



Zur experimentellen Chemotherapie der Tuberkulose

Von Julius Hirsch (Basel)

„Bedeutende Entdeckungen auf dem Gebiete unserer Wissenschaft pflegen ihr Entstehen und ihre Fortentwicklung im allgemeinen in fast typischer Weise zu vollziehen: Vom bahnbrechenden Forscher mehr oder weniger weit entwickelt und gestaltet, erregen sie ein eifriges, oft ein Massenrennen nach dem neu ausgesteckten Ziele: überhastete, nicht selten enthusiastische Bestätigungen, Ergänzungen und Erweiterungen, oft weit über die Tendenz des Entdeckers hinaus. Diesem Erregungs-Stadium folgt meist ein directer Umschlag. Die Begeisterung verfliegt, Übertreibungen fallen wieder, Zweifel und Einwände wachsen und mehren sich, und führen endlich zum Gegentheile, zur übertriebenen Negation. Nun erst folgt die Zeit der ruhigen kritischen Arbeit, die das Mittel zieht aus dem bis dahin Gebotenen in Form fester Errungenschaften, und, was ebenso wichtig, aussichtsreicher Anregungen.“

Diese Worte wurden vor 60 Jahren auf dem X. Congreß für Innere Medizin gesprochen. Sie finden sich in dem einleitenden Referat von Curschmann (1891) zum Thema: Über das Koch'sche Heilverfahren bei Lungentuberkulose und anderen inneren tuberkulösen Erkrankungen.

Curschmann fährt fort: „Die Verlaufskurve der Tuberkulinfrage hat sich bisher in gleichen Bahnen bewegt.“ „Die beiden kurzen Mittheilungen Koch's, in eine schon vom internationalen Congresse her fieberhaft gespannte Welt hinausgesandt, entfachten eine Begeisterung ohne Gleichen. Laien und Ärzte, politische und Fachzeitschriften warfen sich der Bewegung in die Arme. Allerwärts auf's Höchste getriebene Hoffnungen, bis dahin kaum erlebte praktische und wissenschaft-Massenarbeit, unzählbare, zum Theil überstürzte Publikationen.“ Aber: „Laien und Ärzte hatten sich eben die Sache zu leicht gedacht, die ersteren im Anfange zu sehr befangen von den einfachen Verhältnissen des Experimentes und der darauf gegründeten Theorien, nicht genügend gefaßt auf die zahllosen verwickelten Aufgaben am Krankenbette.“ „Dazu verfuhr man Anfangs viel zu schematisch, ohne rechte Auswahl der geeigneten Fälle, ohne Individualisierung in Bezug auf Menge und Darreichungsweise des Heilmittels. Daher vor Allem die zahllosen Mißerfolge, raschen Verschlimmerungen und Todesfälle, die bei den Ärz-

¹ Vortrag, gehalten vor dem Naturhistorisch-Medizinischen Verein zu Heidelberg am 12. 2. 1952.

ten begreifliche Zweifel, unter den Leidenden eine wahre Panik hervorriefen.“ „Wir sind aus diesem Stadium der Depression heraus, nunmehr in dasjenige ruhiger Arbeit gekommen. Für die Klinik mehren und erweitern sich mit wachsender Objectivität der Ärzte die Aufgaben. Mehr und mehr wird es klar, daß die große Frage zum wenigsten im Reagensglase und am Versuchsthiere, sondern nur am Krankenbett weiter reifen kann.“

In dem 150 Seiten langen Bericht über die Sitzungen vom 7. April 1891 folgen die Hauptreferate (von Jaksch, Ziegler, Heubner, Moritz Schmidt, Dettweiler, Sonnenburg, Bacelli und Klebs) und das Protokoll einer bewegten Debatte unter dem Vorsitz von Naunyn. Der 60 Jahre alte Bericht enthält eine Fülle kritischer Bemerkungen und konstruktiver Ideen zur Beurteilung einer spezifischen Tuberkulose-Therapie und zur Prüfung von Tuberkulose-Heilmitteln, die für die moderne Chemotherapie der Tuberkulose ebenso aktuell und lehrreich sind, wie die einleitenden Worte Curschmann's.

Über den derzeitigen Stand der Chemotherapie der Tuberkulose ist zu sagen: Wir befinden uns weder in einem Erregungs-Stadium noch in einem Depressions-Stadium, sondern eher in einer Periode kritischer Arbeit¹. Die übertriebenen Hoffnungen, die von der amerikanischen Entdeckung des *Streptomycin* und von der deutschen Erfindung des p-Acetylamino-benzaldehyd-thiosemicarbazon (TB I) als Tuberkulose-Heilmittel angeregt wurden, und die bis in die Tagespresse und Magazine zu spüren waren, sind verflogen. Wir sind uns darüber klar, daß die drei Pionier-Präparate *Streptomycin* (bzw. *Dihydro-Streptomycin*), *TB I* und *PAS* — jedes für sich oder auch in Kombination — keine Allheilmittel gegen die vielfältigen Formen tuberkulöser Infekte darstellen. Wir kennen ihre Nebenwirkungen und wir wissen, daß sie bei chronischer Anwendung — früher oder später — infolge Festigung der Erreger versagen können. Die Leistungsfähigkeit der bis heute in die Praxis eingeführten Tuberkulose-Heilmittel ist begrenzt; aber sie ist bei bestimmten Krankheitsformen so überzeugend, daß sie nicht mehr zu entbehren sind. Das Bedürfnis nach einer Verbesserung und Ausweitung der therapeutischen Möglichkeiten ist unverkennbar, und so steht die Auffindung neuer Antibiotica und synthetischer Präparate auf dem Arbeitsprogramm zahlreicher Forschungslaboratorien.

¹ Anmerkung bei der Drucklegung: Berichte New Yorker Tagesblätter vom 22. 2. 52 über das Tbc.-Heilmittel Isonicotinsäure-hydrazid haben inzwischen ein neues heftiges „Erregungs-Stadium“ ausgelöst.

Wege der Forschung zu neuen Chemotherapeutica

Das Suchen nach neuen *Antibiotica* unterscheidet sich kaum von der Tätigkeit eines Wüschelrutengängers, der nach einer Wasser- oder Erzader fahndet; die Chancen, etwas zu finden, hängen von der Länge des zurückgelegten Weges ab. So hat Waksman in den Jahren 1939—1949 mehrere Tausend *Actinomyces*-Stämme isoliert und im Diffusionstest auf antibiotische Aktivität geprüft. Nach den Erfahrungen von Waksman (1949) finden sich unter 300 Stämmen höchstens 10, die über den Screening-Test hinaus einer weiteren Bearbeitung wert sind. Auf diese Weise entdeckte Waksman 1949 in den Ausscheidungen eines *Streptomyces*-Stammes (Nr. 3535) das *Neomycin*, ein Antibioticum, das streptomycinresistente Tuberkelbazillen in vitro und im Tierversuch hemmt. Ein zweites Antibioticum, das *Diomycin*, das die Lücken der Streptomycin-Therapie ausfüllen sollte, wurde vom Forschungsstaff der Chas. Pfizer, Inc. (Finlay, Hobby und Mitarbeiter, 1951) gleichfalls aus *Streptomyces*-Kulturen isoliert. Andere Antibiotica mit tuberkulostatischer Aktivität im Reagenzglas und im Tierversuch sind: *Nocardine* aus einer *Nocardia*-Art (Emmart, 1947, 1949); *Lupulon* aus Hopfen-Extrakt (Chin, Anderson, Alderton und Lewis, 1949).

