XIV.

Aus den Laboratorien des physiologisch-chemischen Instituts (Prof. Dr. Hofmeister) und der medizinischen Klinik (Prof. Dr. Erich Meyer) in Straßburg.

Über die Eigenschaften und Wirkungen des Östrins und seine Beziehung zur perniziösen Anämie der Pferde.

(Ausgeführt mit Unterstützung der v. Recklinghausen-Stiftung.)

Von

Dr. Richard Seyderhelm,

Assistent der medizinischen Klinik.

(Mit 1 Figur, 8 Kurven und Tafel I/II.)

Inhaltsübersicht.

	Seite
A. Einleitung	254
Historisches	254
Material. Vorkommen der Larven	257
B. Eigenschaften und Darstellung des Östrins	258
C. Toxische Wirkungen des Östrins	268
I. Auf das Pferd	268
II. Auf das Kaninchen	270
III. Auf den Hund	272
IV. Auf andere Tiere	273
D. Hämolyseversuche in vitro	277
I. Mit Larvenextrakten	277
II. Mit Larvenexkreten	286
E. Hämolyseversuche am lebenden Tiere	290
I. Mit den Larvenlipoiden	290
II. Mit den wässrigen Gesamtextrakten der Larven	294
III. Mit Östrin	301
Anhang: Die osmotische Resistenz der Erythrocyten	306
F. Die Frage der Übertragbarkeit der Krankheit	306
I. Übertragungsversuche mit Kaninchen	308
II. Versuche zur Analysierung des übertragenden Agens	314
G. Epikrise	321
H. Zusammenfassung	324

A. Einleitung.

Historisches.

In früheren, in Gemeinschaft mit meinem Vater ausgeführten Untersuchungen¹⁾ wurde an einer größeren Versuchsreihe von Pferden experimentell der Nachweis erbracht, daß die perniziöse Anämie der Pferde, auch infektiöse Anämie der Pferde genannt, durch die im Pferdemagen schmarotzenden *Gastrophilus*larven, die Larven der Pferdebiessfliege, *Oestrus equi*, hervorgerufen wird. Es gelang, durch fortgesetzte Injektionen wässriger Extrakte von *Gastrophilus*larven beim Pferde das Bild der perniziösen Anämie, wie sie vor allem in Lothringen endemisch ist, in allen ihren Einzelheiten zu erzeugen. Es ließ sich mit Sicherheit feststellen, daß die Larven hierbei nicht die Rolle des Wirtes eines die Krankheit hervorrufenden Mikroorganismus spielen, sondern daß in den Larven enthaltene Giftstoffe die Krankheit auslösen. Hierbei blieb zunächst die Frage offen, ob es sich um ein einheitliches tierisches Gift oder um mehrere toxische Substanzen handelt, die beim Pferde einerseits eine in erster Linie das Zentralnervensystem befallende akute Giftwirkung, andererseits bei chronischer Verabreichung subletaler Dosen schwere Anämie und die mit ihr einhergehenden pathologisch-anatomischen Veränderungen auslösen. Der Kürze wegen wurde vorläufig der durch seine akute, durchaus typische Wirkung auf Pferd und Esel charakterisierte Bestandteil der *Gastrophilus*larven als »Östrin« bezeichnet²⁾.

Es erhob sich nun zunächst die Frage nach den chemischen und physikalischen Eigenschaften des Östrins, vor allem aber war der Entstehungsmechanismus der Anämie zu verfolgen und zu ent-

1) K. R. Seyderhelm und R. Seyderhelm, Die Ursache der perniziösen Anämie der Pferde. Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. 76, S. 149—201. — Dieselben, Wesen, Ursache und Therapie der perniziösen Anämie der Pferde. Arch. f. wissenschaftl. u. prakt. Tierheilkunde Bd. 41, 1914. — Dieselben, Experimentelle Untersuchungen über die Ursache der perniziösen Anämie der Pferde. Berliner Tierärztl. Wochenschrift 1914, Nr. 34. — R. Seyderhelm, XVII. Tagung der Deutschen Pathologischen Gesellschaft 1914.

2) Da es nicht gelungen ist, bei der Verarbeitung der Östruslarven die wirksamen Bestandteile in chemisch reiner Form zu isolieren, so kann die Bezeichnung »Östrin« nicht auf scharf begrenzte chemische Bedeutung Anspruch erheben. Es empfahl sich aber, für denjenigen Bestandteil der Extrakte, welcher das akute, durch nervöse, sekretorische und Fiebersymptome charakterisierte Vergiftungsbild erzeugt und sich durch Thermostabilität, Löslichkeit in 50%igem Alkohol und kolloide Natur auszeichnet, einen kurzen, handlichen Namen zu wählen.

scheiden, ob und welche anderen in den Larven enthaltenen Substanzen hierbei eine Rolle spielen, oder ob das Östrin selbst die Anämie hervorruft. Zweck der vorliegenden Untersuchungen, die während eines Zeitraumes von mehreren Jahren nur mit Unterbrechungen durchgeführt werden konnten, war es, diese Fragen zu beantworten.

Herrn Prof. Hofmeister und Herrn Prof. Erich Meyer sei auch an dieser Stelle für ihre Ratschläge und Unterstützung, desgleichen dem Kuratorium der v. Recklinghausen-Stiftung, insbesondere Herrn Dr. H. v. Recklinghausen, für die materielle Unterstützung aus der genannten Stiftung gedankt, ebenso wie ich meinem Vater für die Möglichkeit zu den an zahlreichen Versuchspferden vorgenommenen Versuchen danke.

Chemische und toxikologische Untersuchungen über die Gastrophiluslarven fehlen fast völlig sowohl in der Literatur der tierischen Gifte als auch in der veterinärmedizinischen Literatur der allgemeinen Tierpathologie. Die Gastrophiluslarven wurden im Gegenteil meistens als harmlose Parasiten des Pferdes angesehen. Es erklärt sich dies einerseits daraus, daß in der Tat viele Pferde die genannten Parasiten in ihrem Magen beherbergen, ohne Krankheitserscheinungen zu zeigen, andererseits weil die nahezu spezifische Giftwirkung auf das Pferd eine Auffindung des Giftes auf experimentellem Wege erschwerte: Dosen des Giftes, die ein Pferd in wenigen Minuten töten, rufen bei den üblichen Versuchstieren, beim Kaninchen, Meerschweinchen, Hund, Maus und Frosch keine sichtbare Wirkung hervor. Da experimentelle Versuche mit dem Extrakte von Gastrophiluslarven am Pferde bisher nicht angestellt waren, lag keine Veranlassung vor, irgendwelche pathologischen Zustände beim Pferde mit einer Intoxikation von seiten der Gastrophiluslarven in Zusammenhang zu bringen.

Und doch hat man schon von jeher das Vorhandensein größerer Mengen von Gastrophiluslarven im Magen der Pferde mit verschiedenen Krankheitszuständen in einen kausalen Zusammenhang gebracht. So beobachtete man Kolikanfälle, allgemeine Verdauungsstörung, ferner in vielen Fällen extreme Anämie, allgemeine wässerige Infiltration des Unterhautzellgewebes, Kräfteverfall usf. Im Jahre 1866 beschreibt ein französischer Autor, Cambron¹⁾, eine Krankheit bei Pferden, deren Bild klinisch genau der heute als perniziöse Anämie bezeichneten Krankheit in allen Einzelheiten entspricht, und bringt

1) Cambron, Annales vétérin. 1866, S. 455.

sie in Zusammenhang mit den *Gastrophilus*larven, von denen er in all diesen Fällen stets eine große Anzahl fand.

In allen Fällen aber wurde, namentlich in der neueren Literatur, der Zusammenhang als rein mechanischer Natur aufgefaßt, etwa so, daß infolge der durch die *Gastrophilus*larven bedingten Verengung des Darmlumens eine verminderte Futteraufnahme und dadurch eine Beeinträchtigung des allgemeinen Nährzustandes bedingt würde.

Daneben vertrat Ries¹⁾ die Ansicht, daß die *Gastrophilus*larven (neben anderen Parasiten) den Erreger der perniziösen Anämie der Pferde beherbergen können und so eventuell eine Verbreitung der genannten Krankheit bewirken, eine Ansicht, die sich bisher nicht beweisen ließ.

Bezüglich der oben nur angedeuteten tierpathologischen Einzelheiten sei auf die ausführlichere Besprechung der zugehörigen Literatur in unserer, an obengenannter veterinärliterarischer Stelle niedergelegten Arbeit hingewiesen. Dagegen sei hier noch der biologisch interessanten Veränderungen Erwähnung getan, die in der Magenwand der Pferde durch die *Gastrophilus*larven hervorgerufen werden, namentlich deswegen, weil auf Grund der histologischen Untersuchungen derselben zuerst vermutungsweise auf eine von den Larven abgesonderte, örtlich reizende Substanz geschlossen worden ist. Gujot²⁾ (1901) und Weinberg³⁾ (1907) haben diese Veränderungen besonders eingehend untersucht. Letzterer beschreibt die an der Ansatzstelle der Larven sich findende subakute oder chronische Entzündung; er findet dabei häufig eine Endarteriitis oder Endomesarteriitis der kleinen Arterien, zuweilen auch ausgedehnte Ulzerationen, von hohen gewucherten Epithelrändern umgeben. Nach Weinberg sind diese Veränderungen der Magenwand meistens die Folge einer gleichzeitigen Invasion von Bakterien, die durch die Larven inokuliert würden. Petit⁴⁾ (1910), und im gleichen Sinne urteilt Perroncito⁵⁾, will des öfteren Epithelwucherungen mit echtem papillomatösem Aufbau von karzinomartigem Typus gefunden haben. Er stellt die Hypothese auf, »es möchten die Larven ein krebsartiges Gift (virus cancéreux) transportieren und inokulieren«. Es findet sich hier also, wenn auch nur histologisch begründet, zum ersten Male die Vermutung, daß die *Gastrophilus*larven eine gewebsschädigende Substanz absondern.

1) Ries, *Recueil de méd. vét.* 1906, S. 677.

2) Gujot, *Arch. de parasitologie* 1901, T. 4.

3) Weinberg, *Annales de l'inst. Pasteur* 1907, T. 21.

4) Petit, *Recueil de méd. vét.* 1910, T. 57.

5) Perroncito, *Fortschritte der Veterinärmedizin* 1903, Hft. 1.

Endlich hat Weinberg¹⁾ (1908) die Gastrophiluslarven auf hämoxische Substanzen untersucht. Er fand, daß die Eingeweide der Östridenlarven im allgemeinen kein Blut enthalten. Wenn man in dessen die Larven einer großen Anzahl von Pferden untersuche, finde man solche, deren Darm ganz von hämolysiertem Blut angefüllt ist. Die Gastrophiluslarven ernähren sich also nach seiner Ansicht vom Blute ihres Wirtes, aber ihr Saugen finde intermittierend statt. Er schließt daraus, sie sezernierten Substanzen, die imstande seien, die Gerinnung des Blutes zu hemmen und die roten Blutkörperchen aufzulösen. Diese Substanzen seien nicht spezifisch und schienen thermostabil zu sein. Es sei sehr wahrscheinlich, daß die Gastrophiluslarven, wenn sie sehr zahlreich wären, durch die dauernden Blutentziehungen bei ihrem Wirt einen gewissen Grad von Anämie hervorrufen könnten.

Material. Vorkommen der Larven.

Das Larvenmaterial, das bei den vorliegenden Versuchen zur Verarbeitung gelangte, etwa 10 000 Stück, war zum großen Teil auf dem Schlachthof in Metz²⁾ gesammelt, der Rest stammte vom Schlachthof in Straßburg und von mehreren anderen Schlachthöfen Mitteldeutschlands. Die relative Häufigkeit der Gastrophiluslarven bei den Schlachtpferden in Metz entspricht der überaus starken Verbreitung der Larven in Lothringen. Das zahlreiche Vorkommen der Gastrophiluslarven dortselbst erklärt sich außer aus klimatologischen Gründen durch den Umstand, daß in Lothringen eine ausgedehnte Pferdezucht getrieben wird, die Pferde die meiste Zeit auf der Weide verbringen, die Larven also hier günstige Bedingungen zur Fortentwicklung finden. Auch in den von der perniziösen Anämie der Pferde heimgesuchten Departements Frankreichs sind die Gastrophiluslarven überaus häufig. Relative Häufigkeit der Gastrophiluslarven und Vorkommen der perniziösen Anämie gehen Hand in Hand. Genauere Statistiken über das Vorkommen der Larven in Deutschland, namentlich in den Hauptpferdezuchtgebieten, fehlen. Im Elsaß sind Fälle von perniziöser Anämie der Pferde eine Seltenheit. Wir bekamen bisher nur drei innerhalb 4 Jahren zu sehen. Auf etwa 4000 Larven vom Schlachthof in Metz kamen im gleichen Zeitraum nur etwa 100 Stück vom Schlachthof in Straßburg!

1) Weinberg, Compt. rend. de soc. biolog. 1908, T. 65.

2) Auch an dieser Stelle danke ich Herrn Schlachthofdirektor Dr. Kuppelmayr in Metz für seine stets bereite Unterstützung durch Übersendung von Larvenmaterial.

Im wesentlichen bestanden die Larvensendungen aus Exemplaren der Spezies *Gastrophilus equi*, nur zum geringen Teile aus *G. haemorrhoidalis*, *nasalis* und *pecorum*. Unter 4110 Larven aus Metz befanden sich 125 Stück *G. haemorrh.* Letztere machten somit nur etwa 3% der Gesamtzahl aus. Die übrigen *Gastrophilus*arten, wie *G. nasalis* und *G. pecorum* fanden sich ebenfalls nur in geringer Anzahl. Die Hauptmenge der Larven bestand aus *G. equi*¹⁾. Unter den Larven vom Schlachthof in Straßburg fanden sich Exemplare von *G. haemorrh.* nur äußerst selten, innerhalb zweier Jahre nur etwa 20 Stück. In den früheren Untersuchungen (a. a. O.) hatte sich uns ergeben, daß sich gerade *G. haemorrh.*, die kleinste unter den *Gastrophilus*larvenarten, für das Pferd als ganz besonders toxisch erwies.

Es sei hierbei erwähnt, daß sich jetzt im Kriege dieses Zahlenverhältnis völlig geändert hat, *Gastrophilus*larven, insbesondere auch *G. haemorrh.*, auf dem Schlachthof in Straßburg bedeutend vermehrt auftreten, im Gegensatz zum Schlachthof in Metz, wo das Vorkommen der *Gastrophilus*larven auffallend nachgelassen hat. Selbstverständlich führt sich diese Verschiebung auf die durch den Krieg bedingte enorme Ortsveränderung des gesamten Pferdmaterials zurück. Anderenorts soll hierauf noch näher eingegangen werden.

Der erwähnten Häufigkeit der einzelnen Larvenarten entsprechend kamen zu den vorliegenden Versuchen in erster Linie Exemplare von *G. equi* zur Verarbeitung. Die Verwendung von *G. haemorrh.* wird stets besonders hervorgehoben²⁾.

Die Larven wurden zum großen Teil direkt lebend zur Extraktion und weiteren chemischen Verarbeitung verwendet. Infolge der enormen Lebenszähigkeit bleiben sie an der Luft meist 8—14 Tage und länger am Leben. Zum Teil wurden die Larven mittels Chloroformdämpfen (innerhalb weniger Stunden) abgetötet und teils bei Zimmertemperatur, teils bei 37° getrocknet, um erst später extrahiert zu werden. Ein weiterer Teil endlich wurde lebend bei 37° in Ringelösung gehalten zwecks Gewinnung und weiterer Verarbeitung der Exkrete der Larven.

B. Eigenschaften und Darstellung des Östrins.

Anfänglich ergaben sich für die chemische Untersuchung der Extrakte der *Gastrophilus*larven gewisse technische Schwierigkeiten, die in erster Linie darauf beruhten, daß wegen der ausgesprochenen

1) Herrn Prof. Dr. Döderlein am hiesigen zoologischen Institut der Universität, der mir auch im Verlauf dieser Arbeit wiederholt mit seinem Rat zur Seite stand, spreche ich meinen Dank aus.

2) Bezüglich der interessanten biologischen Verhältnisse der *Gastrophilus*larven bzw. Östrusfliegen siehe die frühere Arbeit in diesem Archiv Bd. 76, S. 155. Im übrigen sei auf die der Arbeit beigegebenen Abbildungen verwiesen (Taf. I/II, Fig. 1 und 2).

Spezifität der Giftwirkung des Östrins, die sich fast ausschließlich auf das Pferd zu beschränken schien, nur dieses Tier zur Prüfung der einzelnen chemischen Fraktionen in Frage kam. Die ungleiche Giftempfindlichkeit der einzelnen Versuchspferde, ferner die schwankende Giftigkeit der einzelnen Larvenextrakte brachte die Notwendigkeit mit sich, jedes neu eingestellte Versuchspferd zunächst auf seine Giftempfindlichkeit zu prüfen und mit steigenden Mengen des Ausgangsmaterials langsam die minimale Wirkungs-dosis festzustellen, da naturgemäß nicht mit tödlichen Dosen gearbeitet werden konnte.

Vorgreifend sei aber schon hier erwähnt, daß sich im Laufe der Versuche schließlich herausstellte, daß das 10–20fache der für das Pferd tödlichen Dosis auch beim Kaninchen bei intravenöser Injektion eine typische, ganz analoge Giftwirkung hervorruft (vgl. S. 270 f.).

Über die leichte Löslichkeit des Östrins in Wasser und seine Kockstabilität haben wir bereits in unserer früheren Arbeit (vgl. Fußnote S. 254) berichtet. Der wässrige, bei Zimmertemperatur durch Schütteln der (am besten mit Quarzsand) fein verriebenen Larven erhaltene Extrakt stellt eine mehr oder minder trübe, graugelbe bis bräunlich rote, leicht schäumende Lösung von aromatischem Geruch und neutraler Reaktion dar.

Diese Lösung zeigt im wesentlichen folgende Eigenschaften:

- Kochen gibt einen mehr oder minder starken Niederschlag.
- Biuretreaktion negativ.
- Millonsche Reaktion positiv.
- Xanthoproteinreaktion positiv.
- Reduzierende Wirkung gegenüber Kupfersulfat stark ausgesprochen.
- Mit Azeton feinflockiger Niederschlag.
- Mit absolutem Alkohol, doppeltes Volumen, feinflockiger Niederschlag.
- Mit gesättigter Kochsalzlösung, doppeltes Volumen, kein Niederschlag.
- Mit gesättigter Ammonsulfatlösung Niederschlag.
- Mit Jodquecksilberkalium Niederschlag.
- Mit Jodwismutkalium geringer Niederschlag.
- Mit Pikrinsäure geringer Niederschlag.
- Mit Phosphorwolframsäure sehr reichlicher, flockiger Niederschlag.
- Gerbsäure desgleichen.
- Phosphormolybdänsäure desgleichen.
- Phosphor nachweisbar.
- Schwefel nicht vorhanden.

Prüfung der Löslichkeit des Östrins in 50%igem Alkohol.

18. XI. 1912. Wässriger Extrakt von 2 *Gastrophilus*larven wird mit der gleichen Menge absoluten Alkohols versetzt, das Filtrat zur Trockene gebracht, der Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Diese Lösung gelangt zur intravenösen Injektion in Versuchspferd Nr. 21.

Typische Wirkung, Zittern am ganzen Körper, Steigen der Temperatur von 38,0 auf 40,4⁰¹), des Pulses von 36 auf 60 pro Minute; Temperatur noch am 20. XI. 40,2°. Das Tier erholt sich nur langsam.

Aus diesem und allen späteren Versuchen folgt, daß das Östrin in 50%igem Alkohol löslich ist.

Prüfung der Löslichkeit des Östrins in Äther.

19. I. 1914. Der Rückstand eines Alkoholextraktes von 5 Gastrophiluslarven wird in der Wärme ausgiebig mit Äther extrahiert, der Rückstand des Äthers mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und dem Versuchspferd Nr. 54 intravenös injiziert. Es tritt keine Reaktion auf.

Diese sowie spätere Versuche zeigen, daß das Östrin in Äther unlöslich ist.

Verhalten des Östrins gegenüber Phosphorwolframsäure.

7. I. 1913. 2 Gastrophiluslarven werden mit 40 ccm physiologischer Kochsalzlösung verrieben, die Aufschwemmung filtriert und durch Kochen nach Ansäuern mit Essigsäure die Eiweißkörper entfernt. Von dieser Lösung gelangt die eine Hälfte (= 1 Gastrophiluslarve) als Kontrollprüfung (auf ihre Wirksamkeit) zur intravenösen Injektion auf Versuchspferd Nr. 36 am 8. I. 1913. Die Lösung erweist sich wirksam. Die andere Hälfte wird mit Phosphorwolframsäure gefällt und filtriert. Der Rückstand wird gewaschen und mit Wasser aufgenommen, darauf Barytwasser im Überschuß hinzugesetzt, Kohlensäure eingeleitet und filtriert. Dieses Filtrat wird mit Natriumkarbonat auf neutrale Reaktion gebracht.

Am 10. I. 1913 gelangt diese dem Phosphorwolframsäure-Niederschlag entsprechende Lösung zur intravenösen Injektion auf Versuchspferd Nr. 36. Es tritt keine Reaktion ein.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-Niederschlag wird in der gleichen Weise von der Phosphorwolframsäure befreit und am 11. I. 1913 dem Versuchspferd Nr. 36 intravenös injiziert. Es tritt eine deutliche typische Reaktion ein.

Diese Prüfung des Verhaltens gegenüber Phosphorwolframsäure wird wiederholt. Als Versuchspferd diente Nr. 38. Der Ausgang des Versuches war der gleiche.

Es folgt daraus, daß das Östrin durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt wird.

Verhalten des Östrins gegenüber höheren Konzentrationen von Alkohol.

Am 10. I. 1914 werden 10 Larven, sorgfältig in Wasser verrieben, filtriert, darauf die Lösung mit dem gleichen Volumen 90%igen Alkohols

1) Normale Temperatur beim Pferde: bis 38,5°, Puls normalerweise: 36 pro Minute.

versetzt und etwa $\frac{1}{4}$ Stunde gekocht. Das Filtrat wird zur Trockene gebracht und in 200 ccm Wasser aufgenommen. Zunächst wird die Wirkung dieser Ausgangslösung geprüft. Hierzu dient Versuchspferd Nr. 54. Dies Tier erhält am 11. I. 1914 intravenös 5 ccm der Lösung, 0,25 Gastrophiluslarve¹⁾ entsprechend; keine Wirkung; nach einer $\frac{1}{2}$ Stunde weitere 0,5 Larven intravenös; ebenfalls keine Wirkung. Das gleiche Tier erhält am nächsten Tage vormittags 20 ccm der obigen Lösung = 1,0 Larven intravenös, wiederum keine Wirkung, um 2,00 Uhr p. m. intravenös noch 15 ccm derselben Lösung (= 0,75 Larven), um 2,30 Uhr beginnt das Tier am ganzen Körper heftig zu zittern, knickt wiederholt in den Hinterbeinen ein, wird äußerst unruhig. Um 2,45 Uhr Höhepunkt der Wirkung: Tier kann sich vor Zittern und allgemeiner Schwäche kaum mehr auf den Beinen halten, Puls 60 pro Minute. Tier scheint ernstlich gefährdet. Langsame Besserung. Um 4,00 Uhr zittert Tier nicht mehr. 4,30 Uhr: Temperatur 39,0°. Puls 48 pro Minute. Um 11,00 Uhr p. m. Temperatur 37,8°, Puls 42.

Es hatten sich offenbar die Dose vom Nachmittag und die vom Vormittag in ihrer Wirkung summiert. Die Reaktion ist also nach intravenöser Injektion des Extrakts von $1\frac{3}{4}$ Larve eingetreten. Gleichzeitig ergibt sich aus diesem Versuche, daß durch $\frac{1}{4}$ stündiges Kochen in 50%iger alkoholischer Lösung das Östrin seine Wirksamkeit nicht verliert.

Der Rest der obigen Stammlösung wurde zunächst auf ganz geringes Volumen eingedampft und dann mit der 4fachen Menge absoluten Alkohols versetzt, der Niederschlag mit absolutem Alkohol gewaschen, dann in 150 ccm Wasser aufgenommen und nochmals filtriert. Das Filtrat wurde bei 50° zur Trockene gebracht und in 150 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und ebenfalls nochmals filtriert.

Zur Prüfung auf die Wirksamkeit von Filtrat und Rückstand diente wieder Versuchspferd Nr 54, bei dem die Reaktion vom 12. I. 1914 vollkommen abgeklungen war.

Am 14. I. 1914 Prüfung des Filtrats (in 80%igem Alkohol löslicher Teil).

2,15 Uhr intravenös 20 ccm = 1,0 Larve, keine Reaktion.

3,00 » » 10 » = 0,5 » » »

3,55 » » 10 » = 0,5 » » »

Es erwies sich das Filtrat unwirksam.

Am 15. I. 1914 Prüfung der Fällung (in 80%igem Alkohol unlöslicher Larventeil).

2,25 Uhr intravenös 20 ccm = 1,0 Larve.

2,45 Uhr Tier wird von einer plötzlichen Schwäche auf der Hinterhand befallen, knickt öfters im Kreuz ein, zittert am ganzen Körper. Beim Gehen Taumeln, Gefahr des Umstürzens. Langsames Abklingen der Reaktion.

Daraus folgt, daß das Östrin aus seiner wässerigen Lösung durch die 4fache Menge absoluten Alkohols, d. h. in einer 80%igen Al-

1) Der Kürze halber wurde im folgenden die jeweilige, a Larven entsprechende Extraktmenge als = »a Larven« bezeichnet.

koholkonzentration, gefällt wird. Das Östrin ist also in 50%igem Alkohol löslich, in 80%igem Alkohol unlöslich. Weiter folgt aus dem letzten Versuch, daß durch $\frac{1}{4}$ stündiges Kochen in 50%igem Alkohol die Giftigkeit des Östrins nicht herabgesetzt wird.

