[Aus der Bakteriolog. Abteilung des Pathologischen Instituts in Berlin.]

Experimentell-therapeutische Studien bei Trypanosomeninfektionen.

Von

J. Morgenroth und F. Rosenthal.

I. Mitteilung.¹

Über die Wirkung des Kaliumantimonyltartrats auf die Trypanosomeninfektion der Mäuse.

Es liegen jetzt eine große Anzahl von Versuchen vor, welche sich mit der Wirkung der Antimonverbindungen bei Trypanosomenerkrankungen beschäftigen; meist beziehen sie sich auf den Brechweinstein, das Kaliumantimonyltartrat, zum Teil auf andere, bekannte oder auch nach dem Muster des Atoxyls hergestellte neue Verbindungen des Antimons.² Man verdankt Mesnil und Nicolle und vor allem H. G. Plimmer, sowie seinen Mitarbeitern Thomsen, Bateman und Fry die Kenntnis der energischen Wirkung, welche Verbindungen des Antimons auf die Trypanosomeninfektion der Versuchstiere ausüben.

Was die bisherigen Beobachtungen über das Eintreten einer Antimonfestigkeit betrifft, so stimmen sie in einem wesentlichen Punkt überein. Es ist keinem der Untersucher gelungen, durch fortgesetzte Behandlung eines Trypanosomenstammes mit Antimonverbindungen allein eine antimonfeste Rasse zu erzielen.

¹ Das Ergebnis dieser Versuche wurde bereits kurz in der Gesellschaft der Charité-Ärzte vom 3. November 1910 mitgeteilt. *Berliner klin. Wochenschrift*. 1911. Nr. 2.

² Wir besprechen hier die ausgedehnte Literatur dieses Gebietes nicht und verweisen auf die vortreffliche Bibliographie und die Referate, welche von dem Sleeping Sickness Bureau in London veröffentlicht werden.

Eine vorübergehende Festigkeit ist einige Male beschrieben. Plimmer und Bateman¹ berichten über eine Beobachtung an mit Nagana infizierten Ratten, die mit großen Dosen Natriumantimonyltartrat behandelt waren. Zwei Ratten starben nach dem zweiten Rezidiv mit lebenden Trypanosomen im Blut, welche antimonfest geworden waren; die letzten Dosen Antimon entfernten die Trypanosomen nicht aus dem Blut, führten auch zu keiner Verminderung. Die Festigkeit blieb nicht lange erhalten, schon in der zweiten Passage schienen die Trypanosomen in ihrer Empfindlichkeit gegen Antimon wieder normal geworden zu sein.

Plimmer und Bateman bestätigen damit die Beobachtungen von Mesnil und Brimont² an mit Nagana infizierten Mäusen. Diese Autoren beobachteten öfters, daß nach mehrmaliger Behandlung der Rezidive mit Kaliumantimonyltartrat die Trypanosomen schließlich nicht mehr beeinflußt werden, aber nach Übertragung auf eine andere Maus war die Empfindlichkeit gegen das Mittel wieder dieselbe wie die des ursprünglichen Stammes.

Auch Ehrlich³ scheint durch Behandlung mit Antimon allein nicht zu einer direkten Festigung gegen Antimonpräparate gelangt zu sein. Dies dürfte aus folgender Bemerkung hervorgehen: „Nach unseren Beobachtungen scheint es, daß man die allerhöchsten Grade der Festigkeit speziell gegen Antimon und arsenige Säure, wenigstens an kleinen Versuchstieren, nur erreichen kann auf einem Umwege, indem man von verschiedenen Arsanilstämmen ausgeht.“

Neuerdings hat Heckenroth⁴ [in Mesnils Laboratorium die Bemühungen von neuem aufgenommen, ohne Umwege zu antimonfesten Trypanosomen zu gelangen. Übereinstimmend mit den früheren Beobachtungen sah auch dieser Autor nach mehrmaliger erfolgreicher Behandlung der Rezidive mit Brechweinstein bei einem Teil der Mäuse schließlich eine erhebliche Resistenz der Trypanosomen eintreten. Die primäre Resistenz trat nicht regelmäßig ein und blieb bei 27 von 48 Mäusen vollständig aus. Wurden die resistenten Trypanosomen auf frische Mäuse übertragen, so konnte keine Dauer dieser Resistenz beobachtet werden. Eine Ausnahme von der beobachteten Regel machen zwei Fälle, bei welchen die Resistenz noch in der ersten Passage erhalten blieb, um aber dann wieder zu verschwinden. Nähere Angaben über den Grad dieser Resistenz fehlen.⁵

¹ Plimmer u. Bateman, *Proceed Roy. Soc.* 1908. Vol. LXXX. p. 477.

² Mesnil u. Brimont, *Compt. rend. soc. biol.* 1908. T. LXIV. p. 820 und *Annales de l'Institut Pasteur.* 1908. T. XXII. p. 856.

³ Ehrlich, *Chem. Ber.* Jahrg. XLII. S. 1.

⁴ Heckenroth, *Annales de l'Institut Pasteur.* 1910. T. XXIV. p. 721.

