



Physisch-chemisch onderzoek van enkele immuniteitsreacties

<https://hdl.handle.net/1874/323049>

A. qu. 192, 1937.

E. H. BOASSON

Physisch-Chemisch
Onderzoek van enkele
Immunitereacties

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AMSTERDAM
BIGOT EN VAN ROSSUM N.V.

PHYSISCH-CHEMISCH ONDERZOEK VAN
ENKELE IMMUNITEITSREACTIES

Diss Utrecht 1937

Physisch - Chemisch Onderzoek van enkele Immunitetsreacties

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN
GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUUR-
KUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE
UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAG-
NIFICUS DR. W. E. RINGER, HOOGLEERAAR IN
DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, VOLGENS
BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT
IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN OP
MAANDAG 21 JUNI 1937, DES NAMIDDAGS
TE 4 UUR

DOOR

EDUARD HEIN BOASSON

GEBOREN TE AMSTERDAM



AMSTERDAM
BIGOT EN VAN ROSSUM N.V.

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW

Het verschijnen van mijn proefschrift geeft mij de gelegenheid te getuigen van mijn erkentelijkheid jegens allen, die tot mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

Grooten dank ben ik U verschuldigd, Hooggeleerden en Lectoren aan de Universiteit van Amsterdam, met wie ik via college, laboratorium en studeerkamer in nader contact mocht komen. Dit contact heeft mij èn wetenschappelijk èn als mensch verrijkt.

Hooggeleerde KRUYT, Uw belangstelling en medeleven zijn mij tot grooten steun geweest. Aan de gesprekken met U be- waar ik kostbare herinneringen.

Hooggeleerde WOLFF, Hooggeachte Promotor, het is mij niet mogelijk, nu reeds het voorrecht, onder Uw persoonlijke leiding gewerkt te hebben, ten volle te beseffen. De tijd, dien ik in Uw laboratorium-gemeenschap ben opgenomen geweest, behoort tot de gelukkigste, die een wetenschappelijk werker kan beleven. Bij de groote mate van vrijheid, die U mij gelaten hebt, wist U steeds door Uw kritischen zin en Uw initiatief richting aan mijn werk te geven. Ik hoop in de toekomst te kunnen toonen, dat ik Uw belangstelling en Uw vertrouwen waardig was.

Zeergeleerde JULIUS, zeer veel ben ik U verschuldigd. Uw vriendschappelijke belangstelling, Uw daadwerkelijken bijstand en Uw helder inzicht zijn mij steeds weer tot steun geweest.

Zeergeleerde VAN EEKELEN, waarde EMMERIE, ook op Uw kennis en ervaring mocht ik telkens weer een beroep doen, en niet tevergeefs.

Den directeur van het Rijks-Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht, en den chef van de serologische afdeling van die instelling, dank ik voor de bereidwilligheid, waarmede zij mij diphtherie-toxine en -antitoxine ter beschikking stelden.

Aan alle werkers van het Hygiënisch Laboratorium tenslotte mijn dank voor hun hulpvaardigheid en voor de prettige wijze, waarop zij mij een plaats in hun kring hebben gegeven.

INHOUD

	Blz.
Inleiding	I
DEEL I, PRECIPITINE-REACTIE.	
I. Beknopt historisch overzicht	4
II. Materiaal en methode	6
III. Eerste resultaten	7
IV. A. Bespreking van de resultaten;	
Toxine-antitoxine-vlokking	12
B. Richting van verder onderzoek	17
V. Experimenten over electrolyt-invloed	20
VI. Bespreking van de resultaten	24
VII. Algemeen overzicht:	
A. Het mechanisme	31
B. De aard van de reagerende groepen	35
DEEL II, LYSOZYM-WERKING.	
A. Historisch overzicht	38
B. Materiaal en methode	40
C. Bepaling van lysozym	45
D. Morphologie van het lysis-proces	48
E. Uitwendige variabelen in het lysis-proces	51
F. Chemisme van de werking van lysozym	57
G. Het verband tusschen serologische en enzymatische processen	58
Summary	60
Bibliografie	61

INLEIDING

Het doel van het onderzoek, een studie van het fysisch-chemisch karakter van processen, samenhangend met immuniteit, vraagt een voor dat doel geschikte experimenteele techniek. Als zoodanig is in vele gevallen een bekende optische methode, nl. het bepalen van de licht-absorptie, bruikbaar.

De processen, die men op deze wijze kan bestudeeren, zijn in twee groepen te splitsen:

A. processen, waarbij de gemeten absorptie met den tijd toeneemt.

B. processen, waarbij de absorptie afneemt.

Van elke groep koos ik één voorbeeld, en wel:

van groep A: de precipitine-reactie, d.i. de vorming van een specifiek precipitaat, tusschen paardenserum en het serum van daarmee geïmmuniseerde konijnen.

van groep B: de lysis van bacteriën onder invloed van lysozym, een stof, die in staat is bepaalde bacteriën op te lossen. Vooral traanvocht en kippeneiwit bevatten veel lysozym.

Het onderzoek, met de daarop aansluitende beschouwingen, valt dus in twee gedeelten uiteen.

Daaraan laat ik vooraf gaan enkele opmerkingen over het gebruik van den extinctiometer en over de waarde van troebelingsmetingen. Men bedenke daarbij, dat voor het onder B genoemde proces nog geen andere quantitatieve methode bestaat, om het lysisproces als zoodanig waar te nemen, terwijl de meest exacte techniek voor vlokkingreacties, de ultramicroscopische telling, bij eiwitsolen niet toegepast kan worden.

De lichtabsorptie door een colloïdale oplossing hangt niet op eenvoudige wijze van den toestand van de oplossing (grootte, aantal, aard van de deeltjes) af (zie bijv. GRIBNAU, 13). Bovendien, als de absorptie voortdurend verandert, kan ze niet nauwkeurig bepaald worden, daar de voor een meting noodige tijd te groot is. Bij het bestudeeren van vlokking- of lysisprocessen met behulp van den Moll-extinctiometer kan men echter ook tevreden zijn met het bepalen van den uitslag van

den galvanometer. De galvanometer wordt dus meet-instrument, inplaats van nul-instrument. De uitslag, u , hangt nog minder dan de extinctie op bekende wijze samen met den toestand van de oplossing, maar kan tenminste continu worden afgelezen.

De regelmatige, en reproduceerbare, verandering van u met het verloop van het proces, dat men onderzoekt, bewijst, dat een samenhang van u met den toestand van de onderzochte oplossing wel degelijk bestaat. Men kan zich dezen toestand gekarakteriseerd denken door een getal T , varierende van 0 (= oorspronkelijke toestand) tot bijv. 100 (= eindtoestand, dus totale vlokking, resp. lysis). Wat voor u geldt ten opzichte van T , geldt evenzeer voor du/dt , de verandering van u in de eenheid van tijd, en dT/dt . Deze laatste grootheid is de coagulatie- resp. lysis-snelheid.

Indien nu een invloed van zekere variabelen op du/dt kan worden vastgesteld, dan zal dit het gevolg zijn van den invloed, die zij op dT/dt hebben, zij het misschien niet in precies gelijke mate. Maar steeds zal een grootere invloed op dT/dt zich uiten als een grootere invloed op du/dt , m.a.w. het verloop van du/dt met een willekeurige variabele a geeft het verloop van dT/dt met a weer. Speciaal de waarde van a voor bijzondere punten is van beteekenis: waar du/dt maximaal is, moet ook dT/dt een maximum hebben, en dergelijke.

Op deze gewoonlijk gevolgde redeneering is door WANNOW (27, daar ook verdere litt.) critiek geoeffend. Het betreft in Wannow's onderzoek de vlokking van een As_2S_3 -sol door verschillende zouten: KCl , $MgCl_2$, $AlCl_3$, $ThCl_4$. Er bleek nu, dat de bereikte maximale troebeling afhankelijk was van het gebruikte zout. Wannow vergelijkt echter den invloed van twee variabelen tegelijk: zoowel het zout, als de gebruikte concentratie. Dan geldt natuurlijk de bovenstaande redeneering niet meer. Waar het den invloed van zouten betreft, bevatten mijn proefreeksen slechts één variabele, n.l. de concentratie van steeds hetzelfde zout, of den aard van het gebruikte zout, bij steeds dezelfde concentratie. Onder deze voorwaarden is er dus geen principieel bezwaar tegen, in het volgende du/dt als maat voor de coagulatie- resp. lysis-snelheid te gebruiken.

Dit is natuurlijk alleen dan geoorloofd, als, behalve de te bestudeeren variabele, alle andere grootheden, die den uitslag van den galvanometer (u) bepalen, constant zijn. Ik wil na-

gaan, in hoeverre hieraan in het te bespreken onderzoek is voldaan.

- a) De elektrische stroom, waarmee de lichtbron gevoed wordt, moet volkomen constant zijn. Ik bereikte dit, door de voedingsbatterij tijdens het gebruik bij te laden. De gloeistroom zelf werd met een fijn regelbaren weerstand ingesteld. Op deze wijze gelukte het, de variaties zoodanig te beperken, dat zij op het resultaat niet meer van invloed waren.
- b) Vreemde, zwevende deeltjes in de gebruikte vloeistoffen (vooral in de sera) werden verwijderd door met een snelle centrifuge (14000 t.p.m.) zeer scherp te centrifugeeren.
- c) De concentratie van de lichtverstrooiende en -absorbeerende deeltjes moet constant zijn, aan het begin van elke proef.

Bij de proeven met lysozym was dit eenvoudig te bereiken door steeds evenveel bacteriën toe te voegen. Het lysozym zelf veroorzaakt, in de gebruikte hoeveelheden, geen waarneembaren uitslag.

Bij de precipitine-reactie is het niet mogelijk, streng aan dezen eisch te voldoen, daar hier beide reagerende bestanddeelen een zekere eigen extinctie hebben. Deze is echter gering, zoolang geen vlokking optreedt. Het gaat er dus voornamelijk om, de concentratie van het vlok-bare sol constant te houden, in dit geval van het antiserum. Immers het is bekend, dat het precipitaat voor het grootste deel uit antilichaam bestaat (MARRACK, 20, pag. 109). Dit punt zal nog aan een nadere discussie onderworpen worden.

Op grond van het bovenstaande meen ik, dat de experimentele techniek inderdaad zooveel mogelijk aan de te stellen eischen voldoet.

DEEL I: PRECIPITINE-REACTIE.

I. BEKNOPT HISTORISCH OVERZICHT.

De litteratuur over het chemisch aspect van immunologische reacties, en speciaal van precipitine-reacties, is in 1934 door MARRACK (20) in een voortreffelijke monografie verzameld. Ik wil voor een algemeen overzicht, en voor bijzonderheden van de litteratuur voor 1934 naar MARRACK's werk verwijzen, en slechts die onderzoekingen nader bespreken, die in direct verband met mijn eigen onderzoek staan.

Wat bij immunologische studies steeds weer op den voorgrond treedt, is de merkwaardige specificiteit; deze is vooral zoo onbegrijpelijk, omdat de reagerende systemen van colloïdalen aard zijn. De colloïdchemie immers kent een dergelijke specificiteit in het geheel niet. De antilichamen zijn chemisch niet van normale globulinen te onderscheiden (MARRACK, hfdst. II).

Door HEIDELBERGER en PEDERSEN (17) zijn antisera tegen pneumococcen, en daaruit bereide gezuiverde antilichaamfracties, onderzocht met de ultracentrifuge. De sedimentatieconstante van het antilichaam uit konijnenserum was identiek met die van normaal konijnenserum-globuline. In paardenserum blijkt de antilichaamfunctie gebonden te zijn aan een fractie met een grootere sedimentatieconstante (dus met grootere deeltjes), die ook in normaal paardenserum in geringe concentratie voorkomt. Dit bevestigt dus de opvatting, dat de antilichaamfuncties gebonden zijn aan normale bestanddeelen van het serum. Zoolang het niet gelukt, hen daarvan te scheiden, moet men aannemen, dat het antilichaam veranderd globuline is.

Het onderzoek naar de oorzaken van de specificiteit is in een nieuw stadium gekomen door als antigeen te gebruiken eiwitten, waarin vreemde verbindingen gesubstitueerd zijn. Dit gelukt bijv. door koppeling van eiwit met diazoniumzouten (LANDSTEINER). Daardoor verandert het immunologisch karakter van het antigeen, er ontstaan nieuwe elementen in de specificiteit. Voor de daarbij optredende regelmatigheden, zoo-

als samenhang tusschen immunologische aequivalentie van twee antigenen, en de mengkristalvorming van de verbindingen, die de karakteristieke eigenschappen aan het antigeen verleenen (z.g. determinante groep) moet ik hier verwijzen naar MARRACK, hfdst. III en IV.

Het onderzoek naar de specificiteit kan zuiver kwalitatief zijn: er ontstaat een precipitaat, of niet. Daarbij stuit men echter op bijzonderheden van quantitatieven aard, die nadere bestudeering eischen.

Het is n.l. gebleken, dat slechts in een bepaald gebied van concentratie-verhoudingen van antigeen en antilichaam precipitatie optreedt. Daarbuiten vindt geen zichtbare reactie plaats. Dit is het z.g. zône-phenomeen, dat in het volgende aan een nadere beschouwing onderworpen zal worden (een overzicht geeft MARRACK op blz. 107 e.v.).

Het onderzoek van het zône-phenomeen kan op verschillende wijzen uitgevoerd worden. Daarbij blijft steeds de inrichting van de proef dezelfde, n.l. een der reagentia in constante hoeveelheid, het andere in steeds toenemende verdunning. Slechts de techniek van waarneming kan verschillend zijn.

1. De eenvoudigste methode bepaalt zich tot het constateeren of er na een zekeren tijd al dan niet een neerslag is ontstaan. Dit kan nog nauwelijks een quantitatieve methode heeten.
2. De analyse van precipitaten (zie b.v. HEIDELBERGER en KENDALL, 14, en HAUROWITZ, 18) is zeer tijdroovend, en leent zich juist voor de studie van het zône-phenomeen minder goed, omdat men slechts den eindtoestand, en niet het proces zelf waarneemt.
3. De derde wijze van waarneming is gebaseerd op het bepalen van den tijd, waarna zichtbare vlokken optreden.

Deze methode is oorspronkelijk toegepast op de toxine-antitoxine-vlokkings, door RAMON (23). DEAN en WEBB (6) bewezen, dat men bij gewone precipitine-reacties hetzelfde resultaat krijgt. De vlokkings-tijd heeft voor een bepaalde verhouding antigeen/antilichaam (G/A) een minimum; aan weerszijden van deze verhouding treedt de vlokkings eerst later op.

Deze optimale verhouding („optimum proportion”) is verschillend, als men de eene maal het antilichaam, den anderen

keer het antigeen constant houdt. De op de eerste wijze gevonden verhouding bleek overeen te komen met het neutrale punt, d.w.z. men kan dan, na volledige precipitatie, noch antigeen noch antilichaam meer aantoonen in de bovenstaande vloeistof. De kwestie der twee verschillende optimale verhoudingen zal nog nader worden besproken.

Van den invloed van electrolyten en van de pH op de precipitine-reactie, en speciaal op het zône-phenomeen, is nog maar weinig met zekerheid bekend (zie b.v. MARRACK, blz. 87, 92 e.v.). Vast staat alleen, dat zouten in hooge concentratie de precipitatie geheel onderdrukken. HEIDELBERGER en KENDALL (15) vermelden, dat de samenstelling van het neerslag (uit antipneumococcon-serum en specifiek koolhydraat-antigeen) verandert bij toevoeging van zouten, terwijl door BROWN (3) in hetzelfde systeem een verschuiving van de optimale verhouding, bij toevoeging van zout, is waargenomen. Een verklaring van deze veranderingen geven de onderzoekers niet.

II. MATERIAAL EN METHODE

Als antigeen werd gebruikt paardenserum.

De antisera werden verkregen door konijnen met paardenserum te immuniseren.

De vijf gebruikte sera gaven in de ringreactie nog een troebeling met antigeen-verdunningen van 1 : 5000 à 1 : 10000.

Voor het gebruik werden de sera scherp gecentrifugeerd, om ze zooveel mogelijk van zwevende deeltjes te bevrijden.

De gebruikte verdunningsvloeistoffen komen in den tekst ter sprake. Het volume der reactie-vloeistof was bij alle proeven van een serie constant.

Alle proeven werden bij kamertemperatuur uitgevoerd (ca. 18°).

Na menging van antigeen en antiserum, in geschikte concentraties, ontstaat langzamerhand een precipitaat. De eerste periode van dit proces, nl. de toenemende troebeling, werd met den Moll-extinctiometer waargenomen. Daarvoor werden aan het instrument enkele wijzigingen aangebracht. Ter besparing van vloeistof werd de groote, 10cc bevattende, cuvette vervangen door een kleine, met een inhoud van ca. 1.3cc. Dartoewerden op de vlakgeslepen einden van een stukje glasbuis

kleine glaasjes gekit. In de buis was een gaatje gemaakt voor de vulling. Een soms noodige reiniging gelukte uitstekend met een klein propje watten. De lichtbundel werd afgeschermd, door aan den cuvette-houder twee diafragma's te bevestigen, een voor en een achter de cuvette; door een metalen plaatje met een gat op de juiste plaats werd het doel op eenvoudige wijze bereikt.

Het geheel kwam tusschen de lamp en de thermozuil, op de plaats van de groote cuvette.

De cuvette voor de compensatie-thermozuil werd vervangen door een iris-diafragma. De uitslag, door deze zuil alleen veroorzaakt, is een uitstekende contrôle op het constant zijn van de lichtbron.

De gevoeligheid van het zoo gewijzigde instrument is natuurlijk kleiner dan bij gebruik van de groote cuvette; zij bleek echter voor de meeste gevallen voldoende.

De menging der reagentia had plaats in de cuvette, met behulp van een capillaire pipet. Tegelijk werd een stopwatch in werking gesteld. Vervolgens werd elke 30 seconden de stand van den galvanometer (u) afgelezen. (Daarbij konden op de in m.m. verdeelde schaal de halve schaaldeelen nog worden afgelezen. Onderdeelen worden met + of — aangegeven, dus $25^+ = 25 + \frac{1}{4}$ etc.). Uit de gemeten waarden van uitslag (u) en tijd (t) werd een u-t-kromme samengesteld.

