

Deutsche Medizinische Wochenschrift

Begründet von Dr. Paul Börner

HERAUSGEBER:

Geh. San.-Rat Prof. Dr. Schwalbe

Berlin-Charlottenburg, Schlüterstraße 53

VERLAG:

GEORG THIEME-LEIPZIG

Antonstraße 15

Nummer 37

Donnerstag, den 9. September 1920

46. Jahrgang

Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin.

Ueber die chemotherapeutische Wirkung einiger Farbstoffe im Tierversuch gegenüber bakteriellen Infektionen.¹⁾

Von Prof. F. Neufeld, Dr. O. Schiemann und Dr. Baumgarten.

Von Neufeld und Schiemann²⁾ wurde vor einiger Zeit Mitteilung über die Wirkung von Trypaflavin — 3,6-Diamino-10-Methylakridiniumchlorid —, einer von Ehrlich und Benda hergestellten und gegen Trypanosomen wirksam befundenen Akridinverbindung, im Tierversuch gegen die Infektion mit zwei septikämischen Krankheitserregern, nämlich Pneumokokken und Hühnercholera, gemacht. Besser noch als das Trypaflavin wirkte das niedere, von Ehrlich gegen Trypanosomen weniger wirksam befundene Homologe, die Diaminoakridinbase bzw. deren Salze; diese Stoffe haben eine Methylgruppe weniger als Trypaflavin, verhalten sich also zu ihm wie das Morphin zum Kodein, das Kuprein zum Chinin. Mit diesen Stoffen gelang es damals, bei einmaliger Injektion kurze Zeit nach der Infektion von pneumokokkeninfizierten Mäusen fast die Hälfte, von hühnercholerainfizierten drei Viertel zu retten. Die Ergebnisse würden sich vielleicht bei mehrfacher Einspritzung verbessern lassen; wir haben aber die Versuche in dieser wie in mancher anderen Richtung mit Rücksicht auf den Tiermangel nicht fortgesetzt, sondern uns mit der grundsätzlichen Feststellung der Heilwirkung begnügt. Da bisher als chemotherapeutische Mittel gegen bakterielle Infektion überhaupt nur die von Morgenroth und seinen Mitarbeitern studierten Chininderivate und das Salvarsan bekannt sind, so erscheinen uns die Befunde doch bemerkenswert. Wir stehen bei der chemotherapeutischen Bekämpfung der Bakterienkrankheiten noch so in den Anfängen, daß wir wohl am besten es so machen wie Ehrlich vor 15 Jahren bei seinen ersten Trypanosomenversuchen, indem wir alle Stoffe, die überhaupt einen spezifischen Einfluß erkennen lassen, zum Ausgangspunkt weiterer Untersuchungen machen.

Wirkung der Akridinverbindungen bei Infektionen mit Pneumokokken und Hühnercholera. Weitere Versuche haben uns die Heilwirkung der Akridinstoffe gegen Pneumokokken und Hühnercholera bei gleicher Anwendung und Dosierung, wie in der vorigen Arbeit angegeben, bestätigt; sie haben aber auch bestätigt, daß der Heilwirkung gewisse Grenzen gesetzt sind. Wenigstens bei einmaliger Injektion ist uns bei zu hoher Virulenz der Erreger oder bei größerer Infektionsdosis ein Schutz überhaupt nicht gelungen, vermutlich weil dann die Erreger sich so schnell vermehren, daß die abtötende Wirkung der Mittel damit nicht Schritt halten kann. So haben wir nebeneinander denselben Hühnercholera-Stamm in zwei verschieden virulenten Varianten benutzt. Der weniger virulente Stamm, der dauernd durch Mäuse gegangen war, tötete mit $1/100\,000$ bis $1/1\,000\,000$ Oese in 24, selten erst 48 Stunden, er besaß also immer noch nach gewöhnlichen Begriffen eine recht hohe Virulenz. Durch einmalige Passage durch ein Huhn gewann aber der Stamm dauernd eine höhere Virulenz: er tötete jetzt bis wenigstens $1/100\,000\,000$ Oese in 24 Stunden (kleinere Dosen haben wir nicht versucht). Während bei der ersten Variante des Stammes, wie erwähnt, etwa $3/4$ der Tiere gerettet wurden, ist uns bei dem Hühnerpassagestamm bisher eine Rettung nicht gelungen. Dagegen haben die Akridinstoffe bei keinem der 5 Pneumokokkenstämme, die wir heranzogen, versagt; es gelang sogar ein Schutz gegen die 100- bis 1000fach tödliche Dosis eines Pneumokokkenstammes Wa. von besonderer Virulenz, der bis zur Verdünnung 1:1 Milliarde Bouillonkultur in 48 Stunden tötete (die Pneumokokkeninfektion verläuft auch bei höchst virulenten Stämmen deutlich langsamer als die Infektion mit Hühnercholera).