⁵ Brieflich teilte Breinl an den Herausgeber des „Sleeping Sickness Bureau-

Wenn man auf Grund dieser Versuche annehmen darf, daß eine direkte Festigung gegen Antimon auf dem üblichen Wege kaum zu erzielen ist, so ist von um so größerer Bedeutung die Erkenntnis, daß auf indirektem Wege eine Festigung erreicht werden kann. Für unsere weiteren Auseinandersetzungen sind die Einzelheiten dieser Versuche nicht von Bedeutung; und wir führen dieselben deshalb nur summarisch an. Mesnil und Brimont¹ konnten einen Surrastamm, den sie zuerst atoxylfest gemacht hatten, dann auch leicht gegen Brechweinstein festigen. Ehrlich² behandelte einen Naganastamm bis zur Festigung, zunächst mit Arsacetin, dann mit Arsenophenylglyzin; eine weitere Behandlung mit arseniger Säure festigte den Stamm gegen Kaliumantimonyltritarat. Endlich beobachtete Ehrlich³ einmal einen brechweinsteinfesten Stamm, der durch ausschließliche Behandlung mit Arsenophenylglyzin erzielt worden war.

Wir möchten zunächst über unsere Versuche berichten, die wir mit einem Stamm von Nagana und von Dourine angestellt haben.

Beide Stämme verdanken wir Herrn Dr. von Prowazek vom Hamburger Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten.

Als Grundlage aller Versuche mußte zunächst eine sorgfältige Einstellung in bezug auf die trypanozide Wirkung unseres Präparates vorgenommen werden. Es ist dies um so notwendiger, als die mehr oder weniger genauen Angaben anderer Autoren immer nur für den jeweils benutzten Stamm Geltung haben und nicht einmal als endgültige Feststellungen für diesen zu betrachten sind, da zweifellos eine spontane Veränderung der Trypanosomenstämme in ihrem Verhalten zu Arzneimitteln im Laufe der Zeit eintreten kann. Es ist daher notwendig, für jede ausgedehnte Versuchsreihe immer von neuem die wichtigsten Konstanten festzustellen, wie das hier geschehen ist.

Wir bemühten uns zunächst, bei dem in unserem Laboratorium gezüchteten Stamme von Nagana und Dourine die Heilwirkung zu ermitteln bei Injektion der Brechweinsteinlösung, nachdem die Infektion einen hohen Grad erreicht hatte, also etwa 1 bis 2 Tage vor dem sicheren Tode der Tiere.

Die Versuche wurden an Mäusen von 15 bis 20 g^{mm} angestellt. Die Infektion geschah subkutan oder intraperitoneal, und ihr gleichmäßiger Verlauf wurde durch Kontrollversuche, wie wir sie in den Tabellen mitteilen, gewährleistet.

Bulletin“ mit, „that resistance to tartar emetic is more easily developed than resistance to atoxyl.“ *Sleep. Sickn. Bur. Bull.* 1908. No. 1. p. 17.

¹ A. a. O.

² A. a. O.

³ Ehrlich, Vortrag am 7. April 1910. *Archiv für Schiffs- u. Tropenhygiene*. 1909. Bd. XIII. Beih. 6. S. 91.

Als Grundlage der Versuche diene uns die Feststellung der Wirkung des *Tartarus stibiatus*, wie sie in den vorstehenden Tabellen I und II wiedergegeben ist.

Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß die unbehandelten oder ungenügend behandelten mit Nagana infizierten Mäuse meist am 4., seltener am 3. Tage starben.

Die mikroskopischen Befunde werden folgendermaßen bezeichnet:

(+) bedeutet ein Trypanosoma oder nur wenige Trypanosomen bei Durchsicht zahlreicher Gesichtsfelder, + = in den meisten oder allen Gesichtsfeldern ein Trypanosoma, dazwischen auch mehrere, ++ = mehrere (5 bis 10) Trypanosomen im Gesichtsfeld, +++ = zahlreiche Trypanosomen, ++++ = sehr zahlreiche Trypanosomen, wie sie kurz vor dem Tode der Tiere zu finden sind, — = nicht untersucht.

Am 2. Tage nach der Infektion haben die meisten Mäuse ++ oder +++, einige +. Es ist dies der geeignete Zeitpunkt für Heilungsversuche, da bei längerem Warten schon am 3. Tage ein Teil der Tiere der Infektion erlegen ist. Die Versuche Nr. 88 bis 102 sind gleichzeitig angestellt. Wie aus der Tabelle I (Nagana) ersichtlich ist, ist die subkutane Injektion von 0.025^{ccm} einer Verdünnung 1:1000 (= 0.25:1:10000) von Kaliumantimonyltartrat in physiologischer Kochsalzlösung vollständig unwirksam. 0.05^{ccm} erzielt entweder keine Wirkung oder eine vorübergehende Verminderung der Trypanosomen, bzw. Hemmung der Entwicklung. Der Eintritt des Todes verzögert sich bei einigen Tieren um 1 bis 2 Tage. 0.1^{ccm} 1:1000 führt meist zu einem Verschwinden der Trypanosomen, doch findet dasselbe deutlich verlangsamt statt. Bei Maus 100 und 101 ist das Blut erst am 2. Tage nach der Injektion frei von Trypanosomen, am 8. Tage, d. h. 6 Tage nach der Injektion, ist bei allen Tieren, bei denen die Trypanosomen aus dem Blute verschwunden waren, ein Rezidiv eingetreten. 0.2^{ccm} 1:1000 ist diejenige Dosis, welche mit Sicherheit bei allen Tieren die Trypanosomen zum Verschwinden bringt. Auch hier ist die Heilung keine endgültige, sondern es treten nach einiger Zeit Rezidive auf. Auch bei 0.3 und 0.4^{ccm} werden dieselben nicht mit Sicherheit vermieden, doch ist hier in einigen Fällen ein dauerndes Freibleiben von Trypanosomen zu erreichen. Bei 0.4^{ccm} und, wie wir aus anderen Versuchen wissen, in noch höherem Grade bei 0.5^{ccm} interferiert die Giftwirkung des Brechweinsteins und führt in einer Anzahl der Fälle zu einer subakuten oder chronischen, schließlich letal verlaufenden Intoxikation.

