

I. RÉSZ.

**Salvarsan és rokon arsenobenzolderiva-
tumok biológiai vizsgálatának új módja
histochemiai módszerrel.**

	Oldal
I. A módszer technikai kivitele	12
II. A módszer teljesítőképességének határai, az alapját képező reactio mibenléte és a specificitás kérdése	15
III. Az arsenobenzolhalmozás morphológiája. A különböző arsenoderivatumok histologiai képe egérszervekben	18
IV. Histologiai salvarsankimutatás embereknél	27
V. Szintelen organikus anyagok láthatóvá tétele a testben. Eredmények és kilátások	30
Összefoglalás	32
Eine neue histochemische Methode zur biologischen Untersuchung des Salvarsan und verwandter Arsenobenzolderivate (Zusammenfassung der Resultate)	35
Irodalom	39

Míg az azo-csoport erős chromophor és az azobenzol derivatumaik közül kitűnő vitalis festékek kerültek ki, addig az arsen megfelelő vegyületének: az arsenobenzolnak a derivatumaik vitalis festőerővel nem bírnak és ennél fogva azok a testbe való befecskendezés után eltűnnek a vizsgáló szeme elől. *Ez a körülmény az érthető oka annak, hogy a chemotherapiás arsenobenzolderivatumok (Salvarsanderivatumok) esetében a bekebelezett gyógyszer további sorsáról biztosat sokkal kevesebbet tudunk, mint az azovegyületek vagy más olyan anyagok sorsáról, amelyek az élő testen való áthaladásuk közben színes voltuknál, vagy fénytörési különbözetnél fogva a mikroskoppal tovább követhetők vagy pedig histochemiai reactio útján könnyedén színezhetők a sejtekben és a szövetekben (lipoidok, vas stb.).* Ezzel kapcsolatban az arsenobenzolok esetében el voltunk eddig zárva attól a lehetőségtől is, hogy a vitalis eloszlás befolyását a biológiai hatásokra avagy különféle beavatkozások hatását az arsenobenzoldistributióra, kísérletekben tanulmányozhassuk.

Nem rég említést tettem¹⁾ arról, hogy ha specialis kísérleti módszerrel kísérleti állatok reticuloendotheljét (R. E.) neosalvarsannal töltöttem meg, az Gefrierschnitten aus der Leber gelang es mir, mit Glycerin-Ammoniak-Ag. NO₂ das Vorhandensein von Salvarsan in den Sternzellen mikrochemisch nachzuweisen“ és tovább azt a következtetést vontam le, hogy: „Diese schwarze Reaction ist also leicht auslösbar, wenn in den Zellen Salvarsan granula vorhanden sind, sie scheint daher zur Lösung jener wichtigen Frage geeignet, wie sich Salvarsan zum R. E. verhält“. — További vizsgálataim ebben az irányban teljes sikerre vezettek.

A f. évi X. internat. zoologiai congressussal kapcsolatban üléselő internat. experimentalis cytologiai congressuson



(Budapest, 1927. szept. 3—10.) már arról számolhattam be,²⁾ hogy *sikerült kidolgoznom egy olyan mikrotechnikai módszert, amellyel a befecskendezett Salvarsanderivatumok állatok, sőt ember testében is, a sejtekben és a szövetekben láthatóvá tehetőek.* Demonstrált készítményeimen a különböző arsenoderivatumokat egér és patkány szerveiben époly világosan lehetett látni, mintha nem a csaknem színtelen arseno-vegyület, hanem valamely intenzív színű vitalis festék injiciáltatott volna előzőleg a testükbe. Rámutattam akkor arra is, hogy a vizsgált arsenvegyületek szöveti localisatiója bizonyos savanyú diszozofestékekéhez egészen hasonlóknak bizonyult.

Sikerült tehát a salvarsancsoport biológiai vizsgálása számára ugyanolyan kedvező optikai feltételeket előteremteni, amilyen kedvező feltételek különben csak a legjobb vitalis festékeinknél vannak adva.

A chemotherapia vonatkozásai a vitalis festészethez *Ehrlich* óta tisztán állanak előttünk. *Ehrlich* műveiben nevezetes fejtegetéseket találhatunk a biológiai hatás és a vitalis eloszlás összefüggéseiről, amit a vitalis festékeknel mikroskoppal közvetlenül tanulmányozhatunk. Az ő munkálataiban a vitalis festés nagy szerepet játszott s ezzel kapcsolatos az is, hogy az alkotó vegyész és a kísérleti gyógyászat épen a festékchemia területén forrottak össze közös munkára. Mégis azt kell megállapítanunk, hogy a mikroszkop a chemotherapiai problémák vizsgálatánál csak eleinte játszott nagyobb szerepet s ennek igen egyszerű oka van. A chemotherapia eleinte, — amint maga *Ehrlich* mondotta — *festéktherapia* volt. Később azonban a chemotherapiai kutatás az optimalisan ható szereket olyan vegyületek körében találta fel, melyeknek erős színe nincsen s az ilyen anyagokat azután láthatóvá tenni a testben ritkán sikerült. Ez volt a helyzet a chemotherapeuticumok classikus csoportjában: az arsenobenzolok esetében is. Világos volt, hogy valamely módszer ezeknek a vegyületeknek a láthatóvá tételére sejtekben és szövetekben, nagyot lendítene dinamikájuk vizsgálatán és megértésén — de a latens szöveti kép „előhívóját“ nem sikerült megtalálni.

Egy ilyen módszer hiányát maga *Ehrlich* is érezte: az ő ösztönzésére és vezetése alatt próbálkozott *Stühmer*³⁾ az *Ehrlich*—*Bertheim*-féle reagenssel (paradimethylaminobenzal-

dehyd), de a Salvarsan *mikroskopos* kimutatására alkalmas módszert nem alkotott.*)

Kétségtelen, hogy ezen a téren eddig még *Stühmer* ment a legtöbbre (v. ö. *Stühmer*⁴) 491. l.), de a módszer durvasága és csekély teljesítőképessége miatt az ezen a téren histologiai megoldásra váró problémák megoldatlanul maradtak és kellett, hogy maradjanak.

Az ilyen és hasonló methodikai lehetőségek jelentőségéről *Ehrlich*, analog esetről beszélve — mikor a színes principium organikus festék — egy helyen (*Ehrlich* és *Herter*⁵) a következőket mondja: „Es wird immer von grossem Interesse sein, Farbstoffe herzuleiten, in denen ein starkwirkender Rest enthalten ist, weil möglicherweise in einem Teil dieser Derivate toxische Wirkung enthalten sein könnte und damit die Möglichkeit gegeben wäre, durch biologische und mikroskopische Untersuchungen den Zusammenhang zwischen Verteilung und Wirkung genau zu verfolgen, eine Forderung, deren allgemeine Bedeutung ohne weiteres ersichtlich ist“. Az itt ismertető módszer révén ez a teljesítmény, az arsenobenzoloknál elérett, mert a salvarsanderivatokban egy igen érdekes toxikus hatásokkal, sőt emellett még sokoldalú parasiticid hatásokkal is rendelkező anyagcsoportot sikerült a mikroskopos vizsgálat hatáskörébe vonni, a kívánt lehetőség tehát adva van: „biologiai és mikroskopos vizsgálatokkal az eloszlás és a hatások összefüggését pontosan követni“.

Nem mulaszthattam el, hogy ne idézzem annak a kutatónak idevágó véleményét, aki a vitalis festészeti és rokon módszerek jelentőségét minden irányban a legvilágosabban és a legátfogóbb pillantással látta meg.

*) „Es lassen sich wohl die Verhältnisse grobmakroskopisch zur Darstellung bringen, auch wohl zuweilen gröbere Gewebsabschnitte differenzieren, aber zum mikroskopischen Nachweis ist das Reagens leider nicht geeignet“. „Feinere Einzelheiten allerdings, etwa Verteilung der Niederschläge in einzelnen Gewebsabschnitten, Zellgruppen etc. konnten in der Regel nicht erkannt werden, da die Gewebe in der stark sauren und konzentrierten Sublimatlösung zu stark durch Koagulation verändert wurden“. *Stühmer*⁶), 591. l.

I. A módszer technikai kivitele.

A módszer ammoniákos ezüstnitrátoldatnak a szövetekben vitalisan rögzült salvarsan által való reductioján alapul.

Az ammoniákos ezüstnitrátoldat önmagában a histológiai használatra nem alkalmas, főként ezüstcsapadéknak a szövetekben való kiválása miatt. Mihelyt adódott az a feladat, hogy a salvarsant a szövetekben kimutassák, mindjárt gondoltak a könnyen reducálódó femsókra, hogy azokkal a hevesen reducáló salvarsan esetleg kimutatható lenne. A tiszta anorganikus reagensekkel való próbálkozások sem használható módszert, sem említésre méltóbb újabb megismeréseket nem eredményeztek. Még a szövettani munkálkodásnak olyan kiváló otthonában, mint az *Unna* intézete, végzett vizsgálatok is, melyeket *Tryb⁶⁾* folytatott, olyan többszörösen téves conclusióra vezettek, hogy ezüstnitrát (vagy osmiumsáv) reductioja útján csak a localis depot helyén szabadon fekvő salvarsanrögöket lehet megfeketíteni, ellenben a szervekből készült metszeteken a módszer nem válik be, „da einmal die Partikel in Zellen eingeschlossen sind und zweitens Salvarsan in solchen Fällen doch schon etwas von seiner Reduktionskraft verloren hat“.