Verhalten des Östrins gegenüber Azeton.

Als Ausgangsmaterial diente eine durch wiederholtes Füllen mit absolutem Alkohol erhaltene Östrinlösung. Zusatz der 4fachen Menge frisch destillierten Azetons gab einen Niederschlag, derselbe wurde nach vorausgegangenem Waschen mit reinem Azeton in wässrige Lösung gebracht, das Filtrat eingedampft und ebenfalls in Wasser aufgelöst.

Der erste Versuch an Versuchspferd Nr. 55 verlief völlig negativ: Das Tier erhält am 21. I. 1914 intravenös vom Azetonfiltrat so viel, als 2 Larven entspricht, ohne zu reagieren. Am 22. I. 1914 intravenöse Injektion vom Azetonniederschlag, entsprechend 1,5 Larven, auf das gleiche Versuchspferd; abermals keine Reaktion.

Der Versuch wird wiederholt mit einem bisher nicht vorbehandelten Versuchspferd Nr 56.

Am 23. I. 1914 intravenös Azetonfällung, entsprechend 2 Larven. Nach wenigen Minuten setzt eine sehr starke Reaktion ein: starkes Zittern am ganzen Körper, wiederholtes Einknicken der hinteren Extremitäten, wiederholte Defäkationen, Konjunktiven der Augen hochrot, Puls 70 pro Minute. (Mit 50 cem Immunserum wird die Wirkung in wenigen Minuten kupiert.)

Das gleiche Versuchspferd erhält am übernächsten Tage von dem durch Azeton nicht gefällten Teile so viel, als 2 Larven entspricht. Nach 30 Minuten starke Reaktion, Zittern, Dyspnoe, Fieber usw. Es erweisen sich also beide Fraktionen wirksam.

Es folgt aus diesen Versuchen, und wurde durch spätere Versuche bestätigt, daß das Östrin durch Azeton nur unvollkommen gefällt wird. Es läßt sich auch durch wiederholtes Füllen mit absolutem Azeton keine quantitative Fällung des Östrins erzielen.

Läßt man eine durch wiederholtes Füllen mit absolutem Alkohol gewonnene Östrinlösung mehrere Tage im Kühlraum stehen, so scheidet sich an der Oberfläche und auch auf dem Boden der Lösung ein membranartiger Niederschlag ab (mikroskopisch keine Bakterien). Dieser häutchenförmige Niederschlag wurde mittels Platinnetz von der Lösung getrennt und mit Wasser gewaschen. Er erwies sich beim Verbrennen als eiweißhaltig, war in verdünnter Salzsäure unlöslich, desgleichen in Kalilauge. Er wurde mehrere Stunden hindurch mit Wasser geschüttelt, es resultierte eine kolloidale Lösung, die sich beim Tierversuch als unwirksam erwies. Die vom genannten Niederschlag befreite Lösung wies im Tierversuch keinerlei Verminderung ihrer Giftwirkung auf.

Die Lösung der durch mehrfaches Füllen mit absolutem Alkohol erhaltenen Niederschläge (vgl. oben) gibt die obengenannten Fällungen der wässrigen Ausgangsextrakte (vgl. S. 259) nur noch zum

geringen Teile. Es findet keine Fällung mit Jodwismutkalium, Jodjodkalium, Pikrinsäure, Phosphorwolframsäure, Uranylazetat statt, auch nicht mit Kupfersulfat, Kupferazetat, Eisenchlorid, Magnesiumsulfat, Zinksulfat. Dagegen ergeben sich mehr oder minder reichliche Niederschläge mit:

Quecksilberazetat, Merkuronitrat, Merkurinitrat, neutralem, namentlich basischem Bleiazetat.

Die genannte Lösung reduziert übrigens Kupfersulfatlösung nicht mehr, reduziert dagegen nach 3 Minuten langem Kochen mit Salzsäure Fehlingsche Lösung. Die Molischsche Reaktion ist stark positiv.

Fällung des Östrins durch Schwermetalle.

1. Durch Bleisalze.

Es sollte zunächst geprüft werden, ob eine Fällung des Östrins durch basisches Bleiazetat stattfindet.

Zuvor war die Feststellung nötig, ob durch Schwefelwasserstoff, der zur Entfernung des Bleis dienen sollte, das Östrin in seiner Wirksamkeit beeinträchtigt wird.

In die Extraktlösung von 2,5 Larven wird 1 Stunde lang Schwefelwasserstoff geleitet, darauf durch einen kräftigen Kohlensäurestrom wieder entfernt. Diese Lösung wird Versuchspferd Nr. 67 intravenös verabreicht. Nach 2 Stunden typische Reaktion.

Durch Schwefelwasserstoff wird also die Giftwirkung des Östrins nicht wesentlich beeinträchtigt.

Bei dieser Gelegenheit wurde auch die Einwirkung von Schwefelsäure auf Östrinlösung untersucht (1 cem 25%ige Schwefelsäure auf 100 cem Extraktlösung, 1 Stunde lange Einwirkung bei Zimmertemperatur, darauf Neutralisierung mit Natronlauge). Es wurde wiederum dem Versuchspferd Nr. 67 am 14. V. 1914 die so behandelte Lösung, 2 Larven entsprechend, intravenös verabreicht: typische Reaktion. Der Versuch wurde wiederholt mit Versuchspferd Nr. 65 am 3. VI. 1914 mit einer Lösung von $1\frac{1}{2}$ Gastrophiluslarvenextrakt, der in der gleichen Weise der Wirkung verdünnter Schwefelsäure ausgesetzt war. Auch in diesem Fall trat die toxische Wirkung des Östrins zutage. Die gleiche Lösung, und zwar das gleiche Quantum, wurde zu gleicher Zeit Versuchspferd Nr. 68 intravenös injiziert, rief hier jedoch keine Spur von Wirkung hervor, eins der vielen Beispiele, wie äußerst verschieden sich die einzelnen Pferde dem Östrin gegenüber empfindlich erweisen (vgl. unten S. 264 und 266).

Es erweist sich das Östrin demnach auch gegenüber geringer Konzentration von Schwefelsäure resistent.

Dennoch verursachten die nun folgenden Tierversuche mit Bleifällung und Bleifiltrat große Schwierigkeiten, in erster Linie wieder durch die oben erwähnte stark verschiedene Empfindlichkeit der einzelnen Pferde gegenüber subletalen Dosen von Östrin bedingt. Die Versuche mit Bleifällung erstreckten sich auf die Versuchspferde Nr. 65, 66, 67, 68, 69

und 73. Von diesen Tieren erwies sich Versuchspferd Nr. 66 als ganz unbrauchbar für unsere Versuche. Ebenso wie Versuchspferd Nr. 68 (vgl. oben), zeigte es sich Östrinlösungen von bekanntem Giftgehalt gegenüber äußerst resistent. Es möge dies aus folgendem Parallelversuch hervorgehen.

Versuchspferd Nr. 68 und 66 erhalten am 27. V. 1914 intravenös ersteres 2 Larven (absolute Alkoholfällung) letzteres 4 Larven von derselben Lösung. Tier Nr. 68 reagiert so stark, daß der Exitus droht, Tier Nr. 66 reagiert trotz der doppelten injizierten Menge überhaupt nicht. Aus diesem Grunde durften zunächst negative Ausfälle der Versuche nicht als beweiskräftig bei der Beurteilung angesehen werden. Es würde zu weit führen, die einzelnen Versuche, namentlich die negativ ausgefallenen, anzuführen. Bei den Versuchspferden Nr. 65, 67, 68, 69 und 73 ließ sich in übereinstimmender Weise feststellen, daß das Östrin durch Bleisalze gefällt wird. Die Entfernung des Bleis geschah dabei teils mit Schwefelwasserstoff, teils mit Schwefelsäure. Die Lösungen, die injiziert wurden, waren neutralisiert.

Beispiele: Versuchspferd Nr. 65 erhält am 19. VI. 1914 intravenös dem Bleiniederschlag entsprechend 2 Larven. Nach 40 Minuten tritt eine sehr schwere Reaktion ein. Das Tier schwankt, zittert am ganzen Körper, knickt wiederholt in den Hinterbeinen ein, die Temperatur steigt auf $40,1^{\circ}$, der Puls auf 60 pro Minute. Die Reaktion klingt nur langsam ab.

Versuchspferd Nr. 67 erhält am 22. V. 1914 intravenös die bleifällbaren Substanzen, entsprechend 2 Larven. Nach 20 Minuten wird das Tier sehr unruhig, der Puls steigt auf 52 pro Minute, nach weiteren 5 Minuten beginnt es in den hinteren Extremitäten zu zittern und des öfteren einzuknicken. Nach 1 Stunde ist die Reaktion abgeklungen.

Zu gleicher Zeit erhält Versuchspferd Nr. 68 die gleiche Menge derselben Lösung intravenös, das Tier reagiert noch wesentlich stärker als Tier Nr. 67.

Ebenfalls typisch war die Reaktion bei Versuchspferd Nr. 69. Am 8. VI. 1914 Prüfung der Empfindlichkeit des Pferdes: 2 Larven (absolute Alkoholfällung) rufen eine typische, nach 60 Minuten einsetzende, 5 Stunden andauernde Reaktion hervor.

Am 9. VI. 1914 intravenöse Injektion vom Filtrat des Bleiniederschlags, entsprechend 2 Larven, keine Reaktion (auch bei Versuchspferd Nr. 68 mit dem gleichen Material keine Reaktion).

Am 10. VI. 1914 intravenöse Injektion der gleichen Lösung, doppelte Menge, entspräche 4 Larven, keine Reaktion (auch bei Versuchspferd Nr. 68 mit gleichem Material keine Reaktion).

Am 11. VI. 1914 intravenöse Injektion der zugehörigen Bleifällung, entsprechend einer Menge von $1\frac{1}{2}$ Larven. Nach 20 Minuten heftig einsetzende Reaktion, zahlreiche, zuletzt flüssige Defäkationen, Zittern am ganzen Körper, Schwanken. Puls steigt rasch auf 95 pro Minute, Temperatur von $38,3$ auf $40,2^{\circ}$. Stark beschleunigte Atmung, 40 pro Minute. Noch am Abend Puls 72, Respiration 36 pro Minute. Noch am nächsten Tage Puls 80, Respiration 36 pro Minute, Temperatur $38,6^{\circ}$. Tier zittert immer noch leicht, schwankt stark beim Gehen, es erhält subkutan 60 ccm Immunserum und 40 g Ol. camph. forte. Abends Tier ruhiger, Temperatur

wieder 40,0°, Puls 60, Respiration 36 pro Minute. Am nächsten Tage 6,00 Uhr a. m. Temperatur 39,7°, Puls 60, Respiration 36 pro Minute, nachmittags Temperatur 39,8°.

Am 14. VI. 1914 6,00 Uhr a. m. Temperatur 38,5°, Puls 64 pro Minute. Im Blutausstrich keine eosinophilen Zellen. Abends Temperatur 39,1°. Tier frisst immer noch nicht, die Konjunktiven sind gelblich verwaschen.

Am 15. VI. 1914 6,00 Uhr a. m. Temperatur 39,1°, Puls 56, Respiration 24 pro Minute.

In den folgenden 8 Tagen bleibt die Pulszahl noch gesteigert, das Tier erholt sich im übrigen wieder.

Die Reaktion war in diesem Falle besonders typisch und anhaltend. Auffallend war das völlige Fehlen der eosinophilen Zellen auf der Höhe der Reaktion.

Auch bei Versuchspferd Nr. 73 erwies sich am 4. VII. 1914 eine Bleifällung entsprechend 3 Larven äußerst wirksam. Es traten starkes Zittern, Einknicken im Kreuz, Unruhe, Defäkationen usw. ein. Der Puls stieg von 36 auf 60 pro Minute, die Temperatur von 37,9 auf 39,9°. Die Konjunktiven waren hochrot injiziert. Am folgenden Tage noch deutliche Pulsbeschleunigung (44 pro Minute).

Auch in diesem Falle typische Reaktion nach Injektion der bleigefällten Substanzen. Als Ausgangsmaterial für diese Bleifällung waren in 50%igem Alkohol gekochte Larven zur Verwendung gekommen.

Versuche mit dem Filtrate der Bleifällung am selben Versuchstiere (am 7. VII. und 8. VII. 1914) blieben auch in diesem Falle ohne Reaktion.

Übereinstimmend ergeben die genannten Versuche, daß das Östrin quantitativ durch basisches Bleiazetat gefällt wird.

2. Durch Quecksilbersalze.

Oben wurde bereits erwähnt, daß die durch wiederholtes Füllen mit absolutem Alkohol gewonnene Östrinlösung mit Quecksilberazetat einen reichlichen Niederschlag gibt. Es sollte festgestellt werden, ob das Östrin mit diesem Niederschlag ausgefällt wird.

An dieser Stelle sei hervorgehoben, daß sich im Laufe der Versuche, auf besondere Anregung von Herrn Prof. Hofmeister, herausstellte, daß unter Verwendung von durch wiederholte Alkoholfällung gewonnenem eiweißfreien Material mit einer für das Pferd vielfach tödlichen Dosis die Östrinwirkung auch beim Kaninchen hervorgerufen werden kann. Während der Extrakt von 4—5, zuweilen jedoch auch schon von $\frac{1}{2}$ Larve, den Tod eines Pferdes herbeiführt, verursacht, wie wir an anderer Stelle gezeigt haben, die gleiche Menge beim Kaninchen (ebenfalls bei intravenöser Einverleibung) keinerlei sichtbare Wirkung. Es ist dieser Unterschied aber, wie sich später herausstellte, kein absoluter sondern nur ein quantitativer. Extraktmengen von 10—15 Larven und mehr lösen auch beim Kaninchen eine ganz be-

stimmte, der Giftwirkung beim Pferd nahezu entsprechende, unter Umständen tödliche Reaktion aus. Es soll im pharmakologischen Teile dieser Arbeit spezieller auf diese Giftwirkung beim Kaninchen eingegangen werden. Hier sei sie nur deswegen erwähnt, weil unsere Versuche, insbesondere die analytischen, durch die Auffindung dieser Tatsache in eine gewisse Unabhängigkeit vom Pferde als dem bisher einzig in Betracht kommenden Versuchstiere gebracht worden sind. Speziell die Frage der Fällbarkeit des Östrins durch Quecksilber wurde am Kaninchen gelöst.

Eine 10 Monate unter Toluol im Dunkeln aufbewahrte Östrinlösung (Fällung in 80%igem Alkohol, in Wasser gelöst) wurde mit Quecksilberazetat gefällt, das Quecksilber durch Schwefelwasserstoff, der Schwefelwasserstoff durch Erhitzen entfernt.

Kaninchen a (700 g Gewicht) erhält am 12. VI. 1915 intravenös quecksilbergefallte Substanz, entsprechend 50 Larven. Es tritt nach 65 Minuten eine typische schwere Reaktion auf, wie sie des Näheren weiter unten beschrieben wird. Das Tier erholt sich wieder.

Kaninchen b (700 g Gewicht) erhält das zugehörige Quecksilberfiltrat, es zeigt keine Spur von Wirkung.

Dieser Versuch wird mit dem gleichen Material und mit den gleichen Tieren (a und b) in umgekehrter Verteilung wiederholt.

Kaninchen a erhält diesmal das Quecksilberfiltrat, entsprechend 60 (!) Larven, es zeigt keine Reaktion.

Kaninchen b erhält den zugehörigen Quecksilberniederschlag: nach 40 Minuten heftig einsetzende Reaktion, schwere Dyspnoe, Defäkationen, Ataxie, in der darauf folgenden Nacht Exitus. (Die Sektion des Tieres ergab etwa zehn punktförmige Blutungen im unteren Teile des Colon descendens, sonst ohne Besonderheiten.)

Aus diesem Versuche geht hervor, daß das Östrin ebenso wie durch Bleisalze auch durch Quecksilbersalze (im vorliegenden Falle Quecksilberazetat) quantitativ ausgefällt wird.

Dialysierbarkeit des Östrins.

Die Dialysierbarkeit des Östrins wurde außer in Versuchen am Kaninchen auch am Pferde geprüft. Zur Dialyse wurden ausschließlich Schilfschläuche verwendet. Auch hier verliefen wieder aus den oben genannten Versuchsschwierigkeiten mehrere Versuche negativ. Es ergab sich jedoch, daß das Östrin nicht dialysiert.

Am 27. VII. 1914.

Versuchspferd Nr. 73	erhalten je gleiche Menge	Nr. 73 reagiert stark,
» » 74	Dialysierückstand (5 Tage	» 74 » »
» » 75	dialysiert)	» 75 » nicht.

Auch in diesem Parallelversuch zeigt sich wieder die verschiedene Giftempfindlichkeit der einzelnen Pferde.

Vier Versuche mit Dialysaten an Versuchspferd Nr. 71 und 73 ergaben keine Reaktion.

Das Dialysat von 120 Larven (Alkoholfällung, in Wasser gelöst) wurde am 24. VII. 1914, Kaninchen Nr. 285 (braun, 1140 g Gewicht) intravenös injiziert. Es trat keine sichtbare Reaktion ein.

In einem weiteren Dialyserversuch mit 20 Larven (Alkoholfällung, in Wasser gelöst) wurde der innerhalb 6 Tagen nicht dialysierte Rückstand Kaninchen Nr. 286 (weiß, 1380 g Gewicht) intravenös injiziert; sehr starke typische Wirkung (vgl. Figur S. 271).

Darstellung des Östrins.

Der Gang der Darstellung des Östrins auf Grund der oben ermittelten Eigenschaften gestaltet sich im wesentlichen folgendermaßen: Die Larven werden mittels Quarzsand sorgfältig im Mörtel in 50%igem Alkohol verrieben und damit mehrere Stunden hindurch entweder bei Zimmertemperatur geschüttelt oder mittels Rückflußkühler unter Kochen extrahiert. Dieser nach dem Filtrieren dunkel rotbraun gefärbte, kolloidal scheinende Extrakt wird vorsichtig durch Erwärmen zur Trockene gebracht; der Rückstand mit destilliertem Wasser aufgenommen, mehrere Stunden geschüttelt, die klare wässrige Lösung erneut eingengt und mit der vierfachen Menge absoluten Alkohols versetzt; der sich mehr oder minder rasch bildende Niederschlag, der das Östrin nahezu quantitativ enthält und sich in den nächsten 24 Stunden zu Boden absetzt, wird durch wiederholtes Waschen (am besten mittels Zentrifuge) mit 80%igem Alkohol, darauf mit absolutem Alkohol und mit Äther gereinigt, dann in wenig destilliertem Wasser aufgelöst, die Fällung mit Alkohol noch 1—2mal wiederholt und der Niederschlag abermals sorgfältig gewaschen. Ein Kontrollversuch am Kaninchen ergibt die toxische Wirksamkeit dieser Lösung. Hierauf wird die Lösung zunächst mit basischem Bleiazetat gefällt, der Niederschlag, der das Östrin enthält, mit Wasser sorgfältig gewaschen, das Blei durch Einleiten von Schwefelwasserstoff in die Suspension als Sulfid gefällt und durch Filtrieren entfernt, ein Überschuß von Schwefelwasserstoff durch vorsichtiges Erhitzen beseitigt und die schwachsaure Reaktion der Lösung mittels Natronlauge neutralisiert. Es resultiert eine schwach gelblich gefärbte Lösung von kolloidaler Natur, die beim Schütteln deutlich schäumt und sich im Tierversuch als wirksam erweist. Diese Lösung wird hierauf in analoger Weise mit Quecksilberazetat gefällt. Der Quecksilberniederschlag, der wiederum das Östrin enthält, wird ebenfalls durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, die Lösung zum Schluß neutralisiert. Auch diese wässrige

Lösung erweist sich im Tierversuch als wirksam. Endlich wird nochmals in gleicher Weise wie oben mit der vierfachen Menge Alkohol gefällt, der grauweißliche Niederschlag in 50%igem Alkohol gelöst und mit dem gleichen Volumen Äther versetzt. Nach etwa 48 Stunden setzt sich ein feiner weißlicher Niederschlag ab, der nach der Lösung in Wasser der Dialyse im Schilfschlauch unterzogen wird. Die auf diesem Wege gewonnene Giftsubstanz wurde im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Bei den mit dieser Substanz angestellten Mikroanalysen (Dr. Lieb, Graz) ergab sich ein unerwartet hoher Aschengehalt (79,31 %), daneben 8,31 % C, 1,27 % H und 0,98 % N. Das Verhältnis C : H : N wäre demnach etwa 10 : 18 : 1. Einen Schluß auf die chemische Natur der Substanz erlauben diese Zahlen nicht. Eine nochmalige Darstellung und weitere Reinigung war aus Mangel an Material nicht durchzuführen.

In unserer früheren Arbeit konnte bereits der Nachweis geführt werden, daß die von den lebenden Larven ausgeschiedenen Exkrete eine analog toxische Wirkung auf das Pferd ausüben wie die Extrakte der Larven selbst. Es wurde hieraus geschlossen, daß das Östrin von den Larven ausgeschieden wird. Bewahrt man Larven lebend in Wasser oder Salzlösung bei Brutschranktemperatur auf, so trübt sich nach mehreren Stunden die Lösung und erweist sich in höherer Konzentration nicht nur für das Pferd, sondern auch wie die Larvenextrakte selbst für das Kaninchen toxisch.

Die chemische Untersuchung der Exkretlösung an der Hand der oben gewonnenen Resultate ergab, daß das Gift der Exkrete nach seinen Eigenschaften (Fällbarkeit durch Alkohol, Blei, Quecksilber, Kolloidnatur) mit dem Östrin der Larvenextrakte identisch ist.

C. Toxische Wirkung des Östrins.

I. Auf das Pferd.

Bezüglich der Wirkung des Östrins auf das Pferd sei an dieser Stelle nur in Kürze zusammengefaßt, was sich im einzelnen in unserer oben zitierten Arbeit* (vgl. S. 254) dargestellt findet. Zahlreiche inzwischen angestellte Versuche haben ergeben, daß die Wirkung der bei der Darstellung des Östrins gewonnenen Schlußfraktion im wesentlichen die gleiche ist, wie mit den nativen Larvenextrakten, daß die in obiger Arbeit beschriebenen Vorgänge bei der akuten tödlichen Vergiftung mit Larvenextrakt einer Östrinvergiftung entsprechen.

In allen Fällen nahm die Vergiftung bei letalem Ausgang nach intravenöser Einverleibung des Giftes im wesentlichen folgenden Verlauf:

Pulsbeschleunigung, allgemeine Unruhe, wiederholte Defäkationen, Zittern am ganzen Körper, Beschleunigung und Vertiefung der Atmung, Schweißausbruch, Fließen von Speichel und Nasenschleim, hochgradige Injektion der Augenbindehäute, Augentränen, schwere Dyspnoe, Lähmung der hinteren Extremitäten, Nachlassen der inzwischen hochgradig frequenten Herztätigkeit, Dyspnoe, Atemstillstand, zuweilen vereinzelte Konvulsionen des ganzen Körpers, Exitus.

Der ganze Vorgang der tödlichen Vergiftung kann sich bei stärkerer Dosis (z. B. entsprechend 4 Larven) innerhalb weniger (10 bis 15 Minuten) abspielen, und zwar in diesem Fall im nahezu direkten, zeitlichen Anschluß an die Injektion. Bei kleineren, aber doch noch tödlichen Dosen ist der Verlauf meist derart, daß das Pferd zunächst $1\frac{1}{2}$ — $1\frac{1}{2}$ Stunden völlig reaktionslos bleibt, dann plötzlich wiederholt mit den Hinterbeinen einknickt, unruhig wird, am ganzen Körper zittert usw. wie oben. Diese »Inkubation« betrug in einem Falle (Versuchspferd Nr. 10) 24 Stunden. Nach dieser Zeit sank es infolge einer Lähmung der hinteren Extremitäten zu Boden und verendete nach weiteren 24 Stunden unter schwerer Dyspnoe (vgl. a. a. O., S. 158).

Von der tödlichen bis zur schwachen, nur durch leichtes Zittern des Körpers, Pulsbeschleunigung angedeuteten Wirkung ließen sich die verschiedensten Übergänge beobachten, vgl. die Protokolle der obigen Giftanalyse. Die mittelgradige, vorübergehende Wirkung trat stets erst etwa 1—2 Stunden nach der intravenösen Injektion auf, begann meist mit Zittern der hinteren Extremitäten, eventuell wiederholtem Schwanken und Einknicken im Kreuz bzw. in den Hinterbeinen, Puls- und Atembeschleunigung, stärkerer Unruhe, Rötung der Konjunktiven, wiederholten Defäkationen.

Die individuelle Verschiedenheit in der Reaktionsfähigkeit der einzelnen Pferde auf die gleiche Giftmenge war überaus groß. Es wurden wiederholt zwei bzw. drei Pferde mit der gleichen Menge des gleichen Injektionsmaterials injiziert (vgl. oben S. 264 und 266), mit durchweg verschiedenem Erfolge. Am deutlichsten war dies beim Analysenversuch mit Versuchspferd Nr. 66 und 68. Tier Nr. 68 reagierte so stark, daß der Exitus drohte; Tier Nr. 66 reagierte trotz der doppelten Injektionsmenge überhaupt nicht.

Was sich ferner in der früheren Arbeit für die Wirkung der Larvenextrakt-Injektionen auf die Körpertemperatur der Pferde nachweisen ließ (vgl. a. a. O., S. 162f.), gilt im speziellen für die Wirkung des Östrins. Fast jede mit äußerer Reaktion einhergehende Östrininjektion bewirkt beim Pferd einen mehr oder minder hohen Temperaturanstieg, der 2—3 Tage dauert, unter Umständen nach mehreren Tagen abermals »spontan« auftreten kann.

