



Onderzoeken over de stofwisseling van 1(+) en d(-)-glutaminezuur in tumoren met behulp van deuterium als indicator

<https://hdl.handle.net/1874/360692>

A. g. v. 192, 1942

ONDERZOEKINGEN OVER DE STOFWISSELING VAN
l(+)- EN d(-)-GLUTAMINEZUUR IN TUMOREN MET
BEHULP VAN DEUTERIUM ALS INDICATOR

A. J. KLEIN

s.
cht

2

ONDERZOEKINGEN OVER DE STOFWISSELING VAN
l(+)- EN d(-)-GLUTAMINEZUUR IN TUMOREN
MET BEHULP VAN DEUTERIUM ALS INDICATOR

Diss. Utrecht 1942

ONDERZOEKINGEN OVER DE STOFWISSELING VAN
l(+)- EN d(-)-GLUTAMINEZUUR IN TUMOREN MET
BEHULP VAN DEUTERIUM ALS INDICATOR

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOC-
TOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN
DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP
GEZAG VAN DEN WAARNEMENDEN REC-
TOR MAGNIFICUS L. VAN VUUREN, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DE
SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BE-
DENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP
MAANDAG 20 APRIL 1942, DES NAMIDDAGS
TE 3 UUR

DOOR

ANTONIE JACOB KLEIN
GEBOREN TE HEERLEN

UNIVERSITEIT VAN ROTTERDAM
FACULTEIT DER RECHTEN
INSTITUUT VOOR DE RECHTEN VAN DE MENSCHEN

PROEFSTUK

DE RECHTEN VAN DE MENSCHEN
IN HET LICHT VAN DE
NEDERLANDSE GRONDWET
VAN 1953



U. RECHT

UNIVERSITEIT VAN ROTTERDAM

AAN MIJN OUDERS
AAN MIJN VROUW

De voltooiing van dit proefschrift biedt mij een welkome gelegenheid om U, Hoogleraren, oud-Hoogleraren en Lectoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, hartelijk dank te zeggen voor hetgeen Gij tot mijn wetenschappelijke opleiding hebt bijgedragen.

In het bijzonder dank ik U, Hooggeleerde K ö g l, Hooggeachte promotor, voor de voortdurende belangstelling welke Gij voor mijn werk hebt gehad en voor het assistentschap waartoe Gij mij hebt waardig geacht. Dat ik aan het onder Uw bezielende leiding staande kankeronderzoek heb mogen deelnemen, waardoor ik met problemen in aanraking kwam, die steeds mijn grootste interesse hebben gehad, is een eer, welke ik nimmer zal onderschatten.

U, Zeergeleerde E r x l e b e n en jullie, waarde v a n V e e r s e n en waarde K l a a r e n b e e k, dank ik voor de prettige samenwerking. De hulp, welke ik van jou, v a n V e e r s e n, mocht ontvangen, is voor mij van zeer groote waarde geweest.

Tenslotte dank ik mijn collega's, de laboranten en het gezamenlijk personeel van het Organisch Chemisch Laboratorium voor de in velerlei opzichten verleende medewerking.

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Gezien de groote beteekenis van het kankervraagstuk is het vanzelfsprekend, dat sedert geruime tijd niet alleen de medische wetenschap, maar ook de biologie en de scheikunde hebben getracht iets ter opheldering van de problemen bij te dragen. Hetgeen de biologie en wel in het bijzonder de genetische richting heeft bereikt, moet hier uiteraard buiten beschouwing blijven. Het chemisch onderzoek strekte zich in drie richtingen uit. Als eerste hiervan noemen wij de onderzoekingen naar de chemische bestanddeelen van de gezwellen, waarbij men van de onderstelling uitging, dat het biologisch zoo sterk afwijkende kankerweefsel in kwalitatief of kwantitatief opzicht zou moeten verschillen van het normale weefsel. Ondanks veelvuldige pogingen is het echter tot voor kort niet gelukt bij het doode weefsel, naast histologische verschillen, ook een chemisch onderscheid te constateeren.

Wel heeft O. Warburg¹⁾ — en hiermede komen wij aan de tweede richting van het onderzoek — in het jaar 1924 een belangrijk verschil bij de levende weefsels ontdekt ten opzichte van de glykolyse: „Charakteristisch für die Tumorzelle ist nicht die Gärung schlechthin, sondern die Gärung in Sauerstoff“. De beteekenis van deze ontdekking voor het tumorvraagstuk zelf werd echter veel kleiner, toen Warburg en zijn medewerkers vonden dat embryonale weefsels zich evenzoo gedragen. Een verklaring, waarom in het eene geval de zinlooze groei, bij de embryo echter hoogst doelmatige ontwikkeling optreedt, zal langs deze weg niet kunnen worden verwacht.

Een derde richting van chemisch onderzoek werd omstreeks tien jaar geleden door het werk van E. L. Kennaway en J. W. Cook ingeleid. Deze auteurs hebben als kankerverwekkend agens

1) O. Warburg, K. Posener en E. Negelein, *Biochem. Z.* 152, 309 (1924); vgl. O. Warburg, *Naturwissenschaften* 25, 1 (1927).

van de steenkolenteer benzopyreen kunnen indentificeeren. Sindsdien is nog een groot aantal andere kankerverwekkende verbindingen ontdekt. Verschillende van deze cancerogene stoffen en wel vooral het methylcholanthreen, een afbraakproduct van een galzuur (desoxycholzuur), deden de veronderstelling voor de hand liggen, dat dergelijke stoffen in het organisme door een anormale omzetting van een steroïde zouden kunnen ontstaan. Het methylcholanthreen is echter een product van het laboratorium en tot nu toe is het niet gelukt de hypothese van een anormale steroidstofwisseling in de tumoren, door de isoleering van een chemisch gedefinieerde cancerogene stof uit gezwellen, te bewijzen. Het lijkt niet onmogelijk dat dit op den duur zal gelukken, zoodat men op deze wijze iets over de prikkel te weten komt, welke in het organisme tot de vorming van een „spontaan tumor” leidt.