A magam sikerét nagyrészt egy mikrotechnikai fogás kihasználásának köszönhetem, mely abban áll, hogy *egy isolatoranyagot alkalmazok és a reactiót a szövetben erősen viscosus közegben folytatom le. Ezt az isolatórt a glycerinben sikerült megtalálnom.*

Az eljárás sikerének másik előfeltételét jelentette az, mikor rájöttem, hogy *a latens salvarsankép: a szövetekben vitalisan megkötött arsenobenzol; egyszerűen formalinnal rögzíthető.* Egy olyan módszer, melynél — mint *Stühmer* különben sem kielégítő módszerénél — rögzítetlen anyagból való metszetekkel kellett volna küzködni, nem számíthatna szélesebbkörű alkalmazásra. — Több alkalommal meggyőződést szereztem arról, hogy a formalinban rögzített anyagból készült metszeteken a reactio ugyanazt az eredményt adja, mint nativ metszeteken.

A *Simarro* és *Ramón y Cajal*-féle histológiai ezüstmódszereket photographiai ezüstmódszereknek nevezték. Ennek a módszernek a lényegét megfordított photographiai processushoz kellene hasonlítani. A photographus a lemezen levő latens

ezüstképet többértékű phenolok, vagy aminophenolok oldatában való fűrösztéssel „előhívja“ és azután a nem reducált ezüstnek natriumthiosulfatoldattal való eltávolítása útján a képet állandósítja. A salvarsan láthatóvá tételére való szövettani eljárásnál a latens képet a metszetekben eloszlott arsenobenzol alkotja: a szövetekben vitálisan rögzült organicus „előhívó szer“, míg a reducalandó ezüstsó abban a fürdőben foglal helyet, melybe a salvarsantartalmú metszeteket helyezni kell, hogy a salvarsankép láthatóvá váljon. A metszetek azután épúgy natriumthiosulfattal állandósíttatnak, akárcsak valamely photogramm.

A salvarsanra vizsgálandó szervdarabkákat 4 rész dest. vízből és 1 rész (40%-os) formalinból álló keverékben rögzítem. A rögzített anyagot azután 4 napon belül feldolgozom. Tovább tartani a formalinban a darabkákat nem ajánlatos, mert később a folyadék a salvarsant a szövetekből, úgylátszik, kiáztatja.

A darabkákból azután fagyasztó mikrotomon metszeteket készítek, az eloszlásviszonyok áttekintése céljából 20—30 μ -os metszetek, a finomabb cellularis eloszlásviszonyok és a salvarsanlerakodással kapcsolatos kórszövettani elváltozások tanulmányozására lehetőleg 10 μ -os metszeteket vágok, ami a zsigerek esetében a csupán pár napos rögzítés dacára sem fog nagyobb nehézségekbe ütközni.

Most már a metszetek vagy direct, vagy H₂O-ben való fűrösztés után — az utóbbi eddigi tapasztalataim szerint nem hátrányos — egy ezüstöző reagensbe kerülnek.

Ez a reagens mindig frissen készítendő. 1.5%-os vizes *ezüstnitrátoldatba* annyi csepp *liquor ammonii caust.-t* cseppen-tünk, míg a folyadék ismét feltisztul. Ehez az oldathoz mármost *egyenlő mennyiségű glycerin bidestill. purissim-*ot adunk. Tehát a reagens összetétele:

1 rész ammoniakos ezüstnitrátoldat,

1 „ „ tiszta glycerin.

A reagenst Petri-csészébe töltjük és benne a metszeteket 30—35 percig fűrösztjük, vigyázva, hogy egymásra ne kerüljenek. A csészét közben néhányszor erőteljesen meghimbáljuk, hogy a légbuborékokat kihajtsuk a metszetek alúl.

Ebben a reagensben a szövetekben vitálisan rögzült salvarsanderivatam megbarnul vagy megfeketedik.

Ezután a fölösleges, nem reducált ezüst eltávolítása végett a metszetek dest. vízben való 1 percig tartó mosás után *natriumthyosulfat* 1%-os vizes oldatába kerülnek ca. 6—10 percre, ami a képek állandósítására elegendő lesz.

Most a metszeteket dest. vízben leöblítjük.

Mindig készítsünk olyan praeparatumot, amelyen tisztán a salvarsanreactio eredménye látható. Ebben az esetben tehát a további kezelés menete: víztelenítés a szokásos módon, xylol, canadabalsam, fedőlemez.

De miután a salvarsankimutatási eljárás a metszeteket nem rongálja meg, végrehajthatunk egyidejűleg különböző festéseket is, pl. magfestést (alauncarmin, haematoxylin), zsírfestést (scharlach R.) stb. s ezek kifogástalanul sikerülnek.

Tehát az arsenobenzolok kimutatásának menete röviden ez:

1. Rögzítés formalinban, 1—4 nap.
2. Fagyasztott metszetek.
3. (Dest. víz).
4. Ezüstnitrat-ammoniak-glycerin 30—35'.
5. Dest. víz 1'.
6. Natriumthyosulfat 1%, 6—10'.
7. Dest. víz.
8. (Magfestés).
9. Víztelenítés.
10. Balsam, fedlemez.

Látni való, hogy a *histologiai arsenobenzolkimutatás e módszere alig körülményesebb, mint a legegyszerűbb szövettani vaskémlés.*

Ha azzal a feladattal állunk szemben, hogy minimalis mennyiségű arsenobenzolt kell kimutassunk a szövetekben, az eljárást célszerű még egy actussal kibővíteni. Ez elé a feladat elé mindenekelőtt akkor állítatunk, ha *emberi* szervezetben intravenás injectio után kívánjuk a salvarsant kimutatni, miután embernél viszonylag kis mennyiségű arsenobenzol igen nagy tömegére a cellularis és fibrillaris structurának oszlik el. Eddig egy alkalmas esetünk volt, ahol a salvarsanvizsgálatot elvégeztem — erről később beszámolok. Ebben az elveszett esetben (lyssa) 10 éves gyermeknek 24 órán belül 2×10 ctgrm. neosilbersalvarsan injiciáltatott s ez a mennyiség már elég volt arra, hogy

a salvarsan halmozódást a Kupffer-sejtekben a leírt módon is szépen ki lehessen mutatni. Még erősebb salvarsanképeket is létre lehetett hozni azonban a következő módosítással: A készről leszedett metszeteket először dest. vízben jól kimossuk, majd az $\frac{1}{2}$ óráig tartó ezüstitrat-ammonia-glycerin fürdő után még *tiszta glycerinbe* visszük a metszeteket 1. órára; közben vigyázunk arra, hogy egymásra ne feküdjenek s a csészét többször meglóbáljuk, hogy a metszetek friss glycerinnel jussanak érintkezésbe.

Ez az erősítés valószínűleg azon alapul, hogy a lassan reducalódó ezüst a már jelen levő „ezüstcsírákhoz“ megy — egy ismért colloidchemiai jelenség, mely nevezetesen a photographiában és a mikrotechnikai ezüstöző eljárásoknál. (E. R. *Liesegang*) nagy szerepet játszik.

II. A módszer teljesítőkéességének határai; az alapját képező reactio mibenléte és a specificitás kérdése.

Az ismertetett módszerrel egereken és patkányokon végzett vizsgálataim szerint a befecskendezett arsenobenzolderivatium további sorsát és útját a testben sikerült épen annyira láthatóvá tenni és mikroskoppal követni, mint a legjobb savanyú vitalis festékekét. Láthatóvá lettek mindazok a morfológiai részletek, amelyeket az ilyen vitalisan festett készítményekről is ismerünk = a befecskendett anyag szemcsés halmozódása specialis sejtekben, a hajszáleres embolusok, a kiválasztással kapcsolatos szemcsés halmozódás a vesetubulusokban, a diffus beivódás mesenchymatikus rostokba. Miután az eljárás a salvarsant fedő fekete vagy sötétbarna színűre festi a szövetben, a finomabb részletek még élesebbek, mint pl. a trypankéknél. A test egész R. E. rendszerének finom, de nagyon distinct impraegnatioja az Earseno nevű cukor-salvarsan-vegyület injectioja után (24 óra mulva) olyan szép képet mutat, mely tisztán vitalifestészeti szempontból is elsőrangú teljesítménynek felel meg.

Ezeknek a dolgoknak a figyelembe vétele alapján azt merném mondani, hogy *az ismertetett mikrotechnikai módszerrel az arsenobenzolok kimutatásánál eléretett az a legmagasabb telje-*

sitmény, amire egyáltalában példa van hasonló eloszlásmódust követő anyagok szöveti demonstratiojában.

Az ammoniákos ezüstnitratoldattal előidézhető reactio a salvarsanderivatumnak nem specifikus quantitív chemiai reactiója, sőt tudvalevőleg azt a legkülönbözőbb reducaló anyagok adják. A reactionnak ez a nem specíficus jellege azonban az eljárás használhatóságát csak egészen különleges problema-állításonkánál teheti illusoriussá — a legtöbb esetben, a legfontosabb feladatok megoldásánál ennek a körülménynek semmi jelentősége nincs és nem is lehet. Ne felejtjük el különben, hogy olyan reagenst, amely csupán a salvarsannal összehozva képezne valamely színes terméket, még a laboratóriumi chemia sem mutatott fel*) s tulságos kívánság volna a histológustól azt kívánni, hogy a chemikus előtt járjon. — A legfontosabb követelményeknek, amelyek egy ilyen szövettani eljárással szemben emelhetők, az ismertetett módszer elegendő tesz, mert *a salvarsanderivatumokkal intensiv optikai effectus közben reagál, ellenben a kísérleti állatok normalis szöveteivel nem ad reactiót: a salvarsan electiv histologiai feltüntetésére tehát alkalmas.* A módszerrel kezelt metszetek, ha az egér vagy patkány előzőleg nem kapott salvarsant, teljesen szintelenek maradnak. Előrement salvarsaninjectio esetén ellenben a depho helyeken előttünk állanak a salvarsanhalmazódásnak qualitative és quantitative különböző erős barnásfekete képei. Világos, hogy *ha a reactio chemiai szempontból szigorúan specifikus volna a salvarsanra, akkor is ugyanezt a képet kapnánk és semmivel sem tudnánk többet.*

Egérnél salvarsant nem kapott állatokban positiv reactio csak egy helyen mutatkozik: a mellékvesében. A velő állomány diffus barnás színt vesz fel a reagensben, a velő és kéreg határán pedig egyes sejtek barnás fekete színűre festődnek. Ez a tünet, ha egyszer tudomásul vettük, nem ejthet tévedésbe és mint zavaró momentum teljesen jelentéktelenné lesz.