Die Chancen der chemischen Synthese neuer Heilmittel hängt mehr oder minder auch von der Zahl der dargestellten Präparate ab, gleichgültig, welche Spielregel dabei befolgt wird. Die Synthese neuer Produkte kann von bewährten Verbindungstypen (wie den Thiosemicarbazonen und der PAS) ausgehen und Abwandlungen darstellen, die bisher nicht bekannt waren. Die Synthese kann sich auch von einer Leit-Idee auf ein bisher noch nicht begangenes Gelände treiben lassen.

Beobachtungen über Zusammenhänge zwischen chemischer Konstitution und biologischer Aktivität können für eine solche Fahrt ins Blaue als Vorspann dienen. Im Beginn der Sulfonamid-Ara lockte das Prinzip der kompetitiven Hemmung als ein fruchtbarer Leitgedanke der chemotherapeutischen Forschung. Man synthetisierte Abwandlungen essentieller Baustoffe und Wachstumsstoffe oder Abwandlungen von spezifischen Leibessubstanzen der Bakterien, welche die Synthese der lebenden Substanz, die Keimvermehrung, blockieren sollten. Diese Arbeitsrichtung lieferte wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiete der Biochemie der Mikroorganismen; aber bisher ist kein praktisch brauchbares Heilmittel aus solchen „Verdrängungsreaktionen“ hervorgegangen.

Es ist auch vorgekommen, daß der Griff einer „glücklichen“ Hand, durch keine Theorie beschwert, zu einem aussichtsreichen Produkt gelangte, und daß dann „der Weg zum Erfolg“ erst rückläufig freigelegt und dem Verständnis zugänglich gemacht werden konnte.

Die chemische Synthese von Tuberkulose-Heilmitteln steht heute vor allem auf dem Programm von Forschungslaboratorien der pharmazeutischen Industrie, wo die materiellen und technischen Voraussetzungen für die Entwicklung und Prüfung großer Reihen neuer Verbindungen gegeben sind. So ist die Entdeckung der Thiosemicarbazone als Thera-

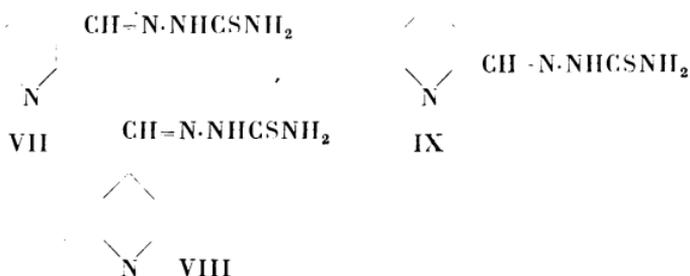
peutica aus den Laboratorien der I. G. Farbenindustrie hervorgegangen. Als bestes Produkt dieser Reihe hat Domagk (1946) das *p*-Acetyl-amino-benzaldehyd-thiosemicarbazon (II) befunden. Die Verbindung — zunächst TB I/698 genannt — wurde mit der gesetzlich geschützten Handelsbezeichnung *Conteben* in die Klinik eingeführt. Identische Handelsprodukte sind: *Tibione*, *Berculon A*, *Benzthiazone*, *Myrizon*, *Thio-paramizon* und viele andere.

R		CH=N·NHCSNH ₂	I
CH ₃ CO·NH		CH=N·NHCSNH ₂	II
C ₂ H ₅ ·SO ₂		CH=N·NHCSNH ₂	III
(CH ₃) ₂ CH		CH=N·NHCSNH ₂	IV
C ₂ H ₅ ·NH·CO·NH		CH=N·NHCSNH ₂	V
NaOOC·CH ₂ ·CH ₂ ·CO·NH		CH=N·NHCSNH ₂	VI

Nach den Erfahrungen der Sulfonamid-Ära war es selbstverständlich, daß das Thema der Thiosemicarbazone, von denen eine Unzahl denkbar ist, nun auch von anderen Arbeitskreisen in Angriff genommen wurde. Diesbezügliche Publikationen sind 1949 aus den Laboratorien der Imperial Chemical Industries, Ltd. (England) und 1950 aus dem Squibb Institute for Medical Research erschienen. Beide Arbeitskreise haben mehr als 100 bekannte und neue Thiosemicarbazone und verwandte Verbindungen *in vitro* und *in vivo* geprüft. Irgendein neues Produkt wird nicht herausgestellt; die deutschen Ergebnisse werden bestätigt: die Gruppe der in *para*-Stellung substituierten Benzaldehyd-Thiosemicarbazone (I) ist allen anderen geprüften Verbindungen deutlich überlegen. Nur wird innerhalb dieser Gruppe die Rangordnung abweichend beurteilt. Die Engländer (Hoggarth, Martin, Storey und Young, 1949) und die Amerikaner (Hamre, Bernstein und Donovick, 1950) geben an, daß das *p*-Äthylsulfonyl-benzaldehyd-thiosemicarbazon (III) (das deutsche TB III) besser wirkt als TB I (II). Nach den amerikanischen Autoren soll auch das Isopropyl-Derivat (IV) dem TB I überlegen sein.

Andere bereits im Handel befindliche Thiosemicarbazone aus der Gruppe der Benzaldehyd-Thiosemicarbazone sind: Äthylureido-benzaldehyd-thiosemicarbazon (V) und das wasserlösliche Natriumsalz des Succinylamino-benzaldehyd-thiosemicarbazon (VI). Beide Verbindungen zeigten bei der Prüfung in unserem Mäusetest im Vergleich mit dem Pionier-Präparat TB I keine kurative Wirkung. In einer Veröffentlichung der Boots Pure Drug Co. über die experimentellen Erfahrungen mit mehr als 1000 Verbindungen (Croschaw und Dickinson, 1950) finden sich auch einige Produkte, die den Thiosemicarbazonen mehr oder weniger nahe stehen. Von 24 im Reagenzglas hoch aktiven Produkten war keines im Tierversuch wirksam.

Seit einer Reihe von Jahren steht die Tuberkulose-Forschung auch auf dem Programm der wissenschaftlichen Laboratorien der J. R. Geigy A.G., Basel. Neben anderen ist die Klasse der Thiosemicarbazone zur Darstellung neuer Verbindungen herangezogen worden. Die Chemiker H. Gysin und R. Hagenbach¹ haben vor allem die Synthese der Thiosemicarbazone *heterocyclischer* Aldehyde in Angriff genommen, die — so weit bekannt — von den deutschen Initiatoren der Thiosemicarbazon-Therapie nicht berücksichtigt wurden. In der ersten Hälfte des Jahres 1950 habe ich eine Reihe dieser heterocyclischen Aldehyde im Tierexperiment untersucht; als Vergleichsprodukt diente TB I. Von diesen Verbindungen zeigte G 22'597, das *Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazon* (VII), gegen das Pionier-Präparat eine deutliche Überlegenheit. Ebenso wirksam ist das isomere Pyridin-4-aldehyd-thiosemicarbazon (VIII), während die dritte isomere Verbindung, Pyridin-2-aldehyd-thiosemicarbazon (IX), zu toxisch ist, um im Tierversuch ausreichend geprüft zu werden. Auf Grund der in vivo feststellbaren tuberkulostatischen Eigenschaften heterocyclischer Thiosemicarbazone hat die J. R. Geigy A.G. die Herstellung dieser neuen Verbindungen zum Patent angemeldet.



