

**A r c h i v**  
für  
**pathologische Anatomie und Physiologie**  
und für  
**klinische Medicin.**

---

Bd. 125. (Zwölfte Folge Bd. V.) Hft. 3.

---

**XXI.**

**Ueber die Bedeutung der Leukocyten bei Infection des Organismus durch Bakterien.**

(Zur Frage der Phagocytose.)

(Aus dem bakteriologischen Institut des Herrn Prof. A. Babuchin.)

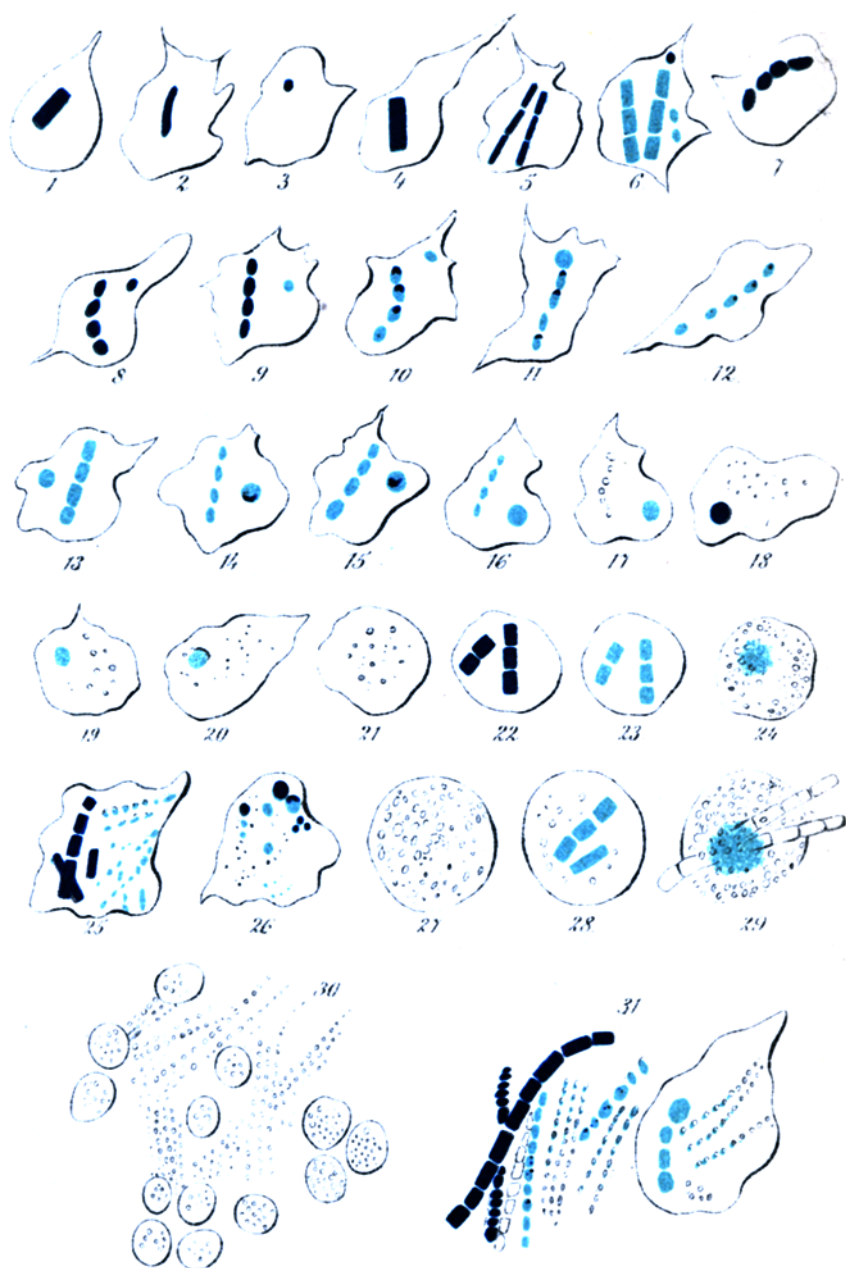
Von Dr. med. Peter Netschajeff in Moskau.

(Hierzu Taf. VIII.)

---

Noch immer ist die Bedeutung der sogenannten beweglichen oder Wanderzellen, die Rolle, welche dieselben im thierischen Organismus spielen, in tiefes Dunkel gehüllt. Max Schulze, Häckel, Recklinghausen und Preyer haben gezeigt, dass die Leukocyten contractile thierische Zellen sind, welche die Fähigkeit besitzen, ihre Form zu ändern, gleich den Amöben protoplasmatische Fortsätze auszusenden und sich zu bewegen. Dank diesen Eigenschaften vermögen sie verschiedene, in den Organismus eingeführte Fremdkörper (z. B. gepulverten Zinnober, Carmin, Milchkügelchen, Blutpigment u. s. w.) zu ergreifen.

Als mit der Entwicklung der Bakteriologie bewiesen wurde, dass viele Krankheiten ihre Entstehung dem Eindringen gewisser Bakterien in den thierischen Organismus verdanken, sahen mehrere Beobachter (Klebs, Ruele, Waldeyer, Frisch und Birch-Hirschfeld) Bakterien auch im Protoplasma der Leukocyten.



Birch-Hirschfeld sah Diplokokken in den Leukocyten Masernkranker, Koch Tuberkelbacillen in den Leukocyten Tuberculöser. Somit kann man die Fähigkeit der Leukocyten, Fremdkörper in sich aufzunehmen, für vollständig bewiesen erachten. Die Bakterien, welche, als pflanzliche Organismen, im Thierkörper ebenso gut Fremdkörper darstellen, wie Zinnober, Indigo u. s. w., können, wie dies aus den Beobachtungen der genannten Forscher hervorgeht, von den Leukocyten aufgenommen werden; dies ist auch vollkommen natürlich und geht logisch aus den Eigenschaften der Leukocyten hervor. Die Bedeutung dieser Thatsache jedoch ist noch immer räthselhaft. Die einen Forscher messen ihr keine grosse Bedeutung bei, sehen dieselbe für eine zufällige Erscheinung an und sprechen sogar geradezu die Vermuthung aus, dass die Leukocyten, indem sie die Bakterien ergreifen, die Verschleppung derselben in die verschiedenen Organe bedingen und somit die Erkrankung des Organismus begünstigen. Andere hingegen und besonders Metschnikoff geben dieser Erscheinung eine ganz andere Erklärung. Nach Ansicht des letzteren verdaut die Wanderzelle, wenn sie eine Bakterie ergriffen hat, dieselbe in ihrem Protoplasmaleibe, gleich einer Amöbe (intracelluläre Verdauung), assimiliert sie und befreit auf diese Weise den thierischen Organismus von den eingedrungenen Mikroben.

Die von Metschnikoff vertretenen Ansichten haben bekanntlich zum Aufbau einer ganzen Hypothese geführt, der sogenannten Phagocytentheorie, welcher der Kampf um's Dasein zwischen den Zellen des Organismus und den Bakterien, das Verschlucktwerden der letzteren durch die ersteren, zu Grunde liegt; aus diesem Grunde haben die Leukocyten den Namen Phagocyten, Fresszellen, erhalten. Ungeachtet der von Metschnikoff und anderen Forschern zu Gunsten dieser Hypothese angeführten Beobachtungen, ungeachtet ihrer Originalität und ihrer geradezu verlockenden Eigenschaften, ruht sie doch auf schwankendem Grunde, und somit kann diese Frage noch lange nicht als gelöst angesehen werden.

Die Leukocyten verschlingen Bakterien: dies ist über allem Zweifel erhaben. Ueber das Schicksal jedoch, welches die von den Leukocyten verschlungenen Bakterien erleiden, be-

stehen nur Vermuthungen. Die von den Leukocyten aufgenommenen Bakterien zeigen hie und da ein verändertes Aussehen, sog. Degenerationszeichen. Metschnikoff sucht zu beweisen, dass eine ähnliche Degeneration nur in den Zellen vorkommen kann und das Resultat intracellulärer Verdauung der Bakterien in den Leukocyten ist. Die Beobachtungen seiner Gegner, welche auf das Entstehen derartiger Degenerationsformen ausserhalb der Zelle hinweisen, hält er für unrichtig und für abhängig einerseits von technischen Mängeln in der Herstellung der Präparate (die degenerirten Bakterien fallen bei der Bearbeitung aus den Leukocyten heraus); andererseits, meint er, können diese Formen beim Absterben der Leukocyten entstehen, welche die Bakterien während ihres Lebens ergriffen und verändert haben und hierauf abgestorben und zerfallen sind. In Folge dessen seien die degenerirten Bakterien aus den Leukocyten herausgefallen und sähen wie frei liegende aus.

Als ich meine Untersuchungen begann, schien es mir, dass die bekannte Thatsache, dass die Leukocyten die Bakterien zu ergreifen vermögen, uns wohl kaum das Recht giebt, derartige Schlussfolgerungen zu machen, wie dies Professor Metschnikoff und seine Anhänger thun. Die Anwesenheit von degenerirten Formen in den Leukocyten bietet uns ebenfalls keine Anhaltspunkte für irgend welche Schlussfolgerungen, um so weniger, als ähnliche Formen auch ausserhalb der Leukocyten vorkommen (was auch Metschnikoff selbst nicht in Abrede stellt). Ausserdem hat weder Metschnikoff, noch auch einer seiner Nachfolger durch directe Beobachtung die Veränderung der Bakterien in den Leukocyten (die sogenannte intracelluläre Verdauung) gezeigt. Indirecte Beweise können aber in diesem Falle wohl kaum irgend welchen wissenschaftlichen Werth beanspruchen. In Folge dessen war der Zweck meiner Untersuchungen: 1) die Erscheinungen des Ergreifens der Bakterien durch Leukocyten an verschiedenen Thieren kennen zu lernen; 2) wenn möglich durch directe Beobachtung die Veränderungen zu verfolgen, welche mit den von Leukocyten verschluckten Bakterien vorgehen, und 3) die Bedeutung dieser Aufnahme der Bakterien durch Leukocyten für die Erklärung der Immunität zu ergründen.

## Versuche an Fröschen.

Um den im Organismus nach der Infection durch Mikroben eintretenden Prozess zu studiren, begann ich meine Versuche an Fröschen. Einerseits, weil die Frösche ein für Experimente sehr geeignetes Object sind, andererseits, weil ich die Vorgänge, welche von verschiedenen Forschern bei Versuchen eben an diesen Thieren beschrieben worden, kennen lernen wollte.

Vor Allem interessirte es mich, die Aufnahme der Mikroben durch die Leukocyten in Augenschein zu nehmen. Zu diesem Zwecke benutzte ich eine Reincultur virulenter Anthraxbacillen, sowie Froschlymphe; letztere entnahm ich entweder dem Lymphherz des Frosches, was ziemlich unbequem ist, oder dem sublingualen Lymphsack. Die Zunge wurde an ihrer Wurzel durch eine Ligatur umschnürt, wodurch der Lymphsack am nächsten Tage anschwellt; aus diesem wurde die frische, reichlich Lymphkörperchen (Leukocyten) enthaltende Flüssigkeit entnommen. Aus dieser Lymphe wurde ein hängender Tropfen hergestellt, demselben eine auf Agar-Agar gezüchtete Milzbrandcultur zugesetzt und das auf diese Weise hergestellte Präparat der mikroskopischen Untersuchung unterzogen.

Die sogleich nach Herstellung des Präparates vorgenommene mikroskopische Untersuchung ergab, dass die Stäbchen theils frei lagen, theils den Leukocyten anhafteten. Die Leukocyten änderten ihre Gestalt, sandten einige Male sehr lange Pseudopodien aus, aber das unmittelbare Erfassen der Stäbchen zu beobachten gelang mir nicht. Oefters konnte man sehen, wie der Leukocyt seine Pseudopodien in der Nähe eines Stäbchens aussandte, es berührte, aber nicht erfasste. In diesen Präparaten, welche bei gewöhnlicher Temperatur oder im Thermostaten bei 35° binnen 24 Stunden oder mehr gehalten wurden, zerfielen die Leukocyten gewöhnlich; die Anthraxbacillen wuchsen zu langen Fäden, bildeten keine Sporen und tödteten hiermit inficirte Mäuse.

In der folgenden Serie meiner Experimente verfuhr ich anders. Die Cultur wurde in den dorsalen Lymphsack des Frosches eingeführt und auf einem Schwamme oder auf Hollundermark fixirt. Dies wurde auf folgende Weise bewerkstelligt. Dem Frosche wurde die Rückenhaut, nachdem dieselbe mit Sublimatlösung abgewaschen, aufgeschnitten und nach Durchziehen von Ligaturen wurde unter die Haut ein Schwamm oder Hollundermark, mit Anthraxcultur getränkt, eingeführt und die Ligaturen geschlossen. Hollundermark und Schwamm waren vorher im Trockenschranke sterilisirt und trocken mit einer in (0,75procentiger) Kochsalzlösung suspendirten, auf Bouillon oder Agar-Agar gezüchteten Reincultur von Milzbrandbacillen getränkt. In verschiedenen Zeitabschnitten (1—10 Tagen) entfernte ich den Schwamm und das Mark und untersuchte sie sowohl im frischen Zustande, als auch gefärbt. Bei der Untersuchung des frisch entnommenen Markes zeigten die aus ihm gefertigten Schnittpräparate unter dem Mikroskope an der Peripherie eine Ansammlung einer grossen Anzahl von Leukocyten, welche letztere auch in das Innere durch die Kanälchen des Marks eingedrungen waren. Zwischen

den Leukocyten lagen auch Anthraxbacillen, jedoch in ihnen selbst waren keine sichtbar. Die Zwischenräume zwischen den Scheidewänden und die Markkanälchen selbst waren mit einer Flüssigkeit, welche bei Zusatz von Alkohol gerann, gefüllt.