Wenn wir die verschiedenen Versuchsreihen vergleichen, so ergibt sich, daß durchaus nicht immer diejenigen am günstigsten ausfielen, bei denen die Infektion mit dem kleinsten Multiplum der tödlichen Dosis erfolgte. Die Feststellung der kleinsten tödlichen Dosis gibt uns offenbar nicht einen vollständigen Maßstab für den jeweiligen Virulenzzustand einer Kultur. Dasselbe hat sich bereits

früher bei Versuchen mit antiinfektösen Sera gegen Septikämieerreger, besonders bei der Wertbestimmung des Pneumokokken- und Rotlaufserums, gezeigt; man kann daher solche Sera nur in der Weise genau vergleichen, daß man sie gleichzeitig mit derselben Kultur prüft. Man kann sich vielleicht vorstellen, daß die kleinste tödliche Dosis nur der Ausdruck dafür ist, eine wie große Menge der Bakterien der Organismus durch seine natürlichen Abwehrkräfte unschädlich machen kann, während eine zweite, hiervon unabhängige Komponente der Virulenz durch die Vermehrungsgeschwindigkeit der Erreger im infizierten Tier bedingt ist. Es spricht wohl manches dafür, daß auch diese Eigenschaft großen Schwankungen unterliegt, die sich aber nicht ohne weiteres im Verhalten der Kontrolltiere zeigen. Wir möchten glauben, daß diese zeitlichen Verhältnisse sowohl bei der Chemo- wie bei der Serotherapie eine große Rolle spielen.

Nicht ganz selten haben wir die von Ehrlich als Konträreffekt beschriebene und kürzlich wieder von Kolle an Kaninchen mit Impfsyphilis bei Verwendung subtherapeutischer Dosen von Silbersalvarsan festgestellte Erscheinung beobachtet, d. h. eine infektionsbefördernde Wirkung der Mittel. Wir sahen nicht nur eine Beschleunigung der Infektion, sondern erlebten es mehrfach, daß behandelte Tiere an der Infektion starben, während die mit der gleichen Dosis infizierten Kontrollen überlebten. Man hat diese Erscheinung, entsprechend den analogen Beobachtungen über die wachstumsanregende Wirkung von Antiseptika in schwachen Konzentrationen, in vitro auf eine Reizwirkung zurückgeführt. Wir sahen aber eine Infektionsbeförderung auch bei großen Dosen; hier kann man vielleicht einfach annehmen, daß in dem durch die Giftwirkung geschwächten Organismus schon kleinere Mengen von Erregern zur Infektion genügen als beim normalen Tier.

Vitroversuche mit Akridinverbindungen. Wir haben nun die Akridinverbindungen in vitro bezüglich ihrer entwicklungshemmenden und abtötenden Wirkung auf eine Reihe von Bakterien untersucht. Dabei ergaben sich, wie bereits in unserer ersten Mitteilung ausgeführt wurde, bei den einzelnen Versuchen gewisse Unterschiede, und zwar auch bei Entwicklungshemmungsversuchen, die wir sonst als die einfachsten gegenüber den Abtötungsversuchen bevorzugten. Die stärksten Schwankungen sahen wir bei Staphylokokken sowie bei Kolibazillen, während die Versuche mit Hühnercholera nicht regelmäßig ausfielen.