A reactio eredményének a megítélésénél annyiban nehezebb helyzetben vagyunk, mint a spectrum színeit viselő vitalis

*) „Man wird sich hier erinnern müssen, dass nach Ehrlich das paradimethylamidobenzaldehyd kein eigentliches Reagens auf Salvarsan ist, sondern, dass die in diesem enthaltene Amidogruppe die Reaction gibt“ (Stühmer³⁾ S. 595.

festékeknel, hogy a reactio termék barnás-fekete, tehát ugyanolyan színű, mint a barna pigmentek. Tapasztalt histologus azonban, ha ilyen differentiálásra kerülne sor, aligha fog tévedni s pl. nem téveszti össze salvarsannal az emberi anyagánál a májban esetleg előforduló pigmentet, amely persze a reagenssel nem kezelt metszeten is látható. — Tudott dolog volt eddig is, hogy ezüstözés a bőr melaninját és a melanin szintelen előterrékeit is megfeketítik. Ez a tünelény ennél az eljárásnál is bekövetkezik.

Egy figyelemre méltó kérdés az, hogy az ismertetett reactio segítségével a testbe bekerült s ott chemiai átalakuláson, oxydatios vagy reductiós reactiókon keresztül eső salvarsanderivatumokat a bomlástermékek melyik fokozatáig lehet histologiailag követni a szervezetben? — A salvarsanok chemiai átalakulásairól a szervezetben igen keveset tudunk. *Ehrlich* a testbe juttatott chemotherapeuticumok további sorsának kérdését főleg épen mint chemiai problémát vizsgálta. Az ő vizsgálatai irányították a figyelmet a 3 és 5 értékű arsenvegyületek között lehetséges átalakulásokra oxydatiós, illetve reductiós folyamatok révén s ezen a nyomon továbbhaladva *Voegtlin*⁷⁾, ⁸⁾, ⁹⁾, ¹⁰⁾, ¹¹⁾ és *társai*, *Simić*¹²⁾ és mások érdekes kísérletekkel mutatták meg, hogy ezekből az átalakulásokból egyes pharmacodynamikailag eltérő phasisokat ki lehet ragadni és chemiailag definiálni lehet. Ezekben a pharmacodynamikai fejtegetésekben a „változatlan“ salvarsan: tehát az *arseno*-fokozat mellett az *arsinoyd*- és *arsinsav*-fokozat szerepelnek. Histologiai reactióm az átalakulások chemiai jellemzésére nem látszik alkalmasnak, pl. az ezüstöt a salvarsannak megfelelő arsinsav is reducálja (*Ehrlich*, *Bauer* és *Benda*). De megmutatja e reactio a salvarsanderivatumok physico-chemiai állapotváltozását a testben és ezen az alapon bizonyos következtetéseket vonhatunk le: vizsgálataink szerint a salvarsanderivatumok felhalmozódása a R. E. sejtekben, amint azt mindjárt bővebben kifejítjük, azon alapul, hogy a salvarsanderivatum physikai állapotváltozást szenved: belőle praecipitatum keletkezik s ezt látjuk a sejtekben felhalmozva. Ez a praecipitatum-képződés a salvarsanok labilis vegyi szerkezetén alapul. Az arsinsavak ellenben nagyon stabil, crystalloid vegyületek, úgyhogy vegytani szempontból alig lehet elképzelni, hogy a testben physikai állapotukat vál-

toztassák és praecipitatum alakjában váljanak ki. Bizonyosnak látszik, hogy az arsinsavak, mint ilyenek, a R. E.-ben granularisan nem halmozódnak fel.

Ezek alapján nagy valószínűséggel mondhatjuk, hogy *azok a sokszor hatalmas mennyiségű arsenicalia-tömegek, melyeket a reactio a R. E.-ben láthatóvá tesz, amennyiben nem a bomlatlan arsenovegyületből állanak, a bomlásban még az arsinsav fokozat előtt állanak. Ugyanezt a következtetést vonhatjuk le a capillaris salvarsanembolusok összetételére vonatkozólag is.*

Amit a reactio segítségével a szervekben pár perccel az injectio után látunk, — s ilyenkor a szervekben már dús arsenobenzolképeket találhatunk —, az a bizonyossággal határos valószínűséggel *az el nem bomlott arseno-vegyület felhalmozódása.*

III. Az arsenobenzolhalmozás morphológiája. A különböző arsenoderivatumok histologiai képe egérszervekben.

Midőn már kezemben volt az alkalmas módszer az arsenobenzolok histologiai kimutatására, első dolgom volt, hogy a testbe fecskendezett arsenobenzol további sorsának morphologiai viszonyait kiderítsem és a különböző derivatumok között ebben a tekintetben valószínűleg majd mutatkozó különbségeket megállapítsam.

Eleve világos volt, hogy egy ilyen módszer birtokában a salvarsanok vitalis eloszlására, a szervekben való megkötetésére és kiválasztására vonatkozó ismereteinket egy lépéssel tovább lehet fejleszteni. Sok olyan problema állott itt teljesen megoldatlanul, sok olyan közvetlenül és elfogadható exactsággal be nem bizonyított föltevés volt ezen a téren, melyekre a végleges feleletet épen egy ilyen szövettani módszertől lehetett várni s meg is lehetett kapni, mihelyt láthatóvá lettek az arsenobenzolok a sejtekben és szövetekben. A salvarsaneloszlásról a szervezetben bizonyos képet eddig is alkothattunk az arsenmeghatározások adataiból, ám ezek az adatok nem mutatják meg, hogyan localisalodik az arsenobenzol a szerveken belül.

Ezekből az arsenmeghatározási adatokból ugyan próbál-

tak következtetni a finomabb elosztási viszonyokra. Most már birtokában lévén a közvetlen és exact adatoknak, könnyű kimutatnom a közvetlen bizonyítékok fölényét és egy fontos példán illusztrálnom, hogy ezek a következtetések milyen ingatag talajon mozogtak.

Gondolok az arsenobenzolok eloszlása és a R. E. készülék összefüggésére vonatkozólag nyilvánított nézetekre.

Egy oly problema ez, melynek megoldása évek óta késett és legújabb vizsgálatok közvetve épen most az érdeklődés előterébe tölték.

*Schlossberger*¹³⁾, ¹⁴⁾ és *del Baere*¹⁵⁾ nyomán fölteszik, hogy a salvarsanok a vérbe jutva a máj, lép, mellékvese, csontvelő stb. R. E.-sejtjeibe köttetnek meg, bár a salvarsan elhelyezkedését e szervek specialis sejtjeiben még senki sem látta, legkevésbé lehetett szó erről az embernél.

A legfontosabbnak vallott érv, amelyet emellett a fölvétel mellett *Schlossberger* nyomán többen felhoznak az, hogy a béfecskenedések után ezek a szervek tartalmaznak legtöbb arsenot, már pedig ezek ismeretesen épen a legkimondottabb „reticuloendothel-szervek“. Eltekintve attól, hogy *Foulerton* ugyanezen törvényszerűségéből a quantitativ arseneloszlási adatoknak azt következtette, hogy a salvarsant a szervek lipidja köti meg — a fenti érvelés gyöngesége kitűnik a következő módszerem segítségével megállapított adatból:

Ha egérnek intravenásan „Sulfo-Trearsenan“ nevű készítmény alakjában dioxydiamidoarsenobenzoldisulfonsavasz-natriumot fecskendezünk a vérébe, akkor a beadott arsenobenzol az injectio utáni órákban tényleg főleg a májban, a lépben, a vesében és a mellékvesében fog lekötetni — ámde a reticuloendothel ezekben a szervekben — és egyáltalában — legfeljebb minimalis salvarsan nyomokat tartalmaz — ugyanis az arsenobenzol a mondott szervek kötőszöveti stromájában elnyelve helyezkedik el.

A kísérletes salvarsankutatás ebben a histologiai módszerben egy olyan eszközt nyer a distributioval kapcsolatos problémák vizsgálatára, amely a quantitativ arsenmeghatározáshoz képest jelentékeny gyakorlati előnyökkel bír és olyan vizsgálatok céljaira is alkalmazható lesz, amelyeknél a régi módszerek szóba sem jöhetnek. Mindenek előtt messzibb vezet, mert a

szerveken belüli localisatiót is elárulja, a salvarsant a sejtek belsejében is megmutatja és pedig messzemenőleg még nem bomlott organicus vegyület stadiumában. A nehézkes és hosszadalmas arsenmeghatározásokkal szemben néhány órai mikrotechnikai munka után részletes qualitativ és quantitativ képet kaphatunk az arsenobenzol eloszlásáról a kísérleti állat szervezetében, úgy hogy segítségével sorozatos kísérletekben az arsenobenzol distributio eltéréseinek megállapítása rövid idő alatt lebonyolítható.

Eddigi vizsgálataimból az tűnt ki, hogy az arsenobenzolderivatumok) általában a vitalis distributionak azt a típusát követik, amelyet a savanyú vitalis sulfonsavfestékek, különösen a benzopurpurin sorozat tagjai. Azaz lehetne — sit venia verbo! — mondani, hogy a salvarsanok láthatatlan savanyú vitalis festékek.*

Ennek az eloszlástypusnak jellemző vonása az, hogy a befeccskendett anyag befogadásában a reticuloendothelialis sejtek szerepelnek. Lehetne reticuloendothelialis eloszlástypusnak is nevezni.