Ferner wurde das Mark nach Behandlung mit Alkohol untersucht. Die nach 24 Stunden gemachten Schnitte wurden mit Methylenblaulösung nach Gram und Bizzozero gefärbt und in Canadabalsam eingebettet. Die auf diese Weise hergestellten Präparate zeigten schon nach 24 Stunden (seit Einführung des Marks in das Thier) an der Peripherie derselben und zum Theil in den Saftkanälchen eine ziemlich reichliche Ansammlung von Leukocyten. Die Milzbrandbacillen lagen hier mit den Leukocyten vermischt, ebenso wie in den Markkanälchen; in den Leukocyten selbst aber konnte man sie nur äusserst selten vorfinden. Je später das Mark aus den Thieren entfernt wurde, desto weniger Bacillen konnte man wahrnehmen; ihre Formen waren verändert, sie zeigten Dégenerationsvorgänge. Die letzteren wurden an ganz frei liegenden, nicht von Leukocyten gewissermaassen „verschluckten“ Bacillen wahrgenommen. Im Centrum einiger Markpräparate konnte man zuweilen Haufen von Bacillen, welche die Centralhöhlungen des Markes dicht anfüllten, sehen; besonders war dies der Fall, wenn das Mark mit einer Bouilloncultur getränkt war, so dass man den Eindruck gewann, die Anthraxbacillen wären hier angelangt und im Besitze von Nahrungsstoff weiter gediehen. Nach Verlauf von 10 Tagen oder auch länger fand man im Präparat Bacillen äusserst selten. Das Mark war um diese Zeit von gallertigem Exsudat umgeben, das theils aus Leukocyten, theils aus unregelmässigen protoplasmatischen Bildungen zerfallener Leukocyten und dünnen Fasern bestand. Auf Grund dieser Beobachtungen schloss ich, dass Anthraxcultur, auf Markstücken unter die Haut des Frosches eingeführt, von einer grossen Anzahl von Leukocyten umgeben wird und dann zerfällt und verschwindet; dass aber dieses Zerfallen auf dem Wege geschieht, wie es Metschnikoff angiebt, das habe ich nicht beobachtet.

Aus den Versuchen mit Einführung von Schwämmen unter die Haut der Frösche ergab sich etwas Anderes.

Nachdem die Schwämme mit Anthraxcultur getränkt und in den dorsalen Lymphsack der Frösche eingeführt worden waren, wurden sie ebenso wie das Mark in verschiedenen Zeitabschnitten entfernt und ihr Inhalt auf Deckgläschen entleert. Die lufttrockenen Präparate wurden in Alkohol oder über der Flamme fixirt und gefärbt. In solchen Präparaten konnte man unter dem Mikroskope Anthraxbacillen, von Leukocyten in grosser Anzahl verschluckt, sehen. Einzelne Stäbchen zeigten ihre normale Form, die Form der anderen aber war in verschiedener Weise verändert und zeigte sogenannte Dégenerationserscheinungen. Doch konnte man den letzteren auch ausserhalb der Leukocyten in Menge begegnen. Trotz der grossen Anzahl von Experimenten (79) gelang es keinmal, ein Präparat zu finden, in dem alle Stäbchen von Leukocyten aufgenommen waren: die Bacillen befanden sich sowohl innerhalb, als auch ausserhalb der Leukocyten. Die Zahl der ver-

schluckten Stäbchen war sehr verschieden. Zuweilen beherbergte ein Leukocyt 8—10 Stäbchen. Am grössten war ihre Anzahl in den Leukocyten in den ersten 24—48 Stunden, in den darauf folgenden Tagen war sie geringer.

Aus den zu verschiedenen Zeiten (nach 1—10 Tagen) entfernten Schwämmen wurden auch noch mehrere Culturen auf Nährböden und im hängenden Tropfen angelegt. Bis zum 8. Tage entwickelten sich die Milzbrandbacillen; nach dem 8. Tage blieben die Züchtungsversuche resultatlos. Impfungen mit dem Saft, welcher am 5. Tage direct dem Schwamm entnommen wurde, waren für Thiere nicht mehr tödtlich. Ebenso verhielt es sich mit den Impfversuchen, welche mit einer vorher auf Nährböden verpflanzten Milzbrandcultur vorgenommen wurden.

Anthraxcultur, welche im Frosche 5 Tage verbleibt, verliert also ihre Giftigkeit, hat aber noch die Fähigkeit, auf Nährböden zu gedeihen. In hängenden Tropfen, welche aus der Flüssigkeit des Schwammes hergestellt und in den Brutschrank bei 35° gebracht waren, nahm man das Wachsen der Anthraxbacillen zu langen Fäden wahr, aber eine Sporenbildung zeigten sie nicht. Die sich hier befindenden Leukocyten zerfielen gewöhnlich und verschwanden.

Auch andere Mikroorganismen, *Bacillus subtilis* und Emmerich's Bacillen, führte ich den Fröschen unter die Haut ein. Die mit Reincultur des *Bac. subtilis* getränkten und unter die Haut der Frösche gelegten Schwämme riefen ebenso, wie die mit Milzbrandcultur versehenen, eine Ansammlung von Leukocyten hervor. Die aus der Flüssigkeit der Schwämme hergestellten (fixirten) Präparate gaben ein gutes Bild der Aufnahme des *Bacillus subtilis* durch Leukocyten, obgleich viele Bacillen auch ausserhalb der Leukocyten lagen. Die Flüssigkeit aus einem Schwamm, der unter der Froschhaut gelegen hatte, gab, auf Nährgelatine übertragen, keine Cultur von *Bac. subtilis*. Die Bakterien gingen offenbar nach 24stündigem Aufenthalte im Organismus zu Grunde. Ähnliches wurde auch an Emmerich's Bacillen beobachtet.

#### Versuche an Tritonen.

Um die Aufnahme der Bakterien durch Leukocyten zu beobachten, bilden die Tritonen ein sehr geeignetes Object. Ihre farblosen Blutkörperchen zeichnen sich bekanntlich durch relativ sehr grossen Umfang aus. Ebenso wie bei den Fröschen führte ich ihnen unter die Haut mit Milzbrandcultur getränkte Schwämme ein und untersuchte, indem ich dieselbe, nach verschiedenen Zeitintervallen entfernte, die aus ihnen entnommene Flüssigkeit. An der Seite des Rückens wurde die Haut in Form eines Lappens mit der Scheere aufgeschnitten und die Wunde mit dem Messer vertieft. Nach Durchziehen seidener Ligaturen wurde der Schwamm eingeführt und die Ligaturen zugezogen; die Ränder der Wunde wurden geebnet und zuweilen

mit Celloidinlösung oder Collodium bedeckt. Darauf wurden die Tritonen in poröse Töpfe aus ungebranntem Thon gesetzt, welche zur Erhaltung der feuchten Atmosphäre im Wasser standen.

Die aus der ausgepressten Flüssigkeit des Schwamms hergestellten Präparate, in Methylenblau oder nach Gram gefärbt, gaben ein sehr klares Bild durch Leukocyten verschlungener Milzbrandbacillen. Erstere enthielten in ihrem Protoplasma zuweilen eine sehr grosse Anzahl von Bacillen (30 und mehr). Die einen Bacillen hatten ein ganz normales Aussehen, mit klaren und deutlichen, getrennten Contouren ihrer Glieder, und waren gut gefärbt, andere waren verändert. Diese Veränderungen zeigten ein verschiedenes Gepräge. Die Stäbchen waren blasser gefärbt, entweder waren sie dicker oder dünner, als die normalen, mit verwischten Contouren, oder sie zeigten Ausbuchtungen; andere waren keulenförmig gestaltet oder an ihren Enden angefressen; wieder andere nahmen bogenförmige Gestalt an oder bildeten eine Zickzacklinie; ausserdem lagen die einzelnen Glieder zuweilen rosenkranzartig (torulöse Form). Einzelne Stäbchen waren in kleine Körnchen zerfallen, welche sich in eine oder zwei Parallelreihen lagerten. Zuweilen konnte man beobachten, wie die Stäbchen in ihrer einen Hälfte ein normales Aussehen hatten, während ihre andere Hälfte in kleine Körnchen zerfallen war. In anderen Fällen lagen die Körnchen in den Leukocyten in Haufen, nicht im geringsten mehr ihrer Lage nach an Stäbchen erinnernd; aber das Aussehen der Körnchen, ihre Form und ihre Fähigkeit, nach Gram sich zu färben, erinnerten an die der zerfallenen Stäbchen. Gewöhnlich 3 mal 24 Stunden nach Einführung der Cultur unter die Haut war die Anzahl der in dieser Weise veränderten Stäbchen ziemlich bedeutend. Allein ebenso veränderte Formen, wie in den Leukocyten, traf man in den Präparaten in grosser Menge auch ausserhalb derselben, sie lagen ganz frei. Die Flüssigkeit, welche am 3. Tage aus dem Schwamme ausgepresst und mit welcher eine weisse Maus geimpft wurde, führte deren Tod nicht herbei; auf Nährböden geimpft, gab sie jedoch eine Cultur mit einer grossen Anzahl von Involutionenformen. Am 4. und 5. Tage gaben die Impfungen keine Colonien, wobei oft andere fremde Culturen erschienen. Nach 5 Tagen konnte man in den Präparaten gewöhnlich Bakterien nicht wahrnehmen, während die Leukocyten grösstentheils sich als zerfallen erwiesen und viele Vacuolen enthielten. Vacuolisirte Leukocyten zeigten im frischen Zustande keine Bewegungen; ihr Protoplasma war unbeweglich, sie waren todt. Bei Besichtigung der aus dem Schwamme entnommenen frischen Flüssigkeit konnte man sowohl bei Tritonen, wie bei Fröschen, die verschiedensten Bewegungen des Protoplasmas der Leukocyten beobachten und in ihnen Bacillen wahrnehmen. Veränderungen aber in der Form der Bacillen, wie wir sie in Fixirpräparaten wahrgenommen haben, zu sehen und ihnen zu folgen, gelingt nicht. Das gestattet die Annahme, dass der grössere Theil der Veränderungen an den Stäbchen in den fixirten Präparaten das Resultat der künstlichen Bearbeitung der Bakterien sei, um so mehr, als solche veränderte Formen zuweilen auch aus Reinculturen (z. B. die torulöse Form) gewonnen wurden.



Das Aussehen frischer Präparate verändert sich bedeutend nach der Bearbeitung, sowohl in Bezug auf die Bakterien, als auch in Bezug auf die Leukocyten. Die Anzahl frei liegender Stäbchen in fixirten Präparaten ist gewöhnlich grösser, als die in frischen. Präparate, welche aus einem und demselben Schwamme hergestellt waren, zeigten in einem Falle mehr Bacillen, im anderen Falle weniger. Was aber die Leukocyten anbelangt, so ändern sie ihre Gestalt in frischen Präparaten beständig und haben deshalb die verschiedensten Formen; beim Trocknen — Fixiren — wird der grössere Theil rund oder oval, oder sie zerfallen in eine formlose Masse, und daher ist es nicht möglich, sie in demselben Zustande zu erhalten, in welchem wir sie in frischen Objecten sehen. Diese Veränderungen nach der Bearbeitung betreffen nicht allein die Leukocyten der Tritonen, sondern auch die aller anderen Thiere, an denen Versuche angestellt wurden.

Daraus ersehen wir, dass Schlussfolgerungen über das Verhalten der Bakterien zu den Leukocyten in dem Sinne, als gingen diese Veränderungen in Form und Gestalt nur unter dem Einfluss von Leukocyten vor sich und seien sogar das Resultat der intracellulären Verdauung in Folge der oben beschriebenen wechselnden Bedingungen, unbegründet ist.

#### Experimente an Warmblütern.

Experimente an Warmblütern wurden an weissen Mäusen, Meerschweinchen, Kaninchen, Tauben, Hühnern und Hunden angestellt. Diesen Thieren wurde Milzbrandcultur ebenfalls unter die Haut vermittelt sterilisirter Schwämme eingeführt. Gewöhnlich wurden die Haare geschoren, die Haut rasirt, mit einer Sublimatlösung abgewaschen, darauf wurde der Einschnitt gemacht und die Haut nach beiden Seiten hin abpräparirt, und endlich wurden die Ligaturen angelegt und der mit Milzbrandcultur getränkte Schwamm in die Wunde eingeführt. Nach 1, 2 und mehr Tagen wurde der Schwamm entfernt und aus der aus ihm ausgepressten Flüssigkeit wurden Präparate hergestellt. Färbung und Bearbeitung waren dieselben, wie bei den Experimenten an Kaltblütern. Bei weissen Mäusen nahmen wir nach 20 Stunden, wenn die Thiere noch am Leben waren, in den aus der Schwammflüssigkeit hergestellten Präparaten gewöhnlich nur eine grosse Anzahl von Anthraxbacillen wahr, welche gut gefärbt waren und fast eben dasselbe Aussehen hatten, welches man an Reinculturen wahrnimmt; veränderte Formen aber und Leukocyten waren niemals anwesend.

Bei analogen Experimenten an Meerschweinchen und Kaninchen fanden wir in der aus dem Schwamme ausgepressten Flüssigkeit auch in grosser Anzahl Anthraxbacillen, welche, wie die bei Mäusen, sich gut färbten und Wachstumserscheinungen zeigten; Degenerationsformen fehlten. Hier fanden sich Leukocyten vor, aber in sehr geringer Anzahl; verschluckte Bacillen fehlten. Tauben, Hühner und ausgewachsene Hunde blieben bei diesen Experimenten immer am Leben; — sie sind bekanntlich gegen Milzbrand im-

mun. Auch diesen Thieren wurden, ganz wie bei Kaltblütern, Hollundermark oder Schwamm mit Milzbrandcultur unter die Haut eingeführt.

Das Mark, mit Milzbrandcultur getränkt, wurde nach 24 Stunden und mehr nach seinem Verbleiben unter der Haut der Taube oder des Huhnes entweder im frischen Zustande oder nach Alkoholbehandlung in Augenschein genommen. In frischen Markschnitten konnte man sowohl bei Tauben, als auch bei Hühnern die peripherischen Theile des Markes mit einer grossen Anzahl von Leukocyten umgeben sehen, welche, wie bei Kaltblütern, in das Innere der Markkanälchen eingedrungen waren; die Räume zwischen den Scheiden des Markes, desgleichen die Kanälchen waren noch mit einer hellen Flüssigkeit angefüllt, welche bei Alkoholzusatz gerann. Die Bakterien lagen mit Leukocyten vermischt ebenso in den Saftkanälchen des Markes. Von Leukocyten verschluckte Bakterien gelang es hier nicht zu sehen; die Leukocyten hatten immer ein runde Form und liessen auch beim Erhitzen keine Bewegungen wahrnehmen.