Endlich gilt auch das früher für die pathologisch-anatomischen Veränderungen nach akuter *Gastrophilus*-larven-Vergiftung Gesagte in der gleichen Weise für die histologischen Veränderungen nach dem akuten Östrintode beim Pferde:

Hochgradige Hämorrhagien auf sämtlichen Schleimhäuten, vor allem des Magen- und Darmtrakts, Hyperämie aller Organe, Milzschwellung. Hämorrhagien auf Endo- und Perikard, Nierenblutungen. Blut ungeronnen, teerfarben. Mikroskopisch in der Leber und Milz mehr oder minder starke Parenchymschädigung und Blutungen. Histologische Untersuchungen des Zentralnervensystems stehen noch aus.

Zu einem neuen Bilde führte längere Zeit hindurch erfolgte Verabreichung subletaler Dosen von *Gastrophilus*-larven-Extrakten: Die Einwirkung auf das Blut steht hier im Vordergrund, es entwickelt sich die an genannter Stelle beschriebene schwere Anämie. Die Frage, ob diese hämotoxische Wirkung durch das Östrin oder durch andere in den Extrakten enthaltene Stoffe ausgelöst wird, kommt in einem anderen Teile dieser Arbeit zur Besprechung. Hier sei noch kurz erwähnt, daß die sowohl im Verlauf der experimentellen als auch der in natura beobachteten perniziösen Anämie der Pferde, vor allem die im Endstadium einsetzenden Lähmungserscheinungen in den hinteren Extremitäten, lebhaft an die oben bei der akuten Östrinwirkung auftretenden Paresen erinnern.

II. Auf das Kaninchen.

Schon oben wurde erwähnt, daß die anfangs vermutete ausschließliche Giftigkeit des Östrins für Pferd und Esel nur eine relative Spezifität darstellt. Aus dem Umstande, daß der Extrakt von 4 Larven auf der einen Seite ein Pferd tötet, auf der anderen Seite beim Kaninchen nach intravenöser Injektion keine äußerlich wahrnehmbare Reaktion auslöst (vgl. a. a. O. S. 157), auch Hunde, Meer-schweinchen, Mäuse, Geflügel, Frosch sich ähnlich refraktär verhalten, wurde eine ausschließlich die Equiden betreffende spezifische Giftwirkung angenommen. Es stellte sich später heraus, daß es gelingt, mit höheren Giftdosen auch beim Kaninchen eine analoge Giftwirkung hervorzurufen.

Injiziert man einem Kaninchen den Extrakt von 10–20 Larven oder besser die entsprechende Menge Östrin in die Ohrvene, so stellen sich nach 30–60 Minuten zuerst Veränderungen in der Respiration ein, diese wird weniger frequent und erfolgt zeitweise auffallend tief und stoßweise. Das Tier wird gleichzeitig unruhig, springt im Käfig herum, häufig aber fehlt dieses Stadium der Exzitation, und es stellt

sich bald eine deutliche, allgemeine Mattigkeit ein. Das Tier liegt mit aufgestütztem Kopf da, die Fortbewegung scheint erschwert, die hinteren Extremitäten werden mühsam angezogen. Das Tier verharret schließlich mit den hinteren Extremitäten, später auch mit den vorderen in jeder ihm angewiesenen Zwangslage. Diese Lähmungserscheinungen greifen dann auf den ganzen Körper über, das Tier liegt mit mehr oder minder gespreizten Vorderbeinen und zur Seite geneigtem Kopf flach auf dem Bauche ruhig da, die Atmung erfolgt dabei entweder beschleunigt und mühsam oder aber dauernd langsam und vertieft (vgl. Figur). Häufige, bald flüssig werdende Defäkationen. Später sinkt das Tier ganz auf die Seite und liegt mit nach hinten überstrecktem Kopfe auf seiner Unterlage. Sensibilitätsstörungen lassen sich nicht nachweisen. Sehr ausgesprochen ist in diesem Stadium immer die völlige Erschlaffung, das Sinken des Tonus

Figur.

der gesamten Rumpfmuskulatur. Häufig treten gegen Ende von Zeit zu Zeit klonische Krämpfe in den Beinen auf, eventuell unterbrochen von heftigen Kontraktionen der Antagonisten unter extremem Opisthotonus. Der Zustand der allgemeinen Parese kann 20—30 Minuten andauern, das Tier ist dabei unfähig, sich auf den Beinen zu halten. Sensible Reize werden am ganzen Körper empfunden. Gegen Ende wird die Atmung immer langsamer, eventuell etwa vier Respirationen pro Minute, und oberflächlicher, und unter erneuten klonischen Krämpfen tritt völliger Atemstillstand ein. Nach Eintritt des Respirationsstillstandes schlägt das Herz noch einige Zeit, eventuell noch 2 Minuten lang weiter. Die Krämpfe vor dem Exitus können ganz fehlen oder nur angedeutet sein. In vereinzelten Fällen wiesen die flüssigen Defäkationen kurz vor dem Exitus Blutbeimengungen auf. In einzelnen Fällen kam es zu einer terminalen Hämoglobinurie.

Während der Verlauf der akuten Östrinvergiftung beim Kaninchen im wesentlichen mit dem beim Pferde übereinstimmt, bietet das Sek-

tionsbild des östrinvergifteten Kaninchens bei weitem nicht die hochgradigen allgemeinen Hämorrhagien wie sie oben beim Pferde beschrieben wurden. In etwa 10 Fällen fanden sich im Verlaufe des Intestinaltraktes stechnadelkopf- bis pfenniggroße Blutungen, meist im Verlauf des oberen Dünndarms und des Dickdarmes, speziell des Blinddarmes, zuweilen auf der Serosa des Magens, der Harnblase, auf der Oberfläche der Nieren, der Thymus, selten auch auf dem Endokard, stets jedoch nur in geringem Umfange. In etwa 5 Fällen fehlten derartige Blutungen völlig! Mikroskopisch fand sich eine mehr oder minder ausgesprochene Parenchymschädigung der Leber, einhergehend mit hochgradiger Überfüllung der Blutkapillaren, des weiteren Parenchymschädigung und Hyperämie der Milz und der Nieren. Untersuchungen des Zentralnervensystems stehen noch aus.

In welcher Weise wiederholt verabreichte subletale Dosen von wässerigen Larvenextrakten einerseits, von Östrin andererseits beim Kaninchen wirken, wird ebenfalls in einem anderen Teile der Arbeit (vgl. S. 294) ausführlich beschrieben werden.

Anhang.

Die blutdrucksenkende Wirkung der Larvenextrakte.

Mehrere an Kaninchen vorgenommene Blutdruckversuche ergaben eine bedeutende blutdrucksenkende Wirkung der wässerigen Larvenextrakte. Es lag daher nahe, festzustellen, ob letztere dem Östrin oder anderen Substanzen zuzuschreiben ist.

Zusammengefaßt ergab sich hierbei folgendes:

Die blutdrucksenkende Substanz zeigt die folgenden Eigenschaften:

Sie ist löslich in Wasser, 50- und 80%igem Alkokol, unlöslich in absolutem Alkohol, Methylalkohol und Cloroform.

Das bei der obengenannten Fällung des Östrins in 80%igem Alkohol erhaltene Filtrat wirkt blutdrucksenkend; die Fällung, die das Östrin enthält, bewirkt keine Blutdrucksenkung. Auch die durch Blei- und Quecksilber-Salzfällung erhaltene Östrinfraktion bewirkt keine Blutdrucksenkung.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die blutdrucksenkende Wirkung der wässerigen Larvenextrakte nicht durch das Östrin bedingt ist. Eine nähere chemische Untersuchung der in den Larven enthaltenen blutdrucksenkenden Substanz wurde nicht vorgenommen.

III. Auf den Hund.

Auch bei den übrigen Laboratoriumstieren gelingt es, mit entsprechend größeren Dosen von Östrin eine Giftwirkung zu erzielen.

Die Symptome der Vergiftung sind hier ähnlich wie beim Pferd und Kaninchen. Hunde reagieren erst auf Östrinmengen, die 30 und mehr Larven entsprechen. Im folgenden Falle bewirkte die intravenöse Injektion einer 30 Larven entsprechenden Alkoholfällung (in physiologischer NaCl-Lösung gelöst) eine starke, nach mehreren Stunden wieder abgeklungene Reaktion:

10,55 Uhr. Intravenös absolute Alkoholfällung von 30 Larven, in physiologischer NaCl-Lösung gelöst.

11,15 Uhr. Tier niedergeschlagen.

11,35 Uhr. Wiederholtes Erbrechen von galligem Schleim. Tier schüttelt sich wiederholt.

11,40 Uhr. Respiration langsam und vertieft.

11,45 Uhr. Erneutes Erbrechen unter starkem Würgen. Konjunktiven hochrot injiziert. Tier sehr schlapp.

11,55 Uhr. Abermals Erbrechen. Gang mühsam, schwankend.

12,30 Uhr. Tier liegt matt auf dem Boden, erneutes Erbrechen. Starke Diarrhöe, nicht blutig.

2,00 Uhr. Tier noch sehr matt, inzwischen wiederholt flüssige Stühle. Kein Erbrechen mehr.

4,00 Uhr. Tier wieder munter, springt herum.

Am folgenden Tage, abgesehen von geringer Schwäche der Hinterbeine, die z. B. noch Treppensteigen unmöglich macht, äußerlich wieder völlig normal.

Bei zwei weiteren Hunden, welchen das Östrin subkutan einverleibt wurde, äußerte sich das Vergiftungsbild in ähnlicher Weise. Allerdings traten nicht die typischen Lähmungserscheinungen, wie sie oben beim Pferd und Kaninchen beschrieben wurden, auf. Desgleichen war das Sektionsbild wesentlich verschieden von dem beim Pferde beobachteten. Blutungen fanden sich bei zwei vergifteten Hunden (s. unten) überhaupt nicht. Die Wirkung scheint beim Hunde fast ausschließlich das Zentralnervensystem zu betreffen. Bei der Sektion fanden sich deutliche Parenchymschädigung und Blutungen in der Leber und Milz. Wie relativ widerstandsfähig sich Hunde gegenüber dem Östrin, vor allem bei subkutaner Verabreichung, verhalten, geht aus folgendem Versuch hervor:

Ein Hund, der aus anderen Gründen wiederholte Injektionen von Larvenextrakten, entsprechend 5—10 Larven bzw. entsprechenden Östrinmengen erhalten hat, bekommt

am 4. IV. 1916 subkutan 40 Larven	} vorübergehende, mäßig starke Reaktion.
» 5. IV. 1916 » 40 »	
» 6. IV. 1916 » 80 »	

in der darauffolgenden Nacht Exitus.

Ein weiterer Hund verendete nach subkutaner Injektion von Östrin aus 40 Larven.

IV. Auf andere Tiere.

In ähnlicher Weise widerstandsfähig gegenüber größeren Östrindosen zeigten sich Rind und Schaf. Beide reagierten auf subkutane

Injektion von 10—20 Larven nur mit mehr oder minder hoher Temperatursteigerung und allgemeiner Niedergeschlagenheit.

Auch beim Meerschweinchen bedurfte es höherer Östrindosen, um eine letale Wirkung zu erzielen.

Beispiel:

9,45 Uhr. Intraperitoneal 24 Larven (Alkoholfällung, an Pferd und Kaninchen als wirksam befunden).

11,15 Uhr. Tier unruhig, wiederholt Diarrhöen.

12,10 Uhr. Anfallsweise auftretendes Zittern des ganzen Körpers.

12,20 Uhr. Dauernd starkes Zittern, Tier sehr ängstlich, Haare gestäubt.

1,00 Uhr. Tier äußerlich wieder ruhig, niedergeschlagen. Am nächsten Morgen tot im Käfig.

In der freien Bauchhöhle etwa 5 cem rötliche Flüssigkeit. Nebennierenoberfläche von Hämorrhagien durchsetzt. Keine Darmblutungen. Im übrigen keine makroskopischen Veränderungen.

Gar keine sichtbare Wirkung ließ sich beim Frosch (*R. esculenta* und *temporaria*) erzielen. Es wurden Östrindosen entsprechend bis zu 20 Larven subkutan injiziert, Dosen, die genügen, um mehrere Pferde zu töten. In keinem Falle wurde eine Wirkung beobachtet.

Ebensowenig ließ sich ein toxischer Einfluß auf Kaulquappen nachweisen.

Vergleicht man die Giftwirkung des Östrins auf die einzelnen Tierarten, so ergibt sich eine sehr weitgehende, quantitative Differenz. Im Vordergrund stehen das Pferd und der Esel. Beide erwiesen sich dem Östrin gegenüber so eminent empfindlich, daß zuerst eine ausschließliche Giftigkeit des Östrins für die Equiden (vgl. oben) angenommen wurde. Läßt man die ziemlich weitgehenden individuellen Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit innerhalb der gleichen Tierart außer acht, so ergeben sich die folgenden mittleren Vergleichswerte:

	Tödliche Dosis	
	intravenös	pro kg
Pferd (400 kg Gewicht) 4 Larven . .	0,00008 g	0 0002 mg
Kaninchen (1 kg Gewicht) 20 Larven	0,0004 »	0,4 »
Hund (8 kg Gewicht) 40 Larven . .	0,0008 »	0,1 »

Bei dieser Berechnung ist die oben gefundene Östrinmenge in einer Larve gleich 0,00002 g eingesetzt.

Das Östrin ist demnach für das Pferd pro Kilogramm berechnet 500 mal giftiger als für den Hund und 2000 mal giftiger als für das Kaninchen.

Die obigen Werte beziehen sich auf intravenöse Injektionen. Die resorptiven Erscheinungen nach subkutaner Injektion von Östrin gleichen vollkommen denjenigen, die oben für die intravenöse Injektion als typisch beschrieben wurden. Der Verlauf der Vergiftung ist dabei wesentlich verlangsamt, was auf eine schwere Resorbierbarkeit des Giftes hindeutet. Einzelheiten hierüber finden sich ebenfalls in der zitierten früheren Arbeit (vgl. Versuchspferd Nr. 19, S. 159). Auch bezüglich der Wirkung des per os dem Pferde eingeführten Östrins sei auf S. 166 (Versuchspferd Nr. 16) der genannten Arbeit verwiesen. Beim Kaninchen und Hund wurden keine Versuche bezüglich der Resorbierbarkeit des Östrins von seiten des Magen-Darmtrakts angestellt.

In der Giftigkeit der einzelnen Larvenarten ließen sich besondere Unterschiede nur in dem Verhalten der kleinsten der Larvenarten, des *G. haemorrhoidalis*, im Vergleich zu den übrigen Arten feststellen. In früherer Arbeit (vgl. diese Zeitschrift Bd. 76, S. 160) bot sich bereits Gelegenheit, auf die besonders toxische Wirksamkeit der wässerigen Extrakte von *G. haemorrh.* hinzuweisen. Versuchspferd Nr. 41 verendete nach der Injektion des wässerigen Extraktes von einem *G. haemorrh.* unter den charakteristischen Vergiftungserscheinungen. Daß diese exquisite Giftigkeit der *G. haemorrh.*-Larven bezüglich der Pathogenese der perniziösen Anämie der Pferde vielleicht eine besondere Rolle spielt, wurde ebenfalls als möglich bezeichnet. Es scheint allerdings, daß auch in Fällen, wo nur *G. equi* gefunden wird, perniziöse Anämie auftreten kann. Einige inzwischen vorgenommene Versuche am Kaninchen sprachen ebenfalls dafür, daß *G. haemorrh.* auch für diese Tierart, wenigstens bei intravenöser Injektion, besonders toxisch ist. Während in der Regel der Extrakt von 15–20 *G. equi* für Kaninchen die tödliche Dosis darstellt, verendete Kaninchen Nr. 63 nach der intravenösen Injektion des wässerigen Extraktes von 4 *G. haemorrh.* unter den charakteristischen Vergiftungserscheinungen:

Kaninchen Nr. 63, schwarz, 1000 g Gewicht.

18. X. 1916. Hämoglobin 73 ‰, Erythrocyten 5 400 000, Leuko-
cyten 6500.

6,40 Uhr. Intravenös 4 *G. haemorrh.* (Frischgewicht der Larven
= 0,2 g!).

7,00 Uhr. Dyspnoe, Benommenheit, Paresen der hinteren Extremitäten.

9,00 Uhr. Tier erholt sich wieder.

19. X. 1916. Tier sehr matt, frißt wenig.

20. X. 1916. Tier sehr schlapp, paretisch.

11,00 Uhr a. m. Hämoglobin 69 ‰, Erythrocyten 4 680 000, Leuko-
cyten 3500, Gewicht 900 g.

7,00 Uhr p. m. Tier moribund, Dyspnoe, Paresen.

2 Minuten vor dem Tode: Hämoglobin 50 %, Erythrocyten 1 750 000, Leukocyten 4000.

Die Sektion ergab keine Blutungen, Leber sehr blutreich, Milz stark geschwollen, dunkelschwarz. Bakteriologische Untersuchung der Organe ergab vereinzelte grampositive Kokken in Leber und Milz. Kultur der letzteren wurde auf Kaninchen Nr. 66 (1 cem einer Aufschwemmung von einem Agarröhrchen, 5 Tage alt) verimpft, Tier bleibt gesund, keine Blutveränderung, 2 1/2 Monate beobachtet.

G. nasalis und *pecorum* scheinen sich in der Toxizität ihrer wässerigen Extrakte nicht von derjenigen des *G. equi* zu unterscheiden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es nicht gelungen ist, das Östrin in einer chemisch reinen, etwa krystallinischen Form darzustellen, in erster Linie deswegen, weil es sich um einen kolloiden Körper handelt, dann aber, weil die Ausbeute der einzelnen Larve (ein *G. equi* wiegt frisch im Durchschnitt 0,1—0,2 g) an toxischer Substanz nur sehr gering ist; eine Larve enthält etwa 0,00002 g der als »Östrin« bezeichneten, toxisch wirkenden Fraktion. Die durch den Krieg verursachte Erschwerung in der Beschaffung von Larvenmaterial verhinderte eine größere Ausbeute. Auf Grund der obigen Versuche lassen sich daher nur bestimmte chemische und physikalische Eigenschaften des Östrins angeben.

Das Östrin ist eine kolloidale, stark schäumende Substanz, in Wasser löslich, desgleichen in 50 %igem Alkohol, unlöslich in höher konzentriertem Alkohol, in Äther, Chloroform, zum Teil löslich in Azeton. Es wird durch die üblichen Alkaloidreagenzien, z. B. Phosphorwolframsäure, nicht ausgefällt, dagegen quantitativ durch Blei- und Quecksilbersalze. Durch Erhitzen wird seine Wirksamkeit nicht wesentlich herabgesetzt, geringen Säuregraden gegenüber verhält es sich ebenfalls refraktär. Es dialysiert nicht durch Schilfschläuche.

Bezüglich seiner toxischen Wirkung auf Tiere — das Pferd erweist sich bei weitem am empfindlichsten — steht bei der akuten Vergiftung eine Einwirkung auf das Zentralnervensystem im Vordergrund: Benommenheit, Paresen, Reizung und Lähmung des Respirationszentrums, Diarrhöen, Tod durch Atemstillstand. Beim Pferd kommt hinzu: allgemeine Kapillarhyperämie und Ekchymosen, vor allem der Darmschleimhäute, des Endo- und Perikards, der Serosen, des Parenchyms der Leber, Milz, Nieren u. a. Organe. Beim Kaninchen finden sich nur vereinzelte zirkumskripte Blutungen im Darm, meist Dickdarm, stets Hyperämie und Blutungen in der Leber, zum

Teil auch in der Milz und in den Nieren. Häufig Hämoglobinurie. Die Vergiftung geht ohne Blutdrucksenkung einher. Beim Hund und der Maus wurden keine Blutungen gesehen. Frösche erwiesen sich resistent.

Die Vergiftungserscheinungen treten stets erst 30–60 Minuten nach der Injektion auf, ausgenommen bei mehrfach tödlicher Dosis beim Pferd, wo sie sich schon nach wenigen Minuten einstellen können. Die »Inkubation« kann andererseits, insbesondere beim Pferd, länger als 24 Stunden dauern.

Toxikologisch erinnert das Östrin in seinen Wirkungen an das Schlangengift einerseits, an gewisse Kapillargifte, wie das Sepsin, andererseits. Eine atropinartige Wirkung, ähnlich wie die des Muskarins, ließ sich niemals nachweisen, wie es überhaupt auch nach seinen chemischen Eigenschaften keinen Alkaloidcharakter aufweist.

Frühere Versuche, die für eine Antigennatur sprechen, gestatten es auch in die Gruppe der »Toxine« einzureihen.

Besondere Bedeutung für die dieser Arbeit zugrunde liegende Frage nach der Entstehung der perniziösen Anämie der Pferde gewinnt seine bei wiederholter Verabreichung subletaler Dosen zutage tretende anämisierende Wirkung. Daß es, wenngleich es die roten Blutkörperchen im Glase nicht auflöst, im Tierkörper zum Blutgift wird, ergibt sich aus dem folgenden Teile dieser Arbeit.

D. Hämolyseversuche.

1. Versuche mit Larvenextrakten.

Nachdem in den obengenannten früheren Versuchen der Beweis erbracht war, daß es gelingt, durch wiederholte Verabreichung subletaler Dosen von Kochsalzlarvenextrakten beim Pferd das Bild der perniziösen Anämie hervorzurufen, nachdem weiterhin die Bedeutung des Östrins als eines für das Pferd hochgradig toxischen, in den Larven enthaltenen und von ihnen mit den Exkreten ausgeschiedenen, tierischen Giftes nachgewiesen war, war die weitere wichtige Frage zu entscheiden, ob die durch die Larven erzeugte Anämie durch den als Östrin bezeichneten giftigen Stoff, oder durch andere in den Larven enthaltene Substanzen verursacht wird.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Hämolyseversuche *in vitro* mit den verschiedenartigsten Larvenextrakten und unter Benutzung verschiedener Blutkörperchenarten angestellt¹⁾.

1) Herr Privatdozent Dr. Meyerstein unterstützte mich bei einem Teil der folgenden Versuche mit seinen Ratschlägen, wofür ich ihm auch an dieser Stelle danke.

Die Technik dieser Hämolyseversuche war die übliche. Es gelangten 5%ige Aufschwemmungen wiederholt gewaschener Blutkörperchen zur Verwendung. Die Versuchsröhrchen blieben 1 Stunde im Brutschrank, darauf über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Es gelangten fast ausschließlich frische lebende Larven hierfür zur Verarbeitung; sie wurden mit Quarzsand sorgfältig verrieben und mehrere Stunden mittels Schüttelmaschine in dem jeweiligen Lösungsmittel extrahiert.

Diese Extrakte wurden bei möglichst niedriger Temperatur zur Trockene gebracht und darauf mittels physiologischer Kochsalzlösung zur Lösung bzw. möglichst gleichmäßigen Suspension gebracht, und zwar meistens in der Konzentration, daß 1,0 ccm einer Larve entsprach.

Das Versuchsergebnis mit Larvenextrakten in physiologischer Kochsalzlösung, ob filtriert oder nicht filtriert, war in allen Versuchen, gleichgültig, welche *Gastrophilus*larvenart oder welche Blutkörperchenart zur Verwendung kamen, stets negativ. Auch nach Zusatz von Serum bzw. Lezithinlösung konnte unter den verschiedensten Versuchsanordnungen keine Hämolyse in vitro erzielt werden.

Gleichfalls im wesentlichen negativ verliefen Hämolyseversuche mit Extrakten, die mit Äther, absolutem Alkohol, Chloroform, Methylalkohol, Azeton hergestellt waren, gleichgültig ob mit oder ohne Serum bzw. Lezithinzusatz.

Dagegen wurde stets Hämolyse in vitro durch mit 50- bzw. 80—90%igem Alkohol hergestellte Extrakte erzielt.

Frische Larven werden in 50%igem Alkohol fein verrieben und mehrere Stunden geschüttelt, das Filtrat zur Trockene gebracht, der Rückstand mit physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen, und zwar in den meisten Versuchen mit so viel Kubikzentimeter, als Larven extrahiert waren, so daß 1,0 ccm einer Larve entspricht.

Extrakt	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Physiologische NaCl-Lösung	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5
Pferdebloodkörperchen . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Nach 60 Minuten bei 37° .	0	+	fk	k	k

Das Resultat war im wesentlichen das gleiche, ob *G. equi*, *nasalis*, *pecorum* oder *haemorrhoidalis* zur Verwendung kamen.

Quantitative Unterschiede in den einzelnen Versuchsergebnissen erwiesen sich im wesentlichen nicht von der Larvenspezies abhängig. Manche Larven hämolysierten stärker, manche schwächer, bei gleichen Gewichtsverhältnissen. Ob hierbei der jeweilige Entwicklungszustand der Larven oder andere Faktoren eine Rolle spielen, läßt sich zunächst nicht entscheiden. Längere Zeit im trockenen Zustande aufbewahrte Larven zeigten eine mehr oder minder herabgesetzte hämo-

lytische Fähigkeit ihrer Alkoholextrakte. Der bei wiederholter Extraktion mit 50%igem Alkohol restierende Rückstand des Larvenmaterials erwies sich in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen als nicht hämolytisch wirksam.

Durch weitere Versuche mit verschiedenem Larvenmaterial ließ sich ferner feststellen, daß die Hämolyse der Alkoholextrakte weder durch Erwärmen auf 56° noch durch mehrstündiges Kochen der Extrakte — sei es in Alkohol oder in Wasser — irgendwie beeinträchtigt wird.

Ferner zeigte es sich, daß der Grad der Hämolyse ein verschiedener war, je nachdem ob die Alkoholextrakte nach ihrer Eintrocknung und Aufnahme in physiologischer Kochsalzlösung filtriert oder nicht filtriert wurden. Filtrierte Lösungen erwiesen sich außerdem relativ um so wirksamer, je mehr Flüssigkeit verwendet und je besser durch Schütteln eine gleichmäßige Verteilung erzielt war. Die Substanz, die die Hämolyse bewirkt, scheint demnach schwer löslich in Wasser.

