II. Aus dem städtischen Krankenhause Moabit in Berlin,
Abtheilung des Herrn Professor Dr. Renvers.

Ueber die chemische Wirkung der Elektrolyse auf toxische und immunisierende Bacteriensubstanzen.

Von Dr. med. S. Krüger, Volontärassistenten.

Seitdem Behring die grosse Entdeckung gemacht hat, dass die immunisierenden und heilenden Stoffe im Blutserum künstlich immunisirter Thiere enthalten sind und mit demselben auf inficirte Thiere übertragen werden können, so dass die Infection thatsächlich zur Heilung kommt, und neuerdings mit seinem Diphtherieheilserum so bedeutende Erfolge zu erringen vermocht hat, scheint die schwierige Aufgabe, die Infectionskrankheiten durch specifisch wirkende Mittel zu heilen, gelöst zu sein. Und doch wie lang ist der Weg und mit welchen Opfern muss der Erfolg erkaufte werden. Viele Monate, ja sogar Jahre sind erforderlich, um bei Thieren die erforderliche Höhe der Immunität zu erreichen, so dass sich dem bacteriologischen Forscher der Wunsch mehr und mehr aufdrängt, mit Umgehung des Thierkörpers direkt aus Bacterienculturen die Heilkörper darstellen zu können. Nachdem Pasteur zuerst bei der Hühnercholera bewiesen hat, dass man mit erwärmten Hühnercholera-bacterienculturen Thiere gegen die nachfolgende Infection schützen kann, sind mit Hilfe der Wärme auf diesem Gebiete wesentliche Erfolge nicht zu verzeichnen gewesen. Der Weg zur Gewinnung einer sicheren Schutzimpfung gegen die meisten Infectionskrankheiten ist damit gewiesen, Heilung der vorgeschrittenen Infection erreicht man jedoch nicht. Eine ganz leichte Infection, durch abgeschwächte Bacterien erzeugt, kann man zwar im Anfangsstadium mit grossen Mengen erwärmter Bacterienculturen zum Stillstand bringen, bei jeder stärkeren Erkrankung des Versuchsthieres lässt aber diese Heilmethode vollständig im Stich. Die Wärme, welche von 60—70° eine Stunde lang angewendet wird, tödtet sporenlose Bacterien und schwächt ihre Toxine ab, ohne die Impfschutz verleihenden Substanzen gänzlich zu zerstören. Geht man unter 60° herab, so sind die Toxine oder primären Gifte noch so wirksam, dass das geimpfte Thier zugrunde geht, überschreitet man 70°, so werden zwar die primären Gifte zerstört, aber in demselben Maasse verlieren die immunisierenden Substanzen an schutzgebender Kraft, während sich andererseits aus den in der Cultur befindlichen Bacterienleibern Secundärgifte, die sogenannten Proteine bilden. Eine Vervollkommnung dieser Methode ist demnach kaum denkbar. Es wurde deshalb schon von verschiedenen Autoren versucht, die Toxine der Bacterienculturen auf rein chemischem Wege zu beseitigen. Aber glänzende Erfolge sind auch hier nicht errungen worden. Da nun aber der thierische Organismus die giftigen Substanzen injicirter Bacterienculturen in so vollkommener Weise zu zerstören weiss, ohne die Impfschutz verleihende Kraft derselben zu beeinträchtigen, und andererseits die chemischen Vorgänge im Thierkörper hauptsächlich auf Reduction und Oxydation beruhen, so liegt es nahe, zunächst oxydirende und reducirende Kräfte auf Bacterienculturen einwirken zu lassen, ob vielleicht so auch mit Ausschluss der thierischen Zelle eine Vernichtung der Bacterientoxine ohne Schädigung der immunisierenden Substanzen zu erreichen sei. Von allen Mitteln, welche dies voraussichtlich zu leisten imstande sind, hat die Elektrolyse, mittels der polarisirbaren Platinelektroden zur Anwendung gebracht,