Az arsenobenzolok reticuloendothelialis halmozódását pompásan sikerült láthatóvá tenni, nemcsak az egér és patkány szerveiben, ahol a R. E. salvarsantartalma oly hatalmas méretet ölthet, hogy a metszetek szabad szemmel is erős barna színűek tőle, hanem sikerült immár egy emberi esetben is.

A salvarsan reticuloendothelialis halmozását már *Schlossberger* is föltételezte, de közvetett, valószínűségi érvekkel támogatva ezt a fölvételt. Exact módon bebizonyítva ez a fontos dolog eddig nem volt. A természetszerű, közvetlen bizonyíték: arsenobenzolderivatumok kimutatása a R. E. sejtekben mindeddig hiányzott, mert hiányzott a módszer, mellyel a reticuloendothelialis halmozódást qualitative és quantitative vizsgálhatjuk s így ezen a téren exact alapokon tovább építhetünk. A bizonytalan hypothesisok helyét most szemmelátható tények foglalhatják el.

Nem mulaszthatom el, hogy e helyen kifejezést ne adjak Isodalkozásomnak *Schlossbergernek* nagy theoreticus éleslátása fölött, aki előre meglátta a reticuloendothelialis halmozó-

*) A *kathodikus* Salvarsandichlorhydrat is!

dás lehetőségét, annak hatásait mérlegelte és helyesen tudott megjelölni bizonyos folyamatokat, hogy azokban a R. E.-nek szerepe van.

A vizsgálatokból az tűnt ki, hogy a különböző arsenobenzolderivatumok a testben igen különbözőképpen oszlanak el. A további vizsgálatok ezen jellemző különbségekről szóló adatokon épülnek föl.

A vizsgálatokat egereken végeztem 9, a gyakorlatban használt legfontosabb arsenobenzolderivatumokat tartalmazó gyártmánnnyal.

Az 1 cm³ oldatban intravenásan befecskendezett dosis tolerata injectioja után végzett vizsgálatok a következő eredményre vezettek:

A derivatumoknak a szövetekben a következő rögzülési típusait lehetett látni:

1. Szemcsés halmozódás reticuloendothelialis sejtekben.
2. Szemcsés halmozódás a vesetubulusok hámsejtjeiben.
3. Diffus beívódás specialis mesenchymatikus rostokban és fibrillákban.
4. Arsenobenzolembolusok a capillarisokban.

A különböző praeparatumokat a histologiai képek alapján a következő három csoportba lehet osztani:

I.

1. Salvarsan (Höchst) mint Dichlorhydrat oldva.
2. Silbersalvarsan (Höchst).
3. Neosilbersalvarsan (Höchst).
4. Salvarsan (Höchst) alkalisalva.

II.

- Neosalvarsan (Höchst).
Sulfotreparsenan (Clin.).

III.

- Sulfoxyl-Salvarsan (Höchst).
Eparseno (Pomaret 132) (Poulenc).
Arsalyt (Höchst).

Az I. csoportra jellemző, hogy a befecskendett anyag a nagyvérkör szűk capillarisaiban, de leginkább a tüdő capillarisaiban, amelyeken először kell áthaládnia, nagyon sok kerekded arsenobenzolból álló embolust képez és a R. E. parti sejtjeiben erősen halmozódik.

A II. csoportnál a szövettani képet a befecskendezett arsenobenzol beivódása kötőszöveti rostokba és fibrillákba dominálja. Kiderült az eddig nem ismert körülmény, hogy bizonyos salvarsanderivatumok hatalmas reservoirja a testben a kötőszövet.

A III. csoportra jellemző, hogy a szövetekben kimutatható arsenobenzol mennyiség viszonylag kevés: a kötőszövethez nem affinisak és a R. E. halmazás kistokú.

A salvarsaneloszlás szövettani képe a jellemző különbségekkel már 70' múlva ki van alakulva és később lényeges eltolódások nincsenek.

Ezért a 70'-es leleteket veszem alapul a leíráshoz.

1. *Salvarsan*, mint dichlorhydrat oldva:

A *tüdő* hajszálereiben rengeteg kerekded arsenobenzol-embolus. Ugyanílyen hajszáleres embolusok elég sűrűn vannak a szívizomban, kevesebb az agyban, vesében, mellékvesében. A R. E.-nek *a vérmederrel közvetlen érintkező sejtjeiben (Uferzellen, Siegmund)* meglepően nagy mennyiségű salvarsan, így *a májban* a Kupffer sejtekben, *a lépben* a pulpában, de különösen a folliculusok határán fekvő sejtekben, *a mellékvese capillarisok* endotheljében, *a vese* glomerulusaiban és a tubulusok között fekvő phagocytáló elemekben. E sejtek, különösen a májban és lépben, duzzadásig teltek meglehetősen durva salvarsanszemcsékkel. A vese kanyarulatos csatornáinak hámsajtjeiben (ebben az időben még csak) finom, halvány szemcsézetet mutat a reactio.

2. *Silbersalvarsan*. Teljesen azonos a kép, de a kétszeres adag ellenére ($1/_{700}$ grm. Dichlorhydratsalvarsan — $1/_{300}$ grm. Silbersalvarsan) kifejezetten, bár nem sokkal kevesebb embolus a szervekben és kevesebb arsenobenzol a R. E.-ben. A R. E.-ben lerakodott mennyiség 24 óra múlva leölt állatokban sem mutatott észrevehető szaporulatot, csak a fekete szemcsézet a vesetubulusokban erősödött. A tubuli contorti sűrűn telve voltak finom szemcsékkel.

3. *Neosilbersalvarsan*. Ismét ugyanazon eloszlástypus, de az embolusok mennyisége és a R. E.-ben felhalmazott arsenobenzolmennyiség megint egy fokkal kevesebb, mint a Silbersalvarsannál.*) Ennél a derivatumnál megvizsgáltam 24 óra

*) Ha tekintetbe vesszük az adagok nagyságát, akkor kitűnik, hogy a histochemiai salvarsan-reactio egy nagy (grandualis) különbséget tett

mulva *thoracalis* és *mesenterialis nyirokcsomókat* is és azokban szintén kifejezett salvarsanhalmazást találtam a reticuloendothelialis elemekben. A *bőrben* pedig, különösen a legfelszínesebb capillarisokban, számos salvarsanembolust lehetett látni, melyeket sötét salvarsanbeivódásos udvarok öveztek. Általában ennél a praeparatumnál a reticuloendothel sejtekben a salvarsan finomabb szemcsézet alakjában halmozódik. A kiválasztási kép a vesében ugyanúgy viselkedik, mint a Silber-salvarsainál említettem.

4. *Salvarsan, alkalisálva* (mononatrium só) és „*Salvarsannatrium*”. A két praeparatum viselkedése között feltűnőbb eltérés nem mutatkozott. A hajszáleres embolusok száma és a reticuloendothelialis halmozódás mértéke mintegy félakkora, mint az ezüstsalvarsannál és kisebb, mint a neosilbersalvarsannál. A salvarsankép a vesében ugyanúgy viselkedik, mint a fentieknél.

Patkányoknál ki lehetett mutatni, hogy a *csontvelő* R. E. sejtei is a salvarsanhalmazó sejtek közé tartoznak (Neosilbersalvarsan, Salvarsan alkalisált.)

Mindegyik felsorolt derivatum diffus beivódás alakjában megkötetik a kötőszövet azon részeiben is, amelyek a következő csoportnál a legfőbb dephelyek, de aránylag kis mértékben: az illető kötőszöveti rostok s fibrillák csak világosbarna reakciót adnak.

5. *Neosalvarsan*. 6. *Sulfotreparsenan*. Ezeknek a derivatumoknak fő dephelye nem a R. E., hanem a kötőszövet. A lép trabecularis váza, egész kötőszövetes stromája, a portaelágazások falának és általában az érapparat falának bizonyos rostjai a sok beivódott salvarsan miatt sötétbarnára, vagy egészen feketére festődnek. Azon tünetmennyel állunk tehát szemben ezeknél az arsenobenzoloknál, amelynek analogonját már ismertük a trypankéknél, de más vitalis festékeknél is, így azo-

érzékelhetővé az ezüstsalvarsan és a neoezüstsalvarsan között. Neoezüstsalvarsannál szinte kétszer annyi ($1/175$ grm. = dos. toler. pro 20 grm. testsúly) beadása után észleltem megközelítőleg olyan fokú arsenobenzol-emboliát és reticuloendothelialis halmozást, mint az ezüstsalvarsan tolerált adaga ($1/500$ grm. pro 20 grm. testsúly) után. Amint később közlendő vizsgálataim megmutatták, ez a különbség a neoezüstsalvarsan viszonylag kisebb toxicitásának szövettani alapja.

kéknél, benzopurpurinnál stb. A trypankék és az arsenobenzolok részben a kötőszövetnek azonos részeit itatják át. Ha pld. a lép arsenobenzol képét és trypankék intravenás befecskendése után talált képét összehasonlítjuk, akkor tökéletesen ugyanazt a kötőszöveti rendszert látjuk megfestődve, csak más-más színre. Az érapparat falában a localisatio szempontjából némi differentiák vannak. A sulfotreparsenannál a tüdőben is csak elvétve 1—2 embolust láthatunk egy metszeten, a R. E. halmozódás csak nyomokban mutatható ki. A későbbi órák folyamán a R. E.-ben még fokozódik a halmozódás, de végeredményben is csak kis fokot ér el. A neosalvarsan mintegy átmenetet képez az előbbi csoporthoz, mert itt egyes kísérletekben még sok tüdőembolus és elég kifejezett reticuloendothelialis halmozódás is mutatkozott a kötőszöveti halmozás mellett. Mindkét derivatumnál már 70' múlva is intensiv szép kiválasztási képet találni a vesé kanyarulatós csatornáiban, mely 24 óra múlva még jóval erősebb fokot ér el.