III. EERSTE RESULTATEN.

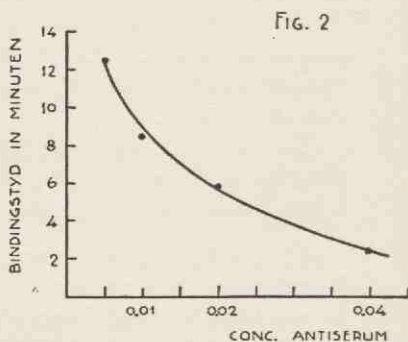
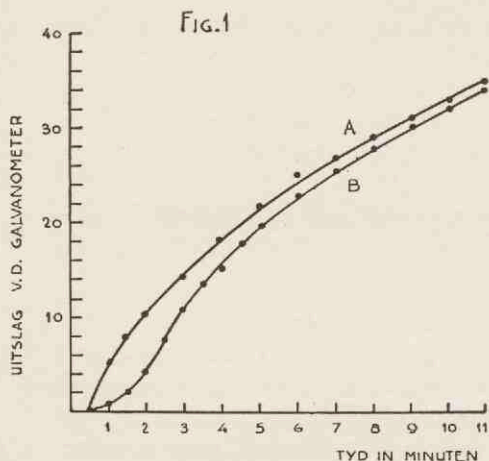
Het karakter der u-t-krommen werd bestudeerd met anti-serum I. De verdunningsvloei-stof was daarbij in hoofdzaak $\frac{1}{15}$ m. fosphaatbuffer van pH 7.7. Met $\frac{1}{15}$ m. buffer van pH 5.9, zoowel als met physiologische NaCl-oplossing werden analoge resultaten verkregen.

a. Indien de toename van de troebeling niet al te snel gaat, heeft de u-t-kromme een vorm als B in fig. I. Ter vergelijking is daarnaast gezet de u-t-kromme voor vlokking met tannine, A, waarbij evenveel antiserum, in dezelfde verdunningsvloei-stof, werd gebruikt als voor de bepaling van kromme B. De hoeveelheid tannine werd zoo gekozen, dat de verkregen krommen goed vergelijkbaar zijn.

Kromme A vertoont den gewonen vorm, die men in het algemeen vindt, bij troebelingsmetingen aan vlokkende solen

(zie b.v. het reeds geciteerde onderzoek van WANNOW, 27).

Kromme B daarentegen vertoont een duidelijk buigpunt. Daar dit buigpunt volkomen reproduceerbaar blijkt, is het waarschijnlijk een bijzonderheid van de precipitine-reactie. Voor een nader onderzoek werden daarom de volgende proeven gedaan:



b. 1. Bij constante verhouding der componenten (antigeen en antiserum) werden de absolute concentraties gewijzigd. Daardoor verandert natuurlijk de snelheid, waarmee u toeneemt ¹⁾, maar tevens verandert de tijd, waarna het buigpunt bereikt wordt (t_b). Zoo vond ik de volgende cijfers:

T a b e l 1

verduunning van het antiserum (antigeen evenredig verdund)	tijd, waarna het buigpunt bereikt wordt (t_b), min.:
I : 25	2½; 3.
50	5½; 6½.
100	8 ; 9.
200	12 ; 13.

Fig. 2 geeft deze resultaten grafisch weer.

2. Bij constante concentratie antiserum werd de concen-

¹⁾ Bij de groote verdunningen moest zelfs de groote cuvette gebruikt worden; de geringere troebeling kan zoo door grooter gevoeligheid van het instrument gecompenseerd worden.

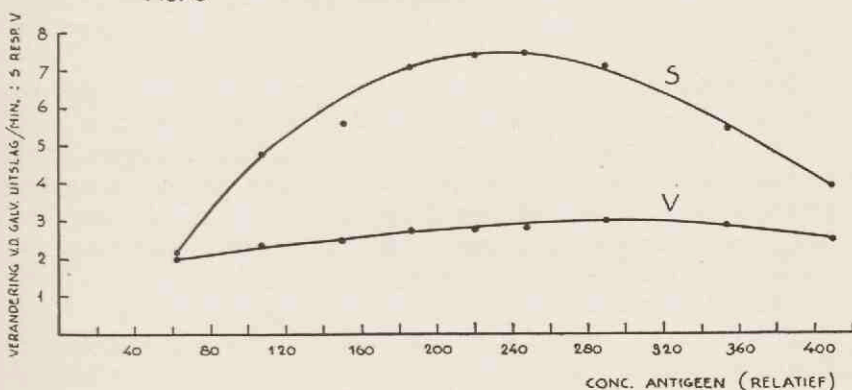
tratie van het antigeen gevariëerd („optimum-proportion”-methode van DEAN en WEBB, 6). In navolging van MARRACK (l.c. blz. 108) zal deze werkwijze in het vervolg als α -methode worden aangeduid. Daarbij blijkt de „buigpunts-tijd”, t_b , maar weinig te veranderen. Er treden echter andere veranderingen in de u-t-kromme op, die ik wil weergeven door van elke kromme twee grootheden te bepalen, n.l. de waarde van du/dt in het buigpunt, en een waarde van du/dt in een later stadium, b.v. na 7 à 8 minuten; het buigpunt ligt hier bij ca. 3 min.).

du/dt stelt (zie inleiding) een coagulatie-snelheid voor. Dan is dus du/dt in het buigpunt de maximale coagulatie-snelheid, verder S genoemd.

De tweede waarde is dan de coagulatie-snelheid op het latere tijdstip, verder V genoemd.

De resultaten geeft fig. 3, en wel:

FIG. 3

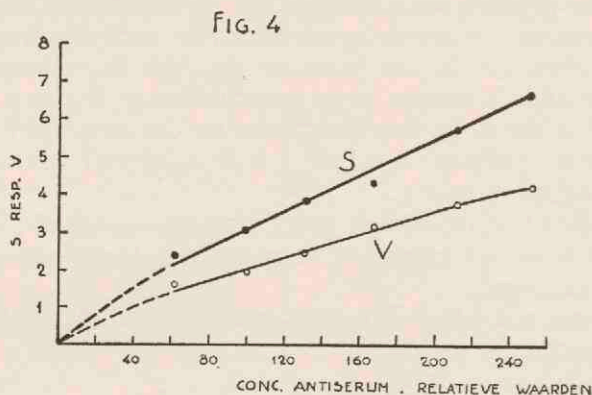


kromme S: S als functie van de concentratie antigeen (de eenige variabele in deze proeven). Daarbij gaat S door een maximum.

kromme V: V als functie van de concentratie antigeen. Zoo er in deze kromme al een afhankelijkheid van de concentratie tot uiting komt, dan is deze toch veel minder uitgesproken dan in kromme S.

3. Bij constante concentratie antigeen werd de concentratie van het antiserum gevariëerd. MARRACK duidt deze methode aan als het β -procédé. Daarbij bleek, dat in het onder-

zochte traject zoowel S als V regelmatig met de concentratie antiserum toenemen (fig. 4, waarin kromme S de S-waarden, V de V-waarden geeft).



c. 1. Het was nu de vraag, in hoeverre deze resultaten met de andere antisera (II, III, IV en V) bevestigd konden worden.

Bij serum II bleek allereerst, dat, onder overigens gelijke omstandigheden, veel meer antiserum noodig was dan met serum I, om een behoorlijk meetbare troebeling te krijgen. Het serum kon slechts ca. 1 : 6 verdund worden, tegen 1 : 25 bij serum I. Fig. 2 leert, dat in dit geval de tijd, noodig om het buigpunt te bereiken, t_b , zoo klein kan worden, dat van betrouwbare aflezingen, ter bepaling van S, geen sprake kan zijn. Inderdaad kwam het buigpunt niet duidelijk tot uiting.

Ik moest dus zoeken naar een middel, om bij grotere verdunning, bijv. 1 : 20, toch een behoorlijk sterke troebeling te krijgen. Waarschijnlijk zou dan het buigpunt later optreden, en dus beter voor metingen toegankelijk zijn.

Toevoeging van alcohol (ca. 15 %) leidde tot het gewenschte resultaat. De contrôle-proef met antiserum of anti-geen alleen gaf bij die alcohol-concentratie nog geen troebeling. Met meer alcohol wordt ook deze contrôle positief, hoewel veel zwakker, dan indien beide componenten aanwezig zijn. Bovendien treedt er bij deze contrôle-proeven geen buigpunt in de u-t-kromme op, wèl bij de specifieke precipitatie. Dit wijst dus ook weer erop, dat het buigpunt bij de precipitatie-reactie behoort. Toch is toevoeging van alcohol niet bevredigend.

Hetzelfde resultaat bleek nu bereikt te kunnen worden door verlaging van de pH en van de zoutconcentratie. Zoo werd tenslotte als verdunningsvloeistof zeer geschikt bevonden een 1 : 5 verdunde fosphaatbuffer van pH 5.9 (eindconcentratie dus $\frac{1}{75}$ molair).

Voor serum III gaf een NaCl-oplossing van 5 m. aeq./L heel goede resultaten. Voor de sera IV en V voldeed deze verdunningsvloeistof ook. Soms werd er, ter buffering, nog glycoll aan toegevoegd, tot een concentratie van $\frac{1}{20}$ mol/L. Een invloed van het glycoll zelf kon niet worden waargenomen.

2. Na de invoering van als bovenstaand gewijzigde verdunningsoplossingen werden de krommen S, en, voor zoover bepaald, V, voor alle sera teruggevonden. Een voorbeeld voor serum II geeft fig. 5, voor serum IV fig. 6. Resultaten met serum III komen in het volgende nog herhaaldelijk voor (fig. 9, 10, 11, 12).

De verschillen tusschen de sera zijn slechts graadueel: het

FIG. 5. SERUM II

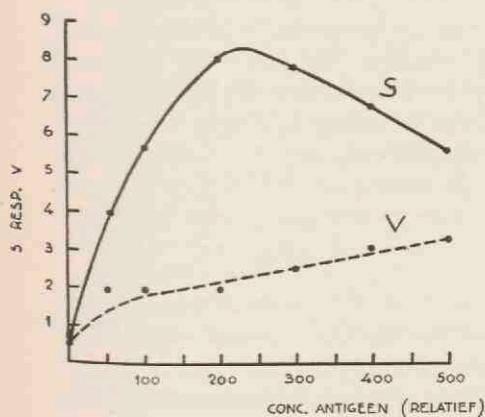
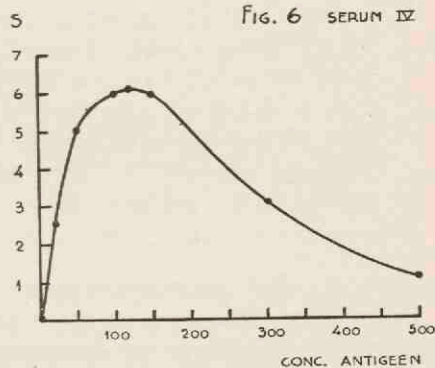


FIG. 6 SERUM IV



maximum van kromme S (S-waarden) is bij serum II vrij vlak, als bij serum I, bij serum III echter zeer scherp.

Uit de figuren 3 en 5 blijkt, dat de grootheid V minder uitgesproken afhangt van de concentratie-verhouding der reagentia dan S. De bepaling van V-krommen werd daarom verder achterwege gelaten.

d. De reproduceerbaarheid van de u-t-krommen is in het algemeen goed. Duplo-proeven, zelfs op verschillende dagen,

gaven slechts kleine afwijkingen in S , van de orde van $1/4$ — $1/2$ schaaldeel, op een totaal van 8 of meer. Ook het vloeiende verloop van S met de concentratie van het antigeen (fig. 3, 5, 6 enz.) wijst op goede reproduceerbaarheid.

IV. BESPREKING VAN DE TOT DUSVER VERKREGEN RESULTATEN.

A.

a. *Over het buigpunt* (fig. 1).

Noch antigeen, noch antilichaam alleen precipiteeren spontaan. Evenmin tannine. Zoowel in de precipitine-reactie als bij de vlokking van eiwit door tannine moet er dus een soort verbinding ontstaan, die vervolgens uitvlokt. Het voorkomen van een buigpunt in de u - t -kromme kan dan ongedwongen verklaard worden, door aan te nemen, dat de binding van antigeen en antilichaam langzaam plaats vindt, die van tannine aan eiwit echter veel sneller. De tijd, waarna het buigpunt bereikt wordt, kan dus ook bindingstijd genoemd worden (t_b).

Deze opvatting vindt steun in de proeven, waarbij de absolute concentraties gevarieerd werden (fig. 2): bij verdunning neemt de kans op botsing tusschen twee deeltjes af (dus ook de kans op gunstige, d.i. tot binding leidende botsing), met als gevolg een langere periode, voordat de binding zoo volledig mogelijk is. Dan zal de ontstane verbinding het gemakkelijkst vlokken, dus daar treedt een maximum in du/dt op, m.a.w. daar heeft de u - t -kromme een buigpunt.

b. *Het zône-phenomeen* (fig. 3, 5, 6). *a*-methode.

De verhouding antigeen/antilichaam (G/A) blijkt vooral invloed te hebben op de maximale coagulatie-snelheid (S). Het maximum van S is te vergelijken met den minimum-vlokingstijd in de proeven van DEAN en WEBB (6).

Op de daarop volgende periode blijkt de invloed der verhouding G/A veel geringer. De grootheid V is over een groot traject nagenoeg onafhankelijk van G/A . Hier blijkt, dat weliswaar de begin-condities in het eindresultaat, n.l. den vlokingstijd, tot uiting komen, maar toch hun invloed alleen uitoefenen in het begin van het proces.

De vraag, of het maximum van S ligt bij de „neutrale” verhouding (waarbij, na volledige precipitatie, nòch antigeen, nòch

antilichaam meer in de bovenstaande vloeistof zijn aan te toonen), evenals de minimum-vlokkings-tijd (DEAN en WEBB, 6), heb ik slechts in een enkele steekproef onderzocht. Het resultaat wees wel in deze richting. Het is evenwel a priori niet noodig, dat men, met als criterium eenerzijds den vlokkings-tijd, anderzijds de troebelings-snelheid, exact gelijke waarden voor de optimale verhouding vindt. De eene methode meet het begin, de andere het einde van hetzelfde proces. Secundaire factoren, werkend in de periode tusschen volledige binding (buigpunt) en vlokking, een vrij langen tijd dus (vgl. fig. 6a, en blz. 16), kunnen op het eindresultaat nog wel een geringen invloed hebben.

c. β -methode (fig. 4).

Bij proeven met constante concentratie antigeen en variatie van het antiserum vindt men in het algemeen ook een bepaalde verhouding, waarvoor de vlokkings-tijd een minimum is. (TAYLOR, 25a). Blijkbaar werd echter in de in fig. 4 weergegeven proeven de daarvoor noodige concentratie antiserum niet bereikt. Ook in proeven met een ander serum (V) kon het β -optimum niet gevonden worden. Blijkbaar moet men daarvoor, met de gebruikte sera, de (constante) antigeen-concentratie zeer klein nemen. In dat geval echter gaat de vlokking zóó langzaam, dat met den extinctiometer geen betrouwbare resultaten meer te verkrijgen zijn. In verband met de geringe beteekenis van de β -methode voor precipitine-reacties (zie hieronder) werden deze proeven niet verder voortgezet.

De beide optimale verhoudingen (α - en β -methode) vallen niet samen. BROWN (3) toonde aan, dat met een speciale techniek het verschil overbrugd kon worden. Zij liet bij de β -methode de buizen, waarin zij de vlokking waarnam, staan tot in alle een precipitaat was opgetreden. Door schudden werd dit geredispergeerd. Daarbij blijkt een bepaald precipitaat het meest resistent, n.l. dat, wat ontstaan is uit de oplossing, waarvan de samenstelling overeen komt met de optimale verhouding volgens de α -methode. De zoo gewijzigde β -methode noemt BROWN de γ -methode.

Een overeenkomstig gewijzigd α -procédé levert hetzelfde resultaat als de ongewijzigde, oorspronkelijke α -methode. Deze proeven bewijzen dus, dat het α -optimum meer beteekenis heeft dan het β -optimum.

Het verschil tusschen α - en β -optimum moet als volgt begrepen worden:

S-waarden, zooals als vlokkingstijden zijn slechts vergelijkbaar, als de totale hoeveelheid vlokbaar sol constant is (verg. inleiding). Neemt deze toe, dan zal, door grooter botsingskans, ook S toenemen. Daarbij bereiken de gevormde aggregaten ook eerder een bepaalde grootte, d.w.z. ze worden eerder zichtbaar, of wel de vlokkingstijd neemt af.

Noch de α -, noch de β -methode voldoen geheel aan dezen eisch. Alleen, de afwijkingen zijn bij constant antiserum veel kleiner dan bij constant antigeen, omdat het precipitaat, dus ook het vlokbare sol, voor het grootste deel uit antilichaam bestaat (MARRACK, blz. 109 e.v.). Variatie van het antilichaam (β -methode) geeft dus groote fouten, variatie van het antigeen (α -methode) slechts geringe. Een eventueel klein verschil van de α -optimale verhouding en de werkelijke neutrale verhouding valt blijkbaar binnen de grenzen der waarneming.

d. Bij de Ramon-titratie, d.w.z. de vlokking van diphtherietoxine en anti-toxine (RAMON, 23) wordt de β -methode toegepast. De resultaten daarvan, uitgedrukt in de verhouding van de werkzaamheid van antitoxine en toxine, blijken te kloppen met de dierproef. (Althans als er geen anatoxine aanwezig is. Anatoxine is toxine, dat zoodanige veranderingen heeft ondergaan, dat het niet meer toxisch, wel nog antigeen is; aanwezigheid van anatoxine uit zich dus niet in de dierproef, wel in de vlokkingreactie.) Toch kan men zich heel goed denken, dat een colloïdchemisch „neutraal” neerslag in vivo nog een toxische werking heeft door afsplitsing van geringe hoeveelheden toxine. Voor neutralisatie in vivo is dan meer antitoxine noodig dan in de vlokproef. De overeenstemming tusschen dierproef en vlokkingstitratie volgens de β -methode kan dus ook toevallig zijn. Levert echter werkelijk de β -methode hier het „neutrale” punt, dan moet men aannemen, dat het precipitaat in hoofdzaak uit toxine bestaat.

Volgens sommige onderzoekers (b.v. BROWN, l.c.) vallen het α - en het β -optimum geheel samen. Dit is op theoretische gronden onmogelijk, maar het verschil kan wel zeer gering zijn (zie blz. 16).

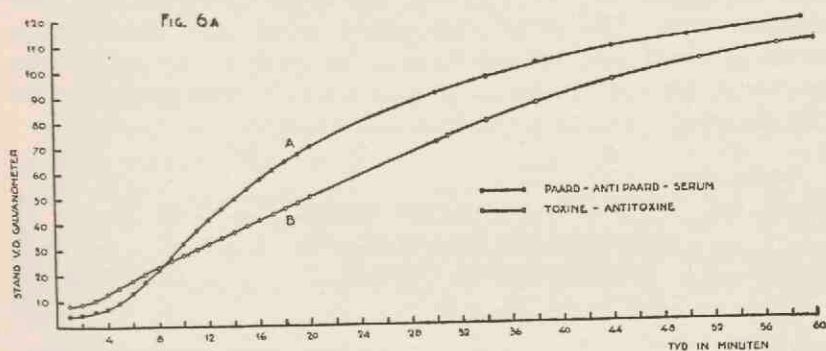
Enkele oriënteerende troebelingsmetingen werden bij de toxine-antitoxine-vlokking uitgevoerd.

Een moeilijkheid daarbij is, dat de snelheid van troebeling veel geringer is dan bij de onderzochte precipitine-reactie. Daarom moest met de groote cuvette (zie inleiding), dus met grooter gevoeligheid gewerkt worden, wat de betrouwbaarheid van de resultaten ongunstig beïnvloedt.