¹⁾ Näheres in meiner Arbeit: Ueber den Einfluss des constanten elektrischen Stromes auf Wachsthum und Virulenz der Bacterien. Zeitschrift für klin. Medicin Bd. XXII, Heft 1 und 2.

entschiedene Vorzüge. Zunächst ist man durch ein permanent in den äusseren Stromkreis eingeschaltetes Galvanometer jeden Augenblick über die Stärke und Constanz des Stromes und damit über die Intensität der chemischen Vorgänge an dem Elektrodenpaar orientirt, sodann wird der zu untersuchenden Flüssigkeit keine fremde Substanz von aussen zugesetzt, sondern die chemische Zersetzung erfolgt von innen heraus.

In dieser Hinsicht habe ich schon in den Jahren 1891—92 eine ganze Reihe von Versuchen angestellt.¹⁾ Bevor ich jedoch die Wirkung der Elektrolyse auf toxische, bezw. immunisirende Bacterienproducte prüfen konnte, musste ich zunächst feststellen, inwieweit die lebenden Bacterien selbst durch den constanten elektrischen Strom beeinflusst werden. Zuerst bediente ich mich unpolarisierbarer Elektroden, um den elektrischen Strom an sich mit Ausschluss der Zonen wirken zu lassen.

Das Resultat war: Der constante elektrische Strom unter möglichstem Ausschluss der chemischen Wirkung der Ionen mittels der unpolarisierbaren Elektroden zur Anwendung gebracht, vermag die Bacterien in ihrem Wachsthum vollständig aufzuhalten, ohne sie abzutöten.

Sodann ging ich zur Anwendung des constanten Stromes mittels polarisierbarer Platinelektroden über. Das Ergebniss einer langen Reihe von Versuchen liess sich folgendermassen zusammenfassen:

Der constante elektrische Strom, unter Mitwirkung der Ionen zur Anwendung gebracht, vermag bei genügender Stärke, Dichte und Dauer die Bacterien und ihre Dauerformen abzutöten. Zu dieser Wirkung bedarf es um so geringerer Stromstärke, je länger die Zeit der Einwirkung dauert.

Nun erst war es mir möglich, an meine Aufgabe, die Wirkung der Elektrolyse auf die toxischen und immunisirenden Substanzen zu prüfen, mit Aussicht auf Erfolg heranzutreten. Ohne auf die Einzelheiten der Versuchsanordnung hier näher einzugehen, will ich nur hervorheben, dass es mir thatsächlich schon damals gelungen ist, Thiere gegen Pneumococceninfektion und Choleraintoxication mit elektrolytisch vorbehandelten Pneumococcen respective Cholera-Bacterienbouillonculturen ohne jede toxische Erscheinung zu immunisiren. Die Bacterien waren dabei, wie ich mich durch Austrich auf Agarnährboden überzeugte, getödtet und die toxischen Substanzen vernichtet oder abgeschwächt, ohne dass die immunisirenden Stoffe geschädigt wurden, denn die geimpften Versuchsthiere wurden reactionslos immun. Es liess sich demnach das Resultat dieser Versuche dahin zusammenfassen: Bei gewisser Stromstärke und Zeitdauer ist die elektrolytische Behandlung einiger Bacterienulturen geeignet, diesen in analoger Weise wie die Erwärmung zu immunisirenden Wirkungen zu verhelfen.

Vor dem Erscheinen meiner Arbeit war die Elektrolyse nur zur Abtödtung von Bacterien angewendet worden, von mir wurde dieselbe zuerst dazu benutzt, giftige Bacterienulturen zur Immunisirung geeignet zu machen. Damit wird die Behauptung des Dr. Smirnow, welche er in seiner¹⁾ Arbeit: „Ueber die Behandlung der Diphtherie mit Antitoxinen, die ohne Vermittelung des thierischen Organismus darstellbar sind“, aufstellt, dass nämlich die Elektrolyse in Betreff der Eiweisskörper noch kein einziges mal geprüft sei, und dass er sich genöthigt gesehen habe, die Ausarbeitung der Methode zu übernehmen, vollständig hinfällig.