7. *Sulfoxyl-Salvarsan*. Nagyon különös elosztási viszonyai vannak. Tudott dolog volt, hogy ez a salvarsan cumulatora leghajlamosabb, tehát azt lehetett volna gondolni, hogy a szövetekben nagymértékben raktároztatik. Ezzel szemben kitűnt, hogy ennél a derivatumnál a szövetekben a reactionnal kimutatható salvarsanmennyiség minimalis. Embolusokat egyáltalában nem okoz. Az első óra elteltével a R. E.-ben még csak kevés finom szemcse van, később a halmozás maximumán is, melyet kb. 50 óra múlva ér el, csak kislefokú, finomszemcséjű halmozódást tapasztaltam. Feltűnő volt, hogy másnapra a bőr histiocytái is megteltek finom szemcsékkel s a halmozás itt aránylag erős fokú volt, mert kb. a Kupffer sejtek halmozásával volt egyenlő. A vesé kanyarulatós csatornáiban a szemcsészet képe 70' múlva kb. a neosalvarsannal egyező volt. 4 nap múlva, mikor még a testben sok salvarsan kell hogy legyen, hiszen a dosis tolerata ilyenkor még le tud győzni egy recurrens fertőzést, még csak a májban mutatkozott némi reactio.

A kötőszövet iránt nem mutat affinitást ez a derivatum.

A Sulfoxylsalvarsan *Bauer*¹⁶⁾ és saját vizsgálataim szerint kifejezetten colloidalis sajátságokkal bír és nehezen diffundál. Ez a körülmény összevetve azzal, hogy ezt a salvarsant a szervek minimalis mértékben kötik le, arra engedett követke-

tetni, hogy ez a derivatum a vérben magas concentratióban sokáig kering, abban mintegy megrekedve, szemben az erősen histotrop derivatumokkal, amelyeknél a vérből a szervek, nevezetesen a R. E. tekintélyes salvarsanmennyiséget kötnek le. Ez az eredmény frappánsan egyezik azzal az eredménnyel, amelyre *Wechselmann, Lockemann és Ulrich*¹⁷⁾ jutott arsenmeghatározások útján. Ők ugyanis embernél azt találták, hogy épen a Sulfoxylsalvarsan után a vér nagyon sokáig, a többi salvarsan-derivatumhoz képest rendkívül nagy mennyiségű arsen-t tartalmaz pld. egy esetben a harmadik napon még a beadott mennyiség 60%-ának megfelelő arsen-t tartalmazott. Ugyanekkor más derivatumoknál, amelyeket én erősen reticuloendotheliotropoknak találtam, megállapították, hogy ezek csakhamar a szervekbe kell, hogy lekötessenek.

A sulfoxylsalvarsan ilyen különleges viselkedésének a magyarázatát véleményem szerint ezek a vizsgálataim adták meg, melyek szerint tehát ez a derivatum nagy concentratioját a vérben azért képes sokáig megtartani, mert azt sem a R. E., sem a kötőszövet (számbavehetően) nem kissebbitik.

Ami a bőr histiocytáiban észlelt halmozást illeti, erre vonatkozólag további vizsgálatokat tartok szükségesnek, amelyek során a nagyon heterogen összetételű Sulfoxylsalvarsan oldatnak egyes componenseit is meg kellene vizsgálni a reactio szempontjából.

8. *Eparseno (Pomaret 132.)*. E cukorsalvarsannál a szövetekben lerakódásra kerülő mennyiség csekély. Embolusokat egyáltalában nem alkot. 70' múlva a parti sejtekben még csak nyomokban van salvarsan. Nagy áthatoló képességgel bír, a reticuloendothelialis halmozódás nem szorítkozik a parti sejtekre, hanem az egész testben az összes extravascularis fekvésű histiocytákra is kiterjed. 24 ó. múlva, a halmozás maximumán az egész test összes R. E. elemeinek protoplasmájában szénfekete, roppant finom szemcséket látunk elhíntve. De a halmozás quantitative meg sem közelíti azon méreteket, melyet az erősen reticuloendotheliotrop derivatumok (1.—4.) elérnek, makroszkopice a metszeteken fel sem tűnik, de a specialis sejtek finom, distinct impraegnatioja talán az összes derivatumok között a legszebb mikroszkopos képet nyújtja. Láthatóvá lesz a bőr egész histocytá rendszeré, fekete szemcsékkel telt sejtek

tűnnek fel a szívizomban, a vázizmok kötőszövetében, a vesetok zsírszövetében stb.

A vesében már 70' mulva pompás kép mutatkozik. A kanyarulatot csatornák sűrűn telvék finom fekete szemcsékkel. Másnap a kép még erősebb, a vesekéregnek már szabad szemmel is kivehető szürke színt kölcsönöz. Erősebb kiválasztási képe csak a következő praeparatumnak van.

9. *Arsalyt.* Ennél a praeparatumnál a módszer az összes szervekben R. E. sejtekben és kötőszövetben egyaránt negatív eredményt ad, csupán a lép stromája ad igen halvány reactiót; ellenben a vesében oly erős reactiót kaptam 70' és még inkább 24 ó. mulva, hogy a metszetek makroszkoposan egészen szürkéknek látszanak. A tubulusok tömve vannak fekete, elég durva szemcsékkel.

A salvarsanok szöveti lekötésének időbeli viszonyaira vonatkozólag a következő adatok tájékoztatnak:

Az erősen reticuloendotheliotrop salvarsanoknál a hatalmas R. E. halmozódás képe már 8' mulva p. i. megtalálható, hogy később már észrevehetően ne is nőjön.

Neosilbersalvarsannál a dosis tolerata intravenás befecskendezés után leölt állatoknál 24 ó. mulva a kép, szemben a 70'-es képpel, észrevehetően változást nem mutatott, 48 ó. mulva a hajszáleres embolusok oldódása, megkevesbedése volt észlelhető, 3 nap mulva az embolusok száma kb. félfannyinak találtatott és a R. E. halmozás különösen a lépben kifejezetten megkevesbedett; 6 nap mulva a tüdőben az embolusok apró szemcsés maradványoktól eltekintve eltűnnek, a lépben a halmozásnak csak nyomain voltak még láthatók, különösen eltűntek a folliculusokat övező salvarsangyűrűk. A Kupffer sejtekben azonban már ekkor is elég sok salvarsan volt.

Egy alkalisált salvarsan túlادagolása miatt a 13 napon elpusztult egérnél a májban még a Kupffer-sejtek salvarsan szemcséket elég sűrűn tartalmaztak.

A granularis salvarsan halmozódás cykusa tehát maximalis halmozás esetén 18 napot tehet ki.

Subcután adagolás esetén azt a szerepet, melyet intravenás adagolásnál a parti sejtek játszanak, a bőr és bőralatti rétegek histiocytái veszik át. Neosilbersalvarsan és sulfotriparisenan subcután adagolása után 24 órával a histiocytákat, külö-

nösen az előbbi derivatumnál, salvarsanszemcsékkel telve találtam, úgyszintén erős reactiot adott a kötőszövet, különösen a rugalmas rostok.

A halmozás szempontjából ezen vizsgálatok alapján a megvizsgált derivatumokat a következő sorba állíthatjuk:

- | | |
|--|-----------------------|
| 1. Salvarsandichlorhydrat. | 6. Sulfotreparsenan. |
| 2. Silbersalvarsan. | 7. Eparseno. |
| 3. Neosilbersalvarsan. | 8. Sulfoxylsalvarsan. |
| 4. Salvarsan alkal., „Salvarsannatrium“. | 9. Arsalyt. |
| 5. Neosalvarsan. | |

Az első 5 derivatumnál a R. E. halmozás mértéke fokozatosan csökken. Ezek a derivatumok egyszersmint embolusokat is képeznek. Constatálhatjuk azt a figyelemre méltó törvényszerűséget, hogy az embolusképződés gazdagsága egyenesen arányos a R. E. halmozás mértékével. 1—5-ig fokozatosan csökken az embolusok száma is. A 6—8 derivatumoknál a R. E. halmozás kistokú és lassankint fejlődik ki. A 9-nél hiányzik. Az 5. és 6. derivatumnál a szövetekben megkötött mennyiség még elég nagy, mert a kötőszövet sok arsenobenzolt megköt. A 7—9-nél a szövetekben kimutatható arsenobenzol mennyiség minimalis. A sor elejétől végéig tehát az arsenobenzol képek intenzitása és bonyolultsága csökkenő tendenciát mutat.

Ez a tétel nem vonatkozik a vesetubulusokra.

A granulumképek a vesében épen fordítva, a sor vége felé levő praeparatumoknál a legintenzívebbek és leggyorsabban alakulnak ki, a sor elején levő praeparatumoknál lassan jelennek meg és gyöngék, míg az 5. és 6. átmenetet képeznek. A R. E. granulum halmozódás és a tubularis granularis halmozás között tehát bizonyos ellentétesség mutatkozik s ennek a relationak okait és szükségszerűségét később publikálandó vizsgálatok ki is mutatták.