In elk geval kon het volgende worden vastgesteld:

1. de reactie verloopt ook bij kamertemperatuur met behoorlijk meetbare snelheid; zulks in tegenstelling met de gangbare meening, die ertoe leidde, de titratie volgens RAMON bij 50° uit te voeren.¹⁾ Enkele oriënterende proeven bij hooger temperatuur, waarbij het geheele toestel in een kleinen luchtthermostaat werd geplaatst, schijnen erop te wijzen, dat weliswaar bij 37° C. het proces sneller verloopt dan bij 20° , maar bij 50° niet sneller dan bij 37° .

Bij de gewone proefopstelling, met buizen in een waterbad, spelen echter de convectie-stroomen een belangrijke rol: men



laat opzettelijk een deel van de reactie-vloeistof boven het wateroppervlak van het verwarmingsbad uitsteken. De convectie, die de vlokking versnelt, is natuurlijk bij 50° nog sterker dan bij 37° . Toch komt het mij voor, dat men met deze „roer-inrichting” een element van onzekerheid invoert. Hetzelfde geldt natuurlijk voor op analoge wijze uitgevoerde precipitine-reacties.

¹⁾ Verschillende antitoxische sera kunnen, wat hun vlokkingssnelheid betreft, enorm uiteenloopen: in de proef bij 50° kan de minimum-vlokkingstijd variëren van $\frac{1}{2}$ uur tot 5 uur of meer! Het is natuurlijk heel goed mogelijk, dat de door mij gebruikte sera alle tot het „snelle” type behoorden. Waarop de onderlinge verschillen der sera berusten, is niet bekend. Waarschijnlijk zijn zij vergelijkbaar met de gevonden verschillen tusschen de gebruikte precipiteerende sera; zie c. blz. 10.

2. De gevonden u-t-krommen toonen geen duidelijk buigpunt; fig. 6a geeft naast elkaar een paard-antipaard-precipitatie (A, met antiserum I, verg. fig. 2 en blz. 8), en een toxine-antitoxine-vlokking, bij 50° (B). Men merke ook op, dat in beide gevallen de uitslag na 1 uur nog steeds toeneemt: er zijn dan nog geen vlokken (vgl. blz. 12, b).

De binding geschiedt hier dus blijkbaar sneller dan in de precipitine-reactie, waardoor het bepalen van S-waarden onmogelijk is. Toch is de verdunning van het antiserum soms vrij groot, 1 : 25 à 30 (vgl. blz. 12, a).

Als maatstaf voor de reactie-snelheid nam ik daarom eenvoudig de verandering van den galvanometer-uitslag in een willekeurigen tijd, nl. van $\frac{1}{2}$ tot 10 minuten, Δu .

3. Bij variatie van de concentratie antitoxine, met constante toxine-concentratie (β -methode, Ramon-titratie), vindt men een maximum van Δu voor een bepaalde verhouding der componenten. Uit deze verhouding werd, met de bekende werkzaamheid van het antitoxine, de sterkte van het toxine berekend. De zoo gevonden waarde stemt bevredigend overeen met de op de gewone wijze bepaalde waarde:

antitoxine: 450 A.E.	
toxine: A.W. , volgens opgave R.I.V. ca. 16	
berekend uit Ramontitratie, in het	
laboratorium uitgevoerd	ca. 17 (2x)
berekend uit Δu	16; 16 $\frac{1}{2}$

4. Ook bij variatie van het toxine, met constant antitoxine (α -methode) is er een verhouding, waarvoor Δu maximaal is. De daaruit berekende sterkte van het toxine is verschillend van de volgens 3. bepaalde:

antitoxine: 450 A.E.	
toxine volgens opgave R.I.V. A.W. = 16	
berekend uit Δu (β -methode)	16.7
id. id. (α -methode)	14.7

De verschillen zijn weliswaar zeer gering, vergeleken bij wat men met precipitine-reacties vindt. De geheele zône is trouwens erg smal (zie ook blz. 14, d).

5. De metingen worden ongunstig beïnvloed door het feit, dat zoowel toxine als antiserum sterk gekleurd zijn. Ik heb

getracht dit eenigszins te ondervangen door als verdunningsvloeistof in geval 4. een bouillon te gebruiken, die ongeveer dezelfde extinctie had als de toxine-bouillon. In geval 3. nam ik, in enkele proeven, behalve antiserum ook nog normaal paardenserum, en hield de som van beide constant. Hoewel daarmee een verbetering is bereikt, geef ik toch bovenstaande cijfers onder een zeker voorbehoud.

Een vollediger, en nauwkeuriger, onderzoek zal pas met gezuiverde oplossingen (liefst geheel kleurloos) mogelijk zijn.

e. De gevonden verschillen tusschen de voor de precipitine-reactie gebruikte antisera schijnen samen te hangen met den colloïdalen toestand van het antilichaam (het antigeen was in alle proeven hetzelfde paardenserum).

Een verklaring van deze verschillen is hier niet mogelijk. Het bestaan ervan echter brengt de beteekenis naar voren van een systematische studie van den invloed van electrolyten en van de pH.

B.

a. Zeer in het kort samengevat waren de resultaten:

1. de binding van antigeen en antilichaam kon aangetoond, en de ervoor noodige tijd bepaald worden.

2. Het zône-phenomeen is terug te brengen tot den invloed, die de verhouding der componenten op de eerste stadia der vlokking heeft. Op het verdere verloop der vlokking is een invloed van deze beginconditie niet duidelijk meer aan te toonen.

b. Bij mijn verder onderzoek ging ik uit van de twee grondgedachten in de immunologie, nl. die van EHRLICH en die van BORDET.

Volgens EHRLICH waren immunologische reacties te vergelijken met echte, specifieke, chemische reacties, terwijl BORDET juist den nadruk legde op het colloïdchemische karakter der processen. Daarbij stond (natuurlijk, in 1900) de adsorptie op den voorgrond.

De moderne ontwikkeling der immuunchemie wijst sterk in de door EHRLICH aangegeven richting; toch blijft ook BORDET's inzicht van waarde. Tot een mogelijke combinatie van beide beginselen kan men komen op grond van de volgende overwegingen:

1. De krachten tusschen antigeen en antilichaam zijn specifiek. (EHRLICH.)

2. Variatie van de verhouding antigeen/antilichaam kan geen invloed hebben op den aard van deze krachten.

3. Het zône-phenomeen moet dus verklaard kunnen worden uit het niet-specifieke karakter, dat deze krachten natuurlijk ook moeten hebben.

4. Daarvoor moet men dus zoeken naar analoge verschijnselen, berustend op krachten, die geen enkel specifiek element in zich hebben.

5. Daarbij dient men zich te wenden tot het gebied der lyophile colloïden, waartoe immers alle immunologisch belangrijke verbindingen behooren.

Een dergelijke analogie kan inderdaad gevonden worden, immers een sterk zône-effect vindt men bij de complex-coacervatie, of algemeener, bij de complexvorming (BUNGENBERG DE JONG c.s. 4).

c. Complexvorming is de wederzijdsche vlokking van tegengesteld geladen hydrophiele colloïden. Het klassieke voorbeeld is de reactie tusschen arabische gom (negatief) en gelatine (positief, dus bij een pH, lager dan het iso-electrisch punt). Er treedt een tweede gecondenseerde phase op, die, afhankelijk van de omstandigheden, dunvloeiaar tot geheel vlokkig kan zijn. De coacervatie is maximaal voor een bepaalde concentratieverhouding der reagentia; deze verhouding komt vrijwel overeen met die, waarbij het coacervaat geen electrokinetische potentiaal heeft, dus met het neutrale punt. Met meer gelatine is het coacervaat positief, met minder gelatine negatief geladen. Bij verandering van de pH verschuift deze neutrale verhouding: bij hooger pH is meer gelatine noodig. Boven het iso-electrisch punt treedt de complexcoacervatie in het geheel niet op.

De verklaring van deze verschijnselen moet gezocht worden in de electrostatische attractie tusschen de tegengesteld geladen deeltjes. Is deze grooter dan de afstooting tusschen de gelijk geladen deeltjes, dan blijft er in totaal nog een attractie over, de z.g. effectieve attractie, die tot aggregatie van de deeltjes leidt. De effectieve attractie is voor een bepaalde verhouding der solen maximaal, n.l. waar de positieve en de negatieve ladingen elkaar juist neutraliseeren. De aggregatie gaat gepaard met een desolvatie. De intensiteit van deze desolvatie bepaalt den aard van het product der reactie: bij zwakke desolvatie vloeistof, bij sterkere meer een vlokkel.

d. Een vergelijking van complex-coacervatie en precipitine-reactie levert het volgende:

1. bij beide het zône-phenomeen.
2. bij beide correspondeert de optimale verhouding met een neutrale verhouding.
3. Het verschil is, dat bij de complexcoacervatie de componenten *tegensteld*, bij de precipitine-reactie echter *gelijk* geladen zijn, en elkaar als gevolg daarvan afstootten.

Het is echter zeer goed denkbaar, dat tusschen *positieve groepen* van het eene deeltje, en *negatieve groepen* van het andere deeltje een attractie bestaat. Als inderdaad daardoor een aggregatie tot stand kan komen, dan moet dat in verband worden gebracht met stereochemische factoren, die immers in de immuunchemie zoo'n belangrijke rol spelen (zie historisch overzicht en hoofdstuk VII). Een dergelijk vermoeden is, op geheel anderen grond, door HAUROWITZ (18) geuit, die er verder geen experimenteelen steun voor geeft.

Door OSTWALD (22) is reeds de analogie tusschen complex-coacervatie en precipitine-reactie gesignaleerd. Hij zag echter niet de ladings-tegenstelling, maar de dehydratatie als primaire oorzaak, vandaar de naam dehydratatie-vlokking. Experimenteële studies over deze analogie zijn door OSTWALD niet gemaakt, en zijn mij ook verder niet bekend.

e. Door BUNGENBERG DE JONG (l.c.) is aangegeven, op welke wijze men kan nagaan, of de wisselwerking tusschen twee solen op onderlinge electrostatische attractie berust (complex-vorming). Ik noem:

1. studie van coacervaat-druppels, b.v. desintegratie in een electrisch veld.
2. electrophoretische metingen aan coacervaten.
3. studie van den invloed van electrolyten op de reactie.

Voor de precipitine-reactie zijn 1. en 2. onbruikbaar: er treden geen zichtbare druppels op¹⁾, dus is desintegratie daarvan niet mogelijk; en zoowel de uitgangssolen als het precipitaat zijn negatief geladen, ook electrophorese kan geen uitsluitel geven. Blijft over de studie van den invloed van electrolyten en van de pH.

¹⁾ Noot bij de correctie: HEIDELBERGER en KENDALL (J. Exp. Med. 65, 647 (1937)) beschrijven precipitaten (uit anti-pneumococcenserum en specifiek koolhydraat) met een gelei-achtige consistentie. Mogelijk is dat reeds een overgang naar een meer vloeibaren toestand.

Bij de complexcoacervatie is n.l. gebleken, dat deze door electrolyten onderdrukt wordt. De werking van verschillende zouten is vooral afhankelijk van de lading der ionen. Werkt men met aequivalente concentraties, dan vindt men, dat steeds de hoogerwaardige ionen de vlokking sterker onderdrukken; dus als $x-y$ een zout voorstelt met een x -valent kation en een y -valent anion, dan vindt men

$4-1 > 3-1 > 2-1 > 1-1$ voor de kationen, bij gelijk anion
en $1-4 > 1-3 > 1-2 > 1-1$ voor de anionen, bij gelijk kation.

Dit optreden van de beide valentie-regels¹⁾ is karakteristiek voor de complex-coacervatie.

De verklaring vindt men in de verzwakking van het electrisch veld van het deeltje door de ionen, waarbij hoogerwaardige ionen sterker werken dan lager geladen ionen. En wel werken natuurlijk de negatieve ionen op de positieve deeltjes, en de positieve ionen op de negatieve deeltjes. Maar steeds is het resultaat een verzwakking van de effectieve attractie.

f. De invloed van electrolyten is reeds in hoofdstuk I in het kort besproken (blz. 6). Het feit, dat ook hier hoge concentraties electrolyt remmend werken, is al een aanwijzing voor de analogie van precipitine-reactie en complexcoacervatie. Nader gegevens, verkregen met behulp van de in het voorgaande ontwikkelde techniek, zijn verzameld in het volgende hoofdstuk.

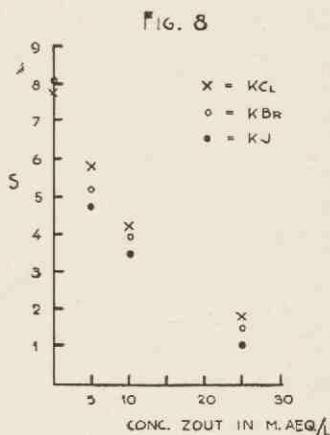
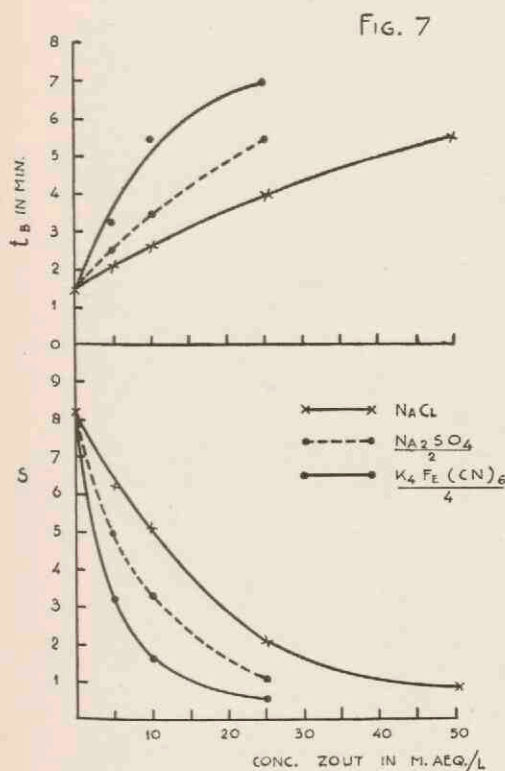
V. EXPERIMENTEN OVER ELECTROLYT-INVLOED.

a. Eerst werd onderzocht de invloed van verschillende anionen, bij gelijk kation, en wel bij één enkele verhouding anti-geen/antilichaam. Onderzocht werden NaCl , $\text{Na}_2\text{SO}_4/2$, en $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/4$ (het verschil tusschen K en Na speelt in het geheel geen rol) voor den invloed van de valentie, en KCl , KBr en KJ voor den invloed van de lyotropie (vgl. noot 1 op blz. 23). De proeven werden gedaan met antiserum II en iets minder antigeen, dan met het neutrale punt (dus met het maximum van S) overeen komt.

De resultaten geven fig. 7 en 8; daarbij is de concentratie

¹⁾ In de colloïdchemie bekend als Schulze-Hardy-regels; zie b.v. FREUNDLICH, Kapillarchemie, 4de druk, II, 121.

van het electrolyt in milli-aequivalenten per liter gegeven, en hebben S en t_b dezelfde beteekenis als tevoren.



b. Het onderzoek van een volledige reeks van positieve ionen wordt onmogelijk gemaakt door het feit, dat 3- en meerwaardige kationen eiwit precipiteeren en/of door hydrolyse van hun zouten moeilijkheden geven. Bij complexe ionen kan bovendien de intense kleur een bezwaar zijn. Het wegvallen van dit criterium maakte het noodzakelijk te zoeken naar een andere methode om den invloed van de valentie der ionen op de precipitatie vast te stellen.

De studie van den invloed van verschillende electrolyten op het zône-effect (volgens de optimum-proportie- of α -methode, vgl. blz. 12, en fig. 3, 5 en 6) bleek voor dit doel bruikbaar te zijn.

Bij het gebruikte serum III waren 4 punten, behalve de con-

trôle met antigeen-concentratie 0, voldoende om met eenige zekerheid de S-G/A-kromme te construeren.¹⁾

Dit werd nu gedaan voor drie zouten, n.l. K_2SO_4 (1-2),

FIG. 9

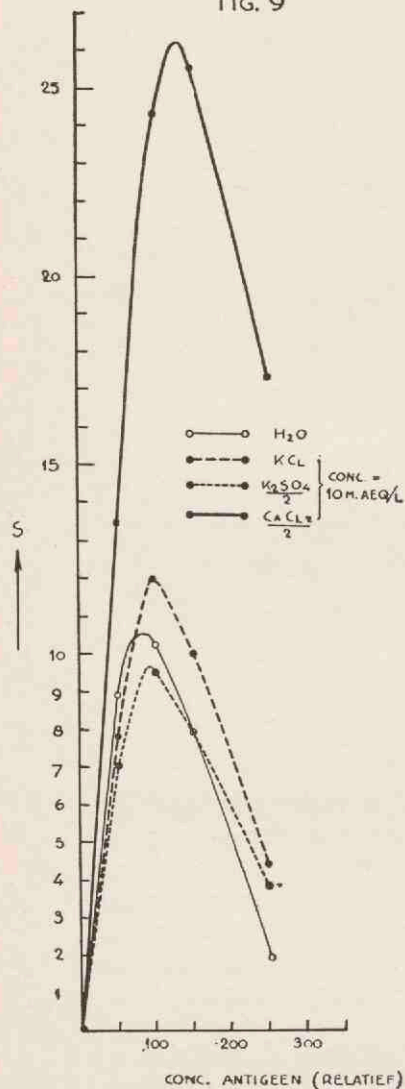
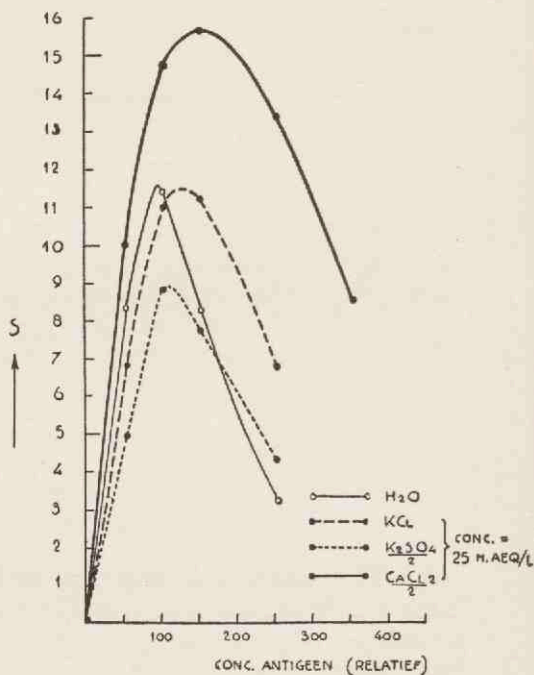
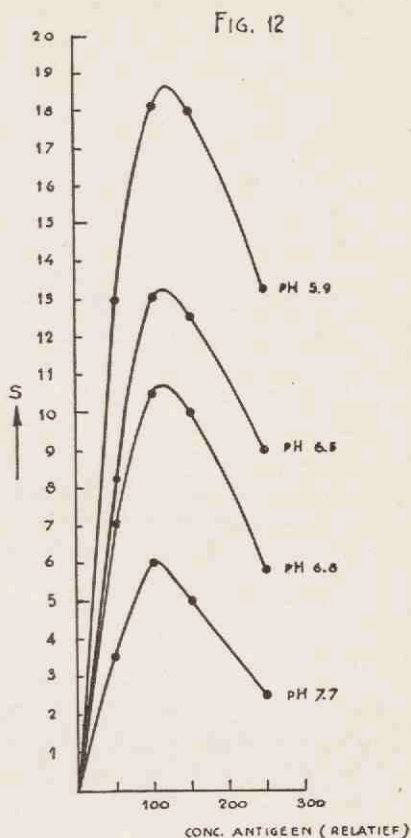
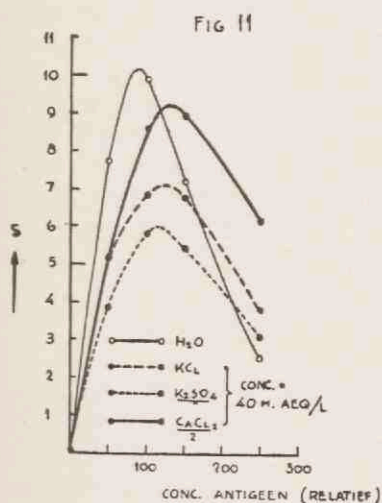


FIG. 10



¹⁾ Het bepalen van een grooter aantal punten was bezwaarlijk, omdat het dan niet mogelijk bleek, een volledige reeks, dus alle zouten bij één

KCl (1-1) en CaCl_2 (2-1), en bij drie concentraties, n.l. 10,



25 en 40 m. aeq./L. Ter vergelijking werd aan elke serie een reeks proeven zonder zout toegevoegd.¹⁾

De resultaten zijn grafisch weergegeven in fig. 9, 10 en 11, waarbij ik mij tot de grootheid S beperkte.

c. De invloed van de pH werd, eveneens met serum III, op geheel analoge wijze onderzocht door aan de basis-verdun-

concentratie, op één dag te bepalen. Dit laatste echter is, met het oog op mogelijke veranderingen van de gebruikte oplossingen van antigenen en antiserum, zeer gewenscht.