Tabelle II gibt die Verhältnisse bei der in analoger Weise verlaufenden Dourineinfektion wieder. Hier übt 0.05^{ccm} der Brechweinsteinlösung

1:1000 keine Wirkung aus. Bei 0.1 ccm sind starke Differenzen zu beobachten; in einem Teil der Fälle verschwinden die Trypanosomen aus dem Blut, in einem anderen Teil tritt nur eine Verzögerung im Fortgang der Infektion auf. 0.2 ccm und 0.3 ccm bringen in der Mehrzahl der Fälle die Trypanosomen zum Verschwinden. Daß darauf aber nicht mit Sicherheit zu rechnen ist, zeigen Maus 127 und 128, bei denen nur eine Hemmung der Vermehrung eintritt. 0.4 ccm endlich entfernt die Trypanosomen in allen Fällen aus dem Blute. Nirgends aber ist die Heilung eine dauernde, zwischen dem 7. und 11. Tag treten die Rezidive ein.

Ein Vergleich dieser Resultate zeigt, daß in Bezug auf primäre Wirksamkeit und auf Dauerheilung die Resultate bei Nagana günstiger sind, als bei Dourine. Es sind dies offenbar Verschiedenheiten, die nicht von der betreffenden Trypanosomenspezies abhängig sind, sondern von den Eigentümlichkeiten der einzelnen Rasse, denn Mesnil und Brimont¹ haben gerade die entgegengesetzte Beobachtung gemacht, indem ihr Dourinestamm leichter durch Brechweinstein zu beeinflussen war, als ihr Naganastamm.

Bei dieser Gelegenheit wollen wir auf eine Beobachtung hinweisen, die wir zwar nicht weiter verfolgen konnten, die aber doch vielleicht für diejenigen, welche Versuche in der gegebenen Richtung ausführen, von einem gewissen Interesse sein dürften.

Es zeigte sich nämlich plötzlich, daß eine mehrere Tage alte Lösung von Brechweinstein 1:1000, die durch Verdünnung einer Stammlösung von 1:100 hergestellt wurde, erheblich giftig geworden war. 0.2 ccm tötete die Mäuse bereits nach 1 bis 2 Stunden, wobei Streckkrämpfe und Lähmung der Hinterbeine fast durchgängig beobachtet wurden. Die trypanozide Wirkung der Lösung, wie sie sich durch das rasche Verschwinden der Trypanosomen unmittelbar nach der Injektion dokumentierte, war dabei anscheinend unverändert.

Da, wie sich nun herausstellte, in der Stammlösung eine Hefe gewachsen war, so glaubten wir zunächst, diese Veränderung auf eine chemische Einwirkung derselben zurückführen zu dürfen; es gelang uns aber nicht, weiterhin derartige giftige Lösungen zu erhalten, auch nicht dadurch, daß wir Lösungen von Brechweinstein mit der Hefe impften, die in denselben sehr gut fortkam. Auch große Mengen der Hefekultur auf Agar wirkten nicht toxisch. Es muß also die Frage, in welcher Weise aus dem weniger giftigen Brechweinstein eine giftige Verbindung entstanden ist, offen bleiben. Praktisch zogen wir aus dem Vorkommnis die Lehre, immer nur frische Lösungen zu verwenden.

¹ A. a. O.

Versuche mit chemotherapeutischen Agenzien bei Trypanosomeninfektionen verlaufen in der Regel so, daß bei einer schon fortgeschrittenen Infektion die Heilung schwieriger und nur mit stärkeren Dosen zu erzielen ist, wie bei einer Infektion leichteren oder mittleren Grades. Über die prophylaktische Wirkung der Arzneimittel, d. h. über die Wirkung bei Injektion gleichzeitig mit der Infektion, gehen die Angaben auseinander, und speziell Ehrlich¹ bemerkt, im Anschluß an Beobachtungen von Uhlenhuth bei Hühnerspirillose, daß in gewissen Fällen die pro-

Tabelle III.

Nagana Prowazek. A. 551—568. Subkutan.

Tart. stib. 1:1000, subkutan. Prophylaktischer Versuch.

Tage post inf.	0.3 Tart. 1:1000				0.2 Tart. 1:1000			
	551.	552.	553.	554.	555.	556.	557.	558.
1.								
2.	0	0	0	0	(+)	0	0	0
3.	0	0	0	0	+	0	0	+++
4.					+++	(+)	++	+++
5.	0	0	0	†	†	++	†	†
6.						+++		
7.	† (Tryp. im Herzblut)	+++	0					
8.		+++	0					
9.		†	† (keine Tryp. im Herzblut)					
10.								

Tage post inf.	0.1 Tart. 1:1000				0.05 Tart. 1:1000				Kontrollen	
	559.	560.	561.	562.	563.	564.	565.	566.	567.	568.
-1.										
2.	(+)	(+)	+	+	+++	+	+	+++	++	++
3.	+++	++	+++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++
4.	†	+++	†	†	†	†	†	†	†	†
5.		†								
6.										
7.										
8.										
9.										
10.										

¹ Ehrlich, *Zeitschrift f. ärztl. Fortbildung*. 1909. Jahrg. VI. S. 721.

phylaktische Wirkung hinter der Heilwirkung zurücksteht, eine Divergenz, die auf das Auftreten von Antikörpern bei der Heilwirkung zurückgeführt wird, welche an der Zerstörung der Trypanosomen mitwirken sollen. Wir haben nun an unserem Naganastamm prophylaktische Versuche mit Brechweinstein angestellt, die in der Tabelle III wiedergegeben sind.