In den gefärbten Schnitten des zuerst auf 24 Stunden in Alkohol gebrachten Markes zeigten die Leukocyten sich grösstentheils in eine körnige Masse zerfallen und so verändert, dass man sie kaum unterscheiden konnte. Daher gelang es nicht, in solchen Präparaten verschluckte Bacillen zu bemerken; die Bakterien lagen entweder ganz isolirt oder in einem Haufen zerfallener Leukocyten. Die Färbung der Milzbrandbacillen war in diesem Falle verschieden: die Bacillen, welche nur einen Tag in den Tauben oder Hühnern verblieben waren, färbten sich besser, als die an den folgenden Tagen entfernten, wo man auch mehr veränderte Formen beobachten konnte. Am 6. oder 7. Tage verschwanden die Bakterien aus dem Mark, wenigstens konnte man in keiner Weise an ihnen eine Färbung erzielen.

Die Versuche mit Einführung von Schwämmen bei Tauben und Hühnern ergaben ebenso wenig überzeugende Resultate, trotzdem die Untersuchung und Färbung mit denselben Vorichtsmaassregeln, welche Hess empfiehlt, ausgeführt wurden. Der unter die Haut eingeführte Schwamm trocknet gewöhnlich sehr schnell aus und bleibt zuweilen so fest an dem Gewebe kleben, dass er mit Mühe abgerissen wird; einen Tropfen Flüssigkeit zu erhalten, fällt deswegen zuweilen sehr schwer, besonders ist dies am 3. oder 4. Tage der Fall. In den von Tauben gewonnenen Präparaten gelingt es zuweilen von Leukocyten verschluckte Bakterien zu beobachten, dies ist aber eine sehr seltene Erscheinung. Bei Hühnern ist die Grösse der Leukocyten im Vergleich zu den Milzbrandstäbchen so gering, dass das Verschlingen der Stäbchen durch Leukocyten fast gar nicht zu constatiren war. Gewöhnlich lagen die Stäbchen in verschiedenen Degenerationsstadien immer frei.

Die im Organismus der Hühner und Tauben 3 Tage lang gewesene Milzbrandcultur wirkte auf Mäuse nicht lethal, trotzdem sie auf Nährböden gedieh. Die aus der Schwammflüssigkeit hergestellten hängenden Tropfen zeigten im Thermostaten bei 35° eine Entwicklung der Milzbrandbacillen zu langen Fäden, aber ohne Sporenbildung.

Bei Hunden konnte nach Einführung von Schwämmen die Aufnahme der Bakterien durch Leukocyten in grösserem Maasse, als bei Tauben und Hühnern, constatirt werden. Gewöhnlich schon nach 24 Stunden nahm man in den Präparaten eine ziemlich bedeutende Anzahl innerhalb der Leukocyten eingeschlossener Bakterien wahr. Der mit Milzbrandcultur getränkte Schwamm rief eine sehr starke Eiteransammlung hervor. Die Milzbrandbacillen hatten, wie immer im Organismus immuner Thiere, ein anderes Aussehen, als bei Mäusen und Kaninchen; sie waren dünner, liessen sich schlechter färben und befanden sich grösstentheils im Degenerationszustande, besonders am 3. und 4. Tage. Degenerationsformen fanden sich sowohl innerhalb der Leukocyten, als auch ausserhalb derselben. Nachdem die Milzbrandcultur 3 Tage unter der Haut eines Hundes gewesen, führte sie bei weissen Mäusen den Tod nicht herbei, gedieh aber auf Nährböden; die Culturen jedoch trugen in diesem Falle einen Involutionscharakter.

Indem ich die eben beschriebenen Experimente zur Lösung der von mir gestellten Aufgabe unternahm, hatte ich die Absicht, die Erscheinungen der Aufnahme der Bakterien von Seiten der Leukocyten bei Warmblütern, wie bei Kaltblütern, so kennen zu lernen, wie sie von vielen Forschern beschrieben waren.

Für meinen Zweck war es vollständig gleichgültig, an welchem Theil des Organismus die Bacillen mit Leukocyten in Berührung traten. —

Wie wir gesehen haben, kann eine directe Vermischung einer Bakterienkultur mit Leukocyten enthaltender Lymphe kein günstiges Beobachtungsobject abgeben, da dieser Modus im bedeutenden Maasse die vitalen Eigenschaften sowohl der Lymphe, als auch der Leukocyten beeinflusst. Dagegen ist das directe Einführen der Bakterien in den Organismus, — besonders mit Fixirung derselben, — die bequemste Methode, weshalb ich sie auch beibehalten habe.

Bei meinen Versuchen habe ich mich überzeugt, dass die Leukocyten Bakterien aufnehmen, — diese Thatsache ist zweifellos. Frösche und Tritonen sind in dieser Hinsicht am meisten geeignet. Bei Mäusen und Meerschweinchen sahen wir nicht nur nicht, dass die Bakterien von Leukocyten aufgenommen wurden, sondern wir haben nicht einmal eine Ansammlung von Leuko-

cyten an der Einführungsstelle der Bakterien beobachtet. Bei Kaninchen zeigten sich allerdings Leukocyten, aber ohne Bakterien zu enthalten. Aus den Versuchen an Hühnern, Tauben und Hunden, d. h. an Thieren, welche bekanntlich für den Milzbrand unempfindlich sind, hätten wir nach der Theorie von Metschnikoff analoge Erscheinungen erwarten müssen; bei uns war aber der Effect kein gleichartiger. Bei Hunden bildet das Verschlucken der Bakterien durch Leukocyten eine gewöhnliche Erscheinung und findet ziemlich häufig statt, während dieser Vorgang bei Vögeln eine Seltenheit ist, trotz aller Vorsichtsmaassregeln bei der Herstellung der Präparate.

Wir haben gesehen, dass die Bakterien nach der Einführung in Mäuse, Kaninchen und Meerschweinchen und nach ihrer Weiterentwicklung im Organismus derselben verschiedene Farbstoffe gut aufnehmen und sich ebenso färben lassen, wie die aus Reinculturen entnommenen Bakterien, während die Milzbrandbacillen, nachdem sie einige Tage im Organismus immuner Thiere gewesen sind, die Farbstoffe mangelhaft aufnehmen, sich ungleichmässig färben und zuweilen in kleine Körnchen zerfallen. Diese mangelhafte Färbbarkeit der Bakterien ist, nach der Meinung der Forscher, das Resultat des Absterbens derselben im Organismus immuner Thiere (Frösche, Tritonen, Hunde und Hühner), — es sind sogenannte Degenerationsformen. Wie wir früher erwähnt haben, trifft man diese veränderten Formen der Bakterien sowohl in Leukocyten, als auch ausserhalb derselben, und es gelang uns nicht, trotz aller Vorsichtsmaassregeln bei der Behandlung, ein Präparat herzustellen, wo alle Bakterien in Leukocyten eingeschlossen waren. Bei der Untersuchung frischer Objecte kam es zuweilen vor, dass wir Präparate erhielten, wo frei liegende Bakterien nur in sehr geringer Zahl vorhanden, die Leukocyten aber buchstäblich vollgepfropft mit Bakterien waren. In Folge rein optischer Bedingungen konnten irgend welche Veränderungen der Bakterien in den Leukocyten nicht beobachtet werden. Nach Austrocknen und Färben dieser Präparate konnten veränderte Bakterienformen constatirt werden; andererseits ist der Zweifel berechtigt, wie schon erwähnt, ob nicht einzelne veränderte Formen künstlich zu Wege gebracht worden waren. Auf diese Weise bleibt es unbewiesen, ob wirklich die von

Metschnikoff beschriebenen Veränderungen der Bakterien innerhalb der Leukocyten stattfinden; die fixirten Präparate können kaum als ein genügendes Kriterium für den Beweis der in Leukocyten stattfindenden Veränderungen der Bakterien dienen. Wir begreifen, warum so viele verschiedene und entgegengesetzte Schlussfolgerungen gemacht wurden, welche auf den bis jetzt angewandten Beobachtungsmethoden basirten. Der beste Modus zur Beobachtung der Veränderungen der Bakterien innerhalb der Leukocyten wäre ja natürlich die Untersuchung und Beobachtung frischer Objecte. Die Leukocyten der Kaltblüter (der Frösche und Tritonen) geben dazu ein ziemlich günstiges Material, aber ungefärbte Bakterien innerhalb der Leukocyten zu beobachten, ist fast unmöglich. In Folge dessen wandte ich eine neue Methode an, deren Beschreibung den Gegenstand des nächstfolgenden Abschnittes bildet.

---

Bekanntlich behalten einige Gewebe des thierischen Organismus, nach ihrer Behandlung im lebenden Zustande mit Farbstoffen, ihre vitalen Eigenschaften bei und geben uns damit die Möglichkeit, die in ihnen stattfindenden mikroskopischen Veränderungen zu beobachten. Dieser Modus, nemlich das Färben der Objecte in ihrem lebenden Zustande, wurde zur Lösung unserer Aufgabe benutzt.

Der leitende Gedanke des von mir befolgten Verfahrens bestand darin, dass ich die Bakterien in ihrem lebenden Zustande zu färben versuchte und die auf diese Weise gefärbten in Berührung mit Leukocyten brachte. Für die Färbung der Bakterien wandten wir verschiedene Farben an, wählten aber schliesslich als die beste das Methylenblau, in 1procentiger wässriger Lösung. Mit dieser Lösung färben sich die Bakterien sehr gut intensiv blau und bewahren dabei am meisten ihre vitalen Eigenschaften. Wenn die auf diese Weise gefärbten Bacillen auf Nährböden übertragen werden, so gedeihen sie üppig (die Cultur wächst jedoch als farblose). Auf weisse Mäuse verimpft, tödten sie die Thiere etwas später, 3 bis 5 Tage nach erfolgter Infection. Für die Versuche wurden gewöhnlich nur Bacillenformen des Milzbrandes verwandt, — solche, wo die Abwesenheit von Sporen bewiesen war; letztere färben sich im

frischen Zustande mit Methylenblau gewöhnlich nicht. Die Bakterien, welche Eigenbewegung haben, z. B. *Bac. subtilis*, bewahren ihre Bewegungsfähigkeit nach der Färbung noch längere Zeit. —

Das Verfahren der Einführungsweise gefärbter Bakterien war folgendes: Der vorher sterilisirte Schwamm wurde mit einer in physiologischer Kochsalzlösung (0,75 pCt.) suspendirten Reincultur (aus Bouillon, oder besser Agar-Agar) getränkt. Nachdem der Schwamm mit der Cultur genügend getränkt worden war, wurde er der Tasse mit einer geglühten Pincette entnommen und auf denselben mittelst eines Glasstäbchens ein Tropfen Methylenblaulösung aufgetragen (der Schwamm war jetzt dunkelblau gefärbt).

Wenn man nun dem gefärbten Schwamme einen Tropfen Flüssigkeit entnimmt und unter das Mikroskop bringt, so sieht man, dass alle Bakterien intensiv blau gefärbt sind. Der auf diese Weise behandelte Schwamm wurde unter die Haut der Thiere gebracht. Das Thier muss schon früher vorbereitet, die Haut mit einer Sublimatlösung abgespült, der Schnitt gemacht und Ligaturen angelegt sein. Der Rand der Wunde wird mit einer ausgeglühten Pincette erfasst, die Ligatur gelöst und in die Wunde, ohne deren Ränder zu berühren, der gefärbte Schwamm eingeführt, darauf die Ligaturen zugezogen. In bestimmten Zeitabschnitten wurde der Schwamm herausgenommen und sein Inhalt tropfenweise auf Objectgläser ausgepresst. Diese Tropfen wurden mit Deckgläsern, deren Ränder mit Vaseline bestrichen waren, bedeckt; die Deckgläser wurden mit der Nadel sanft gedrückt, damit das Vaseline fester klebe und der Tropfen auf dem Präparat sich gleichmässig vertheile. Die auf diese Weise angefertigten Präparate trocknen nicht aus und können mehrere Stunden beobachtet werden. Die Leukocyten der Kaltblüter (Frösche und Tritonen) blieben bei solcher Beobachtungsart lange lebensfähig (bis zu zweimal 24 Stunden). In den, längere oder kürzere Zeit unter der Haut befindlichen Schwamm wanderte eine grosse Anzahl von Leukocyten, welche gefärbte Bakterien aufnahmen.

Das Protoplasma der Leukocyten war in diesem Falle farblos, die Bacillenformen aber blieben blau gefärbt und lagen in den Leukocyten intracellulär.

Im Besitze solcher Objecte konnten wir ziemlich bequem das Schicksal der in den Leukocyten eingeschlossenen gefärbten Bakterien beobachten. Die Versuche in dieser Richtung wurden mit *Bacillus megatherium* und *Bac. anthracis* angestellt. Es wurden im Ganzen etwa 200 Beobachtungen gemacht, und dieselben in verschiedener Weise modificirt. Ich habe die Absicht, von denselben nur die typischen zu beschreiben:

Versuche mit *B. megatherium*.

Zu den Versuchen wurde eine Reincultur von *B. megatherium*<sup>1)</sup> auf Agar-Agar, in physiologischer Kochsalzlösung (0,75 pCt.) suspendirt, benutzt. Mit dieser Flüssigkeit wurde der sterilisirte Schwamm getränkt und, mit Methylenblau gefärbt, unter die Haut der Frösche eingeführt.

Experiment. — Der mit gefärbten Bakterien getränkte Schwamm wurde in den dorsalen Lymphsack des Frosches eingeführt; nach 24 Stunden entfernt, wurden aus ihm Präparate gefertigt. In den Präparaten war eine grosse Anzahl farbloser lebender Leukocyten, mit blauen Megatheriumstäbchen angefüllt, welche im Protoplasma intracellulär eingeschlossen waren; einige Stäbchen aber lagen in relativ nicht grosser Anzahl ausserhalb der Leukocyten, sie waren ebenfalls gefärbt und zeigten eine geringe Eigenbewegung. Die Zahl der verschluckten Stäbchen in den Leukocyten war sehr verschieden. Einzelne Leukocyten waren vollgepfropft, andere wiesen ein, zwei Stäbchen auf, in mehreren aber konnten keine Stäbchen constatirt werden. Das Protoplasma der Leukocyten änderte mannichfaltig seine Gestalt, indem es bald von dieser, bald von jener Seite Fortsätze aussandte. Die Stäbchen in den Leukocyten änderten ebenfalls mit den Bewegungen des Protoplasma ihre Lage und Form. Bald sahen sie dicker, bald dünner aus, bald wie ein Punkt; bald schien es, als ob sie aus den Leukocyten verschwanden, um wieder in der früheren Gestalt zu erscheinen. Das Bild änderte sich fast jede Secunde vor den Augen des Beobachters. Die Färbung der Stäbchen war mannichfaltig, angefangen von stark gefärbten, fast schwarzblauen, bis zu kaum merklich blau gefärbten; oft waren die in einem und demselben Leukocyten liegenden Stäbchen verschieden gefärbt, die einen dunkler, die anderen heller.