IV. Histologiai salvarsankimutatás embernél.

Hála a módszer érzékenységének: a reticuloendothelialis arsenobenzolhalmozás tünetényét már embernél is sikerült kimutatnom. Általában eddig az ember R. E. rendszere a halmozások szempontjából a tapasztalatok szerint a kísérleti állatok R. E.-jével lényegben egybehangzó viselkedést mutatott s

ennélfogva a priori is nagy valószínűséggel birt az a felvétel, hogy az állatkísérleteink eredményei a lényegesebb mozzanatokkal illetőleg az emberre is átvihetők. Az emberen végzett arsenmeghatározások már eddig is bebizonyították, hogy épen úgy, mint állatoknál, a vérbe fecskendett arsenobenzol egy része az injectio után igen rövid idő alatt a belső szervekben deponálódik (l. különösen *Wechselmann*, *Lockemann* és *Ulrich*¹⁷-ot). Nehéz lett volna elképzelni, hogy embernél a histologiai localisatio szempontjából ez az arsenobenzol-megkötés a szervekben másként történjék, mint az állatoknál. Sőt az a körülmény, hogy a nem reticuloendotheliotrop sulfoxylsalvarsan kivételes viselkedést épen olyan értelemben mutatott, mint az az állatkísérletek eredményeiből következtethető volt, arra mutatott, hogy a vitális elosztás dynamikája és morphológiája nemcsak az általános principiumok tekintetében követi az állati typust, hanem az egyes derivatumok között állatkísérleteimben kimutatott különbségek az embernél is analog módon érvényesülnek. A későbbi vizsgálatok aztán, amely vizsgálatok a distributio mozzanatok és a biologiai effectusok összefüggéseire is kiterjedtek, ezt a feltevést a valószínűségnek igen magas fokára emelték. Ennek közvetlen és definitív bizonyítékát természetesen az képeznék, hogyha alkalmas emberi esetekben különböző salvarsanderivatumok adagolása után e reactioval ugyanazon histologiai képeket lehetne találni, mint az állatoknál. Azonban a priori nem volt biztos, hogy a salvarsankimutató pld. a R. E.-ben sikerüljön, mert az a testsúlyhoz viszonyítva aránylag kevés salvarsanmennyiség, amit embernek adni lehet, esetleg a sejteknek és szöveteknek ilyen nagy quantumára eloszolva alul marad azon küszöbértéken, amely még e reactioval kimutatható, vagy pedig a R. E. sejtekbe ideiglenesen felhalmozódva hamarabb távozik azokból, mint a halál időpontja. Olyan esethez hozzájutni, amelyben az injectio után percek, vagy 1—2 óra múlva következett be a halál, a lehető legkritikábban sikerülhet a vizsgálónak.

Mindenesetre eredményt csak abban az esetben lehet remélni, mikor az állatkísérletekben erősen halmozódó derivatum nagy adagja után rövid idővel következett be a halál. Eddig két ilyen alkalmas eset adódott s ez esetekben a salvarsan kimutató a szövetekben tényleg sikerült is.

Alkalmam volt 4 órával a halál után vizsgálatra megkapni egy 10 éves gyermek szerveit, aki *lyssában* pusztult el és a halál beállta előtt 17 és 7 órával 10—10 ctgrm. Neosilbersalvarosan fecskendeztetett be könyökvisszerébe 10—10 cm³ dest. vízben oldva.

A salvarsanreactioval a májban a Kupffer sejtekben finom, szemcsés salvarsanhalmozódásnak igen szép képét lehetett találni.

Jelentékenyen kevesebb salvarsanszemcsét találtam a mellékvesében a velő és kéreghajszálerek endothelsejtjeiben. Kimutatható volt a salvarsanhalmozás az inguinalis nyirokmirigyekben, igen kevés salvarsant kilehetett mutatni a lépsinusok endotheljében, a vesékben nyomok, a bőrben és a tüdőben a reactio teljesen negativ volt. Embolusokat tehát nem lehetett kimutatni.

Egy másik esetben, mikor a beteg egy hosszabb neosalvarsan-higany cura után, 5 nappal az utolsó injectio után (higany? salvarsan?) halt meg és egy további esetben (*anaemia perniciosa progressiva*), amely salvarsant egyáltalában nem kapott, a reactio a fentemlített szervekben teljesen negativ volt. Ezek az esetek controllként szolgálhatnak.

Ezen eredmény alapján szabad fölvennünk, hogy alkalmas esetekben a többi, erősen reticuloendotheliotrop salvarsanok halmozását (Altsalvarsan, Silbersalvarsan, Salvarsannatrium) is kilehet mutatni ember R. E. sejtjeiben. Ez a következtetésünk már be is igazolódott a salvarsannátriumra vonatkozólag, mióta e sorokat írtam: egy újabb esetben ugyanis 10 ctgrm. salvarsannatrium intravénás befecskendése után 8 órával elhalt ca. 80 kgrmmos férfinak a májában szépen sikerült kimutatni a salvarsanhalmozást a Kupffer-féle sejtekben, más szervekben a reactio negativ volt.

A neosilbersalvarsan alkalmazásának előbbi esetben követett módja mellett (10 cm³ oldószer, lassú fecskendezés) előbbi individumnál capillaris embolusokat nem okozott, vagy azok a halál előtt liquidálódtak, — szemben a patkányon és egéren észlelt viselkedésével, ahol embolusokat mindig okozott s ezek kb. 3—4 napig persistáltak. Ez a lelet természetesen nem bizonyítja azt, hogy a hajszáleres arsenobenzol embolusképződés embernél egyáltalában nem jön létre. Sőt az előttünk

fekvő tényálladékból szinte bizonyosan következtethetem, hogy az állatkísérleteim tanúsága szerint embolusképződésre leghajlamosabb Salvarsandichlorhydrat, legalább is ha töményebb oldatban alkalmazzák, az erekben embernél is okoz salvarsan-embolusokat.

Ismeretes dolog, hogy midőn az ember- és állat-gyógyászatban még a savanyú salvarsanoldatot alkalmazták, az intravenás injectio után fellépett súlyos tünetek, az agoniás tünetek és a kórbonctani-kórszövet-tani lelet elemzése alapján már fölvetették, hogy a salvarsan a tüdőben emboliákat okoz s azon histológiai képek alapján, amelyeket a kísérleti állatoknál a savanyú salvarsanoldat alkalmazása után reakciónk láthatóvá tett, ennek a föltevésnek a helyességében nem kételkedhetünk. Nyúlnál a salvarsandichlorhydrat (és a töményen alkalmazott alkalisalt salvarsan) praecipitatumának fennakadását a tüdőben *Stühmer*³⁾ is kitudta mutatni az *Ehrlich-Bertheim* reagenssel.

V. Szintelen organikus anyagok láthatóvá tétele a testben. Eredmények és kilátások.

Újabban figyelemre méltó törekvéseket registrálhatunk, melyek előtt hasonló célok lebegnek, mint aminő cél eltérésére a salvarsanokra vonatkozólag e közleményben módszert ajánlottam. Ezek a vizsgálatok szintén arra törekednek, hogy bizonyos szintelen szerves anyagokat a testben láthatóvá tegyenek.

A technikai elv, amit alkalmaznak, egészen más, mint amelyet én alkalmaztam. *Möllendorff* és *Herzfeld*¹⁸⁾ vizsgálatai adták hozzá az alapokat. Az ők vizsgálatai szerint basikus festékek is behatolnak a R. E.-be, csak hogy normalis körülmények közt ott nem halmozódnak fel. Ha azonban a basikus festéket olyan állatba injiciálják, amelyek előzőleg savanyú festékeket halmoztak fel, reticuloendothelialis sejtjeikbe, akkor a granulomoknak a basikus festékekkel való vitalis felülfestése jön létre a R. E. sejtjeiben. *Schulemann*¹⁹⁾, ²⁰⁾ aztán példát mutatott e tünelmény kiaknázásának egy érdekes lehetőségére: sikerült neki bizonyos szintelen medicamentumok halmozási helyeit kimutatnia basikus festékekkel való utólagos vitalis felülfestéssel. Később *Roehl*²¹⁾ sikerrel alkalmazta a chrysoidin R. besicus festéket a germaninsorozat szintelen sulfonsavai localisatiojának

kinyomozására, amely huyganyyszármazékok közé a nevezetes trypanosomagygyszer: a Bayer 205 (Germanin) is tartozik.

*Schulemann*²⁰⁾ szerint remélhető, hogy ez a methodika még tovább is kiépíthető olyan szintelen colloidok, illetve semicolloidokra is, melyek normalis vagy kóros körülmények között a R. E. sejtjeivel kapcsolatba lépnek, mint pl. tápanyagok bomlás-termékei (fehérjék, zsírhasítási termékek s. i. t.), valamint toxinok és sok más biologiailag fontos anyagokra, melyek kolloid oldatúak. *Schulemann*t pontos és kiterjedt vizsgálatok savanyú festékekkel, vezették arra a felfogásra, hogy a colloidok (semicolloidok) eloszlása elsősorban a physico-chemiai oldódási caractertől van föltételezve és föltétlenül alaposan veszi valószínűnek azt, hogy pl. a fehérje hasítási termékek vagy a szappanok, melyeknek physico-chemiai oldódási karaktere sok tekintetben hasonló a savanyú festékekéhez, az élő szervezetben is hasonlóképen viselkednek, mint ezek s ilyenformán azokat a szóbanforgó módszerrel ki lehetne mutatni.

Az én eredményeim igazolják ezt a programot és munkahypothesist. Bár egészen más úton értem el az eredményt, mutatják a vizsgálataim, hogy láthatatlan organikus vegyületek láthatóvá tétele igen jól sikerülhet. Továbbá fokozzák a valószínűségét annak, hogy a szóban volt fontos szintelen anyagok a R. E.-el kapcsolatba lépnek s eszerint a basikus festékekkel való felülfestés lehetősége fönnáll. Ugyanis egyrészt az arsenobenzolok semicolloidalis oldatai több tekintetben hasonlóképen viselkednek, mint a disazofestékek oldatai s tényleg most kiderült, hogy vitalis eloszlásuk is rokon a savanyú festékekével.