Die Infektion wurde hier subkutan ausgeführt und zwar wurden je 0.2^{cem} einer Blutverdünnung, die nur wenige Trypanosomen in jedem Gesichtsfeld enthielt, unter die Haut eines Oberschenkels eingespritzt. Unmittelbar nach der Infektion erfolgte die Injektion der Brechweinsteinlösung unter die Bauchhaut.

Ein Vergleich der Tabellen I und III zeigt, daß hier die prophylaktische Wirkung keineswegs stärker ist, als die kurative, sondern daß im Gegenteil ein deutlicher Unterschied zum Nachteil der ersteren besteht. 0.05^{cem} der Verdünnung 1:1000 erweisen sich in beiden Fällen als unwirksam. 0.1^{cem} führt im prophylaktischen Versuch noch kaum zu einer Entwicklungshemmung, dagegen ist die gleiche Dosis im Heilversuch imstande, meist ein Verschwinden der Trypanosomen herbeizuführen. Ausgesprochen ist auch die Differenz bei 0.2^{cem}, eine Dosis, die sich beim Heilversuch als zuverlässig wirksam erweist, die dagegen im prophylaktischen Versuch nicht ausreicht und nur zu einer Verzögerung der Entwicklung der Trypanosomen führt.

Selbst 0.3^{cem} ist nicht als zuverlässig prophylaktisch wirksam anzusehen. Es ist fraglich, ob die Verdopplung derjenigen Menge (0.2^{cem} 1:1000), welche in allen unsern Heilversuchen nie versagte, eine sichere prophylaktische Wirkung herbeiführen würde.

Wie sehr hier die Wirkungen der verschiedenen Gruppen trypanozider Agenzien voneinander abweichen, zeigt ein Vergleich mit den von Morgenroth und Halberstaedter¹ beschriebenen Chininversuchen, in welchen nur eine prophylaktische Wirkung, eine Heilwirkung dagegen überhaupt nicht zutage trat.

Unsere weiteren Versuche waren nun, und zwar mit großer Ausdauer, darauf gerichtet, eine Festigung der Trypanosomen gegen Brechweinstein auf direktem Wege zu erzielen, die, wie in der Einleitung angeführt, bisher nicht gelungen war. Es zeigte sich auch in unseren Versuchen, daß unter keinen Umständen die Trypanosomen eine dauernde Festigkeit gegen Antimon gewinnen, selbst nach monatelanger Behandlung. Man könnte nach den vorhandenen Ergebnissen beinahe versucht sein als Regel aufzustellen, daß eine direkte Festigung gegen Antimon zu den Unmöglichkeiten gehört.

¹ Morgenroth u. Halberstädter, *Sitzungsbericht der kgl. preuß. Akademie der Wissenschaften*. Sitzung der phys.-math. Klasse vom 21. Juli 1910.

Soweit stehen unsere Resultate mit den Ergebnissen der bereits angeführten Untersucher im Einklang. Ebensowenig wie diesen ist es uns gelungen, durch Behandlung mit Brechweinstein allein zu einem Stamm von erheblicher und dauernder Festigkeit zu gelangen. Man könnte angesichts dieser Erfahrungen zunächst geneigt sein, dem Brechweinstein nur einen minimalen Einfluß in bezug auf Festigung zuzuschreiben, der weit hinter dem der in dieser Richtung am besten untersuchten organischen Arsenverbindungen zurücksteht.

Wenn wir nun den Versuch machen, in das Phänomen der Arzneifestigkeit tiefer einzudringen, so dürfen wir es wohl nicht als Ganzes zu fassen versuchen, sondern wir müssen es in seine Komponenten zerlegen. Sucht man mit Hilfe einer verfeinerten Methodik eine primäre Beeinflussung der Trypanosomen durch die Einwirkung des Brechweinsteins festzustellen, welche in der Richtung einer Festigung läge, so findet man, daß tatsächlich eine solche stattfindet. Es gelingt auf diese Weise durch die hier gegebenen günstigen Bedingungen des Experiments eine Erscheinung isoliert zu betrachten, welche bei anderen Fällen, z. B. Atoxyl, Arsazetin, Dioxydiamidoarsenobenzol sich der Beobachtung entzieht, oder ihr wenigstens nur sehr schwer zugänglich gemacht werden dürfte. Gerade in unserm Falle läßt es sich zeigen, daß die Trypanosomen durch die Einwirkung des Brechweinsteins sehr leicht eine Veränderung ihrer Resistenz gegen dieses Agens erleiden, und zwar im Sinne einer Resistenzsteigerung. Es sind also auch hier die Vorbedingungen zur Erlangung einer Festigkeit erfüllt, d. h. der notwendigste Faktor ist in seinen Elementen vorhanden. Daß er nicht schließlich doch zu einer Festigung führt, muß an besonderen Momenten liegen, die wir später noch kurz zu besprechen haben.

Man möge sich zunächst die Verhältnisse vergegenwärtigen, wie sie bei der subkutanen Injektion einer Brechweinsteinlösung und dem ihr folgenden Verschwinden der Trypanosomen aus der Blutbahn vorliegen. Der Brechweinstein wird offenbar vom Subkutangewebe aus mit großer Schnelligkeit resorbiert und erscheint in der Folge in rasch ansteigender Konzentration in der Blutbahn. Zugleich setzt auch die Elimination des in der Blutflüssigkeit gelösten Brechweinsteins ein, gleichviel, worauf dieselbe beruhe (Ausscheidung, Zerstörung, chemische Umwandlung, Gewebsbindung). Die jeweilige Konzentration des Brechweinsteins im Blut ist also die Resultante zweier einander entgegenwirkender Faktoren. Die höchste Konzentration im Blut stellt das Gleichgewicht zwischen Resorption und Elimination dar, schiebt sich also als Horizontale von unbekannter Länge zwischen den aufsteigenden und absteigenden Ast der Konzentrationskurve ein.