Ausser den Stäbchen fanden sich im Protoplasma der Leukocyten auch runde gefärbte Kügelchen von verschiedener Grösse und verschiedener Färbung — von hellblau bis dunkelblau. Während der Beobachtung veränderten sie ebenso, wie die Stäbchen, ihre Lage zugleich mit der Bewegung des Protoplasma. Viele Leukocyten enthielten weder Stäbchen noch Kügelchen, in anderen traf man nur Stäbchen oder nur Kügelchen. Einzelne Leukocyten zeigten keine Bewegungen und die in denselben eingeschlossenen Bakterien änderten ebenfalls nicht ihren Standort, — das waren todt Leukocyten.

Es wurde eine Masse auf diese Weise hergestellter Präparate durchgesehen und überall stiessen wir auf ein und dasselbe Bild. Nach mehreren Stunden der Beobachtung eines auserlesenen Präparats konnte man wahrnehmen, dass die in den Leukocyten eingeschlossenen Stäbchen sich zu entfärben anfangen, sie wurden blasser, in ihrer Form aber erlitten sie

<sup>1)</sup> Gewöhnlich wurden nur vegetative Formen angewandt, wovon man sich durch vorangehende Untersuchung überzeugte.

keine Veränderungen. Das Präparat wurde unter dem Mikroskop bis zum folgenden Tage liegen gelassen.

Am anderen Tage (nach 25 Stunden) erwies sich bei der Untersuchung des Präparats, dass fast alle Stäbchen aus den Leukocyten verschwunden oder nicht zu sehen waren; nur einzelne Leukocyten enthielten in sehr geringer Anzahl sehr bedeutend blasser tingirte Stäbchen und Kügelchen. Nur wenige Leukocyten zeigten eine Bewegung, die meisten aber waren unbeweglich. Das ganze Präparat war also binnen 24 Stunden entfärbt. Diese Versuche wurden mehrere Male wiederholt und immer erhielten wir dieselben Resultate: die Präparate entfärbten sich fast immer nach 24 Stunden.

Experiment. — Es wurde ein frisches Präparat hergestellt, die Leukocyten waren mit gefärbten Stäbchen angefüllt. Das Präparat wurde im Dunkeln aufbewahrt, um zu sehen, ob nicht das Licht auf seine Entfärbung wirke. Nach 24 Stunden waren fast alle in den Leukocyten eingeschlossenen Stäbchen entfärbt und unsichtbar. Aus diesen mehrfach wiederholten Versuchen schlossen wir, dass das Entfärben der innerhalb der Leukocyten eingeschlossenen Bakterien unabhängig vom Lichte stattfindet.

Experiment. — Dem Frosche ist unter die Rückenhaut ein Schwamm mit gefärbten Stäbchen von *B. megatherium* eingeführt. Nach 24 Stunden wurde der Schwamm herausgenommen, ein frisches Vaselinepräparat hergestellt und unter das Mikroskop gebracht. Im Gesichtsfelde wurde ein Leukocyt, der nur einen *Bacillus megatherium* enthielt, ausgewählt und der weiteren Beobachtung unterworfen. Der Leukocyt war lebend und farblos, sein Protoplasma veränderte beständig seine Form, sandte Fortsätze aus und seinen Bewegungen folgend änderte auch das Stäbchen seine Lage. Zugleich mit der Lage veränderte sich auch das Aussehen desselben, worauf schon oben hingewiesen ist. Bald war es dicker, bald dünner, bald bekam es das Aussehen eines Punktes. Alle diese Veränderungen konnte man auf den ersten Blick für wirkliche Veränderungen des Stäbchens halten, aber nach längerer Beobachtung erwies es sich, dass dies eine optische Erscheinung war, eine Folge der beständigen Bewegung des Protoplasma und der mannichfachen Bewegungen des Stäbchens selbst. Denn nach einiger Zeit erhielt das Stäbchen wieder sein früheres Aussehen und seine frühere Lage.

Zwei Stunden nach Beginn der Beobachtung kam im Protoplasma des Leukocyten ein blauer Punkt zum Vorschein, welcher sich allmählich vergrößerte und im weiteren Verlauf sich als ein blaues Kügelchen von ziemlich correcter Form präsentirte. Dieses Kügelchen lag ganz isolirt vom Stäbchen, welches in dieser Zeit in Nichts sein Aussehen und seine Form verändert hatte. So vergingen noch 3—4 Stunden, und das Stäbchen sowohl, als auch das Kügelchen fuhren fort, ihre Lage im Protoplasma zu ändern. Nach Verlauf von 6—7 Stunden (vom Anfang der Beobachtung) hatte das Kügelchen bedeutend an Volumen zugenommen und eine noch



intensivere Färbung erhalten, das Stäbchen war blasser geworden und seine einzelnen Theile waren ungleichmässig gefärbt. Die einen waren stärker tingirt, die anderen schwächer, ja in einzelnen Theilchen erschien die Farbe ungleichmässig vertheilt; die Contouren Grenzen des Stäbchens waren weniger scharf umschrieben. In Folge dieser ungleichmässigen Färbung erschienen auch die einzelnen Glieder ungleich; die einen dicker, die anderen dünner. Auf die Genauigkeit der Beobachtung war auch die beständige Bewegung des Protoplasma der Leukocyten von Einfluss. Bei der weiteren Beobachtung sahen wir nur die beständig fortschreitende Entfärbung des Stäbchens. Nach 15 Stunden waren die einzelnen Theile des Stäbchens schon kaum zu unterscheiden; das Stäbchen schien aus kleinen Körnchen zusammengesetzt und kaum bläulich gefärbt zu sein. Diese Körnchen entfärbten sich immer mehr, bis man endlich nur einige farblose Körnchen sehen konnte, welche ihrer Lage nach an das Stäbchen erinnerten.

Nach gänzlicher Entfärbung der Körnchen ist ihre Verbindung unter einander gelöst, sie treten deutlicher hervor, sind leichter zu unterscheiden und liegen grösstentheils isolirt. Nach Verlauf von 19 Stunden konnte man trotz sorgfältigster Beobachtung Stäbchen in den Leukocyten nicht mehr bemerken, während das gefärbte Kügelchen in dieser Zeit sich bedeutend vergrössert und eine dunkelblaue, fast schwarze Farbe angenommen hatte. In diesem Moment also konnten wir nur das gefärbte Kügelchen und die im Protoplasma der Leukocyten glänzenden Körnchen sehen. Bei der weiteren Beobachtung bemerkten wir, dass auch das Kügelchen nach 2—3 Stunden blasser zu werden begann und endlich sich ganz entfärbte. 26 Stunden nach Beginn der Beobachtung bewegte sich noch der Leukocyt, jedoch sehr schwach; er war farblos, sein Protoplasma erschien weniger durchsichtig und enthielt nur glänzende, stark lichtbrechende Körnchen.

Bei Wiederholung dieser Versuche erhielten wir im Allgemeinen dieselben Resultate. Der Entfärbungsprozess des im Protoplasma des Leukocyten eingeschlossenen Stäbchens ging in einigen Fällen langsamer, innerhalb 25—28 Stunden vor sich; die Zahl der gefärbten Kügelchen war 2, 3 und mehr, in einigen, wenn gleich auch sehr seltenen Fällen fand die Entfärbung des Stäbchens auch ohne Bildung dieser Kügelchen statt.

Wie aus diesen Untersuchungen hervorgeht, sind diese Kügelchen in keinem Falle das Resultat der Veränderungen des Stäbchens, sondern bilden sich unabhängig vom Stäbchen im Protoplasma und stellen somit den Uebergang des Farbstoffes aus dem Stäbchen in's Protoplasma des Leukocyten dar; der Farbstoff concentrirt sich also hier in Form dieser Bildungen. Diese gefärbten Kügelchen erscheinen ganz plötzlich im Gesichtskreise des Beobachters. — Lässt man die entfärbten Präparate zwei und mehr Tage liegen, so kann man das Verschwinden sämmtlicher Stäbchen aus den Leukocyten constatiren; letztere wiederum zerfallen nach 3 Tagen in eine formlose Masse; in einigen Präparaten entwickeln sich nach Zerfall der Leukocyten von Neuem farblose Exemplare des Bacilli megatherium,

Bei weiterer Fortsetzung dieser Versuche nahmen wir den mit gefärbter Cultur des *B. megatherium* getränkten Schwamm nach 2, 3 und mehr Tagen heraus und beobachteten die Präparate, welche aus der in ihm enthaltenen Flüssigkeit hergestellt wurden. Die Objecte innerhalb der ersten 3 Tage und sogar die des 4. Tages wiesen unter einander keine bemerkbaren Differenzen auf, so dass man bei Durchmusterung solcher Präparate nicht bestimmen konnte, wie viel Tage der Schwamm im Frosche gelegen hatte, so geringe Unterschiede wiesen sie auf. In den am 3. und 4. Tage entfernten Präparaten war anscheinend im Vergleiche zu den früher entnommenen die Zahl der gefärbten Kügelchen grösser; Leukocyten, die nur Kügelchen enthielten, traten häufiger auf; man fand solche Leukocyten gewöhnlich in grösserer Anzahl am 4. und 5. Tage.

In den am 5.—7. Tage entfernten Schwämmen wird die Zahl der Bakterien immer geringer und nach 7 Tagen endlich verschwinden sie ganz, so dass die Präparate, welche aus dem am 8. Tage entfernten Schwamme angefertigt werden, keine Bakterien, aber auch keine gefärbten Kügelchen aufwiesen. Die Leukocyten sind fast alle unbeweglich, sie befinden sich in regressiver Metamorphose und erscheinen grösstentheils in eine feinkörnige Masse zerfallen, so dass zuweilen das Präparat nur einen Detritus darstellt, in dem man mit Mühe einzelne Elemente unterscheiden kann.

#### Versuche mit *B. anthracis*.

Die Beobachtungen mit *B. anthracis* wurden nach derselben Methode und in derselben Richtung, wie die mit *B. megatherium*, ausgeführt. Indem wir aus dem Schwamme, welcher mit gefärbten Milzbrandstäbchen getränkt und verschieden lange im Organismus gewesen war, mit Vaseline bestrichene Präparate anfertigten, konnten wir auch hier die Veränderungen verfolgen, welche in den von Leukocyten aufgenommenen Bakterien stattfinden.

Die Leukocyten nehmen Milzbrandbacillen in verschiedenster Anzahl auf, und da die Milzbrandbacillen ausser isolirten Stäbchen sich auch in langen Fäden darstellen, so konnte man häufig genug einen solchen Faden im Protoplasma des Leukocyten eingeschlossen sehen; der Faden nahm in diesem Falle eine eigenthümlich gekrümmte Form an. Bei Beobachtung des Entfärbungsprozesses der von Leukocyten aufgenommenen Stäbchen trafen wir dieselben Erscheinungen, wie bei den Versuchen mit *B. megatherium*. Das Stäbchen entfärbte sich ebenfalls nach einem gewissen (20 bis 30 Stunden) Zeitraume und zerfiel in kleine Körnchen. Die Bildung gefärbter Kügelchen fand auch hier statt. Hierbei müssen wir jedoch folgende Thatsachen erwähnen: Die Versuche, welche zu verschiedenen Jahreszeiten (im Herbst, Winter und Frühling) gemacht wurden, gaben verschiedene Resultate in Bezug auf die Dauer des Entfärbungsprozesses der innerhalb der Leukocyten befindlichen Bakterien. Die Präparate, welche vom Frosche im Herbst (October und November) angefertigt wurden, entfärbten

sich nach 24 — 22 Stunden, die im Winter hergestellten aber entfärbten sich viel langsamer. Aus Winterthieren erhielten wir die schlechtesten Präparate; die Leukocyten verloren bald ihre vitalen Eigenschaften, — ihre Bewegung hörte auf. Im Frühlinge stellte ich meine Versuche mit ganz frischen (eben gefangenen) Fröschen an, der Entfärbungsprozess ging hier am schnellsten vor sich. Schon nach 18—20 Stunden waren die Präparate vollständig farblos.

Das Entstehen der gefärbten Kügelchen und ihr plötzliches Auftreten im Protoplasma des Leukocyten bietet eine interessante Erscheinung, und bei den Versuchen mit Milzbrandcultur wollten wir uns nochmals darüber klar werden, ob diese Bildungen in Leukocyten entstehen, welche keine Stäbchen enthielten. Aber nach langer und aufmerksamer Beobachtung solcher farbloser, Stäbchen nicht enthaltender Leukocyten konnte das Auftreten dieser Kügelchen nicht constatirt werden; wenn auch Leukocyten vorkamen, die nur Kügelchen enthielten, so musste vorausgesetzt werden, dass der Leukocyt früher ein Stäbchen enthalten habe, welches sich jetzt schon entfärbt hatte. Die vollständige Entfärbung und das scheinbare Zerfallen des Stäbchens im Leukocyten lässt jedoch die Frage aufkommen, ob auch wirklich das Stäbchen aus dem Leukocyt verschwunden oder ob nur seine Anwesenheit daselbst dem Auge nicht sichtbar geworden ist. Wir stellten folgenden Versuch an:

Mehrere frische Präparate mit Leukocyten, welche blaue Milzbrandstäbchen enthielten, wurden bis zum vollständigen Entfärben sich selbst überlassen. Nachdem in den Leukocyten keine Stäbchen wahrzunehmen waren, hoben wir vorsichtig das Deckglas auf und brachten einen Tropfen Methylenblau (in physiologischer Lösung) darauf. In diesem Falle färbten sich die Leukocyten blau mit grünlichem Schimmer, die verschwundenen Stäbchen aber konnten bei dieser Färbung nicht constatirt werden. Wenn man diese entfärbten Präparate austrocknet, fixirt, mit Eosin färbt und darauf nach Gram behandelt, konnte man sehen, dass die Leukocyten keine Milzbrandstäbchen enthielten, obgleich sie vorher in grosser Anzahl vorhanden gewesen waren.