¹⁾ Zonder zout, of „in water” beteekent, dat géén zout aan de basis-verdunningsvloeistof werd toegevoegd; niet, dat de oplossing geheel zoutvrij was. De basis-vloeistof was in alle proeven een oplossing van 5 m. aeq./L NaCl en 50 m. mol/L glycoll.

ningsvloeistof (die hier geen glycocoll bevatte!) fosphaatbuffers van verschillende pH toe te voegen.

De resultaten zijn samengevat in fig. 12.

VI. BESPREKING VAN DE RESULTATEN.

a. De proeven van fig. 7 en 8 wijzen al in de richting van complexvorming: inderdaad blijkt de lading van het anion een belangrijker factor dan de plaats in de lyotrope reeks.

De invloed van het electrolyt uit zich op tweeërlei wijze: bij toenemende concentratie neemt S af, t_b toe. Vooral het toenemen van t_b is van belang: t_b is een maat voor de snelheid, waarmee de primaire binding plaats vindt. Er blijkt dus, dat werkelijk de primaire reactie vertraagd wordt, en niet alleen de precipitatie van de gevormde verbinding van antigeen en antilichaam langzamer verloopt.

De afname van S volgt natuurlijk automatisch uit de geringere bindingsnelheid.

De onderzoekers, die zich met den invloed van electrolyten op de precipitine-reactie hebben bezig gehouden, vestigen vooral de aandacht op het lyotrope effect (zie DOWNS en GOTTLIEB, 7; verdere litt. bij MARRACK, p. 95 e.v.). Uit het bovenstaande is gebleken dat de valentie een grootere rol speelt. Daarbij bedenke men echter, dat de zoutconcentratie in deze proeven veel kleiner was dan de gebruikelijke. Daar moet wel de oorzaak liggen, dat het effect van de valentie nu pas duidelijk naar voren komt (zie ook blz. 27).

b. Een vollediger inzicht in den invloed van het electrolyt geven de proeven over het zône-effect (fig. 9, 10 en 11). Daarbij vallen de volgende merkwaardigheden op:

1. eenzelfde concentratie van eenzelfde zout kan, ten opzichte van water (n.b. zie noot 1 op blz. 23!), zoowel remmend als versnellend op de precipitatie werken, afhankelijk van de verhouding antigeen/antilichaam (b.v. in fig. 11).

2. de optimale verhouding verschuift, afhankelijk van aard en concentratie van het toegevoegde zout.

3. de afzonderlijke waarden van S zijn ook afhankelijk van aard en concentratie van het toegevoegde zout.

c. Ik wil deze punten aan een nadere beschouwing onderwerpen.

ad 1: Dit moet een gevolg zijn van de eigenaardigheden, onder 2 en 3 genoemd.

ad 2: De gevonden verschuivingen van het optimum zijn samengevat in onderstaande tabel 2. Daarbij noem ik de verschuiving: het quotient van de *optimale verhouding met zout, gedeeld door de optimale verhouding zonder zout* (in plaats van de verhouding G/A kan men eenvoudig de concentratie van G nemen, daar A toch in alle proeven dezelfde concentratie heeft).

T a b e l 2, verschuivingen van de optimale verhouding.

concentratie m. aeq./L.	K ₂ SO ₄	KCl	CaCl ₂
0	1.00	1.00	1.00
10	1.09	1.17	> 1.65 *
25	1.16	1.37	1.53
40	1.28	1.39	1.44

* De waarde bij 10 m. aeq./L. CaCl₂ is een onderste grens. Een nauwkeuriger bepaling is niet mogelijk, omdat S niet goed bepaald kon worden: het buigpunt in de u-t-kromme komt hier te vroeg.¹⁾

Het bestaan van een verschuiving van de optimale verhouding is op zichzelf al een bewijs voor den electrostatischen aard van de specifieke attractie. Immers in het algemeen zullen positieve en negatieve groepen niet in gelijke mate worden veranderd; waar zonder zout aequivalentie was, zal die met zout niet meer zijn.

De richting van de verschuiving is niet te voorspellen. Indien men echter de waarden voor KCl als uitgangspunt neemt, kan van die voor aequivalente concentraties K₂SO₄ enerzijds, CaCl₂ anderzijds, wèl iets voorspeld worden.

Immers vervanging van KCl door K₂SO₄ in aequivalente concentratie laat den invloed der kationen ongewijzigd. De negatieve groepen veranderen dus niet. Echter werkt SO₄^{''}/2 sterker dan Cl', zoodat de positieve groepen verzwakt worden.

¹⁾ De nauwkeurigheid van deze cijfers moet men niet al te hoog aanslaan; immers de krommen zijn bepaald met slechts 5 punten (zie blz. 21). De onderlinge verhouding in een horizontale of verticale rij is echter ongetwijfeld juist, en het is deze onderlinge verhouding, waaraan verdere beschouwingen vast te knopen zijn.

Daardoor moet de optimale verhouding zoo veranderen, dat er meer positieve, of minder negatieve groepen zijn (vgl. b.v. den invloed van de pH op de complexcoacervatie van arabische gom en gelatine).

Vervanging van KCl door CaCl₂ echter zal de positieve groepen onveranderd laten, en de negatieve groepen verzwakken; dan zijn voor optimale precipitatie méér negatieve groepen noodig.

Aan het bovenstaande kan, voor alle drie onderzochte concentraties, voldaan worden door aan te nemen, dat de reagerende groepen in het antilichaam positief, in het antigeen negatief zijn. Daarbij is van deze groepen slechts verondersteld, dat hun werking afhangt van hun electrostatisch veld; wat overigens de aard van deze groepen is, kan nog in het midden gelaten worden.

Het verloop van de verschuiving met de concentratie van één zout is iets minder eenvoudig. Weer zij de invloed van KCl uitgangspunt van de beschouwing. Experimenteel blijkt, dat de verschuiving grooter is dan 1.00 (dat er dus mèt zout meer antigeen noodig is, om een bepaalde hoeveelheid antiserum optimaal te vlokken, dan zonder zout), dus dat de negatieve groepen sterker worden beïnvloed dan de positieve groepen (10 m. aeq./L). Men kan verwachten, dat bij hogere zoutconcentratie het verschil in werkzaamheid der ionen zich minder zal doen voelen. Een aanduiding daarvoor vindt men in de waarden bij 25 en 40 m. aeq./L, die niet meer met zekerheid verschillend te noemen zijn, m.a.w. bij nog hogere concentratie zou ongetwijfeld de verschuiving weer gaan afnemen.

Dit nu ziet men bij CaCl₂: daar wordt, door de zooveel sterkere werking van het Ca-ion, de maximale verschuiving eerder bereikt (n.l. al bij de eerste onderzochte concentratie), en de proeven geven alleen de daarop volgende daling weer.

Evenzoo is het duidelijk, dat bij K₂SO₄ het verschil tusschen de werking van positieve en negatieve ionen kleiner is dan bij KCl, met als gevolg een kleinere verschuiving, die in het onderzochte traject alleen maar toeneemt.

Uit de waarnemingen bij de drie zouten is dus het geheele beeld af te leiden, dat één zout in een volledige concentratiereeks zou geven.

Metingen bij hogere zoutconcentraties worden, door de dan te kleine S-waarden, te weinig betrouwbaar. Alleen met

CaCl_2 werd in een voorloopige proef met 50 en 100 m. aeq./L gewerkt.

Inderdaad neemt dan de verschuiving verder af; bij 50 m. aeq./L vond ik ca. 1,4, in goede overeenstemming met de waarde voor 40 m. aeq./L, bij 100 m. aeq./L nog slechts 1,2, juist zooals te verwachten was.

Een verschuiving van de optimale verhouding onder invloed van electrolyt was totnutoe alleen in het systeem anti-pneumococccen-serum + specifiek koolhydraat bekend (BROWN, 3).

Dat bij andere systemen nooit verschuivingen zijn gevonden, kan twee oorzaken hebben. In de eerste plaats is de vlokkingstijd, die altijd bij zône-studies bepaald wordt (zie blz. 5), misschien minder gevoelig voor kleine veranderingen van de verhouding antigeen/antilichaam dan de troebelingsnelheid S.

Maar in elk geval zijn de hoogere zoutconcentraties, die men gewoonlijk toepast (zie blz. 24), minder geschikt om dergelijke effecten te bestudeeren. Zoowel het verschil tusschen de zouten onderling als de invloed van verdere zout-toevoeging, wordt kleiner, naarmate de uitgangskoncentratie toeneemt.

Men zal zich herinneren, dat de zoutconcentratie in de hier beschreven proeven met opzet zoo laag gekozen was, om bij kleine concentraties der reagerende componenten toch een behoorlijk meetbaar effect te krijgen (blz. 11, 12). Daarbij is nu tevens gebleken, dat door het laag houden der zoutconcentraties de gelegenheid ontstond, den invloed van dit electrolyt op de reactie te bestudeeren (vgl. ook blz. 24).

Dat in het door BROWN onderzochte systeem (l.c.) toch groote verschuivingen optreden, ondanks de hooge zoutconcentraties, is waarschijnlijk een speciale eigenschap van dit systeem.

ad 3. Bij het bestudeeren van den invloed van electrolyten op S-waarden moet rekening worden gehouden met de boven besproken verschuiving van het optimum. Strikt vergelijkbaar zijn slechts die S-waarden, die bij *vergelijkbare* (d.i. dus in het algemeen verschillende) waarden van G/A vallen. Als vergelijkbare verhoudingen G/A komen slechts de optimale verhoudingen in aanmerking, omdat daar de reactieve groepen in antigeen en antilichaam electrisch aequivalent zijn. Andere vergelijkbare verhoudingen G/A kunnen alleen uit de optimale

verhoudingen worden afgeleid, en leveren dus geen nieuwe mogelijkheden.¹⁾

In tabel 3 zijn de S-waarden bij de optimale verhoudingen (dus de maximale S-waarden) weergegeven als het quotient van S-(max. met zout) gedeeld door S-(max. zonder zout), dus geheel analoog aan de waarden van de verschuiving in tabel 2.

T a b e l 3, relatieve S-waarden bij de optimale verhouding.

conc. in m. aeq./L.	K ₂ SO ₄	KCl	CaCl ₂
0	1.00	1.00	1.00
10	0.90	1.12	2.37
25	0.76	0.98	1.36
40	0.60	0.71	0.91

Weer moet men nu vergelijken:

òf den invloed van de zoutconcentratie bij eenzelfde zout,
òf den invloed van verschillende zouten in aequivalente
concentratie.

Men moet er hier rekening mee houden, dat op S ook de niet-specifieke afstooting, tengevolge van de negatieve lading en de hydratatie der deeltjes, invloed heeft. Het maximum van S bij ca. 10 m. aeq./L. KCl is daarvan een uiting. Immers de attractie wordt door toevoeging van zout steeds verzwakt. Een sterkere vlokking kan dus alleen het gevolg zijn van een gelijktijdige vermindering van de afstooting, die de verzwakking van de attractie overcompenseert. Bij hooger concentratie KCl overweegt de verzwakking van de attractiekrachten boven die van de afstootende krachten.

Het gedrag van CaCl₂ is nu duidelijk: de verzwakking der afstooting is zooveel sterker, met als gevolg een veel hooger maximum. Hierbij zij opgemerkt, dat de contrôle, $G = 0$, bij deze concentratie CaCl₂ werkelijk nog o leverde, niettegenstaande de zeer snelle troebeling in de andere proeven.

Bij K₂SO₄ is de verzwakking der attractie sterker dan bij KCl, die van de afstooting echter gelijk, zoodat hier geen maximum in het verloop van S met de concentratie optreedt.

Het is haast onnoodig, er nog op te wijzen dat ook de volg-

¹⁾ In de proeven van fig. 7 en 8 is hiermee geen rekening gehouden. Dat was echter niet noodig, want het overwegen van den valentie-invloed boven het lyotrope effect komt er even goed in tot uiting.

orde in een horizontale rij, dus bij aequivalente concentratie steeds $\text{CaCl}_2 > \text{KCl} > \text{K}_2\text{SO}_4$, geheel in het kader van deze beschouwingen past.

d. Uit deze proeven blijkt, dat de electrolyt-invloed volkomen te verklaren is met de hypothese, dat de precipitatie-reactie op electrostatische attractie tusschen antigeen en anti-lichaam berust; daarbij moet men natuurlijk rekening houden met het feit dat beide negatief geladen zijn, wat afstooting geeft. Houdt men dat in het oog, dan is de analogie met de complexcoacervatie inderdaad volkomen.

Er moet met nadruk op gewezen worden, dat de samenstelling van het gebruikte antigeen op zichzelf géén verklaring kan leveren voor welk der gevonden verschijnselen ook.

e. Blijft nog te bespreken den invloed van de pH (fig. 12). Ook deze is weer in twee deelen te splitsen, nl. bij toenemende pH een verschuiving van het optimum en een verlaging van de S-waarden.

1. De invloed op de S-waarden is zeer groot, en moet worden verklaard door de met de pH toenemende negatieve lading der deeltjes, dus door toenemende *afstooting*. Daarbij zal ook de bindingstijd moeten toenemen. Inderdaad vond ik voor de optimale verhoudingen:

T a b e l 4.

pH	S	t_b
5.9	19	$3\frac{3}{4}$ min.
6.5	13	$1\frac{1}{2}$ „
6.8	11	$1\frac{3}{4}$ „
7.7	6	2 „

2. Dat de waargenomen verschuiving van de optimale verhouding zoo gering is, is niet zoo eenvoudig te verklaren (men vergelijkte b.v. den zeer grooten invloed van de pH op de complexcoacervatie van arabische gom en gelatine). De verschuiving is wel in de richting, die men verwachtten zou: bij hooger pH zijn minder negatieve groepen noodig. Als echter de binding op b.v. COO^- en NH_3^+ -groepen berustte (zie HAUROWITZ, 18), dan zou men een veel grooter verschuiving verwachten. Een zeer geringe verschuiving werd in enkele proeven met serum II ook gevonden. Men zou zelfs een deel der verschuiving nog kunnen toeschrijven aan de vervanging

van de eenwaardige $H_2PO_4^-$ -ionen in de bufferoplossing door tweewaardige HPO_4^{2-} -ionen, met toenemende pH.

Het is wel interessant, er in dit verband op te wijzen, dat ook bij andere processen gevallen zijn gevonden, waar de invloed van de pH zeer gering is. Zoo bestudeerden BUNGENBERG DE JONG en YOUKOVSKY (5) de concentratie $CaCl_2$, noodig om een lecithine-coacervaat juist te ontladen. Deze ontladingsconcentratie bleek op eigenaardige wijze van de pH af te hangen: bij het iso-electrisch punt natuurlijk 0, daarna stijging, *vanaf pH 4 tot pH 9 nagenoeg constant*, dan verdere stijging. Dus ook hier sterke invloed van electrolyten, blijktens de ontlading, en in een vrij groot traject een zeer geringe invloed van de pH. Ik wijs slechts op de uiterlijke analogie, zonder nu ook een dieperen samenhang met de precipitine-reactie te veronderstellen.

Voor een verklaring van den geringen invloed van de pH op de optimale verhouding zou men kunnen overwegen, of misschien de actieve groepen een dipool-karakter hebben. Voorloopig echter is het nog niet mogelijk, hier een beslissing te treffen.

f. Het is hier de plaats om terug te komen op de verschillen tusschen de sera onderling (vgl. blz. 17 en de noot op blz. 15). De op blz. 11 geschetste maatregelen, genomen om de precipitatie te versnellen, zijn met de kennis van het bovenstaande volkomen begrijpelijk. Immers de snelheid, waarmee de vlokking plaats vindt, is in hooge mate afhankelijk van de samenstelling van het milieu, waarbij zoowel de specifieke attractie, als de niet-specifieke afstooting (lading en hydratactie, dus ook invloed van alcohol) een rol spelen. Het is alleszins plausibel, dat de onderlinge verhouding tusschen specifieke en niet-specifieke krachten bij verschillende sera anders kan zijn.

Zijn daarmee de verschillen der sera onderling begrijpelijk gemaakt, de diepere oorzaak van deze verschillen onttrekt zich nog aan de waarneming. Dit punt valt echter buiten de studie van het mechanisme der precipitine-reactie.

VII. ALGEMEEN OVERZICHT.

Tenslotte wil ik trachten, mijn onderzoek in een breeder verband met de vele immunochemische onderzoeken te beschouwen.

A. Over het mechanisme.

De meest gangbare opvatting over het tot stand komen van de verschijnselen van agglutinatie en precipitatie legt den nadruk op het hydrophobe karakter van de ontstane verbinding tusschen antilichaam en antigeen (d.i. dus de gesensibiliseerde bacterie resp. de primaire verbinding tusschen antigeen en antilichaam). Deze opvatting vindt steun o.a. in de electrophoretische metingen van NORTHROP en DE KRUYF (19), waarbij bleek, dat gesensibiliseerde bacteriën zich electrophoretisch gedragen als gedenatureerd globuline. Ook de invloed van zeer geringe zoutconcentraties op de agglutinatie is analoog aan dien op gedenatureerd globuline. Vooral door EAGLE (9) is de nadruk gelegd op deze analogie met denaturatie. Daar het antilichaam het grootste deel van het precipitaat, resp. de oppervlakte van een gesensibiliseerde bacterie, uitmaakt, zou denatureering van het antilichaam inderdaad tot deze verschijnselen leiden.