Behalve door kankerverwekkende stoffen kunnen ook door tal van andere uitwendige factoren gezwellen ontstaan. De vraag in hoeverre deze zeer verschillende factoren in het weefsel wellicht dezelfde storing veroorzaken, kon niet worden beantwoord, evenmin had men een verklaring voor het principieel verschillend biologisch gedrag van normale en tumorcellen.

Begin 1939 verscheen een publicatie van Kögl en Erxleben²⁾, welke ten aanzien van het kankervraagstuk geheel nieuwe gezichtspunten opende. Uitgaande van de ervaring dat bij hormonen, vitaminen, enz. de antipoden van deze stoffen vaak een andere activiteit vertoonen, met verder de ondervinding dat de proteïnen — voor zoover onderzocht — uitsluitend opgebouwd zijn uit α -aminozuren van dezelfde configuratie (1-reeks), zijn deze onderzoekers er toe overgegaan de hydrolysaten van tumorproteïnen te onderzoeken op het eventueel voorkomen van d-aminozuren.

Zij hydrolyseerden proteïnen afkomstig van verschillend materiaal en isoleerden hieruit een aantal als eiwitbouwsteenen bekende aminozuren. Van deze aminozuren werd, na reiniging door middel van herhaald omkristalliseeren of neerslaan, de specifieke draaiing bepaald.

2) F. Kögl en H. Erxleben, Z. physiol. Chem. 258, 57 (1939).

De resultaten van dit onderzoek kunnen zeer in het kort in de volgende drie punten worden samengevat:

1. Normaal weefsel leverde uitsluitend aminozuren van de natuurlijke (l-) configuratie.
2. Kwaadaardige gezwellen bevatten naast die van de natuurlijke configuratie ook bouwstenen van de onnatuurlijke (d-) configuratie m.a.w. de tumorproteïnen zijn partieel geracemiseerd.
3. In alle onderzochte gevallen was de racemisatiegraad van glutaminezuur het hoogst (tot 89 %).

Het spreekt vanzelf, dat die aminozuren waarvan bekend was, dat zij tengevolge van de proefomstandigheden gedurende de hydrolyse ten deele racemiseerden, al direct buiten beschouwing werden gelaten. Ook namen K ö g l en E r x l e b e n aan, dat een percentage d-vorm kleiner dan twee geen zeker bewijs vormde voor racemisatie, gezien de onnauwkeurigheden bij de bepaling van de optische activiteit.

De genoemde bevindingen hebben geleid tot het opstellen van een geheel nieuwe gezweltheorie door K ö g l. Hij ziet namelijk de diepere oorzaak van de kanker in de aan iedere groei ten grondslag liggende enzymatische eiwitsynthese en wel primair in de beschadiging van het proteolytische fermentsysteem: „es handelt sich darum, dasz die Krebszelle die Fähigkeit verloren hat, in ihr Struktureiweisz wie die normale Zelle ausschlieszlich die natürlichen Aminosäuren einzubauen". Door synthese van verkeerde proteïnen ontstaan dan de kankercellen.

De infiltratieve groei van een gezwel kan men zich zoo voorstellen, dat de normale cellen geen weerstand kunnen bieden aan het opdringen van de tumorcellen, daar zij de betreffende proteolytische fermenten, leidende tot een afbraak van de verkeerde tumorproteïnen, missen.

Ook op tal van andere punten van het kankervraagstuk werd door deze gezweltheorie een nieuw licht geworpen.

De publicatie van K ö g l en E r x l e b e n was in de afgelopen drie jaren het onderwerp van veel discussies en in tal van laboratoria het uitgangspunt voor nieuw experimenteel werk. Wel kunnen wij constateeren dat van medische zijde nauwelijks prin-

cipieele bezwaren tegen de nieuwe gezweltheorie konden worden ingebracht. In het algemeen was men het er over eens, dat de resultaten, indien zij konden worden bevestigd, voor het kankervraagstuk van de grootste betekenis zijn.

Natuurlijk rees er in de eerste plaats twijfel of men hier inderdaad met een voor gezwellen specifiek verschijnsel te doen heeft. Er werd aan de mogelijkheid gedacht dat de stereochemische afwijking slechts in de necrose optreedt en eventueel ook bij andere pathologische weefsels wordt gevonden. Kögl, Erxleben en Herken³⁾ konden echter al vrij spoedig mededeelen, dat bij Jensen-sarcomen en bij benzopyreentumoren de proteïnen van de necrose-arme randzônes en het necrotische centrum na hydrolyse practisch hetzelfde percentage d-glutaminezuur leveren. Bovendien konden noch bij niet-carcinomateuse necrose noch bij miliaartuberculose sterisch afwijkende bouwsteenen worden geïsoleerd.

De hoofdaanvallen tegen de nieuwe richting werden echter op het feit gebaseerd, dat in verschillende andere laboratoria de experimenteele uitkomsten van Kögl en Erxleben niet konden worden gereproduceerd. Wij willen er echter de nadruk op leggen, dat nadien Kögl en zijn medewerkers⁴⁾ aan een uitgebreid materiaal hun eerste vondsten ondubbelzinnig konden bevestigen. Overigens zal deze kwestie een belangrijk onderdeel vormen van de dissertatie van G. J. van Veen, zoodat wij op deze plaats hierop niet nader ingaan.

Nog uitgebreider dan de literatuur over al of niet geslaagde pogingen tot isolering van dl-glutaminezuur uit hydrolysaten van tumorproteïnen, werd die over het optreden van d-peptidasen in weefsels en lichaamsvloeistoffen. Tot 1939 werd in de enzymologie algemeen aangenomen, dat de proteolytische enzymen zeer specifiek zijn ingesteld op de polypeptiden, respectievelijk proteïnen, welke uit de gewone l-aminozuren zijn opgebouwd (E. Fischer,

3) F. Kögl, H. Erxleben en H. Herken, *Z. physiol. Chem.* 263, 107 (1940).