Tehát hasonló physico-chemiai oldódási viszonyok esetében itt valóban a vitalis eloszlásviszonyok is hasonlónak bizonyultak. Másrészt a már *Schulemann* által gyanuba vett szappanokról most még inkább föltételezhetjük, hogy ebbe az eloszlástypusba tartoznak, mert a salvarsannal ismeretesen analog kolloidchemiai sajátságokat mutatnak. *Freundlich*, *Stern* és *Zocher*²²⁾ szerint a salvarsan és Neosalvarsan oldataikban mint semicolloidok lépnek fel, azaz ezek az oldatok úgy molekularis, mint kolloid-dispers részeket tartalmaznak, tartalmaznak közönséges ionokat és kolloidionokat: tehát kolloidelektrolytok, mint a szappanok, a cetylsulfonsav és a húgysavas sók oldatai. Érdekes, hogy éppen a húgysav ilyen szempontból való meg-

vizsgálásának szükségességére már *Schulemann*²³⁾ is figyelmeztetett.

A szintelen vegyületek láthatóvá tételére irányuló törekvések jelentőségét főleg az adja, hogy az anyagoknak minél gazdagabb sokaságára terjeszthetjük ki a mikroszkopos látás körét, annál szélesebb bázist nyer az anyagok distribúcióját kormányzó érek vitalis dynamikájának kísérleti kutatása.

Arról, hogy az arsenobenzolderivatumok szöveti kimutatására kidolgozott módszeremmel végzett kísérletekkel mennyire lehetett bepillantást nyerni ezen vegyületek eloszlásának vitalis dynamikájába, mennyire lehetett eddig eljutni a salvarsan-halmozás chemiai physico-chemiai és physiologiai feltételeinek megismerésében, arról a következő részekben számolok be.

Összefoglalás.

Eddig nem létezett módszer arra, hogy arsenobenzol-vegyületeket a szervezet belsejében mikroszkoppal tanulmányozni lehessen. E nevezetes chemotherapeuticumok — nem lévén erős színük — a bekebelezés után a szövetekben, a sejtekben láthatatlan alakban vannak jelen és a próbálkozások, hogy a mikroszkopos localisatio láthatóvá tétessék, mindezideig sikertelenek maradtak. A specialis salvarsan problémák (a toxicus hatások, a cumulatio mechanismusa stb.) vizsgálatánál, újabban a reticuloendothel-készülék (R. E.) chemotherapiiai jelentőségének kutatásánál, nagyon nélkülözték a vizsgálók a mikroszkop segítségét avégből, hogy a szer további sorsát a test belsejében szemmel kísérhessék. Különösen hiányzott egy módszer salvarsan praeparatumok R. E. sejtekben való halmozásának vizsgálására; erre vonatkozólag exact adatok teljesen hiányoztak.

Most sikerült nekem betölteni ezt a hézagot a salvarsan biologiai vizsgálatának methodikájában. Eljárásommal a salvarsant és derivatumait a befecskendés után úgy az állat, mint az emberi szervezetben a szövetekben és sejtekben, láthatóvá lehet tenni. E mikrotechnikai módszer könnyen kivihető; ezüstnek a szövetekben való reductioján alapul, az ott vitalisan rögzült salvarsan által. Az arsenobenzol a szövetekben barnásfekete színben tűnik elő.

Ezzel a mikrotechnikai feltüntetési eljárással az arsenobenzolok kimutatásánál eléretett az a legmagasabb teljesítmény, amire egyáltalában példa van hasonló elosztástypust követő anyagok szövettani demonstratiojában. A szövettani arsenobenzolképek optikai élesség és finomság tekintetében vetekednek a legszebb vitalis festésekkel.

A reactiot a szövetekben közvetlenül az injectio után minden valószínűség szerint a még lebontatlan, az arseno-vegyület fokozatán álló salvarsan adja; későbbi időben, ha nem le nem bontott arsenobenzol, akkor olyan termékek, amelyek a bomlásban még nem jutottak el az arsinsav-fokozatig.

Eljárásommal sikerült földerítenem a salvarsanok és a R. E. közötti kapcsolat kérdését, ad oculos demonstrálnom azt, hogy bizonyos arsenobenzolok a R. E.-ben halmozódnak fel és pedig nemcsak állatoknál (egér, patkány), hanem embernél is (neoezüstsálv.-halmozódás a Kupffer-sejtekben 10 éves gyermek májában). A reactio annyira érzékeny, hogy embernél is tanulmányozható vele a salvarsan viselkedése a testben, különösen a R. E.-ben. Kísérleti állatoknál könnyű mikrotechnikai munkával hamarosan egy qualitative és quantitative részletezett képet lehet alkotni a salvarsanvegyület localisatiojáról a testben, aminek fontossága a kísérleti vizsgálódás szempontjából nyilvánvaló.

Nagyszámú egérkísérletben megvizsgáltam az arsenobenzol képet a szervekben 9, a praxisban használt salvarsan-derivatumnál intrevenás adagolás után (salvarsan, mint chlorhydrat, mint alkalisó, ezüstsa., neoezüstsa., neosa., formaldehyd-sulfit-sa., eperseno, sulfoxylsa., arsalyt). Az arsenobenzolképek lényeges és jellemző eltéréseket mutatnak a különböző derivatumoknál. A salvarsanok általában a distributionak, szöveti localisationak, halmozásnak azt a typusát követték, amelyet a savanyú vitalis festékek, különösen a benzopurpurin és a rokon vegyületek. Ennek az elosztástypusnak jellemző vonása az, hogy a befecskendett anyag befogadásában a R. E. szerepel — tehát reticuloendothelialis elosztástypust mutatnak. A szövetekben az arsenobenzolnak következő rögzülési typusait lehetett látni:

1. Szemcsés halmozódás a R. E. sejtekben.

2. Szemcsés halmozódás a vesetubulusok — főleg a fődarab (Hauptstück) — hámsejtjeiben.

3. Diffus beivódás specialis mesenchymaticus rost-structurákban (lép-stroma stb.).

4. Arsenobenzol embolusok a (hajszál) erekben.

A vizsgálataim kimutatták, hogy milyen nagy szerepe van (hajszáleres) arsenobenzol-embolusok képződésének bizonyos salvarsanoknál. Bizonyos derivatumoknak — így a neosalvarsannak is — fő megkötő-helye a kötőszövet.

A salvarsanok mikrotechnikai feltüntetése terén elért siker reményt nyújt arra nézve, hogy a jövőben sikerülni fog még más fontos szintelen szerves anyagok localisatioját is láthatóvá tenni a szervezetben.

Eine neue histochemische Methode zur biologischen Untersuchung des Salvarsan und verwandter Arsenobenzolderivate.

Zusammenfassung der Resultate.

Es wird ein neues Verfahren beschrieben, mit dessen Hilfe es gelingt, das Schicksal der in den Körper gelangten Arsenobenzol-Verbindungen innerhalb des Organismus zu erforschen. Da diese wichtigen Chemotherapeutica selbst keine starke Farbe haben, bleiben sie in den Zellen und Geweben unsichtbar; alle Versuche ihre Lokalisation sichtbar zu machen blieben bisher erfolglos. Bei der Untersuchung der Salvarsan-Probleme (toxische Wirkung, Mechanismus der Kumulation usw.) und — in neuerer Zeit — beim Studium der chemotherapeutischen Bedeutung des retikuloendothelialen Apparates (R. E.) wurde es als grosser Mangel empfunden, dass die Hilfe des Mikroskops zwecks Ermittlung des weiteren Schicksals dieser Verbindungen nicht in Anspruch genommen werden kann. Insbesondere fehlte eine Methode zur Untersuchung der Speicherung der Salvarsanpraeparate in den Zellen des R. E., diesbezüglich fehlten exakte Daten vollständig.

Es ist nun gelungen, diese Lücke in der Methodik der biologischen Salvarsan-Forschung auszufüllen. Mit der beschriebenen Methode gelingt es Salvarsan und seine Derivate nach deren Einverleibung in den Organismus sowohl in tierischen als auch in menschlichen Geweben und Zellen sichtbar zu machen. Dieses mikrotechnische Verfahren ist leicht ausführbar; es beruht auf der Reduktion des Silbers in den Geweben durch das dort vital fixierte Salvarsan. Das Arsenobenzol erscheint in den Geweben braun-schwarz gefärbt.

Meine Erfolge habe ich einem mikrochemischen Kunstgriff zu verdanken, der darin besteht, dass ich einen Isolator verwende und die Reaktion in den Geweben in einem Medium von starker Viskosität ablaufen lasse. Eine weitere Bedingung für die Erfolge meiner Methode lag in meiner Entdeckung, dass das latente Salvarsan, das in den Geweben vital gebundene Arsenobenzol, einfach mittels Formalin fixierbar ist.

Die zur Untersuchung auf Sa.-Gehalt bestimmten Organtheilchen werden in einer Mischung von 4 Teilen dest. Wassers und 1 Teil einer 40%-igen Formalinlösung fixiert. Das fixierte Material wird binnen 4 Tagen aufgearbeitet. Länger sollen die Stückchen nicht in der Formalinlösung belassen werden, weil das Sa. durch die Flüssigkeit sichtlich aus den Geweben ausgeschwemmt wird. Aus den so vorbehandelten Gewebstücken werden dann Gefrierschnitte angefertigt, u. zw. zur allgemeinen Übersicht der Verteilungs-Verhältnisse solche von 20—30 μ Dicke, zum Studium feinerer zellulärer Verhältnisse und der mit der Salvarsan-Deponierung einhergehenden histo-pathologischen Veränderungen Schnitte von möglichst 10 μ . Dies gelingt bei den Eingeweiden auch trotz der nur wenige Tage dauernden Fixation stets ohne besondere Schwierigkeiten.

Die Schnitte gelangen nun entweder direkt, oder nach Abspülen in Wasser — was nach meinen bisherigen Erfahrungen nicht schädlich ist — in ein versilberndes Reagens. Dieses Reagens ist stets frisch zu bereiten. In eine 1.5%-ige wässrige Silbernitratlösung werden so viele Tropfen von Liquor Ammonii caust. gegeben, als eben notwendig sind, damit die Flüssigkeit wieder klar wird, hierauf gibt man zu dieser Lösung Glycerin bidestill. purissimum in gleichen Mengen.

