelle zeigt, ergibt dieses Antiserum bei einwandfreien Kontrollen nur mit roher, nicht mit gekochter Menschenmilch Komplementbindung, ein Ergebnis, das nach unseren Immunisierungsversuchen zu erwarten war, da ja die gekochte Milch nur die Kaseinrezeptoren in reaktionsfähigem Zustande enthält, deren Antikörper aber in dem durch Vorbehandeln mit Blutserum gewonnenen Immunserum fehlen.

Trotz der nicht unerheblichen Reaktion dieses Antiserums mit roher Milch ist die Komplementbindung beim Zusammenwirken mit dem homologen Blutserum, wie Kolonne Ic der Tabelle zeigt, nicht von besonders beträchtlichem Grade. Denn die vollständige Hemmung der Hämolyse reicht nur bis zur Serumverdünnung 1:2560. Allerdings war es leicht möglich, die Empfindlichkeit der Re-

aktion erheblich zu steigern, indem bei Verwendung einer geringeren Antiserumdosis (0,025 ccm) die absolute Komplementbindung mit homologem Blutserum noch einen Titer von 1:10240 erreichte und eine fast vollständige Hemmung der Hämolyse („Spur“) noch bei 40960-facher Verdünnung eintrat. Jedoch bewirkte die Reduktion der Antiserumdosis zugleich eine Verminderung der Empfindlichkeit gegenüber Milch, indem nur noch bei 80- oder 160-facher Milchverdünnung vollständige Aufhebung der Komplementwirkung eintrat. Wir können in diesen quantitativen Verhältnissen jedoch keine allgemeine Regel erblicken, da wir ein derartiges anscheinend paradoxes Verhalten nur bei dem einen Antiserum antrafen. Im übrigen hat sich zwar bei der Untersuchung anderer von uns hergestellter Menschenantisera die Verwendung hoher Dosen (0,1 ccm) im Interesse einer möglichst hohen Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber Milch als zweckmäßig erwiesen, ohne daß aber bei quantitativer Variation eine wesentliche Disproportionalität zwischen der Empfindlichkeit gegenüber Milch und Blutserum bestand. Ein gelegentlicher Mangel an Parallelismus in dem oben erörterten Sinne mag vielleicht durch die Pluralität der Rezeptoren eine Erklärung finden. Wenn man nämlich annimmt, daß der Rezeptorenapparat der Albumine und Globuline einerseits im Blutserum, andererseits in der Milch nur eine partielle Identität aufweist, resp. daß nur eine relativ geringe Fraktion der Blutrezeptoren in der Milch vorhanden ist, so kann man es wohl verstehen, daß diejenigen Partialantikörper des Serumantisera, welche auch auf die Milchrezeptoren wirken, in mehr oder weniger geringerer Konzentration vorhanden sein können, als die Gesamtmenge der mit dem homologen Antigen reagierenden Immstoffe. Unter diesen Bedingungen könnte zur maximalen Empfindlichkeit bei der Reaktion mit Milch eine größere Antiserumdosis erforderlich sein, als bei der Komplementbindung mit Blutserum. Denn wenn auch das Optimum des Komplementbindungseffektes in bestimmten Zonen von der Vermeidung eines Antigen- und Antikörperüberschusses abhängt, so sinkt doch andererseits in gewissen Grenzen mit einer Erhöhung der einen Komponente der zur Komplementbindung erforderliche Bedarf an der anderen.

Wie dem aber auch sei, jedenfalls zeigen unsere Untersuchungen, daß auch bei der direkten Methode des Komplementbindungsversuches die gekochte Milch sich von der rohen dadurch unterscheidet, daß die mit dem Blutserum gemeinsamen Rezeptoren fehlen resp. derart reduziert sind, daß eine Differenzierung zwischen gekochter und roher Milch auf biologischem Wege möglich ist. Das läßt sich in gleicher Weise wie für Frauenmilch auch für Kuhmilch erweisen. Wir haben 6 Rinderserumantisera untersucht, die mehr oder weniger stark auch mit Kuhmilch, aber nicht oder höchstens mit wenig beweiskräftiger Andeutung mit gekochter reagiert haben, und lassen im folgenden ein Versuchsbeispiel folgen.

Absteigende Mengen von

- a) roher Kuhmilch,
- b) 30 Minuten lang gekochter Kuhmilch,
- c) Rinderserum

wurden

I. unter Zusatz von je 0,1 ccm Rinderserumantiserum 19 c,

II. ohne weiteren Zusatz (Kontrollen)

mit Komplement digeriert. Nach 1-stündigem Aufenthalt bei 37° erfolgte Zusatz von Blut und Ambozeptor. Das Ergebnis zeigt Tabelle V.

Tabelle V.

Verd.-Grad der Antigene (1 ccm)	Eingetretene Hämolyse											
	I. Rinderserumantiserum						II. Kontrollen					
	a		b		c		a		b		c	
	Rohe Milch nach	Gek. Milch nach	Rinderserum nach	Rohe Milch nach	Gek. Milch nach	Rinderserum nach	Rohe Milch nach	Gek. Milch nach	Rinderserum nach	Rohe Milch nach	Gek. Milch nach	Rinderserum nach
1 ^a	2 ^a	1 ^b	2 ^b	1 ^c	2 ^c	1 ^a	2 ^a	1 ^b	2 ^b	1 ^c	2 ^c	
40	0	0	w.	m.	0	0	m.	m.	m.	m.	st.	f. k.
80	0	0	m.	st.	0	0	st.	st.	m.	st.	f. k.	k.
160	0	0	st.	f. k.	0	0	st.	f. k.	st.	f. k.	f. k.	k.
320	0	w.	st.	k.	0	0	f. k.	f. k.	f. k.	k.	k.	k.
640	w.	st.	f. k.	k.	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
1280	m.	f. k.	k.	k.	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
2560	st.	k.	k.	k.	0	0	k.	k.	k.	k.	k.	k.
∞	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Wie die Tabelle zeigt, gibt auch die Kuhmilch nur in rohem, nicht in gekochtem Zustande Komplementbindung mit einem durch Serumimmunsierung gewonnenen Antiserum. Zwar ist auch bei

Verwendung gekochter Milch in höheren Dosen eine partielle Hemmung der Hämolyse wahrzunehmen. Diesem Hemmungsgrade entspricht aber, wie die Kontrollen zeigen, die eigene antikomplementäre Milchwirkung. Die letztere war in diesen Versuchen, zumal von besonderen Maßnahmen zu ihrer Elimination abgesehen wurde, oft nicht zu vermeiden. Sie schmälert aber nicht die Berechtigung zu der Schlußfolgerung, daß sich rohe und gekochte Milch durch die Immunitätsreaktion mittels Komplementbindung markant differenzieren lassen.

Auch mittels der Präzipitation wurden in allerdings nur gelegentlich angestellten Versuchen verwandte Resultate erhalten, indem 2 Rinderserum-antisera, welche 5000- resp. 10000-fach verdünntes Rinderserum präzipitierten, mit 500- resp. 1000-fach verdünnter roher Milch noch deutlich reagierten, während in 100-fach verdünnter gekochter Milch eine sicher charakterisierbare Niederschlagsbildung auch nach 24 Stunden nicht eingetreten war. Die Versuche sind jedoch zu gering an Zahl, um bestimmte Schlußfolgerungen zu gestatten. Verwiesen sei hierzu auf die Angaben von Meyer und Aschoff, nach denen die durch Blutkörperchen- bzw. Epithelinjektionen erzeugten Immunsera auf frische Milch stärker, auf erhitzte schwächer oder gar nicht koagulierend wirken.

Die hier mitgeteilten, auf Grund von Komplementbindungsversuchen erhobenen Befunde stehen in gutem Einklang mit den schon erwähnten interessanten Untersuchungen von Uhlenhuth und Haendel¹⁾ über die gegenseitigen Beziehungen von roher, 45 Minuten lang gekochter Milch und Blutserum bei der Anaphylaxie. Den Autoren dienten für die Untersuchungen Kuhmilch und Rinderserum. Es ergab sich, daß mit frischer Milch sensibilisierte Meerschweinchen auch gegenüber gekochter Milch und Rinderserum überempfindlich waren. Dagegen hatte die Sensibilisierung mit gekochter Milch nur Anaphylaxie bei Reinjektion von Milch, nicht von Blutserum zur Folge. Umgekehrt reagierten die mit Rinderserum vorbehandelten Tiere bei der Reinjektion außer auf Serum auch auf rohe, aber nicht auf gekochte Milch. Allerdings betrachten die Autoren die Verhältnisse bei der Anaphylaxie insofern nicht ganz eindeutig, als einerseits auch ein mit gekochter Milch sensibilisiertes Tier auf die Reinjektion

1) Uhlenhuth und Haendel, diese Zeitschr., Bd. 4, 1910, p. 761.

von Rinderserum leichte Symptome aufwies, andererseits nach Vorbehandlung mit Rinderserum und Reinjektion von gekochter Milch die nachfolgende Injektion von frischer Milch zwar noch zu schweren Symptomen, aber nicht mehr zum Exitus führte, also einem gewissen Grad von Antianaphylaxie begegnete. Bei der passiven Sensibilisierung mit einem Rinderserumantiserum „verhielten sich die derart präparierten Tiere gegenüber der Prüfungsinjektion mit frischer oder gekochter Milch im allgemeinen refraktär“. Doch zeigten einige mit frischer Milch reinjizierte Tiere deutliche, wenn auch leichte Reaktionen. Das Fehlen oder nur leichte Auftreten von Anaphylaxiesymptomen kann aber sehr wohl dadurch bedingt gewesen sein, daß die injizierten Milchmengen zu gering waren, zumal in unseren Komplementbindungsversuchen mit Serumantiserum im günstigsten Falle 8mal soviel Milch als Blutserum, meist aber höhere Multipla zur Erzielung des gleichen Effektes erforderlich waren. Ebenso ist es verständlich, daß bei der Nachbehandlung mit Serum nach der Vorprüfung mit Milch nur ein geringgradiger Schutz festzustellen war. Wesentlich erscheint immerhin der Umstand, daß ein gewisser schützender Einfluß sich wohl bei der Vorinjektion mit frischer, aber nicht oder nicht allgemein mit gekochter Milch geltend machte.

Ueberblickt man die Anaphylaxieversuche Uhlenhuths und Haendels, und vergleicht man ihre Ergebnisse mit den von uns bei der Komplementbindung erhaltenen Resultaten, so dominiert augenscheinlich ein enger Parallelismus. Offenbar werden die Erscheinungen beherrscht durch die komplexe Antigenkonstitution der Milch, welche aus coctostabilen Kaseinrezeptoren und coctolabilen, mit dem Blutserum gemeinsamen Rezeptoren resultiert. Geringfügige Abweichungen von den sich hieraus ergebenden Gesetzmäßigkeiten könnten durch eine freilich nur minimale Gemeinschaft coctostabiler Milch- und Serumrezeptoren eine Erklärung finden. In praktischer Hinsicht spielt dieses Moment jedoch, wie wir gesehen haben, keine Rolle, zumal die Komplementbindungsversuche durch geeignete quantitative Anordnung des Versuches leicht die Demonstration absoluter Differenzen ermöglichen.

Ob freilich das durch die hier erörterten Untersuchungen theoretisch fundierte Verfahren einer Differenzierung zwischen roher und gekochter Milch als serodiagnostische Methode bei der Verfügung über eine Reihe andersartiger Wege für die Praxis in Betracht kommen dürfte, soll dahingestellt bleiben. Vor der Anaphylaxie, die bereits in Versuchen von Uhlenhuth und Haendel eine Unterscheidung von gekochter und frischer Milch erlaubte, wird man der Komplementbindung die Vorteile der Reagenzglasmethode zusprechen können. Unsere eigenen Erfahrungen zeigen zudem, daß die Komplementbindung bei Verwendung geeigneter Serumantisera sehr prägnante Resultate liefert.

Was den Grad des thermischen Eingriffs, welcher zur Eliminierung der biologischen Reaktionsfähigkeit von Serumkomponenten der Milch erforderlich ist, anlangt, so sind unsere Versuche in quantitativer Hinsicht nicht ganz einheitlich. Immerhin zeigte sich, daß 30 Minuten lang auf 55° erhitze Milch überhaupt nicht, 30 Minuten lang auf 70° erhitze Milch nur geringgradig von frischer Milch zu unterscheiden ist. Ueber den Einfluß der Dauer des Kochens gibt das folgende Versuchsbeispiel Auskunft.

Absteigende Mengen von:

- a) roher Kuhmilch,
- b) einmal aufgekochter Kuhmilch,
- c) 10 Minuten lang gekochter Kuhmilch,
- d) 30 Minuten lang gekochter Kuhmilch,
- e) Rinderserum

werden:

I. unter Zusatz von je 0,067 ($\frac{1}{3} \cdot 0,2$) ccm Rinderserumantiserums 129 c,

II. ohne weiteren Zusatz (Kontrolle)

mit Komplement digeriert. Nach einstündigem Aufenthalt bei 37° erfolgte Zusatz von Blut und Ambozeptor. Das Ergebnis nach 1 Stunde zeigt Tabelle VI auf p. 334.

Wie die Tabelle zeigt, ist die Reaktionsfähigkeit der Milch nach einmaligem Aufkochen erheblich reduziert, nach 10 Minuten langem Kochen fast ganz aufgehoben. In anderen Versuchen war allerdings einmaliges Aufkochen fast ohne Einfluß, während schon 5 Minuten langes Kochen zu fast

Tabelle VI.

Verdünnungsgrad der Antigene (1 ccm)	Eingetretene Hämolyse									
	I. Rinderserumantiserum					II. Kontrollen				
	a rohe Milch	b aufge- kochte Milch	c 10'— 100° Milch	d 30'— 100° Milch	e Rin- der- ser.	a rohe Milch	b aufge- kochte Milch	c 10'— 100° Milch	d 30'— 100° Milch	e Rin- der- ser.
40	0	Sp.	stark	f. k.	0	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	k.
80	0	w.	f. k.	f. k.	0	f. k.	f. k.	f. k.	f. k.	k.
160	0	f. k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
320	w.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
640	st.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
1 280	k.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
2 560	k.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
5 120	k.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
10 240	k.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
20 480	k.	k.	k.	k.	0	k.	k.	k.	k.	k.
40 960	k.	k.	k.	k.	st.	k.	k.	k.	k.	k.
∞	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

völliger Inaktivierung genügte. Nach $\frac{1}{2}$ -stündigem Kochen der Milch war jedenfalls regelmäßig das Komplementbindungsvermögen im Verein mit Serum-Antiserum beseitigt, und es gelingt derart, auf biologischem Wege gesetzmäßige Unterschiede des biochemischen Verhaltens roher und gekochter Milch zum sinnfälligen Ausdruck zu bringen. Offenbar bewirkt eben das Kochen der Milch gewissermaßen eine biologische Isolierung des Kaseins, und die mitgeteilten Komplementbindungsversuche bestätigen daher, ebenso wie die Anaphylaxieexperimente Uhlenhuths und Haendels, auf neuartige Weise die biologische Sonderstellung, welche besonders J. Bauer dem Kasein auf Grund seiner mit der Komplementbindungsreaktion erhobenen Befunde zugeschrieben hat. Gleichzeitig ergibt sich, daß in der Milch coctostabile und coctolabile Rezeptoren nebeneinander vorhanden sind. In dieser Hinsicht ähnelt das Verhalten der Milch demjenigen der roten Blutkörperchen, in denen nach inzwischen bekannt gewordenen Ergebnissen von Doerr und Pick¹⁾ [vgl. hierzu auch Sachs

1) R. Doerr und R. Pick, Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1913, p. 129.

und Nathan ¹⁾] gleichfalls durch Kochen die Gegenwart zweier differenter Rezeptorfractionen nachweisbar ist.

Zusammenfassung.

1) Die Untersuchung einer Reihe von Laktosera mittels Komplementbindung ergab bei geeigneter Versuchsanordnung ein mehr oder weniger starkes Uebergreifen der Reaktion auf das homologe Blutserum.

2) Zur sinnfälligen Demonstration der mit dem Blutserum reagierenden Partialantikörper sind in der Regel hohe Laktoserumdosen erforderlich, während eine Reduktion der Antiserummenge, wie das im allgemeinen für die Komplementbindung zutrifft, die Möglichkeit schärferer Differenzierung gewährt.

3) Im Gegensatz zu den durch Immunisieren mit roher Milch gewonnenen Laktosera wirken die Antisera der $\frac{1}{2}$ Stunde lang gekochten Milch nur auf Milch, nicht auf Blutserum.

4) Serumantisera geben bei geeigneter Versuchsanordnung auch mit homologer Milch Komplementbindung. Dieses Uebergreifen der Reaktion unterbleibt, wenn die Milch gekocht ist.

5) Es gelingt derart, rohe und gekochte Milch durch Komplementbindung zu unterscheiden.

6) Die erhobenen Befunde finden ihre Erklärung durch das Vorhandensein coctostabiler und coctolabiler Rezeptoren in der Milch und die biologische Isolierung des Kaseins durch den Kochprozeß.

1) H. Sachs und E. Nathan, diese Zeitschr., Bd. 19, 1913, p. 235.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin;
 Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Im-
 munitätsforschung und experimentelle Therapie, Vorsteher: Prof.
 Dr. E. Friedberger).]

Weitere Beiträge zur Frage der heterogenetischen Antikörper¹⁾.

Von **Friedrich Schiff**, Medizinalpraktikant.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. November 1913.)

Die ursprüngliche Ansicht, daß den hämolytischen Immun-
 körpern eine strenge Spezifität im eigentlichen Sinne des
 Wortes, also eine Wirkung nur gegen das Eiweiß der das
 Antigen liefernden fremden Species zukomme, mußte modi-
 fiziert werden, als es Ehrlich und Morgenroth²⁾ gelungen
 war, durch intraperitoneale Vorbehandlung von Ziegen mit
 dem Blute anderer Ziegen hämolytische Sera zu erhalten, die
 neben dem Blute mancher Ziegen auch Hammelblut auflösten,
 durch Immunisierung von Kaninchen mit Rinderblut ein
 Hämolysin nicht nur gegen Rinderblut, sondern auch gegen
 Hammelblut.

Von diesen und ähnlichen Beobachtungen ausgehend,
 gaben Ehrlich und Morgenroth dem Spezifitätsbegriff
 eine allgemeinere Fassung, die sowohl für die bisher bekannten
 Erscheinungen, wie auch, wie sich in der Folge herausgestellt
 hat, für eine große Reihe von bis dahin noch nicht bekannten
 Tatsachen anwendbar war, eine Fassung, die insofern den bis-
 herigen Anschauungen schroff gegenüberstand, als sie die Be-
 deutung der Species für die Spezifität als eine mehr zufällige
 und nicht unbedingt notwendige hinstellte.

Erwachsen auf dem Boden der struktur-chemischen An-
 schauungen Ehrlichs, nimmt die Ehrlich-Morgenroth-
 sche Definition der Spezifität den aus der Ehrlichschen
 Seitenkettentheorie bekannten Begriff des Rezeptors zu Hilfe.

1) Vgl. auch Friedberger und Schiff, Vortrag in der Berliner
 Mikrobiol. Gesellschaft, Sitzung vom 7. Nov. 1913. Berl. klin. Wochenschr.,
 1913, No. 50.

2) Ehrlich und Morgenroth, Ueber Hämolysine, III. Mitteilung.
 Berl. klin. Wochenschr., 1900, No. 21.

Indem aber Ehrlich und Morgenroth¹⁾ unter Rezeptoren „diejenigen bindenden Gruppen im Protoplasmamolekül“ verstehen, „an welchen eine fremde eingeführte Gruppe anhaftet“, setzen sie nichts voraus als die sehr allgemeine Betrachtungsweise des Ehrlich'schen Verteilungsprinzips, und es kann deshalb der Begriff des Rezeptors zur Beschreibung von tatsächlichen Verhältnissen lediglich als „ordnendes Prinzip“, wie sich Morgenroth²⁾ ausdrückt, verwendet werden. Nur in diesem Sinne soll in dieser Arbeit von Rezeptoren die Rede sein.

Nach der Auffassung von Ehrlich und Morgenroth³⁾ sind die Antikörper spezifisch nicht gegen das gesamte Arteriweiß, sondern gegen die Teile des Eiweißmoleküls, die die Antikörperbildung ausgelöst haben, in der Sprache der Seitenkettentheorie gegen die Rezeptoren, soweit sie haptophore Gruppen im Antiserum liefernden Organismus vorgefunden haben. Von der Gesamtheit der z. B. im Hammelblutkörperchen vorhandenen Rezeptoren sind aber nicht alle ein Bestandteil nur des Hammelblutkörperchens, sondern einzelne finden sich z. B. auch im Rinderblutkörperchen, andere sind, wie schon in ihrer 6. Mitteilung über Hämolyse Ehrlich und Morgenroth hervorgehoben haben, weit verbreitet im Tierreich, unabhängig von der Stellung ihres Trägers im zoologischen System, wofür von ihnen als Beispiel das Vorhandensein von Rezeptoren für Ricin und Abrin bei sehr verschiedenartigen Tieren angeführt wird.

Diese letztere Beobachtung trat zunächst ganz in den Hintergrund gegenüber den Erfahrungen bei der praktischen Eiweißdifferenzierung, die gelehrt haben, daß das gemeinsame Vorkommen von Rezeptorengruppen bei artverschiedenen Tieren sich gewöhnlich beschränkt auf solche Formen, die zoologisch oder botanisch einander sehr nahe stehen, so daß sogar in Fällen, in denen vom Standpunkt der Systematik aus keine sehr nahe Verwandtschaft zu bestehen schien, trotzdem lediglich aus dem serologischen Verhalten auf das Vorhandensein einer solchen im Sinne der Deszendenztheorie geschlossen wurde (Uhlenhuth, Marshall, Nuttall). Ausnahmen, z. B. Antimenschensera, die auch gegen Pferdeblut gerichtet waren, wurden gelegentlich beobachtet, eine prinzipielle Bedeutung diesen „übergreifenden“ Seris aber nicht zugeschrieben.

So erschien es als Widerspruch mit dem in weiteren Kreisen immer noch festgehaltenen Begriff der Artspezifität, aber sehr wohl in Einklang mit dem von Ehrlich und Morgenroth begründeten Begriff der Rezeptorenspezifität, als in einer Reihe von Untersuchungen, deren erste die bekannte von Uhlenhuth⁴⁾ über die Spezifität der Linsensubstanz

1) Ehrlich und Morgenroth, III. Mitteilung.

2) Morgenroth und Rosenthal, *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 39, 1912, p. 97.

3) Ehrlich und Morgenroth, Ueber Hämolyse, VI. Mitteilung. *Berl. klin. Wochenschr.*, 1901, No. 21 und 22.

4) Uhlenhuth, *Festschrift für R. Koch*, 1903.

war, gezeigt werden konnte, daß manchen Organzellen eine neben und ganz oder zum Teil unabhängig von der Artspezifität bestehende Organspezifität zukomme.

Auch Experimente, die zur Aufstellung des Begriffes der Zustandspezifität führten, und die wichtige neue Gesichtspunkte ergaben (Obermayer und Pick), vermochten die allgemeine Gültigkeit der Rezeptorenspezifität nicht einzuschränken.

Auf das Vorkommen gleichartiger bindender Rezeptoren bei sehr verschiedenen Tierarten hatten schon die Untersuchungen von Ehrlich über das Ricin und Abrin hingedeutet. Eine Deutung in demselben Sinne forderten später noch zahlreiche andere Befunde, so die von Sachs¹⁾ beim Arachnolysin erhobenen und neuerdings ganz besonders die von Morgenroth und Rosenthal²⁾.

Dagegen lagen zunächst keinerlei Angaben vor über ein entsprechendes Vorkommen von antikörperbildenden Rezeptoren; auf ein solches wurde zum ersten Male mit Bewußtsein hingewiesen in Untersuchungen von v. Dungern und Hirschfeld³⁾ sowie v. Dungern und Brockmann⁴⁾ über Hämagglutinine. Diese Autoren fanden nicht nur im Menschenserum Agglutinine, die durch Blutkörperchen ganz verschiedener Tierarten adsorbiert wurden, sondern sie erhielten auch nach Immunisierung eines Kaninchens und eines Hundes mit Menschenblut Immunsere, die auch Hundeblood agglutinierten. Immerhin handelte es sich hier nicht um regelmäßige Befunde und die erzeugten Agglutinine standen an Stärke hinter den gegen das Antigen gerichteten weit zurück.

Versuche von Frouin und Lisbonne⁵⁾, die durch Injektion von „huile d'œuf“, dem früher offizinellen Eieröl, Hämolyse gegen verschiedene Tierarten erzielt haben wollten, fanden wegen ihrer Unwahrscheinlichkeit keine Beachtung, um so weniger, als es sich nur um schwache Hämolyse handelte und eine Täuschung durch schon vorhandene normale nahelag.

Diese Möglichkeit war gänzlich auszuschließen bei Versuchen, über die Forssman⁶⁾ 1911 berichtete. Forssman erhielt durch parenterale Zufuhr von Meerschweinchenorganzellen sowie von Pferdenierenemulsion bei Kaninchen

1) Sachs, Hofmeisters Beitr., Bd. 2, 1902.

2) Morgenroth und Rosenthal, Biochem. Zeitschr., Bd. 36, 1911; Bd. 39, 1912.

3) v. Dungern und Hirschfeld, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1911.

4) Brockmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 9, 1911.

5) Frouin et Lisbonne, C. r. Soc. Biol., T. 70, 1911. — Frouin, C. r. Soc. Biol., T. 62, 1907.

6) Forssman, Biochem. Zeitschr., Bd. 37, 1911. F. v. Hintze, ebenda, Bd. 44, 1912.

hochwertige Hämolysine gegen Hammelblut, ein Befund, der seitdem immer wieder bestätigt worden ist. Dies Hämolysin besitzt, wie schon Forssman feststellte und wie eingehendere Untersuchungen von Friedberger und Schiff¹⁾ bestätigten, durchaus die charakteristischen Eigenschaften eines hämolytischen Ambozeptors. Daß dieser Ambozeptor von den als Antigen verwandten Organen durchweg in vitro gebunden wird, hat entgegen der ursprünglichen Forssmanschen Annahme, aber in Uebereinstimmung mit fast allen Versuchen von Forssman, Orudschiew²⁾ betont und im Sinne einer Rezeptorengemeinschaft zwischen den betreffenden Organen und den Hammelblutkörperchen gedeutet.

Doerr und Pick³⁾ haben dann die Verbreitung dieser Rezeptorengruppe in der Tierreihe weiter untersucht und ganz ebenso wie bei den von Forssman gefundenen Organen noch ein Bindungs- und Bildungsvermögen für Hammelhämolysin bei den Organen des Hundes und der Katze, des Huhnes und der Schildkröte festgestellt, während Versuche mit den Organen des Rindes, des Schweines und der Taube, sowie einiger anderer Species ein negatives Ergebnis hatten. Die Analyse dieser Verhältnisse im Bindungsversuch hat Orudschiew sowie Doerr und Pick dahin geführt, das zwischen Hammelblutkörperchen und den Organen der angeführten Tierarten angenommene Verhältnis der Rezeptorengemeinschaft dahin zu präzisieren, daß in allen diesen Organen identische Rezeptorengruppen vorhanden seien, die sich im Hammelblutkörperchen neben zahlreichen anderen finden und die durch Kochen nicht zerstört werden.

Bail und Margulies⁴⁾ haben zu den bekannten Tatsachen über den Antagonismus zwischen Tieren mit Hammelhämolysin bindenden bzw. bildenden Organen („Meerschweinchentypus“) und Tieren, deren Organe Hammelhämolysin weder binden noch bilden („Kaninchentypus“), die interessante Beobachtung hinzugefügt, daß das Bindungsvermögen der Meerschweinchenorgane aufgehoben wird durch das Serum von Tieren des Meerschweinchentypus. Sie nehmen aber an, daß ein strenger Gegensatz zwischen Kaninchen- und Meerschweinchentypus nicht besteht, sondern daß Uebergänge vorhanden sind.

Daß auch für das Bildungsvermögen ein scharfer Gegensatz nicht anerkannt werden kann, haben etwa gleichzeitig Friedberger und Schiff⁵⁾ gezeigt, indem sie eine, wenn auch nur geringe Vermehrung der

1) Friedberger und Schiff, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 39.

2) Orudschiew, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 16, 1913.

3) Doerr und Pick, Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1913. II. Mitteil. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913.

4) Bail und Margulies, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913.

5) Friedberger und Schiff, a. a. O.

normalen Hammelhämolysine des Kaninchens durch Organe von Tieren des Kaninchenotypus erzielten (Kaninchen- und Rattenorgane, Menschenblutkörperchen).

Friedberger und Schiff machten in derselben Arbeit auf Beziehungen aufmerksam, die zwischen dem Bindungsvermögen der Organe für Hammelhämolysin und ihrer Giftigkeit zu bestehen scheinen.

Sie zeigten, daß bei einer und derselben Tierspecies das Bindungsvermögen der im Tierversuch zu ermittelnden Giftigkeit parallel geht. Sie heben aber ausdrücklich hervor, daß doch nun keineswegs das Bildungs- und Bindungsvermögen sich mit der akuten Giftigkeit deckt!

Von Forssman, Orudschiew, sowie Doerr und Pick sind die durch Forssman und die späteren Untersucher gefundenen Tatsachen auch zu dem Versuch einer Erklärung für die Wirkung der primär toxischen Antisera (Friedberger und Castelli) herangezogen worden.

Sachs und Nathan¹⁾ haben im Zusammenhang hiermit die Beziehung zwischen Hämolysingehalt und dem Grad der Toxizität bei mit gekochtem Hammelblut von Kaninchen gewonnenen Immunsereis untersucht.

Es ist nun auffällig, daß alle diese heterogenetischen Antikörper ein hämolytisches Vermögen nur gegenüber den Blutkörperchen des Hammels (und der Ziege) besitzen. Hierbei sei ausdrücklich hervorgehoben, daß bisher zu derartigen Immunisierungsversuchen nur eine einzige Tierspecies, nämlich das Kaninchen, herangezogen wurde.

Ich untersuchte deshalb auf Veranlassung von Prof. Friedberger und unter seiner Leitung im Anschluß an unsere früheren Studien über heterogenetische Antikörper einerseits, ob auch hämolytische Sera, die nicht gegen Hammelblutkörperchen, sondern gegen andere Blutkörperchen gerichtet sind, durch heterologe Organe eine Abschwächung ihrer hämolytischen Kraft erleiden, andererseits, ob Immunsereis, die man bei Behandlung verschiedener Species mit demselben Antigen (Hammelblut) erhält, sich heterologen Organen gegenüber im Bindungsversuch verschieden verhalten.

Die Bindungsversuche wurden angestellt mit wässerigen Extrakten. Die Extrakte wurden, soweit es sich um Laboratoriumstiere handelte, unmittelbar nach der Entblutung bereitet, bei Schlachthoftieren wenige Stunden nach der Schlachtung. Ich benutzte die Methode von Ichikawa²⁾.

1) Sachs und Nathan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913.

2) Ichikawa, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, 1913.

Es wurden abgewogene Mengen der durch kurze Spülung in physiologischer Kochsalzlösung von eventuell anhaftendem Blut befreiten Organe fein zerschnitten, mit der doppelten Menge physiologischer Kochsalzlösung in der Reibschale verrieben und bei 37° 2 Stunden digeriert. Der Organbrei wurde nunmehr wenige Minuten zentrifugiert und die noch trübe, zellenreiche Flüssigkeit zum Bindungsversuch verwandt. In den Organen enthaltenes Blut setzt sich gewöhnlich in einer deutlich abgegrenzten Schicht zu Boden, so daß es leicht ausgeschaltet werden kann. Die Abgüsse wurden entweder sofort oder nach Aufbewahrung im Frigo benutzt. Mit Extrakten, die älter als 3—4 Tage waren, wurden nur ausnahmsweise Versuche angestellt; es konnte dann in Kontrollversuchen festgestellt werden, daß das Bindungsvermögen sich gegen vorher nicht geändert hatte. Auch 14-tägige Pferde- und Hundenierenextrakte vermochten Hammelblutambozeptoren noch zu binden, wurden jedoch für die in dieser Arbeit erwähnten Versuche nicht angewandt.

Die nach Ichikawa bereiteten wässerigen Extrakte zeigen im Bindungsversuch, wie uns zahlreiche frühere Erfahrungen gelehrt haben, im Prinzip genau dieselben Eigenschaften, wie die von Forssman verwendeten nativen und die von Morgenroth und von Orudschiew benutzten mehrfach gewaschenen Aufschwemmungen, sowie auch wie die nach Doerr und Pick hergestellten Extrakte (Verreiben des Immunserums mit den zerkleinerten Organen).

Geringe quantitative Unterschiede könnten immerhin bestehen; es kam aber hier nur darauf an, Organe zu finden, die das betreffende Antiserum so stark binden, daß eine einfache Adsorption auszuschließen war. Daß bei stark bindenden Organen zwischen einer reichlich Zellen enthaltenden Aufschwemmung und einem sehr zellenarmen Extrakt, der durch stundenlanges Zentrifugieren von allen gröberen Partikelchen befreit war, in der von mir gewöhnlich angewandten Anordnung keine Unterschiede bestehen, zeigt der folgende Versuch.

Versuch 1.

5 g Pferdeniere werden fein zerkleinert, in der Reibschale mit 10 ccm 0,85-proz. Kochsalzlösung verrieben und 2 Stunden bei 37° digeriert. Der Organbrei wird durch Gaze filtriert, dem Filtrat eine Quote (I) entnommen und der Rest des Filtrates 3 Minuten zentrifugiert. Dem noch völlig trüben Abguß wird eine Quote (II) entnommen und der Rest des Abgusses in zwei Teilen (III und IV) im ganzen noch 3 Stunden scharf zentrifugiert. Nach etwa 1/2-stündigem Zentrifugieren wird bei III der Bodensatz jedesmal aufgeschüttelt, bei IV entfernt und nur der Abguß weiter zentrifugiert.

Aufbewahren im Frigo und Bindungsversuch am folgenden Tag.

Schildkrötenmuskel-Kaninchenambozeptor K 33, lösende Dosis für Hammelblut 0,001.

Je 2,0 ccm des 50-fach verdünnten Ambozeptors werden mit 2,0 ccm der 5-fach verdünnten Organextrakte I, II, III, IV, sowie mit 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung 1 Stunde bei 37° digeriert. Zentrifugieren sämtlicher Röhren und Titration der Abgüsse gegen Hammelblut mit 0,1 ccm Meerschweinchenserum als Komplement.

Hämolyse durch Schildkrötenantiserum.

Menge der Abgüsse	Nach Digerieren mit den Organextrakten				Nativ
	I	II	III	IV	
0,8	Spur	Spur	Spur	Spur	k.
0,6	f. 0	f. 0	f. 0	f. 0	k.
0,4	0	0	0	0	k.
0,2	0	0	0	0	k.
0,6	0	0	0	0	f. k.

Abkürzungen: k. = komplette Hämolyse, f. k. = fast komplette Hämolyse; f. 0 fast keine Hämolyse.

Dieser Versuch nötigt noch nicht zu dem Schluß, daß den Zellen ein Bindungsvermögen überhaupt nicht zukomme, und daß es etwa allein eine wasserlösliche Substanz sein müsse, die die Bindung bewirkt.

In diesen Versuchen waren die Extrakte so konzentriert, daß auch beim scharfen Zentrifugieren immer noch zur Bindung ausreichende Mengen zurückbleiben konnten, zumal Doerr und Pick¹⁾ festgestellt haben, daß noch sehr geringe Mengen von Pferdeniere Hammelambozeptor zu binden vermögen. Wenn man jedoch mit verdünnten Extrakten die Bindungskraft bestimmt, so sieht man, daß der zellreiche und der fast zellfreie Extrakt sich erheblich unterscheiden.

Während noch die 10-fach verdünnten Extrakte sich annähernd gleich verhalten, bindet bei 50-facher Verdünnung der stundenlang zentrifugierte und von Sediment befreite Extrakt nur schwach, der ebenso lange zentrifugierte, aber nachträglich wieder aufgeschüttelte Extrakt noch sehr erheblich.

Versuch 2.

Verwandt wurden die Extrakte I, III und IV des vorhergehenden Versuches. Mit derselben Ambozeptorverdünnung wie oben wurden gleiche Mengen der 10-, 50- und 100-fach verdünnten Extrakte 1 Stunde bei 37°

1) Doerr und Pick, II. Mitteil., a. a. O.

digiert, dann die Gemische zentrifugiert und die Abgüsse gegen Hammelblut ausgewertet (Komplement 0,1 Normalmeerschweinchenserum).

Hämolyse durch Schildkrötenimmunserum.

Abgüß- menge	Nach Digestion mit den Extrakten									Nativ
	I			II			III			
	Verdünnung der Extrakte									
	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	1/10	1/50	1/100	
0,8	0	m.	f. k.	f. 0	Hauch	k.	f. 0	k.	k.	k.
0,6	0	schw.	Hauch	0	st.	f. k.	0	k.	k.	k.
0,4	0	Sp.	st.	0	m.	Hauch	0	k.	k.	k.
0,2	0	Sp.	schw.	0	f. 0	m.	0	st.	st.	k.
0,1	0	0	0	0	0	f. 0	0	m.	m.	Hauch

Abkürzungen: k. = komplett, f. k. = fast komplett, st. = stark, m. = mäßig, schw. = schwach, Sp. = Spur.

Versuche mit Hammelmeerschweinchenambozeptor.

Ueber die Eigenschaften eines Hammelmeerschweinchenimmunserums lassen sich nach dem, was über die Beziehungen zwischen Hammelblutkörperchen und Meerschweinchenorganen bisher festgestellt ist, von vornherein bestimmte Voraussetzungen machen.

Forssman¹⁾ hat gefunden, und Doerr und Pick²⁾, sowie eigene Versuche haben das bestätigt, daß man durch Injektion von Pferdeniere beim Meerschweinchen Hammelhämolysin nicht erhält. Nun binden in vitro die Meerschweinchenorgane das durch Pferdeniere beim Kaninchen erzeugte Hammelhämolysin vollständig. Wenn im Meerschweinchenorganismus ein ähnliches Hämolysin entsteht wie im Kaninchen, und wenn die Meerschweinchenorgane sich in vivo diesem gegenüber nicht anders verhalten als gegenüber dem Hammelkaninchenhämolysin, so müssen im Verlaufe der Immunisierung die Meerschweinchenorgane ein entstehendes Hammelhämolysin dem Kreislauf entziehen. Hiermit steht in Einklang, daß Doerr und Pick bei Meerschweinchen, denen sie Pferdenierenkaninchenambozeptor injiziert hatten, ein sehr rasches Verschwinden aus der Blutbahn beobachtet haben.

1) Forssman a. a. O.

2) Doerr und Pick, I. Mitt. a. a. O.

Falls man nun einem Meerschweinchen Hammelblutkörperchen injiziert, so würden durch elektive Absorption im Verlauf der Immunisierung diejenigen Teile des Antikörpers, die sich gegen die auch im Meerschweinchen vorhandenen Rezeptoren richten, aus dem Blute verschwinden.

Dagegen müßte *ceteris paribus* das Meerschweinchenimmenserum von Rinderblut gebunden werden bzw. Rinderblut lösen; denn die Meerschweinchenorgane enthalten, wie Orudschiew¹⁾ gezeigt hat, keine Rezeptoren für den rinderblutlösenden Anteil der Hammelkaninchensera.

Die tatsächlichen Bindungsverhältnisse entsprechen für die Organe, die den Hammelkaninchenambozeptor binden, ganz den Voraussetzungen. Außerdem lassen aber auch alle die Organe, die ihn nicht binden, den Hammelmeerschweinchenambozeptor unbeeinflusst.

Versuch 3.

Bindungsversuch mit Hammelblutmeerschweinchenambozeptor.

Je 2,0 ccm des 50fach verdünnten Ambozeptors F 97 wurden mit 2,0 ccm der 5fach verdünnten Organextrakte bzw. mit 2,0 ccm physiologischer Kochsalzlösung eine Stunde bei 37° digeriert, dann die Gemische zentrifugiert und die Abgüsse auf Hammelblut titriert. (Komplement 0,1 Normalmeerschweinchen Serum.)

Ab- guß- menge	Hämolyse des Hammelblutes durch Hammelmeerschweinchenambozeptor						nativ (ent- sprechend verdünnt)
	nach Digestion mit Nierenextrakten von						
	Hammel	Pferd	Rind	Schwein	Kanin- chen	Meer- schweinchen	
0,6	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,4	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.
0,2	st.	st.	st.	st.	st.	st.	st.
0,1	m.	m.	m.	m.	m.	m.	m.

Abkürzungen wie in Versuch 2.

Ganz entsprechend fielen Bindungsversuche mit Hundeniere, Hundelunge, Rattenlunge, Taubenlunge, Froschlunge, Schildkrötenleber, Aalmuskel, Aalleber aus.

Gegenüber Rinderblut verhielt sich der Hammelmeerschweinchenambozeptor, was von vornherein nicht zu erwarten war, anders als der Hammelkaninchenambozeptor. Rinderblut wurde nämlich nicht gelöst und nicht gebunden. 8 Meer-

1) a. a. O.

schweinchen, die mit Hammelblut immunisiert waren, verhielten sich in dieser Beziehung übereinstimmend.

Dies läßt sich nicht erklären durch eine Rezeptorengemeinschaft zwischen dem Antigen und den Organen des Immunieres, wie vorhin das Fehlen der Bindung an Pferdeniere gedeutet werden konnte. Hier müßte vielmehr angenommen werden, daß dem Meerschweinchen für diejenigen Rezeptoren, die Hammel- und Rinderblutkörperchen gemeinsam haben, haptophore Gruppen fehlen, so daß hier ein gegen Rinderblut gerichteter Teil des Antikörpers überhaupt nicht entsteht.

Es wurden nun auch Meerschweinchen mit gekochtem Hammelblut behandelt. Da zwischen Meerschweinchenorganen und gekochtem Hammelblut Beziehungen vorhanden sind, die von Doerr und Pick¹⁾ im Sinne einer Rezeptorengemeinschaft aufgefaßt worden sind, so war es das Wahrscheinlichste, dasselbe Resultat zu erhalten wie bei der Immunisierung mit Pferdeniere, also überhaupt keine Hämolysinbildung.

Bei der Prüfung am 8. Tage nach der Injektion zeigte bei allen vier injizierten Tieren das inaktivierte Serum in Dosen von 0,1 mit 0,1 normalem Meerschweinchenserum als Komplement ein mäßiges Lösungsvermögen für Hammelblut, während das Serum derselben Tiere vorher ebenso wie das von 8 mit Pferde- oder mit Rinderniere behandelten Tieren in derselben Dosis keine Spur von Hämolyse verursachte. Daraufhin wurden die Tiere wiederum mit gekochtem Hammelblut behandelt und nach weiteren 7 Tagen wurden nicht stark, aber jedenfalls deutlich hämolytische Sera erhalten.

Versuch 4.

4 Meerschweinchen im Gewicht von 300—350 g erhalten intraperitoneal am 24. IX. und 30. IX. je 2,0 ccm einer gewaschenen 100-proz. Aufschwemmung von Hammelblut, die 15 Minuten lang gekocht worden war.

7. X. Blutentnahme: bei allen 4 Seris (inaktiviert bei 56°; 0,1 Normalmeerschweinchenserum als Komplement) bewirkt 0,1 Hämolyse mäßigen Grades gegenüber Hammelblut. Pferde-, Rinder- und Kaninchenblut wird nicht hämolysiert.

7. X. und 10. X. Je nochmalige intraperitoneale Injektion wie anfangs.

17. X. Blutentnahme: hämolytischer Titer für Hammelblut bei 2 Tieren 0,06, bei den beiden anderen 0,04. Pferde- und Rinderblut wird nicht hämolysiert.

1) Doerr und Pick, I. Mitt.

Die Sera der mit gekochtem Blut behandelten Meerschweinchen unterscheiden sich von denen der mit nativem Blut behandelten. Das durch natives Blut erzeugte Immunsrum wurde nämlich gar nicht, das durch gekochtes erhaltene wenigstens zum Teil von gekochten Hammelblutkörperchen gebunden. Das zeigen die folgenden Versuche.

Versuch 5 und 6.

I. Je 2,0 ccm des 50fach verdünnten Hammelblutmeerschweinchenambozeptors werden gemischt mit 2,0 ccm

- 1) einer 10-proz. Aufschwemmung gewaschenen nativen Hammelblutes,
- 2) derselben Aufschwemmung, nachdem sie 15 Minuten gekocht worden war,
- 3) physiologische Kochsalzlösung.

1 Stunde Digerieren bei 37°, zentrifugieren und Titration der Abgüsse.

II. Mit dem 5fach verdünnten, nach wiederholter Injektion von gekochtem Hammelblut vom Meerschweinchen F104 entnommenen Ambozeptor wird der entsprechende Versuch angesetzt.

Ab- guß- menge	Hämolyse durch Meerschweinchenimmunsrum, das hergestellt war durch Injektion von					
	nativem Hammelblut			gekochtem Hammelblut		
	nach Digestion mit		nativ (ent- sprechend verdünnt)	nach Digestion mit		nativ (ent- sprechend verdünnt)
	Hammel- blut	Hammel- blut 100°		Hammel- blut	Hammel- blut 100°	
0,8	f. k.	k.	k.	Sp.	k.	k.
0,6	0	k.	k.	0	trübe	k.
0,4	0	k.	k.	0	trübe	k.
0,2	0	st.	st.	0	st.	st.
0,1	0	Sp.	Sp.	0	Sp.	m.

k. = komplett, st. = stark, m. = mäßig, Sp. = Spur.

Es folgt aus der gelungenen Immunisierung, daß beim Kochen im Hammelblut, abgesehen von denjenigen Rezeptoren, die es mit den Meerschweinchenorganen gemeinsam hat, noch andere erhalten bleiben, die wahrscheinlich im nativen Hammelblut schon vorhanden waren¹⁾. Dann muß allerdings erwartet

1) Es ist hier auch an die von Rosenthal (Bioch. Zeitschr., Bd. 46, 1912) für osmierte Blutkörperchen erörterte Möglichkeit des Manifestwerdens latenter Rezeptoren zu denken.

werden, daß auch das durch native Hammelblutkörperchen beim Meerschweinchen gewonnene Immunsrum wenigstens in geringem Maße von gekochtem Hammelblut gebunden wird. In dem angeführten Versuche ist das nicht der Fall. Es ist aber möglich, daß bei anderen quantitativen Verhältnissen auch der durch native Hammelblutkörperchen erzeugte Ambozeptor an gekochtes Blut gebunden wird.

Der hammelblutlösende Anteil des Rinderkaninchenserums.

Ich behandle hier zunächst die Verhältnisse des hammelblutlösenden Anteils des Rinderkaninchenserums und erst später die des rinderblutlösenden Anteils.

Orudschiew¹⁾ hat schon festgestellt, daß die hammelblutlösende Komponente des von Kaninchen gewonnenen Rinderimmunsrum sich von dem entsprechenden durch Hammelblutinjektion erhaltenen Immunsrum dadurch unterscheidet, daß sie nicht durch Organe des Meerschweinchens gebunden wird. (Orudschiew hat hierdurch ausschließen können, daß die „Bindung“ etwa durch eine Beeinträchtigung des Komplementes vorgetäuscht sei.)

Ich habe nun die Bindungsverhältnisse des hammelblutlösenden Anteils des Rinderkaninchenserums für die Organe einer Reihe von anderen Tieren sowie auch gegenüber gekochtem und ungekochtem Hammel- und Rinderblut untersucht.

Gegenüber nativem und gekochtem Hammelblut verhält sich der hammelblutlösende Anteil so, wie es nach den Angaben von Orudschiew über das Fehlen der Bindung durch Meerschweinchenorgane zu erwarten war. Der Ambozeptor wird vollständig gebunden durch natives, gar nicht oder fast gar nicht durch gekochtes Hammelblut. Der Hammelblutanteil des Rinderkaninchenserums wird ferner, wie bekannt, durch natives Rinderblut ebenfalls vollständig gebunden; dagegen wird er gar nicht gebunden durch gekochtes Rinderblut, wie der folgende Versuch zeigt.

1) a. a. O.

Versuch 7.

2,0 ccm eines 10-fach verdünnten Rinderkaninchenambozeptors werden mit 2,0 ccm der folgenden 10-proz. Blutkörperchenaufschwemmungen angesetzt:

- 1) natives Rinderblut,
- 2) natives Hammelblut,
- 3) gekochtes Rinderblut,
- 4) gekochtes Hammelblut.

1 Stunde Digerieren bei 37°, darauf Zentrifugieren und Titration der Abgüsse gegen Hammelblut.

Abguß- menge	Hämolyse von 5-proz. Hammelblut durch Rinderkaninchen Serum				
	nach Digestion mit				nativ (entsprechend verdünnt)
	nativem Blut		gekochtem Blut		
	Rind	Hammel	Rind	Hammel	
0,8	0	0	k.	k.	k.
0,6	0	0	k.	k.	k.
0,4	0	0	k.	k.	k.
0,2	0	0	k.	Hauch	k.
0,1	0	0	stark	stark	stark

k. = komplette Hämolyse.

Es verlieren also beim Erhitzen auf 100° sowohl Hammel- als Rinderblutkörperchen die Fähigkeit, den Hammelanteil des Rinderkaninchen Serums zu binden. Man darf hieraus schließen, daß alle diejenigen Anteile, die beide Blutkörperchenarten gemeinsam besitzen, nicht hitzebeständig sind.

Durch Digestion mit Organextrakten, wobei dieselben Organe und Tierspecies geprüft wurden, wie in Versuch 3, erlitt der hammelblutlösende Anteil des Rinderkaninchen Serums keine Abschwächung.

Versuch 8.

Der 10-fach verdünnte Rinderkaninchenambozeptor wurde mit den 5-fach verdünnten Organextrakten zu gleichen Teilen gemischt. Behandlung der Gemische wie in Versuch 3. Dieselben Organe wie in Versuch 3.

Das hämolytische Vermögen der Abgüsse war in keinem Fall verschieden von dem des entsprechend verdünnten Ambozeptors.

Besonders hervorgehoben sei, daß auch die geprüften Organe des Aales den Ambozeptor nicht gebunden haben. Die

Aalorgane binden ebensowenig, wie ich außerdem festgestellt habe, den Ambozeptor aus einem durch Hammelblut erzeugten Kaninchenantiserum.

Da Friedberger und Schiff gezeigt haben, daß vor allem giftige Organextrakte einen Einfluß auf die Entstehung heterogenetischer Hämolysine haben ¹⁾, so hatten wir zunächst eine intensive Bindung bei den Aalorganextrakten erwartet, die wir entsprechend der bekannten Giftigkeit des Aalserums für hochtoxisch hielten. Zu unserer Ueberraschung stellte sich aber heraus, daß die Organextrakte des Aales gar keine besonders intensive Giftigkeit besitzen. Namentlich der Muskelextrakt steht an Giftigkeit weit hinter der des Serums zurück.

Das Serum der von A. Mosso ²⁾ untersuchten Aale war schon in den Dosen von 0,05 intravenös injiziert für Kaninchen akut tödlich, vom Serum der von mir in Berlin gebrauchten Flußaale genügt nach den Erfahrungen Dr. Steindorffs in unserem Institut 0,1, um den Tod eines Kaninchens herbeizuführen.

Der Aalmuskelextrakt dagegen hatte, in erheblicher Menge injiziert, nicht den Tod des Tieres zur Folge, der Aalleberextrakt erwies sich als giftiger, aber er war stark blutig gefärbt, so daß eine Interferenz mit der Wirkung von Aalblut nicht ausgeschlossen werden kann.

1) Wir hatten gleichzeitig hervorgehoben, daß auch relativ ungiftige Antigene wie die Rattenniere oder gekochte Hammelerythrocyten (nach einer neueren Untersuchung von Pick ist auch die Pferdlinse hierher zu rechnen) heterogenetisches Hammelhämolysin produzieren. Wir konnten damals aber in einer besonderen Versuchsreihe demonstrieren, daß für die Organe des einzelnen Tieres ein solcher Parallelismus tatsächlich besteht.

Die genaue quantitative Bestimmung des Bindungsvermögens der einzelnen Organe, wie sie Doerr und Pick vorgenommen haben, bestätigen das insofern, als sie Lunge und Myocard sowie Niere am stärksten bindend fanden, während Gehirn, Leber und Milz ein geringeres Bindungsvermögen hatten. Ein Vergleich mit der durch Friedberger und Ichikawa ^{*)} für die einzelnen Organe des Kaninchens festgestellten Giftigkeit zeigt, daß hier dieselbe Reihenfolge gilt.

2) A. Mosso, Arch. f. exp. Pathol., Bd. 25, 1889.

^{*)} Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, 1913.

Versuch 9.

Kaninchen K 29, Gewicht 1650 g, erhält intravenös 3,0 ccm Aal-
muskelextrakt (1:2).

Unmittelbar danach Niesen, dann Kotabgang. Wird bald munter,
nach 6 Minuten Dyspnoë, scheinbar Paresen, sitzt mit ausgestreckten
Vorderbeinen, erholt sich.

Kaninchen K 30, Gewicht 1750 g, erhält intravenös 2,5 ccm Leber-
extrakt (1:2) (stark blutig gefärbt).

Krämpfe sofort nach der Injektion, tot nach 2 Minuten.

Ich stelle nun noch tabellarisch die Bindungsverhältnisse
zusammen, soweit sie geeignet sind, die verschiedenen unter-
suchten Hammelambozeptoren zu charakterisieren. Dabei
rechne ich als Bindungen nur sehr starke Bindungen in dem
Sinn, wie sie Doerr und Pick als positiv aufgefaßt haben.
Die Angaben über Hammelblut- und Pferdenierenimmunsere
sind aus den Arbeiten von Forssman, Orudschiew, sowie
Doerr und Pick entnommen. Von ihrer allgemeinen Gültig-
keit habe ich mich in fast allen Fällen durch eigene Versuche
überzeugt. Die 5 angeführten hammelblutlösenden Ambo-
zeptoren lassen sich, wie aus der Tabelle ersichtlich, durch
ihr verschiedenes Verhalten in den Bindungsversuchen unter-
scheiden. Von dem angeführten Pferdenierenambozeptor nicht
zu unterscheiden sind einstweilen die durch Meerschweinchen-,
Hunde-, Katzen-, Hühner- und Schildkrötenorgane erzeugten
Antisera.

Hammelblutlösende Antisera.

Antigen	Hammelblut, Pferdeniere, Rinder- blut (Hammelblut 100°)			Hammelblut, Hammelblut 100°	
	Kaninchen			Meerschweinchen	
Bindung durch Hammelblut	+	+	+	+	+
Hammelbl. 100°	+	+	—	—	±
Rinderblut	+	—	+	—	—
Rinderblut 100°	.	—	+	—	.
Pferdeniere	+	+	—	—	—
Schweineniere	—	—	—	—	—

+ starke, ± sehr geringe, keine Bindung, . nicht untersucht.

Pferdeblutkaninchen Serum.

Als Immuntiere wurden hier, wie bei der Herstellung der weiter unten zu besprechenden Menschen- und Rinderimmunsera Kaninchen verwendet, für deren inaktiviertes Serum vor der Behandlung die kleinste unter Zusatz von 0,1 Meer-schweinchenserum Hammelblut komplett lösende Dosis bestimmt worden war. Es ergab sich eine kleine, aber regel-mäßige Steigerung des Lösungsvermögens für Hammelblut, was in Analogie zu setzen ist zu der von Friedberger und Schiff nach Injektion von Menschenblut beobachteten Steige-rung des hämolytischen Titers für Hammelblut.

Versuch 10.

4 Kaninchen wurden am 25. IX. und 30. IX. mit gründlich in phys. Kochsalzlösung gewaschenen Pferdeblutkörperchen intravenös injiziert (100-proz. Aufschwemmung, je 1,5 ccm). Blutentnahme am 7. X.

Kaninchen No.	Hämolytischer Titer für			
	vor Injektion		nach Injektion	
	Hammel	Pferd	Hammel	Pferd ¹⁾
K 39	> 0,1	> 0,2	0,01	0,003
K 35	> 0,1	dgl.	0,005	0,005
K 36	> 0,2	„	0,04	0,004
K 37	0,08	„	0,02	0,003

Das zu den Bindungsversuchen verwendete Pferdeblut-antiserum wurde durch keines der geprüften Organe gebunden. Ich begnüge mich deshalb damit, die Versuchsanordnung an-zugeben.

Versuch 11.

2,0 ccm des 100-fach verdünnten Pferdeblutimmunserums K 35 wurden mit 2,0 ccm der 5-fach verdünnten Organextrakte 1 Stunde bei 37° digeriert, sodann zentrifugiert und die Abgüsse mit Pferdeblut (5-proz. Aufschwem-mung) titriert. Ebenso wie der entsprechend verdünnte native Ambozeptor lösten die Abgüsse komplett bis zu Mengen von 0,1 (entsprechend 0,0005 des unverdünnten Ambozeptors).

Die geprüften Organe waren Niere von Pferd, Rind, Hammel, Schwein, Hund, Mensch, Lunge von Ratte, Hund, Mensch, Taube, Frosch.

1) Da Pferdeblut sehr stark agglutiniert wurde, war der Titer für Pferdeblut nicht mit völliger Genauigkeit anzugeben.

Menschenblutkaninchen Serum.

Die Bindungsversuche fielen hier sämtlich negativ aus. Auch hier beschränke ich mich deshalb bei der völligen Uebereinstimmung aller Versuche auf die Wiedergabe der Versuchsanordnung.

Versuch 12.

Es mußte ein nur schwach hämolytischer Ambozeptor (Kaninchen F 22) benutzt werden. Der unverdünnte Ambozeptor wurde in Mengen von 0,5 ccm mit der gleichen Menge der 5-fach verdünnten Organextrakte bzw. mit 10-proz. Blutkörperchenaufschwemmungen gemischt, 1 Stunde bei 37° digeriert und dann zentrifugiert. Die Abgüsse lösten mit 0,1 Meerschweinchenserum 5-proz. gewaschenes Menschenblut noch komplett in Mengen von 0,06 ccm, ebenso wie das native, nur entsprechend verdünnte Serum.

Hammelblut, Rinderblut, Pferdeblut, sowie gekochtes Menschenblut schwächte den Ambozeptor nicht ab.

Von Organen wurden geprüft: Pferdeniere, Rinderniere, Schweineniere, Hammelnieren, Kaninchennieren, Kaninchenlunge, Schildkrötenlunge, Froschlunge.

Der rinderblutlösende Anteil des Rinderblutkaninchen Serums.

Die Versuche wurden im Zusammenhang mit denjenigen für den hammelblutlösenden Anteil des Rinderblutkaninchen Serums angestellt, indem hierbei gleichzeitig das Lösungsvermögen der Abgüsse gegenüber Rinderblut bestimmt wurde.

Ein Organ mit eindeutigem Ambozeptorbindungsvermögen, wie es etwa die Pferdeniere gegenüber Hammelambozeptor besitzt, wurde nicht gefunden.

Gar nicht gebunden wurde der Ambozeptor durch die Nieren von Pferd, Hammel, Schwein, Ratte, Meerschweinchen, Mensch, durch Aalmuskel, Schildkrötenmuskel, Schildkrötenlunge.

Ein sehr mäßiger Grad von Bindung wurde beobachtet bei den Organen eines Hundes (der Versuch wurde mehrfach wiederholt), bei Froschlunge und bei einer Menschenlunge. Da diese Lunge (nicht pathologisch veränderte Lunge eines Kindes) auch die Hammelkomponente des Serums entsprechend beeinflußte, dürfte hier an eine Wirkung auf das Komplement

zu denken sein, um so mehr als, wie angeführt, Menscheniere sich indifferent verhielt.

Bei den Hundeorganen (Lunge und Muskel), die, wie besonders geprüft wurde, das hammelblutlösende Schildkrötenimmenserum sehr stark banden, wurde aus dem Rinderimmenserum nur die rinderblutlösende Komponente, allerdings auch nur spurweise abgeschwächt, dagegen nicht die hammelblutlösende.

Ich gebe hier das Protokoll, gleichzeitig als Beispiel für alle anderen mit diesem Ambozeptor ausgeführten Versuche.

Versuch 13.

Je 2,0 ccm des 10-fach verdünnten Rinderkaninchenambozeptors K 13 werden mit 5-fach verdünntem Hundelungenextrakt bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung (je 2,0 ccm) 1 Stunde bei 37° digeriert, dann zentrifugiert und die Abgüsse gegen Hammelblut und gegen Rinderblut ausgewertet.

Abguß- menge	Hämolyse von			
	Hammelblut		Rinderblut	
	nach Digestion des Ambozeptors mit Hundelunge	durch nativen Ambozeptor	nach Digestion des Ambozeptors mit Hundelunge	durch nativen Ambozeptor
0,2	k.	k.	k.	k.
0,1	Hauch	Hauch	f. k.	k.
0,08	stark	stark	Hauch	k.
0,06	mäßig	mäßig	stark	k.
0,04	Spur	Spur	mäßig	f. ganz k.
0,02	0	0	Spur	stark
0,01	0	0	0	mäßig

Versuche, durch intravenöse Injektion der zum Bindungsversuch verwandten Hundeorganextrakte, sowie von Frosch- und Menschenorganextrakten beim Kaninchen die Bildung von Rinderhämolysin zu erzielen, hatten bisher keinen Erfolg. Bekanntlich lösen auch die nach Injektion von Meerschweinchenorganen gewonnenen Kaninchensera niemals Rinderblut. Auch für diese Organe hat aber Morgenroth ein mäßiges Bindungsvermögen gegenüber Rinderimmenserum gesehen. Da die Antigenfähigkeit der bindenden Organe einstweilen als Prüfstein für die Spezifität angesehen werden muß, so können diese schwachen, von mir beobachteten Bindungen zunächst auch als unspezifische Adsorptionen aufgefaßt werden.

Als tatsächliches Ergebnis muß festgestellt werden, daß Beziehungen, wie sie zwischen Hammelblutkörperchen und einer Reihe von heterologen Organen bestehen, Beziehungen, die als Rezeptorengemeinschaft aufgefaßt worden sind, sich weder für Rinderblut, noch für Pferdeblut, noch für Menschenblut haben auffinden lassen, daß also jene rätselhafte „Rezeptorengruppe“ immer noch eine ganz eigenartige Sonderstellung einnimmt.

Zusammenfassung.

1) Pferdenierenextrakte, die durch mehrstündiges Zentrifugieren möglichst zellfrei gemacht wurden, erfahren eine Verringerung, aber keine Aufhebung ihres Bindungsvermögens für hammelblutlösende Ambozeptoren.

2) Durch Injektion von Hammelblut erhält man beim Meerschweinchen ein Immunserum, das sich von dem entsprechenden beim Kaninchen unterscheidet.

Das Hammelmeerschweinchenserum wird nicht durch diejenigen heterologen Organe abgeschwächt, die nach Forssman bzw. Doerr und Pick das Hammelkaninchenserum binden.

Das Hammelmeerschweinchenserum wird auch von anderen untersuchten heterologen Organen nicht gebunden.

Das Hammelmeerschweinchenserum wirkt auf Rinderblut nicht lytisch.

3) Vom Kaninchen gewonnene Antisera gegen Pferdeblut, Menschenblut und Rinderblut werden durch eine Reihe heterologer Organe, die zum großen Teil Hammelhämolysin binden, nicht oder doch wenigstens nicht einwandfrei gebunden.

Nachdruck verboten.

[Aus der serologischen Abteilung (Dr. Emmerich) des Heidelberger Pathologischen Instituts (Direktor: Professor Dr. Ernst).]

Untersuchungen mit Hühnereigelb-Antiserum.

Von **Herbert Seng.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. November 1913.)

Kurz nach Bekanntwerden der Präzipitationsmethoden machten Uhlenhuth und Ottolenghi darauf aufmerksam, daß es gelingt, mittels der Methode das Eigelb des Hühnereis von dem anderer Vogeleier zu unterscheiden, und in der Folgezeit erschienen noch mehrere Arbeiten, welche auf die praktische Verwendbarkeit der Methode zur Untersuchung von Nahrungsmitteln hinwiesen und sich mit dem biologischen Verhalten des Eigelbes oder der ganzen Eisubstanz verschiedener Tiere zu einem Hühnereigelb-Antiserum, sowie mit dem serologischen Nachweis von Eigelb in Nahrungsmitteln beschäftigten.

Von Uhlenhuth und Ottolenghi, Galli-Valerio und Borland, sowie Emmerich wurde das Eigelb verschiedener Tierarten gegenüber hochwertigem Hühnereigelb-Antiserum untersucht, und sämtliche Autoren stellten fest, daß den Hühnern nahestehende Vogelarten mit Hühnereigelb-Antiserum eine deutliche, wenn auch abgeschwächte Präzipitation gaben. Außerdem wurde von den oben Genannten, sowie Schütze die Möglichkeit des Nachweises von Eigelb in Nahrungsmitteln außer Zweifel gestellt, wobei jedoch besonders Emmerich darauf hinwies, daß ein negatives Resultat bei der Nahrungsmitteluntersuchung sehr wohl durch die Bereitungsart des betreffenden Präparates bedingt sein könnte und deshalb nur beschränkte oder gar keine Schlüsse auf die Verwendung von Eigelb bei der Herstellung der Präparate zuläßt.

Zu der Frage, welche bei der Herstellung in Betracht kommenden Vorgänge und die Elimination welcher Bestandteile dem Eigelb seine für das Zustandekommen der Präzipitinreaktion erforderlichen Eigenschaften nehmen, soll die vorliegende Arbeit, die auf Veranlassung von Herrn Dr. Emmerich vorgenommen wurde, einen Beitrag liefern.

Im wesentlichen jedoch sollen die Resultate der biologischen Prüfung des Eigelbs von Tieren, vor allem Vögeln,

mitgeteilt werden, die bisher zum größten Teil noch nicht nach der Präzipitationsmethode untersucht wurden. Und ferner soll untersucht werden, ob der Ausfall der Reaktion namentlich mit Rücksicht auf die Antigenverdünnungen, in denen noch eine positive Reaktion auftritt, in Einklang zu bringen ist mit der gebräuchlichen Einteilung der Vogelarten. Zum Vergleich herangezogen wurden zur Bewertung dieser Befunde die Resultate, die Nuttall vom gleichen Gedanken ausgehend dadurch erhielt, daß er Hühnerblutantisera mit dem Blut einer sehr großen Reihe von Vögeln präzipitieren ließ.

Die Beschaffung eines einigermaßen ausreichenden Materials war sehr schwierig und nur durch die Güte der Direktion des Zoologischen Gartens zu Frankfurt a. M. und der Zoologischen Gesellschaft in Hamburg möglich, denen ich hier nochmals meinen ergebensten Dank ausspreche.

Herstellung des Serums: Alle 5—6 Tage wurden jedem von 3 Kaninchen 2 ccm einer Hühnereigelb-Aufschwemmung 1 : 50 in physiologischer NaCl-Lösung in die Ohrvene injiziert. Aus technischen Gründen wurden 2mal 4 ccm intraperitoneal gegeben.

Ein Serum reagierte nach der vierten Injektion mit Hühnereigelb in Verdünnung 1 : 20 000 positiv, worauf das Tier entblutet wurde. Die beiden anderen erst nach der fünften Injektion mit einer Verdünnung von 1 : 10 000 bzw. 1 : 20 000. Das Serum wurde mit dem Uhlenhuthschen Filtrierapparat filtriert und in sterile Glasröhrchen eingeschmolzen im Eisschrank aufbewahrt.

Die Antisera behielten, wie die Kontrollen ergaben, 2 Monate ihre Wirksamkeit fast unverändert bei, erst dann zeigte sich eine geringe Abschwächung.

Ferner wurde bei jeder Untersuchung festgestellt, daß der betreffende Extrakt oder das betreffende Eigelb mit normalem Kaninchenserum und das verwendete Antiserum mit physiologischer Kochsalzlösung keine Reaktion gab. Die einzelne Reaktion wurde in der gebräuchlichen Weise so ausgeführt, daß 0,9 ccm der Eigelbverdünnung mit 0,1 ccm Antiserum unterschichtet wurde.

Verwertet wurden nur solche Befunde, die spätestens 15 Minuten nach Anstellung der Reaktion erfolgten. Zunächst soll hier eine Tabelle folgen, welche die Resultate der Präzipitinreaktion zwischen dem Eigelb verschiedener Vogelarten und Hühnereigelb-Antiserum enthält.

I. Ord- nung	II. Familie	III. Name	IV. Verdünnungen des Eigelba					V. Bemer- kungen	
			1 : 1000	1 : 2000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000		
Pici	Picidae	1. Gattung nicht be- kannt	s	s	s' sch	8' Sp	0	N I: sch	
		Gallus domesticus	s	s	s	1'	5' Sp		
Passeres	Fringil- lidae	2. Serinus canarius, Kanarienvogel	1'	1' sch	0	0	0	N I: sch	
		G. d.	s	s	s	10' Sp	0		
		3. Passer domesticus, Sperling	s	s	5'	12' sch	0		
		G. d.	s	s	s	s	2' sch		
		4. Fringilla coelebs, Buchfink	5'	5'	0	0	0		
	Alaudi- dae	6. Galerita cristata, Haubenlerche	G. d.	s	s	s	1/2'	3'	Wenig Ei- gelb, Em- bryo (1,05 g)
			G. d.	s	s	s	1/2'	3'	
			7. Sylvia cinerea, Dorngrasmücke	3' sch	0	0	0	0	
			G. d.	s	s	s. sch	5' sch	0	
			8. Turdus musicus, Drossel	1'	1'	3' sch	0	0	
Turdi- dae	9. Turdus merula, Amsel	G. d.	s	s	s	s	2' sch	N I: 0—sch deutl. N II: mittl. Wenig Ei- gelb, Em- bryo	
		G. d.	s	s	3' sch	0	0		
		G. d.	s	s	s	s	2' sch		
		G. d.	s	s	1' Sp	0	0		
Paridae	11. Panurus biarmi- cus, Bartmeise	G. d.	s	s	s	1/2'	s	N I: sch, deutl. N II: deutl.	
		G. d.	s	s	s	s	2' sch		
Sturni- dae	12. Sturnus vulgaris, Star	G. d.	3' sch	3' sch	4' sch	0	0	N I: 0	
		G. d.	s	s	s	1/2'	3'		
Corvi- dae	13. Corvus frugilegus, Saatkrähe	G. d.	s. sch	s. sch	?	10' sch	0	N I: 0	
		G. d.	s	s	s	s	2' sch		
Rapta- cores	Vulturi- dae	14. Vultur monachus, Mönchsgeier	G. d.	s	s	2'	6' Sp	0	N I: deutl.
			G. d.	s	s	s	1/2'	3'	
	Falconi- dae	15. Ibycter Chi- nango	G. d.	s	s	4' sch	4' sch	0	
			s	s	s. Sp.	2' Sp	8' Sp		

I. Ord- nung	II. Familie	III. Name	IV. Verdünnungen des Eigelbs					V. Bemer- kungen
			1:1000	1:2000	1:5000	1:10 000	1:20 000	
Rapta- cores	Falconi- dae	16. <i>Astur palumba- rius</i> , Habicht G. d.	2' beg. 4' s	2' beg. 4' s	3' beg. 4' 1'	10' sch 4' sch	0 6' sch	Wenig Ei- gelb, Em- bryo, N I: sch
		17. <i>Falco subbutea</i> , Lerchenfalke G. d.	1' s	1' s	3' sch s	6' Sp s. sch	0 6' sch	
Colum- binae	Colum- bidae	18. <i>Columba livia</i> , domest., Taube G. d.	s s	s s	s s	5' Sp 1'	10' Sp 5' Sp	N I: 0—sch Eigelb m. et- was Eiklar verm.
		19. <i>Columba livia cu- cullata</i> , Perücken- taube G. d.	s. sch. s	2' s	3' s	0 1'	0 5' Sp	
Gallina- cei	Tetrao- nidae	20. <i>Caccabis rufa</i> , Rothuhn G. d.	s s	1' s	1' s	1' sch 1/2'	0 3'	N I: sch N II: deutl. N II: stark
	Phasia- nidae	21. <i>Phasianus colchi- cus</i> , Gem. Fasan G. d.	s s	2' s	5' s	12' s. sch	0 5' Sp	
		22. <i>Phasianus mong- olicus</i> , Mongol- fasan G. d.	s s	s s	1' s	6' 1/2'	0 3'	
		23. <i>Gallophasis nyc- theremus</i> , Silber- fasan G. d.	s s	s s	s s	2' 1'	7' 5'	
		24. <i>Pavo cristatus</i> , Pfau G. d.	s s	s s	1' sch s	3' sch s. sch	0 6' sch	
		Craci- dae	25. <i>Meleagris gallo- pavo</i> , Pute G. d.	s s	s s	s s	0 s. sch	
	Grallae	Chara- driidae	26. <i>Vanellus crista- tus</i> , Kiebitz G. d.	s s	s s	s s	s. sch 1'	
Lamelli- rostris	Cygni- dae	27. <i>Cygnus atratus</i> , schwarzer Schwan G. d.	s s	s s	s s	2' 1'	2' 5' Sp	
		Anseri- dae	28. <i>Anser domesticus</i> , Hausgans G. d.	s s	s s	s. sch s	2' 1'	0 5' Sp

I. Ord- nung	II. Familie	III. Name	IV. Verdünnungen des Eigelbs					V. Bemer- kungen
			1 : 1000	1 : 2000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	
Lamelli- rostris	Anseri- dae	29. Anser anser L. (var. dom.), Tou- louser Gans	s	s	s. sch	2'	0	Wenig Ei- gelb, Em- bryo Mit Eiklar verm.
		G. d.	s	s	s	1'	5' Sp	
		30. Brauta canadensis, Trompetengans	2'	2'	2'	2'	6'	
	Anati- dae	G. d.	s	s	s	s. sch	6' sch	
		31. Anas domestica, Hausente	s	s	s. sch	0	0	
		G. d.	s	s	s	s. sch	5' Sp	
Longi- pennes	Laridae	32. Anas boscas L. (var. dom.), Peking- ente	1'	2'	2'	4' sch	5' Sp	
		G. d.	s	s	s	s. sch	6' sch	
		33. Larus (genaue An- gabe nicht mög- lich), Möve	s. sch	s. sch	0	0	0	
		G. d.	s	s	s	s. sch	6' sch	

Erklärung der Tabelle: Rubrik I enthält die Namen der Ordnungen, II die Namen der Familien, III die Namen der Vögel, IV die Resultate der Reaktionen, wobei folgende Abkürzungen verwendet wurden:

s = die Reaktion trat sofort deutlich auf; 2' = die Reaktion trat nach 2 Minuten deutlich auf; sch = die Reaktion trat schwach auf; Sp = es trat nur eine Spur auf; 0 = keine Reaktion.

Jeder einzelnen Reaktion ist als Vergleich gegenübergestellt die Reaktion, welche das verwendete Antiserum mit der gleichen Verdünnung von Hühnereigelb ergab.

Rubrik V enthält 1. Bemerkungen über besondere Beschaffenheit des vorliegenden Eies oder über Versuchsfehler; 2. zum Vergleich die Resultate, welche Nuttall bei einigen der hier bearbeiteten Vogelarten zwischen deren Blutserum und Hühnerblutantiserum (N I) oder zwischen deren Eiklar und Hühnereiklarantiserum (N II) erhielt. N: 0—sch heißt: die Resultate mehrerer Versuche von Nuttall waren teils negativ, teils schwach positiv.

Bei der Betrachtung der Tabelle daraufhin, bis zu welcher Verdünnung die einzelnen Eigelbarten innerhalb der gleichen Familie mit dem Antiserum reagieren, ergibt sich bei verschiedenen Familien ein beträchtlicher Unterschied.

Während die beiden Vertreter der Familie Turdidae (No. 8 und 10) bis zur Verdünnung 1:5000, und die Falconidae (No. 15—17) bis zu 1:10 000 reagieren, zeigen sich innerhalb der Familien Fringillidae, Columbidae, Phasianidae, Anseridae und Anatidae zum Teil sehr starke Unterschiede.

Auffallend ist die Differenz zwischen zwei im System sich so nahestehenden Eigelbarten wie No. 18 und 19, die auf keinen Fall auf dem geringen Versuchsfehler bei No. 19 beruhen kann, ebenso zwischen No. 31 und 32.

Seltsam ist, daß von den 4 dem Gallus domesticus sehr nahestehenden Phasianidae No. 21—24 3 nur bis 1:10 000 reagieren, während verschiedene Angehörige sogar anderer Ordnungen, z. B. No. 18, 26, 27, 30, 32, eine Reaktion bis 1:20 000 ergeben.

Bei der geringen Zahl der untersuchten Arten ist wohl anzunehmen, daß bei weiterer Ausdehnung der Untersuchungen sich auch bei den Turdidae und Falconidae Unterschiede zeigen würden. Einzig wäre wohl hervorzuheben, daß die Gattungen der eigenen Ordnung (Gallinacei) alle mit Ausnahme von No. 25 bis 1:10 000 reagierten.

In der Geschwindigkeit, mit welcher die Reaktion auftritt, sind Unterschiede von 1 Minute nicht zu verwerten, da das Serum sich unten im Glase verschieden schnell deutlich absetzt.

Auch wenn man nur die größeren Zeitunterschiede berücksichtigt, wobei natürlich die einzelnen Versuche nur mit Berücksichtigung der Reaktionsgeschwindigkeit des verwendeten Serums gegenüber Hühnereigelb untereinander verglichen werden dürfen, scheint sich keine Gesetzmäßigkeit im Verhalten der nächstverwandten Gattungen oder Familien im Vergleich zu fernstehenden zu ergeben.

Zum Vergleich mit den Resultaten, welche Nuttall bei Anstellung von Präzipitationsreaktion zwischen Blutserum und Hühnerblutantisera erhielt (N I in Rubrik V) zeigt sich, daß bei No. 1, 3, 12, 13, 16, 18, 21, 25 keine Uebereinstimmung besteht, und zwar sind die Nuttallschen Versuche außer bei No. 25 durchweg schwächer ausgefallen. Besonders auffallend ist der Unterschied bei No. 13 und 18.

Bei No. 8, 9, 14, 23 läßt sich eine gewisse Uebereinstimmung erkennen, während bei No. 25 das Serum wesentlich stärker reagierte.

Mit den Reaktionen zwischen Eiklar der einzelnen Vogelarten und Hühnereiklarantiserum (N II) stimmen die Resultate in Rubrik IV bei No. 8, 21, 23 gut überein im Gegensatz zu No. 10.

Ob sich bei Bewertung der Stärke des Ausfalls jeder einzelnen Reaktion irgendwelche Gesetzmäßigkeit zeigen würde, läßt sich mangels einer genauen Methode zur quantitativen Beurteilung nicht sagen.

Wenn sich auch nach dem bis jetzt Erwähnten im Ausfall der Reaktion keine Gesetzmäßigkeit ergeben hat, die Schlüsse zuließe auf die Stellung der einzelnen Vogelarten im System oder auf die verwandtschaftlichen Beziehungen der einzelnen Vogelarten zueinander, so hat sich doch immerhin gezeigt, daß wir bei sämtlichen untersuchten Arten eine zwar verschieden starke, aber immer positive Reaktion erhielten, die uns beweist, daß das Eigelb der verschiedenen Vögel sich größtenteils aus den gleichen Komponenten aufbaut.

Ganz offenbar wird darnach das Präzipitinogen gebildet von einem allen Eigelbarten gemeinsamen prinzipiell gleichartigen Komplex, dessen Größe und Zusammensetzung uns bis jetzt unbekannt ist, und es drängte sich deshalb die Frage auf, ob dieser Komplex von den gesamten Bestandteilen des Eigelbs gebildet wird, oder ob es gelingt, durch Trennung den wirksamen Komplex zu isolieren.

Bevor wir versuchten, einen Beitrag zur Lösung dieses Problems zu liefern, wurde jedoch noch eine andere Frage näher berührt, nämlich die, ob die während der Bebrütung sich im Eigelb vollziehenden chemischen qualitativen und quantitativen Veränderungen einen Einfluß auf die biologische Reaktionsfähigkeit des Eigelbs gegenüber einem spezifischen Antiserum haben. Nach Levene treten während der Bebrütung im Eigelb Monoaminosäuren auf, während sich nach Tichomiroff die ursprünglich vorhandenen Bestandteile prozentual derartig ändern, daß die unlöslichen Eiweißkörper, Glykogen, Fett und Cholesterin abnehmen, dagegen Lecithin und stickstoffreiche Basen zunehmen.

Also das Auftreten eines neuen Bestandteiles und eine prozentuale Verschiebung der vorhandenen. No. 9 und 10 zeigen einen Vergleich der Reaktion des Eigelbs eines Eies, in welchem neben Eigelb ein Embryo vorhanden war, und eines solchen in einem früheren Bebrütungsstadium. Während die Reaktion bei den Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 sofort auftrat, begann sie bei 1:5000 in No. 9 2 Minuten später, Doch berechtigt dieser Befund kaum zu irgendwelchen Schlüssen.

Ein weiterer Versuch in dieser Richtung zum Vergleich der Reaktion des Dotters eines frisch gelegten Hühnereis und der eines 9 Tage bebrüteten Hühnereis, in welchem schon ein Embryo vorhanden war, hatte folgendes Resultat:

	1:1000	1:2000	1:5000	1:10 000	1:20 000
Bebrütetes Ei	s	1' Sp	4' sch	6' sch	4' sch
Frisches Ei	s	1' sch	4' sch	6' sch	6' Sp

Dieses Ergebnis läßt sich mit dem obigen nicht recht in Einklang bringen.

Sobald aber das Eigelb die beim Aufbau des Embryos eintretende Differenzierung durchgemacht hat, gibt auch die Gesamtheit der differenzierten Stoffe keine Reaktion mehr mit dem Antiserum. Ein Extrakt aus Embryonen von No. 3, 4, 9, 16, 30 mit physiologischer NaCl-Lösung ergab keine Reaktion.

Einmal konnte auch das Serum eines Embryos (No. 30) zu einem Versuch herangezogen werden. Die Präzipitation fiel vollständig negativ aus. Dieses Resultat stimmt überein mit den früheren Uhlenhuthschen Versuchen, der mit Blut von jüngeren Hühnern keine Präzipitation bekam, während das Serum des ausgewachsenen Huhnes positiv reagierte. Diese Befunde weisen darauf hin, daß junge Tiere, sowohl Embryonen wie ausgetragene, keine präzipitierenden Eigelbbestandteile in ihrem Blut haben und daß erst mit der Zeit der Geschlechtsreife Eigelbbestandteile (Ovar) im strömenden Blute kreisen. Mit Hinsicht auf die neueren Arbeiten Abderhaldens gewinnen diese Fragen an Interesse. Doch würden weitere Versuche auf diesem Gebiete in größerer Zahl vielleicht zur Klärung dieser interessanten Frage beitragen.

Zum Studium der Frage, ob nur das ganze Eigelb imstande ist, eine Präzipitinreaktion mit dem Eigelbantiserum zu geben, ob also sämtliche Bestandteile sich an der Anregung der Produktion spezifischer Antikörper beteiligen, oder ob diese Fähigkeit an Gruppen teilweise chemisch nahe verwandter Körper von ähnlichen physikalischen Eigenschaften gebunden ist, wurden zunächst Aether- und Alkoholextrakte hergestellt.

Zur Gewinnung des Aetherextraktes wurde der Dotter eines Hühneries erst 2 Stunden mit der 5-fachen Menge Aether in der Schüttelmaschine bei Zimmertemperatur ausgeschüttelt, dann der Aether abgesaugt und der Rest weitere 10 Stunden mit etwa der 10-fachen Menge Aether geschüttelt.

Der Alkoholextrakt wurde durch 3-stündiges Schütteln mit 96-proz. kalten Alkohol hergestellt.

Die Extrakte wurden bei 38° im Vakuum eingedampft und die Rückstände mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt zum Versuch verwendet. Nach Goble sind die Bestandteile des Hühnereigelbs folgende:

	%	Löslichkeit	
		in Aether	in Alkohol
Wasser	51,8		
Vitellin	15,8	unlöslich	unlöslich
Nuklein	1,5	unlöslich	unlöslich
Palmitin	.	leicht	kaum
Stearin	20,3	löslich	sehr wenig
Olein	.	leicht	sehr wenig
Cholesterin	0,4	leicht	wenig
Glycerin- Phosphorsäure }	1,2	(Zersetzungsprodukt von Phosphatiden, Bang)	
Lecithin	7,2	leicht	leicht
Cerebrin	0,3	unlöslich	unlöslich
Farbstoffe	0,5	teilweise löslich	teilweise löslich
Galle (?)	1,0	teilweise	teilweise

Folglich wären im Aetherextrakt Lecithin, Palmitin, Stearin, Olein, Cholesterin, Farbstoffe, einzelne Gallenbestandteile (z. B. Cholesterin, Lecithin, Fett), im Rückstand Vitellin, Nuklein, Cerebrin, einzelne Gallenbestandteile (vor allem Mucin).

Der Alkoholextrakt enthält vor allem Lecithin, Spuren von Palmitin, Stearin, Olein, etwas Cholesterin und Gallenbestandteile (z. B. Cholesterin, Lecithin, Biliverdin). Der Rückstand besteht aus Vitellin, Nuklein, Palmitin, Stearin

Olein, Cholesterin, Cerebrin, Gallenbestandteilen (vornehmlich Mucin, Bilirubin).

In beiden Fällen muß ein Teil des Lecithins zurückgeblieben sein, da Vitellin wahrscheinlich in Bindung mit Lecithin vorhanden ist (Vitellin ist wahrscheinlich überhaupt ein Gemisch von verschiedenen Lecithinverbindungen) und diese Bindung durch Bearbeitung mit kaltem Alkohol nicht getrennt wird.

Ferner ist in der obigen Analyse von Goble nicht angegeben, woher das Nuklein stammt, welches, soweit ich sehen kann, nur als Spaltungsprodukt von Nukleoproteiden vorkommt.

Auch das Erwähnen der Galle in der chemischen Analyse dürfte nur als Sammelbegriff zu verwerthen sein.

Die Rückstände des ausgeschüttelten Eigelbs und die Rückstände der abgedampften Extrakte wurden mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und je 0,9 ccm davon mit 0,1 ccm Antiserum unterschichtet. Keine der 4 Proben ergab eine Präzipitation, was namentlich für den Rückstand bei Alkoholextraktion verständlich ist, wenn man die intensive Einwirkung des Alkohols auf die Eiweißkörper bedenkt. Es muß jedoch bemerkt werden, daß die stärkste Konzentration der Aufschwemmungen, mit welcher die Reaktion angestellt wurde, 1:1000 war, da bei stärkerer Konzentration die Aufschwemmung zu trübe war, um eine Reaktion erkennen zu lassen.

Es scheint, als ob jedoch ein recht großer Teil der in Aether löslichen Bestandteile im Eigelb fehlen können, ohne dem Eigelb seine Reaktionsfähigkeit zu nehmen. Denn Eigelb, welches nur 3 Stunden mit Aether ausgeschüttelt war, was zweifellos die Lösung eines beträchtlichen Teiles der löslichen Bestandteile zur Folge hatte, zeigte noch deutliche Reaktion:

	1:1000	1:2000	1:5000	1:10 000
Eigelb (3 Std. ausgeschüttelt)	2' s	2' s	5' Sp 1'	0 4' sch
Frisches Eigelb				

Die Frage nach der praktischen Verwertbarkeit des Hühner-eigelb-Antiserums zur Prüfung von Nahrungsmitteln oder sonst

von industriellen Produkten wurde noch in einigen Versuchen geprüft, und zwar wurde zunächst Ray-Seife untersucht, welche nach Angabe der Fabrik 25 Proz. Hühnereisubstanz, „Eiweiß und Dotter“, enthält.

Die Seife wurde in physiologischer NaCl-Lösung gelöst und ergab in einer Verdünnung, welche einer Eigelblösung von 1:48 000 entsprach — angenommen, daß Eigelb und Eiklar im gleichen Verhältnis in der Seife vorhanden sind wie im Ei — eine sofort beginnende, nach 1 Minute deutliche Präzipitation, da aber das Serum, welches bei der Reaktion zur Verwendung kam, mit Hühnereigelbaufschwemmung in Verdünnung 1:10 000 keine Präzipitinreaktion gab, wurden Kontrollen ausgeführt, deren Resultate folgende waren:

Ray-Seife = Eigelbaufschwemmung	1:48 000	
+ Normalkaninchen Serum		sofort starke Präzipitation
Garantiert reine Handseife (Seifenfabrik Klar, Heidelberg) + Antiserum		sofort deutl. Präzipitation
Dieselbe + Normalkaninchen Serum		dgl.
Braune Schmierseife	1:1000 + Antiserum	dgl.
	1:5000 + Antiserum	keine Präzipitation
	1:2000 + Normalserum	dgl.
Weißer Schmierseife	1:1000 + Antiserum	sofort deutl. Präzipitation
	1:5000 + Antiserum	keine Präzipitation
	1:2000 + Normalserum	nach 2' deutlicher Ring etwas oberhalb der Berührungsstelle von Serum und Seifenlösung
	1:5000 + Normalserum	keine Reaktion

Wir ersehen daraus, daß verschiedene Seifen auch mit Normalserum eine präzipitationsähnliche Reaktion geben, eine Bestätigung früher bereits von anderer Seite veröffentlichter Befunde.

Auch für die Prüfung von Nahrungsmitteln, insbesondere Backwaren, ist die Reaktion, wie oben erwähnt, nur beschränkt verwertbar, da, um nur einige Beispiele herauszugreifen, sowohl ein viertelstündiges Erwärmen im Wasserbad auf 100° C als auch ein 22-stündiger Aufenthalt im Brutschrank von 56° einer frischen Hühnereigelbaufschwemmung in physiologischer Kochsalzlösung (1:100) die Fähigkeit, mit dem Antiserum zu reagieren, vollkommen nahm.

Zum Schluß sei noch erwähnt, daß Ei und Embryoextrakt von Würfelnatter sowie mehreren Fischarten (*Esox lucius* — Flußhecht, *Salmo salar* — Salm, *Lucioperca sandra* — Zander, *Solea vulgaris* — Seezunge, *Clupea alosa* — Mai-

fisch, Rot-Soles) vollständig negative Reaktion ergaben. Doch hat bereits Emmerich bei verschiedenen anderen untersuchten Fischeiern, sowie bei Schildkröteneiern positive Präzipitation bekommen. Es bedarf also weiterer Versuche auf breiterer Basis, um die vorerst sich noch widersprechenden Befunde zu erklären.

Zusammenfassung.

1) Der Ausfall der Präzipitinreaktion mit Hühnereigelb-Antiserum bei verschiedenen Vogelarten zeigt keine Uebereinstimmung mit der Einteilung im System.

2) Im Hühnerei nimmt die Fähigkeit des Eigelbs, mit dem spezifischen Antikörper zu reagieren, mit der Bebrütungszeit nicht ab.

3) Embryoextrakte sowie Blutserum eines Embryo geben keine Reaktion.

4) Nach Ausschüttelung von Eigelb mit Alkohol und Aether geben weder die Rückstände noch die extrahierten Stoffe eine Reaktion. Das Eigelb verliert mit fortschreitender Aetherextraktion allmählich seine biologischen Eigenschaften gegenüber spezifischem Antiserum.

5) Erhitzen von Eigelb hebt die Präzipitation auf.

6) Mehrere Arten von Fischeiern und ein Schlangenei, sowie ein Schlangenembryo geben negative Reaktion.

Literatur.

Abderhalden, Biochemisches Handlexikon.

— Biochemische Arbeitsmethoden.

Emmerich, Untersuchungen mit Eigelbantisera, zugleich ein Beitrag zu den Beziehungen der verschiedenen Eigelbarten zueinander. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1913.

Galli-Valerio et Bornand, Sur quelques applications des lacto- et ovo sera. *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, 1912.

Leunis, Synopsis der drei Naturreiche.

Nuttall, Bloodimmunity and Bloodrelationship.

Oppenheimer, Handb. d. Biochem. (zit. Levene, Goble, Tichomiroff).

Schütze, *Zeitschr. f. Hyg.*, Bd. 47. 1904.

Uhlenhuth und Weidanz, Praktische Anleitung zur Ausführung des biologischen Eiweißdifferenzierungsverfahrens (zit. Ottolenghi).

Nachdruck verboten.

[Aus dem Serobakteriologischen Laboratorium des Stadtkrankenhauses in Stettin.]

Ueber Antikörperbildung gegen Bandwurmlipide.

Ueber antigene Eigenschaften von Lipoiden.

VIII. Mitteilung.

Von Dr. Kurt Meyer.

(Eingegangen bei der Redaktion am 20. November 1913.)

Vor längerer Zeit berichtete ich¹⁾ über Immunisierungsversuche an Kaninchen, die mit dem lecithinähnlichen Lipoid aus Bandwurmeibessubstanz angestellt wurden, von dem ich zuvor festgestellt hatte, daß es mit einem durch Immunisierung mit wässerigen Bandwurmextrakten gewonnenen Serum spezifische Komplementbindung gab. Die Versuche hatten ein negatives Ergebnis. Keines der Tiere bildete in eindeutiger Weise Antikörper, während nach der Immunisierung mit wässerigen, also eiweißhaltigen Bandwurmextrakten, die weit weniger komplementbindendes Antigen enthielten als die bei jenen Versuchen verwendeten Lipoidemulsionen, starke Antikörperbildung eintrat.

Diese Tatsache schien zunächst gegen die Ehrlichsche Seitenkettentheorie zu sprechen, indem das Lipoid zwar Antikörper band, aber nicht Antikörperbildung hervorrief, und Waelsch²⁾, der kürzlich ganz analoge Beobachtungen mit Lipoiden machte, die aus einer Subtilisart hergestellt waren, hält damit den Beweis für erbracht, das die haptophore Gruppe der Antigene mit der eigentlich antigenen nicht identisch zu sein braucht. Ich selbst sprach mich dahin aus und glaube auch noch jetzt, daß dieser Schluß zu weit geht. Allerdings als einfache Hyperregeneration abgesättigter Rezeptoren im Sinne Weigerts, kann die Antikörperbildung angesichts dieser Tatsachen nicht mehr aufgefaßt werden. Aber die Ehrlichsche Schule selbst hat diese ursprüngliche Theorie dahin erweitert, daß für den Uebertritt der in vermehrter Menge gebildeten Rezeptoren ins Blut noch ein besonderer Sekretionsreiz erforderlich ist. Dieser Reiz, dessen Annahme allerdings nur eine Umschreibung der Tatsachen darstellt und das

1) Kurt Meyer, diese Zeitschr., Bd. 11, 1911, p. 211.

2) Waelsch, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 71, 1913, p. 503.

Wesen der Antikörperbildung wieder in Dunkel hüllt, könnte bei gewissen Antigen sehr schwach sein, wodurch das Ausbleiben der Antikörperbildung erklärt würde.

In einer späteren Arbeit konnte ich ¹⁾ mitteilen, daß mir auch Antikörperbildung gegen reine Lipoide gelungen sei und zwar war dies der Fall bei dem aus Tuberkelbacillen dargestellten kephalinähnlichen Lipoid. Allerdings waren die so gewonnenen Sera nicht hochwertig. Andererseits schien die Spezifität der Sera um so sicherer, als sie nur mit dem Lipoid, nicht mit dem Tuberkelbacilleneiweiß Komplementbindung gaben.

Gelegentlich dieser Arbeit erwähnte ich bereits, daß ich in einzelnen Fällen auch Antikörperbildung gegen Lecithin aus Bandwurmsubstanz beobachtet hatte. Diese Beobachtung bestätigte sich bei neuen Versuchen, die in dieser Richtung angestellt wurden. Bei Kaninchen, die drei intravenöse Injektionen von je 1 cg Lipoid in Abständen von fünf Tagen erhalten, kann es in der Tat entgegen meinen früheren Erfahrungen bisweilen zur Antikörperbildung kommen. Die höchstwertigen auf diese Weise gewonnenen Sera gaben mit 0,5 ccm eine Aufschwemmung 1:5000 des Lipoids noch in einer Menge von 0,02 ccm völlige Komplementbindung (0,05 ccm Meer-schweinchenserum). Die Antikörperbildung war also immer noch erheblich schwächer als bei Immunisierung mit wässrigen Extrakten, wo Sera mit einem Titer von 0,001 ccm keine Seltenheit sind.

Nachdem ich weiterhin bei den Tuberkelbacillenlipoiden festgestellt hatte, daß das „Kephalin“ zur Antikörperbildung weit besser geeignet ist als das „Lecithin“ — mit diesem war mir die Erzeugung von Antikörpern überhaupt nicht gelungen — stellte ich in der oben beschriebenen Weise Immunisierungsversuche mit dem Bandwurm-„Kephalin“, also dem im Gegensatz zum Lecithin in Alkohol unlöslichen acetonfällbaren Lipoid an.

Ganz anders als mit dem Lecithin wurde hierbei nun regelmäßig Antikörperbildung erzielt

1) Kurt Meyer, diese Zeitschr., Bd. 15, 1912, p. 245.

und zwar in weit höherem Grade. In einer Versuchsserie von 8 Kaninchen betrug der Serumtiter einmal 0,02 ccm, dreimal 0,01 ccm, einmal 0,005 ccm und dreimal 0,002 ccm. Die Antikörperbildung war demnach hinter der bei Immunisierung mit wässerigen, also eiweißhaltigen Bandwurmextrakten erreichbaren nur unwesentlich zurückgeblieben.

Nach den früher bei den Tuberkelbacillenantikörpern gemachten Feststellungen war es von Interesse, die Spezifität der gebildeten Antikörper näher zu umgrenzen.

Zunächst wurde untersucht, ob die bei Immunisierung mit Lecithin einerseits, mit Kephalin andererseits entstandenen Antikörper identisch sind. Es wurden zu diesem Zwecke Lecithin- und Kephalinsera sowohl gegen Lecithin wie Kephalin ausgewertet (Tabelle I).

Tabelle I.

	0,5 ccm Lecithin 1:5000				0,5 ccm Kephalin 1:2500			
	Lecithin-serum 1	Lecithin-serum 2	Kephalin-serum 1	Kephalin-serum 2	Lecithin-serum 1	Lecithin-serum 2	Kephalin-serum 1	Kephalin-serum 2
0,02 ccm	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01 "	i.	i.	0	0	i.	i.	0	0
0,005 "	k.	k.	0	0	k.	k.	0	0
0,002 "	.	.	0	0	.	.	0	0
0,001 "	.	.	i.	i.	.	.	i.	i.
0,0005 "	.	.	k.	k.	.	.	k.	k.

0 = keine Hämolyse; i. = inkomplette Hämolyse; k. = komplette Hämolyse.

Wie die Tabelle ergibt, war das relative Stärkeverhältnis der Sera gegenüber den beiden Antigenen das gleiche. Hieraus ist zu schließen, daß die Lecithin- mit den Kephalinantikörpern identisch sind.

Die nächsten Versuche betrafen das Verhältnis der Lipoid zu den Eiweißkörpern. Für die Tuberkelbacillen hatte ich seiner Zeit angegeben, daß es besondere Lipoid- und Eiweißantikörper gibt, die nur mit dem homologen Antigen reagieren. In Versuchen mit höherwertigen Seren habe ich inzwischen gefunden, daß die Trennung zwischen diesen beiden Antikörperkategorien keine absolute ist. Die Lipoidantikörper

reagieren in schwachem Maße auch mit lipoidfreien Bacillen und umgekehrt die mit lipoidfreien Bacillen gewonnenen Antikörper auch mit Lipoiden.

In analoger Weise wurden die Verhältnisse bei den Bandwurmantikörpern geprüft. Ich suchte zunächst Antisera gegen die Eiweißkörper des Bandwurms zu gewinnen. Schon früher erwähnte ich, daß bei Immunisierung mit ausgeätherten wässrigen Extrakten¹⁾ wenig wirksame Sera erhalten werden. Neuerdings stellte ich Immunisierungsversuche mit Bandwurmeibessubstanz an, die mit Alkohol und Aether extrahiert, getrocknet und möglichst fein verrieben war und als feine Aufschwemmung in Mengen von 1 cg intravenös injiziert wurde. Offenbar leidet bei der Extraktion die antigene Wirkung des Bandwurmeiweißes, denn auch die so gewonnenen Sera hatten einen nur niedrigen Titer. Auch im Komplementbindungsversuch reagiert die extrahierte Leibessubstanz nur schwach. Immerhin ließen sich die beabsichtigten Versuche durchführen.

Ein Eiweißantiserum und zwei Kephalinsera wurden sowohl gegen die extrahierte Leibessubstanz wie gegen Kephalin ausgewertet. Mit Rücksicht auf die schwache Wirksamkeit der Leibessubstanz sei besonders hervorgehoben, daß Komplementbindung durch Summationswirkung nach den Kontrollen aus-

1) In meiner ersten Mitteilung hatte ich angegeben, daß durch Aetherextraktion das spezifische Komplementbindungsvermögen der wässrigen Extrakte aufgehoben wird und auf den Aetherextrakt übergeht. Ich hatte daraus geschlossen, daß das Komplementbindungsvermögen der wässrigen Extrakte ausschließlich durch Lipoide bedingt sei. Inzwischen in analoger Weise mit Petroläther angestellte Extraktionsversuche haben ergeben, daß hierbei das Komplementbindungsvermögen der wässrigen Extrakte nur relativ wenig abgeschwächt wird und das des Petrolätherextrakts nur mäßige Werte erreicht. Ich deute meine früheren Ergebnisse daher jetzt so, daß die Aufhebung des Komplementbindungsvermögens der wässrigen Extrakte nicht allein durch Extraktion der Lipoide, sondern auch durch die bei Aetherextraktion eintretenden Koagulationsvorgänge an den Eiweißkörpern bedingt ist. Das Urteil über die Stärke des Komplementbindungsvermögens des Aetherextrakts wird durch dessen starkes Eigenhemmungsvermögen erschwert, so daß ich mich möglicherweise bezüglich der quantitativen Verhältnisse getäuscht habe. Jedenfalls dürfte auch den Eiweißkörpern ein erheblicher Anteil an dem Komplementbindungsvermögen der wässrigen Extrakte zukommen.

geschlossen werden konnte. Das Ergebnis der Versuche ist in Tabelle II wiedergegeben.

Tabelle II.

	0,5 ccm Bandwurmeiweiß 1 : 500			0,5 ccm Kephalin 1 : 2500		
	Eiweißserum	Kephalin-serum 1	Kephalin-serum 2	Eiweißserum	Kephalin-serum 1	Kephalin-serum 2
0,05 ccm	0	0	0	0	0	0
0,02 „	i.	0	i.	0	0	0
0,01 „	f. k.	i.	f. k.	f. k.	0	0
0,005 „	k.	k.	k.	k.	0	0
0,002 „	0	i.
0,001 „	i.	k

Die Tabelle läßt eine unzweifelhafte Spezifität der beiden Antikörperkategorien erkennen. Allerdings reagiert wegen der schwachen Wirksamkeit des Eiweißes auch das Eiweißserum mit dem Kephalin stärker als mit dem Eiweiß. Während aber das Stärkeverhältnis des Eiweißantiserums zu den beiden Kephalinseren gegenüber Eiweiß als Antigen 1:2 und 1:1 ist, sind die Werte bei Verwendung von Kephalin als Antigen 1:10 und 1:5, mit anderen Worten, die Kephalinsera reagierten mit dem Kephalin 10mal stärker als mit Eiweiß, das Eiweißserum nur doppelt so stark. Die Kephalinsera zeigten also relativ stärkeres Reaktionsvermögen mit dem Kephalin, das Eiweißserum mit dem Eiweiß.

Die Verhältnisse liegen demnach ganz wie bei den Tuberkelbacillenantikörpern. Lipoid- und Eiweißantikörper lassen sich voneinander unterscheiden, zeigen aber Verwandtschaftsreaktion. Auch hier läßt sich mit Sicherheit der Schluß ziehen, daß die antigene Wirkung der Lipoide nicht durch beigemengte Eiweißspuren bedingt sein kann. Wäre dies der Fall, so bliebe unerklärt, warum die so erzeugten Eiweißantikörper mit den supponierten Eiweißspuren in den Lipoiden stärker reagieren sollen als mit den reinen Eiweißkörpern.

Die von mir seit mehreren Jahren vertretene Auffassung, daß gewisse Lipoide antigene Eigenschaften besitzen, wird also durch eine weitere Beobachtung gestützt. Es ist nicht zu verkennen, daß jene Auffassung noch einem gewissen Mißtrauen begegnet. Auch Landsteiner, der diese Frage als

einer der ersten aufgeworfen und wiederholt kritisch erörtert hat¹⁾, steht ihr mit Reserve gegenüber. Ihm scheinen besonders zwei Punkte noch nicht ganz geklärt, einmal ob die antigene Wirkung auf die Lipide auf solche und nicht auf etwaige vorhandene Beimengungen zurückzuführen ist, sodann, ob die Lipide nicht nur antikörperbindend, sondern auch wirklich antikörperbildend wirken.

Der erste Punkt scheint mir, abgesehen von anderen Argumenten, durch die Differenzierung der Eiweiß- und Lipidantikörper entschieden zu sein. Was die Antikörperbildung gegen Lipide betrifft, so war mir eine solche bisher nur in bescheidenem Maße gelungen, mit der durch Eiweißstoffe erzielbaren nicht zu vergleichen. Durch die oben mitgeteilten Versuche dürfte auch diese Lücke ausgefüllt sein. Daß bei den Lipiden vom Charakter des Lecithins das Antikörperbildungs- im Gegensatz zum Antikörperbindungsvermögen verhältnismäßig schwach ausgesprochen ist, kann nur von sekundärer Bedeutung sein. Sind doch auch bei den Eiweißkörpern solche Unterschiede bekannt. Es braucht nur an die Schwierigkeit der Hämolysinerzeugung gegen Menschenblutkörperchen im Vergleich zu der gegen Hammelblutkörperchen erinnert zu werden.

Die größere Bereitwilligkeit, den Eiweißkörpern antigene Eigenschaften zuzugestehen, schreibt sich wohl von der Zeit her, da deren Struktur noch in Dunkel gehüllt war und die Deutung rätselhafter Eigenschaften der Proteine von der Aufklärung ihres chemischen Baues erwartet werden durfte. In dieser Beziehung hat die Forschung eine gewisse Enttäuschung gebracht. Es scheint sicher zu sein, daß die Eiweißkörper zwar ein sehr großes, aber recht monoton aufgebautes Molekül besitzen, dessen Struktur ihre biologischen Eigentümlichkeiten, insbesondere die ihnen im Gegensatz zu den anorganischen und anderen organischen Substanzen zukommende antigene Wirkung, nicht recht zu erklären vermag.