Sehr häufig waren hämolytisch wirksame Extrakte in höherer Konzentration weniger stark hämolytisch, bzw. überhaupt nicht hämolytisch wirksam. Besonders ausgesprochen war diese paradoxe Erscheinung, wenn nicht die bei der ersten, sondern der zweiten oder der dritten Alkoholextraktion des gleichen Larvenmaterials gewonnenen Lösungen verwendet wurden, z. B.:

Zweite Extraktion in 50%igem Alkohol (1,0 ccm = 1 Larve).

Extrakt	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0
Physiologische NaCl-Lösung	1,9	1,5	1,0	0,5	—
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Nach 60 Minuten bei 37° .	0	k	++	0	0

Es erklärt sich dies wohl daraus, daß bei höherer Konzentration der Extrakte die Hemmung ständiger zunimmt als das Lösungsvermögen. Hierfür spricht der genannte Unterschied im diesbezüglichen Verhalten von erstem und zweitem Extrakt. Beim ersten Extrakt des gleichen obigen Ausgangsmaterials gestaltete sich die Hämolyse bei gleicher Konzentration folgendermaßen:

Erste Extraktion.

Extrakt	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0
Physiologische NaCl-Lösung	1,9	1,5	1,0	0,5	—
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Nach 60 Minuten bei 37° .	k	k	k	fk	++

Im zweiten Extrakt (s. oben) ist also das Verhältnis von hemmender zu lösender Substanz zugunsten der ersteren verschoben, da sich die Hauptmenge der hämolysierenden Substanz bereits im ersten Extrakte befindet.

Auf der Anwesenheit dieser bei höheren Konzentrationen von Alkoholextrakten zur Geltung kommenden hämolysehemmenden Substanzen beruht auch die oben festgestellte Tatsache, daß die mit Kochsalzlösung hergestellten Larvenextrakte bzw. Suspensionen keine Spur von Hämolyse bewirken. In diesem Falle überwiegen die hemmenden Substanzen so stark, daß überhaupt keine Hämolyse zustande kommt. Diese antihämolytische Wirkung läßt sich auch in der Weise zeigen, daß man Kochsalzlarvenextrakt zu Alkohollarvenextrakt, der an und für sich komplette Hämolyse bewirkt, hinzusetzt: Es tritt dann keine Hämolyse auf.

Die hämolytische Wirksamkeit der Alkohollarvenextrakte erwies sich für die verschiedensten Blutkörpercherarten als nahezu gleich. Benutzt wurden Blutkörperchen vom Pferd, Rind, Schwein, Hammel, Kaninchen, Meerschweinchen und Mensch. Desgleichen war es ohne wesentlichen Einfluß auf den Ablauf der Hämolyse, ob die Blutkörperchen gewaschen oder nicht gewaschen waren.

Hemmung der Hämolyse durch Serum.

Mengt man hämolytischen Larvenextrakt mit kleinen Mengen Serum und setzt dann Blutkörperchen zu, so wird die Hämolyse entweder ganz aufgehoben oder gehemmt. Das gleiche tritt ein, wenn man Blutkörperchen zunächst mit Serum mengt und darauf den Extrakt hinzufügt. Setzt man hingegen zu dem Gemenge Blutkörperchen + Extrakt Serum, so tritt die Hemmung nur auf, wenn dieser Zusatz zeitlich unmittelbar danach erfolgt, wartet man mit dem Serumzusatz mehrere Minuten, so erfolgt dann momentane Hämolyse, d. h. Beschleunigung der Hämolyse. Letzterer Vorgang wird unten beschrieben werden (vgl. S. 281).

Die Hemmung der Hämolyse durch Serumzusatz bei Einhaltung der obigen Reihenfolge ist unabhängig davon, welche Serumart, und ob frisches, älteres oder inaktiviertes Serum zur Verwendung gelangt. Mengen von 0,05 ccm Serum aufwärts bewirken komplette Hemmung der Hämolyse. Außer durch Serum gelingt die Hemmung mit Cholesterin. Benutzt wurde eine nach A. Minz¹⁾ dargestellte Cholesterinsuspension.

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 9, S. 361.

Eine warme, gesättigte Cholesterinlösung in Methylalkohol wird mittels angewärmter Pipette zu 8,5%iger Kochsalzlösung zugefügt, und zwar 1 cem zu 9 cem Kochsalzlösung.

Extrakt	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	(0,5
Cholesterinsuspension . . .	—	0,1	0,2	0,5	1,0	—	0,1 Serum
Physiologische NaCl-Lösung	1,0	0,9	0,8	0,5	—	—	0,9
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Nach 60 Minuten bei 37° .	k	+	Spur	0	0	0	0)

Beschleunigung der Hämolyse durch Serum.

Fügt man nach der Mischung von Blutkörperchen und hämolytischem Extrakt zeitlich unmittelbar danach Serum hinzu, so ist, wie gesagt, der Effekt der gleiche, als wie wenn zum Gemisch hämolytischer Extrakt + Serum Blutkörperchen hinzugefügt werden, d. h. es tritt keine Hämolyse auf. Erfolgt jedoch der Zusatz des Serums zum Gemisch Blutkörperchen + hämolytischer Extrakt erst mehrere Minuten nach deren Mischung, so erfolgt augenblickliche Hämolyse:

Hämolytischer Extrakt	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Physiologische NaCl-Lösung	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Zusatz von 0,1 Serum nach	30 Sek.	60 Sek.	2 Min.	5 Min.	10 Min.	kein Serum
Hämolyse, momentan.	0	++	+++	fk	k	0
Nach 60 Minuten . .	0	fk	k	k	k	k

Demnach liegt das zeitliche Optimum für den Serumzusatz bei der obigen Versuchsanordnung bei 5—10 Minuten. Quantitativ verschieben sich die Verhältnisse etwas bei anderen Mengen von Extrakt und Serum. Frisches und inaktiviertes Serum geben dabei das gleiche Resultat.

Für die jeweilige Extraktmenge läßt sich in analoger Weise auch die optimale Serummenge bestimmen, welche momentane Hämolyse bewirkt:

Hämolytischer Extrakt	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Physiologische NaCl-Lösung	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Nach 10 Minuten Zusatz von Serum . .	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2	—
Hämolyse, momentan.	Spur	+++	k	+++	+++	0

Demnach liegt bei 1,0 Extraktmenge und 10 Minuten Wartezeit der optimale Serumzusatz bei 0,1 Serummenge. Wie zahlreiche Versuche ergaben, ist die optimale Serummenge abhängig von der jeweiligen Extraktmenge und der Wartezeit, d. h. der Zeit zwischen Mischung von Blutkörperchen und Extrakt einerseits und Serumzusatz andererseits.

Versuche mit steigenden, bzw. fallenden Larvenextraktmengen ergaben, daß der genannte Einfluß des Serums auf die Hämolyse der Extrakte ein rein zeitlicher ist, d. h., daß die an und für sich bestehende hämolytische Wirksamkeit der Extrakte durch den Serumzusatz nicht quantitativ gesteigert, sondern nur der zeitliche Vorgang der Hämolyse, der z. B. in 30 Minuten bei 37° abläuft, beschleunigt wird und augenblicklich eintritt.

Als Beispiel hierfür seien die beiden folgenden Reihen: a) ohne, b) mit Serumzusatz angeführt:

a) Ohne Serumzusatz.

Extrakt	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Physiologische NaCl-Lösung	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Hämolyse, momentan	0	0	0	0	0	0
Nach 60 Minuten	0	0	Spur	++	k	k

b) Mit Serumzusatz.

Extrakt	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
Physiologische NaCl-Lösung	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4
Blutkörperchen	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Nach 10 Minuten Zusatz von Serum	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Hämolyse, momentan	0	0	0	Spur	k	k
Nach 60 Minuten	0	0	Spur	++	k	k

Das Endresultat der Hämolyse ist demnach bei a) und bei b) quantitativ im wesentlichen das gleiche, der Unterschied liegt allein im zeitlichen Ablauf der Hämolyse.

Durch Cholesterin, das in gleicher Weise wie das Serum die Hämolyse der Extrakte hemmt, läßt sich bei zeitlich verspätetem Zusatz zum Gemisch Blutkörperchen + Extrakt keine Beschleunigung der Hämolyse erzielen. Im Gegenteil tritt auch in diesem Falle Hemmung der Hämolyse ein.

Das »Beschleunigungsphänomen« konnte auch ausgelöst werden, wenn die Blutkörperchen eine Zeitlang ($\frac{1}{2}$ Stunde) in der Kälte der Einwirkung des Larvenextraktes ausgesetzt waren, darauf einmal ge-

waschen und wieder aufgeschwemmt, und ihnen 0,1 Serum zugesetzt wurde. Auch in diesen Falle erfolgte momentane Hämolyse. Die hämolytische Substanz des Extraktes wurde demnach bei 0° von den Blutkörperchen verankert.

Versuche einer »Lezithid«darstellung fielen negativ aus. Es wurde nach der von Morgenroth und Carpi¹⁾ für das Bienengift angegebenen Methode verfahren: Digerieren der Larvenextrakte mit gleichen Teilen 50%iger Lezithinlösung in Methylalkohol 24 Stunden bei 37°, Zusatz von 7 Vol. Alcohol absolut., Niederschlag abfiltriert, Filtrat mit etwa 7 Vol. Äther versetzt, Niederschlag mit Äther gewaschen und getrocknet, in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen. Keine Hämolyse!

Des weiteren wurden die Larvenextrakte auf fettspaltendes Ferment untersucht, da es, worauf vor allem Neuberg und seine Mitarbeiter²⁾ und Noguchi³⁾ hingewiesen haben, eine lipolytische Form der Hämolyse gibt. Die Versuche ergaben, daß die Kochsalzextrakte frischer Larven in der Tat ein durch 1/2 stündiges Erwärmen auf 56° zerstörbares, fettspaltendes Ferment enthalten, daß aber die genannte Wirkung geringgradig ist und als Ursache beträchtlicher Hämolyse nicht in Frage kommen kann. Diese Versuche wurden unter Benutzung von Ol. ricin. als Indikator angestellt.

Es geht aus den obigen Hämolyseversuchen hervor, daß alkoholische Extrakte von Larven Hämolyse bewirken, und daß die hämolytische Substanz bzw. Substanzen Seifennatur besitzen. Die Koktostabilität, das Verhalten gegenüber Serum, Cholesterin usw., die Nichtspezifität für bestimmte Blutkörperchenarten ließen dies auf Grund der vorliegenden allgemeinen Kenntnisse über die hämolytische Wirksamkeit von Organextrakten von vornherein vermuten. Durch die Untersuchungen von Levaditi⁴⁾, später Noguchi⁵⁾ und Tallquist⁶⁾, des weiteren von Korschun-Morgenroth⁷⁾, Morgenroth-Schäfer⁸⁾, Friedemann⁹⁾ und Schäfer¹⁰⁾ sowie durch andere Autoren ist festgestellt, daß das wirksame Agens der hämolytischen Organextrakte aus Seifen oder seifenartigen Verbindungen besteht. Auf die umfangreiche Literatur, die sich hierüber, sowie über Seifen-hämolyse überhaupt angehäuft hat, soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden.

1) Berl. klin. Wochenschr. 1906, Nr. 44.

2) Literatur bei Kraus-Levaditi Bd. II, S. 978, 1909.

3) Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 185, 1907.

4) Annales de l'institut Pasteur Bd. 17, S. 187, 1903.

5) Biochem. Zeitschr. Bd. 6, S. 185, 1907.

6) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 61, Hft. 5—6.

7) Berl. klin. Wochenschr. 1902, S. 870.

8) Biochem. Zeitschr. Bd. 21, S. 205, 1909.

9) Arch. f. Hygiene Bd. 69, S. 105, 1909.

10) Biochem. Zeitschr. Bd. 35, S. 445, 1911.

Es ließe sich an der Hand der oben geschilderten Einzelheiten zeigen, daß die Erfahrungen, die man mit anderen hämolytischen Organextrakten, z. B. Pankreasextrakten, gesammelt hat, in ganz analoger Weise für die aus den Larven gewonnenen Extrakte Geltung haben, daß vor allem das oben geschilderte Verhalten der Larvenextrakte gegenüber dem Serum (einerseits Hemmung, andererseits Beschleunigung des hämolytischen Vorgangs durch Serumzusatz) dem Verhalten von Seifenlösungen entspricht, wie es von M. Friedemann und Sachs¹⁾ und Fr. Sachs²⁾ beschrieben wurde. Daß wässrige Larvenextrakte, bzw. Suspensionen keine Hämolyse bewirken, beruht, wie oben gezeigt werden konnte, auf der gleichzeitigen Anwesenheit von hämolysehemmenden Stoffen in den wässrigen Larvenextrakten, Stoffen, die bei der Extraktion mit 50- bzw. 80%igem Alkohol zum größten Teil ungelöst zurückbleiben. Daß der zur Trockene gebrachte alkoholische Extrakt in Wasser schwer löslich ist, daß man weniger eine Lösung als vielmehr eine Suspension von hämolytisch wirksamer Substanz erhält, entspricht ganz dem Verhalten der Organextrakte, wie es von Morgenroth und Schäfer³⁾ beschrieben wurde, und erklärt auch, daß bei sorgfältiger Filtration ein großer Teil der hämolytischen Substanz auf dem Filter zurückbleibt (vgl. wenig lösliche Seifen wie das palmitinsäure Natron). Auch die Tatsache, daß die Hämolsine der Larvenextrakte bei 0° von den roten Blutkörperchen verankert werden, ohne zunächst in geeigneter Menge hämolytisch zu wirken, entspricht dem von Korschun-Morgenroth beschriebenen Verhalten der Hämolsine der Organextrakte.

Der Mechanismus der Hemmung der Hämolyse durch geringe Serummengen verlief bei den Larvenextrakten ebenfalls analog der Hemmung der Seifenhämolyse, wie sie durch die Untersuchungen von Noguchi⁴⁾ und von Liebermann⁵⁾ bekannt ist. Blutkörperchen, zur Mischung Extrakt + Serum zugesetzt, werden nicht oder nur schwer gelöst. Auch die Hemmung der Hämolyse durch Cholesterin findet ihre Analogie in der Hemmung der Seifenhämolyse durch das Cholesterin, wie sie von Iscovesco⁶⁾, Iscovesco und Foucaud⁷⁾ und W. Meyerstein⁸⁾ festgestellt wurde. Ebenso ließ sich das Be-

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 12, S. 259, 1908.

2) Ebenda S. 278.

3) Ebenda Bd. 21, S. 305, 1909.

4) Ebenda Bd. 6, S. 327, 1907.

5) Ebenda Bd. 4, S. 25, 1907.

6) Compt. rend. de la Soc. de Biolog. 1908, S. 404.

7) Ebenda S. 677.

8) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. 1909, Bd. 60, S. 385.

beschleunigungsphänomen — für Ölsäure zuerst von v. Liebermann¹⁾ beobachtet — in den obigen Versuchen in der gleichen Weise mit den hämolytischen Larvenextrakten anstellen: Belädt man die Blutkörperchen zuerst mit dem hämolytischen Extrakt und fügt dann nach kurzer Zeit irgendwelches Serum hinzu, so kommt es zu rapider Auflösung der Erythrocyten. Dieser interessante Vorgang, von v. Liebermann zuerst fälschlich als Komplementwirkung gedeutet, wurde später durch v. Dungern und Coca²⁾, Friedemann und Sachs³⁾, Fr. Sachs⁴⁾, Liefmann und Cohn⁵⁾ des Näheren analysiert. Vergleicht man die obigen mit den Larvenextrakten gewonnenen Versuchsergebnisse mit den Versuchen der genannten Autoren, so ergibt sich eine völlige Übereinstimmung im Mechanismus des Beschleunigungsphänomens. Auch die von Fr. Sachs gefundene Tatsache, daß das genannte Phänomen statt durch Serum auch durch Natronlaugezusatz ausgelöst werden kann, ließ sich bei analoger Versuchsanordnung für die Larvenextrakte bestätigen.

Die Seifennatur der in den Larvenextrakten wirksamen hämolytischen Substanzen, die sich demnach auf Grund dieser hier kurz zusammengefaßten Analogien mit dem bereits bekannten Mechanismus der Seifenhämolyse mit aller Wahrscheinlichkeit ergab, bestätigte sich als solche durch die chemischen Eigenschaften. Durch Schütteln der mit Salzsäure versetzten hämolytischen Extrakte mit der mehrfachen Menge Äther geht die hämolytische Substanz in den Äther über. Nach Verdampfen des Äthers, Aufnahme des Rückstandes in Wasser, Neutralisieren mit Lauge, zeigt diese Lösung quantitativ die gleiche hämolytische Fähigkeit wie der Ausgangsextrakt.

Starke Säure bewirkt eine milchige Trübung, die sich in Äther löst. Kalzium- und Bariumsalze rufen stärkere oder schwächere Niederschläge hervor. Die Erdalkalien inaktivieren die hämolytische Wirksamkeit.

Daß mehrere Seifen in Frage kommen, ist höchst wahrscheinlich, und es ist keineswegs auszuschließen, daß auch andere Substanzen wie freie Fettsäuren in Betracht kommen. Eine nähere chemische Analyse wurde zunächst nicht vorgenommen.

Die oben erwähnte Tatsache, daß lange Zeit aufbewahrte Larven eine abgeschwächte hämolytische Wirkung ihrer Extrakte zeigen, steht

1) Arch. f. Hygiene Bd. 62, S. 277, 1907 und Biochem. Zeitschr. Bd. 4, S. 25, 1907.

2) Berl. klin. Wochenschr. 1908, S. 348.

3) Biochem. Zeitschr. Bd. 12, S. 259, 1908.

4) Ebenda S. 278.

5) Ebenda Bd. 26, S. 85, 1910.

nicht im Gegensatz zu der Seifennatur der hämolytischen Substanzen. Friedemann und Sachs¹⁾ machten die Beobachtung, daß ihre 1%ige Stammlösung von oleinsäurem Natron nach mehrwöchigem Stehen bei Zimmertemperatur spontan eine gewisse Abschwächung ihrer Wirksamkeit zeigte.

II. Hämolyseversuche mit Larvenexkreten.

Bewahrt man lebende, frisch aus dem Pferdemagen gewonnene Larven in physiologischer Kochsalz- oder Ringerlösung im Brutschrank bei 38° auf, so bleiben, zumal wenn man die Flüssigkeit öfters erneuert, die Larven längere Zeit am Leben. Diese Frist läßt sich verlängern, wenn man der Lösung Serum oder sonstige Eiweißgemische zusetzt. Eingehendere Versuche wurden jedoch über letztere Frage nicht vorgenommen. Die Kochsalzlösung beginnt sich nach einiger Zeit zu trüben und stellt nach 24 Stunden eine opake, kolloidale, bei größerer Larvenanzahl leicht gelblich gefärbte Flüssigkeit dar. Aus früheren Versuchen am Pferd und Kaninchen (s. oben) wissen wir, daß diese Exkretlösung Östrin enthält, daß die Larven demnach noch nach ihrer Entfernung aus dem natürlichen Aufenthaltsort, dem Pferdemagen, mehrere Tage hindurch Östrin mit ihren Exkreten absondern. Es stellte sich ferner heraus, daß diese Exkretion nur in der Wärme, nicht hingegen im Eisschrank stattfindet.

Es schien nun wichtig, zu entscheiden, ob diese Larvenexkrete hämolytische Stoffe enthalten. Die Versuchsanordnung war eine doppelte. Zunächst wurden gewaschene Blutkörperchen direkt der als »Nährlösung« dienenden Kochsalzlösung beigelegt und hierauf mit den Larven zusammen bei Brutschranktemperatur aufbewahrt. Derartige Versuche wurden mit allen in Betracht kommenden Larvenarten und mit den verschiedensten Blutkörperchenarten angestellt. Im ganzen wurden etwa 40 derartige Versuche unter den verschiedensten Kombinationen angesetzt. Es seien die folgenden Versuche herausgegriffen.

Bringt man lebende, völlig entwickelte Larven mit Pferdeblutkörperchen bei Körpertemperatur zusammen, so tritt nach einiger Zeit komplette Hämolyse ein. Wählt man die Versuchsanordnung z. B. so, daß man je zwei Larven zusammen mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung und 1 ccm 5% iger Blutkörperchenaufschwemmung in Reagenzgläsern zusammenbringt, so beginnt die Hämolyse meist nach 6—8 Stunden, um im Verlauf der nächsten 4—6 Stunden komplett zu werden. Setzt man eine größere Anzahl solcher Versuche mit

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 12, S. 264.

Larven der gleichen Art, die alle aus dem gleichen Pferdemenagen stammen, an, so zeigt sich, daß die einzelnen Exemplare sich dabei unter Umständen wesentlich verschieden verhalten, daß die Hämolyse im einen Glase etwas schneller, im anderen etwas langsamer verläuft.

Fast regelmäßig wurde mit kleinen jugendlichen Exemplaren von *G. equi*, *pecorum*, vor allem haemorrh. bei dieser Versuchsanordnung keine Hämolyse erzielt.

Wesentliche Unterschiede in der Hämolyse wurde bei Verwendung verschiedener Blutkörperchenarten erhalten. Am häufigsten entsprach das Resultat dem folgenden typischen Versuch:

	G. equi je 3 Exemplare + Pferde- blut- körperchen	G. equi je 3 Exemplare + Schweine- blut- körperchen	G. equi je 3 Exemplare + Hammel- blut- körperchen	G. equi je 3 Exemplare + Rinder- blut- körperchen
Hämolyse nach 6 Stunden	0 +	0 Spur	0 0	0 0
» » 12 »	k k	fk k	0 Spur	0 0

Die Röhrchen mit Pferdeblutkörperchen weisen nach 12 Stunden komplette Hämolyse auf, die mit Schweineblutkörperchen verhalten sich annähernd gleich, keine oder nur geringe Hämolyse tritt mit Hammel- und Rinderblutkörperchen auf.

Wurden die gleichen Larven jetzt nach sorgfältiger Abspülung in anderer Reihenfolge mit den verschiedenen Blutkörperchenarten zusammengebracht, so hämolysierten die Larven, die vorher Rinder- bzw. Hammelblutkörperchen nicht hämolysiert hatten, jetzt Pferde- und Schweineblutkörperchen, hingegen hämolysierten die aus Pferde- und Schweineblutkörperchen genommenen Larven jetzt keine Hammel- und Rinderblutkörperchen. Dieses Verhalten konnte in wiederholten Versuchen mit dem verschiedensten Larvenmaterial festgestellt werden, wie z. B. im folgenden Versuche:

	a	b	c	d
I. Je 4 Exemplare <i>G. equi</i> mit Pferdeblut- körperchen a) nach 12 Stunden . . .	++	++	+	+
b) » 15 » . . .	k	k	+++	fk
Darauf mit Hammelblutkörperchen nach 20 Stunden	0	0	0	0
II. Je 4 Exemplare <i>G. equi</i> mit Hammelblut- körperchen nach 24 Stunden	a ₁	b ₁	c ₁	d ₁
Darauf mit Pferdeblutkörperchen nach 15 Stunden	0	0	0	0
	k	k	fk	k

Diese zunächst bei *G. equi* sich findende spezifische Hämolyse der lebenden Larven für Pferde- bzw. Schweineblutkörperchen traf jedoch nicht in allen Fällen zu. Einige Male hämolysierten Larven in gleicher Stärke Pferde-, Schweine-, Rinder-, und Hammelblutkörperchen von vornherein. Worauf diese Unterschiede beruhen, läßt sich zunächst nicht entscheiden.

Bei den übrigen Larvenarten, vor allem *G. pecorum* und *nasalis*, ließ sich ein ähnliches spezifisches Verhalten wiederholt feststellen. In der Mehrzahl der Fälle war bei *G. pecorum* die Hämolyse spezifisch für Pferde- und Hammelblutkörperchen. Schweine- und Rinderblutkörperchen wurden fast nicht hämolysiert. *G. nasalis* und *haemorrhoidalis* verhielten sich meistens wie *G. equi*.

Die Versuchsergebnisse waren fast stets die gleichen, ob gewaschene oder nicht gewaschene, ob in Kochsalz- oder Rohrzuckerlösung gewaschene Blutkörperchen verwendet wurden. Geringe Unterschiede traten nicht mit der Regelmäßigkeit auf, um verwertet zu werden.

Fügt man zu den in Blutkörperchenaufschwemmungen befindlichen, lebenden Larven Serum, so tritt zeitlich eine Beschleunigung des Hämolysevorgangs ein. Bei Zusatz von z. B. 1,0 frischen oder inaktivierten Serums zu 3 Larven (in 5 cem Kochsalzlösung + 1,0 cem 5%iger Blutkörperchenaufschwemmung), die ohne Serum nach 4 Stunden Spuren von Hämolysen bewirken, erfolgt in der gleichen Zeit komplette Hämolyse.

Das gleiche »Beschleunigungsphänomen«, das oben bei der Hämolyse der Larvenextrakte beobachtet werden konnte, zeigt sich auch hier bei der mit den Exkreten lebender Larven erzielten Hämolyse. Dies deutet schon darauf hin, daß die Natur der hämolytischen Substanzen hier wie dort die gleiche ist, daß es sich auch bei der Exkrehämolyse um eine Seifenhämolyse handelt.

Während bei der obigen Versuchsanordnung, d. h. bei Zusammenbringen von lebenden, absondernden Larven mit Blutkörperchen bei entsprechender Blutkörperchenart stets Hämolyse erhalten wurde, trat wider Erwarten keine Hämolyse auf, wenn man die Exkretflüssigkeit (ohne Larven!) mit Blutkörperchen versetzte. Dieses Resultat stand zunächst im Widerspruch zu den obigen Versuchsergebnissen. Hämolyse ließ sich auch nicht durch nachträglichen Serum- oder Lezithinzusatz erzielen. Es wurden im ganzen etwa 20 Exkretflüssigkeiten des verschiedensten Larvenmaterials daraufhin untersucht.