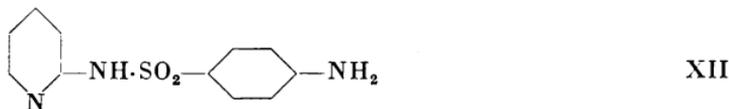
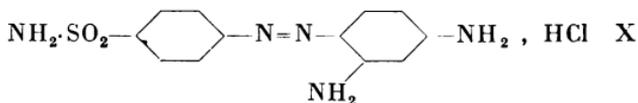
In einer Sitzung der Französischen Academie der Wissenschaften am 20. November 1950 wurde eine experimentelle Studie von Levaditi, Girard, Vaisman und Ray vorgelegt, in der die Wirksamkeit von Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazon (VII), identisch mit unserem G 22'597, beschrieben wurde; auch hier war TB I zum Vergleich herangezogen worden. Im Mäusetest konnte aus den histologischen Veränderungen und dem Bazillenbefund der Lungen eine Überlegenheit der heterocyclischen Verbindung festgestellt werden. Im Mai 1951 erschien eine weitere kurze Mitteilung über diesen Gegenstand aus den Laboratorien der Hoffmann La Roche in Nutley (USA). Grunberg und Leviant berichteten über die Wirkung der Thiosemicarbazone der Pyridin-3- und -4-aldehyde (VII, VIII) im Vergleich zum TB I. Die Präparate wurden dem Futter beigemischt. Gegen den intravenös gesetzten Infekt zeigten die drei Verbindungen den

¹ Siehe Hagenbach und Gysin (1952).

gleichen Effekt; dagegen waren die Pyridinaldehyd-Derivate dem Benzaldehyd-Derivat überlegen, wenn die Mäuse intranasal infiziert und von einer bronchogenen Tuberkulose befallen waren.

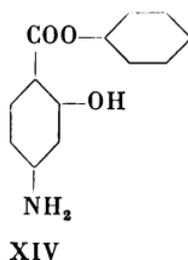
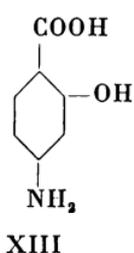
Die amerikanischen Autoren hatten an Ergebnisse von Chorine (1945) und von McKenzie (1948) angeknüpft, die durch Verfüttern von Pyridin-3-carbonsäure-amid (Nicotinsäure-amid) die Ausbreitung eines tuberkulösen Infektes im Meerschweinchen bzw. in der Maus eindämmen konnten. Diese Hemmung kann nur mit großen Dosen erzielt werden, wie Fust und Studer (1951) bestätigt haben. Nach McKenzie handelt es sich um eine Vitamin-Wirkung; nach Hurni (1951) vielleicht um einen unspezifischen Reiz, aber nicht um einen tuberkulostatischen Effekt.

Auf jeden Fall haben drei Forschungskreise — in der Schweiz, in Frankreich und in USA — unabhängig voneinander den Weg zu den Thiosemicarbazonen der Pyridin-aldehyde gefunden. Der Übergang zu *heterocyclischen* Verbindungen hat auch in den ersten Entwicklungsphasen der modernen Chemotherapie bakterieller Infektionen einen deutlichen therapeutischen Fortschritt gebracht: 1935 wurde der Azofarbstoff *Prontosil* (X) als Pionierpräparat von Domagk beschrieben. Ein Jahr später zeigten die beiden Tréfouël, Bovet und Nitti (1936), daß die chemotherapeutische Wirkung des *Prontosil* lediglich auf dem eingebauten Sulfanilamid (XI) beruht. Erst damit wurde der Weg für weitere Synthesen geöffnet. 1938 lieferten Ewins, Phillips und Newberry mit der Synthese des *heterocyclischen Sulfapyridin* (XII) das erste Produkt aus der Reihe hochwertiger Sulfapreparate.



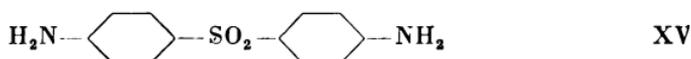
Über Versuche, auf der Basis der *p*-Aminosalizylsäure (XIII) neue Tuberkulose-Heilmittel zu synthetisieren, haben Hirt und Hurni (1949) zusammenfassend berichtet. Von 116 verschiedenen PAS-Derivaten und ähnlichen Verbindungen zeigten die besten Produkte gerade noch die tuberkulostatische Aktivität der Muttersubstanz; in keinem Fall wurde ein besserer Effekt erzielt. Buechi, Lieberherr und Flury (1951) haben noch etwa 20 weitere Derivate und Analoga der PAS hergestellt, ohne einen Fortschritt zu erzielen. Inzwischen ist nur eine einzige Verbindung bekannt geworden, welche die Wirkung der PAS *in vitro* und *in vivo* deutlich übertrifft, das Produkt Fr 7

von Americano Freire (1950), der *Phenyl-ester* der *p-Aminosalizylsäure* (XIV), ein Analogon zu dem bekannten Antisepticum *Salol*.



Die Prüfung im Institut Pasteur durch Noel Rist und Mitarbeiter ergab, daß der wasserunlösliche Ester in ölicher Lösung oder in wäßriger Suspension — parenteral appliziert — die Wirkung von Streptomycin im Mäusetest erreicht. Bei peroraler Darreichung geht die Wirkung von Fr 7 nicht über den Effekt von PAS hinaus. Dieser Befund entspricht einer Beobachtung von Nencki (um 1890), daß Salole im Darm durch Pankreas-Enzyme und Bakterien aufgespalten werden. Auf Grund eigener Beobachtungen an der infizierten Maus kann ich die ausgezeichnete Wirkung von Fr 7 bestätigen.

Die Bemühungen, aus dem 4-, 4'-Diamino-diphenyl-sulfon (XV) wirksame Chemotherapeutika gegen die Tuberkulose zu entwickeln, liegen Jahre zurück und hatten keinen praktischen Erfolg zu verzeichnen. Nur die Kernsubstanz „la sulfone mère“, die aus den Anfängen der Sulfonamid-Ära her stammt, hat sich im Laufe der Zeit als ein wirksames Chemotherapeuticum gegen die Lepra bewährt.



Von anderen Verbindungstypen, die in den letzten Jahren zur Synthese von Tuberkulose-Heilmitteln herangezogen worden sind, liegt meines Wissens noch kein Produkt vor, das neben den Thiosemicarbazonen und der PAS Eingang in die Therapie gefunden hat.