In Uebereinstimmung mit Browning fanden wir, daß Trypaflavin auf Streptokokken und Pneumokokken, besonders aber auf Staphylokokken zuweilen in reinem Serum (aktiv oder inaktiv) viel stärker als in Bouillon wirkte; gegenüber Hühnercholera war die Wirkung in beiden Medien etwa gleich.

Nachstehend geben wir für eine Reihe von Bakterien die Werte der Entwicklungshemmung durch Trypaflavin; die Werte für Abtötung nach 24 Stunden fallen damit annähernd zusammen. Die Angaben beziehen sich auf Wachstum in Bouillon: Gonokokken und Meningokokken 1:300 000—30 000 000, Hühnercholera 800 000 bis 2 000 000, Cholera 300 000—1 000 000, Pneumo- und Streptokokken 200 000, Milzbrand, Micr. melitensis, Diphtherie, Shiga-Ruhr 100 000 bis 300 000, Staphylokokken 10 000—100 000 (mittlere Werte, nach beiden Seiten schwankend), Pest 40 000, Y-Ruhr 30 000, Koli, Typhus, Paratyphus, Influenza unter 15 000.

Die Salze der Diaminoakridinbase wirkten gegen Gonokokken etwa 3- bis 10mal schwächer als Trypaflavin, auch gegen Hühnercholera war die Wirkung geringer, bei Pneumokokken und Melitensis etwa gleich. Die toxische Dosis der Mittel lag etwa $2\frac{1}{2}$ mal höher als beim Trypaflavin. In diesem Falle wird also die Wirkung auf Bakterien durch Einführung einer Methylgruppe nicht sehr stark verändert.

Hiernach sind die Akridinstoffe theoretisch schon dadurch von großem Interesse, daß sie zu den stärksten bisher bekannten Antiseptika gehören; dabei ist trotz der unverkennbaren Elektivität ihre Wirkung sehr vielseitig, ihr „Streukegel“ nach Ehrlich sehr groß.

Heilwirkungen der Akridinverbindungen bei anderen Infektionen. Mit den stark beeinflussten Bakterien haben wir, soweit sie genügend virulent waren, Versuche an Mäusen angestellt. Dabei zeigten die Mittel gegen Milzbrand (bei subkutaner Einspritzung 5' nach i. per. Infektion) eine deutliche, wenn auch schwache Wirkung: von 11 Mäusen wurde eine gerettet, bei 7 war

¹⁾ Nach einem Vortrag in der Berliner mikrobiologischen Gesellschaft am 3. V. 1920. — ²⁾ D. m. W. 1919 Nr. 31.

der Verlauf (bis zu 8 Tagen) verzögert. Bei einigen Versuchen mit *Micrococcus melitensis* und *Diphtherie* schien ebenfalls ein Einfluß vorhanden zu sein, doch war die Virulenz der Stämme nicht gleichmäßig genug, um ein sicheres Urteil zu fällen. Dagegen sahen wir bei Streptokokken, die in vitro ebensogut wie Pneumokokken beeinflusst wurden, einen gewissen Erfolg; allerdings haben wir nur wenige Versuche angestellt. Durch i. per. Einspritzung kurz nach der Infektion konnten wir einige mit der 10fach tödlichen Dosis des Streptokokkus Aronson infizierte Mäuse retten; bei einem Versuch mit der 100fach tödlichen Dosis eines anderen Stammes gelang nur eine Verzögerung.