In neuerer Zeit neigt man daher mehr und mehr dazu, die physikalischen Eigenschaften der Eiweißkörper, insbesondere

1) Landsteiner, Jahresber. d. Immunitätsf. I. Abt., Bd. 6, 1910, p. 209; und Kolle-Wassermann, Handb. d. pathog. Mikroorgan., Bd. 2, 1913, p. 1241.

ihre kolloidale Natur in den Vordergrund zu stellen, und es sind bekanntlich erfolgversprechende Versuche in dieser Richtung auch zur Erklärung der Immunkörperreaktionen unternommen worden (Landsteiner u. a.).

Unter diesem Gesichtspunkte darf wohl darauf hingewiesen werden, daß sich auch die Lipide oder wenigstens ein Teil von ihnen, unter ihnen gerade die von uns als antigen wirksam befundenen, wie hydrophile Kolloide verhalten und in ihren wässerigen Emulsionen bezüglich ihrer Stabilität, der inneren Reibung, des elektrischen Verhaltens, der Fällbarkeit durch Elektrolyte usw. weitgehende Analogien mit den Pseudolösungen der Eiweißkörper aufweisen. Es kann daher nicht überraschen, wenn sie auch die antigene Wirkung und die Immunspezifität mit ihnen teilen. Trifft dies aber zu, so ergibt sich, daß jene Eigenschaften nicht von der chemischen Struktur abhängig sein können, da diese bei den Lipiden völlig anderer Art als bei den Eiweißkörpern ist. Hierin glaube ich die allgemeine biologische Bedeutung der von mir gefundenen Tatsachen erblicken zu dürfen.

Zusammenfassung.

Es gelingt, durch Immunisierung von Kaninchen mit Bandwurmlipiden spezifische Antisera zu erzeugen. Die Antikörperbildung ist schwach und inkonstant bei Immunisierung mit dem lecithinähnlichen Lipoid. Sie erreicht dagegen ähnlich hohe Werte wie bei der Eiweißimmunisierung bei der Immunisierung mit dem kephalinähnlichen Lipoid.

Eine Differenzierung zwischen den Lecithin- und Kephalinantikörpern ist nicht möglich. Dagegen lassen sich die Lipoid- von den Eiweißantikörpern unterscheiden. Sie reagieren mit dem homologen Antigen bedeutend stärker als mit dem heterologen.

Mit Rücksicht auf die Zweifel, denen die antigene Wirkung der Lipide noch begegnet, wird auf die vielfachen Analogien hingewiesen, die die Lipide in physikalisch-chemischer Beziehung mit den Eiweißkörpern aufweisen und die eine Uebereinstimmung auch im immunchemischen Verhalten als durchaus möglich erscheinen lassen.

Nachdruck verboten.

[Laboratoire de M. Metschnikoff à l'Institut Pasteur.]

Séro-diagnostic du cancer.

Par MM. T. Yamanouchi et M. Lytchkowsky.

(Eingegangen bei der Redaktion am 25. November 1913.)

Nous avons étudié la réaction de 279 sérums provenant de sujets cancéreux et non cancéreux, en présence de l'extrait aqueux des cultures d'un microcoque que nous avons isolé dans un grand nombre de cas de cancer.

Sur 20 cancéreux, dont les fragments aseptiques de la tumeur ou de métastases ganglionnaires ont étéensemencés sur bouillon de mamelle de vache non neutralisé¹⁾, 13 cas nous ont donné une culture pure d'un microcoque dont la morphologie et les propriétés ont été reconnues identiques à celles du micrococcus néoformans décrit par Doyen; dans 7 cas nous avons obtenu une culture mixte du même microcoque et du staphylocoque. Ce microcoque, dont la présence s'est montrée constatée dans les tissus cancéreux, a été employé comme antigène.

Préparation de l'antigène.

Le microbe provenant de ces cas de cancer et cultivé en surface sur gélose, a été desséché dans le vide. Après un broyage minutieux et prolongé, 0.50 gr. de cette poudre ont été mis en contact avec 100 c. c. d'eau salée physiologique phéniquée à 0.25 %. Cette émulsion a été agitée pendant trois heures, et la macération a été continuée pendant vingt-quatre heures à la température de la chambre. Ensuite, on centrifuge le liquide. La réaction ne se produit régulièrement que si l'antigène est préparé avec un très grand soin.

Comme complément, nous avons employé du sérum frais de cobaye, à des doses variables.

1) Faire macérer à la glacière, pendant 24 heures, 500 gr. de mamelle de vache dégraissée et hachée, dans 1000 gr. d'eau distillée.

Exprimer le liquide et ramener à 1000. Ajouter 1 gr. de peptone sèche et 0.50 gr. de chlorure de sodium pur. Chauffer lentement jusqu'à 120°.

Laisser refroidir, filtrer et mettre en tubes. Il faut parfois plusieurs filtrations pour obtenir un liquide tout à fait transparent.

Nous n'avons pas employé d'ambocepteur (sérum hémolytique d'un lapin préparé).

Le sérum de chaque malade, fraîchement recueilli et reconnu non hémolytique, doit être chauffé à 56° pendant 30 minutes afin de détruire le complément.

Pour chaque sérum, on prépare 4 tubes avec les mélanges suivants :

	Sérum du malade	Antigène	Sérum de cobaye à dilution convenable (par ex. 1/8)	Eau salée physiologique
1 ^{er} tube	0.1	0.1	0.1	0.7
2 ^{me} tube	0.1	0.1	0.15	0.65
3 ^{me} tube	0.1	0.1	0.20	0.6
4 ^{me} tube (contrôle)	0.1	—	0.1	0.7

On place les tubes à l'étuve à 38° pendant 30 minutes, puis on ajoute à chaque tube 0.1 c. c. d'une suspension à 5 % des globules rouges du mouton. Les tubes sont placés de nouveau à l'étuve jusqu'à ce que le 4^{me} tube (tube de contrôle) soit complètement hémolysé.

Les sérums examinés ont été prélevés soit à Paris, à la Clinique de M. Doyen, soit à Rouen, dans le service du Pr. Bataille, soit au Havre, dans les services des Drs. Le Nouëne et Laurent.

Nous avons fait des expériences comparatives avec des antigènes provenant d'autres microbes pathogènes: staphylocoque, streptocoque, coli, pneumocoque — qui existent chez beaucoup de sujets cancéreux ou non cancéreux — ainsi qu'avec les antigènes provenant de microbes non pathogènes: choléra des poules, sarcines et bacillus subtilis.

Ces expériences de contrôle ont démontré que la fixation du complément peut avoir lieu, aussi bien chez les malades cancéreux que chez les sujets non cancéreux, en présence d'un antigène préparé avec des microbes qui existent souvent comme infection banale dans l'espèce humaine.

Au contraire, la fixation du complément ne s'est jamais produite avec les antigènes provenant des cultures de choléra des poules, de sarcines ou de bacillus subtilis.

Le tableau ci-dessous montre que le diagnostic de cancer a pu être établi ou précisé dans des cas douteux au point de vue clinique, c'est-à-dire pour des cancers à siège profond,

dont l'existence a été vérifiée, soit par l'opération chirurgicale, soit, dans les services hospitaliers, à l'autopsie du malade.

Diagnostic	Nombre des cas	Résultat	
		Positif	Négatif
		Pas d'hémolyse	Hémolyse
Cancer de la langue	12	12	—
Cancer du larynx	3	3	—
Cancer de l'oesophage	4	4	—
Cancer de l'estomac	32	32	—
Cancer du pancréas	1	1	—
Cancer du rectum	8	8	—
Cancer du sein	37	30	7
Cancer de l'utérus	22	22	—
Cancer de l'ovaire	3	3	—
Epithélioma en voie de généralisation	22 = 144	22	—
Petits cancroïdes localisés (au début)	8	—	8
Adénome du sein	5	—	5
Sarcome	5	2	3
Myxome	1	—	1
Fibrome de l'utérus	2 = 21	—	2
Tuberculose	21	—	21
Hydrocèle du testicule	1	—	1
Hernie inguinale	1	—	1
Hystérie	1	—	1
Rétrécissement fibreux du rectum	1	—	1
Dilatation de l'estomac	4	—	4
Prolapsus de l'utérus	1	—	1
Hémorroïdes	1	—	1
Pleurésie exsudative	2	—	2
Métrite chronique	1	—	1
Salpingite purulente	3	—	3
Appendicite aigue	1	—	1
Abcès sous-cutané	5	—	5
Néphrite purulente	3	—	3
Fracture de la cuisse avec plaie	1	—	1
Angine	2	—	2
Laryngite chronique	2	—	2
Fistule intestinale	1	—	1
Ulcère de l'estomac	1	—	1
Lithiase biliaire	2	—	2
Lithiase rénale	1	—	1
Sujete en apparence sains	14 = 70	1	13
Syphilis	44 = 44	10	34
	279		

Nous n'envisagerons que le diagnostic du cancer.

Nous relevons, sur un total de 279 sérums examinés, 144 cas correspondant à des cancers caractérisés, avec 137 résultats positifs (7 résultats négatifs dans de petites tumeurs du sein, encore localisées).

Pour les petits cancroïdes au début, pour le sarcome et pour les tumeurs bénignes, au contraire, il y a eu seulement, sur 21 cas, 2 résultats positifs.

Enfin, sur 70 personnes atteintes de lésions diverses ou en apparence saines, nous relevons un seul résultat positif, chez un sujet qui présente plusieurs cas de cancer parmi ses antécédents héréditaires immédiats. Sur 44 syphilitiques, 10 cas ont donné la réaction positive et 34 cas ont donné la réaction négative.

L'hémolyse a été empêchée d'une manière très nette dans tous les cancers bien caractérisés, c'est-à-dire dans les cancers compliqués de métastases ou d'infection ganglionnaire; elle a été aussi très nette dans les cancers profonds encore au début, particulièrement dans les cancers de l'oesophage, de l'estomac, du pancréas et de l'ovaire.

Si nous examinons les chiffres du tableau, nous constatons que, sur 37 cancers du sein, 7 n'ont pas donné la réaction; il s'agissait de très petites tumeurs au début, bien localisées et sans infection ganglionnaire.

On remarquera que les épithélioma ou les cancroïdes de la peau avec adénopathie ont tous donné la réaction positive. Au contraire, les petits cancroïdes localisés et très limités ont donné la réaction négative. Il en a été de même d'un myxome sous-cutané et de deux fibromes de l'utérus. Cinq adénomes du sein ont donné également la réaction négative.

Chez tous les autres malades atteints d'affections quelconques ou de suppuration, la réaction a été négative.

Nous avons examiné, comme contrôle, les sérums d'un certain nombre de sujets en apparence sains et d'un grand nombre de sujets nettement syphilitiques.

Sur 14 sujets en apparence sains, la réaction spécifique du cancer a été observée dans un cas. Ce malade, dont nous avons conservé l'adresse, sera tenu en observation; c'est un homme de 45 ans, qui est venu consulter parce qu'il s'affaiblissait et se croyait atteint de cancer; il y a plusieurs cancéreux dans ses antécédents héréditaires immédiats.

Chez 44 syphilitiques où la réaction de Wassermann a été positive, 10 fois la fixation du complément a eu lieu en présence de notre antigène spécial, c'est-à-dire que la réaction

a été la même que dans les cancers confirmés. Si l'on considère la fréquence extrême du cancer chez les anciens syphilitiques, il est possible que certains de ces syphilitiques soient atteints de cancer latent; il est possible également que la fixation du complément se produise, dans certains cas de syphilis, par un mécanisme différent et que nous chercherons à élucider.

Ces 10 malades seront suivis afin de juger si, dans l'avenir, un certain nombre d'entre eux ne seront pas atteints de tumeurs malignes.

Zusammenfassung.

Mit der Ausnahme des syphilitischen Blutserums, welches mit unserer spezifischen Antigene das Komplement manchmal fixiert, ist die oben erwähnte Seroreaktion spezifisch für Carcinom. Sie ist besonders wichtig für die Diagnose der tief liegenden Tumoren, welche man klinisch schwer bestätigen kann.

Nachdruck verboten.

[Aus der Poliklinik für Hautkrankheiten der Universität Berlin
(Direktor: Geh. Medizinalrat Prof. Dr. E. Lesser).]

Chemotherapeutische Versuche mit Quecksilberpräparaten bei experimenteller Kaninchensyphilis.

Von Dr. Franz Blumenthal,
Assistent der Poliklinik.

(Eingegangen bei der Redaktion am 26. November 1913.)

Nachdem die systematische Erforschung der Beziehungen von Konstitution und therapeutischer Wirkung bei den Arsenpräparaten zu den bedeutenden Fortschritten geführt hatte, die ihren Höhepunkt in der Salvarsantherapie der Syphilis erreichten, durfte man hoffen, auf demselben Wege auch auf anderen Gebieten therapeutisch vorwärts zu kommen. Speziell war es naheliegend, zu versuchen, ob es nicht gelänge, auch von dem Quecksilber, das seit Jahrhunderten bei der Syphilis rein empirisch verwendet wurde, durch chemotherapeutische

Studien noch wirksamere Verbindungen zu finden, als die bisher in der Syphilistherapie vorhandenen.

Bekanntlich enthielten bis vor kurzem sämtliche in der Syphilistherapie verwendeten Quecksilberpräparate mit wenigen Ausnahmen das Quecksilber als Ion. Wegen der hohen Toxizität aller dieser Verbindungen war es nur möglich, das Quecksilber in relativ geringen Mengen dem menschlichen Organismus einzubringen. Man hat daher versucht, durch Herstellung neuer Präparate, namentlich solcher, die das Quecksilber nicht in ionisierter Form, sondern in fester Bindung enthalten, durch Veränderung der Konstitution und Einführung verschiedener Seitenketten die Toxizität der Präparate und ihre spirillozide Wirkung zu beeinflussen und so zu Quecksilberverbindungen zu gelangen, die bei relativ geringer Toxizität eine größere spirillozide Wirkung entfalten.

Derartige Versuche konnten in großem Maßstabe natürlich nur an Tieren vorgenommen werden.

Schon aus früherer Zeit liegen einige experimentelle Untersuchungen mit Quecksilberverbindungen vor. Sie wurden aber unternommen nicht so sehr, um die verschiedenen Quecksilberpräparate in ihrer Wirkung auf die Syphilis zu vergleichen, als in der Absicht, einen Einblick in die Art der Hg-Wirkung bei dieser Erkrankung zu bekommen. Speziell suchte man die Frage zu lösen, ob es sich um eine direkt spirillozide Wirkung handelt, oder nur um eine indirekte Beeinflussung des syphilitischen Prozesses durch die den Organismus verteidigenden Elemente (Beeinflussung der Leukozyten, Vermehrung der Abwehrstoffe des Serums etc.). Eine einwandfreie Lösung dieser Frage ist bisher noch nicht erbracht worden.

Die ersten, die an syphilitischen Tieren die Heilwirkung des Quecksilbers studierten, waren Metschnikoff und Roux. Neisser und seine Mitarbeiter haben dann in großem Maßstabe vergleichende experimentelle Untersuchungen über die Heilwirkung verschiedener chemischer Körper auf die Syphilis ausgeführt (Arsen, Jod, Quecksilber, Chinin etc.) und dabei eingehende therapeutische Versuche mit Quecksilberverbindungen an syphilitischen Affen gemacht. Halberstädter injizierte Affen 2—10 cg Sublimat subkutan. Dabei scheint er nach Injektion von 10 cg eine Heilung gesehen zu haben; allerdings ging das Tier nach einigen Tagen an Quecksilberintoxikation zugrunde.

Neisser selbst berichtet über eine große Reihe von Heilversuchen bei Affensyphilis. Hauptsächlich prüfte er das Sublimat, das Hydrargyrum colloidal und das Hydrargyrum salicylicum. Es zeigte sich, daß zwischen den einzelnen Präparaten von kolloidalem Quecksilber große Unterschiede in der Wirkung vorhanden sind. So wurde das Heydensche Präparat in $\frac{1}{2}$ -proz. Lösung bis zu 4 ccm pro Kilogramm Tier gut vertragen, während das Mercksche Präparat nur bis zu 1 ccm, also nur in viel geringerer Dosis ohne Schaden für das Tier injiziert werden konnte. Neisser stellte sowohl präventive als Heilversuche bei seinen Affen an. Von der präventiven Injektion sah er keinen deutlichen Erfolg. Auch die Heilversuche

mit Hydrargyrum colloidalen fielen negativ aus. Günstiger waren die Resultate beim Sublimat und dem Hydrargyrum salicylicum. Nach Sublimatinjektionen verschwanden die syphilitischen Erscheinungen bei Anwendung von sehr hohen Dosen. Doch vertrugen die Affen die Sublimatinjektionen sehr schlecht. Am besten wirkte das Hydrargyrum salicylicum. Neisser glaubt aber nicht, daß dieser Effekt auf der Konstitution des Präparats beruht, vielmehr dürfte nach seiner Ansicht die verlangsamte Resorption infolge der Unlöslichkeit des Hydrargyrum salicylicum der Grund hierfür sein.

Das Quecksilber wird von Affen relativ schlecht vertragen. Die Tiere bekommen leicht Stomatitis und verlieren die Freßlust. Die Mengen, die Neisser anwenden konnte, waren daher relativ gering. Immerhin sind sie erheblich höher, als die beim Menschen üblichen Dosen (1 kg Affe = 1 kg Mensch gerechnet). Hierfür gibt Neisser interessante Berechnungen. Er stellt einen Affen mit dem Durchschnittsgewicht von 2 kg einem Menschen von 60 kg gegenüber. Es würde dann die Injektion von 30 mg Sublimat, die Neisser beim Affen verwendet, einer Gesamteinjektion von 900 mg beim Menschen entsprechen, also einer Kur von 45 aufeinanderfolgenden Injektionen von 0,02 Sublimat. Das sind Quecksilberdosen, die wir einem Menschen im Verlaufe einer Kur nicht zu geben vermögen.

Auch die Dosen von Hydrargyrum salicylicum sind viel höher als die in der menschlichen Therapie üblichen. Neisser injizierte einem Affen 50–80 mg dieses Präparates. Das entspricht auf das Kilogramm Tier berechnet 15–24 der beim Menschen üblichen Injektionen.

Sowohl mit Sublimat als auch mit dem Hydrargyrum salicylicum erzielte er in einer großen Reihe von Fällen Heilung, die er teils durch Reinfektion, teils durch negativen Ausfall der Organimpfung nachwies. Auch Tomaszewski gibt an, daß er bei seinen Heilversuchen an Affen sehr große Dosen verwenden mußte, um einen Erfolg zu erzielen. Daß irgendein prinzipieller Unterschied in der Wirkung der von ihm verwendeten Quecksilberpräparate vorhanden ist, glaubt Neisser nicht. Nach seiner Ansicht bekommt man mit allen diesen Präparaten nach demselben Modus verlaufende Quecksilbervergiftungen. Nur der Zeitpunkt, an welchem der letale Ausgang eintritt, wechselt, wenn man mit verschiedenen Quecksilberpräparaten die gleiche Quecksilbermenge in den Organismus einführt.

Bei der Kaninchensyphilis liegen Untersuchungen über therapeutische Wirkung mit Quecksilberverbindungen von Uhlenhuth und Weidanz und Tomaszewski vor. Uhlenhuth und Weidanz konnten mit reinen Quecksilberpräparaten¹⁾ einen deutlichen präventiven Einfluß auf die Syphilisinfektion nicht erkennen. Tomaszewski sah bei lang fortgesetzten Injektionen von Sublimat eine gewisse, wenn auch unsichere präventive Wirkung, solange er Dosen gab, die den in der menschlichen Syphilistherapie üblichen entsprachen, auf das Kilogramm Körpergewicht be-

1) Das von ihnen mit Erfolg verwendete Hydrargyrum atoxylicum entfaltet kombinierte Arsen-Quecksilberwirkung und schaltet daher für unsere Betrachtungen aus.

rechnet. Allerdings mußten die Injektionen sehr lange fortgesetzt werden. Erhöht man die oben angegebenen Dosen auf das 8—10-fache, so werden die Resultate erheblich besser. Bei seinen Heilversuchen trat in zwei Fällen nach Sublimatinjektionen Heilung der ausgedehnten spezifischen Keratitis ein. Das eine der geheilten Kaninchen erhielt 10 Sublimatinjektionen à 1 mg, das andere 12 derartige Injektionen.

Aus allen diesen Versuchen geht hervor, daß es mit den bisher erwähnten Quecksilberpräparaten nur außerordentlich schwer gelingt, die Syphilis bei Versuchstieren zur Ausheilung zu bringen, und zwar nur bei häufig wiederholter Injektion ziemlich hoher Dosen Quecksilber. Ein Quecksilberpräparat, das bei einmaliger oder zweimaliger Injektion eine Heilung der experimentellen Kaninchensyphilis oder doch wenigstens ein Verschwinden der Spirochäten auf längere Zeit hervorbringt, kann daher, wenigstens für die Kaninchensyphilis, den früher üblichen Präparaten gegenüber für überlegen angesehen werden.

Den experimentellen Versuchen mit solchen Quecksilberverbindungen, die das Quecksilber als Ion enthalten, war dadurch eine Grenze gesetzt, daß dieselben sehr giftig sind, so daß die Tiere, die wirksame Dosen erhielten, an Quecksilbervergiftungen starben. Von den aromatischen Verbindungen war in der menschlichen Therapie eigentlich nur das Hydrargyrum salicylicum im Gebrauch, von dem Dimroth zuerst festgestellt hat, daß es nicht das Quecksilbersalz der Salicylsäure ist, sondern das Quecksilber im Kern enthält. Für vergleichende Versuche war dieses Präparat wegen seiner Schwerlöslichkeit schlecht geeignet, da es infolgedessen viel langsamer und unregelmäßiger resorbiert wird wie die löslichen Präparate ¹⁾.

Schrauth und Schöller haben nun das Salicylquecksilber dadurch löslich gemacht, daß sie das Aminoxyisobuttersauresalz der o-Oxyquecksilbersalicylsäure herstellten. Dieses Salz, das unter dem Namen Asurol in den Handel gebracht wird, fällt kein Eiweiß aus seinen Lösungen und enthält ebenso wie das Salicylquecksilber das Hg nicht in ionisierter Form, sondern im aromatischen Kern. Das Präparat enthält 40,3 Proz. Quecksilber. Die von Neisser angeführten Versuche an Affen ergaben, daß das Asurol für dieselben sehr giftig ist, so daß Heilversuche bei diesen Tieren nicht durchgeführt werden konnten. Für Kaninchen konnte ich

1) In neuester Zeit hat Ferdinand Blumenthal gefunden, daß das Hydrarg. salicylicum in Piperazinslösung löslich ist.

in meinen später noch ausführlich erwähnten Versuchen gleichfalls eine relativ hohe Giftigkeit feststellen. Diese am Tier erhobenen Befunde entsprechen auch völlig den in der menschlichen Syphilistherapie mit dem Präparate gemachten Erfahrungen.

Bei Prüfung der neuen zu untersuchenden Präparate gingen wir so vor, daß wir nach Bestimmung der Toxizität ihre spirillozide Wirkung bei spirochäteninfizierten Tieren feststellten. Zuerst arbeitete ich mit Hühnerspirillose. Hierbei hat man den Vorteil, in relativ kurzer Zeit Serien von Versuchen ausführen zu können, da es sich um eine schnell verlaufende Erkrankung handelt. Ferner läßt sich die Wirkung des Präparates auf die Spirochäten im Blute der Tiere leicht verfolgen; doch bald verließ ich diese Prüfungsart, da sie mir für die Beurteilung der Wirkung eines Präparates zu unsicher erschien; denn die Hühnerspirillose ist eine Erkrankung, bei der in einem erheblichen Prozentsatze Spontanheilungen vorkommen. Die Höhe dieses Prozentsatzes wechselt je nach der Virulenz des verwendeten Stammes, und die Virulenz des einzelnen Stammes unterliegt häufig plötzlichen Aenderungen. So verlor ein Stamm, der bei einem ersten Versuch so virulent war, daß sämtliche infizierten Tiere starben, plötzlich seine Virulenz und fast alle infizierten Tiere blieben am Leben. Derartige Vorkommnisse erschweren natürlich sehr die Beurteilung der spirilloziden Wirkung eines Präparates. Dazu kommt noch, daß es meiner Ansicht nach nicht zugänglich ist, um die Wirksamkeit eines Präparates auf die Syphilisspirochäten zu prüfen, irgendeine beliebige Spirochätenerkrankung zu wählen (Hühnerspirillose, Rekurrenz); namentlich aber die Hühnerspirochäten steht der Syphilisspirochäten sehr fern, und der Verlauf der Erkrankung ist ein ganz verschiedener, in dem einen Falle eine Septikämie, die in wenigen Tagen zum Tode oder zur Heilung führt, in dem anderen Falle chronische Gewebserkrankung, die sich über lange Zeit erstreckt. Hierzu kommt noch, daß das Huhn und der Mensch sich toxikologisch dem Quecksilber gegenüber völlig verschieden verhalten.

Kolle und seine Mitarbeiter haben für ihre verschiedenen toxikologischen und parasitoiden Untersuchungen das Huhn gerade aus dem Grunde gewählt, weil dasselbe relativ sehr große Quecksilbermengen verträgt und sie daher vergleichsweise sehr viel Quecksilber einführen konnten.

Ich glaube nicht, daß es zweckmäßig ist, um ein für die menschliche Syphilistherapie geeignetes Präparat zu finden, ein gegen Quecksilber in so hohem Maße refraktäres Tier zu wählen, wie das Huhn. Denn der Mensch ist außerordentlich empfindlich gegen Quecksilber, noch weit empfindlicher als der Affe oder das Kaninchen, die Quecksilber auch nur sehr schlecht vertragen. So konnten wir bei einem 60 kg schweren Menschen höchstens die gleiche Dosis eines Präparates anwenden, die ein mittelschweres (2—3 kg) Kaninchen ohne Krankheitserscheinungen ertrug. Wenn man ein Quecksilberpräparat toxikologisch für den Menschen ausprobieren will, wird man daher gut tun, mit gegen Quecksilber hoch empfindlichen Tieren zu arbeiten und nicht mit refraktären Arten.

Wir haben aus diesem Grunde für unsere toxikologischen Studien das Kaninchen gewählt, da wir zugleich in der experimentellen Kaninchensyphilis ein ausgezeichnetes Testobjekt für die Wirkung eines Präparates auf syphilitische Krankheitsprozesse besitzen. Speziell bei der Hodensyphilis des Kaninchens läßt sich die Wirkung eines Präparates auf den syphilitischen Prozeß und die Spirochäte leicht erkennen. Allerdings erfordert das Arbeiten mit Kaninchensyphilis viel Zeit und Mühe, denn die Tiere zeigen häufig erst nach Monaten Erscheinungen, und von einer großen Anzahl geimpfter Tiere sind immer nur wenige für die Versuche brauchbar. Trotz dieser Schwierigkeiten glaubte ich, nachdem auch ich zuerst mit Hühnerspirillose gearbeitet hatte, aus den oben angeführten Gründen als Testobjekt ausschließlich die Kaninchensyphilis nehmen zu müssen. Mit syphilitischen Affen als Testobjekt zu arbeiten, verbietet sich aus materiellen Gründen. Im folgenden werde ich im großen und ganzen nur meine Versuche mit Kaninchensyphilis mitteilen und nur kurz diejenigen mit Hühnerspirillose erwähnen, soweit ich glaube, daß sie allgemeineres Interesse haben.

Bei unseren Versuchen prüften wir eine Reihe neuer Quecksilberpäparate, die zum größten Teile von Herrn Dr. Lüdecke im Laboratorium der Vereinigten chemischen Werke, Charlottenburg, dargestellt wurden. Ein Präparat wurde von Herrn Professor Ferdinand Blumenthal und Dr. Curt Oppenheim und eines von Herrn Geheimrat

Salkowski dargestellt. Die toxikologischen Untersuchungen wurden von Ferdinand Blumenthal und Curt Oppenheim im chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts der Berliner Universität ausgeführt und diejenigen Präparate, deren Anwendung aussichtsreich erschien, mir zur Prüfung übergeben.

Die meisten der von mir untersuchten Präparate enthielten das Quecksilber nicht als Ion, sondern im Benzolkern in fester Bindung. Hierbei ist dasselbe entweder zwischen zwei Benzolkernen mit je einer Valenz verankert oder aber es ist mit einer Valenz an einen Ring gebunden.



Bei der ersten Bindungsart ist das Quecksilber völlig maskiert und kann als solches mit Schwefelwasserstoff auch nach Erwärmen nicht nachgewiesen werden, ferner wird aus Eiweißlösungen das Eiweiß nicht ausgefällt. Bei den Verbindungen, die das Quecksilber nur mit einer Valenz gebunden haben, fällt dasselbe gleichfalls kein Eiweiß aus Eiweißlösungen aus und ist direkt durch Schwefelwasserstoff nicht nachzuweisen, wohl aber wird es nach Erwärmung durch Schwefelwasserstoff ausgefällt. Schließlich untersuchten wir auch einige Verbindungen, die das Quecksilber als Ion enthielten.

I. Versuche mit aromatischen Quecksilberverbindungen, die das Quecksilber in völlig maskiertem Zustand enthalten.

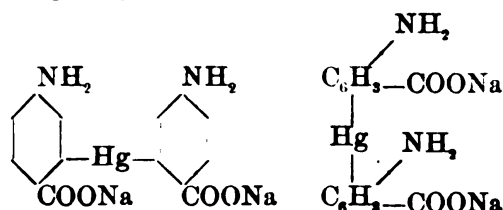
Bei den von mir untersuchten Verbindungen dieser Gruppe handelt es sich um Mercuridibenzoesäuren, in die verschiedene Gruppen in Orthostellung eingeführt sind.

Wir untersuchten die Diaminodiphenylmercuridicarbonsäure, die Dinitrodiphenylmercuridicarbonsäure und die Diodiphenylmercuridicarbonsäure. Diese Verbindungen sind von Ferdinand Blumenthal und Curt Oppenheim einer eingehenden toxikologischen Untersuchung unterworfen worden. Die Versuche, die teils an Kaninchen, teils an Ratten ausgeführt wurden, zeigten, daß diese maskierten Quecksilberverbindungen eine sehr geringe Toxizität für Versuchstiere

haben, so daß es mit ihnen gelingt, ein vielfaches derjenigen Quecksilberdosis ohne Schaden in den Organismus einzuführen, die beim Sublimat noch vertragen wird.

A. Versuche mit diaminodiphenylmercuridicarbonsaurem Natrium.

Das diaminophenylmercuridicarbonsaure Natrium



stellt ein weißliches bis gelbes Pulver dar, das sich in kaltem Wasser mit gelblicher bis gelbbrauner Farbe leicht löst. Es enthält 38 Proz. Hg. Kaninchen von 2—3 kg vertragen subkutan 1—1,5 g der Substanz.

I. Hühnerspirillose¹⁾.

Huhn 1. 7. III. Impfung mit 1 ccm Blut subkutan. 9. III. subkutane Injektion von 0,3 g. 10. III. Spiroch. +. 11. III. Spiroch. ++. 13. III. Spiroch. 0. Tier bleibt gesund.

Huhn 2. 7. III. Impfung mit 1 ccm Blut subkutan. 9. III. subkutane Injektion von 0,3 g. 10. III. Spiroch. ++. 12. III. Spiroch. ++++. 13. III. Tier krank, Spiroch. —. 14. III. Spiroch. —, Tier krank. 15. III. Heilung.

Huhn 3, Kontrolltier. 7. III. Impfung mit 1 ccm Blut subkutan. 10. III. ++++ Spirochäten. 12. III. Tier stirbt.

Huhn 6. 18. III. Impfung mit $\frac{1}{2}$ ccm Blut subkutan. 20. III. subkutane Injektion von 0,1 g. 21. III. Spiroch. ++++. 22. III. Spirochäten ++++. 23. III. Spiroch. ++++. Tier stirbt.

Huhn 7. 18. III. Impfung mit $\frac{1}{2}$ ccm Blut subkutan. 20. III. Injektion von 0,175 g subkutan. 21. III. Spiroch. ++++. 22. III. Spiroch. ++++. 23. III. tot aufgefunden.

Huhn 8. 18. III. Impfung mit $\frac{1}{2}$ ccm Blut subkutan. 20. III. Injektion von 0,2 g subkutan. 21. III. Spiroch. ++++. 22. III. Spiroch. ++++. 23. III. tot aufgefunden.

Huhn 9, Kontrolltier. 18. III. Impfung mit $\frac{1}{2}$ ccm Blut subkutan. 21. III. Spiroch. ++++. 22. III. Spiroch. ++++. 24. III. Tier stirbt.

1) + bedeutet vereinzelt Spirochäten; ++ fast in jedem Gesichtsfeld eine Spirochäte; +++ in jedem Gesichtsfeld mehrere Spirochäten; ++++ in jedem Gesichtsfeld zahlreiche Spirochäten.

Huhn 10. 23. III. Impfung mit $\frac{1}{2}$ ccm Blut subkutan. 25. III. Injektion von 0,3 g subkutan. 27. III. Spiroch. + + + +. 28. III. Spirochäten +. 29. III. Spiroch. —, Tier stirbt.

II. Kaninchensyphilis.

Tier 26. Geimpft am 20. XII. in beide Hoden. 8. III. geschlossener, über erbsengroßer Knoten im linken Hoden, Spiroch. ++. Injektion von 0,3 g intravenös. 9. III. Spiroch. + + + +. 10. III. Spiroch. +. 13. III. Spiroch. —. 14. III. Knoten erheblich kleiner, Spiroch. —. Tier stirbt.

Tier 40. Geimpft am 2. II. in beide Hoden. 8. III. links Abszeß, rechts erbsengroßer Knoten und oberflächliche Ulzeration. Spiroch. rechts + + + +. Injektion von 0,3 g subkutan. 9. III. Spiroch. + + + +, klinisch keine Veränderung. 10. III. Spiroch. ++. 14. III. oberflächliche Ulzeration abgeheilt, Knoten rechts viel kleiner, Spiroch. +. 15. III. Spirochäten —. 17. III. Spiroch. +. 28. III. völlige Heilung. 22. V. Rezidiv, Spiroch. ++.

Tier 43. Geimpft am 2. II. in beide Hoden. 8. III. bds. pfenniggroße Primäraffekte, Spiroch. +, bds. Injektion von 0,3 g subkutan. 9. III. Spiroch. bds. ++. 10. III. Spiroch. bds. ++. 14. III. Spiroch. bds. spärlich. Erscheinungen bds. auf die Hälfte zurückgegangen. 15. III. Spiroch. rechts +, links —. 17. III. Spiroch. bds. + + + +, Knoten wieder gewachsen. 15. IV. Spiroch. bds. + + + +, pfenniggroßer Primäraffekt.

Tier 91. Geimpft am 17. VI. in beide Hoden. 8. VII. rechts linsengroßer Knoten, links pfenniggroßer Primäraffekt. Spiroch. bds. +. 1. Injektion von 0,2 g subkutan. 10. VII. Spiroch. bds. ++, klinisch unverändert. 2. Injektion von 0,2 g subkutan. 12. VII. Spiroch. bds. ++. 3. Injektion von 0,2 g subkutan. 14. VII. klinisch keine Veränderung. Spiroch. bds. ++. 4. Injektion von 0,2 g subkutan. 17. VII. Spiroch. bds. +, klinisch unverändert.

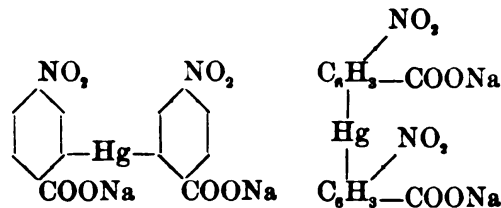
Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das diamino-mercuridiphenyldicarbonsaure Natrium sowohl eine Wirkung gegen die Hühnerspirillose als auch gegen die Kaninchensyphilis entfaltet, allerdings sind beide Wirkungen nicht sehr stark. Immerhin scheint 0,3 des Präparates doch einen gewissen Schutz gegen Hühnerspirillose auszuüben (vgl. Tier 1 und 2) und auch bei Tier 10 ist die Wirkung auf die Spirochäten unverkennbar, wenn auch das Tier der Infektion erliegt. Selbstverständlich muß bei der Bewertung dieser Resultate berücksichtigt werden, daß die Hühnerspirillose, wie schon oben erwähnt, eine Erkrankung ist, bei der ein ziemlich hoher Prozentsatz Spontanheilungen vorkommt. Doch war der Stamm, den wir damals benutzten, besonders virulent. Da ferner gerade die mit den größten Mengen des Präparates

behandelten Tiere eine Beeinflussung der Spirochäten zeigten, geht man wohl nicht zu weit, wenn man in der Beeinflussung der Spirochäteninfektion in den oben erwähnten Fällen eine Wirkung des Quecksilberpräparates sieht.

Auch bei der Kaninchensyphilis war einmal eine gewisse, wenn auch sehr langsame Wirkung nach subkutaner Injektion von 0,3 g Tier (Tier 40) vorhanden. Bei der intravenösen Injektion von 0,3 g verschwanden zwar die Spirochäten relativ schnell (Tier 26), doch ging das Tier an der offenbar zu großen Dosis zugrunde. Auf jeden Fall ist die Wirkung des Präparates sehr inkonstant (Tier 43, Tier 91).

B. Versuche mit dinitromercuridiphenyldicarbonsaurem Natrium.

Das dinitromercuridiphenyldicarbonsaure Natrium



stellt ein in heißem Wasser leicht lösliches gelbliches, kristallinisches Pulver dar. Sein Quecksilbergehalt beträgt 34,72 Proz. Kaninchen von 2—3 kg vertragen 1—1,5 g des Präparates subkutan, ohne erhebliche Krankheitserscheinungen zu zeigen. Intravenös stellt 0,5 g die Dosis letalis dar.

Bei der Prüfung dieses Präparates an Hühnerspirillose stießen wir dadurch auf Schwierigkeiten, daß unser Hühnerspirillosestamm an Virulenz eingebüßt hatte, so daß plötzlich ein großer Teil unserer Kontrolltiere spontan gesundete; auch andere Stämme, die wir uns verschafften, hatten keine größere Virulenz. Wir glaubten daher besser ganz von der Prüfung dieses Präparates bei Hühnerspirillose abzusehen, da Zufälligkeiten zu leicht zu Fehlschlüssen führen konnten, und beschränkten uns völlig auf die Prüfung des Präparates bei Kaninchensyphilis.

a) Subkutan, einmalige Injektion.

Tier 6. Geimpft am 2. XI. in beide Hoden. 24. IV. rechts Pfenniggroßer Primäraffekt, links Knoten von Kleinerbsengröße, Spiroch. bds. ++.

Injektion von 0,3 g. 25. IV. Spiroch. links ++, rechts ++++. 26. IV. Spiroch. links negativ, rechts +. 29. IV. klinische Erscheinungen bds. bedeutend im Rückgang. Spiroch. bds. negativ, 2. V. Spiroch. bds. negativ, klinische Erscheinungen fast geschwunden. 8. V. rechts Spiroch. +, links negativ. 17. V. links geheilt, rechts kleiner Knoten, Spiroch. ++. Rezidiv.

Tier 54. Geimpft am 23. III. in beide Hoden. 24. IV. rechts 3 Knoten von Erbsengröße, rechts Spiroch. ++++, Injektion von 0,3 g. 25. IV. Spiroch. ++. Die Spirochäten verschwinden nicht, beobachtet bis 13. V. klinische Erscheinungen am 13. V. über haselnußgroßer Tumor, Spiroch. +++.

Tier 57. Geimpft am 23. III. in beide Hoden. 1. V. rechts Primäraffekt von Kleinerbsengröße. Injektion von 0,5 g. 2. V. Spiroch. ++++, klinisch keine Veränderung, Spirochäten verschwinden nicht. Tier stirbt am 5. V.

Tier 63. Geimpft am 23. III. in beide Hoden. 1. V. bds. markstückgroßer Primäraffekt, Spiroch. bds. ++. Injektion von 0,6 g. 2. V. bds. Spiroch. ++++. 3. V. Spiroch. bds. —, Primäraffekt viel kleiner. 4. V. rechts Spiroch. +, links Spiroch. —. 5. V. rechts Spiroch. —, links +, Primäraffekt auf die Hälfte verkleinert. 6. V. Spiroch. bds. negativ. Primäraffekt kaum noch infiltriert, erheblich kleiner geworden. 10. V. klinische Erscheinungen fast verschwunden, doch finden sich noch vereinzelt Spirochäten bds.

Tier 55. Geimpft am 23. III. in beide Hoden. 8. V. rechts erbsengroßer Knoten, links über erbsengroßer Knoten, Spiroch. bds. ++++. Injektion von 0,6 g. 9. V. Spiroch. bds. ++++. 10. V. links Spiroch. ++++, rechts ++. 15. V. Spiroch. bds. negativ, klinische Erscheinungen auf die Hälfte zurückgegangen. 16. V. Spiroch. bds. —. 18. V. klinische Erscheinungen fast geheilt, rechts Spiroch. +, links —. 22. V. Spiroch. bds. ++.

Tier 85. Geimpft am 30. V. in beide Hoden. 24. VIII. links großer Knoten, Spiroch. ++++. Injektion von 0,4 g. 25. VIII. Spiroch. +. 26. VIII. Spiroch. negativ. 28. VIII. Spiroch. negativ. Knoten fast geschwunden. 31. VIII. geheilt, beobachtet bis 28. XI.

Tier 110. Geimpft am 21. VII. in beide Hoden. 19. VIII. rechts erbsengroßer Knoten, daneben zwei kleinere linsengroße Knoten, links linsengroßer Knoten, Spiroch. bds. ++. Injektion von 0,2 g. 22. VIII. Spiroch. ++. 23. VIII. Spiroch. —. Knoten kleiner. 24. VIII. Spiroch. —. 1. IX. Spiroch. —. Tier geheilt. 9. X. Rezidiv, bds. Knoten von Linsengröße. Spiroch. bds. ++.

Intravenöse Versuche.

Tier 106. Injektion von 0,1 g am 12. X. Tier bleibt gesund.

Tier 107. Injektion von 0,2 g am 12. X. Tier stirbt am 25. X.

Tier 110. Geimpft am 21. VII. in beide Hoden. 22. X. erbsengroßer Primäraffekt rechts ++, links großer Primäraffekt, Spiroch. bds. ++++. Injektion 0,5 g. 23. X. Durchfall, starke diffuse Schwellung an beiden Hoden, hart schwärzlich nekrotisch verfärbt. Spiroch. bds. —. 24. X.

Spiroch. bds. —. 24. X. Spiroch. bds. —. 26. X. Haut stößt sich in mortifizierten Fetzen ab, Spiroch. —. 28. X. rechts ist in dem Scroptum die mortifizierte Stelle abgerissen, infolgedessen ist ein großer Teil des Hodens freigelegt, links Herd vollkommen weich und viel kleiner. 1. XI. Tier stirbt.

Tier 117. Geimpft am 21. VIII. in beide Hoden. 28. X. rechts fast marktstückgroßer Primäraffekt, ungefähr $\frac{1}{2}$ cm dick, Spiroch. ++++. Injektion von 0,4 g. 19. X. keine Veränderung, Spiroch. ++++. 20. X. Spiroch. ++, keine klinische Veränderung. 22. X. Primäraffekt auf die Hälfte verkleinert, ganz weich, Spiroch. —. 23. X. Spiroch. —, Primäraffekt ganz weich. 28. X. Spiroch. —. Es hat sich eine Höhle gebildet, die eitrig belegt ist. 2. XI. Höhle kleiner geworden, Spiroch. —. 8. XII. Tier geheilt. Spiroch. —, beobachtet bis zum 18. II.

Tier 121. Geimpft am 21. VIII. in beide Hoden. 31. X. rechts erbsengroßer, links haselnußgroßer Knoten. Spiroch. bds. ++++. Injektion von 0,4 g. 1. XI. Spiroch. bds. ++. 2. XI. Knoten etwas kleiner, Spiroch. —. Spiroch. bleiben —. Tier geheilt am 25. XI., beobachtet bis 4. I.

Mehrmalige Injektionen, subkutan.

Tier 54. Geimpft am 23. III. in beide Hoden. 13. V. harter Strang, rechts haselnußgroßer Tumor, Spiroch. ++++. Injektion von 0,3 g. 15. V. Spiroch. +, klinisch keine Veränderung. Injektion von 0,3 g. 16. V. Spiroch. —. 17. V. Spiroch. —. Injektion von 0,3 g. 19. V. Spiroch. —, Tumor auf die Hälfte verkleinert. 29. V. Tier geheilt, Spiroch. —, beobachtet bis 15. VI.

Tier 90. Geimpft am 17. VI. in beide Hoden. 24. VII. erbsengroßer Primäraffekt rechts, links Knoten von Erbsengröße, Spiroch. ++++. Injektion von 0,3 g. 26. VII. Spiroch. bds. +. Injektion von 0,3 g. 27. VII. Knoten links verschwunden, Primäraffekt rechts trocknet ab. Spiroch. —. 28. VII. Spiroch. —. Injektion von 0,3 g. 29. VII. Spiroch. —. 31. VII. Spiroch. —, klinische Erscheinungen erheblich geringer geworden. 7. VIII. Tier geheilt, beobachtet bis 8. XI.

Tier 97. Geimpft am 17. VI. in beide Hoden. 27. VII. links erbsengroßer Knoten, Spiroch. ++++. Injektion von 0,3 g. 29. VII. Spiroch. ++++. Injektion von 0,3 g. 31. VII. Knoten um die Hälfte kleiner geworden, Spiroch. —. 4. VIII. fast geheilt, Spiroch. —. 7. VIII. geheilt bis auf kleinen Strang, beobachtet bis zum 9. X.

Tier 92. Geimpft am 17. VI. in beide Hoden. 31. VII. rechts Primäraffekt von Erbsengröße, Spiroch. ++. Injektion von 0,3 g. 1. VIII. Spiroch. ++++. 2. VIII. Spiroch. +. Injektion von 0,3 g. 3. VIII. Spiroch. —. Primäraffekt kleiner. 4. VIII. Spiroch. —. 7. VIII. fast geheilt, Spiroch. —. 11. VIII. Spiroch. +, beobachtet bis zum 1. IX.

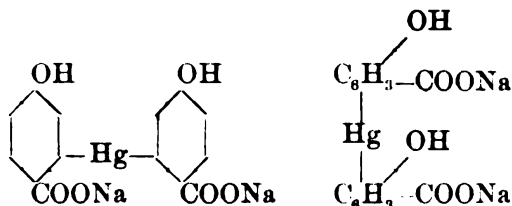
Die angeführten Versuchsprotokolle zeigen, daß die spirillozide Wirkung des Dinitropräparates erheblich höher ist, als diejenige des Diaminopräparates. Schon eine einmalige

Injektion von 0,4 g subkutan kann ein dauerndes Verschwinden der Spirochäten und eine völlige Heilung bewirken (Tier 85, 98). Auch bei Injektion von 0,3 g verschwinden die Spirochäten vorübergehend (Tier 6), doch folgt in diesem Falle sehr schnell ein Rezidiv. Immerhin sind die Resultate sehr inkonstant, denn auch Dosen von 0,5 und 0,6 g genügen nicht in allen Fällen, um die Spirochäten zum Verschwinden zu bringen. Vielleicht spielen bei dieser wechselnden Wirkung Verschiedenheiten in der Resorption eine große Rolle. Dafür spricht auch, daß die Resultate bei der intravenösen Injektion wesentlich konstanter sind. Hier liegt die Dosis curabilis bei 0,4 g (Tier 117, 121). Bei intravenöser Anwendung von 0,5 g ist die spirillozide Wirkung des Dinitropräparates eine außerordentlich starke. So beobachtete ich bei Tier 116 24 Stunden nach der Injektion eine starke, diffuse Schwellung der Krankheitsherde, die schließlich zur Abstoßung in nekrotischen Fetzen führte. Die Spirochäten verschwanden innerhalb 24 Stunden. Diese Erscheinungen sind wohl als eine außerordentlich starke Herxheimersche Reaktion zu deuten.

Da die Dosis letalis schon 0,5 g darstellt, liegen bei intravenöser Anwendung des Präparates Dosis curabilis und Dosis letalis sehr nahe beieinander. Am besten ist die Wirkung des Präparates bei mehrmaliger Injektion. Eine zweimalige Einspritzung in Zwischenräumen von 2 Tagen bringt die Spirochäten schon vorübergehend zum Schwinden (Tier 110), und eine zwei- bis dreimalige Injektion von 0,3 g genügt regelmäßig zur dauernden Heilung.

C. Versuche mit dioxydiphenylmercuridicarbonsaurem Natrium.

Das dioxydiphenylmercuridicarbonsaure Natrium stellt ein wasserlösliches kristallinisches Pulver dar. Es enthält 38,6 Proz. Hg. Kaninchen von 2—3 kg vertragen 0,1—0,2 g des Pulvers.



Subkutan.

Tier 163. Geimpft am 22. XII. in beide Hoden. 22. II. rechts bohngroßer Primäraffekt, Spiroch. ++. Injektion von 0,05 g. 23. II. etwas kleiner, Spiroch. + + + +. 24. II. Spiroch. +. 26. II. Spiroch. + + + +. Primäraffekt eher gewachsen. Tier bleibt ungeheilt.

Tier 147. Geimpft am 24. XI. in beide Hoden. 27. III. rechts weicher erbsengroßer Knoten, Spiroch. +. Injektion von 0,1 g. 28. III. Spiroch. —. 30. III. Spiroch. —. 2. IV. Spiroch. —. Knoten fast geschwunden. 14. IV. Rezidiv + + +, 3 weiche Erosionen am linken Hoden. Spiroch. +.

Tier 194. Geimpft am 23. III. in beide Hoden. 21. V. markstückgroßer Primäraffekt links, bohngroßer rechts. Injektion von 0,2 g, Spiroch. + + + +. 22. V. Spiroch. bds. + + + +. 23. V. links Primäraffekt deutlich verkleinert, Spiroch. bds. + + + +. 24. V. Primäraffekte haben an Größe wieder zugenommen, keine Heilung.

Tier 203. Geimpft am 12. IV. in beide Hoden. 27. VI. bds. erbsengroße Knoten, Spiroch. bds. + + + +. Injektion von 0,3 g. 28. VI. Tier stirbt.

Diese Versuche zeigen, daß die Wirksamkeit des Präparats eine außerordentlich wechselnde ist. Bei Tier 147 verschwinden die Spirochäten auf Injektion von 0,1 g für längere Zeit, während bei Tier 194 0,2 g nicht zur Heilung genügt. Ja, bei diesem Tier ist überhaupt kaum eine Beeinflussung der Spirochäten zu konstatieren. Nur die klinischen Erscheinungen bessern sich vorübergehend. Die wechselnde spirillozide Wirkung dürfte vielleicht denselben Grund haben, den Ferdinand Blumenthal und Oppenheim für die Verschiedenheit der Toxizität gerade dieses Präparates festgestellt haben. Sie fanden nämlich, daß das Dioxyprodukt, wenn es nicht in sehr verdünnter Lösung injiziert wird, an der Injektionsstelle ausgeschieden wird und von dort aus als Depot wirkt, während es in verdünnter Lösung sofort resorbiert wird. Auf jeden Fall sind die Resultate mit dem Dioxyprodukt vom therapeutischen Gesichtspunkt aus nicht sehr günstig, da die gerade vertragene Dosis von 0,2 noch eine recht unsichere Wirkung hat.

Allen von uns untersuchten Mercuridibenzoesäuren kommt demnach eine ausgesprochene spirillozide Wirkung auf die Syphilisspirochäte zu. Sie ist am schwächsten bei dem Diaminopreparat. Am günstigsten für eine therapeutische An-

wendung liegen die Verhältnisse bei dem Dinitroprodukt; denn hier ist die heilende Dosis bei subkutaner Injektion kaum ein Drittel so groß wie die tödliche Dosis für ein Kaninchen. Wir haben deshalb auch dieses Präparat für Heilversuche am Menschen verwendet. Hierbei zeigte es sich nun, daß wir bei einem erwachsenen Menschen bei weitem nicht die Dosen geben konnten, die von einem mittelschweren Kaninchen anstandslos vertragen werden. Wir sahen Magen-Darmstörungen, Stomatitis und Albuminurie bei Dosen auftreten, die weit geringer waren, als die unseren Kaninchen gegebenen. Es zeigt dies, daß der menschliche Organismus offenbar viel besser befähigt ist, aus derartigen Verbindungen das Quecksilber frei zu machen, als das Kaninchen. Lokal war die Reizung an der Injektionsstelle sehr stark, nicht geringer, als wir es bei intramuskulärer Salvarsaninjektion gesehen haben. Hierbei spielt vielleicht weniger das Quecksilber eine Rolle, als vielmehr die Konstitution des Präparates, die der des Salvarsans sehr ähnlich ist.

Auch die Wirkung der Dinitrodiphenylmercuridicarbonsäure auf den syphilitischen Prozeß beim Menschen entsprach durchaus nicht den Erwartungen, die man an dieselbe nach den Tierversuchen stellen durfte.

Während es bei den Tierversuchen an Kaninchen sich dem Sublimat weit überlegen zeigte, erreichte es beim Menschen die Wirkung des Sublimats nicht, auch bei Verwendung von an die Grenze des toxischen gehenden Dosen. Dieses Ergebnis mahnt sehr vorsichtig bei der Uebertragung am Tier gewonnener therapeutischer Resultate auf die menschliche Therapie. Für die experimentelle Erforschung erscheint die Tatsache von großer Wichtigkeit, daß keinerlei Uebereinstimmung in der Wirkung der einzelnen Quecksilberpräparate auf die verschiedenartigen Spirochäten und bei den verschiedenen Tierarten besteht, so daß nach unserer Meinung jedes Ergebnis nur für die Tierart und die Spirochäten gilt, für die es gefunden ist.

Die Dinitroverbindung wirkte gut bei der experimentellen Kaninchensyphilis, versagte aber bei der menschlichen Syphilis, und wie Kollé und seine Mitarbeiter fanden, auch bei der Hühnerspirillose. Aehnliche Er-

fahrungen machten Levaditi und Fourneau bei einem von ihnen untersuchten Präparat, das gleichfalls das Quecksilber völlig maskiert enthält. Die von ihnen untersuchte Verbindung ist die Dinitro- resp. Diaminoverbindung des Paraoxydiphenylquecksilbers. Das Diaminoprodukt wurde acetyliert.

Sie fanden, daß ihrem Präparate bei der Hühnerspirillose zwar eine deutlich prophylaktische, aber nur eine geringe Heilwirkung innewohnte, während die Erfolge bei der Kaninchensyphilis recht deutliche waren. 0,035 g intravenös eingespritzt, läßt in 12 Tagen ziemlich große Primäraffekte verschwinden, nachdem die Spirochäten innerhalb von 3 Tagen verschwunden waren. Auch in Levaditis Versuchen war die Heilwirkung nicht immer konstant. Da die tödliche Dosis 0,04—0,05 g betrug, so ist allerdings fast die tödliche Dosis nötig gewesen, um das Tier mit einer Injektion zu heilen. Bei wiederholten Einspritzungen kann man mit etwas kleineren Dosen auskommen. In einem anderen Versuch wurden 2 Einspritzungen von 0,015 und 0,016 pro Kilogramm Tier angewandt¹⁾.

Doch wenn uns auch das Tierexperiment täuschen kann, so dürfen wir nicht vergessen, welche außerordentlichen Fortschritte uns gerade auf chemotherapeutischem Gebiete die experimentelle Forschung gebracht hat.

Die an den von uns untersuchten Präparaten gemachten Erfahrungen zeigen ferner, daß durch Einführung verschiedener Gruppen in die aromatischen Quecksilberdicarbonsäuren sich erhebliche Unterschiede in der Giftigkeit und therapeutischen Wirkung hervorbringen lassen. Diese Tatsache, die für die Arsenpräparate allgemein anerkannt wird, war für das Quecksilber bisher noch nicht festgestellt worden. Wie stark der Einfluß dieser Gruppen auf die Wirkung der Präparate ist, geht aus dem Vergleiche unserer Versuche mit denjenigen anderer Autoren hervor. So machen Schrauth und Schoeller

1) Levaditi und Launoy schreiben, daß die tödliche Dosis bei der intravenösen Einspritzung zwischen 0,04 und 0,05 bei 1000 g beträgt, und sie multiplizieren diese Dosis entsprechend dem Gewicht des Kaninchens, nehmen also an, daß bei einem Kaninchen von 3 kg 0,12—0,15 die tödliche Dosis sein würde. Ich möchte diese Art, die Giftigkeit festzustellen, für nicht ganz zweckmäßig halten. Es läßt sich in den wenigsten Fällen die Toxizität in dieser Weise multiplizieren. Häufig wird sich zeigen, daß ein doppelt so schweres Tier nicht die doppelte Dosis verträgt, wie ein anderes Tier. Manchmal allerdings zeigt es sich auch, daß es mehr verträgt, da die Toxizität beim Kaninchen schon an und für sich innerhalb erheblicher Grenzen schwankt.

ganz besonders darauf aufmerksam, daß die von Pesci dargestellte Quecksilberdibenzoesäure im Tierexperiment nicht wirkt. Sie haben dann gemeinschaftlich mit Schilling systematische Untersuchungen über die Wirkung aromatischer Quecksilberverbindungen an infizierten Tieren angestellt und konnten eine Beeinflussung der Infektion durch diese Quecksilberdicarbonsäure nicht konstatieren. Sie hielten es anscheinend für unmöglich, daß solche maskierten Quecksilberverbindungen eine Wirkung Spirochäten gegenüber ausübten, denn sie haben ihrer Ueberraschung über meine positiven Resultate besonderen Ausdruck gegeben. Da nun an der Richtigkeit der negativen Resultate von Schrauth, Schoeller, Schilling und Krogh nicht zu zweifeln ist, ebensowenig an den positiven Ergebnissen von mir, Kolle und seinen Mitarbeitern, sowie von Levaditi und Launoy bei solchen maskierten Hg-Verbindungen, so muß der Grund für die Divergenz der Wirkung des Quecksilbers in der sonstigen Konstitution der Verbindung liegen. Es zeigen gerade diese divergierenden Resultate, wie wichtig die Seitenketten für die Wirkung einer Verbindung sind, auch wenn die wirksame Substanz — hier das Quecksilber — sonst in gleicher Bindung sich befindet. Die von Levaditi und Launoy mitgeteilten Versuche sind zwar nicht an Dicarbonsäuren angestellt, sondern an mercurierten Phenolen, aber das prinzipielle ist, daß das Hg in ihnen ebenfalls völlig maskiert ist. Bei den aromatischen Arsenkörpern ist es insbesondere die Amidogruppe, deren Wichtigkeit für die Verankerung des Präparats an die Trypanosomen und Spirochäten bei Atoxyl und Salvarsan klar geworden ist. Für die maskierten aromatischen Hg-Verbindungen spielen auch Nitro- und Oxygruppen eine ausschlaggebende Rolle. Alle diese Gruppen vermitteln beim syphilitischen Tier die spirillozide Wirkung. Für die Wirkung der Nitrogruppe ist es von größter Bedeutung, daß diese im Tierkörper teilweise in eine Amidogruppe reduziert wird, denn Ferdinand Blumenthal und Curt Oppenheim konnten bei allen Tieren, welche mit den Nitroverbindungen gespritzt waren, im Harn nach direkter Diazotierung mit *a*-Naphthol den entsprechenden Farbstoff erhalten. In den Verbindungen, in denen aber diese Seitenketten fehlen, war, soweit sie

studiert, das Quecksilber anscheinend ohne Wirkung. Das geht aus den oben erwähnten Versuchen von Schrauth und Schoeller deutlich hervor, denn alle von ihnen untersuchten Quecksilberdicarbonsäuren waren solche, in denen diese Seitenketten fehlten.

II. Versuche mit aromatischen Verbindungen, die das Quecksilber in halbmaskierter Form enthalten.

In der menschlichen Therapie werden aromatische Quecksilberpräparate, die das Metall in halbfester Bindung enthalten, seit langer Zeit angewendet. Besonders das Hydrargyrum salicylicum findet ausgedehnte Verwendung in der Syphilistherapie.

Dimroth hat zuerst nachgewiesen, daß dasselbe nicht das Quecksilbersalz der Salicylsäure ist, sondern daß das Quecksilber im Benzolkern steht. Schrauth und Schoeller haben dann das unlösliche Hydrargyrum salicylicum dadurch löslich gemacht, daß sie einen Buttersäureradikal in das Präparat einführten. Es ist das ein Doppelsalz aus Quecksilbersalicylat und amidooxybuttersaurem Natron. Dieser Körper wird unter dem Namen Asurol in den Handel gebracht. Sonst wird von Präparaten dieser Gruppe noch das Enésol viel verwendet. Dasselbe ist ein salicylarsensaures Quecksilber.

Für uns schaltet das Enésol ohne weiteres aus, da es sich bei ihm um kombinierte Quecksilber-Arsenwirkung handelt und wir es deshalb nicht mit reinen Quecksilberpräparaten vergleichen können; das Hydrargyrum salicylicum ist für vergleichende chemotherapeutische Versuche ungeeignet, da es schwer löslich und daher seine Resorption zu wechselnd ist. Wir haben uns deshalb darauf beschränkt, von bekannten Präparaten das Asurol zu prüfen und mit neuen Präparaten in seiner Wirkung zu vergleichen.

A. Versuche mit Asurol.

Das Asurol stellt das aminoxyisobuttersaure Doppelsalz der o-Oxyquecksilbersalicylsäure dar. Es enthält 40 Proz. Quecksilber und ist in Wasser gut löslich.

Tier 121. Injektion von 0,1 g subkutan am 5. I. 13. I. Tier stirbt.

Tier 131. Geimpft am 17. X. in beide Hoden. 8. I. 10-pfennigstückgroßer Primäraffekt links, Spiroch. ++. Injektion von 0,02 g subkutan. 9. I. Durchfall, Spiroch. ++. Tier stirbt.

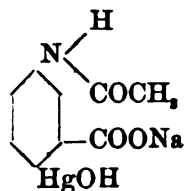
Tier 140. Geimpft am 28. X. in beide Hoden. 11. I. drei erbsengroße Primäraffekte rechts, links Knoten von Linsengröße, ferner haselnußgroßer erodierter Knoten. Injektion von 0,05 g subkutan. 12. I. Spiroch. bds. ++++. 13. I. Durchfall. Spiroch. rechts —, links ++, Erscheinungen bds. zurückgegangen. 15. I. Spiroch. bds. —, Erscheinungen bds. deutlich verkleinert. 18. I. rechts erbsengroßer Knoten, links trockene Erosion, Spiroch. bds. —. 11. II. Spiroch. —, klinische Erscheinungen geheilt. 1. III. Rezidiv, Knoten von Erbsengröße, bds. Spiroch. ++++.

Tier 139. Injektion von 0,02 g intravenös am 16. II. Tier stirbt am 17. II.

Demnach wird das Asurol bei subkutaner Injektion nur in Dosen vertragen, die unterhalb 0,1 g liegen. Nach intravenöser Injektion ging das Versuchstier schon bei 0,02 g innerhalb 24 Stunden zugrunde. Diese hohe Giftigkeit für Kaninchen entspricht völlig den Erfahrungen, die Neisser mit diesem Körper bei Affen gemacht hat. Die spirillozide Wirkung des Präparates ist recht deutlich. Nach Injektion von 0,05 g (Tier 140) verschwinden die Spirochäten nach 3—4 Tagen, und die Krankheitserscheinungen gehen zurück; doch genügt die Dosis nicht, um eine Dauerheilung herbeizuführen. Denn nach einigen Wochen trat ein Rezidiv auf. Eine höhere Dosis zu verwenden, ist aber unmöglich, da wir uns mit 0,05 schon dicht an die Grenze der toxischen Dosis bringen.

B. Versuche mit acetaminomercuribenzoesaurem Natrium.

Das Präparat hat folgende Formel:



Das Präparat ist in kaltem Wasser ziemlich schwer löslich, in 0,9-proz. Kochsalzlösung leicht löslich, doch halten sich diese Lösungen nicht, wenn sie nicht fest verschlossen unter indifferentem Glase aufbewahrt werden. Besser löst sich das Präparat in verdünnter Piperazinslösung. Diese Lösungen

sind haltbar. Das Präparat enthält 48 Proz. Quecksilber und wird unter dem Namen Toxynon in den Handel gebracht. Die tödliche Dosis für ein Kaninchen von 2–3 kg bei subkutaner Injektion beträgt ungefähr 0,15 g. Bei intravenöser Injektion werden manchmal bis 0,04 g vertragen.

Subkutane Versuche.

Tier 127. Geimpft am 17. X. in beide Hoden. 5. I. beiderseits Erosionen, Spiroch. ++. Injektion von 0,025 g. 6. I. Spiroch. ++, klinisch keine Veränderung. 8. I. Erosionen trocknen ab, Spiroch. bds. +. 9. I. Spiroch. —, Erosionen kleiner. 11. I. Spirochäten —. 15. I. Spirochäten —, Erosionen ganz flach. 18. I. rechts geheilt, links kleine trockene erodierte Stelle, Spiroch. bds. —. 29. I. Rezidiv links, Erosionen wieder härter, größer, Spiroch. +.

Tier 144. Geimpft am 24. II. in beide Hoden. 13. III. rechts pfenniggroßer Primäraffekt, links erbsengroßer Knoten, Spiroch. beiderseits + + + +. Injektion von 0,025 g. 14. III. Erosionen rechts trocken, Spirochäten bds. —. 15. III. Spiroch. bds. +, klinisch keine Veränderung. 16. III. Spiroch. —, Primäraffekt fast verschwunden, Knoten verschwunden. Tier beobachtet bis 31. X.

Tier 182. Geimpft am 23. I. in beide Hoden. 13. III. rechts markstückgroßer Primäraffekt, $\frac{1}{2}$ ccm dick, links nichts, Spiroch. rechts + + + +. Injektion von 0,025 g. 15. III. Spiroch. + + + +, klinisch keine Veränderung. 16. III. Spiroch. +. Primäraffekt kleiner und weicher. 18. III. Spiroch. ++. Primäraffekt fast eingetrocknet. 26. III. Primäraffekt unverändert, Spiroch. ++. Tier stirbt.

Tier 153. Geimpft am 5. XII. in beide Hoden. 22. II. links markstückgroßer Primäraffekt, Spiroch. + + + +. Injektion von 0,025 g. 23. II. Spiroch. + + + +, klinisch keine Veränderung. 24. II. Spiroch. +. 26. II. Spiroch. —. Primäraffekt um $\frac{1}{4}$ kleiner, weicher. 28. II. Primäraffekt weiter verkleinert, Spiroch. —. 1. III. Spiroch. —, klinisch keine Veränderung. 15. III. Spiroch. —, noch ganz geringe Erosion. 26. III. geheilt. Tier stirbt bald darauf.

Tier 142. Geimpft am 28. X. in beide Hoden. 9. X. rechts zwei Primäraffekte, der eine bohnen groß, der andere erbsengroß. Injektion von 0,05 g. 11. XII. Primäraffekt um die Hälfte verringert, Spiroch. —. 12. XII. Spiroch. —. 13. XII. Primäraffekt abgetrocknet, ganz weich, Spiroch. —. 15. XII. auf dem größeren Primäraffekt noch Kruste, der andere völlig abgetrocknet. 4. I. geheilt, beobachtet bis 18. I.

Tier 124. Geimpft am 17. X. in beide Hoden. 5. I. links markstückgroßer Primäraffekt, rechts erbsengroße Verhärtung und Erosion, Spiroch. rechts ++, links + + +. Injektion von 0,05 g. 6. I. Spiroch. +, klinisch keine Veränderung. 7. I. rechts Spiroch. —, links gleichfalls —, Primäraffekt weich, um die Hälfte kleiner. 9. I. Spiroch. bds. —,

klinische Erscheinungen deutlich zurückgegangen. 11. I. Spiroch. bds. —, infiltrative Geschwulst, links noch Schorf. 18. I. rechts geheilt, links noch wenig große eingetrocknete Erosion, Spiroch. —. 29. I. Spiroch. —, links noch geringer Strang. 5. II. geheilt, beobachtet bis 19. II.

Tier 146. Geimpft am 24. I. in beide Hoden. 22. II. rechts haselnußgroßer Knoten, links noch etwas größerer Knoten, Spiroch. bds. + + + +. Injektion von 0,05 g. 23. II. Spiroch. bds. —. 24. II. Spiroch. bds. —, klinische Erscheinungen auf die Hälfte zurückgegangen. 28. II. Tier stirbt.

Tier 162. Geimpft am 15. II. in beide Hoden. 22. II. haselnußgroßer Primäraffekt, rechts Spiroch. + + + +. Injektion von 0,05 g. 24. II. Spiroch. —. 26. II. Primäraffekt auf die Hälfte zurückgegangen. Spirochäten —. 1. III. klinisch keine Veränderung, Spiroch. —. 15. III. geheilt. Beobachtet bis zum 31. X.

Tier 170. Geimpft am 22. XII. in beide Hoden. 4. III. links markstückgroßer Primäraffekt, Spiroch. + + + +, Injektion von 0,05 g. 5. III. Primäraffekt um die Hälfte kleiner, Spiroch. —. 7. III. Spiroch. —, Primäraffekt fast eingetrocknet. 8. III. Spiroch. —. 13. III. geheilt. Beobachtet bis 26. III.

Tier 140. Geimpft am 28. X. in beide Hoden. 27. III. rechts über bohngroßer, links erbsengroßer Knoten, rechts Spiroch. + + + +, links +. Injektion von 0,05 g. 28. III. Spiroch. links —, rechts + +. 29. III. Knoten links fast verschwunden, rechts Knoten weicher, Spiroch. bds. —. 30. III. Spiroch. bds. —, links geheilt, rechts noch kleiner Knoten. 2. IV. Spiroch. bds. —, weicher kleiner Knoten, Tier stirbt.

Tier 163. Geimpft am 22. XII. in beide Hoden. 27. III. links markstückgroßer Primäraffekt, rechts zehnpfennigstückgroßer Primäraffekt, erbsengroßer Knoten, Spiroch. links + +, rechts + + + +. Injektion von 0,05 g. 28. III. Spiroch. + + + +, 29. III. Spiroch. rechts + + + +, links + +. 30. III. Spiroch. links —, rechts + +, bds. stark verkleinert. 31. III. Spiroch. links —, rechts +. 1. IV. Spiroch. bds. +, klinische Erscheinungen um die Hälfte verkleinert. 14. V. rechts und links großer Knoten und Erosion Spirochäten +.

Tier 130. Geimpft am 17. X. in beide Hoden. 29. XI. zehnpfennigstückgroßer Primäraffekt links, rechts kleine Erosionen von Linsengröße, Spiroch. bds. + + + +. Injektion von 0,1 g. 30. XI. Spiroch. bds. + + + +. 1. XII. Spiroch. bds. + + + +. 2. XII. Primäraffekt auf die Hälfte verkleinert, Spiroch. bds. —. 7. XII. fast geheilt, Spiroch. bds. —. 8. XII. nur noch Schorf, Spiroch. —. 4. I. geheilt, beobachtet bis 27. VI.

Tier 133. Geimpft in beide Hoden am 28. X. 29. XI. links zwei Primäraffekte von Pfenniggröße, rechts prall elastische Geschwulst des Hodens, links Spiroch. —, rechts Spiroch. + + + +. Injektion von 0,1 g subkutan. 30. XI. Spiroch. rechts + +, links —. 1. XII. Spiroch. bds. —. 2. XII. Spiroch. bds. —, klinische Erscheinungen geringer geworden. Tier stirbt am 5. XII.

Tier 135. Geimpft am 28. X. in beide Hoden. 22. XI. rechts erbsengroßer Primäraffekt, links große Erosionen und erbsengroßer Knoten. Spiroch. bds. ++. Injektion von 0,3 g. 21. XI. Spiroch. bds. ++. 22. XI. Spiroch. +. 23. XI. Spiroch. bds. —. Primäraffekt im Abtrocknen, Knoten kleiner. 24. XI. Erscheinungen fast verschwunden, Spiroch. bds. —. 27. XI. Tier stirbt.

Tier 224. Geimpft am 15. VII. in beide Hoden. 15. VIII. links kleinbohngroßer, rechts erbsengroßer Primäraffekt, Spiroch. bds. +. Injektion von 0,05 g. 19. VIII. Spiroch. bds. —, keine Verkleinerung. 20. VIII. Spiroch. bds. —, klinische Erscheinungen auf die Hälfte zurückgegangen. 22. VIII. Spiroch. bds. —, klinische Erscheinungen fast verschwunden. 30. VIII. Spiroch. bds. —. Tier geheilt.

Intravenöse Versuche.

Tier 130. Injektion von 0,03 g am 16. II. Tier lebt. Gewicht 2320.

Tier 118. Gewicht 2250. Injektion von 0,02 g am 12. II. Tier lebt.

Tier 143. Geimpft am 29. XI. in beide Hoden. 8. I. markstückgroßer Primäraffekt bds. Injektion von 0,04 g. Tier stirbt nach 12 Stunden.

Tier 144. Geimpft am 29. XI. in beide Hoden. 11. I. rechts markstückgroßer Primäraffekt mit großer Leistenrüse, links ein erbsengroßer Primäraffekt. Spiroch. bds. + + + +. Injektion von 0,01 g. 12. I. Spiroch. rechts +, links + + + +. 13. I. Spiroch. bds. ++, klinische Erscheinungen, Primäraffekt kleiner und weicher. 15. I. Spiroch. —, bds. Primäraffekt flacher und vereitert. 18. I. rechts Primäraffekt flach, kaum pfenniggroß, weich, Spiroch. —, links Primäraffekt klein ganz weich, Spiroch. —. 19. I. Spiroch. bds. —. 22. I. Spiroch. bds. —. 29. I. Rezidiv, links großer Primäraffekt, Spiroch. + + +, rechts Spiroch. —.

Tier 178. Geimpft am 23. I. in beide Hoden. 4. III. drei linsengroße Primäraffekte. Injektion von 0,0125 g. 5. III. Injektionsstelle am Ohr stark geschwollen. Spiroch. bds. + + + +. 6. III. Tier stirbt.

Tier 236. Geimpft am 26. VIII. in beide Hoden. 11. XI. bds. markstückgroßer Primäraffekt, Spiroch. ++. Injektion von 0,03 g. 12. I. Spiroch. bds. ++. Primäraffekt etwas kleiner. Tier stirbt.

Tier 238. Geimpft am 26. VIII. in beide Hoden. 11. XI. Spiroch. bds. + + + +, markstückgroßer Primäraffekt bds. Injektion von 0,03 g. 12. XI. Spiroch. bds. + + + +, klinisch keine Veränderung. Tier stirbt.

Demnach genügt häufig eine einmalige subkutane Injektion von 0,025 g, um eine Heilung herbeizuführen. Bei den Tieren 144 und 153 verschwinden die Spirochäten innerhalb 48 resp. 72—96 Stunden und die Tiere bleiben dauernd gesund. Doch ist der Heilerfolg dieser Dosis ein sehr verschiedener.

Bei Tier 127 verschwinden zwar die Spirochäten allmählich, doch tritt schon nach 14 Tagen ein Rezidiv auf und bei Tier 182 ist überhaupt nur ein vorübergehender Einfluß auf die Spirochäten und die Krankheitserscheinungen zu erkennen. Bei subkutaner Injektion von 0,05 g sind fast in allen Fällen nach 24 Stunden die Spirochäten definitiv verschwunden (Tier 142, 124, 146, 162, 170, 140, 224, 194). Nur bei Tier 163 wird kaum eine Beeinflussung der Spirochäten und der Krankheitserscheinungen beobachtet. Dieses Tier hatte am 21. II. 0,05 g dioxymercuridiphenyldicarbonsaures Natrium ohne Erfolg bekommen. Am 27. III. wurde es mit 0,05 g acetylamino-mercuribenzoesaurem Natrium behandelt. Hier liegt die Möglichkeit vor, daß die Spirochäten durch die vorhergehende Injektion quecksilberfest geworden waren und daher die Heilwirkung ausblieb. Noch höhere Dosen brachten die Spirochäten gleichfalls zum Verschwinden (Tier 130, 133, 135). Doch hatten wir bei diesen Mengen schon Tierverluste.

Im allgemeinen kann man 0,1 g des Präparates als die Dosis bene tolerata für ein Kaninchen von 2—3 kg bezeichnen. Wenn wir die Wirksamkeit des Präparates bei der Kaninchensyphilis mit der des Asurols vergleichen, so ergibt dies für das Toxynon ein recht günstiges Resultat. Intravenöse Versuche habe ich nicht sehr zahlreich angestellt, da hier die wechselnde toxische Wirkung noch viel stärker in Erscheinung tritt. So vertrugen Tier 118 und 130 0,02—0,03 g des Präparates, während Tier 236 nach intravenöser Injektion von 0,0125 g zugrunde ging. Daß das Gewicht des Tieres hierbei keine entscheidende Rolle spielt, geht daraus hervor, das Kaninchen 178 schwerer wog als die beiden überlebenden Kaninchen. Auch Verschiedenheiten in der Resorption können bei intravenöser Injektion für derartige Unterschiede kaum verantwortlich gemacht werden.

Einen Heilversuch führten wir mit 0,01 g (Tier 144) durch. Die Spirochäten verschwanden bei dem Tier innerhalb 72 Stunden, aber nur vorübergehend. Immerhin hatte auch diese Dosis eine deutliche spirillozide Wirkung.

Therapeutische Versuche am Menschen habe ich mit dem Präparat nicht angestellt, dagegen sind in neuerer Zeit von

Guttman intravenöse Injektionen von Toxynon bei Syphilitikern gemacht worden, die zeigen, daß das Präparat bei diesem Anwendungsmodus beim Menschen sehr wirksam ist.

III. Versuche mit Quecksilbersalzen.

Wie schon oben erwähnt, konnten mit Quecksilbersalzen besondere therapeutische Resultate bei der experimentellen Syphilis bisher nicht erzielt werden. Um einen Erfolg zu erzielen, war es entweder nötig, Dosen zu geben, bei denen die Tiere zugrunde gingen, oder aber die Injektionen nicht tödlicher Dosen mußten sehr oft wiederholt werden. Erst in letzter Zeit habe ich mich dem Studium von Verbindungen zugewandt, die das Quecksilber als Ion enthalten, in der Hoffnung, daß sich auch hier Unterschiede der einzelnen Präparate in bezug auf chemotherapeutische Wirkung feststellen lassen. Diese Versuche sind erst im Beginn, und ich möchte hier nur kurz über ein Präparat berichten, das von Herrn Geheimrat Salkowski dargestellt und mir zur Prüfung übergeben wurde. Es ist dies eine von der Firma Knoll & Co. nach einem besonderen Verfahren hergestellte in Wasser lösliche paranukleinsäure Quecksilberverbindung, die mit Eiweißlösungen keinen Niederschlag gibt. Die Versuche sind mit einer mir von Herrn Geheimrat Salkowski übergebenen Lösung angestellt, von der 1 ccm 0,005 g Quecksilber entsprach. Nach toxikologischen Versuchen, die in größerem Maßstabe von Ferdinand Blumenthal und Kurt Oppenheim ausgeführt wurden, beträgt die Dosis bene tolerata bei einem Kaninchen von 2—3 kg 0,1 g des Salzes.

Versuche mit einem nukleinsäuren Quecksilberpräparat. (Geheimrat Salkowski.)

Subkutan.

Tier 244. Geimpft am 31. X. in beide Hoden. 24. II. talergroßer weicher Primäraffekt rechts, links pfenniggroßer, Spiroch. bds. ++++. Injektion von 0,1 g. 25. II. Spiroch. bds. —, links Primäraffekt erheblich eingetrocknet, rechts wenig vermehrt. 26. II. Spiroch. bds. —. 27. II. Spiroch. bds. —. 28. II. Spiroch. bds. —, rechts Primäraffekt auf die

Hälfte kleiner, links fast abgetrocknet. 3. III. Spiroch. —, bds. klinisch fast geheilt. 29. III. klinisch fast abgeheilt, Spiroch. bds. —. Tier stirbt am 30. III.

Tier 246. Geimpft am 31. X. in beide Hoden. 24. II. markstückgroßer Primäraffekt bds., Spiroch. bds. ++. Injektion von 0,1 g. 25. II. klinische Erscheinungen unverändert. Spiroch. —. 26. II. Tier tot aufgefunden.

Tier 250. Geimpft am 7. III. in beide Hoden. 15. III. rechts Knoten von Erbsengröße, pfenniggroßer Primäraffekt, links Knoten von Erbsengröße. Primäraffekt von Markstückgröße. Spiroch. rechts + + + +, links + +. 15. V. Injektion von 0,1 g. 16. V. rechts Spiroch. + + +, links Spiroch. + +. 17. V. links Spiroch. +, rechts —. Erscheinungen beiderseits auf die Hälfte zurückgegangen. Die harten Knoten sind weich geworden. Primäraffekt bds. infiltrierte. 19. V. Spiroch. bds. —. Knoten fast geschwunden. Primäraffekt weich. 20. V. Erscheinungen trocknen ab. Spiroch. —. 28. V. Spiroch. bds. —, ganz geringe Erosionen. 6. VI. geheilt. Tier stirbt am 12. VI.

Tier 252. Geimpft am 17. III. in beide Hoden. 15. V. rechts zehnpfennigstückgroßer Primäraffekt, links pfenniggroßer. Spiroch. bds. + +. 15. V. Injektion von 0,05 g. 16. V. Spiroch. rechts + + +, links + +. 17. V. klinisch unverändert. Spiroch. rechts + + +, links + +. Injektion von 0,05 g = 2. Injektion. 19. V. um die Hälfte kleiner geworden, rechts Erscheinungen, um die Hälfte verkleinert, Spiroch. +, keine klinische Veränderung. 20. V. Spiroch. bds. —, klinische Erscheinungen bds. zurückgegangen. 21. V. Spiroch. — bds. 24. V. Spiroch. rechts —, links +, klinische Erscheinungen fast zurückgegangen. 26. V. Spiroch. bds. —, klinische Erscheinungen im Rückgang. 6. VI. geheilt.

Demnach genügt eine einmalige Injektion von 0,1, um große Primäraffekte zur Heilung zu bringen. Die Spirochäten verschwinden nach 24—48 Stunden (Tier 244, 250). Auch bei dem Tier 246, das zwei Tage nach der Injektion starb, waren die Spirochäten verschwunden. Eine einmalige Injektion von 0,05 g hatte keine Wirkung. Auf Wiederholung der Dosis verschwanden die Spirochäten, wenn auch langsam.

Mit dem paranukleinsauren Quecksilber gelingt es also mit einer einmaligen Injektion die experimentelle Syphilis der Kaninchen zur Heilung zu bringen. Allerdings liegt die Dosis, die hierzu nötig ist, dicht an der tödlichen. Immerhin scheint mir das Resultat ein sehr günstiges zu sein gegenüber den sonst gebräuchlichen inonisierten Verbindungen.

Zusammenfassung.

In den vorhergehenden Ausführungen habe ich ihnen ein Bild zu geben versucht der bisherigen Resultate meiner chemotherapeutischen Versuche mit Quecksilberpräparaten. Sie zeigen, daß das Quecksilber auch in völlig maskiertem Zustande wirksam ist. Die von uns untersuchten Mercuridiphenyldicarbonsäuren haben sowohl eine toxische als auch spirillozide Wirkung. Ferner sind auch bei den Quecksilberverbindungen, ähnlich wie bei den Arsenverbindungen, die Seitenketten von großer Bedeutung für die Wirkung. Wir haben gesehen, daß, während die Mercuridibenzoesäure nach Versuchen von Schrauth und Schöller nicht wirkt, diese Verbindung nach Einführung von Nitro-, Oxy- und Amidogruppen deutliche spirillozide Wirkung bekommt. Auch zwischen der Wirkung der verschiedenen Gruppen ist eine große Differenz. Die Oxygruppen entgiften sehr wenig, während die Amido- und Nitrogruppen eine sehr starke Herabsetzung der Toxizität bedingen. Die Nitrogruppe ihrerseits erhöht dann wiederum beträchtlich die spirillozide Wirkung des Präparates. Auch in dem acetaminomericuribenzoesaurem Natrium und in der paranukleinsauren Quecksilberverbindung Salkowskis haben wir Verbindungen vor uns, bei denen wir weit mehr Quecksilber in den Organismus bringen können, als mit anderen halbmaskierten resp. ionisierten Quecksilberverbindungen.

Wir sehen also auch hier, daß nicht nur die Menge Quecksilber, die eingebracht wird, sondern auch die Art der Bindung und die Konstitution von bedeutendem Einflusse auf die Wirksamkeit ist.

Schließlich möchte ich am Schluß noch einmal hervorheben, daß gerade nach meinen Erfahrungen man nicht berechtigt ist, Befunde, die man an einer Tierspecies und einer Spirochätenart erhoben hat, ohne weiteres auf die menschliche Syphilistherapie zu übertragen. Diese experimentellen Versuche geben uns zwar Fingerzeige, können uns aber auch einmal irreführen; sehen wir doch beim Tiere wirksame und wenig toxische Präparate beim Menschen unwirksam und

404 Blumenthal, Chemotherap. Versuche mit Quecksilberpräparaten.

toxisch wirken, und andererseits sehen wir beim Tiere von den in der menschlichen Therapie so bewährten Salzen eine nur sehr geringe Wirkung.

Literatur.

- Abelin, Deutsche med. Wochenschr., 1912, p. 1824.
Blumenthal, Franz, Med. Klinik, 1911, p. 1506.
— VII. Internationaler Kongreß für Dermatologie, Rom 1912, p. 613.
— Centralbl. f. Bakt., Bd. 54, Beiheft, 1912, p. 36.
Blumenthal, Ferdinand, Biochem. Zeitschr., Bd. 32, 1911, p. 59.
— Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 12.
— und Oppenheim, Carl, Biochem. Zeitschr., Bd. 36, 1912, p. 202.
— — Ibid., Bd. 39, Heft 1 und 2.
Dimroth, Berichte der Deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 35, Heft 1 und 3.
Guttman, Berliner klin. Wochenschr., 1913.
Kolle und Rothermundt, Centralbl. f. Bakt., Bd. 54, Beiheft, 1912, p. 65.
— — und Dale, Med. Klinik, 1912, No. 2, p. 65.
— — und Peschic, Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 34.
Launoy et Levaditi, Compt. rend. de l'acad. des sciences, 1911, p. 304,
— — Soc. de Biol., 1913, p. 18.
Müller, Schöller und Schrauth, Biochem. Zeitschr., Bd. 3, Heft 5 und 6.
Neisser, A., Beiträge zur Pathologie und Therapie der Syphilis, Berlin 1911.
Schöller und Schrauth, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1910, No. 36.
— — Med. Klinik, 1912, p. 1200.
Tomaszewski, Deutsche med. Wochenschr., 1910, p. 1447.
Uhlenhuth und Weidanz, Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 20.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin; Direktor: Geheimrat Prof. Dr. A. Heffter (Abteilung für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie; Vorsteher: Prof. Dr. E. Friedberger).]

Weitere Beiträge zur Wirkungsweise des Kaolins und anderer chemisch indifferenten und unlöslichen anorganischer kolloidaler Substanzen ¹⁾.

Von **E. Friedberger** und **Ryozo Tsuneoka** aus Kyoto.

(Eingegangen bei der Redaktion am 28. November 1913.)

Die Versuche, über die im nachstehenden berichtet werden soll, knüpfen unmittelbar an eine frühere Veröffentlichung von Friedberger und Kumagai (diese Zeitschr., Bd. 13, 1912, Heft 2) an. In dieser Arbeit war die bereits von Gengou studierte eigentümliche Wirkung des Kaolins auf rote Blutkörperchen *in vitro* näher untersucht worden.

Das Kaolin, ebenso das Bariumsulfat, Aluminiumhydroxyd, Talcum und, wie wir neuerdings auch feststellen konnten, der Meerschweinchenblutserum, besitzen, obwohl völlig unlöslich, die merkwürdige Eigenschaft in Kochsalzlösung suspendiert eine intensive Hämolyse aller darauf untersuchten Blutarten herbeizuführen. Diese Hämolyse wird durch Serum gehemmt, die hemmende Kraft des Serums wird durch Erhitzen auf 56° nicht aufgehoben.

Von den Serumfraktionen wirkt das Globulin stärker hemmend als das Albumin, auch Gelatine und Agar-Agar hemmen; das hemmende Prinzip wird dem Serum durch das Kaolin entzogen. Es konnte festgestellt werden, daß die Hämolyse des Kaolins auf einer Adsorption aus den Blutkörperchen beruht; ebenso wie auf isolierte tierische Zellen wirkt das Kaolin auch auf Bakterien lytisch.

Was nun die Giftwirkung des Kaolins *in vivo* anlangt, so wurde man auf diese erst aufmerksam, als man durch Behandlung von normalem Meerschweinchenblutserum mit Kaolin ein dem Anaphylatoxin ähnliches Gift zu erhalten wählte.

Wie Friedberger und Szymanski ²⁾ damals festgestellt haben, beruht aber die vermeintliche Giftwirkung des Serums lediglich auf dem

1) Vorgetragen in der Sitzung der Berliner Mikrobiol. Gesellschaft vom 7. November 1913.

2) Verhandl. d. Vereinigung f. Mikrobiol., Dresden 1911. Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 50, Beih., p. 71—73.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XX.

Zurückbleiben von Kaolin infolge ungenügender Zentrifugierung. Es ist bereits von uns darauf hingewiesen worden, daß auch das Kaolin in akut tödlichen Dosen im Gegensatz zum Anaphylatoxin keine Lungenblähung bedingt. Sachs und Ritz¹⁾ haben dann die Giftwirkung des Kaolins an sich näher untersucht und eine beträchtliche Temperatursenkung durch 2—3 ccm einer 0,5-proz. Kaolinlösung beobachtet. Sachs und Ritz machten auch bereits als erste die wichtige Beobachtung, daß die Giftwirkung des Kaolins durch aktives Meerschweinchenserum paralytisiert wird, während inaktives Serum diese Wirkung nicht haben soll. Was die Todesursache durch Kaolin in größeren Dosen anlangt, so hatten auch wir, wie andere Autoren, sie im wesentlichen rein mechanisch durch Embolien zu erklären versucht. Eine nähere Analyse der Kaolinvergiftung führte uns jedoch zu ganz anderen Resultaten.

Wir benutzten zu unseren Versuchen ein Kaolinpräparat von Kahlbaum. Das Kaolin wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, in die Jugularvene injiziert, stets in einem Volum von 1—2 ccm. Die Symptome der Vergiftung sind bei größeren Dosen außerordentlich stürmisch und akut. Die Tiere zeigen lebhaftere Krämpfe, die entfernt an die bei Anaphylaxie erinnern, und der Tod tritt in wenigen Minuten ein. Bei der Obduktion zeigt sich die Lunge nicht gebläht, das Blut bleibt flüssig. Bei kleineren Dosen folgt häufig auf die anfänglichen Krämpfe ein Lähmungsstadium, das Tier liegt auf der Seite, zeigt kolossalen Temperatursturz und verendet oft erst nach mehreren Stunden. Schon dieser protahierte Tod spricht nicht gerade dafür, daß es sich um eine einfache Emboliewirkung handelt. Wir bringen im nachstehenden eine Reihe von Versuchen zur Bestimmung der tödlichen Dosis des Kaolins.

Dosis letalis von Kaolin.

1. Versuch.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat und Obduktionsbefund
	No.	Gewicht in g	
0,05	T 50	190	Sofort Krämpfe, tot nach 1 Min.
0,03	T 52	190	dgl., tot nach 3 Min.
0,02	T 51	190	dgl., tot nach 8 Min.
0,01	T 53	200	Schwer erkrankt, überlebt
0,008	W 387	210	Ohne Besonderheiten, überlebt
0,005	T 39	200	dgl.

1) Verhandl. d. Vereinigung f. Mikrobiol., Berlin 1912. Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 54, p. 178, 250.

In diesen Versuchen wurde das Kaolin ohne weiteres in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt injiziert. Bei einem weiteren Versuch haben wir zunächst das Kaolin gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung ausgeschwemmt, um eventuell lösliche Beimengungen zu beseitigen. Das ausgeschwemmte Kaolin wurde im Trockenschrank bei 100° getrocknet, dann wieder fein pulverisiert und bis zur Abwägung im Exsikator gehalten. Die Bestimmung der Giftigkeit des so behandelten Kaolins zeigt die folgende Tabelle.

2. Versuch.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat und Obduktionsbefund
	No.	Gewicht in g	
0,02	W 482	215	Sehr krank, Krämpfe, tot nach 10 Min. (Lungen hellrot, etwas gebläht; Blut flüssig)
0,015	W 441	230	Schwer krank, überlebt
0,015	W 406	190	Sofort Krämpfe, tot nach 10 Min. (Lungen nicht gebläht, Blut wein- farbig, flüssig)
0,01	W 439	200	Leicht krank, überlebt

Analog verlief der folgende Versuch mit 3mal gewaschenem Kaolin.

3. Versuch.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,02	T 96	200	Fällt sofort um, schwer erkrankt, tot nach 10 Min.
0,015	T 95	220	Ohne Besonderheiten
0,015	T 72	160	Schwer krank, Krämpfe; steht nach 3 Min. auf und überlebt
0,01	T 125	170	Leicht krank, bald erholt

Es ergibt sich, daß ein Unterschied in der Toxizität nicht vorhanden ist, so daß also nicht eine lösliche Beimengung zum Kaolin in der ersten Versuchsreihe die Giftigkeit bedingt hatte.

Wenn die Wirkung des Kaolins eine rein mechanische wäre, so könnte eine Aufschwemmung der gröberen Partikel natürlich giftiger wirken als eine Emulsion von feinerer Korngröße der Teilchen. Wir haben eine Kaolinsuspension in ein Sedi-

mentationsrohr von 128 cm Länge und 2 cm Durchmesser gebracht, daß in verschiedener Höhe vom Boden (30, 60 und 90 cm) mit Auslässen versehen waren. Nach 30 Minuten wurde aus dem untersten Auslaß und aus dem obersten Auslaß eine bestimmte Menge der Kaolinsuspension abgenommen und in der oben beschriebenen Weise getrocknet. Die untere Quote enthielt natürlich bedeutend gröbere Partikel als die obere. Gleichwohl ist die Giftigkeit gleicher Mengen beider Fraktionen die gleiche, wie das der folgende Versuch zeigt.

4. Versuch.

Kaolin aus oberer Schicht.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,03	T 62	230	Sofort typisch erkrankt, tot nach 2 Min.
0,02	T 31	230	vgl.
0,01	T 35	240	Schwer krank, nach 10 Min. steht das Tier wieder auf und überlebt

Kaolin aus unterer Schicht.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,02	T 57	240	Schwer erkrankt, tot nach 5 Min.
0,01	T 63	220	Fällt sofort um, aber in 18 Min. wieder erholt

Wir bringen dann noch einen weiteren Versuch, der das gleiche Resultat ergibt.

5. Versuch.

Kaolin aus oberer Schicht.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,02	T 46	270	Schwer krank, tot nach 5 Min. (Im rechten Herzen koaguliertes Blut. Keine Lungenblähung)
0,015	T 61	210	Fällt sofort um, tot in 17 Min. (Blut flüssig, keine Lungenblähung)
0,01	T 60	200	Fällt sofort um, steht in 20 Min. wieder auf und überlebt

Kaolin aus unterer Schicht.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,02	T 56	265	Schwer erkrankt, tot nach 5 Min. (Blut flüssig, keine Lungenblähung)
0,015	T 55	215	Schwer krank, Abgang von Harn, tot in 15 Min. (Blut flüssig)
0,01	T 33	205	Fällt sofort um, steht nach 25 Min. wieder auf und überlebt

Aus diesem Versuch ergibt es sich schon, daß die eigentliche Giftwirkung des Kaolins kaum auf einem mechanischen Moment allein oder auch nur vorwiegend beruhen kann. Wie ist sie zu erklären? Wenn wir uns der vorerwähnten Versuche von Friedberger und Kumagai erinnern, die eine direkte Schädigung der Blutkörperchen *in vitro* durch das Kaolin nachgewiesen haben, so liegt es nahe, eine ähnliche Wirkung auch für das Kaolin *in vivo* anzunehmen, d. h. die Giftwirkung auf die Adsorption gewisser Bestandteile lebenswichtiger Zellen zurückzuführen.

Nun konnte die hämolytische Wirkung des Kaolins *in vitro* dadurch aufgehoben werden, daß man das Kaolin vorher mit Eiweiß in Kontakt brachte. Dadurch belädt sich das Kaolin mit gewissen Bestandteilen und wird seiner Fähigkeit beraubt, auf die Blutkörperchen adsorbierend zu wirken, und die Hämolyse zu verursachen. Wenn die Wirkung des Kaolins im Tierkörper der auf die Blutzellen *in vitro* entsprach, so mußte auch *in vivo* die Giftigkeit des Kaolins durch vorherigen Kontakt mit eiweißhaltigen Medien aufgehoben werden. Wir haben zunächst Versuche mit artgleichem (Meerschweinchenserum) angestellt, dessen entgiftende Wirkung bereits Sachs und Ritz beobachtet haben.

1 g Kaolin wurde mit 3 ccm frischem Meerschweinchenserum eine Stunde bei 37° digeriert, sodann wurde, wie stets, kräftig bei 4000 Touren solange zentrifugiert, bis mikroskopisch im Serum keine Kaolinpartikel mehr zu sehen waren; bis also die Substanz völlig ausgeschleudert war. Dann wurde der Bodensatz noch mit Kochsalzlösung dreimal gleichfalls jedesmal bis zur völligen Ausschleuderung des Kaolins gewaschen. Eine Kontrollprobe mit der gleichen Kaolinmenge wurde entsprechend behandelt, jedoch ohne vorherigen Serumzusatz. Die Giftigkeit der beiden Kaolinquoten zeigt die folgende Tabelle.

A. Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,02	W 440	230	Ohne Besonderheiten Krank, fällt nach 10 Min. um, aber in weiteren 10 Min. wieder erholt
0,03	W 320	230	
0,04	W 452	210	Schwer erkrankt, überlebt Tot nach 6 Min.
0,05	W 424	250	

B. Kochsalz-Kaolin.

Genau so behandelt mit NaCl-Lösung, wie die andere Quote
mit Serum.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,01	W 453	200	Ohne Besonderheiten Schwer krank, Krämpfe, tot nach 50 Min.
0,015	W 444	230	
0,02	W 429	210	Fällt sofort um, Krämpfe, tot nach 5 Min.

Analog verlief ein weiterer Versuch, in dem das Kaolin
dreimal mit je 5 ccm frischem Meerschweinchenserum digeriert
worden war.

Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,01	T 47	210	Ueberlebt
0,02	T 42	230	dgl.
0,03	T 43	200	dgl.
0,05	T 41	190	Sofort Krämpfe, tot nach 2 Min.

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß ebenso wie die
hämolytische Wirkung des Kaolins in vitro so auch die toxische
in vivo durch Vorbehandlung mit Serum bedeutend abge-
schwächt wird. Es dürfte das darauf zurückzuführen sein,
daß durch die Vorbehandlung mit Serum die Adsorptionskraft
des Kaolins in vivo entsprechend verringert wird. Zwischen
aktivem und inaktivem Serum besteht bezüglich der Wirkung

auf das Kaolin kein wesentlicher Unterschied, wie die beiden folgenden Versuchsreihen zeigen, in denen bei gleicher Versuchsanordnung wie vorher einmal aktives, einmal inaktives Serum benutzt wurde.

1. Versuch.

A. Inaktives Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,04	T 76	190	Fällt um, steht bald wieder auf, jedoch tot nach 3 Stdn.
0,05	T 74	230	Leicht krank, tot nach 30 Stdn.
0,05	T 84	225	Tot in 30 Min.

B. Aktives Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,03	W 502	220	Leicht krank, überlebt
0,04	W 500	220	Fällt um, steht bald wieder auf, überlebt
0,05	T 60	200	Tot nach 15 Min.

C. Kontrolle. Kochsalz-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,01	W 505	230	Ueberlebt
0,015	W 501	240	dgl.
0,02	W 504	240	Tot nach 5 Min.

2. Versuch.

A. Inaktives Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,04	W 477	230	Fällt nach 12 Min. um, steht aber wieder auf und erholt sich
0,05	W 508	220	Schwer krank, steht jedoch in 15 Min. auf und überlebt
0,06	W 513	200	Tot in 2 Min.

B. Aktives Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,04	W 475	235	Fällt sofort um, schwer krank, tot nach 1 Stde. dgl., tot nach 5 Min.
0,05	T 96	240	

C. Kontrolle. Kochsalz-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,01	T 92	210	Ohne Besonderheiten Schwer krank, tot in 35 Min. dgl., tot in 5 Min.
0,02	W 494	220	
0,03	W 510	250	

Bei den Hämolyseversuchen von Friedberger und Kumagai war bereits festgestellt worden, daß die entgiftende Wirkung der Globulinfraction des Serums größer ist, als die der Albuminfraction. Diese Verhältnisse kehren auch bei der jetzigen Versuchsanordnung wieder.

1 g Kaolin wurde jeweils mit gleichen Mengen Globulin resp. Albuminlösung eine Stunde bei 37° behandelt und in der üblichen Weise auf die Giftigkeit am Meerschweinchen ausgewertet. Das Resultat zeigt die folgende Tabelle.

A. Globulin-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,03	T 172	210	Fällt sofort um, steht nach 3 Min. wieder auf. Am anderen Morgen tot gefunden Schwerste Symptome, tot nach 10 Min.
0,04	T 174	200	

B. Albumin-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gewicht in g	
0,015	T 180	210	Ueberlebt Fällt sofort um, tot nach 3 Stdn. Keine Lungenblähung. Springt, laut schreiend, fällt nach 3 Min. um. Tot in 15 Min.
0,02	T 181	200	
0,03	T 176	220	

Es ergibt sich, daß die mit Albumin vorher digerierte Kaolinquote giftiger ist als die mit Globulin behandelte.

Das Serum läßt sich durch andere Eiweißkörper ersetzen, z. B. Eiereiweiß.

Giftigkeit des Eiereiweiß-Kaolins.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gew. in g	
0,01	W 482	200	Leicht erkrankt, Krämpfe, überlebt
0,02	W 484	200	dgl.
0,03	W 483	210	dgl.
0,04	W 470	250	Fällt nach 10 Min. um, Krämpfe, steht wieder auf. Morgens tot gefunden
0,05	W 468	230	Fällt sofort um, Dyspnoe, Krämpfe, tot nach 20 Min.

Giftigkeit des Kochsalz-Kaolins.

0,01	W 453	200	Ueberlebt
0,015	W 444	230	Tot nach 50 Min.
0,02	W 429	210	Tot in 5 Min.

Auch Agar-Agar entgiftet, ebenso wie das für die hämolytische Wirkung bereits von Friedberger und Kumagai festgestellt war.

1 g Kaolin wird mit 10 ccm 0,2-proz. Agarlösung dreimal je 1 Stunde bei 42° digeriert, dann mit heißer Kochsalzlösung gewaschen und wie früher behandelt.

Giftigkeit des Agar-Kaolins.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gew. in g	
0,02	T 93	190	Schwer krank, aber bald erholt
0,03	T 103	175	dgl., fällt nach 35 Min. um, tot
0,04	T 90	200	Fällt sofort um, schwer erkrankt, tot nach 45 Min.
0,05	T 99	190	Sofort sehr schwer krank, tot nach 2 Min.

Untertödliche Dosen des Kaolins bedingen einen Temperatursturz (Sachs und Ritz); auch dieser wird durch vorherige Digerierung mit Serum in Uebereinstimmung mit Sachs und Ritz aufgehoben, wie das die folgende Tabelle zeigt.

Kochsalz-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Temp. vor Injektion	Temperatur nach Injektion in:			
	No.	Gew. in g		15'	30'	60'	90'
0,005	81	210	37,3	34,7	36,2	36,8	37,0
0,008	80	210	37,1	34,6	35,7	35,9	36,4
0,01	82	210	37,0	33,3	33,8	35,0	35,0

Serum-Kaolin.

Dosis	Meerschweinchen		Temp. vor Injektion	Temperatur nach Injektion in:			
	No.	Gew. in g		15'	30'	60'	90'
0,005	75	210	37,8	37,5	37,6	37,8	37,8
0,008	73	220	37,4	36,5	37,5	37,4	37,5
0,01	74	230	37,7	35,0	36,9	37,3	37,5
0,015	78	220	36,7	36,0	37,0	37,3	37,1
0,02	79	220	36,8	35,2	36,8	37,2	37,0
0,03	77	220	37,3	33,0	33,3	34,7	34,7

Kleinere Kaolindosen bedingen Fieber. Auch diese Fieberwirkung wird durch Serum beeinflusst.

Dosen von Kaolin, die im Kochsalz die Temperatur konstant lassen, bedingen im Serum Fieber.

10. XI. Serum-Kaolin.

Meerschw.		Dosis	Vor d. Injekt.	Nach der Injektion in:							
No.	Gew. in g			1/2 ^h	1 ^h	1 1/2 ^h	2 ^h	2 1/2 ^h	3 ^h	5 ^h	
215	200	0,001	38,6	38,4	39,0	38,9	38,8	38,8	38,8	38,5	—
216	200	0,001	37,9	38,5	38,8	38,5	38,6	38,4	38,2	38,4	—
207	200	0,002	38,1	38,2	38,5	39,5	38,4	38,6	38,4	38,3	—
208	220	0,002	38,7	39,2	38,0	40,0	39,7	39,7	39,3	39,2	—
209	200	0,003	37,5	38,6	39,4	39,1	39,1	39,1	38,3	38,4	—
210	200	0,003	38,0	39,2	39,0	39,8	39,7	39,5	39,2	38,7	—
211	200	0,004	38,0	38,9	39,0	40,2	39,6	39,5	38,7	38,8	—
217	200	0,005	37,0	37,5	38,0	38,4	38,8	39,0	39,4	38,9	—

1 g Kaolin wurde mit je 5 ccm Meerschweinchenserum 3mal bei 37° C digestiert, dann vorsichtig gewaschen.

NaCl-Kaolin.