Das Reagens besteht also aus:

- 1 Teil Ammoniak-Silbernitratlösung und
- 1^o Teil reinsten Glycerins.

Diese Mischung wird in eine Petrischale gegossen und die Schnitte darin 30—35 Min. gebadet, wobei darauf zu achten ist, dass sie nicht aufeinander zu liegen kommen. Während des Badens soll die Schale leicht bewegt werden, damit sich etwaige Luftblasen entfernen.

In diesem Reagens färbt sich das in den Geweben vital gebundene Salvarsanderivat braun oder schwarz.

Um nun das überflüssige nicht reduzierte Silber zu entfernen, werden die Schnitte, nachdem sie in dest. Wasser ca. 1 Minute lang gewaschen worden waren, in eine 1%-ige wässrige Natriumthiosulfatlösung gelegt, wo sie 6—10 Min. verbleiben; dies genügt auch zur Dauerfixierung der Schnitte. Hierauf werden die Schnitte in dest. Wasser abgespült, dann in der üblichen Weise entwässert und in Xylol, Kanadabalsam usw. unter einem Deckglas aufbewahrt. Es ist darauf zu achten, dass stets auch Praeparate angefertigt werden, welche nur mit dem Salv. Reagens behandelt, worden waren, sonst aber ungefärbt sind, um das Ergebnis der Salv. Reaktion richtig beurteilen zu können.

Da obiges Verfahren die Schnitte nicht schädigt, können gleichzeitig auch andere Färbemethoden ausgeführt werden z. B. Kernfärbungen (Alaunkarmin, Haematoxylin), Fettfärbungen (Scharlachrot) usw., welche tadellos gelingen.

Der Gang der Untersuchung auf Arsenobenzole ist also kurz folgender:

1. Fixieren in Formalinlösung, 1—4 Tage.
2. Gefrierschnitte.
3. (Destill. Wasser).
4. Silbernitrat-Ammoniak-Glycerin, 30—35 Min.
5. Destill. Wasser, 1 Min.
6. Natriumthiosulfat 1%, 6—10 Min.
7. Destill. Wasser.
8. (Kernfärbung, oder dgl.).
9. Entwässern.
10. Kanadabalsam, Deckglas.

Wie man sieht, ist dieses Verfahren des histologischen Arsenobenzolnachweises kaum komplizierter, als der einfachste histologische Eisennachweis.

Mit diesem mikrotechnischen Darstellungsverfahren wurde bei dem Nachweis der Arsenobenzole eine derart grosse Leistung erzielt, wie sie nur überhaupt bei der histologischen Darstellung von Stoffen mit ähnlichem Verteilungstypus bisher erreicht werden könnte. Die histologischen Arsenobenzolbilder dürfen was optische Schärfe und Feinheit anbelangt den schönsten Vitalfärbungen an die Seite gestellt werden.

Die Reaktion wird in den Geweben unmittelbar nach der Injektion höchstwahrscheinlich durch das noch ungespaltene auf der Stufe der Arseno-Verbindungen stehende Salvarsan hervorgerufen, später wenn nicht durch ungespaltenes Arsenobenzol, so durch Produkte, welche in der Spaltung noch nicht den Grad der Arsinsäure erreichten.

Mit der Methode gelang es, in der Frage des Zusammenhanges zwischen den Salvarsanen und dem R. E. eine Klärung zu schaffen, ferner ad oculos zu demonstrieren, dass gewisse Arsenobenzole im R. E. gespeichert werden, u. zw. nicht nur bei Tieren (Maus, Ratte) sondern auch beim Menschen (Silbersalvarsan-Speicherung in den Kupffer-schen Zellen der Leber eines 10 jähr. Kindes). Die Reaktion ist so empfindlich, dass man damit auch beim Menschen das Verhalten des Salvarsans im Körper, insbesondere im R. E. studieren kann. Bei Versuchstieren gelingt es mittels leichter mikrotechnischer Arbeit in kurzer Zeit ein qualitativ und quantitativ differenziertes Bild über die Lokalisation der Salvarsanverbindungen im Körper herzustellen. Es ist klar, wie wichtig dies vom Standpunkt der experimentellen Forschung ist.

In einer grossen Zahl von Versuchen an Mäusen wurde das Arsenobenzolbild in den Organen nach intravenöser Injektion von 9 verschiedenen in der Praxis gebräuchlichen Salvarsanderivaten untersucht (Salvarsan als Chlorhydrat, als Alkalisalz, Silbersalvarsan, Neosilbersalv., Neosalv., Formaldehyd-Sulfit-Salv., Eparseno, Sulfoxylsalv., Arsalyt). Die Arsenobenzolbilder zeigen bei den verschiedenen Derivaten wesentliche und charakteristische Differenzen. Was die Distribution, die Gewebslokalisation und die Speicherung anlangt, zeigen die Salvarsane im allgemeinen den Typus der sauren Vitalfarbstoffe, insbesondere den des Benzopurpurin und verwandter Verbindungen. Zur Charakteristik dieses Typus gehört der Umstand, dass bei der Aufnahme des injizierten Stoffes das R. E. eine Rolle spielt; die genannten Verbindungen zeigen also einen retikuloendothelialen Lokalisations-Typus. In den Geweben waren folgende Lokalisationstypen des Arsenobenzols zu finden:

1. Körnige Speicherung in den Zellen des R. E.
2. Körnige Speicherung in den Epithelzellen der Nierentubuli-insbesondere in denen des Hauptstückes.

3. Diffuse Durchtränkung spezieller mesenchymatöser Faserstrukturen (Milz-Stroma usw.).

4. Arsenobenzol-Emboli in den (Kapillar-) Gefässen.

Obigen Untersuchungen haben gezeigt, wie gross die Rolle der Bildung der (kapillären) Arsenobenzol-Emboli bei gewissen Salvarsanen ist. Der Haupt-Fixations-Ort gewisser Derivate — so auch des Neosalv. — ist das Bindegewebe.

Der auf dem Gebiete des mikrotechnischen Nachweises der Salvarsane erzielte Erfolg gestattet zu hoffen, dass es in der Zukunft gelingen werde, die Lokalisation auch anderer farbloser organischen Stoffe im Organismus sichtbar zu machen.

Irodalom.

1. *Jancsó, N. jun.*: Neuer Weg zur pharmakodynamischen Beeinflussung des retikuloendothelialen Systems. Deutsche med. Wochenschr. 1927. No. 27. S. auch: Zeitschr. f. die ges. experim. Medizin. 1927. B. LVI. 1—2.
2. *Jancsó, N. jun.*: About the derivatives of arsenobenzene and the acid azo-stains and their similar distribution in the organism. Arch. f. experim. Zellforschung. 1928. B. VI.
3. *Stühmer, A.*: Arch. f. Dermat. u. Syphil. 1914. B. 120. S. 589.
4. *Stühmer, A.*: Kolle-Zieler: Handbuch d. Salvarsantherapie. Urban & Schwarzenberg. 1924. B. I. S. 485.
5. *Ehrlich, P. u. C. A. Herter*: Zeitschr. f. physiol. Chemie. 1904. B. 41. S. 379.
6. *Tryb, A.*: Monatsh. f. prakt. Dermatol. 1911. B. 52. S. 405.
7. *Voegtlin, C. u. H. W. Smith*: Journ. of pharm. and experim. ther. 1920. Vol. 15. p. 475.; 1921. Vol. 16. p. 199.; 1921. Vol. 16. p. 449.
8. *Voegtlin, C.*: Physiol. Review. 1925. V. p. 63.
9. *Voegtlin, C., Dyer, H. A. u. Leonard, C. S.*: Public. Health Rep., Washington D. C. 1923. XXXVIII. No. 33. p. 1882.
10. *Voegtlin, C., Dyer, H. A. u. Miller, D. W.*: Journ. of Pharm. and exper. ther. 1924. XXIII. p. 54.
11. *Voegtlin, C., Johnson, J. M. a. Dyer, H. A.*: Journ. of pharm. and exper. ther. 1926. XXVII. p. 467.
12. *Simič, T. V.*: Zeitschr. f. Hyg. 1923. B. 99. S. 417.
13. *Schlossberger, H.*: Kolle-Zieler: Handbuch d. Salvarsantherapie. Urban & Schwarzenberg. 1924. B. I. S. 19.
14. *Schlossberger, H.*: Chemotherapie der Infektionskrankheiten. 1927. Kraus-Brugsch: Spezielle Pathologie und Therapie innerer Krankheiten. Urban & Schwarzenberg. Berlin u. Wien. Lief. 456—459.
15. *del Baere, L. J.*: Wiener klin. Wochenschr. 1925. XXXVIII. No. 42. S. 1130.

16. *Bauer, H.*: Arb. a. d. Staatsinst. f. exp. Ther. u. d. Georg Speyer
Hause Frankfurt a. M. H. 8. 1919. S. 43.
17. *Wechselmann, W., G. Lockemann u. W. Ulrich*: Arch. f. Dermat
u. Syph. 1923. B. 142. S. 163.
18. v. *Möllendorf u. E. Herzfeld*: Anat. Heft. I. 1917. 164. S. 451.
19. *Schulemann, W.*: Zeitschr. f. angew. Chemie. 1921. S. 238.
20. *Schulemann, W.*: Deutsche med. Wochenschr. 1927. No. 4.
21. *Roehl, W.*: Arch. f. Schiff. u. Trop. Hyg. 1926. XXX. Beih. I.
S. 103.
22. *Freundlich, H., H. Zöcher u. R. Stern*: Biochem. Zeitschr. 1923. B.
138. S. 307.
23. *Schulemann, W.*: Biochem. Zeitschr. 1917. B. 80. S. 1.
-