Wenn wir nun die Annahme machen, daß alle gleichzeitig in der Blutbahn vorhandenen Trypanosomen von vollständig gleicher Empfindlichkeit gegenüber der Einwirkung des Brechweinsteins sind, so ergibt sich ein idealer, leicht zu übersehender Fall. Die gleiche Empfindlichkeit würde sich darin äußern, daß 1. die für das Verschwinden der Trypanosomen entscheidende Konzentration des Giftes für alle Individuen die gleiche ist, 2. daß dieses Verschwinden selbst für alle Individuen die gleiche Zeit in Anspruch nimmt. Unter dieser Bedingung müßte das Verschwinden der Trypanosomen aus der Blutbahn mit einem Schlage erfolgen. Bei sorgfältiger mikroskopischer Beobachtung würden entweder die intakten Trypanosomen in voller Zahl oder sämtliche vorhandenen Trypanosomen auf einer bestimmten Stufe der Schädigung, wie sie durch fortlaufende Beobachtung festgestellt werden kann, vorhanden sein, oder endlich müssen sämtliche Trypanosomen gleichzeitig verschwunden sein.

Dieser ideale Grenzfall ist niemals gegeben, denn hier, wie in der ganzen Organismenwelt, gilt das Queteletsche Gesetz.¹ Es besteht eine mittlere Empfindlichkeit, um welche sich die Empfindlichkeit der Individuen gruppieren muß, und zwar so, daß die Zahl der dem Durchschnitt nahe kommenden Individuen die größte, die Zahl der vom Durchschnitt nach beiden Seiten sich entfernenden Individuen die kleinste ist. So wenig uns nun im einzelnen eine Analyse der hier stattfindenden Vorgänge möglich ist, so müssen wir unter allen Umständen erwarten, daß sich diese Resistenzunterschiede ausprägen in der Art, wie das Verschwinden der Trypanosomen stattfindet. Wir sind leider nicht in der Lage, die beiden oben angeführten Faktoren, welche das Maß der Empfindlichkeit abgeben, voneinander zu trennen, sondern wir müssen uns damit zufrieden geben, daß die empfindlichsten Individuen zuerst, die am wenigsten empfindlichen zuletzt verschwinden. Wir gelangen aber bei dieser Betrachtung zu einem Grenzwert, der sich ohne besondere Feinheiten der Untersuchungsmethode unschwer bestimmen läßt, und dem eine einschneidende Bedeutung zukommt.

Wenn wir das Verschwinden der Trypanosomen unter dem Einfluß des Brechweinsteins in einer Kurve festlegen, deren Ordinate die Zahl der Trypanosomen in einem bestimmten Blutvolumen, deren Abszisse die Zeit mit dem Moment der Injektion als Nullpunkt ist, so erreicht die Kurve die Abszisse dann, wenn sämtliche Trypanosomen aus dem Blut verschwunden sind; und die Entfernung dieses Punktes vom Nullpunkt ist das Maß für die Resistenz der überhaupt vorhandenen resistentesten Individuen.

¹ S. z. B. Th. Morgan, *Experimentelle Zoologie*. Leipzig u. Berlin 1909. — Vgl. auch v. Prowazek, *Archiv für Protistenkunde*. 1910. Bd. XVIII. S. 221.

Wir sind also mit Hilfe dieser Kurve, gleichartige Versuchsbedingungen supponiert, wobei die wohl erlaubte Voraussetzung noch die ist, daß unter sonst gleichen Bedingungen Resorption und Elimination des Brechweinsteins bei den Versuchstieren im wesentlichen gleichartig verläuft, in der Lage, festzustellen, ob durch irgend welche Einflüsse unser Trypanosomenstamm in der Weise verändert wird, daß die Resistenz der widerstandsfähigsten Individuen sinkt oder wächst. Im ersteren Fall nähert sich der Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse dem Nullpunkt, im letzteren Falle entfernt er sich von ihm.

Das Eintreten eben dieses zweiten Falles ist nun die unerläßliche Bedingung für jede Art von Festigung. Was auch sonst noch hierbei mitwirken mag, die fortschreitende Festigung ist unter allen Umständen durch ein fortschreitendes Abrücken vom Nullpunkt charakterisiert, und die höchstmögliche Festigung der festesten Individuen wäre dann erreicht, wenn die Kurve sich asymptotisch der Abszisse nähert.

Daß man auch in diesem Falle von der Erlangung eines in seiner Gesamtheit wirklich festen Stammes noch weit entfernt ist, ist klar. Denn die festen Stämme, selbst für die maximal mögliche Dosis des schädigenden Agens, sind charakterisiert durch eine Gerade, parallel der Abszisse.

Es muß also bei der Ausbildung der Festigkeit ein zweites Moment hinzutreten, welches eine Verschiebung bewirkt, in dem Sinne, daß immer mehr Individuen die Eigenschaft der in der gewollten Entwicklung stets an der Spitze voranschreitenden festesten Individuen annehmen.