Meerschw.		Dosis	Vor d. Injekt.	Nach der Injektion in:							
No.	Gew. in g			1/2 ^h	1 ^h	1 1/2 ^h	2 ^h	2 1/2 ^h	3 ^h	5 ^h	
212	200	0,001	37,8	38,5	39,0	39,8	39,9	39,2	38,8	38,2	—
213	180	0,002	37,0	37,6	38,5	39,0	38,8	38,4	38,0	38,8	—
218	200	0,003	38,2	38,4	38,5	38,7	38,2	38,2	38,3	38,5	—
219	200	0,004	38,3	38,7	38,7	39,0	38,8	39,0	38,8	38,3	—
220	190	0,005	37,5	36,6	37,0	38,0	38,2	38,1	38,1	38,1	—

1 g Kaolin wurde mit NaCl-Lösung ganz genau so wie Serum-Kaolin behandelt.

In analoger Weise wie das Kaolin wird auch das Bariumsulfat, das an sich bedeutend weniger giftig ist, durch Serum entgiftet. Zu diesem Versuch wurde Hammelserum benutzt.

1 g Bariumsulfat wurde mit 5 ccm Serum zweimal je 1 Stunde bei 37° digeriert. Die Behandlung war im übrigen die gleiche, wie in den früheren Versuchen. Die Toxizität des so behandelten Bariumsulfats und der Bariumsulfat-Kochsalzkontrolle zeigt die folgende Tabelle.

Giftigkeit von Bariumsulfat.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gew. in g	
0,05	178	240	Erkrankt gar nicht
0,1	175	230	dgl.
0,2	190	240	Atemnot, Krämpfe, tot nach 2 Min.

Toxizität von mit Serum behandelten Bariumsulfat.

Dosis	Meerschweinchen		Resultat
	No.	Gew. in g	
0,2	185	200	Fällt sofort um, setzt sich jedoch bald wieder auf
0,3	193	200	Leicht krank, bald erholt
0,4	194	220	Sofort Dyspnoe, Krämpfe, tot nach 3 Min.

Zusammenfassung.

1) Kaolin und andere Suspensionskolloide entfalten im tierischen Organismus eine intensive Giftwirkung.

2) Die Giftigkeit des Kaolins beruht nicht auf der Beimengung sekundärer löslicher Substanzen.

3) Die Giftwirkung des Kaolins ist nicht mechanisch zu erklären; sie dürfte darauf beruhen, daß in vivo eine Absorption gewisser Bestandteile lebenswichtiger Zellen statt hat (Analogie der Wirkung, mit der des Kaolins in vitro bei der Hämolyse).

4) Entsprechend diesem Wirkungsmechanismus wird die toxische Wirkung des Kaolins durch Vorbehandlung mit Serum,

Eiereiweiß, Agar usw. bedeutend abgeschwächt. Zwischen aktivem und inaktivem Serum besteht bezüglich der Wirkung auf das Kaolin kein wesentlicher Unterschied. Von den Serumfraktionen wirkt das Globulin stärker entgiftend als das Albumin.

5) In analoger Weise, wie das Kaolin, wird auch Barium-sulfat durch Serum entgiftet.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Universität Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth) und aus der Universitäts-Augenklinik No. I zu Budapest (Direktor: Hofrat Prof. Dr. Emil von Grósz).]

Ueber die Grundlagen der anaphylaktischen Theorie der sympathischen Ophthalmie.

Erwiderung.

Von Dr. **Andreas Rados**,
Assistent der Klinik.

In Bd. 19, Heft 5 dieser Zeitschrift hatte ich¹⁾ Untersuchungen über Organspezifität der Isoantikörper nach intravenöser und subkutaner Vorbehandlung mit arteigenen Uvea-, Hornhaut bzw. Nierenaufschwemmungen bei Kaninchen veröffentlicht, die Elsch nig²⁾ zu einer längeren Diskussion Anlaß gegeben haben.

Bekanntlich hat Elschnig, eine Hypothese von Bail verfolgend, in mehreren Arbeiten den Standpunkt vertreten, daß nach Vorbehandlung mit Uvealeiweiß bzw. chemisch reinem Pigment bei Kaninchen sich Antikörper erzeugen lassen, welche auf Aderhaut eingestellt sind. Die Spezifität der Uveaantikörper muß natürlich eine Bedingung sein, wenn man mit deren Hilfe die Ophthalmia sympathica erklären will. Wenn diese

1) Rados, Ueber das Auftreten von komplementbindenden Antikörpern nach Vorbehandlung mit arteigenen Gewebezellen nebst Bemerkungen über die anaphylaktische Entstehung der sympathischen Ophthalmie.

2) Elschnig, Ueber die Grundlagen der anaphylaktischen Theorie der sympathischen Ophthalmie. Diese Zeitschr., Bd. 20, Heft 3.

Isoantikörper keine Organspezifität besitzen, wird wohl dadurch sehr fraglich, wie und mit welchem Rechte man diese zur Erklärung der Ophthalmia sympathica überhaupt heranziehen kann?

Elschnig schreibt in seiner Bemerkung: „Rados hat meine Untersuchungen nur insoweit nachgeprüft, als er Kaninchen mit arteigener und artfremder Uvealemulsion immunisiert hat etc.“ Diesbezüglich muß ich bemerken, daß sämtliche Tiere mit arteigenem Material vorbehandelt wurden, was außer in der Uebersicht der Tabellen auch auf p. 586 meiner Arbeit hervorgehoben ist. „Die Resultate der Tierexperimente dürfen nicht ohne weiteres auf die menschliche Pathologie übertragen werden. Mit besonderer Vorsicht dürften wohl die mit artfremdem Material erhaltenen Resultate für die menschliche Pathologie verwertet werden.“ Darum haben wir eben alle Versuche mit arteigenen Organextrakten angestellt. Auf diesen Punkt habe ich darum besonders mein Augenmerk gerichtet, weil die Resultate der Elschnigschen Untersuchungen sich hauptsächlich aus mit artfremdem Material immunisierten Tieren ergeben haben, besonders die unter Elschnigs Leitung von Kraupa ausgeführten Versuche, zu welchen Elschnig ein Vorwort geschrieben und hervorgehoben hatte, daß die Keratitis parenchymatose durch die Organspezifität der Hornhautantikörper ähnlicherweise auf anaphylaktischen Grundlagen erklärt werden könne wie die Ophthalmia sympathica.

Schon in meiner Arbeit habe ich bezüglich der Arbeit von Kraupa angeführt: „Nur in einem Falle wurden Komplementbindungsversuche angestellt, wo das Immunserum durch Vorbehandlung mit artgleichen Hornhäuten hergestellt wurde; das Serum ergab aber auch mit Hornhaut keine vollständige Hemmung der Hämolyse.“ Uebrigens hat Kraupa bei artfremdem Material auch mit Leberkontrollen eine vollständige Hemmung erzielt, welche nur darum nicht genügend berücksichtigt wurden, weil Leber auch mit normalen Seris eine Hemmung verursachen kann.

Nach Elschnig besteht kein vollständig diametraler Gegensatz zwischen unseren Ergebnissen, und er erwähnt, daß er in der Zusammenfassung des zweiten Teiles seiner Arbeit¹⁾ selbst gesagt hatte (p. 546), daß den Isoantikörpern „keine Artspezifität, wohl aber eine gewisse Organspezifität zukommt“. Die These der Organspezifität dominiert aber in allen Arbeiten Elschnigs. So z. B. am ersten Blatte des dritten Teiles (Graefes Arch. f. Ophthalmologie, Bd. 78, Heft 3, p. 549) rekapituliert er die Ergebnisse des zweiten Teiles und sagt: „Ich konnte nachweisen, daß Uvealemulsion (Uvea und Pigmentepithel), parenteral in den Tierkörper eingebracht, antigen wirkt; die Uvea besitzt ‚ausgesprochene‘ Organspezifität, nicht Artspezifität; der wirksame Bestandteil ist wahrscheinlich das Pigment.“

Weiterhin kann es nur in obigem Sinne erklärt werden, daß Elschnig (Graefes Arch. f. Ophthalmologie, Bd. 76, II. Teil, p. 531)

1) Graefes Arch. f. Ophthalmie, Bd. 76, 1910.

in seiner Arbeit hervorhebt: „Wenn ich die ausführliche Darstellung dieser Frage (Organantikörper) durch Fleischmann und Davidson verfolge, so läßt sich das bisherige Ergebnis der einschlägigen Forschungen am besten mit den Worten der genannten Autoren zusammenfassen:

Organzellen erzeugen, in den Tierkörper injiziert, Organzellantikörper, nicht streng organspezifischer Natur, aber keine Serumantikörper.“

Fleischmann und Davidson sagen aber in der Zusammenfassung ihrer Arbeit, wie ich auf p. 584 meiner Arbeit schon zitiert habe:

„Organzellen erzeugen, in den Tierkörper injiziert, Organzellantikörper nicht organspezifischer und nicht streng artspezifischer Natur, aber keine Serumantikörper (Präzipitine).“

Aus meinen Tabellen ist ersichtlich, daß die betreffenden Kaninchen-Aderhautantisera und ebenso die Kaninchen-Hornhaut, bzw. Nierenantisera auch mit anderen, nicht nur mit dem zur Immunisierung verwendeten Antigenen eine vollständige Hemmung der Hämolyse verursachten. Elschmig zitiert aus meiner Arbeit die Tabellen I, II und III, wo bei Aderhautantisera Aderhaut als Antigen schon in geringeren Mengen die Hemmung der Hämolyse verursachte, als Hornhaut und Nierenantigen bei annähernd gleicher Versuchsanordnung, und versucht weiterhin meine Resultate wegen angeblich ungenauer Austitrierung zu entkräften.

Ich glaube, daß in meinen Versuchen die in jedem Kaninchenserum für Hammelblut vorhandenen normalen Hämolyse überhaupt keine Verwirrung verursachen konnten, was aus den folgenden Auseinandersetzungen ja auch ersichtlich wird.

In meinen Untersuchungen spielte der Umstand die Hauptrolle, daß die nicht zur Immunisierung verwendeten Kontrollantigene auch zu einer vollständigen Hemmung der Hämolyse führten. Es war nicht eine Lösung, sondern eine Hemmung der Hämolyse vorhanden. Eine vorhergehende Ausschaltung der normalen Hämolyse für Hammelblut könnte nur zur Folge haben, daß eventuell die Kontrollantigene auch in kleineren Mengen eine Hemmung, und nicht eine Lyse verursachen. Es ist ja möglich, daß so einige positive Resultate verloren gegangen sind, aber keinesfalls ist es möglich, daß dadurch ein positives Ergebnis, d. h. eine irrtümliche Hemmung statt einer Hämolyse vorgetäuscht worden ist.

Elschnig hat in seiner Bemerkung überhaupt nicht die Tabelle No. X meiner Arbeit berücksichtigt, obgleich diese wichtige Angaben enthält. In diesen Untersuchungen wurden alle Immunsera geprüft, ob sie mit der arteigenen Linse — die nach den Untersuchungen von Uhlenhuth ausgesprochen organspezifisch wirkt — eine Hemmung der Hämolyse verursachen können. Die verschiedenen Sera zeigten das gleiche Verhalten. Die Linsenaufschwemmung als Antigen ergab in größeren Mengen „regelmäßig eine allerdings unvollständige Lösung der Hammelblutkörperchen“.

Eben darum glaube ich das Verhalten der Aderhaut biologisch nicht mit dem Verhalten der Linse identifizieren zu können, sondern den übrigen nicht organspezifischen Antikörper bildenden Organen gleich stellen zu müssen.

Ich habe bezüglich der K ü m m e l l s c h e n Ergebnisse nicht behauptet, daß diese gegen die E l s c h n i g s c h e Theorie sprechen, sondern betont, daß die Zuverlässigkeit der Epiphaninreaktion noch nicht als endgültig erledigt angesehen werden kann, und daß die Ergebnisse von K ü m m e l l nicht im Sinne der E l s c h n i g s c h e n Theorie zu verwerten sind. K ü m m e l l berichtet ja in seiner zweiten Mitteilung, daß die Reaktion im Durchschnitt in 30 Proz. der Fälle (bei sympathischer und nicht sympathischer Entzündung) positiv ausfiel, wobei ich noch die Rolle der zellulären Anaphylaxie hervorhob.

Bezüglich der Papilloretinitis und Atrophia nervi optici sympathica schrieb ich: „E l s c h n i g versucht trotzdem alle Fälle und Modifikationen der sympathischen Ophthalmie mit Hilfe seiner Anschauung zu erklären“, worunter ich selbstredend die sympathische Entzündung nach Chorioidealtumoren etc. verstanden habe, was auch aus den folgenden Zeilen ersichtlich war „und bezweifelt das Vorhandensein einer Papilloretinitis und gleichfalls Atrophie nervi optici sympathica. Diese von verschiedenen Autoren beschriebene Form der sympathischen Ophthalmie läßt sich auch mit der E l s c h n i g s c h e n Anschauung nicht erklären, und so könnten die sympathischen Entzündungen auf keiner einheitlichen Aetiologie beruhen“. Diese Worte entsprechen vollständig dem, was E l s c h n i g in seiner 6. Mitteilung sagt (Gräfes Arch. f. Ophthalm., Bd. 81, p. 363). „Ein vollgültiger Beweis scheint mir aber für das Vorhandensein (einer Papilloretinitis sympathica), wie schon oben wiederholt gesagt, hierfür nicht vorzuliegen“. Er schreibt später, daß diese Art der Erkrankung mit seinen Ansichten nicht in Einklang zu bringen ist, weil nach M o r g u l i é s „eine Organspezifität, oder überhaupt Antigenwirkung von parenteral eingeleiteter Gehirnsubstanz im Kaninchen nicht nachweisbar ist.“ Ueber das Vorhandensein der Papilloretinitis sympathica muß aber hervorgehoben werden, daß I m r e ¹⁾ jr. in seiner Statistik (das Material der Klinik) unter 109 Fällen 11 gefunden hatte, die mit voller Sicherheit in dieser Form auftraten.

Endlich sei es mir gestattet zu bemerken, daß ich die Dialysierversuche absichtlich nicht angeführt habe, obzwar diese mir schon darum nicht „noch unbekannt“ sein können, weil Versuche in dieser Richtung von mir gemeinschaftlich mit M. G e l e n c s é r längst angestellt worden sind. Die diesbezüglichen Resultate sind aber zurzeit noch nicht genügend zu überblicken, und weiterhin können meines Erachtens auch die mit der A b d e r h a l d e n s c h e n Methodik nachweisbaren proteolytischen

1) Imre jr., Die sympathische Ophthalmie, Szemészet, 1913 (ungarisch).

Fermente nicht ohne weiteres mit den Isoantikörpern zusammen behandelt werden.

Die Frage der Isoantikörper bedarf noch jedenfalls weitere Bearbeitung. Aber auch aus diesen Zeilen geht es hervor, daß die Isoantikörper nach parenteraler Einverleibung von Aderhaut, bzw. Hornhaut kein organspezifisches Verhalten zeigen.

Eben darum muß es wiederholt werden, was ich in der Zusammenfassung meiner Arbeit bereits gesagt habe, daß die nach Immunisierung mit arteigenen Aderhaut-, Hornhaut- und Nierenaufschwemmungen gebildeten Isoantikörper weder art-, noch organspezifisch sind.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XX. No. 5.

Nachdruck verboten.

[Research Laboratory, Parke, Davis & Co., Detroit, Michigan.]

Numerical Variations of the White Blood Cells in Mice Inoculated with Transplantable Adenocarcinoma.

By **F. W. Baeslack, M. A., M. D.**

With 19 figures in text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 27. Oktober 1913.)

The exchange of metabolic products within the organism is to a large extent affected by the blood and lymph, so that both may be looked upon as the transmitters of ferments and their products from tissue to tissue, and any changes from the usually prevailing conditions have in turn their influence upon the cells of the blood, so that, from the picture which the blood presents, we are able to gauge the course of certain diseases.

Many of the acute infectious diseases, as well as those which have severe chronic disturbances of nutrition and metabolism in common, have their influence upon the blood. Thus every process of infection and intoxication is to a certain degree a picture of the destruction of the white cells, peculiar to that process. This destruction is in proportion to the severity of the infection or intoxication; to the specific action of the infecting or intoxicating agent on the blood, and blood forming organs; and to the resistance of the organism.

The observation that the number of the white blood corpuscles was frequently increased in cancer has been made by numerous observers. Andrae (1) was perhaps the first who recognized the leucocytes in the abnormally increased number of cells. The findings of Andrae were confirmed by Vidal (2) and a number of other French observers. More detailed observations on this subject were made by Lücke (3) who concluded that this increase in the number of leucocytes in cancer was a sign that the disease had become general and involved the entire body. Neubert (4) was unable to find any cardinal changes in the number of leucocytes. He noted, however, that the numerical relationship between the mononuclear and polynuclear forms of white blood cells had been shifted in favor of the polynuclear cells. Very exact data concerning the occurrence of leucocytosis in cancer are found in the observations of Hayem and Alexander (5). These authors noted that not all cases of

carcinoma and sarcoma of various organs were accompanied by a leucocytosis. In ten of the fourteen cases of Scirrhus growths, and in five out of twelve cases of cancer of the stomach a leucocytosis was observed. The relationship which possibly exists between the seat of the tumor and its histological structure is not considered by them. Schneider (6) cites twelve cases of cancer of the stomach, in all of which leucocytosis was present, while Laache (7) was unable to find any in the five cases he reported. In a series of forty-six cases of cancer of the stomach cited by Cabot (8), fifteen showed leucocytosis and thirty-one showed none. "In some of the cases the counts were verified by repeated examinations, while in others only a single count, that made when the patient entered the hospital was recorded." An equal divergence of opinion exists in regard to the leucocyte count in cases where the malignant new growth involved other organs. Thus Hayem was unable to note an increase in the number of leucocytes in 6 cases of cancer of the uterus, whereas Rieder found 30 800 in a single case and Cabot cited three cases each showing distinct leucocytosis. One may conclude from these reports that leucocytosis is the rule in carcinoma, but that there are many exceptions, and that the leucocytosis is in proportion to the malignancy, to the rapidity and the extent of the growth of the tumor. Factors which govern the degree of leucocytosis seem to be the position of the tumor, the resistance of the individual, the daily variations in the growth of the tumor as well as the liberation of the metabolic products from it, which carried by the blood stream may influence the blood forming organs.

The location of the tumor determines to a considerable degree the facility with which the products of metabolism of the cancer cell enter the blood or lymph stream. Enzymes, liberated through the breaking down of the tumor cells find their way into the circulation and stimulate the formation of other ferments in the organism. While cancer tends to increase in size, invading the surrounding tissues, its rate of growth is not uniform, periods of slow and rapid growth alternate with periods during which growth seems to be entirely arrested, or we may even note retrogression of the tumor in certain parts with rapid development in others at the same time. Furthermore, on account of the abnormal metabolism of the cancer cell, products of this metabolic action are discharged into the blood, which may to a large extent cause an increase in certain white blood cells. This possibility has been advanced by Meltzer (9) who observed that there is a difference in the ferment between the leucocytes and the lymphocytes, since the one acts in alkaline, the

other in acid media, and that there might be some definite relation between certain conditions of acidity and lymphocytosis.

In the histological study of retrograding tumors in mice (10) one is impressed by the large amount of round cell infiltration at the margin of the tumor and along the strands of actively proliferating connective tissue, which may be observed dipping into the tumor undergoing retrogression. This preponderance of small round cells about the margin of such tumors has also been observed by von Hanseman, Wisnieski and recently again by Da Fano (11) who points out that the development of tumor immunity is coincident with a general reaction of the connective tissue throughout the organism. The polynuclear leucocytes appear first at the place of the implanted tumor, where under aseptic conditions, without showing phagocytic activity, they undergo degeneration. The lymphocytes then appear in large numbers around the inoculated tumor to diminish again gradually after immunity is established. That the leucocytes seem to be in a close relationship to the development of tumor immunity is, furthermore, shown by the fact that the inoculation of dead tumor cells is followed neither by this round cell infiltration nor by the development of tumor immunity.

To determine whether the growing or retrograding neoplasm had any influence on the ratio of the white blood cells, total as well as differential counts were made in mice inoculated with transplantable tumors, and on two spontaneous tumor mice found among our own stock in the course of these experiments. A total as well as differential blood count was made on each mouse before inoculation. The blood for the succeeding daily differential counts was taken each morning, and was obtained by cutting off a small portion of the tail of the animal. The second or third drop of blood was used for making the blood smear. The wound was sealed by a cautery to prevent infection. The smears were stained with the Wright's modification of Jenner's stain. In the early experiments 500 cells were counted from each preparation, later 200 cells. The cells counted were the polymorphonuclear leucocytes, small mononuclear lymphocytes, large lymphocytes and eosinophiles. The counts from day to day were tabulated and the percentages of the polymorphonuclear leucocytes and small lymphocytes were plotted. The large lymphocytes and eosinophiles were not included in the charts to avoid making them too complicated.

The number of mice used in the individual experiments was small, because a small number of animals could be kept under better observation, and it was thought best to allow a long period of time for this work, so that the effect of the variation in the virulence of the tumor might be noted. In all about 50 mice served as a basis for these experiments which extend over the period of one year. The tumors used for transplantation were tested in each instance for sterility by means of smears and cultures, as were also a large number of tumors of these mice at the time of their death, for the purpose of excluding any error of variation in the blood counts due to terminal infection. The tumors were charted every other day to note any change in their size and rate of growth.

From the experiments forming the basis for this communication, the records of four have been selected as representative of the possible fate of the transplanted tumor material. In the first experiment we have a non-take, in the second a rapid tumor development following inoculation, in the third are brought out spontaneous retrogression, while the fourth experiment permits of comparing the changes of the differential blood count with the actual blood counts on the dates indicated.

The differential blood counts done on the spontaneous tumor mice do not vary from those observed in inoculated mice.

Experiment I. Serial No. 22. May 17, 1911.

Mouse tumors 20 F and G employed for inoculation. Weight of mice 16.5 gr. and 17.5 gr. respectively. Weight of tumors 1.1 gr. and 2.1 gr. respectively. Age of tumors (time elapsed from date of inoculation to May 17th), 9 days.

Ratio of tumor to salt solution 1:3, dose 0.5 ccm.

Two mice were inoculated and were kept under observation from May 17th until June 17h, 1911. No tumor developed, although the lot from which these tumors were taken gave a yield of 77 %.

Both charts exhibit a fall of the small mononuclear lymphocytes and a rise of the polymorphonuclear leucocytes. This fall in the number of the mononuclear lymphocytes is noticeable at once, following the inoculation, and the divergence in the qualitative ratio of these two blood constituents increases from 10—13 days after inoculation to be followed by

a rise in the small lymphocytes and a drop in the polymorphonuclear leucocytes. The length of time required for the absorption of the inoculated tumor material is about the same, while the rate of absorption is not uniform, as appears

Fig. 1.

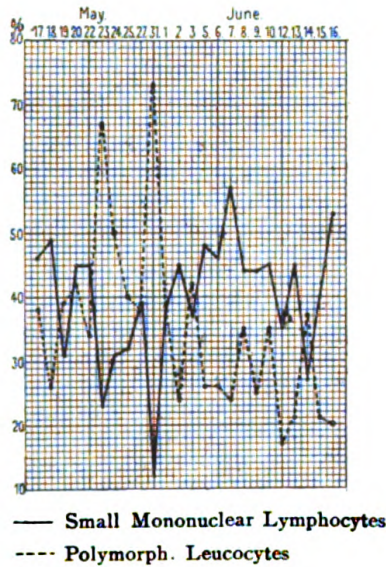
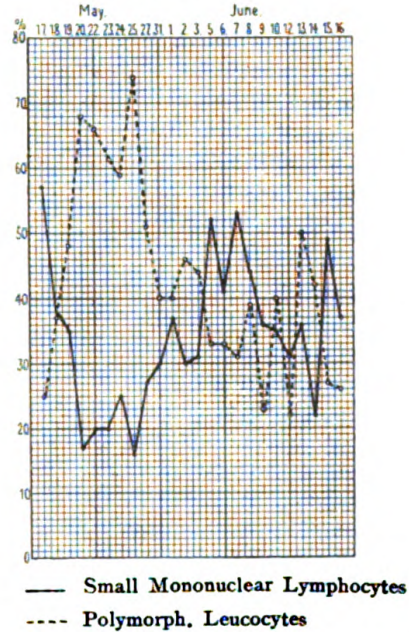


Fig. 2.



in the chart of 22 A from May 23rd to 31; and from May 20th to 25th in the chart of mouse 22 B. The mice happened to be immune to this strain of tumor, for no tumor developed after reinoculation on June 18th.

Experiment II. Serial No. 38. June 27, 1911. (See Plate I p. 429.)

Mouse tumor 32 D employed for inoculation. Weight of mouse 28.5 gr. Weight of tumor 5.6 gr. Age of tumor (time elapsed from date of inoculation to June 27th, 1911), 25 days.

Ratio of tumor to salt solution 1:3; dose 0.5 ccm.

Three mice were inoculated.

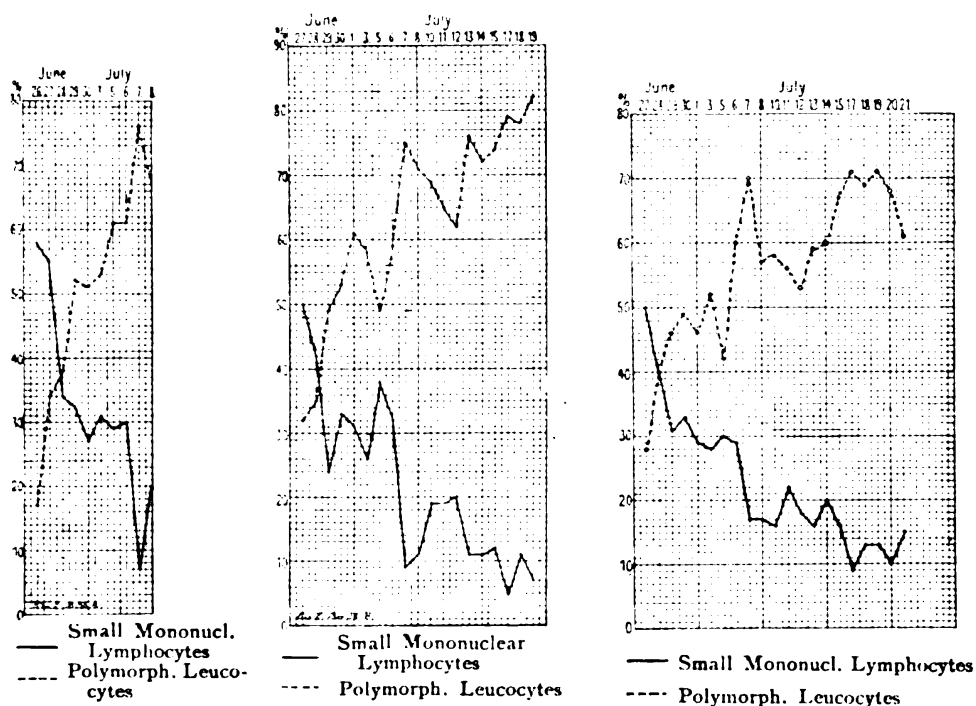
Letter	Died	Weight of		Remarks
		Animal	Tumor	
A	7/10/11	22.0	.	Large tumor; about 8.0 gr.
21.0 gr.				
B	7/20/11	26.1	8.55	
21.0 gr.				.
C	7/22/11	25.6	8.61	.
24.0 gr.				

As appears from the above records, all three mice developed large tumors which grew very rapidly, killing the mice in 13, 23 and 25 days respectively. Mouse A was decomposed, so that it was impossible to perform an autopsy. Mice B and C were autopsied and cultures were made from the tumor and liver on agar agar and bouillon which were sterile after 24 hours' incubation.

Fig. 3.

Fig. 4.

Fig. 5.



As in charts 1 and 2, the above charts exhibit the same decrease in the mononuclear lymphocytes and the increase in the polymorphonuclear leucocytes following the inoculation. However, the lines continue to diverge as the tumor cells injected begin to multiply, giving rise to a tumor weighing at least eight grams in each of the three mice inoculated. That the decrease in the small mononuclear lymphocytes is not relative, but actual appears from the blood count made on mouse C the day before it died. The total number of red cells had fallen from 10440000 the day before inoculation to 2528000; and the total number of white blood cells had risen

from 14500 to 24920. The number of polymorphonuclear leucocytes the day before the inoculation was 123 out of 438 cells counted, or 28.08 % and that of the small lymphocytes was 220, or 50.22 %; while the day before the animal died the number of polymorphonuclear leucocytes was 327 out of 532 cells counted, or 61.46 %, and that of the small lymphocytes was 83 or 15.6 %. For the charting of the tumors see Plate I p. 429.

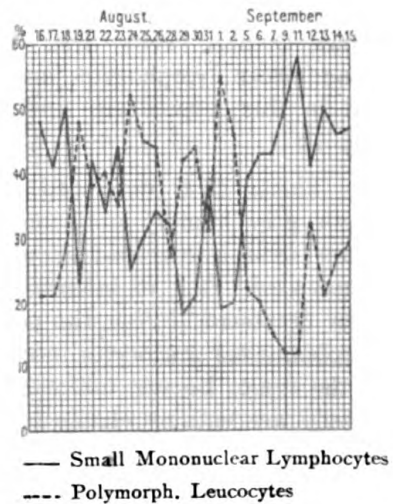
Experiment III. Serial No. 49. August 17, 1911.
(See Plate II p. 429.)

Mouse tumor employed: 41 B. Weight of mouse: 25.0 gr. Weight of tumor: 4.0 gr.
Age of tumor from inoculation to death: 31 days.
Ratio of tumor to salt solution 1 : 3. Dose: 0.5 ccm.

Letter	Died	Weight of		Remarks
		Animal	Tumor	
A 25 gr.	.	.	.	Last charting 11/14/11. Tumor was absorbed. Released 11/14/11.
B 23.0 gr.	10/21/11	22.0	7.3	.
C 26.0 gr.	.	.	.	Recovered. Released 11/14/11.
D 18.0 gr.	9/9/11	19.0	6.0	.

As pointed out in the two preceding experiments, there is an initial rise in the number of polymorphonuclear leucocytes and a fall in the small mononuclear lymphocytes following the inoculation. Mouse 49 A did not develop a tumor. The injected tissue was entirely absorbed September 9th; 19 days after inoculation. The charting of the blood findings of this animal shows a decided increase of the small mononuclear

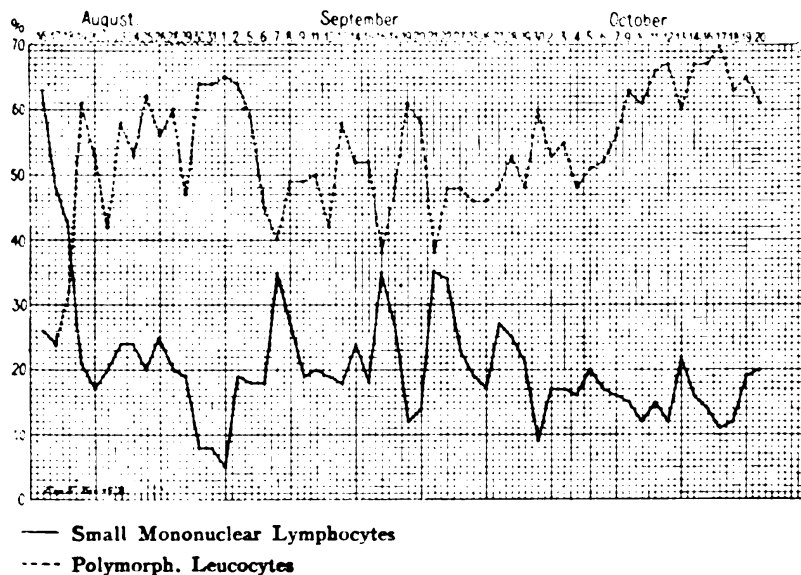
Fig. 6.



lymphocytes with a corresponding decrease of the polymorphonuclear leucocytes. (See Fig. 6.)

Mouse 49 B was under observation from August fifteenth until October twentieth. On September the fifth, there is was notable fall in the number of polymorphonuclear leucocytes and a rise in the number of small mononuclear lymphocytes. This relationship between the two classes of blood cells continued until September twenty-third, after which there was a constant divergence in the numerical ratio of these cells. The charting of this tumor shows that it diminished in size during this period and that it increased after September twenty-seventh until it caused the death of the

Fig. 7.



animal October twenty-first. The lines representing the ratio of the small mononuclear lymphocytes and the polymorphonuclear leucocytes diverge and in this respect are similar to those of Exp. II, Figs. 1, 2, 3. (See Fig. 7.)

Mouse 49 C developed a tumor five days after inoculation. This tumor grew rapidly until on August 30 it weighed about 4.0 gr. The tumor then retrograded spontaneously, and on Sept. 12 it had entirely disappeared. It is of interest to note that the small mononuclear lymphocytes decreased during the period of active tumor growth while the polymorphonuclear leucocytes increased and that shortly before the retrogression of the tumor became noticeable the relationship between these two classes of cells was entirely changed. (See Fig. 8 p. 430.)

Mouse 49 D developed a tumor which grew uninterruptedly until it caused the death of the animal 31 days after inoculation. The chart of

Experiment II. Ser. 38.

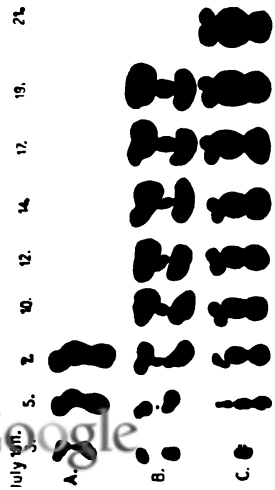


Plate I.

Experiment III. Ser. 49.

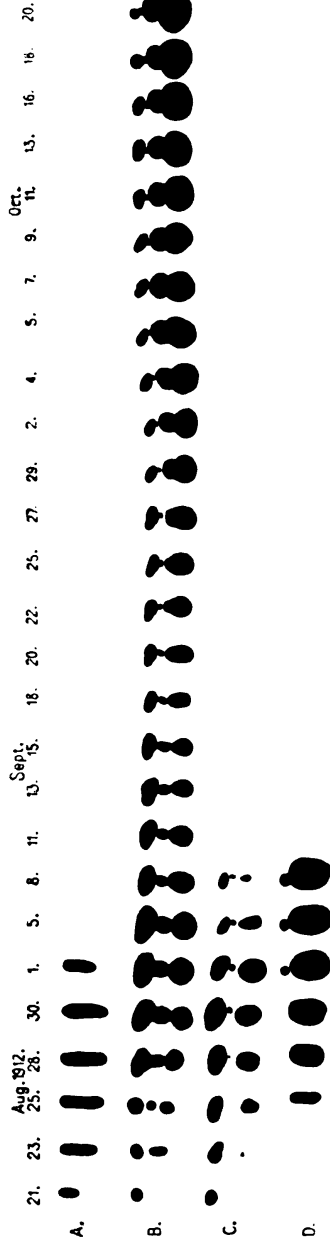


Plate II.

Experiment IV. Ser. 72.



Plate III.

the variation of the two classes of blood cells is very much like those of Exp. I, Fig. 1 and 2. (See Fig. 9.)

Fig. 8.

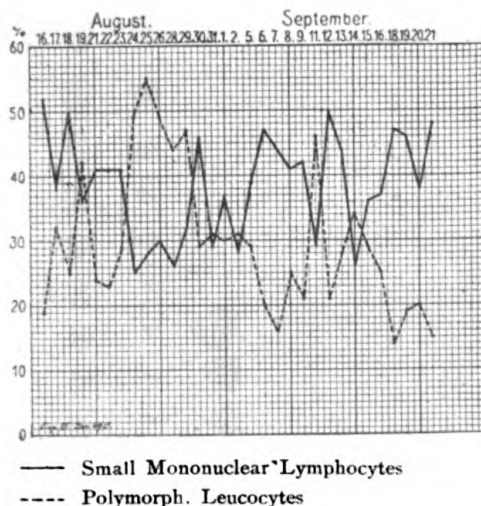
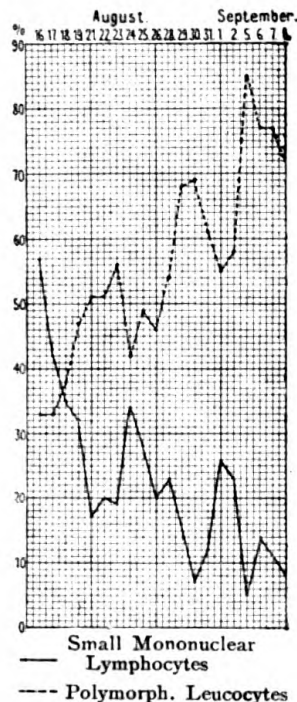


Fig. 9.



Experiment IV. Serial No. 72. December 4, 1912.
(See Plate III p. 429.)

Mouse tumor employed 70 E. Weight of mouse 23.5 gr. Weight of tumor 2.0 gr.

Ratio of tumor to salt solution 1:2. Dose 0.5 c. c.

Cultures made from the tumor, liver and spleen of this mouse were sterile. 5 micc were inoculated from this tumor.

Letter	Died	Killed	Weight of		Remarks
			Animal	Tumor	
A ♀ 23.0 gr.	.	1/3/12.	30.0	13.0	9.0 gr. of this tumor had grown by infiltration into the abdominal cavity. This tumor involved the right kidney and the muscles of the back. Culture from tumor sterile.
B ♂ 17.2 gr.	12/30/11.	.	24.0	8.5	The tumor at the root of the tail had broken through 12/26 13. The death of this mouse may have been due to intercurrent infection. Cultures from tumor not sterile.

Letter	Died	Killed	Weight of		Remarks
			Animal	Tumor	
C ♀ 23.8 gr.	2/3/12.	.	23.0	7.0	Culture from tumor sterile.
D ♀ 22.9 gr.	2/23/12.	.	23.5	5.5	Culture from tumor sterile.
E ♂ 20.0 gr.	3/1/12.	.	30.0	12.5	This mouse drowned in the drinking cup. Cultures from tumor sterile.

In the course of these experiments the question arose whether the variations observed in the differential blood counts of the white cells might not be relative only. To determine this, total blood counts were made about every five days. The blood counts in the animals developing cancer showed an actual decrease in the red cells and an increase of the white cells. Judging from the results of these counts the leucocytosis is actual. The following table gives the blood counts of Exp. IV, Serial No. 72, and may serve as an illustration of the blood findings in the other experiments.

Exp. IV. Serial No. 72.

Date	72 A.		72 B.		72 C.		72 D.	
	Reds	Whites	Reds	Whites	Reds	Whites	Reds	Whites
12/4/11.	10 150 000	12 000	9 600 000	10 000	11 700 000	11 000	10 800 000	9 000
12/9/11.	10 380 000	16 000	10 800 000	13 000	11 100 000	10 000	10 280 000	10 000
12/12/11.	10 190 000	19 000	9 400 000	19 000	11 500 000	11 000	10 100 000	12 000
12/16/11.	8 300 000	17 000	6 100 000	16 000	9 800 000	12 000	10 190 000	16 000
12/21/11.	7 600 000	20 000	4 560 000	19 000	7 300 000	17 000	8 100 000	15 000
12/27/11.	5 900 000	21 000	4 360 000	22 000	8 600 000	15 000	8 300 000	14 000
12/30/11.	4 470 000	23 000	.	.	8 400 000	18 000	8 320 000	17 000
1/2/12.	7 120 000	19 000	7 600 000	16 000
1/5/12.	7 370 000	19 000	6 260 000	17 000
1/11/12.	5 940 000	21 000	6 000 000	18 000
1/16/12.	8 670 000	22 000	7 500 000	18 000
1/20/12.	7 150 000	23 000	7 400 000	20 000
1/25/12.	5 290 000	24 000	6 600 000	21 000
1/31/12.	4 470 000	25 000	5 390 000	20 000
2/2/12.	2 500 000	27 000	4 780 000	22 000
2/7/12.	2 300 000	21 000
2/13/12.	3 200 000	23 000
2/19/12.	3 800 000	23 000

The polymorphonuclear leucocytes and mononuclear lymphocytes showed the following percentage variations on the days complete counts were made on four of the mice of Experiment IV.

Date	Exp. IV. 72 A.			72 B.			72 C.			72 D.		
	Total No. of white blood cells	% of poly-morphonuclear leucocytes	% of small mononuclear lymphocytes	Total No. of white blood cells	% of poly-morphonuclear lymphocytes	% of small mononuclear lymphocytes	Total No. of white blood cells	% of poly-morphonuclear leucocytes	% of small mononuclear lymphocytes	Total of white blood cells	% of poly-morphonuclear leucocytes	% of small mononuclear lymphocytes
12/4/11.	12 000	43.8	34.9	10 000	66.1	18.9	11 000	38.0	21.9	9 000	40.1	33.1
12/9/11.	16 000	55.8	27.4	13 000	59.1	13.3	10 000	53.1	20.9	10 000	54.1	24.6
12/12/11.	19 000	52.7	15.2	19 000	67.7	8.3	11 000	61.1	15.8	12 000	50.9	23.1
12/16/11.	17 000	42.3	22.2	16 000	52.0	8.2	12 000	46.2	18.0	16 000	57.1	14.7
12/21/11.	20 000	60.0	23.9	19 000	58.3	19.6	17 000	35.2	30.0	15 000	40.9	15.3
12/27/11.	21 000	52.4	21.8	22 000	64.7	20.7	15 000	44.1	23.5	14 000	55.3	21.3
12/30/11.	23 000	65.5	22.7	.	.	.	18 000	42.7	33.4	17 000	42.6	31.3
1/2/12.	19 000	41.2	31.3	16 000	49.5	27.5
1/5/12.	19 000	44.1	20.1	17 000	45.4	24.8
1/11/12.	21 000	50.0	23.7	18 000	40.1	22.4
1/16/12.	22 000	61.4	23.4	18 000	64.8	21.9
1/20/12.	23 000	57.4	14.4	20 000	57.3	15.6
1/25/12.	24 000	61.5	22.6	21 000	45.4	17.5
1/31/12.	25 000	64.3	23.7	20 000	67.9	10.5
2/2/12.	27 000	68.6	17.9	22 000	61.9	19.5
2/7/12.	21 000	61.0	21.5
2/13/12.	23 000	63.8	23.9
2/19/12.	23 000	72.3	8.5

The percentages of large lymphocytes and eosinophiles have been omitted.

Fig. 10.

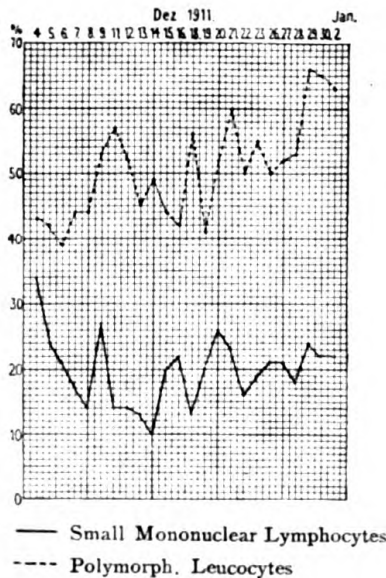


Fig. 11.

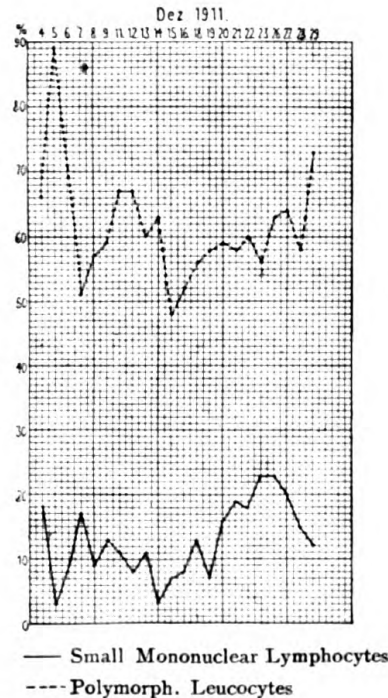


Fig. 12.

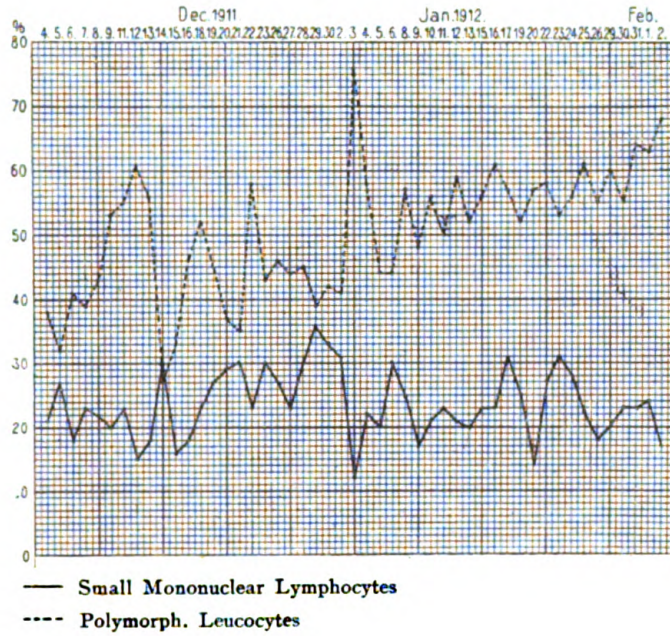


Fig. 13.

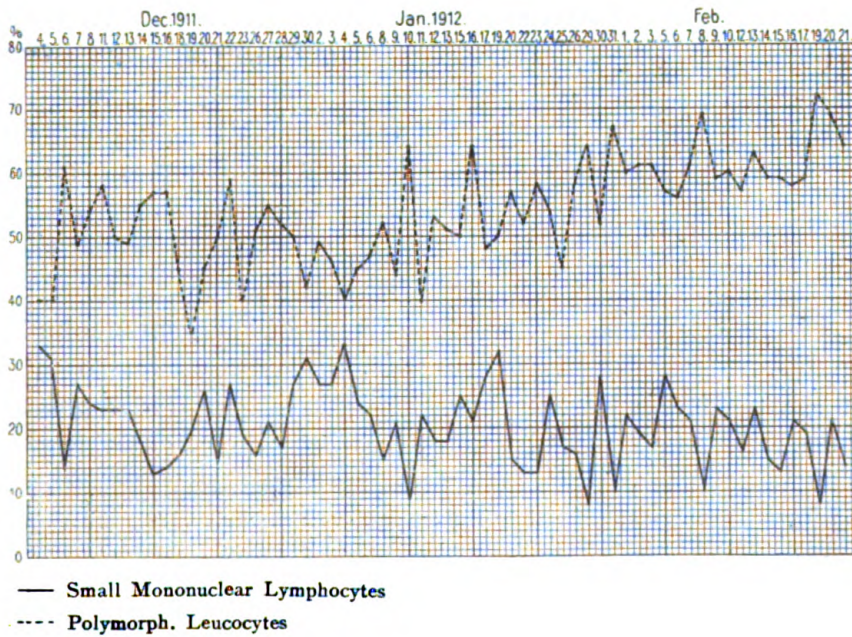
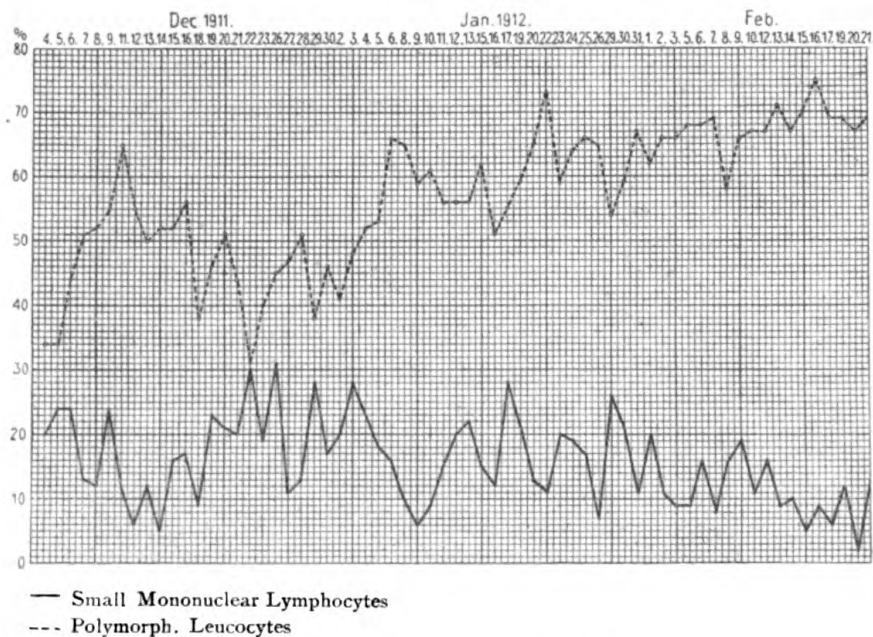


Fig. 14.



The two spontaneous tumor mice which were found in our own stock of breeding mice and included in this communication presented the same characteristic relationship between the polymorphonuclear leucocytes and the small mononuclear lymphocytes already observed in mice inoculated with transplantable tumor. The two spontaneous tumors were also of the adeno-carcinomatous type. (See Fig. 15 and 16.)

Fig. 15.

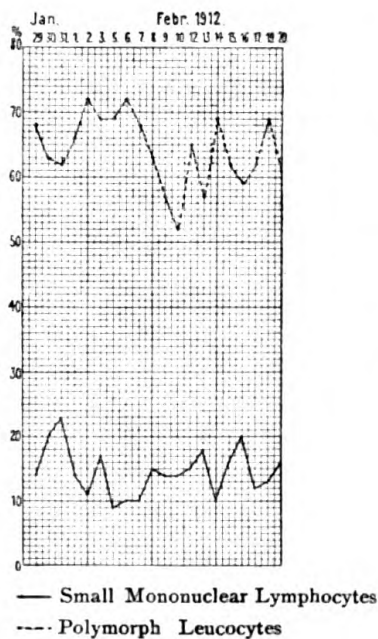
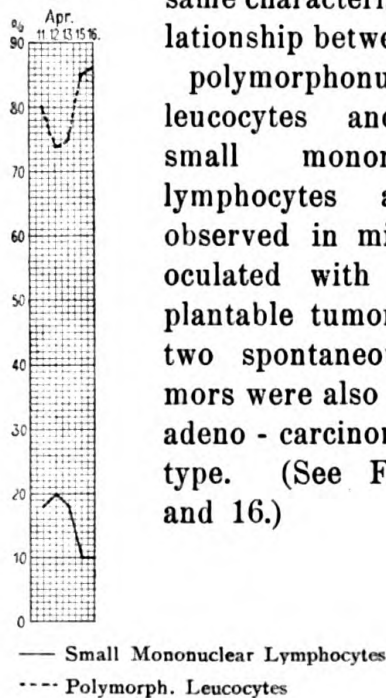


Fig. 16.



The two spontaneous tumor mice which were found in our own stock of breeding mice and included in this communication presented the same characteristic relationship between the polymorphonuclear leucocytes and the small mononuclear lymphocytes already observed in mice inoculated with transplantable tumor. The two spontaneous tumors were also of the adeno-carcinomatous type. (See Fig. 15 and 16.)

Zusammenfassung.

1) Die Anwesenheit des Carcinoms im Organismus der Mäuse verschiebt das numerische Verhältnis der polynuklearen Leukocyten zu den kleinen mononuklearen Lymphocyten.

2) Die Leukocytose scheint in Mäusen, die von einem aktiv wachsenden Carcinom befallen sind, konstant zu sein.

3) Stillstand im Tumorwachstum oder spontane Heilung gehen mit der Verminderung der Leukocytose und der Zunahme der kleinen mononuklearen Lymphocyten Hand in Hand.

4) Dieselben Verhältnisse finden sich auch in Mäusen, die von spontanem Adenocarcinom befallen sind.

5) Ob die Lymphocytose und die Rückbildung in einem kausalen Verhältnisse stehen, kann nicht mit Bestimmtheit angenommen werden, da Lymphocytose oft in rapider Konvaleszenz von solchen Krankheiten beobachtet wird, die durch Verminderung der Lymphocyten gekennzeichnet sind. Die Lymphocytose scheint ein Ausdruck erneuerter physiologischer Aktivität des Körpers zu sein, welche durch die formative Hyperazidität bedingt wird.

References.

- 1) Andrae, Essai d'haematol. pathologie, Paris, 1843, p. 51.
- 2) Vidal, Arch. général de médecine, Serie 3, T. 8, 1890, p. 333.
- 3) Lücke, Das Carcinom, Erlangen 1867.
- 4) Neubert, Ein Beitrag zur Blutuntersuchung speziell bei der Phthisis pulm. und beim Carcinom, Inaug.-Diss., 1889.
- 5) Hayem et Alexander (De la leucocytose dans les cancrés.). Compt. rend. de la société etc. 1887, No. 17, Serie 8, T. 4, p. 270.
- 6) Schneider, Inaug.-Diss. Berlin, 1888.
- 7) Laache, Langenbecks Archiv, 1893, p. 486.
- 8) Cabot, Clinical examination of the blood, 1897, p. 297.
- 9) Meltzer, S. P., Journ. of A.M.A., June 10, 1911, p. 1753.
- 10) Gaylord, Clowes and Baeslack, Medical News, Jan. 14, 1905.
- 11) Da Fano, Fifth Scientific Report on the Investigations of the Imp. Cancer Res. Fund, 1912, p. 57.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Universitäts-Institut für Hygiene und Bakteriologie in
Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle).]

Chemotherapeutische Experimentalstudien bei Trypanosomeninfektionen.

II. Mitteilung.

Von **W. Kolle, O. Hartoch** und **W. Schürmann.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. November 1913.)

In der vorliegenden Arbeit, die als Fortsetzung der von uns bereits veröffentlichten chemotherapeutischen Studien bei Trypanosomeninfektionen¹⁾ zu gelten hat, sei einerseits über den weiteren Verlauf der bereits veröffentlichten Versuche berichtet, andererseits seien die Erfahrungen an größeren Laboratoriumstieren wiedergegeben.

Es handelt sich auch bei Behandlung der letzteren um die gleichen Prinzipien und Methoden, auf die der eine von uns zuerst auf der Tagung der freien Vereinigung für Mikrobiologie in Berlin im Frühjahr 1913 hingewiesen hat. Das Prinzip der Salbenbehandlung in Form von Schmierkuren mit unlöslichen Antimonpräparaten, das uns bei Behandlung der experimentellen Trypanosomeninfektion bei Mäusen so glänzende Resultate ergeben hatte, sollte in gleicher Weise auch an den größeren Laboratoriumstieren, speziell Hunden, ausprobiert werden. Ferner war es notwendig, das Antimontrioxyd, dessen therapeutischer Wert sich bei naganainfizierten Mäusen in hervorragender Weise erwies, ebenso bei größeren trypanosomeninfizierten Tieren therapeutisch zu verwenden.

Der auffallend günstige chemotherapeutische Koeffizient bei Mäusen ließ uns damals die Erwartung aussprechen, daß dieses Mittel, selbst in der Voraussetzung einer beträchtlich kleineren Toleranz größerer Tiere gegen dieses Therapeuticum

1) W. Kolle, O. Hartoch, M. Rothermundt und W. Schürmann, Chemotherapeutische Versuche bei Trypanosomeninfektionen. Zeitschrift f. Immunitätsforschung, Bd. 19, 1913, Heft 1, und Deutsche med. Wochenschr., 1913, No. 18.

dennoch als ein wertvolles Mittel sich auch bei den letzteren erweisen würde.

Ehe wir nun zu der Wiedergabe der einzelnen Versuche übergehen, seien bereits an dieser Stelle einige Punkte aus den Schlußfolgerungen, die wir aus den Ergebnissen unserer letzten experimentellen Arbeiten ziehen müssen, erwähnt und etwas eingehender besprochen.

Zunächst müssen wir vorweg nehmen, daß unsere Erwartungen von dem therapeutischen Wert des intramuskulär eingeführten Trixidins bei der experimentellen Trypanosomeninfektion der größeren Tiere sich nicht in dem Maße bestätigt haben, wie wir es nach dem Ausfall der Mäuseversuche erwarten durften. Der Grund hierfür liegt in folgendem. Bekanntlich führten wir das Antimontrioxyd in Form einer öligen Suspension den Mäusen intramuskulär ein und beobachteten mit Ausnahme einer nicht einmal bedeutenden reaktiven Schwellung an der Injektionsstelle keinerlei ernstere Symptome. In gleicher Weise reagierten auch die Meerschweinchen auf die intramuskuläre Injektion nur mit lokaler Schwellung, die nach mehr oder weniger kurzer Zeit normalen Verhältnissen Platz machte. Ganz anders gestalteten sich die Verhältnisse als wir zu Versuchstieren Kaninchen, Affen und Hunde heranzogen. In den meisten Fällen bewirkte die intramuskuläre Einführung des „Trixidins“ bei diesen Tierarten erst eine beträchtliche lokale Schwellung, die aber anstatt wie bei den anderen Tieren wieder glatt abzuklingen, zu Abszeßbildung führte. Wurden die Abszesse nicht eröffnet, so brachen sie meistens von selbst auf. Die Abheilung der Abszesse war in solchen Fällen meist beträchtlich verlangsamt, bedingt durch eine ungenügende Freilegung der Abszeßhöhle. Besonders hartnäckig und unangenehm waren die Abszedierungen bei Kaninchen, bei denen es weniger zu einer rasch verlaufenden Abszeßbildung mit dünnflüssigem leicht nach außen abzuleitendem Eiter kam, als zu einer viele Tage post injectionem sich entwickelnden Erweichung der lokalen Schwellung mit starker Einschmelzung und Nekrose des umliegenden Gewebes. In solchen Fällen genügte auch eine Inzision der erweichten

Partie meist nicht, um den Prozeß zum Stillstand zu bringen; es bildeten sich vielmehr Senkungsabszesse, die an anderen Stellen durchbrachen und die Kaninchen gingen uns dann vielfach an diesen unangenehmen Komplikationen unter Erscheinungen der Abmagerung und Kachexie zugrunde.

Die eben beschriebenen Abszedierungen nach intramuskulärer Trixidineinführung bei Kaninchen, Affen und Hunden, die wir als eine „Crux“ für die Verwendung bezeichnen müssen, waren, wie gesagt, am stärksten bei Kaninchen ausgebildet, obwohl gelegentlich gleich große Trixidindosen von Kaninchen vollständig reaktionslos vertragen wurden.

Worauf dieses auffällig differente Verhalten der verschiedenen Tierarten und auch verschiedener Individuen derselben Species gegen die intramuskuläre Einverleibung des gleichen Mittels zurückzuführen ist — konnte vorderhand nicht entschieden werden. Die Abszeßbildung, eine Erscheinung, mit der wir nach den glatt verlaufenen Mäuse- und Meerschweinchenversuchen nicht gerechnet hatten, ist im wesentlichen der Grund, der unsere an das Trixidin geknüpften Erwartungen im Sinne eines praktisch verwertbaren Therapeutikums für die intramuskuläre Anwendung einzuschränken veranlaßt.

Es lag nun nahe, den Versuch zu machen, diese unliebsame Komplikation, die geradezu den Erfolg einer solchen Behandlung in Frage stellte, zu beseitigen.

Zahlreiche Versuche durch Zusatz der verschiedensten Mittel, der abszedierenden Wirkung des Trixidins entgegenzuwirken, Versuche bei denen das Calciumchlorid sich noch am wirksamsten erwies, führten dennoch nicht zu einem einwandfreien Resultat. Eine vollständige Paralysisierung dieser Wirkung gelang uns weder auf chemischem Wege, noch durch Verteilung der zu injizierenden Trixidinmenge an verschiedenen Körperstellen.

Ganz anders gestalteten sich die Resultate, als wir nach orientierenden Vorversuchen dazu übergingen, das Antimontrioxyd statt in öliger Emulsion intramuskulär zu injizieren, das Mittel in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt intravenös zu verabreichen. Die theoreti-

schen Bedenken, ein unlösliches pulverförmiges, dazu spezifisch ziemlich schweres Metallpräparat intravenös zu injizieren, wurden durch das Experiment selbst widerlegt. Abgesehen von einigen Todesfällen, die uns in der ersten Zeit unterliefen, als wir mit der dazu erforderlichen Technik noch nicht völlig vertraut waren, gelang es uns später regelmäßig, die erforderliche Menge Antimontrioxyd intravenös einzuführen, ohne daß das Versuchstier auch nur die geringsten Symptome aufwies. Die beim Kaninchen in die Ohrvene, beim Meer-schweinchen in die freigelegte Vena jugularis durchgeführten Injektionen ließen keinen Zweifel darüber, daß dieser Weg durchaus gangbar ist.

Die therapeutischen Erfolge einer solchen Behandlung mittelst intravenöser Injektionen des Antimontrioxyds sind, wie die Protokolle (siehe Kaninchenversuche) es des näheren ausführen, so eklatant, daß wir auf Grund dieser Befunde unsere ursprüngliche Ansicht und die Behauptung von der hervorragenden therapeutischen Bedeutung des Antimontrioxyds für die Behandlung der Trypanosomeninfektion durchaus und im vollsten Maße aufrecht erhalten müssen.

Eine einmalige bzw. zweimalige intravenöse Injektion des Mittels genügte, um eine durch zahlreiche Mausimpfungen erwiesene Dauersterilisierung bei dourineinfizierten Kaninchen zu bedingen. Aus diesen Versuchen geht nun mit Deutlichkeit hervor, daß das Antimontrioxyd auch in diesen Fällen das gleiche bei Kaninchen zu leisten vermag, wie bei den Mäuseversuchen, wenn man nur durch Vermeidung der intramuskulären Injektion die Abszeßbildung ausschaltet.

Die Tatsache, daß wir vor die Notwendigkeit gestellt worden sind, ein unlösliches, relativ grobpulverisiertes Präparat, wie es das käufliche von Kahlbaum hergestellte Antimontrioxyd darstellt, intravenös einzuführen, legte die Frage nahe, ob es nicht gelänge, durch ein chemisches Verfahren, das von dem üblichen in der Praxis angewandten sich unterscheidet, das Antimontrioxyd in einer feiner verteilten Form zu erhalten, in einer Form, die sich der kolloidalen Form nähere. Eine erhöhte therapeutische Wirksamkeit, bedingt durch die auf solche Weise gewonnene größere Ober-

fläche und die Darstellung einer für die intravenöse Injektion handlichen und durchaus ungefährlichen (Embolien) Form des Präparates, waren die Erwartungen, die wir an ein modifiziertes Verfahren knüpften.

In Gemeinschaft mit Herrn Prof. Dr. E. Bürgi und Herrn v. Trazewski, Mitarbeiter am medizinisch-chemischen Institut der Berner Universität, in deren Händen die chemische Arbeit lag, gingen wir dazu über, das Antimontrioxyd aus Brechweinsteinlösungen durch ein besonderes Fällungsverfahren in feinsten Form zu erhalten. Nach einigen Vorversuchen gelang es denn auch, ein Antimontrioxydpräparat zu gewinnen, das, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, sich nicht wie das gewöhnliche käufliche Präparat unmittelbar als Bodensatz abschied, sondern längere Zeit gleichmäßig suspendiert in der Kochsalzlösung sich hielt und erst allmählich zu Boden setzte. Auch bei mikroskopischer Betrachtung des Kahlbaumschen Trioxyds, verglichen mit dem von Bürgi und v. Trazewski hergestellten, ergaben sich ausgesprochene Unterschiede, sowohl in der Form als in der Größe der einzelnen Körner. Durch weitere Modifikation des angewandten Verfahrens ist es ferner gelungen, das Antimontrioxyd in so feiner Form zu erhalten, daß die einzelnen Partikel selbst unter starken Vergrößerungen des Mikroskopes kaum die Größe von Kokken hatten. Die Körper, in derartig feinsten Form gewonnen, waren in bezug auf ihr physiologisch-pharmakologisches Verhalten den kolloidalen Stoffen ähnlich.

Sowohl mit dem I. als mit dem II. Präparat sind von uns Tierversuche (Toxizitätsbestimmungs- wie therapeutische Versuche) angestellt worden, über die wir an dieser Stelle noch nicht berichten können.

Auf jeden Fall haben uns diese Versuche die Ueberzeugung gegeben, daß die günstigen Resultate, die wir bereits mit dem einfachen grobpulverigen käuflichen Antimontrioxyd bei intravenöser Injektion erzielt haben (s. Protokolle), durch das gleiche nur in feinsten Form gefällte Präparat ganz wesentlich noch verbessert und erweitert werden können. Auch die gefahrlose Anwendung eines solchen Präparates für intravenöse Injektion beim

schlafkranken Menschen, auf die es in der Praxis in erster Linie ankommen dürfte, kann zweifellos auf diesem Wege gelöst werden. Die mitgeteilten Versuche über die therapeutischen Versuche mit Antimontrioxyd, die mit dem käuflichen Antimontrioxyd ausgeführt wurden, müssen demnach auch von dem Gesichtspunkte aus betrachtet werden, daß wir vor der Hand nur die prinzipielle Seite der Frage über den Wert des Antimontrioxyds für die Behandlung der experimentellen Trypanosomeninfektion bei größeren Tieren zu lösen trachteten. Ein endgültiges Urteil über die praktische Verwendbarkeit des kolloidalähnlichen Antimonpräparates kann erst auf Grund größerer Reihen diesbezüglicher Versuche gefällt werden.

Bezüglich des Prinzipes der Salbenbehandlung mit unlöslichen Antimonpräparaten bei größeren Tieren, das sich bei unseren bereits mitgeteilten Mäuseversuchen so außerordentlich bewährt hat, seien an dieser Stelle noch einige Bemerkungen vorausgeschickt.

Die Mäuseversuche haben uns gelehrt, daß man bei Anwendung der Antimonschmierkuren meist nur dann auf zuverlässige therapeutische Resultate rechnen darf, wenn die Schmierungen in gewissen Zeitabständen wiederholt in genügender Zahl zur Anwendung gelangen. In vereinzelt Fällen gelang es wohl auch mit einer bzw. zwei Schmierungen bei Mäusen eine Dauersterilisierung zu erzielen, doch war in den meisten Fällen ein regelrechter Turnus von Schmierungen notwendig, um das therapeutische Resultat nicht in Frage zu stellen.

Bei unseren Versuchen an dourineinfizierten Hunden gingen wir demgemäß so vor, daß gewöhnlich nach dem ersten Erscheinen der Trypanosomen im Blut (Blutausstrich-Burripräparat) mit der Inunktionsbehandlung begonnen wurde und in bestimmten Zeitintervallen von durchschnittlich 5—12 Tagen die Schmierungen wiederholt wurden. Die Zahl der Schmierungen variierte von 1—9. Als Salbe diente, wie auch bei unseren Mäuseversuchen, Dimethylphenylpyrazolon - Antimontrichlorid-Eucerin-Salbe (Scheitlin), die wir nur in schwächerer Kon-

zentration, und zwar in einer 20-proz. Form benutzten. Als Inunktionsstelle diente die rasierte Bauch- und Brustfläche und die Innenseite der Hinterbeine. Die Reaktionserscheinungen seitens der Haut, die wir bei unseren mit Schmierkuren behandelten Mäusen seinerzeit beobachteten, fehlten auch nicht ganz bei den Hunden. In den meisten Fällen beschränkte es sich jedoch nur auf einen geringfügigen varicellenähnlichen Ausschlag, der in kurzer Zeit wieder verschwand. Vielfach wurden die Schmierungen reaktionslos vertragen.

Was die Resultate der bei Hunden durchgeführten Schmierkur anlangt, so war auch bei ihnen ein promptes Verschwinden der Trypanosomen aus dem peripheren Blute (mikroskopische Kontrolle) die ausnahmslose Regel. Bei fortgesetzter Behandlung blieb das Blut auch mikroskopisch trypanosomenfrei bis zum Tode des Tieres. Die intra vitam und post mortem ausgeführten Tierimpfungen ergaben ein wechselndes Resultat. Auffällig aber war es, und das sei hier schon betont, daß im Gegensatz zu den Mäuseversuchen die Schmierungen bei den Hunden in den meisten Fällen zu chronischen Vergiftungserscheinungen führten. Die Tiere gingen meist nach einiger Zeit unter einem ganz ähnlichen (s. Protokoll) klinischen Symptomenkomplex zugrunde und wiesen auch bei der Sektion pathologisch-anatomische Befunde auf, die auf eine chronische Antimonvergiftung bezogen werden mußten. Ob nun die Hunde dem Antimon gegenüber eine besonders große Empfindlichkeit aufweisen, wie es gegenüber anderen Metallverbindungen bei einer Reihe anderer Tiere bekannt ist (z. B. Kühe gegen Hg), ist eine Frage, deren Bejahung sowohl auf Grund unserer Versuche wie gewisser Literaturangaben naheliegt.

Nichtsdestoweniger zeigen die Versuche (Versuch 22, 23, 25), daß es mit Hilfe der Salbenbehandlung gelingt, selbst bei einer Tierspecies die so schwer einer erfolgreichen Trypanosomentherapie zugänglich ist, wie der Hund, die Dourineinfektion zur Heilung zu bringen.

Daß es bei Tierarten, die gegen das Antimon sehr intolerant sind, zu chronischen Intoxikationen kommen kann,

kann an dem von uns aufgestellten Prinzip der Depotbehandlung mit unlöslichen Präparaten nichts ändern.

Es wäre zu untersuchen, ob bei Befürchtung von Intoxikationen es nicht möglich ist, die überschüssigen, therapeutisch nicht mehr notwendigen Metalldepots zu neutralisieren, ähnlich wie z. B. mit Hilfe des Hexatantalats es Morgenroth gelungen ist, die Wirkung des Kaliumantimonyltartrats aufzuheben.

Ergänzungsbericht über den weiteren Verlauf der in der I. Mitteilung ¹⁾ veröffentlichten Versuche.

Die zur Bestimmung der Toxizität des Trixidins verwendeten Mäuse, über welche wir die Beobachtungsergebnisse bis zum 89. Tage wiedergegeben hatten (Tabelle IV der I. Mitteilung), sind auch heute (249. Tag) zum Teil noch am Leben (s. Tabelle I), zum Teil interkurrent gestorben. Die Tatsache, daß gerade die mit großen Dosen gespritzten Tiere zur Zeit noch gesund sind, schließt es aus, den Tod der interkurrent gestorbenen Tiere auf eine Antimonvergiftung zu beziehen.

Tabelle I.
Toxizitätsbestimmung des Trixidins.

Mäuse No.	Gew. in g	Dosis pro 10 g Körpergewicht	Tage					
			142	147	148	158	208	249
1135	15	120 mg	lebt	lebt	lebt	lebt	lebt	†
1136	12	120 "	"	"	"	"	"	†
1133	15	60 "	"	"	"	"	"	munter
1134	15	60 "	"	"	"	"	"	munter
1148	20	50 "	"	"	"	"	†	
1113	15	30 "	"	†				
1115	15	25 "	†					
1116	15	25 "	"	"	†			
1117	15	20 "	"	"	"	†		
1118	10	30 "	"	"	"		† 196 Tag.	

Ergänzend zur Tabelle V der I. Mitteilung diene folgende Tabelle II, aus der hervorgeht, daß auch der weitere Verlauf des Auswertungsversuches des Trixidins durchaus unsere Erwartungen bewahrheitete. Keine von den Mäusen ist einem Rezidiv erlegen. Es war also durch die einmalige Injektion des Antimontrioxyds eine Dauersterilisierung, d. h. Heilung herbeigeführt.

1) Loc. cit.

Tabelle II.

Auswertung der Dosis *efficax* des Trixidins an naganainfizierten Mäusen (Antimontrioxydsuspension).

Mäuse No.	Gew. in g	Tage						
		1	2	3	5	183	187	287
794	15	● ¹⁾	+ sw, 10 mg	+ sw	0	0	+0	
795	20	●	+ sw, 10 „	0	0	+0		
864	15	●	+ sw, 2,5 „	0	0	+0		
865	16	●	+ sw, 1 „	0	0	0	0	0) munter
866	15	●	+ sw. 1 „	+ sw	0	0	0	0)

Auch die Versuche den prophylaktischen Wert des Trixidins bei Naganainfektion an Mäusen festzustellen, die wir in der I. Mitteilung in Tabelle VI wiedergaben und deren Beobachtungszeit sich bis zum 75. Tage ausdehnte, sind durchaus im Sinne unserer Voraussetzungen weiter verlaufen. Die unten folgenden Tabellen III und IV zeigen, daß bis auf den 203. bzw. 222. Tag die Mäuse rezidivfrei blieben. Auch die Tatsache, daß die Mäuse trotz der großen Dosen symptomlos ohne Anzeichen einer chronischen Giftwirkung bis auf den heutigen Tag noch am Leben sind, bestätigt unsere Anschauung über die Ungiftigkeit des Antimontrioxyds für den Mäuseorganismus.

Es käme auf Grund dieser Beobachtung dem Antimontrioxyd im Mäuseversuch ein prophylaktischer Wert zu, wie er bisher noch bei keinem Trypanosomenmittel ermittelt worden ist.

Ergänzende Versuche, die Schutzkraft über die in Tabelle III als Maximum angegebene Zeit von 17 Tagen auszudehnen, haben gezeigt, daß es auch bei einer Zeit von 20, ja von 30 Tagen gelingt, wenn auch nicht mit großer Regelmäßigkeit das Angehen der Infektion hintanzuhalten.

Tabelle III.

Propylaktischer Versuch mit einmaliger Trixidgabe bei Naganainfektion.

Mäuse No.	Dosis in mg	Tage										
		1	2	37	75	117	134	183	203	206	215	222
1162	20	.	● ¹⁾	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1199	10	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	10	.	●	0	0	0	0	+0	0	0	0	0
1193	20	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1194	20	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0

1) ● = Infektion.

Mäuse No.	Dosis in mg	Tage													
		1	6	8	10	12	14	17	37	75	117	134	159	183	203
1259	20	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1261	20	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1262	20	.	.	●	0	0	†0	0	0	0	0	0	0	0	
1264	20	.	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1266	20	.	.	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1268	20	●	0	0	0	0	0	0	0	
1269	20	●	0	0	0	0	0	0	0	
1270	20	●	0	0	0	0	0	0	0	
1271	20	●	0	0	0	0	0	0	
1272	20	●	0	0	†0	0	0	0	
1273	20	●	0	0	0	0	0	0	
1247	30	.	.	●	0	0	0	0	0	0	0	†0	0	0	
1248	30	.	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1250	30	.	.	.	●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1258	30	●	0	0	0	0	0	0	0	0	

Tabelle IV.

Prophylaktischer Versuch mit wiederholter Trixidgabe bei Naganainfektion.

Mäuse No.	Dosis in mg	Tage													
		1	2	8	10	12	19	25	33	129	196	202	203	206	
1196	10	.	● ¹⁾	0	0	0	0	5 mg	0	0	†0	0	0	0	
1197	10	.	●	0	0	0	0	5 "	0	0	0	0	0	0	
1198	10	.	●	0	0	0	0	5 "	0	0	0	0	0	0	
1260	20	.	.	●	0	0	10 mg	0 "	0	0	0	0	0	0	
1191	20	.	●	0	0	0	0	0	10 mg	†0	0	0	0	0	
1245	30	.	.	●	0	0	15 mg	0	0	0	0	0	0	0	
1253	30	●	15 "	0	0	0	0	0	0	0	
1254	30	●	15 "	0	0	0	0	0	0	0	
1255	30	●	15 "	0	0	0	0	0	0	0	

Auch die weitere Beobachtung der Mäuse, die teils mit Nagana, teils mit Gambiense infiziert waren und einer systematischen Schmierkur mit Antimonsalben unterworfen waren (Tabelle IX, X, XI der I. Mitteilung), bestätigte unsere seinerzeit aufgestellte Behauptung, daß es gelingt, in einem großen Prozentsatz der Fälle eine Dauersterilisierung der infizierten Tiere auf diesem Wege herbeizuführen.

Die untenfolgenden Tabellen V, VI und VII zeigen, daß kein einziges von den damals als geheilt betrachteten Tieren ein Rezidiv bekommen hat. Die interkurrent

1) ● = Infektion.

gestorbenen Mäuse waren, wie die mikroskopische Untersuchung des Blutes und der Tierversuch bewies, steril eingegangen.

Tabelle V.

Uebersicht über Heilerfolge bei naganainfizierten Mäusen durch systematische Inunktionskuren mit Antimon-met-Salbe 50%.

No.	Gewicht in g	Tage																	
		1	2	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23	25	162	284		
682	15	Infektion mit Nagana	+sw ● ¹⁾	+0w ●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0	
684	15		+w ●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
685	15		+sw ●	+w ●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
707	15		+sw ●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
734	19		sw ●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
736	19		sw ●	w	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
738	19		+w ●	0	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
741	20		+w ●	+w ●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
744	20		+sw ●	+	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0

Tabelle VI.

Uebersicht über die Heilerfolge mit einer 40-proz. Dimethylphenylpyrazolonacetylantimontrichloridsalbe bei Nagana.

No.	Gew. in g	Tage																
		1	2	3	4	5	6	15	133	142	232	241	248	261	275	283	284	333
714	15	Infektion mit Nagana	+sw ● ¹⁾	+w ●	+sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
716	15		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
717	15		+sw ●	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
718	15		+sw ●	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
751	17		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
754	19		+sw ●	sw	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
757	17		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
758	18		+sw ●	+sw ●	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
759	16		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
941	20		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
942	20		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
943	19		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
1011	19		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
1013	14		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
1014	14		+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
1015	15	+sw ●	w	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	
192	15	.	.	.	+w ●	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
495	15	.	.	.	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
496	15	.	.	.	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

1) ● = Schmierung.

Tabelle VII.
40-proz. Antimon-Pyrazolonsalbe bei Gambiense.

No.	Tage										
	1	3	4	5	7	90	109	181	234	254	260
104	Infektion mit Gambiense	+sw	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0
107		+sw	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0
101		+sw ● ¹⁾	+sw ●	0	0	0	0	0	0	0	0
136		.	+sw ●	0	0 ●	0	0	0	+0		
162		.	.	.	+(w) ●	●		0	0	0	
163		.	.	.	+sw ●	●		0	0	0	
168		.	.	.	+sw ●		+ zerfressen				

Ehe wir zur Besprechung der therapeutischen Versuche an größeren Laboratoriumstieren übergehen, seien noch eine Reihe chemotherapeutischer Studien wiedergegeben, die wir bei Behandlung von dourineinfizierten und gambienseinfizierten Mäusen gemacht haben.

Es galt zunächst, zu zeigen, daß die mit Antimontrioxyd bei naganainfizierten Mäusen erhobenen Befunde auch bei den chronischer verlaufenden Trypanosomeninfektionen Geltung haben. Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß eine einmalige Injektion des Antimontrioxyds bei dourineinfizierten und gambienseinfizierten Mäusen in den meisten Fällen vor einem Rezidiv nicht zu schützen vermag, suchten wir durch mehrmalige, in gewissen Zeitintervallen verabfolgte Gaben eine Dauersterilisierung herbeizuführen.

Die folgenden Tabellen VIII und IX (p. 448—450) geben eine Uebersicht über die hierbei erzielten Resultate.

Wie aus den Tabellen VIII—IX hervorgeht, gelang es auch bei dourine- und gambienseinfizierten Mäusen durch das Antimontrioxyd bei mehrmaliger Injektion in gewissen Zeitintervallen eine Dauersterilisierung zu erzielen.

Zwar stehen die Heilresultate zahlenmäßig hinter denen bei Naganainfektion erzielten erheblich zurück, doch ist dabei die unverhältnismäßig schwerere therapeutische Beeinflussbarkeit der als Gewebsparasiten auftretenden Dourine- und Gambiense trypanosomen in Erwägung zu ziehen. Auf jeden Fall gelang es auch hierbei in bei weit mehr als 50 Proz. der infizierten Tiere Dauerheilungen zu erreichen.

1) ● = Schmierung.

Tabelle VIII. Therapeutische Versuche an

No.		Tage							
		8	10	11	12	13	14	15	26
1415	Inf.	+w	+++ 2 mg ¹⁾	+++	+w	++	++ 2 mg	0	0
1417	„	+sw	+sw	+w, 2 mg	+w	0	0	0	0
1418	„	0	0	+sw	+w, 2 mg	+(+)	+2 mg	0	0
1419	„	0	0	+sw	.	+w, 2 mg	0	0	0
1422	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1424	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1434	„	0	0	+sw	+sw	+w, 2 mg	+w	0	0
1437	„	0	0	0	sw, 2 mg	0	0	0	0
1438	„	0	+ 2 mg	0	0	0	0	0	0
1440	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1441	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1442	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1446	„	+	+++ 2 mg	0	0	0	0	0	0
1447	„	sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0	0
1448	„	+	++ 2 mg	0	0	0	0	0	0
1449	„	+	++ 2 mg	0	0	0	0	0	0
1450	„	+	++ 2 mg	0	0	0	0	0	0
1452	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1454	„	0	0	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0
1455	„	0	+sw	+w, 2 mg	0	0	0	0	0
1460	„	+++ 2 mg	0	0	0	0	0	0	0
1464	„	+	++ 2 mg	0	0	0	0	0	0
1465	„	+sw	0	0	0	0	0	0	0
1467	„	+++ 2 mg	0	0	0	0	0	0	0
1468	„	+++ 2 mg	0	0	0	0	0	0	0
1469	„	+++ 2 mg	0	0	0	0	0	0	0
1470	„	+++ 2 mg	+++	+	0	0	0	0	0
1474	„	+++ 2 mg	0	0	0	0	0	0	0
1476	„	+++ 2 mg	++(+)	++	0	0	0	0	0
1484	„	+ 2 mg	—	0	0	0	0	0	0
1485	„	++2 mg	—	0	0	0	0	0	0
1486	„	++(+) 2 mg	++	0	0	0	0	0	0
1487	„	++2 mg	+++	+(+)	0	0	0	0	0
1488	„	++(+) 2 mg	++(+)	0	0	0	0	0	0
1490	„	+++ 2 mg	+++	0	0	0	0	0	0
1491	„	+++ 2 mg	+++	0	0	0	0	0	0

1) pro 10 g Gewicht.

dourineinfizierten Mäusen mit Antimontrioxyd.

		Tage															
		34	37	68	69	76	77	78	85	110	116	141	146	152	159	216	
2	mg	†0															
2	"	0	0	2 mg	0	0	0	0	0	0	0	†0					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	†0					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	†0					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	†+++					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0					
2	"	†0															
2	"	0	†0	44 Tage	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	†0			
2	"	0	0	2 "	0	†0											
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	†+++					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0					
2	"	0	†+++	48 Tage	2 "	0	0	0	0	0	0	0					
2	"	0	†+++	0	0	0	0	0	†0								
2	"	0	0	2 mg	0	0	0	0	0	0	†0	} Diar- rhöe					
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	†0						
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	†0						
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	†0						
2	"	0	0	2 "	0	0	0	†0									
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	†0							
2	"	0	0	0	0	†0											
2	"	0	0	2 mg	0	0	0	0	0	0	0					†0	
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	†+++		
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	"	0	0	0	0	0	†+++										
2	"	0	0	2 mg	0	0	†0										
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	†+++				
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
2	"	0	0	2 "	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		

Generated on 2019-01-13 00:01 GMT / http://hdl.handle.net/2027/uc1.b3208393
Public Domain in the United States; Google-digitized / http://www.hathitrust.org/access_use#pd-us-google

Tabelle IX. Therapeutischer Versuch bei Gambiense-Mäusen mit wiederholten Trixidgaben.

Maus No.	Gewicht in mg	Tage													
		1	4	5	14	42	86	88	89	93	104	119	126	154	
Infektion mit Gambiense															
1583	14		+sw 3 mg ¹⁾	0	0	0	+++								
1584	15		+sw 3 mg	0	0	3 mg	—	0	3 mg	0	0	0	0	0	0
1585	12		+sw 3 mg	0	0	3 mg	—	0	3 mg	0	0	0	0	0	0
1586	13		+sw 3 mg	0	0	3 mg	—	0	3 mg	0		+0			
1587	15		+sw 3 mg	0	0	3 mg	—	0	3 mg	0	0	0	0	0	0
1588	16		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0		3 mg	0	0	0	0	0	0
1589	15		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0		3 mg	0	0	0	0	0	0
1591	16		+sw 3 mg	0	0	3 mg	—	+++	—						
1592	12		+sw 3 mg	0	0	3 mg	—		3 mg	+0					
1593	15		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1594	14		+sw 3 mg	0	0	3 mg	+++								
1595	12		+sw 3 mg	0	0	0		0		+++					
1596	15		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0	0		+++					
1597	15		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0			+++					
1598	14		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0		3 mg	0		+++			
1599	14		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0	0	3 mg	0	0	0	0	0	0
1600	11		+sw 3 mg	0	0	+sw 3 mg	0	0	3 mg	0	0	0	+++		
1601	11		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0	0	3 mg	0	0	0	0	0	0
1602	11		+sw 3 mg	0	0	3 mg	0	0	3 mg	0	0	0	0	0	0

1) pro 10 g Gewicht.

Unter den zahlreichen Versuchen, das Antimontrioxyd mit bereits bekannten Trypanosomenmitteln zwecks Erhöhung der Wirksamkeit zu kombinieren, möchten wir die Kombination mit Trypanrot nicht unerwähnt lassen. Die anderen Kombinationen, speziell mit Fuchsin, ergaben keine wesentliche Erhöhung der Antimontrioxydwirkung. Bei einer kombinierten Behandlung von Antimontrioxyd und Trypanrot gelang es bereits mit einer einzigen Antimontrioxydgabe, die dourineinfizierten Mäuse dauernd zu sterilisieren.

Tabelle X.
Kombinierte Behandlung dourineinfizierter Mäuse.
Antimontrioxyd + Trypanrot.

	17. V.	10. Tag 26. V.	13. Tag 28. V.	14. Tag 29. V.	28. Tag 13. VI.	33. Tag 18. VI.	68. Tag 23. VII.	173. Tag 5. XI.
1425	Infektion	0	+sw ● ¹⁾	0	† 0	—	—	—
1426		0	+sw ●	0	0	0	0	0
1427		0	+sw ●	0	0	0	0	0
1428		0	+sw ●	0	0	0	0	0
1429		0	+sw ●	0	0	0	0	0
Kontrolle		3. VI.	7. VI.	9. VI.	18. VI.	24. VI.		
1570		Infiziert	+sw 5 mg Trypanrot	0	0	† + + +		

Versuche an Affen.

Die therapeutischen Versuche mit Hilfe der intramuskulären Einverleibung von Antimontrioxyd, wie auch mit Anwendung der Antimonantipyrinrichloridsalbe, die wir an einer Reihe von mit Gambiense infizierten Affen durchgeführt haben, ergaben, daß sowohl das Antimontrioxyd als auch die Salbe die Trypanosomen zum Schwinden bringen. Ein endgültiges Urteil über den Wert der obigen Behandlung läßt sich trotz der in 5 Fällen negativ verlaufenen Mausimpfung (s. Tabelle XI) nicht fällen, da die Versuchstiere zu kurze Zeit nach der Behandlung eingingen. Ob der frühzeitige Tod als Antimonvergiftung aufzufassen ist, kann in Berücksichtigung der

1) Injektion von 3 mg Trypanrot und 2 mg Antimontrioxyd pro 10 g Gewicht i. m.

Tabelle XI. Therapeutische Versuche an Affen mit Antimontrioxyd

Affe I 1900 g	3. III. inf. v. Maus 1042	12. III. 0	13. III. + sw ● ¹⁾	14. III. 0	19. III. 0	22. III. 0	24. III. + sw ●	26. III. + sw 0,5 Sb.- Trioxyd i. m.	8. IV. + sw	9. IV. + sw ●	10. IV. 0
Affe II 2160 g	3. III. inf. v. Maus 1042	12. III. 0	13. III. + sw	15. III. + sw	18. III. + w	20. III. +(+)					
Affe V	18. IV. inf. v. Maus 1228	21. IV. 0	25. IV. + w 0,5 Sb.-Trioxyd an 3 Stellen i. m.	26. IV. 0	28. IV. 0	29. IV. 0 schr krank Diarrhöe					
Affe VI	26. IV. inf. v. Maus 1313	5. V. 0	6. V. + sw	7. V. + sw, 0,5 Sb.-Trioxyd i. m.	8. V. 0	15. V. 0,5 Trioxyd i. m. Diarrhöe					
Affe VII	26. IV. inf. v. Maus 1313	5. V. 0	6. V. + sw	7. V. + sw, 0,2 Sb.-Trioxyd i. m.	8. V. 0	12. V. 0, 0,2 Sb.- Trioxyd i. m.					
Affe VIII	26. IV. inf. v. Maus 1313	5. V. 0	6. V. + sw 0,5 Sb.-Trioxyd i. m.	7. V. 0	10. V. 0,3 Sb.-Trioxyd i. m.	16. V. 0 0,3 Sb.-Trioxyd i. m.					
Affe III	18. IV. inf. v. Maus 1228	21. IV. † 0. Durchfall. Sektion: Hyperämie des Dünndarmes, sonst o. B.									
Affe IV	18. IV. inf. v. Maus 1228	21. IV. † 0. Durchfall. Sektion: Hyperämie des Dünndarmes, sonst o. B.									

Sektionsbefunde nicht eindeutig entschieden werden. Wenn wir es auch nicht für ausgeschlossen halten, daß im Gegensatz zu der großen Toleranz der Mäuse — siehe die Arbeit Kolle, Hartoch, Rothermundt und Schürmann — die Affen dem Antimon gegenüber sich sehr empfindlich erweisen, so möchten wir andererseits die Frage nicht entscheiden im Hinblick auf die große Empfänglichkeit der Affen für eine Stallinfektion (Darmkrankheit) und die Möglichkeit, daß unsere Versuchstiere einer solchen erlegen sind. Diese Erwägung ist um so berechtigter, als erstens Affe III und IV, ohne mit Antimon behandelt zu sein, unter gleichen Symptomen eingingen wie die mit Antimon behandelten Affen. Zweitens spricht der Versuch an Affe I (verglichen mit Affen V, VI und VII) dafür,

1) ● = Schmierung mit einer 20-proz. Dimethylphenylpyrazolon-antimontrichlorid-Salbe.

und Dimethylphenylpyrazolonantimontrichlorid-Salbe.

19. IV. 0	25. IV. 0	28. IV. 0 Schwellung d. Augenlider	2. V. + sw	3. V. a. m. ++ ●, 0,5 Sb.-Triox. i. m., 0,05 Neosalvarsan i. m.	3. V. p. m. + (w)	5. V. krank 0	6. V. † 0. Sektionsbefund: Seröser Erguß im Herzbeutel u. Abdomen, Milz vergrößert, sonst o. B. Mausimpf. v. Leber, Milz u. Gehirn 1387—1392	25. V. Mäuse vom 6. V. steril
22. III. +++ 0,5 Sb.-Trioxyd i. m.	24. III. ++ (+) sehr krank	26. III. †	30. IV. † 0. Sektionsbefund: Seröses Exsudat im Herzbeutel. Andeutung von Muskatnußleber. Injektion der Gefäße im Splanchnicusgebiet	30. IV. Mausimpf. von Leber, Milz und Nebenniere. 1363—1367	12. VII. Mäuse v. 30. IV. steril			
17. V. 0,2 Sb.-Trioxyd i. m. an verschiedenen Stellen. Durchfall	27. V. † 0	27. V. Mausimpf. v. Leber, Milz 1528—1531	22. V. † 0. Sektion: Lunge, Herz o. B. Darmgeschwüre im Dünndarm. Submuköse Blutungen. Dysenterie?	22. V. Mausimpf. v. Leber u. Milz 1506—1509	3. VII. Mäuse vom 22. V. steril			
20. V. † 0. Sektionsbefund: Im Netz und Mesenterium weiße, grieß-ähnliche Körnchen. Hyperämie im Gebiete des Splanchnicus. Qualitativer Antimonnachweis im Netz negativ	20. V. Mausimpf. v. Milz u. Leber 1496—1499	12. VII. Mäuse v. 20. V. steril						

daß, wenn überhaupt der Tod auf eine Antimonvergiftung bezogen werden sollte, die Inkubationszeit bei den letzteren eine viel zu kurze wäre. Die intramuskuläre Einverleibung des Antimontrioxyds setzte selbst bei Verteilung der zu injizierenden Antimontrioxydaufschwemmung auf verschiedene Stellen des Körpers Abszesse, die meist zum Durchbruch kamen und nur langsam verheilten. Die in einem Falle durchgeführte Kombination (Affe I) des Antimontrioxyds mit Salvarsan ergab kein eindeutiges Resultat.

Im Hinblick auf diese Ergebnisse halten wir die Affenversuche für ungeeignet, um eine Beurteilung des Wertes der Antimonbehandlung bei Gambiense zu gestatten. Eine Weiterführung der Affenversuche war mit Rücksicht auf die Schwierigkeit der Materialbeschaffung und der immer vorhandenen Gefahr einer Stallinfektion nicht geboten.

Therapeutische Versuche an dourineinfizierten Hunden.

In den folgenden Versuchen wurde die therapeutische Wirksamkeit des intramuskulär einverleibten Antimontrioxyds und der kutanen Anwendung der Dimethylphenylpyrazolon-antimontrichlorid-Salbe (20-proz.) an dourineinfizierten Hunden studiert.

Der von uns benutzte Stamm tötete die Versuchstiere, wie aus der Tabelle XII hervorgeht, ausnahmslos, und zwar innerhalb von 4 bis 7 Wochen. Die Trypanosomen, die meist 2—3 Wochen nach der Infektion im Blute spärlich auftraten, schwanden vielfach für kürzere oder längere Zeit aus dem peripheren Blute, um meist kurz vor dem Tode in größerer Anzahl wieder zu erscheinen. Die allgemeinen Symptome der Krankheit und der pathologisch-anatomische Sektionsbefund stimmten auch bei unseren Versuchen mit den aus der Literatur bekannten Daten überein, nur daß die Augenerscheinungen (Uhlenhuth) keineswegs so regelmäßig beobachtet werden konnten, wie von anderer Seite beschrieben worden ist.

Tabelle XII. Kontrollhunde.

									Gelebt nach der Infektion
Hund III 14 500 g	29. IV. Infekt.	14. V. +sw	3. VI. +(w)	10. VI. ++	13. VI. †				46 Tage
Hund VI 2500 g	5. V. Infekt.	15. V. +sw	19. V. +sw	27. V. +sw	10. VI. 0	13. VI. +sw	21. VI. ++	22. VI. †	48 „
Hund VIII 2730 g	5. V. Infekt.	15. V. 0	19. V. 0	27. V. +sw	6. VI. ++	13. VI. +++	14. VI. †		40 „
Hund XI —	21. V. Infekt.	3. VI. +w	10. VI. +s(w)	16. VI. ††††					27 „

Hundeversuche.**Antimonbehandlung bei Dourine¹⁾.**

Hund 1, 5750 g.

15. IV. Infektion subkutan.

2. V. Blutbefund 0. Blauer Schimmer auf der Pupille.

4. V. +sw.

1) Zeichenerklärung: 0 = keine Trypanosomen; +sw = 1—4—5 Trypanosomen im Präparat; +w = in jedem 2.—3. Gesichtsfeld ein Trypanosoma; + = in jedem Gesichtsfeld ein Trypanosoma; ++ = in jedem Gesichtsfeld 2—6 Trypanosomen.

7. V. +sw; 0,3 Antimontrioxyd pro kg Gewicht i. m.
9. V. 0; Abszeß an der Injektionsstelle.
17. V. Abszeß verheilt.
28. V. 0; Verimpfung von Blut auf Mäuse 1530 31.
14. VI. Mausimpfung vom 28. V. positiv. Blutbefund +sw. 0,2 Antimontrioxyd i. m.
16. VI. Abzesse an den Injektionsstellen.
26. VI. 0; Abszesse fast verheilt.
2. VII. 0; ganz munter.
8. VII. 0.
10. VII. Bissig; verändertes Aussehen; wankt beim Gehen.
12. VII. Symptome nehmen zu, frißt faßt gar nicht.
17. VII. †0; Sektionsbefund o. B., nur im linken Seitenlappen des Großhirns, kleiner Erweichungsherd. Verimpfung der Milz und von Blut auf Mäuse 1868—1871. Wegen Wutverdacht das Gehirn auf 2 Kaninchen verimpft.
19. VII. Mausimpfung vom 17. VII. †0 Bakteriämie.
21. VIII. Die mit Gehirn geimpften Kaninchen gesund.

Das Ergebnis dieses Versuches läßt sich dahin zusammenfassen, daß es nicht gelungen ist, durch eine einmalige Behandlung mit 0,3 g Antimontrioxyd pro Kilo Gewicht den Versuchshund vor einem Rezidiv zu schützen (28. V.), obwohl im Anschluß an die Injektion der Blutbefund von +w innerhalb von 24 Stunden auf 0 fiel. Eine erneute Trixidinbehandlung (200 mg Antimontrioxyd) bewirkte zwar wieder eine Sterilisierung, über deren Dauerwirkung wegen des frühzeitigen Todes des Versuchstieres kein Urteil abgegeben werden kann, speziell da die mit postmortalem Blut und einer Milzemulsion gespritzten Mäuse vor Ablauf der Inkubationszeit steril starben.

Das auffällige klinische Symptomenbild kurz vor dem Tode, das wir übrigens auch bei einigen anderen mit Antimon behandelten Hunden beobachteten, deuten wir als Erscheinungen einer Antimonvergiftung, zumal der Verdacht auf Wut durch die Kaninchenimpfung ausgeschlossen werden konnte. Der Hund lebte vom Tage der Infektion gerechnet 93 Tage.

Hund 2.

15. IV. Infektion subkutan.
17. V. +sw.
24. V. +sw.
13. VI. Rechtes Auge bläuliche Cornea; linkes Auge ebenso.
17. VI. Exophthalmus.

30*

- 21. VI. Linkes Auge aufgehell; rechtes Auge trübe. Exophthalmus im Schwinden. 400 mg Antimontrioxyd i. m.
- 23. VI. 0; Abszesse am linken Hinterbein; Cornea fast aufgehell.
- 24. VI. 0.
- 26. VI. 0.
- 27. VI. Noch Abszesse. Rechtes Auge aufgehell; linkes Auge noch trübe Cornea. Blutbefund 0.
- 30. VI. 0.
- 1. VII. In Chloroformnarkose bei Enukleation des Bulbus gestorben. Mausimpfung: Blut und Milz. 1788,1791.
- 21. VII. bzw. 5. VIII. Mausimpfung vom 1. VII. negativ.

Der Erfolg der Behandlung war das Schwinden der Trypanosomen aus dem peripheren Blute. Bis zum Tode intra operationem blieb der Blutbefund steril und auch die post mortem geimpften Mäuse blieben gesund. Leider ist die Beobachtungszeit zu kurz gewesen, um von einer Dauersterilisierung des Hundes sprechen zu können. Lebensdauer: 76 Tage.

Hund 5, 2750 g.

- 5. V. Infektion subkutan.
- 15. V. +w. 0,1 g Antimontrioxyd pro Kilo Gewicht.
- 16. V. +w.
- 17. V. 0.
- 23. V. 0. Abszesse.
- 29. V. 0.
- 11. VI. 0.
- 14. VI. Gewicht 2550 g. 0,1 g Antimontrioxyd pro Kilo Gewicht.
- 17. VI. Conjunctivitis. 0.
- 23. VI. 0+. Dünndarmschleimhaut stark gerötet; Perforations-Peritonitis. Blutbefund 0. Milz klein. Mausimpfung: Blut und Milz. 1743/46.
- 24. VII. Mausimpfung vom 23. VI. negativ.

Auch hier bewirkte die intramuskuläre Einverleibung des Antimontrioxyds eine Blutsterilisierung, die bis zum Tode des Tieres anhielt. Auch die mit postmortaler Blut- und Milzemulsion gespritzten Mäuse erkrankten nicht an Trypanosomiasis. Als Todesursache kommt eine interkurrente Erkrankung in Betracht.

Hund 7.

- 5. V. Infektion subkutan.
- 15. V. +w. 0,05 g Antimontrioxyd intramuskulär pro Kilo Gewicht.

- 16. V. +w.
- 17. V. +sw.
- 19. V. 0.
- 23. V. Abszesse an den Hinterbeinen.
- 27. V. 0.
- 29. V. Blutimpfung auf Mäuse 1534—35.
- 10. VI. Mausimpfung vom 29. V. positiv.
- 23. VI. Mausimpfung 1741—42.
- 26. VI. +sw. 100 mg Sb.-Trioxyd intramuskulär. Geschwollenes Gesicht. Geschwollene Konjunktiven. Verdacht auf Staupe. 10 ccm normales Pferdeserum.
- 30. VI. Abszesse am rechten Hinterbein eröffnet. Blutbefund 0.
- 2. VII. 0.
- 5. VII. Geschwollenes Gesicht. Konjunktiven geschwollen. Blutbefund 0. 10 ccm normales Pferdeserum.
- 8. VII. Mausimpfung vom 23. VI. positiv.
- 11. VII. I. Schmierung.
- 12. VII. II. Schmierung. Pusteln.
- 19. VII. Linkes Auge normal, rechtes Auge Cornea getrübt. Blutbefund 0. III. Schmierung.
- 21. VII. †. Blutbefund 0. Sektion: Linke Lunge hypostatische Herde. Darm ganz weiß, mit dünnflüssiger gelber Flüssigkeit gefüllt. Milz sehr klein, sonst o. B.
- 21. VII. Mausimpfung von Milz und Blut. 1902—1905.
- 21. VIII. Mausimpfung vom 21. VII. negativ.

Der frühzeitige Tod, der auf interkurrente Ursache zurückzuführen ist, läßt ein eindeutiges Urteil über den Erfolg der Behandlung trotz der negativen Mausimpfung nicht fällen.

Hund 9.

- 19. V. Infektion subkutan.
- 10. VI. 0.
- 11. VI. 0. Mausimpfung 1675—1676.
- 25. VI. Mausimpfung positiv. Antimontrioxyd. 200 mg an 4 Körperstellen i. m.
- 2. VII. Geschwollenes Gesicht. 0. Keine Abszesse. Antimontrioxyd. 200 mg an 4 Körperstellen verteilt.
- 4. VII. 0.
- 5. VII. 0. Erbrechen; sehr schwach. (Staupe?) Sektion: Peritonitis; Magen und Zwölffingerdarm stark gerötet. Blutbefund 0. Mausimpfung 1810 11.
- 5. VIII. Mausimpfung vom 5. VII. negativ.

Auch bei diesem Hunde, der jedenfalls der intestinalen Staupeform erlegen ist, läßt sich ein Urteil über den End-erfolg der Behandlung nicht fällen.

Hund 10.

19. V. Infektion subkutan.
 26. V. 0.
 4. VI. 0. Blutimpfung auf Mäuse 1677—1688.
 20. VI. 0. Mausimpfung vom 4. VI. positiv. 120 mg Antimontrioxyd i. m.
 26. VI. Abszesse an den Injektionsstellen.
 2. VII. +w. 200 mg Antimontrioxyd an vier Stellen i. m.
 3. VII. Zahlreiche Auflösungsformen neben intakten Trypanosomen.
 4. VII. 0.
 8. VII. 0. Kleine Abszesse an zwei Stellen eröffnet.
 11. VII. 0. Abszesse geheilt. I. Schmierung.
 13. VII. 0. Kleine Pusteln an der geschmierten Haut.
 19. VII. 0. Pusteln abgeheilt. II. Schmierung.
 24. VII. 0. III. Schmierung.
 28. VII. 0.
 29. VII. Blutverimpfung auf Mäuse 1940, 1941.
 9. VIII. 0.
 12. VIII. Mausimpfung vom 29. VII. positiv. Schwellung des Gesichtes diffus. IV. Schmierung.
 13. VIII. Schwellung des Kopfes und Gesichtes nicht zurückgegangen. Schleimhaut des Gaumens stark geschwollen. Gaumenabdrücke auf der Zunge. Trübung der Hornhaut des linken Auges im unteren Segment. V. Schmierung.
 14. VIII. Leichte Besserung sämtlicher Symptome. VI. Schmierung.
 15. VIII. Schwellung des Kopfes und Gesichtes noch weiter zurückgegangen. Corneatrübung nicht fortgeschritten. Bestäubung der kranken Cornea mit Antimontrioxyd.
 16. VIII. Trübung der Cornea aufgehellt.
 18. VIII. Befund an der Hornhaut wieder normal. Auch die Schwellung am Kopfe und Gesicht und Gaumen total geschwunden. VII. Schmierung.
 22. VIII. 0. Klinisch o. B. VIII. Schmierung.
 28. VIII. 0.
 5. IX. 0. Klinisch o. B. IX. Schmierung.
 14. IX. Verändertes Benehmen. Scheu, still, beim Zufassen bissig. Verringerte Eßlust.
 18. IX. Gleiche Erscheinungen, nur stärker. Fühlt sich schwach, liegt viel, leichtes Taumeln beim Aufstehen.
 20. IX. Zunehmende Erscheinungen — sehr bissig, totgeschlagen. Sektion: Hund stark abgemagert, Leber leicht vergrößert, Milz stark vergrößert, hart, Oberfläche granuliert, Nebennieren vergrößert, blaß; Nieren, Lungen, Herz o. B. Verimpfung von Blut, Milz und Leber auf Mäuse 2125—2130.
 2. X. Mausimpfungen vom 20. IX. positiv.

Das Ergebnis des obigen Versuches kann dahin zusammengefaßt werden, daß trotz einer zweimaligen intramuskulären

Anwendung von Antimontrioxyd und einer neunmaligen Schmierung es nicht gelungen ist, eine Dauersterilisierung des Versuchstieres herbeizuführen. Den Tod des Hundes fassen wir als einen Antimontod auf, speziell in Berücksichtigung des auffälligen klinischen Bildes kurz vor dem Exitus. Lebensdauer: 124 Tage.

Hund 14.

- 21. V. Infektion subkutan.
- 3. VI. +w. 0,2 g Antimontrioxyd pro Kilogramm Gewicht i. m.
- 4. VI. 0.
- 6. VI. Abszeß am rechten Bein.
- 10. VI. 0.
- 26. VI. 0. 100 mg Antimontrioxyd i. m.
- 2. VII. Fistel noch am linken Bein. 0.
- 7. VII. 0.
- 14. VII. 0. I. Schmierung.
- 19. VII. †. Darmschleimhaut gerötet, Gefäße im Splanchnicusgebiet stark erweitert, sonst o. B.
- 19. VII. Mauseimpfung Blut und Milz 1894—1897. Mäuse an Septikämie gestorben.

Hund 15.

- 31. V. Infektion subkutan.
- 26. VI. 0.
- 2. VII. +w. 200 mg Antimontrioxyd an vier Körperstellen i. m.
- 4. VII. 0. Rechtes Auge: blauer Schimmer auf der Cornea.
- 5. VII. Abszeß am linken Vorderbein; trübe Cornea; Conjunctivitis; r. Exophthalmus. 0.
- 8. VIII. †. Blutbefund 0. Links Pneumonie, Darm blaß, Milz nicht vergrößert.
- 8. VII. Mauseimpfung Milz und Blut 1814—1817.
- 8. VIII. Mauseimpfung vom 8. VII. negativ.