Etwas Anderes <sup>1)</sup> wurde beobachtet in Leukocyten, deren Protoplasma keine Bewegung zeigte, also in todtten Leukocyten. Man konnte wahrnehmen, dass die gefärbten Stäbchen in diesen Leukocyten lange Zeit sich nicht entfärbten; es vergingen 24, 48 Stunden und sogar mehr, das Stäbchen blieb gefärbt. Am zweiten Tage wurde es gewöhnlich bedeutend blasser, behielt jedoch seine frühere Form, ebenso auch der Leukocyt,

<sup>1)</sup> Die Milzbrandstäbchen, welche im lebenden Zustande mit Methylenblau gefärbt werden und im Leukocyten sich befinden, vertragen in den fixirten Präparaten die Färbung nach Gram gut. Nach der Eosinfärbung zeigen einzelne Leukocyten ein körniges Aussehen, d. h. Ehrlich's eosinophile Körnigkeit.

welcher farblos blieb. Nach 24 Stunden wurde der Leukocyt allmählich körnig; sein Protoplasma behielt noch die runde Form, zerfiel aber in kleine Körnchen. Das Stäbchen verschwand in diesem Falle, und an seiner Stelle lagen mehrere kleine Körner, grünlichblau gefärbt. Ein Entstehen von gefärbten Kügelchen, wie es in lebenden Leukocyten beobachtet wurde, fand hier nicht statt.

In anderen Fällen zeigte das im abgestorbenen Leukocyten befindliche Stäbchen andere Erscheinungen. Am zweiten, dritten Tage zerfiel das Protoplasma in eine feinkörnige Masse, das Stäbchen wurde blasser, zerfiel aber nicht, sondern wuchs aus dieser körnigen Masse heraus. Der herausgewachsene Theil des Stäbchens war gewöhnlich farblos, der im Leukocyten steckende aber behielt zuweilen noch einen hellbläulichen Schimmer.

Wenn Leukocyten, welche anfangs bei der Untersuchung lebend gewesen waren und in denen das Stäbchen bereits sich zu entfärben begonnen hatte, abstarben, so ging der Entfärbungsprozess des Stäbchens in der Weise vor sich, wie er für todte Leukocyten oben beschrieben worden ist. Angenommen, wir beobachten einen lebenden Leukocyten, der ein gefärbtes Stäbchen enthält. Letzteres beginnt allmählich blass zu werden, es vergehen 8—10 Stunden, die Bewegungen des Leukocyten hören auf; aber auch das Stäbchen hört auf sich zu entfärben; es vergeht ein Tag und mehr, aber es bleibt noch gefärbt. Fuhr dagegen der Leukocyt sich zu bewegen fort, so war das Stäbchen nach 20—28 Stunden gänzlich entfärbt und zerfallen. Nehmen wir zu verschiedenen Zeiten den Schwamm aus dem Frosche heraus, so sehen wir, dass die Milzbrandstäbchen in den ersten zwei Tagen gewöhnlich in grosser Anzahl von den Leukocyten aufgenommen sind, frei dagegen finden sie sich in relativ sehr geringer Anzahl. Am 3.—4. Tage ist die Zahl der in Leukocyten befindlichen Stäbchen eine geringere, als an den ersten 2 Tagen; dabei kommen auch freiliegende blau gefärbte Stäbchen vor. Am 3.—5. Tage fällt besonders die grosse Anzahl blauer Kügelchen auf. Am 5. und 6. Tage ist die Zahl der Milzbrandstäbchen gering, auch nimmt allmählich die Zahl der gefärbten Kügelchen ab. Am 7.—8. Tage stellt die aus dem Schwamme gepresste Flüssigkeit grösstentheils eine kleinförmige Masse von zerfallenen Individuen dar, Bakterien aber fehlen (Prozess, ähnlich demjenigen beim *M. megatherium*).

Bei Entnahme des Schwammes in den ersten Stunden nach seiner Einführung unter die Haut haben wir beobachtet, dass hier die Leukocyten erst nach 4—5 Stunden auftreten. Gewöhnlich fehlen in den ersten Stunden die Leukocyten im Schwamme ganz; erst nach 5 Stunden vermehren sie sich allmählich und wir sehen in den Leukocyten schon aufgenommene Bakterien. Bei der Untersuchung geht der Entfärbungsprozess und das Zerfallen der Stäbchen innerhalb der Leukocyten auch in diesem Falle innerhalb 20—28 Stunden vor sich. Die, gefärbte Stäbchen enthaltende Flüssigkeit aus dem Schwamme giebt, wenn sie sogar 4—5 Tage unter

der Haut des Frosches gewesen ist, auf Nährmedien, sowie auf hängende Tropfen verimpft, Milzbrandculturen. Die Impfungen weisser Mäuse aus ein- und zweitägigen Schwämmen verursachen den Tod dieser Thiere; bleiben die Schwämme länger liegen, so bleiben auch die Impfungen meist wirkungslos. Die in hängenden Tropfen entwickelten Milzbrandstäbchen ergaben in diesem Falle Krüppelformen.

Analoge Experimente mit *B. anthracis* wurden auch an Tritonen ausgeführt; diesen Thieren wurden ebenfalls Schwämme mit gefärbten Milzbrandstäbchen eingeführt. Hierbei wurden ähnliche Erscheinungen beobachtet, nur ging das Verschwinden der Stäbchen schneller vor sich. Gewöhnlich waren schon nach 2 Tagen in den Leukocyten meist nur blau gefärbte Kügelchen, dagegen Bakterien in sehr geringer Anzahl zu sehen. Am 3.—4. Tage enthielt die aus dem Schwamme ausgepresste Flüssigkeit todte Leukocyten, welche sich theils im Zerfallstadium befanden, theils der Vacuolisation anheimfielen; zuweilen wurde auch eine fremde Cultur beobachtet. Die Uebertragung der Schwammflüssigkeit auf Nährböden brachte erst nach 24 Stunden eine Entwicklung der Milzbrandstäbchen hervor; nach 48 Stunden jedoch geschah dies nur selten. Die geimpften Mäuse blieben meistens am Leben.

Bis jetzt beschrieben wir die Erscheinungen, welche in den von Leukocyten aufgenommenen Stäbchen vor sich gingen; von freiliegenden, nicht aufgenommenen sprachen wir nur beiläufig. Es interessirten uns jedoch auch die in den Präparaten freiliegenden Stäbchen. Die in frischen Präparaten vorkommenden, nicht aufgenommenen Stäbchen und zuweilen sogar ganze Fäden des *B. anthracis* waren, wie die in Leukocyten befindlichen, blau gefärbt. Die einen hatten ein normales Aussehen mit leicht unterscheidbaren Einzelheiten, in den anderen war der Involutionscharakter ausgeprägt, sie waren dicker, ihre Enden aufgetrieben und die Glieder schwer zu sehen. Einzelne Fäden zeigten eine sehr feine Zerklüftung in einzelne Theilchen, welche nicht immer gleiches Aussehen hatten und Körnern ähnelten. Zuweilen waren freiliegende Stäbchen in sehr kleine hellblau gefärbte Körnchen zerfallen, so dass sie ihrem Aussehen und ihrer Farbe nach an die von Leukocyten in verschiedenen Entfärbungs- und Zerfallstadien aufgenommenen Stäbchen erinnerten. Wenn man ein isolirtes Stäbchen oder einen freiliegenden Milzbrandfaden im Gesichtsfelde fixirt und ihr Schicksal ebenso verfolgt, wie das mit dem von Leukocyten aufgenommenen Stäbchen geschah, so sieht man das Stäbchen nach einer bestimmten Zeit blasser werden und darauf nach 2—3 Tagen in kleine Körnchen zerfallen, welche grösstentheils grünlich gefärbt sind; oder das Stäbchen wächst in einen langen Faden aus, wobei letzterer gewöhnlich den Involutionscharakter trägt. Das Zerfallen des Stäbchens ausserhalb der Leukocyten geht also viel langsamer vor sich, als innerhalb der Leukocyten.

Experimente mit *B. amylobacter*.

Um eine Cultur des *B. amylobacter* herzustellen, schneidet man gewöhnlich eine Kartoffel in Scheiben, legt sie in ein nicht zu hohes Glasgefäss, giesst bis zum Rande Wasser hinein und bedeckt es. Nach einigen Tagen entwickeln sich auf der unteren Fläche der Kartoffelscheibe Stäbchen verschiedener Grösse (es sind Anaëroben), welche sich bei endosporener Entwicklung in einer schwachen Jodlösung blauviolett färben.

Experiment. — Mit der Cultur des *B. amylobacter* wurde ein sterilisirter Schwamm getränkt, mit Methylenblau gefärbt und unter die Haut eines Frosches gebracht. Nach 24 Stunden wurde der Schwamm herausgenommen und es wurden frische Vaselinepräparate angefertigt. Die Bakterien waren blau gefärbt, lagen grösstentheils in Leukocyten und färbten sich mit Jod braun; die Leukocyten aber färbten sich mit Jod gelb.

Experiment. — Zwei Fröschen wurde unter die Haut *Amylobacter*cultur, aber nicht gefärbt, eingeführt, da es von Interesse war, zu erfahren, wie sich die von Leukocyten aufgenommenen Bakterien zu Jod verhalten. Am anderen Tage wurde der Schwamm entnommen. In frischen Präparaten waren Stäbchen in den Leukocyten nicht zu sehen, die ausserhalb liegenden gut sichtbar. Nach Hinzufügung von Jod färbte sich die Stärke, welche zufällig in den Schwamm gerathen war, blauviolett, die Leukocyten gelb; jedoch waren Bakterien in letzteren nicht sichtbar. Freiliegende Bakterien färbten sich ebenfalls nicht blauviolett, sondern wurden entweder gelb oder blieben farblos; die zur Controle auf Kartoffeln gefärbten nahmen blauviolette Farbe an.

Da sich in den Präparaten die freiliegenden *B. amyl.* auch nicht mit Jod färben, so entsteht die Frage, ob nicht das Plasma des Blutes selbst auf sie modificirend wirkt. Um dies zu prüfen, wurde Froschplasma genommen und *B. amylobacter* 24 Stunden hineingethan. Nach Verlauf dieser Zeit liessen auch diese sich nicht blauviolett färben.

## Experiment mit Lakmus.

Nach den Beobachtungen von Metschnikoff produciren das Protoplasma der Plasmodien, Infusorien und Amöben, sowie auch die uninucleären Leukocyten der Tritonen ein sauerreagirendes Ferment, aus welchem Grunde von ihnen aufgenommene blaue Lakmustheilchen eine rothe Färbung annehmen. Wir stellten folgende Versuche an: Mehreren Fröschen wurde unter die Haut ein mit einer physiologischen Kochsalzlösung, die feinen gepulverten blauen Lakmus enthielt, getränkter Schwamm eingeführt. Nach Verlauf von 24 Stunden waren in den Schwamm Leukocyten eingewandert und nahmen Lakmusstückchen auf. Frische Präparate zeigten in der That die Aufnahme von Lakmusstückchen durch Leukocyten, aber unsere Folgerungen sind andere, als die von Metschnikoff. Größere Lakmusstückchen schimmerten in's Bläuliche, die feineren in den Leuko-

cyten eingeschlossenen aber waren farblos. Wenn letztere auch zuweilen einen bläulichen oder röthlichen Schimmer hatten, so war es eine optische Erscheinung, bedingt durch Brechung des Lichts (Diffraction).

#### Experimente an Warmblütern.

Nachdem wir nun die Veränderungen der gefärbten Bacillen in den Leukocyten der Kaltblüter beobachtet hatten, machten wir dieselben Experimente auch an Warmblütern. Hier wurde ganz ebenso der sterilisirte Schwamm mit Milzbrandcultur getränkt, mit der Methylenblaulösung gefärbt und dem Thiere eingeführt. Da wir jedoch bei den Fröschen den Schwamm in den Lymphsack einführten, so mussten wir auch hier ein analoges Organ — die Bauchhöhle — wählen.

Experiment. — Einem ausgewachsenen Hunde wurde sein Fell auf dem Bauche unter dem Nabel rasirt, die entblösste Fläche mit Seife und Sublimatlösung abgewaschen. Der Einschnitt, 4—6 cm lang, wurde auf der Linea alba gemacht und das Bauchfell, wie üblich, eröffnet. Nach Durchschneidung des Bauchfells wurden durch Bauchfell und Haut seidene Ligaturen gezogen, die Wunde mit Sublimatgaze trocken abgewischt und nach Stillung der Blutung (welche sehr bedeutend war) der Schwamm mit gefärbten Milzbrandstäbchen in die Bauchhöhle eingeführt; der Schwamm war an einen Seidenfaden befestigt, dessen Enden frei aus der Wunde hervoringen, die Ligaturen wurden zugezogen und die Hautwunden vernäht. Nach 24 Stunden wurde die Wunde geöffnet und der Schwamm am Seidenfaden aus der Bauchhöhle herausgenommen. Aus der ausgepressten Flüssigkeit wurden frische, mit Vaseline bestrichene Präparate hergestellt. Die mikroskopische Untersuchung dieser Präparate wies eine Menge von Leukocyten, Bacillen und Fäden von *B. anthracis*, welche jedoch farblos waren, auf; sie hatten sich entfärbt und nur einzelne von ihnen hatten einen bläulichen Schimmer. Gefärbte Stäbchen waren innerhalb der Leukocyten nicht vorhanden und es wurden die Erscheinungen, welche wir bei Fröschen gesehen hatten, nicht beobachtet. Obgleich wir diese Versuche mehrfach wiederholten, erzielten wir doch immer die gleichen ungünstigen Resultate.

Die Versuche an Kaninchen, Meerschweinchen, Mäusen und Tauben zeigten ebenfalls, dass gefärbte Bakterien, welche diesen Thieren im Schwamme eingeführt waren, sich nach 24 Stunden vollständig entfärbten. Diese Methode also (die Einführung des Schwammes) erwies sich bei Warmblütern als untauglich.

Wir änderten daher unsere Beobachtungsmethode. Die Milzbrandcultur wurde zwischen zwei Deckgläser gelegt, und damit diese nicht fest an einander kleben, wurden zwischen dieselben dünne Papierstreifen oder Seidenfäden gebracht; diese Gläser wurden mit einem Seidenfaden zusammengebunden und darauf in die Bauchhöhle eingeführt. Nach längerer oder kürzerer Zeit wurden sie wieder entfernt und der mikroskopischen Untersuchung unterworfen.