Wie dies aber möglicherweise zustande kommt, bedarf einer besonderen Überlegung, für welche uns die vorliegenden Kenntnisse über das Verhalten arzneifester Stämme eine Handhabe bieten. Für die Vererbung der Eigenschaften der Trypanosomen fallen alle jene Komplikationen weg, welche sich bei der geschlechtlichen Vermehrung ergeben. Die Trypanosomen vermehren sich ungeschlechtlich durch Zweiteilung, und die Grundfrage ist für uns die, ob die Tochterindividuen die gleiche Resistenz, wie die Mutterindividuen beibehalten müssen, oder nicht. Diese Frage muß dahin beantwortet werden, daß beides stattfinden kann, ohne daß wir die Bedingungen für den Eintritt einer der beiden Möglichkeiten kennen. Wenn wir sehen, daß ein arsanilfester Stamm seine Festigkeit durch mehrere hundert Generationen beibehält (Ehrlich), so beweist uns dies, daß ohne äußere Einwirkungen die Resistenz bei der fortgesetzten Teilung erhalten bleibt. Dem stehen aber die Fälle gegenüber, bei welchen im Laufe kürzerer oder längerer Zeit ein allmähliches Absinken der Resistenz bis zur Norm wieder stattfindet. Solange wir die Bedingungen für dieses entgegengesetzte Verhalten nicht kennen, bleibt das Geheimnis der Festigung unerschlossen.

Es ist ja zweifellos das Nächstliegende, sich die Frage vorzulegen, inwieweit hier die Auslese als regulierender Faktor herangezogen werden darf. Daß man mit der Auslese allein nicht auskommt, braucht kaum gesagt zu werden. Der letzte Teil unserer Kurve, repräsentiert durch die jeweils resistantesten Individuen, enthält etwas Neues, was niemals Produkt einer Auslese sein kann. Hier liegt eine Erscheinung vor, die unerklärlich bleibt, und es braucht kaum besonders betont zu werden, daß sie durch die Ehrlichsche „Einziehung der Chemozeptoren“ geschickt umschrieben, aber nichts weniger als aufgeklärt wird.

Nur als regulierender Faktor zwischen den neugebildeten resistantesten Individuen und den übrigen kann die Auslese einsetzen, und für ihre Wirksamkeit ist Bedingung, daß die erworbene erhöhte Resistenz vererbt wird.

Wir sind also so weit, drei Bedingungen, welche erfüllt werden müssen, wenn überhaupt eine Festigkeit erreicht werden soll, voneinander abzuscheiden:

1. die Entstehung resistenterer Individuen,
2. die Vererbung der so gewonnenen Resistenz,
3. die Erhaltung derselben durch Auslese.

Der erste Faktor allein ist die Grundbedingung aller Festigkeit, kann sie jedoch an und für sich niemals hervorbringen. Er läßt sich aber, auch wenn die beiden anderen Faktoren fehlen, wie sich aus unseren Auseinandersetzungen ergibt, isoliert untersuchen, und sein Vorhandensein zeigt, daß die wichtigste biologische Grundlage für die Festigkeit vorhanden ist, selbst wenn eine solche niemals zustande kommt.

Daß dies bei Brechweinstein der Fall ist, ergibt sich aus den folgenden Versuchen:

Wir haben zunächst in einer großen Zahl von Vorversuchen das Verschwinden unbehandelter Nagana-Trypanosomen aus der Zirkulation nach Injektion von 0.2 ^{cem} Kaliumantimonyltartrat 1:1000 verfolgt. Die in der Literatur über das Verschwinden der Trypanosomen aus dem Blut nach Brechweinstein-Injektionen vorliegenden Angaben von Plimmer und Thomson,¹ Plimmer und Bateman,² Mesnil und Brimont,³ Maja,⁴ die übereinstimmend von einem Verschwinden der Trypanosomen nach ca. 2 Stunden berichten, erfuhren nach unseren ersten Resultaten

¹ A. a. O.

² A. a. O.

³ Ref. *Bulletin de l'Inst. Pasteur*. 1908. T. VI. p. 495.

⁴ Ref. *Ebenda*. 1909. T. VII. p. 885.

dahin eine Präzision, daß die Schnelligkeit des Verschwindens sich zum Teil abhängig von der augenblicklich im Blute vorhandenen Trypanosomenmenge zeigte. So ergaben sich in unsern ersten Versuchen, in denen wir noch von einer exakten Trypanosomenzählung Abstand nahmen, folgende Werte:

Tabelle IV. Nagana.

Maus-Nr.	Trypanosomen- gehalt des Blutes	Injizierte Brech- weinst.- Dosis	M i n u t e n						
			5	10	20	30	60	90	120
152	+	0.2 $\frac{1}{1000}$	(+)	(+)	0	0	0	0	—
93	++	0.2 $\frac{1}{1000}$	+	(+)	(+)	0	0	0	—
151	++	0.2 $\frac{1}{1000}$	+	(+)	0	0	0	0	—
153	+++	0.2 $\frac{1}{1000}$	+++	+++	++	++	+	(+)	0
71	+++	0.2 $\frac{1}{1000}$	—	+	+	(+)	(+)	(+)	0

Diese Tabelle zeigt, daß das Verschwinden der Trypanosomen insofern von der ursprünglich vorhandenen Trypanosomenmenge abhängt, als der Nullpunkt um so schneller erreicht wird, je weniger Trypanosomen ursprünglich vorhanden sind.