Bemerkenswerte Heilerfolge hatten wir bei der i. per. Cholerainfektion an Meerschweinchen und Mäusen, wenn wir die Akridinstoffe einige Zeit nach der Infektion ebenfalls intraperitoneal gaben. Unsere Cholera 3, eine alte Laboratoriumskultur, gewann nach einer Reihe von Passagen eine so hohe Virulenz, daß etwa $1/100$ Oese Meerschweinchen tötete. Alle Versuche sind mit dem gleichen Stamm, aber zu verschiedenen Zeiten gemacht worden, während die Kultur sich auf verschiedener Virulenzstufe befand. Bemerkenswert ist, daß unsere Kultur, und zwar anscheinend von Anfang an, für Mäuse hochvirulent war, die tödliche Dosis war etwa $1/50$ bis $1/100$ Oese i. per. Nach unseren Erfahrungen eignen sich Mäuse ebenso gut zu derartigen Choleraersuchen wie Meerschweinchen. Zwei unserer Versuchsprotokolle sind nachstehend wiedergegeben; sie zeigen, daß die Mittel auch in solchen Dosen, die erheblich unter der toxischen liegen, noch wirksam sind und daß zuweilen noch bei Einspritzung $1\frac{1}{2}$ Stunden nach der Infektion Tiere gerettet wurden. Auch die Versuche mit Cholera fielen nicht ganz regelmäßig aus; nicht selten hatten auch hier kleinere Dosen bessere Heilwirkung als größere.

Versuch vom 28. I. 1920 an Mäusen. 2 Kontrollen mit $1/50$ Oese Chol. i. per. † in 24 Stunden. Je 2 Mäuse nach 15' mit $1/3000$, $1/6000$, $1/9000$ Trypaflavin (immer pro 20-g-Maus) überleben; ebenso eine Maus nach 90' mit $1/9000$ i. per. behandelt. Mit Diaminoakridinnitrat $1/2000$ und $1/6000$ nach 15' wurden je 2 Mäuse gerettet, ferner eine von zweien mit $1/4000$; auch eine nach 90' mit $1/3000$ injizierte Maus überlebt.

Versuch an Meerschweinchen vom 20. I. 1920. Je eine Kontrolle mit $1/84$ und $1/128$ Oese Chol. † in 24 Stunden. Behandlung nach 15' und nach 30': Meerschweinchen mit $1/1000$ und $1/500$ Diaminoakridinnitrat überleben, mit $1/200$ † nach 48 Stunden.

Gleichzeitig wurde eine Maus mit Chinolinrot 1:10000 behandelt; sie starb erst nach 4 Tagen an Giftwirkung, ohne Bazillen.

Es sei noch bemerkt, daß Sublimat und Karbol in Dosen, die schon toxisch waren, keine Wirkung bei den cholerainfizierten Tieren hatten.

Versuche mit anderen Farbstoffen. Wir haben nun eine Anzahl weiterer Farbstoffe untersucht, und zwar zunächst in vitro. Wir fanden dabei, wie zum großen Teil schon aus den Versuchen anderer Autoren lange bekannt ist (vgl. Eisenberg¹) bei einer Reihe von Farbstoffen recht starke und elektive Wirkungen. So lag für Kristallviolett, Methylviolett, Brillantgrün, Dahlia (Grubler) die Grenze der Entwicklungshemmung für Milzbrand zwischen 1 und 10 Millionen. Dahlia wirkte auffallenderweise auf Staphylokokken weit stärker als auf Streptokokken, sodaß die letzteren aus Gemischen rein gewonnen wurden. Chinolinrot wirkte bis 1:300 000 auf Cholera. Auch diese Mittel, insbesondere Brillantgrün und Chinolinrot, ergaben bei einzelnen Versuchen starke Differenzen, die wenigstens zum großen Teil auf dem Nährboden beruhen.

Einige der in vitro stark wirkenden Mittel wurden wiederum im Tierversuch geprüft, wobei wir mehrfach Heilerfolge feststellten. So zeigte Akridinorange (Chlorzinkdoppelsalz des vierfach methylierten Diaminoakridins) eine nicht unbeträchtliche Wirkung auf Hühnercholera, wenn das Mittel auch den anderen, vorher untersuchten Akridinverbindungen wohl nicht gleichkommt. Auch ein Auroposphin (G. extra von Kahlbaum) erwies sich bei summarischer Prüfung als deutlich wirksam.