**Experiment.** — Einem ausgewachsenen Hunde wurde die Bauchhöhle eröffnet und die zusammengebundenen Deckgläser mit der in ihnen eingeschlossenen Milzbrandcultur eingeführt; die Fäden der letzteren waren frei von Sporen und in Methylenblau gefärbt. Nach Verlauf von 24 Stunden wurde die Wunde geöffnet; aus der Bauchhöhle wurden die Gläser entnommen und unter das Mikroskop gelegt. Die Untersuchung zeigte zwischen den Gläsern, sowohl in der Peripherie, als theilweise auch im Centrum eine Ansammlung von Leukocyten. Die blaue Färbung der Bacillen war fast gänzlich geschwunden, nur einzelne Stäbchen hatten einen bläulichen Schimmer. Von Leukocyten aufgenommene Bacillen gelang es fast gar nicht wahrzunehmen. Die Milzbrandcultur erschien in dem Präparate theils in Form sehr kleiner Stäbchen (die letzteren waren nur in geringer Anzahl vertreten); andererseits zeigte der grösste Theil der langen, freiliegenden Fäden Theilungserscheinungen, so dass es dem Aussehen nach schwer zu unterscheiden war, ob wir es hier mit einer arthrosporen Theilung besonderer Art (in einem anderen Nährmedium) oder mit einem beginnenden Zerfallprozess zu thun hatten. Um das zu ergründen, wurden von derjenigen Stelle des Gläschens aus, an der sich am meisten Bakterien in diesem Zustande fanden (im Centrum), weisse Mäuse geimpft und auch Culturversuche auf Nährböden gemacht. Die Maus starb nach Verlauf von 46 Stunden, das aus dem Herzen entnommene Blut enthielt Milzbrandbacillen. Auf dem Nährboden (Gelatine) wuchs eine Cultur.

**Experiment.** — Da die Milzbrandbacillen in Hunden sich schnell entfärben, so wurden ungefärbte Milzbrandfäden eingeführt. Die Gläser wurden aus der Bauchhöhle eines ausgewachsenen Hundes nach 48 Stunden entfernt. Die Anzahl der Leukocyten war eine ziemlich bedeutende im ganzen Präparate, verschluckte konnten jedoch nicht wahrgenommen werden, dagegen waren die Leukocyten voll glänzender Körnchen. — Die Milzbrandstäbchen und Fäden stellten auch hier den feinen Spaltungsprozess, jedoch noch ausgeprägter, als im vorhergehenden Experimente, dar. Solche Versuche wurden mehrere (6) angestellt. In einigen (4) Fällen bewirkte die Uebertragung von den Gläsern auf Nährmedien das Gedeihen der Milzbrandcultur und den Tod der Maus; in anderen Fällen (2) aber starben die Thiere nicht und Culturen entwickelten sich auch nicht (in diesen beiden Fällen hatten sich fremde Culturen eingefunden). Wir trockneten und färbten diese Präparate und sahen die Milzbrandfäden und Stäbchen grösstentheils verändert, sehr wenige von ihnen lagen im Protoplasma von Leukocyten.

**Experiment.** — Einem ausgewachsenen Hunde wurden in die Bauchhöhle Gläser mit Milzbrandfäden eingeführt. Am 3. Tage wurden die Gläser entfernt. Unter dem Mikroskope erwiesen sich in dem Präparate die Milzbrandfäden in kleine Körnchen zerfallen, welche reihenweis dalagen und ihrer Lage nach völlig an Fäden erinnerten. Die Leukocyten befanden sich sowohl an den peripherischen Theilen (hier mehr), als auch im Centrum des Präparats und lagen zwischen den zerfallenen Fäden. Wir konnten klar



beobachten, dass dieses Zerfallen der Milzbrandfäden ohne jegliche Aufnahme durch Leukocyten stattgefunden hatte. Die Leukocyten waren mit Körnchen angefüllt, welche ihrem Aussehen nach an die Körnchen zerfallener Bakterien erinnerten. Die Impfversuche gaben in diesem Falle ein negatives Resultat; die Maus blieb am Leben und auf den Nährmedien gedieh keine Cultur.

Nachdem wir mehrere (5) solcher Versuche angestellt hatten, hielten wir es für unnöthig weiterzugehen. Es war klar, dass die Milzbrandfäden in den ersten Tagen im Organismus des Hundes, eines gegen diese Bakterienart immunen Thieres, also unter ungünstigen Ernährungsbedingungen, Erscheinungen von anthrosporer Theilung hervorrufen; die Milzbrandbakterien waren in diesen Fällen noch am Leben und bei Versetzung in günstigere Verhältnisse entwicklungsfähig. Aber diese Spaltung führte nicht zu einer weiteren Entwicklung der Milzbrandstäbchen, sondern zu ihrem Zerfall in kleine Körnchen, was wir auch bei den letzten Experimenten sahen. Ob ein solches Zerfallen der einzelnen Milzbrandstäbchen innerhalb von Leukocyten stattfand, vermochten wir nicht zu beobachten, wie uns das an Kaltblütern gelang. Diese Experimente an Hunden stellten also fest, dass die Milzbrandfäden im Organismus eines immunen Thieres ohne Zuthun der Leukocyten und ohne dass sie von ihnen aufgenommen werden, zerfallen können.

Junge Hunde von 2—3 Monaten verhalten sich jedoch zu den Milzbrandbakterien anders, sie sind meist empfänglich für letztere und gehen unter Erscheinungen einer Allgemeininfektion zu Grunde. Die in ihre Bauchhöhle gebrachten Gläser mit Milzbrandcultur zeigten ebenfalls eine grosse Ansammlung von Leukocyten, aber ein Zerfallen der Bakterien, wie wir es bei ausgewachsenen Hunden gesehen, gelang es hier nicht zu beobachten. In Trockenpräparaten färbten sich die Bakterien vorzüglich und nur ein sehr geringer Theil derselben war verändert. Die Aufnahme von Bakterien durch Leukocyten wurde auch bei jungen Hunden beobachtet, aber in sehr geringem Maasse. Trotz der grossen Anhäufung der Leukocyten (ebenso viel wie bei ausgewachsenen Hunden) in den Präparaten gingen die jungen Hunde gewöhnlich schnell an der Allgemeininfektion durch Milzbrand zu Grunde. Das aus ihren Herzen entnommene Blut wies gewöhnlich eine grosse Anzahl von Milzbrandstäbchen mit Vermehrungserscheinungen auf. Die Uebertragung von den Gläsern auf Nährmedien und Mäuse gab ebenfalls positive Resultate.

Eben solche Experimente stellten wir auch mit Kaninchen an, welche für Milzbrand empfänglich sind.

Experiment No. 1. Einem ausgewachsenen Kaninchen wurden Gläser mit Milzbrandcultur in die Bauchhöhle eingeführt. Nach 48 Stunden wurden sie entfernt. In dem Präparate war eine Ansammlung von Leukocyten sichtbar, welche grösstentheils an der Peripherie, theils auch im Centrum lagen; Milzbrandstäbchen waren in grosser Anzahl vorhanden (daneben hatten sich auch fremde Culturen angefündet). Bei der Färbung war keine Aufnahme der Bacillen zu bemerken und ebenso wenig ein Zerfall der Stäbchen. Die

Uebertragungen auf Nährmedien und Mäuse gaben positive Resultate; das Kaninchen ging an Allgemeininfektion zu Grunde.

Experiment No. 2. Einem Kaninchen wurde Milzbrandcultur zwischen zwei Gläsern eingeführt, die Cultur war auf das ganze Präparat vertheilt. Nach 3mal 24 Stunden wurde sie herausgenommen. Die mikroskopische Untersuchung wies eine grosse Ansammlung von Leukocyten nach, grösstentheils an der Peripherie, aber auch in bedeutender Anzahl im Centrum des Präparats. Die Leukocyten lagen mit Milzbrandbacillen gemischt, eine Aufnahme fehlte; die Stäbchen zeigten Vermehrungserscheinungen. Das Kaninchen starb an Allgemeininfektion an demselben Tage.

Experiment No. 9. Einem grossen schwarzen Kaninchen wurde zwischen 2 Gläsern Milzbrandcultur eingeführt; dieselbe befand sich in sehr geringer Menge im Centrum des Präparats und zwar in Form eines kleinen Tropfens (die Milzbrandcultur von Agar-Agar wurde in physiologischer Lösung gut umgeschüttelt). Das Präparat wurde nach 3mal 24 Stunden aus der Bauchhöhle entfernt. Die Leukocyten hatten sich ausnahmslos an der Peripherie der Präparate angesammelt, im Centrum waren sie fast gar nicht vorhanden, nur einzelne weisse Blutkörperchen zeigten sich dort. Milzbrandfäden waren nicht vorhanden, es wurde nun ein körniger Zerfall und eine fremde Cultur (in Form von Stäbchen mit abgerundeten Enden) beobachtet. Nach der Gram'schen Färbung wurden keine Stäbchen constatirt. Augenscheinlich waren die Stäbchen aus Mangel an Nährmaterial, da sie weit im Centrum des Präparats lagen, und der Zufluss von Blutplasma erschwert war, zerfallen, vielleicht auch in Folge der Einwirkung der fremden Cultur. Uebertragungsversuche auf Mäuse, sowie auf Gelatine ergaben negative Resultate, Culturen entwickelten sich nicht. Das Kaninchen ging am 8. Tage zu Grunde, das Cadaver war sehr abgemagert und im Blute konnten keine Milzbrandstäbchen gefunden werden.

Experiment 10. — Einem grossen Kaninchen wurde Milzbrandcultur ebenso, wie im Experiment 9, eingeführt. Nach 3mal 24 Stunden wurden die Gläser aus der Bauchhöhle entfernt. Leukocyten waren in grosser Anzahl vorhanden, Bakterien wenig; unzweifelhaft stellten die Stäbchen Involutionsformen dar. Die Leukocyten waren in sehr grosser Anzahl mit glänzenden Körnern angefüllt. Das Präparat zeigte ein, dem bei Hunden gewonnenen ähnliches Bild; die Leukocyten, mit Körnchen angefüllt, hatten hier dasselbe Aussehen, wie bei Hunden. Eine Maus und Nährgelatine wurden geimpft; die Maus blieb am Leben, auf der Nährgelatine gedieh keine Milzbrandcultur. Eines von den aus einander genommenen Gläsern wurde mit Methylenblau (in physiologischer Lösung) im frischen Zustande gefärbt, — die Bakterien färbten sich nicht. Die Körner innerhalb der Leukocyten erinnerten dem Aussehen nach an Fett, deshalb wurde das Präparat mit Osmiumsäure gefärbt, — die Körnchen färbten sich nicht. Das Kaninchen ging am 14. Tage zu Grunde und in dem aus dem Herzen entnommenen Blute wurden keine Milzbrandbacillen gefunden. —

An Kaninchen wurden im Ganzen 10 Experimente angestellt. Von ihnen starben 8 an Allgemeininfektion in Fällen, wo zwischen die Gläser viel von der Milzbrandcultur gelegt war; zwei Kaninchen aber, bei denen, wie wir gesehen, nur eine minimale Menge der Cultur in's Centrum des Präparats placirt war, blieben am Leben (Experiment 9 und 10). In den 8 Experimenten, wo die Kaninchen starben, war die Ansammlung von Leukocyten immer eine bedeutende; sie wären jedoch nicht so körnig, wie die vom 9. und 10. Experiment; die Aufnahme von Milzbrandstäbchen fehlte, wie wir gesehen. Im 9. und 10. Experimente war ebenfalls keine Aufnahme der Stäbchen zu constatiren, sie waren augenscheinlich aus Mangel an Nahrung zerfallen, und ihre Zerfallproducte waren von den Leukocyten, wie wir es auch bei Hunden gesehen, aufgenommen.

Der beim 10. Experiment entstandene Zweifel, ob diese glänzenden Körner nicht Fett seien, und die Färbungsergebnisse mit Osmiumsäure verpflichteten uns, um uns genau zu überzeugen, mehrere solcher Versuche an Hunden und Fröschen anzustellen (obgleich wir bei den letzteren unmittelbar das Zerfallen der Bakterien in einzelne Körnchen wahrgenommen hatten). Bei der Färbung der Präparate, sowohl der von Hunden, als auch der von Fröschen, mit Osmiumsäure und Cyanin wurden negative Resultate erhalten, — die Körner stellten keine Fettbildungen dar.

In unseren Experimenten an Warmblütern konnten wir die Veränderungen der Bakterien in den Leukocyten nicht unmittelbar verfolgen. Gefärbte Bakterien entfärbten sich, wie wir gesehen, schnell im Organismus der Warmblüter, und innerhalb von Leukocyten waren sie nicht zu sehen. Andererseits verlieren auch die Leukocyten selbst, welche sich durch geringe Grösse auszeichnen, sobald sie aus dem Organismus, aus ihrem normalen Verhältniss, herausgebracht werden, sehr rasch ihre vitalen Eigenschaften und zeigen keine Bewegungen mehr. Unzweifelhaft ist uns nur die eine Thatsache, dass bei Hunden und Kaninchen (unter gewissen Bedingungen des Experiments) die Milzbrandbakterien unabhängig von den Leukocyten zerfallen können; ob ein gleiches Zerfallen innerhalb der letzteren stattfindet, vermochten wir nicht zu beobachten. Die Bilder, welche sich uns in den Präparaten von Hunden und Kaninchen ergaben, waren einander ziemlich ähnlich. Bei beiden Thieren war eine Ansammlung der Leukocyten, die Bedingungen des Experiments und die mikroskopische Gruppierung der Elemente gleich; dennoch entwickelte sich bei Kaninchen und jungen Hunden der Milzbrand und tödtete die Thiere. Bei ausgewachsenen Hunden aber zerfiel die Cultur und die Thiere blieben am Leben. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass wir, ohne die Möglichkeit des Zerfallens der Bakterien unter dem Einflusse von Leukocyten in Abrede zu stellen, noch weitere Bedingungen im Thierorganismus suchen müssen, und zwar den Einfluss seiner flüssigen Elemente. Zu diesem Zweck machten wir folgende Versuche:

## Versuche mit Einführung von Bakterien in die Blutbahn.

Die von verschiedenen Forschern angestellten Versuche weisen darauf hin, dass frisches Blut bei Entnahme aus dem thierischen Körper und sogar Blutserum die Eigenschaft besitzt, pathogene Bakterien zu vernichten, und dass es diese Fähigkeit mehrere Stunden lang bewahrt. Die Schlüsse jedoch, die auf Grund dieser Versuche gemacht worden sind, können kaum für richtig angesehen werden, da bekanntlich das Blut, nachdem es dem Organismus entnommen ist, zweifellos seine physiologischen Eigenschaften verliert und deshalb sein Einfluss auf Bakterien jetzt ein anderer sein wird, als innerhalb des Organismus selbst. In Folge dessen schien es uns nothwendig, Versuche anzustellen hinsichtlich der Einwirkung intravasculären Blutes auf pathogene Bakterien. Die Erfahrung zeigt, dass das Blut, wenn man ein Blutgefäß an zwei Stellen in gewisser Entfernung von einander unterbindet, in diesem Abschnitte lange nicht gerinnt, denn es behält durch Berührung mit den Gefäßwänden seine physiologischen Eigenschaften bei. Auf Grund dieser Thatsache wurde folgender Versuch angestellt:

Einem ausgewachsenen Hunde wurde auf der rechten Seite des Halses die subcutane Vena jugularis blossgelegt und von dem anliegenden Gewebe abpräparirt. Dann wurden in einiger Entfernung von einander zwei Ligaturen angelegt. Die obere Ligatur wurde zuerst geschlossen; dadurch fiel die Vene zusammen; darauf wurde in der Nähe der unteren Ligatur die Nadel einer Koch'schen Spritze eingestochen und die Vene zusammen mit der Nadel vermittelst der unteren Ligatur geschlossen. Die Spritze enthielt eine in physiologischer Kochsalzlösung suspendirte Milzbrandcultur.