Wir gingen nun dazu über, festzustellen, ob sich unter geeigneten Versuchsbedingungen nach Einführung einer bestimmten heilenden Brechweinsteindosis eine übereinstimmende Kurve des Verschwindens der Trypanosomen aus der Blutbahn erzielen lasse. Zu diesem Zwecke haben wir in einer Versuchsreihe mit frischen Naganastämmen vor der Injektion und während des Versuches in bestimmten Zeitabständen eine Zählung der Trypanosomen vorgenommen, wobei wir folgende Technik befolgten:

Da wir nur mit minimalen Blutmengen arbeiten durften, um nicht durch die häufigen Blutentnahmen das Versuchsergebnis erheblich zu beeinträchtigen, so wurde mit der Zeiss-Thomaschen Erythrozytenpipette, wie sie bereits von Löwenstein¹, allerdings unter Zuhilfenahme großer Blutmengen, benutzt wurde, unter möglicher Vermeidung von Druck aus der Schwanzspitze Blut bis zu dem ersten Teilstrich der Kapillare aufgezogen, eine Flüssigkeitsmenge, die dem zehnten Teil des Kapillarinhaltes, bis zur Marke 1 gerechnet, entspricht. Es wurde alsdann mit physiologischer Kochsalzlösung bis zur Marke 1 des Mélangeurs nachgesaugt, die gesamte Flüssigkeitssäule auf einen sorgfältig gesäuberten Objektträger ausgespritzt und durch mehrmaliges Aufsaugen und Ausspritzen eine gleichmäßige Blutverdünnung bewirkt. Durch nochmalige Wiederholung der Prozedur mit dem 10 fach verdünnten Blute wurde so eine 100 fache Verdünnung ge-

¹ Löwenstein, *Diese Zeitschrift*. 1909. S. 416.

wonnen, deren Trypanosomen in der für rote Blutkörperchen üblichen Weise in der Zählkammer ausgezählt wurden. Es ist hierbei zu bemerken, daß sich nicht alle Trypanosomen in der Einstellungsebene befinden und daß bei der Zählung alle Trypanosomen berücksichtigt wurden, die bei verschiedener Einstellung sichtbar werden. Zunächst konstatierten wir, daß die übliche Methodik der Durchsicht des frischen Deckglaspräparates zur Abschätzung der im Blute befindlichen Trypanosomen bei hohen Trypanosomenzahlen zu versagen beginnt. So entsprechen der Bezeichnung + + + Trypanosomenzahlen von ca. 60000 bis 300000 im Kubikzentimeter Blut, ohne daß sich diese Differenzen bei Betrachtung des frischen Bluttröpfens deutlich manifestieren. Das gleiche gilt für die extremen Trypanosomenwerte kurz vor dem Tode des Versuchstieres. Trypanosomenwerte zwischen 400000 und 1000000 lassen im frischen Präparate keine merklichen Unterschiede erkennen.

Es ergab sich nun aus einer großen Reihe von Versuchen, daß für die von uns in den Kurvenversuchen zur Anwendung kommende Heildosis von 0.2^{cem} Tartarus stibiatus 1:1000 bei einer Trypanosomenzahl von ca. 50000 bis 300000 im Kubikzentimeter Blut die Kurven des Verschwindens der Trypanosomen aus der Zirkulation eine gewisse zeitliche Übereinstimmung zeigten, wie dies folgende Kurven demonstrieren:

Es geht aus diesen Kurven hervor, daß bei Trypanosomenzahlen zwischen 50000 und 300000 pro Kubikmeter sich das Verschwinden der Trypanosomen in der Regel in einem Zeitraum von 70 bis 180 Minuten vollzieht. Diese zeitlichen Grenzwerte sind abhängig von der Antimon-

empfindlichkeit der resistantesten Normalindividuen. Je ausgeprägter deren Unempfindlichkeit gegen Kaliumantimonyltartrat ist, desto mehr nähert

Kurve III.
Nagana-Normalstamm.

Kurve IV.
Nagana-Normalstamm.

Kurve Va 10. XI. 10.
Nagana-Normalstamm.

sich der Zeitwert des Verschwindens der Trypanosomen dem oben festgestellten Maximum. Dementsprechend haben wir in den angeführten

Versuchen je nach der Antimonresistenz verschiedene Trypanosomengruppen zu unterscheiden. In den Versuchen I und IV zeigen die resistantesten

Individuen ungefähr den gleichen Grad der Antimonunempfindlichkeit, wie dies aus dem gleichen zeitlichen Endeffekt hervorgeht. In beiden Fällen verschwinden die Trypanosomen 70 Minuten nach der Kaliumantimonyltartratinjektion. Ihnen reißen sich Trypanosomen höherer Normalresistenz im Versuch III an, die bis zu 90 Minuten nach der Brechweinsteininjektion in der Zirkulation nachweisbar sind. Die Vertreter der höchsten Normalantimonresistenz stellen die resistentesten Individuen unter den Trypanosomen der Kurve III dar, die durch ein zeitliches Verschwinden erst nach 180 Minuten nach der Kaliumantimonyltartrat-injektion charakterisiert sind. Dieser maximale Zeitwert wurde in keinem unserer zahlreichen Versuche überschritten.

Es geht somit hieraus hervor, daß die Kurven des Verschwindens der Trypanosomen aus der Blutbahn ein Mittel zur Differenzierung der resistentesten Gruppe der in Zirkulation gleichzeitig vorhandenen Trypanosomen darstellt.

Eines Wortes bedarf noch der rapide Abfall der Kurve IV von 300 000 auf 23 000 Trypanosomen innerhalb von 5 Minuten nach der Brechweinsteininjektion. Es ist dies eine Erscheinung, der wir auch in anderen Versuchen wieder begegnen werden, und die auf eine besondere Fragilität der Trypanosomen bei hohem Gehalt des Blutes an Trypanosomen hinweist, auf die zuerst Mesnil und Brimont¹ und Friedberger² aufmerksam gemacht haben.