Bringt man derartige Exkretflüssigkeit zur Trockene und extrahiert den Rückstand mit 50%igem Alkohol, filtriert den klaren Extrakt, dampft ein und nimmt in physiologischer Kochsalzlösung auf, so

zeigt diese Lösung starke hämolytische, thermostabile Wirksamkeit. Daraus folgt, daß die fertige Exkretlösung zwar hämolytische Substanz enthält, die bei der obigen Versuchsanordnung zur Wirksamkeit gelangt, als solche aber analog den wässerigen Larvenextrakten (vgl. oben S. 278 u. f.) infolge Anwesenheit hämolysehemmender Substanzen keine Hämolyse bewirkt. Durch Extraktion mit Alkohol läßt sie sich in wirksamer Form gewinnen. Die weitere chemische Untersuchung ergab, daß, wie schon auf Grund der Analogie zu der hämolytischen Wirksamkeit der Larvenextrakte geschlossen wurde (vgl. oben »Beschleunigungsphänomen«), der hämolytisch wirksame Bestandteil der Larvenexkrete aus Seifen besteht.

Die Frage, warum die sezernierenden, lebenden Larven Hämolyse bewirken, die »fertigen« Exkretlösungen hingegen nicht, obgleich in beiden Fällen neben den hämolytischen auch hämolysehemmende Substanzen in Betracht kommen, ist zunächst nicht endgültig zu entscheiden. Wahrscheinlich hängt dies weniger von einer aktiven Beteiligung der lebenden Larven am Hämolyseprozeß ab, als vielmehr von der verschiedenen jeweiligen Konzentration von hämolysierender einerseits und hämolysehemmender Substanz andererseits. Das langsam von den Larven abgesonderte Exkret enthält wahrscheinlich die hemmenden Substanzen in einer Konzentration, in der sie noch nicht hemmend wirken, während die gleichzeitig abgesonderten hämolysierenden Substanzen sofort von den Blutkörperchen gebunden werden und nach Erreichung eines optimalen Wertes die Hämolyse herbeiführen. Im Gegensatz hierzu enthalten die fertigen Exkrete bereits so viel hämolysehemmende Substanz, daß eine Hämolyse von vornherein ausgeschlossen ist.

Wesentlich schwieriger ist die Beurteilung der wenn auch nicht immer, so doch sehr häufig zu beobachtenden Spezifität der Hämolyse lebender Larven. Sie steht zunächst im Gegensatz zu der Tatsache, daß die Hämolyse der Larvenextrakte keine spezifische, daß überhaupt sonst Seifenhämolyse, vor allem aber die Hämolyse der auf die erwähnte Weise mit 50%igem Alkohol extrahierten Exkrete für die einzelnen Blutkörperchenarten keine spezifische ist. Hier kann man wohl nicht umhin, eine aktive Rolle der lebenden Larven als Erklärung dafür anzunehmen, daß die gleichen lebenden Larvenexemplare z. B. mit Hammelblutkörperchen zusammengebracht keine Hämolyse bewirken, Pferdeblutkörperchen dagegen komplett lösen.

All diese Fragen verdienen eine besondere, in vieler Hinsicht interessante Resultate versprechende, eingehende Untersuchung, wie

sie, als nicht in direkter Beziehung zu dieser Arbeit stehend, nicht weiter verfolgt werden konnte. Für die dieser Arbeit zugrunde liegende Frage genügte die Feststellung, daß die bei Körpertemperatur in flüssigem Medium aufbewahrten Larven außer dem Östrin hämolytisch wirksame Substanzen absondern, daß diese Hämolyse nach den gleichen Gesetzen erfolgt, wie die oben beschriebene Hämolyse der Larvenextrakte, daß beide als eine Seifenhämolyse zu betrachten sind. Von besonderer Bedeutung mußte diese Feststellung von dem Gesichtspunkt aus erscheinen, ob und in welchen Zusammenhang diese nachweisbar von den im Pferdemagen haftenden Larven dauernd abgesonderten, hämolytisch wirkenden Substanzen mit der Entstehung einer Anämie gebracht werden müssen.

E. Hämolyseversuche am lebenden Tier.

I. Injektion der Lipide.

Ausgehend von der Fragestellung nach dem Entstehungsmodus der Larvenanämie war im vorigen Kapitel die Frage nach dem Vorhandensein hämolytisch wirksamer Substanzen Gegenstand der experimentellen Untersuchung gewesen. Dabei hatte sich herausgestellt, daß die *Gastrophilus*larvenextrakte bei entsprechender Versuchsanordnung (Extraktion mittels Alkohols) Hämolyse *in vitro* bewirken. Ferner hatte sich gezeigt, daß die Larven auch in ihren Exkreten diese *in vitro* hämolytisch wirksamen Substanzen absondern. Des weiteren ergab sich, daß diese hämolytischen Substanzen zur Hauptmenge aus Seifen bestehen. So erschien es zunächst höchstwahrscheinlich, daß hämolytische Wirksamkeit der Larven einerseits und Anämie der Pferde andererseits in einem direkten kausalen Zusammenhang stehen. Die von den auf der Magenschleimhaut haftenden Larven dauernd ausgeschiedenen hämolytischen Substanzen würden von der Darmschleimhaut resorbiert und führten mit der Zeit zu der mehr oder minder schweren Anämie des Wirtes. Besonders wahrscheinlich mußte diese Annahme auf Grund der Analogie mit den von der *Bothriocephalus*anämie wohlbekannten Tatsachen zutreffen. Auf Grund eingehender Untersuchungen sind Tallquist¹⁾ und Faust und Tallquist²⁾ zu dem Resultat gekommen, daß die in der *Bothriocephalus*leibessubstanz enthaltenen, *in vitro* hämolytisch wirksamen Lipide, im speziellen ein Ölsäure-Cholesterinester, zur schweren perniziösen Anämie des Wurmträgers führen. Beim *Bothriocephalus* werden die genannten hämolytischen Stoffe durch Absterben der Parasiten frei

1) Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 61, S. 427, 1907.

2) Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. 57, S. 367, 1907.

und resorbierbar, bei den Larven kommt es dauernd zur Ausscheidung solcher Hämolytika auf dem physiologischen Wege der Exkretion.

Von diesem — wie sich später herausstellte, unzutreffenden — Gesichtspunkt ausgehend, sollten die nächsten Versuche den kausalen Zusammenhang zwischen Lipoidsubstanzen der Larven und Anämie experimentell erhärten. Versuchstiere, und zwar Kaninchen, erhielten die gesamten Lipoidsubstanzen aus den Larven unter Ausschluß des Östrins, unter ständiger Kontrolle des Blutbildes injiziert.

Zunächst erhob sich die Schwierigkeit einer Trennung der Lipoidsubstanzen von dem Östrin. Nach zahlreichen, vergeblichen Versuchen gelang es, diese Trennung auf Grund der oben gefundenen Fällbarkeit des Östrins durch höhere Konzentrationen von Alkohol durchzuführen.

Die durch Extraktion mit 50%igem Alkohol erhaltene Lösung, zur Trockene gebracht, in Wasser aufgenommen, enthält sowohl das Östrin wie die hämolytischen Substanzen, die Lipoide, und löst Blutkörperchen auf. Versetzt man diese 50%ige alkoholische Lösung mit der 1—2fachen Menge absoluten Alkohols, so erhält man einen Niederschlag, der das Östrin enthält und, in Wasser aufgelöst, keine Hämolyse in vitro bewirkt. Das klare, bräunlich gefärbte Filtrat hingegen enthält die gesamten hämolytischen Substanzen; zur Trockene gebracht, in Wasser aufgenommen zeigt diese Fraktion die unverminderte hämolytische Wirksamkeit des Ausgangsextraktes. Durch mehrmalige Wiederholung des genannten Fällungsprozesses erzielt man eine nahezu quantitative Trennung von Östrin einerseits und Seifen andererseits. Mit den auf diese Weise hergestellten Lipoidfraktionen, deren hämolytische Wirksamkeit im Einzelfalle vor dem Tierversuche durch Hämolyseversuch in vitro jeweilig quantitativ festgestellt wurde, wurden Versuchstiere intravenös behandelt.

Aus der Zahl der Versuche seien die folgenden herausgegriffen:

Kaninchen Nr. 11, braun, 1850 g Gewicht.

Das Tier erhält wiederholte intravenöse Injektionen einer auf die obige Weise dargestellten Lipoidfraktion aus Larven. Die hämolytische Wirkung der Lösung in vitro war folgende: 0,1 ccm bewirken in 30 Minuten komplette Hämolyse von 1 ccm 5%iger Blutaufschwemmung. Kleinere Dosen bewirken nur partielle Hämolyse.

Datum	Injiziert	Hämoglobin ¹⁾	Erythrocyten	Leukocyten	Gewicht
22. II. 1916	intravenös 5 ccm	78 %	6 320 000	8 200	1850 g
23. II. 1916	» 5 »	—	—	—	—
24. II. 1916	» 5 »	—	—	—	1800 g
25. II. 1916	» 8 »	—	—	—	—

1) Die Untersuchungen wurden mittels eines Hämoglobinometers von Autenrieth und Königsberger ausgeführt.

Datum	Injiziert	Hämo- globin	Erythro- cyten	Leuko- cyten	Gewicht
26. II. 1916	intravenös 15 ccm	—	—	—	—
27. II. 1916	» 20 »	—	—	—	—
28. II. 1916	» 35 »	75 %	5 940 000	11 600	1720 g
5. III. 1916	» 20 »	—	—	—	—
7. III. 1916	» 20 »	—	—	—	—
8. III. 1916	» 30 »	67 %	5 100 000	13 600	1720 g
9. III. 1916	» 25 »	—	—	—	—
12. III. 1916	» 30 »	72 %	4 900 000	10 200	1700 g

In den Blutausstrichen fehlen Polychromasie, Anisocytose, Erythroblasten.

Trotz der längere Zeit fortgesetzten Injektionen ist bei dem Tier keine beträchtlichere Anämie eingetreten.

Aus dem folgenden Tierversuch, in welchem wiederholte Zählungen in kurzen Zeitabständen nach der jeweiligen Injektion vorgenommen wurden, ist der Einfluß der einzelnen Injektion aufs Blutbild zu ersehen:

Kaninchen Nr. 1, schwarz, 1700 g Gewicht.

Datum	Injiziert	Hämo- globin	Erythro- cyten	Leuko- cyten	Gewicht
12. XII. 1915	intravenös 4 ccm	65 %	4 800 000	5 000	1700 g
Nach 2 Stunden	—	63 »	5 160 000	3 500	—
» 6 »	—	57 »	4 180 000	9 000	—
13. XII. 1915	intravenös 4 ccm	65 »	4 720 900	20 600	—
14. XII. 1915	» 4 »	63 »	4 960 000	16 000	—
15. XII. 1915	» 10 »	60 »	4 520 000	5 800	1550 g
Nach 2 Stunden	—	58 »	4 020 000	8 400	—
» 6 »	—	55 »	3 540 000	16 600	—
16. XII. 1915	intravenös 10 ccm	65 »	4 800 000	10 600	—
28. XII. 1915	» 10 »	65 »	5 280 000	11 200	1630 g

In unmittelbarem Anschluß an die jeweilige Injektion der hämolytischen Substanz tritt im obigen Fall eine deutliche Senkung von Hämoglobin- und Erythrocytenzahl auf, die aber in den nächsten Stunden wieder restituiert wird.

Drei weitere Versuche, in der gleichen Art mit Kaninchen angestellt, fielen in analoger Weise aus; es ergab sich bei längere Zeit fortgesetzten Injektionen keine ausgesprochene Anämie.

Von drei in gleichem Sinne ausgefallenen Versuchen am Hund mit hämolytischer Larvenfraktion sei der folgende in extenso angeführt:

Datum	Injiziert	Hämo- globin	Erythro- cyten	Leuko- cyten	Gewicht
25. XI. 1915	intrav. 4 Larven ¹⁾	93 %	4 140 000	15 800	6040 g
Nach 6 Stunden	—	88 »	5 180 000	21 600	—
26. XI. 1915	intrav. 4 Larven	68 »	3 660 000	—	—
29. XI. 1915	» 4 »	—	—	—	—
1. XII. 1915	» 4 »	87 %	5 940 000	22 400	—
16. XII. 1915	» 5 »	80 »	4 400 000	32 000	5500 g
24. XII. 1915	—	83 »	4 920 000	14 600	—
3. I. 1916	—	80 »	5 380 000	19 800	—
14. I. 1916	intrav. 4 Larven	86 »	5 500 000	16 800	—
15. I. 1916	» 4 »	86 »	5 560 000	17 500	5200 g
24. I. 1916	» 12 »	87 »	5 040 000	13 600	—
Nach 6 Stunden	—	80 »	4 580 000	14 000	—
25. I. 1916	—	83 »	4 950 000	13 000	5500 g

In den Blutaussstrichen weder Polychromasie noch Anisocytose oder Erythroblasten.

Es ist demnach auch bei dem obigen Hunde zu keiner stärkeren Anämie gekommen, nach der auf die erste Injektion folgenden Senkung erfolgte rasche Regeneration. Zum Schluß resultiert ein etwas geringerer Hämoglobinwert bei ursprünglichem Erythrocytenwert (Erniedrigung des Färbeindex!).

Vergleicht man diesen im wesentlichen negativen Ausfall der Versuche mit dem Ergebnis unserer an Pferden vorgenommenen Injektionen von nativen, wässerigen Larvenextrakten, die zur schwersten perniziösen Anämie geführt hatten (vgl. a. a. O.), so kommen zur Erklärung zunächst zwei Möglichkeiten in Betracht. Entweder ist die hämolytische Wirkung der Larvenextrakte, speziell des hämolytischen Teiles, eine für das Pferd spezifische, oder aber die oben am Kaninchen und Hund geprüfte, *in vitro* hämolytische Substanz ist nicht der ätiologische Faktor bei der Entstehung der perniziösen Anämie der Pferde. Gegen erstere Möglichkeit spricht der Umstand, daß *in vitro* die hämolytische Wirkung der Larvenextrakte für die verschiedenen Blutkörperchenarten keine wesentlichen Unterschiede erkennen läßt. Es war darum zunächst auf Grund der obigen Versuche wahrscheinlicher, daß **nicht** der seifenartige, *in vitro* hämolytische Teil der Larven die Anämie der Pferde erzeugt.

Um diese Frage zu entscheiden, wurden zunächst wässrige Gesamtextakte der Larven, dann die verschiedenen Fraktionen,

1) D. h. die 4 Larven entsprechende Lipoidfraktion.

wie sie beim Gang der obigen chemischen Analyse der Larvenextrakte erhalten wurden, auf ihre anämisierende Wirkung am Kaninchen geprüft.

II. Injektion wässriger Gesamtextrakte.

Kaninchen Nr. 13, schwarz, 1600 g Gewicht.

Die lebenden Larven wurden nach sorgfältiger Reinigung (1 Stunde im Wasserstrahl) mit physiologischer Kochsalzlösung verrieben, das Filtrat subkutan injiziert.

Datum		Injektion	Hämo- globin	Erythro- cyten	Leuko- cyten	Gewicht
5. III. 1916	vorm.	intrav. 5 Larven	78 ‰	5 180 000	6400	1600 g
	nachm.	» 5 »				
6. III. 1916		—	—	—	—	—
7. III. 1916	nachm.	intrav. 6 Larven	75 ‰	4 500 000	5400	—
8. III. 1916	vorm.	—	52 »	3 120 000	2200	1420 g
	nachm.	—	49 »	3 260 000	3600	—
9. III. 1916		—	47 »	2 720 000	2600	1390 g

Kurve 1. Kaninchen Nr. 13.

Das Tier wurde am 9. III. entblutet.

Im Urin war am 8. und 9. III. die Urobilinogenreaktion mit Ehrlichs Reagens in der Kälte positiv! Das Tier zeigte gegen Ende ausgesprochene allgemeine Schwäche, die Konjunktiven der Augen waren hochgradig blaß.

Die Blutausstriche zeigten vom 7. III. ab wiederholt kernhaltige rote Blutkörperchen und eine gegen Ende stark zunehmende Anisocytose und Polychromasie, z. T. basophile Punktierung der Erythrocyten, starke Verminderung der Blutplättchen.

Sektionsbefund.

1. Makroskopisch.

Organe hochgradig blutleer. In der Bauchhöhle kein abnormer Inhalt. Leber scheint leicht vergrößert, von brauner Farbe, Konsistenz weich.

Milz leicht geschwollen, blutreich. Nieren blaß. Magen und Darm ohne Blutungen. Keine Drüsenschwellungen. Herz und Lungen ohne Besonderheiten. Knochenmark des Femur weich, von blaßroter Farbe.

2. Mikroskopisch.

Leber. Zentralvenen stark erweitert. Die Leberbalken erscheinen durch ein zwischengelagertes, zellreiches Gewebe an vielen Stellen wie auseinandergedrängt. Die Anordnung dieses Gewebes ist eine herdförmige, am intensivsten in der Peripherie der Acini. Keine Beziehung zum Lebergewebe erkennbar. Außerdem längs der periportal Gefäße starke zelluläre Anhäufungen. Bei starker Vergrößerung sieht man eine netzförmige Grundsubstanz, in der die Zellen liegen. Die meisten Zellen haben einen runden, homogenen Kern und einen schmalen Protoplasmasaum, daneben liegen andere größere mit gelapptem Kern, sowie Zellen mit intensiv rotgefärbtem Protoplasma und Kernabschnürungen. Ferner vereinzelte granuliert Leukocyten. Außerdem sehr viel freies und von den Zellen aufgenommenes Pigment. Vereinzelte Übergänge von Endothelien in die genannten Zellgruppen. Die um die periportal Gefäße gelagerten Zellen haben den gleichen Charakter. Deutliche Hämosiderose. Verfettung mäßigen Grades. Die Leberzellen zum Teil degeneriert, vakuolisiert, verfettet. In den Ausstrichpräparaten: Zahlreiche polymorphkernige Leukocyten, Myelocyten, große basophile mononukleäre Zellen, Normoblasten.

Milz. Follikel klein, locker gefügt, Pulpäräume von zahlreichen, oft in Gruppen liegenden myeloiden Elementen erfüllt: Myelocyten, Normoblasten, azidophil granulierten Zellen, daneben Detritus, Pigmentzellen.

In den Ausstrichpräparaten ebenfalls Normoblasten, Myelocyten, mit azidophiler und basophiler Granulation, zahlreiche polymorphkernige Leukocyten.

Knochenmark. Reines Zellenmark, viele Normoblasten, Megaloblasten, Megalocyten, Knochenmarksriesenzellen, Mastzellen. Im Ausstrich desgleichen.

Nieren. Deutliche epitheliale Degeneration.

Es ist demnach in überraschend kurzer Zeit nach Injektion des wässerigen Gesamtextraktes von nur 16 Larven (wässriger Gesamtextrakt) zu einer rasch fortschreitenden Anämie gekommen (vgl. Kurve 1). Die Erythrocytenzahl ist relativ stärker vermindert als der Hämoglobingehalt, d. h. der Färbeindex wird größer als 1, wie dies besonders aus der obigen Kurve hervorgeht. Ausgesprochene Leukopenie. Normoblasten, Anisocytose, Polychromasie, basophile Punktierung. Hochgradige myeloide Umwandlung in der Leber und Milz. Verfettung und Parenchymdegeneration. Auffallend ist die überaus rasche Entstehung dieser hochgradigen Veränderung im Verlauf von 4 Tagen.

Der obige Versuch wurde mit drei weiteren Kaninchen wiederholt. In allen Fällen stellte sich rasch eine progrediente Anämie ein. Ein weiteres Beispiel sei hier angeführt:

Kaninchen Nr. 16, grau.

Datum	Injektion	Hämo- globin	Erythro- cyten	Lenko- cyten	Gewicht
9. III. 1916	intravenös 6 Larven	68 ‰	5 380 000	9000	1670 g
11. III. 1916	» 6 »	55 »	4 020 000	6200	1620 »
12. III. 1916	—	53 »	3 860 000	3200	1510 »
13. III. 1916	intravenös 4 Larven	52 »	3 620 000	4800	1620 »
14. III. 1916	—	54 »	3 960 000	1800	1510 »
15. III. 1916	intravenös 3 Larven	44 »	2 660 000	4600	1510 »
16. III. 1916	—	41 »	2 800 000	3600	1520 »
17. III. 1916	—	45 »	2 580 000	3000	1410 »
18. III. 1916	—	33 »	2 840 000	4400	1400 »
Exitus.

Kurve 2. Kaninchen Nr. 16.

Die Blutaussstriche zeigten vom 12. III. ab wiederholt kernhaltige rote Blutkörperchen und eine besonders gegen das Ende sehr deutlich werdende Polychromasie, Anisocytose und zum Teil basophile Punktierung der Erythrocyten. Blutplättchen vermindert.

Sektionsbefund.

1. Makroskopisch.

Organe hochgradig blaß. Keine Blutungen. Leber leicht geschwollen, blutreich, Konsistenz weich. Milz ebenfalls leicht geschwollen, blutreich, weich. Nieren blaß. Keine Drüsenschwellungen. Herz und Lungen ohne Besonderheiten. Knochenmark hellrot, weich.

2. Mikroskopisch.

Leber. Zwischen den einzelnen Leberbalken ein ungemein zellreiches Gewebe, durch das die Leberbalken an einzelnen Stellen auseinanderge-

drängt scheinen. Die Gesamtheit dieses zwischengelagerten Gewebes erinnert außerordentlich an Knochenmarksgewebe, namentlich dadurch, daß nicht eine Zellform sondern zahlreiche, vor allem auch granulierten Zellen (Myelocyten) vorhanden sind. Die meisten Zellen besitzen ein Protoplasma, dessen Färbung sich von dem Rot der Blutkörperchen unterscheidet. Einzelne zeigen allerdings die gleiche Färbung. Die stark rot gefärbten Zellen zeigen zum Teil starke Fragmentierung der Kerne (Kernzerfall der Erythroblasten). In den basophilen Zellen zum Teil Radkerne, Maulbeerkerne, Kranzkerne und eingebuchtete Kerne. Sehr starke zelluläre Anhäufungen längs der periportal Gefäße. Starke Hämosiderose. Starke Degeneration der Leberzellen. Im Ausstrich zahlreiche Lymphoidzellen, Myelocyten, Normoblasten und polymorphkernige Leukocyten.

Milz. Follikel klein, Pulpa sehr zellreich, von massenhaft größeren Lymphoidzellen, Myelocyten und polymorphkernigen Leukocyten angefüllt. Viel Pigment. Gefäße erweitert. Im Ausstrich neben kleinen Lymphocyten zahlreiche basophile große mononukleäre Zellen, pigmenthaltige Zellen, Myelocyten, Normoblasten.

Knochenmark. Dichtes Zellmark, sehr zahlreiche Knochenmarkriesenzellen, viele Normoblasten, mäßig viel Pigment. In den Ausstrichen desgleichen.

Nieren. Starke epitheliale Degeneration.

Es ist demnach auch in diesem Falle in der kurzen Zeit von 9 Tagen nach subkutaner Injektion von 19 Larven zu einer rasch fortschreitenden Anämie gekommen (vgl. Kurve 2). Auch in diesem Falle ist der Färbeindex gleich bzw. höher als 1. Ausgesprochene Leukopenie. Normoblasten, Anisocytose, Polychromasie, basophile Punktierung der Erythrocyten. Hochgradige myeloide Umwandlung in der Leber und Milz. Verfettung und Parenchymdegeneration.

Noch ein weiterer Fall möge die Entstehung einer schweren Anämie nach Injektionen wässriger Larvenextrakte zeigen:

Kaninchen Nr. 41, hellgrau.

Datum	Injektion	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten	Gewicht
1. VI. 1916	—	85 %	5 400 000	5600	1660 g
3. VI. 1916	intravenös 7 Larven	—	—	—	—
4. VI. 1916	—	80 %	5 800 000	1500	—
5. VI. 1916	—	81 »	5 920 000	1800	—
6. VI. 1916	intravenös 4 Larven	—	—	—	—
7. VI. 1916	—	57 %	2 520 000	4200	—
8. VI. 1916	intravenös 3 Larven	59 »	3 800 000	4600	—
9. VI. 1916	—	55 »	2 640 000	4000	—
10. VI. 1916	—	52 »	1 760 000	3800	1190 g
Gefötet.

Kurve 3. Kaninchen Nr. 41.

Die Blutaussstriche zeigten vom 7. VI. ab wiederholt kernhaltige rote Blutkörperchen und eine besonders gegen Ende sehr deutlich werdende Anisocytose und Polychromasie der roten Blutkörperchen. Das Tier zeigte gegen Ende hochgradigen Kräftezerfall. Die Konjunktiven der Augen sehr blaß.

Sektionsbefund.

1. Makroskopisch.

Innere Organe sehr blaß, Leber braun, Konsistenz etwas erweicht. Milz leicht geschwollen. Nieren, Herz und Lungen makroskopisch ohne Besonderheiten. Keine Blutungen. Knochenmark weich, hellrot.

2. Mikroskopisch.

Leber. Die Ausstrichpräparate sehr zellreich. In der Mehrzahl große Lymphoidzellen, ferner Myelocyten, Normoblasten und polymorphkernige Leukocyten. In den Schnitten ein die Leberbalken fast verdrängendes Zellgewebe. Die Endothelien zeigen an vielen Stellen eine Auftreibung des Protoplasmas, die den Übergang zu Blutzellen wahrscheinlich macht. Deutliche Hämosiderose. Starke Verfettung und Parenchymdegeneration der Leberzellen. Kapillaren stark mit Blut überfüllt. Die Leberbalken liegen an einzelnen Stellen wie eingeschleitet in Blut.

Milz. In den Ausstrichpräparaten neben den zahlreichen kleinen Lymphocyten auffallend viel größere Zellen von Myelocytencharakter, zahlreiche Normoblasten. Im Schnitt entsprechende Pulpawucherung, die Follikel klein. Sehr viel freies Pigment.