Behalve dat het mechanisme van de denatureering uit den aard der zaak geheel in het duister blijft, is er bovendien een principiëel bezwaar tegen deze theorie: zij eischt nl., dat alleen de primaire binding specifiek is, terwijl de secundaire aggregatie (agglutinatie of precipitatie) zou worden veroorzaakt door het hydrophobe karakter, d.w.z. *niet specifiek* zou zijn. Voor precipitine-reacties is dit niet experimenteel te toetsen, wèl echter voor de agglutinatie van bacteriën.

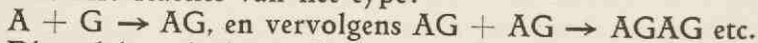
TOPLEY, WILSON en DUNCAN (26) onderzochten de agglutinatie van een mengsel van twee op het oog te onderscheiden bacteriën door een mengsel van de bijbehorende antisera. De theorie zou dan eischen, dat men in de geagglutineerde massa de beide bacteriën onregelmatig verdeeld vindt. TOPLEY c.s. vonden echter steeds groote aggregaten van één bacteriesoort. Dergelijke groote aggregaten liggen natuurlijk wèl onregelmatig door elkaar. De conclusie hieruit is, dat de krachten, die het z.g. secundaire proces, dus de eigenlijke agglutinatie, tot stand brengen, even specifiek (en dus vermoedelijk dezelfde) zijn, als die, welke de primaire binding veroorzaken. Wegens de identiteit van agglutinine en precipitine (MARRACK, pag. 126) geldt dan hetzelfde voor precipitine-reacties.

Door MARRACK (blz. 105) is erop gewezen, dat een dergelijke, geheel specifieke, attractie tusschen antigeen en antilichaam ook tot deeltjes met een hydrophoob karakter zou kunnen leiden. Indien n.l. de z.g. polaire groepen van het

antilichaam, waarvan men algemeen aanneemt, dat zij de hydratatie-centra vormen, in de reactie een rol spelen, dus van wisselwerking met de omgeving worden uitgesloten, dan zal de hydratatie afnemen, met als gevolg een hydrophoob karakter van het gevormde aggregaat. Indien nu zowel antilichaam als antigeen meer dan één specifiek reagerende groep per deeltje hebben, kunnen zoo, door *specifieke* krachten, groote aggregaten gevormd worden. (Vergelijk daarmee de opvatting van HAUROWITZ (18), dat elk antilichaam-deeltje maar één reactieve groep zou bevatten). Over den aard van de krachten zegt MARRACK niet meer, dan dat zij waarschijnlijk op polaire groepen berusten.

Het zône-phenomeen, waarvan elke theorie der precipitine-reactie rekenschap zal moeten geven, komt volgens MARRACK (blz. 113) tot stand door de mate, waarin een „continu rooster” (continuous lattice) gevormd kan worden, wat dan de grootte van de ontstane aggregaten bepaalt. De optimale verhouding zal dan bepaald worden door de grootte der primaire deeltjes en het aantal reactieve groepen op elk deeltje. Een dergelijk beeld is eerder ontleend aan kristallografische begrippen dan aan de colloïd-chemie. Als gevolg daarvan laat het geen ruimte voor de karakteristieke verschuiving der optimale verhouding onder invloed van electrolyten. Bovendien zou de invloed van overmaat van een der componenten, speciaal van overmaat antigeen, als deze berustte op de vorming van minder groote aggregaten, zich eerst uiten in de latere stadia van de vlokking, terwijl in het voorgaande gebleken is, dat juist in het begin-stadium deze invloed het sterkst merkbaar is.

Door HEIDELBERGER en KENDALL (14) is een theorie van het mechanisme van precipitine-reacties opgesteld, uitgaande van de veronderstelling, dat het heele proces bestaat uit bimoleculaire reacties van het type:



Dit zal in principe wel niet voor bestrijding vatbaar zijn, maar de toepassing van de wetten van het chemisch evenwicht, dus van de thermodynamica, op dergelijke reacties tusschen colloïden heeft geen physische beteekenis. Dat de resultaten door een bepaalde formule kunnen worden weergegeven bewijst nog niet de juistheid van die formule! (Zie ook MARRACK, blz. 122). Bovendien verklaart deze theorie niet het zône-effect, zoodat HEIDELBERGER en KENDALL hun toevlucht

moeten nemen tot allerlei hypothetische oplosbaarheden van hun aggregaten. Ook de aard van de werkzame krachten komt in deze theorie in het geheel niet tot uiting.

Zowel MARRACK als HEIDELBERGER en KENDALL nemen aan, in tegenstelling met de oudere denatureeringstheorie, dat er uitsluitend specifieke krachten in het spel zijn. Dit eischt de aanwezigheid van meer dan één actieve groep per deeltje; immers indien een deeltje slechts één reactieve groep bevatte, dan zou de reactie niet verder kunnen gaan dan tot de vorming van een complex AG, één deeltje antilichaam + een deeltje antigeen, waarna de reactie niet verder zou kunnen verlopen. Er is echter geen enkel bezwaar tegen, de aanwezigheid van meer reactieve groepen per deeltje aan te nemen; integendeel, het lijkt zelfs onwaarschijnlijk, dat de groote eiwitdeeltjes elk slechts één actieve groep zouden bevatten.

Het in de vorige hoofdstukken besproken onderzoek leidde tot de beschouwing van de precipitine-reactie als een soort complexvorming in den zin van BUNGENBERG DE JONG, met dit verschil, dat de attractie slechts plaatselijk, gebonden aan bepaalde groepen, is, terwijl de deeltjes elkaar in het algemeen afstooten als gevolg van hun negatieve lading.

Men kan zich het geheel nu als volgt voorstellen:

Aan elke reactieve groep komt een werkingssfeer toe. De grootte daarvan wordt uitsluitend bepaald door de sterkte van het electrostatische veld van de groep. Komen twee groepen, tot reactie in staat (dus de eene behoorend tot antigeen, de andere tot antilichaam), binnen elkanders werkingssfeer, dan zal binding het gevolg zijn. Beschouwt men nu de werkingssfeer als elementair deeltje, dan gaat de redeneering van BUNGENBERG DE JONG, ter verklaring van het zône-effect (zie blz. 18), voor dit geval volkomen door.

Dus ook hier, evenals bij de complexcoacervatie, kan het proces, en speciaal het zône-effect, niet begrepen worden alleen uit de wisselwerking tusschen twee deeltjes: de reactie van elk deeltje wordt mede bepaald door alle andere. Daarom ook is het voor de redeneering niet van belang, dat een aantal actieve groepen (die in de beschouwing als elementaire deeltjes optreden) aan één deeltje gebonden is. Dit aantal immers valt geheel in het niet bij het totale aantal.

De totale lading van de deeltjes, dus de afstooting op grooten afstand, vermindert de kans, dat twee werkingssferen

in reactie treden (vandaar het begrip „gunstige botsing”), en wel des te sterker, naarmate de lading der deeltjes grooter is.

Verandering van de totale lading verandert echter niet de werkingssferen zèlf, en dus ook niet de optimale verhouding. Daaruit volgt echter nog niet, dat verandering van de pH, die de totale lading bepaalt, nu ook de optimale verhouding totaal onveranderd moet laten, want de pH kan ook de actieve groepen zelf beïnvloeden. Daarvoor verwijs ik naar de bespreking van den pH-invloed op blz. 29 (hoofdst. VI, e.).

Zoals elke complex-vorming zal ook de reactie tusschen antigeen en antilichaam met een dehydratatie gepaard gaan, waardoor de uiterlijke analogie met denatureeringsverschijnselen duidelijk wordt. De opvatting van de precipitine-reactie als een complexvorming blijkt dus op eenvoudige wijze reken-schap te geven van het colloïdchemische, d.i. dus het niet-specifieke, deel der verschijnselen.

Het lijkt niet uitgesloten, dat aan de beschouwing van de antigeen-antilichaamverbinding als een complexvorming een algemeener beteekenis toekomt dan alleen voor de precipitine-reactie. Immers ook bij bacteriolyse (NEISSER en WECHSBERG, 21) en bij de agglutinatie (b.v. DUNCAN, 8) bestaat het zône-effect. Bij de agglutinatie is ook de verschuiving van de optimale verhouding door electrolyt geconstateerd (BIER, 1). In een zeer recent onderzoek beschrijft DUNCAN (8a) ook den invloed van zout (NaCl) op de agglutinatie. Zoowel de experimenteele resultaten (verschuiving van de optimale verhouding) als de conclusie (invloed van het zout vooral op de primaire reactie tusschen antigeen en antilichaam) passen geheel in het hiervóór ontworpen beeld. De „rooster”-theorie van MARRACK (l.c.) kan deze verschijnselen niet zoo eenvoudig verklaren.

Een interessant vraagstuk, dat nog maar weinig onderzocht is, is het mechanisme van de remming der precipitatie door haptenen. Deze remming is specifiek (voor een overzicht zie MARRACK, hoofdst. III). Daar het hapteen in structuur overeenkomt met de actieve groepen van het *antigeen*, ligt het voor de hand, dat het hapteen specifiek zal reageren met de actieve groepen van het *antilichaam*. Men denke zich het geval, dat hapteen is toegevoegd in een concentratie, die de precipitatie niet geheel verhindert, maar alleen vertraagt. Daarbij kan men zich voorstellen, dat een aantal antilichaam-groepen door het

hapteen ontoegankelijk wordt gemaakt voor de actieve groepen van het volwaardige antigeen. De gelijkwaardigheid van alle reactieve groepen van het antilichaam eischt dan echter, dat een dergelijke verdeling tusschen vrije en door hapteen bezette groepen statistisch is, zoodat in den loop van den tijd toch alle groepen voor het antigeen toegankelijk worden. Het systeem zal zich dus gedragen, alsof de activiteit, de werkings-sfeer, van elke antilichaam-groep verkleind is. Daaruit zou volgen, in het ontworpen beeld, een verandering van de optimale verhouding, naar *minder* antigeen.

Volgens een onderzoek van MARRACK (blz. 115—116) zou echter de optimale verhouding niet veranderen, hetgeen door MARRACK als een steun voor zijn theorie wordt beschouwd. Waar echter gebleken is, dat deze theorie niet in staat is, den electrolyt-invloed te verklaren en bovendien andere onderzoekingen over dit punt mij niet bekend zijn, moet een verklaring in elk geval worden uitgesteld totdat deze kwestie nader onderzocht is. Het systeem met paardenserum als antigeen leent zich daartoe natuurlijk niet.

Tenslotte is het mogelijk gebleken, van den invloed van electrolyten op de optimale verhouding (die alleen vanuit het gezichtspunt der complexvorming te begrijpen is) een practische toepassing te maken. HEIDELBERGER en KENDALL (16) slaagden er n.l. in, door behandeling van een specifiek precipitaat, uit anti-pneumococcenserum en specifiek koolhydraat, met geconcentreerde zoutoplossingen, afsplitsing van antilichaam te verkrijgen en op deze wijze antiserum te zuiveren. Zooals reeds eerder (blz. 27) vermeld, zijn de verschuivingen in dit systeem zeer groot. Het is echter in principe niet uitgesloten, ook andere sera, en antigenen, op deze wijze te zuiveren, waarbij de in het voorgaande behandelde techniek van onderzoek een waardevol hulpmiddel zal blijken.

B. De aard van de reageerende groepen.

Is dus een bevredigend inzicht in het mechanisme der precipitatie verkregen, geheel anders staat het met de kennis van de groepen, welker electrostatisch veld de specifieke attractie veroorzaakt. Voor zoover het het antigeen betreft, weet men, dat talloze verbindingen na substitutie in eiwit, b.v. via het diazoniumzout (LANDSTEINER), aan dat eiwit een eigen specifiek karakter geven (MARRACK, hfdst. III). Een sprekend

voorbeeld van de mate van specificiteit werd onlangs gevonden door GOEBEL (12), die aantoonde, dat het p-amino-phenol- α -glucoside immunologisch totaal verschillend is van het overeenkomstige glucuronide; beide verbindingen onderscheiden zich alleen door een CH_2OH - resp. een COOH -groep in de zijketen van den koolhydraat-zesring.

In het algemeen kan men zeggen, dat er twee factoren zijn, die het immunologisch gevolg van de invoering van een verbinding in het antigeen bepalen, nl. stereochemische eigenschappen (ringstructuur, plaats van substituenten) en de aard van de sterk polaire groepen (SO_3H , AsO_3H_2 , COOH). Het is dus de geheele verdeling van het elektrische veld in de „determinante” groep, die de specificiteit beheerscht (ERLENMEYER en BERGER, 11).

Van de natuurlijke antigenen weet men nagenoeg niets. Sterk verschillende „determinante” groepen zijn, althans bij de eiwitten, niet met zekerheid bekend, zoodat waarschijnlijk de configuratieve factoren het geheel zullen beheerschen. Misschien geeft de recente vondst, dat ook eiwitten steeds een klein percentage koolhydraat bevatten (SÖRENSEN, 25) een aanwijzing, in welke richting hier een oplossing mogelijk is.

Evenmin kent men de actieve groepen van het antilichaam. Ook hier neemt men aan (MARRACK, blz. 86, 104, 105), dat de specifieke reactiviteit tot stand komt door een voor elk geval karakteristieke verdeling van de polaire groepen op het oppervlak van het deeltje. Er zouden dus echte „actieve” plaatsen zijn (vgl. blz. 33). De electrolyt-invloed, zooals die in het voorgaande besproken is, bevestigt de grondgedachte, dat het electrostatische krachten zijn, die het gedrag bepalen. In enkele gevallen heeft men kunnen aantoonen, dat bepaalde groepen *niet* voor het antilichaam-karakter verantwoordelijk zijn. Een voorbeeld daarvan is het diphterie-antitoxine, verkregen door paarden met diphterie-toxine te immuniseeren. Indien het toxine gebonden heeft, reageert het ontstane aggregaat nog met precipiteerend serum tegen paardenserum; anderzijds kan het precipitaat van antitoxine en precipitine nog toxine binden (MARRACK, blz. 86). Voor het gedrag als antilichaam zijn dus andere groepen verantwoordelijk dan voor de eigenschappen als antigeen.

Natuurlijk heeft men ook getracht, het antiserum chemisch te veranderen. Helaas is het totnutoe niet gelukt, een behande-

ling te vinden, die de antilichaam-functies ongewijzigd laat. Het best onderzocht is de invloed van koppeling met diazoniumzouten door BREINL en HAUROWITZ (2) en onlangs door EAGLE, SMITH en VICKERS (10). Deze laatsten onderzochten van één serum, nl. antipneumococcon-serum, verschillende functies, zooals agglutinatie, precipitatie van specifiek koolhydraat, complementbinding, in afhankelijkheid van de mate van koppeling met diazoniumzout. Daarbij verdwijnen op den duur alle karakteristieke eigenschappen, echter in zeer verschillende mate. Het eerst de precipitatie, dan de agglutinatie enz. In hoeverre hier de aanwezigheid van meer dan één antilichaam een rol speelt, is nog de vraag. Men moet in elk geval quantitative gegevens (zône-studies, electrolyt-invloed) in de beschouwing betrekken. Dergelijke gegevens zijn nog niet bekend.

Op geheel andere wijze is het vraagstuk door ROSENHEIM (24) aangepakt. Zij bestudeerde den invloed van enzymatische afbraak (pepsine, trypsine) op de agglutininen in een anti-typhusserum. Daarbij komt de merkwaardigheid aan den dag, dat sera van dieren, die slechts één maal geïmmuniseerd zijn, zich anders gedragen dan sera, welke na een aantal immunisaties verkregen worden.

Bij herhaalde immunisatie wordt n.l. het z.g. H-agglutinine veel stabielier tegen genoemde enzymen; het O-agglutinine daarentegen ondergaat geen verandering. Men moet hier met ROSENHEIM aannemen, dat de karakteristieke groepeerings, die van globuline antilichaam maakt, zich bevindt aan den buitenkant van het deeltje, wat heel plausibel is. Afbraak door enzymen begint ook aan den buitenkant, en vernietigt dus al spoedig het agglutineerend vermogen van het deeltje. Indien echter in de daaronder liggende lagen dezelfde groepeerings voorkomt, zal het overgebleven, van zijn buitenste lagen ontdane, deeltje toch nog agglutineerend werken. Een dergelijke dieper in het deeltje doorgedrongen invloed van het antigeen zal reeds bij de synthese van het globuline werkzaam zijn geweest.

Waarom het verschijnsel bij het O-agglutinine niet optreedt, en of het ook bij andere systemen bestaat, deze vragen wachten op nader onderzoek. De in dit proefschrift beschreven onderzoekingsmethode zal ook een waardevol hulpmiddel kunnen zijn bij dergelijke onderzoekingen, die gericht zijn op de studie van den bouw van het antilichaam, en dus van eiwitten in het algemeen.

DEEL II: LYSOZYMWERKING.

A. HISTORISCH OVERZICHT.

I. - In 1922 ontdekte FLEMING (30) een stof, die in staat was, in korten tijd suspensies van bepaalde bacteriën geheel te doen ophelderen. Deze stof, door FLEMING „lysozym” genoemd, bleek in het dierlijk organisme zeer verbreid voor te komen.

Bij de wisselwerking tusschen bacterie en lysozym doen zich een aantal vragen voor, nl.:

a) Wat is lysozym, chemisch en biologisch, welke betekenis heeft het voor het dierlijk organisme?

b) Welke bacteriën worden door lysozym opgelost, gedood of in hun groei belemmerd? (dit hangt dus nauw samen met het onder a genoemde).

c) Van welken aard is de wisselwerking tusschen bacterie en lysozym?

d) Welke zijn de factoren, die op deze wisselwerking invloed hebben?

Het hier te bespreken onderzoek bepaalt zich in hoofdzaak tot vraag c en d; een beknopt overzicht over de op de punten a en b betrekking hebbende litteratuur moge daaraan voorafgaan.

II. *Het lysozym.*

Een onderzoek naar de chemische eigenschappen van het lysozym dient door een reiniging te worden voorafgegaan. WOLFF (45) heeft dat het eerste geprobeerd. Als uitgangsmateriaal gebruikte hy kippeneiwit, dat het hoogste gehalte aan lysozym heeft. Door precipitatie met colloïdaal ijzerhydroxyde kon hij een groot deel van het eiwit verwijderen. Indampen, dialyse, herhaling van de behandeling met ijzerhydroxyde, en precipitatie met alcohol leverden tenslotte een vermoedelijk nog niet geheel zuiver preparaat, waarvan enkele tienden milligrammen even werkzaam waren als 1 cc. eiwit.

Eerst kort geleden beschreven MEYER en medewerkers (38) een andere methode. Eiwit wordt met ijskoude aceton behan-

deld. Het verkregen neerslag wordt gedroogd, en met alcoholisch azijnzuur geëxtraheerd. Na een precipitatie met alcohol, en weer oplossen volgt als geheel nieuwe stap een precipitatie met flaviaan-zuur. Zij krijgen zoo preparaten welke werkzaamheid vrijwel dezelfde is als van die van WOLFF.