Zur experimentellen Prüfung von Tuberkulose-Heilmitteln

Wenn ich über die Methoden zur Kennzeichnung und zur Prüfung von Tuberkulose-Heilmitteln spreche, so kommt es mir in erster Linie darauf an, die Grenzen zu zeigen, die der Deutung experimenteller Ergebnisse gesetzt sind. Die Zahl der „Tuberculostatica“ kann beliebig vermehrt werden, wenn man sich mit der Prüfung im Reagenzglas begnügt und auf den Tierversuch verzichtet; dann wird jede Substanz mit einer polyvalenten antibakteriellen Aktivität, die auch Tuberkelbazillen hemmt oder abtötet, als spezifisches Chemotherapeuticum gegen Tuberkulose gelten. Der Reagenzglasversuch kann als „screening test“, als Wegweiser der Forschung, dienen; aber es geht nicht an,

daß man den tuberkulostatischen Titer *in vitro* zur therapeutischen Bewertung eines Präparates heranzieht und ihn womöglich in einer klinischen Publikation als Beweismaterial herausstellt.

Aus den Ergebnissen eines Tierexperimentes ist der klinische Wert eines Tuberkulose-Heilmittels auch nicht mit Sicherheit vorauszusagen.

Ich erinnere an das Schicksal des Promin, das als Derivat des 4-, 4'-Diamino-diphenylsulfon (XV) von Parke and Davis synthetisiert wurde. Die Ergebnisse, welche Feldman und Hinshaw (1945) mit Promin an tuberkulösen Meerschweinchen erzielen konnten, waren so demonstrativ, daß diese Versuche heute noch als Muster eines therapeutischen Experimentes angeführt werden. Am Krankenbett haben Promin und ähnliche Derivate vollkommen versagt.

Mensch, Meerschweinchen und Maus reagieren auf den tuberkulösen Infekt und auf die Pharmacodynamic eines Präparates so grundverschieden, daß sich der Beitrag eines Tierversuches zur Kennzeichnung eines Chemotherapeuticum nur auf die einzige Fragestellung beschränkt: Kann man mit verträglichen Dosen des Präparates *in vivo* einen tuberkulostatischen Effekt hervorrufen? Ob ein tuberkulostatischer Effekt auch im menschlichen Organismus verifiziert werden kann, und ob seine Stärke und seine Dauer ausreichen, bis die Abwehrkräfte den Infekt überwunden haben, kann nur die klinische Prüfung entscheiden.

Zur Prüfung chemotherapeutischer Heilmittel gegen die Tuberkulose im Reagenzglas und im Tierversuch sind so viele Methoden angegeben worden, daß ich auf ihre Darstellung in den Fortschritten der Tuberkuloseforschung (1948) von Noel Rist und (1950) von E. Suter verweisen muß; ferner auf den Bericht der American Trudeau Society in den Review of Tuberculosis vom Februar 1950; hier wird der Versuch einer Standardisierung typischer Verfahren unternommen.

Seit einer Reihe von Jahren wird neben dem Meerschweinchen, dem klassischen Versuchstier der Tuberkulose-Forschung, auch die Maus zur Prüfung von Tuberkulose-Heilmitteln herangezogen. Der Aufwand an Zeit, Raum und Personal und der Verbrauch an Medikamenten ist im Mäusetest wesentlich geringer als im Meerschweinchenversuch. Der Vorteil des Mäusetestes ist unverkennbar, wenn es sich um die gleichzeitige vergleichende Prüfung einer großen Reihe von Präparaten handelt.

Während ein Meerschweinchen mit wenigen Keimen eine schwere generalisierte Infektion annehmen kann, muß eine Maus mit einer dichten Suspension eines geeigneten Tbc.-Stammes überschwemmt werden, um an einer tödlichen Lungentuberkulose zu erkranken. Zudem verläuft die Lungentuberkulose der Maus im allgemeinen ohne eine spezifische produktive Reaktion der Gewebe.

Gegen den Mäusetest wird angeführt, daß die Meerschweinchen-Tuberkulose der menschlichen Infektion doch näher stehe; ein therapeutischer Effekt lasse sich beim Meerschweinchen an der Einschmelzung von zerstörtem Gewebe, am

Wuchern von Granulationen und anderem mehr viel leichter abschätzen. Diese Argumentation ist bestechend, aber nicht stichhaltig; die histologisch nachweisbare Tendenz zur Heilung ist eine Reaktion des Meerschweinchens und keine Leistung des Chemotherapeuticum, dessen Anteil am Ausgang einer experimentellen und einer klinischen Infektion ausschließlich von seiner bakteriostatischen Aktivität abhängt.

Der Mäusetest stellt an die Aktivität eines Heilmittels viel größere Anforderungen: Durch die massive Infektion wird der ganze Körper der Maus mit Tuberkelbazillen überschwemmt, die in den Lungen dichte Massenkulturen angehen lassen. Im infizierten Meerschweinchen hat ein Chemotherapeuticum kaum mit einer so ungehemmten Keimproliferation — wenigstens nicht von vornherein — zu kämpfen; seine Aktivität findet außerdem eine Unterstützung in den spezifischen Abwehrkräften des kranken Tieres. So kommt es, daß schwächere Tuberculostatica im Mäusetest wenig günstig abschneiden.

Die Einführung des Mäusetestes in einen Forschungsbetrieb erfordert eine gründliche methodische Vorarbeit, bis seine Reproduzierbarkeit sichergestellt ist. Mit der Übernahme eines bestimmten Mäusestammes und eines bestimmten Thc.-Stammes ist die Stabilität der Versuchsbedingungen keineswegs garantiert. Tierhaltung und Nährmedien — man könnte sagen das Klima des Betriebes — können unberechenbare Abwandlungen in der Empfänglichkeit der Mäuse und in der Virulenz der Keime verursachen. Daher werden häufig typische Verfahren in der Hand verschiedener Experimentatoren mehr oder weniger umgestaltet. So hat es auch einige Zeit gedauert, bis wir einen zuverlässigen Mäusetest entwickelt hatten.

Ohne auf alle technischen Details unseres Mäusetestes einzugehen, seien nur einige Hinweise gegeben: vier Wochen alte Jungmäuse aus ein und derselben Zucht werden intravenös mit einer elektrophotometrisch standardisierten Suspension unseres humanen Thc.-Stammes G 6 infiziert. Die Therapie beginnt im allgemeinen 24 Stunden nach der Infektion. Die Dosierung richtet sich nach dem Tagesgewicht der Maus. Orale Applikationen erfolgen mit der Schlundsonde; die Beimengung der Medikamente zum Futter ist ein unkontrollierbares Verfahren. Meist werden die Versuche nach vier Wochen abgebrochen. Zur Kennzeichnung des Infektionsverlaufes bzw. des tuberkulostatischen Effektes der geprüften Präparate werden alle verfügbaren Daten herangezogen: Die Gewichtskurven und das Verhalten der Tiere, die Absterbekurven in den Serien gleichbehandelter und nicht behandelter Mäuse, die makroskopischen und histologischen Sektionsbefunde, die Keimdichten in Lungenausstrichen.