4) F. Kögl en H. Erxleben, *Z. physiol. Chem.* 261, 154 (1939); 264, 108, 198 (1940); F. Kögl, H. Erxleben en A. M. Akkerman, idem 261, 141 (1939); F. Kögl, H. Erxleben en H. Herken, idem 263, 107 (1940); 264, 220 (1940); H. Erxleben en H. Herken, idem 264, 240 (1940).

M. Bergmann, enz.). De meer intensieve studie van deze vraagstukken, welke door de nieuwe gezweltheorie van Kögl was uitgelokt, heeft in de laatste tijd getoond, dat eenvoudige peptiden, zooals d-leucylglycine of d-leucylglycylglycine ook door enzymextracten van normale weefsels kunnen worden gesplitst⁵⁾. Uiteraard zal een splitsing en ook een enzymatische synthese van een eenvoudig di- of tripeptide niet veel kunnen zeggen over het verloop van de processen, welke bij de afbraak of de opbouw van de proteïnen zelf de doorslag geven.

Dat er inderdaad bij de proteolyse van normaal weefsel en van tumoren principieele verschillen optreden, konden Kögl en Erxleben door de volgende proef aantonen:

Een hond werd gedurende vier dagen gevoed met gekookt weefsel van Brown-Pearc-gezwellen. Uit de faeces en urine werden peptiden geïsoleerd die respectievelijk 58 en 19 procent d(—)-glutaminezuur bleken te bevatten, terwijl de totale hoeveelheid peptide, respectievelijk glutaminezuur, in de urine tienmaal groter was dan bij het voeden van een gelijke hoeveelheid rundvleesch het geval was. Hiermede is aangetoond, dat in het darmkanaal in ieder geval proteïnen met d-bouwstenen veel moeilijker worden gesplitst dan normale eiwitten en bovendien dat de aanwezigheid van de verkeerde bouwstenen ook het drie- tot viervoudige aan normale glutaminezuurresten onttrekt aan de inwerking der enzymen van de spijsvertering.

Reeds in de eerste mededeeling van Kögl en Erxleben werd de aandacht gevestigd op essentiële fermenten, welke de desoriëntering van de groei veroorzaken en kennelijk „in den Zellstrukturen fest 'verankert' sind". Tot voor kort stond geen methode ter beschikking om over de actie van dergelijke onoplosbare proteïnasen van het weefsel iets te weten te komen. Nu zijn echter in de laatste jaren isotopen beschikbaar ook van die elementen, welke van belang zijn voor de organische chemie, waardoor voor de moderne biochemie geheel nieuwe wegen werden geopend.

5) Vgl. o.a. E. Bamann en O. Schimke, *Biochem. Z.* 310, 131 (1941); H. Herken, A. Schmitz en R. Merten, *Naturwissenschaften* 29, 670 (1941).

Onderzoekingen in deze richting werden vooral door Amerikaanse auteurs uitgevoerd. Hiervan moeten wij in verband met ons eigen werk in de eerste plaats de belangrijke publicaties van Schoenheimer en zijn medewerkers noemen. In twee series mededeelingen samengevat onder de titels „Deuterium as an indicator in the study of intermediary metabolism”⁶⁾ en „Studies in protein metabolism”⁷⁾ deden Schoenheimer, Rittenberg en hun medewerkers verslag van hun ervaringen en resultaten bij het gebruik van deuterium en ^{15}N als hulpmiddel bij onderzoekingen over de stofwisseling.

Uiteraard beperken wij ons ertoe van het uitgebreide materiaal slechts resultaten en ervaringen te vermelden, welke voor ons in verband met de eiwitstofwisseling onmiddellijk van betekenis zijn.

Volgens Schoenheimer en Rittenberg kan met behulp van deuterium als indicator op twee verschillende wijzen een onderzoek worden ingesteld naar bepaalde problemen die zich bij de stofwisseling voordoen.

1. Men kan de weg nagaan die een met isotopen gemerkt stofwisselingsproduct in het lichaam volgt, door het met het overige voedsel toe te dienen en na verloop van eenige tijd de overeenkomstige verbinding weer uit het lichaam te isoleren.

Een voorbeeld van deze werkwijze is de volgende door Schoenheimer, Ratner en Rittenberg uitgevoerde proef:

Vier ratten werden gedurende drie dagen op een dieet gehouden, dat naast de normale dieetbestanddelen een bepaalde hoeveelheid l(-)-leucine bevatte, dat met D en ^{15}N was gemerkt. Na deze drie dagen werden de dieren gedood en uit de weefsels werd l(-)-leucine geïsoleerd. Dit leucine werd vervolgens op het gehalte aan D en ^{15}N onderzocht. Afgezien van verschillende

6) R. Schoenheimer, D. Rittenberg en medewerkers, *J. Biol. Chem.* 111, 163, 169, 175, 183, 505 (1936); 114, 381 (1936); 117, 485 (1937); 120, 155, 503 (1937); 121, 235 (1937); 124, 159 (1938); 125, 1, 13, 23 (1938).

7) R. Schoenheimer, D. Rittenberg en medewerkers, *J. Biol. Chem.* 127, 285, 291, 301, 315, 319, 333, 385 (1939); 130, 703 (1939); 132, 227 (1940); 134, 653 (1940).

andere resultaten vonden de auteurs, dat het leucine geïsoleerd uit de levers van de proefdieren 0,44 atoomprocent deuterium bevatte. Daar het deuteriumgehalte van het leucine in het dieet oorspronkelijk 1,8 atoomprocent bedroeg, volgt hieruit dat minstens 24 procent van het leverleucine door leucine uit het dieet vervangen moest zijn.

Wij halen juist dit voorbeeld aan omdat het, zooals wij later zullen zien, ook in verband met de door ons uitgevoerde onderzoeken van groot belang is.

Schoenheimer en Rittenberg hebben er echter nadrukkelijk op gewezen dat voor deze en soortgelijke proeven aan twee voorwaarden moet zijn voldaan. In de eerste plaats moet het deuterium stabiel in de te onderzoeken stof zijn gebonden en in de tweede plaats mag de te onderzoeken verbinding op haar weg in het lichaam niet bij zoodanige reacties worden betrokken, dat het tengevolge daarvan deuterium verliest.