Het is hier de plaats, om een protest te laten hooren tegen hun kritiek op de zuivering met ijzerhydroxyde: mij gelukte deze behandeling vrijwel steeds zonder verliezen van eenige beteekenis.

Over de eigenschappen van deze preparaten het volgende.

Volgens MEYER c.s. geeft het gezuiverde lysozym een aantal eiwitreacties en een positieve nitroprusside-reactie; de MOLISCH-reactie op reduceerende koolhydraten is, in overeenstemming met WOLFF, negatief, Broom in ijsazijn wordt ontcleurd. Opvallend is de groote bestendigheid tegen hitte, mits de oplossing zuur is. In alkalische oplossing wordt het lysozym snel geïnactiveerd. Door peroxyden, door J in KJ en door cupro-oxyde wordt het lysozym geïnactiveerd. Deze inactivering konden MEYER c.s. althans gedeeltelijk opheffen door zwavelwaterstof. Zij concludeeren daaruit, dat lysozym alleen in den gereduceerden vorm werkzaam is. Het reduceerend vermogen wordt door hen aan de aanwezigheid van sulfdrylgroepen toegeschreven.

Over de moleculaire grootte van lysozym is nog weinig bekend. GILDEMEISTER (33) toonde zeer elegant aan, dat het door cellophaan diffundeert, en dus kleinere deeltjes zou hebben dan de bacteriophag. Toch kan men een lysozym-oplossing uitstekend van zouten bevrijden door dialyse. Vermoedelijk is het zoo, dat er wel een geringe diffusie door het membraan plaats vindt; er is echter voor een zichtbaar effect op de bacteriën zoo weinig noodig, dat er toch practisch geen verliezen hoeven op te treden.

III. *Iets over de functie van het lysozym in het organisme.*

Hoewel het lysozym zeer verbreid voorkomt, wordt het slechts in traanvocht en in wit van eieren in groote concentratie gevonden. Dat het daar ook een beschuttende werking heeft, is alleszins waarschijnlijk. De groote houdbaarheid van eiwit is vermoedelijk aan het lysozym toe te schrijven. Ten aanzien van traanvocht is onze kennis nog iets uitgebreider. Het is nl. bekend, dat gebrek aan vitamine A, waarbij vaak

ooginfecties optreden, gepaard gaat met een geringer lysozym-gehalte van het traanvocht. Voor den mensch is dit door ANDERSEN (28) aangetoond; toediening van vitamine A aan de patiënten had een stijging van het lysozym-gehalte van het traanvocht tengevolge. Het verband tusschen vitamine A en lysozym ligt nog geheel in het duister.

De functie in het overige deel van het organisme is minder duidelijk. Dit bevat veel minder lysozym dan traanvocht. Het gehalte van de verschillende weefsels is ook niet gelijk. Een recent onderzoek daarover is b.v. dat van FLOREY (31), terwijl ook GILDEMEISTER (33) eenige resultaten meedeelt. Nu moet hierbij worden opgemerkt, dat de methode van extractie, éénmaal met physiologische zoutoplossing, zeker onvoldoende is, daar het lysozym sterk geadsorbeerd wordt. Bovendien is de adsorptie afhankelijk van de pH, en dan nog verschillend voor verschillende adsorbentia. Zoo adsorbeeren b.v. lecithine en kool sterker in alkalische oplossing dan in zure, terwijl het bij de adsorptie door de bacterie juist andersom is (zie hoofdstuk E). Het is dus zaak, de cijfers, die hierover bekend zijn, met het noodige voorbehoud te aanvaarden.

Verder is uit het geringe ter beschikking staande materiaal niet met zekerheid af te leiden, dat ook pathogene bacteriën van lysozym een doodende of groeiremmende werking onder vinden. Proeven van WOLFF (45) wijzen wel in deze richting, terwijl uit het werk van FRIEDBERGER en HODER (32) blijkt, dat sommige pathogene kiemen althans een invloed ondervinden van verdund eiwit. Het onderzoek van THOMPSON en KHORAZO (44) over het gedrag van een aantal staphylococcestammen onder invloed van lysozym schijnt erop te wijzen, dat juist de minst pathogene het sterkst door lysozym worden aangetast. Een oordeel over deze kwestie is dus bij den huidige stand van onze kennis nog geheel onmogelijk.

IV. De litteratuur, betrekking hebbend op de onder 3 en 4 genoemde vragen, zal niet apart behandeld, maar in den tekst besproken worden.

B. MATERIAAL EN METHODE.

I. Als lysozym-oplossing werd gebruikt òf verdund eiwit òf een preparaat, bereid volgens WOLFF (l.c.), waarbij echter de laatste phase achterwege gelaten was (preparaat CE1).

De gebruikte bacterie was een stam van *Micrococcus Lyso-*

deicticus, een door FLEMING (l.c.) geïsoleerde luchtbacterie, die zeer gevoelig is voor lysozym. Het bleek noodig, de bacteriën aan een voorbehandeling te onderwerpen, teneinde te voorkomen, dat de gevoeligheid voor lysozym in den loop van den dag veranderde. Dit kon bereikt worden door de bacteriën te doodden. Daardoor zet men vele omzettingen stop, m.a.w. de toestand wordt althans gedeeltelijk gefixeerd. Doode bacteriën lyseeren even goed als levende, mits het bacterie-eiwit niet gecoaguleerd is. Ongeschikt is b.v. het doodden door verhitting. Tenslotte werd als volgt te werk gegaan:

Een versche, hoogstens 24 uur oude agarcultuur wordt opgenomen in 4 cc. gedestilleerd water, waarna 1 cc. 5 % -phenol wordt toegevoegd. In deze 1 % -phenol-oplossing worden de bacteriën snel gedood. Na 1 uur worden de bacteriën gecentrifugeerd, en door eenige malen wasschen met aqua dest. en opnieuw centrifugeeren van phenol en bestanddeelen van den voedingsbodem bevrijd. Tenslotte wordt dan in weinig aqua dest. een dikke suspensie bereid, die verder voor het gebruik verdund kan worden.

Een mogelijke invloed van het gedestilleerde water op de doode cellen uit zich bij de lysis door lysozym niet. Een voordeel is bovendien, dat het suspenderen in aqua dest. zeer gemakkelijk gaat, terwijl tevens de mogelijkheid ontstaat, in geheel zoutvrije oplossing te werken (hoofdstuk E).

II. *Over de techniek van het lysozym-onderzoek.*

Alle in de litteratuur beschreven bepalingen van lysozym zijn verricht op de volgende wijze:

Van de te onderzoeken oplossing worden progressieve verdunningen gemaakt. Aan een gelijke hoeveelheid van elke verdunning wordt een eveneens gelijke hoeveelheid bacteriën toegevoegd, waarna het geheel een zekeren tijd (1—48 uur) bij een constante temperatuur bewaard wordt. Daarna gaat men na, hoever de lysis is voortgeschreden. Dit is het zwakke punt van deze techniek, wat het beste door een voorbeeld geïllustreerd kan worden (tabel 5):

T a b e l 5.

a) titratie van een geconcentreerde oplossing; aflezing na $\frac{1}{2}$ uur bij 56° C.

verdunning:	10	100	1000	10000	20000	50000	100000	200000	500000	Contrôle
resultaat:	+	+	+	+	+	±	± ⁽⁺⁾	±	—	—

b) titratie van een verdunde oplossing; aflezing na 1 uur bij 56° C.

verdunning:	1	2	4	8	16	32	64	128	Contrôle
resultaat:	+	+	$\begin{matrix} + \\ (\pm) \end{matrix}$	$\begin{matrix} + \\ - \end{matrix}$	$\begin{matrix} (\pm) \\ - \end{matrix}$	$\begin{matrix} (\pm) \\ - \end{matrix}$	-	-	-

Uit de zeer onscherpe grens tusschen totale lysis en afwezigheid van eenige lysis blijkt, dat het zeer moeilijk, zoo niet onmogelijk is, op deze wijze verschillen in lysozym-gehalte aan te toonen, indien zulke verschillen niet minstens 100 % bedragen. De oorzaak ligt voor de hand: de lysis is een geleidelijk verloopend proces, waarvan totale opheldering (+ in tabel 5) het eindstadium is. Maar dan spreekt het ook vanzelf, dat men in een reeks als hierboven beschreven ook verdunningen vindt, waarin de lysis weliswaar niet totaal is, maar waarin toch een duidelijke vermindering der troebeling is waar te nemen, en wel ook dit weer in verschillende mate. De onmogelijkheid, om met het bloote oog geringe verschillen in troebeling waar te nemen, beperkt dus de nauwkeurigheid van de methode.

III. Ik verwachtte gunstiger resultaten met een methode, waarbij het geheele verloop van de lysis quantitatief gevolgd kon worden. Het aangewezen instrument hiervoor is de extinctiometer.

Beide cuvetten van den Moll-extinctiometer worden gevuld met de verdunningsvloeistof (buffer, zoutoplossing, bouillon etc.), waarna de uitslag van den galvanometer met behulp van de compensatie-inrichting op 0 gebracht wordt. Nu wordt aan een der cuvetten zooveel van een dikke bacterie-suspensie toegevoegd, dat de uitslag een bepaalde waarde heeft. Indien men zorg draagt, alle omstandigheden constant te houden (zie inleiding), dan heeft men steeds evenveel bacteriën gesuspendeerd (zie ook blz. 44). Indien men nu een kleine hoeveelheid van de te onderzoeken lysozym-oplossing toevoegt, goed mengt en tegelijkertijd de stopwatch indrukt, dan kan men het geheele verloop van de lysis volgen aan den steeds afnemenden uitslag van den galvanometer.

Daarbij valt allereerst op, dat de reactie onmiddellijk begint, zelfs met zeer kleine hoeveelheden lysozym. Dat men op deze wijze kleinere hoeveelheden lysozym kan aantoonen dan met de oude techniek is een bijkomstigheid van meestal slechts geringe waarde. Belangrijker is, dat men nu een getallenmaat

heeft voor de snelheid, waarmee de bacteriën worden „opgelost”.

Een voorbeeld van een proef volgt hieronder (tabel 6). De tijd o is niet die, waarop het lysozym werd toegevoegd, maar die, waarop de uitslag een bepaalde, steeds dezelfde, waarde bereikte. Het voordeel daarvan is, dat op deze wijze de door de menging ontstane onregelmatigheden vermeden worden. Men gebruikt dus steeds hetzelfde punt van de lysis als nulpunt.

Het volledige protocol luidt:

Tabel 6.

pH 5.9
susp. phenol

gloeistroom voor: 3.70; na: 3.70
nulpunt galv.meter id: o ; na o
lysozymopl.: $0.241 - 0.136 = 0.105$ cc.

t	u	t	u
voor	86	240	$48\frac{1}{4}$
0	80	300	45
15"	74	360	$42\frac{1}{4}$
30	$70\frac{1}{4}$	420	40
45	$67\frac{1}{4}$	480	38
60	$64\frac{1}{2}$	540	$36\frac{1}{4}$
90	$60\frac{1}{4}$	600	$34\frac{1}{2}$
120	57		
150	$54\frac{1}{4}$		
180	$52\frac{1}{4}$		

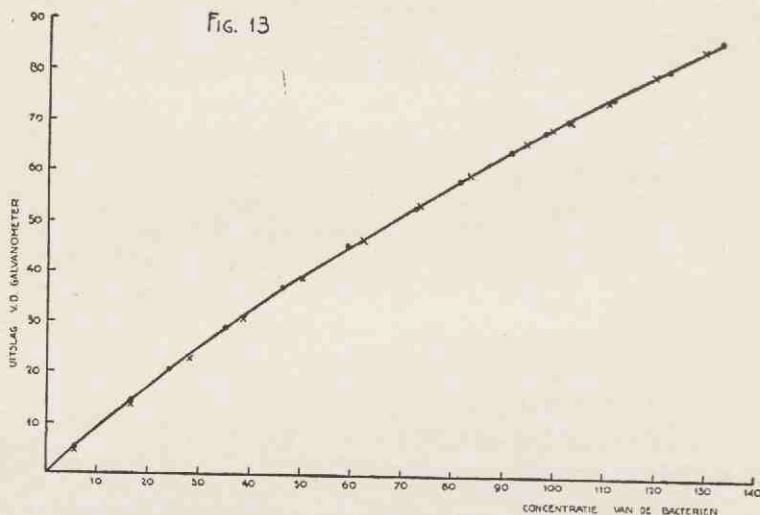
(t = tijd; u = galvanometeruitslag).

Deze cijfers eischen nauwelijks een nadere toelichting; u als functie van t is een gladde, regelmatig afnemende lijn, van het type, dat bij allerlei reacties gevonden wordt.

Ik heb verder getracht, een inzicht te krijgen in de reproduceerbaarheid van de metingen, en wel op de volgende wijze.

De meetcuvette wordt gevuld met de heldere verdunningsvloeistof, en de uitslag van den galvanometer op o gebracht. Dan wordt uit een microburet een geconcentreerde bacterie-suspensie toegevoegd en na elke toevoeging de stand van den galvanometer afgelezen. Men kent dan den bij elke (relatieve) bacterie-concentratie (uit de bekende volume-verhoudingen direct te berekenen) behoorenden galvanometeruitslag; deze

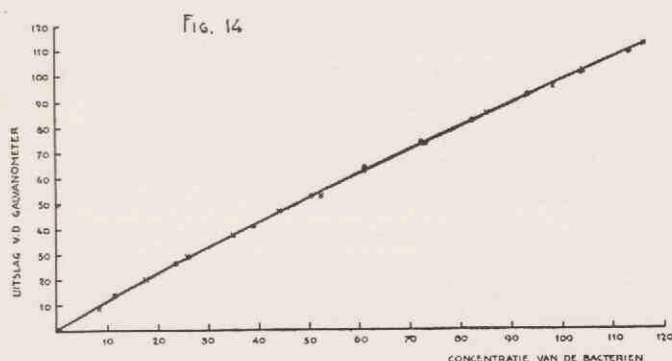
cijfers geven, in een grafiek uitgezet, een gladde lijn. Doet men nu een dergelijke serie aflezingen, uitgaande van een andere bacterie-suspensie met een andere concentratie, dan krijgt men weer een stel bij elkaar behorende waarden van u en c (concentratie). Om nu beide reeksen te kunnen vergelijken, bepaalt men, welke concentratie een bepaalden, willekeurigen, uitslag geeft, (b.v. 70), en deelt dan de concentratie-waarden in elke reeks door de bij die reeks behorende uitgangskoncentratie, waaraan de waarde 100 wordt toegekend. Beide series worden zoo op dezelfde, procentueele, schaal gebracht. Indien nu alle punten in één grafiek worden uitgezet, dan blijken ze op één kromme te liggen, wat zeker een voldoende bewijs voor de reproduceerbaarheid van de gemeten grootte, den uitslag van



den galvanometer, mag worden geacht. Ook de nauwkeurigheid blijkt gunstig te zijn: afwijkingen, grooter dan $\frac{1}{2}$ schaaldeel, komen niet voor; dit beteekent een nauwkeurigheid van ca. 1 %, voor niet al te kleine uitslagen (zie figuur 13).

Hier, zooals verder gedurende het onderzoek, werd de galvanometer niet op de volle gevoeligheid gebruikt, doch op ca. $\frac{1}{10}$ daarvan, met behulp van een shunt. Bij de volle gevoeligheid wordt het apparaat erg gevoelig voor stofjes en dergelijke verontreinigingen. Hoewel het niet noodig bleek, hier met deze groote gevoeligheid te werken, heb ik toch een dergelijke contrôle-proef uitgevoerd bij de volle gevoeligheid, waarvan de

resultaten in fig. 14 zijn samengevat. Hoewel de afwijkingen iets grooter zijn dan in fig. 13, zooals te verwachten was, is het resultaat toch nog zeer bevredigend, en het geeft dus een voldoende rechtvaardiging van het gebruik, dat bij enkele der in deel I beschreven proeven van deze groote gevoeligheid gemaakt is.



C. BEPALING VAN LYSOZYM.

Indien men nu de in tabel 6 neergelegde lysisproeven wil gebruiken voor de bepaling van het lysozym-gehalte van een onbekende oplossing, dan dient men het volgende te bedenken. De gemeten grootheid (uitslag van den galvanometer) is een functie van vele variabelen, waarvan men echter een aantal constant kan houden. Voor zoover het het toestel zelf betreft, is dit reeds in de inleiding behandeld. De hoeveelheid toegevoegde bacteriën kan constant gehouden worden door steeds zooveel toe te voegen, dat een bepaalde uitslag bereikt is. De temperatuur kan als variabele worden uitgeschakeld: de schommelingen in de kamertemperatuur waren steeds zeer gering (N.B. voor metingen bij hogere temperaturen kan deze methode ook gebruikt worden; zie in deel I de proeven over toxine-antitoxine-vlokking).

De overige variabelen in de proef oefenen hun invloed op het eindresultaat, den galvanometer-uitslag, uit via het lysisproces. Het zijn allereerst de lysozym-concentratie, verder alle denkbare veranderingen in de reactie-vloeistof, samen te vatten als uitwendige variabelen.

De samenstelling van de vloeistof heeft men geheel in de hand, daar zoowel bacteriën als lysozym in gedestilleerd water

zijn gesuspendeerd, resp. opgelost. (Hier komt al naar voren, dat men ook den invloed van de samenstelling van de vloeistof op deze wijze zal kunnen bestudeeren; zie hoofdstuk E.) Bij de bepaling van lysozym houdt men dus ook deze constant.

Er blijven dan als variabelen alleen over de tijd t , en de concentratie van het lysozym, c . Men kan dus schrijven:

$$f(c, t, u) = 0.$$

Het is duidelijk, dat deze onbekende functie niet gebruikt kan worden om c te bepalen. Iets verder komt men, door nòg een der variabelen constant te houden, nl. u of t , m.a.w. door

$$f(c, u)_t = 0 \quad \text{of} \quad f(c, t)_u = 0$$

te bepalen. Daarvoor is een aantal metingen noodig.

Beide functies worden voorgesteld door kromme lijnen, die dus experimenteel te bepalen zijn. Ik heb steeds $f(c, u)_t = 0$ bepaald door enkele punten te meten met bekende concentraties lysozym, c . De hiervoor noodige 4—5 punten kunnen in ruim 1 uur bepaald worden, zoodat het tijdverlies geen al te groote rol speelt. Ik deed dit elken keer opnieuw, en gebruikte de zoo verkregen ijkkromme slechts één dag.

Indien men daarna de lysis meet met een oplossing van onbekende concentratie, dan kan men daarvoor ook een waarde van u bepalen; door interpolatie in de ijkkromme vindt men dan direct de waarde van c . Men bepaalt dus eigenlijk de concentratieverhouding van een bekende en een onbekende oplossing. Een voorbeeld geeft tabel 7.