Knochenmark. Sehr zellreiches, in erster Linie aus ungranulierten Zellen bestehendes Mark. Sehr viele Knochenmarksriesenzellen.

Nieren. Deutliche epitheliale Degeneration.

Auch in diesem Falle ist es demnach in der kurzen Zeit von 10 Tagen zu einer stark progredienten Anämie gekommen (vgl. Kurve 3). Besonders auffallend ist bei diesem Kaninchen die sehr starke Er-

höhung des Färbeindex. Auch in diesem Falle wieder Anisocytose, Polychromasie der Erythrocyten und dauernde Leukopenie. Die extramedulläre Blutbildung in der Leber und Milz erreicht die gleichen Grade wie in den beiden obigen Versuchen.

Aus den oben angeführten Tierversuchen folgt, daß es, im Gegensatz zu den anfangs mit in vitro hämolytischem Larventeile angestellten Versuchen, leicht gelingt, mit nativen wässerigen Gesamtextrakten der Larven in kurzer Zeit eine progrediente Anämie zu erzeugen. Nach kurzer Zeit treten im Gefolge der Injektionen kernhaltige Blutkörperchen auf, Hämoglobin- und Erythrocyten-Zahl nehmen rapid ab. Die Erythrocyten zeigen deutliche Anisocytose und Polychromasie, zum Teil basophile Punktierung. Der Färbeindex bleibt dauernd über eins, ist zum Teil sogar wesentlich erhöht. Die Leukocytenzahl fällt ebenfalls und bleibt fast dauernd unter der Norm, dauernde Leukopenie. Die Veränderungen in den Organen entsprechen ebenfalls in allen Einzelheiten dem bei der perniziösen Anämie der Pferde von mir beschriebenen Befund¹⁾: Hochgradig rotes, in voller Funktion begriffenes Knochenmark, ausgedehnte myeloide Umwandlung der sekundär blutbildenden Organe, der Leber und Milz, die an einzelnen Stellen direkt an das histologische Verhalten einer leukämischen oder der fötalen Leber in gewissen Stadien der Entwicklung (5.—7. Monat) erinnert. Diese Anämie verläuft also beim Kaninchen im wesentlichen in der gleichen Weise, wie sie früher von uns beim Pferde ebenfalls mit wässerigen Larvenextrakten erzielt wurde, und die typischen histologischen Veränderungen sind hier wie dort die gleichen.

Aus dem obigen negativen Ausfall der Versuche mit der Lipoidfraktion, aus dem positiven Ausfall mit den wässerigen Gesamtextrakten der Larven geht hervor, daß erstere, d. h. die in vitro hämolytisch wirkenden Substanzen, die übrigens zum großen Teile in kolloidaler Form auch in den wässerigen Gesamtextrakten enthalten sind, nicht die Ursache der Anämie sind, sondern daß hierfür eine andere, in den wässerigen Larvenextrakten enthaltene Substanz in Betracht kommt.

Aufgabe der folgenden Versuche war es, die Eigenschaften dieser Substanz festzustellen.

Nachdem sich zunächst im Tierversuche erwiesen hatte, daß 1stündiger Aufenthalt der wässerigen Extrakte bei 58° die anämi-

1) R. Seyderhelm, Über die perniziöse Anämie der Pferde (Beitrag z. vergleichenden Pathologie der Blutkrankheiten). Beiträge z. path. Anat. u. allgem. Pathol. Bd. 58, S. 285—318.

sierende Wirkung der letzteren nicht aufhebt — Kaninchen Nr. 43 wurde in ganz analoger Weise anämisch —, sollte der Einfluß höherer Temperaturen beobachtet werden: Die wässerigen Larvenextrakte wurden zu diesem Zwecke 15 Minuten in kochendem Wasser gelassen, vor der subkutanen Injektion die ausgefallenen Eiweißniederschläge durch Schütteln in möglichst gleichmäßige Suspension gebracht und dann zur subkutanen Injektion auf Kaninchen Nr. 44 verwendet:

Kaninchen Nr. 44, schwarz.

Datum	Injektion	Hämo- globin	Erythro- cyten	Leuko- cyten	Gewicht
3. VI. 1916	intravenös 7 Larven	79 ‰	6 700 000	9000	1260 g
4. VI. 1916	—	75 »	5 600 000	8200	—
5. VI. 1916	—	79 »	5 560 000	3000	—
6. VI. 1916	intravenös 4 Larven	—	—	—	—
7. VI. 1916	—	65 ‰	4 080 000	—	940 g
8. VI. 1916	intravenös 3 Larven	62 »	4 320 000	8400	—
9. VI. 1916	—	60 »	3 100 000	5200	—
10. VI. 1916	—	52 »	4 280 000	9000	870 g
11. VI. 1916	—	68 »	3 860 000	5400	—
13. VI. 1916	—	58 »	2 980 000	7500	830 g
14. VI. 1916	—	62 »	3 300 000	2800	—

Kurve 4. Kaninchen Nr. 44.

Da das Tier nahe vor dem Exitus steht, wird es entblutet.

Die Blutaussstriche zeigten vom 7. VI. 1916 ab wiederholt kernhaltige rote Blutkörperchen und eine gegen Ende stark zunehmende Anisocytose und Polychromasie, zum Teil basophile Punktierung der Erythrocyten.

Sektionsbefund.

1. Makroskopisch.

Innere Organe blaß, Leber leicht geschwollen, blutreich. Milz nicht vergrößert. Nieren, Herz und Lungen ohne Besonderheiten. Knochenmark weich, hellrot.

2. Mikroskopisch.

Die ganze Leber ist von starken, periacinären Zellanhäufungen durchsetzt, daneben streifenförmige intraacinäre Zellgruppen. Der Charakter derselben ist der gleiche myeloide wie in den oben beschriebenen Fällen, meist große Lymphoidzellen, Normoblasten, daneben Myelocyten und polymorphkernige Leukocyten. Starke Degeneration der Leberzellen, einhergehend mit Verfettung und Vakuolisierung, Hämosiderose. In den zellreichen Ausstrichen Normoblasten, Lymphoidzellen, Myelocyten usw.

Milz: Deutliche Verkleinerung der Follikel. Im Pulpagewebe, frei oder in Zellen eingeschlossen, viel Pigment, zerfallene rote Blutkörperchen, zahlreiche Gruppen von myeloiden Zellen. In den Ausstrichpräparaten neben den kleinen Lymphocyten zahlreiche basophile große mononukleäre Zellen, Myelocyten, Normoblasten; polymorphkernige Leukocyten.

Knochenmark: Ziemlich viel Knochenmarksriesenzellen, viele Normoblasten, Myelocyten. Gefäße blutreich, Pigment

Niere: Deutliche Epitheldegeneration.

Eine bakteriologische Untersuchung (Dr. Noack¹⁾) von Blut, Leber und Milz ergab Sterilität.

Es ist also auch mit gekochten wässerigen Larvenextrakten, unter Anwendung der nahezu gleichen Larvenzahl, zur analogen Entwicklung einer fortschreitenden Anämie (vgl. Kurve) und zu den gleichen Organveränderungen gekommen, wie mit den nicht erhitzten Extrakten. Die Erhöhung des Färbeindex ist in diesem Falle besonders deutlich (vgl. Kurve). Die anämisierende Substanz erfährt also durch $\frac{1}{4}$ stündiges Erhitzen auf 100° keine Abschwächung ihrer Wirksamkeit.

III. Injektionen von Östrin.

Es wurden darauf die einzelnen Fraktionen, wie sie bei der oben beschriebenen Östrindarstellung (vgl. S. 267) erhalten wurden, auf ihre anämisierende Wirkung am Kaninchen geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß alle diejenigen Fraktionen, die das Östrin enthalten, anämisierende Wirkung besitzen. Der Niederschlag, der beim Zusatz der gleichen Menge absoluten Alkohols zum 50%igen alkoholischen Larvenextrakt entsteht und das Östrin enthält, besitzt anämisierende Wirkung, löst in vitro hingegen keine Blutkörperchen auf. Das Filtrat, die etwa 80%ige alkoholische Lösung, enthält die oben genannten Lipoidsubstanzen, vor allem Seifen, entfaltet in vitro Hämolyse, besitzt aber, wie wir oben zeigen konnten (vgl. S. 290 u. f.), keine wesentliche anämisierende Wirkung.

1) Herrn Dr. Noack (mediz. Klinik), der zahlreiche bakteriologische Untersuchungen für diese Arbeit ausführte, sei auch an dieser Stelle hierfür bestens gedankt.

Löst man den obigen Alkoholniederschlag in wenig Wasser, fällt mit basischem Bleiazetat, verfährt zur Entfernung des Bleis, wie oben angegeben (vgl. S. 267), so erhält man abermals die anämisierende Substanz in dem Niederschlag. Aus der größeren Anzahl der Tierversuche sei nur der folgende als besonders typisch angeführt:

Kaninchen Nr. 49, silbergrau.

Zur Verwendung gelangte ein Bleiniederschlag, dargestellt aus der wässrigen Lösung eines Alkoholniederschlags (2 malige Bleifällung). Die toxische Wirksamkeit dieser Fraktion war am Kaninchen Nr. 48 erprobt: Es trat die typische Östrinwirkung mit darauffolgendem Exitus unter schweren Paresen und Dyspnoe auf.

Wiederholte intravenöse Injektionen auf Kaninchen Nr. 49.

Datum	Injektion	Hämo- globin	Erythro- cyten	Lenko- cyten	Ge- wicht
21. VI. 1916	intravenös 10 ccm	76 ‰	5 600 000	9 500	800 g
22. VI. 1916	—	74 »	5 280 000	7 900	—
23. VI. 1916	intravenös 15 ccm	—	—	—	—
24. VI. 1916	—	70 ‰	4 800 000	6 000	750 g
25. VI. 1916	—	64 »	3 800 000	4 800	—
26. VI. 1916	intravenös 15 ccm	79 »	4 160 000	4 700	720 g
27. VI. 1916	—	60 »	2 840 000	3 300	770 »
28. VI. 1916	—	65 »	3 560 000	7 900	800 »
30. VI. 1916	intravenös 5 ccm (neue Fällung)	63 »	3 600 000	12 500	—
1. VII. 1916	intravenös 8 ccm	56 »	2 640 000	6 100	—
2. VII. 1916	—	55 »	2 550 000	3 800	—
3. VII. 1916	—	50 »	1 950 000	3 000	750 g

Kurve 5. Kaninchen Nr. 49.

In direktem Anschluß an die einzelnen intravenösen Injektionen trat eine mehr oder minder heftige Allgemeinreaktion (Dyspnoe, Paresen) auf

Die Blutaussstriche zeigten vom 25. VI. 1916 ab wiederholt kernhaltige rote Blutkörperchen und eine gegen Ende stark zunehmende Anisocytose und Polychromasie, zum Teil basophile Punktierung der Erythrocyten.

Das Tier wurde nach einiger Zeit getötet.

Sektionsbefund.

1. Makroskopisch.

Organe hochgradig blaß, Leber bräunlichgelb. Der Gallenblaseninhalt von hellgelber Farbe. Konsistenz weich. Milz auffallend klein, Gewicht 170 mg. Keine Blutungen. Nieren, Herz und Lungen ohne sichtbare Veränderung. Knochenmark hellrot, weich.

2. Mikroskopisch.

Leber: Die ganze Leber erscheint durchsetzt von zahlreichen zelligen Elementen, die an einzelnen Stellen die Leberbalken auseinanderdrängen. Auch in diesem Falle lassen sich extravaskuläre, periportale Herde, aus Myelocyten und Leukocyten bestehend, einerseits und intrakapillär gelegene Zellhaufen andererseits, aus Lymphoidzellen und zahlreichen Normoblasten bestehend, unterscheiden. Letztere bieten wiederum das Bild starker Kernfragmentierung. Man sieht Randkerne, Kranzkerne, Maulbeerkerne und eingebuchtete Kerne. An einigen Stellen erscheint das Grundgewebe wie ausgepinselt. Die Endothelien scheinen an vielen Stellen in die zwischen- gelagerten Blutzellen überzugehen. Starke Hämosiderose. Deutliche Leberzellendegeneration. Es finden sich vereinzelte Herde, in denen die Leberzellen fast total verfettet sind, so daß diese Stellen im übrigen Gewebe wie helle Lücken hervortreten. In den Ausstrichpräparaten fällt ebenfalls der enorme Zellreichtum auf, meistens große Lymphoidzellen, ferner Normoblasten und granulierten Zellen (Myelocyten und Leukocyten).

Milz: In diesem Falle erscheinen die Follikel besonders hochgradig reduziert, einzelne sind nur als ganz kleine Reste zu erkennen. Die oben erwähnte Verkleinerung der Milz beruht also direkt auf einem Follikelschwund. Stark gewucherte, myeloide Elemente und Normoblasten enthaltende Pulpa. Viel Pigment. Die Endothelzellen sind zum Teil auffallend groß. In den Ausstrichpräparaten das gleiche Bild.

Knochenmark: Reich an Normoblasten und größeren Lymphocyten ähnlichen Zellen (Lymphoidzellen), daneben Myelocyten und Leukocyten.

Nieren: Starke epitheliale Degeneration.

Der Verlauf der Anämie bei diesem Kaninchen unterscheidet sich in nichts von dem bei den obigen Tieren, denen wässrige Larvenextrakte injiziert wurden (vgl. Kurve). Auch hier erhöht sich der Färbeindex über die Norm. Normoblasten treten im Blut auf, gegen Ende seltener werdend. Eine deutliche Anisocytose, Polychromasie und Poikilocytose kommt zur Entwicklung und wird gegen Ende besonders hochgradig. Auch in diesem Falle findet sich eine ausgesprochene Leukopenie. Die pathologisch-anatomischen Veränderungen entsprechen in vollem Umfange den in den obigen Fällen

erhaltenen histologischen Bildern. Hochgradige extramedulläre Blutbildung in Leber und Milz. Starke Hämosiderose in der Leber und Milz. Parenchymdegeneration und Verfettung. Bemerkenswert ist in diesem Falle das Fehlen einer stärkeren Gewichtsabnahme, wie sie in den obigen Fällen bei Verwendung von wässerigen Gesamtextrakten erhalten wurde. Offenbar kommt dort die Wirkung anderer, wahrscheinlich Eiweißnatur besitzender Substanzen mit zur Wirkung, die bei der Verwendung von gereinigtem Material ausbleibt.

Im Verlauf weiterer analoger Versuche stellte sich heraus, daß die anämisierende Substanz in allen Fraktionen nachweisbar war, in denen sich nach der obigen Darstellung das Östrin fand. Unter anderem erwies sich auch der Quecksilberniederschlag anämisierend. Ferner gingen durchweg allgemeine Gift-, d. h. Östrinwirkung, und Beeinflussung des Blutbildes Hand in Hand. Im Anschluß an die schwerere neurotoxische Wirkung trat auch die stärkere Blutkörperchensenkung ein. Diese durchgehende Analogie im physikalisch-chemischen Verhalten sowie in den toxischen Wirkungen, die Unmöglichkeit, neurotoxische und anämisierende Komponente auf Grund irgendeiner Verschiedenheit im physikalischen oder chemischen Verhalten zu trennen, zwang zu der Annahme, daß das Östrin, das eigentliche tierische Gift der Larven, nicht nur, wie insbesondere bei der akuten Vergiftung, eine toxische Wirkung auf das Zentralnervensystem, speziell auf das Atemzentrum ausübt, sondern weiterhin bei wiederholter Einverleibung zur Entwicklung einer schweren Anämie führt. Und dies, obwohl das Östrin im Glase auf Blutkörperchen nicht hämolysierend einwirkt. Der hämatologische und pathologisch-anatomische Befund ist dabei der gleiche, wie er bei der in natura vorkommenden perniziösen Anämie der Pferde gefunden wird, und wie er von uns durch Injektion wässriger Larvenextrakt beim Pferd erzielt worden ist; alle spezifischen Merkmale, insbesondere erhöhter Färbeindex, Anisocytose, Leukopenie, ausge dehnte extramedulläre Blutbildungsherde in der Leber und der Milz lassen sich nachweisen. Ganz im Gegensatz hierzu führt die wiederholte Injektion der in vitro hämolytisch wirkenden Lipoidbestandteile der Larven nur zu einer relativ geringgradigen Anämie, die mit Erniedrigung des Färbeindex und Leukocytose, ohne Anisocytose, Polychromasie usw. einhergeht und nicht myeloide Umwandlung in den Organen bewirkt.

Um mit der Lipoidfraktion der Larven einen geringen Grad einer solchen sekundären Anämie zu erzielen, bedarf es einer Menge, die bis zu 100 Larven und mehr entspricht, wie z. B. beim Kaninchen

Nr. 11 (vgl. S. 291). Eine einmalige Injektion der Lipoidfraktion von 10 Larven (vgl. Kaninchen Nr. 1, S. 292) ruft eine in den folgenden Stunden deutlich werdende Senkung der Hämoglobin- und Erythrocytenwerte hervor, die aber nach 24 Stunden wieder abgeklungen ist. Demgegenüber genügten vom wässerigen Gesamtlarvenextrakt in den obigen Versuchen im ganzen 14—19 Larven, um zu der beschriebenen progredienten, primären Anämie zu führen.

Die Analogie zur Bothriocephalusanämie, bei welcher Lipotide, speziell Ölsäure, das anämisierende Moment darstellen sollen, führte zu Beginn dieser Arbeit zu der Fragestellung, ob auch im Falle der Gastrophiluslarvenanämie Lipotide die Ursache sind (vgl. oben S. 290).

Die obigen Versuche haben gezeigt, daß die Lipoidsubstanzen der Larven für die Entstehung der Anämie nicht in Frage kommen, daß vielmehr die Anämie durch das in vitro Blutkörperchen nicht auflösende, spezifische tierische Gift der Larven, das Östrin hervorgerufen wird. Durch die oben erwähnte chemische Bearbeitung der Larvenextrakte lassen sich Östrin und hämolytisch wirkende Lipoidsubstanzen trennen. Aus der folgenden Zusammenstellung geht die Divergenz der beiden Gruppen in bezug auf Hämolyse in vitro und Anämie deutlich hervor. Die einzelnen Fraktionen sind dabei in der Reihenfolge der oben erwähnten Darstellungsweise des Östrins angeführt. Neurotoxische, fieber- und anämisierend wirkende Eigenschaft gehen Hand in Hand. Die in vitro hämolytisch wirkende Fraktion trennt sich in der Konzentration von 80%igem Alkohol vom Östrin und bewirkt keine, bzw. keine wesentliche Anämie:

Fraktion	Östrinwirkung			Lipotide Hämolyse in vitro
	Neuro- toxische Wirkung	Fieber- wirkung	Hämolyse in vivo (Anämie)	
In Wasser löslicher Larventeil	+	+	+	— (da durch andere Larven- bestandteile gehemmt)
In 50%igem Alkohol löslich	+	+	+	+
In 80%igem Alkohol löslich	—	—	—	+
In 80%igem Alkohol gefällt	+	+	+	—
Durch Bleilösung ge- fällt	+	+	+	—
Durch Quecksilberlö- sung gefällt	+	+	+	—

Anhang.

Die osmotische Resistenz der Erythrocyten.

Durch die interessanten Versuche von Morawitz und Pratt¹⁾, Itami und Pratt²⁾, die durch die Arbeiten von Hanna Hirschfeld³⁾ und Rosenthal⁴⁾ bestätigt wurden, ist bekannt, daß sich bei experimenteller Blutgiftanämie (Phenylhydrazin) eine enorme Resistenzerrhöhung der roten Blutkörperchen gegenüber hypotonischen Kochsalzlösungen findet, eine Steigerung, die von manchen Autoren als der Ausdruck einer enormen Stromavermehrung angesehen wird. Die Resistenz der Blutkörperchen bei der perniziösen Anämie des Menschen ist in den meisten Fällen gegenüber der Norm ebenfalls erhöht. Nicht publizierte, frühere Versuche haben ergeben, daß die Resistenz der Blutkörperchen bei der in natura vorkommenden perniziösen Anämie der Pferde gegenüber hypotonischen Kochsalzlösungen, wenn auch nicht beträchtlich, so doch deutlich erhöht ist. Es mußte daher von Interesse sein, wie sich in dieser Beziehung die Blutkörperchen bei der experimentellen, durch Östrin hervorgerufenen Anämie verhalten.

Die daraufhin angestellten Versuche ergaben, daß auch in diesem Falle eine Erhöhung der osmotischen Resistenz zustande kommt. Während normalerweise die Resistenz der Kaninchenerythrocyten minimal bei 0,50, maximal bei 0,32%iger Kochsalzlösung liegt, erhöhte sich dieselbe bei der experimentellen Östrinanämie auf minimal 0,40, maximal auf 0,28%ige Kochsalzlösung. Es wurden im ganzen bei vier Kaninchen mit Östrinanämie derartige Bestimmungen ausgeführt, alle mit dem im wesentlichen gleichen Resultat. Vergleichende Untersuchungen über Strommenge wurden nicht angestellt. Vor jedem Versuche wurde die Resistenz der Erythrocyten des betreffenden Kaninchens geprüft und in den obigen normalen Grenzen liegend gefunden.

F. Die Frage der Übertragbarkeit der Krankheit.

Während die Frage der Entstehung der perniziösen Anämie der Pferde bezüglich der Eigenschaften der Substanz, die sie hervorruft, im vorstehenden Teile ihre befriedigende Lösung gefunden hat, bleibt jetzt nach wie vor unerklärt, warum die perniziöse Anämie der Pferde auf andere Pferde mittels Blut übertrag-

1) Morawitz und Pratt, Münchener med. Wochenschr. 1908, S. 1817.

2) Itami und Pratt, Biochem. Zeitschr. Bd. 18, S. 302, 1909.

3) Hanna Hirschfeld, Fol. haem. Arch. IX, S. 554.

4) Rosenthal, Ebenda Arch. X, S. 253. S. im übrigen Literatur bei Nägeli, Blutkrankheiten und Blutdiagnose S. 77, 1912.

bar ist. In den früheren, in Gemeinschaft mit meinem Vater ausgeführten Untersuchungen¹⁾ konnte der experimentelle Nachweis erbracht werden, daß die mit wässerigen *Gastrophilus*larvenextrakten erzeugte schwere Pferdeanämie durch Blut in der gleichen Weise auf gesunde Pferde übertragen werden konnte, die letzteren tödlich erkrankten, und ihr Blut wiederum beim gesunden Pferde eine Erkrankung hervorrief, andere Tiere hingegen, Kaninchen, Meer-schweinchen usw. nicht erkrankten; demnach das gleiche Verhalten, wie bei der in natura beobachteten perniziösen Anämie der Pferde. Und zwar gelang dies auch bei Verwendung von Larven, die von gesunden Pferden stammten! Bezüglich der Einzelheiten sei auf die früheren Arbeiten verwiesen. Hier sei nur nochmals hervorgehoben, daß aus den Untersuchungen von Carré und Vallée, die von v. Ostertag u. a., desgleichen von uns selbst bestätigt wurden, hervorgeht, daß auch das durch Chamberland- und Berkefeldfilter filtrierte Serum die Krankheit überträgt oder, genauer ausgedrückt, einen Krankheitszustand erzeugt, der in vielen Beziehungen dem des Ausgangstieres gleicht. Auf letzteren Punkt wird später näher einzugehen sein.

Die genannten Forscher kamen auf Grund dieses Befundes zum Schlusse, daß ein ultravisibler Mikroorganismus, ein ultravisibles Virus, die Krankheit hervorruft. Durch 1stündige Erhitzung auf 58° verliert das Serum die Fähigkeit, zu übertragen. Eintrocknetes Serum ist noch nach 7 Monaten wirksam, das Serum soll auch Fäulnis gegenüber eine starke Widerstandskraft besitzen.

Von diesen bekannten Tatsachen ausgehend, suchten wir selbst zu Beginn unserer Versuche (1912) auf Grund vielfacher Beobachtungen, die die Vermutung eines fliegenden Insektes als Zwischenwirt nahelegten, nach einem solchen, und auf Grund der Tatsache, daß in jedem einzelnen Falle von etwa 100 uns zugegangenen Sektionsbefunden *Gastrophilus*larven im Magen vorhanden waren, injizierten wir Extrakte der letzteren von dem Gesichtspunkt aus auf Pferde, daß die Larven vielleicht den oben genannten ultravisiblen Erreger enthielten. Dabei zeigte es sich, daß eine einzelne oder einige wenige Injektionen von Larven aus solchen erkrankten Pferden keine perniziöse Anämie beim Versuchspferde hervorrufen, daß sich jedoch durch zahlreiche, oft wiederholte Injektionen von *Gastrophilus*larvenextrakten, auch von gesunden Pferden stammend, genau jenes Krankheitsbild erzeugen läßt, wobei sich im klinischen sowie pathologisch-anatomischen Verhalten, einschließlich Übertragbarkeit, voll-

1) Vgl. Literaturangabe S. 254.

kommene Übereinstimmung findet. Die Tatsache, daß einmalige Injektion eines Larvenextraktes — von Larvenmaterial aus krankem Pferde — die Krankheit nicht auslöste, daß vielmehr zahlreiche, jeweilig mit allgemeiner Giftwirkung einhergehende Injektionen nötig waren, sprach gegen die Annahme eines in den Larven enthaltenen Mikroorganismus und sprach für die Wirkung eines chemischen Giftes. Der Beweis hierfür konnte in dieser Arbeit erbracht werden, und zwar zeigte sich, daß nicht Lipoidstoffe, wie man erwarten sollte, sondern ein an und für sich nicht hämolytisch wirkender Bestandteil der *Gastrophilus*larven, das Östrin, die Anämie hervorruft.