Hund 16.

- 31. V. Infektion subkutan.
- 2. VII. +sw. 200 mg Antimontrioxyd an vier Körperstellen i. m.
- 8. VII. Linkes Auge im oberen Quadranten weiße Trübung. Protrusio bulbi. Blutbefund 0.
- 9. VII. †. Sehr großes Herz, gefüllt mit flüssigem Blut. An allen vier Injektionsstellen große Abszesse. Tod: Resorptionstod durch Eiter? Mauseimpfung: Blut, Leber, Milz 1822—1829.
- 9. VIII. Mauseimpfung vom 9. VII. negativ.

Hund 18.

- 3. VI. Infektion subkutan.
- 24. VI. +w. 200 mg Antimontrioxyd i. m.

- 25. VI. +sw.
- 26. VI. 0.
- 2. VII. Leichte Infiltration am linken Hinterbein. Blutbefund 0.
200 mg Antimontrioxyd i. m.
- 8. VII. Abszesse an allen Beinen.
- 11. VII. †0. Sektion: Milz vergrößert. Leber groß und hart. Sonst
o. B. Mauseimpfung 1842–45: Blut und Milz.
- 9. VIII. Mauseimpfung vom 11. VII. negativ.

Hund 20.

- 3. VI. Infektion subkutan.
- 30. VI. 0.
- 2. VII. Mauseimpfung 1790–91: positiv am 16. VII.
- 16. VII. I. Schmierung.
- 18. VII. Starke Pustelbildung.
- 25. VII. 0.
- 28. VII. Abszeß in einer Brustwarze. Jodbehandlung.
- 29. VII. Abszeß geht zurück.
- 12. VIII. 0.
- 18. VIII. 0. II. Schmierung.
- 19. VIII. Fünfmaststückgroße granulierende Fläche am Bauche.
- 23. VIII. Wunde granuliert gut. III. Schmierung.
- 28. VIII. IV. Schmierung.
- 1. IX. 0.
- 6. IX. V. Schmierung.
- 8. IX. †0. Große eiternde Bißwunde. Leber o. B. Milz leicht
vergrößert, Darm, Lunge, Herz o. B. Verimpfung von Blut,
Milz und Leber auf Mäuse 2082–87.
- 20. X. Mauseimpfung vom 8. IX. negativ.

Der Erfolg der Behandlung war in diesem Falle insofern günstig, als es durch die eingeleitete Schmierbehandlung gelungen ist, eine Blutsterilität zu erzielen, die bis zum Tode des Hundes anhielt. Auch scheint der Hund in den Organen, wie die post mortem ausgeführten Mauseimpfungen (Blut, Milz und Leber) zeigen, keine Trypanosomen mehr beherbergt zu haben.

Hund 21.

- 4. VII. Infektion.
- 28. VII. +sw. I. Schmierung.
- 29. VII. 0.
- 30. VII. 0. II. Schmierung.
- 31. VII. Pusteln an der geschmierten Stelle.
- 5. VIII. 0. Blutimpfung auf Mäuse 1973/74.
- 13. VIII. 0. III. Schmierung.
- 18. VIII. 0. IV. Schmierung.

28. VIII. 0. V. Schmierung.
9. IX. 0. Klin. o. B. VI. Schmierung. Mausimpfung vom
5. VIII. 0.
20. IX. 0. Klin. o. B. VII. Schmierung.
30. IX. 0. Klin. o. B. VIII. Schmierung.
1. X. Verändertes Benehmen; Hund mißtrauisch, schwankt beim
Gehen.
2. X. Leichte Schwellung am Kopf. Mausimpfung mit Blut 2161/62.
6. X. 0. Zunehmende Symptome, abnehmende Freßlust.
7. X. †. Sektionsbefund: Milz und Leber vergrößert, Nebennieren
hart und klein. Alle Organe sehr blutreich. Verimpfung von
Blut und Milz auf Mäuse 2171—74.
14. X. Mausimpfung vom 2. X. positiv.
20. X. Mausimpfung vom 7. X. positiv.

In diesem Falle gelang es nicht durch eine systematisch durchgeführte Schmierkur den Hund zu sterilisieren. Obwohl die Trypanosomen gleich im Anschluß an die erste Schmierung aus dem Blute verschwanden und bis zum Tode des Versuchstieres nie wieder mikroskopisch nachgewiesen werden konnten, ergaben die Mausimpfungen vom 5. VIII., 2. X. und 7. X. dennoch ein positives Resultat.

Hund 22.

4. VII. Infektion subkutan.
23. VII. 0.
28. VII. +w. I. Schmierung.
29. VII. 0.
30. VII. II. Schmierung.
31. VII. Pusteln an der geschmierten Stelle.
9. VIII. 0. III. Schmierung.
21. VIII. 0. †. Sektion: Muskatnusleber; starke fettige Degeneration der Leber. Milz klein, Pulpa atrophisch, Trabekel ausgeprägt; Nieren, Herz, Lunge o. B. Verimpfung auf Mäuse: Blut, Milz, Leber 2048—2053.
2. X. Mausimpfung vom 21. VIII. negativ.

Hund 23.

8. VII. Infektion subkutan.
19. VII. 0.
23. VII. +sw. I. Schmierung.
24. VII. +sw. Wenige Pusteln an der geschmierten Stelle.
25. VII. 0. Pusteln abgeheilt. II. Schmierung.
28. VII. 0. III. Schmierung.
29. VII. 0. Mausimpfung 1938/39, am 28. VIII. negativ.
5. VIII. 0.
18. VIII. 0. IV. Schmierung.

- 28. VIII. 0. V. Schmierung.
- 13. IX. 0. Klinisch o. B. VI. Schmierung.
- 23. IX. 0. Klinisch o. B. VII. Schmierung.
- 4. X. 0. Klinisch o. B. VIII. Schmierung.
- 12. XI. 0. Klinisch o. B.
- 12. XII. 0. Klinisch o. B.

Die vor 5 Monaten gesetzte Infektion mit positivem Blutbefund am 23. VII. konnte durch eine systematisch durchgeführte Schmierkur in der Weise beeinflußt werden, daß ohne Auftreten von einem Rezidiv (s. Mausimpfung vom 29. VII.) der Versuchshund zur Zeit als klinisch geheilt betrachtet werden kann.

Hund 24.

- 30. VII. Infektion subkutan.
- 12. VIII. +w. I. Schmierung.
- 13. VIII. +sw (w). II. Schmierung.
- 14. VIII. 0. Viele Pusteln an der Schmierfläche.
- 18. VIII. 0. III. Schmierung.
- 23. VIII. 0.
- 28. VIII. 0. IV. Schmierung.
- 5. IX. 0.
- 13. IX. +. V. Schmierung.
- 15. IX. 0.
- 18. IX. 0. VI. Schmierung.
- 20. IX. 0.
- 23. IX. 0. VII. Schmierung.
- 4. X. 0. VIII. Schmierung.
- 23. X. Verändertes Aussehen; schwach auf den Füßen.
- 25. X. Status idem.
- 27. X. †0. Milz vergrößert. Herzhypertrophie. Alle Organe sehr blutreich. Pankreas groß mit Blutungen durchsetzt. Nebennieren hart, blaß, groß. Därme hyperämisch. Mausimpfung: Blut und Milz 2208—11.
- 10. XI. Mausimpfung vom 27. X. positiv.

Eine viermalige Schmierung vermochte nicht den Hund vor einem Rezidiv (13. IX.) zu schützen. Ebensowenig führten weitere vier Schmierungen eine Heilung herbei.

Hund 25.

- 30. VII. Infektion subkutan.
- 12. VIII. +sw. I. Schmierung.
- 13. VIII. +w. II. Schmierung. Viele Pusteln.
- 14. VIII. +sw. Pusteln.
- 15. VIII. 0. Pusteln.
- 25. VIII. 0. Pusteln abgeheilt.

28. VIII. 0. III. Schmierung.

1. IX. Hund mager, einige Pusteln und wunde Stellen an der Schmierfläche.

5. IX. IV. Schmierung.

20. IX. 0. V. Schmierung. Noch nicht verheilte Wunden an der geschmierten Bauchfläche.

30. IX. VI. Schmierung.

2. X. Hund schwach. †. Blutbefund 0, Milz vergrößert; sonst o. B. Mausimpfung: Blut und Milz 2157—60.

31. X. Mausimpfung vom 2. X. negativ.

Die durch die Schmierbehandlung erzeugte Blutsterilisation hielt bis zum Tode des Versuchstieres an und auch die post mortem mit Herzblut und Milz geimpften Mäuse sind steril geblieben. Es scheint sich trotz der relativ kurzen Beobachtungszeit um eine Dauersterilisation zu handeln. Die Ursache des Todes bleibt trotz Verdachtes auf Antimonvergiftung unsicher.

Hund 27.

6. VIII. Infektion subkutan.

25. VIII. +sw. I. Schmierung.

26. VIII. 0.

1. IX. 0. II. Schmierung.

13. IX. 0. III. Schmierung.

20. IX. 0. IV. Schmierung.

30. IX. 0. V. Schmierung.

25. X. verändertes Aussehen. Schwächegefühl.

30. X. ebenso.

3. XI. †0. Leicht vergrößerte Milz. Nebennieren blaß und weich. Mausimpfung: Blut und Milz 2220—23.

24. XI. Mausimpfung vom 3. XI. positiv.

Auch bei diesem Hunde war der Erfolg der Inunktionsbehandlung der, daß dauernd eine Blutsterilisation erzielt wurde. Trotzdem ging das Versuchstier 89 Tage nach der Infektion zugrunde und beherbergte, wie die mit postmortalem Blut geimpften Mäuse beweisen, noch Trypanosomen im Organismus.

Hund 28.

6. VIII. Infektion subkutan.

19. VIII. +sw. I. Schmierung.

20. VIII. +sw. Pusteln.

22. VIII. 0.

23. VIII. 0.

1. IX. 0. II. Schmierung.

9. IX. 0. Pusteln abgeheilt.

13. IX. 0. III. Schmierung.

23. IX. 0. IV. Schmierung.
 4. X. 0. V. Schmierung.
 6. X. 0. Hund krank. Starke Schmerzen auf Druck in der Leber-
 gegend.
 8. X. 0. Ebenso.
 11. X. †. Sektionsbefund: Pankreas sehr groß. Milz vergrößert.
 Leber hart, vergrößert, sehr blutreich. Alle Organe sehr blut-
 reich. Nebennieren hart, weiß, atrophisch. Oberlappen der
 rechten Lunge mit vielen Blutungen durchsetzt. Verimpfung
 von Blut und Milz auf Mäuse 2180—2183.
 28. X. Mausimpfung vom 11. X. positiv.

Wie aus dem Protokoll hervorgeht, genügte eine fünfmalige
 Schmierung nicht, um eine Dauersterilisierung zu erzielen.

Fassen wir das Ergebnis unserer therapeutischen Ver-
 suche mit Antimonpräparaten an Hunden zusammen, so müssen
 wir zunächst eine anscheinend außerordentlich starke
 Intoleranz der Hunde gegen Antimon feststellen, die
 eine erfolgreiche Durchführung der Antimontherapie bei der

Tabelle
 Dourine-

No. 2	Kontrolle	17. II. Subkutane	24. II. 0	28. II. +sw	11. III. +(w)	3. IV. ++++	8. IV. +sw	23. IV. ++++	
No. 3	Kontrolle	17. II. Infektion	24. II. 0	28. II. +sw	11. III. +(w)				
No. 1		7. I. Infiziert subkut.	1. II. +sw	11. II. ++ ● ¹⁾	12. II. +(+) ● ¹⁾	13. II. +(+)	20. II. ++ Stib. met. 0,5 mg pro 10 g Ge- wicht	21. II. 0	4. III. 0
No. 4		17. II. Infiziert subkutan	24. II. +sw	26. II. +sw ● ¹⁾	28. II. 0● ¹⁾	11. III. 0	27. III. 0	29. IV. 0	
No. 5		17. II. Infiziert subkutan	24. II. 0	26. II. +sw ● ²⁾	28. II. 0● ²⁾	11. III. +w	14. III. +w, 2 mg Antimon- trioxyd pro 10 g Ge- wicht i. m.	27. III. 0	
No. 6		17. II. Infiziert subkutan	24. II. 0	26. II. +sw● ²⁾	28. II. 0● ²⁾	11. III. +w	14. III. +w 2mg Anti- montrioxyd pro 10 g Gew. i. m.		

- 1) ● = Schmierung mit 40-proz. Dimethylphenylpyrazolonantimon-
 2) ● = Schmierung mit 50-proz. Antimon-metallicum-Salbe.

Trypanosomeninfektion bei dieser Tierart erschwert. Prinzipiell bleiben aber die von uns niedergelegten Methoden der Behandlung von Trypanosomeninfektionen mit unlöslichen depotbildenden Mitteln bestehen. Sowohl die mit vollem Erfolg durchgeführten Behandlungen mit Antimontrioxyd und der Antimonsalbe bei anderen Tierarten als auch die Heilerfolge, die wir an Hunden (s. Hund 28) erzielt haben, sprechen dafür, daß wir gerade in den wasserunlöslichen depotbildenden Antimonverbindungen besonders wertvolle therapeutische Mittel zur Behandlung der chronischen Trypanosomeninfektionen besitzen. Vielleicht gelingt es aber auch bei Hunden durch Anwendung der intravenösen Einführung von kleineren Dosen des Antimontrioxyds eine womöglich noch verstärkte Dauerwirkung bei Vermeidung der Intoxikationserscheinungen zu erzielen, eventuell unter Heranziehung von Hexatantalat, um das therapeutisch überschüssige, deponierte Antimon zu neutralisieren.

XIII.

Meerschweinchen.

28. IV. +sw	30. IV. +sw 2 mg Antimontrioxyd pro 10 g Gewicht	2. V. 0	11. VI. 0	31. VII. 0	25. VIII. 0	10. IX. †0. Sektion: Lungen hyperämisch. Herz o. B. Nieren o. B. Nebennieren groß, gelb. Schwangerer Uterus. Peritonitis mit wenig Exsudat. Mausimpfung 2092—93. 20. X. Mausimpfung vom 10. IX. 0				
10. V. 0	19. V. 0	11. VI. 0	31. VII. 0	22. VIII. 0	8. IX. †0. Pseudotuberkulose. Mausimpfung 2088, 2089	9. X. Mausimpfung vom 8. IX. 0				
29. IV. 0	10. V. 0	11. VI. 0	31. VII. 0	22. VIII. 0	5. IX. 0	18. IX. †0. Sektion: o. B., nur vergrößerte Nebennieren. Milz klein. Mausimpfung 2117—2120. Blut und Milz negativ	21. X. Mausimpfung vom 18. IX. negativ			
27. III. 0	29. IV. 0	10. V. 0	19. V. 0	11. VI. 0	31. VII. 0	22. VIII. 0	22. IX. 0	5. XI. 0	12. XI. 0	lebt am 12. XII.

trichlorid-Salbe.

Meerschweinchenversuche.

Die therapeutischen Versuche an dourineinfizierten Meerschweinchen wurden zum weitaus größten Teile durchgeführt mit Antimontrioxyd. Letzteres wurde ausnahmslos in Form der öligen Emulsion intramuskulär gegeben und wurde mit Ausnahme einer lokalen reaktiven Schwellung, die nach relativ kurzer Zeit verschwand, anstandslos vertragen. Auch konnten wir bei den verabfolgten Gaben (s. Tabelle) keine chronischen Vergiftungserscheinungen mit Sicherheit fest-

Dourine-

	24. V.	2. VI.	10. VI.	14. VI.	18. VI.	21. VI.	29. VII.	4. VIII.	14. VIII.
Kr. 420 g		.	+sw	+ sw, 84 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0
Nack. r. 470 g Kontrolle		.	0	0	0	+sw	+sw Klinisch krank	.	+sw(w)
Rück. r. 380 g		.	+sw	+ w, 76 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0
Steiss r. 450 g		.	+sw	+ w, 90 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0
r. Vordb. rot 400 g Kontrolle		.	0	0		+sw	+sw Klinisch krank	++	
l. Hinterb. r. 500 g		.	+sw	+ sw, 100 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0
r. Hinterb. r. 420 g		.	0	+ w, 84 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0
Nase bl. 450 g		.	0	+ sw, 90 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0
Rück. bl. 420 g		.	0	+ sw, 84 mg Sb.-Trioxyd i. m.	0	.	0	.	0

Subkutane Infektion

stellen. Die therapeutischen Erfolge waren äußerst günstige, und es gelang mit einer einmaligen Injektion, die Versuchstiere mit Ausnahme von einem Falle dauernd zu sterilisieren. Leider ging uns ein nicht unbeträchtlicher Teil der Versuchstiere an einer ausgebrochenen Stallepidemie (Pseudotuberkulose und Pneumonie) vorzeitig zugrunde, doch blieben auch in diesen Fällen die postmortal durchgeführten Mauseimpfungen steril.

Auf p. 464—469 bringen wir einige Auszugstabellen unserer therapeutischen Versuche an Meerschweinchen.

Meerschweinchen vom 24. V.

18. VIII.	26. VIII.	6. IX.	8. IX.	5. XI.	
.	.	.	.	0	lebt am 12. XII.
.	† +sw. Milz groß. Peritonitis mit eitr.-fibrinös. Belag	.	.	24. IX. †0. Milz nicht vergröß. Maus- impf. 2131—32	21. X. Maus- impf. v. 24. IX. 0
†. Sektions- befund o. B. Mauseimpf. 2044—45	.	22. IX. Mauseimpf. vom 18. VIII. negativ	.	.	.
0	.	.	.	10. X. †0. Befund o. B., nur Nebennieren vergrößert. Maus- impfung. Blut u. Milz. 2184—2187	5. XI. Maus- impfung vom 10. X. 0
0	.	.	†0. Sektion. Gra- viditas. Uterus entzündet. Peri- tonitis. Maus- impf. 2090—91	.	7. X. Maus- impfung vom 8. IX. 0
0	.	.	.	0	lebt am 12. XII.
0	.	†0. Pseudo- tuberkulose. Mauseimpf. 2080—81	.	9. X. Mauseimpfung vom 6. IX. 0	.

Dourine-

	14. VI.	26. VI.	30. VI.	5. VII.	7. VII.	29. VII.
St. r. 440 g	infiz. subkut.	0	0	0	+ w, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Gew. i. m.	0
Nase r. 550 g	„	0	0	+ sw	+ sw, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Gew. i. m.	0
l. Hinterb. r. 420 g	„	0	0	0	+ sw, 2 mg dgl.	† 0 Pneu- monie
Nase grün 580 g	„	0	+ sw	+ sw (w)	+ sw, 2 mg dgl.	0
Nack. gr. 580 g	„	0	0	+ sw	+ sw, 2 mg dgl.	† 0 Pseudo- tuberkulose
Rück. gr. 650 g	„	0	+ sw	+ sw	+ sw, 2 mg dgl.	0

	14. VI.	24. VI.	27. VI.	7. VII.	9. VII.	14. VII.	18. VII.	21. VII.	22. VII.
R. r.	0	0	0	+ w, 2 mg Sb.-Trioxyd i. m. pro 10 g Gewicht	0	† 0			
St. r.	0	0	0	+ sw, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Ge- wicht	0	.	.	.	† Sektion o. B. Milz kl. Lungen hyperäm. Maus- impf. 1907—ab
Nas. Rück. r. Kontrolle	0	0	0	0	0	.	.	+ sw	.
R. bl.	0	0	0	+ sw, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Ge- wicht	0
St. bl	0	+ sw	0	+ sw, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Ge- wicht	0
K. gr.	0	0	0	+ sw, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Ge- wicht	0
St. gr.	0	+ sw	0	+ sw, 2 mg Sb.-Trioxyd pro 10 g Gew.	0	.	† 0 Sektion o. B. Milz kl. Maus- impf. 1882—85	.	18. VIII. Mausimpfung vom 18. VII. 0

Meerschweinchen vom 14. VI.

2. VIII.	14.VIII.	29.VIII.	6. IX.	5. XI.
† 0 Pseudo- tuberkulose	0	† Pseu- dotuber- kulose		0 lebt am 12. XII.
	0		† 0. Sektion: Milz klein, Andeutung von Muskatnußleber. In der r. Lunge Eiterherd. Pericarditis serosa, Peritonitis serofibrinosa; vergrößerte rote Neben- nieren. Mausimpfung 2078—79	3. X. Mausimpfung vom 6. IX. negativ

29. VII	5. VIII.	7. VIII.	11.VIII.	15. IX.	5. XI.	8. XI.
	19. VIII. Mausimpf. vom 22. VII. 0					
0	† 0 typischer Dourinebefund.				0	† 0 Mausimpf. 2240—43
0						26. XI. Mausimpf. v. 8. XI. positiv
0					0	lebt am 12. XII.
			† 0 große Cyste an d. Bauchseite, r. mit Eiter gef. Milz klein, Pleu- ritis. Mausimpf. 2102—03		21. X. Mausimpf. vom 5. IX. 0	

Tabelle XIV.

Kan. grau, l. Ohr rot	9. VI. Inf. subcon- junctival, r. Auge	16. VI. Ob. r. Lid stark ge- schwollen. Con- junctiva gerötet, geschwollen. Eite- riges Sekret im Con- junctivalsack	12. VII. R. Befund wie am 16. VI. nur stärker. L. normaler Befund. Hoden u. Penis o. B.	14. VII. I. Schmie- rung. Anti- monpyra- zolon-salbe	30. VII. R. Lidspalte ganz klein. Lidränder ge- schwollen, haarlos. Sekret. 100 mg Antimon- trioxyd i. v.
Kan. schwarz, l. Hinterbein rot	9. VI. Infektion durch die Vorderkam- mer, durch die Linse in den Glaskörper, l. Auge	11. VI. L. Hornhaut nor- mal. Luxatio len- tis. Katarrhakt. Ueber der Linse ge- trübter Glaskörper sichtbar	16. VI. L. Conjunctiva stark injiziert. Linse vollstän- dig weiß. Cornea etwas trübe	12. VII. L. Augenlider stark geschwol- len. Augäpfel kaum sichtbar. Eiteriges Sekret. Hoden ge- schwollen	16. VII. Status idem. I. Schmierung. Antimonpyra- zolon-salbe 20 Proz.
Kan. grau, l. Ohr blau	9. VI. Infekt. durch Cornearitz- ung, l. Auge	11. VI. o. B.	16. VI. Leichte Se- kretion am l. Auge, sonst o. B.	12. VII. Penis geschwollen, geschwollen, gerötet. Aug- äpfel normal. Mausimpfung 1850-51 am 27. VII. +	16. VII. L. u. r. Augenlider ge- schwollen, gerötet. I. Schmierung. Antimon- pyrazolon-salbe 20 Proz.
Kan. gelb, l. Ohr blau r. Ohr rot	6. VIII. Infektion subkutan	21. VIII. Hoden vergrößert. Hoden- punktat + 100 mg Antimon- trioxyd i. v.	3. IX. Hoden noch immer vergrößert. Prae- putium geschwollen. Augen normal. 100 mg Antimontrioxyd i. v.		
Kan. weiß, r. Vorderbein grau	23. VI. Infektion subkutan	3. VII. Maus- impfung 1800-01	16. VII. Mausimpfung v. 3. VII. + I. Schmierung. Antimonpyrazolon- Salbe 20 Proz.	16. VIII. Maus- impfung 2025-26	20. VIII. Praeputium stark geschwollen, Serotum mit Krusten und Borken bedeckt. Ohren öde- matös. Nase und Schnauze haarlos, eiteriges Nasensekret. Lider r. und l. kolossal ge- schwollen. Augäpfel kaum sichtbar
Kan. grau- gelb, beide Vorderf. rot	6. VIII. Infektion subkutan	21. VIII. Klin. o. B. 2062-63.	Mausimpfung	Mausimpfung vom 21. VIII. positiv. L. Augenlid geschwollen, sonst klin. o. B. 100 mg Antimontrioxyd i. v.	3. IX.
Kan. grau, r. Hinterbein rot	21. V. Infektion in die vordere Augenkam- mer, r. Auge	2. VI. Conjunctiva, r. ge- rötet, Katarrhakt. Trübung der Cor- nea. Hoden nicht vergrößert	12. VI. Mausimpfung 1704-03	23. VI. Mausimpfung v. 12. VI. positiv	30. VI. Augenbefund zu- rückgegangen. Ho- den geschwollen. Serotum prall, mit Borken bedeckt

Dourine-Kaninchen.

7. VIII. R. Lidspalte normal. Keine Eiterung mehr	13. VIII. L. u. r. Auge normal, klar. Mausimpfung 2001-02 am 11. IX. 0	50 mg Trioxyd i. v.	20. VIII. Klin. o. B., r. Augenlid normal bis auf geringe Borke	11. IX. R. Auge, Behaarung fast normal. Lider r. normal. Mausimpfung 2100-01 am 21. X. 0	3. XI. o. B. Mausimpfung 2224-25 am 13. XII. negativ	
30. VII. Hoden geschwollen. Scrotum teils nekrotisch, l. Augenlider stark geschwollen, gerötet. Eiterig. Sekret. Katarrhakt stationär. 100 mg Antimontrioxyd i. v.	7. VIII. Hodenschwellung deutl. zurückgegangen. Auch die Augensymptome wesentlich besser	13. VIII. Cornea getrübt, noch leichte Eiterung. Scrotum nekrotisch. Nase ohn. Behaarung. 50 mg Antimontrioxyd i. v. Mausimpf. 1999-2000 am 11. IX. 0	20. VIII. L. Lider blaß, reaktionslos, keine Eiterung. Hoden reparatorische Vorgänge. Behaarung beginnt	11. IX. Befund normal. Der nekrotische Hoden wird abgebunden. Mausimpfung 2098-99 am 21. X. 0	3. XI. Klin. ganz gesund. Der abgebundene Hoden abgefallen. Mausimpfung 2226-27 am 13. XII. negativ	
30. VII. L. Hoden geschwollen, r. Hoden normal. Penis und Präputium geschwollen. l. Lider stark geschwollen u. gerötet, haarlos, r. gleicher Befund, nur schwächer. 100 mg Antimontriox. i. v.	7. VIII. Hodenschwellung zurückgegangen. Penis abgeschwollen, ebenso Augenlider	13. VIII. Alle Symptome bis auf den Haarausfall geschwunden. Mausimpfung 2003-04 am 11. IX. 0	20. VIII. Klin. o. B.	11. IX. Klin. o. B. Mausimpfung 2096-97 am 21. X. 0	3. XI. Klin. o. B. Mausimpfung 2228-29 am 13. XII. negativ	
18. IX. Klinisch gesund	22. IX. Klinisch gesund	3. XI. Klinisch gesund Mausimpfung 2230-31	12. XII. Mausimpfung vom 3. XI. 0			
100 mg Antimontrioxyd i. v.	25. VIII. Sämtliche Symptome bis auf den Haarausfall geschwunden	5. IX. †. Sektion: Milz nicht vergrößert. Leber vergrößert, von lehmartigem Aussehen. Peritonitis. Mausimpfung 2076-77	8. IX. Mausimpfung vom 5. IX. †0 an Bakteriämie			
18. IX. L. Lider noch geschwollen und gerötet. Vagina geschwollen	22. IX. Stark abgemagert. Status idem	1. X. †. Sektionsbefund: o. B. Verimpfung von Blut und Milz auf Mäuse 2153-56	22. X. Mausimpfung vom 1. X. positiv			
10. VII. Lider geschwollen. Hoden status idem	16. VII. I. Schmierung, Antimonpyrazolonsalbe 20 Proz.	30. VII. 100 mg Antimontrioxyd i. v., Befund wie am 10. VII.	13. VIII. Mausimpfung 2911-12	20. VIII. Hoden weich von normaler Größe. Penis normal, klin. o. B.	13. IX. Mausimpfung v. 13. VIII. negativ	12. XI. Klinisch o. B. Mit Ausnahme des bestehenden traumatischen Katarrhaktes keinerlei Symptome. Mausimpfung 2248-49 am 12. XII. 0

Bei einem weiteren Teil der dourineinfizierten Meerschweinchen gaben wir das Antimontrioxyd, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, intravenös bzw. intrakardial. Auch diese Applikationsart wurde von den Tieren gut vertragen und war die Wirkung eine prompte. Ob man bei der intravenösen Einführung zur Erzielung einer Dauersterilisation bei Meerschweinchen eventuell mit kleineren Dosen auskommen kann, muß die weitere Beobachtung ergeben.

Therapeutische Versuche an Kaninchen.

Eine große Reihe von Heilversuchen sind von uns angestellt worden an Kaninchen, die mit Nagana und Dourine

Tabelle XV.

Kan.-Stirn rot 1860	16. V. Infektion	26. V. Beide Hoden prall gespannt u. heiß. Im Hodenpunktat Trypanosomen. 400 mg Antimontrioxyd (1 ccm Trixid i. m.)	27. V. Hoden bedeutend weicher	2. VI. Hoden wieder normal. Mausimpfung am 9. VI. +++
Kan., r. Ohr rot	16. V. Infektion	agl.	agl.	agl. Mausimpfung 1571, 1572 am 9. VI. +++
Kan. schwarz l. Ohr bl.	10. VI. Infektion	9. VII. l. Lider geschwollen. Erste Schmierung. Antimonpyrazolon-Salbe 20 Proz. Mausimpfung 1832, 1833 am 15. VII. +++	20. VIII. r. Lider ganz geschwollen u. gerötet: Umgebung des Auges haarlos. l. gleicher Befund. Nase u. Schnauze haarlos. Penis und Hoden normal. 100 mg Antimontrioxyd i.v.	
Kan. l. Ohr rot. Kontrolle	10. VI. Infektion	18. VI. klinisch o. B.	9. VII. stark abgemagert. Mausimpf. † 1830, 1831	15. VII. Mausimpfung vom 9. VII. positiv

Aus der Tabelle XIV (p. 470/71) geht hervor, daß es mit Ausnahme von einem Falle durch intravenöse Einführung verhältnismäßig kleiner Antimontrioxydgaben gelingt, dourineinfizierte Kaninchen dauernd zu sterilisieren.

Die Tabelle XV zeigt, daß dort, wo das Antimontrioxyd bei intramuskulärer Injektion vertragen wird, es auf diese Weise gelingt, die Naganainfektion zu heilen.

infiziert waren. Die im Beginne unserer Versuche durchgeführten intramuskulären Einführungen des Antimontrioxyds in Form der öligen Suspension führten, wie bereits in der Einleitung hervorgehoben, zu Abszeßbildung, die eine Urteilsfällung über den therapeutischen Wert infolge eines meist frühzeitigen Todes erschweren, bzw. in Frage stellen.

Wir verzichten daher auf die Wiedergabe der zahlreichen diesbezüglichen Versuchsprotokolle.

Recht eindeutig sind hingegen die Befunde, die wir bei Behandlung der nagana- bzw. dourineinfizierten Kaninchen erzielten bei intravenöser Einführung des Antimontrioxyds (siehe Tabelle XIV auf p. 470/71 und Tabelle XV).

Nagana-Kaninchen.

4. VI. Im Hodenpunkt keine Trypanosomen	21. VI. Abszesse an den Injektionsstellen	27. VI. Abszesse eröffnet 150 mg Trypanrot subkutan	9. VII. †. Sektion: Milz klein. Leber o. B., sonst o. B. Mausimpfung 1826, 1827	8. VIII. Mausimpfung v. 9. VII. 0
	21. VI. keine Abszesse an den Injektionsstellen	27. VI. 200 mg Antimontrioxyd (0,5 ccm Trixid i.m.) + 300 mg Trypanrot subkutan	15. VII. an der Injektionsstelle des Trypanrots Abszesse, klin. o. B.	7. XI. ganz gesund, sehr fett geworden. Mausimpfung 2232, 2233 am 12. XII. 0
23. VIII. wesentl. Besserung, speziell d. Augenbefundes	25. VIII. Besserung anhaltend. Symptome mit Ausnahme des Haarschwundes verschwunden		7. XI. ganz gesund, fett geworden. Behaar. norm. Mausimpfung 2234, 2235 am 12. XII. 0	

Auch die Prüfung des Antimontrioxyds auf seinen prophylaktischen Wert bei Kaninchen und Meer-schweinchen ergab, wie die untenfolgende Tabelle XVI zeigt, daß es gelingt, durch vorherige intravenöse Injektion verhältnismäßig kleiner Gaben das Angehen der Dourineinfektion zu verhindern. Die erzielten Resultate bestätigen vollauf unsere Erfahrungen, die wir bei Prüfung der prophylaktischen Wirkung bei dourineinfizierten Mäusen erheben konnten.

Tabelle XVI.
Prophylaktisch Trioxidin i. v.

	2.VIII.	6. VIII.	3. IX.	22.IX.	7. X.	4. X.	8. X.	7. XI.	12. XII.
Kan. weiß beide Ohren gr.	30mg	infiz. Dourine	klin. o. B.	klin. o. B.	Maus- impf. vom 3. IX. 0	† Sektion o. B. Maus- impfung 2161—64	.	Mausimpf. v. 4. X. 0	
Kan. gelb r. Ohr grün	50mg	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	klfn. o. B.	klin. o. B.	klin. o. B. Mausimpf. 2236—37	Mausimpf. v. 7. XI. 0
Kan. grau l. Ohr gr. r. Ohr bl.	100mg	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	klin. o. B.	klin. o. B.	klin. o. B. Mausimpf. 2238—39	Mausimpf. v. 7. XI. 0
		31. VII.	6. VIII.	23. VIII.	29. VIII.	11. IX.	12. XI.	15. XII.	
Meerschw. Nase rot	50 mg i. v.	inf. Dourine	0	0	0	0	0	0	
Meerschw. Nacken rot	30 mg i. v.	dgl.	0	0	0	0	0	0	

Zusammenfassung.

In den vorstehenden Untersuchungen sind die Ergebnisse unserer chemotherapeutischen Studien der Behandlung von experimentellen Trypanosomeninfektionen mit unlöslichen Antimonpräparaten bei größeren Laboratoriumstieren zusammengezogen.

Es hat sich gezeigt, daß das bei Mäusen so außerordentlich stark therapeutisch wirksame Antimontrioxyd auch für die Behandlung der chronischen Trypanosomeninfektion bei größeren Tieren als Therapeuticum in Betracht kommt, speziell da, wo es möglich ist, die lokale Abszeßbildung, verursacht durch intramuskuläre Injektion, durch intravenöse Einführung zu vermeiden. Auch die Kombination des Antimontrioxyds mit anderen löslichen, schnell wirkenden Trypanosomenmitteln dürfte für eine erfolgreiche Behandlung der Trypanosomeninfektion in Betracht kommen.

Bezüglich der Salbenbehandlung mit unlöslichen organischen Antimonpräparaten konnten wir an dourineinfizierten Hunden den Beweis erbringen, daß es auch allein durch diese

Behandlung gelingt, den Krankheitsprozeß günstig zu beeinflussen. Eine recht hochgradige Intoleranz gegen Antimonpräparate, wie wir sie gerade bei Hunden bzw. bei derjenigen Tierspecies, die wir zu den Salbenversuchen benutzt haben, beobachten konnten, gestattet nicht ein endgültiges Urteil zu fällen über die Möglichkeit, mit Hilfe der Salbenbehandlung bei anderen größeren Tieren Dauerheilungen zu erzielen.

Die bereits in der ersten Mitteilung aufgestellten Prinzipien der Therapie von Trypanosomeninfektionen mit unlöslichen, depotbildenden Mitteln müssen wir auch auf Grund dieser Versuche als eine Bereicherung unserer therapeutischen Maßnahmen bei chronischen Trypanosomen betrachten, vor allem die Kombinationstherapie.

Nachtrag bei der Korrektur.

Nach Abschluß der Arbeit erhielten wir eine briefliche Mitteilung von Geheimrat Prof. Dr. von Ostertag über die Erfolge der Behandlung von natürlich trypanosomeninfizierten Rindern mittels Trixidins. Bei den von Ostertag und Veterinärbakteriologe Wölfel in Ostafrika ausgeführten Versuchen hat das Mittel seine starke therapeutische Wirksamkeit gezeigt, da die mit dem Präparat behandelten Rinder ca. 2 Monate nach Abschluß der Behandlung trypanosomenfrei geblieben sind.

Zur Entscheidung der Frage, ob eine Dauersterilisierung bei den mit Trixidin behandelten Tieren erzielt worden ist, sollen die Beobachtungen in Deutsch-Ostafrika weiter fortgeführt werden, über deren Resultat Herr Dr. Wölfel auf Veranlassung von Geheimrat Ostertag uns noch berichten wird.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Pathologischen Institut der Universität Jena
(Direktor: Prof. Rössle).]

Ueber lokale gewebliche Anaphylaxie.

Von **cand. med. Arthur Fröhlich.**

Mit 1 Tafel, 2 Kurven und 3 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 3. Dezember 1913.)

Da nach den bisherigen Ergebnissen der Anaphylaxieforschung eine spezifische Verankerung des Giftes an bestimmte Organe nicht festgestellt werden konnte, insbesondere da alle Versuche, anaphylaktische Reaktionskörper im Gehirn, Rückenmark, Leber, Milz, Niere, Nebenniere etc. nachzuweisen vollkommen negativ verliefen und selbst Exstirpation des Großhirns, Durchschneidung des Halsmarkes und des Vagus einen Einfluß auf den Eintritt des anaphylaktischen Shockes und damit einen zentralen Ausgangspunkt für diesen nicht erkennen ließen, mußte dem Gedanken Raum gegeben werden, daß es sich bei dem anaphylaktischen Zustande um eine allgemeine Eigenschaft des Körpers handeln könnte, ein Standpunkt, der schon mehrfach von den Autoren, besonders aber von Friedberger vertreten worden ist. Mithin mußte die Reaktion auf Anaphylatoxin nicht allein durch intravenöse Reinjektion homologer Sera, sondern auch durch lokale Applikation auf eine beliebige Körperstelle auslösbar sein.

Auf Veranlassung von Herrn Prof. Rössle unterzog ich mich der Aufgabe, experimentelle Untersuchungen darüber anzustellen.

Zu diesem Zwecke erschien das Mesenterium des Frosches im Cohnheimschen Versuch als ein geeignetes Objekt, nachdem von Friedberger und Mita die Möglichkeit der Sensibilisierung auch von Kaltblütern, speziell der Frösche, nachgewiesen war¹⁾.

1) Nach Abschluß der Arbeit erschien eine Mitteilung von Friedberger, Gröber und Galambos (s. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, 1913) über Versuche mit Vagotomie bei sensibilisierten Meerschweinchen, wodurch die Autoren eine Verminderung der anaphylaktischen Symptome

Ueberdies bot gerade die Cohnheimsche Versuchsanordnung besondere Vorteile, da die hier auftretenden Phänomene zum ersten Male mit dem Mikroskop direkt verfolgt und in ihrem pathologisch-anatomischen Geschehen sicherer gedeutet werden konnten, während unsere bisherigen Kenntnisse über Anaphylaxie ihren Ursprung vorwiegend in klinischen Beobachtungen haben, die in wenigen Fällen von Menschen, in den meisten von Tierexperimenten gewonnen waren, zumal auch die Sektionsbefunde akut verendeter Tiere (Otto, Gay und Southard) den ursächlichen Zusammenhang der Dinge nicht aufzudecken vermochten.

Nach ihren Versuchen mit intravenöser Reinjektion an Sommerfröschen (an Winterfröschen ist Friedberger und Castelli die Erzeugung der Anaphylaxie nicht gelungen) zogen Friedberger und Mita den Schluß, daß als charakteristisches Symptom des Shocks außer schweren allgemeinen Erscheinungen eine Beeinflussung der Zirkulation (Pulsverlangsamung von 40 auf 18 in 3 Stunden) und speziell eine Schädigung des Herzens in den Vordergrund tritt. Diese letztere Erscheinung haben die beiden Autoren dann am isolierten Froschherzen in der Versuchsanordnung von Straub weiter verfolgt, mit dem Erfolge, daß sie nach jedesmaliger Applikation von Anaphylatoxin eine Verlängerung der Diastole bis zu vollständigem Stillstande des Herzens in dieser Phase erhielten.

Handelte es sich bei dieser Erscheinung um eine spezifisch nur am Herzen lokalisierte Ueberempfindlichkeit, so mußte auch bei andersartiger als intravenöser Anwendung des Anaphylatoxins eine direkte Beeinflussung des Herzens in den Versuchen bemerkt werden. Stellte jedoch die Anaphylaxie eine allgemeine Eigenschaft des Körpers dar, so mußten sich die Versuchsergebnisse am Herzen bei Wahl eines anderen Applikationsortes ändern; in diesem Falle mußte also die Reaktion am Herzen als eine experimentell bedingte lokale Auslösung der allgemeinen Ueberempfindlichkeit des Tierkörpers aufgefaßt werden.

erzielten. Da jedoch trotz Vagotomie, besonders bei großen Reinjektionsdosen der unveränderte Shock eintrat, so kann erst aus weiteren Versuchen ersehen werden, worauf die Gegensätze der Autoren beruhen.

Daß wir bei der Froschanaphylaxie nicht die gleichen Symptome wie bei der Warmblüteranaphylaxie erwarten dürfen, ist wohl ohne weiteres einleuchtend. Müssen doch insbesondere beim Kaltblüter naturgemäß sämtliche Erscheinungen des Temperatursturzes, der schweren Lungenschädigung und, infolge unserer mangelhaften Kenntnisse darüber, eines etwaig veränderten Blutbildes fehlen. Zum Beweise, daß meine Tiere tatsächlich anaphylaktisch waren, hatte ich demnach als sicher anerkannte Kriterien nur die Phänomene einer Gefäßerweiterung, hervorgerufen durch das hypothetische Vasodilatin, die Bildung eines spezifischen Oedems und einer Blutdrucksenkung zur Verfügung. Dabei mußte erstmalig der Befund erhoben werden, ob diese Erscheinungen auch bei Kaltblütern Symptome spezifisch-anaphylaktischer Natur darstellten.

Technik.

Eine große Schwierigkeit bestand zunächst darin, gute Frösche zu erhalten. Bei den zuerst aus einer Tierhandlung bezogenen Exemplaren zeigte sich infolge der schlechten Qualität eine derartige Empfindlichkeit schon gegen das Trauma der Versuchsanordnung (Cohnheim'scher Versuch), daß die Erlangung von gleichwertigen Resultaten von vornherein in Frage gestellt war. Ist es doch eine bekannte Tatsache (Cohnheim u. a.), daß zwei Frösche außerordentlich verschieden stark auf den gleichen Reiz reagieren können; um wie viel mehr mußte dies bei schlechter Qualität in den Experimenten am empfindlichen Mesenterium in Erscheinung treten. Diesem Mangel abzuhelfen, gelang mir dadurch, daß ich nur frisch persönlich eingefangene Tiere derselben Gegend verwendete, die unter ganz gleichen Bedingungen in Tontöpfen mit Wasserpflanzen und etwas Wasser, das jeden dritten Tag erneuert wurde, kühl und dunkel gehalten wurden. Ohne besondere Fütterung kann man sie so bequem über 5 Wochen lang frisch erhalten.

Die Verwendung von nur männlichen Tieren ist zwar durch die einfacheren Verhältnisse gegeben, doch konnte ich bei einiger Vorsicht ebensogut auch weibliche Tiere verwenden. Für den Versuchszweck wurden die Frösche curarisiert.

Etwas Curare wird im Mörser ganz fein pulverisiert, davon mit steriler 0,8-proz. Kochsalzlösung eine 1-proz. Stammlösung hergestellt und 3 bis 4 Tage im Thermostaten bei 37° unter häufigem Umschütteln gehalten. Darauf wird filtriert, wobei man eine absolut klare und haltbare Flüssigkeit von goldgelbem Aussehen erhält, die mit der Zeit einen belanglosen Bodensatz aufweist. Diese Stammlösung wird zum Versuch im Verhältnis von 1:10 mit Kochsalzlösung verdünnt. Davon genügt für einen kräftigen Frosch eine Menge von 0,1–0,2 ccm (also 1:10 000 bis 1:5000) in den Rückenlymphsack, um ihn in 1–2 Stunden unbeweglich zu machen, auf die Dauer von ca. 24 Stunden, die man ohne Schaden durch Nachspritzen ganz kleiner Mengen verlängern kann. Bei dieser Zubereitung von Curare habe ich niemals einen Versager oder zu starke Vergiftung an den Tieren gesehen.

Zu der Ausführung des Cohnheimschen Versuches sei folgendes erwähnt:

An dem curarisierten Tier macht man mit einer scharfen Schere einen Schnitt in der linken Bauchseite. Es ist von Wichtigkeit, daß der Schnitt nur ca. 1½ cm von der Schenkelbeuge nach oben reicht, da sonst stark blutende Gefäße verletzt werden, deren Stillung oft schwierig ist. Dann wird die Muskulatur durchtrennt, und kurze Zeit ein kleiner Kochsalzwattetampon in die Oeffnung gesteckt, um jede Verunreinigung mit Blut zu vermeiden. Der vorliegende Teil ist gewöhnlich der Magen. Diesen zieht man heraus, um Platz zu bekommen. Dann geht man mit einer Pinzette bis in die rechte Bauchseite unterhalb der Leber, und sucht den Dickdarm zu fassen (kenntlich an seiner schwärzlichen Farbe) und zieht ihn heraus. Es gelingt dann leicht, von hier aus die einzelnen Schlingen des Dünndarms bis zu seiner oberen Fixationsstelle herauszuziehen. Bei weiblichen Tieren muß man noch die Eileiter und Ovarien vorher herausholen. Die nicht gebrauchten Teile bringt man in die Bauchhöhle zurück.

Am geeignetsten ist der obere Teil des Dünndarmes, da im unteren das Mesenterium oft sehr stark mit Pigmentzellen versehen ist. Das Mesenterium des Darms wird nun von seinem oberen Teile an vorsichtig auf einer rechteckig ausgeschnittenen Korkplatte ausgespannt, am besten mit Igelstacheln, die man leicht kurz schneiden kann. Nachdem man sich noch einmal von der ganz gleichmäßigen Ausspannung des Mesenteriums überzeugt hat, ist das Tier zum Versuch fertig.

Bemerkt sei noch, daß, wenn man eben frisch gefangene Frösche verwendet, man sehr viele Stase in den kleinen Gefäßen, unregelmäßige Kontraktion mit sichtbarer Aenderung des Gefäßvolums und oft sich umkehrende Stromrichtung des Blutes beobachtet, Erscheinungen, für die in dem noch wohlgefüllten Darne der frischen Tiere die physiologischen Verdauungsreize verantwortlich zu machen sind, wodurch aber

ein exaktes Experimentieren bisweilen unmöglich ist. Es ist daher zweckmäßig, nur Tiere nach einer Gefangenschaft von 4—5 Tagen zu gebrauchen, da der Darm dann fast leer und frei von diesen Sensationen ist. Jedoch erhält man auch so einmal ein Mesenterium, das reichlich Stase zeigt, die aber meist auf Rechnung der Prozedur beim Aufstecken und Aufspannen des Darmes zu setzen ist. Man läßt solche Frösche am besten 1—2 Stunden in einer feuchten Kammer liegen, mit dem Erfolge einer guten Wiederherstellung der Blutzirkulation. Da nach Friedberger und Mita die anaphylaktischen Erscheinungen bei Sommerfröschen sinnfälliger verlaufen, muß diesem Faktor besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Meine Versuche führte ich teilweise im Juni, August und September an ca. 80 Fröschen aus.

Die Sensibilisierung geschah nach den Vorschriften Friedbergers durch Injektion von Blutseris, teils vom Schwein und Hammel gewonnen, in der Dosis von 0,1—0,5 ccm in den Rückenlymphsack. Von dem 7. Tage ab nach der Injektion wurden die Tiere dann zu den Anaphylaxieversuchen verwendet.

Am günstigsten scheint mir nach den bisherigen Erfahrungen der 8.—15. Tag nach der Injektion zu sein. Nach dieser Zeit fiel oft eine trägere Reaktion auf das homologe Serum auf, die auf abnehmende Sensibilität gegen das Gift schließen läßt; ebenso wie auch der hemmende Einfluß von kalter Witterung und dunklem Aufbewahrungsort unverkennbar war.

Das homologe Serum wurde teils aufgetropft, teils in getrockneter Form als Serublättchen auf das Mesenterium gelegt, da es mir vor allen Dingen auf Lokalreaktion ankam, die natürlich bei flüssigem Serum nie so lokalisiert beobachtet werden kann. Das Serum wurde unter aseptischen Kautelen über Schwefelsäure vorsichtig ausgetrocknet. So erhält man ein absolut klares Material, das infolge des Flüssigkeitsverlustes konzentriert ist und einen relativ hohen Kochsalzgehalt aufweist. Diesem Kochsalzgehalt des Serums muß selbstverständlich Rechnung getragen werden, da das Kochsalz selbst infolge seiner hygroskopischen und anderen Eigenschaften gewisse Erscheinungen hervorruft, auf die ich noch genauer zurückkommen werde. Da sich jedoch dieser Faktor durch

alle Versuche gleichmäßig hindurchzieht, kommt er bei den Vergleichsresultaten als konstante Wirkung in Wegfall. Die Menge des aufgelegten Serums betrug schätzungsweise $\frac{1}{6}$ mg.

Zur Darstellung der Nerven bediente ich mich der vitalen Methylenblaufärbung ($\frac{1}{4}$ -proz. Lösung) nach Ehrlich und der Methode mit Rongallitweiß (Dr. Grübler) nach Kreibig. Diese Lösungen wurden intra vitam aufgetropft und die Färbung teilweise nach Unterbindung des Darmes und Abschneiden supravital fortgesetzt. Ueber die Güte der beiden Farbstoffe möchte ich sagen, daß man mit beiden gute Resultate erhält, jedoch färbt das Rongallitweiß etwas schneller und vielleicht sicherer. Ein Nachteil ist die geringe Haltbarkeit der Stammlösung und der starke Gehalt an Schwefelammonium, dessen Einwirkung auf das Gewebe nicht außer acht gelassen werden darf, auch nicht in der verdünnten Lösung (6 bis 10 Tropfen auf 50 Kochsalzlösung), während sich die alte Methylenblau-methode Ehrlichs durch absolute Reizlosigkeit auszeichnet.

Immerhin bedeutet die Kreibigsche Methode eine große Verbesserung in der Technik der vitalen Nervenfärbung. Nach der unter mikroskopischer Kontrolle vollzogenen Färbung wird in 5-proz. Ammoniummolybdat ca. 1 Stunde lang fixiert, in destilliertem Wasser gewaschen und durch absoluten Alkohol und Xylol in Balsam eingebettet.

Da das Mesenterium leicht schrumpft, ließ ich dasselbe auf Korkrahmen ausgespannt die Reagenzien passieren. Erst in dem Xylol wurde es vom Darne abgeschnitten.

Da beim Warmblüter als ein Kardinalsymptom der Anaphylatoxinwirkung eine starke Blutdrucksenkung sich geltend macht, habe ich auch beim Frosch in vielen Versuchen den Blutdruck mit gutem Erfolge zu bestimmen versucht. Ich bediente mich zu diesem Zwecke der unblutigen Methode Riva-Roccis. Die Manschetten stellte ich mir aus Fingerlingen, Glasrohr, Leukoplast her, in der Größe passend und verstellbar für den Unterschenkel des Frosches.

Zur Kontrolle des Sistierens und Wiederauftretens der Pulswellen mußte füglich ein zweites Mikroskop benutzt werden, durch das ich an der ausgespannten Schwimmhaut die durch den Druck der Manschette hervorgerufenen Phänomene an den Arterien genau beobachten konnte.

Auf das Anlegen der Manschette am Unterschenkel, der vorher mit Talkum eingepudert wird, ist große Sorgfalt zu verwenden, da schon kleine Fehler darin ungleiche Resultate bedingen; es muß deshalb jede Bestimmung sofort wiederholt werden. Erst wenn man über eine größere Erfahrung darin

verfügt, kann man sicher sein, einwandfreie Resultate zu erlangen.

Zur Festhaltung einiger anaphylaktischer Zustandsbilder bediente ich mich ferner der Mikrophotographie, da die Erhaltung jener mit Fixationsflüssigkeiten etwas zweifelhaft erscheinen mußte.

Zu diesem Zwecke wurde der ganze Frosch auf einer Glasplatte unter das senkrecht stehende Mikroskop gebracht, die betreffende Stelle des Mesenteriums eingestellt und nach Einrichtung des mikrophotographischen Apparates Momentaufnahmen gemacht.

Die beigefügten Photographien haben eine Belichtungszeit von $\frac{1}{90}$ Sekunde, bei ca. 50-facher Vergrößerung. Dabei wurde es selbstverständlich vermieden, das Mesenterium dem grellen Bogenlicht vor der Aufnahme auszusetzen; dasselbe kam nur im Augenblick der Aufnahme mit dem lebenden Mesenterium in Berührung. Der Einwand, es könne sich bei den abgebildeten Phänomenen teilweise um eine Lichtreaktion handeln, muß demnach von vornherein zurückgewiesen werden.

Im Anschluß hieran seien zunächst zwei typische Protokolle der beiden Versuchsreihen veröffentlicht.

Ich beginne mit dem Versuch am sensibilisierten Tier.

Rana esculenta, 50 g schwer, männlich. Vor 7 Tagen mit 0,25 g Schweineserum in den Rückenlymphsack gespritzt.

Nach Curarisierung Cohnheimsche Versuchsanordnung. Das homologe Serum wird getrocknet als Schüppchen aufgelegt, ungefähr in die Mitte mehrerer Arkaden unter Mikroskopkontrolle.

Fast momentan innerhalb 10—15 Sekunden bildet sich Stase in den direkt berührten und nahe vorbeiziehenden Kapillaren. Die Stase nimmt noch an Umfang zu, so daß sie oft bis an die Radix und den Darm in Erscheinung tritt. Die Kapillaren sind unregelmäßig in ihren Konturen, in der Nähe des Herdes maximal dilatiert, an anderen Stellen dagegen sehr eng. Gleichzeitig zerschmelzen die Serumschuppen (Oedem), sie sind nach $\frac{3}{4}$ —1 Stunde fast vollkommen homogen glasig aufgequollen, bisweilen kaum noch sichtbar. Lange Strecken der in Stase befindlichen Gefäße zeigen als Inhalt nur Plasma mit einigen Blutplättchen. Die stockenden Erythrocyten werden an den maximal dilatierten Stellen der Kapillaren zusammengeballt und dicht zusammengepreßt, so

daß ihre Konturen verschwinden. Die nur Plasma enthaltenden statischen Gefäße zweigen von intakten Kapillaren ab. Man sieht oft, wie von hier aus in die leere Kapillare einige Erythrocyten, aber mehr Leukocyten hineingeschwemmt werden, die sehr langsam bis an die geballten roten Blutkörperchen getrieben werden. An einer Stelle kann man einen ganzen Pfropf von Leukocyten wahrnehmen. Das Ganze wiederholt sich rings um einen Herd, so daß im Zentrum der Herd mit den dilatierten Kapillaren und Erythrocytenstase liegt, im Umkreise dagegen die meisten Kapillaren nur mit Plasma-inhalt die obige Erscheinung zeigen.

Emigration von Leukocyten wird hier und da nach 30 Minuten beobachtet. Auffällig sind an den allmählich dilatiert erscheinenden großen Gefäßen, Arterien wie Venen, Kontraktionsstellen. Diese Kontraktion findet sich oft auch an der Einmündungsstelle einer kleinen aus dem Serumgebiete kommenden Gefäßes in eine Vene, aber auch an solchen der anderen Arkade, wo kein Serum liegt.

An einer Arterie sind 3—4 Kontraktionsringe hintereinander gelegen. Gefäßmaß an dieser Stelle 0,15—0,08. Aus den Kapillaren des Herdes ist Erythrocytenaustritt mäßigen Grades bemerkbar, die Venen sind nach einer Stunde reichlich mit Leukocyten besetzt, der ganze freiliegende Darmteil erscheint schwer hyperämisch und ödematös. Die Stase verliert sich bis zum Versuchsende nicht.

Zeit	Blutdruck	Puls	Gefäßmaße in Mikrometerteilstrichen											
			11	17	17,5	13	19	22	4	17	14	17	14	
5,30	31	44	11	17	17,5	13	19	22	4	17	14	17	14	
Serum aufgelegt														
6,15	24	52	18	20	18,9	19	18	27	5	19,5	14	20	16	
6,42	24	50,52												
6,48	24	46												
7,30	27,5	43	17	18	18	11,5	15	22	5	17	13	16	12	
8,45	31,5	40	11	20	13	11	15	16	4	15	13	16	12	
			V	A	V + V		V + A		A	V + V	A	A		

(7,30 unregelmäßige Herzaktion, die Kreuze (+) bedeuten die Lagerung der Serumherde zwischen den Gefäßen.)

Kontrollversuch:

Rana esculenta, 55 g, männlich, unbehandeltes Tier. Nach Curarisierung Cohnheim'scher Versuch.

Getrocknetes Schweineserum wird an mehreren günstig erscheinenden Stellen unter Mikroskopkontrolle aufgelegt. An einer Stelle kümmern sich die Kapillaren überhaupt nicht um das aufgelegte Serum, an anderen tritt nach 30 Sekunden bis 10 Minuten Stase ein, die langsam einsetzt. Es kommt dabei zu Dilatation der Kapillarstellen, in denen die Erythrocyten zusammengeballt werden. Leere Gefäßstrecken mit nur Plasma-inhalt und vereinzelt Blutplättchen kommen zur Ausbildung, dieselben sind jedoch kurz, wie überhaupt die Stase sehr zirkumskript erscheint. In die Einmündungsstelle einer solchen plasmahaltigen Kapillare in die noch in Zirkulation befindliche Nachbarkapillare werden vereinzelt Erythrocyten und mehr Leukocyten hineingeschwemmt. Jedoch rückt plötzlich unter Pulsationserscheinungen wieder die normale Blut-säule vor, die Stase verliert sich und die Zirkulation wird wieder normal.

An einer anderen Stelle geht die Stase nach 30 Minuten bis eine Stunde wieder weg, bisweilen hält dieselbe noch längere Zeit an.

Emigration wird nach 30 Minuten beobachtet; die Venen sind zu dieser Zeit reichlich mit Leukocyten besetzt, jedoch nicht so stark wie im vorhergehenden Versuch.

An einer in Zirkulation gebliebenen Kapillare dicht am Serumherd, setzen sich einzelne Leukocyten an der Wand an, die leicht wieder fortgerissen, immer wieder durch andere ersetzt werden.

Die Gefäßkonturen sind regelmäßig, Erythrocytenaustritt ist nicht bemerkbar. Der ganze Darm erscheint blaß und etwas ödematös.

Zeit	Blutdruck	Puls	Gefäßmaße				
9,15	26	50	36	18	46	22	35
Serum aufgelegt							
9,30	26	50	34	16	41	28	38
9,45	26,4	48	30	12	40	27	27
10,0	26	46	23	11	28	24	24
10,15	26	46	21	10	25	24	22
10,45	25,5	48	29	13	33	25	30

(Nach 4 Stunden vitale Färbung.)

Um eine Beurteilung der im Vorhergehenden an zwei typischen Versuchsbeispielen geschilderten Vorgänge zu ermöglichen, seien zunächst nun die Erscheinungen erwähnt, wie sie am normalen unbehandelten Mesenterium nach Cohnheims Angaben und eigenen Erfahrungen eintreten, wenn man dasselbe frei an der Luft liegen läßt.

Makroskopisch entwickelt sich allmählich eine Hyperämie, nach etlichen Stunden bildet sich ein trüber Hauch, und nach 15—24 Stunden eine Pseudomembran, die abziehbar ist. Als Endresultat erhalten wir also stets eine starke diffuse Peritonitis, einhergehend mit allgemeiner seröser Durchtränkung und Verquellung der freiliegenden Darmteile. Was sich bis zur Vollendung dieses Endstadiums bemerkbar macht, sind vor allem die Veränderungen an den Gefäßen.

In den Arterien, die durchschnittlich kleiner sind als die Venen, herrscht der typische Achsenstrom mit sichtbarer Pulsation vor; die Plasmazone ist ca. 0,01 mm breit. In den Venen herrscht langsamere, gleichmäßige Strömung, die Plasmazone ist schmaler und man bemerkt oft Halt machende Leukocyten, die leicht wieder fortgerissen werden, an der Venenwand.

In den Kapillaren schlägt die Stromrichtung oft um, sehr leicht tritt Stase ein, vor allem dann, wenn der Darm noch in reger Verdauungsarbeit ist. Bei Hungertieren kann man sich, wie ich schon oben erörterte, von einer größeren Gleichmäßigkeit der Blutzirkulation überzeugen. In der Nähe der Kapillaren sieht man bisweilen normalerweise 4—5 Leukocyten zusammenliegen. Die in Stase befindlichen Gefäße selbst sind gleichmäßig und regelmäßig in ihren Konturen und ihrer Weite, man sieht nie darin Plasmalücken, das sind Stellen, an denen die Erythrocytensäule auseinandergewichen, die Kapillare jedoch nicht kollabiert ist, so daß solche Stellen als ganz farblos nur noch mit Plasma gefüllt erscheinen.

Im weiteren Verlauf tritt nach ca. 10—15 Minuten eine allmählich und ganz langsam einsetzende Dilatation der Arterien ein, die ihren Höhepunkt nach ca. 2 Stunden erreicht. Besonders auffällig ist oft eine solitär auftretende Kontraktionsstelle an einer Arterie.

Die Venen werden ebenfalls dilatiert, nur tritt die Erweiterung viel langsamer ein (3 Stunden). Zugleich mit dem Eintritt der Dilatation macht sich eine Verlangsamung der Strömung geltend. In den Arterien geht der Achsenstrom verloren, die Plasmazone wird immer schmaler, und die Blutssäule füllt allmählich das ganze Gefäß aus. Die Leukocyten streben bereits der Gefäßwand zu und sie werden nur durch Pulsation wieder weiter getrieben. In den Venen füllt sich die periphere Zone (die ursprüngliche Plasmaschicht) mit zahllosen weißen Blutkörperchen. Dieser Wall wird immer dichter.

Darauf (bis nach 2 Stunden) treten an der Außenseite der Vene buckelartige Vorsprünge auf. Birnenförmig aufgetrieben, haften sie mit einem Stiele an der Gefäßwand, wobei, wohl hervorgerufen durch die Strömung des entzündlichen Oedems, oft pendelartige Bewegungen zu bemerken sind. Diese Emigration führt nach 3–4 Stunden zu einem dichten Ring von Leukocyten um die Vene herum, doch kann eine genaue Zeitangabe nicht aufrecht erhalten werden, da selbst am gleichen Tier große Unterschiede bemerkt werden können.

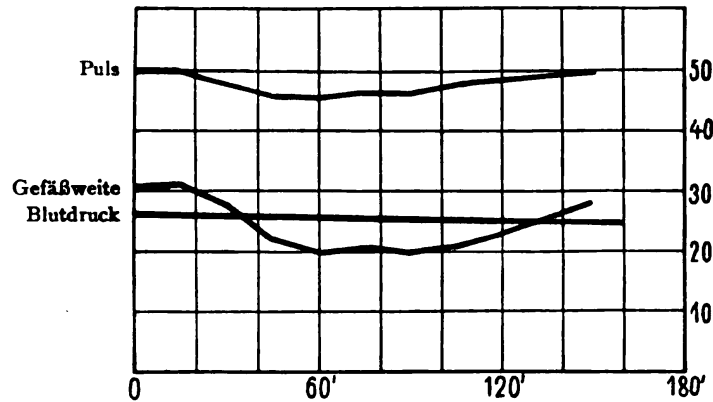
Die Kapillaren erweitern sich ebenfalls etwas (etwa um $\frac{1}{4}$). In denjenigen Kapillaren, wo die Strömung anhält, tritt nichts besonderes ein, dagegen kommt in solchen, wo sich partielle oder dauernde Stase entwickelt hat, Auswanderung von Leukocyten und nach langer Zeit vereinzelter Austritt roter Blutkörperchen zur Beobachtung.

Beim Vergleich der beiden angeführten Versuchsprotokolle treten sofort bestimmte Unterschiede hervor. Beiden ist gemeinsam, daß sie in ihren Bildern vollkommen verschieden sind von denen, wie sie unter dem allgemeinen Einfluß des Luftreizes sich entwickeln; speziell untereinander verglichen, zeichnen sie sich durch die andersartige Reaktion auf den Serumreiz aus.

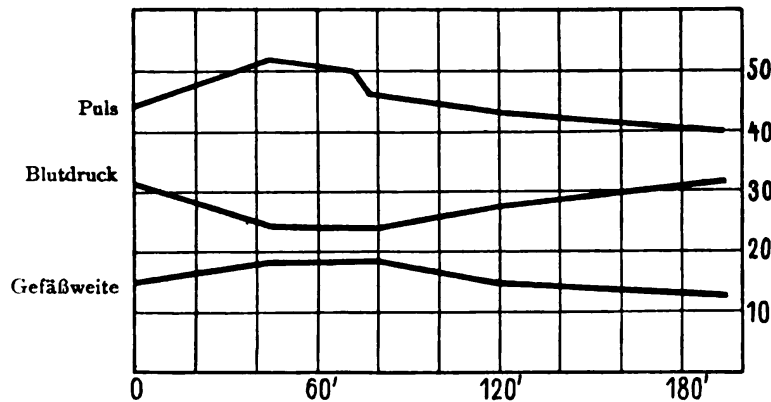
Am besten dürfte das aus den hier beigefügten Kurven hervorgehen.

Bei Kurve 1 fällt zunächst die Konstanz des Blutdruckes auf, die langsame Abnahme desselben ist auf Curarewirkung (vergl. Marchand in Krehl-Marchand) und Eröffnung der Lymphsäcke zurückzuführen.

Als Reaktion auf die erstmalige Applikation von Serum tritt vor allem eine starke Gefäßkontraktion in Erscheinung, die nach 1½ Stunden wieder verschwindet. Die zeitlich zusammenfallende Verringerung der Pulszahl steht in Uebereinstimmung mit der Gefäßverengung. Von einer speziellen



Kurve 1. Reaktion auf Serum beim nicht vorbehandelten Tier. (Applikationsort: Mesenterium.)



Kurve 2. Reaktion auf Serum beim anaphylaktischen Tier. (Applikationsort: Mesenterium.)

Der Puls ist angegeben nach der Zahl der Herzaktionen pro Minute. Der Blutdruck in Quecksilbermillimetern und die Gefäßweite in Mikrometerteilstrichen, wobei das Durchschnittsmaß aus der Messung sehr vieler Gefäße gewonnen ist.

Herzschädigung kann auch deshalb nicht gesprochen werden, da ja die Konstanz des Blutdruckes die vollständig erhaltene Regulationsfähigkeit im Zirkulationssystem beweist. Die Kurve zeigt also den vollständigen Verlauf einer normalen Serum-

reaktion und zugleich, daß die erstmalige Anwendung artfremden Eiweißes durchaus nicht reizlos vom Organismus vertragen wird.

Ganz anders dagegen das Bild auf Kurve 2 vom sensibilisierten Tier.

Als Reaktion auf die lokale Applikation von homologem Serum findet sich hier eine Blutdrucksenkung um 7 mm Quecksilber. In anderen Versuchen habe ich eine Gesamtsenkung bis zu 10 mm beobachtet. Also um $\frac{1}{8}$ des Normalen, was ungefähr mit den Resultaten am Warmblüter von Biedl und Kraus übereinstimmt, die 15—30 Sekunden nach der Reinjektion eine beginnende Blutdrucksenkung von vorher 120—150 auf schließlich 80, 60 mm und darunter beobachteten.

Ueber die Schnelligkeit des Reaktionseintrittes kann ich nach speziell darauf gerichteten Versuchen sagen, daß ich bereits nach 2 Minuten eine Senkung um 4 mm Quecksilber feststellte, die gewöhnlich in einer halben Stunde ihren tiefsten Punkt erreichte. Wenn man in Betracht zieht, daß sich die Kaltblüter allgemein durch trägere Reaktion auf alle Reize auszeichnen, so ist diese Reaktion als eine dem Warmblüter analoge anzusprechen.

Als zweites spezifisches Symptom zeigt die Kurve eine starke Dilatation der Gefäße, die nach Erreichung des Höhepunktes durch eine übermäßige Kontraktion abgelöst wird. Gleichzeitig mit der Blutdrucksenkung und Gefäßdilatation, macht sich eine Beschleunigung der Herzaktion geltend, die in dem Maße, wie die anderen Erscheinungen schwinden, wieder zur Norm zurückkehrt.

Diese Pulsbeschleunigung kann teilweise aufgefaßt werden als ein Versuch des Organismus, die durch die Vasodilatation bedingte enorme Blutdrucksenkung durch vermehrte Arbeitsleistung zu kompensieren. Dies entspräche den Anschauungen von Biedl und Kraus, welche die Blutdrucksenkung nicht auf Herabsetzung der Leistungsfähigkeit des Herzens, sondern lediglich auf eine Verringerung der peripheren Widerstände zurückführen.

Da jedoch die beschleunigte Herzaktion nicht genügt, um ein Sinken des Blutdruckes zu verhindern, muß unter allen Umständen eine Störung der normalen Regulationsvorgänge,

insbesondere also beim anaphylaktischen Shock eine spezifische Schädigung des diese Reize übermittelnden sympathischen Nervensystems vorliegen. Bei Kurve 1 ist ja das korrespondierende Arbeiten von Herz und Gefäßen ohne weiteres ersichtlich.

Die bei lokaler Applikation von Anaphylatoxin auf das Mesenterium zu beobachtenden Herzerscheinungen stehen im Gegensatz zu den durch intravenöse Reinjektion gewonnenen Resultaten. Meine hierauf gerichteten Nachuntersuchungen stimmen mit den Angaben Friedbergers und Mitas überein.

Es zeigt sich hier eine sofort nach der Reinjektion einsetzende Verlangsamung der Herzaktion (z. B. von 50 auf 34 in einer halben Stunde). Bei meinen lokalen Versuchen erhielt ich stets eine Beschleunigung. — Der Unterschied in diesen beiden verschiedenen Ergebnissen kann nur dadurch erklärt werden, daß im ersteren Falle das Herz der Ort einer anaphylaktischen Lokalreaktion ist, die direkt ausgelöst wird durch die intravenöse Beibringung des Giftes. Denn dieses gelangt ja hierbei zunächst in den rechten Vorhof und Ventrikel, und da der Frosch nur einen gemeinsamen Ventrikel besitzt, ist mit Sicherheit anzunehmen, daß sofort ein Teil des Giftes durch die Coronararterien dem Herzen zugeführt wird, worauf das Herz mit einer schweren Funktionsstörung antwortet.

Beim Warmblüter wird das Gift durch das rechte Herz zunächst der Lunge zugeführt, und tatsächlich sehen wir auch momentan eine schwere Lungenschädigung in Erscheinung treten. Umgekehrt erhält man (Friedberger und Mita) bei unvorbehandelten Kontrolltieren intravenös mehrfach Pulsbeschleunigung, bei lokaler Anwendung (Mesenterium) des spezifischen Giftes dagegen Pulsverlangsamung; was wiederum im ersteren Falle eine direkte Lokalreaktion am Herzen beweist.

Es ergibt sich hieraus: Daß wir bei der Anaphylaxie streng unterscheiden müssen zwischen der allgemeinen Reaktion, bedingt durch die Störung der normalen Regulationsvorgänge am Gefäßapparat, und der Lokalreaktion am Orte der Applikation des Giftes, je nach dessen Wahl wir eine differente Nebenwirkung erhalten müssen.

Mithin stellt eben auch die Ueberempfindlichkeit eine ganz allgemeine Eigenschaft des Körpers oder, bestimmter gesagt, überall vorkommender Gewebsarten dar, und dafür kommt in Betracht: das lockere faserige Bindegewebe mit seinen Zellen, das Blut und das Nervensystem.

Eine bestimmtere Lokalisierung der primären Giftwirkung konnte deshalb nur nach dem Studium der lokalen Erscheinungen am Applikationsorte (Mesenterium) erwartet werden.

Aus den oben gemachten Angaben in den Versuchsprotokollen kann ohne weiteres ein Unterschied in der lokalen Giftwirkung ersehen werden. Beim unbehandelten Tier reagieren bisweilen einige Kapillaren überhaupt nicht auf den Reiz, in anderen dagegen entwickelt sich Stase, und zwar ist der Eintritt oft ein zögernder und die Dauer eine beschränkte.

Beim sensiblen Tier dagegen tritt die Stase fast momentan auf, zeichnet sich durch größeren Umfang aus und kann sehr lange anhalten. Zum Beweise, daß es sich hier nicht um eine zufällige Erscheinung infolge größerer physiologischer Reizbarkeit der Versuchstiere handelte, wurde zur Kontrolle am gleichen Tier mit zwei verschiedenen Serumarten experimentiert, von denen das eine Serum homolog war, also dem bei der Vorbehandlung benützten entsprach.

Auch hierbei konnte einwandfrei die differente Anaphylatoxinwirkung festgestellt werden. Wenn man Versager erhält, wie das in jedem Tierexperiment vorkommt, so liegt der Grund darin nur in Zufälligkeiten, die man erst durch Erfahrung beherrschen lernt. Die Anaphylatoxinwirkung ist also lokal quantitativ stärker als die einfache Serumwirkung.

Bei der Erörterung über die Ursache des Staseintrittes muß zunächst der Kochsalzgehalt des betreffenden Serums in Betracht gezogen werden. Bekanntlich können wir ja durch die verschiedensten Chemikalien, darunter auch die Chlor-salze, eine Stase direkt hervorrufen, indem diese Stoffe wasserentziehend und schädigend auf die Gefäßwand einwirken.

Im entsprechenden Versuch wurde denn auch stets bei Auflegung kleinster Kochsalzkristalle eine rapid eintretende

Stase beobachtet, hervorgerufen durch ein sichtbares, an der dem Kochsalzherd am nächsten liegenden Kapillarstrecke austretendes Oedem, so daß der Kristall sofort zerschmolz. Dieses Oedem war so heftig, daß die Stromrichtung unterhalb des Herdes sich umkehrte. Als Zeichen der schwersten Gefäßwandschädigung zeigte sich dann ein fortwährend erfolgender Austritt einzelner Erythrocyten an der Oedemdurchbruchsstelle.

Diese reine Kochsalzwirkung kann nicht für die Stase verantwortlich gemacht werden. Dafür sprechen erstens zwei meiner Versuche, in denen ich einmal beim unbehandelten Tier durch Auftropfen von flüssigem isotonisch verdünntem Hühnereiweiß, ein anderes Mal beim anaphylaktischen Tier durch Auftropfen des homologen Hammelserum eine allgemeine Stase erlebte; zweitens aber spricht dafür der Unterschied in der Qualität der reinen Kochsalz- und der Serumstase.

Bei der ersteren konnte ich niemals die Ausbildung der oben erwähnten Plasmalücken entdecken. Offenbar handelt es sich hiernach bei der Wirkung des getrockneten Serums um zwei vollkommen zu trennende Giftwirkungen, nämlich um eine physikalisch-chemische Schädigung durch Kochsalz, die zwar infolge der minimalen Menge des verwendeten Serums nur ganz gering sein kann, aber doch in Betracht gezogen werden muß, und um eine toxische Wirkung auf die Kapillarwand.

Wichtiger erscheint mir ja für die vorliegenden Zwecke nur die Feststellung von spezifischer Wirkung des Anaphylatoxins gegenüber dem einfachen Serum, denn der Kochsalzgehalt war ja in beiden Fällen derselbe. Und dieser Unterschied ist auch gegeben durch die verschieden starke Ausbildung der Plasmalücken in den beiden Versuchsreihen. Dieses Phänomen muß hier in seiner pathologisch-anatomischen Bedeutung für die Anaphylaxie und die Entzündung überhaupt noch näher besprochen werden.

Die Plasmalücken entstehen, wie schon oben kurz angedeutet, durch das Austreten von Oedem aus der durch Serum geschädigten Kapillarwand. Dieser lokale Flüssigkeitsverlust muß von den Nachbarkapillaren her ersetzt werden. Dabei imponiert nun die Erscheinung, daß aus den Kapillaren nicht eine Blutsäule in das abzweigende, eben in Stase geratende

Gefäß nachrückt, sondern nur Blutplasma. (Siehe Fig. 1 auf der Tafel.)

Durch die einrückende Flüssigkeit wird das Blut akut eingedickt und so werden die Erythrocyten dicht am Schädigungsorte gewissermaßen zusammenfiltriert, da ja Oedem aus dieser Stelle austritt. In günstigen Fällen kann dieses Phänomen rings um den ganzen Herd sich einstellen. In den Kapillaren, von denen die zuerst körperchenleeren Kapillarstrecken abgehen, bleibt die Zirkulation vollkommen im Gang und der Erythrocytenstrom schießt an der Plasmalücke vorbei.

Was wir als die erste Ursache der Stase anzusprechen haben, ob die Kapillarwand durch bestimmte Aenderung ihres Kontraktionszustandes dabei direkt mitspielt, oder ob die durch den Oedemaustritt bedingte lokal veränderte Blutbeschaffenheit durch momentane Erhöhung der Viskosität des Blutes zu einer Verkeilung und so zur Stase der Körperchen führt, darüber kann erst dann entschieden werden, wenn weitere Studien noch mehr Klarheit in diese schwierigen Verhältnisse gebracht haben.

Auf jeden Fall sah ich in meinen Versuchen, besonders bei anaphylaktischen Tieren, die Stase momentan binnen Sekunden eintreten und oft so großen Umfang annehmen, daß das aufgelegte Serum alsbald in einem ischämischen Bezirk als Zentrum lag und damit aus dem Blutkreislaufe ausgeschaltet war.

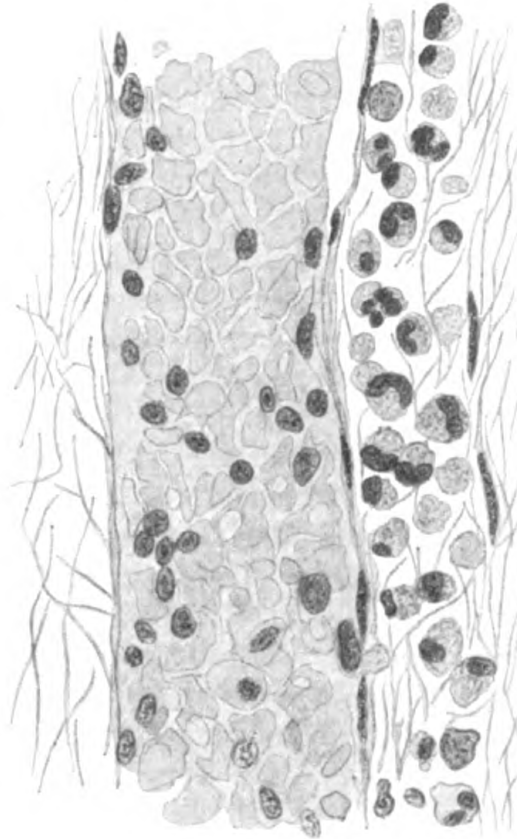
In allen Kapillargefäßen aber werden in den Wandpartien Leukocyten unter oftmaligem Haltmachen langsam weiter getrieben. Diejenigen Leukocyten nun, die an der Seite der abzweigenden Kapillaren angetrieben werden, werden in dieselbe hineingeschwemmt und langsam nach dem Schädigungsorte hingetrieben. Als Ursache dafür ist ohne weiteres die langsame andauernde Strömung in der Plasmakapillare, bedingt durch den anhaltenden Oedemaustritt und dessen Ergänzung von den Nachbargefäßen her, anzusehen. Daß die Erythrocyten nicht in ihrem Strome abgelenkt werden, ist ebenfalls leicht erklärbar. Der schwache Seitenstrom ist eben nicht imstande, die Richtung der im Schwung befindlichen, spezifisch schwereren Erythrocyten insgesamt zu ändern. Es kommt zwar vor, daß ab und zu einzelne derselben vom Rande der roten Blutsäule losgerissen in die Plasmakapillaren gelangen, während die spezifisch leichteren Leukocyten ohne Schwierigkeit abgetrieben werden. (Siehe Fig. 2 auf der Tafel.)

Auf jeden Fall entsteht in der ursprünglich körperchenleeren Kapillarstrecke eine Ansammlung von Blutkörperchen,

bei denen das normale Verhältnis von Leukocyten und Erythrocyten sehr stark zugunsten der weißen Körperchen verändert ist. Ich hatte unter anderem an einer besonders günstigen Stelle Gelegenheit, eine direkte Pfropfbildung von nur Leukocyten zu beobachten, die auf obige Weise entstanden war.

Aus der Feststellung dieser Tatsachen geht hervor, daß bei einem lokalen Entzündungsreize — um einen solchen handelt es sich ja in den vorliegenden Fällen — die Mehrzahl der vorzufindenden Leukocyten nicht auf chemotaktischem Wege direkt angelockt wird, sondern daß zuerst infolge dieser eintretenden mechanischen Verhältnisse der Organismus sofort ein Depot von Leukocyten in der Nähe des Reizes setzt. Zweitens aber erklärt sich daraus, da ja das gleiche Phänomen sich rings um den Herd abspielen kann, daß man in vielen Entzündungsfällen anfangs nicht im Zentrum die meisten Leukocyten vorfindet, sondern im Umkreis davon als Leukocytenwall. Die in den Kapillaren angehäuften Leukocyten beginnen alsbald mit der Emigration, um so geschlossen durch Chemotaxis teils angelockt, teils vielleicht durch das nachsickernde Oedem getrieben, gegen den Herd vorzurücken (Fig. 3).

An dieser Stelle sei es mir erlaubt, die Frage kurz zu streifen, ob wir überhaupt nach bisherigen Erfahrungen der



H. Giltsch gez.

Fig. 3. Entzündungsleukocytose durch Serumreiz an einer Kapillare. Vitale Färbung. Kerne der Erythrocyten sind nicht alle gefärbt. Zeiss $\frac{1}{12}$ Imm., Ok. 1.

Chemotaxis von Leukocyten diejenige Rolle bei Entzündungsreizen zuerkennen dürfen, die sie bislang in unseren Anschauungen darüber gespielt hat. Unwahrscheinlich mußte es doch immer sein, wie eine chemotaktische Anlockung der zirkulierenden Leukocyten durch eine intakte Gefäßwand hindurch direkt erfolgen sollte.

Da es mir nun im Verlauf meiner Untersuchungen gelang, mechanische Verhältnisse für die Leukocytose um Entzündungsherde herum direkt verantwortlich zu machen, ist ohne weiteres die Kritik an der Frage berechtigt, ob denn die Chemotaxis in entzündlichen Geweben in dem bisher geglaubten Maße überhaupt besteht.

Die bereits erwähnten Unterschiede in der Ausdehnung der Stase und Plasmalücken in den beiden Versuchsreihen, insonderheit der stärkeren und umfangreicheren Ausbildung dieser Erscheinungen beim anaphylaktischen Tier, gestatten ohne weiteres den Schluß, daß es sich hier, da ja eine stärkere Gefäßwandschädigung die Ursache sein muß, um das bekannte Arthussche Phänomen des spezifischen Oedems durch Anaphylatoxinwirkung handeln muß. Ueber weitere Differenzen im Ablaufe der Entzündung möchte ich nur erwähnen, daß beim sensibilisierten Tier infolge der Dilatation der Gefäße die Erscheinungen der Entzündung viel energischer und stärker auftreten im Gegensatz zu der schwächer und zirkumskripter erscheinenden Entzündung beim einfachen Serumversuche am Normaltier infolge der Kontraktion der Gefäße.

Als weitere spezifische Erscheinung wurde im anaphylaktischen Versuch der hämorrhagische Charakter der Entzündung festgestellt. Vereinzelt Diapedese von Erythrocyten mit Hämolyse, Körnelung in der Färbung und Zertrümmerung, einhergehend mit einer schweren ödematösen Durchtränkung der Gewebe.

Von ganz besonderer Bedeutung für das Verständnis der Auslösung des anaphylaktischen Shockes sind nun die Erscheinungen, wie sie am vital gefärbten Nerven im Mesenterium des sensibilisierten Frosches regelmäßig beobachtet wurden.

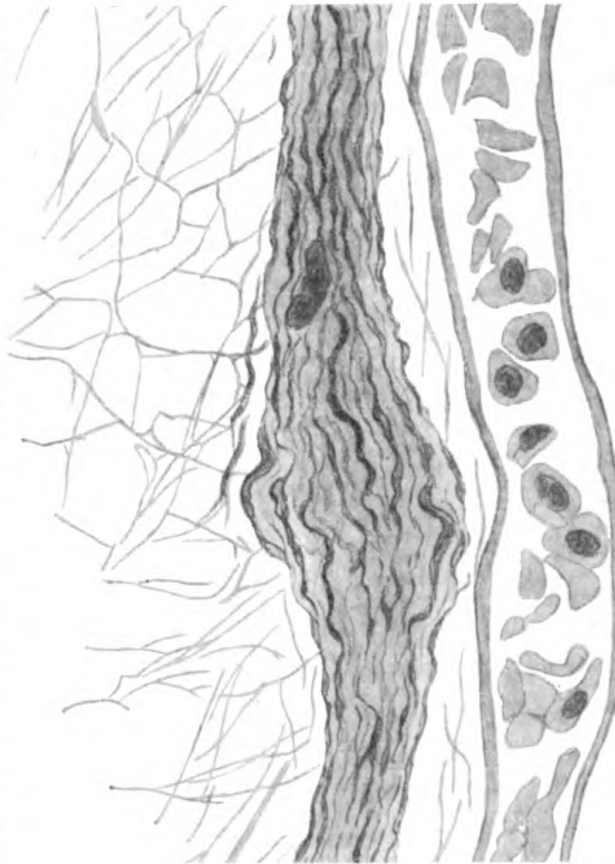
Der normale vital gefärbte Nerv ist glatt, gleichmäßig in seinen Konturen und eng gefügt. Die einzelnen Fibrillen kann man daran kaum erkennen, sie sind zart und dünn. Zu-

weilen erscheint eine unregelmäßige Konturzeichnung vorge-
täuscht durch einen Färbefehler, indem einzelne Randpartien
nicht gefärbt sind und so eine Verdünnung dieser Stelle vor-
täuschen. Bei starker Vergrößerung kann man sich sofort
von dieser Täuschung überzeugen. Ebenso erscheint ein Nerv
unregelmäßig, wenn
das Mesenterium
schief ausgespannt
und gefaltet ist (da-
bei zeigt der Nerv
einen wellenförmigen
Verlauf), und
wenn bei einer Teil-
ungsstelle der ab-
zweigende Nerv
nicht gefärbt ist,
was wiederum eine
Verdickung an die-
sem Orte vortäu-
schen kann. Ein
dem normalen ganz
gleiches Bild bieten
die Nervenpräpa-
rate vom einfachen
Serumversuch dar.

Ganz anders
dagegen dasjenige
vom anaphylakti-
schen Versuchs-
tiere: hier begegnet
man plötzlich in der
Nähe des Anaphyla-
toxinherdes einer

spindlichen Auftreibung des Nerven. Die Nervenfibrillen sind
aufgelockert und auseinander gedrängt, ohne daß eine Ver-
mehrung des Zwischenbindegewebes bemerkbar wäre (Fig. 4).

An anderen Stellen sieht man einen Nerven auf lange
Strecken hin verquollen, erst weiter ab vom Herd nimmt der-
selbe die normale Konfiguration wieder an (Fig. 5).



H. Giltsch gez.

Fig. 4. Spindelförmige ödematöse Auflocke-
rung und Verquellung eines Nerven in der Nähe
des Serumherdes beim anaphylaktischen Tier.
Vitale Methylenblaufärbung. Zeiss $\frac{1}{12}$ Imm.,
Ok. 2.

Es liegt auf der Hand, daß für diese Quellungserscheinung nur ein innerhalb des Nerven auftretendes akutes Oedem schwerster Art verantwortlich zu machen ist, das oft zu einer Auftreibung des Nerven bis über das dreifache des Normalen führt, wobei auch die einzelnen Nervenfibrillen verquollen erscheinen.

Um mich von vornherein gegen den Vorwurf etwa zufällig erhaltener Bilder zu sichern, färbte ich sofort vor Versuchs-



H. Giltch gez.

Fig. 5. Derselbe Nerv: a in der Nähe des Serumherdes bis auf das 3-fache verquollen, Verdickung der einzelnen Elemente; b eine Stelle nach der Radix mesenterii zu in vollkommen normaler Konfiguration. Anaphylaktisches Tier. Vitale Färbung. Zeiss $\frac{1}{12}$ Imm., Ok. 2.

beginn die Nerven vital an, so daß sie deutlich erkennbar waren und erhielt als Resultat, daß sowohl bei Anwendung von Kochsalzkristallen und andersartigem Serum Veränderungen obiger Art sicher nicht auftraten. Nur bei homologem Serumreiz konnten die Quellungserscheinungen einwandfrei direkt beobachtet werden. Es handelt sich also hier um eine zum ersten Male erhaltene Schädigung von Nerven streng spezifisch-anaphylaktischer Natur. Daß diese Vorgänge im Nerven zu einer schweren schädigenden Reizung führen müssen, brauche ich wohl kaum zu erwähnen, kennen wir doch aus den Ver-

suchen am Nervmuskelpräparat der Physiologen her, wie geringste Aenderungen der Kochsalzkonzentration und die geringsten Austrocknungserscheinungen einen starken Reizeffekt verursachen. Dabei handelt es sich hier um marklose Nerven, die infolge des Fehlens der Markscheide weniger geschützt sind.

Aus diesen Ergebnissen ist ohne weiteres der Schluß gerechtfertigt, daß wir hier im Nerven den direkten Reaktionsort der Anaphylatoxinwirkung vor uns haben. Danach würde also durch die erstmalige Seruminjektion eine spezifische Sensibilisierung des Nervensystems erzielt. Tatsächlich sprechen

ja auch die bisherigen Ergebnisse der Anaphylaxieforschung durchaus für eine besondere Beteiligung der nervösen Elemente. Andererseits können die anaphylaktischen Gefäßphänomene nicht erklärt werden, ohne die Ursache direkt im sympathischen Nervensystem zu suchen.

Daß tatsächlich eine lokale Gefäßnervenschädigung vorliegen muß, zeigen noch zwei zu besprechende Erscheinungen. Wurden die Nerven erst längere Zeit nach Ablauf der Anaphylatoxiesymptome gefärbt, so konnte kaum noch eine Quellungserscheinung nachgewiesen werden. Das Oedem im Nerven hatte sich in Uebereinstimmung mit den anderen Symptomen zurückgebildet.

Im Beginne des Reparationsvorganges fiel eine außerordentliche Unregelmäßigkeit an allen Gefäßen auf, bis schließlich anhaltende Kontraktionszustände an einzelnen Arterien auftraten, wobei die Venen ebenfalls unregelmäßig dilatiert und verengert erschienen. (Siehe Fig. 6 und 7 auf der Tafel.)

Zum Unterschied gegen die auch sonst normal vorkommenden Einschnürungen, die aber nur solitär auftreten, sind hier mehrere Kontraktionsringe hintereinander geschaltet (s. A.). Das Auftreten derselben ist allgemein physiologisch dadurch erklärt, daß bei anhaltendem einseitigen Reize (Dilatation), nach Erlöschen desselben, sich eine übermäßige antagonistische Wirkung geltend macht.

Ob es sich dabei primär um eine Konstriktorenlähmung oder eine Vasodilatatorenerregung handelt, darauf möchte ich bei dem herrschenden Streite über diese Punkte nicht näher eingehen. Ferner erhielt ich als Zeichen einer Gefäßwandschädigung auf trophoneurotischer Basis die Bildung von intramuralen Hämatomen innerhalb der Gefäßwände von größeren Arterien in regelmäßigen Abständen. Da ich jedoch den gleichen Befund nicht in allen Präparaten erheben konnte, und infolge der vorgerückten Jahreszeit weitere Versuche über die Entstehungsbedingungen dieser Erscheinung aussichtslos erschienen, sei derselbe nur erwähnt als mit großer Wahrscheinlichkeit auf anaphylaktischem Boden stehend. Ergibt ja doch auch die Sektion der reinjizierten Warmblüter multiple Hämorrhagien.

Ueber die Rolle hypertotonischer Salzlösungen in der Anaphylaxie möchte ich noch einiges erwähnen.

Die zuerst von Friedberger und Hartoch erhobenen und von Ritz prinzipiell bestätigten Angaben, daß durch Gegenwart von hypertonen Salzlösungen die Auslösung des anaphylaktischen Shocks verhindert würde — und zwar sei die Verhinderung auf eine Hemmung der Giftbildung, nicht auf Hemmung der Giftwirkung zurückzuführen — veranlaßte mich, da ich ja bei dem erhöhten Salzgehalt des getrockneten Serums eine hypertone Lösung im Gewebe vor mir hatte, meine Präparate daraufhin durchzusehen. Ich erhielt dabei das Resultat, daß die meisten Nervenquellungen im Umkreise des Herdes lagen, während die direkt darunter hindurchziehenden Nerven meist glatt erschienen. Ein Vergleich mit den obigen Erscheinungen ist ohne weiteres gegeben. Die direkt getroffenen Nerven stehen eben unter dem Einfluß der hypertonen Salzlösung des Serums, wobei ihre spezifische Quellung durch den stärkeren osmotischen Druck der Salzlösung verhindert wird. Dies stimmte also mit der Anschauung überein, daß es sich um eine Hemmung der Giftbildung handelt.

Näher auf die bestehenden Theorien der Anaphylaxie und ihre Bewertung einzugehen, halte ich an dieser Stelle nicht für nötig, da ja durch meine Versuchsergebnisse die Beteiligung des Nervensystems und eine spezifische Schädigung desselben festgestellt ist. Wie wir uns die Ursache der Schädigung vorzustellen haben, ob es dabei zu einer direkten Bindung des Giftes an die Lecithine unter Oedembildung kommt — analog einer Beobachtung Friedbergers, welcher in vitro Cobragift durch Anwesenheit von Lecithin teilweise entgiften konnte — und welche Rolle die Leukocyten dabei spielen, darüber können zurzeit nur Vermutungen ausgesprochen werden.

Jedenfalls sind die hier erstmalig experimentell erzielten Nervenschädigungen geeignet, bei der bekannten Reflexerregbarkeit des sympathischen Nervensystems die Symptome des anaphylaktischen Shocks zu erklären.

Zusammenfassung.

1) Die Angaben von Friedberger und Mita über die Möglichkeit der Sensibilisierung von Fröschen werden bestätigt.

2) Auch für Kaltblüter gelten die Vasodilatation und die Blutdrucksenkung als typische anaphylaktische Symptome.

3) Die Auslösung des anaphylaktischen Shocks erfolgt nicht nur bei intravenöser Reinjektion, sondern auch bei lokaler Applikation flüssiger und getrockneter homologer Sera auf das Mesenterium im Cohnheimschen Versuch.

4) Die bei der Reinjektion und bei der mesenterialen Applikation des Serums auftretenden verschiedenen Erscheinungen am Herzen beweisen, daß bei der intravenösen Reinjektion das Herz Sitz einer anaphylaktischen Lokalreaktion wird, analog derjenigen am Mesenterium, an dem durch Auflegen von homologem Serum erstens die Erscheinung eines spezifischen Oedems (Arthussches Phänomen), zweitens eine gegenüber dem einfachen Versuche stärker und schneller einsetzende Stase, drittens eine Dilatation der Gefäße und schließlich eine Verquellung der Nerven sich geltend machen.

5) Hieraus ergibt sich, daß beim Shock zu trennen sind die Lokalreaktionen, die je nach Wahl des Applikationsortes andersartig in Erscheinung treten müssen, von den wohl teilweise reflektorisch auf dem Wege der Gefäßnerven übermittelten Allgemeinreaktionen.

6) Als Ursache für die Auslösung der Reaktion kommen wahrscheinlich die spezifischen Nervenschädigungen der festgestellten Art in Betracht.

7) Bei der Entzündung durch getrocknetes Serum am Mesenterium wird beobachtet, daß der Organismus allein durch mechanische Verhältnisse imstande ist, ein Leukocytendepot im Umkreis des Gifttherdes zu setzen: nämlich durch die Ausbildung von Plasmalücken in der Blutkapillaren, in denen es infolge veränderter Strömungsverhältnisse zu einer Anreicherung von Leukocyten kommt. Bei gut ausgebildeten Kapillaranastomosen führt diese Erscheinung zur Etablierung eines ringförmigen Leukocytenwalles, in dessen Zentrum der Gifttherd in einem aus der Zirkulation vollkommen ausgeschalteten Gewebsteile liegt.

8) Die Richtigkeit der bisherigen Anschauung, daß die Chemotaxis die vorzüglichste Ursache einer lokalen Entzündungsleukocytose sei, muß demnach bezweifelt werden.

9) Die Anaphylaxie stellt eine allgemeine Eigenschaft aller Körpergewebe dar und verrät sich bei Anbringung des homo-

logen Giftes sowohl in Lokal- wie Allgemeinreaktionen. Da sich an den lokalen anaphylaktischen Vorgängen auch die Nerven des Gewebes beteiligen, und zwar in Form herdförmiger Oedeme, so vermittelt sich der lokale anaphylaktische Reiz durch die Nerven reflektorisch dem Gesamtorganismus. Der allgemeine Shock ist also zum großen Teile reflektorische Nervenwirkung; inwieweit außerdem Resorption des Giftes zu neuen Anaphylaxiesymptomen führen kann, so daß der Shock dann gewissermaßen eine Summe von Lokalreaktionen darstellen würde, kann erst aus weiteren Versuchen entschieden werden.

Literatur.

- Aschoff, L., Lehrb. der pathol. Anat., Jena, Gustav Fischer, 1911.
Cohnheim, Ueber Entzündung und Eiterung. Virch. Arch., Bd. 40, 1867.
Friedberger, Deutsche med. Wochenschr., 1911, No. 11.
Friedberger und Mita, Anaphylaxie des Frosches. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 10, 1911, Heft 3, p. 362.
Krehl-Marchand, Handbuch der allgemeinen Pathologie.
Kreibig, Nervenfärbung mit Rongallitweiß. Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 12, p. 546.
Moro, E., Experimentelle und klinische Ueberempfindlichkeit (Anaphylaxie). Lubarsch-Ostertag, Ergebn. der pathol. Anat., XIV. Jahrg., 1910.
Tigerstedt, R., Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Hirzel, Leipzig, 1909.
Weichardt, W., Jahresbericht über die Ergebnisse der Immunitätsforschung, Bd. 7, 1911; Bd. 8, 1912.

Erklärung der Tafel.

Mikromomentaufnahmen vom lebenden Froschmesenterium.
Vergr. ca. 50:1.

Fig. 1. Plasmalückenbildung am Serumherd (×). Kapillarwand nicht kollabiert. Der Blutstrom schießt an der Stelle umkehrend vorbei. Am Rande des Blutstromes Leukocyten sichtbar.

Fig. 2. Plasmalückenbildung am Serumherd (×). Einschwemmen von mehr Leukocyten als Erythrocyten in die anfangs (Fig. 1) leere, statische Kapillarstrecke.

Fig. 6. Unregelmäßige Kontraktionsbildungen an größeren Gefäßen beim Schwinden der allgemeinen anaphylaktischen Symptome. An den schmälern Arterien Schnürringe.

Fig. 7. Ein gleiches Bild wie in Fig. 6. Fast zu gleicher Zeit bilden sich die Nervenquellungen zurück.

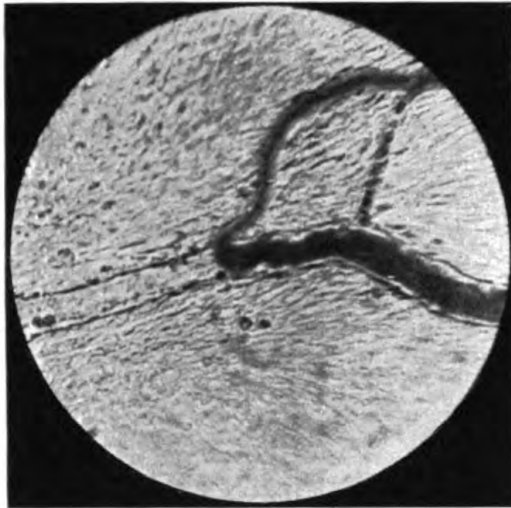


Fig. 1.

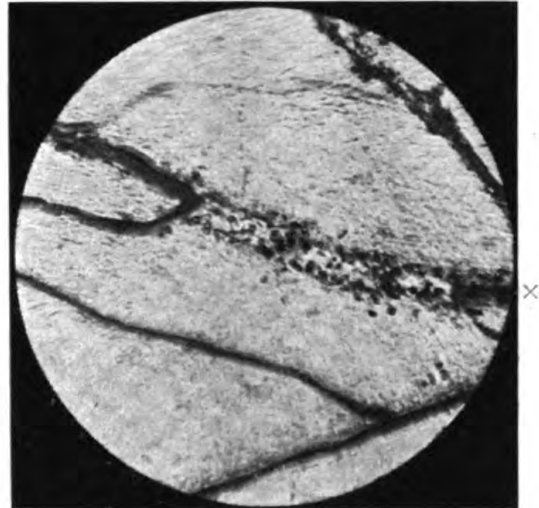


Fig. 2.

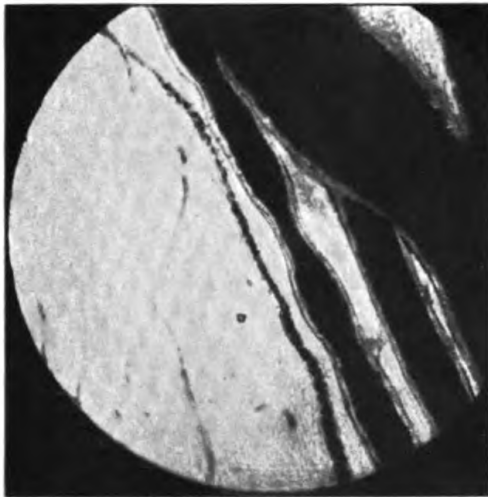


Fig. 6.



Fig. 7.

Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena**.

Nachdruck verboten.

[Aus der medizinischen Klinik der Universität Heidelberg
(Direktor: Prof. Dr. L. Krehl).]

Ueber die Bedeutung der Leber für die anaphylaktische Reaktion beim Hunde.

Von **Gerhard Denecke.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 8. Dezember 1913.)

Aus den Mitteilungen über die Fleischintoxikation von Pawlow und Nencky, Fischler, Rothberger und Winterberg u. a. geht hervor, daß die Leber im Eiweißstoffwechsel eine bedeutsame Rolle spielt, und daß namentlich bei Insufficienz der Leber schwere Allgemeinerscheinungen hervorgerufen werden können, eben durch Produkte des Eiweißstoffwechsels. Ferner hat die Leber die Aufgabe, bei der Harnstoffsynthese die Endprodukte des Eiweißstoffwechsels zu verarbeiten. Es ist nicht unwahrscheinlich, zu denken, daß sie sich dabei übergroßen, plötzlich an sie herantretenden Anforderungen nicht gewachsen zeigt, daß sie von den Spaltprodukten geschädigt wird, die sie sonst selbst unschädlich macht; ein Vorgang, der uns durch eine Urobilinurie angezeigt wird.

Um diese Vorstellungen nachzuprüfen, gilt es experimentell einen plötzlichen Zerfall großer Eiweißmengen in der Blutbahn zu veranlassen und zuzusehen, wie sich die normale und die insuffiziente oder wenigstens geschwächte Leber dazu verhält. Von Fischler und verschiedenen Mitarbeitern sind bereits derartige Versuche mehrfach unternommen worden, ohne zu einem befriedigenden Resultate zu führen. Im folgenden sollte das alte Ziel aufs neue mit den Methoden der Anaphylaxie angestrebt werden. Da der anaphylaktische Shock besonders seit Friedbergers (1) und Hermann Pfeiffers (2) Arbeiten wohl allgemein als Eiweißabbau-Intoxikose angesehen wird, so wählten wir diese Methode um so eher, als die große Schnelligkeit des Prozesses ihn vor vielen anderen auszeichnet.

Wir bedienten uns einer Methode ähnlich denen, die Biedl und Kraus (3) und Schittenhelm und Weichardt (4) angewandt haben. Als Antigen benutzten wir vorzugsweise Hühnereiklar, und es sei gleich hier betont, daß alle unsere Befunde nur für Hühnereiklar erhoben sind, während uns für andere Eiweißarten keine genügend sicheren Beobachtungen zu Gebote stehen. Wir sensibilisierten die Tiere entweder mit 1–3 ccm intravenös oder 5 ccm subkutan. Die Reinjektion erfolgte immer intravenös und zwar nie unter 10 ccm. Die funktionelle Schädigung der Leber führten wir herbei durch die partielle Ausschaltung aus dem Blutkreislaufe, wie es die Ecksche Fistel dadurch ermöglicht, daß das gesamte Pfortaderblut an der Leber vorbei in die Vena cava abgeleitet wird. Inwieweit die Leber wirklich dadurch geschädigt und inwieweit sie ausgeschaltet wird, hat Fischler (5) eingehend mitgeteilt. Wir legten die Anastomose an nach der Methode von Fischler und Schröter (6). Es kamen ausschließlich Hunde zur Verwendung, weil Kaninchen und Meerschweinchen mit ihren zarten Gefäßwänden diese Operation nicht vertragen. Das Zeitintervall zwischen Sensibilisierung und Reinjektion betrug nie weniger als 3 Wochen. Die Injektionen wurden in die großen Fußvenen gemacht, die Blutentnahme für die Leukocytenzählung und die Ausstrichpräparate am Ohre.

Wir untersuchten im ganzen 9 normale Hunde und fanden außer zwei refraktären überall die bekannten Symptome des anaphylaktischen Shocks, wie sie Schittenhelm und Weichardt für den Hund beschrieben haben. Allerdings durchgehend in viel milderer Form. Einen Todesfall im Shock haben wir nie gesehen, ebensowenig Krämpfe. Regelmäßig sahen wir Dyspnoë im Gegensatz zu Biedl und Kraus (3), die Dyspnoë für den Shock der Hunde nicht für charakteristisch erklären. Ferner Erbrechen, Diarrhöe, starken, Urinabgang, Tenesmus und Würgen. In zwei Fällen haben wir einen kurzen Kollaps gesehen. Die anaphylaktische Blutdrucksenkung, deren Ausdruck nach Biedl und Kraus alle genannten Symptome sind, haben wir zweimal registriert und fanden Senkungen, die 30–40 mm Quecksilber betrug und auch sonst der Schilderung der genannten Autoren entsprachen. Immer sank die Zahl der Leukocyten um mindestens 2000, oft um 8 oder 10000. Bei diesen Zählungen wurden die physiologischen Verschiebungen durch die Verdauungsleukocytose in Rechnung gezogen. Doch war das nur selten nötig, da die meisten Versuche außerhalb der Verdauungszeit vorgenommen werden konnten. In einem Falle, bei einer hochschwangeren Hündin, war eine solche starke Leukopenie das einzige Symptom des Shocks.