Op de vraag of de met isotopen gemerkte stoffen zich hetzelfde gedragen als de gewone stofwisselingsproducten en meer in het bijzonder of de physiologische werkzaamheid door de invoering van isotopen niet verandert, gaven de auteurs het volgende antwoord:

Het is bekend⁸⁾, dat water afkomstig uit verschillende dierlijke organen hetzelfde deuteriumgehalte bezit als vrij in de natuur voorkomend, niet aan eenig organisme gebonden, water. In beide komt namelijk op 5000 atomen H, 1 atoom D voor. Uit dit feit blijkt zonder meer dat het organisme niet in staat is onderscheid te maken tusschen moleculen, die alleen H-atomen bevatten en moleculen die daarnaast ook D-atomen bevatten. Immers wanneer dit wel het geval was, dan zou een concentreering of een verdunning van de isotoop in biologisch materiaal moeten zijn waargenomen, hetgeen nooit het geval was.

Schoenheimer heeft zelf verschillende physiologisch werkzame stoffen met deuterium gemerkt en ondanks een vaak hoog deuteriumgehalte (b.v. 11 atoomprocent) nooit iets van een

8) W. W. Steward en R. Holcomb, J. Am. Chem. Soc. 56, 1422 (1934); F. Breusch en E. Hofer, Klin. Woch. 13, 1815 (1934).

verschil in physiologische werkzaamheid ten opzichte van de niet gedeutereerde stoffen kunnen vinden.

Voor het verkrijgen van deze gedeutereerde verbindingen maakten de onderzoekers gebruik van de volgende reeds door andere auteurs toegepaste methoden:

- A. De verbinding werd in sterk zuur of alkalisch milieu met D_2O verhit, waarbij het gebruik van een katalysator zoals Pt of Pd vaak goede diensten bewijst.

Deze methode berust op een uitwisseling van, door de omstandigheden gelabiliseerde, H-atomen tegen D-atomen.

Dergelijke uitwisselingen van H tegen D verlopen bijvoorbeeld in $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$, enz. buitengewoon snel. Omgekeerd is echter precies hetzelfde het geval. Wanneer verbindingen met $-COOD$, $-OD$, $-ND_2$, enz. worden opgelost in H_2O vervangt protium oogenblikkelijk het deuterium.

Tegenover deze labiel aan zuurstof of stikstof gebonden D-atomen staan echter de aan koolstof gebonden deuterium-atomen, want deze zijn in het algemeen veel stabielere *).

- B. De gedeutereerde verbinding werd door synthese uit overeenkomstige bouwstenen en deuterium verkregen. Dergelijke reacties zijn bijvoorbeeld additie van D-atomen of D_2O aan dubbele bindingen.

2. Een tweede methode volgens welke men over het verloop van sommige biochemische reacties iets te weten kan komen, berust op de verhooging van het deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistoffen. Immers wanneer het lichaamsvocht van een dier meer zwaar water bevat dan normaliter daarin voorkomt, zal ook deuterium meer dan anders aan de chemische reacties deelnemen. Zodoende zal het in verhoogde mate in de organische stoffen terecht komen; Schoenhemer concludeert „the rate at which deuterium appears in a compound may therefore be taken as a measure of the rate at which this was formed”. Inderdaad is de opneming van deuterium bij dergelijke proeven moeilijk anders te verklaren, dan door nieuwe vorming van de betrokken stoffen aan

*) Zie hiertoe blz. 19, waar de stabiliteit van de C—D-binding in glutaminezuur wordt besproken.

te nemen. Op de vraag hoe de invoering van het deuterium in de betreffende stof tot stand komt, geeft deze methode natuurlijk geen antwoord.

Om de lichaamsvloeistoffen op een bepaald gehalte aan D_2O te brengen, gaven Schoenheimer en zijn medewerkers aan muizen water te drinken, dat 2,35 atoomprocent deuterium bevatte. Daar de cellen niet in staat zijn gedurende het proces van opneming en uitscheiding D_2O te concentreren (of te verdunnen), kan men verwachten, dat na een bepaalde tijd, wanneer evenwicht is bereikt, de concentratie aan deuterium van de lichaamsvloeistoffen een constante waarde zal bereiken, die kleiner is dan die van het gegeven drinkwater. Bij de verbranding van het voedsel ontstaat namelijk gewoon water, en dit zal, daar het voortdurend aan de lichaamsvloeistof wordt toegevoegd, een verdunning van het drinkwater ten gevolge hebben. Inderdaad bleek in het bovengenoemde experiment dat na zes dagen het deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistof een constante waarde had aangenomen van ongeveer 1,5 atoomprocent (na 3, 4, 5, 9 en 19 dagen waren de concentraties respectievelijk 1,21, 1,09, 1,43, 1,50 en 1,51 atoomprocent).

Voor quantitative stoffwisselingsonderzoekingen heeft de toediening van D_2O in het drinkwater het bezwaar, dat het deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistoffen slechts langzamerhand de maximale waarde bereikt. Om dit bezwaar te ondervangen werd bij de aanvang van de proef zooveel 98 procentig D_2O subcutaan ingespoten, dat het atoompercentage deuterium daarmee direct op een waarde van 1,5 werd gebracht. Dit percentage werd dan constant gehouden door het aan het drinkwater toegevoegde D_2O .

Barbour en Trace⁹⁾ vonden, dat hoge concentraties aan deuterium (20 procent) in de lichaamsvloeistof van muizen, de stoffwisselingsprocessen beïnvloeden en aanleiding geven tot vergiftigingsverschijnselen. Daarom heeft Schoenheimer bij zijn proeven de concentratie zoo laag mogelijk gehouden, opmerkende, dat bij een deuteriumgehalte van 1,5 atoomprocent abnor-

9) H. G. Barbour en J. Trace, J. Pharmacol. and Exp. Therap. 58, 460 (1936).

male verschijnselen noch verwacht kunnen worden, noch ooit gevonden zijn.