Wenn wir mit diesen Normalkurven die Kurven bereits mit Antimon behandelter Trypanosomenstämme vergleichen, wie sie sich nicht selten bereits beim ersten Tartarusrezidiv demonstrieren, so geht aus ihnen deutlich hervor, daß der für eine Festigung wesentlichste Faktor der Entstehung resistenterer Individuen bereits frühzeitig, oft sogar nach nur

Kurve VI^a 2. XII. 10.
Nagana-Normalstamm.

¹ A. a. O.

² Friedberger, *Berliner klin. Wochenschrift*. 1908. S. 1714.

einmaliger Brechweinsteinbehandlung in Erscheinung tritt. Von unseren zahlreichen Versuchen in dieser Richtung seien die folgenden Kurven wiedergegeben (Kurven Va u. Vb).

Die Kurve des Versuches Va stellt den Typus einer Kurve eines zum ersten Male mit Kaliumantimonyltartrat in Berührung gebrachten Naganastammes dar. Wir sehen auch hier zunächst in unmittelbarem Anschluß an die Brechweinsteininjektion das bereits im Versuch IV beobachtete Phänomen des rapiden Abfalls des Trypanosomengehaltes des Blutes. Die resistenteren Normaltrypanosomen verschwinden hier nach 90 Minuten aus der Zirkulation.

Kurve VI^b Nagana. 24. XII. 10.

I. Recidiv nach jedesmaliger Abheilung mit 0,2 ccm Kaliumantimonyltartrat 1:1000 subc.

Die Kurve Vb des ersten Tartarusrezidives, das entsprechend unseren früheren Heilversuchen am 10. Tage nach der Abheilung mit 0,2 ccm 1:1000 Kaliumantimonyltartrat voll entwickelt ist, zeigt hierzu im Gegensatz bereits Trypanosomen von prinzipiell neuen Eigenschaften, denen wir bei Normaltrypanosomen selbst bei den Vertretern der geringsten Normal-Antimonempfindlichkeit niemals begegnen. Wir bemerken hier zum ersten Male das Auftreten von Trypanosomenindividuen, deren die Norm weit überragende Antimonresistenz sich mit einem Ausharren der Individuen noch 12 Stunden und mehr in der Zirkulation nach der Kaliumantimonyltartratinjektion kennzeichnet und die als Vertreter einer Klasse von neuen Individuen anzusehen sind. Analoge Verhältnisse zeigen sich in den Kurven VIa und VIb.

Die Kurve VIa stellt den Ablauf des Verschwindens frischer Nagana-trypanosomen nach der Injektion der gleichen Brechweinsteindosis von

Kurve VII^b Nagana. 21. XI. 10.

I. Recidiv nach Abheilung mit 0,2 ccm Kaliumantimonyltartrat 1:1000 subc.

Kurve VII^a 10. XI. 10.
Normal-Nagana-Stamm.

Kurve VII^c Nagana 24. XI. 10.
Überimpf vom I Recidiv-Stamm
von Maus der Kurve VII^b

0.2^{cem} 1:1000 dar. Der Zeitwert von 130 Minuten nach der Antimonbehandlung, bei welchen die letzten Trypanosomen aus der Blutbahn verschwinden, gibt den Grad der Normal-Antimonunempfindlichkeit der resistentesten Trypanosomenindividuen an. Bei dem am 10. Tage auftretenden ersten Rezidiv ist nach dem Verlaufe der Zeitkurve des Verschwindens noch keine experimentelle Abänderung der Trypanosomen vorhanden. Dagegen begegnen wir im zweiten Tartarusrezidiv 12 Tage nach der Abhandlung des ersten Rezidives (durch 0.2^{cem} Tartarus stibiatus 1:1000 subkutan) bereits Trypanosomen von ganz neuen Resistenzeigenschaften, die sie scharf von den Normaltrypanosomen unterscheiden und deren Antimonresistenz durch einen Maximalzeitwert von mindestens 6 Stunden charakterisiert wird, der von Normaltrypanosomen niemals auch nur annähernd erreicht wird (Kurven VIIa bis VIIc).

Die Kurven des folgenden Versuches VII zeigen zunächst in besonders eklatanter Weise das frühzeitige Auftreten neuer, in ihrer Resistenz gegen Antimon intensiv gesteigerter Trypanosomen. Es liegt bereits nach einmaliger Antimonbehandlung hier in der Kurve VIIb ein Zustand markantester Antimonfestigkeit der Trypanosomen vor, da die sonst sicher heilende Kaliumantimonylartratdosis hier nur eine relativ geringe Verringerung der Trypanosomen hervorrufft, der nach 24 Stunden sich eine erneute Vermehrung anschließt. Eine Übertragung dieser antimonresistenten Individuen auf eine neue Maus führt dann wieder, wie Kurve VIIc zeigt, zu normalen Trypanosomen, ohne daß man die Bedingungen dieses Rückschlages irgendwie analysieren könnte.

Es stellt somit die Zeitkurve des Verschwindens des Trypanosomen aus der Blutbahn nach Einführung chemotherapeutischer Agenzien ein markantes biologisches Reagens zur Differenzierung von unbehandelten und beeinflussten Trypanosomenstämmen dar, das eine feine Analyse der den Resistenzvorgängen zugrunde liegenden Prozesse ermöglicht und die Entstehung neuer resistenterer Individuen bereits zu einer Zeit zu erkennen gibt, in welcher die bisherigen Betrachtungsweisen keine Abweichung von der Norm ergeben würden.