Dr. Smirnow bediente sich bei seinen Versuchen einer V-förmig gebogenen Glasröhre mit Glashahnverschluss in der Mitte, um nach Beendigung der Elektrolyse Anoden- und Kathodenproduct getrennt erhalten zu können. Ein Querschnitt der Röhre ist leider nicht angegeben. Jedenfalls ist es keineswegs gleichgültig, ob der Querschnittsdurchmesser 1 oder 10 cm beträgt, denn danach variiert die Stromdichte, welche allein maassgebend ist. Sodann habe ich in der Arbeit keine Angaben darüber finden können, in welcher Weise die beschriebene V-förmig gebogene Röhre aufgestellt war. Nach meinen Untersuchungen ist es nicht gleichgültig, ob die Schenkel der Röhre nach unten oder nach oben gerichtet sind; im ersten Falle müssen die Ionen, da die Elektroden an den Enden der Röhren sind, die ganze Flüssigkeitssäule durchlaufen, ehe sie sich an der Luft verflüchtigen können, im zweiten Falle verdampfen sie sofort an der nahen Oberfläche. Die erste Anordnung ist bei weitem die stärkere, die zweite die schwächere. Die Nachprüfung wird dadurch unnöthig erschwert. Der Autor benutzte nun als Ausgangsmaterial zu seinen Untersuchungen ca. 4 bis 6 Wochen alte Diphtheriealbumin- oder Diphtheriebouillonculturen. Eine solche Cultur in der vorher erwähnten Röhre bei 80 bis 100 Milliampère sechs Stunden lang, oder Bouillonculturen bis zum Eintritt der

maximalen Helligkeit des reducirten Elektrodenproducts elektrolysirt, hatte ihre giftigen Eigenschaften verloren und zeigte andererseits stark immunisirende, ja heilende Wirkung. Der Autor war imstande, mit ca. 10 ccm dieser so vorbehandelten Flüssigkeit mit tödtlichen Diphtheriegift Dosen inficirte Kaninchen zu heilen. — Anknüpfend an meine früheren Versuche habe ich auf Anregung meines hochverehrten Chefs, des Herrn Professor Dr. Renvers, es unternommen, die Resultate des Herrn Dr. Smirnow einer genaueren Nachprüfung zu unterziehen. Ich benutzte zwei U- oder V-förmig gebogenen Glasröhren von 22 cm Länge und 18 mm Querschnittsdurchmesser, in der Mitte befand sich ein Glashahn, während an beiden Polen je ein Platinadraht als Elektrode eingeschmolzen war. Die eine Glasröhre (ich will sie a nennen) war zur Elektrolyse in der Stellung mit nach oben gerichteten Polen, die andere Röhre b zur Elektrolyse in der Stellung mit nach unten gerichteten Polen eingerichtet, letztere wurde deshalb, um den Gasen das Entweichen zu ermöglichen, mit je einer Abzugsöffnung rechts und links von dem Glashahn versehen. Als Stromquelle diente eine Kette von 60 Zink-Kupfer, sogenannten Siemens-Elementen. Die Stromstärke wurde durch ein in den äusseren Stromkreis permanent eingeschaltetes Galvanometer (Milliampèremeter nach Hirschmann) genau controlirt.

Als Ausgangsmaterial bediente ich mich einer sechs Wochen alten Diphtheriebouilloncultur, von deren Giftigkeit ich mich vorher überzeugt hatte. Ich begann meine Versuche mit Röhre a. Zeitdauer 12 Stunden, absolute Stromdichte = 0,19 Milliampère pro Quadratmillimeter. Die Stromstärke ohne Röhrenquerschnitt anzugeben, führt nur zu Missverständnissen, ich werde deshalb im folgenden nur von absoluter Stromdichte sprechen. Das Resultat war aber hierbei kein sehr zufriedenstellendes. Ich fand, dass die Bacterien ganz entgegen meinen früheren Versuchen trotz der erheblichen Zeitdauer und Stromdichte nicht abgetödtet und auch die Toxine nur ungenügend abgeschwächt waren. Dagegen führte mich dieselbe Zeitdauer und Stromdichte bei der Röhre b mit unten befindlichen Polen sofort zu einem positiven Erfolge. Die Bacterien waren abgetödtet und die Toxine vernichtet, während die immunisirende Kraft erhalten blieb.