Nach Einspritzung einiger Tropfen dieser Flüssigkeit wurde die Nadel entfernt und die Ligatur fest zusammengezogen. Darauf wurde die obere Ligatur ein wenig gelockert und der Gefäßabschnitt füllte sich wiederum mit Blut; nach genügender Anfüllung wurde die obere Ligatur fest zusammengezogen und die Wunde vernäht. Nach Verlauf von 48 Stunden wurde die Wunde, welche per primam intentionem geheilt war, geöffnet und dem Gefäß mit der Pasteur'schen Pincette Blut entnommen.

In frischen Präparaten sahen wir, dass die rothen Blutkörperchen ein normales Aussehen hatten. Leukocyten waren wenig vorhanden (wie es im normalen Blute der Fall ist); die Bakterien waren in geringer Anzahl vorhanden und stellten Involutionsformen dar. Bei der Färbung der Trocken-

präparate erschienen die Bakterien in kleine Körnchen zerfallen (Degenerationserscheinung); der Hund blieb am Leben.

Das Experiment wurde mit demselben Resultate wiederholt. Die Uebertragung auf die Maus gab negative Resultate, auch gedieh keine Cultur.

Experiment. — Bei einem ausgewachsenen Kaninchen wurde dieselbe Operation, wie beim Hunde, an der Vena jugularis gemacht. Nach 2 Tagen wurde ebenfalls die Wunde geöffnet und aus dem Gefässabschnitt mit der Pincette Blut entnommen. In frischen Präparaten erschien das Blut unverändert, Leukocyten waren nur wenige, Bakterien jedoch in grosser Anzahl vorhanden. Die Milzbrandbakterien hatten das normale Aussehen und zeigten Spuren arthrosporer Vermehrung, wie dies im Blute für Milzbrand empfänglicher Thiere stattfindet. In Trockenpräparaten färbten sich die Bakterien prächtig nach Gram'scher Methode und wiesen keine Erscheinungen des Zerfalls auf. Das Kaninchen ging an allgemeiner Milzbrandinfection zu Grunde.

Das Experiment wurde wiederholt und ergab dasselbe Resultat.

Auf Grund dieser Experimente haben wir das Recht zu folgern, dass bei Hunden — Thieren, welche immun gegen Milzbrand sind — die Bakterien ohne Mitbetheiligung der Leukocyten zerfallen können; wahrscheinlich ist dies durch das besondere chemische Verhalten des Hundebutes bedingt. Bei Kaninchen hingegen, deren Blut für den Milzbrand einen guten Nährstoff darbietet, entwickeln sich die Bakterien.

Aus früheren Beobachtungen ist bekannt, dass, wenn man in's Blut irgend einen Farbstoff (Zinnober) in Pulverform einspritzt und darauf eine Entzündung der Hornhaut des zum Experiment dienenden Thieres in der vorderen Augenkammer hervorruft, Leukocyten erscheinen, welche mit diesem Farbstoff beladen sind. Diese Thatsache berücksichtigend habe ich folgenden Versuch gemacht: — Mehreren Fröschen wurde in die Vene auf dem Bauche eine mit Methylenblau gefärbte Megathieriumcultur in physiologischer Lösung, ungefähr 0,1 g, eingespritzt. Unter die Rückenhaut wurde ferner ein sterilisirter Schwamm ohne jegliche Cultur eingeführt. Nach 24 Stunden entnahm ich den Fröschen Blut und fertigte frische Präparate an. Unter dem Mikroskope konnte man Leukocyten mit aufgenommenen blau gefärbten Körnern (in einzelnen auch Stäbchen) wahrnehmen; freie Bakterien gelang es nicht in diesen Präparaten zu sehen. Der am anderen Tage entnommene Schwamm war mit einem gallertigen Exsudat bedeckt. Die aus demselben ausgepresste

Flüssigkeit zeigte in frischen Präparaten eine grosse Menge von Leukocyten, von denen einige mit blau gefärbten Körnern und Stäbchen angefüllt waren. Aus diesen Experimenten ist zu folgern, dass die Bakterien, in die Blutbahn eingespritzt, von Leukocyten aufgenommen werden, welche nach der Aufnahme in die Lymphhöhlungen, welche entzündungserregenden Reizen unterworfen worden waren, emigriren konnten, was auf eine volle Analogie mit den Versuchen, in denen Farbstoffe in die Blutbahn eingeführt wurden, hinweist.

Indem wir die Aufgabe stellten, die Aufnahme der Bakterien durch Leukocyten bei verschiedenen Thieren zu untersuchen, und wir den Methoden, welche schon früher in dieser Richtung vorgeschlagen waren, folgten, waren die von uns erhaltenen Resultate (in der ersten Serie unserer Versuche) gleichlautend mit den Beobachtungen vieler Forscher. Zweifellos erscheint uns die Thatsache, dass die Leukocyten gewisser Thiere die Milzbrandbacillen (ein Mikroorganismus, welcher uns als Hauptobject unserer Arbeit diente) und andere Bakterien aufnehmen. Allein diese Aufnahme tritt nicht in gleichem Maasse bei allen Thieren zu Tage. Bei Mäusen, Meerschweinchen und Kaninchen haben wir eine Aufnahme der Milzbrandstäbchen nicht beobachtet. Bei Fröschen und besonders bei Tritonen wird die Aufnahme der Bakterien sehr oft und in sehr prägnanter Weise, besonders bei den letzteren, beobachtet. Bei Hunden (Thieren, welche gegen Milzbrand immun sind) findet die Aufnahme viel seltener statt und auch in geringerem Maasse, als bei Kaltblütern. Bei Hühnern und Tauben dagegen — auch gegen Milzbrand immunen Thiere — wurden Bakterien innerhalb von Leukocyten äusserst selten, fast kann man sagen, nur zufällig angetroffen. Alle solche Resultate erhielten wir bei gleicher Anordnung der Versuche, bei gleicher Behandlung der Präparate, unter Beobachtung aller dazu nöthigen Vorsichtsmaassregeln. — Andererseits sahen wir (in der ersten Serie unserer Versuche), was schon von den früheren Forschern beobachtet worden war, dass die Bakterien in empfänglichen Thieren sich vermehren und den Organismus (Mäuse, Meerschweinchen, Kaninchen) tödten, in immunen Thieren aber nach kürzerer oder längerer Zeit zerfallen und die Formen annehmen, welche man als Degenerationsformen beschreibt. Indem

wir das verschiedene Aussehen der degenerirten Bakterien und ihr Verhalten gegenüber den Leukocyten studirten, konnten wir in keinem Falle auf Grund unserer fixirten Präparate sagen, wie es Metschnikoff und andere thun, dass diese Formen ausnahmslos nur unter dem Einfluss der Leukocyten entstanden seien. Dieselben fanden sich sowohl innerhalb von Leukocyten, als auch ausserhalb derselben. Jedenfalls kann man bei diesen Untersuchungsmethoden, worauf wir schon früher hinwiesen, keinesfalls beweisen, dass die einzelnen Formen der veränderten Bakterien in einem gewissen genetischen Zusammenhange unter einander stehen, und dass die Gradation der Veränderungen, wie sie Metschnikoff beschreibt, in Wirklichkeit existirt. Wir müssen hier auch der künstlichen Behandlung einen gewissen Einfluss zuschreiben und vielleicht auch der Einwirkung der Reagentien auf die Leukocyten und Bakterien der verschiedenen Thiere. Indem wir diese Möglichkeit zulassen, werden uns die entgegengesetzten Resultate und auch die Erklärung der beobachteten Erscheinungen verständlich, deshalb ist auch die Frage nach den Veränderungen der von den Leukocyten aufgenommenen Bakterien bis jetzt ungelöst geblieben. Die verschiedenen Vermuthungen und die ihrer Idee nach glänzende Theorie von Metschnikoff können keine genauen Erklärungen für all die beobachteten Thatsachen geben und genügen nicht einer streng wissenschaftlichen Anforderung. Todte Objecte, auf Grund welcher grösstentheils die verschiedenen Hypothesen aufgebaut wurden, haben in dieser Beziehung nur einen anatomischen Charakter und können kaum eine klare Vorstellung der physiologischen Prozesse geben. Deshalb scheint uns unser Streben, die Erscheinungen in lebenden Objecten zu beobachten, am meisten zweckentsprechend zu sein. Die Methode, welche wir in diesem Falle befolgten, indem wir gefärbte Bakterien in lebenden Leukocyten bei Kaltblütern beobachteten, gab uns bestimmtere Vorstellungen, als die fixirten Präparate.

Die Thatsachen, die wir bei der Beobachtung gefärbter Bakterien erhalten haben, zeigten uns, dass letztere bei der Färbung im lebenden Zustande ihre Lebereigenschaften nicht verlieren. In den Organismus der Thiere eingeführt, zogen solche Bakterien die Leukocyten an und wurden von denselben

in grösserer oder geringerer Anzahl aufgenommen. Bei der Beobachtung der gefärbten Bakterien innerhalb der Leukocyten konnten wir uns überzeugen, dass die Formen derselben, welche von früheren Forschern (Metschnikoff) als veränderte (die Bakterien wurden dicker oder dünner, ihre Contouren unregelmässig) angesehen sind, abhängig sein konnten von einer bestimmten Lage derselben im Protoplasma, und diese erzeugten, fixirt in gefärbten Präparaten, bei verschiedener Lage derselben in Folge der optischen Erscheinungen die Vorstellung, als ob Veränderungen stattgefunden hätten. Unsere Experimente zeigen, dass gefärbte Bakterien im Protoplasma der Leukocyten sich entfärben und in kleine Körnchen zerfallen. Der Farbstoff geht aus den Stäbchen in das Protoplasma in Form besonderer Bildungen, gefärbter Kügelchen, über, welche sich ebenfalls entfärben. Dieser Prozess verläuft innerhalb vieler Stunden. In todten Leukocyten entfärben sich, wie wir gesehen, die Stäbchen ebenfalls; aber dies geschieht etwas anders: entweder zerfällt der Leukocyt hier sammt den Stäbchen in eine körnige Masse, oder das Stäbchen wächst nach dem Zerfallen des Leukocyten aus demselben heraus. Der Entfärbungsprozess der Stäbchen in Leukocyten geht bei Thieren im Frühling schneller vor sich, als im Herbst und Winter, in welcher Jahreszeit er um vieles langsamer verläuft. In den Präparaten waren solche Stäbchenformen vertreten, welche in verschiedenem Maasse die Färbung zeigten bis zum vollständigen Zerfallen derselben in kleine Körnchen, diese Bakterienformen wurden ausserhalb von Leukocyten beobachtet. Die ausserhalb der Leukocyten liegenden Bakterien zerfielen langsamer, als die innerhalb derselben. Dieses sind eigentlich die Hauptthatsachen, welche uns bei Kaltblütern zu beobachten gelang. Bei Warmblütern konnten wir den Prozess des Zerfallens der Bakterien nicht unmittelbar, wie bei Fröschen, verfolgen, wir constatirten aber, dass dieses Zerfallen im Organismus der Hunde ohne jegliche Aufnahme von Seiten der Leukocyten stattfinden kann, — diese Beobachtung steht im Gegensatz zur Lehre von Metschnikoff. Bei Kaninchen sahen wir ebenfalls einen Conflux der Leukocyten und die mikroskopischen Bilder waren sehr ähnlich denen von Hunden, dennoch gingen die Kaninchen am Milzbrand zu Grunde, die Hunde dagegen blieben am Leben.



Ersichtlich spielen also die Eigenschaften der Säfte der Thiere eine wichtige Rolle beim Zugrundegehen der Bakterien. Dies zeigten uns die Infectionsversuche mit der Milzbrandcultur in die Venen empfänglicher und unempfindlicher Thiere.

Die meisten Beobachtungen über den Einfluss des Blutes und des Blutserums auf Bakterien weisen darauf hin, dass die chemischen Eigenschaften dieser Flüssigkeiten bei der Erklärung der Immunität eine gewisse Bedeutung haben müssen. Das Blut verschiedener Thiere verhält sich im chemischen Sinne nicht gleich zu den verschiedenen Bakterien; im Blute gewisser Thiere entwickelt sich der Milzbrandbacillus schlecht oder gar nicht, dagegen entwickeln sich andere Mikroorganismen. Andererseits gedeiht dieselbe Milzbrandcultur im Blute anderer Thiere, in welchen dagegen andere Mikroorganismen keine Entwicklung zeigen. Folglich verlangen die in den Organismus eingeführten Bakterien zu allererst bestimmte Nährstoffe, ohne welche sie nicht gedeihen können. Wir haben gesehen, dass der Milzbrand in den Organismus unempfindlicher Thiere eingeführt, wie vorausszusehen ist, wenig Nährstoffe findet; er bleibt daselbst eine Zeit lang leben, nach einem Aufenthalte daselbst von 3—5 Tagen lässt er sich noch auf Nährmedien übertragen, zeigt sogar arthrospore Spaltung (diese Theilung trägt aber einen anderen Charakter, als bei empfänglichen Thieren) und führt zum Zerfall im Organismus. Aber wenn die Bakterien keinen für sie genügenden Nährstoff in den Säften des Organismus finden, so haben auch die von ihnen producirten giftigen Stoffe nicht die Kraft, welche es bei besseren Ernährungsbedingungen besitzen. Wenn wir die Milzbrandcultur aus dem Organismus, wo sie 4—5 Tage (bei Fröschen) gewesen, entnehmen, sehen wir, dass sie ihre Giftigkeit verloren hat und auf weisse Mäuse local nicht wirkt. Obgleich sie sich, auf Nährmedien übertragen, vermehrt, so giebt sie eine Nachkommenschaft von Krüppelformen (Involutionenformen).