Voortbouwende op de onderzoekingen van Kögl en Erxleben en gebruik makende van de methodiek van Schoenheimer en zijn medewerkers hebben wij nu getracht een dieper inzicht te krijgen in het gedrag van de tumorcel ten opzichte van l- en d-glutaminezuur, door van beide de stofwisseling in tumoren na te gaan.

Daartoe hebben wij de volgende proeven uitgevoerd:

1. Gedeutereerd l-, d- en dl-glutaminezuur werd gevoerd aan ratten met benzopyreen-tumoren. Na afloop werd uit de tumorproteïnen l- en d-glutaminezuur geïsoleerd en op het deuteriumgehalte onderzocht.
2. Bij ratten met benzopyreen-tumoren en bij konijnen met Brown-Pearce-tumoren werd het lichaamsvocht op een bepaald gehalte aan deuteriumoxyde gebracht en gedurende eenige tijd hierop gehouden. Na afloop werd ook hier uit de tumorproteïnen l- en d-glutaminezuur geïsoleerd en op het deuteriumgehalte onderzocht.

Bovendien werd bij deze, zoowel als bij de onder 1 genoemde proeven, naast de tumor ook normaal weefsel, in de regel afkomstig van de lever, opgewerkt en van het geïsoleerde glutaminezuur eveneens het deuteriumgehalte bepaald.

De reden waarom wij juist van l- en d-glutaminezuur de stofwisseling onderzocht hebben en niet van een van de andere in tumorproteïnen partieel geracemiseerde aminozuren, is gelegen in het feit, dat juist voor glutaminezuur in alle onderzochte gevallen verreweg de hoogste racemisatiegraad werd gevonden.

HOOFDSTUK II

GEDEUTEREERD GLUTAMINEZUUR

1. De bepaling van het deuteriumgehalte

De deuteriumanalyses werden in ons laboratorium uitgevoerd door den heer G. J. van Veersen, die over de toegepaste methoden en de opgedane ervaringen in zijn eigen proefschrift uitvoerig mededeeling zal doen. Gaarne betuig ik hem ook op deze plaats voor de verleende medewerking mijn bijzondere dank. Volledigheidshalve moge hier de werkwijze in het kort worden vermeld. Voor literatuur verwijzen wij naar de nauwkeurige beschrijving welke Keston, Rittenberg en Schoenheimer¹⁰⁾ hebben gegeven.

De te onderzoeken deuteriumhoudende stof werd, onverdund of verdund met de overeenkomstige niet-gedeutereerde stof, in een zuurstofstroom verbrand en het verbrandingswater opgevangen. De verbranding zelf geschiedde in een voor $\pm \frac{2}{3}$ met staafjes koperoxyde gevulde buis van kwartsglas (lengte 75 cm). Nadat het opgevangen water door middel van een klein stukje toegevoegd koperdraad van het eventueel aanwezige chloor (uit de verbrande chloorhydraten) was bevrijd, werd het bij een druk van 1 mm kwik achtereenvolgens afgedestilleerd van a) bariumcarbonaat, b) chroomtrioxyde en c) kaliumpermanganaat + KOH. Tenslotte werd nogmaals, nu echter zonder een enkele toevoeging, bij dezelfde druk gedestilleerd.

Van het aldus verkregen mengsel van H₂O en D₂O bepaalden wij het D₂O-gehalte

1. volgens de methode van de vallende druppel, waarbij ortho-fluortoluol als valmedium diende,
2. met behulp van de interferometer, door gebruik te maken van het verschil in brekingsindex van H₂O en D₂O.

10) A. Keston, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 122, 227 (1937).

Beschikten wij over een voldoende hoeveelheid te analyseren stof, dan pasten wij in de regel beide methoden van onderzoek toe. Was dit niet het geval, dan werd aan de valmethode, als zijnde de zuinigste in het verbruik van verbrandingswater, de voorkeur gegeven.

In beide gevallen werd het te onderzoeken mengsel x vergeleken met van te voren ingewogen oplossingen van D_2O *) in H_2O . Door vergelijking van de valsnelheden en de interferometrische waarden van de bekende oplossingen met die van het onbekende mengsel, kon het D_2O -gehalte van dit laatste, en zodoende het deuteriumgehalte van de oorspronkelijke stof, worden bepaald.

Ter verduidelijking zullen wij voor de beide methoden, aan de hand van een enkel geval, de berekening van het deuteriumgehalte doorvoeren.

Stel wij vonden volgens de druppelmethode de volgende valtijden:

voor oplossing x	62,1 sec.
„ „ 3	66,5 „
„ „ 4	51,5 „

De gewichtspercentages D_2O van de ijkoplossingen waren:

oplossing 1	0,00 %	D_2O
„ 2	0,38 „	„
„ 3	0,76 „	„
„ 4	1,14 „	„
„ 5	1,53 „	„
„ 6	1,86 „	„
„ 7	2,28 „	„

Met deze eene serie ijkoplossingen kon ongeveer een jaar worden gewerkt. Daarna werden nieuwe oplossingen gemaakt. Men zal dan ook bij de bestu-

*) Het in dit proefschrift gebruikte zware water was afkomstig van de Norsk Hydro-Elektrisk Kvaelfstofaktieselskab en werd ons welwillend ter beschikking gesteld door de I. G. Farbenindustrie A. G. Werk Elberfeld. Het D_2O -gehalte van dit product was berekend met behulp van de waarde voor het specifieke gewicht van 100 procentig D_2O , waarvoor $d_{4}^{20} = 1,10541$ (zie Trans. Farad. Soc. XXXIV, 769 (1938)). Het bevatte 99,66 g/100 g D_2O ($d_{4}^{20} = 1,10505$).

deering van dit proefschrift zien dat een gedeelte van de deuteriumanalyses gedaan werd met de eerste, het andere gedeelte met de tweede serie.