Den Temperatursturz, dem Hermann Pfeiffer beim Meerschweinchen so großen diagnostischen Wert beimißt, konnten wir bei unseren Hunden nur in einigen Fällen schwach angedeutet vorfinden. Wir haben neben einem langsamen Absinken um 1–2° öfter auch Steigerungen um 2° im Rektum gefunden. Wie aus Heilners (7) und Fried-

bergers (1) Arbeiten hervorgeht, hängt es ja ganz von der Intensität und vor allem von den quantitativen Verhältnissen des Eiweißzerfalls ab, ob Fieber entsteht oder eine Temperatursenkung. Zudem arbeitet Pfeiffer stets an Meerschweinchen, also Tieren, deren Körperoberfläche viel größer ist im Verhältnis zum Inhalt als bei Hunden. Da die Ursache für den Temperatursturz, die wir doch wohl in einem Versagen der chemischen Wärmeregulierung suchen müssen, im Shock sehr bald wieder aufgehoben wird, ist es unwahrscheinlich, daß es bei Hunden ebenso schnell zu einer Abkühlung kommen soll wie bei dem viel kleineren Meerschweinchen mit der relativ größeren Oberfläche. Auch Biedl und Kraus (3) erwähnen die Temperatursenkung nicht beim Hunde, Schittenhelm und Weichardt (4) beobachteten dagegen Senkungen durchschnittlich um 2°.

Als Ausdruck der von Schittenhelm und Weichardt (8) besonders für Eiklar geforderten Enteritis anaphylactica fanden wir in drei Fällen Beimengungen von frischem Blute zum dünnen Stuhl.

Einer der normalen Hunde wurde kurz nach dem Abklingen der Symptome mit Chloroform getötet. Die Sektion ergab einige Hämorrhagien im Duodenum und Jejunum. Alle anderen Organe waren ohne Besonderheit. In der Leber fanden sich ein paar kleinere Blutungen, mikroskopisch war sie normal. Diese 7. Tiere galten als Kontrollen für die nun folgenden Versuche.

Es galt nun der Eckschen Leber den anaphylaktischen Eiweißzerfall entgegenzustellen, um zu sehen, ob sie in besonderer Weise an der Verarbeitung dieses Materials beteiligt ist, was ja nach den Erfahrungen der sogenannten Fleischintoxikation nicht gerade unwahrscheinlich schien.

Es wurden 11 Hunde untersucht, bei denen die Ecksche Fistel, wie oben erwähnt, angelegt worden war. Sensibilisierung und Reinjektion in denselben Verhältnissen wie bei den Kontrollen. Es folgen 4 Versuchsprotokolle als Beispiele.

1. Hund 145. Schnauzer, Ecksche Fistel am 17. XII. 12. Sensibilisierung am 19. XII. 12 mit 1 ccm Eiklar intravenös.

Reinjektion am 10. I. 13.

8⁶⁶ Temp. 39,2; Leukocyten 10 300, Neutrophile 64²/₃ Proz., Eosinophile 15 Proz.

9^a Reinjektion 10 ccm Eiklar intravenös.

9²⁰ Temp. 39,4.

9³⁰ Temp. 39,4. Der Hund befindet sich so wohl wie vorher, setzt einen festen Stuhl ab.

10³⁰ Temp. 39,4.

12^a Temp. 38,8. Leukocyten 9500, Neutrophile 64²/₃ Proz., Eosinophile 15¹/₃ Proz.

Der Hund hat die ganze Zeit keine Aenderung seines Befindens gezeigt.

2. Hund 159, brauner Schnauzer, Ecksche Fistel am 10. II. 13. Am selben Tage Sensibilisierung mit 1 ccm Eiklar intravenös.

Reinjektion am 15. III. 13.

10¹⁵ Temp. 38,6. Leukocyten 11 000.

10²⁰ Reinjektion 30 ccm Eiklar intravenös.

11¹⁰ Temp. 38,8.

1^a Leukocyten 11 900.

Der Hund war die ganze Zeit genau so munter wie sonst.

3. Hund 188, brauner Pinscher. Ecksche Fistel am 30. IV. 13. Blutung in operatione, in den nächsten Tagen zeigt der Hund die Symptome der Fleischintoxikation, die auf Kochsalzbehandlung verschwinden. Sensibilisierung am 13. VI. 13 mit 10 ccm Eiklar intravenös.

Reinjektion am 5. Juli 13.

11³⁰ Leukocyten 13 500.

11⁴⁰ Reinjektion 10 ccm Eiklar intravenös. Der Hund verhält sich wie sonst, setzt zwei feste und einen weichen Stuhl ab.

12⁴⁰ Leukocyten 13 800.

4. Hund 138, weißer braunfleckiger Hund. Ecksche Fistel am 5. XII. 12. Sensibilisierung mit 1 ccm Eiklar intravenös am 19. XII. 12.

Reinjektion am 17. I. 13.

3⁴⁵ Leukocyten 8200. Neutrophile 68 Proz.; Eosinophile 8 Proz.

3⁵⁵ Reinjektion 10 ccm Eiklar intravenös.

4⁵ setzt festen Stuhl ab und erbricht darauf reichlich.

4¹⁰ bricht nochmals.

6^b Leukocyten 7100; Neutrophile 74¹/₃ Proz., Eosinophile 10¹/₃ Proz.

Zweite Reinjektion am 21. I. 13.

5⁵ Leukocyten 10 900.

5⁷ Reinjektion 10 ccm Eiklar intravenös.

5¹⁵ erbricht.

5²⁵ erbricht nochmals.

6⁵⁰ Leukocyten 13 800.

Der Hund zeigt keine Aenderung im Befinden. Exitus an Phlorrhizinvergiftung am 1. II. 13. Fistel siebartig. Vena portae durchschnitten, Unterbindung nicht durchgängig.

Wir erwarteten bei der Reinjektion bei diesen Hunden schwere Symptome auftreten zu sehen und erlebten das Gegen-

teil. Sämtliche 11 Hunde zeigten nicht eine Spur von anaphylaktischen Zuständen, geschweige denn besonders schwere. Ein Hund (138) hat 10 Minuten p. r. erbrochen, ohne aber sonst etwas zu zeigen, was an Anaphylaxie gemahnt hätte. Bei einer zweiten Reinjektion 4 Tage später erbrach er wieder. Er war also auch nicht antianaphylaktisch geworden. Er wie alle übrigen liefen ebenso munter umher, wie vor der Reinjektion. Wenn Stuhl abgesetzt wurde, so war er geformt und fest. Die Temperatur zeigte bei einigen geringe Erhebungen um 0,2—0,3°. Bei anderen blieb sie konstant. Jedoch haben wir diesem Verhalten aus oben-erwähnten Gründen auch bei diesen Tieren keinen ausschlaggebenden Wert beigemessen. Die Atmung blieb gleichmäßig und ruhig. Das Interesse für die Vorgänge der Umgebung blieb dasselbe, während es bei den 7 normalen Hunden im Shock stets nachgelassen hat. Die Leukocytenzahl blieb konstant innerhalb der normalen Grenzen, und auch die anderen Verschiebungen im Blutbilde, die Nassau für unsere normalen Kontrolltiere beschrieben hat, traten nicht ein. Besonders sei nur hervorgehoben, daß sich auch keine Eosinophilie fand, die wir in Uebereinstimmung mit Schittenhelm bei unseren Kontrollen öfter auftreten sahen. Der Blutdruck wurde in 2 Fällen registriert und zeigte nicht die geringste Aenderung gegen vorher. Nach den Erfahrungen bei unsern Kontrolltieren und dem, was in der Literatur darüber vorliegt, wird man freilich mit dem refraktären Verhalten mancher Hunde zu rechnen haben. Immerhin ist wohl nicht anzunehmen, daß wir gerade in dieser Reihe 11 solcher Tiere gehabt hätten.

Für unsere Frage besagte dieses Resultat nicht viel. Wenigstens war es nicht ohne Analogien. Die Allgemeinerscheinungen vom Typus der Fleischintoxikation konnten aus ähnlichen Gründen ausgeblieben sein, aus denen sie auch bei Phlorizinvergiftung trotz starken Eiweißzerfalls nicht eintritt (Fischler und Kossow, 5). Und wenn die Leber selbst dem Sturm der Eiweißabbauprodukte trotz der Schädigung durch die Fistel nicht erlag, sondern ihrer Funktion genügte, so konnte das daran liegen, daß eben dieser Ansturm die Leber gar nicht plötzlich traf, sondern daß diese Stoffe nur in

kleinen Dosen allmählich der Leber zugeführt wurden, weil ihnen lediglich der Zutritt durch die Arteria hepatica offen stand. Wir hätten dann hier einen ähnlichen Vorgang gehabt, wie ihn Fischler (9) bei seinen Phosphorversuchen beim Eckschen Tiere fand. Man sollte erwarten, daß der Phosphor als spezifisches Lebergift auf eine geschwächte Leber stärker einwirkt als auf eine gesunde. Es verhindert aber die Portalblutleitung den Phosphor am Zutritt zur Leber und so findet man Ecksche Tiere resistenter gegen Phosphor als normale.

Aber alle diese Erwägungen erklärten nur, warum die erwarteten Folgen des Eiweißzerfalls ausgeblieben sein konnten. Sie sagten aber nicht, warum die ganze anaphylaktische Reaktion unterblieb, warum diese 11 Tiere nicht überempfindlich waren. Diese Erscheinung wurde nun zum Hauptgegenstande unserer Untersuchungen. Ehe wir aber auf diese Fragen eingehen, wollen wir eine zweite Versuchsreihe besprechen, die zwar auch für diese Frage von größter Bedeutung ist, doch zunächst unser Ausgangsthema erledigen sollte.

Wir hatten bisher nur den Eck-Hund sensibilisiert, es blieb uns noch übrig, einem sensibilisierten Hunde in einer Zeit, wo er wahrscheinlich anaphylaktisch war, die Ecksche Fistel anzulegen.

Wir injizierten also 10 weitere Hunde, teils subkutan, teils intravenös und operierten alle durchschnittlich 21 Tage später. Leider büßten wir gerade von diesen Tieren 6 durch die verschiedensten Umstände ein.

Die Ueberlebenden wurden 1—3 Tage nach der Operation reinjiziert und alle vier reagierten so, wie wir es von unseren normalen Hunden gesehen haben. Dyspnoë, Erbrechen, blutige dünne Stühle, Würgen, Tenesmus. Auch die Blutdrucksenkung wurde in einem Falle registriert und mit der des Shocks bei den Kontrollen übereinstimmend gefunden. In den beiden Fällen, in denen die Leukocyten gezählt wurden, sank ihre Zahl um mehr als 2000.

4. Hund 202, schwarzer Spitz. Sensibilisierung mit 5 cem 50 Proz. Eiklar subkutan am 29. V. 13.
Ecksche Fistel am 24. VI. 1913.
Reinjektion am 27. VI. 13 mit 10 cem Eiklar intravenös.

Nach etwa 2 Min. Würgen und mehrmaliges Erbrechen von Schleim, leichte Dyspnoë, die andauert. Injektion der Conjunctiven, Mattigkeit.

5. Hund 208, weiß-schwarzer Schnauzer. Sensibilisierung mit 1 ccm Eiklar intravenös am 8. VII. 13.

Ecksche Fistel am 28. VII. 13.

Reinjektion am 1. VIII mit 10 ccm Eiklar intravenös.

Deutliche Dyspnoë, Conjunctivalinjektion etwa 7 Min. lang. Der Hund liegt im Morphiumschlaf zur Blutdruckmessung, der Druck sinkt um etwa 30 mm hg.

Diese Tiere zeigten, daß die durch die partielle Ausschaltung geschädigte Leber nicht schwerer auf den anaphylaktischen Eiweißzerfall reagiert als die voll funktionsfähige. Es treten bei diesen Tieren keine Symptome auf, wie wir sie bei der Fleischintoxikation sehen, und für eine Schädigung des Leberparenchyms selbst lassen sich keine sichtbaren Beweise erbringen. Da Eck-Hunde immer Urobilin im Harn ausscheiden, so könnte nur eine quantitative Bestimmung brauchbare Ergebnisse liefern. Es sei damit nicht gesagt, daß Eiweißspaltprodukte einer geschwächten Leber nicht gefährlicher werden können als einer gesunden. Jedenfalls aber braucht die Leber mit Eckscher Fistel nicht auf Eiweißabbauprodukte, die irgendwo im Körper plötzlich und in großen Mengen entstehen mögen, besonders schwer zu reagieren. Vermutlich spielen ihre ungünstigen Zuflußbedingungen dabei eine große Rolle.

Eben dieser ungünstige Zufluß zur Leber war aber offenbar nicht allein daran schuld, wenn dieselbe Reinjektion bei diesen Tieren einen Shock auslöste, die bei den Tieren der ersten Reihe versagt hatte. War ein Tier anaphylaktisch geworden, so blieb es das auch nach Anlegung der Fistel. Ecksche Tiere aber konnten nicht überempfindlich gemacht werden. Wenn, wie es ja den Anschein hatte, die Leber überhaupt etwas mit dem Vergiftungsvorgang zu tun hatte, so genügte die Arteria hepatica als Zufluß, doch sobald das Gift nur zustande kam. Das machte auch der folgende Versuch klar:

Die große Ähnlichkeit des anaphylaktischen Shocks mit der Erkrankung nach Witte-Pepton hat viele Forscher veranlaßt, die Anaphylaxie einer Peptonvergiftung gleichzusetzen. Wir injizierten einem von unseren 11 Eck-Hunden, die sich gegen Eierklar refraktär verhalten hatten, eine

subletale Dosis Pepton und sahen eine schwere typische Reaktion. Es ist behauptet worden, daß die Leber imstande sei, das Pepton zu entgiften. Diese Behauptung ist jedoch längst von Munk (10) widerlegt worden. Auch die Versuche von Doyon (11), die später noch erwähnt werden sollen, und unsere eigenen Erfahrungen am sogenannten umgekehrten Eck-Hunde sprechen durchaus für das Gegenteil. Doyon injiziert das Pepton in den Ductus choledochus und bekommt mit kleinen Gaben schon schwere Vergiftungen. Der umgekehrte Eck-Hund gibt uns die Möglichkeit, intravenöse Injektionen direkt in die Leber zu machen. Auch darauf wird unten noch eingegangen werden. Wir haben bei einem solchen Tiere sofort das Bild der schweren Intoxikation gesehen nach Injektion von $1\frac{1}{2}$ g Witte-Pepton in Kochsalzlösung.

Das Phänomen mußte also andere Gründe haben. Diese galt es nun experimentell zu eruieren.

Zunächst sei eine Möglichkeit erwähnt, die sich rasch klarstellen ließ. Beim Eckschen Tiere geht alles venöse Blut des Darmes an der Leber vorbei in die Vena cava inferior, und nur ein kleiner Teil kommt auf dem Umwege durch das Herz und das arterielle System in die Leber. Reach (12) fand an der überlebenden Leber, daß sie Eiweißkörper nicht nur aufspeichern, sondern auch bis zur Albumosenstufe etwa abbauen kann. Freund und Popper (13) fanden, daß Eiweißkörper länger unverändert in der Blutbahn verweilen, wenn die Darmgefäße unterbunden sind. Sie ziehen daraus allerdings ganz andere Schlüsse. Sie beweisen damit, daß der Abbau auch parenteral einverleibten Eiweißes in den Darmzellen stattfindet. Aber schließlich ist diese Unterbindung auch nichts anderes als ein Fernhalten der Eiweißkörper vom Pfortadergebiet und damit von der Leber. Also in gewissem Sinne ähnlich wie bei der Eckschen Fistel. Wenn nun die Leber fähig ist, die Spezifität von Eiweißkörpern durch Abbau zu vernichten, für den Fall, daß diese aus irgendwelchen Gründen der Tätigkeit der Darmzellen entgangen sind, so ist es wohl möglich, daß in die Blutbahn der Eckschen Tiere vom Darne aus Eiweißkörper kommen, deren Spezifität noch wohl erhalten ist. Um so mehr als die sogenannten Idiosynkrasien gegen Krebse, Fische, Eier, wie sie beim Menschen doch allgemein als anaphylaktische Erscheinungen aufgefaßt werden, und die Fütterungsanaphylaxie, wie sie Lesné et Richet Fils (14) für Säuglinge, Börnstein (15) und andere

für Meerschweinchen beschrieben haben, trotz Darm- und Leberpassage doch auf Erhaltung der Spezifität der Eiweißkörper beruhen müssen. Unsere Hunde bekamen mit ihrem Futter, den Abfällen aus der Krankenhausküche häufig genug Eier. Meist wird es sich allerdings um durch Kochen denaturiertes Eiereiweiß gehandelt haben, aber es ist durchaus nicht ausgeschlossen, daß auch frisches Eiklar darunter war. Warum sollte nicht bei den Eck-Hunden durch das häufige Eindringen kleiner Dosen in die des Leberschutzes beraubte Blutbahn vom Darne aus eine Antianaphylaxie gegen Hühner-eiklar entstanden sein? Genau so wie man vorbehandelte Tiere durch häufigere Injektion kleiner Dosen vor allem im präanaphylaktischen Stadium antianaphylaktisch machen kann, ohne jemals einen Shock zu sehen zu bekommen (Pfeiffer, 2).

Wir operierten zwei frische Hunde und achteten peinlich darauf, daß sie nach der Operation auf die Dauer von 6 Wochen nur mit Milch und Reis und ähnlichem, jedenfalls ohne Eier, ernährt wurden. Nur etwa 14 Tage nach der Operation bekamen sie jeder an 2 Tagen je 10 Eier zu fressen, die zum Teil mit der Sonde einverleibt werden mußten. Reichlich 3 Wochen später wurden beide mit der üblichen Dosis von 10 ccm Eiklar reinjiziert, ohne auch nur das geringste Zeichen von Anaphylaxie zu geben.

Die beiden letzten Versuchsreihen wiesen uns in eine neue Richtung. Der anaphylaktische Shock ist nach Friedberger: „die giftige Wirkung von unter Einfluß des Komplements aus Antigen und Antikörper entstehenden Abbauprodukten.“ Der erste Versuch hatte gezeigt, daß die Reinjektion des Antigens nicht das Ausschlaggebende war. Folglich mußte man nachsehen, ob dem Eck-Hunde vielleicht eine der beiden anderen Komponenten fehlte, die Antikörper oder das Komplement. Und besonders der letzte Versuch wies uns auf die Antikörper hin. Da es nicht gelungen war, bei weitgehender Ausschaltung der Leber eine Fütterungsanaphylaxie zu erzeugen, so war eben vielleicht gerade die Leberpassage oder der gewisse Abbau, den Reach gefunden hatte, nötig, um dem Eierklar die sensibilisierenden Eigenschaften zu verleihen.

Um Antikörper beim vorbehandelten Eck-Hunde nachzuweisen, machten wir zunächst einen Versuch, uns der passiven Anaphylaxie zu bedienen. Wenn der Eck-Hund wirklich nicht die Fähigkeit hatte, Antikörper zu bilden, so mußte es auch

unmöglich sein, Meerschweinchen mit dem Serum sensibilisierter Eck-Hunde passiv anaphylaktisch zu machen. Es ist uns aber weder mit der Methode von Otto (16) noch mit der von Doerr und Russ (17) gelungen, befriedigende Resultate zu bekommen. Alle unsere Meerschweinchen bekamen zwar Temperatursenkungen, aber es waren keine Unterschiede zu bemerken zwischen den Meerschweinchen, die mit Eck- oder Normalhundserum passiv sensibilisiert worden waren, und denen, die mit Serum nicht vorbehandelter Hunde oder überhaupt nicht gespritzt waren, bei Reinjektion der gleichen Menge Antigen. Frisches Hundeserum ist für Meerschweinchen toxisch und nach halbstündiger Erwärmung auf 50° haben wir nur die genannten Mißerfolge gesehen.

Hermann Pfeiffer (2, p. 196) und Hartoch (18), sowie Doerr und Russ (19) meinen, daß die Stoffe, die wir Präzipitine nennen, identisch seien mit den anaphylaktischen Immunkörpern. Das sollte uns eine zweite Möglichkeit an die Hand geben, Antikörper nachzuweisen. Wir suchten mit der bekannten Uhlenhuthschen Methode nach, ob unsere Eck-Hunde imstande seien, Hühnereiklar zu präzipitieren. Auch das gelang weder mit Eck-Hund- noch mit Normalhundserum, obwohl sich die Normalhunde als sicher anaphylaktisch erwiesen. Auch Leonor Michaelis (20) schreibt, daß die Hunde überhaupt keine präzipitierenden Stoffe bilden. Demgegenüber steht eine Mitteilung von Ascoli (21) vereinzelt da, der von Hunden schon normalerweise Präzipitation von Eierklar sah.

Kraus und Novotny (22) haben vor einiger Zeit gegen die Aufstellung einer solchen Identität Front gemacht und haben auch Seren beschrieben von Tieren, die sicher anaphylaktisch waren, ohne daß diese Seren präzipitieren konnten. In seiner Entgegnung auf diese Arbeit betont Friedberger, daß er diese Identität nur als Arbeitshypothese betrachtet wissen wollte, daß man jedoch bei einem Versagen der sinnlich wahrnehmbaren Präzipitinreaktion die viel feinere Komplementablenkung zu Rate ziehen solle.

Wir hatten auch damit bereits versucht, den Antikörpergehalt unserer Seren zu ermitteln. Als hämolytisches System benutzten wir dasselbe, wie es zur Wassermannschen Re-

aktion benützt wird, ebenso das Komplement. Komplement und Ambozeptor wurden vorher austitriert. Das Resultat war wiederum negativ. Das Serum von sicher anaphylaktischen Tieren ist ebensowenig imstande, die Hämolyse zu hemmen wie das von nicht vorbehandelten.

Das spricht gegen Friedbergers und der erstgenannten Autoren Arbeitshypothese. Es hat vor allem eine grosse Bedeutung für unsere Versuche. Darauf soll später noch eingegangen werden.

Bei der Suche nach dem Komplement unserer Eck-Hunde waren wir glücklicher. Wir hätten nach Friedbergers und Seeligs Versuchen an entlebten Fröschen (23) eine Verarmung erwarten können. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist das nicht der Fall. Die komplettierende Wirkung des Hundeserums ist viel geringer als die des Meerschweinchens, aber ein Einfluß der Leberatrophie ist nicht ersichtlich. Das unverdünnte Hundeserum gibt durchschnittlich in $\frac{1}{2}$ — $\frac{3}{4}$ Stunde komplette Lösung. Schon bei der Verdünnung 1:1 ist eine deutliche Verlangsamung zu spüren und 1:10 ist ganz unwirksam. Wir benutzten wieder das gleiche hämolytische System wie oben.

Serum von	Hämolyse komplett nach					Kontrollen ohne Amboz. Ser. pur.
	pur.	1:1	1:10	1:20	1:40	
Eckhund 229	$\frac{1}{2}$ Std.	1 Std.	∅	∅	∅	∅
" 206	—	—	∅	∅	∅	—
" 195	$\frac{3}{4}$ Std.	1 Std.	∅	∅	∅	∅
" 215	$\frac{1}{2}$ "	—	—	—	—	∅
Normalhund 1	$\frac{1}{2}$ "	1 Std.	∅	∅	∅	∅
" 2	$\frac{1}{2}$ "	—	—	—	—	—
Meerschw.	—	—	$\frac{1}{2}$ Std.	—	—	∅

Unterdessen kam uns eine andere Beobachtung zu Hilfe. Die sogenannten umgekehrten Eck-Hunde geben uns die Möglichkeit, Injektionen auf dem Blutwege direkt in die Leber zu machen. Bei diesen Tieren wird nämlich nach Anlegung der Anastomose die Cava unterbunden. So muß alles Blut der unteren Körperhälfte durch die Wurzel der Porta in die Leber. Wenn also die Leber für die Sensibilisierung eine Be-

deutung besaß, so mußte der umgekehrte Eck-Hund zur Klärung dieser Frage beitragen können.

In dieser Erwartung hatten wir uns nicht getäuscht. Wir injizierten 3 solcher Hunde in die Vene des Hinterfußes, also so, daß die gesamte Injektion alsbald durch die Leber gehen mußte und reinjizierten nach dem üblichen Intervall ebenfalls in den Hinterfuß. Alle 3 Hunde zeigten die schwersten Formen des Shocks, die wir überhaupt gesehen haben.

7. Hund 171, rehbrauner Dackel. Umgekehrte Ecksche Fistel am 18. III. 13. Sensibilisierung mit 1 ccm Eiklar iv. (Hinterbein) am 19. III. 13. Reinjektion am 9. IV. 13.
 10^{15} Leukocyten 10 800.
 10^{20} Reinjektion von 10 ccm Eiklar iv. (Hinterbein).

Sofortiger Kollaps, der etwa 10 Minuten anhält und dann in leichtere Benommenheit übergeht. Schweres Erbrechen und Würgen, deutliche Dyspnoë mit starker abdominaler Atmung. Abgang von viel geformtem Stuhl und Urin sofort nach der Reinjektion. Danach starke Injektion der Konjunktiven, die nach 20 Minuten wieder verblaßt. Wiederholt Abgang von Stuhl und Urin, dann deutlicher Tenesmus. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde kann der Hund zwar wieder laufen, ist aber immer noch gedrückt und atmet schwer.

1^{a} Leukocyten 7030.

Der Hund hat sich ganz erholt.

8. Hund 186, Jagdhund. Umgekehrte Ecksche Fistel am 23. IV. 13. Sensibilisierung mit 1 ccm Eiklar iv. (Hinterbein) am 26. IV. 13. Reinjektion am 19. V. 13 mit 10 ccm Eiklar iv. (Hinterbein).

Sofort nach der Injektion schreit der Hund unvermutet auf und springt in die Höhe. Gleich darauf deutliche Dyspnoë, die immer stärker wird. Dünner Stuhl und Erbrechen in kurzen Intervallen. Der Hund schwankt und legt sich nieder, ist nicht imstande stehen zu bleiben, und sehr matt. Konjunktivalinjektion, starke Salivation. Der Zustand dauert etwa $1\frac{1}{2}$ Stunde an, dann tritt langsam Erholung ein.

9. Hund 191, Wolfshund. Umgekehrte Ecksche Fistel am 14. V. 13. Sensibilisierung am 6. Okt. 13 mit 2—3 ccm Eiklar iv. (Hinterbein). Reinjektion am 11. XI. 13 10 ccm Eiklar iv. (Hinterbein).

Würgebewegungen des Abdomens, die Atmung wird tiefer und geht rasch in eine starke Dyspnoë über. Der Hund gibt einen dünnen breiigen Stuhl von sich und sinkt langsam zusammen. Starke Salivation und Sekretfluß aus der Nase. Die Konjunktiven sind injiziert. Die Dyspnoë und das Würgen sowie der apathische Zustand dauern $\frac{1}{2}$ Stunde an, dann tritt allmählich Erholung ein.

Zweite Reinjektion am 14. XI. 13 bleibt erfolglos.

Die 3 Hunde zeigten eine starke Injektion der Konjunktiven, die wir auch dreimal bei unseren Kontrolltieren und zweimal bei den Eck-Hunden sahen, die vor der Operation sensibilisiert wurden. Man kann diese Conjunctivitis anaphylactica als sicheres Zeichen der peripheren Vasodilatation betrachten. Sie stellt insofern eine ähnliche Erscheinung dar wie die Enteritis anaphylactica von Schittenhelm und Weichardt, hat aber den Vorzug, daß sie ohne weiteres sichtbar zutage liegt, daß man also Auftreten und Verblässen genau verfolgen kann. Sie tritt spätestens 5—7 Minuten p. r. auf und kann bis zu $\frac{1}{2}$ Stunde anhalten.

Waren diese Krankheitsbilder auch geringfügig gegen die von Schittenhelm und Weichardt und Biedl und Kraus, die bekanntlich Tod und Krämpfe häufig gesehen haben, so waren sie doch im Verhältnis zu den Erscheinungen bei unseren Kontrollen so auffallend schwer, daß wir sie als Bestätigung unserer Erwägungen glauben auffassen zu dürfen. Leider muß man sich vorderhand mit allgemeinen Eindrücken bei der Beurteilung eines Shocks behelfen, weil noch keine exakte Maßmethode besteht. Pfeiffers Berechnung, die bei Meerschweinchen so schöne Vergleiche ermöglicht, ist auf den Hund nicht anwendbar. Wir verlassen uns aber gerade bei diesen Tieren um so eher auf den allgemeinen Eindruck, weil die umgekehrten Eck-Hunde sich einer enormen Resistenz gegen alle Schädigungen erfreuen, während die Eck-Hunde immer von etwas zarter Konstitution sind. Schon das weist darauf hin, daß es sich bei der genannten schweren Reaktion um die Hyperfunktion eines Organes handelt, und das ist bei diesen Tieren eben die Leber. Wie erwähnt, sind alle diese Versuche mit Eierklar angestellt. Bei einigen Versuchen mit Rinder-serum fanden wir frisches Serum schon bei der ersten Injektion schwer toxisch für Hunde. Es wäre möglich, daß die schweren Bilder der genannten Autoren darauf zurückzuführen sind, daß sie diese Komponente außer acht ließen.

Zudem machten wir noch die Probe auf das Exempel und injizierten zwei andere umgekehrte Eck-Hunde mit der gleichen Menge in die Vene des Vorderbeins, so daß also das Antigen etwa in denselben Quanten durch die Leber kommt wie beim normalen Hunde, weil es erst an den Nieren vor-

bei muß. Danach reinjizierten wir wieder in die Hinterbeinvene und bekamen dieselben relativ leichten Symptome, wie wir sie bei unseren Kontrollen gesehen hatten. Die Versuchsanordnung zeigte gleichzeitig, daß auch hier nicht der Reinjektion die ausschlaggebende Rolle zukommt.

10. Hund 91, Fox. Umgekehrte Ecksche Fistel am 6. I. 12. Sensibilisierung mit 1 ccm Eiklar iv. am 21. XII. 12 (Vorderbein).

Reinjektion am 11. I. 13.

9^a Temp. 38,5. Leukocyten 8200.

9^b Reinjektion von 10 ccm Eiklar iv. (Hinterbein).

9¹⁰ Temp. 39, erbricht etwas dünnflüssigen Schleim.

9¹⁵ setzt einen zum Teil dünnen Stuhl ab.

9²⁰ Temp. 38,8.

9⁶⁰ Temp. 39,1. Der Hund spielt wieder, Leukocyten 5300.

12^b Temp. 39,1, Leukocyten 3000. Der Hund hat sich vollkommen erholt.

11. Hund 133, schwarzer Spitz. Umgekehrte Ecksche Fistel am 12. III. 12. Sensibilisierung am 19. III. 13 mit 1 ccm Eiklar in die Vorderbeinvene.

Reinjektion am 9. IV. 13.

12³⁰ Leukocyten 17 900.

12⁴⁵ Reinjektion von 10 ccm Eiklar iv. (Hinterbein).

Der Hund setzt geformten Stuhl ab und läßt reichlich Urin. Deutliche Dyspnoë, wiederholt Abgang von dünnem Stuhl, Tenesmus vorübergehendes Wanken und Umsinkenwollen, kann sich aber auf den Beinen halten. Der Hund, der sonst sehr wild ist, ist auffallend ruhig.

3⁴⁵ Leukocyten 6800.

Diese Versuche machen klar, daß die anaphylaktische Reaktion um so stärker ist, je mehr Antigen bei der ersten Injektion sofort durch die Leber geht, und je funktionskräftiger diese Leber ist. Offenbar hat also die Leber eine Bedeutung für die Sensibilisierung. Welcher Art diese sein mag, soll im folgenden erörtert werden.

Aus dem Ausfall aller geschilderten Versuche scheint uns mit Sicherheit hervorzugehen, daß das Hühnereiklar nur dann sensibilisierend wirken kann, wenn es die Leber passiert hat. Wir wollen damit aber nicht sagen, daß wir in der Leber den Ort der Antikörperbildung für Hühnereiweiß suchen, ähnlich wie man etwa die Antitoxine gegen das Tetanusgift an den Zellen des Nervensystems entstehen läßt.

Zu diesem Punkte der Erörterung ist es notwendig, auf Versuche von Manwaring (24) einzugehen. Wir geben deshalb zunächst einen kurzen Bericht seiner Arbeit.

Manwaring hat Hunde mit Pferdeserum anaphylaktisch gemacht und dann durch kühne Unterbindung und Umleitung des Blutstromes die Leber total ausgeschaltet. Derartig vorbereitete Tiere bekommen keine anaphylaktische Reaktion bei der Reinjektion. Er bekommt eine atypische Reaktion bei solchen Tieren nur dann, wenn er innerhalb dreier Minuten nach der Reinjektion die Ligaturen löst, also die Leber wieder einschaltet. Tut er das erst nach 5 Minuten, so unterbleibt die Reaktion, und die Tiere erweisen sich für eine zweite Injektion überempfindlich. Er meint, daß die Endothelien der Blutgefäße in dieser Zeit die Fähigkeit gewinnen könnten, das Antigen zu vernichten. (Warum er die Ausscheidung durch die Nieren gar nicht in Rechnung zieht, ist nicht ersichtlich.)

Manwaring hat nur die Bedeutung der Leber für die Reinjektion feststellen können. Mehr ermöglicht ihm seine Versuchsanordnung nicht, da ihr die Tiere wohl sicher innerhalb weniger Stunden erlegen sind. Er fordert ein Koenzym, was im Darm-Lebergebiet auf die Präparierung hin gebildet werden und das Antigen der Reinjektion dann nach Art der Darmenzyme abbauen soll. Jedoch bemerkt er ausdrücklich, daß er nicht einmal eine Arbeitshypothese über diese Vorgänge aufstellen wolle.

Manwarings Beobachtungen, die uns leider erst nach Abschluß unserer Versuche zu Gesicht kamen, geben mit unseren Ergebnissen ein harmonisches Ganzes. Weil gerade unsere Versuche die Bedeutung der Leber für die Präparierung beleuchten, die Manwaring lediglich theoretisch erschloß. Freilich muß man sich dabei immer gegenwärtig halten, daß Manwaring mit Pferdeserum gearbeitet hat, während wir Eierklar nahmen. Wir haben allerdings auch zwei Eck-Hunde mit Pferdeserum nicht anaphylaktisch machen können, jedoch sind diese Versuche noch nicht abgeschlossen und verwendbar.

In der Tat haben wir ja gefunden, daß es nur mit Beteiligung der Leber gelingt, den Hund zu sensibilisieren, und zwar mit einer Leber, die voll funktionskräftig im Blutstrom steht. Aber nach dem, was wir aus Reachs und anderen

Arbeiten über die Funktion der Leber dem Eiweiß gegenüber wissen, sind wir noch nicht in der Lage, der Leber ohne weiteres die Antikörperbildung zuzuschreiben. Das hypothetische Koenzym Manwarings ist ja schließlich auch nur ein Wort für dieselbe Wirkung, wie sie etwa Pfeiffer seinem fermentartigen Antieiwweiß oder andere Autoren dem Ehrlichen Antikörper plus Komplement zuschreiben (Kiss, 25). Die Tatsache, daß wir von der Leber noch nichts Sicheres, von den polynukleären Leukocyten aber nach Felländer und Kling (26) bestimmt wissen, daß sie eine Quelle des Reaktionskörpers (Antikörper Ehrlichs) sind, sollte uns vorderhand davon abhalten. Denselben Autoren ist es freilich auch gelungen, mit Leberemulsion von Kaninchen bei Meerschweinchen anaphylaktische Bilder hervorzubringen, jedoch bemerken sie ausdrücklich, daß es für diesen Versuch gleichgültig war, ob der Träger der Leber sensibilisiert war oder nicht. Man muß sich also hüten, diese Beobachtung bei unserer Frage zu verwenden.

Die Deutung, die Friedberger den Versuchen von Manwaring gibt, läßt sich nicht mit unseren Beobachtungen in Einklang bringen. Friedberger meint, gestützt auf seine Versuche an Fröschen (23), daß die Ausschaltung der Leber eine Komplementverarmung zur Folge habe, und daß aus diesem Grunde die Reaktion nicht vor sich gehen könne. Manwaring schließt nun seine Ligaturen erst kurz vor der Reinjektion und öffnet sie schon 3 Minuten später wieder, wenn er noch einen Shock erhalten will. Dann müßte also das Komplement innerhalb weniger Sekunden bis auf unwirksame Reste verschwinden und ebenso rasch wieder erscheinen. Das Komplement hält sich aber im Glase viel länger wirksam. Demnach müßte im Körper dauernd Komplement in größeren Mengen zerstört und neugebildet werden. Die von Friedberger tatsächlich beobachteten Komplementverarmungen an den Fröschen waren erst nach 6 Tagen manifest. Außerdem aber haben wir oben mitgeteilt, daß sich ein Einfluß der Eckschen Schädigung auf die komplettierende Wirkung des Serums nicht geltend macht und trotz normalen Komplementgehalts haben unsere Eckschen Tiere auch keine anaphylaktische Reaktion gegeben.

Wir sehen also keinen Grund, unsere Deutung der Ergebnisse Manwarings und unserer eigenen Versuche zu ändern.

Das, was wir bisher vom Verhalten der Leber gegenüber dem zirkulierenden Eiweiß wissen, ist, daß sie imstande ist,

es zu speichern. Das hat Reach für die überlebende und Seitz (27) für die Leber im Organismus bewiesen. Damit stehen weder Manwarings noch unsere Versuche in Widerspruch. Unsere Versuche haben gezeigt, daß der Körper nur dann sensibilisiert werden kann, wenn die Leber diese ihre Funktion voll ausüben kann. Denn, wie unsere Eck-Hunde zeigen, genügen nicht die geringen Mengen, die ihrer Leber durch die Arteria hepatica zukommen mögen, und ehe mehr abgelagert werden kann, ist alles schon wieder ausgeschieden. Eine reichliche Durchblutung ist erforderlich, und je schneller das Eiweiß in die Leber kommt, desto mehr wird behalten, das zeigen die umgekehrten Eck-Hunde. Und Manwarings Versuche zeigen, daß die anaphylaktische Reaktion beim Hunde zirkumskript im Lebergebiet vor sich geht. Das heißt weiter nichts, als die Leber fängt die Reinjektionsmasse ebenso ab, wie sie die präparierenden Mengen aufnahm, und wenn der Zutritt zur Leber ganz versperrt ist, so tritt die Ausscheidung durch die Nieren ein, und der Organismus bleibt empfänglich. Ist der Zutritt aber nicht vollkommen unmöglich, sondern nur verengt, wie bei Manwarings Hund, bei dem die Ligaturen nicht fest saßen, oder bei unseren Tieren, die die Ecksteins Anastomose erst kurz vor der Reinjektion angelegt bekamen, so genügt das zum Zustandekommen einer Reaktion.

Gewiss kann man sich der Vermutung nicht verschließen, daß die Leber wohl noch mehr als nur speichernde Wirkungen entfaltet bei der Eiweiß-Antieiß-Reaktion. Claude Bernard (28) teilt mit, daß Eiereiweiß im Harn wieder erscheint, wenn es in die Jugularvene injiziert wird, daß es dagegen nicht ausgeschieden wird, wenn man es in die Vena portae spritzt, und er schreibt dazu: „Il existe dans le foie une création de matériaux nouveaux qui se melangent au sang, tel qu'il arrive par la veine porte et qui réagissent sur ses éléments de telle façon qu'il donnent lieu à de combinaisons nouvelles.“ Diese „combinaisons nouvelles“ sind jetzt eben noch so hypothetisch wie damals, immerhin aber bleibt der Satz bestehen, daß Eiereiweiß in der Leber eine Veränderung durchmacht. Ueber die Art dieser Veränderung liegen nur wenige Mitteilungen vor. So fand Reach an der überlebenden Leber, daß sie das aufgespeicherte Eiweiß auch abbauen kann

und nach Slowzow (29) soll die Leber die Fähigkeit besitzen, Albumine in Globuline zu verwandeln. Wenn die Globuline die sensibilisierende Fraktion darstellen, so dürfte das von großer Bedeutung sein (19). Wilhelm Spät (30) berichtet dann von einer adsorptiven Wirkung der Leberzellen auf Friedbergers Anaphylatoxin, die diejenige der Leukozyten übertrifft, Blaizot (31) von auffallend schweren Shockerscheinungen, allerdings beim Kaninchen nach Reinjektion in den Ductus choledochus und Doyon (11) schreibt dasselbe vom Hunde nach Peptoninjektionen. Er hat aus der Hundeleber einen Stoff extrahiert, den er Antithrombin nennt, der auf Peptoninjektionen hin in großer Menge abgeschieden wird und dadurch das ganze Krankheitsbild verursachen soll.

Halten wir nun mit diesen vereinzelt Beobachtungen unsere eigenen zusammen, und bedenken wir, daß nicht nur Manwarings Versuche, sondern auch noch das Fehlschlagen der serologischen Reaktionen beim Hunde sehr für fixes Anaphylaktin oder sessile Rezeptoren sprechen, so liegt der Gedanke sehr nahe, den Leberzellen eine bedeutsame Wirkung auf zirkulierendes Eiweiß zuzuschreiben, die mehr ist als ein bloßes Speichern. Allein über eine Vermutung kommen wir bis jetzt noch nicht hinaus.

Mit Sicherheit geht aber aus unseren Versuchen hervor die Notwendigkeit der Leberpassage für die anaphylaktogene Wirkung des Eiklars beim Hunde. Auch die Befunde bei der Fütterungsanaphylaxie lassen sich zwanglos in diesen Gedankengang einreihen. Das Eiweiß, das der Tätigkeit der Darmzellen aus verschiedenen Gründen, Ueberfütterung, Läsion oder andere entgangen ist, bekommt in der Leber erst seine Fähigkeit, zu sensibilisieren. Ob für den nächsten Schub, der die Erkrankung auslöst, die Leberpassage ebenso bedeutungsvoll ist wie für die Reinjektion bei Manwarings Tieren, muß dahingestellt bleiben.

Zusammenfassung.

1) Es gelingt nicht mit Hilfe der Eck'schen Fistel eine verminderte Resistenz der geschwächten Leber gegen Eiweißspaltprodukte nachzuweisen, wie sie beim anaphylaktischen Shock entstehen.

2) Es gelingt nicht, Tiere mit Eckscher Fistel gegen Eiklar anaphylaktisch zu machen, denn:

3) Das Eiklar bedarf der Leberpassage, um im Organismus des Hundes sensibilisierend wirken zu können.

4) Der anaphylaktische Shock ist um so stärker, je mehr Eiklar bei der Sensibilisierung durch die Leber geht, und je funktionsfähiger diese Leber ist (umgekehrter Eck-Hund).

5) Es ist zu vermuten, daß die Leber zirkulierendes genuines Eiweiß nicht nur zu speichern, sondern auch zu verändern vermag.

Diese Versuche sind auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Fischler gemacht worden. Ich danke ihm auch hier für seine gütige Unterstützung während der Arbeit und für die freundliche Ueberlassung des Tiermaterials.

Bei Anstellung der serologischen Reaktionen haben mir Herr Dr. Bardach und Herr Dr. Freund mit technischen Ratschlägen geholfen. Auch den beiden Herren möchte ich hier nochmals meinen Dank sagen.

Literatur.

- 1) Friedberger, Zahlreiche Arbeiten in der Zeitschr. f. Immunitätsf.
- 2) Pfeiffer, Das Problem der Eiweißanaphylaxie. Fischer, Jena 1910.
- 3) Biedl und Kraus, Wien. klin. Wochenschr., 1909, p. 366; dieselben ebenda 1910.
- 4) Schittenhelm und Weichardt, Münch. med. Wochenschr., 1910, p. 1769.
- 5) Fischler und Kossow, Deutsches Arch. f. klin. Med., Bd. 111, 1913, p. 479.
- 6) Fischler, Abderhaldens Methoden, 1912.
- 7) Heilner, Zeitschr. f. Biol., Bd. 58, 1912, p. 333.
- 8) Schittenhelm und Weichardt, Deutsche med. Wochenschr., 1911, p. 867.
- 9) Fischler und Bardach, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 78, 1912.
- 10) Munk, Arch. f. Anat. u. Physiol., physiol. Abteil., 1890, Suppl. p. 137.
- 11) Doyon et Gautier, Compt. rend. de la Société biol., 1908, I, p. 149. Doyon, Morel et Policard, ebenda, 1911, I, p. 372.
- 12) Reach, Biochem. Zeitschr., Bd. 16, 1909, p. 357.
- 13) Freund und Popper, Biochem. Zeitschr., Bd. 15, 1909, p. 272.
- 14) Lesné et Richet Fils, Arch. de Médecine d'enfants, 16, p. 81.
- 15) Börnstein, Centralbl. f. Bakt., Bd. 50, 1909.
- 16) Otto, Münch. med. Wochenschr., 1907, p. 1665.
- 17) Doerr und Russ, Nach Friedberger, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, p. 581.
- 18) Hartoch, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, 1910, p. 153.

- 19) Doerr und Russ, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, p. 206 u. 706.
- 20) Michaelis, Abderhaldens Methoden.
- 21) Ascoli, Münch. med. Wochenschr., 1903.
- 22) Kraus und Novotny, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, p. 692.
- 23) Friedberger und Seelig, Centralbl. f. Bakt., Orig., Bd. 46.
- 24) Manwaring, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, p. 1.
- 25) Kiss, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, p. 558.
- 26) Felländer und Kling, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15.
- 27) Seitz, Pflügers Arch., Bd. 111, p. 309.
- 28) Claude Bernard, Leçons de Physiologie expérimentale I. Paris 1855.
- 29) Slowzow, Russ. Arch. f. Pathol., Klin. Med. u. Bakt., zit. n. Seitz.
- 30) Spät, Berl. klin. Wochenschr., 1913, p. 831.
- 31) Blaizot, Compt. rend. de la Société biol. 1911, 70, p. 385.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Institut für Hygiene und Bakteriologie der Universität
Straßburg (Direktor: Geheimrat Prof. Dr. Uhlenhuth).]

Ueber den Einfluß von Galle und Cholesterin auf die Bildung und Wirkung des sogenannten Anaphylatoxins.

Von **H. Dold** und **M. Rhein**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 9. Dezember 1913.)

In früheren Arbeiten sind von Dold und Aoki¹⁾ die verschiedenen Bedingungen studiert worden, unter welchen eine Abschwächung und völlige Aufhebung der Anaphylatoxinbildung oder -wirkung erfolgt.

Es zeigte sich, daß bei Vorbehandlung der Bakterien mit Alkalien und mit Oelen, ihre Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung bedeutend abnahm und in vielen Fällen eine nachweisbare Giftbildung ganz unterblieb.

In Fortsetzung dieser Studien haben wir auch die Wirkung der Galle auf den Prozeß der Anaphylatoxinbildung aus Bakterien untersucht. Wir gingen dabei teils so vor, daß wir die Bakterien, ehe wir sie der Digestion mit dem Meer-schweinchenserum aussetzten, in geringen Mengen von Meer-

1) Dold und Aoki, Zeitschr. f. Immunitätsforsch., Bd. 15, 1912, Heft 2/3.

schweinchengalle aufschwemmten und schüttelten, teils so, daß wir nach erfolgter Anaphylatoxinbildung geringe Mengen Meerschweinchengalle zusetzten und verschieden lange einwirken ließen, bevor wir das Serum einspritzten.

Die Einzelheiten ergeben sich aus den Versuchen, deren Beschreibung wir hier folgen lassen.

1. Versuch.

9 Oesen einer 48-stündigen Typhuskultur werden in 1 ccm frischer Meerschweinchengalle zerrieben und über Nacht im Eisschrank gehalten.

Hierauf wird die Typhusbacillengalleaufschwemmung mit 12 ccm frischem Meerschweinchenserum versetzt und 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert. Zur Kontrolle werden 3 Oesen derselben Typhuskultur mit 4 ccm desselben Mischserums versetzt und ebenfalls 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert. Von den hierauf klar zentrifugierten Seris erhält:

Meerschw. 1 (210 g) 4 ccm „Galleserum“ i.v. Wirkung: Leichte Erscheinungen.

Meerschw. 2 (200 g) 4 ccm „Galleserum“ i.v. Wirkung: 0.

Meerschw. 3 (200 g) 4 ccm „Kontrollserum“ i.v. Wirkung: Starke Krämpfe. † 2'.

Meerschw. 4 (190 g) 4 ccm „Galleserum“ i.v. Wirkung: Atemnot. Leichte Erscheinungen.

2. Versuch.

9 Oesen einer 48-stündigen Typhusbacillenkultur werden in 1,5 ccm $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erhitzter Galle verrieben und 5 Stunden bei 37° C stehen gelassen. Hierauf werden 12 ccm frisches Meerschweinchenserum zugesetzt, und das ganze wird 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert.

Zur Kontrolle werden 3 Oesen derselben Kultur mit 4 ccm desselben Mischserums versetzt und ebenfalls 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert.

Nach Ablauf dieser Zeit erhält:

Meerschw. 5 (200 g) 4 ccm „Galleserum“ i.v. Wirkung: Leichte Atemnot.

Meerschw. 6 (190 g) 4 ccm „Galleserum“ i.v. Wirkung: Atemnot, sonst nichts Besonderes.

Meerschw. 7 (220 g) 4 ccm „Galleserum“ i.v. Wirkung: Atemnot, Zittern.

Meerschw. 8 (210 g) 4 ccm „Kontrollserum“ i.v. Wirkung: Starke Krämpfe, fällt um, erholt sich langsam wieder.

3. Versuch.

0,3 ccm einer Meerschweinchengalle, in der zahlreiche Staphylokokken spontan gewachsen sind, werden mit 4 ccm frischem Meerschweinchenserum versetzt und 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert.

Das klar zentrifugierte Serum wird einem Meerschweinchen No. 9 von 190 g Gewicht i.v. injiziert.

Wirkung: Atemnot, Zittern.

4. Versuch.

8 Oesen *Prodigiosus* bacillen (mit starker Farbstoffbildung) werden in 1 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt. Nach 2 Stunden werden 16 ccm frischen Meerschweinchenserums zugefügt und 24—48 Stunden lang im Eisschrank digeriert.

Nach 24 Stunden erhält von dem „Galleserum“:

Meerschw. 10 (210 g) 4 ccm i.v. Wirkung: Starke Krämpfe, Lungenblähung. † 3'.

Meerschw. 11 (200 g) 4 ccm i.v. Wirkung: Krämpfe, erholt sich.

Nach 48 Stunden erhält von dem „Galleserum“:

Meerschw. 12 (200 g) 4 ccm i.v. Wirkung: Krämpfe, Lungenblähung. †.

Meerschw. 13 (190 g) 4 ccm i.v. Wirkung: Krämpfe, fällt um, erholt sich wieder.

5. Versuch.

Es wird folgende Versuchsreihe aufgestellt:

- a) 2 Oesen *Prodigiosus* bacillen (mit starker Farbstoffbildung) werden in 0,3 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt.
- b) 2 Oesen „Roter Kieler“ (mit starker Farbstoffbildung) werden in 0,3 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt.
- c) 3 Oesen „Roter Kieler“ (mit starker Farbstoffbildung) werden in 0,3 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt.
- d) 2 Oesen *Sarcina aurantiaca* (geringe Farbstoffbildung) werden in 0,3 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt.
- e) 2 Oesen Friedländer werden in 0,3 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt.
- f) 2 Oesen Typhusbacillen werden in 0,3 ccm frischer Meerschweinchengalle aufgeschwemmt.
- g) 2 Oesen Typhusbacillen werden in 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Die Aufschwemmungen a, b, c, d, e, f und g bleiben 2 Stunden bei Zimmertemperatur.

Hierauf wird zu jeder der Aufschwemmungen 4 ccm eines frischen Meerschweinchenmischserums zugesetzt; es wird 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert, hierauf werden die einzelnen Röhren klar zentrifugiert und je 4 ccm der verschiedenen Sera Meerschweinchen i.v. injiziert.

Es erhält:!

Meerschw. 14 (190 g) 4 ccm aus Mischung a) Wirkung: Schwere Krämpfe, Lungenblähung, † 2'.

- Meerschw. 15 (210 g) 4 ccm aus Mischung b) Wirkung: Krämpfe, fällt um, erholt sich.
 Meerschw. 16 (200 g) 4 ccm aus Mischung c) Wirkung: Krämpfe, † 3'.
 Meerschw. 17 (200 g) 4 ccm aus Mischung d) Wirkung: Dyspnoe, überlebt.
 Meerschw. 18 (190 g) 4 ccm aus Mischung e) Wirkung: Dyspnoe leichte Erscheinungen; überlebt.
 Meerschw. 19 (220 g) 4 ccm aus Mischung f) Wirkung: Brechbewegungen, Dyspnoe, überlebt.
 Meerschw. 20 (200 g) 4 ccm aus Mischung g) Wirkung: Krämpfe, † 3'.

6. Versuch.

Der folgende Versuch wurde analog dem vorhergehenden angestellt, wie aus folgender Tabelle hervorgeht:

Meerschw.-No.	Bakterium	Behandlung mit frischer Meerschw.-Galle	Zugesetzte Serummenge (Meerschw.-Ser.)	Digestionsdauer	Injizierte Serummenge	Gewicht des injizierten Meerschw.	Wirkung
21	1 Oese Ty.	0,2 ccm ¹ / ₂ St. lang	4 ccm	24 St. Eis-schrank	4 ccm	210 g	Atemnot, sonst nichts
22	1 Oese Coli	dgl.	dgl.	dgl.	dgl.	210 "	dgl.
23	1 Oese Tetragenus	"	"	"	"	220 "	"
24	1 Oese Friedländer	"	"	"	"	200 "	"
25	1 Oese Prodigiosus (stark. Farbstoffbildg.)	"	"	"	"	210 "	Leichte Krämpfe, Atemnot
26	dgl.	"	"	"	"	190 "	Schwere Krämpfe, erholt sich
27	dgl.	—	"	"	"	220 "	Krämpfe, fällt um, erholt sich wieder

Aus den bisherigen Versuchen ist zu entnehmen, daß vorherige Behandlung mit Meerschweinchengalle bei einer Reihe von Bakterien die Bildung (oder wenigstens die Wirkung) von Anaphylatoxin vermindert, oft sogar ganz verhindert: Es waren dies B. typhi, B. Friedländer, Tetragenus, Staphylococcus und B. coli.

Bei einer anderen Reihe von Bakterien konnte dagegen eine solche Schutzwirkung der Galle nicht beobachtet werden, nämlich bei *B. prodigiosus*, Roter Kieler, *Sarcina aurantiaca*.

Wie man sieht, unterscheiden sich die beiden Bakteriengruppen dadurch voneinander, daß die ersteren keine Farbstoffbildner, die letzteren dagegen starke Farbstoffbildner sind.

Da wir noch keine sichere Vorstellung darüber haben, wie die Hemmung der Anaphylatoxinbildung oder -wirkung durch die Galle zustande kommt, ist es auch nicht möglich, eine bestimmte Anschauung darüber zu entwickeln, auf welche Weise der Farbstoff der Bakterien diese hemmende Wirkung der Galle paralyisiert.

Die folgenden Versuche beschäftigten sich mit der Frage, ob die hemmende Funktion der Galle auch zur Geltung kommt, wenn man die Galle nachträglich, nachdem es bereits zur Bildung des Giftes gekommen ist, zusetzt. Es wurde des weiteren die Frage untersucht, ob die hemmende Wirkung der Galle auf ihrem Cholesteringehalt beruht, und ob man infolgedessen dieselbe Wirkung durch Cholesterin allein erzielen kann. Um das Cholesterin in einer möglichst adäquaten Form zuzuführen und um Adsorptionswirkungen auszuschließen, verwendeten wir inaktiviertes Meerschweinchen-serum, das Cholesterin in gesättigter Lösung enthielt.

7. Versuch.

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß untersucht, den nachträglich zugesetzte Galle bzw. Cholesterin auf schon fertiges Anaphylatoxin ausüben.

Das Cholesterin wurde in Form eines mit Cholesterin gesättigten inaktivierten Meerschweinchen-serums zugesetzt.

Es wurde zunächst anaphylatoxinhaltiges Serum hergestellt, indem 8 Oesen *Prodigiosus*-bacillen mit 16 ccm frischem Meerschweinchen-serum 24 Stunden lang im Eisschrank digeriert wurden. Das klar zentrifugierte Serum wird in 4 Röhrchen (Röhrchen a, b, c und d) verteilt.

Zu Röhrchen a, b, c wird 0,3 ccm frische Meerschweingalle bzw. „Cholesterin-serum“ zugesetzt und ca. 5 Minuten einwirken gelassen. Röhrchen d erhält keinen Zusatz.

Hierauf wird der Inhalt der 4 Röhrchen 4 Meerschweinchen von annähernd gleichem Gewicht intravenös eingespritzt.

Meerschw.-No.	Erhält intravenös	plus	Wirkung
28	4 ccm anaphylatoxinhaltiges Meerschweinchen-serum	0,3 ccm Meer-schweinchen-galle	Atemnot, Zittern
29	„ dgl.	0,3 ccm „Cholesterinserum“	dgl.
30	„	dgl.	„
31	„	—	Starke Krämpfe, fällt um, erholt sich wieder

8. Versuch.

Je 2 Oesen bei 56° C abgetöter Typhusbacillen wurden in 0,3 ccm frischer Meerschweingalle aufgeschwemmt (Röhrchen a und b) und $\frac{1}{2}$ Stunde lang geschüttelt. Hierauf wurden je 4 ccm eines frischen Meerschweinchenmischserums zugesetzt.

In 2 weiteren Versuchsröhrchen (c und d) wurden je 2 Oesen derselben Typhusbacillen mit 4 ccm desselben Serums zusammengebracht.

Alle 4 Röhrchen wurden 24 Stunden lang im Eisschrank gehalten.

Nach 24 Stunden wird zum Inhalt von Röhrchen c 0,4 ccm Meerschweingalle zugesetzt.

Alle 4 Röhrchen wurden vor der Injektion zentrifugiert. Die injizierten Meerschweinchen hatten annähernd das gleiche Gewicht.

Meerschw.-No.	Erhält intravenös	Wirkung
32	4 ccm aus Röhrchen a	Atemnot, Brechbewegungen
33	4 „ „ „ b	Atemnot, Brechbewegungen, Abgang von Urin und Faeces
34	4 „ „ „ c	Nach 2' Krämpfe, fällt um, erholt sich wieder
35	4 „ „ „ d	Sofort starke Krämpfe, † 2'

9. Versuch.

In dieser Versuchsreihe wurde nochmals der Einfluß des Cholesterins sowohl auf die Bildung des Anaphylatoxins als auch auf die Wirkung des schon fertig gebildeten Anaphylatoxins geprüft.

Es wurden in Röhrchen a und b je 2 Oesen *B. coli* in 0,3 ccm „Cholesterinserum“ $\frac{1}{2}$ Stunde lang geschüttelt. Hierauf erfolgte Zusatz von je 4 ccm frischem Meerschweinchenserum.

In 2 weiteren Röhrchen (c und d) wurden einfach 2 Oesen *B. coli* je mit 4 ccm desselben Meerschweinchenserums zusammengebracht.

Alle 4 Röhrchen wurden hierauf 4 Stunden lang bei 37° gehalten. Röhrchen c erhielt nach Ablauf dieser Zeit 0,4 ccm „Cholesterinserum“, Röhrchen d 0,4 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugesetzt. Alle 4 Röhrchen wurden sodann zentrifugiert.

Meersch.-No.	Erhält intravenös	Wirkung
36	4 ccm aus Röhrchen a	Nach ca. 2' Krämpfe, erholt sich
37	4 „ „ „ b	Leichte Erscheinungen, erholt sich
38	4 „ „ „ c	Zittern, sonst nichts
39	4 „ „ „ d	Sofort starke Krämpfe, † 2'

Das Ergebnis der Versuchsreihe 7, 8 und 9 läßt sich kurz dahin zusammenfassen, daß auch der nachträgliche Zusatz von Galle bzw. Cholesterin die Wirkung des schon gebildeten Anaphylatoxins im allgemeinen herabmindert und zum Teil beseitigt.

Hervorzuheben ist, daß — wie Versuch 7 zeigt — das aus *B. prodigiosus* gebildete Anaphylatoxin durch den nachträglichen Zusatz von Galle bzw. Cholesterin in seiner Wirkung gehemmt wurde, während bei vorausgehender Behandlung des *B. prodigiosus* mit Galle und hierauf folgender Digestion mit frischem Meerschweinchenserum die Bildung des Giftes nicht ausblieb.

Versuch 8 spricht dafür, daß bei nachträglichem Zusatz von Galle die Entgiftung des fertigen Giftes nicht so prompt und vollständig erfolgt, wie wenn man die Galle vor Zusatz des Serums auf die Bakterien wirken läßt.

Aus dem letzten Versuch No. 9 ersieht man — in Bestätigung der früheren Versuche — daß Cholesterin, einerlei ob man es vor der Digestion mit Serum zu den Bakterien setzt oder ob man es nachträglich dem schon gebildeten Gifte zufügt, wie die Galle einen hemmenden Einfluß auf die Anaphylatoxinwirkung ausübt.

Bemerkenswert erscheint es uns, daß die Tiere, welche durch den Galle- oder Cholesterinzusatz vor der akuten Anaphylatoxinvergiftung geschützt werden konnten, in der Regel trotzdem in den folgenden 12–24 Stunden eingingen, und es liegt nahe, anzunehmen, daß es sich unter den von uns gewählten Versuchsbedingungen nicht um eine echte Entgiftung des Anaphylatoxins, sondern nur um eine Hemmung und Larvierung der Wirkung gehandelt hat, welche im lebenden Organismus nach einiger Zeit wieder beseitigt wird.

Im folgenden seien unsere Versuche der Uebersichtlichkeit halber noch tabellarisch zusammengestellt wiedergegeben.

Zusammenfassende Tabelle.

No.	Bakterienart	Vor- behandelt mit	Digiert mit Meer- schweinchen- serum (4 ccm)	Nachträg- licher Zusatz von Galle bzw. Chole- sterin	Wirkung
1	Ty	Meersch.- Galle	24 ^b Eisschr.	—	Leichte Erscheinungen, Atemnot
2	"	dgl.	dgl.	—	0
3	"	—	"	—	Starke Krämpfe, † 2'
(Kontr.) 4	"	Meersch.- Galle	"	—	Leichte Erscheinungen, Atemnot
5	"	1/8 ^b bei 56° er- hitzte Meer- schw.-Galle	"	—	Atemnot, sonst 0
6	"	dgl.	"	—	dgl.
7	"	"	"	—	dgl.
8	"	—	"	—	Starke Krämpfe, er- holt sich wieder
(Kontr.) 9	Staphylo- kokken	Meersch.- Galle	"	—	Atemnot
10	Prodigiosus	dgl.	"	—	Starke Krämpfe, † 3'
11	"	"	"	—	Krämpfe, erholt sich
12	"	"	48 ^b Eisschr.	—	Krämpfe, † 2'
13	"	"	dgl.	—	Krämpfe, erholt sich
14	"	"	24 ^b Eisschr.	—	Starke Krämpfe, † 2'
15	roter Kieler	"	dgl.	—	Krämpfe, erholt sich
16	dgl.	"	"	—	Krämpfe, † 3'
17	Sarcina aurantiaca (geringe Farb- stoffbildung)	"	"	—	Starke Atemnot, überlebt
18	Friedländer	"	"	—	Leichte Erscheinungen
19	Ty	"	"	—	dgl.
20	"	—	"	—	Krämpfe, † 3'
(Kontr.) 21	"	Meersch.- Galle	"	—	Atemnot, sonst 0
22	Coli	dgl.	"	—	dgl.
23	Tetragenus	"	"	—	dgl.
24	"	"	"	—	dgl.
25	Prodigiosus	"	"	—	Leichte Krämpfe, Atem- not
26	"	"	"	—	Schwere Krämpfe
27	"	—	"	—	Krämpfe
28	"	—	"	Cholesterin- serum	Atemnot
29	"	—	"	dgl.	dgl.
30	"	—	"	"	dgl.
31	"	—	"	"	Starke Krämpfe
(Kontr.) 32	Ty	Meersch.- Galle	"	—	Atemnot, leichte Brech- bewegungen
33	"	dgl.	"	—	dgl.

No.	Bakterienart	Vor- behandelt mit	Digiert mit Meer- schweinchens- serum (4 ccm)	Nachträg- licher Zusatz von Galle bzw. Chole- sterin	Wirkung
34	Ty	—	24 ^b Eisschr.	Meersch.- Galle	Nach 2' Krämpfe, erholt sich wieder
35 (Kontr.)	"	—	dgl.	—	Sofort starke Kräm- pfe, † 2'
36	Coli	Cholesterin	† 37 ^o	—	Nach ca. 2' Krämpfe, er- holt sich wieder
37	"	"	dgl.	—	Leichte Erscheinungen
38	"	"	"	Cholesterin- serum (0,4 ccm)	dgl.
39 (Kontr.)	"	"	"	phys. NaCl- Lösung (0,4 ccm)	Sofort starke Kräm- pfe, † 2'

Es ist schon lange bekannt, daß das Cholesterin auf viele Gifte (Tetanustoxin, Diphtherietoxin etc., Cobragift, Saponin, Staphylolysin und andere hämolytische Gifte, auch auf Bakterienextrakte) eine hemmende, „entgiftende“ Wirkung ausübt. Unsere Versuche zeigen, daß dies auch für das sogenannte Anaphylatoxin gilt. Es erscheint unzweifelhaft, daß die von uns beobachtete Wirkung der Galle in der Hauptsache auf dem Cholesteringehalt der Galle beruht, wenn auch eine gleichgerichtete Wirkung für die Gallenseifen wohl vermutet werden muß, nachdem sich ergeben hat, daß eine vorausgehende Behandlung der Bakterien mit Oelen sie ihrer Fähigkeit zur Anaphylatoxinbildung beraubt¹⁾.

Wenn man, wie wir das in Uebereinstimmung mit Friedberger von Anfang an taten, dem sogenannten Anaphylatoxin oder — allgemeiner ausgedrückt — den bei der Wechselwirkung von artfremdem Eiweiß und komplementhaltigen Körpersäften auftretenden Giftstoffen eine große Rolle für die Pathologie der Infektion zuerkennt, so muß man auch den hier mitgeteilten Versuchen eine nicht unbeträchtliche Bedeutung beimessen. Denn sie zeigen einmal, daß in der Galle wuchernde Bakterien nicht oder nur in sehr geringem Grade zur Bildung von Anaphylatoxin führen, und sie zeigen des weiteren,

1) Cf. Dold und Aoki, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, Heft 2/3.

daß wir in dem Cholesterin der Körpersäfte und speziell des Blutes einen die Anaphylatoxinbildung oder wenigstens -wirkung hemmenden Stoff besitzen. Bekanntlich findet sich in jedem Blutserum Cholesterin, und zwar nicht bloß, wie man früher annahm, in gebundener Form [Hürthle¹⁾], sondern auch als freies Cholesterin [Leschke²⁾ u. a.]. Speziell aus der Arbeit von Bürger und Beumer³⁾ geht hervor, daß in jedem Serum ein zwar wechselnder, aber immer beträchtlicher Teil des Gesamtcholesterins in freier Form vorhanden ist (30 Proz. und mehr). Diese Feststellung ist — wie die Autoren mit Recht betonen — deswegen wichtig, weil man dem freien Cholesterin wegen seiner größeren Reaktionsfähigkeit eine größere biologische Bedeutung zuschreiben muß als den Estern des Cholesterins. Auch für die Entgiftung des Anaphylatoxins dürften in erster Linie das freie Cholesterin in Betracht kommen.

Bei der großen Rolle, welche die bei der Wechselwirkung von artfremdem Eiweiß und komplementhaltigen Körpersäften auftretenden Giftstoffe wohl in allen infektiösen Prozessen spielen und angesichts der hier ermittelten Schutzwirkung des Cholesterins gegenüber solchen Giftwirkungen, könnte man die bei fieberhaften Infektionskrankheiten auftretende beträchtliche Vermehrung des Cholesterins als eine Art von Schutzreaktion des Körpers gegen die genannten Giftstoffe deuten, und es liegt der Gedanke nahe, den Krankheitsprozeß und besonders das Fieber, soweit es durch solche Stoffe bedingt ist, durch künstliche Vermehrung des Blutcholesterins therapeutisch zu beeinflussen. Voraussetzung hierbei ist die wohl berechtigte Annahme, daß die im vitro-Versuch ermittelte Schutzwirkung des Cholesterins im allgemeinen auch in vivo gilt.

Daß aber in vivo die Verhältnisse nicht immer so einfach liegen, zeigt das Beispiel des Diabetes mellitus, wo bei starker Vermehrung des Blutcholesterins bekanntlich eine große Neigung zu bakteriellen Infektionen besteht, welche

1) Hürthle, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 21, 1895/96.

2) Leschke, zitiert nach Neuberg: Der Harn.

3) Bürger und Beumer, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 3.

in ihrem Verlauf und ihren Folgen (Fieber etc.) sich von den gewöhnlichen Infektionen nicht unterscheiden. Aber es ist möglich, daß beim Diabetes die Dinge komplizierter liegen, und die Wirkung des Cholesterins durch andere pathologisch vermehrte Blutstoffe kompensiert und annulliert wird.

Zusammenfassung.

Schüttelt man Bakterien in Galle (Meerschweinchengalle) und digeriert sie hierauf mit frischem Serum (Meerschweinchen-serum), so zeigt das Serum nach der Digestion im gewöhnlichen Anaphylatoxinversuch eine stark abgeschwächte oder gar keine Wirkung. Die Tiere gehen jedoch fast regelmäßig innerhalb der nächsten 12—24 Stunden ein.

Die untersuchten, stark farbstoffbildenden Bakterien (*Prodigiosus*, roter Kieler, *Sarcina aurantiaca*) machten eine Ausnahme. Bei ihnen verhinderte eine vorherige Behandlung mit Galle die Anaphylatoxinbildung nicht.

Auch nachträglicher Zusatz von Galle zu fertigem Anaphylatoxin schwächt die Wirkung des Giftes bedeutend ab oder hebt sie ganz auf.

Dieselbe Wirkung, wie Galle, hat gelöstes freies Cholesterin.

Die bei allen Infektionskrankheiten beobachtete Vermehrung des Cholesterins erscheint demnach unter der Voraussetzung, daß die im vitro-Versuch ermittelten Verhältnisse auch in vivo gelten, als eine Art von Schutzreaktion gegen die Giftstoffe, welche aus der Wechselwirkung von artfremdem Eiweiß (speziell Bakterieneiweiß) und den komplementhaltigen Körpersäften entstehen. Vielleicht ist es möglich, solche Krankheitsprozesse (Fieber) durch künstliche Vermehrung des Blutcholesterins günstig zu beeinflussen.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Königlichen Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin (Direktor: Geheimer Ober-Medizinalrat Prof. Dr. Gaffky; Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. Neufeld).]

Beitrag zur Kenntnis arzneifester Bakterienstämme.

Von Dr. W. Köhne.

(Eingegangen bei der Redaktion am 14. Dezember 1913.)

Die Möglichkeit, Bakterien durch Züchtung im Reagenzglas allmählich an Giftstoffe zu gewöhnen, ist schon seit langer Zeit bekannt.

Die ersten Versuche hierüber sind wohl von Kossiakoff auf Anregung Duclaux' mit Milzbrand- und einigen saprophytischen Bakterien gegenüber Sublimat, Borsäure und Borax angestellt worden. Durch allmähliche Gewöhnung an steigende Dosen konnte für Milzbrandbacillen die Grenzkonzentration des Sublimats, die in Bouillon eben noch das Wachstum hemmte, von 1:20 000 auf 1:14 000, die der Borsäure von 1:167 auf 1:125 herabgedrückt werden, und ähnliche Zahlen ergaben sich für die anderen Fälle; in keinem Falle wurde eine Gewöhnung bis zum Doppelten der ursprünglich vertragenen Konzentration erzielt, doch läßt der Autor dahingestellt, ob sich die Anpassung nicht noch weiter treiben läßt. Ueber Gewöhnung des Bac. Friedländer an sehr große Sublimatmengen hat Trambusti berichtet; die ursprünglich bei einer Verdünnung 1:15 000 nicht mehr gewachsene Kultur wuchs später bei 1:2000. Bekannt sind die Untersuchungen von Danysz, der eine allmähliche Gewöhnung des Milzbrandbacillus an steigende Mengen von arseniger Säure erzielte, wobei zugleich die Bildung von Schleimkapseln beobachtet wurde; die Gewöhnung zeigte sich hier aber hauptsächlich darin, daß das Optimum des Wachstums, d. h. die wachstumfördernde Wirkung kleiner Arsenmengen bei einer 5mal höheren Dosis lag, wie anfangs¹⁾.

In der letzten Zeit sind es hauptsächlich die Arbeiten von Marks, Seiffert, Haendel und Baerthlein, Shiga, in denen es den Autoren gelungen ist — und zwar meist recht langsam — Bakterien an schädliche Stoffe zu gewöhnen. So konnte Marks in 3 Jahre lang fortgesetzten Passagen einen Stamm von Hogcholera-Bakterien an das 8-fache der Menge arseniger Säure gewöhnen, die der Ausgangsstamm im Nährboden vertrug; gleichzeitig trat eine Festigkeit gegen Antimon sowie erhebliche morphologische und agglutinatorische Veränderungen ein. Seiffert gelang es, Coli-

1) Benario und Ruppel festigten nach Mitteilung von Shiga Tuberkelbacillen gegen arsenige Säure, doch liegen nähere Angaben über die Versuche wohl nicht vor.

stämme durch mehrmalige Züchtung auf Malachitgrün-Agar malachitgrünfest zu machen, so daß sie bei 10-fach höheren Farbkonzentrationen als ursprünglich gediehen. Haendel und Baerthlein gewöhnten einen Paratyphusstamm in annähernd 1½ Jahren allmählich an das 14-fache, einen Typhusstamm im Verlauf von 2 Jahren an das 28-fache der ursprünglich tolerierten Konzentration von salzsaurem Chinin; die Festigkeit erstreckte sich in verschiedenem Grade auch auf andere Chininpräparate. Die festen Stämme hatten gleichzeitig ihre Beweglichkeit verloren und zeigten auch interessante serologische Veränderungen. Eine nennenswerte Festigung der Bakterien gegen Alkali- und Säurezusatz zum Nährboden gelang den Autoren nicht.

Shiga konnte Cholerabacillen gegen Methylenblau und einige andere Farbstoffe, aber nicht gegen arsenige Säure schnell in hohem Grade festigen, so daß zum Teil das 100-fache der ursprünglichen Menge vertragen wurde; die Gewöhnung gelang bereits in 6–10 Generationen, ließ sich aber anscheinend nicht über einen gewissen Punkt treiben.

Bei allen diesen Versuchen handelte es sich um Stoffe, mit denen nur im Reagenzglas, nicht aber im Tierkörper eine Abtötung der betreffenden Bakterien erzielt worden ist.

Ich habe nun einige Versuche angestellt, um Bakterien im Reagenzglase an solche Stoffe zu gewöhnen, die als spezifisch wirkende Heilmittel in Betracht kommen. Mit dem von Morgenroth in die Chemotherapie eingeführten Aethylhydrocuprein habe ich solche Versuche an Pneumokokken, mit Salvarsan, das gegen Milzbrand und Rotlauf als wirksam erkannt ist (Bettmann und Laubenheimer, Bierbaum, Roos, Neufeld und Schiemann), an den genannten Bakterien angestellt. Diese Versuche lagen um so näher, als die viel diskutierte Frage, ob die chemotherapeutischen Stoffe auf direkte oder indirekte Weise parasitizid wirken, wenigstens soweit Bakterienkrankheiten in Frage kommen, wohl dahin entschieden ist, daß die Wirkung eine direkte ist, d. h. daß die Mittel im lebenden Organismus parasitizid wirken.

Die Entstehung der Arzneifestigkeit im Tierkörper und ihre große theoretische und praktische Bedeutung hat bekanntlich zuerst Ehrlich im Verein mit seinen Mitarbeitern durch sehr eingehende Versuchsreihen an pathogenen Protozoen dargelegt. Morgenroth und Kaufmann haben dann gezeigt, daß auch bei Bakterien eine starke, ja vollkommene Arzneifestigkeit in verhältnismäßig kurzer Zeit eintreten kann. Es gelang den Autoren, in 8 Tagen mittels 4 Passagen durch Mäuse, die ungenügend mit Aethylhydrocuprein behandelt worden waren, Pneumokokkenstämme

so zu verändern, daß sie überhaupt nicht mehr erkennbar durch das Mittel beeinflußt wurden und diese Festigkeit auch nach längeren Passagen durch unbehandelte Mäuse und mehrmonatlicher Austrocknung im Exsikator nicht verloren.

In einer nach Abschluß meiner einschlägigen Versuche erschienenen Arbeit haben dann Tugendreich und Russo über analoge Versuche *in vitro* berichtet. Sie gingen dabei so vor, daß die Pneumokokken mit verschiedenen Aethylhydrocuprein-Verdünnungen (benutzt wurde das salzsaure Salz) 2 Stunden bei Zimmertemperatur in Berührung ließen und daraus die Kulturen züchteten. Bei der 12. in dieser Weise durchgeführten Passage tötete eine Verdünnung 1:500 in 2 Stunden nicht mehr ab (gegen 1:100 000 beim Originalstamm). Eine noch stärkere Festigung gelang nicht. Dieser Stamm erwies sich nun bei Prüfung im Tierversuch als nahezu vollkommen fest; alle Mäuse starben trotz der Behandlung, wenn auch etwas langsamer als die Kontrollen.

Meine Ergebnisse bilden insofern eine Ergänzung zu denen dieser Autoren, als ich bei etwas anderer Versuchsanordnung stets nur eine partielle Festigkeit erzielte.

Wenn wir die bisherigen Versuche mit verschiedenen Bakterienarten und verschiedenen Giften überblicken, so ist sowohl der Grad als auch die Schnelligkeit des erreichten Erfolges in den einzelnen Fällen sehr verschieden; es hängt das offenbar hauptsächlich von der Natur der betreffenden Giftstoffe, ferner auch von der benutzten Bakterienart und von der Methode der Festigung ab. Es sei darauf hingewiesen, daß auch bei Protozoen die Festigkeit gegen Chemikalien ganz verschieden schnell eintritt; Ehrlich und Gonder (Kolle-Wassermanns Handbuch, 2. Aufl., Bd. III, p. 352) unterscheiden danach drei Wege, die zur Festigkeit führen: die durch viele Generationen fortgeführte Behandlung mit steigenden Dosen, wie sie zuerst Ehrlich beim Atoxyl und anderen Arsenikalien durchführte, die schnelle bei Farbstoffen beobachtete und schließlich die plötzliche, mutative Veränderung.

Meine Versuchsanordnung war so, daß ich eine Reihe von etwa 6 Röhren mit Nährflüssigkeit, der das Gift in verschiedenen Verdünnungen zugesetzt war, mit einer Oese Bouillonkultur der betreffenden Bakterien beimpfte. Die Röhren enthielten immer den Gesamthalt von 2 ccm Flüssigkeit, auch wurde immer ein Röhren derselben Nährflüssigkeit ohne Giftzusatz als Kontrolle geführt. Die Züchtung wurde so fortgeführt, daß aus dem letzten makroskopisch noch gut bewachsenen Röhren wieder eine neue Reihe beimpft wurde. Hierbei zeigte sich,

worauf schon Marks, sowie Haendel und Baerthlein hinweisen, daß das Fortführen des Stammes durch einige Zeit in derselben Konzentration meist zu besseren Resultaten führt, als langsames, aber stetiges Steigen im Giftzusatz; auch Shiga sah oft eine sprunghafte Festigung.

Bei Bewertung der Resultate in vitro habe ich mich nicht an die absoluten Konzentrationszahlen gehalten, da diese durch Benutzung einer neuen Bouillonsorte, vielleicht auch durch geringe Fehler beim Pipettieren leicht kleine Abweichungen zeigen können, als Kriterium diene mir vielmehr immer die nebeneinander laufende Prüfung des gewöhnten und des nicht gewöhnten Stammes in Verdünnungen, die in einem Glase angesetzt und von hier in die betreffenden Röhrchen umgefüllt waren. Diese endgültige Prüfung wurde stets mehrfach ausgeführt und zeigte dann immer dieselben Resultate.

Versuche mit Rotlauf.

In der beschriebenen Weise gelang es mir bei Schweine-rotlaufbacillen, auf die Salvarsan noch in einer Verdünnung von etwa $1:1/2$ —1 Million (Neufeld und Schiemann) entwicklungshemmend wirkt, nach 41 Passagen durch Salvarsanbouillon eine solche Festigkeit zu erreichen, daß das 2— $2\frac{1}{2}$ -fache der ursprünglich tolerierten Konzentration des Salvarsans vertragen wurde.

Tabelle eines Kontrollversuches nach der 41. Passage.

Salvarsan- verdünnung in Bouillon	Rotlaufstamm, 41mal durch Salvarsanbouillon passiert (24-stünd. Kultur)	Derselbe Rotlaufstamm, 41mal durch reine Bouillon passiert (24-stünd. Kultur)
1:100 000	0	0
1:200 000	+	0
1:400 000	+	± (schwach
1:500 000	+	+
1:800 000	+	+
1:1 000 000	+	+
Kontrolle	+	+

Es wurde also eine deutliche, wenn auch geringe Gewöhnung von Rotlaufbacillen an Salvarsan in vitro erzielt. Morphologisch war ein Unterschied zwischen den beiden Stämmen nicht zu erkennen.

Ich prüfte nun diese beiden Stämme im Tierkörper. Da man ja beim Salvarsan bis nahe an die Grenze der vom Tier vertragenen Konzentration gehen muß, wenn man überhaupt

eine deutliche Heilwirkung sehen will, so hätte man vielleicht erwarten können, daß der an Salvarsan gewöhnte Stamm im Tier gegen das Mittel nicht empfindlich sein würde, daß also die mit ihm infizierten Mäuse mit den Kontrollen sterben würden. Dies war jedoch nicht der Fall, wie die nachstehenden Tabellen zeigen.

Versuch 1.

Infektion intraperitoneal. Kurz vorher Salvarsan intravenös.

Rotlaufbouillonkultur	Präparat pro 20 g Maus	Anzahl der Tiere	† an der Infektion		Nicht der Infektion erlegen	
			mit den Kontrollen	verzögert	† an Vergiftung	überlebend
a) Infektion mit dem in vitro gegen Salvarsan gefestigten Stamm.						
0,0001	0,0033 g	3	—	—	3	—
0,01	0,0033 „	3	1	—	1	1
b) Infektion mit dem Kontrollstamm.						
0,0001	0,0033 g	3	—	2	1	—
0,01	0,0033 „	3	1	—	2	—

Versuch 2.

Desgleichen Infektion intraperitoneal. Kurz danach Salvarsan.

Rotlaufbouillonkultur	Präparat pro 20 g Maus	Anzahl der Tiere	† an der Infektion		Nicht der Infektion erlegen	
			mit den Kontrollen	verzögert	† an Vergiftung	überlebend
a) Infektion mit dem gewöhnten Stamm.						
0,00001	0,00286 g	6	—	2	2	2
b) Infektion mit dem Stamm aus Bouillonpassagen.						
0,00001	0,00286 g	6	1	1	2	2

Man ersieht aus beiden Versuchen, daß die Rotlaufinfektion durch Salvarsan beeinflußt wird; es überleben mehrere Tiere, andere sterben zum mindesten später als die Kontrollen. Der in vitro gefestigte Stamm unterscheidet sich jedoch im Tierversuch nicht von dem in reiner Bouillon fortgezüchteten.

Versuche mit Milzbrand.

Bei einer Milzbrandkultur konnte ich in ähnlicher Weise eine Festigkeit erzielen. In einer Konzentration von 1:1 Million Salvarsan war (entsprechend den Befunden von

35*

Neufeld und Schiemann) noch ein geringes Wachstum vorhanden, nach Fortführung durch 28 Passagen in Bouillon mit Salvarsanzusatz war eine 2-fache Festigkeit vorhanden.

Tabelle eines Kontrollversuches nach der 28. Passage.

Salvarsan- verdünnung	Milzbrandstamm, 28mal durch Salvarsanbouillon passiert (24-stünd. Kultur)	Derselbe Milzbrandstamm 28mal durch reine Bouillon passiert
1:300 000	0	0
1:400 000	0	0
1:500 000	+	0
1:800 000	+	0
1:1 000 000	+	+
1:5 000 000	+	+
Kontrolle	+	+

Also auch hier eine deutliche, aber nur geringe Gewöhnung. Der Versuch im Tierkörper ergab hier insofern keine Resultate, als der Stamm (Stamm Sobernheim) sehr virulent war, so daß überhaupt kein Einfluß des Salvarsans erkennbar war und alle Tiere nach 24 Stunden mit den Kontrollen zugrunde gingen (vgl. die Versuche von Neufeld und Schiemann mit zwei verschiedenen Milzbrandstämmen).

Versuche mit Pneumokokken.

Zu den Versuchen mit P n e u m o k o k k e n wurde der Laboratoriumsstamm Pneumococcus I verwandt. Aethylhydrocuprein hielt ich in einer Stammlösung von 1:1000 (0,2 g der freien Base in 200 ccm Aqua dest. beim Kochen allmählich gelöst) vorrätig. Als Nährflüssigkeit diente stark alkalische Bouillon, der im Verhältnis 5:100 Rinderserum zugesetzt war. Wie bei einem Versuch von Neufeld und Schiemann lag auch bei meinen Versuchen die Grenze, bei welcher der Pneumococcus noch in Bouillon mit Aethylhydrocupreinzusatz eben wuchs, etwa bei 1:600 000. Nach 6 Passagen in denselben Verdünnungen von 1:100 000—2—4—6—800 000—1 000 000 konnte die Grenze bis zur Konzentration von 1:200 000 hinaufgezüchtet werden; eine stärkere Konzentration wurde nicht vertragen. Einige weitere Versuche ergaben nach 6—8 Passagen annähernd dasselbe Resultat. Bei meinen Versuchen wurde also eine weit geringere Festigung erzielt wie in denen von Tugendreich und Russo. Wie oben erwähnt, war die Versuchsanordnung der Autoren insofern anders, als

sie die Kokken bei größerer Einsaat der Einwirkung des Mittels nur 2 Stunden bei Zimmertemperatur aussetzten und dann daraus die etwa überlebenden Kokken züchteten; diese Versuchsanordnung entspricht also einem Desinfektions-, die unserige einem Entwicklungshemmungsversuch. Außerdem wurden die Passagen länger fortgesetzt als bei meinem Versuch.

Ganz andere Resultate erhielt ich in einer Versuchsreihe mit einem anderen Pneumokokkenstamm. Die Herkunft dieses Stammes war nicht genau festzustellen, er stammte aus dem Exsikkatormaterial des Laboratoriums und gehörte sicher zur Gruppe des Pneumococcus I, da er mit dem Serum I gut agglutinierte. Daß der Stamm früher mit Aethylhydrocuprein in Berührung gekommen ist, ist nicht bekannt, immerhin ist die Möglichkeit nicht völlig auszuschließen, da keine weiteren Angaben über den Stamm vorlagen, und da vor längerer Zeit im Laboratorium mit Aethylhydrocuprein gearbeitet worden war. Diese Kultur wuchs nun bereits bei der ersten Prüfung, die in derselben Weise wie sonst ausgeführt wurde, in einer Konzentration 1:100000 unseres Mittels —, der stärksten, die benutzt wurde. Da ich zunächst an einen Versuchsfehler glaubte, wurde das Experiment in derselben Weise und mit demselben Erfolg wiederholt, alsdann wurden immer stärkere Konzentrationen benutzt, ohne daß jedoch eine Grenze gefunden wurde; über 1:3000 (1 Teil der Stammlösung [1:1000] + 2 Teile Serumbouillon) bin ich dabei nicht hinausgegangen. Als nun aber aus dem Kontrollröhrchen, in welchem derselbe Stamm immer in reiner Bouillon weitergezüchtet worden war, eine Aussaat auf eine 1:3000 äthylhydrocupreinhaltige Bouillon gemacht wurde, trat auch hier reichliches Wachstum auf: Die Kultur war also nicht im Laufe meiner Versuche arzneifest geworden, sondern war es schon vorher gewesen. Daß aber doch im Laufe der Passagen eine zunehmende Festigung eingetreten ist, dafür spricht der verschiedene Einfluß der Tierpassagen auf die verschiedenen Generationen dieser Kultur. Nachdem dieselbe 5 Passagen durch äthylhydrocupreinhaltige Bouillon durchgemacht hatte, wurde damit aus der Verdünnung 1:4000 eine Maus intraperitoneal infiziert. Eine aus dem Blut der gestorbenen Maus angelegte Bouillonkultur des Pneumococcus erwies sich nunmehr in vitro nicht mehr arzneifest; jedenfalls wuchs sie nicht mehr in einer Kon-

zentration 1 : 100 000. Der Stamm wurde dann weiter bis zur 14. Passage durch Aethylhydrocuprein fortgeführt. Jetzt wurde eine nochmalige Tierpassage vorgenommen; nach dieser blieb der Stamm nunmehr in vitro fest.

Bei diesen Versuchen fiel nun weiterhin die völlig verschiedene Morphologie der Pneumokokken gegenüber den ursprünglichen Formen auf, so daß man zuerst an zwei verschiedene Bakterienarten denken konnte. Beim Wachstum in den mit Aethylhydrocuprein versetzten Röhren bildete der Stamm längere, stark gewundene Ketten wie ein Streptococcus, während er in reiner Bouillon in einzelnen, typischen Diplokokkenformen oder in kurzen starren Ketten wuchs. Daß in beiden Fällen derselbe Pneumococcus vorlag, geht daraus hervor, daß bei wechselseitiger Verimpfung (d. h. wenn ich die Kokken aus den Aethylhydrocupreinverdünnungen in reine Bouillon brachte und umgekehrt aus reiner Bouillon in Aethylhydrocuprein) sich die Morphologie innerhalb 24 Stunden wieder ins Gegenteil änderte. Auch das Wachstum auf Hämoglobinagar war insofern von der Norm abweichend, als die Pneumokokken aus den Aethylhydrocupreindröhren den Nährboden nicht in der für den Stamm sonst charakteristischen Weise aufhellten ¹⁾.

Da dieser Stamm also im Reagenzglas die 200-fache Konzentration von Aethylhydrocuprein im Nährboden vertrug, mußte man vermuten, daß er sich im Tierkörper ebenso verhalten würde; in der Tat waren die von Tugendreich und Russo in vitro an das Mittel hochgradig gewöhnten Kulturen ebenso wie die von Morgenroth im Tier gefestigten Stämme in vivo gegen Aethylhydrocuprein völlig unempfindlich.

Die Behandlung der Tiere mit Aethylhydrocuprein erfolgte nach den Vorschriften Morgenroths. Es wurde eine 2-proz. Lösung der freien Base in Olivenöl benutzt, davon am ersten Tage auf je 20 g Mäusegewicht 0,5 ccm injiziert und die Behandlung dann noch 2 Tage fortgesetzt; an diesen Tagen erhielten jedoch alle Tiere ohne Rücksicht auf das Gewicht je 0,35 ccm der Aethylhydrocupreinlösung.

1) Bei späteren Abtötungsversuchen wuchsen die Pneumokokken aus solchen Aethylhydrocupreinverdünnungen, in denen nach 24 Stunden nur spärliche Keime am Leben geblieben waren, mehrfach (im völligen Gegensatz zu den auf dem gleichen Hämoglobinagar gezüchteten Kontrollkulturen) unter dem Bilde großer, runder Staphylokokken, ebenfalls ohne Aufhellung; nach einer Tierpassage erfolgte ein Rückschlag zur Norm.

Versuch 3.

Infektion mit einer 24-stünd. Bouillonkultur des in vitro gegen Aethylhydrocupreinfesten Pneumokokkenstammes.

No.	Gewicht	Infektion	Behandlung pro 20 g Maus 0,5 ccm					
			1	2	3	4	5	
1	19 g	0,1	0,48	0,35	0,35			lebt
2	21 "		0,53	0,35	0,35	■		
3	21 "		0,53	0,30	■	■		
4	18 "	0,01	0,45	0,35	0,35		■	lebt
5	18 "		0,45	0,35	0,35			
6	19 "		0,475	—	■			
7	19 "	0,0001	0,475	0,35			■	lebt
8	18 "		0,45	0,35	0,35	■		
9	18 "		0,45	0,35	—			
10	21 "	0,0001	0,53	0,35	0,30			lebt
11	19 "		0,48	0,35	0,25	■		
12	18 "		0,45	0,35	—			
Kontrollen								
1	—	0,1		■				
2	—	0,01			■			
3	—	0,0001			■			
			Tag	1	2	3	4	5

Tag 1 = Tag der Infektion.

Versuch 4.

Infektion mit einer 24-stünd. Bouillonkultur des Laboratoriumstammes Pneumococcus I.

No.	Gewicht	Infektion	Behandlung pro 20 g Maus 0,5 ccm					
			1	2	3	4	5	
1	18 g	0,1	0,45	0,35	0,35			lebt
2	22 "		0,55	0,35	0,35			
3	19 "		0,48	0,35	0,35			
4	19 "	0,01	0,48	†				lebt
5	17,5 "		0,425	0,35	0,35			
6	18 "		0,45	0,35	0,35		■	
7	17 "	0,0001	0,425	0,35	0,35			lebt
8	17,5 "		0,425	†				
9	17 "		0,425	0,35		■		
10	18 "	0,0001	0,45	0,35	0,35			lebt
11	18 "		0,45	0,35	■			
12	19 "		0,475	0,35	0,35			
Kontrollen								
1	—	0,1		■				
2	—	0,01			■			
3	—	0,0001			■			
			Tag	1	2	3	4	5

Tag 1 = Tag der Infektion.

■ = Tod an Septikämie (Pneumokokken im Blut nachgewiesen).

† = Tod an Vergiftung.

Hiernach zeigte unser *in vitro* hochgradig arzneifester Stamm im Tierkörper nur eine sehr geringe Festigkeit. Von 12 mit dem Passagestamm infizierten und mit Aethylhydrocuprein behandelten Mäusen blieben 5 am Leben, 7 starben an Pneumokokkensepsis, davon 6 später als die betreffende Kontrolle. Von den 12 mit dem gewöhnlichen Pneumokokkenstamm I infizierten Tieren fallen 2 Tiere aus, die an Vergiftung eingingen; von den übrigen 10 wurden 7 gerettet, 1 starb gleichzeitig mit der Kontrolle, 2 verzögert. Eine erhebliche Heilwirkung des Mittels ist zweifellos bei dem Passagestamm vorhanden, doch ist nicht zu verkennen, daß derselbe *in vivo* schlechter wie der Kontrollstamm reagiert.

Es besteht somit ein auffallender Gegensatz zwischen der äußerst starken Arzneifestigkeit *in vitro* und der geringen *in vivo* — ein Gegensatz, der sich in ähnlicher Weise bereits in den Rotlaufversuchen zeigte.

Wir müssen aus den vorliegenden Beobachtungen zunächst den Schluß ziehen, daß die Festigung eines bestimmten Bakteriums gegen einen Arzneistoff nicht nur graduell, sondern auch bezüglich ihrer Stabilität, d. h. der Neigung in die Ausgangsform zurückzuschlagen, verschieden sein kann; auch Shiga sah bei seinen Versuchen mit Farbstoffen bei wenig gefestigten Stämmen nach Züchtung in gewöhnlicher Bouillon schnelle Rückschläge eintreten, bei stärker festen dagegen nicht. Die stark chinifesten Stämme von Haendel und Baerthlein verloren diese Eigenschaft auf gewöhnlichem Nährboden etwa ebenso langsam, wie sie sie erworben hatten. Diese Verhältnisse werden wohl am besten verständlich durch einen Vergleich mit den sonstigen Veränderungen an Bakterien bezüglich ihrer Morphologie, Kolonieform, Beweglichkeit, Agglutination usw., die in neuester Zeit als „Mutationen“ so vielfach studiert worden sind; auch hier gibt es, wenigstens nach Ansicht vieler Autoren (vgl. die Ausführungen von Bernhardt und Ornstein), alle möglichen Uebergänge zwischen den extremen Formen und im besonderen auch alle Uebergänge zwischen veränderten Typen, die äußerst stabil sind und solchen, die sehr leicht und schnell „zurückschlagen“. Auch darin stimmen die Beobachtungen über die Gewöhnung

von Bakterien an Giftstoffe mit denen über sonstige Bakterienveränderlichkeit überein, als dabei neben der beabsichtigten Anpassung häufig ganz andere, anscheinend völlig „richtungslose“ Veränderungen eintreten.

Bei unseren Versuchen haben wir uns vielfach davon überzeugt, daß die gefestigten Stämme ihre Eigenschaften behielten, wenn sie einen oder einige Tage auf gewöhnlicher Bouillon gezüchtet wurden, ebenso haben wir bei den Pneumokokkenstämmen, die durch längere Gewöhnung eine geringe Festigkeit gegen Aethylhydrocuprein erworben hatten, mehrfach festgestellt, daß sie nach ein- oder zweimaliger Mäusepassage noch dieselbe Festigkeit *in vitro* zeigten, wie vorher. Das war, wie schon erwähnt, auch bei der 14. Passage des Pneumococcus in der letzten Versuchsreihe der Fall, während der 5. Passagestamm derselben Reihe in der Maus sogleich zurückschlug. Alle unsere Stämme aber, sowohl die Rotlaufbacillen wie die Pneumokokken, gleichviel ob sie *in vitro* nur 2—3mal oder ob sie 200mal mehr von den Chemikalien vertrugen, wie die Kontrollkulturen, waren im Tierkörper nicht oder nur in sehr geringem Grade arzneifest.

Anscheinend ist die Arzneifestigkeit im Tierkörper im allgemeinen viel schwerer zu erreichen, als die im Reagenzglase; doch erwähnen Haendel und Baerthlein einen Pneumokokkenstamm, der das umgekehrte Verhalten zeigte.

Auch bei den Versuchen mit Trypanosomen zeigten die im Tierkörper gefestigten Stämme eine verschiedene Stabilität; während die hochgradig festen Stämme ihre Eigenschaft nach vielen Passagen durch unbehandelte Mäuse unverändert beibehielten, schlugen andere Stämme, die nur eine geringe Festigkeit besaßen, leicht zurück.

Die Angaben von Morgenroth und Kaufmann bezüglich Gewinnung eines auch *in vivo* arzneifesten Pneumokokkenstammes nach einigen Passagen durch ungenügend behandelte Tiere konnte ich in einer Versuchsreihe nach 4 Mäusepassagen bestätigen. Dabei zeigte sich auch *in vitro* eine schnell zunehmende Gewöhnung, indem der aus der 2. Tierpassage gezüchtete Stamm bereits in der Verdünnung 1:100 000, der aus der nächstfolgenden Passage gewonnene Stamm sogar mindestens bei 1:10 000 Aethylhydrocuprein *in vitro* wuchs; die untere Grenze wurde dabei nicht festgestellt.

Zusammenfassung.

Durch fortgesetzte Züchtung in Bouillon mit steigendem Zusatz von Salvarsan konnten Rotlauf- und Milzbrandbacillen an die doppelte Konzentration des Mittels gewöhnt werden; in derselben Weise wurde ein Pneumokokkenstamm gegen das Dreifache der anfangs vertragenen Menge von Aethylhydrocuprein gefestigt.

Im Tierversuch verhielten sich diese Stämme dem betreffenden Mittel gegenüber nicht anders wie die Ausgangskulturen.

Ein anderer Pneumokokkenstamm erwies sich von Anfang an im Reagenzglas als so fest gegen Aethylhydrocuprein, daß er durch das 200-fache der von einem Normalstamm ertragenen Konzentration des Mittels nicht gehemmt wurde; er zeigte, so lange er in Aethylhydrocuprein-Bouillon wuchs, auch morphologisch starke Veränderungen.

Auch dieser Stamm reagierte im Mäusekörper auf Aethylhydrocuprein, wenn auch deutlich schlechter als ein Normalstamm.

In Bestätigung der Angaben von Morgenroth und Kaufmann, wurde nach wenigen Passagen durch ungenügend behandelte Mäuse ein Pneumokokkenstamm gewonnen, der sowohl in vivo wie in vitro gegen das Mittel hochgradig gefestigt war.

Literatur.

- Benario und Ruppel, XIV. Intern. Hygienekongreß, Bd. 4, p. 79, zitiert nach Shiga.
Bernhardt und Ornstein, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No 1.
Danysz, Ann. Pasteur, 1900, p. 649.
Haendel und Baerthlein, Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 57, Beiheft, p. 196*.
Kossiakoff, Ann. Pasteur, 1887, p. 465.
Marks, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, p. 293.
Morgenroth und Kaufmann, Zeitschr. Immunitätsf., Bd. 15, p. 610.
Neufeld und Schiemann, Centralbl. f. Bakt., Ref., Bd. 57, Beiheft, p. 183*.
Seiffert, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 71.
Shiga, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 18, p. 65.
Trambusti, ref. Baumgartens Jahresb., 1892, p. 490.
Tugendreich und Russo, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 19, p. 156.

Zeitschrift f. Immunitätsforschung. Originale. Bd. XX. No. 6.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Kaiserlichen Institut für experimentelle Medizin in St. Petersburg (Abteilung von A. A. Wladimiroff) und aus dem Krankenhause der St. Georgs-Gemeinde.]

Ueber die primäre Toxizität des Blutserums des Menschen im Verlaufe von Infektionskrankheiten.

Von Privatdozent Dr. med. **N. N. Syrenskij.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. November 1913.)

Schon lange vor dem Auftauchen der Lehre von der erhöhten Empfindlichkeit gegen fremdartige Agentien war vielen Forschern bekannt, daß bei manchen Tieren die intravenöse bzw. intraabdominale Injektion von fremdartigem Serum schwere krankhafte Erscheinungen, bisweilen sogar den Tod hervorrufen kann.

Die Untersuchungen von Mosso (1888) haben ergeben, daß die am meisten toxische Wirkung das Serum des Aales besitzt. Schon 0,02 cem Serum des Aales vermochten, ein Kaninchen von 1 kg Körpergewicht innerhalb einiger Minuten zu töten. Hierauf haben zahlreiche Autoren die Toxizität des Serums vom Menschen, Hammel, Stier, Schwein, Pferd, Esel und von anderen Tieren systematisch studiert. Als Versuchstiere haben einzelne Forscher auch Affen (Camus und Gley) und Mäuse (Stern) und Meerschweinchen (Markoff, Bankowski und Szymanski) verwendet, aber die Mehrzahl der Autoren experimentierte mit Kaninchen. Bei diesen letzteren wurde bei intravenösen Injektionen eine bunte Reihe von Erscheinungen beobachtet: Atemnot, Schwäche, Störung der Herztätigkeit, Manegenbewegungen, klonische und tonische Krämpfe, Stupor, Paresen, Paralysen und Tod. Rummo teilte das gesamte Intoxikationsbild in 2 Stadien ein: in das Erregungs- und Depressionsstadium. Ferner wurde festgestellt, daß intraperitoneale Injektionen gewöhnlich ein weniger stürmisches Bild zur Folge hatten, so daß die Tiere häufig am Leben blieben. Uhlenhuth versuchte als erster fremdartiges Serum subkutan einzuführen und beobachtete ein Infiltrat mit nachfolgender Nekrose an der Injektionsstelle.

Bis 1902—1903, d. h. bis zum Auftauchen der Lehre von der Anaphylaxie, wurde die primäre Toxizität der heterologen Sera gewöhnlich nur konstatiert, und wenn man die Ursache dieser Erscheinung zu erklären suchte, so führte man alles auf toxische Wirkung der Hämolytine zurück

(H. Pfeiffer u. a.). Mit der fortschreitenden Entwicklung der Lehre der Anaphylaxie begann man die Toxizitätserscheinungen meistens vom Standpunkte der Lehre der gesteigerten Empfindlichkeit zu erklären. Das klinische Bild unterschied sich nach einmaliger Einführung heterologer Sera in keiner Weise von demjenigen bei der klassischen Serumanaphylaxie. Ebenso ähnlich waren auch die Befunde bei den pathologisch-anatomischen Sektionen. Die von Dörr und Moldovan wahrgenommene Tatsache des Verschwindens oder der hochgradigen Abnahme des Komplements nach einmaliger intravenöser Injektion von Ochsen Serum beim Meerschweinchen, welche Tatsache dem Verschwinden oder der Abnahme des Komplements bei Anaphylaxie analog ist (Friedberger und Hartoch), gewährte die Möglichkeit, das Bild der Erkrankung des Tieres nach primärer Injektion von heterologem Serum mit demjenigen Bilde noch enger zu verbinden, das bei Anaphylaxie beobachtet wird. Es wurde auch das Auftreten eines Infiltrates mit nachfolgender Nekrose bei subkutaner Einführung von heterologem Serum klar. Man begann diese Erscheinung im Sinne des Arthusschen Phänomens bei Serumanaphylaxie zu erklären.

Die nachfolgende Tabelle zeigt uns die tödlichen Dosen der heterologen Sera bei einmaliger intravenöser Injektion, pro Kilogramm Körpergewicht des Kaninchens berechnet.

Tabelle I.

Sera	Mosso	Charrin	Rummo	Chambrelent u. Tarnier	Leclairche u. Remond	Ludvig u. Saviar	Mairet u. Rose	Guinard u. Dumarest	Albu	Weiß	Uhlenhuth	Sclavo	Gasbarrini	Gley
vom Menschen	. 27,0	10,0	10,0	23,0	8,5	15,2	14,0	10,2	. 8,5
„ Hammel	. .	12,0 20,0	11,0
„ Schwein 35,0	12,0
„ Ochsen	8,0	9,22	. 8,0	6,0	. .	7,5
„ Pferd 44,0	60,0
„ Esel	? 114,0	7,5	. .
„ Hund	23,0	? 10,5
von der Katze	13,5
vom Hirsch	23,0
„ Aal	0,2
„ Torpedo marmorata	1,9

Beim Studium der toxischen Wirkung des Serums von gesunden Menschen haben einige der in der summarischen Tabelle erwähnten Autoren begonnen, die toxische Wirkung der Sera von Kranken zu untersuchen.