Nach intravenöser Infektion sind charakteristische makroskopische Veränderungen nur an den Lungen anzutreffen: Bei tödlich verlaufenen Infektionen sind die Lungen vergrößert, tief rot bis dunkelbraun gefärbt. Das infiltrierte Gewebe ist mit gelblichen Herden oder weiß-grauen Flecken von wechselnder Größe besetzt; die Herde können stark konfluieren und einen solchen Anteil der Lungen ausmachen, daß das eigentliche Lungengewebe fast vollkommen verdrängt ist. Mäuse, die unter dem Einfluß eines tuberkulostatischen Effektes oder wegen geringer Virulenz des Impfmaterials einen langsamen Krankheitsprozeß durchmachen, zeigen gleichfalls vergrößerte Lungen; nur sind diese ziemlich hell, etwa fleischfarben. Es finden sich abgegrenzte Herde, und das umgebende Gewebe ist mäßig oder gar nicht infiltrierte (siehe Abb. 1). Wenn sich Lungen von normaler Größe und normalem Aussehen finden, dann liegt der Verdacht nahe, daß die intravenöse Infektion mißglückt ist; sind in den Ausstrichen der Lungen und anderer Organe keine Bazillen zu finden, dann wird die Maus bei der Auswertung der Versuchsserie ebenso wenig berücksichtigt, wie Tiere, die vorzeitig an anderen Todesursachen eingegangen sind.

Auf Grund der mikroskopischen Veränderungen der Lungengewebe unterscheidet R o u l e t¹ sieben Stufen der Infektion:

- I. Konfluierende schwere tuberkulöse Pneumonie,
- II. Multiple große Pneumonien mit Oedem,
- III. Multiple kleine Pneumonien mit diffusem entzündlichem Oedem,
- IV. Multiple pneumonische Herde ohne Oedem,
- V. Wenige größere oder kleinere pneumonische Herde,
- VI. Spärliche kleine pneumonische Herde,
- VII. Interstitielle Prozesse dominierend.

In umgekehrter Reihenfolge entspricht die Skala etwa dem Verlauf einer progredienten Mäuse-Tuberkulose, die mit den Stufen I—II tödlich endet. Lungen behandelte Tiere, welche vier Wochen nach einer massiven Infektion den Befund der Stufen IV—VII bieten, liefern einen Hinweis für die tuberkulostatische Aktivität des verabfolgten Präparates.

Die eher quantitativen als qualitativen Unterschiede in den makroskopischen oder in den mikroskopischen Lungenbefunden werden von einigen Autoren als einziges Kriterium zur Abschätzung tuberkulostatischer Effekte herangezogen; nur scheint es etwas heikel, den Umfang der pathologischen Veränderungen rechnerisch auszuwerten und in Zahlen oder Prozentzahlen auszudrücken.

Zur zahlenmäßigen Kennzeichnung des Infektionsgrades einer Maus bzw. eines tuberkulostatischen Effektes haben wir die Keim d i c h t e in Ausstrichen herangezogen, die immer aus der gleichen Lungenpartie — aus dem vierten kleinen Hinterlappen der rechten Lunge — angelegt wurden. Die Keimdichte ergibt sich aus der Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Stufen von Keimzahlen in einer Reihe von durchgezählten Gesichtsfeldern. Wir wählten die vier Stufen: 0—1, 2—10, 11—20, 21 und mehr Keime und beschränkten uns auf die Auszählung von 20 Gesichtsfeldern im Lungenausstrich. Die vier Stufen werden (ansteigend) mit 0, 1, 3 und 5 bewertet. Werden die Anzahl der Gesichtsfelder gleicher Stufe mit dem zugehörigen Bewertungsfaktor multipliziert, so liefert die Summe dieser Produkte einen zahlenmäßigen Ausdruck für die Keimdichte im Lungenausstrich, den wir als Infektions-Index bezeichnen. Diese approximative Ermittlung der Keimdichte macht keinen Anspruch auf mathematische Genauigkeit; sie reicht aber aus zur Abschätzung des Infektionsgrades innerhalb einer Versuchsreihe, unabhängig davon, ob das Tier die Versuchsdauer überlebt oder nicht.

Der Infektions-Index war ein wichtiger Wegweiser bei der Entwicklung unseres Mäusetestes, als die Fragen der Virulenz, der Empfänglichkeit verschiedener Mäusezuchten und andere Bedingungen für eine sicher tödliche Infektion noch aufzuklären waren.

Einige experimentelle Ergebnisse

Tabelle Nr. 1 und 2 liefern einen Beitrag zur Bestimmung der Virulenz des Impfmateri als und der Empfänglichkeit von Mäusen für einen intravenösen Infekt; diese zwei Faktoren, welche den Verlauf der experimentellen Infektion beeinflussen, ergeben sich aus den durchschnittlichen Infektions-Indices der Mäuse einer Serie.

¹ Herr Prof. Fr. R o u l e t, Basel, hat die histologische Bearbeitung unseres Sektionsmaterials durchgeführt, wofür ihm auch an dieser Stelle gedankt sei.

Tabelle Nr. 1

Virulenz eines humanen Tbc.-Stammes (G 6) nach einmaliger und nach fortlaufender Passage in DUBOS-Nährlösung							
A infiziert mit der ersten, von LOEWENSTEIN-Agar abgeimpften Passage in DUBOS-Nährlösung				B infiziert mit einer monatelang in DUBOS-Nährlösung gezüchteten Kultur			
Maus Nr.	gestorben nach Tagen	getötet	Infektions- Index	Maus Nr.	gestorben nach Tagen	getötet	Infektions- Index
556	21	—	100	566	—	30	0
557	—	30	100	567	—	30	70
559	—	30	96	568	—	30	1
560	18	—	100	569	—	30	44
561	24	—	100	570	—	30	12
562	29	—	100	571	—	30	82
563	22	—	100	572	20	—	100
565	—	30	100	573	—	30	51
				574	27	—	100
durchschnittlicher I.-I.			99,5	durchschnittlicher I.-I.			51,1
Ergebnis: Fortlaufende Züchtung auf DUBOS-Nährlösung setzt die Virulenz des Tbc.-Stammes G 6 wesentlich herab.							

Tabelle Nr. 2

Empfindlichkeit verschiedener Mäuse-Stämme gegen den humanen Tbc.-Stamm (G 6)							
A. Mäuse-Stamm GEIGY				B. Mäuse-Stamm SCHO			
Maus Nr.	gestorben nach Tag-en	getötet	Infektions- Index	Maus Nr.	gestorben nach Tagen	getötet	Infektions- Index
326	31	—	92	336	—	34	35
327	—	34	68	337	—	34	22
328	24	—	92	338	—	34	100
329	30	—	80	339	—	34	13
330	—	34	2	340	—	34	47
331	—	34	96	341	—	34	100
332	—	34	100	342	—	34	7
333	—	34	64	343	—	34	0
334	28	—	100	344	—	34	68
335	14	—	29	345	—	34	42
durchschnittlicher I.-I.			72,3	durchschnittlicher I.-I.			43,4
Ergebnis: Der Mäuse-Stamm GEIGY ist für den gleichen Infekt deutlich empfänglicher als der Mäuse-Stamm SCHO; es sei bemerkt, daß der durchschnittliche Infektions-Index jeder Serie das Ergebnis der Auszählung von 200 Gesichtsfeldern repräsentiert.							