Ich greife einen Versuch aus der langen Reihe heraus: Ein Kaninchen von 1200 g Gewicht erhielt am 16. November 1894 1 Uhr Mittags 10 ccm Kathodenproduct, welches nach beendeter Elektrolyse neutralisirt war, intravenös, gleich nachher 0,6 ccm einer zweitägigen Diphtheriebouilloncultur subcutan. Die Temperatur betrug um 3½ Uhr 38,8°, um 6½ Uhr 38,5°, am 17. November 8 Uhr Morgen 39,5°, um 12 Uhr 39,3°, am 18. November schwankte die Temperatur zwischen 38,6° und 38,5°. ebenso am 19. November, ich injicirte deshalb um 1 Uhr Mittags 5 ccm wie oben intravenös, worauf die Temperatur nach zwei Stunden auf 39,3° stieg und sich auch an den folgenden Tagen auf dieser normalen Höhe erhielt. Das Thier blieb munter und gesund, während das Controlthier, mit derselben Dosis vergiftet, unter typischem Temperaturabfall am 19. November 10 Uhr Morgens verendete. In gleicher Weise verhält sich das Anodenproduct, wie ich durch eine weitere Versuchsreihe feststellte. Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, dass man mit Hilfe der Elektrolyse Diphtheriebacillenculturen so vorbehandeln kann, dass heilende Wirkungen damit erzielt werden. Ich war somit in der Lage, im wesentlichen die Resultate des Dr. Smirnow bestätigen zu können. Um nun aber festzustellen, ob die Elektrolyse wirklich so viel mehr leiste als die Wärme, setzte ich dieselbe sechswöchentliche Diphtheriebouilloncultur eine Stunde lang einer Temperatur von 65° C aus und stellte auch damit Heilungsversuche an. Die damit behandelten Thiere lebten zwar erheblich länger als die Controlthiere, starben aber schliesslich doch an Entkräftung unter subnormalen Temperaturen. Da nun aber 15 ccm, die zur Heilung eines Kaninchens von 1200 g Gewicht angewendet werden müssen, noch eine so grosse Flüssigkeitsmenge betragen, sodass die Anwendung dieser Methode beim Menschen, wie Dr. Smirnow selbst zugiebt, ausgeschlossen ist, so suchte ich diesem Uebelstande dadurch abzuhelfen, dass ich die immunisirenden Substanzen im Ausgangsmaterial vermehrte. Ich betrat dabei aber nicht denselben Weg wie der oben genannte Autor, welcher die Diphtheriebouillonculturen vor der Elektrolyse auf ¼ Volumen im Vacuum eindampfte. Zunächst war hierbei die Frage zu erledigen: Wo sind die immunisirenden Substanzen zu suchen? Die meisten Forscher neigen nun der Ansicht zu, dass die immunisirenden Substanzen in den Bacterienleibern enthalten sind, denn durch Thonfilter gejagte Bacterienbouillonculturen haben nur sehr ungenügend immunisirende Wirkung. Für einige Bacterienarten ist bereits die Richtigkeit dieser Ansicht bewiesen. Ich verliess deshalb in der Voraussetzung, dass es sich mit der Diphtherie ähnlich verhalte, die flüssigen Nährböden und benutzte jetzt nur feste Nährsubstrate zur Herstellung des Ausgangsmaterials für die Elektrolyse. Zu diesem Zweck impfte ich mittels eines sorgfältig im Dampfkoch-

¹⁾ Berliner klin. Wochenschr. 1894, No. 30.