Tweede serie ijkoplossingen:

oplossing	1a	0,00 %	D ₂ O
"	2a	0,37 "	"
"	3a	0,84 "	"
"	4a	1,20 "	"
"	5a	1,59 "	"
"	6a	1,94 "	"
"	7a	2,38 "	"
"	8a	2,79 "	"

Het verband tusschen gewichtspercentage D₂O en de valsnelheid ($= \frac{1}{\text{valtijd}}$) kan, tusschen de gewichtspercentages van twee opeenvolgende ijkoplossingen, worden aangenomen als te zijn rechtlijnig.

In ons geval mogen wij dan de eenvoudige betrekking opschrijven:

$$\left(\frac{1}{51,5} - \frac{1}{66,5} \right) : \left(\frac{1}{62,1} - \frac{1}{66,5} \right) = (1,14 - 0,76) : x'$$

waarin x' het gewichtspercentage D₂O is, dat wij bij het gewichtspercentage van oplossing 3 moeten optellen, om dat van het mengsel x te verkrijgen.

$$x' = 0,09$$

De oplossing bevat dus:

$$0,76 + 0,09 = 0,85 \% \text{ D}_2\text{O}$$

Stel dat wij verder vonden volgens de interferometrische methode de waarden:

voor oplossing x	173
" "	2 95
voor de nulstand	29

Het verband tusschen gewichtspercentage D₂O en de af te lezen interferometerwaarden is in het geheele gebied waarin we meten, dus van 0 tot 2,79 gewichtsprocent D₂O, rechtlijnig.

De betrekking die wij op kunnen schrijven wordt dan:

$$(173-29) : (95-29) = x : 0,38$$

waaruit volgt:

$$x = 0,83$$

Het mengsel x bevat dus 0,83 % D₂O.

Was deze oplossing x het verbrandingswater van een gedeute-reerde organische stof, b.v. glutaminezuur, dan werd uit het ge-wichtspercentage D₂O van het verbrandingswater met behulp van de volgende formule het atoompercentage deuterium van de ver-brande stof berekend:

$$\text{atoompercentage} = \frac{900 \times \text{gewichtspercentage}}{1000 - \text{gewichtspercentage}}$$

waarbij wij onder het atoompercentage deuterium van een verbind-ing verstaan de verhouding van het aantal in de stof voor-komende D-atomen tot het totale aantal H- en D-atomen. Dit begrip geeft dus aan, welk gedeelte van het oorspronkelijk in de stof voorkomende aantal H-atomen is vervangen door D-atomen.

Wat betreft de fout, die bij de analyse gemaakt werd, hebben wij ondervonden, dat deze voor de onverdund verbrande stof be-droeg 0,01 atoomprocent; verdunden wij de stof daarentegen voor de verbranding bijvoorbeeld vijfmaal, dan werd de fout vijfmaal grooter.

Tot slot vermelden wij, dat voor glutaminezuur in alle in dit proefschrift voorkomende gevallen, indien niet uitdrukkelijk anders vermeld, het opgegeven atoompercentage deuterium werd berekend voor het zoutzuurvrije glutaminezuur, ook dus wanneer het gluta-minezuur als het hydrochloride werd verbrand.

2. Gedeutereerd 1(+)- en d(—)-glutaminezuur

Daar het in onze bedoeling lag om bij de voedingsproeven met gedeutereerd glutaminezuur de beide optische antipoden afzonder-lijk toe te passen, zochten wij naar een geschikte methode om rechtstreeks optisch actief gedeutereerd glutaminezuur te bereiden.

Na eenige minder geslaagde pogingen om langs synthetische

weg, uitgaande van optisch actieve stoffen, deuterium in te voeren, meenden wij tenslotte het beste ons doel te kunnen bereiken door te trachten in een uitwisselingsreactie de waterstof van het glutaminezuur gedeeltelijk door deuterium te vervangen.

In ons geval, waar we uitgingen van optisch zuiver l(+)- en d(-)-glutaminezuur, dienden wij er dan speciaal op te letten de omstandigheden zoodanig te kiezen dat er geen, of zoo goed als geen, racemisatie kon optreden.

Wij werkten daartoe als volgt:

1 g $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ reduceerden wij in 8 cm^3 D_2O ($d_4^{20} = 1,10505$) met deuteriumgas*) tot platina en brachten daarna het geheele mengsel over in een dikwandige glazen buis (Cariusbuis). Vervolgens werden 6 g glutaminezuur en 6 cm^3 geconcentreerd zoutzuur (37%) toegevoegd, de Cariusbuis dichtgesmolten en negen dagen geschud bij 95°C . Het platina werd na afloop afgefiltreerd en de heldere, lichtgele oplossing in vacuum drooggedampt. De laatste bewerking herhaalden wij — om alle labiel gebonden deuterium te verwijderen — nog driemaal telkens met $\pm 30 \text{ cm}^3$ water, namen tenslotte het residu op in 50 cm^3 water en neutraliseerden deze oplossing met geconcentreerde ammonia op congopapier. Hierbij kristalliseerde het zoutzuurvrije glutaminezuur uit. Dit glutaminezuur zuiverden wij nog verder door op te lossen in 60 cm^3 heet water waarna 60 cm^3 warme alcohol werden toegevoegd. Na een nacht staan in de ijskast bedroeg het gewicht van de uitgekristalliseerde hoeveelheid in beide gevallen 5 g.

Voor de specifieke draaiing van het l(+)-glutaminezuur vonden we $+ 31^\circ,8$ (bepaald voor een 5 procentige oplossing in 9 procentig zoutzuur); voor die van het d(-)-glutaminezuur — $31^\circ,7$. De specifieke draaiingen van de uitgangproducten waren respectievelijk $+ 31^\circ,7$ en $- 31^\circ,6$. Een merkbare racemisatie had dus niet plaats gevonden.

De bepaling van het deuteriumgehalte gaf als uitkomst voor het l(+)-glutaminezuur $7,4 \pm 0,1$ atoomprocent D:

*) Het deuterium verkregen wij eenvoudig door electrolyse van het van de Norsk Hydro-Elektrisk Kvaelfabrikationselskab afkomstige D_2O ($d_4^{20} = 1,10505$). Vlg. D. Rittenberg en R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 111, 169 (1935).