Welche Rolle aber spielen die Leukocyten beim Untergange der Bakterien? Unsere Beobachtungen constatiren, dass von den Leukocyten aufgenommene Bakterien in denselben zerfallen, und dass dieser Zerfallprozess der Bakterien in kleine Körnchen denselben Charakter trägt, wie der an ausserhalb der Leukocyten

liegenden Bakterien. In den Leukocyten der Frösche zerfallen sie, wie wir gesehen, in 20—30 Stunden, im Frühling schneller, als im Herbst und Winter; ausserdem kommen die frei liegenden Milzbrandfäden bei Fröschen und Hunden erst am dritten Tage zum Zerfall. Aus diesen Thatsachen ist ersichtlich, dass die von den Leukocyten verschluckten Bakterien schneller zum Zerfall kommen, als die ausserhalb derselben liegenden. Weshalb das geschieht, darüber haben unsere Experimente genauere Nachweise nicht geliefert. Dieses hängt vielleicht davon ab, dass die Leukocyten an und für sich (im chemischen Sinne genommen) ein das Absterben und Zerfallen der Bakterien begünstigendes Medium darstellen, oder dass sie ausserdem die wesentlichen Bestandtheile den Bakterien activ entziehen und dadurch ein schnelleres Zerfallen derselben bewirken. Auf Grund unserer Experimente können wir dies nicht behaupten. Wir haben gesehen, dass der Uebergang des Farbstoffes aus den gefärbten Bakterien in das Protoplasma der Leukocyten in Form besonderer Bildungen (gefärbter Kügelchen) stattfindet; ob dabei aber auch die Bakterien selbst bildenden Bestandtheile denselben entzogen werden, oder ob dies derselbe Prozess ist, welchen Metschnikoff als „intracelluläre Verdauung“ bezeichnet, darüber können wir vorläufig bei völliger Unkenntniss der histochemischen Prozesse nicht einmal eine Vermuthung aussprechen. Jedenfalls spielen die Leukocyten beim Zerfall der Bakterien im Organismus der Thiere eine activere Rolle, als die Säfte, denen einige Forscher den Haupteinfluss in dieser Beziehung zuschreiben (Baumgarten u. A.). Diese Eigenschaft der Leukocyten ist neu und hat eine wichtige Bedeutung bei Erklärung der Befreiung des Organismus von eingewanderten Mikroben.

Was die letzte von uns gestellte Frage anbetrifft, nemlich welche Bedeutung die Leukocyten bei der Erklärung der Immunität gegen pathogene Bakterien haben, so geben unsere Experimente darüber positive Resultate. Aus unseren Untersuchungen geht klar hervor, dass hier die Eigenschaften der Säfte des Organismus eine Hauptrolle spielen. Der Organismus der für den Milzbrand unempfindlichen Thiere bietet ersichtlich zu allererst ein ungünstiges Nährmedium in demselben Sinne, wie auch unsere künstlichen Nährböden für viele Bakterien. Gelangen

nun die Bakterien auf einen für sie ungünstigen Nährboden, so gehen sie zu Grunde, und ihre Aufnahme von Seiten der Leukocyten bildet für ihren Untergang im Organismus keine unbedingte Nothwendigkeit, wie es Metschnikoff glaubt. Andererseits sehen wir, dass die Bakterien, wenn sie in den Organismus empfänglicher Thiere gelangen, wachsen und sich entwickeln, trotz der Anwesenheit von Leukocyten (Kaninchen).

Indem wir hier die Mittheilung unserer Beobachtungen schliessen, halten wir es für nothwendig kurz die Frage zu berühren, wie weit Metschnikoff in seinen Schlüssen Recht hatte, indem er eine so grosse Bedeutung den Leukocyten zuschrieb: „sie sollen die Bakterien verschlingen, den Organismus gegen das Eindringen der Bakterien schützen, und ferner soll auch von ihnen die Empfänglichkeit oder die Unempfänglichkeit des Organismus für die Infection abhängen. Wir wiesen schon früher darauf hin, dass von der Thatsache der Fähigkeit der Leukocyten, Bakterien aufzunehmen, man nicht das Recht hat, wie dies Metschnikoff und nach ihm viele andere thun, auf eine Verdauung der Bakterien in den Leukocyten zu schliessen. Die Angaben von Metschnikoff, dass in den Leukocyten zerfallene Bakterien sich vorfinden, und dass sie in Folge der Verdauung im Protoplasma der Leukocyten entstanden sind, können ebenfalls nicht als logisch angesehen werden: erstens hat Metschnikoff das nicht durch directe Beobachtung bewiesen; zweitens zeigten unsere Experimente klar, dass Bakterien auch ausserhalb der Leukocyten zerfallen; drittens endlich ist der Prozess des Zerfallens sowohl ausserhalb, als auch innerhalb der Leukocyten ganz gleich. Deshalb erscheint es uns seltsam, dass Metschnikoff diesen Zerfallprozess der Bakterien in den Leukocyten eine intracelluläre Verdauung nennt, — es ist dies ein ungenauer Ausdruck. Die Thatsachen, die wir bei unmittelbarer Beobachtung der Bakterien in lebenden Leukocyten erhielten, erlauben uns in einem Falle vom Zerfall der Bakterien im Sinne Metschnikoff's zu sprechen, also von irgend einer Verdauung, und noch weniger kann man den Zerfall der Bakterien in den Leukocyten mit der Magenverdauung, mit Bildung eines sauren Fermentes, identificiren. Der rothe Schimmer der blauen, in den Leukocyten eingeschlossenen Lakmusstück-

chen, den Metschnikoff als Beweis für die Bildung dieses sauren Ferments hält, existirt, wie es unsere Experimente zeigen, de facto nicht und ist eine optische Erscheinung.

Wir haben schon öfters darauf hingewiesen, dass eine künstliche Behandlung, von der auch Metschnikoff spricht, in bedeutendem Maasse sowohl die Leukocyten als auch die Bakterien verändert; es können sogar künstliche Bilder erhalten werden, und doch gründet Metschnikoff unter anderen seine Schlüsse auf Objecte, die er mit solchen Methoden, welche noch lange nicht einwandsfrei sind, erhalten hat. Wir werden es gleich sehen. Aus der Metschnikoff'schen Theorie folgt, dass der Organismus, wenn er nach einer Bakterienkrankheit gesund wird, das dem Umstande verdankt, dass seine Leukocyten die Bakterien aufnahmen und sie zu Grunde richteten. Ausserdem ist experimentell constatirt, dass Bakterien oder Farbstoffe, in's Blut der Thiere eingeführt, von Leukocyten aufgenommen werden (dies ist eine zweifelloose Thatsache). Und doch werden die Spirillen, wie aus den Arbeiten von Metschnikoff über *Febris recurrens* hervorgeht, im Blut der Affen von den Leukocyten nicht aufgenommen. Weshalb? Weil in den Präparaten, die Metschnikoff aus einem Bluttröpfen, welchen er dem Finger entnahm, die Spirillen ausserhalb der Leukocyten lagen. Wir haben schon bei unseren Versuchen an Warmblütern darauf hingewiesen, dass die Leukocyten derselben, dem Organismus entnommen, schnell ihre Lebenseigenschaften verlieren, und deshalb auf Grund solcher Präparate auch keine Schlussfolgerungen zu ziehen sind über das Verhältniss der Bakterien zu den Leukocyten. Bei *Febris recurrens*, einer Krankheit, welche fast immer in Genesung übergeht, müssten Spirillen nach der Theorie von Metschnikoff in den Leukocyten sich vorfinden, und vielleicht waren sie auch da, was ganz natürlich wäre und sich eigentlich auch aus den Eigenschaften der Leukocyten ergeben müsste, und doch erlaubt sich Metschnikoff nach einem aus dem Blute gewonnenen Präparate, in welchem das Verhältniss der Spirillen zu den Leukocyten unzweifelhaft gestört ist, auf eine Unfähigkeit der Leukocyten, die Spirillen aufzunehmen, zu schliessen. — Wir führen dieses Beispiel an, um deutlich zu zeigen, wie ungenau die Schlussfolgerungen von Metschnikoff sind.

Aus seiner Theorie geht hervor, dass die Leukocyten die Beschützer des Organismus gegen die Bakterien darstellen. Aus unseren Versuchen jedoch ersehen wir dies nicht. Das Erscheinen von Leukocyten an der Infectionsstelle erfolgt erst nach Verlauf einiger Zeit (4—5 Stunden), und zwar langsam. Ausserdem ist aus früheren Beobachtungen genau bekannt, dass zur Infection einer Maus oder eines Kaninchens eine minimale Anzahl von Milzbrandbacillen genügt, um lethal zu wirken. Wenn die Leukocyten nun eine Schutzvorrichtungsrolle spielten und der Ausgang von ihnen abhängig wäre, so könnten sie leicht eine so minimale Zahl giftiger Bakterien vernichten. Unsere Experimente an Kaninchen ergeben jedoch, dass die Milzbrandbakterien trotz des grossen Confluxes von Leukocyten (fast ebenso viel, wie bei Hunden) sich entwickeln und diese Thiere tödten. Die Leukocyten können, wie unsere Beobachtungen zeigen, bei dem Untergange der Bakterien behülflich sein, ihn fördern, aber andererseits können sie Bakterien in andere Organe übertragen und eine Allgemeininfektion zu Wege bringen; dieses bestätigen gleichfalls die Untersuchungen von Anhängern der Metschnikoff'schen Theorie.

Wir sehen also, dass die Leukocyten den Organismus gegen eine Bakterieninfection nicht schützen können, und dass die Rolle, die sie als Beschützer des Organismus spielen sollen, des tatsächlichen Beweises entbehrt.

Nachdem wir zu solchen Resultaten in Bezug auf die Rolle der Leukocyten im Organismus der Thiere gekommen sind, können wir die These von Metschnikoff, dass die Säfte des Organismus bei der Erklärung der Immunität keine Bedeutung haben, sondern nur die Phagocyten das Wesentliche sind, nicht für richtig anerkennen. Unsere Experimente beweisen direct, dass der thierische Organismus günstige oder ungünstige Bedingungen für die Entwicklung der Bakterien darbietet, — unabhängig, abgesehen von dem Einfluss der Leukocyten. Sind die Bedingungen im Organismus günstig, so werden die Bakterien wachsen und das Thier tödten, trotz der Anwesenheit von Leukocyten (bei Kaninchen); sind sie ungünstig (Hunde), fallen sie dem Zerfallen anheim, und ihren Untergang werden ebenfalls die Leukocyten fördern.

In der Absicht, in unseren Schlüssen objectiv zu sein, wollen wir uns nicht in nähere (weitere) Erörterungen über die Rolle der Leukocyten im Organismus gegenüber den Bakterien einlassen, noch weniger irgend welche Vermuthungen aussprechen. Wir besitzen zu wenig Thatsachen, um weit gehende Schlüsse zu ziehen; deshalb beschränken wir uns einzig auf das, was direct aus unserer Arbeit hervorgeht.

1. Die Aufnahme der Bakterien durch Leukocyten ist eine unzweifelhafte Thatsache.

2. Die bis jetzt angewandten Untersuchungsmethoden zum Zweck des Erkennens der Veränderungen der Bakterien, welche von den Leukocyten aufgenommen sind, können keine genauen, streng wissenschaftlichen Resultate ergeben.

3. Beobachtungen an lebenden Objecten haben unzweifelhaft den Vorzug.

4. Die im lebenden Zustand mit Methylenblau gefärbten Bakterien verlieren nicht ihre vitalen Eigenschaften und sind zur weiteren Entwicklung fähig.

5. Gefärbte, in den Organismus der Kaltblüter eingeführte Bakterien entfärben sich und zerfallen innerhalb der Leukocyten in ganz kleine Körnchen.

6. Ein eben solcher Zerfallprozess kann sowohl bei Kaltblütern, als auch besonders bei Warmblütern bei den ausserhalb der Leukocyten liegenden Bakterien stattfinden.

7. Das Zerfallen der Bakterien im Organismus geschieht in den Leukocyten schneller, als ausserhalb derselben.

8. Bei der Erklärung der Immunität spielt der Chemismus (der Zellen und Säfte) die Hauptrolle, und der Organismus stellt, abgesehen von allen anderen Bedingungen, zu allererst ein für die Entwicklung der Bakterien günstiges oder ungünstiges Medium dar.

## Erklärung der Abbildungen.

### Tafel VIII.

Fig. 1—4. Dasselbe Stäbchen während 38 Minuten; es verändert seine Lage und Gestalt und nimmt wieder sein früheres Aussehen an.

- Fig. 5—6. Dieselben Stäbchen in verschiedenen Bogen. Fig. 6 zeigt das Blasserwerden der Stäbchen und die Bildung von farbigen Kügelchen.
- Fig. 7—21. Das allmähliche Farbloswerden und Zerfallen eines Stäbchens des *Bacillus Megatherium* im Verlaufe von 20 Stunden. Das Stäbchen wird blasser, das Kügelchen grösser, nimmt immer mehr eine intensive Farbe an und entfärbt sich nachher wieder.
- Fig. 17—21 zeigen kleine Körnchen als Residuen zerfallener Bakterien.
- Fig. 22—24. Entfärbung der Bakterien in toten Leukocyten.
- Fig. 25—27. Einige Milzbrandbacillen, verschieden gefärbt in Leukocyten liegend. Fig. 26 derselbe Leukocyt nach 20 Stunden; Fig. 27 nach 47 Stunden.
- Fig. 28 u. 29. Das Herauswachsen eines Milzbrandstäbchens aus einem toten Leukocyten.
- Fig. 30. Den Zerfall der ausserhalb der Leukocyten liegenden Milzbrandstäbchen in kleine Körnchen beim Hunde.
- Fig. 31. Verschieden gefärbte, im Stadium des Zerfalls befindliche Stäbchen ausserhalb der Leukocyten beim Frosch.

Durch ein Versehen des Lithographen hat sich in die Reihenfolge der Abbildungen ein Fehler eingeschlichen. Auf No. 11 folgt No. 13, dann No. 15, 12, 14 und 16. Weiterhin ist die Reihenfolge richtig.