topf sterilisirten Haarpinsels von einem Röhrchen mit zweitägiger Diphtheriebouilloncultur 40 Petri'sche Platten, die mit erstarrtem Agar gefüllt waren, liess die so angelegten Culturen drei Tage im Brütöfen wachsen und schabte dann den ziemlich reichlich gewachsenen Bacterienrasen mit einem sterilen Messer ab. Ich gewann so mit einem Schlage grosse Mengen von reinen Bacterienleibern ohne oder fast ohne sogenannte Stoffwechselproducte, aber nicht ohne Toxine; solch' abgeschabter Diphtherierasen erwies sich auf Kaninchen verimpft recht giftig. Verunreinigte Platten kommen nur sehr selten bei diesem Verfahren vor und sind andererseits sofort zu erkennen und können ausgeschieden werden. Die gewonnenen Bacterienleiber wurden dann in einer 10/100igen Kochsalzlösung aufgeschwemmt und so der Elektrolyse in der beschriebenen Glasröhre bei derselben Stromdichte wie in den früheren Versuchen (0,19 Milliampère pro Quadratmillimeter) ausgesetzt. Die Zeitdauer glaubte ich jedoch im Vergleich zu den früheren Versuchen mit sechswöchigen Bouillonculturen auf zwanzig Stunden steigern zu müssen. Ich greife zwei Beispiele aus den Monate lang fortgesetzten Versuchen heraus.

Am 19. December 1894, 10 Uhr Morgens erhielt ein Kaninchen von 1500 g Gewicht 2 ccm der so vorbehandelten Bacterienaufschwemmung, und zwar Kathodenproduct, intravenös in die Ohrvene und gleich danach 0,6 ccm zweitägiger Diphtheriebouilloncultur subcutan. Die Temperatur betrug um 12 Uhr 39,6°, um 3 Uhr 39,2°, um 6 Uhr 39,1°. Am 20. December Temperatur um 8 Uhr Morgens 39,3, um 11 Uhr 39,2, um 1 Uhr 39,3, um 7 Uhr 39,6°. Am 21. December Temperatur 8 Uhr Morgens 39,3, 7 Uhr Abends 40,4°. Am 22. December um 8 Uhr Morgens 39,8, 12 Uhr Mittags 40,3, es wurde noch 1 ccm wie oben intravenös injicirt. Die Temperatur stieg um 7 Uhr Abends auf 40,7, um dann am 23. December und allen folgenden Tagen normal zu sein. Das zu gleicher Zeit geimpfte Controllthier starb in der Nacht vom 21. zum 22. December unter subnormalen Temperaturen. Bei den Versuchen mit elektrolytisch vorbehandelten Diphtheriebouillonculturen waren noch 15 ccm zur Heilung des Versuchsthieres nöthig gewesen, bei diesem Versuch mit Bacterienaufschwemmung nur 3 ccm. Weiterhin prüfte ich auch das Anodenproduct, wobei ich anscheinend noch bessere Resultate erhielt. Ich lasse einen Versuch folgen.

Am 4. Januar 1895, 3 Uhr Nachmittags erhielt ein Kaninchen von circa 1500 g Gewicht 0,5 ccm einer giftigen zweitägigen Diphtheriebouilloncultur subcutan, 10 Minuten später 2 ccm der oben beschriebenen Diphtheriebacterienaufschwemmung, und zwar Anodenproduct, intravenös. Zeitdauer der Elektrolyse betrug 20 Stunden, absolute Stromdichte 0,19 M.-A. Die Temperatur betrug um 8 Uhr Abends 39,0, am 5. Januar 1895 8 Uhr Morgens 40,1, um 11 Uhr 39,2, um 1 1/2 Uhr 38,8, um 4 Uhr 39,2, um 7 1/2 Uhr 39,1°. Am 6. Januar 1895 Temperatur um 8 Uhr Morgens 39,3, um 12 Uhr Mittags 39,3, um 8 Uhr Abends 39,2°. Die Temperatur blieb am nächsten und allen folgenden Tagen normal. Das Thier war vollständig munter und konnte noch nach vier Wochen zu anderen Versuchen benutzt werden. Das Controllthier, von gleichem Gewicht und mit derselben Dosis vergiftet, starb in der Nacht vom 6. zum 7. Januar 1895.