0,1020 g gedeutereerd glutaminezuur verbrand met 0,9890 g niet-gedeutereerd glutaminezuur	
nulstand interferometer	= 28,5
waarde voor oplossing x	= 160,5
" " " 3	= 161
valtijd voor oplossing x	= 62,1 sec.
" " " 3	= 63,0 "

voor het d(—)-glutaminezuur $7,5 \pm 0,1$ atoomprocent D:

0,1027 g gedeutereerd glutaminezuur verbrand met 1,1010 g niet-gedeutereerd glutaminezuur	
nulstand interferometer	= 29
waarde voor oplossing x	= 161
" " " 2	= 95
valtijd voor oplossing x	= 62,5 sec.
" " " 3	= 63,6 "

Om de stabiliteit van de C—D-binding in het zoo verkregen glutaminezuur te onderzoeken, verhitten wij de stof met zoutzuur¹¹⁾.

0,200 g 1(+)-glutaminezuur, bevattende 7,0 atoomprocent deuterium, werd opgelost in 5 cm³ geconcentreerd zoutzuur en gedurende 12 uur tot juist koken in een oliebad verwarmd. Daarna dampten we de oplossing in vacuum droog en kristalliseerden het residu eenmaal om uit 20 procentig zoutzuur. Het deuteriumgehalte bleek na deze behandeling te zijn gedaald tot 3,9 atoomprocent, hetgeen overeenkomt met een verlies aan deuterium van 44 procent:

0,0962 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand met 0,2606 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x	= 53,7 sec.
" " " 4	= 51,3 "
" " " 3	= 65,5 "

Op blz. 19 komen wij op de oorzaak van dit verlies nader terug.

Het spreekt vanzelf dat wij, indien wenschelijk, met behulp van de beschreven methode ook in dl-glutaminezuur deuterium tot een overeenkomstig atoompercentage zouden kunnen invoeren. We hebben hiervan geen gebruik gemaakt, daar wij om tot dit doel

11) D. Rittenberg, A. Keston, R. Schoenheimer en G. L. Foster, J. Biol. Chem. 125, 1 (1938).

te geraken over een andere, en zooals we hierna zullen zien, in vele opzichten betere methode beschikten.

3. Gedeutereerd dl-glutaminezuur

Optisch inactief glutaminezuur met een hoog gehalte aan deuterium bereidden wij, uitgaande van α -ketoglutaarzuur, overeenkomstig de methode van Knoop¹²⁾ voor de synthese van gewoon glutaminezuur. Verder maakten wij gebruik van enkele gegevens van Rittenberg en zijn medewerkers¹³⁾, welke deze reactie eveneens hebben uitgevoerd.

10,22 g α -ketoglutaarzuur (smeltpunt 108° — 109° C) *) werden met 2,45 g palladiumoxyde, $122,5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$ en $32,9 \text{ cm}^3$ 25 procentige ammonia gedurende 12 uur in een deuteriumatmosfeer geschud. Hierbij werden $\pm 1800 \text{ cm}^3$ deuterium opgenomen. Het palladium filtreerden wij na afloop van de reactie af, waarna wij de oplossing in vacuum droogdampten. Het residu werd opgenomen in een hoeveelheid water zoodat de verkregen, eenigszins troebele, oplossing een volume had van 25 cm^3 . Deze oplossing werd vervolgens geneutraliseerd met 37 procentig zoutzuur op congopapier, waarbij het glutaminezuur uitkristalliseerde.

Daar dit glutaminezuur blijkens verschillende elementairanalysen door enkel omkristalliseeren uit water of verdunde alcohol practisch niet zuiver was te krijgen, maakten wij er het zoutzure zout van en kristalliseerden dit om uit 20 procentig zoutzuur. De analyse gaf nu de te verwachten percentages C, H en N. Opbrengst 7 g.

Het deuteriumgehalte bleek te zijn $9,42 \pm 0,06$ atoomprocent voor het zoutzure zout, wat overeenkomt met $10,47 \pm 0,06$ atoomprocent voor het vrije glutaminezuur:

0,0320 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand	
met 0,1553 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x	= 38,0 sec.
" " " 6a	= 35,5 "
" " " 5a	= 40,8 "

12) F. Knoop en H. Oesterlin, Z. physiol. Chem. 148, 294 (1925).

13) D. Rittenberg, S. Ratner en H. D. Hoberman, J. Am. Chem. Soc. 62, 2249 (1940).

*) De in dit proefschrift opgegeven smeltpunten zijn niet gecorrigeerd.

Uit het zoutzure zout konden wij zoonoodig weer het vrije glutaminezuur verkrijgen, door op de gewone wijze een waterige oplossing van het zout met 25 procentige ammonia op congopapier te neutraliseeren.

Om te onderzoeken of wij het deuteriumgehalte belangrijk konden opvoeren door de reactie inplaats van in H_2O in een mengsel van H_2O en D_2O te doen verlopen, namen wij de volgende twee proeven.

- A: 1,46 g α -ketoglutaarzuur werd met 17,5 cm³ H_2O , 4,7 cm³ 25 procentige ammonia en 0,350 g palladiumoxyde gedurende 6 uur in een deuteriumatmosfeer geschud.
Opgenomen werden 200 cm³ D_2 .
- B: 1,46 g α -ketoglutaarzuur werd met 13,1 cm³ H_2O , 4 cm³ D_2O , 4,7 cm³ 25 procentige ammonia en 0,350 g palladiumoxyde gedurende 6 uur in een deuteriumatmosfeer geschud.
Opgenomen werden eveneens 200 cm³ D_2 .

In beide gevallen hebben wij op de reeds beschreven wijze, het zoutzure zout van het glutaminezuur geïsoleerd.