Charrin hat als erster auf die erhöhte Toxizität des Serums von eklamptischen Frauen hingewiesen. Rummo hat die Beobachtung gemacht, daß das Blutserum von Personen, die mit Typhus, kruppöser Pneumonie und Eklampsie behaftet sind, stark toxische Eigenschaften besitzt.

Während die tödliche Dosis des Serums von gesunden Menschen für ein Kaninchen von 1 kg Körpergewicht bei intravenöser Injektion 10,0 ccm betrug, wobei der Tod des Tieres schon innerhalb der ersten 4—5 Minuten eintrat, tötete Typhusserum das Kaninchen innerhalb desselben Zeitraumes schon in einer Dosis von 1,5 ccm. Mit dem Studium der Toxizität des Serums bei Eklampsie befaßten sich Ludvig und Savor, Chambrelent und Tarnier u. a. Alle diese Autoren stimmen mit Charrin und Rummo überein; in ihren Beobachtungen war die tödliche Serumdosis der mit Eklampsie behafteten Kranken stets geringer als diejenige gesunder Personen. Guinard und Dumarest fanden das Serum bei akuten Nephritiden als hypotoxisch, bei chronischen Nephriden als hypertoxisch. Albu, der die tödliche Dosis pro Kilogramm Körpergewicht des Kaninchens bei einmaliger intravenöser Injektion mit 9,5—11,0 berechnete, stellte fest, daß die tödliche Dosis bei Erysipel, kruppöser Pneumonie, Urämie und puerperaler Septikämie zwischen 4 und 5 ccm liegt.

Alle aufgezählten Autoren haben sich mit der Frage der Toxizität des Serums jedoch nicht systematisch und auch nicht sehr gründlich befaßt. Die Autoren, namentlich die französischen, beschränkten sich gewöhnlich auf einmalige Bestimmung der Toxizität im Verlaufe des Krankheitsprozesses und stützten sich infolgedessen auf eine geringe Anzahl von Beobachtungen. So hat beispielsweise Charrin alles in allem nur das Serum von 3 eklamptischen Kranken je einmal untersucht. Sogar Uhlenhuth, der die Frage der toxischen Wirkung der Sera der verschiedenen Tierarten am eingehendsten studiert hat, beschränkt sich nur auf einzelne Beobachtungen beim Menschen. So hat er beispielsweise im ganzen 5 Scharlachranke und 2 Typhusranke untersucht und schon aus diesen Untersuchungen Schlüsse über die gesteigerte Toxizität des Blutserums bei diesen Erkrankungen gezogen.

Unter diesen Umständen habe ich es vor 2 Jahren unternommen, die Toxizität des Menschenserums unter normalen und pathologischen Verhältnissen zu erforschen, und die vorliegende Arbeit ist eben dem Studium der Veränderungen der Toxizität des Serums im Verlaufe von Infektionskrankheiten gewidmet. Als Versuchstier wählte ich das Meerschweinchen. Dieses ist für Anaphylaxie am empfänglichsten, so daß bei ihm schon bei minimalen Dosen sich ein typisches Intoxikationsbild entwickelt; außerdem sind im Serum vom Menschen normale hämolytische Ambozeptoren in bezug auf die Erythrozyten des Meerschweinchens fast nicht vorhanden, so daß der Einfluß der Hämolsine fast vollständig ausgeschaltet werden konnte. Bevor ich zum Studium der Sera von kranken Personen schritt, stellte ich an der Hand eines großen Materials die Toxizität des Serums von gesunden

Personen fest. Die tödliche Dosis lag bei einmaliger intravenöser Injektion für 100 g Körpergewicht des Meerschweinchens zwischen 0,5—0,6 ccm. Die Erscheinungen, welche nach der Injektion beobachtet wurden, waren denjenigen des anaphylaktischen Shocks sehr ähnlich. Der Tod des Tieres trat gewöhnlich innerhalb einiger Minuten ein. Das Bild, welches die pathologisch-anatomische Sektion bot, unterschied sich in keiner Weise von demjenigen, das bei Anaphylaxie beobachtet wird. So wurden stets beobachtet: Akutes Lungenemphysem (Auer-Lewis), Pulsation des Herzens nach dem Tode, nicht gerinnendes, flüssiges Blut, Hyperämie und Ekchymosen im Darm usw. Beim Anaphylaxieanfall haben Friedberger und Hartoch, wie oben bereits erwähnt, Verschwinden oder hochgradige Abnahme des Komplements festgestellt, während ich zum ersten Male Abnahme des Fibrinferments im Blute anaphylaktischer Tiere wahrgenommen habe. Um die Analogie zwischen den Erscheinungen der Serumanaphylaxie und denjenigen Erscheinungen näher zu verfolgen, die nach einmaliger intravenöser Injektion von heterologem Serum beobachtet werden, habe ich eine Reihe von Experimenten mit Titrierung des Komplements und des Fibrinferments unternommen. Es ergab sich, daß bei der Einführung von letalen oder subletalen Dosen von normalem Menschenserum beim Meerschweinchen Abnahme sowohl der komplementären Energie des Serums, als auch der Quantität des Fibrinferments konstant beobachtet wird. Durch diese an den im Serum vor sich gehenden Prozessen intimer Natur gemachten Beobachtungen, wurde der Zusammenhang zwischen diesen Phänomenen noch mehr gefestigt, und ich glaube annehmen zu dürfen, daß diese Erscheinungen ein und derselben Natur sind.

Nachdem ich die soeben angeführten Tatsachen eruiert hatte, schritt ich zum Studium der Toxizität der Sera von mit Infektionskrankheiten behafteten Personen. Die erste Infektionskrankheit, auf die ich meine Aufmerksamkeit richtete, war der Abdominaltyphus, da gerade bei dieser Krankheitsform im Blute sämtliche Bedingungen zur Bildung von Anaphylatoxin im Sinne Friedbergers gegeben sind: Antigene in Form der Typhusbacillen und ihrer Endotoxine, Antikörper (Agglutinine u. a.) und Komplement im Ueberschuß (Syrenskij).

Wie man es a priori auch hat erwarten dürfen, hat sich die Toxizität der typhösen Sera als intensiver erwiesen als die Toxizität der Sera von gesunden Personen. In der Mehrzahl meiner Beobachtungen erwies sich schon die Dosis von 0,3 pro 100 g Körpergewicht als tödlich. Bisweilen wirkten tödlich schon 0,25 und sogar 0,2 pro 100 g Körpergewicht, letzteres allerdings ziemlich selten. Die intensivste Toxizität besaß das Serum im Stadium fastigii des Abdominaltyphus. Aber auch hier spielten sowohl die Schwere der Infektion als auch der Charakter der Epidemie zweifellos eine Rolle. So zeigten die abdominaltyphösen Prozesse, welche ich im Jahre 1913 (Januar, Februar und März) beobachtete, einen geringeren toxischen Effekt als die Erkrankungen aus den Jahren 1911 und 1912.

Im Stadium decrementi nahm die Toxizität gewöhnlich ab; blieb sie aber stationär, so trat fast in allen Fällen entweder eine sekundäre Welle oder irgendeine Komplikation ein. In den Fällen, wo der Tod des Tieres nicht bald nach der Injektion eintrat, konnte man, indem man nach der letalen Dosis fahndete, Uebergänge von den schwächsten Graden von Anaphylaxieerscheinungen bis zu hochgradig ausgesprochenen beobachten, wobei die letzteren Erscheinungen ausschließlich von der Dosis des injizierten Serums abhingen. So tötete z. B. die Dosis von 0,4 innerhalb einer Minute, indem das Tier unmittelbar nach der Entfernung vom Operationstische starb; die Dosis von 0,35 übte ihre tödliche Wirkung innerhalb 10—15 Minuten aus. Die Dosis von 0,3 bewirkte schwere Anaphylaxie mit starkem Temperaturabfall, mit Krämpfen usw. Aber nach einigen Minuten erholte sich das Tier und ging erst am folgenden Tage oder nach einigen Tagen zugrunde. Dosen von 0,25 und 0,2 waren absolut unschädlich; bis auf kaum merkliche Zeichen von gesteigerter Empfindlichkeit konnte man nichts feststellen. Das klinische Bild und das Ergebnis der pathologisch-anatomischen Sektion unterschied sich bei der Injektion von Typhusserum in keiner Weise von demjenigen bei der Injektion von normalem Serum. Die nächstfolgende Tabelle veranschaulicht die von uns erhobenen Befunde, wobei aber darauf hingewiesen werden muß, daß in die Tabelle nur die vollständig untersuchten Fälle aufgenommen sind.

Tabelle II.

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
1	O., 19 J. (1912)	6.	38,3	0,3	1 Stunde 13 Min.
		10.	39,9	0,3	13 Min. 0,25—35 Min.
		16.	40,1	0,3	11 Min. 0,25—24 M. 0,2—36 M.
		24.	37,8	0,3	17 Min.
		32.	36,8	0,35	40 "
		40.	36,3	0,4	2 Stunden 10 Min.
2	K., 20 J. (1911)	12.	39,6	0,3	10 Min.
		15.	40,0	0,3	16 Min. 0,25—1 Stunde
		20.	38,9	0,3	2 Min. 0,2—14 Min.
		24.	27,9	0,3	4 Min. 0,2—15 Min.
		34.	39,5	0,3	13 Min. 0,25—50 Min.
		40.	38,1	0,3	22 Min.
		45.	37,3	0,35	43 "
51.	36,4	0,4	lebt, starb des Nachts		
3	Sch., 25 J. (1913)	13.	39,0	0,4	35 Min.
		20.	40,1	0,3	41 "
		27.	38,6	0,3	5 "
		34.	37,3	0,35	56 "
		41.	36,2	0,4	1 Stunde 2 Min.
4	P., 19 J. (1913)	7.	38,9	0,35	12 Min.
		12.	39,7	0,3	17 "
		15.	39,3	0,3	27 "
		20.	37,9	0,35	1 Stunde 2 Min.
		25.	36,9	0,4	58 Min.
5	E., 16 J. (1913)	14.	40,4	0,3	35 Min.
		18.	40,1	0,3	17 "
		23.	39,6	0,3	22 "
		26.	38,4	0,3	36 "
		31.	40,1	0,3	32 "
		34.	39,8	0,3	20 "
6	Tsch., 26 J. (1913)	10.	39,5	0,3	23 Min.
		15.	39,8	0,3	14 Min., 0,25 starb des Nachts
		18.	38,7	0,35	40 Min.
		24.	37,9	0,4	38 "
		30.	37,1	0,4	1 Stunde 40 Min.
		36.	36,5	0,4	2 Stunden 25 Min.
		40.	36,6	0,5	17 Min.
		7	E., 31 J. (1911)	7.	39,0
10.	40,2	0,3		22 "	
13.	40,0	0,3		4 Min. 0,25—39 Min. 0,2 starb des Nachts	
18.	38,8	0,3		18 Min.	
22.	38,1	0,3		25 "	
27.	39,9	0,3		18 "	
32.	38,5	0,3		27 "	
36.	37,3	0,35		43 "	
40.	36,5	0,35		1 Stunde 5 Min.	

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
8	A., 13 J. (1912)	6.	38,8	0,35	1 Stunde 7 Min.
		12.	39,9	0,3	13 Min.
		18.	40,1	0,3	4 Min. 0,25—36 Min.
		24.	38,7	0,3	18 Min.
		30.	39,5	0,3	24 "
		35.	39,1	0,3	28 "
		42.	37,3	0,3	1 Stunde 50 Min.
		50.	36,5	0,35	starb am folgenden Tage
9	K., 16 J. (1912)	5.	39,0	0,3	12 Min.
		11.	40,2	0,3	17 "
		15.	39,8	0,3	43 "
		18.	38,7	0,35	58 "
		21.	38,2	0,35	1 Stunde 35 Min.
		24.	37,7	0,4	23 Min.
		30.	36,9	0,45	25 "
		36.	36,1	0,5	12 "

Meine Befunde über die Toxizität des Serums von abdominaltyphösen Patienten stimmen mit den soeben veröffentlichten Befunden Szymanowskis und Bankowskis überein. Diese Autoren berechnen die tödliche Dosis für das Serum von normalen Personen mit 0,5 pro 100 g Körpergewicht des Meerschweinchens bei einmaliger intravenöser Injektion und sagen, daß diese Dosis beim Abdominaltyphus bis auf 0,25 pro Gramm Körpergewicht hinuntergehen kann.

Ein besonders stark toxisches Serum beobachtete ich bei Erysipel. In stürmisch verlaufenden Fällen mit hoher Temperatur, mit Erscheinungen cerebraler Natur, betrug die tödliche Dosis 0,25—0,3 pro 100 g Körpergewicht des Meerschweinchens. Mit der Kupierung des Krankheitsprozesses nahm die Toxizität des Serums rasch ab, um im Rekonvaleszentenstadium mit der mittleren Toxizität der Sera von gesunden Personen gleichen Schritt zu halten. Die Resultate meiner Beobachtungen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle III.

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
1	I., 23 J.	5.	40,2	0,3	8 Min. 0,25—32 Min.
		8.	39,1	0,3	40 Min.
		14.	36,9	0,4	2 Stunden 43 Min.
2	K., 31 J.	6.	39,9	0,3	9 Min. 0,25—23 Min.
		12.	36,3	0,5	10 Min.
3	P., 16 J.	3.	40,4	0,3	9 Min.
		15.	36,2	0,5	8 "

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
4	S., 40 J.	4.	39,8	0,3	6 Min.
		13.	37,3	0,4	48 „
5	P., 32 J.	5.	39,6	0,3	4 Min.
		11.	37,3	0,45	36 „
6	K., 20 J.	4.	40,1	0,3	6 Min.
		8.	38,9	0,35	30 Min. 0,3 starb des Nachts
7	S., 17 J.	3.	40,5	0,3	4 Min. 0,25—2 Stunden 13 Min.
		6.	39,9	0,3	14 Min.
		9.	38,2	0,3	1 Stunde 12 Min.
		16.	36,8	0,4	42 Min.

Schwach ausgeprägte Toxizität wurde bei Scharlach sowie bei Masern beobachtet, wobei meine Befunde in bezug auf diese Erkrankungen mit denen Szymanowskis und Bankowskis vollkommen auseinander gehen. Während diese Forscher der Toxizität des Serums bei Scharlach den ersten Platz einräumen (in den Untersuchungen dieser Autoren erreichte die tödliche Dosis bei einmaliger intravenöser Injektion sogar 0,13 pro 100 g Körpergewicht des Meerschweinchens), habe ich, indem ich nach dieser Richtung hin ungefähr 20 Scharlachkranke in verschiedenen Krankheitsstadien untersuchte, die tödliche Dosis fast stets mit 0,4 pro 100 g Körpergewicht konstatiert, und nur selten lag diese Dosis zwischen 0,3 und 0,35. Wegen besonderer Arbeitsbedingungen (an kranken Kindern des Städtischen Sampson-Krankenhauses) war es mir nicht möglich, die Toxizität des Serums während des ganzen Krankheitsprozesses systematisch zu untersuchen; ich mußte mich leider auf eine einmalige oder höchstens zweimalige Blutuntersuchung beschränken, aber nichtsdestoweniger dürften die in den verschiedenen Krankheitsperioden ausgeführten Untersuchungen immerhin einen gewissen Wert besitzen, wobei die Einstimmigkeit der gewonnenen Resultate zugunsten der von mir erhobenen Befunde spricht. Einen Unterschied in der Toxizität des Serums im Eruptions-Desquamationsstadium usw. konnte ich nicht wahrnehmen. Augenscheinlich bleiben die toxischen Eigenschaften des Serums bei scharlachkranken Kindern ziemlich lange erhalten, selbst nach Abschluß des Desquamationsstadiums. In meinen Untersuchungen war die Toxizität des Serums sogar noch am 43. bis 56. Tage wenig oder überhaupt nicht verändert.

Die Beobachtungsergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle IV.

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
1	S., 14 J.	2.	39,9	0,4	4 Min.
2	B., 11 J.	4.	38,3	0,4	14 "
3	B., 9 J.	4.	38,3	0,4	1 "
4	Ch., 8 J.	4.	38,0	0,4	5 "
5	P., 8 J.	4.	38,8	0,4	6 "
6	D., 8 J.	5.	37,9	0,4	10 "
7	A., 12 J.	6.	36,2	0,4	13 "
8	S., 6 J.	6.	38,3	0,4	12 "
9	B., 9 J. (2. Mal)	8.	38,0	0,4	28 "
10	A., 12 J. (2. Mal)	10.	37,4	0,4	12 "
11	B., 10 J.	10.	38,2	0,45	15 "
12	S., 7 J.	17.	37,5	0,4	11 "
13	L., 9 J.	18.	37,1	0,35	38 "
14	S., 6 J. (2. Mal)	18.	36,8	0,4	24 "
15	E., 12 J.	19.	37,4	0,4	13 "
16	E., 11 J.	19.	37,2	0,4	1 St. 30 Min.
17	G., 8 J.	20.	36,8	0,3	1 " 2 "
18	L., 10 J.	20.	36,9	0,4	18 Min. 0,35—1 St. 50 Min.
19	S., 9 J.	20.	36,8	0,4	10 "
20	G., 8 J. (2. Mal)	25.	36,7	0,4	5 " 0,35—1 St. 45 Min.
21	P., 10 J.	43.	36,7	0,4	1 St. 32 Min.
22	K., 8 J.	56.	36,8	0,4	50 Min.

Noch geringere Veränderungen der Toxizität zeigten die Masernkranken. Nur bei 4 von 10 untersuchten Kranken konnte man Toxizität von 0,4 pro 100 g Körpergewicht des Meerschweinchens konstatieren. In den übrigen Fällen unterschied sich das Masernserum hinsichtlich des toxischen Effekts in keiner Weise vom Serum von gesunden Personen. Die Resultate sind aus folgender Tabelle zu ersehen.

Tabelle V.

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
1	P., 7 J.	4.	38,5	0,5	23 Min.
2	O., 8 J.	4.	39,2	0,5	17 "
3	G., 6 J.	6.	37,2	0,5	12 "
4	B., 8 J.	6.	38,2	0,4	starb des Nachts
5	W., 12 J.	6.	38,9	0,5	15 Min.
6	K., 10 J.	7.	40,4	0,4	13 "
7	P., 12 J.	8.	36,4	0,5	7 "
8	W., 5 J.	8.	36,4	0,4	1 St. 23 Min.
9	P., 8 J.	8.	37,0	0,4	19 Min.
10	Z., 11 J.	8.	36,4	0,5	12 "

Die veränderlichsten Resultate erzielte ich bei kruppöser Pneumonie. Während manche Sera sich durch starke Toxizität auszeichneten und bei den Versuchstieren ein stürmisches anaphylaxieähnliches Bild hervorriefen, wiesen andere Sera nur geringe Zunahme der Toxizität im Vergleich zur Norm auf. Einen Parallelismus zwischen der Schwere der Erkrankung und der Toxizität des Serums konnte ich nicht wahrnehmen. In allen Beobachtungen konnte nur die eine Tatsache konstatiert werden, nämlich Zunahme der Toxizität des Serums während und in den ersten Stunden unmittelbar nach der Krise, wobei klonische und tonische Krämpfe die dominierende Erscheinung im Bilde des anaphylaktischen Shocks waren. Die Toxizität des Serums kehrte in manchen Fällen schon in den ersten Tagen nach der Krise zur Norm zurück, in anderen Fällen blieb sie 14 Tage lang erhöht. Die tödlichen Dosen lagen gewöhnlich zwischen 0,3—0,4 pro 100 g Körpergewicht des Meerschweinchens. In die nächstfolgende Tabelle sind von 13 nur 6 Beobachtungen aufgenommen worden, die am eingehendsten untersucht worden sind.

Tabelle VI.

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
1	D., 20 J.	3.	39,8	0,3	1 Stunde 56 Min.
		6.	40,1	0,3	53 Min.
		7.	36,3	0,3	22 „ 0,25—59 Min.
		10.	36,9	0,3	1 Stunde 9 Min.
		14.	37,1	0,3	1 „ 45
		18.	36,3	0,35	2 Stunden 45 Min.
2	F., 23 J.	5.	39,5	0,4	30 Min.
		9.	36,3	0,3	51 „
		14.	36,6	0,45	1 Stunde 3 Min.
		18.	37,0	0,5	31 Min.
3	S., 33 J.	6.	40,1	0,4	blieb am Leben
		8.	35,8	0,4	7 Min., 0,35—24 Min., 0,3—2 Stdn. 9 Min.
		10.	36,0	0,5	17 Min.
		15.	36,5	0,5	14 „
		18.	36,5	0,5	14 „
4	L., 40 J.	4.	38,9	0,3	48 Min.
		6.	39,4	0,3	56 „
		7.	35,9	0,3	4 „ 0,25—1 St. 3 Min.
		8.	37,2	0,4	56 „
		12.	37,0	0,5	20 „

No.	Name und Alter	Krankheitstag	Temp. in Grad	Toxizität	Tod des Tieres nach
5	R., 31 J.	3.	38,5	0,4	43 Min.
		5.	39,1	0,4	41 "
		7.	36,8	0,3	19 "
		10.	37,0	0,4	2 Stunden 35 Min.
		15.	36,3	0,5	34 Min.
6	P., 51 J.	3.	38,7	0,45	24 Min.
		5.	38,5	0,4	19 "
		6.	39,1	0,4	31 "
		7.	37,2	0,35	12 " 0,3— starb des Nachts
		9.	37,3	0,35	2 Stunden 40 Min.
		14.	36,1	0,4	2 " 15 "

Um das Intoxikationsbild möglichst zu veranschaulichen, welches sich beim Meerschweinchen nach einmaliger intravenöser Injektion des Serums vom gesunden oder vom kranken Menschen ergibt, möchte ich einige meiner Versuchsprotokolle an dieser Stelle wiedergeben.

Meerschweinchen No. 124, Körpergewicht 460 g, Temp. 36,4°, Respiration 96.
30. XII. 1911. Intravenöse Injektion von Serum vom gesunden Menschen, 0,4 pro 100 g Körpergewicht.

- 2⁰⁰ Injektion.
- 2⁰¹ leichtes Zittern.
- 2⁰⁰ hustet.
- 2⁰⁰ Temp. 35,3°.
- 2⁰⁶ legte sich hin, erhob sich aber sofort.
- 2⁰⁷ wandert, Resp. 180.
- 2⁰⁸ { sitzt ruhig, kauend.
- 2⁴⁵ { Resp. 140—160.
- 2⁵² Temp. 35,0°.
- 3⁰⁰ Temp. 35,2°.
- 3⁰⁰ Temp. 35,6°. Keinerlei Symptome.
- 4⁰⁰ Temp. 36,0°.

Meerschweinchen No. 125, Körpergewicht 360 g, Temperatur 38,3°, Respiration 100. Intravenöse Injektion desselben Serums 0,5 pro 100 g Körpergewicht.

- 4⁰⁰ Injektion.
- 4⁰¹ Augen weit geöffnet, zittert, reibt sich die Nase.
- 4⁰⁰ Defäkation, Harnlassen.
- 4⁰⁰ starkes Zittern, Resp. frequenter.
- 4⁰⁵ Resp. 200, legt sich auf die Seite.
- 4⁰⁷ hat sich selbst erhoben, sitzt zusammengekauert, zittert.

- 4³⁸ kaut, reibt sich die Nase, niest.
- 4⁴⁰ Temp. 36,3°.
- 4⁴¹ plötzlich verfallen, Resp. oberflächlich, unzählbar.
- 4⁴² fällt auf die Seite, schwache Pupillenreaktion.
- 4⁴³ vollständige Prostration.
- 4⁴⁴ klonische und tonische Krämpfe.
- 4⁴⁵ blutiger Schaum aus der Nase, Harnlassen.
- 4⁴⁶ Cheyne-Stockessche Respiration.
- 4⁴⁸ Schaum, agonale, konvulsive Bewegungen.
- 4⁴⁹ Exitus.

Meerschweinchen No. 142, Körpergewicht 420 g, Temp. 38,5°, Respiration 80.

17. I. 1912. Intravenöse Injektion von typhösem Serum der Patientin No. 2, K., vgl. Tabelle No. II, 12. Krankheitstag, Temperatur 39,6°, 0,3 pro 100 g Körpergewicht.

- 3⁵ Injektion.
- 3⁹ reibt sich die Nase, Resp. frequenter.
- 3¹⁰ Resp. 200, sehr oberflächlich, zittert.
- 3¹² Schwäche in den Hinterbeinen, Defäkation.
- 3¹³ Harnlassen, starkes Zittern.
- 3¹⁴ springt mehrmals hoch.
- 3¹⁵ Schaum aus der Nase, Schnappen.
- 3¹⁶ Krämpfe des ganzen Körpers, blutiger Schaum.
- 3¹⁸ Exitus.

Meerschweinchen No. 154, Körpergewicht 380 g, Temp. 37,9°, Respiration 84.

18. III. 1912. Intravenöse Injektion von Serum eines kruppösen Kranken unmittelbar nach der Krise. Vgl. Tabelle VI, Patientin No. 2, F. 0,3 pro 100 g Körpergewicht.

- 1⁴⁷ Injektion.
- 1⁴⁸ niest, reibt sich die Nase, macht Kaubewegungen.
- 1⁴⁹ schüttelt sich, zittert.
- 1⁵⁰ macht Kaubewegungen, reibt sich die Nase, niest.
- 1⁵¹ kauert zusammen.
- 1⁵² Harnlassen, Defäkation, Resp. frequenter.
- 1⁵³ bei Bewegungsversuchen die Hinterpfoten auseinander, stöhnt.
- 1⁵⁶ legt sich auf die Seite.
- 1⁵⁷ Temp. 35,5°, Resp. 200, sehr oberflächlich.
- 1⁵⁸ erhebt sich, setzt sich, Springbewegungen.
- 1⁵⁹ fällt auf die Seite.
- 2 liegt auf der Seite, Resp. sehr oberflächlich, Krämpfe des ganzen Körpers.
- 2³ stöhnt zwischen den Krämpfen, Harnlassen und Defäkation.
- 2⁵ fibrilläre Zuckungen des ganzen Körpers.
- 2²⁰ { Temp. unter 35,0°, liegt in voller Prostration, Atmung ober-
- 2²⁵ { flächlich, Cheyne-Stockesscher Typus, zeitweise Krämpfe
des ganzen Körpers.

2²⁷ blutiger Schaum aus der Nase, Schnappen.

2²⁸ heftiger Anfall von klonischen und tonischen Krämpfen. Exitus.

Meerschweinchen No. 199, Körpergewicht 350 g, Temp. 38,5°, Resp. 100.

14. II. 1913. Intravenöse Injektion von Serum von einer erysipelatösen Kranken. Vgl. Tabelle III, Patientin No. 1. 0,3 pro 100 g Körpergewicht.

2¹² Injektion.

2¹³ fällt auf die Seite, atmet schwer.

2¹⁴ niest.

2¹⁵ Defäkation, Harnlassen.

2¹⁶ große Schwäche, Resp. frequenter.

2¹⁸ versucht sich zu erheben, fällt aber sofort auf die Seite, Krämpfe des ganzen Körpers.

2¹⁹ volle Prostration.

2²⁰ Exitus.

Somit geht aus vorstehender Ausführung hervor, daß die einmalige intravenöse Injektion von heterologem Serum beim Tiere einen Symptomenkomplex verursacht, der sich von demjenigen bei der Serumanaphylaxie durch nichts unterscheidet. Unter Anaphylaxie versteht man bekanntlich die Reaktion des zuvor vorbereiteten Organismus auf die sekundäre Injektion ein und derselben fremdartigen Eiweißsubstanz, während in den Toxikationserscheinungen eine vorangehende Sensibilisation nicht stattfindet. Kann man nun nachweisen, daß diese beiden Zustände einander nahestehende pathologische Grundlagen haben? Um eine Antwort auf diese Frage geben zu können, muß man das Wesen der Anaphylaxie im Lichte der neuesten Erhebungen etwas eingehender betrachten.

Die dominierende Theorie der Anaphylaxie ist gegenwärtig die chemische. Der Schöpfer dieser Theorie, Friedberger, glaubt, daß die Anaphylaxie nichts anderes ist als eine Intoxikation, die durch eine besondere Substanz, nämlich durch Anaphylatoxin, hervorgerufen ist. Das Anaphylatoxin bildet sich nicht nur in vivo, sondern kann auch auf experimentellen Wegen in vitro gewonnen werden. Diese Substanz setzt sich nach der Ansicht von Friedberger aus den vorläufig noch unbekanntem Eiweißspaltungsprodukten zusammen, die sich bei der chemischen Reaktion zwischen dem Antigen, Antikörper und Komplement bilden. Somit ist die Anaphylaxie nichts anderes als eine Erscheinung der parenteralen Verdauung.

Eine Reihe von Untersuchungen aus der neuesten Zeit haben diesen Standpunkt Friedbergers bestätigt. Auch wurde durch die Experimente von Vaughan, Wheeler und Wells erwiesen, daß das Bild, welches sich beim Meer-schweinchen nach einmaliger intravenöser Injektion hydrolytischer Eiweißspaltungsprodukte entwickelt, sich von dem Bilde bei Serumanaphylaxie durch nichts unterscheidet. Ferner wurde diese Frage gemeinsam von mir und Hartoch etwas eingehender behandelt. Indem wir das in bestimmten Dosen bei einmaliger intravenöser Injektion für Meer-schweinchen absolut unschädliche normale Pferdeserum der tryptischen Verdauung aussetzten, gelang es uns, den Nachweis zu führen, daß mit dem Fortschreiten des Spaltungsprozesses des Eiweißmoleküls in einfachere aminosäure Verbindungen (was man nach der Zunahme des Amidstickstoffes beurteilen konnte, der nach der Methode von Sörensen titriert wurde) das Serum immer toxischer wurde und schließlich schon nach einmaliger Injektion den Tod des Versuchstieres unter dem typischen Bilde der Anaphylaxie hervorrufen konnte.

Noch weiter sind in ihren Untersuchungen Weichhardt und Schittenhelm gegangen, welche sich in der letzten Zeit mit der Frage der chemischen Natur der Körper befaßten, welche Erscheinungen von erhöhter Sensibilität unmittelbar hervorrufen. Durch die Untersuchungen dieser Autoren ist erwiesen, daß bei der Spaltung des Eiweißes zunächst Produkte mit hohem Molekulargewicht entstehen, welche tierische Membranen nicht passieren können; diese Produkte rufen bei einmaliger Einführung beim Tiere Temperaturabfall und soporösen Zustand hervor. Geht die Spaltung weiter, so entstehen Spaltungsprodukte, die entweder aus Amidosäuren (Leucin, Tyrosin, Glykokoll u. a.), oder aus Mono- und Diaminosäuren (Kyrine von Siegfried, Protamine und Histone von Kossel) bestehen. Diese letzteren Produkte bewirken auch bei den Tieren diejenigen Erscheinungen, die gewöhnlich als pathognomonisch für Anaphylaxie betrachtet werden, d. h. Krämpfe, akutes Lungenemphysem und Herabsetzung der Gerinnbarkeit des Blutes.

Durch alle diese Beobachtungen ist die Frage endgültig gelöst, wonach bestimmte Eiweißderivate beim Tiere ein typisches Intoxikationsbild hervorrufen können.

Wenn wir das Bild der Toxizität mit der Anaphylaxie in Verbindung bringen wollen, so müssen wir folglich annehmen, daß diese Derivate in gewisser Quantität sowohl im pathologischen als auch im normalen Blute enthalten sein müssen. Die neuesten Untersuchungen von Folin, van Slyke, Abderhalden sprechen zugunsten dieser Annahme. Diese Autoren haben nämlich mit absoluter Sicherheit nachgewiesen, daß im Blute von normalen Tieren im Verdauungsstadium der sogenannte Nichteiweißstickstoff, d. h. derjenige Stickstoff zunimmt, der zu den Substanzen gehört, die durch Hitze und durch chemische Agentien nicht zur Gerinnung gebracht werden können. Die Reaktion mit Ninhydrin lehrt, daß ein großer Teil dieses Nichteiweißstickstoffes zu den Eiweißspaltungsprodukten gehört. Ferner haben Abderhalden und dessen Schüler nachgewiesen, daß immer, wenn in den tierischen Organismus heterologes Eiweiß gelangt, mag dies unter physiologischen Verhältnissen (Chorionzellen bei Schwangerschaft) oder unter pathologischen Bedingungen (bakterielle Eiweißsubstanzen) vor sich gehen, im Blute proteolytische Fermente erscheinen, welche den Namen Schutzfermente erhalten haben und jene antigenen Eiweißsubstanzen spalten.

Wenn nun der Organismus unter zahlreichen pathologischen Bedingungen eine Reihe von Fermenten mobilisieren muß, die früher ihre Tätigkeit nicht entfaltet hatten, so ist es klar, daß der Gehalt des Blutes an Eiweißverdauungsprodukten unter diesen Bedingungen in verschiedenem Maße zunehmen wird. Somit erweisen sich die Toxizität normaler und pathologischer Sera und die Erscheinungen von anaphylaktischer Vergiftung in bezug auf die chemische Basis ihrer Aetiology als einander nahestehend. Hier wie dort werden wir mit Eiweißspaltungsprodukten zu tun haben, die im ersteren Falle dem Versuchstier in fertigem Zustand zugeführt, im letzteren sich im Organismus des sekundär injizierten Tieres bilden werden. Es liegt somit durchaus in der Natur der Sache,

wenn die Symptomatologie bei den Erscheinungen von Toxizität und Anaphylaxie fast die gleiche ist.

Zusammenfassung.

1) Das Serum normaler, völlig gesunder Menschen ist in hohem Grade toxisch für Meerschweinchen. Seine tödliche Dosis liegt bei einmaliger intravenöser Einführung zwischen 0,5 und 0,6 pro Kilo Körpergewicht.

2) Im Verlaufe einer Reihe von Infektionskrankheiten erfährt die Toxizität eine deutliche Steigerung.

3) Beim Abdominaltyphus erweist sich in der Mehrzahl der Beobachtungen die Dosis von 0,3 pro Kilo Körpergewicht als letal.

4) Eine analoge Steigerung der Toxizität läßt sich auch bei Erysipelas nachweisen. Hier liegt die tödliche Dosis gewöhnlich zwischen 0,25 und 0,3 pro Kilo.

5) Bei Scharlach und Masern ist die Toxizität des Serums gleichfalls erhöht, aber nur in sehr geringem Maße.

6) Bei kruppöser Pneumonie ist eine Steigerung der Toxizität des Serums, als Regel, während und unmittelbar nach der Krisis nachweisbar.

Literatur.

- 1) Mosso, Arch. f. exper. Pathol. und Pharmakol., Bd. 25.
- 2) Camus et Gley, C. R. Acad. Sciences, T. 140, 1905.
- 3) Stern, Ref. Dtsch. med. Wochenschr., 1893, p. 454.
- 4) Markoff, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 72, 1912.
- 5) Rummo, Wien. med. Wochenschr., 1891.
- 6) Pfeiffer, H., Zeitschr. f. Hyg., 1905.
- 7) Doerr und Moldovan, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7.
- 8) Friedberger und Hartoch, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3.
- 9) Charrin, Compt. rend. Soc. Biol., 1890, 2.
- 10) Chambrelent et Tarnier, Compt. rend. Soc. Biol., 1892.
- 11) Selavo, zit. nach Markoff.
- 12) Leclainche et Remond, Compt. rend. Soc. Biol., 1893.
- 13) Ludvig und Savor, Monatschr. f. Geburtshilfe, Bd. 1, 1893.
- 14) Mairet et Bose, Compt. rend. Soc. Biol., 1897.
- 15) Guinard et Dumarest, Compt. rend. Soc. Biol., 1897.
- 16) Albu, Virch. Arch., Bd. 149.

- 17) Weiss, Pflüg. Arch., 1896.
- 18) Uhlenhuth, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 26, 1897.
- 19) Gasbarrini, Ref. Zeitschr. f. Biochemie, Bd. 10, 1910.
- 20) Gley, C. R. Acad. Sciences, T. 138, 1904.
- 21) Syrenskij, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1913.
- 22) — Wratschebnaja Gazeta, 1912, No. 16.
- 23) Bankowski und Szymanowski, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1913.
- 24) Vaughan and Wheeler, Journ. of Infect. Diseases, Vol. 4, 1907.
Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 1.
- 25) Wells, The Journ. of Infect. Diseases, Vol. 5, 1908.
- 26) Hartoch, und Syrenskij, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7.
- 27) Weichardt und Schittenhelm, Münch. med. Wochenschr., 1910,
1911 und 1912.
- 28) Folin and Denis, The Journ. of Biolog. Chemistry, 1912, 11.
- 29) Donald, van Slyke and Meyer, The Journ. of Biolog. Chem.,
1912, 12.
- 30) Abderhalden, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 81.

Nachdruck verboten.

[Aus dem chemisch-biologischen Laboratorium der IV. Abteilung
des St.-Rochusspitals der Haupt- und Residenzstadt Budapest
(Oberarzt: Professor Stephan von Tóth)].

Ueber die quantitativen Verhältnisse der Anti- körperproduktion bei Immunisierung mit zwei Antigenen.

Von

Eugen Rosenthal und **Minokichi Takeoka** aus Japan.

(Eingegangen bei der Redaktion am 11. Dezember 1913.)

Will man die Frage studieren, in welcher Weise die Antikörperproduktion nach Einführung eines bestimmten Antigens durch die gleichzeitige Zufuhr eines zweiten antigen wirkenden Körpers beeinflusst wird, so ist es zunächst nötig, darüber ins Klare zu kommen, ob die der Antikörperproduktion entsprechenden Kurven in ihrem Verlauf irgendwelche Gesetzmäßigkeit erkennen lassen, da doch nur in diesem Falle eine durch andere Faktoren erzeugte Beeinflussung erkennbar bzw. zu beurteilen ist.

Die kurvenmäßige Darstellung der Antikörperproduktion wurde, wie bekannt, zuerst von Ehrlich¹⁾ angewendet und dann wurde diese Darstellungsweise von Madsen und Arrhenius²⁾, Salomonsen und Madsen³⁾, v. Dungern⁴⁾ und Bulloch⁵⁾ in verschiedenen Richtungen ausgearbeitet und bei verschiedenen Arten der Antikörperbildung verwendet. Ueber den Einfluß der Alkoholarreicherung auf die Antikörperbildung liegen bekanntlich die Arbeiten Friedbergers⁶⁾ vor, aus welchen hervorgeht, daß bei der Wahl von geeigneten Antigenmengen die Schwankungen in der Art bzw. in dem Verlauf der Antikörperproduktion nicht bedeutend sind.

In bezug auf unsere Versuchsanordnung, wobei wir mit Kaninchen einerseits, mit Hammelerythrocyten und abgetöteten *B. coli*-Aufschwemmungen arbeiteten, waren die Angaben von Fr. Wolf⁷⁾ ganz besonders wertvoll.

Dieser Autor studierte zunächst die quantitativen Verhältnisse der Antikörperbildung bei Kaninchen nach einmaliger Vorbehandlung mit Rinderblutkörperchen und Rinderserum und kam hierbei zum Resultat, daß, während die Präzipitinbildung nach der parenteralen Einfuhr von Rinderserum keine gleichmäßige und stets gleich verlaufende Präzipitinkurven liefert, die Hämolysinbildung ein mehr konstantes Verhalten aufweist. Das wesentliche Resultat der Versuche Fr. Wolfs liegt darin, daß er feststellen konnte, daß nach der intravenösen Einfuhr einer bestimmten Menge von Rindererythrocyten eine Hämolysinproduktion auftritt, deren Kurve etwa vom 3.—6. Tag einen ersten, vom 7.—10. Tag einen zweiten Anstieg aufweist und von da an wieder abfällt.

Wir untersuchten nun die Frage, ob eine derartige Gesetzmäßigkeit im Verlauf der Antikörperkurve auch nach Einfuhr anderer Antigene zu beobachten ist, ferner, in welcher Weise sich diese Kurven gegenseitig beeinflussen, wenn man dasselbe Tier nicht nur mit dem einen, sondern auch mit dem zweiten Antigen gleichzeitig behandelt. — Die Anordnung, nach welcher die weiter unten zu besprechenden Versuche

- 1) P. Ehrlich, Centralbl. f. Bakt., Bd. 10.
- 2) Madsen und Arrhenius, Immunochemie.
- 3) Salomonsen und Madsen, Ann. Inst. Pasteur, 1897.
- 4) v. Dungern, Die Antikörper. Jena 1903.
- 5) Bulloch, Centralbl. f. Bakt. etc., Bd. 29.
- 6) Friedberger, Compt. rend. du XIII. Congr. internat. d'Hyg., Bruxelles 1903.
- 7) Fr. Wolf, Diese Zeitschr., Bd. 14. Heft 6.

ausgeführt werden, ist somit ganz schematisch folgende: Versuchstier A wird mit einer Erythrocytenart, Tier B mit einer abgetöteten Coliaufschwemmung behandelt, während Tier C in gleicher Weise mit derselben Erythrocytenart + Coliaufschwemmung behandelt wird. In täglich entnommenen Serumproben wird bei den Tieren A und C der hämolytische Titer, B und C der Agglutinintiter festgestellt, woraus sich die unbeeinflusste, sagen wir Normalkurve, und die gegenseitig beeinflusste Kurve der Hämolysin- bzw. Agglutininbildung ergibt. — Um von den Verhältnissen ein richtiges Bild zu bekommen, wurden die verwendeten Antigenmengen verschieden groß gewählt, so daß für jedes Antigen je eine Gruppe mit einer kleinen, eine zweite mit einer mittleren, eine dritte mit einer größeren Antigenmenge behandelt wurde.

Für unsere Versuche war es ganz besonders wichtig, die Angaben Fr. Wolfs auf ihre Richtigkeit zu prüfen:

Zu diesem Zwecke wurden zunächst 3 Reihen von Kaninchen mit verschiedenen Mengen von Hammelerythrocyten behandelt; die Individuen derselben Reihe waren, entsprechend der Erfahrung Fr. Wolfs, stets Tiere desselben Wurfes. Es wurde der Versuch in 3 Reihen ausgeführt, wobei die Antigenmengen variiert wurden, und zwar derart, daß vier Kaninchen der I. Reihe 0,5 ccm, vier der II. Reihe je 2 ccm, und vier der III. Reihe mit je 6 ccm einer 20-proz. Hammelerythrocytenaufschwemmung intravenös behandelt wurden. — Die Ausführung des hämolytischen Versuches erfolgte im sogenannten kleinen System, wobei von jeder Komponente je 0,5 ccm zum Versuch verwendet wurde; die Serumverdünnungen waren 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400. — Aehnlich wie Wolf, kam es uns auch nicht selten vor, daß das Meerschweinchenkomplement Normalhämolysine für Hammelerythrocyten enthielt. — Um den hieraus entstandenen Uebelständen aus dem Wege zu gehen, verwendeten wir stets ein Komplement, welches 3–4 Stunden, mit Hammelerythrocyten zusammengebracht, im Eisschrank stand: hierdurch wurde der Ambozeptor des Meerschweinchenserums von den Hammelerythrocyten gebunden, wobei aber keine Hämolyse eintrat. — Nun wurde das überstehende, klare Serum abgehoben, 2–3 Minuten hindurch scharf zentrifugiert und sonst wie gewöhnlich verwendet.

Die Resultate der weiter oben näher besprochenen Versuche befinden sich in der folgenden Tabelle, die Zahlen entsprechen jener minimalen Serummenge, welche innerhalb 2 Stunden 1 ccm 5-proz. Hammelblutaufschwemmung löste.

Tabelle

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I. 0,5	1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	2	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,010	0,010
	3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	†	—	—	—	—	—	—
	4	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,005	0,010	0,010
II. 2,0	5	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,005	0,003
	6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,005	0,010	0,005	0,005	0,003	0,005	0,005
	7	0,1	0,1	0,02	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003	0,003	0,005	0,01
	8	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,02	0,005	0,005	0,010	0,010	0,005	0,005
III. 5,0	9	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,0033	0,0025	0,0025
	10	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,005	0,005
	11	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0,005
	12	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,01	0,005	0,01	†	—	—

Bei Durchsicht der Tabelle kann man zunächst im allgemeinen feststellen, daß die Antikörperbildung selten vor dem 4. Tage beginnt; der nun folgende mehr oder weniger etappenartige Anstieg erreichte in unseren Versuchen um den 10.—12. Tag das Maximum und bleibt 1—3 Tage hindurch auf der gleichen Höhe, um dann bis zum 18.—24. Tage wieder abzufallen. Zwischen der Antikörperproduktion der mit verschieden großen Antigenmengen behandelten Tieren besteht insofern ein Unterschied, daß das erreichte Maximum bei den mit größeren Mengen vorbehandelten Tieren (Gruppe III) höher ist als bei den Tieren der I. bzw. II. Gruppe, und daß der höchste Titer der I. Gruppe das Maximum der II. Gruppe nicht erreicht. Im Anstieg und im Abfall des Titers läßt sich irgendeine, etwa mit den Mengenverhältnissen des Antigens zusammenhängende Eigenschaft der Kurve kaum erkennen; vielleicht könnte man sagen, daß zwischen der I. und III. Gruppe ein Unterschied insofern besteht, daß die Rückkehr zur Norm in der I. Gruppe etwas rascher erfolgt; zwischen der I. und II. Gruppe ist ein derartiger Unterschied sicher nicht vorhanden.

Vergleichen wir nun diese Ergebnisse mit den Resultaten Wolfs, so finden wir zunächst, daß wir den von ihm beobachteten „kritischen Anstieg“ des 3. Tages nur vereinzelt fanden; vielmehr konnten wir gewöhnlich vom 4. Tage an (einige Male sogar erst am 5. Tage) eine Steigerung des Hämolytintiters feststellen. Ferner beobachtete Wolf einen

I¹⁾.

13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0,02	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
0,01	0,01	0,02	0,02	0,2	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,010	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—
0,003	0,005	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—
0,005	0,010	0,010	0,02	0,02	0,10	0,10	0,10	—	—	—	—
0,01	0,01	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
0,005	0,005	0,01	0,01	0,2	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
0,0025	0,005	0,005	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
0,0025	0,0025	0,0033	0,005	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1
0,005	0,0033	0,0033	0,0025	0,0003	0,005	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,1
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

zweiten Anstieg zwischen den 7.—11. Tage, der in unseren Versuchen erst am 10.—12. Tag auftritt und von da an einige (1—3) Tage hindurch auf diesen Höhepunkt stehen bleibt; ein Abfall erfolgt nur nachher. — Ferner ist der Anstieg in unseren Versuchen nur außerordentlich selten steil, man könnte ihn aber als langsam bezeichnen. — Alle diese Verschiedenheiten, welche wir in unseren Versuchen gegenüber dem von Fr. Wolf beobachteten Kurvenverlauf feststellen, scheinen indessen nicht auf wesentlichen Differenzen zu beruhen, schließlich besteht bei Wolfs Kurven ebenso wie bei den unsrigen ein meist zweimaliger Anstieg bis zum Maximum, und wenn manche Details nicht vollständig übereinstimmen, so hat dies seine Ursache zunächst darin, daß die Mengenverhältnisse nicht ganz identisch sind, ferner daß Rassenverschiedenheiten der Versuchstiere wohl auch den Verlauf der Antikörperkurve beeinflussen können; insbesondere hierdurch

1) Die in den Tabellen angegebenen Zahlen zeigen die Serummengen an, die in je 1 ccm der verschiedenen Verdünnungen enthalten sind, und zwar:

0,10	ist in 1 ccm der Verdünnung 1:10 enthalten
0,05	„ „ 1 „ „ „ 1:20 „
0,025	„ „ 1 „ „ „ 1:40 „
0,0167	„ „ 1 „ „ „ 1:60 „
0,0125	„ „ 1 „ „ „ 1:80 „
0,010	„ „ 1 „ „ „ 1:100 „
0,0067	„ „ 1 „ „ „ 1:150 „
0,0050	„ „ 1 „ „ „ 1:200 „
0,0030	„ „ 1 „ „ „ 1:300 „
0,0025	„ „ 1 „ „ „ 1:400 „

dürfte es bedingt sein, daß in unseren Versuchen der steile Anstieg der Kurve meistens fehlte. — Im Endeffekt können wir somit in Uebereinstimmung mit Wolf feststellen, daß bei Kaninchen desselben Wurfes der Verlauf der Hämolysekurve einen stets gleichen Charakter hat, und können noch hinzufügen, daß in derselben quantitative Unterschiede in der Dosierung des Antigens mit genügender Deutlichkeit hervortreten.

Unserem eingangs besprochenen Plan entsprechend war es nunmehr nötig, ein zweites geeignetes Antigen zu finden, nach dessen parenterale Einfuhr die Antikörperbildung ähnlich der Hämolyseproduktion ebenfalls stets gleichen quantitativen Verhältnissen entsprechend erfolgt. — Bereits aus den Versuchen von Fr. Wolf war es bekannt, daß die Präzipitinbildung beim Kaninchen nicht mit genügender Gleichmäßigkeit erfolgt, und somit ist diese für unsere Zwecke nicht geeignet. — Aus dieser Ursache sahen wir uns veranlaßt, mit anderen Antigenen einen Versuch zu machen; unsere Wahl fiel auf das *B. coli*, wobei das nach Einfuhr desselben gebildete Agglutinin untersucht werden sollte. — Die von uns getroffene Versuchsanordnung war hierbei eine ähnliche, wie sie bei der Untersuchung der Hämolyseproduktion war.

Aufschwemmungen von 24-stündigen Agarkulturen des *B. coli* wurden durch 3 Stunden auf einer Temperatur von 60° gehalten, und hierdurch getötet; Sterilitätsprobe. Von dieser Aufschwemmung des *B. coli* wurde eine Emulsion hergestellt, deren 3 ccm im Bakteriometer, den einer von uns¹⁾ vor kurzem angab, eine 5 mm hohe Bakteriensäule liefert. Die intravenöse Injektion dieses Colivaccins wurde auch hier in 3 verschiedenen

Tabelle

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
I. 0,5	13	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,05	0,05
	14	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,025	0,05	0,05
	15	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,05	0,025	0,05
II. 2,0	16	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,05	0,025	0,025
	17	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,025	0,0125
	18	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,025	0,0167	0,01
III. 5,0	19	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,025	0,0167	0,0125
	20	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,01	0,0167	0,0167
	21	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,01	0,025	0,0125

1) E. Rosenthal, Berliner klin. Wochenschr., 1913, No. 38.

Gruppen vorgenommen, und zwar in der Weise, daß bei der ersten Gruppe 0,5 ccm, bei der zweiten 2 ccm, bei der dritten 5 ccm eingeführt wurden. Der Agglutinationsversuch wurde ausgeführt, indem je 1 ccm verschiedener Serumverdünnungen (1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80, 1:100, 1:150, 1:200) mit 1 ccm der obigen Coliaufschwemmung zusammengebracht, und auf 2 Stunden in den Brutschrank gestellt wurden. Die in der unten folgenden Tabelle zusammengefaßten Zahlen geben jene minimale Serum-mengen an, welche in einem Volumen von 1 ccm mit ebenfalls 1 ccm der obigen Coliaufschwemmung innerhalb 2 Stunden zu einer Agglutination führten.

Bei der Betrachtung dieser Tabelle fällt zunächst auf, daß die Antikörperbildung hier nicht um den 4., sondern erst um den 6.—7. Tag beginnt; die Kurve der Agglutininproduktion steigt hierauf — scheinbar den Mengenverhältnissen entsprechend — mehr oder weniger hoch, aber stets steil in die Höhe, verweilt hier nur ganz kurze Zeit, höchstens 2 Tage hindurch, und fällt dann mehr langsam, um in 7—11 Tagen zu einem Minimum herabzufallen und allmählich zu verschwinden. Ein Anstieg in zwei oder mehreren Etappen, wie es bei der Kurve der Hämolysinproduktion beobachtet wurde, kam hier nur ganz vereinzelt und nur bei relativ großen Antigenmengen vor. Vergleicht man die Werte der Parallelversuche, ferner die Zahlen, welche bei den verschiedenen Gruppen erhalten wurden, so erkennt man leicht, daß die Kurve der Agglutininbildung ähnlich ist wie jener der Hämolysinproduktion eine bestimmte Gesetzmäßigkeit eigen ist, deren Einzelheiten weiter oben besprochen wurden. Vielleicht noch mehr klar als bei der Hämolysinkurve treten die Verschiedenheiten der eingeführten Antigenmengen in der

II.

12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—
0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,05	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,0125	0,025	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
0,0167	0,025	0,025	0,05	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
0,0125	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
0,0067	0,005	0,01	0,0167	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—	—
0,0067	0,01	0,0125	0,025	0,025	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—
0,01	0,0067	0,0125	0,0167	0,025	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—

Höhe des Agglutinintiters hervor: je größer die Antigenmenge, um so höher war das Maximum des Agglutinintiters.

Waren nun unsere Versuche soweit fortgeschritten, daß wir im Verlauf der Hämolysin- bzw. Agglutininkurven den quantitativen Verhältnissen entsprechende Resultate erhielten als Tiere mit nur einem oder nur mit dem anderen Antigen vorbehandelt wurden, gingen wir nun daran, in gewissem Sinn die Kombination der obigen Versuche auszuführen, indem bei den sogleich zu besprechenden Experimenten ein Tier, bzw. eine Gruppe von Tieren gleichzeitig mit zwei Antigenen vorbehandelt und der Verlauf der Hämolysin- bzw. Agglutininwerte festgestellt wurde. In bezug auf die Einzelheiten waren diese Versuche folgendermaßen eingerichtet:

4 Kaninchen wurde 0,5 ccm einer 20-proz. Hammelerythrocytenaufschwemmung und 0,5 ccm einer Coliaufschwemmung in die Ohrvene eingeführt, deren 3 ccm eine 5 mm hohe Bakteriensäule lieferte (I. Gruppe); 6 Kaninchen erhielten ebenfalls in die Ohrenrandvene je 2 ccm der gleichen Erythrocytenaufschwemmung und desselben Colivaccins (II. Gruppe) und schließlich wurden 5 Kaninchen auf die gleiche Art mit je 5 ccm Hammelerythrocyten- und Coliaufschwemmung injiziert (III. Gruppe). Die von diesen Tieren täglich entnommenen Blutproben wurden dann in zweifacher Richtung untersucht, und zwar: 1) in bezug auf die hämolytische Fähigkeit, und 2) auf die Höhe des Agglutinintiters. Hierbei ergaben sich die in der folgenden Tabelle zusammengestellten Zahlen, deren Bedeutung dieselbe ist, wie es bereits bei der ersten Tabelle kurz besprochen wurde.

Tabelle III.

Zahlen des Hämolysintiters.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
I.	22	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,01	0,005	0,005	0,01	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	—		
	23	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,005	0,01	0,01	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	
	24	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,005	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	—	
	25	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,005	0,005	0,02	0,02	0,01	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	
II.	26	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	
	27	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,005	0,005	0,01	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	
	28	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,005	0,003	0,005	0,02	0,01	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	
	29	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,005	0,01	0,01	0,005	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	—	
	30	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,01	0,01	0,005	0,003	0,01	0,01	0,1	0,1	0,1	—	—	—	
	31	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,005	0,01	0,01	0,003	0,003	0,005	0,02	0,01	0,1	0,1	0,1	—	
III.	32	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,005	0,005	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1
	33	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,01	0,01	0,005	0,005	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	
	34	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,01	0,005	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	
	35	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,01	0,01	0,005	0,02	0,01	0,02	0,1	0,1	0,1	—	—	—	
	36	0,1	0,1	0,1	0,1	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,005	0,005	0,005	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,1	0,1	0,1

Zahlen des Agglutinintiters.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
I.	22	—	—	—	—	—	—	0,1	0,05	0,05	0,0167	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	—	—	—
	23	—	—	—	—	0,1	0,05	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
	24	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,0125	0,0167	0,025	0,025	0,1	0,1	0,1	—	—	—
	25	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,025	0,0167	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—
II.	26	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,05	0,0167	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,1	—	—	—
	27	—	—	—	—	0,1	0,05	0,05	0,025	0,025	0,0167	0,025	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—	—
	28	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,05	0,025	0,0167	0,05	0,025	0,05	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
	29	—	—	—	—	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,0167	0,010	0,0167	0,025	0,05	0,1	0,1	0,1	—	—	—
	30	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,05	0,0167	0,0125	0,010	0,0167	0,025	0,05	0,025	0,025	0,05	0,1	0,1
III.	31	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,025	0,0125	0,0167	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	0,1	0,05	0,0167	0,0125	0,025	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—	—
	33	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,0125	0,0167	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—
	34	—	—	—	—	—	0,1	0,025	0,05	0,025	0,0167	0,010	0,0125	0,025	0,1	0,1	—	—	—	—
	35	—	—	—	—	0,1	0,1	0,05	0,025	0,025	0,0125	0,0167	0,025	0,025	0,05	0,05	0,1	0,1	—	—
	36	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,05	0,025	0,0167	0,025	0,025	0,05	0,1	0,1	—	—	—	—

Vergleichen wir nun die Werte, welche diese Versuche mit kombinierter Vorbehandlung lieferten, so können wir zunächst feststellen, daß der Typus der Hämolyisin- und Agglutininkurven mit denjenigen, wo nur mit einem Antigen vorbehandelt wurde, im großen und ganzen übereinstimmt. Wollen wir nun die Resultate jener Gruppen miteinander vergleichen, wo die quantitativen Verhältnisse (namentlich in bezug auf die Antigenmenge) gleich waren, so ergibt sich bei der I. Gruppe ein bemerkbarer Unterschied; während das Maximum des Hämolyisintiters bei den nur mit 0,5 ccm 20-proz. Hammelerythrocyten-Aufschwemmung vorbehandelter Tiere meistens 1:100, und nur in einem Fall 1:200 betrug, war das Maximum bei den Tieren derselben Gruppe, wo auch noch 0,5 ccm des bewußten Colivaccins injiziert wurde, nie unter 1:200. Die Steigerung des Hämolyisintiters bei der kombinierten Behandlung ist bei den obigen Mengenverhältnissen der I. Gruppe somit nicht besonders stark, aber zweifellos vorhanden. In bezug auf die Titerwerte der Agglutinine kann man eine Beeinflussung im gleichen Sinn feststellen: bei den kombiniert vorbehandelten Tieren steigt die Kurve in drei Versuchen über den Wert, wo nur mit Colivaccin allein vorbehandelt wurde, ist mit diesem nur in einem Versuch gleich; hier ist, ähnlich wie bei der Hämolyisinproduktion, somit auch eine leichte Erhöhung vorhanden.

Es hat somit den Anschein, als würde die gleichzeitige Einführung von zwei Antigenen in relativ kleinen Mengen — wie dies ja bei der I. Gruppe geschah — eine eben bemerkbare Steigerung der Antikörperproduktion in bezug auf beide Antigene zur Folge haben.

Den Umstand, daß hier mit relativ kleinen Antigenmengen gearbeitet wurde, möchten wir hervorgehoben haben, denn vergleichen wir die entsprechenden Tabellen der II. Gruppe (wo die vierfache Antigenmenge als in der I. Gruppe injiziert wurde), so können wir eine Beeinflussung im ähnlichen Sinn nicht feststellen. Die hier erhaltenen Werte sind beinahe dieselben: bei der gleichzeitigen Vorbehandlung mit zwei Antigenen ergab sich ein Maximum, das mit demselben der getrennt vorbehandelter Tiere übereinstimmt, und dies kann in bezug auf die Agglutininkurve ebenso festgestellt werden, als bezüglich der Kurve der Hämolysinproduktion.

Was schließlich die III. Gruppe betrifft, so ist zunächst bezüglich der Hämolysinbildung bei der kombinierten Behandlung eine bedeutende Abnahme gegenüber der einfachen Vorbehandlung festzustellen; während bei der letzteren Titerwerte von 1:300 und 1:400 erreicht wurden, beträgt das Maximum der Hämolysinkurve bei der kombinierten Vorbehandlung 1:200. — Bezüglich der Agglutininkurve sind die gleichen Verhältnisse vorhanden, indem bei der einfachen Vorbehandlung das Maximum 1:150, bei der kombinierten dagegen 1:80 beträgt.

Wir sehen somit, daß die Verschiedenheit der Antigenmengen bei der gleichzeitigen Einführung zweier Antigene in der Antikörperproduktion nicht mehr hervortritt: Die Titerwerte der ersten beiden Gruppen sind kaum verschieden gegenüber den Zahlen, welche sich bei der einfachen Vorbehandlung bei den verschiedenen Gruppen ergeben. — Fragen wir nun nach der Ursache, warum sich die Antikörperproduktion unter den gegebenen Verhältnissen so verhält, wie wir es eben sahen, so ist wohl die Annahme am meisten naheliegend, daß die Summe der Reize, welche die Injektion der von uns angewandten kleinsten Antigenmengen hervorrief, im tierischen Organismus eine Reaktion erzeugte, welche bei den eben vorhandenen Versuchsbedingungen als eine maximale Leistung zu

betrachten ist. Daß dies tatsächlich so ist, beweist der Umstand, daß bei der geringsten Antigendosis nur eine eben bemerkbare Steigerung der Antikörperbildung vorhanden ist, während namentlich die Werte der III. Gruppe gegenüber der einfachen Vorbehandlung große Unterschiede erkennen lassen.

Das Resultat der Versuche, in denen wir mit relativ hohen Antigendosen arbeiteten, scheint älteren Erfahrungen E. Friedbergers¹⁾ zu entsprechen: wurden Tiere außer mit Cholera-vibrionen auch mit einer anderen Bakterienart geimpft, so betrug der Cholera-Agglutinintiter viel weniger als bei den Kontrollen.

In unseren Versuchen wurde der zeitliche Verlauf in der Produktion zweier ganz verschiedener Antikörper studiert: einmal der lytische Antikörper, der nach der intravenösen Zufuhr von Hammelerythrocyten entstand, und dann der agglutinierender Antikörper, welcher infolge des eingespritzten Colivaccins auftrat. — Die Frage, ob die verschiedenen Antikörper durch die Funktion derselben oder durch die Tätigkeit verschiedener Zellkomplexe, bzw. Organe, oder aber durch gleiche und verschiedene Gruppen innerhalb einer Zelle entstehen, ist so ziemlich unentschieden. — Jedenfalls ist es feststehend, daß an der Antikörperbildung außer den Zellen der Antigen-einspritzung (Peritoneum, Pleura, Conjunctiva etc.) zunächst die Zellen der Milz, des Knochenmarkes, der Lymphdrüsen und die Leukocyten teilnehmen; insbesondere wurden diese Verhältnisse bekanntlich in bezug auf Cholera und Typhus eingehend studiert. — Darüber aber, ob nach Einfuhr eines bestimmten Antigens die Zellen eines bestimmten Organes in Aktion treten gegenüber der Tätigkeit, welche nach der Einfuhr eines zweiten Antigens einsetzt, wo wieder weitere, andere Zellkomplexe die Antikörperproduktion besorgen, liegen keine Angaben vor. — Die von uns ausgeführten Versuche gestatten in dieser Richtung einen gewissen Einblick: würde jedem der von uns untersuchten Antikörper je ein für sich eigener Entstehungsort entsprechen, so wäre ganz theoretisch bei unserer Versuchseinrichtung ein Resultat zu erwarten gewesen, wo

1) E. Friedberger, Berliner klin. Wochenschr., 1904, No. 10.

das Maximum der Antikörperbildung bei der kombinierten Vorhandlung den verschiedenen Antigendosen entsprechend immer den gleichen Wert erreicht hätte als bei der einfachen Art der Immunisierung, wo einem Tier nur die eine Antigenart eingespritzt wurde. Denn würde z. B. der Antikörper a vom Zellkomplex A erzeugt sein, und entstünde der Antikörper b vom Zellkomplex B, so ist zu erwarten, daß bei der gleichzeitigen Immunisierung a und b das gleiche Maximum erreichen, als im Fall, wo sie separat je einem Tier injiziert wurden, vorausgesetzt, daß die Zellkomplexe A und B nicht identisch sind. Diese Möglichkeit hat sich in unserem Fall teilweise scheinbar verwirklicht, und zwar in bezug auf die beiden ersten Gruppen (wo die injizierten Antigenmengen je 0,5 bzw. 2,0 ccm betragen); wie wir sahen, war bei den kombiniert vorbehandelten Tieren der I. Gruppe eher eine leichte Anregung der Antikörperbildung festzustellen, während bei den ebenso behandelten Tieren der II. Gruppe zumindest keine Abnahme im Maximum der Antikörperkurve zu beobachten war. Dies sind jedenfalls Tatsachen, welche dafür zu sprechen scheinen, daß die Antikörperbildung auf die beiden durch die Antigeneinspritzung erzeugten Reize an verschiedenen Punkten ihren Angriffspunkt haben, was insofern nicht besonders wunderbar wäre, als die Natur, die Art der beiden von uns verwendeten Antigene ebenso grundverschieden ist, als die nach Einführung derselben entstandenen Antikörper. — Allerdings läßt sich ein ähnlicher Parallelismus zwischen den entsprechenden Werten der III. Gruppe (wo je 5,0 ccm der Antigene gespritzt wurde) nicht feststellen, da doch hier das Maximum der kombinierten Vorbehandlung die Werte der einfach injizierten Tiere nicht erreicht. Dies ist die Ursache, daß wir die soeben besprochene Möglichkeit, wonach verschiedene, insbesondere die von uns studierten Antikörper vorwiegend, von bestimmten Zellgruppen, bzw. Organe erzeugt werden, von weitem nicht als etwas sicher feststehenden betrachten wollen, obzwar es gut denkbar ist, daß die den verschieden großen Antigenmengen entsprechende, verschieden intensive Antikörperproduktion der einfach vorbehandelten Tiere, speziell bei der III. Gruppe, infolge der stark veränderten Mengenverhältnisse nicht zutage tritt, da

die Reaktionsfähigkeit des zum Versuch herangezogenen tierischen Organismus hinausgeht.

Zusammenfassung.

1) Es wurden die zeitlichen Verhältnisse der Hämolysinproduktion bei Kaninchen nach intravenöser Einfuhr verschiedener Mengen von Hammelerythrocyten studiert, wobei die Angaben von Fr. Wolf im Wesen bestätigt werden konnten.

2) In gleicher Weise wurde auch die Kurve Agglutininproduktion unter gleichen Bedingungen (i. e. intravenöse Injektion, bei Kaninchen) untersucht, wobei auch hier verschiedene Mengen eines Colivaccins injiziert wurden.

3) In einer weiteren Versuchsreihe wurden Tiere mit beiden Antigenen gleichzeitig (Hammelerythrocyten + Colivaccin) vorbehandelt; es ergab sich hierbei, daß bei relativ kleinen und mittleren Antigenmengen die entstandenen Antikörper das Maximum der gesonderten Vorbehandlung erreichten bzw. um ein wenig übertrafen; bei den relativ hohen Antigendosen waren dagegen die Werte der kombinierten Vorbehandlung viel niedriger als bei den Tieren, welche nur mit dem einen Antigen vorbehandelt wurden.

4) Gerade mit Rücksicht auf dieses Verhalten der Antikörperkurve bei den größeren Dosen kann nur innerhalb gewisser, durch quantitative Verhältnisse bestimmten Grenzen von einer relativen Unabhängigkeit der Antikörperproduktion in bezug auf verschiedene Antigene gesprochen werden, obzwar die bei den kleinen und mittleren Antigenmengen erhaltenen Werte der beiden Antikörperkurven in bezug auf die Mengenverhältnisse eine gewisse Unabhängigkeit erkennen lassen. Ob dies sicher in der Beteiligung verschiedener Zellkomplexe ihre Ursache hat, kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht entschieden werden.

Nachdruck verboten.

[Aus der medizinischen Klinik der Universität Breslau (Direktor:
Geh. Rat Prof. Dr. Minkowski).]

Zur experimentellen Chemotherapie der Pneumokokken- infektion.

Von **F. Rosenthal** und **E. Stein**.

Mit 15 Figuren im Text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 28. Dezember 1913.)

Mit der Entdeckung der spezifischen Einwirkung des Aethylhydrocupreins auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion ist die Pneumokokkeninfektion Ausgangspunkt und Basis für eine erfolgreiche Chemotherapie bakterieller Infektionen geworden. Die in dieser Hinsicht grundlegenden Versuche von Morgenroth und Levy¹⁾ bedeuten insofern die Lösung eines Problems, als sie die ersten Experimente darstellen, in denen es gelungen ist, eine bereits fortgeschrittene Infektion mit virulenten Bakterien im chemotherapeutischen Experiment zu heilen.

Es liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit, den Entwicklungsgang der spezifischen Aethylhydrocupreinbehandlung im Tierexperiment zu skizzieren²⁾. Jedenfalls lassen die ausgezeichneten therapeutischen Resultate im Laboratoriumsversuch immer mehr die berechtigte Hoffnung entstehen, daß wir uns allmählich auch einer erfolgreichen chemotherapeutischen Behandlung der menschlichen Pneumokokkenerkrankungen nähern. Es sei in diesem Zusammenhange auf die Erfahrungen von Albert Fränkel³⁾, Vetlesen⁴⁾ und Lenné⁵⁾ hingewiesen, die unter dem Einfluß der Aethylhydrocupreinbehandlung häufig einen milderen und kürzeren Verlauf der Pneumonie beobachteten, und weiter auf einen kürzlich von Wolff und Lehmann⁶⁾ publizierten Fall von Pneumokokkenmeningitis, bei dem es durch intralumbale und intraventrikuläre

1) Morgenroth und Levy, Berl. klin. Wochenschr., 1911, No. 34 und 44.

2) Vgl. Rosenthal, Zeitschr. f. Chemotherapie, Bd. 1, p. 1149.

3) A. Fränkel, Berl. klin. Wochenschr., 1912, p. 664.

4) Vetlesen, Berl. klin. Wochenschr., 1913, No. 32.

5) Lenné, Berl. klin. Wochenschr., 1913, p. 1984.

6) Wolff und Lehmann, Deutsche med. Wochenschr., 1913, No. 51.

Einführung von Aethylhydrocuprein gelang, die Erkrankung zur Heilung zu bringen.

Sein besonderes Anwendungsgebiet scheint schon jetzt das Aethylhydrocuprein in der Ophthalmologie beim *Ulcus serpens* nach Untersuchungen von Schur und Goldschmidt¹⁾ zu finden, welche durch Einträufelung des Mittels in den Conjunctivalsack den Prozeß in ausgezeichneter Weise beeinflussen konnten²⁾.

Auf Grund neuerer Beobachtungen rückt nun neben das Aethylhydrocuprein in jüngster Zeit der Kampfer als chemotherapeutisches Mittel bei der experimentellen Pneumokokkeninfektion.

Die ersten Tierversuche über die Wirkung des Kampfers bei Pneumokokkeninfektion stammen von Welch und Rueck³⁾, welche auf Veranlassung von Seibert³⁾ den Einfluß des Kampfers auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion des Kaninchens untersuchten. Sie stellten eine spezifische Wirkung des Kampferöls auf die Pneumokokkeninfektion fest, indem bei der Mehrzahl der geimpften Kaninchen der Infektionsverlauf deutlich gehemmt erschien, und bei fast der Hälfte der Tiere sogar Dauerheilungen erzielt wurden. Das Resultat dieser Versuche ist um so bemerkenswerter, als es sich hierbei nicht um Ergebnisse der Prophylaxe, sondern um Erfolge des Heilversuches handelt. Obwohl diese Versuche kein einwandfreies Bild geben, da vielfach die Kampferbehandlung mit einer Salicylsäuretherapie kombiniert wurde, und ferner die Experimente unter Weglassung der unbedingt erforderlichen Infektionskontrollen angestellt wurden, so kann doch an der spezifischen chemotherapeutischen Wirkung des Kampfers auf Pneumokokken auf Grund neuerer Versuche von Boehncke⁴⁾, später Leo⁵⁾ kein Zweifel mehr sein.

Freilich haben diese Versuche nur eine Schutzwirkung des Kampfers erkennen lassen, während die Beobachtungen der amerikanischen Autoren über die eklatante Heilkraft des Kampfers nicht bestätigt werden konnten.

1) Schur und Goldschmidt, *Klin. Monatsbl. f. Augenheilkunde*, 1913, Oktober—November.

2) Das Aethylhydrocuprein wird jetzt von den Vereinigten Chininfabriken Zimmer & Co. unter dem Namen „Optochinum basicum“ für die Base und unter der Bezeichnung „Optochinum hydrochloricum“ für das Salz in den Handel gebracht.

3) Seibert, *Münch. med. Wochenschr.*, 1909, No. 36. — *Medical Record*, 1912, April 20.

4) Boehncke, *Berl. klin. Wochenschr.*, 1913, No. 18.

5) Leo, *Deutsche med. Wochenschr.*, 1913, No. 13. — *Münch. med. Wochenschr.*, 1913, No. 34, p. 2397.

Die günstigsten Erfolge mit der prophylaktischen Kampferbehandlung wurden im Mäuseexperiment erzielt.

Hier gelang es Boehncke¹⁾, bei Einhaltung eines zeitlichen Intervalls von ca. 4 Stunden zwischen Behandlung und Infektion ganze Versuchsreihen von Mäusen am Leben zu erhalten, und ebenso gibt Leo²⁾ summarisch an, daß es ihm gelungen sei, in mehreren Versuchsreihen von je „20–25 Mäusen durch wiederholte subkutane Injektion des gesättigten Kampferwassers die überwiegende Mehrzahl der Tiere am Leben zu erhalten, während die Kontrolltiere mit einer Ausnahme sämtlich eingingen“. Dagegen entbehrt die Empfehlung Boehnckes einer Kombinationstherapie von Kampferöl und Pneumokokkenserum der experimentellen Grundlage, da die bei kombinierter Behandlung im Tierexperiment erzielten Erfolge kaum die therapeutischen Resultate mit Kampfer, bzw. Serum allein übertreffen.

Alle bisherigen Versuche sind nur mit wenigen Pneumokokkenstämmen angestellt worden. Nachdem in diesen Experimenten die spezifische Wirkung des Kampfers auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion gesichert war, erschien es uns mit Rücksicht auf eine eventuelle Uebertragungsmöglichkeit der im chemotherapeutischen Experiment gewonnenen Ergebnisse auf die menschlichen Pneumokokkeninfektionen als ein dringendes Bedürfnis, zu untersuchen, ob die gleichen therapeutischen Effekte bei allen typischen Pneumokokkenstämmen zu erreichen sind. Beim Aethylhydrocuprein ist diese Frage durch Gutmann³⁾ in eingehenden Versuchen dahin beantwortet worden, daß alle bisher geprüften Pneumokokkenstämme sich gegenüber dem Aethylhydrocuprein gleich empfindlich erweisen.

Der Ausfall derartiger Versuche ist von vornherein keineswegs zu übersehen. Wenn wir von Erfahrungen auf anderen Gebieten der experimentellen Therapie auf die Verhältnisse bei der experimentellen Pneumokokkeninfektion schließen dürfen, so war mit Unterschieden in der Empfindlichkeit der Pneumokokken gegenüber dem Kampfer mit Wahrscheinlichkeit zu rechnen.

So wissen wir, daß z. B. bei Trypanosomen nicht unerhebliche individuelle Differenzen gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Agen-

1) l. c.

2) l. c.

3) Gutmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, Heft 6.

zien bestehen. So wurde der Mal de Caderas-Stamm des Ehrlichschen Laboratoriums von Trypanrot leicht beeinflußt, während der Mal de Caderas-Stamm von Uhlenhuth resistent gegen Trypanrot war. Weiter wird der von Morgenroth und Halberstädter¹⁾ benutzte, vom Hamburger Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten zur Verfügung gestellte Trypanosomenstamm durch Arsenverbindungen erheblich leichter beeinflußt, als der Ehrlichsche Stamm „Ferox“. Ferner berichten Mesnil und Brimont²⁾, daß ihr Dourinestamm sich gegen Brechweinstein weit empfindlicher erwies, als ihr Naganastamm, während Morgenroth und Rosenthal³⁾ in ihren chemotherapeutischen Studien über den Einfluß des Kaliumantimonyltartrats auf den Verlauf der experimentellen Trypanosomeninfektion die entgegengesetzte Beobachtung machten, indem ihr Naganastamm leichter durch Brechweinstein zu beeinflussen war als ihr Dourinestamm.

Mit dieser variierenden natürlichen Empfindlichkeit der Infektionserreger gegenüber chemotherapeutischen Mitteln erschöpfen sich jedoch keineswegs die im Versuch sich darbietenden experimentellen Möglichkeiten. Wir haben weiter damit zu rechnen, daß unter den Pneumokokkenstämmen auch natürlich feste Stämme vorkommen, welche sich von vornherein refraktär gegen das betreffende chemotherapeutische Agens verhalten, fernerhin, daß bei dem Ausfall der chemotherapeutischen Versuche Prozesse der Arzneifestigkeit erheblich interferieren können, je nachdem es Stämme gibt, die besonders leicht und schnell mit der Ausbildung einer Arzneifestigkeit reagieren und auf diese Weise sich der Einwirkung des chemotherapeutischen Mittels entziehen. Spielen diese Momente auch bei der Aethylhydrocupreinbehandlung der experimentellen Pneumokokkeninfektion nach den Erfahrungen Morgenroths und Kaufmanns⁴⁾ sowie Gutmanns⁵⁾ nur eine untergeordnete Rolle, so ist damit noch nicht der Schluß auf ein identisches Verhalten der Pneumokokken gegenüber dem Kampfer gerechtfertigt.

1) Morgenroth und Halberstädter, Archiv f. Schiffs- und Tropenhygiene, Bd. 15, 1911.

2) Mesnil und Brimont, Compt. rend. Soc. Biol., T. 64, 1908, p. 820 und Annales de l'Institut Pasteur, T. 22, 1908, p. 856.

3) Morgenroth und Rosenthal, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 68, 1911.

4) Morgenroth und Kaufmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, Heft 6.

5) Gutmann, l. c.

Unsere Versuche, festzustellen, ob unter einer Anzahl beliebig ausgewählter Pneumokokkenstämme sich solche befinden, die entweder von Anfang an gegen den Kampfer unempfindlich sind oder unter dessen Einwirkung mit einer rasch einsetzenden spezifischen Arzneifestigkeit reagieren, entsprechen damit einer wichtigen klinischen Forderung. Denn die Verwertbarkeit der im Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse bei der Therapie der menschlichen Pneumokokkeninfektionen hängt selbstverständlich vor allem davon ab, ob das Anwendungsgebiet des Kampfers sich auf eine große Zahl von Pneumokokkenstämmen verschiedener Herkunft erstreckt, oder ob er nur auf einige besonders empfindliche Stämme eingestellt ist. Je häufiger mit dem Vorkommen natürlich resistenter Stämme gegen den Kampfer zu rechnen ist, und je öfter das Phänomen der erworbenen spezifischen Arzneifestigkeit interferiert, um so mehr engt sich das Anwendungsgebiet des Kampfers als chemotherapeutisches Mittel der Pneumokokkeninfektion ein und desto geringer wird seine Bedeutung für die Therapie der menschlichen Pneumokokkeninfektionen.

Es standen uns 6 Pneumokokkenstämme zur Verfügung, die zum Teil von fibrinösen Pneumonien, teilweise von Pneumokokkenmeningitisfällen stammten. Einen Teil dieser Stämme verdanken wir der Liebenswürdigkeit der Herren Prof. Dr. Morgenroth, Prof. Dr. Boehncke und Dr. Oettinger. Alle Stämme waren typisch in bezug auf ihr Wachstum in Bouillon, auf Agar, Schottmüller-Agar, Morphologie, Kapselbildung und Verhalten gegen taurocholsaures Natron, das bekanntlich nach den Untersuchungen von Neufeld¹⁾, R. Levy²⁾, Wiens³⁾ u. a. typische Pneumokokken in kurzer Zeit aufzulösen vermag. Sämtliche Stämme zeigten auf Blutnährböden die charakteristischen feinen Kolonien mit der grünlichen Verfärbung des Nährbodens.

Um eine für die chemotherapeutischen Versuche genügende Virulenz der Pneumokokken zu erzielen, wurden die Stämme zunächst ohne Zwischenschaltung einer Kultur durch mehrere Mäusepassagen hindurch-

1) Neufeld, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 34, 1900.

2) Levy, Virchows Archiv, Bd. 187, 1907.

3) Wiens, Münch. med. Wochenschr., 1907, No. 32.

geschickt, indem vom Herzblute der an der Pneumokokkensepsis verendeten Maus auf eine neue Maus übertragen wurde. Bei mäßiger Virulenz wurden dann die Stämme nach dem Verfahren von Neufeld und Haendel¹⁾ fortgezüchtet. Es wurde aus dem Herzblut einer Maus auf 10-proz. Ascitesbouillon oder Kaninchenserumbouillon übergeimpft und nach 24-stündigem Wachstum eine Maus intraperitoneal mit der Bouillonkultur infiziert. Auf diese Weise konnten wir Pneumokokkenstämme von maximaler Virulenz gewinnen, die ihre Virulenz mit geringen Schwankungen auch durch die weiteren Passagen hindurch bewahrten. Um uns vor einem Verlust der Stämme zu schützen, wurden die pneumokokkenhaltigen Organe einer Maus nach Neufeld und Haendel²⁾ im Exsikkator aufbewahrt. Zwar leidet meist die Virulenz der in den getrockneten Organen eingeschlossenen Pneumokokken, doch ließ sie sich im Bedarfsfalle durch Einschaltung mehrerer Tierpassagen auf den alten Grad gewöhnlich in kurzer Zeit zurückbringen.

Wir geben nun im folgenden unsere Versuche wieder, und zwar in Form von Diagrammen, wie sie bereits seit längerer Zeit sich bei der Wiedergabe chemotherapeutischer Versuche als zweckmäßig erwiesen haben, und wie sie bereits von Morgenroth und Rosenthal³⁾, Morgenroth und Kaufmann⁴⁾, Gutmann⁴⁾ zur Darstellung ihrer Versuche verwendet worden sind. Die folgende Skala veranschaulicht kurz die Bedeutung der einzelnen Quadrate.

Die Diagramme stellen den Stand der Versuche an den einzelnen Tagen dar, wobei der Tag nach der Infektion als erster Versuchstag bezeichnet wird. Die Diagramme sind in den folgenden Versuchstabellen soweit fortgeführt, als sich noch für den Versuch belangreiche Veränderungen ergeben; Versuchstiere, welche in dem letzten Diagramm als lebend gekennzeichnet sind, bleiben auch noch bis zu zweiwöchentlicher Beobachtung und mehr gesund. Jedem Versuchstier entspricht ein Quadrat, das entsprechend der oben wiedergegebenen Skala ausgefüllt ist. Der Tod

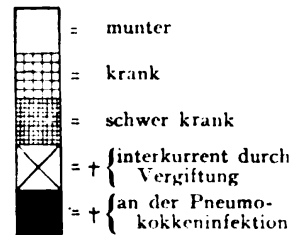


Fig. 1.

der Versuchstiere an der Pneumokokkensepsis wurde durch Untersuchung eines Ausstrichpräparates mit Kapselfärbung festgestellt. Beim Fehlen von kapseltragenden Pneumokokken im Ausstrich wurde zur Sicherstellung der Todesursache häufig noch eine ergänzende bakteriologische Untersuchung

- 1) Neufeld und Haendel, Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 15.
- 2) Neufeld und Haendel, l. c.
- 3) Morgenroth und Rosenthal, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 71, 1912.
- 4) l. c.

des Herzblutes hinzugefügt und beim Fehlen eines bakteriologischen Befundes der Tod als durch Vergiftung erfolgt angenommen. Die tot am Morgen aufgefundenen Tiere und die bis Nachmittag 4 Uhr gestorbenen wurden dem betreffenden Tage, die später gestorbenen dem nächsten Tage zugerechnet.

Was die Kampferbehandlung der Versuchsmäuse betrifft, so wurde der Kampfer in ölicher Lösung subkutan unter die Rückenhaut zugeführt. Für diese Art der Zufuhr waren die Erfahrungen bei der Therapie der experimentellen Pneumokokkeninfektion mit Aethylhydrocuprein maßgebend, das in ölicher Lösung eine weit gleichmäßigere, überlegene Wirkung gegenüber den in Wasser gelösten Aethylhydrocupreinsalzen entfaltete.

Bei der Bestimmung der Toxizität des Kampferöls konnten wir zunächst die Angaben Boehnckes durchaus bestätigen. Als Dosis tolerata ergab sich bei der Anwendung einer 10-proz. Kampferlösung 0,2—0,25 ccm, bei Anwendung einer 5-proz. Kampferöllösung 0,5 ccm pro 20 g Maus. Dabei erwiesen sich entsprechend den Angaben von Boehncke die Mäuse als recht verschieden empfindlich gegenüber dem Chemikale, was besonders bei kleineren Tieren unter 18 g sich häufig als störend bemerkbar machte. Hiernach war auch in den eigentlichen chemotherapeutischen Versuchen mit einem Ausfall von Tieren infolge von Kampfervergiftung zu rechnen. Den deutlichsten Ausschlag des chemotherapeutischen Effektes des Kampfers auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion sahen wir, ebenso wie Boehncke, im prophylaktischen Versuch bei Einhaltung eines zeitlichen Intervalls von 4 Stunden zwischen Kampferzufuhr und intraperitonealer Infektion. Die Infektionsdosis wurde in der Regel durch eine vorausgehende Virulenzprüfung festgestellt und diejenige Kulturmenge zur Infektion verwendet, welche im Virulenzversuch gerade noch sicher zu töten vermochte. Bei Verringerung des Intervalls zwischen Kampferzufuhr und Infektion auf 2 Stunden und weniger, sowie bei gleichzeitig stattfindender Behandlung und Infektion, sowie im Heilversuche vermißten wir selbst bei unseren gegen Kampfer empfindlichsten Stämmen einen deutlichen Einfluß auf den Ablauf der Pneumokokkeninfektion.

Wir gehen nun zur Schilderung unserer Versuche über.

I.

Der Stamm Boehncke zeigte am 27. IX. 1913 eine starke Virulenz, wie dies die folgende Tabelle kurz wiedergibt.

Virulenzprüfung 1. Stamm Boehncke.

27. IX. 1913.	0,5 ccm	1:100	† 1. Tag
	0,5 "	1:100	† 2. "
	0,5 "	1:1000	† 2. "
	0,5 "	1:1000	† 2. "
	0,5 "	1:10 000	† 2. "
	0,5 "	1:10 000	† 2. "

Als sicher tödliche Dosis erwies sich noch eine Verdünnung der Bouillonkultur 0,5 : 10 000. Der im Anschluß an diese Virulenzprüfung vorgenommene Versuch, bei dem die Versuchsmäuse mit 0,5 ccm : 10 000 intraperitoneal infiziert wurden, ist in dem folgenden Diagramm wiedergegeben.

Die Kontrolltiere, die in der zweiten Kolumne wiedergegeben sind, sind am 2. Tage der Infektion erlegen, während die mit Kampfer vorbehandelten Tiere mit einer Ausnahme die Infektion überleben und dauernd gesund bleiben. Nur eine Maus erkrankt trotz Kampferbehandlung an der Pneumokokkensepsis und geht etwa gleichzeitig mit den Kontrollen an der Infektion zugrunde. Daß wir es bei dieser Maus mit größter

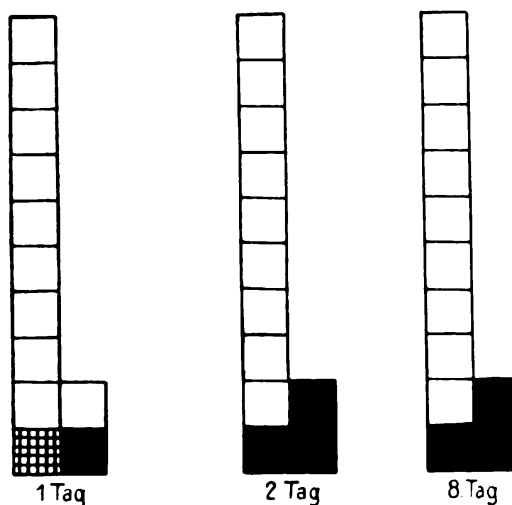


Fig. 2. St. 7—24. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden Nachimpfung mit 0,5 ccm 1:10 000 Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Boehncke.

Wahrscheinlichkeit mit interferierenden Phänomenen einer sich rasch entwickelnden spezifischen Kampferfestigkeit der Pneumokokken zu tun haben, wird noch in späteren Versuchen ausgeführt werden.

Auch bei fraktionierter Kampferbehandlung tritt die chemotherapeutische Wirkung des Kampfers auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion beim Stamm Boehncke in

eklatanter Weise zutage. Die Versuchsmäuse erhielten 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion 0,25 ccm einer 5-proz. Kampferlösung subkutan und nach Ablauf von 24 Stunden die gleiche Kampfermenge. Von den 6 im Versuch verwendeten Mäusen bleiben 5 dauernd am Leben, 1 Maus stirbt trotz Kampferbehandlung am 2. Versuchstage an Pneumokokken.

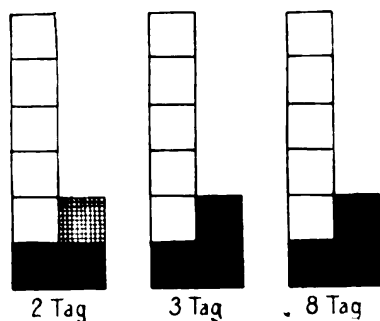


Fig. 3. St. 17—24. Prophylaktischer Versuch mit 0,25 ccm 5-proz. Kampferöls pro 20 g Maus, an 2 Tagen hintereinander subkutan injiziert. 4 Std. nach dem 1. Male intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1:10 000 einer Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Boehncke.

Eine am 5. X. 13 vorgenommene erneute Virulenzprüfung kennzeichnet, nachdem der Stamm Boehncke zahlreiche Mäusepassagen mit Einschaltung gleichvieler Kulturen durchgemacht hat, den Stamm als gleichmäßig virulent.

Virulenzprüfung 2. Stamm Boehncke.

5. X. 1913.	0,5 ccm	1:100	† 2. Tag
	0,5	„ 1:100	† 2. „
	0,5	„ 1:1000	† 2. „
	0,5	„ 1:10 000	† 2. „
	0,5	„ 1:10 000	† 2. „

Auch hier vermag noch eine Verdünnung der Bouillonkultur von 0,5:10 000 die Mäuse akut in 2 Tagen zu töten, wobei es, da weitere Verdünnungen nicht in Anwendung kamen, als fraglich erscheinen muß, ob hier schon die Grenze

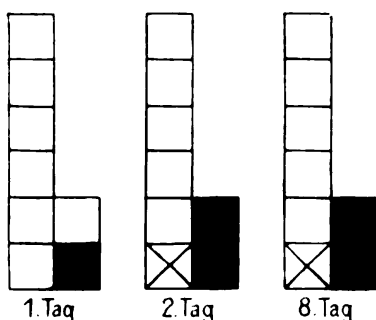


Fig. 4. St. 85—90, 93—94. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1:1000 einer Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Boehncke.

der Virulenz erreicht ist. Der in Fig. 4 wiedergegebene Versuch, welcher gleichzeitig mit der Virulenzprüfung 2 ausgeführt wurde, arbeitet somit mindestens mit dem 10fachen der töd-

lichen Dosis. Trotzdem ist der chemotherapeutische Erfolg der Kampferbehandlung ein außerordentlich günstiger, indem von sämtlichen 6 mit Kampfer behandelten Tieren keines der Infektion erliegt, sondern alle, mit Ausnahme einer Maus, die am 2. Versuchstage an Kampfervergiftung stirbt, dauernd gesund bleiben.

Aehnliche günstige Erfahrungen über den spezifischen Einfluß des Kampfers auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion machten wir bei einem Stamm R, welchen wir aus der Lumbalflüssigkeit eines an Pneumokokkenmeningitis erkrankten Individuums züchteten. Die Versuche mit diesem Stamm R sind in Fig. 5 und 6 wiedergegeben. Die Virulenz des Stammes war anfänglich gering und ungleichmäßig, wie dies die Virulenzprüfung 3 vom 20. VIII. 1913 zeigt.

Virulenzprüfung 3. Stamm R.

20. VIII. 1913.	0,5 ccm	1:10	† 1. Tag
	0,5 „	1:10	† 2. „
	0,5 „	1:100	† 2. „
	0,5 „	1:100	† 2. „
	0,5 „	1:1000	munter
	0,5 „	1:1000	†
	0,5 „	1:10 000	†
	0,5 „	1:10 000	munter

In dem in Fig. 5 wiedergegebenen Versuch vom 23. VIII. 1913 wurde die Kampferbehandlung wie bei Versuch Fig. 2 wieder derartig variiert, daß die Versuchstiere 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,25 ccm 1:100 der Kultur mit 0,25 ccm einer 5-proz. Kampferöllösung behandelt wurden, worauf ihnen nach Ablauf von 24 Stunden die gleiche Kampfermenge subkutan unter die Rückenhaut eingespritzt wurde¹⁾.

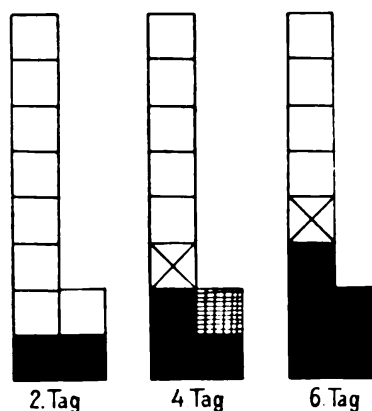


Fig. 5. C 295—304. 0,25 ccm 5-proz. Ol. camphoratum (synthetischer Kampfer) subkutan pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden 0,25 ccm 1:100 Stamm R intraperitoneal. Nach 24 Stunden nochmals 0,25 ccm 5-proz. Ol. camphoratum subkutan.

1) Dieser Versuch ist dadurch bemerkenswert, weil er zeigt, daß auch dem synthetischen Kampfer ein spezifischer Einfluß auf die Pneumokokkeninfektion im prophylaktischen Versuch zukommt.

Die Wirkung des Kampfers auf den Verlauf der Infektion ist unzweifelhaft vorhanden, wenn auch der chemotherapeutische Endeffekt sich nicht so günstig gestaltet wie in den vorangehenden Versuchen. Wir sehen nämlich, daß von 8 Tieren 3 an der Infektion zugrunde gehen, eine Maus der Vergiftung durch das Chemikale erliegt und bloß 4 Tiere dauernd am Leben bleiben. Ungleich bessere Resultate erzielten wir in dem folgenden Versuch Fig. 6 mit dem gleichen Stamme R, welcher am 1. IX. 1913 nach zahlreichen Mäusepassagen eine maximale Virulenz erreicht hat. Hier vermag noch eine Verdünnung der Bouillonkultur 0,5 ccm 1:100 000 die Mäuse akut in 2 Tagen zu töten.

Bei dem in Fig. 6 wiedergegebenen Versuche, der mit der Verdünnung 0,5 ccm 1:100 000 der Bouillonkultur des Stammes R ausgeführt wurde, zeigt der Stamm eine beträchtliche Empfindlichkeit gegen Kampfer.

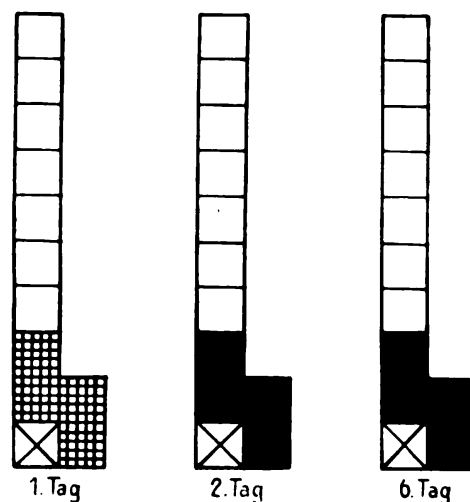


Fig. 6. C 351–362. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm einer 10-proz. Kampferlösung subkutan pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1:100 000 Stamm R intraperitoneal.

Von 10 Tieren bleiben unter der Einwirkung der Kampferbehandlung 7 Tiere dauernd gesund, während eine Maus am ersten Versuchstage bereits an Vergiftung zugrunde geht und zwei andere gleichzeitig mit den Infektionskontrollen der Pneumokokkensepsis erliegen (vgl. Fig. 6). —

In dem folgenden Diagramm 7 ist ein weiterer Versuch mit einem Pneumokokkenstamm Oettinger graphisch wiedergegeben, der sich gleichfalls als kampferempfindlich zeigte. Die Virulenz dieses Stammes wurde nicht näher bestimmt, doch dürfte mit der gewählten Infektionsdosis 0,5 ccm 1:10 000 die Virulenzgrenze mit Wahrscheinlichkeit annähernd erreicht sein, da die Infektion außerordentlich langsam verläuft und

erst am 8. Tage nach der Infektion die unbehandelten Kontrolltiere an der Pneumokokkensepsis zugrunde gehen. Das Resultat der prophylaktischen Kampferbehandlung ist in diesem Versuche ein recht gutes, indem von 10 infizierten und mit Kampfer vorbehandelten Tieren 8 dauernd am Leben bleiben, während 2 der Infektion erliegen. Dieser Versuch demonstriert gleichzeitig ferner an einer Serie von 6 Mäusen die chemotherapeutische Wirkung des Aethylhydrocupreins. Hier genügt

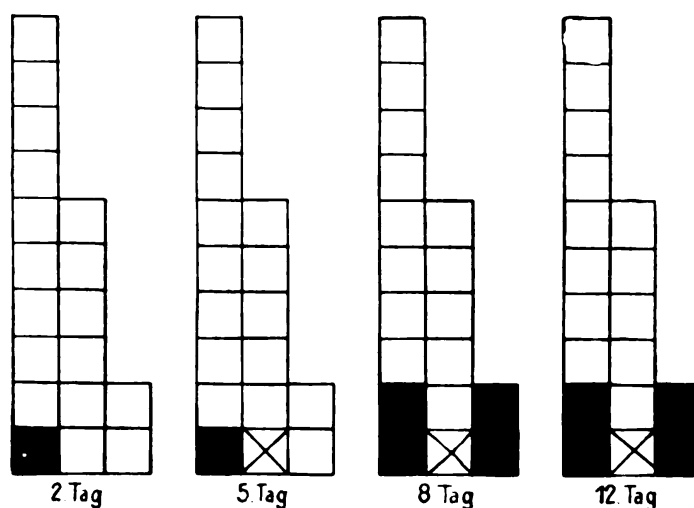


Fig. 7. St. 353—370.

1. Kolonne: Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:10 000 einer Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Oettinger.
2. Kolonne: Prophylaktischer Versuch mit 0,5 ccm 2-proz. Aethylhydrocupreins pro 20 g Maus gleichzeitig mit der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:10 000 einer Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Oettinger. Nach 24 Stunden 2. Infektion von 0,2 ccm 2-proz. Aethylhydrocuprein.

eine zweimalige Behandlung von 0,5 ccm einer 2-proz. Aethylhydrocupreinlösung in Oel, um 5 Tiere dauernd vor dem Ausbruch der Pneumokokkeninfektion zu schützen, während 1 Tier pneumokokkenfrei am 5. Versuchstage offenbar an Intoxikation durch das Chemikale zugrunde geht (vgl. 2. Kolonne der Fig. 7). Aehnliche günstige chemotherapeutische Resultate sind auch von Morgenroth und Kaufmann in ihren chemotherapeutischen Pneumokokkenversuchen mit Aethylhydrocuprein mitgeteilt worden.

II.

Wir haben in den vorangehenden Versuchen in Uebereinstimmung mit den Angaben von Boehncke sowie Leo gezeigt, daß dem Kampfer ein spezifisch-chemotherapeutischer Einfluß auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion zukommt, und daß bei geeigneter Vorbehandlung mit Kampfer es gelingt, den Ausbruch der experimentellen Pneumokokkeninfektion bei einem großen Prozentsatz von Mäusen zu verhüten. Diese Kampferempfindlichkeit der Pneumokokken stellt jedoch, wie sich aus unseren weiteren Versuchen ergibt, nicht eine konstante, charakteristische Eigenschaft der Art dar. So verfügen wir, wie an den folgenden Diagrammen gezeigt wird, über Pneumokokkenstämme, welche sich von vornherein gegen Kampfer refraktär verhalten, und bei denen die prophylaktische Kampferbehandlung ohne jeden bzw. ohne wesentlichen Einfluß auf den Verlauf der Infektion bleibt. Wir führen im folgenden ein solches Beispiel eines spontan kampferfesten Pneumokokkenstammes an. Es handelt sich in diesem Versuche um einen Stamm Hyg, der aus dem Lumbalpunktat einer Pneumokokkenmeningitis gezüchtet war und nach zahlreichen Mäusepassagen eine starke Virulenz für Mäuse erwarb, so daß noch eine Verdünnung einer 24-stündigen Bouillonkultur 0,5 ccm 1:10 000 die Mäuse innerhalb von 2 Tagen tötete.

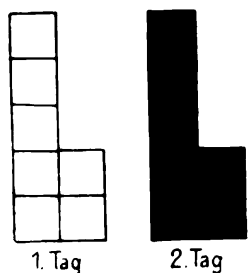
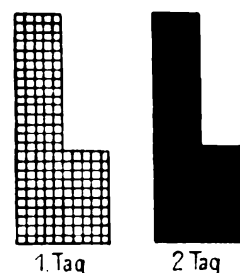


Fig. 8. C 266—270, 276—277. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöl pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1:10 000 Bouillonkultur von Stamm Hyg.

In diesem Versuche 8 sterben trotz prophylaktischer Kampferbehandlung sämtliche Mäuse gleichzeitig mit den Infektionskontrollen an Pneumokokkensepsis, und das gleiche Resultat wiederholt sich in dem folgenden Versuch 9, der mit dem gleichen Stamm nach mehreren Passagen von neuem angesetzt wurde.

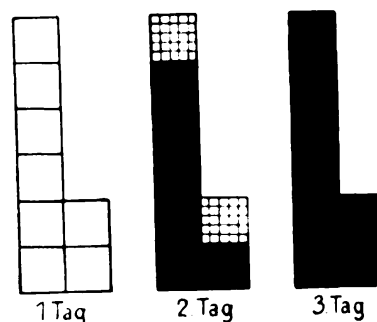
Auch hier erweist sich die Kampferbehandlung als völlig wirkungslos, indem die Infektion ungehemmt wie bei den unbehandelten Kontrollen verläuft.

Fig. 9. C 290—296. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöl pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1 : 10000 Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Hyg.



Neben solchen spontan kampferfesten Stämmen, für die als Beispiel der in den Versuchen 8 und 9 benutzte Pneumokokkenstamm Hyg dienen mag, gibt es nach unseren Erfahrungen auch Pneumokokkenstämme, welche gegenüber dem Kampfer eine schwankende Empfindlichkeit zeigen. Diese variierende Empfindlichkeit gegen Kampfer tritt darin zutage, daß in der einen Passage sich der betreffende Stamm als völlig fest gegenüber dem Kampfer erweist, indem sämtliche Mäuse trotz der Kampfertherapie an der Pneumokokkensepsis zugrunde gehen, während in späteren Passagen doch bei einzelnen Versuchstieren eine deutliche therapeutische Wirkung des Kampfers zu konstatieren ist. Wir schildern ein derartiges Verhalten von Pneumokokkenstämmen im folgenden an den Diagrammen 10—14, bei welchen ein uns von Herrn Prof. Morgenroth freundlichst zur Verfügung gestellter Stamm „Medizinische Klinik“ und ein Stamm Ia benutzt wurde, der in der Mehrzahl der chemotherapeutischen Pneumokokkenversuche Morgenroths und seiner Schüler zur Infektion verwendet worden ist. Aus Versuch 10 geht zunächst hervor, daß der Stamm Morgenroth Ia sich ähnlich wie der im vorangehenden geschilderte Stamm Hyg als spontan kampferfest erweist.

Fig. 10. St. 43—50. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöl pro 20 g Maus. Nach 4 Std. intraperitoneale Infektion mit Bouillonkultur-Verdünnung 0,5 ccm 1 : 10000 Stamm Morgenroth Ia.



Wir sehen nämlich, daß von den 6 Versuchsmäusen, die mit Kampfer 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:10000 gespritzt wurden, 5 Tiere gleichzeitig mit der einen Infektionskontrollmaus am 2. Tage der Infektion erliegen, während die einzige von den behandelten Tieren überlebende Maus ebenso wie die noch lebende Kontrollmaus deutliche Krankheitserscheinungen zeigt. Auch diese Maus geht ungefähr gleichzeitig wie das Infektionskontrolltier am 3. Versuchstage zugrunde, so daß man nach diesem Ergebnis von einem völligen Versagen der Kampfertherapie bei dieser Pneumokokkeninfektion sprechen darf.

Daß dieser anscheinend kampferfeste Pneumokokkenstamm jedoch gegen Kampfer nicht ganz unempfindlich ist, geht aus dem folgenden Versuch 11 hervor, in welchem eine spätere Passage des gleichen Stammes zur Infektion benutzt wurde.

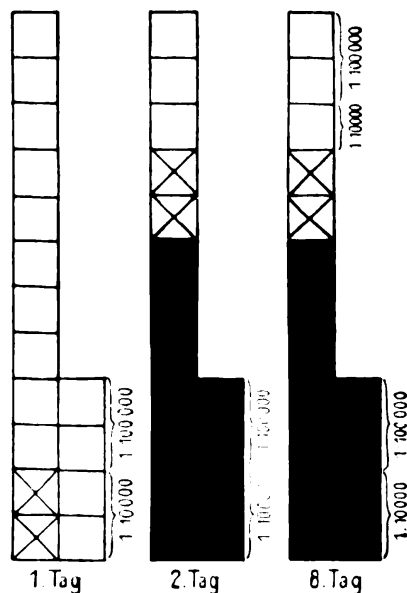


Fig. 11. St. 51–56, 63–68, 75–78. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1:10000, bzw. 0,5 ccm 1:100000 Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Morgenroth Ia.

Durch die fortgesetzten Passagen ist der Stamm Morgenroth Ia virulenter geworden, was daraus hervorgeht, daß die in diesem Versuche mit 0,5 ccm 1:100000 infizierten Kontrollen am 2. Versuchstage der Infektion erliegen. Wir sehen nun in diesem Versuche, daß von 12 mit Kampfer behandelten Tieren 2 bereits der Kampfervergiftung am 1. Tage erliegen, und daß von den übrigen 10 Kampfertieren 7 gleichzeitig mit den Kontrollmäusen an der Infektion zugrunde gehen. Jedoch

überstehen 3 Tiere, dank der Kampferbehandlung, die Infektion und bleiben dauernd gesund.