Tabelle Nr. 3 bringt ein Beispiel zur Auswertung *tuberkulostatischer Effekte* auf Basis der Infektions-Indices und gleichzeitig Ergebnisse zur experimentellen Streptomycin-Therapie bei der Mäuse-Tuberkulose (siehe hierzu Hirsch, 1951).

Tabelle Nr. 3

Wirkung einer kürzeren und einer längeren Behandlung mit Streptomycin 2000 E/20g Maus/Tag							
A. Unbehandelte Kontrollen				B. 31 Tage behandelt und getötet			
Maus Nr.	gestorben nach Tagen	getötet	Infektions-Index	Maus Nr.	gestorben nach Tagen	getötet	Infektions-Index
151	—	31	82	111	—	31	18
152	—	31	100	112	—	31	24
153	—	31	8	113	—	31	0
154	21	—	100	114	—	31	12
155	25	—	100	115	—	31	0
durchschnittlicher I.-I.			78	durchschnittlicher I.-I.			11
C. 31 Tage behandelt				D. 116 Tage behandelt			
118	56	—	100	116	—	116	4
119	85	—	100	117	—	116	0
120	—	116	0	128	—	116	3
126	116	—	69	129	—	116	0
127	77	—	88	130	—	116	0
durchschnittlicher I.-I.			71	durchschnittlicher I.-I.			1,4

Ergebnisse: Unter dem Einfluß von *Streptomycin* wird die Vermehrung der Tuberkelbazillen in den Lungen erheblich gehemmt (Gruppe B). Nach Absetzen des *Streptomycin* flackert die Infektion auf: $\frac{4}{5}$ der Tiere gehen an Tuberkulose zugrunde; der Infektions-Index (Gruppe C) erreicht die Größenordnung des I.-I. der unbehandelten Kontrollen (Gruppe A). Eine fast vier Monate täglich durchgeführte Behandlung mit einer hohen Dosis von 100 mg/kg bewirkt ein deutliches Absinken des I.-I. (Gruppe D), aber keine vollständige Eliminierung der Keime (auch Mäuse mit dem I.-I. = 0 zeigen im Lungenausstrich einzelne Tuberkelbazillen). Obwohl die Maus eine erhebliche natürliche Resistenz gegen Tuberkelbazillen aufweist und nur mit dichten Suspensionen erfolgreich infiziert werden kann, vermag sie keine spezifischen Abwehrkräfte zu entwickeln, um einen weitgehend eingedämmten Infekt vollkommen zu überwinden.

Zur tuberkulostatischen Aktivität von Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazon (G 22'597)

Abb. 1 zeigt die Ergebnisse einer vergleichenden Prüfung von G 22'597 und TB I im Mäusetest unter den Bedingungen eines schweren Infektes, der alle unbehandelten Kontrollen in der dritten und vierten Woche tötet. Die Absterbeordnung (bzw. die Zahl der

Sektionsmaterial (Lungen)

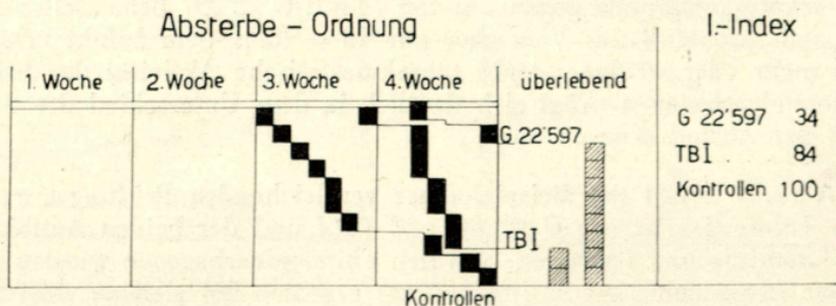
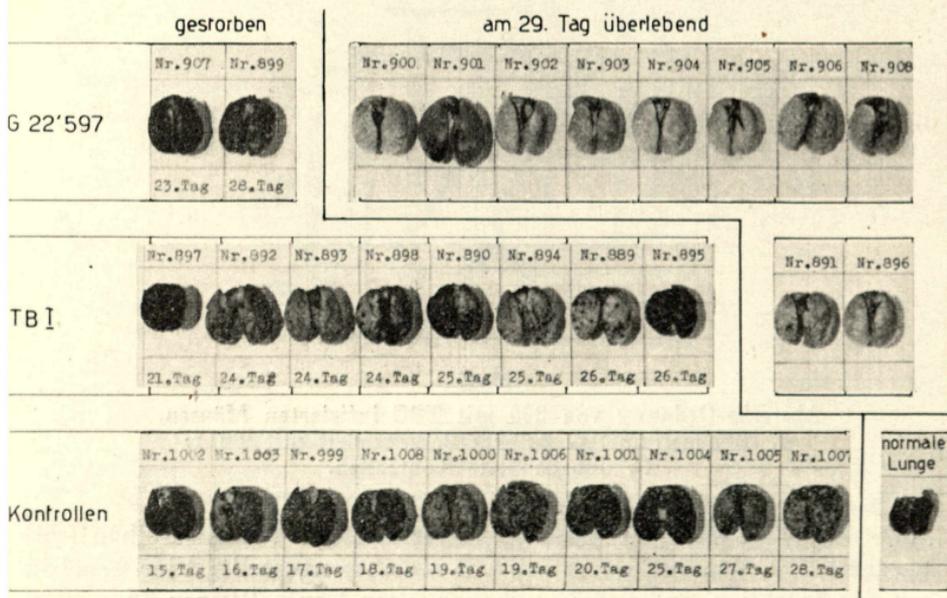


Abb. 1.

Vergleichende Prüfung von G 22'597 und TB I — 2 mg / 20 g Maus / Tag per os —
im Mäusetest (Sektionsmaterial, Absterbeordnung, Infektions-Indices).

Überlebenden), die Infektionsindices und der makroskopische Sektionsbefund der Lungen zeigen übereinstimmend die Überlegenheit des heterocyclischen Thiosemicarbazon. Die Wirkung von *TB I* beschränkt sich im wesentlichen auf eine Verzögerung des Absterbens; die meisten Tiere sterben in der vierten Woche, während von den Kontrollen die Mehrzahl schon in der dritten Woche zugrunde geht.

Absterbe-Ordnung von 230 mit TBC infizierten Mäusen

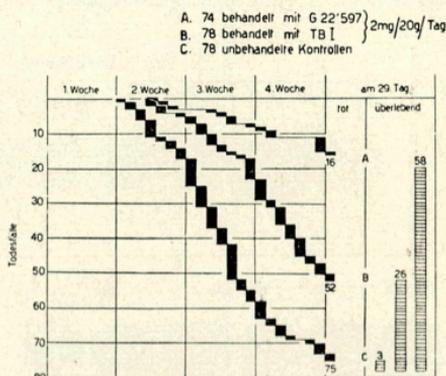


Abb. 2

Absterbe-Ordnung von 230 mit TBC infizierten Mäusen.