T a b e l 7.

a. lysozymoplossing, bevattend 3.18 mg. preparaat CEI in 100 cc.

toegevoegd lys.-opl.	waarden van $u_0 - u_t$		
	$t = 60''$	$120''$	$240''$
0.108 cc.	11.5	17.5	26
0.216	18.5	27	$37\frac{1}{4}$
0.165	15	23	32.5

b. eiwit-oplossing, verdund 1 : 100

toegevoegd:	$t = 60''$		
	$60''$	$120''$	$240''$
1) 0.079 cc.	$17\frac{3}{4}$	$26\frac{1}{4}$	$36\frac{1}{4}$
2) 0.056	$13\frac{3}{4}$	$21\frac{1}{4}$	30.5
3) 0.048	$12\frac{3}{4}$	20	$28\frac{3}{4}$

Uit deze gegevens is door interpolatie te berekenen, met hoe-

veel cc. van de eerste oplossing de betreffende hoeveelheid eiwit correspondeert, nl.:

				gem.
1)	0.206	0.202	0.200	0.203
2)	0.148	0.150	0.150	0.149
3)	0.132	0.132	0.130	0.131

Tenslotte kan nu het quotient bepaald worden van de berekende hoeveelheid standaardoplossing en de toegevoegde hoeveelheid eiwitoplossing:

$$\begin{aligned} 0.203 : 0.079 &= 2.57 \\ 0.149 : 0.056 &= 2.60 \\ 0.132 : 0.048 &= 2.73 \\ \text{gemiddeld} &2.63 \end{aligned}$$

d.w.z. 1 cc. eiwit 1 : 100 bevat evenveel lysozym als 2.63 cc. van de oplossing van het preparaat, en dus bevat 1 cc. onverdund eiwit evenveel lysozym als $2.63 \times 3.18 = 8,3$ mg. van het droge preparaat.

Hierover valt het volgende op te merken:

De nauwkeurigheid van de bepaling is alleszins bevredigend, de fout in één bepaling is hier kleiner dan 5 %. Indien men over een grooter traject van de ijkkromme werkt, zal de fout wel iets groter worden. Voor routine-bepalingen kan men op een fout van ca. 10 % rekenen, wat altijd nog 10 \times zoo nauwkeurig is als de verdunningsmethode, en voor het verdere onderzoek zeker voldoende.

Verder leert deze tabel, dat het geen verschil maakt in het type van de $f(t, u)_e$ -kromme, of men met verdund eiwit of met gezuiverd (niet: zuiver) lysozym werkt; immers in dat geval zou de interpolatie op verschillende tydstippen tot verschillende resultaten moeten leiden, wat niet het geval is. En niet alleen kwalitatief stoort het eiwit niet, ook kwantitatief is een invloed niet aan te toonen, daar dan de verschillende concentraties een verschillend resultaat moesten geven, wat blijkbaar, binnen de foutengrenzen, ook niet het geval is. Ik heb daarin een motief gevonden om het verdere onderzoek met het preparaat CE₁ te verrichten, en de omslachtige verdere reiniging achterwege te laten.

Temeer meende ik dit veilig te kunnen doen op grond van de volgende overweging: in elke proef werd een hoeveelheid van hoogstens 0.25 cc. lysozymoplossing gebruikt. Deze be-

vatten $0.25 \times 0.01 \times 3.18 = 0.008$ mg. vaste stof. De in de proef gebruikte hoeveelheid bacteriën nu is van dien aard, dat er tijdens de lysis zeker een veelvoud hiervan aan vreemde organische stoffen in de oplossing terecht komt, zoodat een algeheele reiniging toch hoogstens een geringen invloed zou kunnen hebben.

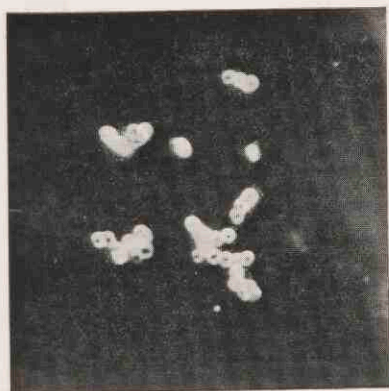
Boven werd reeds aangestipt, dat men op analoge wijze ook den invloed van uitwendige variabelen kan bestudeeren. Men moet dan de lysozymconcentratie c constant houden (eventueel een correctie aanbrengen voor kleine verschillen). Als men de uitwendige variabele a noemt, kan men weer een functie $f(u, a)_t$, $c=0$ bepalen, die den invloed van a weergeeft (zie hoofdstuk E).

D. MORPHOLOGIE VAN HET LYSISPROCES.

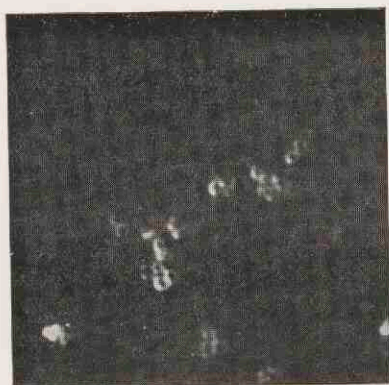
De morphologie van het proces is nog maar weinig bestudeerd. Bij FLEMING (30) vindt men eenige foto's van preparaten, waaruit zou zijn af te leiden, dat de coccen zeer onregelmatige vormveranderingen ondergaan, waarbij de kleurbaarheid afneemt, zoodat men tenslotte niets meer ziet. FLEMING gebruikte daarbij een soort kapselkleuring, die een tamelijk diepen ingreep in de cel vereischt. Door latere onderzoekers (KIGASAWA, 37; SUZUKI, 43) is een zwelling van de cellen in het begin der lysis gevonden.

Ik onderzocht allereerst de lysis met donkerveldbelichting door een cardioïd-condensor. De bedoeling is duidelijk: op deze wijze vindt men het microscopisch equivalent van de extinctiemetingen. Het resultaat was het volgende:

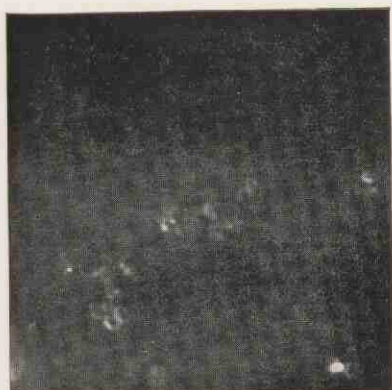
De intacte coccen zijn op den donkeren achtergrond zichtbaar als lichte „ringetjes”. Als nu lysozym wordt toegevoegd (waarvoor natuurlijk een ander preparaat gemaakt moet worden) verandert er eigenlijk niets. Alleen ziet men de helderheid der „ringetjes” geleidelijk afnemen, en wel sneller naarmate meer lysozym was toegevoegd. Dit klopt dus goed: een verminderde lichtverstrooiing gaat samen met een geringere extinctie. Het verrassende echter was, dat het niet mogelijk bleek, zoolang te wachten, dat het beeld geheel verdwenen zou zijn. Steeds bleven zeer flauw de lichtcirkels zichtbaar. Een aantal stadia uit dit proces geeft plaat 1, foto's 1—4; de verschillen zijn in werkelijkheid nog grooter, terwijl van de minst heldere stadia geen bruikbare foto's te maken waren;



1.



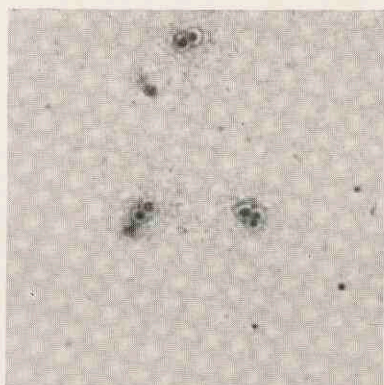
2.



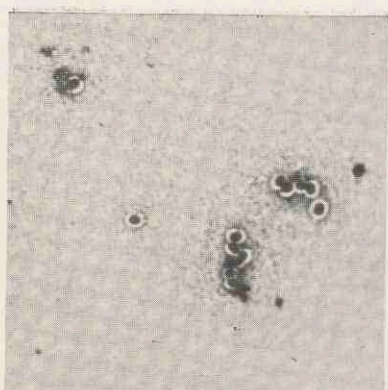
3.



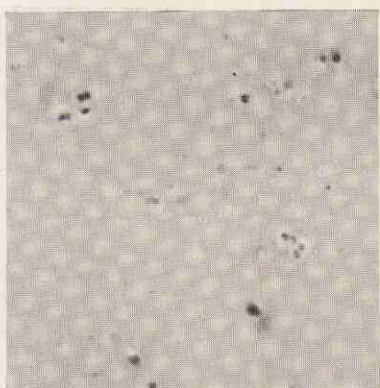
4.



5.



6.



7.



8.

het oog presteert hier meer dan de camera. Opvallend is ook, dat van een zwelling niets te merken is: de grootte van den lichtcirkel verandert tydens de lysis niet merkbaar (de vergroo-ting is in alle foto's gelijk).

Men wordt hier geleid tot de conclusie, dat bij de lysis een zekere wandstructuur blijft bestaan. Ik heb getracht, deze conclusie te bevestigen door Oost-Indische-inkt-preparaten te maken in verschillende stadia der lysis. Later is de Oost-Indische inkt vervangen door serum, waarin 10 % eosine is opgelost (HOWIE en KIRKPATRICK, 36). Dit geeft een gelijkmatiger ondergrond. De bacteriën worden eerst met carbolfuchsine gekleurd, en daarna met een paar druppels eosine-serum uitgestreken. Foto's 5—8 geven het resultaat van een der vele series. De opnamen werden evenals bij de donkerveldbelich-ting gemaakt in groen licht. Dit doet de contrasten goed uitkomen, daar de fuchsine dan vrijwel zwart wordt.

Allereerst valt op, dat werkelijk de cellen niet verdwijnen: de laatste foto is gemaakt na totale opheldering van de suspensie. Wel is de met fuchsine kleurbare substantie uit de cel geheel verdwenen. In tegenstelling met hetgeen in donkerveld gevonden werd, zijn de cellen hier door de lysis duidelijk grooter geworden. Ik meen echter, daarin niet een zwelling te moeten zien, maar een zuiver mechanischen invloed: indien de coccen onder invloed van lysozym vervormbaar worden, zullen zij bij het uitstrijken platgedrukt worden, waardoor zij in het preparaat een tweemaal zoo groot oppervlak innemen. Daarentegen is het niet goed denkbaar, dat de cel zou opzwellen en toch in het donkerveld geen grooter beeld zou geven.

Een verdere bevestiging vond ik, door een groote hoeveelheid coccen tegelijk te laten lyseeren, b.v. een geheele agar-cultuur. Na verloop van tijd wordt gecentrifugeerd bij hoog toerental (14000). Het sediment blijkt nu hetzelfde volume te hebben als het sediment van de nog niet gelyseerde, intacte coccen. Het is, evenals dit laatste, geel gekleurd, terwijl de bovenstaande vloeistof geheel kleurloos is (mits de coccen vooraf grondig van aanhangende bouillon zijn bevrijd). De gele kleurstof wordt dus blijkbaar niet uit den wand vrijgemaakt. Voor deze proef is echter noodig, dat de lysis niet totaal is, wat bereikt werd door de vloeistof een pH van ca. 6 te geven (zie hoofdstuk E). Ik meen echter niet, dat in alkalischer oplossing de cellen wèl stuk gaan, (zie de preparaten boven),

maar dan wordt het verschil in dichtheid tusschen cel en vloeistof zoo gering, dat zelfs met de gebruikte snelloopende centrifuge geen scheiding meer te bereiken is.

Men moet zich dus voorstellen, dat er een zekere wandstructuur bestaat, die onder invloed van lysozym permeabel wordt voor den cel-inhoud. Hoe men zich deze werking kan denken komt nog ter sprake. Datgene, wat men als lysis waarneemt, is dus een diffusie van den cel-inhoud in de oplossing. Daardoor verandert de brekingsindex van de cel: deze wordt tenslotte vrijwel gelijk aan dien van de omringende vloeistof. En dat neemt men waar als opheldering, verminderde extinctie van de suspensie of geringere strooiing bij donkerveldbelichting.

Men kan zich nu denken, dat een dergelijk proces in eerste instantie slechts geringen invloed zal hebben op de functies van den *celinhoud*. Dit is inderdaad gevonden.

PENROSE en QUASTEL (41) onderzochten de enzymatische eigenschappen van *Microc. Lysodeicticus* vóór en na de lysis, waarbij het volgende aan den dag kwam. De echte enzymen („exo-enzymen”) worden door lysozym sterk geactiveerd, wat natuurlijk berust op een beter contact met het substraat. Onderzocht werden catalase, fumarase, urease, peroxydase en de reactie van STORCH met p-phenyleen-diamine.

Alleen de z.g. „dehydrogenase”, bepaald door de reductie van methyleenblauw, verdwijnt bijna geheel. Nu is het algemeen bekend, dat deze dehydrogenase-werking aan het intacte protoplasma is gebonden en daarvan niet dan met verlies van het grootste deel der werkzaamheid te scheiden is. Het is alleszins waarschijnlijk, dat na totale lysis het protoplasma inderdaad ernstig beschadigd is. Meer leert het onderzoek van HEWITT (35), die de redox-potentiaal van een *lyseerende* suspensie bepaalde. Hij neemt aan, dat deze potentiaal een maat is voor de activiteit van het protoplasma, voor de intensiteit van de stofwisseling; en wel zou een negatievere potentiaal een sterkere wisselwerking met het substraat beteekenen. Nu blijkt, dat bij toevoeging van lysozym de redox-potentiaal sterk daalt, om na het bereiken van een minimum weer te stijgen tot een hoogere waarde dan de oorspronkelijke, en wel nog vóór de lysis volledig is. De conclusie hieruit is, dat ook de protoplasma-werking onder invloed van lysozym aanvankelijk toeneemt, waarschijnlijk door een beter contact met het substraat, om echter nagenoeg te verdwijnen, als tijdens de

lysis het protoplasma zijn structuur verliest.

Ik meen in deze, reeds oudere, onderzoekingen, een bevestiging te mogen zien van het ontworpen beeld van het lysisproces. Ook de in hoofdstuk E te bespreken proeven zijn op dezen grondslag aanvaardbaar.

E. DE UITWENDIGE VARIABELEN IN HET LYSISPROCES.

I. De scheiding tusschen lysozym-werking en lysis, die in het vorige hoofdstuk is aangeduid, was reeds geruimen tijd bekend, n.l. sinds NAKAMURA (40) het z.g. alkali-phenomeen ontdekte. Als men lysozym en bacteriën samenbrengt in zure oplossing, dan vindt geen opheldering plaats. Wanneer men nu echter na verloop van tijd neutraliseert, dan heeft de lysis bijna momentaan plaats. HALLAUER (34) heeft het eerst van dit verschijnsel een correcte verklaring gegeven, n.l. dat het lysozym wel de bacterie aantast, maar dat de lysis niet optreedt doordat de inhoud van de cel onoplosbaar is in zuur. Immers deze wordt, na lysis, uit de oplossing weer door zuur neergeslagen (KIGASAWA 37). Hoewel deze laatste onderzoeker geen morphologische veranderingen kon waarnemen in zure oplossing, (hetgeen ik met de donkerveld-methode nog eens kon bevestigen) is er toch wel uiterlijk iets te zien. Hij vond, dat er een karakteristieke vlokking van de bacterie-suspensie optreedt, die duidelijk te onderscheiden is van de vlokking door zuur alleen. Ik kon ook dit geheel bevestigen. Hier blijkt dus weer, dat het lysozym speciaal de oppervlakte van de cel aantast. Het boven beschreven vlokkingverschijnsel vertoont groote analogie met de beschrijving die FRIEDBERGER en HODER (32) geven van vlokking door verdund kippen-eiwit van een aantal niet lyseerbare bacteriën. In hoeverre hier werkelijk een verband bestaat, zal een apart onderzoek moeten uitmaken. Tot zoover de litteratuur.

Het blijkt dus, dat de uitwendige omstandigheden een grooten invloed op het verloop van de lysis hebben. Blijkbaar is de pH een zeer belangrijke factor. Nu was mij bij proeven over de „zuurlysis”, nog met de oude techniek, opgevallen, dat deze sneller gaat dan de gewone, destijds nog in bouillon, met een pH ca. 7, uitgevoerd. (Zie tabel 8.)

T a b e l 8.

- a) met azijnzuur: na 30 min. bij 56° neutraliseeren met ammonia.
 log. verdunning: 1 2 3 4 5 6 7 contrôle
 + + + + $\frac{+}{(\pm)}$ $\frac{+}{\pm}$ $\frac{\pm}{-}$ —
- b) zonder azijnzuur: na 30 min. bij 56°.
 log. verdunning: 1 2 3 4 5 6 contrôle
 + + + $\frac{+}{\pm}$ $\frac{(\pm)}{-}$ — —

Hieruit blijkt dat het verschil inderdaad aanzienlijk is.

Ook bij HALLAUER (l.c.) zijn dergelijke gegevens te vinden; hij trekt er echter niet de voor de hand liggende conclusie uit, dat dit er op wijst, dat de reactie in zuur milieu sneller gaat dan in neutrale of zwak alkalische oplossing.

Zooals al in hoofdstuk III werd aangestipt, kan men den invloed van de pH gemakkelijk bestudeeren door in een serie metingen de pH als eenige variabele op te nemen, dus met constante hoeveelheden lysozym te werken. Ik neem als maat voor de lysozym-werking weer het verschil in galvanometer-uitslag van twee tijden. De oplossingen waren $\frac{1}{15}$ m. fosphaat-buffers, waarvan de pH-waarden met de chinhydron-electrode gecontroleerd werden. Ik kreeg zoo de volgende cijfers:

T a b e l 9.

pH	u(0) — u(5')
5.0	14.5
5.9	33
6.5	34
6.8	31
7.2	26
7.7	15

In fig. 15 zijn deze gegevens grafisch voorgesteld. Men leest eruit af, dat de werking van lysozym een maximum vertoont bij een pH ca. 6.2. Vergelijking met bovenstaande tabel 8 maakt het echter wel zeer waarschijnlijk, dat het maximum veroorzaakt wordt door de onoplosbaarheid van de celbestanddeelen in zure oplossing. Volgens SURANYI (42) begint de „remming” door zuur bij pH. 5.7, wat van 6.2 niet zooveel afwijkt, als men in aanmerking neemt, dat ook de verschillende bacterie-stammen hierin nog wel kunnen verschillen.

verdere lysis remmen. Ook de sterk verminderde lysis-snelheid in 2) kan, althans voor een deel, hieraan worden toegeschreven. Het is dus inderdaad noodzakelijk, om lysozym-bepalingen uit te voeren in oplossingen, waarin nog geen lysis heeft plaats gehad, m.a.w. adsorptie-metingen zijn alleen mogelijk in zure oplossing. Men moet dan na afcentrifugeeren van de bacteriën de vloeistof op de juiste pH brengen, en het niet geadsorbeerde lysozym bepalen.