Es zeigt somit dieser Stamm, wie ein Vergleich der Versuche 10 und 11 lehrt, eine schwankende Empfindlichkeit gegen Kampfer. Und zwar sehen wir in der einen Passage (Fig. 10) eine ausgesprochene Kampferfestigkeit des Stammes, während wenige Passagen später dieser Stamm sich, wenn auch in einem geringen Prozentsatz, doch deutlich kampferempfindlich erweist (Fig. 11). Wie schwankend das Verhalten dieses Stammes gegen Kampfer ist, und wie schwer diese biologischen Phänomene im Experiment zubeheerrschen sind, ergibt sich weiter daraus, daß der gleiche Stamm in einer späteren Passage sich wiederum als völlig kampferfest erweist.

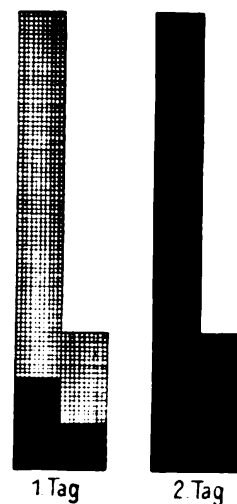


Fig. 12. St. 130—142. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus. Nach 4 Stunden intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm 1:10 000 Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm Morgenroth Ia.

So zeigt Versuch 12, daß sämtliche Versuchstiere trotz Kampferbehandlung gleichzeitig mit den Infektionskontrollen an der Pneumokokkeninfektion sterben.

Genau die gleichen Verhältnisse treffen wir bei dem in den folgenden Diagrammen 13 und 14 beschriebenen Pneumokokkenstamm „Medizinische Klinik“ an. Wie zunächst die Fig. 13 (p. 588) zeigt, wurden 8 Tiere der prophylaktischen Kampferbehandlung mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g unterworfen. Sämtliche dieser Tiere erliegen trotz der Behandlung mit Kampfer der Infektion, nur eine Maus stirbt an Kampfervergiftung, da sich bei ihr weder im Blutausschlag, noch kulturell Pneumokokken nachweisen ließen. Obwohl von den im Versuch verwendeten 3 Kontrolltieren eine Maus am Leben bleibt, demonstriert dieser Versuch doch ohne weiteres die Kampferfestigkeit dieses Stammes, da von 8 Tieren 7 an Pneumokokkensepsis zugrunde gehen, eine Maus der Vergiftung erliegt.

Erweist sich somit in diesem Versuch 13 der Pneumokokkenstamm „Medizinische Klinik“ als absolut kampferfest, so zeigt doch der folgende Versuch 14 eine geringe Beeinflußbarkeit des Stammes (Fig. 14). Während nämlich von 10 mit Kampfer vorbehandelten Mäusen 9 an Pneumokokken zugrunde gehen, übersteht eine von den behandelten Mäusen die Infektion und bleibt dauernd am Leben. Daß es sich bei diesem Tiere nicht etwa um ein spontanes Ueberstehen der

Fig. 13.

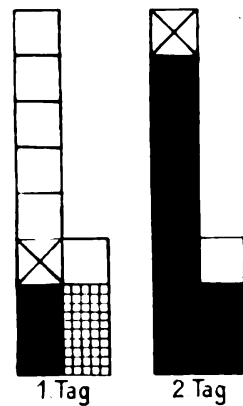


Fig. 14.

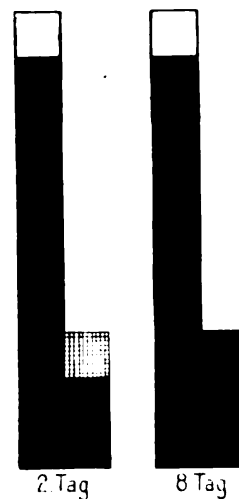


Fig. 13. St. 409—418, 427. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:100 000 Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm „Medizinische Klinik“.

Fig. 14. St. 428—440. Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:100 000 Bouillonkultur von Pneumokokkenstamm „Medizinische Klinik“. Nach 24 Stunden nochmalige subkutane Injektion von 0,1 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus.

Infektion handelt, wie man es ja häufig bei Stämmen mit schwankender Virulenz beobachten kann, sondern um einen Erfolg der Therapie, geht mit Wahrscheinlichkeit aus dem Verhalten der 3 Infektionskontrolltiere hervor, die sämtlich der Infektion erliegen.

Diese variierende Empfindlichkeit der Pneumokokkenstämme Morgenroth Ia und „Medizinische Klinik“ gegen Kampfer steht nicht ohne analoge Beispiele auf anderen Ge-

bieten der experimentellen Chemotherapie da. Morgenroth und Rosenthal¹⁾ haben in ihren experimentellen Trypanosomenstudien chininfeste Trypanosomenstämme beschrieben, deren erworbene Festigkeit gegenüber Verbindungen der Hydrocupreinreihe ähnlichen Schwankungen unterlag. Wir bezeichnen solche Pneumokokkenstämme, deren Kampferfestigkeit sich nicht durchweg in den Passagen vererbt, entsprechend unseren gegen Chininderivate halbfesten Trypanosomenstämmen als „halbfeste“ Pneumokokkenstämme.

III.

An diese Versuche, die uns die Existenz von kampferempfindlichen, kampferhalbfesten und kampferfesten Pneumokokkenstämmen gelehrt haben, knüpften wir nun im weiteren die Frage an, inwieweit unsere kampferempfindlichen Stämme durch den Kampfer im Sinne einer Festigung beeinflußt werden können. Die Frage der erworbenen Arzneifestigkeit der Pneumokokken gegen Kampfer ist von prinzipieller Wichtigkeit, weil die Phänomene der erworbenen Arzneifestigkeit geeignet sind, ein Schlaglicht auf die Genese der spontanen Kampferhalbfestigkeit und Kampferfestigkeit der Pneumokokken zu werfen. Nehmen wir nämlich an, daß die Pneumokokken unter dem Einfluß einer von rein chemotherapeutischen Gesichtspunkten aus unzweckmäßigen Kampferbehandlung rasch kampferfest werden, so ist durchaus die Möglichkeit gegeben, daß die in unseren Versuchen beobachteten Festigkeitsphänomene ursprünglich nicht auf eine spontane, sondern auf eine erworbene Arzneifestigkeit zurückgehen, indem die Pneumokokken erst im Menschen bei Anwendung des Kampfers, z. B. als Herzstimulans bei der Pneumonie, kampferfest werden. Daß mit derartigen rasch einsetzenden Festigungen der Pneumokokken gegen Kampfer zu rechnen ist, haben wir

1) l. c.

bereits bei unseren Versuchen mit kampferempfindlichen Pneumokokkenstämmen betont, indem wir darauf hingewiesen haben, daß das gelegentliche Versagen der chemotherapeutischen Wirkung des Kampfers bei unseren kampferempfindlichen Stämmen möglicherweise auf eine rasch einsetzende Arzneifestigkeit gegen Kampfer zu beziehen ist.

Wir können im folgenden für diese rasch einsetzende Kampferfestigkeit auch den experimentellen Beweis erbringen, da es uns gelungen ist, den kampferempfindlichen Stamm Boehncke durch eine absichtlich unzweckmäßige Behandlung der infizierten Tiere mit Kampfer bereits in drei Passagen absolut kampferfest zu machen.

- St. 166 a. 0,5 ccm 10-proz. Kampferöl subkutan.
Nach 2 Stunden 0,5 ccm unverdünnte Pneumokokkenbouillonkultur Boehncke intraperitoneal.
Am nächsten Tage sehr krank. Im Blutausschlag kapseltragende Diplokokken.
Nochmals 0,5 ccm 10-proz. Kampferöl subkutan.
Nach 2 Stunden †. Ueberimpft auf:
- St. 166 b. 0,5 ccm 10-proz. Kampferöl subkutan.
Gleichzeitig intraperitoneal reichlich Herzblut von Maus St. 166 a.
Am nächsten Tage schwer krank.
Nochmals 0,5 ccm 10-proz. Kampferöl subkutan.
Nach 1 Stunde †. Im Herzblut reichlich kapseltragende grampositive Diplokokken. Ueberimpft auf:
- St. 166 c. 0,5 ccm 10-proz. Kampferöl subkutan.
Nach 4 Stunden intraperitoneal reichlich Herzblut von Maus St. 166 b.
Am nächsten Tage sterbend.
Nochmals 0,5 ccm 10-proz. Kampferöl subkutan.
Nach 1 $\frac{1}{2}$ Stunden †.
Herzblut auf Kaninchenserumbouillon verimpft.

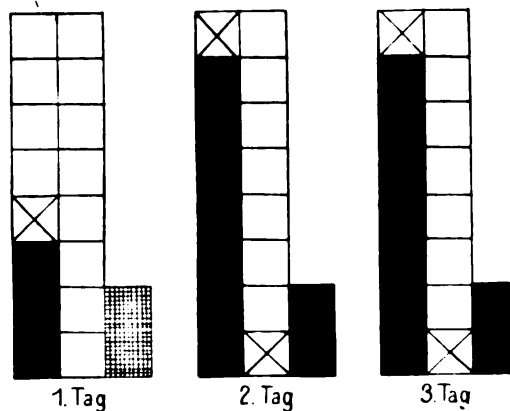
Wir gingen in diesen Versuchen, wie aus dem Protokoll ersichtlich ist, derartig vor, daß wir unsere Versuchstiere nach intensiver Kampferzufuhr intraperitoneal stark infizierten, jedoch das bewährte Intervall von 4 Stunden zwischen Kampferzufuhr und Infektion nicht einhielten. Wir erreichten bei dieser Versuchsanordnung stets ein ungehemmtes Fortschreiten der Infektion, und behandelten, sobald im Blut-

ausstrich die ersten Pneumokokken nachweisbar wurden, die Mäuse nochmals, und zwar mit mehrfach tödlichen Kampferdosen. Sobald die Maus gestorben war, wurde ihr steril entnommenes Herz in physiologischer Kochsalzlösung verrieben und die gewonnene Emulsion einer frischen Maus intraperitoneal injiziert, die in ähnlicher Weise wie die vorangehende Maus St. 166a mit Kampfer behandelt wurde. Diese fehlerhafte Kampferbehandlung wurde nochmals in einer dritten Mauspassage St. 166c wiederholt und dann der chemotherapeutische Versuch mit einer Bouillonkultur dieses Stammes mit dem üblichen Intervall von 4 Stunden zwischen Kampferbehandlung und intraperitonealer Infektion ausgeführt.

Fig. 15. St. 297—314.

1. Kolumne: Prophylaktischer Versuch mit 0,2 ccm 10-proz. Kampferöls pro 20 g Maus 4 Stunden vor der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:1 000 000 Bouillonkultur von dem kampferfesten Pneumokokkenstamm Boehncke.

2. Kolumne: Prophylaktischer Versuch mit 0,4 ccm 2-proz. Aethylhydrocupr.-Lösung pro 20 g Maus gleichzeitig mit der intraperitonealen Infektion mit 0,5 ccm 1:1 000 000 Bouillonkultur des kampferfesten Pneumokokkenstammes Boehncke. An den 3 folgenden Tagen subkutane Injektion von 0,3 ccm 2-proz. Aethylhydrocupreins pro 20 g Maus.



Der Ausfall des Versuches 15 zeigt, daß unter dem Einfluß der Kampferbehandlung der ursprünglich kampferempfindliche Stamm Boehncke im Verlaufe von 3 Passagen kampferfest geworden ist. Der Versuch 15 wurde mit einer Bouillonverdünnung 0,5 ccm 1:1 000 000 ausgeführt, da im Verlaufe der Passagen der Pneumokokkenstamm Boehncke eine maximale Virulenz erlangt hatte, so daß noch Verdünnungen von 1:10 000 000 die Versuchstiere akut in 3 Tagen töteten. Trotz der Anwendung dieser beträchtlichen Kulturverdünnungen gehen sämtliche Mäuse, soweit sie die Kampfervergiftung überstehen,

an der Pneumokokkensepsis zugrunde, eine Maus von den 8 im Versuch verwendeten Tieren stirbt an den Folgen der Kampfervergiftung.

Diese unter dem Einfluß des Kampfers rasch ausgelöste Festigkeit der Pneumokokken steht mit Beobachtungen Morgenroths und Kaufmanns¹⁾ über die Arzneifestigkeit der Pneumokokken gegen Aethylhydrocuprein im Einklang. In ihren Versuchen waren bis zum Eintritt der Festigkeit gegen Aethylhydrocuprein nicht mehr als 8 Tage mit 3 bis 4 Passagen durch Mäuse erforderlich. Dabei ergab sich die wichtige Tatsache, daß die einmalige Passage durch eine sehr energisch behandelte Maus nicht imstande ist, einen Pneumokokkenstamm gegen Aethylhydrocuprein zu festigen.

Aehnliche Beobachtungen über die schnelle Festigung von Bakterien gegen Chemikalien sind von Marks²⁾ (Paratyphus, arsenige Säure), von Shiga³⁾ (Choleravibrionen, Farbstoffe) und Seiffert⁴⁾ (Bacterium coli, Malachitgrün) gemacht worden. Allerdings beziehen sich diese Untersuchungen mangels einer Chemotherapie bakterieller Infektionen auf die „Gewöhnung“ von Bakterien außerhalb des Organismus im Kulturglas.

Auf dem Gebiet der Chemotherapie der Trypanosomeninfektion liegen eine Reihe ähnlicher Beobachtungen über schnelle Festigung gegen chemotherapeutische Agenzien vor, auf die in diesem Zusammenhange kurz hingewiesen sei. Auf dieses Phänomen ist zuerst von Morgenroth und Rosenthal⁵⁾ aufmerksam gemacht worden, welche in ihrer Arbeit über den Einfluß des Kaliumantimonyltartrats zeigen konnten, daß bereits nach einmaliger Behandlung der Trypanosomen mit Brechweinstein ein, wenn auch geringer und vorübergehender, so doch deutlicher Festigkeitsgrad erzielt werden kann. Weiter haben Ehrlich und Gonder⁶⁾

1) Morgenroth und Kaufmann, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, Heft 6.

2) Marks, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 6, 1910, p. 213.

3) Shiga, ibidem, Bd. 18, 1913.

4) Seiffert, Deutsche med. Wochenschr., Bd. 6, 1911, No. 23.

5) Morgenroth und Rosenthal, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 68, 1911.

6) Ehrlich und Gonder, Chemotherapie, in Kolle-Wassermann, 1913. — Ehrlichs Vortrag Dresden 1911: Zeitschr. f. Chemotherapie, Bd. 1, 1912.

gezeigt, daß es mit Derivaten der Phenylarsinsäure gelingt, schon nach einmaliger Behandlung eine sehr hohe Festigkeit gegen andere Arsenikalien herbeizuführen, z. B. mit einem Kondensationsprodukt aus p-Oxymetaamidophenylarsenoxyd + Resorecylaldehyd. Eine Dosis von 0,01 g Arsacetin, die den Ausgangsstamm vollkommen abzutöten vermag, ist nach einmaliger Anwendung des genannten Produktes ohne Einfluß auf die behandelten Trypanosomen. Das Gleiche gelang Kudicke¹⁾ durch Vorbehandlung der Trypanosomen mit Acridin. Aehnliche schnelle Festigungen sind auch von Morgenroth und Rosenthal²⁾ bei den Chinaalkaloiden beobachtet worden.

Es schien uns angesichts dieser erworbenen Festigkeit des ursprünglich kampferempfindlichen Stammes Boehncke von Interesse, zu prüfen, ob der Eintritt der Kampferfestigkeit auch von Einfluß auf das Verhalten der Pneumokokken gegen Aethylhydrocuprein sei. Aus diesem Grunde wurde gleichzeitig mit den Kampfertieren eine weitere Serie von 8 intraperitoneal in gleicher Weise infizierten Mäusen der Behandlung mit Aethylhydrocuprein ausgesetzt. Diese Versuche sind in der 2. Kolumne des Diagramms 15 wiedergegeben. Wir sehen, daß 7 Mäuse die Pneumokokkeninfektion definitiv überstehen, während eine Maus an Vergiftung durch das Chemikale stirbt (p. 591).

Es beweist somit der Ausfall dieses Versuches, daß es sich bei der Kampferfestigkeit der Pneumokokken um eine spezifische Festigkeit der Pneumokokken handelt und daß selbst bei kampferfesten Pneumokokkenstämmen das Aethylhydrocuprein seine chemotherapeutische Wirkung in gleicher Weise wie bei Normalstämmen entfaltet.

Mit diesem Ergebnis steht es auch im Einklange, daß auch unsere spontan kampferfesten Pneumokokkenstämme sich als voll empfindlich gegen Aethylhydrocuprein erwiesen. Rechnen wir die Ergebnisse von Morgenroth und Levy¹⁾, Morgenroth

1) Kudicke, Centralbl. f. Bakt., Bd. 61, 1912.

2) Morgenroth und Rosenthal, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 71, 1912.

3) l. c.

und Kaufmann¹⁾, Gutmann²⁾, Neufeld und Engwer³⁾, Boehncke⁴⁾, die insgesamt bei 15 typischen Pneumokokkenstämmen die überragende chemotherapeutische Wirkung des Aethylhydrocupreins demonstrieren konnten, mit unseren Resultaten zusammen, so ist bisher in der Literatur die spezifische Wirkung des Aethylhydrocupreins an ca. 21 verschiedenen Pneumokokkenstämmen nachgewiesen worden, wozu sich noch nach den Untersuchungen R. Levys⁵⁾ ein Stamm von Streptococcus mucosus gesellt, den man wohl mit Recht jetzt als eine Variation des Pneumococcus lanceolatus auffassen darf. Sehr wichtig ist ferner, daß auch die veröffentlichten Fälle über Ulcus serpens dafür sprechen, daß alle Pneumokokken von dem Aethylhydrocuprein beeinflusst werden. Goldschmidt berichtet über 30 Fälle und Schur über 14 Fälle, die sich alle gleichartig verhalten.

Demgegenüber hat die Kampfertherapie in unseren Versuchen bei 3 von 6 typischen Pneumokokkenstämmen vollkommen oder fast vollkommen versagt⁷⁾.

Wir haben weiter das Verhalten unseres kampferfesten Pneumokokkenstammes Boehncke gegen Kampfer auch bei unmittelbarer Einwirkung in vitro geprüft, worüber die folgenden Reagenzglasversuche Tabelle 16 und 17 Aufschluß geben.

Dem Nachweis grober Differenzen zwischen der Kampferempfindlichkeit unseres kampferfesten und normalen Pneumokokkenstammes Boehncke stand von vornherein der Umstand entgegen, daß bei der Toxizität der im chemotherapeutischen

1) l. c.

2) l. c.

3) Neufeld und Engwer, Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 50; Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 73, 1912.

4) Boehncke, Münch. med. Wochenschr., 1913, No. 8.

5) Levy, Berl. klin. Wochenschr., 1912, No. 53.

6) Es ist allerdings mit der Möglichkeit zu rechnen, daß bei ausgedehnterer Anwendung des Aethylhydrocupreins bei menschlichen Pneumokokkeninfektionen man auch äthylhydrocupreinfesten Pneumokokkenstämmen häufiger begegnen dürfte.

Versuch verwendeten Kampferdosis einer Steigerung der Festigkeit von Anfang an enge Grenzen gesteckt sind, und der Festigkeitsgrad unseres Stammes sich somit nur mäßig von den Normalwerten der Empfindlichkeit des unbehandelten Stammes Boehncke entfernen konnte. Daß innerhalb dieser Grenzen sich jedoch auch in vitro deutliche Unterschiede zwischen den Individuen des normalen und kampferfesten Pneumokokkenstammes feststellen lassen, zeigen die folgenden Experimente, zu deren Technik wir folgendes bemerken möchten:

Der Reagenzglasversuch wurde mit einer alkoholischen (38 Proz. Alkohol) 10-proz. Kampferlösung angestellt. Die Verdünnungen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, wobei der Kampfer in feiner Emulsion ausflockte. Je 0,5 ccm dieser Aufschwemmungen wurden alsdann mit 0,5 ccm einer 24-stündigen Bouillonkultur 20 Minuten lang unter häufigem Schütteln digeriert. Die Kampfermengen sind in den Tabellen wiedergegeben. Nach 20 Minuten wurde jedem Röhrchen 9 ccm Bouillon zugesetzt, woraus eine Verdünnung der Bouillonkultur 1:10 resultierte, und hierauf 0,5 ccm den in den Tabellen aufgeführten Mäusen intraperitoneal injiziert.

Tabelle 16. Normalstamm Boehncke.

Maus No.	Pneumokokkenbouillonkultur	Kampfergehalt	Dauer der Einwirkung	Tod nach Tagen	Bemerkungen
St. 194	0,5 ccm	} 5 Proz.	20 Min.	{ —	Nach 10 Tagen noch pneumokokkenfrei desgl. "
St. 195	0,5 "				
St. 196	0,5 "	} 2,5 "	20 "	{ —	
St. 197	0,5 "				
St. 198	0,5 "	} 1,25 "	20 "	{ 1	
St. 199	0,5 "				
St. 200	0,5 "	} 0,63 "	20 "	{ 1	
St. 201	0,5 "				
St. 202	0,5 "	} 0,32 "	20 "	{ 1	
St. 203	0,5 "				
St. 204	0,5 "	} 0,16 "	20 "	{ 1	
St. 205	0,5 "				
St. 206	0,5 "	} 0,08 "	20 "	{ 1	
St. 207	0,5 "				
St. 208	0,5 "	—	—	1	
St. 209	0,5 "	—	—	1	

Nach 20 Minuten zu jedem Röhrchen 9 ccm Bouillon. Hiervon jeder Maus 0,5 ccm intraperitoneal.

Tabelle 17. Kampferfester Stamm Boehncke.

Maus No.	Pneumokokkenbouillonkultur	Kampfergehalt	Dauer der Einwirkung	Tod nach Tagen	Bemerkungen
St. 210	0,5 ccm	} 5 Proz.	20 Min.	{ --	nach 10 Tagen noch pneumokokkenfrei
St. 211	0,5 "				
St. 212	0,5 "	} 2,5 "	20 "	{ 3	
St. 213	0,5 "				
St. 214	0,5 "	} 1,25 "	20 "	{ 2	
St. 215	0,5 "				
St. 216	0,5 "	} 0,63 "	20 "	{ 2	
St. 217	0,5 "				
St. 218	0,5 "	} 0,32 "	20 "	{ 1	
St. 219	0,5 "				
St. 220	0,5 "	} 0,16 "	20 "	{ 1	
St. 221	0,5 "				
St. 222	0,5 "	} 0,08 "	20 "	{ 1	
St. 223	0,5 "				
St. 224	0,5 "	—		{ 1	
St. 225	0,5 "	—		{ 1	

Nach 20 Minuten zu jedem Röhrchen 9 ccm Bouillon. Hiervon jeder Maus 0,5 ccm intraperitoneal.

Das Ergebnis dieser Reagenzglasversuche ist folgendes: Wir sehen, daß durch eine 5-proz. Kampferaufschwemmung sowohl die Pneumokokken des Normalstammes wie die des kampferfesten Stammes innerhalb 20 Minuten abgetötet werden, so daß die betreffenden Tiere St. 194, 195 und St. 210—211 noch nach 10 Tagen am Leben bleiben. Dagegen ergeben sich bei einem Kampfergehalt von 2,5 Proz. deutliche Differenzen zwischen dem festen und Normalstamm: Während die intraperitoneale Infektion mit 0,5 ccm der 2,5-proz. Kampferpneumokokkenmischung des kampferfesten Stammes unter mäßiger Verzögerung gegenüber den Kontrolltieren bei St. 212 und 213 den Tod der Tiere an der Pneumokokkensepsis beim kampferfesten Stamm Boehncke herbeiführt (Tabelle 17), erweisen sich die Pneumokokken der gleichen Mischung beim Normalstamm, wie dies bei den Mäusen St. 196 und 197 in Tabelle 16 ersichtlich ist, als infektiös, so daß die Mäuse dauernd am Leben bleiben.

Es erweist sich somit der kampferfeste Stamm Boehncke auch in vitro in den durch die Ver-

suchsbedingungen gegebenen Grenzen als fest gegen Kampfer.

Zusammenfassung.

1) Die im vorangehenden geschilderten Versuche beschäftigen sich mit der chemotherapeutischen Wirkung des Kampfers auf die experimentelle Pneumokokkeninfektion. Sie zeigen, daß die Kampferempfindlichkeit der Pneumokokken keine konstante Eigenschaft der Gruppe darstellt. Je nach dem Verhalten der Pneumokokken gegenüber dem Kampfer im Tierkörper kann man kampferempfindliche, kampferhalfeste und kampferfeste Pneumokokkenstämme unterscheiden.

2) Die Kampferhalfestigkeit der Pneumokokken ist dadurch charakterisiert, daß das Verhalten der Pneumokokken in den Passagen gegenüber dem Kampfer ein schwankendes ist. Der gleiche Stamm erweist sich in der einen Passage gegen Kampfer völlig refraktär, während er in anderen Passagen doch bei einzelnen Mäusen unter der Kampferbehandlung abgetötet wird.

3) Neben den spontan kampferfesten Stämmen wird auch im vorangehenden die erworbene Arzneifestigkeit eines ursprünglich kampferempfindlichen Stammes demonstriert. Diese Kampferfestigkeit kann rasch ausgelöst werden und läßt sich dann nicht nur im Tierkörper, sondern auch im Reagenzglasversuch demonstrieren.

4) Die rasch einsetzende Kampferfestigkeit ursprünglich empfindlicher Pneumokokkenstämme legt die Vorstellung nahe, daß die im Tierexperiment beobachtete sogenannte spontane Arzneifestigkeit mancher Pneumokokkenstämme möglicherweise eine erworbene Arzneifestigkeit darstellt, indem die Pneumokokken im Menschen selbst unter dem Einfluß der aus irgendwelchen therapeutischen Erwägungen stattfindenden Kampferbehandlung kampferfest werden.

5) Im Gegensatz zum Kampfer entfaltet das Aethylhydrocuprein bei allen Pneumokokkenstämmen seine bewährte chemotherapeutische Wirkung.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Universitäts-Institut zur Erforschung der Infektionskrankheiten in Bern (Direktor: Prof. Dr. W. Kolle).]

Ueber den Einfluß des ultravioletten Lichtes auf hämolytische Ambozeptoren.

Von Dr. O. Stiner und Dr. S. Abelin.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Januar 1914.)

In einer Anzahl von Veröffentlichungen, besonders aus französischen Laboratorien, wurde mehrfach die Frage erörtert, wie die durch Quecksilberdampfquarzlampen erzeugten ultravioletten Strahlen auf die „Immunkörper“, die aktiven Bestandteile normaler und künstlich erzeugter Sera, einwirken. Die Versuche waren aber meist derart angestellt, daß aus ihrem Ausfall nicht zu ersehen war, ob die Wirkung des ultravioletten Lichtes allein das Endergebnis herbeigeführt hatte, oder ob die von den Lampen erzeugte Wärme dabei wesentlich beteiligt war. In den „Ueberwasserbrennern“, den Trockensystemen der Quarzlampen, kommt es zur Entwicklung hoher Wärmegrade, bis zu 800° C. Es ist selbstverständlich, daß hohe Temperaturen die Wirkung der Lichtstrahlen, fördernd oder hemmend, beeinflussen können. Außerdem wird bei der trockenen Bestrahlung bekanntermaßen Ozon gebildet, so daß auch chemische Umsetzungen, bedingt durch Ozon, bei diesen Versuchen eine Rolle spielen.

Bei unseren Versuchen haben wir das Augenmerk hauptsächlich darauf gerichtet, unter Ausschaltung aller Nebenwirkungen die reine Wirkung des ultravioletten Lichtes zu bekommen. Wir haben seinerzeit bei den in dieser Zeitschrift¹⁾ mitgeteilten Versuchen über die Wirkung der ultravioletten Strahlen auf die Komplemente in kurzen Zügen unsere Versuchsanordnung angegeben. Die wesentliche Rolle dabei spielt die Verwendung eines direkten „Unterwasser-

1) S. Abelin und O. Stiner, Die Einwirkung des ultravioletten Lichtes auf das Komplement des Meerschweinchenserums. Diese Zeitschr., Bd. 19, Heft 1.

brenner-Systems“, wie es der nach den Angaben von Nogier konstruierte Apparat, System Nogier-Triquet M 5, darstellt. Bei dem Apparat, der zur Erzeugung von keimfreiem Trinkwasser bestimmt ist, wird das Leuchtrohr, in dem die ultravioletten Strahlen erzeugt werden, direkt von der zu sterilisierenden Flüssigkeit umspült; die Erhitzung fällt also weg.

Das durch den Kasten fließende Wasser kühlt die Lampe selbsttätig und verläßt den Apparat nur um ca. $\frac{1}{2}^{\circ}$ C wärmer als es eingetreten ist. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in verschlossenen Quarzgläschen von verschiedenem Lumen in dem Gestell der Lampe in ca. 5 cm Entfernung von dem Leuchtrohr angebracht, so daß zwischen Lichtquelle und Untersuchungsflüssigkeit eine ca. 5 cm hohe Wasserschicht von $10\text{--}12^{\circ}$ Temperatur durchfloß. Zwischen den Quarzgläschen und der Kastenwand war eine Schicht fließenden Wassers von ca. 2 cm. Eine Wärmewirkung der Lampe war auf diese Weise bei unseren Versuchen ausgeschlossen. Die Entwicklung von Ozon in den gefüllten und sorgfältig verschlossenen Gefäßen war unmöglich.

Die Bestrahlungsversuche mit Komplement, diesem labilsten wirksamen Körper des Serums, haben ergeben, daß es in Verdünnungen durch ultraviolettes Licht in kurzer Zeit zerstört wird. Nach den Erfahrungen über die Beständigkeit der hämolytischen Ambozeptoren, speziell der hochwirksamen Hämolysine des Kaninchenserums, wie sie durch Injektion von Hammelblutkörperchen beim Kaninchen erzeugt werden, war a priori zu erwarten, daß sie der Abtötung durch ultraviolettes Licht ohne Erhitzung einen großen, wahrscheinlich unüberwindlichen Widerstand entgegensetzen würden. Aus den zahlreichen Untersuchungen menschlicher Sera zur Erforschung des Wesens der Wassermannschen Syphilisdiagnostik konnte der Schluß gezogen werden, daß auch die in vielen Sera enthaltenen Normalambozeptoren eine ziemlich große Resistenz zeigen. Die „Inaktivierung“, das Erwärmen auf 56° C, der Sera zerstört das Komplement, greift aber die hämolytischen Ambozeptoren wenig an. Das Serum eines Kaninchens, welchem Hammelblutkörperchen zur Erzeugung von Hämolysinen eingespritzt wurden, zeigt vor und nach der zur Zerstörung des Komplementes vorgenommenen halb-

stündigen Erwärmung auf 56° dieselben Hämolysewerte. Durch Schütteln wird der hämolytische Ambozeptor nicht zerstört. Die Haltbarkeit bei geeigneter Aufbewahrung ist beinahe unbegrenzt, speziell bei Sera mit hohem hämolytischem Titer. Dieser Titer wird auch durch Trocknen und späteres Lösen des Serums nicht geändert.

Wir haben nun eine Reihe von Kaninchensera, die künstlich erzeugte, gegen Hammelblutkörperchen gerichtete hämolytische Ambozeptoren enthielten, sowie eine Anzahl Normalambozeptoren menschlicher Sera der Bestrahlung bei der Temperatur des fließenden Leitungswassers ausgesetzt und haben konstatieren können, daß die Hämolysine unter geeigneten Versuchsbedingungen durch die reine Wirkung des ultravioletten Lichtes zerstört werden.

Die zu den Versuchen benutzten hämolytischen Ambozeptoren waren in der bekannten Weise hergestellt, daß mittelgroßen Kaninchen zu drei verschiedenen Malen 2 ccm gewaschene Hammelblutkörperchen intravenös injiziert wurden. Wir erhielten auf diese Weise meist sehr hochwertige Sera mit einem hämolytischen Titer von 0,0001—0,001. Ambozeptoren mit niedrigerem Titer pflegen wir für die Wassermannsche Reaktion nicht zu benutzen, da Kaninchenserum in größerer Menge den Ausfall der Reaktion beeinflussen kann. Zu den Bestrahlungsversuchen wurden solche „mißlungene“ Ambozeptoren zugezogen, um zu prüfen, ob niedriger Hämolysingehalt die Zerstörung durch das Licht erleichtert. In der Tat ergaben die Versuche, daß einige hämolytische Sera mit niedrigem Titer in bedeutend kürzerer Zeit, resp. in höherer Konzentration unwirksam wurden, als solche mit hohem Titer.

Im Vergleich zum Komplement setzten die Hämolysine der Zerstörung durch ultraviolette Strahlen einen viel größeren Widerstand entgegen. Speziell spielte die Konzentration eine sehr große Rolle. Während die zur Vernichtung des Komplementes nötige Bestrahlungszeit bei 1-proz. Verdünnungen nach Sekunden zu bemessen war, genügten schon 10 Minuten Bestrahlung nicht immer, um Hämolysine in der gleichen Konzentration abzutöten. Schon bei diesen schwachen Lösungen zeigten sich Unterschiede in der Resistenz der Sera mit niedrigem und hohem Hämolysintiter. Deutlicher aber noch wurden diese Differenzen bei höheren Konzentrationen. Es zeigte sich nämlich die interessante Tatsache, daß die Wirkung der ultravioletten Strahlen für hochwertige Sera

schon bei einer Verdünnung von 1:10 ihre Grenze erreicht hatte. Sera mit hohem Hämolysintiter waren schon bei dieser schwachen Konzentration nicht mehr unwirksam zu machen, auch nicht bei mehrstündiger Bestrahlung. Es zeigt sich höchstens nach 2—3 Stunden eine Abschwächung, wie aus der Tabelle I ersichtlich. Dagegen gelang es in einigen Fällen, schwächere Sera in der Verdünnung 1:10 nach 30 bis 60 Minuten zu zerstören. Auf unverdünnte Sera hatte die Bestrahlung sogar in ganz dünner Schicht (2 mm) und bei mehrstündiger Dauer keinen die Hämolysine schädigenden Einfluß. Tabelle I zeigt an einigen Beispielen das Verhalten der Sera bei verschiedenen Konzentrationen und wechselnder Bestrahlungszeit.

Die Trübung spielte bei diesem verschiedenen Verhalten der Sera keine Rolle. Alle benutzten Sera waren auch in Verdünnung 1:10 vollständig klar und durchsichtig.

Die Resistenz der im menschlichen Blute enthaltenen Normalambozeptoren wurde an ca. 30 Sera ausgeprüft. Es wurden dazu Sera ausgewählt, die diese Ambozeptoren in ziemlicher Menge enthielten, somit einen Hämolysintiter von 0,05—0,01 zeigten. In einem einzigen Fall erhielten wir noch mit 0,007 Hämolyse. Der Gehalt an Ambozeptoren wurde durch Titration des aktiven Serums bestimmt, indem zu fallenden Dosen Serum Hammelblutkörperchen (0,05 ccm) und Komplement (Meerschweinchenserum) zugesetzt wurden. Eine zweite Portion des Serums wurde bei 56° C eine halbe Stunde erwärmt, „inaktiviert“, und dann in gleicher Weise titriert. Eine dritte und vierte Portion des Serums wurde 10 bzw. 20 Minuten den Strahlen der Quarzlampe bei der Temperatur des strömenden Leitungswassers ausgesetzt und nachher ebenfalls auf die Anwesenheit von Hämolysinen geprüft. Dabei zeigte sich, daß die Hämolysine durch das Inaktivieren wenig oder gar nicht leiden, daß der hämolytische Titer höchstens um Zehnteldezimalen abnimmt, z. B. von 0,01 auf 0,02 oder 0,03; oft bleibt er vollständig gleich, selten wird das blutlösende Vermögen ganz aufgehoben. Aus technischen Gründen wurde das Serum nur in 10-proz. Lösung bestrahlt. Schon nach 10 Minuten dauernder Bestrahlung konnte meist eine starke Abschwächung der Hämolysine, bei 20 Minuten ge-

Tabelle I.

Versuche mit künstlich erzeugten, gegen Hammelblutkörperchen gerichteten Ambozeptoren des Kaninchenserums.

Bezeichnung des Ambozeptors	Konzentration in Prozenten	Dauer der Bestrahlung in Minuten	Dosen des Serums															
			0,05	0,03	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,001	0,0008	0,0006	0,0005	0,0003				
a	1	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	
		5	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
		10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
b	1	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	
		10	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
		20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		30	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
c	0,3	30 (neue Lampe)	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
		180	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	
		unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
d	1	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
		10	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+
f	1	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: 0 = Hämolyse, ⊥ = inkomplette Hämolyse, + = Hemmung.

wöhnlich vollständige Zerstörung derselben konstatiert werden. Einige Sera, und zwar stets solche mit höherem Hämolysingehalt, zeigten nach 10 Minuten langer Bestrahlung keine oder sehr geringe Veränderung des hämolytischen Titers; bei einer Bestrahlungsdauer von 20 Minuten wurden aber auch hier die Hämolysine vollständig zerstört (s. Tabelle II, No. 24, 43, 58). Das Verhalten der Normalambozeptoren gegenüber ultravioletten Strahlen war somit ein wesentlich anderes als das der künstlichen Kaninchenambozeptoren.

Tabelle II.
Versuche mit Normalambozeptoren menschlicher Sera.

Kontroll-No. des Serums	Be- strahlungs- dauer in Minuten	Dosen des Serums											
		0,3	0,2	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,009	0,008	0,007	0,006
a) Aktive Sera.													
24	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
66	unbestrahlt	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+	+
	10	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
108	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
110	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
b) Inaktivierte Sera.													
24	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56	unbestrahlt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Die Hämolysine scheinen durch das Inaktivieren des Serums (halbständiges Erwärmen auf 56° C) in einen labileren Zustand übergeführt zu werden, der sie der Wirkung der ultravioletten Strahlen zugänglicher macht. Bei den künstlich er-

zeugten Kaninchenambozeptoren war ein Einfluß des Inaktivierens nicht zu konstatieren.

Eine interessante Tatsache zeigte sich bei der Bestrahlung syphilitischer Sera, die eine positive Wassermannsche Reaktion zeigten. Die Versuche verschiedener Autoren, die sich mit der Verbesserung der Technik der Syphilisdiagnostik befaßt haben, zielten hauptsächlich darauf, die Normalambozeptoren und Komplementoide wegzuschaffen (Wechselmann, Jöchmann, Mintz, Rossi). Es lag nun der Gedanke nahe, die Resultate unserer Versuche im Sinne dieser Autoren nutzbar zu machen, d. h. die Sera durch ultraviolettes Licht von den eine unspezifische Hämolyse erzeugenden Stoffen zu befreien. Es zeigte sich aber bei diesen Versuchen, analog den oben angeführten Befunden, daß es wohl gelingt, das syphilitische Serum, von dem man wegen seines erhöhten Gehaltes an Kolloidstoffen eventuell annehmen konnte, es würde der Bestrahlung mehr Widerstand entgegenzusetzen, vollständig von Komplement und Ambozeptoren zu befreien, daß dabei aber in vielen Fällen die hämolysehemmenden, für Lues charakteristischen Reaktionskörper mit zerstört wurden. Diese Zerstörung war nicht an bestimmte Regeln, wie erhöhter Gehalt an Reaktionskörpern

Tabelle III.

Versuche mit Syphilitiker-Serum (mit positiver Wassermannschen Reaktion). Resultate der Wassermannschen Reaktion mit unbestrahltem und bestrahltem Serum.

Kontrollnummer des Serums	Bestrahlungs- zeit	Dosen des Hauptantigens					Kontrollantigene (Dosis 0,1)		
		0,1	0,075	0,05	0,02	0,01	I	II	III
26	unbestrahlt	+	+	+	L	0	+	+	+
	10 Minuten	+	+	+	0	0	+	+	+
	20 „	0	0	0	0	0	0	0	0
34	unbestrahlt	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 Minuten	0	0	0	0	0	0	0	0
42	unbestrahlt	+	+	+	L	0	+	+	+
	10 Minuten	+	+	+	L	0	+	+	+
	20 „	+	+	+	+	0	+	+	+
56	unbestrahlt	+	L	0	0	0	+	L	+
	10 Minuten	+	+	L	0	0	+	+	+
	20 „	0	0	0	0	0	0	0	0

oder bestimmte Bestrahlungsdauer gebunden, sondern erfolgte ganz regellos. Bei der an unserem Institut geübten Technik der Wassermannschen Reaktion wird das Serum mit fallenden Dosen Antigen titriert, d. h. die Menge der Reaktionskörper ausgewertet. Bestrahlte man ein luetisches Serum, das in der Dosis 0,1 noch mit 0,01 Antigen die Hämolyse hemmte, so war zu erwarten, daß es der Zerstörung der Reaktionskörper, der hypothetischen Kolloide, mehr Widerstand entgegensetzen werde, als ein an solchen Kolloiden armes Serum, das z. B. nur bis 0,075 positiv anzeigte. Die vorstehende Zusammenstellung (Tabelle III) zeigt aber, daß in dieser Beziehung absolut keine Gesetzmäßigkeit herrscht.

Zusammenfassung.

Die künstlich erzeugten Hämolsine des Kaninchenserums (Immunhämolsine) werden in Verdünnung 1 : 100 durch ultraviolette Strahlen einer Quecksilberdampfquarzlampe bei der Temperatur des fließenden Leitungswassers (10—12° C) in ca. 10 Minuten zerstört.

In höheren Konzentrationen erfolgt die Zerstörung bedeutend langsamer. Schon bei Verdünnung des Serums von 1 : 10 sind hochwertige hämolytische Sera (Titer 0,0001—0,001) durch Bestrahlung nicht mehr unwirksam zu machen, während in einigen Fällen Sera mit niedrigem Titer (unter 0,005) durch längere Bestrahlung (30—60 Minuten) ihr hämolytisches Vermögen bei dieser Konzentration einbüßen.

Normalambozeptoren des menschlichen Serums werden in 10-proz. Verdünnungen in kurzer Zeit, 10—20 Minuten, durch die ultravioletten Strahlen vollständig zerstört.

Dieses Verhalten der Normalambozeptoren ist nicht zur Inaktivierung für die Serumdiagnostik der Syphilis nutzbar zu machen, weil in der zur sicheren Unwirksammachung erforderlichen Zeit in vielen Fällen auch die hypothetischen Kolloidkörper des Syphilitikerserums zerstört werden.

Die Zerstörung der für Syphilis charakteristischen Reaktionskörper des Luetikerserums durch ultraviolettes Licht erfolgt ohne Gesetzmäßigkeit, d. h. die Quantität der Reaktionskörper ist ohne Einfluß auf die Zeit der Abtötung.

Nachdruck verboten.

[Aus dem klinischen Laboratorium des Königl. Serafimerlazarets,
Stockholm.]

**Ueber die Bedeutung der im Menschenserum enthaltenen
Normalambozeptoren gegen Hammelblut bei der
Wassermannschen Reaktion.**

Von **J. Tillgren** und **G. Brun**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 12. Januar 1914.)

Bei den Versuchen, die Wassermannsche Reaktion zu verfeinern, haben verschiedene Autoren in einer Reihe von Arbeiten — besonders in dieser Zeitschrift — die im nativen Menschenserum vorhandenen Hammelblutambozeptoren untersucht. Bei der klassischen Methode scheint man diesen wohlbekannten hämolytischen Faktor als irrelevant gegenüber dem großen Ueberschuß von Immunambozeptor angesehen zu haben. Bei der nachfolgenden kritischen Analyse der verschiedenen Komponenten der Reaktion haben die Autoren ihre nicht zu leugnende Bedeutung unter besonderen Bedingungen beobachtet und hauptsächlich auf zwei verschiedenen Wegen versucht, ihres störenden Einflusses auf die Reaktion Herr zu werden.

Der Originalmethode am nächsten lag es, die Normalambozeptoren auszuschalten. Einen Versuch in dieser Richtung hat Bauer (1) gemacht, der sie durch Vorbehandlung mit Hammelblutkörperchen aus dem Serum absorbierte. Dabei beobachtete er aber eine stärkere Hemmung der Hämolyse, die er als die von Sachs (2) zuerst erwiesene sogenannte anti-hämolytische Normalserumwirkung deutete, und er riet von dieser Methode ab, als zu nicht spezifischen Hemmungen führend.

Jacobaeus (3) benutzte als Erster die Absorptionmethode bei der Ausführung der Wassermannschen Reaktion. Er erzielte dabei als praktisches Resultat einen größeren Prozentsatz positiver Reaktionen bei sicher Luetischen. Seit Jacobaeus haben mehrere Autoren dasselbe oder ein ähnliches Verfahren angewandt, zum Teil unter Versuch, die anti-hämolytische Normalserumwirkung auszuschalten.

Auf dem anderen Hauptwege gehen diejenigen Autoren vor, die, von der Originalmethode mehr abweichend, sich der Normalambozeptoren anstatt der Immunambozeptoren bei der Ausführung der Reaktion bedienen, entweder wie Bauer (4), ohne Berücksichtigung ihrer Menge, oder wie in

letzter Zeit Leredde und Rubinstein (5), nach Austitrieren ihrer Menge und, wenn nötig, Hinzufügen von Immunambozeptor.

Bei der Ausführung der Wassermannschen Reaktion im hiesigen Laboratorium (Serafimerlazarett, Stockholm) pflegen wir bei Serum mit unvollständiger Hemmung der Hämolyse die Untersuchung durch die von Jacobaeus angegebene Absorptionsmethode zu ergänzen, wobei wir regelmäßig seine Beobachtungen haben bestätigen können. In einer Reihe von 20 positiven Seris haben wir mit Austitrieren der Hemmungsstärke nach Boas (6) die Originalmethode und die Jacobaeusche Absorptionsmethode verglichen. Unserer Erwartung entsprechend, zeigte es sich dabei als Regel, daß die vorbehandelten Sera stärkere Hemmung aufwiesen als die nicht vorbehandelten: teils erhielten wir eine deutliche Hemmung noch in den niedrigeren Serumdosen, teils erschien dieselbe als die quantitativ stärkere in den unvollständig hemmenden Dosen (Tabelle I).

Tabelle I.

Serum No. 3361	A	B
0,2 ccm	++	+++
0,1 „	(+)	+++
0,05 „	[+]	+++
0,02 „	—	(+)
0,01 „	—	—

Jede Probe enthält, außer den abnehmenden Mengen Menschenserum, 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement, 0,2 ccm 10-proz. alkoholisches Extrakt von Menschenherzen und als hämolytisches System, nach 1 Stunde zugefügt, 1 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen-Emulsion und 3 Einheiten Immunambozeptor, gegen diese gerichtet und von Kaninchen gewonnen. — Durch Komplementzusatz zu den vorbehandelten Blutkörperchen konnten Normalambozeptoren, und zwar in abnehmender Menge nachgewiesen werden. — Die Hämolysehemmung ist in der am meisten üblichen Weise mit +++, ++, +, (+) und — bezeichnet. Nur nimmt das von uns angewandte Zeichen [+] eine Mittelstellung zwischen (+) und — ein. — Die Zahlen der ersten Kolumne geben die angewandten Serumdosen an und die zwei darauffolgenden Kolumnen die Grade der Hämolyse bei vorbehandelten (B) und bei nicht vorbehandelten (A) Seris. Die in diesen Tabellen mitgeteilten Resultate sind 16—24 Stunden nach Beginn der Hämolyse abgelesen und somit als definitiv zu bezeichnen.

Jacobaeus' Absorptionsmethode frappt durch ihre Einfachheit der Ausführung gegenüber z. B. dem zeitraubenden und komplizierenden Austitrieren bzw. Ergänzen durch Normal-

ambozeptor nach Leredde und Rubinstein. Ein mehrmals erhobener Einwand gegen Jacobaeus' Methode ist der, daß dieselbe durch Sachs' antihämolytische Normalserumwirkung beeinflußt werden soll. Aus Sachs' Originalmitteilung geht hervor, daß die von ihm nachgewiesene antihämolytische Normalserumwirkung beim Ausschalten der Normalambozeptoren für die betreffenden Blutkörperchen erscheint. Unsere Versuche zeigen auch, daß sich bei dem Hervortreten von Jacobaeus' Hemmung Normalambozeptorwirkung auf die vorbehandelten Blutkörperchen nachweisen läßt. Da wir aber bei der Untersuchung von anderen (negativen) Seris, die reichlich Normalambozeptor erhielten, und welche also bei Wassermanns Originalmethode keine Hemmung zeigten, fanden, daß dieselben auch bei Anwendung von Jacobaeus' Absorptionsmethode an keiner Hemmung der Hämolyse litten, so veranlaßte dies uns, den Unterschied zwischen dem Hervortreten der Sachsschen und der Jacobaeusschen Hemmung zu untersuchen.

Da ein so großer Ueberschuß an Ambozeptor wie bei Wassermanns Reaktion (3 Ambozeptoreinheiten) bei Sachs' einfachem hämolytischen Versuch ($1\frac{1}{2}$ Ambozeptoreinheiten) nicht zur Anwendung kam, haben wir den letzteren in zwei parallelen Serien nachgeahmt mit kleinster lösender Dosis bzw. dreifacher Menge. Es zeigte sich da (siehe Tabelle II), daß mit der einfachen Dosis eine Hemmung hervortrat, die noch nach 24 Stunden bestand, und zwar bei ebenso kleinen Serummengen (Menschenserum) wie in Sachs' Versuch mit Kaninchenserum. Bei Anwendung der größeren Ambozeptordosis aber zeigte sich die Hemmung der Hämolyse nur als ein verlangsamtes Lösen während der ersten halben Stunde, nach welcher Zeit die Hämolyse überall komplett war.

Tabelle II.
Einfache Ambozeptordosis.

	10 Min.	20 Min.	35 Min.	50 Min.	18 Stdn.
A. Nicht vorbehandelte Sera.					
0,2 ccm	—	—	—	—	—
0,1 „	[+]	—	—	—	—
0,05 „	[+]	—	—	—	—
0,02 „	(+)	—	—	—	—
0,01 „	+	[+]	—	—	—

Bedeutung der im Menschenser. enthalt. Normalambozeptoren etc. 609

	10 Min.	20 Min.	35 Min.	50 Min.	18 Stdn.
B. Vorbehandelte Sera.					
0,2 ccm	+++	++	+(+)	+	+
0,1 „	++	+(+)	+	(+)	(+)
0,05 „	+(+)	+	(+)	[+]	—
0,02 „	+(+)	+	(+)	[+]	—
0,01 „	+	(+)	[+]	—	—

Dreifache Ambozeptordosis.

	5—10 Min.	15 Min.	25—30 Min.	35—40 Min.
A. Nicht vorbehandelte Sera.				
0,2 ccm	—	—	—	—
0,1 „	—	—	—	—
0,05 „	—	—	—	—
0,02 „	—	—	—	—
0,01 „	—	—	—	—
B. Vorbehandelte Sera.				
0,2 ccm	++	(+)	[+]	—
0,1 „	+(+)	(+)	[+]	—
0,05 „	(+)	—	—	—
0,02 „	(+)	—	—	—
0,01 „	[+]	—	—	—

0,1 ccm des in diesem Versuche angewandten Menschenserums zusammen mit 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement bewirkte nach $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° komplette Hämolyse von 1 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen-Emulsion. In Uebereinstimmung mit der von Sachs angewandten Methodik wurde jede Serumprobe, sowohl die vorbehandelten wie die nicht vorbehandelten, zunächst mit 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement während 1 Stunde bei 37° digeriert. Dann wurde jeder Probe 1 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchen-Emulsion + 1, bzw. 3 Immunambozeptoreinheiten (Kaninchenserum) hinzugefügt.

Der übliche Vorversuch ergab, daß man mittels 1 Immunambozeptoreinheit + 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement komplette Hämolyse der im Versuche angewandten Blutmenge nach $\frac{3}{4}$ Stunde bei 37° erlangte. Wenn verglichen hiermit, ist zu bemerken das schnelle Eintreten der kompletten Hämolyse in den Proben mit nicht vorbehandelten Seris und einfacher Ambozeptordose, offenbar durch die Zulage von Normalambozeptoren hervorgerufen.

Angesichts der Hemmung, die das alkoholische Organextrakt bei der Wassermannschen Reaktion ausübt, schien es uns möglich, daß zu derselben sich die obengenannte vorübergehende Hemmung addieren und somit die bleibende Hemmung bei der Absorptionsmethode zuwebringen könnte. Auch hat Bauer (1) beobachtet, daß alkoholisches Organ-

extrakt die antihämolytische Normalserumwirkung verstärken kann.

Unsere nächste Untersuchung ging also darauf aus, die Hämolyse bei Zusatz von mit Blutkörperchen vorbehandeltem Serum und zugleich von der bei der Wassermannschen Reaktion üblichen Menge alkoholischen Organextrakts zu studieren, womit wir an den Ausgangspunkt: die Absorptionmethode bei der Wassermannschen Reaktion, zurückgelangt waren. Auch in diesem Falle trat wie in den in Tabelle II mitgeteilten Versuchen nur eine vorübergehende Hemmung hervor; dieselbe war aber durchgehends von etwas längerer Dauer als die der letztgenannten Versuche. Doch war die Hämolyse nach 1 Stunde in allen Röhrchen komplett bei sämtlichen diesbezüglichen Versuchen (Tabelle III). Bei diesen Versuchen haben wir Sera von sicher Nichtluetischen benutzt, um unter möglichst einfachen Verhältnissen zu arbeiten.

Tabelle III.

	10 Min.	25 Min.	40 Min.	50 Min.
A. Nicht vorbehandelte Sera.				
0,2 ccm	+	+	—	—
0,1 „	(+)	—	—	—
0,05 „	(+)	—	—	—
0,02 „	(+)	—	—	—
0,01 „	[+]	—	—	—
B. Vorbehandelte Sera.				
0,2 ccm	+(+)	(+)	[+]	—
0,1 „	(+)	[+]	—	—
0,05 „	(+)	—	—	—
0,02 „	(+)	fehlt	fehlt	fehlt
0,01 „	[+]	—	—	—

Dieser Versuch ist mit dem in Tabelle II angeführten analog ausgeführt; nur haben wir in diesem Falle jeder Probe 0,2 ccm alkoholischer Menschenherzenextrakt und, nach 1-stündigem Digerieren mit 0,1 ccm Meer-schweinchenkomplement bei 37°, die mit 3 Immunambozeptoreinheiten beladenen Blutkörperchen hinzugefügt. Andere derartige Versuche haben genau dasselbe Resultat ergeben; nur war in einem Versuche die Hämolyse in den Proben mit vorbehandelten Seris erst nach Verlauf einer Stunde komplett.

Aus einer Nachprüfung von Sachs' Hämolyseversuch mit denselben Ambozeptor- und Extraktmengen wie bei der Wassermannschen Reaktion ging also hervor, daß die so-

genannte antihämolytische Normalserumwirkung dabei nur als eine temporäre Hemmung der Hämolyse hervortritt. Da die in Tabelle I angeführten stärkeren Hemmungen dagegen definitiv sind, dürfte es schwierig sein, dieselben a priori für identisch mit der Sachsschen antihämolytischen Normalserumwirkung zu erklären. Man hat indessen keinen Grund, eine prinzipielle Trennung der temporären und der definitiven Hemmung vorzunehmen, und es liegt ja nahe — angesichts der Tabelle I — zu denken, daß die stärkere Hemmung bei der Absorptionsmethode aus einer Summation der persistierenden Hemmung bei der Wassermannschen Reaktion und der temporären, in Tabelle III, hervorging. Eine derartige Summation erklärt jedoch nicht die Hemmung bei der Absorptionsmethode in den Fällen, wo die Wassermannsche Reaktion ganz negative, die Absorptionsmethode dagegen schwächere oder stärkere positive Resultate ergeben hat. In diesen letztgenannten Fällen aber findet man oft, wenn man die Hämolyse bei der Wassermannschen Reaktion in zeitlichen Intervallen genauer verfolgt, nach 1—2 Stunden (wenn die leere und die negative Kontrolle schon gelöst sind) eine stärkere oder schwächere Hemmung, die nachher, und zwar binnen kürzerer Zeit als 12—24 Stunden, der kompletten Hämolyse anheimgefallen ist. Denkbar wäre es, daß diese letzterwähnte temporäre Hemmung sich zu der obengenannten temporären Hemmung (Tabelle III) addierte und so die definitive Hemmung der Absorptionsmethode veranlaßte. In anderen Seris mit derartiger temporärer Hemmung nach der Wassermannschen Reaktion gab aber die Absorptionsmethode keine dauernde Hemmung, trotz der Anwesenheit von Normalambozeptoren.

Mit Rücksicht auf diese letzterwähnten Tatsachen und die im allgemeinen relativ große Entfernung zwischen temporärer und dauernder Hemmung, z. B. in Ambozeptoreinheiten gemessen, können wir nicht die stärkere Hemmung bei der Absorptionsmethode als einen Ausdruck der Sachsschen antihämolytischen Normalserumwirkung betrachten. Die unseres Erachtens wahrscheinliche Erklärung für die stärkere Hemmung bei Jacobaeus' Absorptionsmethode ist die, daß eine Interferenz der eigenen Ambozeptoren die spezifische Hem-

mung bei der Wassermannschen Reaktion mehr oder weniger maskieren kann, wie Jacobaeus selbst in seiner ersten Mitteilung angibt, und wie kürzlich Graetz (7) in einem ausführlichen und kritischen Aufsätze hervorhebt.

Durch den Vorversuch bei der Wassermannschen Reaktion erfährt man die gegenseitigen Mengenverhältnisse zwischen Immunambozeptor und Komplement für die zu lösende Blutmenge berechnet. In den Fällen, wo die hypothetisch-luetische Antigen-Antikörpervereinigung einen so großen Teil des Komplements absorbiert, daß der rückständige Teil nicht hinreicht, um mit Hilfe der Immunambozeptoren das Hammelblut zu lösen, würde der Zusatz von Normalambozeptor die Hämolyse möglich machen. Die Wirkung der gegebenen Menge Komplement könnte also durch Ambozeptorüberschuß verstärkt werden. Jeder, der mit der Wassermannschen Reaktion arbeitet, hat gewiß beobachtet, daß etwas Derartiges möglich ist. Um näher zu eruieren, teils innerhalb welcher Grenzen eine solche Verstärkung eintritt, teils ob sich dabei Immun- und Normalambozeptor ähnlich verhalten, sind wir gegenwärtig mit systematischen Untersuchungen beschäftigt. Der in Tabelle IV angeführte Versuch zeigt ähnliche Verhältnisse wie die von Morgenroth, Sachs (8) u. a. gefundenen.

Tabelle IV.

A.		B.			
Komplementtitrierung		Ambozeptorverdünnung	Komplement 0,05 ccm	Komplement 0,06 ccm	Komplement 0,07 ccm
0,1 ccm	—	1 : 100	—	—	—
0,09 „	—	1 : 200	—	—	—
0,08 „	—	1 : 300	—	—	—
0,07 „	(+)	1 : 400	(+)	—	—
0,06 „	+	1 : 600	+	(+)	[+]
0,05 „	++	1 : 800	++	+	+
0,04 „	+++				
0,03 „	+++				
0,02 „	+++				
0,01 „	+++				

— = komplette Hämolyse; +++ = keine Hämolyse.

Der übliche Vorversuch mit 0,1 ccm Komplement und abnehmenden Ambozeptormengen ergab einen Titer (kleinste lösende Dose) von 1 : 800. — 1 ccm von der Ambozeptorverdünnung 1 : 800 und abnehmende Komplementmengen ergeben die Hämolyse der Tabelle IV A. Tabelle IV B stellt

die Verstärkung der hämolytischen Wirkung drei verschiedener Komplementdosen bei zunehmender Ambozeptormenge dar. Die Resultate sind nach $\frac{3}{4}$ Stunde abgelesen worden.

Ein Zusammenwirken zwischen Immun- und Normalambozeptor in der Richtung, daß die Komplementwirkung verstärkt wird, zeigt Tabelle II, wenigstens mit Rücksicht auf die Lösungsgeschwindigkeit. Ein derart einfaches Zusammenwirken ist die Voraussetzung für die von Leredde und Rubinstein angewandte Vervollkommnung der Bauerschen Methode.

Technik.

Bei unseren Versuchen haben wir die Originaltechnik genau befolgt, aber als Antigen ein 10-proz. alkoholisches Extrakt von Menschenherzen angewandt. Jedes neue Extrakt wurde mit negativen und positiven Seris austitriert, und wir fanden dabei, daß sich die Menge von 0,2 ccm immer als die zu gebrauchende Dose ergab (vgl. Boas, l. c.).

Bei der Absorptionsmethode haben wir Jacobaeus' Vorschriften befolgt, später jedoch und bei allen vergleichenden Versuchen, wie Sachs, bei 37° digeriert. Wir wollen es als besonders wichtig hervorheben, daß man bei Vergleich der Wassermanschen Reaktion mit der Absorptionsmethode die Serumdosen der beiden Serien immer gleichmäßig verdünnen muß. Wir sahen nämlich bei einigen Versuchen eine paradoxe Reaktion, d. h. schwächere Hemmung, in den vorbehandelten Seris, wenn diese längere Zeit als die nicht vorbehandelten verdünnt blieben. Dieselben Sera zeigten bei erneuter Untersuchung und mit Berücksichtigung der oben genannten Vorsichtsmaßregeln die gewöhnliche stärkere Hemmung bei der Absorptionsmethode. Solche paradoxe Reaktionen erklären sich dadurch, daß die spezifisch hemmenden Körper durch Stehenbleiben in verdünntem Zustande einige Zeit vor der Reaktion abgeschwächt werden (Boas, l. c.).

Bei unserem in Tabelle I exemplifizierten Versuche der 20 positiven Luetikersera haben wir mit Hilfe von Boas' Hämoglobinskala versucht, eine zahlenmäßige Uebereinstimmung einerseits zwischen dem Unterschiede der Hämolysestärke bei der Wassermanschen Reaktion und Jacobaeus'

Absorptionsmethode, andererseits dem Grade der Hämolyse der mit den verschiedenen Serumdosen vorbehandelten Blutkörperchen nach Zusatz von 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement nachzuweisen. Es ergab sich jedoch keine vollständige Uebereinstimmung, und die Erklärung steht noch aus.

Betreffs der Absorption gibt Rossi (9) an, daß man durch Vorbehandlung der Sera mit Blutkörperchen bei 0° die Normalambozeptoren ausschaltet, ohne daß die Sera danach das Friedberger-Sachssche Phänomen geben (d. i. antihämolytische Normalserumwirkung zeigen), das seiner Meinung nach den bei 37° vorbehandelten Seris anhaftet. Diese Behauptung ist kürzlich von Leredde und Rubinstein (l. c.) wiederholt worden, welche Rossis Methode angewandt haben. Rossi findet nämlich bei einer Anzahl positiver und negativer Sera „meistenteils das Friedberger-Sachssche Phänomen“, gibt aber nicht an, ob seine Versuche mit 1, 2 oder 3 Immunambozeptoreinheiten ausgeführt sind, auch nicht die Menge von Hemmungsserum, oder nach welcher Zeit die Resultate abgelesen sind. Bis 0,4 ccm Serum, vorbehandelt bei 0° , „weder hindert noch verlangsamt die Hämolyse“ in einem einfachen hämolytischen System mit 2 Ambozeptoreinheiten.

Daß man durch Absorption bei 0° nach Rossi, d. i. durch sogenannte Kältentrennung, irgendwelchen Vorteil gewinne, ist a priori unwahrscheinlich. Denkt man zunächst an die von Ehrlich nachgewiesenen Komplementoide und an ihre von Wechselmann (10) behauptete Verstopfung der hypothetisch-luetischen Antigen-Antikörperverbindung (die eine positive Wassermanssche Reaktion negativ machen könne), so muß man sagen, daß eine Kältentrennung die beste Methode sei, unter Ausschalten der Normalambozeptoren die Komplementoide in dem auf Wassermanssche Reaktion zu untersuchenden Serum zu erhalten. Auch betreffs der Normalambozeptoren fällt es schwer, die Vorteile einer Kältentrennung einzusehen; das Ziel ist ja, die Normalambozeptoren auszuschalten. Aus Untersuchungen von Poggenpohl (11) u. a. geht ja hervor, daß dieselben bei 0° oft nur unvollständig, zuweilen gar nicht von den Blutkörperchen absorbiert werden.

Um einen Vergleich zu ermöglichen, haben wir zu einem einfachen hämolytischen System abnehmende Dosen von Serum, 1) bei 37° vorbehandelt, 2) bei 0° vorbehandelt, 3) nicht vorbehandelt, hinzugefügt. Die Untersuchung ist in 2 parallelen Reihen, mit 1 bzw. 3 Immunambozeptoreinheiten, ausgeführt, und das Ablesen der Resultate in kurzen Zwischenräumen vorgenommen worden. Es zeigte sich da (Tabelle V), daß die antihämolytische Normalserumwirkung in der Serie mit einfacher Immunambozeptordose, wie bei unseren früheren Versuchen, als eine stärkere oder schwächere persistierende Hemmung hervortritt und bis zu einer Serummenge von 0,01 ccm, und zwar in demselben Maße für die bei 0° und die bei 37° vorbehandelten Sera. In der Serie mit 3 Ambozeptoreinheiten, auch hier wie bei unseren früheren Versuchen, trat nur eine temporäre Hemmung hervor, und zwar auch von gleicher Dauer für die bei 0° und die bei 37° vorbehandelten Sera. Bei diesem Versuche haben wir die Vorschriften *Jacobaeus'* befolgt und jede Serumquantität mit 1 ccm 5-proz. Hammelblutkörperchenemulsion, aber bei 37°, digeriert. Während des Zentrifugierens der bei 0° vorbehandelten Sera haben die Röhrchen immer, nach *Rossis* Vorschrift, in größeren Röhrchen mit Eiswasser gesteckt.

Tabelle V.
A. Einfache Ambozeptordose.

	15 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.	100 Min.	16 Stunden	
Bei 0° vorbehandelte Sera.							
0,2 ccm			+++	++(+)	++	++	
0,1 "	keine Hämolyse	keine Hämolyse	+++	++(+)	+(+)	+(+)	
0,05 "			++(+)	++	+(+)	+	
0,02 "			++(+)	++	+(+)	+	
0,01 "			++(+)	++	++	+(+)	(+)
Bei 37° vorbehandelte Sera.							
0,2 ccm			++	++	++	++	
0,1 "	keine Hämolyse	keine Hämolyse	++	+(+)	+(+)	+(+)	
0,05 "			+(+)	+(+)	+(+)	+	
0,02 "			+(+)	+(+)	+(+)	+	
0,01 "			+(+)	+(+)	+(+)	[+]	
Nicht vorbehandelte Sera.							
0,2 ccm		++	+(+)	+	(+)	—	
0,1 "	keine Hämolyse	++	+(+)	+	[+]	—	
0,05 "		++(+)	++	+	(+)	—	
0,02 "		+++	++(+)	+(+)	+	—	
0,01 "		+++	++(+)	+(+)	+[+]	—	

B. Dreifache Ambozeptordose.

	5 Min.	10 Min.	15 Min.	20 Min.	30 Min.	40 Min.	50 Min.	60 Min.
Bei 0° vorbehandelte Sera.								
0,2 ccm	+++	++	++	+(+)	+(+)	+	(+)	—
0,1 „	++	+(+)	+(+)	+	+	—	—	—
0,05 „	++	+(+)	+	[+]	[+]	—	—	—
0,02 „	++	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt	fehlt
0,01 „	++	+(+)	+	[+]	—	—	—	—
Bei 37° vorbehandelte Sera.								
0,2 ccm	+++	++	++	+(+)	+	(+)	[+]	—
0,1 „	++	+(+)	+(+)	+	(+)	—	—	—
0,05 „	++	+(+)	+	[+]	[+]	—	—	—
0,02 „	++	+(+)	+	[+]	[+]	—	—	—
0,01 „	++	+(+)	+	[+]	—	—	—	—
Nicht vorbehandelte Sera.								
0,2 ccm	++	++	+	(+)	[+]	—	—	—
0,1 „	+(+)	+(+)	+	[+]	—	—	—	—
0,05 „	+(+)	+(+)	(+)	[+]	—	—	—	—
0,02 „	+(+)	+(+)	(+)	[+]	—	—	—	—
0,01 „	+(+)	+(+)	(+)	[+]	—	—	—	—

Nach dem Vorversuche wurde als Ambozeptoreinheit eine etwas kleinere Dose (1:1200) gewählt als der durch den Vorversuch sich ergebende Titer (1:1000), um den Verlauf der Hämolyse zeitlich auszudehnen.

0,2 ccm des in diesem Versuche angewandten Hemmungsserums + 0,1 ccm Meerschweinchenkomplement bewirkten in $\frac{1}{2}$ Stunde bei 37° komplette Hämolyse der üblichen Blutmenge.

Um die Absorption bei *Jacobaeus*' Methode mit der bei *Rossis* Methode direkt zu vergleichen, haben wir auch eine größere Serumquantität (1,2 ccm) mit 0,5 ccm gut zentrifugierten Blutkörperchen bei 0° während $\frac{1}{2}$ Stunde vorbehandelt und die Hemmung bei abnehmenden Dosen dieses Serums mit derjenigen der nach *Jacobaeus* vorbehandelten ebenso großen Serumdosen verglichen. Das Resultat war auch in diesem Falle dieselbe schwache temporäre Hemmung in den beiden Serien.

Diese unsere vergleichenden Versuche widersprechen also der Behauptung *Rossis*, daß das *Friedberger-Sachssche* Phänomen (die antihämolytische Normalserumwirkung) den bei 0° vorbehandelten Seris, im Gegensatz zu den bei 37° digerierten, nicht anhafte.

Auch hat *Jacobaeus* (l. c.), um den eventuellen Einfluß der Komplementoide bei seiner Methode zu analysieren, mehr als 30 Sera, die ungleiche Gradation der Hemmung zeigten,

in parallelen Serien, bei 37° bzw. bei 0° vorbehandelt, untersucht, erhielt aber „eine so gut wie absolute Uebereinstimmung“ zwischen den 2 Serien.

Zusammenfassung.

1) **Jacobaeus'** Absorptionsmethode zeigt bei positiven Seris, wenn man dieselben in abnehmenden Mengen titriert, eine analoge Verstärkung gegenüber der Originalmethode (**Wassermannsche** Reaktion), als **Jacobaeus** selbst bei partiellen Hemmungen nachgewiesen hat.

2) Wenn man die **Sachssche** antihämolytische Normalserumwirkung unter denselben Bedingungen wie bei der **Wassermannschen** Reaktion (3 Immunambozeptoreinheiten, 0,2 ccm Hemmungsserum, Extraktzusatz) untersucht, tritt das Phänomen nur als eine temporäre Hemmung hervor. Die Verstärkung der Hemmung bei **Jacobaeus'** Absorptionsmethode ist dagegen persistierend und deren Unterschied von der Hemmung bei der **Wassermannschen** Reaktion darf der Interferenz der Normalambozeptoren angeschuldigt werden.

3) Der antihämolytischen Normalserumwirkung (nach **Sachs**) entgeht man nicht dadurch, daß man die Absorption bei 0° (nach **Rossis** Vorschlag) anstatt bei 37° vornimmt. Es gibt also keinen Grund, die Absorptionsmethode durch eine Kältetrennung zu komplizieren, zumal dieses Verfahren theoretische Bedenklichkeiten mitbringt.

Literatur.

- 1) **Bauer, J.**, Berl. klin. Wochenschr., 1908, No. 17.
- 2) **Sachs, H.**, Deutsche med. Wochenschr., 1905, No. 18.
- 3) **Jacobaeus, H. C.**, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1911, p. 615.
- 4) **Bauer, J.**, Deutsche med. Wochenschr., 1908, No. 16.
- 5) **Leredde et Rubinstein**, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1913, p. 499.
- 6) **Boas, H.**, Die Wassermannsche Reaktion. Berlin, Karger, 1913.
- 7) **Graetz**, Dermatologische Wochenschr., 1913.
- 8) **Morgenroth, J.**, und **Sachs, H.**, Berl. klin. Wochenschr., 1902.
- 9) **Rossi, O.**, Zeitschr. f. Immunitätsf., 1911, p. 321.
- 10) **Wechselmann**, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909.
- 11) **v. Poggenpohl, S.**, Biochem. Zeitschr., Bd. 22, 1909, p. 65.

Nachdruck verboten.

[Aus der Prosektur des k. k. Wilhelminenspitales in Wien.]

**Ueber die Bildung von Antikörpern gegen verändertes
arteigenes Serumweiß.****V. Mitteilung über Antigene.**Von **K. Landsteiner** und **B. Jablons**.

(Eingegangen bei der Redaktion am 13. Januar 1914.)

In der vorhergehenden Mitteilung¹⁾ wurde gezeigt, daß es möglich ist, durch Einwirkung alkoholischer Säuren auf Serumweiß Produkte zu gewinnen, die bei erhaltener Antigen-eigenschaft die serologische Artspezifität zum großen Teile eingebüßt haben. Dies ergab sich daraus, daß ein Antiserum gegen das veränderte Pferdeeiweiß auch auf gleich behandeltes Hühner-, Kanincheneiweiß und Edestin einwirkte. Es blieb aber noch übrig, den Nachweis des Spezifitätsverlustes auf andere Weise zu erbringen und zu zeigen, daß das veränderte Eiweiß auch bei derselben Tierart, von der es stammt, als Antigen wirksam ist, so wie das von Obermayer und Pick²⁾ für das Nitroeiweiß nachgewiesen wurde. Um diese Lücke auszufüllen, haben wir Eiweiß aus Kaninchenserum mit alkoholischer Schwefelsäure behandelt³⁾ und auf seine Antigenwirkung bei Kaninchen untersucht. Wir haben aber außerdem einige andere, aus Kaninchenserum hergestellte Präparate der gleichen Prüfung unterzogen, um über die Möglichkeit einer Immunisierung mit artgleichen Eiweißderivaten weitere Aufschlüsse zu erhalten und zwar nahmen wir gekochtes, mit Alkohol gefälltes, mit wässriger Schwefelsäure, mit Formaldehyd und Alkohol behandeltes Serumweiß.

Die Präparate wurden in derselben Weise bereitet, wie bei der früher mit Pferdeserum ausgeführten Untersuchung⁴⁾, nur wurde das Coctoserum durch halbstündiges Erwärmen im Wasserbade hergestellt und zur Behandlung mit wässriger Säure diesmal Schwefelsäure genommen (das

1) Landsteiner und Präsek, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 20, 1913, p. 211.

2) Pick, Biochemie der Antigene, p. 22. Jena, G. Fischer, 1912.

3) Wir bezeichnen das Präparat als S. Eiweiß.

4) l. c. Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 20, p. 214, 222.

Doppelte des Serumvolumens 50 Proz. H_2SO_4)¹⁾ und mit Wasser nur auf das 10-fache Volumen aufgefüllt. Das Formaldehydeiweiß stellten wir in folgender Weise dar. Kaninchenserum wurde mit dem gleichen Volumen von käuflichem (40-proz.) Formalin versetzt und 20 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, dann mit dem 8-fachen des Serumvolumens (95 Proz.) Alkohol gefällt, filtriert, auf dem Filter gut mit Alkohol, dann mit 1-proz. NaCl-Lösung gewaschen, in der Reibschale verrieben, in dem 3-fachen des Serumvolumens 1-proz. Kochsalzlösung aufgenommen.

Die Präparate wurden für die ganze Immunisierung auf einmal hergestellt, mit $\frac{1}{4}$ -proz. Phenol versetzt im Eisschrank aufbewahrt. Für das S. Eiweiß wurde das Serum normaler Kaninchen genommen, zu den anderen Präparaten Serum gebrauchter, aber gesunder Kaninchen.

Die Immunisierung geschah durch intraperitoneale, in Abständen von 1—2 Wochen wiederholte Injektionen einer gewöhnlich 10 ccm des ursprünglichen Serums entsprechenden Menge der Präparate, nur das Coctoserum wurde abwechselnd in dieser Weise und mittels intravenöser Injektionen 3 ccm Serum entsprechender Mengen beigebracht. Die wirksamen Sera wurden nach der 4.—6. Injektion erhalten. Zur Immunisierung mit S. Eiweiß wurden 6, für die anderen Substanzen je 3 Kaninchen genommen.

Die Komplementbindungsreaktion wurde ebenso ausgeführt wie bei den Versuchen der vorhergehenden Untersuchung, doch hatten die verwendeten Blutkörperchenaufschwemmungen eine Konzentration zwischen 5 und 10 Proz. und die Lysinmenge war meist geringer als die doppelte lösende Quantität.

Bei der Prüfung der Seren mit der Methode der Komplementbindung zeigte es sich, daß von sechs Kaninchen, die mit S. Eiweiß injiziert worden waren, fünf, von drei mit Formaldehydeiweiß injizierten zwei deutlich nachweisbare Immunstoffe gebildet hatten. Beide Arten von Seren wirkten nur auf das zugehörige — strukturhomologe — Kaninchenantigen, nicht auf die anderen aus Kaninchenserum hergestellten Präparate. Die S. Eiweiß-Antiseren reagierten entsprechend den Resultaten der vorhergehenden Mitteilung auch mit Pferde- und Hühner-S. Eiweiß, bei den Antiseren gegen Formaldehydeiweiß ließ sich hingegen keine Reaktion mit Formaldehydeiweiß anderer Species (Pferd, Rind, Huhn) nachweisen.

Die anderen untersuchten Präparate hatten in unseren Versuchen keine sicher erkennbare Antigenwirkung, doch ist es nicht ausgeschlossen, daß sich ein positives Resultat bei zahlreicheren und länger fortgesetzten Versuchen ergeben könnte. Es ist sicher wahrscheinlich, daß auch andere Ver-

1) Beim Zusatz der Säure tritt zuerst Fällung, dann Lösung ein; durch den Wasserzusatz fällt das Eiweiß wieder aus.

änderungen zu finden sein werden, die ebenso Antigeneigenschaften gleichartigen Eiweißes hervorrufen, wie die zwei hier angeführten Reaktionen.

Antigene $\frac{1}{100}$, 2 Kapillartropfen der Immunsereen, Immunsereen etwa eine Woche nach der 4. Injektion entnommen, $\frac{1}{600}$ Lysin (einfache lösende Dosis). Ablesung nach 1 Stunde 37° , Nacht Eiskasten.

Immunsereen gegen Kaninchen-	Alkoholeiweiß	Alkoholeiweiß	Alkoholeiweiß	Alkoholeiweiß	Coctoeiweiß	Coctoeiweiß	Coctoeiweiß	Mit H_2SO_4 gefälltes Eiweiß	Mit H_2SO_4 gefälltes Eiweiß	Mit H_2SO_4 gefälltes Eiweiß	Formaldehydeiweiß	Formaldehydeiweiß	Formaldehydeiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	Kochsalzlösung
Nummer der Immunsereen	413	414	416	446	423	424	425	426	427	428	429	430	431	417	500	
Homologe Kaninch.-Antigene S. Eiweiß	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	schw.	k.	k.	Sp.	Sp.	k.
Pferd	0	0	k.
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.	k.

Gleiche Versuchsanordnung, Immunsereen nach 5 Injektionen Ablesung nach 1 Stunde 37° .

Immunsereen gegen Kaninchen-S. Eiweiß No.	470	472	473	474	Kochsalzlösung
S. Eiweiß Kaninchen	0	k.	schw.	0	k.
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.

Antigene $\frac{1}{100}$, $\frac{1}{600}$ Lysin (einfache lösende Dosis für 2 Stunden), Immunsereen 2 Kapillartropfen, nach der 5.—6. Injektion entnommen. Ablesung nach 2 Stunden 37° , Nacht Eiskasten.

Immunsereen gegen Kaninchen-	Alkohol-eiweiß	Alkohol-eiweiß	Cocto-eiweiß	Form-aldehyd-eiweiß	Form-aldehyd-eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	S. Eiweiß	Kochsalz-lösung
Nummer der Immunsereen	413	414	423	429	431	500	470	474	
Antigene (Kaninchen)	Alkoholeiweiß	k.	k.	.	f. k.	k.	f. k.	k.	k.
	Coctoeiweiß	.	.	f. k.	f. k.	k.	f. k.	k.	k.
	Mit H_2SO_4 gefälltes Eiweiß	.	.	.	f. k.	k.	f. k.	k.	k.
	Formalineiweiß	k.	k.	k.	0	0	f. k.	k.	k.
	S. Eiweiß	k.	k.	k.	f. k.	k.	Sp.	Sp.	Sp.
Kochsalzlösung	k.	k.	k.	k.	k.	k.	f. k.	k.	k.

Bildung von Antikörpern gegen verändertes arteigenes Serumeiweiß. 621

Zur Prüfung der Formalinsera auf Artspezifität wurde ein Versuch mit einer nicht vollständig lösenden Lysinmenge gemacht, doch ließ sich trotzdem eine Mitreaktion auf art-heterologe Sera nicht nachweisen.

Versuch wie der vorhergehende, Lysin $\frac{1}{650}$. Ablesung nach 1 Stunde 37°.

Immunsere gegen Kaninchen-	Cocto- eiweiß	Formalin- eiweiß	Formalin- eiweiß	Kochsalz- lösung
Nummer der Immunsere	423	429	431	
Formalineiweiß Kaninchen	f. k.	0	0	f. k.
„ Pferd	f. k.	s. st.	f. k.	f. k.
„ Rind	f. k.	s. st.	f. k.	f. k.
„ Huhn	f. k.	s. st.	f. k.	f. k.
Kochsalzlösung	f. k.	s. st.	f. k.	f. k.

Zusammenfassung.

Das Eiweiß des Kaninchenserums gewinnt durch Behandlung mit alkoholischer Schwefelsäure die Eigenschaft, bei Kaninchen als Antigen zu wirken und ein gleiches gilt für das mit Formaldehyd und dann mit Alkohol behandelte Serumeiweiß des Kaninchens.

Die erhaltenen Immunsere wirkten nur auf das der Bereitung nach homologe Kaninchenantigen.

Die Sere der erstgenannten Art sind nicht artspezifisch (Wirkung auch auf Pferde- und Hühnereiweiß), wohl aber die Sere gegen Formalineiweiß. Der Verlust der serologischen Artspezifität ist demnach keine notwendige Bedingung für die homologe Antigenwirkung eines veränderten Eiweißkörpers, wenn auch vermutlich die Zerstörung der Artspezifität (bei überhaupt noch erhaltener Antigeneigenschaft) hinreicht, um diesen Effekt herbeizuführen.

Nachdruck verboten.

[From the Department of Experimental Pathology in the Medical College of Cornell University, New York City.]

The Site of Reaction in Anaphylactic Shock.

By **Arthur F. Coca.**

With 1 figure in text.

(Eingegangen bei der Redaktion am 19. Dezember 1913.)

It has been thoroughly established that the symptoms by which the condition of specific hypersensitiveness or anaphylaxis is recognized are due primarily to the interaction of antigen and antibody, though in what way such interaction causes the symptoms is not known. Before the mechanism of the anaphylactic reaction could be discovered it was necessary to determine the site of the reaction. The choice, here, lay obviously between the body fluids and the fixed tissues. The earliest conceptions of this question favored the fixed tissues as the site of the reaction (Besredka and Friedberger) but most of the later work has been devoted to the support and development of the different forms of the humoral theory (Vaughan, Friedemann, Friedberger, Abderhalden, De Waele and others).

A significant objection to the humoral hypothesis is found in the well-known fact (Nicolle, Otto, Doerr and Russ, R. Weil) that the mere presence of sensitizing antibodies in the circulation is not sufficient to cause the condition of hypersensitiveness, a considerable interval of time being required, after the intravenous injection of an immune serum, before passive hypersensitiveness is developed. This fact, which was considered by Doerr and Russ¹⁾ as pointing to a cellular reaction site in passive anaphylaxis, can be brought into harmony with the humoral theory of anaphylaxis only by

1) These authors wrote: „Man muß daher annehmen, daß zunächst eine Verankerung des anaphylaktischen Immunkörpers an Organzellen stattfindet, die eine gewisse Zeit benötigt; erst dann wirkt die Antigenzufuhr deletär“ (Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 3, 1909, No. 2).

assuming a change on the part of the introduced antibodies, which takes place within the circulation of the recipient animal during the latent period.

Such a change was in fact believed by Biedl and Kraus to have been demonstrated by them in a publication entitled „Ueber Aktivierung des anaphylaktischen Reaktionskörpers durch Passage“¹⁾. The observations offered by these investigators in support of their assumption were as follows:

1) The serum of guinea-pigs that had been actively sensitized to horse serum caused no symptoms when mixed with horse serum and injected intravenously into normal guinea-pigs.

2) If the serum of such actively sensitized guinea-pigs was injected intraperitoneally into normal guinea-pigs and these animals were bled to death one hour later, a mixture of the collected blood or serum with horse serum was toxic when injected intravenously into normal guinea-pigs; the collected blood was not toxic if injected intravenously without being mixed with horse serum.

Analysis of the protocols of Biedl and Kraus shows that the experiments are incompetent to explain the latent period in passive sensitization. The inadequacy of their experiments in this respect lies in the fact that whereas the “activation” of the anaphylactic antibodies according to the authors was accomplished by one hour “passage”, the animals themselves that had received the injection, intravenously or intraperitoneally, of the serum of actively sensitized guinea-pigs had not become passively sensitized at the end of one hour. Indeed, in a second series of experiments with dogs the amount of blood (10 c. c.) that was transferred from the actively sensitized dog to the normal dog was not sufficient to sensitize the latter in 48 hrs. Moreover, there is no evidence in the protocols of Biedl and Kraus as to whether the separate injection of “activated” anaphylactic serum and the horse serum would have caused symptoms. In other

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 4, 1910, p. 119.

Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Orig. Bd. XX.

words, the question whether by "passage" the anaphylactic serum acquires the property of immediately sensitizing the recipient animal remains unanswered.

This question has been taken up recently by Weil¹⁾. Ten minimal sensitizing amounts (1.0 c. c.) of the serum of an immunized guinea-pig were introduced by Weil into the peritoneum of normal guinea-pigs and after 24 hours these guinea-pigs were bled to death and the entire collected blood of each animal was injected, again intraperitoneally, into a second series of normal guinea-pigs. These last animals were then tested at increasing intervals as to their hypersensitiveness and it was found that this condition was not fully established in two of the animals after periods of 1½ and 3 hours respectively but was so in the third guinea-pig at the end of a 6 hour interval, which was the same time required for the appearance of complete hypersensitiveness in the control series.

It is necessary in accepting the conclusion drawn by Weil from this experiment to make a reservation on account of his use of the intraperitoneal route in making the sensitizing transfers. In the control series 5 minimal sensitizing amounts of immune serum were injected whereas in those receiving the immune serum after 24 hours "passage" there might have been only one sensitizing quantity available in the transferred blood so that here, conceivably, the absorption time from the peritoneum was to be considered a factor in the delayed appearance of full hypersensitiveness. Moreover, owing to the small number of animals used there is not adequate assurance in Weil's experiment that the transfers of blood from guinea-pigs No. 4 and 5, to No. 7 and 8 would actually have resulted, after a longer interval, in a complete sensitization of the latter animals.

In view of the importance of the question of "activation" to the humoral theory in its relation to passive hypersensitiveness Weil's experiment was repeated as follows:

Between Aug. 6, 1913 and Oct. 11, 1913 rabbits No. 9 and No. 10 received 11 intraperitoneal injections of from 6 to

1) Journ. of Medical Research, Vol. 27, 1913, No. 4.

12 c.c. of the white of hen's egg. On Oct. 20, nine days after the last injection, serum was obtained from these rabbits and 0.3 c.c. of that from No. 9 was injected intravenously into each of 6 normal guinea-pigs weighing between 200 and 240 gr. each. The development of passive hypersensitiveness to egg-white was followed in these animals by injecting 0.3 c.c. of egg-white intravenously at increasing intervals, as indicated in table I, in which the results of the experiment are shown.

Table I.

Showing the development of passive hypersensitiveness in guinea-pigs after the intravenous injection of the serum of immune rabbit No. 9.

Guinea-pig	Interval after the sensitizing injection	Result
1	2 hours	† in a few minutes
2	2 "	no symptoms
3	3 $\frac{1}{2}$ "	† after $\frac{1}{2}$ hour
4	5 "	† " 12 minutes
5	6 "	† in 2 $\frac{1}{2}$ minutes
6	6 "	† " 2 $\frac{1}{2}$ "

It is seen that only one of the 6 guinea-pigs was fully sensitized within five hours after the introduction of the immune rabbit's serum, whereas both of the animals that were tested at 6 hrs. were found to be thoroughly hypersensitive to the egg-white.

In the evening of the same day 9 normal guinea-pigs weighing between 550 and 650 gr. received an intravenous injection of 2.0 c.c. each of a mixture of sera no. 9 and no. 10 without exhibiting toxic symptoms. On the following morning, that is, after an interval of 12 hrs. these 9 animals were bled to death and the serum that was obtained by defibrination and centrifugation of the collected blood was mixed. This mixed serum was then injected intravenously in quantities of 8.0 c.c. each into 9 normal guinea-pigs No. 1 — No. 9 weighing between 300 and 350 gr. The development of passive hypersensitiveness in these animals was tested by the intravenous injection, at increasing intervals, of 0.3 c.c. of egg-white. The results of these tests are shown in table II.

Table II.

Showing the latent period in passive sensitization after "passage".

Guinea-pig	Interval after receiving 8,0 c. c. of combined sera of passively sensitized guinea-pigs	Result
1	1/2 hour	no symptoms
2	1 "	" "
3	2 "	mild symptoms; recovered
4	3 "	no symptoms
5	20 "	† in a few minutes
6	20 "	† " " " "
7	20 "	† " " " "
8	20 "	† " " " "
9	20 "	mild symptoms; recovered

It is seen that of the four animals that were tested within three hours after having received the injection of the combined sera from the first series of passively sensitized guinea-pigs only one showed any sign of hypersensitiveness, whereas of the five that were tested after a longer interval all were found to be thoroughly sensitized excepting one, which responded with distinct though only mild symptoms.

The experiment confirms the results obtained by Weil and shows conclusively that the latent period in passive sensitization is not due to a process of "activation" of the transferred antibodies in the circulation. This latent period, therefore, remains as an unsurmounted obstacle to the acceptance of the humoral theory of anaphylaxis.

Another objection to the humoral theory is presented by facts relating to the passive form of anaphylaxis, that are in striking contrast with those we have just been considering. It is known, namely, that antibodies of foreign origin are rapidly eliminated from the circulation into which they have been artificially introduced. Some experiments of R. Weil¹⁾ show very clearly the rapid diminution of sensitizing antibodies in the circulation of passively sensitized guinea-pigs although the hypersensitiveness of these animals persisted. The suggestion inevitably presents itself and it is adopted by Weil in the discussion of his observations, that there is a

1) loc. cit.

stage in passive anaphylaxis in which there is complete hypersensitiveness, yet there are actually no sensitizing antibodies in the body fluids of the sensitized animal. It is true that while the method employed by Weil failed in some instances to reveal any sensitizing antibodies remaining in the circulation after 48 hrs. the technical limitations of the procedure preclude the possibility of proving the entire absence of those antibodies.

Furthermore, the observed persistence of hypersensitiveness for seventy days after passive sensitization was almost certainly not due, as Weil believes, to the persistence of foreign immune bodies but was probably due to a superinduced active sensitization caused by the transference of small quantities of antigen, which was still present in the immune serum. The partial hypersensitiveness resulting from the second transfer into guinea-pig No. 5 of Weil's table V favors this view and at the same time offers a potent objection to his assumption that the fatal results obtained with guinea-pigs No. 1 and 2 represented a cellular anaphylactic reaction. The observations, however, do not support the humoral theory of anaphylaxis.

In the publication to which we have already referred Weil has presented some experiments that explain very satisfactorily the relative resistance of guinea-pigs that have been "immunized" with larger injections of antigen. Weil's conclusion is that such guinea-pigs are "protected" by an excess of antibodies in the blood, and this conclusion is borne out by the fact, demonstrated by him, that actively or passively sensitized guinea-pigs can be protected from the effect of a number of fatal doses of the antigen by the previous injection of immune guinea-pig's serum or immune rabbit's serum respectively.

These same observations were also used by Weil as an argument pointing to a cellular reaction site in anaphylactic shock and it is evident that they can readily be explained on the basis of the cellular hypothesis. It is also possible, however, to interpret the observations in terms of the humoral theory according to Friedberger's well-known views of the mechanism of anaphylactic shock. In a publication with

Vallardi¹⁾ Friedberger demonstrated the protective effect of an excess of antibodies in the production of "anaphylatoxin" in vitro. It does not seem permissible, therefore, to look upon Weil's "protection" experiments as offering direct evidence of a cellular site in general anaphylactic shock.

Excepting the possibility that the anaphylactic reaction takes place in the fixed tissues but requires the cooperation of some element that is found only in the body fluids, the ideal condition under which the cellular theory of the anaphylactic reaction can be investigated is obtained by isolating from the body fluids the fixed tissues of a sensitized animal and testing them as to their hypersensitiveness to the respective proteid.

The first to attempt the realization of this condition was Manwaring²⁾. Manwaring sensitized a dog weighing 4 kilos with horse serum and then after carrying out a crossed or mutual transfusion between the sensitized dog and a normal dog weighing 5 kilos, he transfused blood into the sensitized dog from another normal dog that weighed 14 kilos. At the end of the first transfusion the normal dog was found to have been passively sensitized to horse serum, and at the end of the second transfusion the actively sensitized dog was found to be still typically hypersensitive to horse serum, although a large part of the animal's blood had been removed by the two operations. Manwaring believes not only that all of the blood of the actively sensitized dog was displaced but that the lymph of the animal was also eliminated by the transfusions. This belief, however, is not supported by a calculation of the volume of blood that was actually available for the purpose of displacement during the two transfusions.

It may be fairly estimated that during the first transfusion about $\frac{5}{9}$ of the sensitized dog's blood was exchanged for an equal volume of the blood of the normal dog, thus leaving $\frac{4}{9}$ to be removed. If the second transfusion was crossed it resulted in an unremoved residue of $\frac{4}{9} \times \frac{4}{18}$ or a

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 7, 1910.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 8, 1911, No. 1.

little more than $\frac{1}{10}$ of the original volume. If, however, the second transfusion was not crossed (Manwaring, in his protocol, is not explicit on this question) then, assuming that the normal dog or, donor, was bled to death during the transfusion, and estimating that about one-half of the donor's entire blood was available for the purpose of displacement (this proportion being equivalent to about $1\frac{1}{2}$ volumes of the sensitized dog's entire blood) according to our own experiences in the perfusion of guinea-pigs the unremoved residue might have been reduced to as little as 5% of the original amount of the sensitized dog's blood.

Evidence is lacking in the protocols of Manwaring's experiments to show that this calculated residue did not contain a quantity of sensitizing antibodies sufficient to account for the symptoms of hypersensitiveness to horse-serum that were elicited after the end of the two transfusions in the actively sensitized dog. With this slight reservation, however, Manwaring's experiment may be considered as supporting the cellular theory of the anaphylactic reaction.

The results of De Waele's¹⁾ transfusion experiments in rabbits cannot be used in the present discussion on account of the uncertainty as to the nature of the effect described by this investigator as occurring upon the second injection of Witte's peptone. That peptone is not generally available as an anaphylactogen was shown in some unpublished experiments by Doerr and Russ²⁾, who failed altogether to cause hypersensitiveness in guinea-pigs either with Witte's peptone or with "Seidenpepton".

More successful tissue isolation was obtained by Schultz³⁾ who was able to demonstrate some differences in the reaction to normal horse serum of the intestinal musculature of sensitized and of normal guinea-pigs.

Employing a technique similar to that of Schultz with the perfused and isolated uterine muscle, Dale⁴⁾ has finally

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, p. 193.

2) Cited by Doerr, Zeitschr. f. Immunitätsf., Ref., Bd. 1, 1910, p. 84.

3) Journal of Pharmacy and Exp. Therap., 1910, p. 549.

4) Journal of Pharmacy and Exp. Therap., Vol. 4, 1913, No. 3.

proven, beyond reasonable doubt, the intrinsic hypersensitiveness to the specific antigen of that tissue in sensitized guinea-pigs.

It has already been suggested that the anaphylactic reaction that takes places in the fixed tissues might require the cooperation of some element of the body fluids. Such a possibility, however, seems to be excluded for hypersensitive unstriped muscle by Dale's experiments with the perfused muscle.

Dale's results are in entire agreement with the previous observations upon the behaviour of the bronchial musculature of the guinea-pig during the general anaphylactic shock, and since the bronchial spasm is usually of sufficient intensity conceivably to constitute the sole cause of death, it is justified to assume that in the general manifestation of anaphylaxis, referred to as "the anaphylactic shock", the conclusion reached by Dale, that the site of the reaction is cellular, is, also, applicable. It is not to be overlooked that the demonstration of the intrinsic hypersensitiveness of the fixed tissues in sensitized animals does not, of itself, exclude the possibility of a humoral reaction as a factor in the production of the general anaphylactic shock. The reaction conceivably could take place in both situations. Furthermore, it is possible and, indeed, probable that the anaphylactic reaction takes place in other tissues beside unstriped muscle, and that the symptoms of general anaphylactic shock are, in part, due to the effect of the reaction in those situations. One is reminded, here, of the early experiments of Besredka in which the test-injection was made into the central nervous system.

The purpose of the present investigation was, however, to show that after the possibility of a humoral reaction has been excluded by a method of general tissue isolation the condition of general hypersensitiveness as exhibited in the anaphylactic shock is still retained. The plan adopted for the purpose was to substitute another fluid, usually the defibrinated blood of normal guinea-pigs for the blood of the sensitized guinea-pig and then to demonstrate that the perfused animal is still hypersensitive to injection of the appropriate proteid.

Technique.

The perfusion of the guinea-pigs was carried out by introducing the desired fluid — saline solution or blood — into the external jugular vein through a paraffined, curved, platinum-iridium needle at the same time that the animal was being bled from the opposite carotid artery. The perfusion fluid was kept at a temperature of from 40° C down to 39° C by being placed in a Liebig's condenser, through the jacket of which warm water was passed from a large protected glass bottle. The perfusion apparatus is shown in the accompanying photograph. The capacity of the inner tube of the condenser is 60 c. c., which is divided into four equal portions by the three constrictions in the tube.

The blood that was collected from the carotid artery was poured into a graduated cylinder in order that the volume of inflow and outflow could be constantly compared. In every experiment ten cubic centimeters of blood

were drawn from the artery before the perfusion was begun and the bleeding was then so regulated that during the greater part of the operation the amount of fluid infused was 5 to 10 c. c. in excess of the amount withdrawn. In some of the experiments the perfusion was inter-



rupted several times with intervals of a few minutes. Before the infusion of blood was resumed at the end of such intervals, the bleeding from the carotid was usually carried so far that the blood issued not in a stream but by drops. By this means the elimination of the animal's own blood was further assisted. The perfusion usually lasted from 25 to 40 minutes.

Preliminary experiments in perfusion of normal guinea-pigs

In order to determine what part of the perfused animal's blood is removed under the conditions of the experiment, normal animals were perfused with warmed Ringer's solution (0.9 % NaCl, 0.02 % KCl and 0.02 % CaCl₂) and the corpuscular sediment in the last portion of blood collected from the carotid artery was compared with the corpuscular sediment in the animal's blood that was obtained before the perfusion was begun. In one such experiment the complement content of the blood obtained from the artery before the perfusion was compared with that of the fluid obtained from the artery at the end of the perfusion. The results of these experiments are shown in table.

Table III.

Weight of animal	Amount of fluid infused	Composition of the perfusion fluid	Percentage of corpuscular sediment in the blood first drawn	Percentage of corpuscular sediment in the blood at the end of the perfusion	Estimated percentage of blood remaining in the perfused animal	Complement content of the blood first drawn	Complement content of blood drawn at the end of the perfusion
gms.	c. c.						
600	65	Ringer's fluid	50 %	3.0 %	6.0 %	—	—
900	120	" "	50 %	0.8 %	1.6 %	—	—
668	65	" "	50 %	2.2 %	4.4 %	$\frac{1}{300} = \text{C.H.}$ $\frac{1}{600} = \text{St.H.}$	$\frac{1}{10} = \text{C.H.}$ $\frac{1}{20} = \text{St.H.}$
271	90	normal guinea-pig's corpuscles suspended in guinea-pigs heated serum	—	—	—	$\frac{1}{400} = \text{C.H.}$ $\frac{1}{800} = \text{M.H.}$	$\frac{1}{10} = \text{M.H.}$ $\frac{1}{20} = \text{M.H.}$

C.H. = Complete hemolysis, St.H. = Strong hemolysis, M.H. = Moderate hemolysis.

It is seen that at the end of the perfusion in the first experiment all but 6 % of the animal's blood had been re-

moved. In the third experiment in which a relatively larger amount of fluid was used for the perfusion all but 1.6 % of the animal's blood had been removed. In the second experiment there is a satisfactory agreement in the results of the estimation of the residual blood by the two methods of examination — i. e., 4.4 % by comparison of the corpuscular sediment and $3\frac{1}{8}$ % by comparison of the complement content of the intravascular fluid before and at the end of the perfusion.

Preliminary experiments in perfusion of normal guinea-pigs were carried out, also, with the pooled defibrinated blood of normal guinea-pigs. In some instances the blood used for the perfusion had not been subjected to any treatment excepting the defibrination. In other experiments the serum of the blood that was used for the perfusion had been separated and heated for one half hour at 55° C and was then cooled and mixed again with the corpuscular sediment, which, in the meantime had been twice washed with two volumes of saline solution. The animals thus treated usually died during the night following the operation; one, however, that had been perfused with normal defibrinated guinea-pig's blood (serum unheated) lived indefinitely*).

*) In the experiments in which the serum of the blood that was used for the perfusion had been heated, the complement content of the intravascular fluid obtained before and after the perfusion was determined. The result of these complement determinations not only bear upon the subject of this investigation but offer confirmation of some previous experiments upon the production of complement.

While the source of complement remains unknown there is at hand some information bearing upon its production. This information concerns chiefly the rate of production and the relation of the leucocytes to the formation of complement.

That complement is constantly and rapidly formed has been demonstrated by Schütze and Scheller¹⁾. These authors found that the blood of rabbits that had been immunized against goat's blood corpuscles could be made apparently free from complement by the intravenous injection into them of large quantities of goat's blood. They then observed that within 2 to 3 hours after such an injection the complementary function of the rabbit's blood was completely restored. In later experiments²⁾ Schütze

1) Zeitschr. f. Hyg., Bd. 36, 1901, p. 270.

2) loc. cit., p. 459.

The preliminary experiments that have been described demonstrate that with the method of perfusion adopted it is

and Scheller showed that the regeneration of complement is prevented by a coincident infection with hog-cholera. In the recent confirmatory study of Lippmann and Plesch¹⁾ it was found that the regeneration of complement in guinea-pigs occurs also after the destruction of the bone-marrow and the leucocytes of the blood by injections of large quantities of Thorium X.

Meyer and Emmerich²⁾ in the course of a study of paroxysmal hemoglobinuria, observed what they interpreted to represent a local production of complement. Having found that immediately after an attack of hemoglobinuria the blood of their patient, obtained in the usual manner, was, by their method of examination, entirely wanting in complementary function, they placed a ligature about one of the patient's fingers during such an attack and immersed it in cold water. With the blood obtained from the ligated finger after being thus chilled, complementary action could be demonstrated, although this function was still lacking in the blood that was obtained simultaneously from another finger which had not been ligated nor chilled.

While it is possible that the increase in the complementary function of the blood observed by Meyer and Emmerich in the experiment just cited was due to a local production of complement some unpublished experiments that were carried out in this laboratory by Dr. Robert A. Cooke offer another explanation of that phenomenon. Cooke exposed the defibrinated blood of three normal human individuals for $\frac{1}{2}$ hour to a low temperature (2° — 4° C) and compared the complementary activity of the blood before and after the chilling. In one of the three cases the complement content of the blood was apparently unaltered by the treatment, but in the two other cases the complementary activity was increased 100 %, that is, it was doubled. The fact that this increase in complementary activity took place only at a low temperature makes it most improbable that it was due to a new formation of complement, and the same consideration should be urged in objection to the conclusion drawn by Meyer and Emmerich from their observation, which may be looked upon as a phenomenon similar in its mechanism to that observed by Cooke.

Our own experiments in which the production of complement seems to be demonstrated are as follows:

1) A guinea-pig, weighing 535 gr., was bled from the carotid artery and at the same time it received into the external jugular vein an infusion of normal guinea-pig's blood, the serum of which had been heated for 35 minutes at 55° C and then mixed again with the washed corpuscular sediment. 45 c. c. of the blood was infused and 40 c. c. of blood was drawn

1) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, 1913, p. 548.

2) Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 44, 1909, p. 308.

possible, with a quantity of perfusion fluid equal to twice the estimated volume of the guinea-pig's blood No. 668 and 600,

from the artery. The first 5 c. c. that was collected from the artery was defibrinated and designated "first running". After an interval of 5 minutes a second portion of 45 c. c. was infused and an equal quantity was taken from the artery. After a second interval of five minutes the last portion of 60 c. c. was infused and 55 c. c. were taken from the artery. After a third interval of three minutes 5 c. c. were collected from the artery and defibrinated; this portion was designated "last running". After a final interval of $1\frac{1}{2}$ hours 5 c. c. were obtained from the heart and designated "heart's blood".

The complement content of the three collected portions of blood was found to be:

First running — $\frac{1}{800}$ = complete Hem., $\frac{1}{800}$ = strong Hem., $\frac{1}{1200}$ = partial Hem.

Last running — $\frac{1}{80}$ = complete Hem., $\frac{1}{100}$ = partial Hem.

Heart's blood — $\frac{1}{100}$ = complete Hem., $\frac{1}{200}$ = very strong Hem.

According to these results there was about 8 % of the original amount of complement in the last running and about 20 % in the heart's blood taken $1\frac{1}{2}$ hours after the end of the perfusion.

2) The second experiment was carried out with a defibrinated blood mixture prepared exactly as in the first experiment. 130 c. c. of the mixture were infused into a guinea-pig weighing 480 gr. in portions of 25–30 c. c. at two minute intervals, the collected portions of blood being "first running"; "last running", taken immediately after the end of the perfusion; "4 minute blood", taken 4 minutes after the end of the perfusion; and " $1\frac{1}{2}$ hr. blood", taken $1\frac{1}{2}$ hr. after the end of the perfusion.

The complement content of these four portions was found to be:

1 st. running, $\frac{1}{400}$ = C.H., $\frac{1}{800}$ = strong H., $\frac{1}{800}$ = slight H.