Von besonderem Interesse ist es aber, daß zwei viel gebrauchte Farbstoffe, Kristallviolett und Brillantgrün, entsprechend ihrer Wirkung in vitro, einen zweifellosen Erfolg bei milzbrandinfizierten Mäusen zeigten. Die sehr hohe und elektive Vitrowirkung dieser Stoffe ist schon lange bekannt, und es ist eigentlich auffällig, daß damit noch keine Tierversuche gemacht zu sein scheinen. Leider sind beide Stoffe, entsprechend früheren Beobachtungen von Wendelstadt, Ehrlich u. a., äußerst giftig; sie rufen sowohl ausgedehnte örtliche Nekrosen, als auch schwere allgemeine Erscheinungen hervor, und viele Mäuse erliegen der Vergiftung erst nach längerer Zeit. Nun hat Ehrlich eine sehr große Zahl von Derivaten der Farbstoffe dieser Gruppe, die zum großen Teil eigens hergestellt waren, gegen Trypanosomen untersucht, jedoch, abgesehen vom Trypanosan, das wir bei Bakterien unwirksam fanden, ohne großen praktischen Erfolg: entweder war es nicht gelungen, die Mittel zu entgiften, oder es war gleichzeitig die Wirkung auf Trypanosomen verlorengegangen. Es wäre gewiß erwünscht gewesen, diese Verbindungen gegenüber Bakterien zu untersuchen, leider waren sie aber in der Fabrik Casella nicht mehr vorhanden.

Ebenfalls gegen Milzbrand wirksam und dabei weniger giftig fanden wir ein Dahlia (Grubler), das zwar ebenfalls Nekrose

macht, aber bis zu $1/300$ g (auf 20-g-Maus) gegeben werden konnte. In Dosen $1/500$ bis $1/1000$ g, bis zu 1 Stunde nach der Infektion gegeben, vermochte es einzelne Mäuse zu retten. Eine Uebersicht über diese Tierversuche gibt die Tabelle.

Versuche an Mäusen.

	Brillantgrün	Milzbrand Kristall- und Methylviolett	Dahlia	Hühnercholera Akridin- orange	Auoposphin
Gerettet	7	5	3	7	1
Verzögert	1	1	4	2	2
† an Gift	10	7	—	1	2
† an Infektion . . .	7	20	10	14	1
zusammen:	25	33	17	24	6

Ferner hatte Chinolingelb (wasserlöslich), das auffallenderweise in vitro ganz unwirksam war, im Mäuseversuch eine gewisse Wirkung gegen Hühnercholera.

Bemerkungen über die Aussichten der Chemotherapie bei Bakterienkrankheiten. Wenn wir zum Schluß auf die Frage eingehen, was von den mitgeteilten Ergebnissen etwa für die menschliche Therapie nutzbar gemacht werden könnte, so müssen dabei wohl die stark giftigen Mittel, wie Brillantgrün und Kristallviolett, zunächst ausscheiden. Bezüglich des Trypaflavins haben wir auf Grund der außerordentlich starken Wirkung auf Gonokokken in vitro bereits in der früheren Mitteilung Versuche am Menschen mit intravenöser Injektion vorgeschlagen. Prof. Bruhns hatte die Freundlichkeit, solche Versuche auszuführen, diese haben jedoch keine deutlichen Erfolge ergeben. Daß beim Menschen die Akridinstoffe viel stärker organotrop sind als bei der Maus, ist nach vergleichenden Blutuntersuchungen nicht anzunehmen. Auch daß die Gonokokken durch ihre intrazelluläre Lagerung geschützt sein sollten, erscheint uns unwahrscheinlich; bei den frischen Prozessen liegen sie ja auch zum großen Teil extrazellulär. Daß eine schnelle Festigung im Körper eintritt, wäre möglich; in vitro ist eine solche erwiesen, aber nicht nur für Gonokokken (Fürstenau), sondern auch für Choleravibrien (Shiga). Am wahrscheinlichsten ist es wohl, daß die zwischen die Epithelzellen eindringenden Gonokokken durch ihre Lagerung dem Einfluß des Mittels besonders schwer zugänglich sind. Vielleicht darf man daher bei frischen gonorrhoeischen Gelenkaffektionen besseren Erfolg erhoffen; möglicherweise könnten auch bei kindlicher Gonorrhoe die Zirkulationsverhältnisse günstiger liegen. Bei Meningokokkensepsis kämen Versuche mit intravenöser, bei Genickstarre mit intralumbaler Anwendung in Frage. Daß man Lösungen von mindestens 1:10 000 intralumbal anwenden kann, hat Prof. Friedemann bei zwei Lyssafällen und einem erst im späten Stadium zur Behandlung kommenden Meningitisfall festgestellt. Da das Mittel in den Urin übergeht, so kann es vielleicht auch bei Blasenaffektionen von Nutzen sein, allerdings wirkt es gerade auf *Bacterium coli* und *Proteus* ziemlich schwach, doch konnte bei einem Versuch durch Kombination von Urotropin und Trypaflavin eine bakterizide Wirkung des Urins auf Kolibazillen erreicht werden. Daß uns Versuche mit kombinierter Anwendung von Optochin- und Akridinverbindungen bei Pneumonie berechtigt erscheinen, wurde bereits in unserer vorigen Arbeit betont.