Dergelijke proeven heb ik uitgevoerd om na te gaan, of er bij de werking van lysozym op de bacteriën zonder lysis soms lysozym verloren zou gaan. Daartoe bracht ik lysozym en een groote hoeveelheid coccen in zure oplossing samen en centrifugeerde na zekeren tijd; in de bovenstaande oplossing werd het lysozym, na neutraliseeren, op de gewone wijze bepaald. Tevens werden de bacteriën in aangezuurd gedestilleerd water opgeschud, en werd in het extract opnieuw lysozym bepaald, enz. enz. Daarbij teekene men aan, dat het niet gelukt, weer een behoorlijk homogene suspensie te krijgen. De verkregen cijfers geven dus maar een ruwe maat voor de adsorptie, omdat het oppervlak van de cellen niet steeds hetzelfde zal zijn. Ik kreeg het volgende resultaat (tabel 10):

Tabel 10.

Lysozym gehalte	Proef I	Proef II
Oorspronkelijke vloeistof na adsorptie	89	52
Extract nr 1	63	45
„ „ 2	69	29
„ „ 3	25	27
„ „ 4	20	63 a)
„ „ 5	2	20 a) in ammoniakale oplossing
Totaal	268	236
Oorspronkelijk toegevoegd	221	256

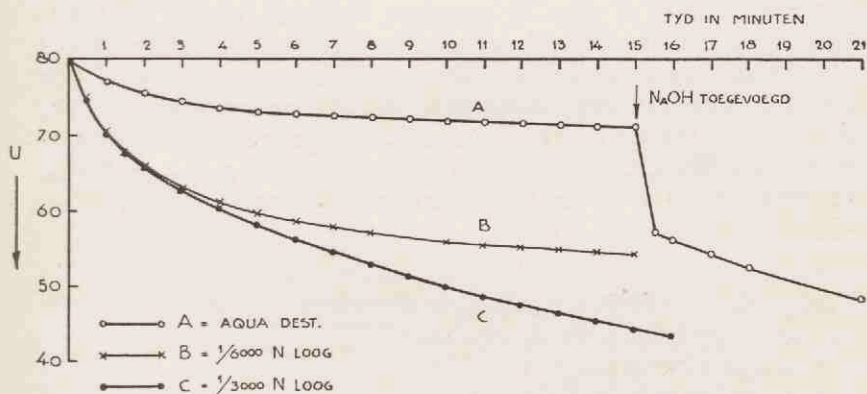
Gezien de geringe nauwkeurigheid, die deze bepalingen hebben (o.a. door het achteraf op de juiste pH brengen) is de overeenstemming tusschen toegevoegd en teruggevonden lysozym bevredigend te noemen. Dit leert ons dus, dat er bij de reactie practisch geen lysozym verloren gaat.

Speciale aandacht verdienen de cijfers gemerkt a). Hier werd

met alkalische oplossing geëxtraheerd, waarbij veel meer lysozym werd afgegeven (de mee opgeloste celbestanddeelen kunnen de werking van het aanwezige lysozym slechts verminderd hebben zie blz. 53), zoodat in werkelijkheid deze cijfers zeker nog hooger moeten zijn). Het blijkt dus, dat in zure oplossing de coccen veel meer lysozym adsorbeeren dan in alkalische oplossing, zoodat ik meen den pH-invloed op de lysis althans voor een groot deel op rekening van het verschil in adsorptie te kunnen schrijven.

Nadat van de bacteriën van proef I alle lysozym verwijderd is (zie laatste extractie) treedt toch met ammonia (in een concentratie, die niet met lysozym behandelde bacteriën niet

FIG. 16



aantast) nog onmiddellijk lysis op. De aanwezigheid van lysozym is dus voor het tot stand komen van het secundaire proces, de lysis, niet noodzakelijk.

III. In gedestilleerd water vindt door lysozym geen zichtbare lysis plaats. Toch is met den extinctionsmeter een, zij het geringe, afname van de troebeling waar te nemen (fig. 16, a, eerste deel van de kromme). Het bleek nu, dat bij toevoeging van NaOH in een eindconcentratie van $\frac{1}{3000}$ N. de lysis wel optrad (fig. 16, c). Met minder loog ($\frac{1}{6000}$ N.) begint de lysis met precies gelijke snelheid (de pH-verandering speelt hier blijkbaar geen rol meer), maar blijft na eenigen tijd achter (fig. 16, b).

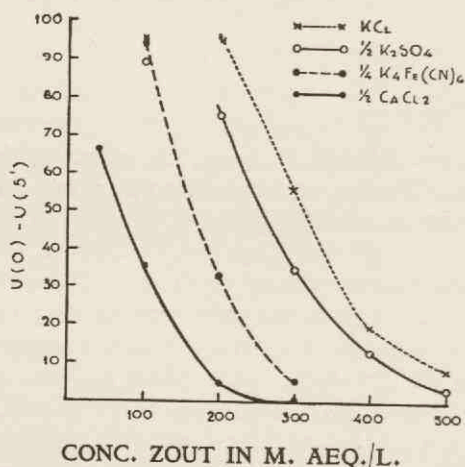
Het ligt voor de hand, aan te nemen, dat ook hier de te geringe oplosbaarheid van den celinhoud in de vloeistof de

lysis remt, en wel in gedestilleerd water vrijwel direct; met $\frac{1}{3000}$ N. loog is er wel een zekere oplosbaarheid, maar al spoedig raakt de oplossing verzadigd, zoodat de zichtbare lysis ook hier geremd wordt.

Dat echter het lysozym in gedestilleerd water wèl op de bacterie inwerkt, kon worden aangetoond door na eenigen tijd loog tot een concentratie van $\frac{1}{3000}$ N. toe te voegen. Daarbij daalt de troebeling plotseling, waarna verder de normale lysis-kromme gevolgd wordt (fig. 16, a, bij de pijl). Dit is dus volkomen analoog aan het alkali-phenomeen van NAKAMURA (zie blz. 51).

IV. De invloed van geconcentreerde zoutoplossingen op de lysis is nog onvoldoende onderzocht. Zeer hoge zoutconcentraties (8 % NaCl) remmen de lysis totaal (ANDERSEN, 29). Het is ondenkbaar, dat in dit geval de remming een gevolg zou zijn van onoplosbaarheid van den cel-inhoud (zie boven), zoodat men gedwongen is, aan te nemen, dat hier de primaire reactie niet plaats vindt. In overeenstemming daarmee vond ANDERSEN geen lysis na uitwassen met 8 % NaCl, en brengen op voor de lysis gunstige zout-concentratie.

FIG. 17



In verband met de in deel I verkregen resultaten was het van belang, ook hier een systematisch onderzoek in te stellen naar den invloed van de valentie der ionen. Daarbij kwam wederom voor den dag, dat de remmende werking, bij aequi-

valente concentratie, toeneemt met de valentie van het anion, dus $\text{Fe}(\text{CN})_6'''/4 > \text{SO}_4''/2 > \text{Cl}'$.

Voor de positieve ionen werd gevonden, dat $\text{Ca}^{++}/2$ sterker remt dan K^+ (zie figuur 17).

Aldus blijkt een analogie te bestaan tusschen precipitine-reacties en de werking van lysozym. Deze analogie vindt nog verderen steun in het feit, dat ook bij de lysis door lysozym een zône-effect optreedt (ANDERSEN, 29). Voor nadere studie van den electrolyt-invloed zouden dergelijke zône-effecten een fraai object vormen (vgl. deel I!). De maximale lysis-snelheid is echter zóó groot, dat van meting met den extintiometer, zooals in het voorgaande beschreven, geen kwestie kon zijn. Dit onderzoek zou weer een speciaal aan het probleem aangepaste techniek eischen.

F. CHEMISME VAN DE WERKING VAN LYSOZYM.

De vraag naar de chemische veranderingen bij de inwerking van lysozym op de bacterie valt in zekeren zin buiten het eigenlijke onderwerp van deze dissertatie, maar eischt toch een korte bespreking.

MEYER en medewerkers (39) vonden, dat lysozym uit mucoïden reduceerende suikers afsplitst; deze mucoïden isoleerden zij uit de bacteriën en ook uit kippeneiwit. Op grond daarvan concludeeren zij, dat ook in den bacterie-wand een afbraak van mucoïden plaats vindt, met als gevolg het permeabel worden van den wand, dus, onder geschikte omstandigheden, lysis.

Het lysozym zou dus een *enzym* zijn. Deze meening is reeds door vroegere onderzoekers uitgesproken, zonder dat dezen er in slaagden, een enzymatische werking vast te stellen. Het feit, dat bij de werking van lysozym op de bacterie geen lysozym verloren gaat (blz. 54), is een bevestiging van deze opvatting. MEYER c.s. (39) zijn er zelfs in geslaagd, uit de door hen gebruikte sarcinen lysozym (althans een lyseerend agens, dat MEYER c.s. als lysozym beschouwen) te isoleren! (Het zou dan een gewoon bestanddeel van de cel zijn?)

Nu is er één feit, dat tegen de enzymatische natuur van het lysozym pleit, nl. de groote thermostabiliteit. Immers de meeste enzymen worden bij 70°C . geïnactiveerd. Het is echter mogelijk, hier een compromis te vinden, en wel op de volgende wijze: de algemeen gangbare opvatting over enzymen

beschouwt het enzym als een complex systeem, bestaande uit een werkzame groep, en een colloïdalen drager. De combinatie van beide is voor de enzymwerking noodig. Het is nu zeer aannemelijk, dat de warmte-inactivering van enzymen een gevolg is van veranderingen van den colloïdalen drager. Immers de temperatuur van 70° is, wat betreft veranderingen in colloïdale systemen, heel gewoon (serum), daarentegen voor ontleding van organische verbindingen in het geheel niet. Het is duidelijk, dat denatureering van den colloïdalen drager inactivering van het enzym ten gevolge heeft. Het lysozym nu blijkt een colloïdalen drager van betrekkelijk kleine deeltjes-grootte te hebben (GILDEMEISTER, 33; zie blz. 39); daarmee kan heel goed een groote thermostabiliteit gepaard gaan.

In alkalische oplossing echter wordt het lysozym door warmte snel geïnactiveerd; dan gedraagt het zich als een gewoon enzym.

Een ander mogelijk bezwaar tegen de enzymatische natuur van het lysozym zou men kunnen vinden in de uitermate geringe concentraties, die nog werkzaam zijn. Dit bezwaar echter kan wel schijnbaar zijn: met een kleinen colloïdalen drager is het aantal actieve groepen per gewichtseenheid veel grooter dan met een grooten drager. Bovendien, de natuurproducten eiwit en traanvocht zijn zéér rijk aan lysozym, terwijl de werkzaamheid in groote verdunning beperkt is tot enkele bijzondere bacteriën: voor de lysis van de meeste lucht-cocci is veel meer lysozym noodig dan voor *Micr. Lyso-deicticus*.

Men kan dus, over het geheel genomen, niet zeggen, dat er principiële bezwaren zijn tegen de beschouwing van lysozym als een mucoïden-splitsend enzym. Daarbij valt aan te teekenen, dat dergelijke enzymen tevoren niet bekend waren (zie MEYER c.s., 39).

G. HET VERBAND TUSSCHEN SEROLOGISCHE EN ENZYMATISCHE PROCESSEN.

MARRACK (20) zegt op blz. 86: (over de antigeen-antilichaam-binding) „Specific combination must recall the combination of enzyme and substrate”

Het feit, dat electrolyten bij een enzymreactie (de lysis door lysozym) een analogen invloed hebben (zie blz. 57) als bij

een serologische reactie (zie deel I, blz. 20 e.v.) geeft een aanwijzing in deze richting.

De invloed van electrolyten op enzymatische processen is herhaaldelijk bestudeerd; meestal echter is een vergelijking met de hier verkregen gegevens niet mogelijk. Ik wil slechts wijzen op het onderzoek van MYRBACK (39a), over den invloed van zouten op de splitsing van zetmeel door amylase. Het blijkt, dat de voor de reactie optimale pH door zout-toevoeging verandert, terwijl deze verandering weer afhankelijk is van het gebruikte zout. Ik kan op MYRBACK's interpretatie niet nader ingaan; alleen meen ik, erop te moeten wijzen, dat ook hier nog een terrein voor verder onderzoek ligt.

SUMMARY.

A. A precipitin-reaction, and
B. the bacteriolysis by lysozyme,
were studied by measuring the light-absorption with a Moll-extinctionmeter.

A. The time-absorption-curve shows an inflection-point, indicating a rather slow combination of antigen and antibody. The time of combination increases when the system is diluted. The *zône*-effect was shown to be a property of the primary reaction. It was discussed in some detail in relation to experimental data on toxin-antitoxin-flocculation. A study of the influence of electrolytes led to the analogy of immune-precipitation and complex-coacervation. In a survey of the most important literature this analogy was discussed.

B. It was found possible to determine the lysozyme-content of a solution within 5 %, whereas the usual technique allows errors up to 100 %.

The morphological details of the lysis were studied.

The influence of pH and salts was discussed. Again, as in the precipitin-reaction, the valency of the ions present was important.

The similarity of the influence of electrolytes on both processes studied, combined with some arguments, favouring the opinion that lysozyme is an enzyme, affords a connection between serological and enzymatic processes, which seems worth of further investigation.

BIBLIOGRAFIE.

DEEL I.

1. Bier, C. R. Soc. Biol. 108, 511 (1931).
2. Breinl & Haurowitz, Z. Imm.forsch. 77, 176 (1932).
3. Brown, Brit. J. Exp. Path. 16, 554 (1935).
4. Bungenberg de Jong, o.a. Protoplasma 15, 110 (1932).
verder Bungenberg de Jong & Dekker, Kolloid-Beihefte, 43, 143 (1935), 43, 213 (1936) en talrijke artikelen in Bioch. Z., Kolloid-Z., etc.
5. Bungenberg de Jong & Youkovsky, C. R. Soc. Biol. 123, 149 (1936).
6. Dean & Webb, J. Path. Bact. 29, 473 (1926).
7. Downs & Gottlieb, J. Inf. Diseases 51, 460 (1932).
8. Duncan, Brit. J. Exp. Path. 13, 498 (1932).
- 8a. Duncan, Brit. J. Exp. Path. 18, 108 (1937).
9. Eagle, J. Immunology 18, 393 (1930).
10. Eagle, Smith & Vickers, J. Exp. Med. 63, 617 (1936).
11. Erlenmeyer & Berger, Bioch. Z. 255, 429 (1932).
id. id. 262, 196 (1933).
12. Goebel, J. Exp. Med. 64, 29 (1936).
13. Gribnau, Diss. Utrecht (1935).
14. Heidelberger & Kendall, J. Exp. Med. 61, 559 (1935), 61, 563 (1935), 62, 467 (1935), 62, 697 (1935).
15. Heidelberger & Kendall, J. Exp. Med. 63, 819 (1936).
16. Heidelberger & Kendall, J. Exp. Med. 64, 161 (1936).
17. Heidelberger & Pedersen, J. Exp. Med. 65, 393 (1937).
18. Haurowitz, Z. Physiol. Chem. 245, 23 (1936).
19. Northrop & De Kruyf, J. Gen. Physiol. 4, 639 (1921), 4, 655 (1922).
20. Marrack, The Chemistry of Antigens and Antibodies, Med. Res. Council, Special Report Series, 194, (1934).
21. Neisser & Wechsberg, Münch. Med. Wochenschr. 48, 697 (1901).
22. Ostwald, Kolloid-Z. 47, 258 (1929), 47, 357 (1929).
23. Ramon, C. R. Soc. Biol. 86, 813 (1922).
24. Rosenheim, Bioch. Journ. 31, 54 (1937).
25. Sörensen & Haugaard, Bioch. Z. 260, 247, (1933).

- Sörensen, *Bioch. Z.* **269**, 271 (1934).
 25a. Taylor, *J. Hygiene* **33**, 12 (1933).
 26. Topley, Wilson & Duncan, *Brit. J. Exp. Path.* **16**, 116 (1935).
 27. Wannow, *Kolloid-Z.* **77**, 46 (1936).

DEEL II.

28. Andersen, *Acta Paediatrica* **14**, 81 (1932).
 29. Andersen, *Z. Imm. Forsch.* **60**, 90 (1931).
 30. Fleming & Allison, *Brit. J. Exp. Path.* **3**, 252 (1922).
 31. Florey, *Brit. J. Exp. Path.* **11**, 251 (1930).
 32. Friedberger & Hoder, *Z. Imm. forsch.* **74**, 429 (1932).
 33. Gildemeister, *Zentralbl. Bakt. I, Or.* **136**, 408 (1936).
 34. Hallauer, *Zentralbl. Bakt. I, Or.* **114**, 519 (1929).
 35. Hewitt, *Bioch. Journ.* **25**, 1452 (1931).
 36. Howie & Kirkpatrick, *J. Path. Bact.* **39**, 165 (1934).
 37. Kigasawa, *Z. Imm. forsch.* **54**, 155 (1928).
 38. Meyer, Thompson, Palmer & Khorazo, *J. Biol. Chem.* **113**, 303 (1936).
 39. id. id. id. id. *J. Biol. Chem.* **113**, 479 (1936).
 39a. Myrbäck, *Z. f. physiol. Ch.* **159**, 1 (1926).
 40. Nakamura, *Z. Imm. forsch.* **38**, 425 (1923).
 41. Penrose & Quastel, *Proc. Royal Soc. Lond. B* **107**, 168 (1931).
 42. Suranyi, *Z. Imm. forsch.* **49**, 166 (1927).
 43. Suzuki, geciteerd door Nakamura (40).
 44. Thompson & Khorazo, *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **33**, 299 (1935).
 45. Wolff, *Z. Imm. forsch.* **50**, 88 (1927), **54**, 188 (1927).

STELLINGEN.

I.

Het aardmagnetisme kan op eenvoudige wijze verklaard worden uit bekende eigenschappen van de materie.

Haalck, Z. f. Physik 105, 81 (1937).

II.

Complexcoacervatie is in beginsel ook mogelijk tusschen gelijk geladen solen.

III.

De opvattingen van Haurowitz over de colloïdale structuur van de eiwitten zijn onvoldoende experimenteel gefundeerd.

Haurowitz, Kolloid-Z. 77, 65 (1936).

IV.

Vergiftigingen door AsH_3 , SH_2 , SeO_2 en TeO_2 berusten, althans gedeeltelijk, op de vorming van de elementen As, S, Se en Te, in fijn verdeelden toestand.

Labes, Kolloid-Z. 79, 1 (1937).

V.

De beste methode om de biochemische zuurstof-behoefte (B.O.D.) van rioolwater te bepalen is die met behulp van den Barcroftmanometer.

Wooldridge & Standfort,

Biochem. J. 30, 132-163, 1542 (1936).

VI.

Het is weinig waarschijnlijk, dat bij de door Marker c.s. aangegeven synthese in redelijke opbrengst het oestron ontstaat.

Marker, Kamm, Oakwood & Laucius,
J. Am. Chem. Soc. 58, 1503 (1936).

Windaus & Deppe, Ber. 70, 76 (1937).

VII.

Voor het nauwkeurig stellen van Kaliumpermanganaatoplossingen verdienen kaliumjodide en arseentrioxiede als standaard de voorkeur boven natriumoxalaat.

Kolthoff, Laitiner & Lingane,
J. Am. Chem. Soc. 59, 429 (1937).

D
Utr
19