Um so unerklärlicher ist es zunächst, daß diese anscheinend durch ein chemisches Gift, das Östrin, hervorgerufene Anämie durch Blut auf gesunde Pferde übertragbar ist. Auszuschließen ist dabei von vornherein, daß es sich hierbei um eine Übertragung eines Giftes im gewöhnlichen Sinn, etwa des Östrins, handeln könnte. Denn erstens erfährt das injizierte Östrin im Pferdekörper eine derartige Verdünnung, daß es z. B. in 10 ccm Serum nicht mehr toxisch wirksam wäre. Zweitens verhalten sich Östrin und der »übertragende Teil« des Serums physikalisch-chemisch grundverschieden voneinander. Das Östrin ist thermostabil, in 50%igem Alkohol löslich, das übertragende Agens in Serum wird durch 1stündiges Erhitzen auf 58° zerstört und ist, wie später gezeigt wird, in 50%igem Alkohol nicht löslich.

Wir stehen demnach vor der schwer verständlichen Tatsache, daß ein chemisches, thermostabiles Gift eine Krankheit hervorruft, die ihrerseits durch ein thermolabiles »x« im Serum dieses Tieres auf gesunde Tiere der gleichen Art übertragbar ist.

I. Übertragungsversuche mit Kaninchen.

Wie die oben auf Veranlassung von Herrn Prof. Hofmeister unternommenen Versuche am Kaninchen ergaben, läßt sich auch beim Kaninchen die oben beschriebene schwere Anämie erzielen. Es war daher zu entscheiden, ob die beim Kaninchen experimentell durch Larvenextrakte erzeugte Anämie ebenfalls auf gesunde Kaninchen übertragbar ist. In diesem Sinne wurden die folgenden Versuche angestellt. Leider mußte die Zahl dieser Versuche aus äußeren Gründen beschränkt bleiben und bedarf in Friedenszeiten einer Fortführung. In einem Teil der Versuche wurde Blut, in einem anderen Teil wurden Leber- bzw. Milzstückchen von etwa 0,2 g Gewicht übertragen. Letztere wurden unter sterilen Kautelen in eine Hauttasche am Rücken der Tiere verpflanzt. Die bakteriologischen

Kontrolluntersuchungen wurden wiederum in lebenswürdiger Weise von Herrn Dr. Noack ausgeführt.

Der erste Versuch dieser Art wurde mit dem Blute und den Organen des S. 294 beschriebenen, durch Larvenextrakte anämisch gemachten Kaninchen Nr. 13 vorgenommen:

Kaninchen Nr. 14, schwarz, 1350 g Gewicht.

Das Tier erhält am 9. III. 1916 subkutan 5 ccm steril aus der Karotis des Kaninchens Nr. 13 entnommenes, defibriniertes Blut. Der Einfluß der Injektion geht aus der folgenden Tabelle hervor:

Datum	Injiziert	Hämo- globin	Erythro- cyten	Lenko- cyten	Gewicht
7. III. 1916	—	72 %	6 110 000	9 500	1350 g
9. III. 1916	subkutan 5 ccm Blut von Kaninchen Nr. 13	73 »	6 020 000	7 400	1380 »
11. III. 1916	—	61 »	5 060 000	8 800	—
12. III. 1916	—	63 »	4 860 000	15 400	1330 g
13. III. 1916	—	60 »	4 900 000	11 200	1400 »
14. III. 1916	—	67 »	5 100 000	8 800	1320 »
15. III. 1916	—	63 »	4 800 000	10 200	—
20. III. 1916	—	70 »	3 900 000	8 000	1370 g
23. III. 1916	—	75 »	4 760 000	6 600	—
24. III. 1916	—	60 »	3 550 000	5 000	—
25. III. 1916	kurz vor dem Exitus	35 »	2 500 000	4 500	1210 g

Abends Exitus.

3 Tage nach der Injektion des Blutes zeigte das Tier allgemeine Mattigkeit, war leicht dyspnoisch; im ganzen etwas benommen. Im Urin war die Urobilinogenreaktion stark positiv. In den folgenden Tagen nahm die Mattigkeit zu, das Tier blieb, auf den Rücken gelegt, liegen. Gegen Ende zunehmende allgemeine Schwäche, Konjunktiven hochgradig blaß. Urobilinogenmenge im Urin wechselnd, zeitweise deutlich erhöht.

Im Blutbild anfangs vereinzelte Normoblasten, eine gegen Ende besonders deutlich werdende Anisocytose und Polychromasie.

Die Sektion bot makroskopisch allgemeine Blässe der inneren Schleimhäute, Leber von hellbrauner Farbe, auf dem Durchschnitt blutreich, Konsistenz erweicht. Milz stark geschwollen, dunkel gefärbt, Milzmasse weich. Nieren, Herz und Lungen makroskopisch ohne Besonderheiten. Keine Blutungen.

Mikroskopisch bot die Leber ein überraschendes Bild: enorme Zelleinlagerungen vom gleichen Umfang und vom gleichen Charakter wie bei Kaninchen Nr. 13, starke intraacinaire Wucherung, Myelo- und Erythropoese, starke adventitielle Zellwucherungen. Hochgradige Leberzellendegeneration, Verfettung. Starke Pigmentablagerung. In den Ausstrichpräparaten viele kernhaltige rote Blutkörperchen, Lymphoidzellen, daneben Myelocyten und Leukocyten.

Die Milz bot ein besonders auffälliges Bild: hochgradiger Schwund allen follikulären Gewebes, an einzelnen Stellen sind nur ganz spärliche Reste erkennbar. Die rote Pulpa ist völlig verändert: sie erscheint bei schwacher Vergrößerung wie fast homogen und strukturlos. Es handelt sich, wie man bei stärkerer Vergrößerung erkennt, um eine ungeheure Ansammlung von roten Blutkörperchen, an einzelnen Stellen basophile größere Zellen vom Typus der Lymphoidzellen. Das ganze Bild gleicht im wesentlichen einem Infarkt. Doch die ganze Milz ist gleichmäßig verändert. Pathologisch-anatomisch lag kein Grund zur Annahme eines Infarktes vor.

Knochenmark. In lebhafter Zellregeneration. Wenig Riesenzellen. Viel Pigment.

Nieren. Deutliche epitheliale Degeneration.

Bakteriologischer Organbefund (Leber und Milz). Steril.

Die Übertragung von 5 ccm defibrinierten Blutes von Kaninchen Nr. 13 hat demnach eine schwere, zum Tode führende Anämie zur Folge gehabt, einhergehend mit hochgradiger myeloider Metaplasie in der Leber, einem enormen Blutzerfall in der Milz (unter äußerst starkem Follikelschwund ohne myeloide Metaplasie). Außerdem starke Parenchymschädigung, vor allem in der Leber, weniger ausgesprochen in den Nieren.

Eine weitere Übertragung von diesem Tiere aus wurde nicht vorgenommen.

In der gleichen Weise wurden je ein kleines Leber- und Milzstück des Kaninchen Nr. 13 auf ein gesundes Kaninchen übertragen:

Kaninchen Nr. 15, schwarz, 1680 g Gewicht

erhält in eine Hauttasche steril eingepflanzt je 0,2 g Leber und Milz von Kaninchen Nr. 13. Der Einfluß der Übertragung erhellt aus der folgenden Tabelle:

Datum	Übertragung	Hämo- globin	Erythro- cyten	Leuko- cyten	Gewicht
7. III. 1916	—	81 %	5 150 000	11 500	1680 g
9. III. 1916	subkutan Leber- und Milzstückchen	80 »	5 200 000	12 000	—
11. III. 1916	—	79 »	5 440 000	6 600	—
12. III. 1916	—	54 »	3 200 000	5 400	1500 g
13. III. 1916	—	60 »	3 900 000	8 800	1550 »
14. III. 1916	—	66 »	4 720 000	10 800	1500 »
16. III. 1916	—	55 »	4 040 000	7 600	1520 »
17. III. 1916	—	57 »	4 260 000	9 800	—
20. III. 1916	—	54 »	3 220 000	9 400	1490 g
21. III. 1916	—	48 »	2 480 000	6 000	1420 »
23. III. 1916	—	41 »	2 920 000	6 400	1400 »

Wegen drohenden Exitus entblutet.

Auch dieses Tier zeigte vom 3. Tage ab allgemeine Mattigkeit und Benommenheit. Im Urin deutlicher werdende Urobilinogenreaktion. Gegen Ende zunehmende Mattigkeit, Konjunktiven von wachsartiger Blässe.

In den Blutaussstrichen am 12. III. bis 14. III. vereinzelte Normoblasten, vom 17. III. ab deutlich werdende Anisocytose und Polychromasie, nicht so ausgesprochen wie im vorigen Fall.

Die Sektion ergab makroskopisch allgemeine Blässe der inneren Schleimhäute, Leber von gelblich brauner Farbe, Konsistenz erweicht. Milz deutlich vergrößert, weich, Struktur undeutlich. Nieren, Lungen und Herz blaß.

Mikroskopisch in der Leber ausgedehnte Verfettungen. In den Abstrichen zahlreiche kernhaltige rote Blutkörperchen und Myelocyten. Wie die Schnitte zeigen, sind diese Elemente meist herdförmig in erweiterten Kapillaren gelegen. Zahlreiche Kernteilungsfiguren dieser Zellen. Die Adventitiazellen sind deutlich gewuchert. Hämosiderose.

Die Milz bietet das Bild einer deutlichen myeloiden Umwandlung. Im Schnitt findet man, entsprechend dem Befunde zahlreicher Myelocyten und kernhaltiger Erythrocyten im Abstrich, viele Blutbildungsherde in der Pulpa.

Knochenmark. Lebhaftige Zellregeneration.

Bakteriologischer Befund. Milz steril, Leber: vereinzelte, gramnegative Stäbchen, die sich als Colibazillen erweisen (Verunreinigung?).

Das Resultat dieses Übertragungsversuches ist demnach im wesentlichen das gleiche wie in dem vorigen Versuche, in welchem Blut zur Übertragung gelangte. Auch hier entwickelte sich, einsetzend etwa 48 Stunden nach der Übertragung, eine progrediente, mit fortschreitendem allgemeinen Kräftezerfall einhergehende Anämie, die in der Zeit von 14 Tagen zum Tode des Tieres führte. Auch in diesem Falle ist es in der Leber und der Milz zu ausgedehnter myeloider Metaplasie vor allem in der Leber, weniger ausgesprochen in der Milz gekommen, eine Metaplasie, die in ihrem Umfang nahezu diejenige der Organe des Ausgangskaninchens (Kaninchen Nr. 13) erreicht. Auch in diesem Falle wurde eine weitere Übertragung auf andere gesunde Kaninchen nicht vorgenommen.

Ein weiterer Übertragungsversuch, diesmal ausgehend von einem Kaninchen (Kaninchen Nr. 50), das durch Injektion wässriger Larvenextrakte, die durch $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ stündiges Erhitzen in kochendem Wasser behandelt waren, anämisch gemacht war, wurde in der Weise angestellt, daß je ein kleines Milz- und Leberstückchen getrennt auf verschiedene normale Kaninchen übertragen wurden.

Dieser Versuch sei im folgenden auszugsweise angeführt:

Kaninchen Nr. 50, braun, Gewicht 1050 g.

Blutstatus vor dem Versuch:

25. VI. 1916. Hämoglobin: 75 %, Erythrocyten: 4 960 000, Leukocyten: 14 900.

Das Tier erhält in der Zeit vom 25. VI. bis 4. VII. den wässerigen Extrakt von 17 G. equi; die wässerigen Extrakte wurden etwa 20 Minuten in kochendem Wasser gehalten, darauf durch Schütteln zu möglichst gleichförmiger Suspension gebracht und subkutan injiziert.

Blutstatus am 5. VII.:

Hämoglobin: 48 %, Erythrocyten: 2 500 000, Leukocyten: 4300, Gewicht 980 g.

Das Tier starb in der Nacht vom 5. VII. auf den 6. VII. Die steril entnommenen Leber- und Milzstücke erwiesen sich bakteriologisch steril.

Die Sektion ergab im übrigen, auch mikroskopisch, das oben wiederholt beschriebene Bild (vgl. Kaninchen Nr. 13, 16, 41), starke myeloide Metaplasie in der Leber (zahlreiche Mitosen) und myeloide Herde in der Milz, lymphoides Mark.

0,2 g Leber- und 0,15 g Milzstückchen wurden getrennt auf Kaninchen Nr. 53 und 54 übertragen. Bei letzteren beiden Tieren war der Einfluß auf das Blutbild der folgende:

Kaninchen Nr. 53, schwarz, 750 g Gewicht.

Das Tier erhält am 6. VII. 1916 subkutan 0,15 g Milz von Kaninchen Nr. 50.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten	Gewicht
5. VII. 1916	78 %	6 200 000	6100	750 g
7. VII. 1916	77 »	6 150 000	7100	760 »
Übertragung.				
8. VII. 1916	62 »	4 450 000	3400	760 »
9. VII. 1916	65 »	4 960 000	5900	720 »
10. VII. 1916	70 »	4 400 000	5800	670 »
12. VII. 1916	69 »	4 700 000	5200	720 »
17. VII. 1916	69 »	5 160 000	6000	720 »
10. VIII. 1916	75 »	4 800 000	8000	700 »

Getötet.

Die mikroskopische Untersuchung der Leber ergab keine myeloide Metaplasie, Kapillaren sehr blutreich. In der Milz die Follikel stark reduziert, die Pulpa sehr zellreich, vereinzelte kleine myeloide Herde. Knochenmark auffallend zellarm.

Kaninchen Nr. 54, schwarz, 850 g Gewicht.

Das Tier erhält am 6. VII. 1916 subkutan 0,2 g Leber vom Kaninchen Nr. 50.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten	Gewicht
5. VII. 1916	74 ‰	5 460 000	6400	850 g
6. VII. 1916	73 »	5 350 000	7200	860 »
Übertragung.				
8. VII. 1916	71 »	4 440 000	6600	820 »
9. VII. 1916	60 »	4 010 000	4700	820 »
10. VII. 1916	72 »	3 800 000	4900	750 »
12. VII. 1916	65 »	3 560 000	7800	820 »
13. VII. 1916	68 »	4 600 000	6400	800 »
14. VII. 1916	64 »	3 640 000	4400	810 »
17. VII. 1916	65 »	4 580 000	6700	830 »
18. VII. 1916	69 »	4 680 000	3800	—
⋮				
10. VIII. 1916	68 »	4 760 000	8300	800 g
Getötet.				

Die mikroskopische Untersuchung der Leber ergab geringgradige, aber deutliche myeloide Zellinfiltration, hauptsächlich intraacinar, Leberzellendegeneration. Verfettung. In der Milz die Follikel klein, locker gefügt, Pulpa reich an myeloiden Elementen in nesterförmiger Anordnung. Knochenmark relativ zellarm.

Auch in diesem Falle, in dem das Ausgangstier mit gekochtem Larvenmaterial anämisch gemacht war, zeigt sich bei der Übertragung von Leber- bzw. Milzstückchen auf gesunde Tiere ein deutlicher Einfluß auf das Blutbild und zum Teil auf die sekundär blutbildenden Organe. Der Einfluß war am deutlichsten bei dem Tiere, das Leber erhielt, weniger ausgesprochen und schneller zur Norm zurückkehrend bei dem Tiere, auf das Milz übertragen wurde. Bemerkenswert ist, daß in beiden Fällen eine, wenn auch vorübergehende Leukopenie auftrat, der Färbeindex, vor allem bei Kaninchen Nr. 54, über den Ausgangswert anstieg. Zu einer tödlichen Erkrankung wie in den obigen Übertragungsversuchen kam es bei den beiden Tieren nicht. Besonders hervorgehoben sei, daß zwei Kontrollversuche mit Übertragung von entsprechend großen Leber- bzw. Milzstückchen von normalen Kaninchen keine derartige Beeinflussung des Blutbildes zur Folge hatten.

Die angeführten Übertragungsversuche zeigen, daß auch die durch Larvenextrakte beim Kaninchen erzeugte Anämie durch Blut bzw. Leber- oder Milzstückchen auf gesunde Kaninchen übertragbar ist und hier zu einer tödlich verlaufenden Anämie führen kann, weiter, daß auch die Anämie, die mit gekochtem Material erzeugt ist, übertragen werden kann. Ersteres ist eine Bestätigung unserer früheren mit Pferden vorgenommenen Übertragungsversuche. Während

die Pferdeanämie, die durch Übertragung von Blut larvenanämischer Pferde erzeugt war, ein weiteres Mal mit Erfolg übertragen wurde, konnten derartige fortgesetzte Übertragungen aus äußeren Gründen am Kaninchen zunächst nicht ausgeführt werden. Die Tatsache, daß gekochtes Larvenmaterial eine übertragbare Anämie hervorruft, dient als weiterer Beweis dafür, daß die Substanz, die die Anämie des Ausgangstieres erzeugt und jenes »x« im Serum dieses Tieres, das die Übertragung bewirkt, zwei verschiedene Dinge sind. Das erstere ist das thermostabile Östrin, hingegen ist das »x«, wie mit Sicherheit feststeht, thermolabil, durch 1 stündiges Erhitzen auf 58° zerstörbar.

Die Frage nach dem Wesen dieser Übertragbarkeit bleibt zunächst nach wie vor ungeklärt. Vom neuem erhärtet wird durch die obigen Versuche nur die Tatsache, daß die durch das Östrin erzeugte Anämie übertragbar ist und daß das übertragende »x« vom Östrin grundverschieden ist. Die in der Literatur vertretene Anschauung, daß ein thermolabiler, ultravisibler Mikroorganismus die Krankheit erzeugt, dürfte hiermit durch die gesamten obigen Versuche in Frage gestellt sein. Es bleibt jetzt zu erörtern, ob die durch das Östrin erzeugte Krankheit durch einen ultravisiblen Mikroorganismus übertragen wird.

II. Versuche zur Analysierung des übertragenden Agens.

Schon oben wurde die Möglichkeit, daß es sich bei der Serumübertragung um eine Östrinübertragung handeln könnte, von der Hand gewiesen; denn die betreffende Östrinmenge, die hierbei einmalig injiziert würde, ist hierfür zu gering, und die Möglichkeit einer oftmalig fortgesetzten Übertragung der Krankheit von Pferd zu Pferd spricht dagegen. Serienweise Übertragungsversuche wurden mit Erfolg von Carré-Vallée, v. Ostertag und van Es und seinen Mitarbeitern ausgeführt, auch die mit Larvenextrakten erzeugte Anämie konnte von uns 3mal von Pferd zu Pferd übertragen werden. Vor allem aber spricht gegen die Annahme einer Östrinwirkung bei der Übertragung das verschiedene Verhalten von Östrin einerseits und übertragendem Agens andererseits gegenüber Hitzeeinwirkung.

Gegen die Annahme eines ultravisiblen Mikroorganismus bei der Übertragung der Krankheit spricht unter Würdigung der obigen Versuchsergebnisse die Unmöglichkeit einer Erklärung für die Frage, wie im Verlaufe einer durch ein chemisches Gift entstandenen Anämie im kranken Organismus ein ultravisibler Mikroorganismus auftritt und zur Wirksamkeit gelangt, und daß dieser dann die durch genannte

Gifte erzeugte Krankheit weiter überträgt. Zum mindestens erscheint es von diesem Gesichtspunkt aus fraglich, ob die Übertragbarkeit in diesem Falle in Analogie zu den, andere Krankheiten erzeugenden und übertragenden ultravisiblen Virusarten gesetzt werden darf. Die aus den obigen Versuchen abgeleitete Tatsache, daß das »ultravisible Virus« der perniziösen Anämie der Pferde nicht bei der Entstehung, sondern nur bei der experimentellen Übertragung eine Rolle spielt, ganz abgesehen zunächst von der Frage, welcher Natur dies ultravisible Virus ist, tritt besonders deutlich in den folgenden, im Übertragungsexperiment beobachteten Erscheinungen zutage. Es seien als Beispiel hierfür die interessanten, mit zahlreichen Pferden in Amerika vorgenommenen Übertragungsversuche von L. van Es, E. D. Harris und A. F. Schalk¹⁾ in Fargo, North Dakota, U. S. A. angeführt, deren gütige Übermittlung ich Herrn Dr. L. van Es verdanke. Die perniziöse Anämie der Pferde, die drüben als »Swamp Fever in Horses« (Sumpffieber der Pferde) bezeichnet wird, ist nach den heutigen Kenntnissen mit unserer perniziösen Anämie der Pferde identisch zu erachten. Die genannten Forscher führten im ganzen 47, meist serienweise, fortlaufende Übertragungsversuche aus. Von diesen 47 Pferden starben, bzw. wurden im moribunden Zustande getötet: 24 (unter diesen ist bei 5 Pferden die Todesursache zweifelhaft), nur leicht erkrankten: 19, der Infektion völlig widerstanden: 4 Pferde. Die ihrer Arbeit beigelegten Illustrationen lassen erkennen, daß die meisten »Versager« nach der zweiten oder dritten Übertragung auftraten. Dieses Verhalten ist, im obigen Zusammenhange betrachtet, auffallend! Besonders wertvoll erscheinen aber die folgenden Feststellungen der genannten Autoren²⁾ (S. 321):

»Wenn wir sorgfältig die klinischen Symptome analysieren, so fällt das regelmäßige Vorkommen der Anämie bei den »Feld«-Fällen³⁾ und das fast regelmäßige Fehlen derselben bei den durch Übertragung erzeugten Fällen auf.« »In keinem einzigen Übertragungsversuche wiederholten sich die Symptome des Ausgangs-Feld-Falles.«

»Wenn wir dies nicht tatsächlich in allen unseren Übertragungsversuchen, die von 6 Feld-Fällen ganz verschiedenen Ursprungs ausgingen, regelmäßig gefunden hätten, würden wir sicher nicht geglaubt

1) L. van Es, E. D. Harris and A. F. Schalk, Swamp Fever in Horses, North Dakota Agricultural Experiment Station (Department of Veterinary Science), Bulletin 94, September 1911.

2) In möglichst wörtlicher Übersetzung wiedergegeben.

3) Mit »field cases« bezeichnen die Autoren die in natura entstandenen Fälle im Gegensatz zu den experimentellen Erkrankungen.

haben, daß die ursprüngliche Erkrankung (the original infection) übertragen wurde¹⁾, sondern daß irgendein anderes Virus zufällig in unsere Versuche hineingekommen wäre (that some other virus had accidentally interfered with our work). Die dauernde Wiederholung unserer Beobachtungen sowie die Autopsiebefunde schließen jedoch eine solche Schlußfolgerung aus. Es erhebt sich die Vermutung, daß in unseren experimentell erkrankten Fällen gewisse kausale Momente nicht mit zur Geltung kommen (that certain contributory causes are not in operation).«

An einer anderen Stelle (S. 319) wird ebenfalls wieder hervor-gehoben:

»Nur in ganz wenigen Fällen kam es bei künstlicher, durch Übertragung erzeugter Erkrankung zu einer merklichen Anämie, und eine große Anzahl der Fälle kam mit normaler, ja zum Teil sogar mit über die Norm erhöhte Erythrocytenzahl zum Exitus.« Ähnliches wurde nach Angabe der genannten Autoren auch von Todd und Wolbach²⁾ wiederholt bei ihren Übertragungsversuchen festgestellt. »In einem der letzteren Fälle stieg die Erythrocytenzahl nach der Impfung mit Blut im Laufe von 3 Monaten von $6\frac{1}{2}$ auf $8\frac{1}{2}$ Millionen«, und die Verfasser fügen hinzu, »wenn nicht die zeitweisen Temperaturanstiege im Anschluß an die Impfung aufgetreten wären, wäre die Frage erlaubt gewesen, ob überhaupt eine Übertragung des Sumpffiebers stattgefunden hat.«

Aus diesen interessanten, umfassenden Beobachtungen der amerikanischen Forscher geht hervor, daß die Übertragbarkeit bei der in Frage stehenden Erkrankung in ihrem »Mechanismus« etwas Besonderes, von der Norm abweichendes darstellt, was im Rahmen des oben Gesagten von Bedeutung erscheint.

Ähnliche Beobachtungen bei der experimentellen Übertragung der Krankheit durch Serum wurden auch in Deutschland, z. B. von J. Hempel³⁾ gemacht. Während die Mehrzahl der mit Serum kranker Tiere gespritzten Pferde an Anämie erkrankten, trat bei einigen eine Zunahme von Hämoglobin und Erythrocyten auf, wie z. B. im folgenden Falle:

Pferd Nr. 3.

Datum	Hämoglobin	Erythrocyten	Leukocyten
29. I. 1907	98 %	8 875 000	9278
30. I. 1907	100 ccm von krankem Pferd (Nr. 9)		
18. II. 1907	101 %	9 401 600	10 423
22. II. 1907	140 »	15 520 000	—

Dabei traten gleichzeitig klinisch alle Symptome (Fieber usw.) auf, wie sie bei der perniziösen Anämie der Pferde wahrgenommen werden.

1) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

2) Todd und Wolbach, The swamp fever of horses. The Journal of medical Research. Vol. 24, S. 213. Boston 1911.

3) J. Hempel, Beiträge zur Kenntnis der ansteckenden Anämie der Pferde. Zeitschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere Bd. V, S. 381, 1908.

Es lag nahe, die Eigenschaften des übertragenden »x« im Serum näher zu untersuchen, und zwar, da bakteriologisch nichts festzustellen war, auf chemisch-physikalischem Wege neue Eigenschaften dieses »x« aufzufinden. Bei diesen Versuchen wurde Serum von in natura an perniziöser Anämie erkrankten Pferden verwendet. Zunächst wurde das Verhalten des übertragenden »x« in diesem Serum gegenüber Alkohol geprüft:

50 ccm Serum von einem perniziös-anämischen Pferde (aus Lothringen) wurden mit der mehrfachen Menge absoluten Alkohols versetzt, die Menge des reichlichen Koagulats auf ein Filter gebracht, bei 37° getrocknet und darauf 10 Tage mit absolutem Alkohol, dann 10 Tage mit Äther auf dem Schüttelapparat extrahiert, unter 2 tägigem Wechsel des Extraktionsmittels.

Der absolute alkohol- bzw. ätherlösliche Teil wurde zusammen mit dem ersten Filtrat im Faustschen Trockenapparat bei 40° zur Trockene gebracht und dann in 20 g sterilem Olivenöl durch Schütteln suspendiert.