A. behandelt mit G 22'597; B. behandelt mit TB I;

C. unbehandelte Kontrollen.

Das Ergebnis von acht weiteren vergleichenden Versuchsreihen (mit insgesamt 230 Mäusen) ist in Abb. 2 zusammengestellt: Vier Wochen nach der Infektion sind von 78 unbehandelten Kontrolltieren 75 = 96% gestorben; von 78 mit *TB I* behandelten Mäusen sind 51 = 65% an Tuberkulose zugrunde gegangen; von 74 mit *G 22'597* behandelten sind bis zum Abschluß des Versuches nur 16 = 22% dem Infekt erlegen. Die mehr oder weniger starke tuberkulostatische Aktivität der beiden Thiosemicarbazonen prägt sich deutlich in dem Unterschied der Steilheit der Absterbekurven aus.

Abb. 3 liefert das Beispiel einer vergleichenden Prüfung der beiden Thiosemicarbazone *G 22'597* und *TB I* und der beiden Antibiotica *Streptomycin* und *Viomycin*; von den Thiosemicarbazonen wurden zwei Dosen (2 mg und 1 mg/20 g Maus/Tag) gegeben. Bei gleicher Dosierung (2 mg) vermögen die beiden Antibiotica und *G 22'597* einen tödlichen Infekt vier Wochen lang einzudämmen, wozu die Aktivität von *TB I* nicht ausreicht (der einzelne Todesfall in der *Viomycin*-Reihe kann nicht als signifikant gelten). Das Merkmal des Überlebens liefert im vorliegenden Versuch keinen Hinweis auf Unterschiede der Aktivitäten

Absterbe - Ordnung

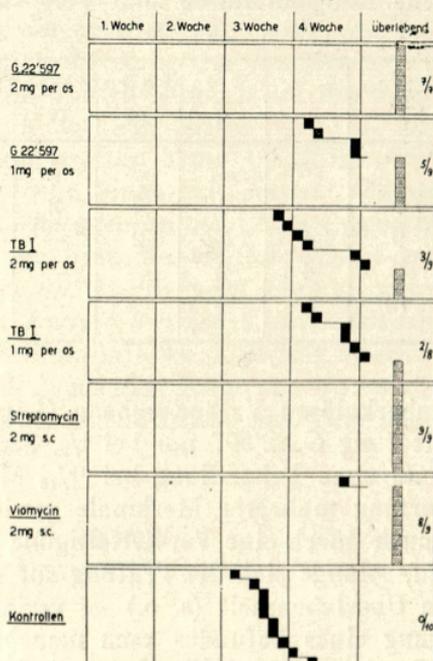


Abb. 3.

Vergleichende Prüfung von G 22'597, TB I, Streptomycin und Viomycin im Mäusetest.

von G 22'597, Streptomycin und Viomycin; dieser läßt sich jedoch aus den Daten der Infektions-Indices gewinnen. Die Keimzählung in Lungenausstrichen ergab:

nach Behandlung mit 2 mg	durchschnittlicher Infektions-Index
Streptomycin s. c.	30
Viomycin s. c.	47
G 22'597 per os	52
TB I per os	86
unbehandelte Kontrollen	95

Danach ist die Aktivität des Streptomycin den Aktivitäten von Viomycin und G 22'597 überlegen, die hinsichtlich der I.-Indices praktisch keinen Unterschied aufweisen.

Bemerkenswert ist, daß auf Grund der Absterbe-Ordnung 1 mg G 22'597 mehr leistet als 2 mg TB I. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der histologischen Untersuchung (Prof. Roulet) bestätigt.

Histologische Lungenbefunde zum Versuch Abb. 3

behandelt mit	Dosis mg	Zahl der Mäuse	davon Infektions-Stufen						
			I	II	III	IV	V	VI	VII
G 22'597	2	7	—	—	—	4	1	—	2
	1	9	—	1	3	2	1	1	1
TB I	2	9	4	—	2	—	1	2	—
	1	8	4	2	—	—	1	—	1
Kontrollen	—	10	6	4	—	—	—	—	—

Die schwersten tuberkulösen Veränderungen (I und II) finden sich nach Behandlung mit 1 mg G 22'597 nur bei $\frac{1}{9}$, nach Behandlung mit 2 mg TB I bei $\frac{4}{9}$ und ohne Behandlung bei $\frac{10}{10}$ Mäusen.

Durch die Auswertung mehrerer Merkmale gewinnt der Mäusetest eine Sicherheit, die auch durch eine Vervielfältigung der Tierzahl nicht erreicht werden kann, solange sich die Prüfung auf ein einziges Merkmal — wie z. B. die Überlebenszeit (s. o.) — verläßt. Ein wertvoller Beitrag zur Bestätigung eines Befundes kann manchmal auch dadurch geliefert werden, daß man vom Schema des typischen Testes abweicht und die Versuchsanordnung ändert.

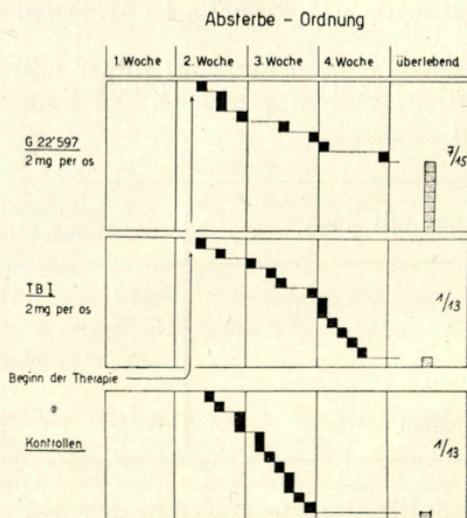


Abb. 4.

Vergleichende Prüfung von G 22'597 und TB I im Mäusetest;
Beginn der Therapie am neunten Tage nach der Infektion.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches. Mit der „Therapie“ wurde erst am neunten Tage nach der Infektion begonnen. Zu dieser Zeit ist die Ausbreitung der Bazillen in den Lungen weit vorgeschritten und ein Gewichtssturz leitet das Absterben der bis dahin nicht behandelten Mäuse ein (siehe Abb. 5). Unter diesen schweren Bedingungen gelingt es, mit 2 mg *G 22'597* noch 7 von 15 Mäusen über die vierte Woche hinaus zu retten, während die gleiche Dosis *TB I* nur noch vorübergehend die Absterbegeschwindigkeit etwas zu bremsen vermag; am Ende der dritten Woche setzt ein steiler Abfall der Absterbekurve ein. Damit wird einmal mehr nachgewiesen, daß das heterocyclische *Pyridin-3-aldehyd-thiosemicarbazon* (*G 22'597*) eine hervorragende tuberkulostatische Aktivität besitzt, welche die des Pionier-Präparates *TB I* aus der Reihe der in para-Stellung substituierten Benzaldehyd-Thiosemicarbazone deutlich übertrifft.