Last running, $\frac{5}{100}$ = C.H., $\frac{2}{100}$ = strong H., $\frac{15}{1000}$ = partial H.

4 minute blood, $\frac{15}{1000}$ = C.H., $\frac{1}{100}$ = strong H., $\frac{75}{10000}$ = partial H.

$1\frac{1}{2}$ hr. blood, $\frac{75}{10000}$ = C.H., $\frac{5}{1000}$ = slight H.

In this experiment there was about 8 % of the original amount of complement in the "last running", 16 % in the 4 minute blood and 30 % in the blood taken a little over an hour later

Against the assumption of a constant formation of complement as an explanation of the rapid and considerable increase of this function in the blood of the perfused guinea-pigs the suggestion may be made that the increase was due to the constant addition of complement to the blood from the lymphatic circulation.

The rate of flow of the lymphatic circulation has been estimated by Heidenhain in dogs at about $2\frac{1}{2}$ c. c. per hour per kilo of animal. In man the rate has been estimated by Munk and Rosenstein at from one to two cubic centimeters per hour per kilo.

to remove all but $4\frac{1}{2}$ to 6 % of the animals blood without causing its immediate death; while with three volumes or more, No. 900 and 271, all but about $1\frac{1}{2}$ % or less may be removed.

These facts having been established the next question that presented itself was whether the degree of tissue isolation obtained by the method was sufficient for the intended purpose. In other words, would there not be sufficient antibodies in the fraction of the sensitized guinea-pig's blood that remained

If the rate of flow of the lymphatic circulation in the guinea-pig is proportionately the same as it has been found to be in the two instances referred to, the addition of lymph to the blood circulation in a 500 gr. guinea-pig would be about 1.0 c. c. per hour or about 4 % of the entire volume of the animal's blood. Therefore, if the complement content of the lymph is not greater than that of the blood — and from the experiments of Pagano¹⁾, Falloise²⁾, Batelli³⁾ and of Hughes and Carlson⁴⁾ that of the lymph would appear to be usually less — then the increase in complement in the blood of the perfused animals that could be accounted for by the addition from the circulation would be about 4 %.

The increase in complement observed in the perfused guinea-pigs was in one instance from 8 % to 20 % — an increase of 12 % — in $1\frac{1}{2}$ hrs., and in the second experiment, from 16 % to 30 % — an increase of 14 % — in $1\frac{1}{4}$ hrs. In both cases, therefore, there was an increase of about 10 % per hour or $2\frac{1}{2}$ times the estimated hourly addition from the lymph. Hence the experiments may be looked upon as confirming in guinea-pigs the demonstration previously made in rabbits of a constant, rapid production of complement.

In both of the foregoing experiments more complement was found in the blood at the end of the perfusion than was found in the two experiments of table III in which a comparative determination of complementary strength was made. This discrepancy is explained by the fact that the operation of perfusion in the experiments of table III was conducted rapidly, requiring only 5 to 10 minutes, whereas in the experiments just described the perfusion was carried out much more slowly — requiring 25 to 40 minutes. The difference in the amount of complement found at the end of the perfusion in the two series of experiments no doubt represents a part of the complement addition made to the blood circulation during the longer perfusion time from the lymph circulation and from the sources of complement production.

- 1) Archives italiennes de biologie, Vol. 20, 1894, p. 110.
- 2) Bulletin de academie royale de Belgique, 1903, No. 6.
- 3) Compt. rend. soc. biol., T. 56, 1904, p. 99.
- 4) Amer. Journ. of Physiol., Vol. 21, 1908, p. 236.

in the animal after the perfusion to account for any reaction which might be caused by the subsequent injection of the proteid that had been used for the sensitization?

Since, in all the perfusion experiments that were carried out with sensitized guinea-pigs, crystalline egg-albumen had been used for the sensitization, some light is thrown upon this question by the following experiments:

A number of guinea-pigs were given a subcutaneous injection of 0.05 c. c. of a 3½% solution of crystalline egg-albumen and after 16 days ten of these animals were tested as to their hypersensitiveness with an intravenous injection of 0.4 c. c. of the same proteid. All of the ten guinea-pigs died within a few minutes after this second injection and showed the symptoms and the gross anatomical changes that are characteristic of anaphylactic shock. From this result it can be safely assumed that all of the other animals of the series were similarly hypersensitive.

With the blood of the other sensitized animals the method of passive transference of the hypersensitiveness to normal guinea-pigs was employed with the purpose of learning whether sensitizing antibodies were present in the blood and in what quantity.

21 of the sensitized guinea-pigs were bled to death and the entire amount of blood obtained from each animal was injected into the peritoneal cavity of a normal guinea-pig. The blood was obtained, after the animals had been made insensible with ether and after the skin had been removed from the entire chest, by opening the chest wall widely and cutting open the auricle of the heart. Care was taken not to cut the heart in any other place. By this method more than half of the entire calculated amount of blood was obtained from each guinea-pig.

Out of the 21 blood transfers 9 resulted in a transference of fatal hypersensitiveness (tested with 300 minimal lethal doses of the egg-albumin solution) and two resulted in a transference of moderate hypersensitiveness. In these two instances the recipient animals upon being tested, on the day following the blood transfer, with an intravenous injection of crystalline egg-albumen immediately became sick but ultimately recovered.

None of the remaining ten guinea-pigs was found to have become even slightly hypersensitive to large injections of the egg-albumin through the transfer of blood from the actively sensitized animals.

In making the transfers the following amounts of blood were available: for the nine guinea-pigs that acquired a fatal hypersensitiveness; 6, 8, 8, $7\frac{1}{2}$, 6, 7, $7\frac{1}{2}$, 8 and 8 c.c. respectively; for the two guinea-pigs that became only moderately hypersensitive, 18 and 7 c.c.; and for the ten guinea-pigs that showed no symptom of hypersensitiveness after the transfer, 16, 12, 8, 8, $7\frac{1}{2}$, $8\frac{1}{2}$, 7, $6\frac{3}{4}$, 7 and $7\frac{1}{2}$ c.c. respectively. The recipient guinea-pigs weighed between 200 and 240 gr.

From six of the actively sensitized guinea-pigs quantities of 4 or 5 c.c. of defibrinated blood were transferred to normal guinea-pigs. None of these transfers resulted in a passive sensitization of the recipients although in two instances the passive transfer of hypersensitiveness was successful with larger quantities (8 c.c.) of the same individual's blood.

The wide difference in the sensitizing value of the blood of the different individuals, as shown in the foregoing experiments, made it seem inexpedient to carry any further the attempt to determine the smallest amount of blood with which it might be possible passively to transfer hypersensitiveness from a guinea-pig that has been actively sensitized with a single small injection of crystalline egg-albumin. However, the experiments just described make it seem unlikely that this minimal quantity would ever fall below 6 c.c. of the defibrinated blood.

In each of the two perfusion experiments, which are now to be described, that were carried out with actively sensitized guinea-pigs the quantity of fluid perfused was equal to five times the volume of the animal's blood; hence if the quantity of the animals blood that was not removed by the perfusion was not more than $1\frac{1}{2}\%$, as our preliminary experiments would indicate, this residue in either animal was less than 0.5 c. c.

It seems permissible, therefore, to conclude that the symptoms of hypersensitiveness that were elicited in the two

actively sensitized guinea-pigs after perfusion were not dependent upon the antibodies that might have been present in the unremoved residue of the animal's blood, but to antibodies situated elsewhere, that is, in the fixed tissues.

The protocols of these two experiments follow.

1) A guinea-pig weighing 366 gr. that two months previously had received 0.1 c.c. of a 3½% solution of crystalline egg-albumin by subcutaneous injection, was bled from the carotid artery and at the same time was given an infusion of the pooled defibrinated blood of four normal, male guinea-pigs into the opposite external jugular vein. 105 c.c. of the defibrinated blood were infused; two-thirds in the first 20 minutes and one-third in the next 5 minutes. 97 c.c. of blood were collected from the carotid artery.

After an interval of ½ hour, during which time the guinea-pig recovered from the effects of the ether and became lively and strong on its feet, 0.5 c.c. of a 3½% solution of crystalline egg-albumin was injected into the external jugular vein on the side from which the animal had been bled. Immediately upon being released again from the animal board the guinea-pig fell on its side and died within two minutes showing marked symptoms of dyspnoea but with only slight convulsive movements of the legs and ears. The chest was opened immediately after respiration had ceased and the heart was found to be still beating and filled with fluid blood and the lungs were greatly distended. There was a partial heart-block, the ratio of auricular to ventricular beat being 2 to 1.

On a basis of 5% of the body weight the estimated amount of the animal's blood was about 18 c.c. or less than one-fifth of the volume of defibrinated blood infused.

2) A guinea-pig weighing 542 gr. and having had the same previous treatment as the animal in the preceding experiment, received, during ten minutes, 130 c.c. of the pooled defibrinated blood of normal, male guinea-pigs into the external jugular vein, and during the same period 125 c.c. of blood were collected from the carotid artery. In this experiment the serum of the blood that was used for the perfusion had been heated for ¾ hour at 52° C and afterwards mixed with the washed corpuscles. After an interval of ½ hour after the end of the perfusion, during which time the guinea-pig had sufficiently recovered from the operation to be able to walk, 0.5 c.c. of the crystalline egg-albumin solution was injected intramuscularly¹⁾, Twenty minutes after this injection the guinea-pig showed marked signs of dyspnoea and lay down on its side. The respiratory

1) An accident had made intravenous injection impossible. Previous experiments had shown that the great majority of guinea-pigs that have been sensitized to egg-albumen can be killed with a subcutaneous injection of 0.1 c.c. of a 3½% solution of that proteid.

movements became progressively slower and more violent, then weaker and gasping in character till death occurred, without convulsions, ten minutes after the beginning of the symptoms. The autopsy showed the heart still beating and the lungs distended.

To sum up the experiments thus far described:

It has been shown that by perfusion of the guinea-pig's circulatory system with a quantity of fluid equal to two volumes of the animals entire blood, the unremoved residue of the guinea-pig's blood is about 4 to 6 % of the original amount.

When the perfusion is carried out with a quantity of fluid equal to three volumes of the animal's blood, all but 1.6 % is displaced and it may be assumed, therefore, that after perfusion with a quantity of fluid equivalent to five volumes of the animals blood the unremoved residue is less than $1\frac{1}{2}$ %.

It has been shown that the smallest quantity of the blood of guinea-pigs actively sensitive to egg-albumin with which it is possible to transfer fatal hypersensitiveness to another guinea-pig is about 6 c. c.

Two guinea-pigs that were actively sensitized to egg-albumin were perfused with five volumes of the defibrinated blood of normal guinea-pigs. The estimated residue of blood that was not displaced by the perfusion was in both instances less than 0.5 c. c. or less than $\frac{1}{12}$ of the minimal amount capable, under the most favorable circumstances, of establishing complete hypersensitiveness in a normal guinea-pig. Both of these guinea-pigs were shown after the perfusion to be still hypersensitive to the egg-albumin and the conclusion seems justified that the hypersensitiveness was not due to antibodies remaining in the circulation with the unremoved residue of blood but to those situated in the fixed tissues.

Perfusion experiments with passively sensitized guinea-pigs.

The serum of rabbit No. 513, which had received numerous large peritoneal injections of the white of hen's egg, was found to be capable of passively sensitizing a guinea-pig in a quantity of 0.1 c. c. Guinea-pigs No. 370, 179, 388 and 369 having received 0.4 c. c. of serum No. 513 by peritoneal injection were perfused and then tested, by intravenous injection as to

their hypersensitiveness to crystalline egg-albumin. These animals were found to be highly hypersensitive to the proteid after the perfusion, all four dying within a few minutes after the injection of the egg-albumin.

The perfusions with No. 370 and No. 179 were carried out on the day following the injection of the immune rabbit's serum; those with No. 388 and No. 369 were carried out on the third day after that injection. An intravenous injection of 0.5 c.c. of a 3½% solution of crystalline egg-albumin was used for the tests. With the first three animals the perfusion fluid consisted of 20 to 30 c.c. of Ringer's fluid followed with the defibrinated blood of normal guinea-pigs. With the last animal — No. 369 — the perfusion fluid consisted of normal guinea-pigs blood corpuscles suspended in Ringer's solution. The amounts of fluid perfused were:

Guinea-pig	Weight	Perfusion fluid, c.c.
No. 370	300 gr.	90
„ 179	300 „	90
„ 388	273 „	100
„ 369	342 „	120

Estimating the quantity of each animal's blood to equal 5% of the body weight, the amount of the perfusion fluid used in each instance compared with the entire amount of the animals blood was respectively 6, 6, 7 and 7 volumes. The interval of time between the end of the perfusion and the injection of the egg-albumin was respectively 1½ hrs., 10 minutes, 5 minutes and 2 minutes. With No. 369 a comparative determination of complementary activity was made in the blood that was obtained before the beginning of the perfusion, at the end of the perfusion and after death, from the heart. The results were as follows:

First running	$\frac{1}{600} = \text{C. H.}$	$\frac{1}{500} = \text{Strong H.}$
Last „	$\frac{1}{60} = \text{C. H.}$	$\frac{1}{100} = 0$
Heart's blood	$\frac{1}{60} = \text{C. H.}$	$\frac{1}{100} = 0$

No diminution in the amount of complement in the blood is demonstrated, by the preceding titration, between the end of the perfusion and the death of the animal by anaphylactic shock, although the intravascular fluid previous to the injection of the egg-albumin, contained so little

complement that relatively slight changes in the concentration of that reagent could have been detected. However, on account of the demonstrated rapid production of complement, it is not permissible to conclude from this result that complement took no part in the anaphylactic reaction. Indeed, the failure of the heart's blood to show a distinct increase in complementary activity as compared with that of the blood that was obtained several minutes previously offers some support to the belief that some complement was withdrawn from the circulation as a result of the anaphylactic reaction. It is certain, however, that the amount of complement withdrawn during the anaphylactic shock was relatively small.

The question as to the relation of complement to the anaphylactic shock cannot, therefore, be answered by these perfusion experiments; but here the analogous observations of Dale supply indirect evidence that indicates that the production of the general anaphylactic shock is not dependent upon the cooperation of complement and that the changes that have been noted in this constituent of the blood during the shock are incidental to the anaphylactic reaction, not essential to it.

The perfusion experiments with passively sensitized guinea-pigs are made the more significant by reason of the fact, which we have already discussed, that heterologous antibodies are quickly eliminated from the circulation of the animal into which they have been introduced. It is probable that at the time of the perfusion of guinea-pig's No. 388 and 369 — three days after the passive sensitization with 4 minimal sensitizing amounts of immune rabbit's serum — very little of the foreign antibodies remained in the circulation.

The evidence presented in the foregoing experiments is clearly incompatible with any humoral theory of anaphylaxis; for, on the one hand, no explanation is available for the fact that the presence in the blood circulation of any quantity of sensitizing antibodies is not of itself sufficient to establish hypersensitiveness, and, on the other hand, it has been shown that the removal from the circulation of those antibodies in an animal that has already become hypersensitive

does not result in a loss of the hypersensitiveness. The conclusion seems inevitable that the anaphylactic reaction takes place in the fixed tissues and not in the body fluids.

It follows, therefore, that the observations that have served as the basis of the different forms of the humoral theory have had to do with phenomena that are not concerned in the mechanism of the anaphylactic reaction.

Zusammenfassung.

1) Wenn sensibilisierende Antikörper in die Blutzirkulation eines anderen Tieres eingeführt werden, erleiden jene während der Latenzzeit keine Veränderung, die sie befähigen würde, bei der Einführung in ein zweites Tier sofortige Ueberempfindlichkeit hervorzurufen; die Latenzperiode der passiven Anaphylaxie ist daher auf Grund der Humoraltheorie der Anaphylaxie bis jetzt noch nicht erklärt.

2) Meerschweinchen wurden mit defibriniertem Blut anderer Meerschweinchen in solcher Menge durchspült, um schätzungsweise das Blut des Versuchstieres bis auf einen möglichst kleinen Rückstand zu entfernen. So behandelte Tiere konnten zumindest 6 Stunden nach der Durchspülung lebend erhalten werden.

3) Aktiv und passiv sensibilisierte Meerschweinchen, denen auf diese Weise ihr eigenes Blut entzogen wurde, blieben im höchsten Grade überempfindlich.

4) Nachdem Meerschweinchen mit Blutkörperchen in einem komplementfreien Medium durchspült und so das eigene Komplement auf ein Minimum (2—3 Proz.) reduziert worden war, konnte ein Wiederauftreten des Komplementes in der Zirkulation in kurzer Zeit beobachtet werden.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Hygienischen Institute der Deutschen Universität in Prag
(Vorstand: Prof. O. Bail)].

Immunistierungsversuche gegen den *Vibrio El Tor*¹⁾.

Von **Karl Rotky**,
Assistent am Institut.

(Eingegangen bei der Redaktion am 10. Februar 1914.)

In einer im Juli 1913 erschienenen Mitteilung²⁾ beschrieb ich Versuche, die ich über Anregung von Prof. O. Bail unternommen habe und die die Gewinnung eines antiaggressiven Immunserums gegen den *Vibrio El Tor* zum Zwecke hatten. Da wir in diesem *Vibrio* einen Halbparasiten besitzen, der sich vorübergehend auf die Infektionsstufe eines echten Parasiten bringen läßt, so erschien es nicht ausgeschlossen, durch ein ähnliches Verfahren, wie es bei Milzbrand, Schweinerotlauf und Hühnercholera zum Ziel führt, auch gegen *El Tor* ein Immunserum zu gewinnen, dessen Wirkung nicht auf Bakterizidie beruht, bezw. nach Entfernung der bakteriziden Komponente noch vorhanden ist.

Der *El Tor*-Stamm, mit dem die Versuche ausgeführt wurden, stammt aus dem hygienischen Institut in Breslau und ist derselbe, mit dem auch die in der ersten Mitteilung erwähnten Versuche angestellt wurden.

Abgesehen von der Möglichkeit einer klinischen Anwendung eines derartigen Immunserums kam die theoretische Bedeutung der Frage in Betracht, da es bisher noch nicht sicher gelang, gegen Halbparasiten eine andere als bakterizide und opsonische Immunität festzustellen.

Zur Morphologie der *El Tor*-Vibrionen sei folgendes bemerkt: Präparate aus Agar- oder älteren Bouillonkulturen zeigen das typische Bild der Cholera oder choleraähnlichen Vibrionen. Es sind zarte, gerade oder leicht gekrümmte Vibrionen von mittlerer Länge. In frisch angelegten (3—4-stündigen) Bouillonkulturen findet man überwiegend lange, zarte Spirillen mit zahlreichen Windungen. Injiziert man eine Aufschwemmung von Kultur-

1) Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Literatur in Böhmen.

2) K. Rotky, Prager med. Wochenschr., Bd. 38, No. 28.

vibrionen einem Meerschweinchen, so zeigt schon eine Entnahme nach einer halben Stunde, daß mit den Mikroorganismen eine auffallende Veränderung vor sich gegangen ist: Sie sind kürzer und dicker geworden. Diese Veränderung schreitet im Laufe der zweiten halben Stunde noch weiter fort und nach ungefähr einer Stunde haben sie sich so sehr verändert, daß sie das Aussehen von Vibrionen vollkommen eingebüßt und die Gestalt von kurzen, plumpen Stäbchen angenommen haben. Diese Veränderung, die wir im Sinne O. Bails als Animalisierung bezeichnen — eine pathologische Reaktion des Mikroorganismus auf die, die Lebensundurchdringlichkeit schützenden Kräfte des Mikroorganismus — tritt bei allen zu Versuchen verwendeten Tieren (Meerschweinchen, Kaninchen, Maus) in ähnlicher Weise auf, jedoch sehen die Vibrionen in der Maus meist etwas zarter aus als im Meerschweinchen. Sehr oft, indessen nicht regelmäßig, zeigen diese tierischen Vibrionen einen hellen Hof; ob hier an eine Andeutung einer Kapselbildung zu denken ist, bleibe dahingestellt.

Die Untersuchung der Wirkungsweise von Meerschweinchenleukocyten und Serum ergab ähnliche Resultate, wie sie Weil und Toyosumi¹⁾ für die Cholera 74 festgestellt haben, mit dem Unterschiede, daß das aktive Meerschweinchenserum allein nie bakterizid wirkte. Größere Differenzen zwischen tierischen und Kulturvibrionen konnten nicht festgestellt werden.

Die in den folgenden Versuchen angewendete Technik hält sich im wesentlichen an die von Weil²⁾ angegebene Methode; es sei daher nur kurz folgendes dazu bemerkt:

Die Meerschweinchenleukocyten wurden durch Intrapertonealinjektion von 20–30 ccm steriler Bouillon, die Kaninchenleukocyten durch Intrapleuralinjektion von 10–20 ccm Aleuronat gewonnen, 3mal mit NaCl gewaschen und pro Röhrchen in einer Menge von etwa 0,1 g verteilt. Normalödem und Exsudat, das als Kontrollflüssigkeit zum Aggressin, als welches Exsudat und Oedem infizierter Tiere verwendet wurde, diente, wurde durch subkutane bzw. intraperitoneale Injektion steriler Bouillon erzeugt. Zur Abtötung der Leukocyten wurde die Buchnersche Gefriermethode verwendet, und die Extraktionsflüssigkeit + Leukocytentrümmer geprüft. Als Versuchsdauer wurde eine Zeit von 4–5 Stunden angewendet.

Versuch I.

	Tier. Vibr.	Kult. Vibr.
0,5 Meerschw.-Ser. aktiv	unendlich	unendlich
0,5 „ + Leukocyten	60 000	„
(0,5 Ser. + „Leukocyten) gefroren	80 000	„
0,5 NaCl.	unendlich	„
0,5 „ + Leukocyten	3	100 000
(0,5 „ + „) gefroren	1 984	60 000
Einsaat	4 000	4 500

1) Weil und Toyosumi, Arch. f. Hygiene, Bd. 71.

2) Arch. für Hygiene, Bd. 74.

Versuch II.

	Tier. Vibr.	Kult. Vibr.
0,5 Ser. aktiv	unendlich	unendlich
0,5 " " + Leukocyten	150 000	100 000
(0,5 " + Leukocyten) gefroren	150 000	120 000
0,5 NaCl	unendlich	unendlich
0,5 " + Leukocyten	100 000	2 000
(0,5 " + ") gefroren	48 000	7 000
0,4 " + 0,1 Ser.	unendlich	—
0,4 " + 0,1 Ser. + Leukocyten	120 000	—
0,4 " + 0,1 Aggressin (sterilisiert mit Toluol)	unendlich	—
0,4 " + 0,1 " + Leukocyten	"	—
Einsaat	45 000	6 000

Versuch III.

Als Einsaat wurden nur tierische Vibrionen aus dem Subkutanödem eines infizierten Meerschweinchens verwendet, als Aggressin Oedem, das durch $\frac{1}{2}$ Stunde bei 56° sterilisiert wurde; auch das normale Kontrollödem wurde $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erwärmt.

0,49 NaCl + 0,01 norm. Oedem	unendlich
0,49 " + 0,01 " " + Leukocyten	8 000
0,49 " + 0,01 Aggressin	unendlich
0,49 " + 0,01 " + Leukocyten	2 160
0,45 " + 0,05 norm. Oedem	unendlich
0,45 " + 0,05 " + Leukocyten	35 000
0,45 " + 0,05 Aggressin	unendlich
0,45 " + 0,05 " + Leukocyten	12 000
0,4 " + 0,1 norm. Oedem	unendlich
0,4 " + 0,1 " + Leukocyten	100 000
0,4 " + 0,1 Aggressin	unendlich
0,4 " + 0,1 " + Leukocyten	3 808
0,5 NaCl	unendlich
Einsaat	40 000

Versuch IV.

Auch in diesem Versuche wird das Aggressin und das als Kontrolle verwendete Normalödem $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erwärmt, wodurch das Aggressin auch sterilisiert wurde. Zur Einsaat wurden tierische Vibrionen aus dem Subkutanexsudat eines infizierten Meerschweinchens verwendet.

0,49 NaCl + 0,01 Oedem	unendlich
0,49 " + 0,01 " + Leukocyten	124
0,49 " + 0,01 Aggressin	unendlich
0,49 " + 0,01 " + Leukocyten	1 260
0,45 " + 0,05 Oedem	unendlich
0,45 " + 0,05 " + Leukocyten	2 000
0,45 " + 0,05 Aggressin	unendlich
0,45 " + 0,05 " + Leukocyten	496
0,4 " + 0,1 Oedem	unendlich
0,4 " + 0,1 " + Leukocyten	18 000
0,4 " + 0,1 Aggressin	unendlich
0,4 " + 0,1 " + Leukocyten	1
0,3 " + 0,2 Oedem + Leukocyten	100 000
0,3 " + 0,2 Aggressin + Leukocyten	72
0,5 "	250 000
0,5 " + Leukocyten	1 500
0,5 Serum aktiv	300 000
0,5 " + Leukocyten	180 000
Einsaat	10 000

Versuch V.

In diesem Versuche, der dazu angestellt wurde, um festzustellen, ob auch nicht erhitztes Aggressin die anscheinend paradoxe Wirkung des auf 56° erwärmten zeigt, wurde als Aggressin Exsudat eines 250 g schweren Meerschweinchens verwendet, das durch 1-stündiges Schütteln mit Toluol sterilisiert worden war (was durch Agarausstriche bestätigt wurde). Als Kontrollflüssigkeit diente durch Injektion steriler Bouillon gewonnenes Normalexsudat, das ebenfalls 1 Stunde lang mit Toluol geschüttelt wurde. Aus beiden Flüssigkeiten wurde das Toluol durch Verdunsten entfernt. Das Material zur Einsaat lieferten die aus dem Exsudat des infizierten Tieres abzentrifugierten Vibrionen.

0,5 NaCl	300 000
0,5 „ + Leukocyten	28
0,5 aktives Meerschweinchenserum	unzählbar
0,5 „ + Leukocyten	300 000
0,49 NaCl + 0,01 Normalexsudat	unzählbar
0,49 „ + 0,01 „ + Leukocyten	5
0,49 „ + 0,01 Aggressin	unzählbar
0,49 „ + 0,01 „ + Leukocyten	3
0,45 „ + 0,05 Normalexsudat	unzählbar
0,45 „ + 0,05 „ + Leukocyten	716
0,45 „ + 0,05 Aggressin	unzählbar
0,45 „ + 0,05 „ + Leukocyten	32
0,4 „ + 0,1 Normalexsudat	unzählbar
0,4 „ + 0,1 „ + Leukocyten	14 000
0,4 „ + 0,1 Aggressin	unzählbar
0,4 „ + 0,1 „ + Leukocyten	337
Einsaat tierischer Vibrionen	300 000

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß der *Vibrio El Tor* sich am auffälligsten dadurch von Cholerastämmen¹⁾ unterscheidet, daß er durch aktives Meerschweinchenserum nicht abgetötet wird. Die Meerschweinchenleukocyten wirken in Kochsalzlösung außerordentlich stark, im aktiven Serum gar nicht oder höchstens insoweit, als sie eine Vermehrung verhindern. Durch Gefrieren wird im allgemeinen an der Wirkungsweise der Leukocyten nicht viel geändert. Normalexsudat und Oedem hindern die Leukocytenbakterizidie in hohem Maße, das als Aggressin bezeichnete Exsudat und Oedem infizierter Tiere zeigt in den Reagenzglasversuchen keine aggressive Wirkung, es hindert die Wirkung der Leukocyten nicht, oder doch viel weniger wie das Normalexsudat; der Charakter dieses „Aggressins“ zeigt sich in derartigen Versuchen ähnlich dem einer durch Bakterien erschöpften Körperflüssigkeit. Die Erscheinung, daß sich die Aggressinwirkung im Reagenz-

1) U. a. Bail und Suzuki, Arch. f. Hygiene, Bd. 73.

glasversuch nicht nachweisen läßt, ist ja von ähnlichen Versuchen mit anderen Infektionserregern her bekannt.

Es ist naheliegend, die Unwirksamkeit des Serums als eine Teilursache der gegen andere Cholerastämme so unvergleichlich höheren Infektiosität dieses Vibrio für das Meer-schweinchen anzusehen.

In weiteren, ebenfalls nur als Orientierungsversuche aufzufassenden Reagenzglasversuchen wurde die Wirkungsweise der Zellen und Säfte des Kaninchens auf El Tor-Vibrionen festzustellen versucht.

Versuch VI.

	Tier. Vibr.	Kult. Vibr.
0,5 akt. Kaninchenserum	3	2
0,5 „ „ + Leukocyten	5	4
0,5 Ser. + Leukocyten gefroren	7	3
0,5 NaCl	928	unzählbar
0,5 „ + Leukocyten	32	100 000
0,5 „ + „ gefroren	27	150 000
Einsaat	208	28 000

Die tierischen Vibrionen wurden aus dem Intrapertonealexsudat eines infizierten Kaninchens gewonnen.

Versuch VII.

	Tier. Vibr.	Kult. Vibr.
1,0 akt. Kaninchenserum	224	14
0,4 Ser. + 0,1 Normalödem	37 000	100 000
0,4 „ + 0,1 „ + Leukocyten	58 000	100 000
0,4 „ + 0,1 Aggressin	100 000	unzählbar
0,4 „ + 0,1 „ + Leukocyten	200 000	„
0,3 „ + 0,2 Normalödem	unzählbar	„
0,3 „ + 0,2 „ + Leukocyten	„	„
0,3 „ + 0,2 Aggressin	„	„
0,3 „ + 0,2 „ + Leukocyten	„	„
Einsaat	70 000	15 000

Die tierischen Bakterien aus dem Subkutanödem eines infizierten Kaninchens. Das als Aggressin verwendete Subkutanödem und das als Kontrolle verwendete Normalödem wurden $\frac{1}{2}$ Stunde auf 56° erwärmt, wodurch das Aggressin gleichzeitig sterilisiert wurde.

Die Zahl der Versuche ist zu gering, um daraus weitergehende Schlüsse zu ziehen, doch geht aus ihnen mit Sicherheit hervor, daß die El Tor-Vibrionen von aktivem Kaninchenserum abgetötet werden. Auch die Kaninchenleukocyten wirken in Kochsalzlösung; ob sie auch im Serum wirken, läßt sich wegen der Eigenwirkung des Kaninchen-

serums nicht feststellen. Auf 56° erhitztes Normalödem hindert die Bakterizidie des Kaninchenserums mit und ohne Leukocyten; noch mehr scheint das als „Aggressin“ bezeichnete Oedem infizierter Tiere die Bakterizidie zu verhindern.

Wie schon in der ersten Mitteilung erwähnt, war der El Tor-Stamm, den wir zu unseren Versuchen benutzten, durch lange saprophytische Züchtung auf eine sehr niedere Virulenz gesunken, hatte aber nach einigen Tierpassagen wieder rasch eine relativ hohe Infektiosität erreicht. Die niederste tödliche Dosis liegt für Meerschweinchen von 250 g um $\frac{1}{1000}$ Oese, und zwar sterben Tiere mit $\frac{1}{100}$ bis $\frac{1}{200}$ Oese intraperitoneal nach 5—8 Stunden, subkutan etwa 6—10 Stunden. $\frac{1}{1000}$ Oese tötete erst nach 1—2 Tagen.

Für Mäuse lag die in 5—7 Stunden tödliche Dosis unter $\frac{1}{100}$ Oese, bei beiden Arten der Infektion. Eine große Schwierigkeit, mit der wir während der ganzen Versuche zu kämpfen hatten, lag in der Labilität der Virulenz. So kommt es auch, daß sich die einzelnen Versuche schlecht miteinander vergleichen lassen, besonders was die Zeit betrifft, in der die Tiere sterben. Die Virulenz wird nicht nur durch wenige Ueberimpfungen auf Agar sehr rasch herabgesetzt, auch eine etwas erhöhte Brutschranktemperatur genügt, sie sehr zu verschlechtern, außerdem scheinen dabei noch ganz unkontrollierbare Umstände eine Rolle zu spielen. Auch gibt es unter den Mäusen einen gewissen Prozentsatz natürlich resistenter Tiere, die oft Infektionen von $\frac{1}{100}$ Oese überstehen. Daher war es nötig, eine außerordentlich große Zahl von Mäuseversuchen anzustellen, um Zufälligkeiten mit möglicher Sicherheit auszuschalten. Ich möchte hier darauf hinweisen, daß es den Anschein hat, als wäre die Virulenz einer bei Zimmertemperatur oder um 30° gewachsenen Kultur wesentlich höher, als die einer im Brutschrank gezüchteten, was sich vielleicht durch geringere eintretende Degeneration bei niedrigeren Temperaturen erklären ließe. Wir verwendeten zu den Infektionsversuchen fast immer 24-stündige Agarkulturen, die entweder frisch aus dem Herzblut infizierter Tiere, oder nach höchstens 1—2 Agarüberimpfungen gezüchtet wurden.

In den folgenden Versuchen suchten wir eine aggressive Wirkung des Subkutanödems infizierter Meerschweinchen nachzuweisen. Das Oedem enthielt stets eine ungeheure Menge von Vibrionen. Es wurde zunächst möglichst klar zentrifugiert und dann durch Schütteln mit Toluol sterilisiert, was durch Ausstriche auf Agar kontrolliert wurde. Das Toluol wurde durch Verdunsten entfernt. Zur Infektion wurde in den meisten der folgenden Versuche eine 24-stündige Agarkultur aus dem Herzblut infizierter Tiere verwendet und die Vibrionen in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt.

Versuch VIII.

3 Meerschweinchen von 250 g. Oedem und Infektion subkutan.

Meerschw. 1: 1,8 Aggressin + $\frac{1}{1000}$ Oese El Tor	stirbt nach 24 Stunden unter Vermehrung ¹⁾ der Vibrionen
Meerschw. 2: 1,8 NaCl + $\frac{1}{1000}$ Oese El Tor	stirbt nach 3 Tagen unter Vermehrung der Vibrionen
Meerschw. 3: 1,8 Oedem allein	zeigt außer geringem vorübergehend. Oedem keine Erscheinung.

Versuch IX.

3 Meerschweinchen von 250 g. Oedem und Infektion subkutan.

Meerschw. 4: 1,3 Aggressin $\frac{1}{2500}$ Oese El Tor	stirbt nach 36 Std. unter Vermehrung der Vibrionen
Meerschw. 5: 1,3 NaCl + $\frac{1}{25000}$ Oese El Tor	stirbt nach 53 Std. unter Vermehrung der Vibrionen
Meerschw. 6: 1,3 Aggressin allein	zeigt keinerlei Reaktion.

Beide Versuche zeigen übereinstimmend eine starke Beschleunigung der Infektion durch das Oedem infizierter Tiere, die wahrscheinlich auf aggressiver Wirkung beruht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die aktive Immunität gegen El Tor bei der Maus untersucht. Zu diesem Zweck wurden 10 Mäuse (Serie A) einmal mit je 0,2 ccm und in Intervallen von einer Woche noch 2mal mit je 0,4 ccm Aggressin, 10 andere (Serie B) 3mal mit je $\frac{1}{5}$ Kultur abgetöteter El Tor-Vibrionen subkutan injiziert. Als Aggressin

1) Wo es in der Folge „Vibrionenvermehrung“ heißt, ist typische Sepsis gemeint, das Exsudat bzw. Oedem enthält unendlich viele Vibrionen, auch im Blut gelingt fast stets schon mikroskopisch der Nachweis.

wurde Subkutanödem infizierter Meerschweinchen verwendet, das klar zentrifugiert und hierauf mit Chloroform sterilisiert wurde, was durch Agarausstriche kontrolliert wurde. Die zur Immunisierung der Serie B verwendeten Vibrionen wurden durch eine Stunde auf 60° erhitzt. Die Injektionen wurden fast reaktionslos vertragen.

Versuch X.

Mit 1/50 Oese intraperitoneal infiziert.

Maus Serie A: lebt

Maus Serie B: lebt

Maus Kontrolle: stirbt nach 7 Std. mit Vermehrung.

Versuch XI.

Mit 1/50 Oese intraperitoneal infiziert. Bei der einen Hälfte des Versuches wurden Kapillarentnahmen gemacht, um die Art der Immunität festzustellen.

	Nach 10 Min.	Nach 40 Min.	Nach 100 Min.
2 Mäuse: Serie A	Zahlreiche zarte Vibrionen, mäßige Menge von Lymphocyten, keine Granula	Vibrion. tierisch, in gleicher Anzahl	Ganz vereinzelt leben tierische Vibrionen, zahlreiche Leukocyten
2 Mäuse: Serie B	Zahlreiche zarte Vibrionen, stellenweise in Häufchen, mäßige Menge von Lymphocyten, keine Granula	Vibrion. tierisch, gleiche Anzahl, auch hier meist in kleinen Häufchen	Vereinzelt tierische Vibrionen, zahlreiche Leukocyten
2 Mäuse: Kontr.	Zahlreich zarte Vibrionen	Tierische Vibrionen in gleicher Anzahl	Geringe Vermehrung der Vibrionen, keine Leukocyten a) stirbt nach 5 1/2 Std. b) stirbt nach 12 Std.

Die Sektion beider Kontrollmäuse ergab Vermehrung der Vibrionen, die auch im Herzblut mikroskopisch nachweisbar waren.

Versuch XII.

Mit 1/50 Oese subkutan infiziert.

Maus Serie A lebt

B

Kontrollmaus stirbt nach 5 1/2 Std. mit Vibrionenvermehrung.

Versuch XIII.

Mit 1/15 Oese subkutan infiziert.

Maus Serie A lebt

B

Kontrollmaus stirbt vor 10 Std. mit Vibrionenvermehrung.

Versuch XIV.

Mit $\frac{1}{30}$ Oese intraperitoneal infiziert.

Maus Serie A	stirbt vor 14 Std.	} Bei allen Tieren Vibrionen- vermehrung.
" " B	" " 14 "	
Kontrollmaus	" " 14 "	

Versuch XV.

Mit 0,1 cem nativem Oedem eines kleinen infizierten Meerschweinchens subkutan infiziert.

Maus Serie A	lebt
" " B	" " " "
Kontrollmaus	stirbt vor 11 Std. mit Vibrionenvermehrung.

Aus den Versuchen ergibt sich, daß es gelingt, Mäuse sowohl mit Aggressin, wie mit großen Mengen abgetöteter Vibrionen (die Mäuse erhielten im ganzen $\frac{3}{5}$ Kulturen) gegen eine El Tor-Infektion immun zu machen. Diese Immunität ist gegen eine Subkutaninfektion höher als gegen eine intraperitoneale und bei den beiden Immunisierungsarten im wesentlichen gleich hoch. Nach der mikroskopischen Beobachtung des Infektionsverlaufes läßt sich bei aktiv immunisierten Mäusen keinerlei Bakterizidie erzielen. Das Bild des Verlaufes ist das der antiaggressiven Immunität. Granulabildung wurde nicht beobachtet.

Die Behandlung von Meerschweinchen mit Aggressin ergab schon nach der ersten Injektion eine relativ hohe aktive Immunität, doch ließen derartige Versuche in der Regel keinen Schluß auf eine etwaige andere als bakterizide Immunität zu, da die injizierten Vibrionen in Granula zerfielen, was ja von vornherein zu erwarten war; denn die im Oedem bzw. Exsudat vorhandenen Bakterien-substanzen mußten natürlich auch die Bildung von Bakterioly-sinen anregen. Es sei aber der Vollständigkeit halber ein diesbezüglicher Versuch mitgeteilt, bei dem es sich wahrscheinlich um eine antiaggressive aktive Immunität beim Meerschweinchen handelt.

Versuch XVI.

Zwei kleine Meerschweinchen werden mit El Tor subkutan infiziert und nach 18 Stunden verblutet. Die Untersuchung des Blutes auf einer Agarplatte ergab 25 Keime im Kubikzentimeter. Das Serum wurde dann bei 60° $\frac{1}{2}$ Stunde lang sterilisiert, und 7 cem davon einem 250 g schweren Meerschweinchen subkutan injiziert. Nach 8 Tagen wurde dieses Tier zu-

gleich mit einem gleichgroßen Kontrolltier mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal infiziert. Kapillarentnahmen ergaben folgenden Verlauf:

	Nach 2 Min.	Nach 1 Std. 40 Min.	Nach 5 Std.	
Immuntier:	Zahlreiche, zarte Vibrionen, keine Granula	Einzelne tierische Vibrionen, keine Granula, zahlreiche Leukocyten	Massenhaft Leukocyten, ganz vereinzelt tierische Vibrionen	lebt
Kontrolltier:	Zahlreiche, zarte Vibrionen	Zahlreiche tierische Vibrionen, vereinzelt Leukocyten	Vibrionen in großer Menge, keine Leukocyten	stirbt nach 6 Std. mit Vermehrung der Vibrione

Da in diesem Falle die Zahl der dem Immuntier injizierten Vibrionen kleiner war als 200, war das Entstehen einer bakteriziden Immunität wohl nicht zu erwarten, auch der Verlauf des Versuches spricht für eine antiaggressive Immunität, da wir keine Granulabildung sahen, auch das Verschwinden der Vibrionen lange Zeit in Anspruch nahm.

Ehe wir die passiven Immunitätsversuche anführen, sei noch einmal kurz die schon in der ersten Mitteilung beschriebene Art der Immunisierung erwähnt; große, ca. 400 g schwere Meerschweinchen wurden in Abständen von 8 Tagen mit sterilisiertem Subkutanödem und Serum infizierter Tiere behandelt. Zur Sterilisierung wurden die Flüssigkeiten mit Toluol geschüttelt, das dann durch Verdunsten entfernt wurde. Die Menge des injizierten Aggressins betrug zwischen 2 und 6 ccm pro Injektion. Ein Teil der Tiere erhielt erst 2—3 Injektionen von sterilem Aggressin und dann noch 2 von nativem Oedem, aus dem der größte Teil der Vibrionen vorher durch Zentrifugieren entfernt wurde. Die Meerschweinchen vertragen dieses Aggressin sehr gut und zeigen nur hie und da geringe lokale Reizerscheinungen. Das auf solche Weise gewonnene Serum wird im folgenden der Einfachheit halber als „anti-aggressives Serum“ bezeichnet.

Das in den folgenden Versuchen als „erschöpftes Immuns serum“ bezeichnete Serum wurde durch mehrfache Behandlung mit abgetöteten El Tor-Vibrionen seiner Bakteriolyse vollkommen beraubt; meist wurde es zweimal hintereinander durch je 1 Stunde bei 35° in der Weise behandelt, daß auf den Kubikzentimeter Serum 2—6 Kulturen kamen. Die Unter-

suchung des Immunserums im bakteriziden Plattenversuch ergab mit 0,05 ccm aktivem Meerschweinchenserum als Komplement im unbehandelten Immunserum in der Regel Wirkung bis zu Verdünnungen von 1:1000, in einem Falle sogar nur bis 1:20. Das erschöpfte Serum ließ stets unbeschränkte Vermehrung zu.

Versuch XVII.

Infektionsdosis $\frac{1}{20}$, Oese El Tor gleichzeitig intraperitoneal.

Meerschw. 7: 0,1 erschöpftes Imm.-Ser. lebt
 „ 8: 0,1 unbehandeltes „ „ „
 „ 9: 0,1 (Kontrolle) normales Meerschw.-Ser. inakt. stirbt nach 7 Std.

Durch Kapillarentnahmen wurde folgender Versuch der Infektion festgestellt:

Meerschweinchen 7: Die gleich nach der Injektion sehr zarten Vibrionen erscheinen nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde animalisiert, nach 2 Stunden sind sie neben ziemlich zahlreichen Leukocyten in ungefähr gleicher Anzahl wie zu Beginn vorhanden, nach 6 Stunden hat das Tier im Exsudat massenhaft Leukocyten und daneben Vibrionen, deren Zahl nur um wenigens verringert ist. Die Leukocyten zeigen keine Phagocytose.

Meerschweinchen 8: Schon nach 10 Minuten sind im Exsudat fast nur mehr Granula vorhanden, nach 1 Stunde treten auch hier Leukocyten auf, die deutliche Granulaphagocytose zeigen, schon nach 2 Stunden ist auch von den Granulis nichts mehr zu sehen.

Meerschweinchen 9: Nach 1 Stunde beginnen sich die tierisch gewordenen Vibrionen zu vermehren, das Tier stirbt mit massenhaft Vibrionen im Exsudat, auch im Blut sind dieselben mikroskopisch nachzuweisen.

Die beiden Tiere mit Immunserum zeigten im Laufe des Versuches keine Erkrankung.

Versuch XVIII.

Infiziert mit $\frac{1}{50}$, Oese gleichzeitig intraperitoneal.

Meerschw. 10: 0,1 unbehandeltes Imm.-Ser. intraperitoneal lebt
 „ 11: 0,05 „ „ „ „ „
 „ 12: 0,01 „ „ „ „ „
 „ 13: 0,1 erschöpftes Imm.-Ser. intraperitoneal „
 „ 14: 0,05 „ „ „ „ „
 „ 15: 0,01 „ „ „ „ „
 „ 16: Kontrolle, stirbt nach ca. 10 Std. mit Vermehrung der Vibr.

Kapillarentnahmen zeigten nach $1\frac{1}{2}$ Stunden bei No. 10 und 11 zahlreiche Leukocyten, die Granulaphagocytose aufwiesen, sowie einzelne extracelluläre Granula. Bei No. 12 ebenfalls ziemlich viele Leukocyten zu sehen und daneben freie tierische Vibrionen in mäßiger Menge. Granulabildung war bei diesem Tiere nicht vorhanden. Die Tiere No. 13 und 14 zeigten denselben Befund wie No. 12. No. 15 hatte weniger Leukocyten und zahlreiche tierische Vibrionen, desgleichen das Kontrolltier No. 16.

Das Tier No. 15 erkrankte vorübergehend an einer leichten Peritonitis und hatte nach 5 Stunden noch ziemlich viele Vibrionen in der Bauchhöhle.

Versuch XIX.

Immunsrum 14 Stunden vorzeitig subkutan, infiziert mit $\frac{1}{100}$ Oese.

Meerschw. 17: 0,5 erschöpftes Imm.-Ser. lebt
 „ 18: 0,05 „ „ „
 „ 19: 0,5 unbehandeltes „-Ser. „
 „ 20: 0,05 „ „ „
 „ 21: 0,5 normales Meerschw.-Ser. (Kontrolle) stirbt nach 7 Std.

	Unmittelbar nach der Infektion	Nach 1 Stunde
Meerschw. 17	Überall Vibrionen	Vereinzelte Vibrionen
„ 18		Vibrionen in gleicher Anzahl
„ 19		Keine Vibrionen, Granula nicht nachweisbar
„ 20		desgl.
„ 21		Vibrionen in gleicher Anzahl

	Nach 2 Stunden	Nach 3 Stunden	Nach 7 Stunden
Mrschw. 17	Vibr. nicht mit Sicherheit nachzuweisen	Keine Vibrionen	Steriler, dünner Eiter
„ 18	Vibrionen in gleicher Anzahl	Vibr. in gleicher Anzahl	Vereinzelte Vibrionen, Leukocyten
„ 19	Keine Vibrionen, zahlreiche Leukocyten	Zahlreiche Leukocyten	Steriler, dünner Eiter
„ 20	desgl.	desgl.	desgl.
„ 21	Geringe Vermehrung der Vibrionen	Starke Vermehrung der Vibr.	Stirbt, massenhaft Vibr. im Exsudat und Blut

Versuch XX.

Immunsrum 15 Stunden vorzeitig subkutan, infiziert mit $\frac{1}{100}$ Oese intraperitoneal.

Meerschw. 22: 0,5 erschöpftes Serum lebt
 „ 23: 0,1 „ „ „
 „ 24: 0,05 „ „ „
 „ 25: Kontrolle ($\frac{1}{100}$ Oese) stirbt nach 10 Std. mit Vermehrung.

Durch Kapillarentnahmen alle halben Stunden wird der Infektionsverlauf kontrolliert.

Alle Tiere mit Immunsrum zeigen in den ersten Stunden eine ziemlich gleichbleibende Menge von Vibrionen, keine Spur von Bakteriolyse; nach 5—7 Stunden erfolgt ein lebhaftes Zuströmen von polymorphkernigen Leukocyten und gleichzeitig ein langsames Verschwinden der Vibrionen.

Ob die Vibrionen ausschließlich durch Phagocytose verschwinden oder an das Netz und Peritoneum gehen, läßt sich nicht ganz sicher entscheiden; jedenfalls zeigt sich an einzelnen Leukocyten deutliche Phagocytose.

Versuch XXI.

1 ccm Immunserum mit 2 ccm Kochsalzlösung verdünnt. Die Hälfte unbehandelt (Serum A), die andere Hälfte mit 1 Kultur El Tor erschöpft (Serum B).

Immunserum 22 Stunden vorzeitig subkutan, infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Meersch.	26	: 0,4	Serum B	lebt
"	27	: 0,05	"	B stirbt nach 9 Stunden
"	28	: 0,4	"	A lebt
"	29	: 0,05	"	A "
"	30	: Kontrolle		stirbt nach 9 Stunden.

Infektionsverlauf:

Meersch. 26: Während der ersten 3 Stunden bleibt die Zahl der Vibrionen auf gleicher Höhe; in der dritten Stunde beginnt das Auftreten der Leukocyten und gleichzeitig eine langsame Abnahme der Vibrionen, die indessen noch nach 6 Stunden zwischen den zahlreichen Leukocyten vereinzelt nachzuweisen sind.

Meersch. 27: Nach 2—3 Stunden setzt die Vermehrung der Vibrionen ein, das Tier stirbt mit massenhaften Vibrionen; Leukocyten treten nicht auf.

Meersch. 28: 5 Min. nach der Infektion ist noch keine Spur von Bakteriolyse zu sehen; im Verlauf der nächsten 40 Min. verschwinden die Vibrionen vollständig, ohne daß im Exsudat Granula nachweisbar wären. Nach 2 Stunden reichliches Zuströmen von polymorphkernigen Leukocyten.

Meersch. 29: Verlauf ähnlich wie bei Meersch. 28; nach 45 Min. sind bei diesem Tier indes noch einzelne Vibrionen zu sehen. Auch hier konnte keine Granulabildung bemerkt werden.

Meersch. 30: Wie beim Meersch. 27, doch setzt die Vibrionenvermehrung etwas früher und lebhafter ein.

Versuch XXII.

Immunserum 16 Stunden vorzeitig subkutan, infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Meersch.	31	: 0,25 erschöpftes Immunserum		lebt
"	32	: 0,1	"	stirbt nach 8 Stunden
"	33	: 0,1 unbehandeltes	"	" " 7 "
"	34	: Kontrolle		" " 7 "

Entnahmen zeigten folgenden Verlauf der Infektion:

Meersch. 31. Nach 30 Min: Vibrionen in der gleichen Anzahl, wie unmittelbar nach der Injektion; keine Spur von Bakteriolyse. Nach 70 Min.: Die Vibrionen sind vollständig tierisch geworden, sie haben sich nicht vermehrt. Nach $2\frac{1}{4}$ Stunden: Vibrionen in gleicher Anzahl; ziemlich viel polymorphkernige Leukocyten. Nach 5 Stunden: Geringe Abnahme der Vibrionen, die aber noch in großer Zahl neben den vielen Leukocyten zu sehen sind.

Die anderen 3 Tiere zeigten in den ersten 2 Stunden eine ziemlich gleichbleibende Anzahl von Vibrionen, von da an setzt jedoch eine enorme Vermehrung derselben ein; Leukocyten traten bei diesen Tieren nicht auf.

Versuch XXIII.

Das Immuneserum wird 16 Stunden vorzeitig subkutan gegeben, die Infektion beträgt $\frac{1}{50}$ Oese El Tor intraperitoneal.

Meersch. 35 : 0,45 erschöpftes Serum	lebt
„ 36 : 0,45 unbehandeltes „	„
„ 37 : Kontrolle	stirbt nach 6 $\frac{1}{2}$ Stunden.

Der Verlauf der Infektion zeigte folgendes:

Meersch. 35: Durch etwa 3 Stunden bleibt die Anzahl der Vibrionen, die nach $\frac{1}{2}$ —1 Stunde animalisiert erscheinen, gleich groß; die Vibrionen zeigen nicht die geringste Spur von Granulabildung. Nach ungefähr 2 Stunden beginnt ein reichliches Zuströmen von Leukocyten und dann eine langsame Abnahme der Vibrionen; deutliche Phagocytose, die phagocytierten Vibrionen zerfallen innerhalb der Leukocyten in Granula, mit denen manche Leukocyten dicht angefüllt erscheinen; auch jetzt ist keine Spur einer extrazellulären Granulabildung zu bemerken. Noch nach 5 Stunden sind neben den zahlreichen Leukocyten einzelne Vibrionen mikroskopisch nachweisbar.

Meersch. 36: Im Verlaufe der ersten $\frac{1}{2}$ Stunde tritt Granulabildung ein, doch ist deren Verlauf ein so langsamer, daß erst nach 1 Stunde alle Vibrionen verschwunden oder bakteriolysiert sind; die Abnahme der Granula erfolgt dann ziemlich rasch; auch hier treten nach etwa 2 Stunden Leukocyten auf, an denen aber keine Phagocytose zu sehen ist.

Meersch. 37: Die Vibrionen, die nach ungefähr $\frac{1}{2}$ —1 Stunde tierisch werden, beginnen sich nach etwa 1 $\frac{1}{2}$ Stunde zu vermehren, schon nach 2 $\frac{1}{2}$ Stunden sind sie massenhaft im Exsudat vorhanden; Leukocyten treten nur in sehr geringer Menge auf, das Tier stirbt unter enormer Vermehrung der Vibrionen, die auch im Herzblut mikroskopisch nachzuweisen sind.

Meersch. 35 zeigt im Verlauf des Versuchs schwere Peritonitis, Meersch. 36 erkrankt nicht.

Versuch XXIV.

Das Serum wird 18 Stunden vorzeitig gegeben, die Infektionsdosis beträgt $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Meersch. 38 : 0,5 ersch. Imm.-Ser.	stirbt nach 12 Std. mit sterilem Befund
„ 39 : 0,2 „ „	stirbt nach 6 Std.
„ 40 : 0,5 unbeh. „ „	lebt
„ 41 : 0,2 „ „	lebt
„ 42 : Kontrolle	stirbt nach 5 Std.

Infektionsverlauf:

Meersch. 38: Die Vibrionen bleiben durch etwa 5 Stunden in gleicher Anzahl, bei der Sektion sind weder im Exsudat noch im Blut Vibrionen nachweisbar.

Meersch. 39: Die Vermehrung der Vibrionen setzt nach etwa 2 Stunden ein, das Tier stirbt mit massenhaft Vibrionen.

Meerschw. 40: Nach $\frac{1}{2}$ Stunde zeigt das Tier noch keine Granulabildung, die Vibrionen verschwinden im Laufe der nächsten Stunde ohne daß Granula zu sehen wären.

Meerschw. 41: Keine Bakteriolyse; nach 5 Stunden sind neben den zahlreichen polymorphkernigen Leukocyten noch immer einzelne Vibrionen zu sehen.

Meerschw. 42: Nach ungefähr einer Stunde setzt die Vibrionenvermehrung ein, das Tier stirbt mit massenhaft Vibrionen.

Versuch XXV.

Immunserum 18 Stunden vorzeitig subkutan, infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Meerschw. 43:	0,1 unbeh. Imm.-Serum	lebt
„ 44:	0,05 „ „	lebt
„ 45:	0,01 „ „	stirbt nach ca. 10 Std. mit Vermehrung d. Vibr.
„ 46:	0,1 ersch. Imm.-Serum	erkrankt nach 6 Std. an schwerer Peritonitis, ist am nächsten Tag vollkommen munter, stirbt nach 48 Std. steril
„ 47:	0,05 „ „	stirbt nach ca. 10 Std. mit Vermehrung d. Vibr.
„ 48:	0,01 „ „	stirbt nach ca. 12 Std. mit Vermehrung d. Vibr.
„ 49:	0,1 norm. Meerschw.-Ser.	stirbt nach ca. 9 Std. mit Vermehrung d. Vibr.

Kapillarentnahmen nach einer Stunde zeigten bei No. 43 zahlreiche tierische Vibrionen, sowie Spuren von Granulabildung. Bei den übrigen Tieren tierische Vibrionen in großer Anzahl; keine Spur von Granulis. Nach 2 Stunden waren bei No. 43 und 44 neben einzelnen Vibrionen (in 44 etwas mehr als in 43) zahlreiche Leukocyten zu sehen, die Granulaphagocytose erkennen ließen. Bei den übrigen Tieren derselbe Befund, wie nach einer Stunde. No. 46 zeigte noch nach 12 Stunden vereinzelt Vibrionen, daneben massenhaft Leukocyten, die sowohl Granulaphagocytose, wie Einschluß von intakten Vibrionen aufwiesen.

Versuch XXVI.

Immunserum 2 Stunden vorzeitig intraperitoneal, infiziert mit $\frac{1}{10}$ Oese intraperitoneal.

Meerschw. 50:	0,25 ersch. Imm.-Ser. intraperitoneal	lebt
„ 51:	0,25 unbeh. „ „	lebt
„ 52:	0,25 Meerschw.Ser. inaktiv „ „	stirbt nach $5\frac{1}{2}$ Std.

No. 51 und 52 zeigten in Entnahmen unmittelbar nach der Infektion sehr zahlreiche Leukocyten, Meerschw. 52 nur sehr wenig; offenbar beruht diese Erscheinung darauf, daß das erschöpfte Immunserum durch seine Eigenschaft als Bakterienextrakt die Leukocyten fernhält.

Infektionsverlauf:

Meerschw. 50: In den ersten 2 Stunden hält sich die Zahl der Vibrionen, die nach etwa einer Stunde animalisiert erscheinen, auf ungefähr

gleicher Höhe, dann treten nach ca. 2 Stunden viele Leukocyten auf und die Vibrionen verschwinden langsam, sind aber nach 3 $\frac{1}{2}$ Stunde neben den Leukocyten noch vereinzelt vorhanden.

Meerschw. 51: Schon in der ersten Stunde nimmt die Zahl der Vibrionen, die auch hier tierisch werden, ab, die Leukocyten bleiben in gleicher Menge; Granulabildung ist extracellulär nicht mit Sicherheit zu erkennen. Nach 3 Stunden sind die Vibrionen vollkommen verschwunden.

Meerschw. 52: Nach etwa einer Stunde setzt die Vibrionenvermehrung ein; die Leukocyten, die bisher reichlich in unveränderter Menge vorhanden waren, nehmen rasch ab, nach 3 Stunden ist die Zahl der Vibrionen enorm gestiegen, die Leukocyten sind vollkommen verschwunden. Das Tier stirbt mit massenhaft Vibrionen.

Versuch XXVII.

Immunserum vor- und gleichzeitig, infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Meerschw. 53: 0,5 ersch. Imm.-Ser. vorzeitig, sub-	stirbt nach 9 Std.
kutan	
Meerschw. 54: 0,5 unbeh. Imm.-Ser. vorzeitig, sub-	lebt
kutan	
Meerschw. 55: 0,5 ersch. Imm.-Ser. gleichzeitig, in-	lebt
traperitoneal	
Meerschw. 56: 0,5 unbeh. Imm.-Ser. gleichzeitig, in-	lebt
traperitoneal	
Meerschw. 57: Kontrolle	stirbt nach 7 Std.

Infektionsverlauf:

Meerschw. 53: Die Vibrionen beginnen sich nach ca. 2 Stunden zu vermehren und das Tier stirbt mit zahlreichen Vibrionen.

Meerschw. 54: Nach einer Stunde beginnt eine langsame Abnahme der Vibrionen ohne Granulabildung, gleichzeitig treten Leukocyten auf. Nach 2 $\frac{1}{2}$ Stunden sind neben den zahlreichen Leukocyten noch vereinzelt Vibrionen zu sehen.

Meerschw. 55: Verlauf wie beim Meerschw. 54; Leukocyten in geringerer Anzahl.

Meerschw. 56: Nach 10 Minuten finden sich Vibrionen und Granula in ungefähr gleicher Menge, nach einer Stunde sind nur noch vereinzelt Granula vorhanden. Zahlreiche Leukocyten.

Meerschw. 57: Vermehrung der Vibrionen setzt nach etwa einer Stunde ein, das Tier stirbt mit massenhaft Vibrionen; Leukocyten treten nicht auf.

Versuch XXVIII.

Im folgenden Versuche wurde sowohl unser antiaggressives, vom Meerschweinchen gewonnenes Serum, sowie ein bakterizides Immunserum zur Anwendung gebracht. Das letztere Serum war durch eine einmalige intravenöse Injektion von einer Oese abgetöteter *El Tor*-Vibrionen

von einem Kaninchen gewonnen wurden. 1 ccm von jedem Serum wurde mit der gleichen Menge Kochsalzlösung verdünnt und zweimal mit je einer Kultur abgetöteter Vibrionen erschöpft. Die Auswertung der Sera auf Bakterizidie im Plattenversuche ergab mit 0,05 aktivem Meerschweinchen-serum als Komplement, das allein wirkungslos war, und einer Einsaat von 15 000 Keimen folgende Werte:

	0,1	0,01	0,001	0,0001
Antiaggressives Serum, unbeh.	0	2	120	9.000
„ „ ersch.	unzählbar	unzählbar	unzählbar	unzählbar
Bakterizides Serum, unbeh.	0	0	0	0
„ „ ersch.	6000	11000	unzählbar	unzählbar

Die Immunsera wurden 15 Stunden vorzeitig subkutan gegeben, die Infektionsdosis war $\frac{1}{100}$ Oese.

Meerschw. 58: 0,2 antiaggressives Serum, unbehandelt	lebt
Meerschw. 59: 0,1 antiaggressives Serum, unbehandelt	„
Meerschw. 60: 0,2 antiaggressives Serum, erschöpft	„
Meerschw. 61: 0,1 antiaggressives Serum, erschöpft	„
Meerschw. 62: 0,2 bakterizides Ser., unbehandelt	„
Meerschw. 63: 0,1 bakterizides Ser., unbehandelt	„
Meerschw. 64: 0,2 bakterizides Ser., erschöpft	stirbt nach 26 Std. mit Vermehrung d. Vibr.
Meerschw. 65: 0,1 bakterizides Ser., erschöpft.	stirbt nach ca. 12 Std. mit Vermehrung d. Vibr.
Meerschw. 66: Kontrolle	stirbt nach ca. 12 Std. mit Vermehrung d. Vibr.

Kapillarentnahmen ergaben folgenden Versuchsverlauf:

Nach $1\frac{1}{2}$ Stunde waren bei allen Tieren mäßig viele Leukocyten vorhanden, am meisten bei No. 58 und 59, am wenigsten bei No. 65. Bei den Tieren mit unbehandeltem Serum waren keine Vibrionen zu sehen (No. 58, 59, 62, 63). Bei allen übrigen zahlreiche tierische Vibrionen. Nach 6 Stunden hatten No. 58, 59, 62 und 63 sterilen, dünnen Eiter, No. 60 hatte neben vielen Leukocyten ganz vereinzelte, No. 61 etwas mehr Vibrionen. No. 64, 65, 66, hatten schwerste Peritonitis und zeigte massenhaft Vibrionen.

Der Grund dafür, daß das Tier mit der höheren Dosis des erschöpften bakteriziden Immunserums einige Zeit überlebte, dürfte wohl auf der nicht ganz vollständigen Erschöpfung beruhen, die auch aus dem Plattenversuche hervorgeht.

Wenn wir die Ergebnisse dieser Meerschweinchenversuche, welche, um eine Prüfung zu ermöglichen, in größerer Zahl und

ohne Auswahl wiedergegeben sind, überblicken so zeigen sich zwar einige Differenzen, besonders in der Virulenz der Tor-Vibrionen worauf wir schon zu Anfang hingewiesen haben, im großen und ganzen sind aber die Ergebnisse doch als einheitliche zu bezeichnen. Es zeigt sich, daß ein durch mehrere Injektionen von sterilem oder auch lebende Vibrionen enthaltendem Oedem, Exsudat, bzw. Serum El Tor infizierter Tiere vom Meer-schweinchen gewonnenes Serum, auch wenn es seiner bakteriolytischen Immunkörper vollkommen beraubt wird, was durch Plattenversuche kontrolliert wird, eine Schutzwirkung gegen eine mehrfach tödliche Dosis von Tor-Vibrionen ausübt. Diese Schutzwirkung kommt sowohl bei vorzeitiger, wie bei gleichzeitiger Anwendung des Serums zum Ausdruck, ebenso bei subkutaner, wie intraperitonealer Injektion. Eine Wirkung des erschöpften Serum durch Bakteriolyse ist nicht nur durch den Nachweis des Fehlens der bakteriziden Immunkörper im Reagenzglasversuch vollkommen auszuschließen, auch die direkte Beobachtung des Verlaufs der Infektion durch Kapillarentnahmen ergibt mit vollständiger Sicherheit das Fehlen der Bakteriolyse. Bei gleichzeitiger intraperitonealer Injektion von Immunserum und Vibrionen zeigt sich eine Schutzwirkung des erschöpften Serums bis zu Dosen von 0,01 ccm, wenn mit $\frac{1}{50}$ Oese infiziert wird. Bei vorzeitiger Seruminjektion schwankt die Grenze der schützenden Menge um 0,1 ccm, doch schützt in manchen Fällen auch noch 0,05 ccm. In beiden Fällen ist eine Verschlechterung der Schutzwirkung durch die Bakterienbehandlung zu sehen, die ja durch den Wegfall der bakteriziden Komponente selbstverständlich wird. Der Versuch XXVII zeigt einen Vergleich mit bakterizidem Immunserum, das durch einmalige Bazilleninjektion gewonnen wurde. Hier schützt das erschöpfte bakterizide Serum nicht, während die Tiere mit beiden Dosen des erschöpften antiaggressiven Serums am Leben bleiben. Daß die Schutzwirkung im unbehandelten Serum ausschließlich auf Bakterizidie — die gewiß dabei auch eine Rolle spielt — beruht, ist nicht wahrscheinlich. Unsere Sera wiesen nämlich einen recht geringen Titer auf (ein Serum wirkte nur bis 0,05 ccm im Plattenversuch) und da durch vorzeitige Seruminjektion außerdem ein großer Teil der Immunkörper verloren geht, wie dies unter anderen Pfeiffer und Fried-

berger¹⁾, sowie Ungermann und Kandiba²⁾ nachgewiesen haben, ist wohl nicht anzunehmen, daß die bakteriziden Schutzkräfte allein es waren, die hier zur Wirkung kamen. Noch ein Umstand stand mit dieser Auffassung in Uebereinstimmung; bei Immunitätsversuchen mit rein bakteriziden Seris zeigt sich bekanntlich die Erscheinung, daß die Tiere, trotzdem die Vibrionen in der Bauchhöhle in Granula zerfallen und verschwinden, doch am nächsten Tage unter Vibrionenvermehrung sterben. Uns ist es im Verlaufe dieser ganzen Versuche auch nicht ein einziges Mal vorgekommen, daß ein Tier, das den ersten Ansturm der Infektion überwunden hatte, einer erneuten Vermehrung der Vibrionen zum Opfer gefallen wäre. Tiere, die nach 3—4 Stunden noch keine Vermehrung der Vibrionen zeigten, gingen nie mehr an Sepsis zugrunde. Die wenigen, die dann noch starben, ergaben stets sterilen Befund, scheinen also einer Giftwirkung erlegen zu sein.

Das Bild der ganzen Wirkungsweise unseres Serums zeigt eine auffallende Uebereinstimmung mit der Schutzwirkung anti-aggressiver Sera: Das Serum wirkt nach der Herausnahme der bakteriolytischen Immunkörper dadurch, daß es die Vermehrung der Vibrionen verhindert, ohne sie selbst sichtbar irgendwie zu verändern. Die Entfernung der Vibrionen geschieht wohl vorzüglich durch Phagocytose, wobei die Vibrionen erst aufgenommen werden und dann im Innern der polymorphkernigen Leukocyten in Granula zu zerfallen scheinen. Extracelluläre Granulabildung wurde bei der Anwendung erschöpften Serums nie, auch bei vorzeitiger Anwendung unbehandelten Serums selten und dann nur in geringstem Ausmaße beobachtet. Es scheint also auch die Schutzwirkung des unbehandelten Immunserums — bei vorzeitiger Anwendung — nicht ausschließlich auf Bakteriolyse zu beruhen. Beweisend gegen die Annahme einer trotz Erschöpfung irgendwie noch vorhandenen Bakterizidie ist das Vorhandensein intakter tierischer Vibrionen, oft neben zahlreichen Leukocyten, nach 5 bis

1) Centralbl. f. Bakt., Bd. 37.

2) Dieselbe Zeitschr., Abt. I, Bd. 50, Referate, Bericht der Mikrobiolog. Vereinigung.

6 Stunden, oft sogar noch nach längerer Zeit. Denn daß ein Keim von so enormer Infektiosität, wie es der virulente El Tor-Vibrio ist, sich unter solchen Umständen im Tierkörper in einer Menge aufhält, die den mikroskopischen Nachweis erlaubt, ohne eine Sepsis zu veranlassen, erscheint doch wohl ziemlich ausgeschlossen. Der Vergleich mit rein bakterizidem Serum lehrt, daß die Bakterizidie in den ersten Minuten nach der Injektion der Vibrionen abläuft, so daß nach längstens 10–15 Minuten auch nicht ein unversehrter Keim mehr zu sehen ist. Ein Tierischwerden tritt natürlich in diesem Falle nie auf, und man kann sagen, wenn in einem mit rein bakterizidem Immunserum behandelten Tiere einmal tierische Vibrionen, und sei es auch nur in minimaler Menge, zu sehen sind, das Tier unbedingt verloren ist. Eine Prüfung unseres Serums auf Antitoxine konnten wir nicht vornehmen, da wir weder in Bouillonfiltraten noch in sterilisiertem Oedem infizierter Tiere eine besondere Giftwirkung fanden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Serum bei Mäusen in Anwendung gebracht. Wie schon in der ersten Mitteilung erwähnt, schützte rein bakterizides Immunserum die Maus auch in hohen Dosen, sowohl vorzeitig wie gleichzeitig gegeben, weder in erschöpftem noch unbehandeltem Zustand. Entnahmen aus der Bauchhöhle ergaben dabei dichtest agglutinierte Vibrionenhaufen, doch keine Granulabildung. Wie im folgenden Versuche zu sehen ist, gelingt es, die Maus mit sensibilisierten Vibrionen tödlich zu infizieren, während das Meerschweinchen sensibilisierte Vibrionen zugleich bakteriolysiert.

Versuch XXIX.

A.

$\frac{1}{25}$ Kultur El Tor wird mit 2 ccm Immunserum sensibilisiert und abzentrifugiert, hierauf in 2 ccm Kochsalzlösung aufgeschwemmt, davon erhält ein Meerschweinchen von 200 g und eine Maus je 1 ccm intraperitoneal.

Entnahmen zeigen beim Meerschweinchen stärkste Granulabildung und Verschwinden der Vibrionen in etwa 15 Minuten, bei der Maus keine Bakteriolyse.

Die Maus stirbt nach 6 Stunden mit Vibrionenvermehrung, das Meerschweinchen überlebt.

B.

$\frac{1}{2}$ Oese El Tor wird mit $\frac{1}{2}$ ccm bakterizidem Immuneserum $\frac{1}{2}$ Stunde lang bei 34° sensibilisiert, abzentrifugiert, gewaschen. Intraperitoneal injiziert.

Maus a	$\frac{1}{25}$ Oese sensibilis. Vibr.	stirbt nach ca. 8 Std. mit Vibrionenvermehrung
„ b	$\frac{1}{60}$ „ „ „	erkrankt im Versuchsverlauf, überlebt aber
Kontrollmaus	$\frac{1}{50}$ „ nicht sensibilis. Vibr.	stirbt nach ca. 8 Std. mit Vibrionenvermehrung

Dieselben sensibilisierten Vibrionen wurden im Meerschweinchen sogleich in Granula aufgelöst.

Berücksichtigt man die Verluste im Verlauf des Sensibilisierens, Waschens etc., so sieht man, daß es sich hier um nur geringe quantitative Unterschiede handelt.

Nach diesen Vorversuchen, die das Ergebnis hatten, daß die Bakterizidie bei der Maus nur eine untergeordnete Rolle spielt (siehe auch Versuch XLV), was jedenfalls darauf zurückzuführen ist, daß ihr das Komplement fehlt, bzw. nur in Spuren vorhanden ist, schien die Maus das geeignetste Versuchstier zu sein, um eine nicht auf Bakterizide beruhende Immunität nachzuweisen. Die diesbezüglichen Versuche ergaben auch im wesentlichen ein günstiges Resultat, litten jedoch, wie schon eingangs erwähnt, unter dem Umstand, daß ein kleiner Prozentsatz der Mäuse eine relativ hohe natürliche Resistenz gegen El Tor-Infektionen besitzt, was oft zu Schwankungen in den Versuchsergebnissen führte, für die wir anfangs keinen Grund aufzufinden wußten. Obwohl die rasch tödende Dosis bei der Maus unter $\frac{1}{200}$ Oese liegt, infizierten wir daher meist mit $\frac{1}{50}$ — $\frac{1}{20}$ Oese, was allerdings den Nachteil hatte, daß letztere Dosis manchmal (bei besonders hoher Virulenz) die Immunitätsgrenze durchbrach. Wir teilen die folgenden Versuche nicht ausgewählt, sondern fast ganz so, wie sie in den Protokollen aufgenommen wurden, mit allen Schwankungen mit.

Versuch XXX.

Immuneserum gleichzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{60}$ Oese subkutan.

Maus 1:	0,2 ersch.	Immuneser.	lebt
„ 2:	0,1 „	„	„
„ 3:	0,05 „	„	„
„ 4:	0,2 unbeh.	„	„
„ 5:	0,1 „	„	„
„ 6:	0,05 „	„	„
„ 7:	Kontrolle	„	stirbt nach $7\frac{1}{2}$ Std. mit Vibrionen- vermehrung

Versuch XXXI.

Immunsersum gleichzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{25}$ Oese subkutan.

Maus	8: 0,05	ersch.	Immunsers.	lebt
"	9: 0,005	"	"	"
"	10: 0,05	unbeh.	"	stirbt nach 5 Std. (die Sektion ergab massenhaft anaerobe Stäbchen im Blut, keine Vibrionen)
"	11: 0,005	"	"	lebt
"	12: Kontrolle	"	"	stirbt nach 7 Std. mit Vibrionenvermehrung

Versuch XXXII.

Immunsersum gleichzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{20}$ Oese subkutan.

Maus	13: 0,1	ersch.	Immunsers.	stirbt nach 3 Tagen an einer Sekundärinfektion
"	14: 0,01	"	"	lebt
"	15: 0,001	"	"	stirbt nach 40 Std. mit Vibrionenvermehrung
"	16: 0,1	unbeh.	"	lebt
"	17: 0,01	"	"	"
"	18: 0,001	"	"	"
"	19: Kontrolle	"	"	stirbt nach 9 Std. mit Vibrionenvermehrung

Versuch XXXIII.

Immunsersum gleichzeitig intraperitoneal; infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Maus	20: 0,2	ersch.	Immunsers.	lebt
"	21: 0,1	"	"	stirbt nach 9 Stunden
"	22: 0,05	"	"	lebt
"	23: 0,01	"	"	"
"	24: 0,2	unbeh.	"	"
"	25: 0,1	"	"	"
"	26: 0,05	"	"	stirbt nach 8 Stunden
"	27: 0,01	"	"	" " 9 "
"	28: Kontrolle	"	"	" " 7 "

Die gestorbenen Tiere zeigten enorme Vermehrung der Vibrionen.

Versuch XXXIV.

Immunsersum gleichzeitig intraperitoneal; infiziert mit $\frac{1}{25}$ Oese intraperitoneal.

Maus	29: 0,1	ersch.	Immunsers.	stirbt nach 14 Std. mit Vibrionenvermehrung
"	30: 0,01	"	"	lebt
"	31: 0,005	"	"	stirbt nach 36 Std. an einer Sekundärinfektion
"	32: 0,1	unbeh.	"	lebt
"	33: 0,01	"	"	"
"	34: 0,005	"	"	"
"	35: Kontrolle	"	"	stirbt nach 5 Std. mit Vibrionenvermehrung

Versuch XXXV.

Immunsrum gleichzeitig intraperitoneal; infiziert mit $\frac{1}{25}$ Oese intraperitoneal.

Maus 36:	0,1	ersch.	Immunsrum.	lebt
„ 37:	0,01	„	„	„
„ 38:	0,001	„	„	stirbt nach 20 Stunden
„ 39:	0,1	unbeh.	„	lebt
„ 40:	0,01	„	„	„
„ 41:	0,001	„	„	„
„ 42:	Kontrolle	„	„	stirbt nach 7 Stunden

Eine Entnahme nach $1\frac{1}{2}$ Stunde zeigte in allen Mäusen mit Immunsrum tierische Vibrionen in ziemlich großer Anzahl, die keine Spur von Bakteriolyse aufwiesen. Ueberall mäßig viele Leukocyten, die besonders bei den Tieren mit unbehandeltem Immunsrum starke Phagocytose zeigten. Im Kontrolltier waren massenhaft Vibrionen zu sehen. Die Maus No. 38 ergab bei der Sektion nur ganz vereinzelte Vibrionen im Exsudat, die Kontrollmaus unbeschränkte Vermehrung.

Versuch XXXVI.

Immunsrum gleichzeitig intraperitoneal; infiziert mit $\frac{1}{10}$ Oese intraperitoneal.

Maus 43:	0,2	ersch.	Immunsrum.	stirbt nach 8 Stunden
„ 44:	Kontrolle	„	„	„ 6 „

Sektionsbefund:

Maus 43: Im Exsudat nur sehr geringe Menge von Vibrionen, die keinesfalls die Menge der injizierten Vibrionen überschritt. Blut steril.

Maus 44: Im Exsudat und Blut massenhaft Vibrionen.

Versuch XXXVII.

Infektion mit tierischen Vibrionen; als Infektionsmaterial dient eine Kochsalzaufschwemmung der aus dem Oedem eines infizierten Meer-schweinchens abzentrifugierten Vibrionen. Immunsrum gleichzeitig intraperitoneal.

Maus 45:	0,2	ersch.	Immunsrum.	lebt
„ 46:	0,1	„	„	„
„ 47:	0,2	unbeh.	„	„
„ 48:	0,1	„	„	„
„ 49:	Kontrolle	„	„	stirbt nach 10 Std. mit Vibrionenvermehrung

Eine Entnahme nach $5\frac{1}{2}$ Stunden zeigte bei den Mäusen No. 45—48 sehr wenig Vibrionen, eine mäßige Menge von Leukocyten, keine Spur von Granulabildung.

Maus 49 wies zahlreiche Vibrionen auf.

Versuch XXXVIII.

Das Immunsrum 16 Stunden vorzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese subkutan.

Maus 50:	0,25	erschöpftes	Immunsrum.	lebt
„ 51:	0,1	„	„	„
„ 52:	0,05	„	„	stirbt nach 7 Stunden

Maus 53: 0,25	unbehandeltes Immuner.	lebt
„ 54: 0,1	„ „	„
„ 55: 0,05	„ „	„
„ 56: Kontrolle	„ „	stirbt nach 6 Stunden

Die Maus 52 hatte im Blut vereinzelte, die Maus 56 sehr zahlreiche Vibrionen.

Versuch XXXIX.

Immunsorum 16 Stunden vorzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{76}$ Oese intraperitoneal.

Maus 57: 0,5	erschöpftes Immuner.	lebt
„ 58: 0,25	„ „	„
„ 59: 0,1	„ „	stirbt nach ca. 16 Stunden
„ 60: 0,5	unbehandeltes Immuner.	lebt
„ 61: 0,25	„ „	„
„ 62: 0,1	„ „	„
„ 63: Kontrolle	„ „	stirbt nach 6 Stunden

Die Sektion ergab bei der Maus 59 sterilen Befund, die Maus 63 hatte im Blut zahlreiche Vibrionen.

Versuch XL.

Immunsorum 22 Stunden vorzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{75}$ Oese intraperitoneal.

Maus 64: 0,3	erschöpftes Immuner.	lebt
„ 65: 0,1	„ „	„
„ 66: 0,3	unbehandeltes Immuner.	„
„ 67: 0,1	„ „	„
„ 68: 0,3	Meersch.-Ser. inakt. (Kontrolle)	stirbt nach 6 $\frac{1}{2}$ Stunden

Infektionsverlauf:

Maus 64—67 zeigten einen übereinstimmenden Verlauf der Infektion. Nach einer Stunde waren überall zahlreiche Vibrionen zu sehen, keine Spur einer Granulabildung; von da an begann ein Zuströmen von Leukocyten und ein langsames Abnehmen der Vibrionen. Nach 5 Stunden waren aber zwischen den sehr zahlreichen Leukocyten noch immer vereinzelte Vibrionen vorhanden.

Die Kontrollmaus 68 zeigte nach 1 Stunde eine beginnende Vermehrung der Vibrionen, die nach dem Tod auch im Blut zahlreich waren.

Versuch XLI.

Immunsorum 18 Stunden vorzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{50}$ Oese intraperitoneal.

Maus 69: 0,5	erschöpftes Immuner.	lebt
„ 70: 0,1	„ „	„
„ 71: 0,5	unbehandeltes Immuner.	„
„ 72: 0,1	„ „	„
„ 73: Kontrolle	„ „	stirbt nach 6 $\frac{1}{2}$ Stunden

Entnahmen nach 1 Stunde zeigten bei den mit Serum vorbehandelten Mäusen Vibrionen in mäßiger Menge ohne eine Spur von Granulabildung, während im Kontrolltier nach dieser Zeit schon starke Vermehrung zu erkennen war; die Vibrionen waren überall animalisiert.

Um zu sehen, ob die Vibrionen noch nach längerer Zeit im Tier nachweisbar wären, wurde am nächsten Tag, wo alle Mäuse vollständig munter waren, die Maus 70 getötet. Mikroskopisch waren die Vibrionen nicht mit Sicherheit nachzuweisen, doch ergaben Kulturen aus dem Blut und Abstriche vom Netz zahlreiche El Tor-Kolonien.

Versuch XLII.

Immunsrum 17 Stunden vorzeitig subkutan; infiziert mit $\frac{1}{20}$ Oese intraperitoneal.

Maus 74: 0,2 erschöpftes Serum	stirbt nach 10 Stunden
„ 75: 0,05 „ „	stirbt nach 10 Stunden
„ 76: 0,2 unbehandeltes Serum	lebt
„ 77: 0,05 „ „	„
„ 78: 0,2 normales Meersch.-Ser. inakt.	stirbt nach 7 Stunden

Entnahmen nach 1 Stunde zeigten bei allen Mäusen animalisierte Vibrionen in großer Menge; keine Spur von Granulabildung. — Die gestorbenen Tiere zeigten Vibrionenvermehrung.

Versuch XLIII.

Zu diesem Versuche wurden die Mäuse 8 Stunden vorzeitig mit dem Immunsrum subkutan behandelt und mit $\frac{1}{60}$ Oese El Tor intraperitoneal infiziert.

Maus 79: 0,2 erschöpftes Immunsrum.	lebt
„ 80: 0,1 „ „	„
„ 81: 0,2 unbehandeltes Immunsrum.	„
„ 82: 0,1 „ „	„
„ 83: Kontrolle „ „	stirbt nach ca. 18 Stunden

Die immunisierten Mäuse blieben im Laufe des Versuches vollkommen munter, die Kontrolle zeigte Vermehrung der Vibrionen.

Versuch XLIV.

Immunsrum 6 Stunden vorzeitig; 84–87 Serum subkutan, Infektion intraperitoneal, Infektion subkutan. 89–92 Serum intraperitoneal, infiziert mit $\frac{1}{60}$ Oese.

Maus 84: 0,2 ersch. Immunsrum	stirbt nach 6 Std. mit sehr geringer Vibrionenmenge im Exsudat; Blut steril
Maus 85: 0,05 ersch. Immunsrum.	lebt
„ 86: 0,2 unbeh. „ subkutan	lebt
„ 87: 0,05 „ „ „	stirbt nach 12 Std., Befund wie bei No. 84
„ 88: Kontrolle (Infektion intraperit.)	stirbt nach 6 Std. mit massenhaft Vibrionen
„ 89: 0,2 ersch. Immunsrum. intraperit.	lebt
„ 90: 0,05 „ „ „	„
„ 91: 0,2 unbeh. „ „	„
„ 92: 0,05 „ „	„
„ 93: Kontrolle II (Infektion subkutan)	stirbt nach 24 Std. mit massenhaft Vibrionen

NB. Die Mäuse No. 84 und 87 waren besonders klein.

Versuch XLV.

Im folgenden wurde unser antiaggressives Serum gleichzeitig mit einem vom Kaninchen gewonnenen rein bakteriziden Serum verglichen; gleichzeitig wurden auch Mäuse mit sensibilisierten Vibrionen infiziert. Die Auswertung des Kaninchenserums im Plattenversuch ergab mit 0,5 ccm aktivem Meerschweinchenserum als Komplement, das an sich vollkommen unwirksam war, bei einer Einsaat von 16000 Keimen bis zu 0,0001 ccm (weitere Verdünnungen kamen nicht in Anwendung) vollkommen sterile Platten, während das antiaggressive Serum nur bis 0,01 wirkte, also mindestens 100mal schwächer bakterizid ist.

Die sensibilisierten Vibrionen wurden durch $\frac{1}{2}$ stündige Behandlung einer Oese mit 1 ccm Kaninchenimmunserum gewonnen. Immunserum und Infektion gleichzeitig intraperitoneal.

Maus 94: $\frac{1}{50}$ Oese + 0,1 bakter. Immunser.	stirbt nach ca. 9 Std. mit Vibrionenvermehrung
„ 95: $\frac{1}{25}$ „ + 0,1 „ „	stirbt nach 5 Std. mit Vibrionenvermehrung
„ 96: $\frac{1}{50}$ „ + 0,1 antiaggr. „	lebt
„ 97: $\frac{1}{25}$ „ + 0,1 „ „	lebt
„ 98: $\frac{1}{50}$ „ sensibilisierte Vibrionen	erkrankt; überlebt jedoch
„ 99: $\frac{1}{25}$ „ „ „	stirbt vor 27 Std. mit Vibrionenvermehrung
„ 100: Kontrolle $\frac{1}{50}$ Oese	stirbt nach 4 Std. mit Vibrionenvermehrung
„ 101: Kontrolle $\frac{1}{25}$ Oese	stirbt nach $3\frac{1}{2}$ Std. mit Vibrionenvermehrung

Wenn wir das Ergebnis der Mäuseversuche überblicken, so scheint aus ihnen die Möglichkeit hervorzugehen, eine gegen den Vibrio El Tor gerichtete, nicht bakterizide Immunität zu erzielen. Die Wirkung des unbehandelten und des seiner Bakteriolyse beraubten Immunserums zeigt nur an der unteren Titergrenze quantitative Differenzen, ein Unterschied in der Art der Wirkung besteht, wenigstens nach dem Bilde zu urteilen, das Kapillarentnahmen ergeben, nicht. Die Vibrionen werden nie nachweisbar in Granula aufgelöst, sie bekommen nach etwa 1 Stunde das kurze, dicke Aussehen der tierischen Form und bleiben durch längere Zeit (mikroskopisch sind sie meist noch nach 5 Stunden nachweisbar) im Exsudat bestehen. Nach etwa 1 Stunde treten polymorphkernige Leukocyten auf, die immer reichlicher zuströmen. Zugleich nimmt die Zahl der Vibrionen langsam ab. Daß dies zum größten Teil durch Phagozytose geschieht, erscheint nach der direkten Beobachtung als erwiesen. In manchen Fällen lassen sich noch nach mehr als 12 Stunden Vibrionen am Netz kulturell nachweisen. Es gelingt, die

Maus mit sensibilisierten Vibrionen tödlich zu infizieren, rein bakterizides Immunserum schützt die Maus nicht, oder fast nicht, ein Beweis, daß die Bakterizidie hier nur eine ganz untergeordnete Rolle spielen kann.

Der Versuch, auch vom Kaninchen ein ähnliches Immunserum durch Subkutanbehandlung mit Oedem bzw. Exsudat infizierter Kaninchen zu gewinnen, hatte ein negatives Ergebnis. Das Kaninchen ist ein sehr empfindliches Versuchstier, erliegt der El Tor-Infektion in sehr kurzer Zeit und zeigt meist nur sehr wenig Oedem. Das so gewonnene Immunserum zeigte den Charakter eines rein bakteriziden Antiserums von beträchtlicher bakteriolytischer Wirkung (Titergrenze: 0,00005).

Die eingehende Mitteilung der Versuchsergebnisse bezweckt wesentlich nur, die Aufmerksamkeit darauf zu lenken, daß es unter besonderen Umständen auch bei Vibrionen gelingen kann, aktive und passive Immunität zu erzielen, bei der bakterizide Wirkungen zwar intervenieren können und dann gewiß von großem Werte für das Ueberstehen der Infektion sind, die aber durch die Bakterizidie allein nicht erklärt werden können.

Der Schwächen der einzelnen Versuchsreihen ungeachtet, die leicht zu ersehen sind, spricht doch das Gesamtergebnis für die Möglichkeit einer Immunität, die durch Behandlung des schützenden Immunserums mit großen Mengen von Bakterien — in konzentriertem, wie verdünntem Zustande — nicht erschöpft werden, also auch nicht wohl rein bakterizid sein kann. Es soll dabei ohne weiteres zugegeben werden, daß eine vollständige Erschöpfung hochwertiger bakterizider Immunsera durch abgetötete Bakterien nicht leicht zu erreichen ist; der Versuch XXVII bringt dafür sogar ein gutes Beispiel. Aber die durch Oedemimmunisierung vom Meerschweinchen gewonnenen Sera waren im Vergleich zum Kaninchenserum überaus wenig bakteriolytisch wirksam, und behielten doch den größten Teil ihres Schutzwertes bei eingreifender Behandlung mit Bakterien.

Folgende Erklärung scheint nach den angeführten Versuchen als die wahrscheinlichste: Der Organismus des Hauptversuchstieres für Halbparasiteninfektionen, des Meerschweinchens, bietet für das Zustandekommen bakterizider Effekte

die günstigsten Verhältnisse. Es wird daher Granulabildung etc. injizierter Vibrionen zu sehen sein, sowie sich die geringste Möglichkeit dafür bietet. Im Gegensatz dazu ist der Mäuseorganismus nur wenig zu höhergradigen bakteriziden Wirkungen befähigt. Es wird also im Meerschweinchen die bakterizide Komponente eines Immunserums stets sehr deutlich zur Wirkung kommen, während in der Maus die Schutzwirkung des Serums mehr auf der zweiten Komponente beruht, die nicht durch Bakteriensubstanz erschöpfbar, also auch nicht bakterizid ist. Hingegen ist das Meerschweinchen ein bekannt schlechter Bildner von cytolytischen Immunkörpern, während es sehr wohl zur Produktion der zweiten, hier als antiaggressiv bezeichneten Immunitätskomponente verwendet werden kann, was durch die Wahl eines geeigneten Antigens noch deutlicher zum Ausdruck kommt. Das so erhaltene Serum wird nicht frei, aber arm an Bakteriolytinen sein, deren Wirkung auch dem Schutzwert trefflich zustatten kommt; die Entfernung desselben durch Bakterienbehandlung ist indessen für den Schutzwert von geringerer Bedeutung, namentlich wieder im Mäuseversuche.

Es sei hier wieder auf die bereits in der ersten Mitteilung erwähnte Arbeit von Rusznyak¹⁾ hingewiesen, der im erschöpften Typhusserum eine Wirkung im Tierversuche zu finden glaubt. Seine Versuchstechnik wurde schon von Bessau²⁾ kritisiert; immerhin ist er durch Bessau nicht widerlegt, da dieser zur Erschöpfung des Serums im Gegensatz zu Rusznyak nicht abgetötete, sondern lebende Bacillen verwendet; durch lebende Bacillen kann, wie dies Bail³⁾ für das Milzbrandserum nachgewiesen hat, sehr wohl auch eine eventuell vorhandene, nicht auf Bakterizidie beruhende Immunität erschöpft werden. Daß Bessau zugunsten seiner Ansicht auf die Tatsache so großes Gewicht legt, daß sensibilisierte Bacillen in der Meerschweinchenbauchhöhle bakteriolysiert werden, ist nicht recht verständlich, da es wohl niemandem einfallen dürfte, das Bestehen einer auf Bakterizidie beruhenden Immunität gegen Halbparasiten in Frage zu ziehen.

1) Rusznyak, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 58, Heft 2.

2) Bessau, Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Bd. 59, Heft 7.

3) Bail, Folia serologica, 1909.

Zusammenfassung.

1) El Tor-Vibrionen zeigen im Tierkörper eine morphologische Veränderung, sie werden kurz und dick, was als Ausdruck des Tierischwerdens (Animalisierung) aufzufassen ist.

2) Untersuchungen über die Wirkungsweise der Meerschweinchenleukocyten ergeben sehr starke Wirkung der Leukocyten in Kochsalzlösung, die durch Gefrieren im wesentlichen nicht beeinflußt wird. Im aktiven Serum wirken die Leukocyten nicht, aktives Serum allein läßt unbeschränkte Vermehrung zu.

3) Kaninchenleukocyten wirken in Kochsalzlösung, auch die Kombination Leukocyten + aktives Serum ist wirksam, doch wirkt hier auch schon das Serum allein.

4) Das mit Toluol sterilisierte Oedem El Tor infizierter Tiere scheint eine infektionsfördernde Wirkung auszuüben, trägt also den Charakter eines Aggressins.

5) Es gelingt, Mäuse durch Vorbehandlung sowohl mit Aggressin, wie mit großen Mengen abgetöteter Bacillen gegen subkutane, sowie intraperitoneale Infektion mit mehrfach tödlicher Dosis zu immunisieren. Die Immunität scheint nach dem Bilde, das sich aus Kapillarentnahmen ergibt, eine antiaggressive zu sein. Granulabildung konnte bei der Maus nicht beobachtet werden.

6) Die Maus wird durch rein bakterizides Immunserum, selbst wenn es in hohen Dosen zur Anwendung kommt, nicht oder nur minimal geschützt. Es gelingt, die Maus mit sensibilisierten Vibrionen tödlich zu infizieren.

7) Ein durch mehrere Injektionen von sterilem Aggressin gewonnenes Meerschweinchenimmunserum schützt auch, nachdem es durch Behandlung mit großen Mengen abgetöteter Vibrionen seiner bakteriziden Immunkörper beraubt wurde, sowohl Meerschweinchen wie Mäuse gegen eine mehrfach tödliche El Tor-Infektion. Der Verlauf der Infektion spricht für eine antiaggressive Immunität.

8) Vom Kaninchen gelang es nicht, ein derartiges Serum zu gewinnen.

Nachdruck verboten.

[Aus dem Laboratorium der inneren Abteilung des Krankenhauses
Magdeburg-Sudenburg (Direktor: Dr. Schreiber).]

Ueber die Giftigkeit arteigenen Serums und die Anaphylatoxinbildung aus Agar und Gelatine.

Von Dr. P. Haren,
Assistenzarzt.

(Eingegangen bei der Redaktion am 30. Januar 1914.)

In einer früheren Arbeit¹⁾ habe ich auf Grund von Tierversuchen gezeigt, daß arteigenes Serum, sowohl aktiv wie inaktiv im allgemeinen ungiftig ist. Stühmer²⁾ konnte bis zu 25 ccm sowohl aktives wie inaktives arteigenes Serum injizieren, ohne daß die Tiere selbst bei Reinjektion eingingen. Es lag nun nahe, nachzuprüfen, ob man durch irgendwelche chemische oder physikalische Eingriffe die Giftigkeit des Serums erhöhen oder verringern kann.

Zunächst versuchte ich, ob etwa stärkeres Erwärmen Einfluß auf die Giftigkeit des Blutserums habe. Dies erschien uns von Wichtigkeit mit Rücksicht auf die Frage, ob sich etwa bei Verbrennung auch im Serum giftige Stoffe bilden können. Es zeigte sich aber, daß das Serum, das bis nahe an die Gerinnungsgrenze erwärmt war, gegenüber normalem, eher an Giftigkeit abnimmt, als zunimmt.

Desgleichen hat auch eine länger dauernde Röntgenbestrahlung keinerlei Einfluß auf die Toxizität des arteigenen Serums. Wir setzten aktives Kaninchenserum selbst bis zu $\frac{1}{4}$ Stunde Röntgenstrahlen aus, ohne daß die Giftigkeit desselben zunahm (vgl. Versuchsreihe 1).

-
- 1) Ueber die Giftigkeit arteigener Eiweißstoffe, Diss. Leipzig, 1913.
 - 2) Deutsche med. Wochenschr., 1912, No. 45.

Versuchsreihe 1.

No.	Ge- wicht in g	Inj.- Menge in ccm	Symptome	Ausgang
205	1220	8,0	keine Erscheinungen	lebt
321	1500	8,0	„ „	„
565	1100	8,0	„ „	nach 4 Tg. tot aufgefunden

Die Tiere vertragen also die intravenöse Injektion von 8 ccm pro Kilogramm sehr gut. Ein Tier starb zwar nach 4 Tagen, die Sektion desselben ergab aber keine Veränderungen, die man in irgendwelchen Zusammenhang mit Anaphylaxie bringen könnte.

Ferner erschien es uns interessant, zu untersuchen, ob das Serum durch längeres Schütteln außer einer Aenderung seines Komplementgehaltes, die ja aus verschiedenen Mitteilungen her bekannt ist, etwa auch eine Aenderung seiner Giftigkeit erführe. Indessen zeigte sich, daß selbst durch 1-stündiges Schütteln des Serums keinerlei Aenderung in seiner Giftigkeit bewirkt wird.

Versuchsreihe 2.

Frisches aktives Meerschweinchenserum wird während 1 Stunde im Schüttelapparat behandelt und nachher Meerschweinchen intravenös injiziert.

No.	Ge- wicht in g	Inj.- Menge in ccm	Symptome	Ausgang
1	290	3,0	keine Erscheinungen	lebt
2	280	5,0	„ „	„
3	250	6,0	geringe Unruhe und beschleunigte Atmung	„

Neuerdings ist es bekanntlich B o r d e t ¹⁾ gelungen, durch Digerieren von Meerschweinchenserum mit Agar ein Gift darzustellen, das intravenös injiziert, typische anaphylaktische Erscheinungen hervorruft. N a t h a n ²⁾ und andere haben die Versuche B o r d e t s nachgeprüft und sind zu denselben Resultaten gekommen. Nach neueren Untersuchungen scheint es sich in der Tat um ein echtes Anaphylatoxin zu handeln, das sich aus einem im Agar enthaltenen Eiweiß bildet [Loewit

1) Compt. rend. Soc. Biol., T. 74, 1913, No. 5.

2) Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 17, H. 4.

und Bayer¹⁾]. Wir haben diese Versuche ebenfalls wiederholt, indem wir uns ganz genau an die Vorschriften von Bordet hielten. Wir benutzten eine Agarlösung von 0,5/100 in physiologischer Kochsalzlösung. Als serumspendende Tiere dienten uns Meerschweinchen von 250—400 g.

Versuchsreihe 3.

Zu je 1 ccm Agarlösung werden 5 ccm normales Meerschweinchen-serum hinzugefügt, das Gemisch 3 Stunden im Brutschrank bei 37° aufbewahrt und nachher $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert (Versuch I). In gleicher Weise wird ein zweiter Versuch mit inaktivem Meerschweinchen-serum an- gestellt (Versuch II).

Ver- such	Ge- wicht in g	Inj.- Menge in ccm	Symptome	Ausgang
I	220	4,0	Unruhe, Dyspnoë, Sprünge	lebt
I	260	3,0	" "	" "
I	280	5,5	" " legt sich	erholt sich, lebt
II	300	4,0	" " Sprünge, Aufschreien	" " "

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, gelang es uns, bei den Tieren leichte anaphylaktische Erscheinungen hervorzurufen, und zwar im Gegensatz zu den Resultaten von Nathan auch mit inaktivem Serum, wobei es uns sogar auffiel, daß die Erscheinungen im letzten Versuch noch ausgeprägter waren.

In der folgenden Versuchsreihe mischten wir fallende Dosen von Agar mit je 5 ccm aktivem Meerschweinchen-serum.

Versuchsreihe 4.

Agar- menge in ccm	Ge- wicht in g	Inj.- Menge in ccm	Symptome	Ausgang
2,5	250	4,5	während d. Inj. starke Krämpfe	† nach 2'
1,0	250	4,5	" " " " " "	† " 3'
0,5	250	4,5	leichte Krämpfe, Dyspnoë "	erholt sich, lebt
0,25	300	4,5	" " " " " "	lebt " "
0,025	280	4,0	keine Erscheinungen "	lebt " "

Die Sektion der eingegangenen Tiere ergab: Lungenstarre, Weiterschlagen des Herzens nach erfolgtem Tode; da-

1) Arch. f. exper. Path. u. Pharmak., Bd. 74, H. 34, p. 164.

gegen konnten wir eine Verzögerung der Blutgerinnung nicht feststellen.

Das sich bildende Anaphylatoxin ist auch nur giftig für die Tierart, mit deren Blut es bereitet wurde, nicht aber für eine andere, wie nachfolgende Versuche deutlich zeigen.

Da aktives Kaninchenserum für Meerschweinchen primär giftig ist, stellten wir die Serummenge fest, die, wenn auch mit Erscheinungen, vertragen wurde. In einer 2. Serie wurde dann dasselbe Kaninchenserum mit Agar gemischt und ebenfalls Meerschweinchen injiziert. Ein Vergleich der beiden Versuchsreihen ergibt für das mit Agar behandelte Kaninchenserum keine Erhöhung seiner Giftigkeit Meerschweinchen gegenüber.

Versuchsreihe 6.

1) Aktives Kaninchenserum wird Meerschweinchen intravenös injiziert.

No.	Ge- wicht in g	Inj.- Menge in ccm	Symptome	Ausgang
1	250	3,0	starke Krämpfe	erholt sich, lebt
2	320	2,0	leichte „	„ „ „
Derselbe Versuch mit inaktivem Kaninchenserum				
1	250	3,0	keine Erscheinungen	lebt

Versuchsreihe 7.

3) 5 ccm aktives Kaninchenserum werden mit je 1 ccm Agar gemischt, das Gemisch 2 Stunden in dem Brutschrank bei 37° aufbewahrt, dann $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert und Meerschweinchen intravenös injiziert.

No.	Ge- wicht in g	Inj.- Menge in ccm	Symptome	Ausgang
1	270	2,0	keine Erscheinungen	lebt
2	270	3,0	leichte Krämpfe u. Sprünge	erholt sich, lebt
Dieselben Versuche mit inaktivem Kaninchenserum und Agar				
1	300	3,0	keine Erscheinungen	lebt

Ausgehend von dem auch andererseits erörterten Gedanken, daß die Ursache der anaphylaktischen Erscheinungen in kolloidalen Verschiebungen im Serum zu suchen sei, wiederholten wir dieselben Versuche mit Gelatine, wobei wir dieselben Mischungsverhältnisse beibehielten und nur den Prozentgehalt der Gelatine in den einzelnen Versuchen steigerten.

Versuchsreihe 8.

Gelatinelösung 0,5/100 in physiologischer Kochsalzlösung. Zu je 1 ccm Gelatine werden 5 ccm normales Meerschweinchenserum hinzugefügt. Das Gemisch wird 3 Stunden im Brutschrank bei 37° gehalten und dann $\frac{1}{2}$ Stunde zentrifugiert. Dieser Versuch wurde sowohl mit aktivem (Versuch I) wie mit inaktivem Serum gemacht (Versuch II).

Versuch	Gewicht in g	Inj.-Menge in ccm	Symptome	Ausgang
I	360	6,0	keine Erscheinungen	nach 8 Tagen †
I	250	4,5	„ „	am nächsten Tage †
I	265	5,0	„ „	nach 8 Tagen †
II	225	4,5	„ „	„ 8 „ †

An den Organen der eingegangenen Tiere wurden bei der Sektion keine Veränderungen gefunden.

Im nächsten Versuche mischten wir fallende Dosen von Gelatine von verschiedenem Prozentgehalt mit aktivem Meerschweinchenserum.

Versuchsreihe 9.

Menge d. Gelat. in ccm	Gewicht in g	Inj.-Menge in ccm	Gelat. in Proz.	Symptome	Ausgang
1,0	260	4,5	1	keine Erscheinungen	lebt
0,5	270	4,5	1	„ „	nach 2 Tagen †
0,25	230	4,5	1	„ „	lebt
0,1	300	4,0	1	„ „	„
1,0	320	4,5	10	leichte Dyspnoë, Sprünge	erholt sich, lebt
0,5	300	4,5	10	„ „	„ „ „
0,25	330	4,0	10	keine Erscheinungen	lebt
0,1	250	4,0	10	„ „	„

Wie Versuchsreihe 9 zeigt, ist es uns auch durch Digerieren von 10 Proz. Gelatine mit aktivem Meerschweinchenserum bei 2 Tieren gelungen, leichte anaphylaktische Erscheinungen hervorzurufen. Ob diese aber durch Bildung eines Anaphylatoxins aus aktivem Meerschweinchenserum und Gelatine hervorgerufen sind, lasse ich unentschieden; bekanntlich kann jedoch die Gelatine Eiweißstoffe enthalten. Beachtenswert ist, daß bei den ersten Versuchen mit $\frac{1}{2}$ Proz. Gelatine die Versuchstiere nach ca. 8 Tagen eingegangen sind, was vielleicht mit weiteren Abbauprozessen des Eiweißes im tierischen Organismus zusammenhängt, worauf ich in der früheren Arbeit schon hingewiesen habe.

Zusammenfassung.

1) Durch Erwärmen, Röntgenbestrahlung und Behandlung im Schüttelapparat konnten im Serum keine Veränderungen hervorgerufen werden, die eine Erhöhung der Giftigkeit bedingten.

2) Durch Digerieren vom aktivem arteigenem Meerschweinchenserum mit Agar kann ein Gift dargestellt werden, daß, derselben Tierart injiziert, typische anaphylaktische Erscheinungen hervorruft.

3) Durch Digerieren artfremden aktiven Serums mit Agar bleibt diese Giftbildung aus.

4) Durch Digerieren von arteigenem Meerschweinchenserum (aktiv und inaktiv) mit 10-proz. Gelatinelösung kann man ebenfalls bei derselben Tierart durch intravenöse Einverleibung anaphylaktische Erscheinungen leichter Natur hervorgerufen.

DATE DUE SLIP
UNIVERSITY OF CALIFORNIA MEDICAL SCHOOL LIBRARY

THIS BOOK IS DUE ON THE LAST DATE
STAMPED BELOW

Jan 8, '27