Der von alkohol- und ätherlöslichen Bestandteilen befreite Koagulatrückstand wurde ebenfalls bei 40° getrocknet und dann mit physiologischer Kochsalzlösung zu einer feinen Aufschwemmung verarbeitet.

Alkoholkoagulat und Alkoholfiltrat des Serums gelangten dann getrennt zur subkutanen Injektion auf gesunde Pferde, das Filtrat auf Versuchspferd Nr. 63, das Koagulat auf Versuchspferd Nr. 64.

Aus den Temperaturkurven geht am besten der weitere Verlauf des Versuches hervor.

Kurve 6. Versuchspferd Nr. 63.

Kurve 7. Versuchspferd Nr. 64.

Der Unterschied in der Reaktion der beiden Pferde ist eklatant. Das Tier, das die Injektion vom Alkoholfiltrat erhalten hat (Pferd Nr. 63), ist nicht erkrankt, kein Temperaturanstieg, keine Puls-erhöhung, keine Gewichts-, keine Hämoglobinabnahme. Das Tier, das die gesamten Alkoholkoagulate, in erster Linie also die Ei-weißkörper des Serums, erhalten hat (Pferd Nr. 64), erkrankt 7 Tage nach der Injektion unter Fieber, schon vorher ist das Hämoglobin gefallen, letzteres sinkt im späteren Verlauf weiter. Das Ge-wicht fällt ebenfalls. Das Pferd macht im weiteren Verlauf einen schwer-kranken Eindruck. Erneute fieberhafte Temperaturanstiege treten auf.

Aus diesem Versuche folgt: das übertragende »x« des Serums wird durch Alkohol mit den Serumeiweißkörpern ausgefällt. Obwohl es im frischen Serum in seiner Eigenschaft als »ultravisibles Virus« die feinsten Poren eines Berkefeldfilters passierte, geht es jetzt in der betreffenden Alkoholkonzentration nicht durch das Papier-filter, sondern bleibt in toto mit dem ausgefallenen Eiweißkoagulat auf demselben. Ferner folgt aus dem obigen Versuch, daß die Wirksamkeit des übertragenden »x« durch den 20tägigen Aufenthalt in ab-solutem Alkohol und Äther (je 10 Tage!) nicht zerstört wird.

Auf Grund der Tatsache, daß das übertragende »x« des Serums mit den Eiweißkörpern koaguliert wird, ohne seine Wirksamkeit zu verlieren, wurde in einem weiteren Versuche die Fällung der Eiweiß-körper mit Ammoniumsulfatlösung vorgenommen, und zwar erst in halb-, dann in ganzgesättigter Konzentration. Auf diese Weise wurden Globulin- und Albumin-Fraktion des perniziös-anämischen Serums erhalten. Aus dem folgenden Versuche geht hervor, in welche der beiden Fraktionen das übertragende »x« hineingeht:

Versuchspferd Nr. 70, braune Stute, 400 kg Gewicht.

Das Tier erhält am 25. VI. 1914 subkutan die Globulinfällung von 50 cem perniziös-anämischen Pferdeserums (aus Lothringen).

Kurve 8.

Das Pferd macht vom 10. VII. ab, wo die erste Fiebertemperatur auftritt, einen schwerkranken Eindruck. In der Folgezeit erneute Fieberanfälle, fortschreitende Gewichts- und Hämoglobinabnahme.

Das Tier erkrankt demnach nach einer Inkubation von 14 Tagen.

Versuchspferd Nr. 72, Rappe (Stute), 435 kg Gewicht.

Das Tier wird im Anschluß an die Injektion 3 Wochen lang täglich 2mal gemessen. Es treten niemals Fiebertemperaturen auf. Der Puls bleibt dauernd auf 36 pro Minute. Gewicht und Hämoglobin erfahren keine Abnahme. Auch im übrigen treten keine Krankheitserscheinungen auf.

Das Tier erkrankt also nicht.

Aus diesem Parallelversuch folgt, daß das übertragende »x« im Serum der perniziösen Anämie der Pferde durch halbgesättigte Ammonsulfatlösung quantitativ ausgefällt wird. Die Albuminfraktion erweist sich bei subkutaner Verimpfung auf das Pferd als unwirksam. Das übertragende »x« ist in der Globulinfraktion enthalten.

Weitere geplante Versuche am Pferde, die weiteren Aufschluß über die physikalisch-chemischen Eigenschaften des übertragenden »x« im Serum der kranken Pferde geben sollten, mußten infolge Kriegsausbruches unterbleiben.

Diese letzten Versuche beweisen wieder zunächst, daß zwischen dem Östrin und dem übertragenden »x« im Serum ein prinzipieller Unterschied besteht, daß das letztere, das »ultravisible Virus«, sich wie ein Eiweißkörper verhält, thermolabil ist, mit den Eiweißkörpern des Serums durch Alkohol koaguliert wird, des weiteren bei der Fällung mit halbgesättigtem Ammonsulfat in der Globulinfraktion quantitativ ausfällt, Eigenschaften, die dem Östrin nicht zukommen. Das Östrin ist im Gegensatz hierzu thermostabil, wird in 50% igem Alkohol nicht koaguliert und durch halbgesättigtes Ammonsulfat nicht gefällt.

Dagegen erlauben die angeführten Versuche kein abschließendes Urteil über die Natur des übertragenden »x« im Serum, insbesondere die Frage, ob es sich um ein »lebendes« Wesen oder um einen chemischen Körper handelt, ist dadurch nicht ganz entschieden. Auffallend bleibt immerhin, wenn es ein Mikroorganismus wäre, daß 10tägiges Schütteln mit absolutem Alkohol und daran anschließendes 10tägiges Schütteln mit Äther die »Virulenz« nicht zerstört hat, eine Tatsache, die bei Annahme eines lebenden Mikroorganismus nur durch die weitere Annahme von »Dauerformen« erklärlich wäre. Für die ultravisiblen Virusarten ist etwas derartiges bis jetzt nicht bekannt.

Auffallend ist weiterhin, daß ein ultravisibler Mikroorganismus, der durch die feinsten Tonkerzenfilter hindurchgeht, durch Alkohol einerseits, durch halbgesättigtes Ammonsulfat andererseits quantitativ ausgefällt wird, so daß er nicht mehr, auch nicht zu einem geringen Teile, gewöhnliche Papierfilter passiert.

Berücksichtigt man dieses auffallende »chemische« Verhalten des ultravisiblen Virus, zieht man ferner die wichtigen obigen Beobachtungen der amerikanischen Forscher über den grundverschiedenen Verlauf der durch Übertragung entstandenen Erkrankung in Betracht, und erinnert man sich der in unserer früheren Arbeit erwähnten Beobachtungen, daß eine Übertragbarkeit von Pferd zu Pferd in natura keine Rolle spielt, vielmehr die epidemiologischen Beobachtungen dagegen sprechen, vor allem alle in natura erkrankten Pferde Gastrophiluslarven in Magen beherbergen, so fällt es schwer, das »ultravisible Virus« der perniziösen Anämie der Pferde in direkte Analogie zu den übrigen bekannten ultravisiblen Infektionserregern zu setzen. Die Krankheit entsteht nicht durch einen ultravisiblen Infektionserreger, sondern wie oben bewiesen durch das Östrin; das »ultravisible Virus«, das die Krankheit überträgt, tritt in natura niemals als Erreger der Krankheit auf, sondern tritt nur bei der experimentellen Übertragung in Erscheinung.

Es liegt uns fern, uns auf Grund von Vermutungen auf eine bestimmte Theorie festzulegen. Weitere Versuche allein können diese Fragen entscheiden. Hier sei in diesem Zusammenhang nur nochmals die in der ersten Arbeit in diesem Archiv (vgl. Literaturangabe S. 254) geäußerte Möglichkeit erwähnt, daß im Verlauf der durch das Östrin hervorgerufenen Erkrankung ein gegen den eigenen Organismus gerichtetes Stoffwechselprodukt entsteht, das, auf gesunde Pferde übertragen, hier unter Erkrankung der letzteren zur Wirkung kommt und wiederum zur neuen Bildung des gleichen Stoffwechselproduktes Anlaß gibt. Diese Stoffwechselprodukte, d. h. das oben als »x« bezeichnete übertragende Agens, sind nur gegen die eigene Art gerichtet. Es sei diese Auffassung zunächst als Arbeitshypothese aufgestellt. Daneben muß theoretisch die Möglichkeit offen gelassen werden, daß das übertragende Agens von vornherein in den Larven in irgendwelcher Verbindung mit dem Östrin enthalten ist. Dagegen spricht erstens die Tatsache, daß auch die mit gekochten Larvenextrakten experimentell erzeugte Anämie übertragbar ist, das thermolabile ultravisible Virus würde dadurch unwirksam, zweitens, daß einmalige Injektion von Larvenextrakt, der das vermehrungsfähige ultravisible Virus enthält, für die Erzeugung der perniziösen Anämie

genügen müßte. Sowohl beim Pferd wie beim Kaninchen stellt sie sich aber als Folge einer chronischen Vergiftung dar, die nur durch wiederholte Injektionen erzielt werden kann. Durch die oben angeführte Möglichkeit, bei zweckentsprechender Versuchsanordnung auch mit Kaninchen die genannten Fragen bearbeiten zu können, wird einem weiteren Kreise von Autoren als wie bisher das Studium dieser Probleme zugänglich sein.

G. Epikrise.

Unterzieht man die im vorstehenden gewonnenen Kenntnisse einer zusammenfassenden Kritik, so ergibt sich, daß die perniziöse Anämie der Pferde in vieler Hinsicht eine ganz eigenartige Stellung in der Pathologie der Tierkrankheiten einnimmt. Während sie anfangs infolge der im Vordergrund stehenden Blutarmut, verglichen mit der in der menschlichen Pathologie unaufhaltsam zum Tode führenden perniziösen Anämie, als solche den gleichen Namen erhielt, wurde sie später auf Grund der experimentellen Untersuchungen der französischen Forscher Carré und Vallée, die die Übertragbarkeit der Krankheit mittels Blut auf gesunde Pferde im Experimente nachweisen konnten, als eine Infektionskrankheit, als eine durch ein ultravisibles Virus hervorgerufene Erkrankung angesehen. Sie wird seitdem in der Literatur auch häufig als »infektiöse Anämie« bezeichnet, vor allem in der französischen veterinärmedizinischen Literatur findet sich fast ausschließlich der Name »Anémie infectieuse«. Die Beobachtung, daß sich niemals eine direkte Übertragung von einem Pferd auf das daneben stehende nachweisen ließ, gab dann verschiedentlich zu der Vermutung Anlaß, daß Zwischenwirte, vielleicht Insekten, die Krankheit, d. h. das Virus übertragen. Trotz umfangreichster Untersuchungen, namentlich in Japan und den Vereinigten Staaten, gelang es nicht, einen solchen Zwischenwirt aufzufinden, wenngleich die Möglichkeit, daß fliegende Insekten eine Rolle spielen, immer wahrscheinlicher wurde¹⁾.

Unsere anfänglich in diesem Sinne unternommenen Versuche, vor allem dann die Feststellung, daß sich in jedem unter etwa 100 Fällen der perniziösen Anämie der Pferde *Gastrophilus*larven, d. h. die Larven der Pferdebießfliege (*Oestrus*) im Magen der erkrankten Pferde auffanden, führte uns dann zu der in früheren Arbeiten mitgeteilten Tatsache, daß die genannte Krankheit der Pferde durch oftmalige Injektionen wässriger Extrakte dieser Larven in allen ihren Einzel-

1) Vgl. die ausführliche Besprechung der japanischen Arbeiten in unserer S. 254 unter 3 zitierten Arbeit im Arch. f. prakt. u. wiss. Tierk.

heiten (Fieberverlauf, Anämie, pathologisch-anatomischer Befund und Übertragbarkeit) experimentell erzeugt werden kann. Die damals offen gelassene Frage nach dem näheren Entstehungsmodus der Anämie fand ihre Bearbeitung in der vorliegenden Arbeit.

Abgesehen von den meist beträchtlichen Fiebertemperaturen und der Übertragbarkeit, erinnert die Krankheit aufs erste an die durch den *Bothriocephalus* hervorgerufene perniziöse Anämie des Menschen. Hier wie da finden sich im Intestinaltraktus Parasiten, die zu einem enormen Blutzerfall beim Wirt führen. In meiner Arbeit über die pathologische Anatomie und Hämatologie dieser Krankheit¹⁾ wurde der Vergleich mit der menschlichen perniziösen Anämie durchgeführt und diese weitgehende Übereinstimmung vor allem auch im histologischen Befund festgestellt. Es lag die Vermutung nahe, daß auch im Falle der equinen perniziösen Anämie hämolytische Substanzen, aus den *Gastrophilus*larven stammend, zu der Anämie führen. Nach Tallquist²⁾ sollen direkt wirkende Lipoidstoffe des *Bothriocephalus* nach vorangegangener Resorption die Anämie durch Auflösung der roten Blutkörperchen bewirken. Weitere Untersuchungen von Faust und Tallquist³⁾ zeigten, daß die Ölsäure hierfür in Betracht käme. Tierversuche von Faust⁴⁾ lehrten, daß die subkutane Einverleibung von ölsaurem Natrium bei Kaninchen eine zum Tode führende Anämie hervorruft. Diese Auffassung ist von vielen Seiten nicht unwidersprochen geblieben, z. B. von Krehl⁵⁾, Morawitz⁶⁾ und Naegeli⁷⁾. »Hämolytische Substanzen sind im Organismus weit verbreitet, werden aber offenbar in ihrer Wirkung durch besondere Schutzmaßregeln des Organismus unschädlich gemacht, ihre Isolierung beweist nicht ihre tatsächliche Einwirkung« (Naegeli). Vor allem wird die leichte Hemmung der Seifenhämolyse durch geringste Mengen von Serum, bzw. Cholesterin ins Feld geführt. Projiziert auf unsere Fragestellung, mußte sich hieraus zunächst die Aufgabe ableiten, zu untersuchen, ob sich hämolytische Substanzen in den *Gastrophilus*larven finden, welcher Natur sie sind, und ob sie in genetischer Beziehung zur Anämie stehen. Auf Grund der obigen Versuche ergab sich, daß die ge-

1) Vgl. Literaturangabe S. 299.

2) Tallquist, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 61, S. 427, 1907.

3) Faust und Tallquist, Arch. f. exper. Path. u. Pharm. Bd. 57, S. 375, 1907.

4) Faust, Ebenda. Suppl. Festschr. f. Schmiedeberg S. 171, 1908.

5) L. Krehl, Pathol. Physiologie 8. Aufl., S. 148, 1914.

6) P. Morawitz, Blut u. Blutkrankheiten i. Handb. d. inn. Med. v. Mohr u. Stähelin Bd. IV, S. 196, 1912.

7) O. Nägeli, Blutkrankheiten u. Blutdiagnostik II, S. 438, 1912.

nannten Larven in der Tat hämolytisch wirkende Substanzen enthalten, und daß letztere Lipoidstoffe, in erster Linie Seifen sind. Es gelang jedoch nicht, durch wiederholte Injektionen dieser hämolytischen Lipoidstoffe beim Kaninchen eine beträchtliche, in ihrem Verlauf auch nur annähernd an die perniziöse Anämie der Pferde heranreichende Anämie zu erzielen. Eine geringe Senkung der Blutwerte trat zwar ein, aber der Färbeindex sank unter die Norm, die Restitutionsfähigkeit war überaus groß, in den Organen fand sich keine Spur einer myeloiden Metaplasie, wie sie für die perniziöse Anämie der Pferde besonders charakteristisch ist. Dagegen ließ sich durch Injektion wässriger Gesamtlarvenextrakte eine hochgradige, in allen Einzelheiten der perniziösen Anämie der Pferde gleichende fortschreitende Blutarmut beim Kaninchen erzielen. Aus den oben wiedergegebenen Versuchen, in denen Schritt für Schritt die einzelnen chemischen Larvenfraktionen auf ihre anämisierende Wirkung am Tier geprüft wurden, ergab sich dann, daß jene Fraktion, welche das Östrin, wie von uns vorläufig das spezifische tierische Gift der *Gastrophilus*-Larven bezeichnet wurde, enthält, die charakteristische Anämie erzeugt. Auf Grund seiner Unlöslichkeit in 80 % igem Alkohol gelang es, eine Trennung des Östrins von den obengenannten hämolytischen Lipoidsubstanzen quantitativ durchzuführen. Letztere lösen Blutkörperchen, bei Ausschluß hemmender Substanzen, wie sie z. B. auch schon in den wässrigen Larvenextrakten wirksam sind, im Reagenzglase komplett. Die geringgradige Anämie, die man mit ihnen erzielen kann — und man bedarf hierzu unter Umständen 100 und mehr Larven —, zeigt den Typus der sekundären Anämie. Das Östrin hingegen läßt die roten Blutkörperchen im Reagenzglase intakt, führt aber im Tierkörper — und hier genügt die 10—20 Larven entsprechende Östrinmenge — zur schweren, fortschreitenden perniziösen Anämie mit allen Einzelheiten der endemischen perniziösen Anämie der Pferde.

Über die Art und Weise, wie und in welchen Organen dieser Vorgang der Hämolyse zustande kommt, läßt sich vorläufig nichts Näheres aussagen. Sie erinnert zunächst an den Vorgang der Genese der experimentellen Anämien mit manchen bekannten Blutgiften, wie dem Toluylendiamin, Pyrocin, Pyrogallol u. a. Diese »indirekten« Blutgifte führen bekanntlich zu schweren Anämien nach Injektion von Dosen, die ebenfalls an und für sich im Reagenzglase die roten Blutkörperchen nicht auflösen. Wie weit im übrigen die Analogie mit diesen Giften geht, ist nicht zu entscheiden.

Das Östrin selbst ist, wenn man es als einheitliches Gift auffassen will, nach unseren Versuchen ein schweres parenchymschädigendes Gift, dessen Wirkung sich bei der akuten Vergiftung auch auf das Zentralnervensystem, in erster Linie auf das Atemzentrum, erstreckt. Toxikologisch erinnert das Östrin in seinen Wirkungen an das Schlangengift einerseits, an gewisse Kapillargifte, wie das Sepsin, andererseits. Eine atropinartige Wirkung, ähnlich wie die des Muskarins, ließ sich niemals nachweisen, wie es überhaupt auch nach seinen chemischen Eigenschaften keinen Alkaloidcharakter aufweist. Aus früheren Versuchen ergab sich seine Antigennatur.

Seine kausale Beziehung zur perniziösen Anämie der Pferde konnte in den obigen Versuchen festgestellt werden. Eine direkte hämolysierende Wirkung geht ihm ganz ab; soweit sie den Larven zukommt, ist sie auf die Anwesenheit von Seifen zurückzuführen.

Ein Vergleich der Genese der Anämie mit bekannten Verhältnissen bei den perniziösen Anämien des Menschen läßt sich nicht ziehen. Die eigentlichen Ursachen der letzteren kennen wir nicht. Es ist dies der erste Fall, daß sich für eine in natura auftretende perniziöse Anämie ein toxisches Agens als auslösende Ursache ansprechen läßt.

Daß im übrigen der perniziösen Anämie der Pferde infolge ihrer »Übertragbarkeit« eine besondere Stelle im System der Anämien zukommt, haben wir in dem entsprechenden Kapitel (vgl. S. 306 u. f.) ausführlich dargetan. Das Wesen dieser »Übertragbarkeit«, die nur im Experiment zutage tritt, und die in natura bei der Verbreitung der Krankheit keine Rolle spielt, entspricht nicht der Übertragbarkeit im gewöhnlichen Sinne einer Infektionskrankheit.

H. Zusammenfassung.

1. Es wird aus den im Magen des Pferdes schmarotzenden *Gastrophilus*larven (der Pferdebießfliege, *Oestrus equi*) der durch seine akute, nervöse, sekretorische und Fieberwirkung charakterisierte toxische Bestandteil, vorläufig als »Östrin« bezeichnet, in seinem chemischen und physikalischen Verhalten untersucht, seine Kolloidnatur, Thermostabilität, Löslichkeit in Wasser, 50% igem Alkohol, Unlöslichkeit in höher konzentriertem Alkohol, Äther usw., Fällbarkeit durch Blei- und Quecksilbersalze, Nichtfällbarkeit durch Alkaloidreagenzien usw. festgestellt.

2. Es wird die akute toxische Wirkung des Östrins auf das Pferd, Kaninchen und andere Versuchstiere untersucht und seine pyrogene und neurotoxische Wirkung des näheren analysiert.

Beim Pferd kommt es zu allgemeiner Erregung, Schweißausbruch, Diarrhöen, Dyspnoe, Lähmung der hinteren Extremitäten. Der Exitus erfolgt unter allgemeinen Paresen und schwerer Dyspnoe. (Tödliche Dosis etwa 0,00008 g Östrin pro 400 kg Pferd.) Kaninchen reagieren mit Somnolenz, allgemeinen Paresen und Dyspnoe. Keine Sensibilitätsstörungen. Der Tod erfolgt durch Atemstillstand. Häufig vor dem Exitus einsetzende Hämoglobinurie. (Tödliche Dosis etwa 0,0004 g Östrin pro 1 kg Kaninchen.) In den Organen, vor allem in der Leber, findet sich eine mehr oder minder schwere Parenchymschädigung. Beim Pferd kommt es, im Gegensatz zum Kaninchen, zu schweren allgemeinen kapillaren Blutungen.

3. Die Frage nach dem näheren Zusammenhang zwischen Gastrophiluslarven und perniziöser Anämie der Pferde, insbesondere nach der Natur der anämisierenden Substanz, wird untersucht. Zweierlei grundverschiedene Bestandteile der Larven besitzen eine Einwirkung auf das Blut und lassen sich durch Fraktionierung mittels Alkohols voneinander trennen.

a) Die alkohollösliche Fraktion, enthaltend die seifenartigen Substanzen und Lipide:

Sie lösen rote Blutkörperchen im Glase auf. Diese Hämolyse ist am deutlichsten mit Larvenextrakten in 50%igem Alkohol. Alle Eigenschaften der Seifenhämolyse (Hemmung durch Serum, Cholesterin, »Beschleunigungsphänomen«, Thermostabilität usw.) lassen sich nachweisen. Die gleichen seifenartigen Substanzen werden in den Exkreten lebender Larven ausgeschieden.

Intravenöse Behandlung von Kaninchen mit diesen Fettsäuren führt (unter Verwendung relativ großer Mengen, entsprechend über 100 [!] Larven) zu geringgradiger sekundärer Anämie ohne extramedulläre Blutbildung.

b) Die alkoholunlösliche Fraktion, das Östrin:

Es löst die roten Blutkörperchen im Glase nicht auf. Wiederholte Injektionen (es genügt unter Umständen das Östrin von 10—20 Larven und weniger!) hingegen führen beim Kaninchen in wenigen Tagen zu schwerer Anämie, die durch Erhöhung des Färbeindex, Polychromasie, Anisocytose, Resistenzhöhung der Erythrocyten, dauernde Leukopenie, Verminderung bzw. Fehlen der Blutplättchen, hochgradige myeloide Umwandlung in Leber und Milz, Hämosiderose, Parenchymschädigung charakterisiert ist. Die Veränderungen gleichen in allen Einzelheiten der früher durch wässrige Larvenextrakte bei Versuchspferden erzielten Anämie, sowie der endemisch auftretenden perniziösen Anämie der Pferde.

4. Dieser als »Östrin« bezeichneten Endfraktion, die zur genannten schweren Anämie führt, kommt auch die oben erwähnte pyrogene und neurotoxische Wirkung zu.

5. Die mit wässerigen, auch gekochten Larvenextrakten erzeugte Kaninchenanämie erweist sich wie die der Pferde auf gesunde Tiere gleicher Art übertragbar.

6. Diese Übertragbarkeit der Anämie, die ausschließlich im Experiment zutage tritt, spielt bei der Verbreitung der Krankheit keine Rolle; einige Eigenschaften des übertragenden »Virus«: Thermolabilität, Unlöslichkeit im Alkohol, Äther, Fällbarkeit durch halbgesättigte Ammoniumsulfatlösung, werden unter Verwendung von Serum perniziös-anämischer Pferde und unter Benutzung von Versuchspferden sichergestellt. Danach sind Östrin und übertragendes Virus anscheinend nicht identisch.

7. Es wird aus obigem der Schluß gezogen: Die perniziöse Anämie der Pferde wird nicht durch die von den *Gastrophilus*-Larven in ihren Exkreten ausgeschiedenen, in vitro hämolytischen, seifenartigen Substanzen, sondern durch einen ebenfalls mit den Larvenexkreten abgesonderten, in charakteristischer Weise toxisch wirkenden, rote Blutkörperchen im Glase **nicht** lösenden, alkoholfällbaren Bestandteil (Östrin) erzeugt.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel I/II.

Fig. 1. *Gastrophilus equi*-Larven in situ, an der Grenze von Cardia- und Pylorus-
teil des Pferdemagens sitzend, nach eigenem Präparat in Kaiserlingscher
Lösung.

Fig. 2. Fliegenstadium von *Gastrophilus equi* (*Oestrus equi*), nach Abbildung
in Brauer, Monographie der Östriden, Wien 1864.

Fig. 3. Leber von Kaninchen Nr. 16 (vgl. S. 296), stärkere Vergrößerung. Leitz,
Okul. 3. Obj. 5. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Intrakapilläre, myeloide
Zellnester. Hämosiderose.

Fig. 4. Die gleiche Leber, Ölimmersion. Färbung: Hämatoxylin-Eosin. Intra-
kapilläre Nester, myeloide Zellen.

Fig. 5. Milz von Kaninchen Nr. 16. Leitz, Okul. 1. Tubus ausgezogen. Obj.
Ölimmersion. Im Zentrum von unten nach oben ziehende myeloide Zell-
infiltration.

1.

2.

3.

4.

5.