Durch diese Versuche wird bewiesen, dass man eine in drei Tagen zum Tode führende Diphtherieinfection eines Kaninchens von 1500 g Gewicht durch intravenöse Injection einer elektrolytisch genügend vorbehandelten Diphtheriebacterienaufschwemmung zur Heilung bringen kann. Es ist eine solche Heilung wohl als eine Schnellimmunisirung anzusehen, wobei der infectirte Organismus gewissermaassen mit stark immunisirenden Substanzen überschwemmt wird, so dass die Infection sofort unterdrückt wird. Diese so vorzüglich immunisirende Lösung stellt sich als eine farblose, vollkommen klare Flüssigkeit von schwach alkalischer Reaction dar. Eiweiss ist darin nur in Spuren enthalten, so dass auch hierdurch der Gedanke nahegelegt ist, dass die immunisirenden Substanzen nicht an Eiweiss gebunden sind, eine Ansicht, die schon von anderer Seite vielfach erörtert wurde.

Bei so günstigen Thierversuchen ist wohl die Frage berechtigt, soll eine solche, wie ich ausserdem noch feststellte, an sich ungiftige Flüssigkeit nicht auch beim Menschen versucht werden? Da zur Heilung eines Kaninchens von 1500 g Gewicht 2 ccm ausreichten, so würden für ein Kind von 15–20 kg Gewicht 20 bis 26 ccm zur Unterdrückung der Infection erforderlich sein. Diese Flüssigkeitsmenge kann aber, ohne dickflüssig zu werden, im Vacuum mit Leichtigkeit auf 1/5 Volum eingedampft werden, so dass jetzt zur Heilung eines Kindes nur noch 4–5 ccm erforderlich wären, die nöthigenfalls noch verdoppelt werden könnten. Es sei mir gestattet, diese von mir dargestellte immunisirende Flüssigkeit mit dem Normalserum Prof. Behring's vom Jahre 1893 zu vergleichen. Prof. Behring präcisirt den Wirkungswerth desselben in kurzen Worten dahin¹⁾: „Der tödtliche Ausgang der Vergiftung eines Meerschweins von mittlerem Körpergewicht (circa 500 g) mit 0,8 ccm von meinem alten Diphtheriegift wird durch das Diphtherienormalheilserum verhütet, wenn 1/4 Stunde vor der subcutanen Injection der Giftlösung demselben Meerschwein an einer von der Giftinjectionsstelle entfernten Hautpartie das Serum

in einer Menge von 1:100 (ca. 5 ccm) subcutan applicirt wird.“ Von dem Normalserum waren zur Heilung eines Meerschweins von 500 g Gewicht 5 ccm erforderlich, von meinem elektrolytisch hergestellten Immunisirungsstoff sind zur Heilung eines Kaninchens von 1500 g Gewicht nur 2 ccm erforderlich, ausserdem lässt sich seine Immunisirungskraft durch Eindampfen im Vacuum auf 1/5 Volum um das fünffache steigern. Trotzdem wurden am Menschen Heilversuche bis jetzt nicht angestellt, weil die Methode zuvor an anderen Versuchsthiere und anderen Infectiouskrankheiten weiter geprüft wird und andererseits die begründete Hoffnung vorhanden ist, durch eine Modification der Darstellungsweise noch erheblich stärker immunisirende Lösungen darzustellen, worüber ich mir in nächster Zeit zu berichten vorbehalte.

Zum Schluss ist es mir eine ganz besonders ehrenvolle Pflicht, meinem hochverehrten Chef, Herrn Prof. Dr. Renvers, für das wohlwollende Interesse, mit welchem er meine Arbeit verfolgte, meinen verbindlichsten Dank abzustatten.

¹⁾ Deutsche medicinische Wochenschr. 1893, No. 17.