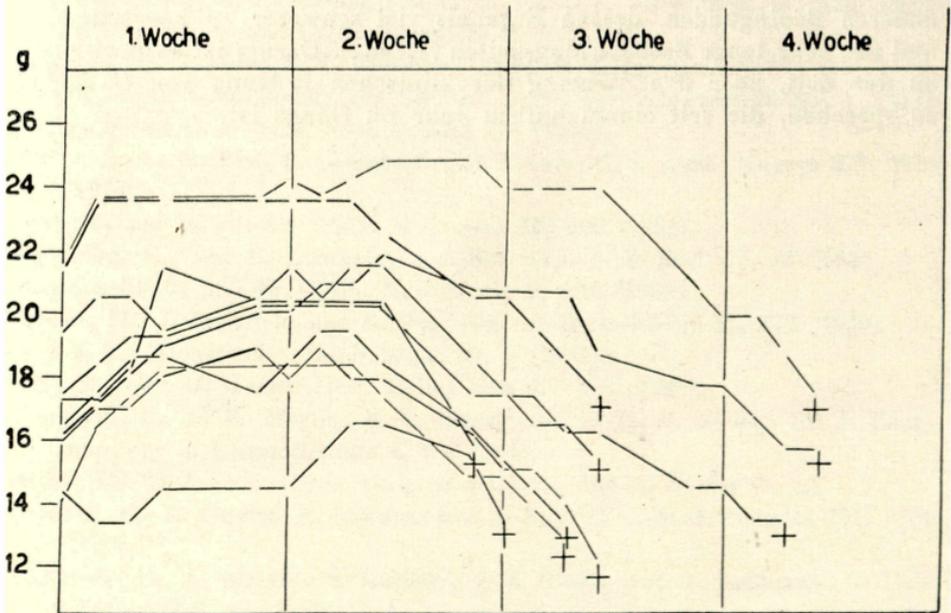


Abb. 5.

Gewichte einer Gruppe von zehn Jungmäusen (Mäusestamm Gy) nach Infektion mit dem humanen Tbc.-Stamm G 6.

Zur klinischen Prüfung neuer Tuberkulose-Heilmittel

Der tuberkulöse Infekt kann beim Menschen eine solche Fülle verschiedener Krankheitsformen hervorrufen, daß man besser nicht von der Tuberkulose, sondern von den Tuberkulosen des Menschen spricht. Der Verlauf der Tuberkulosen ist nicht nur von der Schwere des Infektes, sondern auch von der Abwehr-Reaktion — von der Immunitätslage — abhängig. Die Immunitätslage ist individuell verschieden; sie kann bei dem gleichen Patienten erheblichen Schwankungen unterworfen sein, so daß Verlauf und Ausgang eines Infektes nicht vorauszusehen sind. Wie einfach sind dagegen die Verhältnisse im Tierversuch! Wenn einmal Virulenz des Keimmaterials und Empfänglichkeit der Tiere gegeneinander ausgewogen sind, dann verläuft die Infektion mit der Regelmäßigkeit eines Uhrwerks ab.

Also: Mit der ersten Prüfung eines Heilmittels am Krankenbett beginnt eine neue Phase der Forschung, ein Experiment unter völlig anderen Bedingungen, dessen Ergebnis viel schwerer zu beurteilen ist und das sehr lange Beobachtungszeiten verlangt. Darum ist es noch nicht an der Zeit, über den Ausgang der klinischen Prüfung von G 22'597 zu sprechen, die seit einem halben Jahr im Gange ist.

Literatur

- American Trudeau Society:** Amer. Review of Tuberculosis **61**, 274 (1950).
- Buechi, J., R. Lieberherr und M. Flury:** Helv. Chim. Acta **34**, 2076 (1951).
- Chin, Y., H. H. Anderson, G. Alderton und J. C. Lewis:** Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. **70**, 158 (1949).
- Chorine, V.:** C. r. Acad. Sciences **220**, 150 (1945).
- Crochaw, B., und L. Dickinson:** Br. J. Pharmacology a. Chemotherapy **5**, 178 (1950).
- Curschmann:** Verhandlungen des Congresses für Innere Medizin, X. Congreß, Wiesbaden 1891, S. 83 ff.
- Domagk, G.:** Dtsch. med. Wschr. **61**, 250 (1935).
- Domagk, G., R. Behnisch, F. Mietzsch und H. Schmidt:** Naturwissenschaften **33**, 315 (1946).
- Emmart, E. W.:** Amer. Rev. Tuberculosis **56**, 316 (1947).
- Emmart, E. W., R. E. Kießling und T. H. Stark:** J. Bacteriology **57**, 509 (1949).
- Ewins, A., Philips und G. Newberry:** B. P. 516, 288.
- Feldman, W. H., und H. C. Hinshaw:** Amer. Rev. Tuberculosis **51**, 582 (1945).
- Finlay, C. A., G. L. Hobby und Mitarb.:** Amer. Rev. Tuberculosis **63**, 1 (1951).
- Freire, S. A.:** C. r. Acad. Sciences **231**, 728 (1950).
- Freire, S. A., N. Rist, F. Grumbach und S. Cals:** C. r. Acad. Sciences **231**, 1004 (1950).
- Fust, B., und A. Studer:** Helv. Med. Acta **18**, 449 (1951).
- Grunberg, E., und B. Leiwant:** Proc. Soc. exp. Biol. Med. **77**, 47 (1951).
- Hagenbach, R., und H. Gysin:** Experientia **8**, 184 (1952).
- Hamre, D., J. Bernstein und R. Donovick:** J. Bacteriology **59**, 675 (1950).
- Hirsch, J.:** Monatsschr. Kinderheilk. **99**, 5 (1951).
- Hirt, R., und H. Hurni:** Helv. Chim. Acta **32**, 378 (1949).
- Hoggarth, E., A. R. Martin, N. E. Storey und E. H. P. Young:** Br. J. Pharmacology a. Chemotherapy **4**, 248 (1949).
- Hurni, H.:** Diskussions-Bemerkung zu Fust, B., und A. Studer (1. c.).
- Levaditi, C., A. Girard, A. Vaisman und A. Ray:** C. r. Acad. Sciences **231**, 1174 (1950).
- McKenzie, D., L. Malone, S. Kushner, J. J. Oleson und Y. Subbarow:** J. Lab. a. Clin. Med. **33**, 1249 (1948).
- Nencki, M. von** (zitiert nach S. Fraenkel: Arzneimittel-Synthese, Julius Springer, Berlin 1921, S. 562).
- Rist, N.:** Fortschr. d. Tuberkuloseforschung I. 55—132, S. Karger, Basel und New York (1948).
- Suter, E.:** ibidem III, 210—307 (1950).
- Tréfouël, J., Mme. J. Tréfouël, F. Nitti und D. Bovet:** C. r. Soc. Biol. **120**, 755 (1936).
- Waksman, S. A., und H. A. Lechevalier:** Science **109**, 305 (1949).
- Waksman, S. A., H. A. Lechevalier und D. A. Harris:** J. Clin. Inv. **28**, 934 (1949).

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen des Naturhistorisch-medizinischen Vereins zu Heidelberg](#)

Jahr/Year: 1952

Band/Volume: [19_2](#)

Autor(en)/Author(s): Hirsch Julius

Artikel/Article: [Zur experimentellen Chemotherapie der Tuberkulose 1-19](#)