Da die örtlichen Verhältnisse, die die Zugänglichkeit der Krankheitserreger für die Mittel bedingen, ausschlaggebend sind, so ist natürlich aus unseren Choleraersuchen unmittelbar kein Anhaltspunkt für die Möglichkeit einer Beeinflussung der menschlichen Cholera zu entnehmen. Voraussichtlich liegen die örtlichen Bedingungen für die Einwirkung eines Mittels in der Darmwand, wo sich der Krankheitsprozeß bei der menschlichen Cholera abschließt, viel ungünstiger als in der freien Bauchhöhle. Immerhin zeigt die vorzügliche Wirkung des Emetins bei Amöbenruhr bei intravenöser Einspritzung, daß geeignete Mittel in genügender Konzentration dorthin gelangen können. Wir würden es daher immerhin für richtig halten, wenn Aerzte, denen menschliche Cholerafälle zu Gebote stehen, einen Versuch mit frühzeitiger intravenöser Einspritzung der Akridinstoffe machen würden.

Das Hauptinteresse unserer Versuche sehen wir in den theoretischen Ergebnissen. Nach den bekannten negativen Ergebnissen von Koch und Behring galt ja eine innere Desinfektion lange Zeit überhaupt als aussichtslos. Die glänzenden Erfolge Ehrlichs bezogen sich auf die zweifellos viel leichter beeinflussbaren Trypanosomen und Spirochäten. Eine Bemerkung Ehrlichs² aus dem Jahre 1907 zeigt, wie weit er selbst damals davon entfernt war, an eine Heilwirkung unserer bekannten Farbstoffe bei bakteriellen Infektionen zu denken. Er erwähnt beiläufig, schon im Jahre 1880, als er die intensive Färbekraft des Methylensblaus für Bakterien entdeckt hatte, habe Leopold Landau ihm vorgeschlagen, damit Heilversuche an Tieren anzustellen; er habe sich aber damals nicht entschließen können, dieser Anregung zu folgen, sondern habe erst lange nachher das Methylensblau gegen Malaria versucht. Es hätte doch eigentlich sehr nahegelegen, die gebräuchlichsten Bakterienfarbstoffe, zu denen Kristallviolett und Methylviolett gehören, an Tieren zu prüfen, die mit Bakterien infiziert waren. Merkwürdig ist auch, daß Shiga² (1913) bei Versuchen über Festigung von Bakterien gegen Farbstoffe in Ehrlichs Laboratorium die starke Wirkung von Trypaflavin auf Choleravibrien in vitro feststellte, ohne

¹) Zbl. f. Bakt. (Orig.) 71, 420.

²) B. kl. W. 1907 Nr. 9 bis 12. — ²) Zschr. f. Immun. Forsch. 18 S. 65.

daß er anscheinend den Versuch gemacht hat, das Mittel, dessen starke Wirkung auf Trypanosomen bekannt war, im Tierversuch gegen Cholerainfektion zu prüfen. Erschlossen wurde das Gebiet der Chemotherapie bei Bakterienkrankheiten wie bekannt erst durch Morgenroth. Unsere Versuche deuten wohl darauf hin, daß eine chemotherapeutische Beeinflussung bakterieller Infektionen doch in größerem Umfange möglich ist, als man es bisher wohl angenommen hat.