De deuteriumanalyse gaf voor het glutaminezuur van proef A de waarde $12,3 \pm 0,1$ atoomprocent deuterium:

0,0286 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand	
met 0,2076 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x	= 44 sec.
" " " 5	= 42,7 "
" " " 4	= 51,9 "

Voor het glutaminezuur van proef B werd gevonden de waarde $15,7 \pm 0,1$ atoomprocent deuterium:

0,0312 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand	
met 0,2139 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x	= 36,1 sec.
" " " 7	= 32,7 "
" " " 6	= 37,5 "

Inderdaad had dus toevoegen van D_2O een verhooging van het deuteriumgehalte tot gevolg. Daar het er, met het oog op de uit te voeren voedingsproeven, weinig op aan kwam of wij werkten

met een glutaminezuur, dat 12,3 atoomprocent deuterium bevatte of met een praeparaat, dat ruim 3 atoomprocent meer inhiield, besloten wij, gezien de D_2O -besparing, aan de oorspronkelijke uitvoering van de proef in H_2O -milieu vast te houden.

Ook hier, evenals bij de uitwisselingsreactie, onderzochten wij de stabiliteit van de C—D-binding door te koken met zoutzuur.

0,140 g van het volgens proef A verkregen glutaminezuur-HCl werd gekookt met 3,5 cm^3 geconcentreerd zoutzuur gedurende 12 uur. De oplossing dampten wij daarna in vacuum droog en het residu werd eenmaal uit 20 procentig zoutzuur omgekristalliseerd. Volgens de deuteriumanalyse bevatte het zoutzuurvrije glutaminezuur nu 11,6 atoomprocent deuterium, m.a.w. een verlies aan deuterium van 5,7 %:

0,0244 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand	
met 0,1513 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x	= 40,1 sec.
" " " 5a	= 40,2 "

0,180 g van het volgens proef B verkregen glutaminezuur behandelden wij op dezelfde wijze met 4,5 cm^3 geconcentreerd zoutzuur. Hier gaf de deuteriumanalyse voor het glutaminezuur een waarde van 14,5 atoomprocent deuterium, hetgeen overeenkomt met een verlies aan deuterium van 7,7 %:

0,0262 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand	
met 0,1480 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x	= 33,1 sec.
" " " 6a	= 35,3 "
" " " 7a	= 30,9 "

Vergelijken wij deze waarden met de waarde gevonden bij het door uitwisseling verkregen gedeutereerde glutaminezuur, dan valt direct op het enorme verschil in stabiliteit van de C—D-binding. Een volledige opheldering van deze kwestie geeft echter een publicatie van Ratner, Rittenberg en Schoenheimer¹⁴). Op grond van hun onderzoekingen over de stabiliteit van de C—D-binding in glutaminezuur komen deze auteurs tot de

14) S. Ratner, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 135, 357 (1940).

conclusie dat het waterstofatoom in de α -positie en de waterstofatomen in de β -positie stabiel, die in de γ -positie „semilabel” zijn. Onder semilabel verstaan zij hier een zeer langzame uitwisseling van D tegen H en omgekeerd. Het door hen in een uitwisselingsreactie in sterk zuur D_2O -milieu verkregen glutaminezuur bevatte semilabel deuterium in de γ -positie, het uit α -ketoglutaarzuur verkregen product stabiel deuterium in de α - en in de β -positie.

Deze feiten geven een afdoende verklaring voor het door ons gevonden verschil in stabiliteit.

HOOFDSTUK III

VOEDINGSPROEVEN MET GEDEUTEREERD GLUTAMINEZUUR BIJ RATTEN MET BENZOPYREEN-TUMOREN

Voor de medische kant van de in de volgende hoofdstukken besproken proeven stond ons ter zijde de heer F. W. Klaarenbeek, die in de biochemische afdeling van ons laboratorium de benodigde tumorstammen heeft gekweekt en operaties, inspuitingen e.d. bij de proefdieren uitvoerde. Ook op deze plaats wil ik niet nalaten hem hiervoor mijn bijzondere dank te betuigen.

Het opwekken van de benzopyreen-tumoren geschiedde door normale ratten subcutaan in de rug te injecteren met $\frac{1}{2}$ cm³ olijfolie, waarin was opgelost 10 mg benzopyreen. Na drie tot vier maanden begon zich dan op de plaats van de inspuiting een gezwel te ontwikkelen.

De voedingsproeven voerden wij uit bij series van vier tot zes volwassen ratten met goed ontwikkelde benzopyreen-tumoren.

Rat no. 1: Gewicht 200 g. Tumor ter grootte van een walnoot (geschat gewicht 10 g).

Rat no. 2: Gewicht 205 g. Tumor ter grootte van een walnoot (geschat gewicht 15 g).

Rat no. 3: Gewicht 210 g. Tumor ter grootte van een walnoot (geschat gewicht 10 g).

Rat no. 4: Gewicht 160 g. Tumor ter grootte van een hazelnoot (geschat gewicht 5 g).

Rat no. 5: Gewicht 190 g. Tumor ter grootte van een walnoot (geschat gewicht 15 g).

Rat no. 6: Gewicht 220 g. Tumor ter grootte van een mandarijn (geschat gewicht 35 g).

De dieren werden in afzonderlijke kooien geplaatst en gedurende vier dagen op een diët van de volgende samenstelling gehouden:

rijstzetmeel (<i>amylum oryzae</i>)	50	%
gemalen mais	30	%
gedroogd kippeneiwit	5	%

reuzel	6 %
levertraan	1½ %
gedroogde brouwerijgist	5 %
zoutmengsel ¹⁵⁾	2½ %

Iedere rat kreeg hiervan per dag 12 g, met 5 g water aangemaakt tot een deeg. Verder ontvingen de dieren drinkwater ad libitum.

Na afloop van de vier dagen voegden wij aan het diët toe gedeutereerd dl-glutaminezuur, bereid op de reeds beschreven wijze uit α -ketoglutaarzuur, met een deuteriumgehalte van 10,5 atoomprocent. Aan 98 g diët werd 2 g gedeuteerd glutaminezuur toegevoegd.

Van het diët met zwaar glutaminezuur gaven wij iedere rat eveneens een dagelijks rantsoen van 12 g, dat volledig verbruikt werd. Na zeven dagen werden de dieren gedood.

Ter bepaling van het deuteriumgehalte der lichaamsvloeistoffen namen wij van de ratten nos 1, 4 en 6 ongeveer 1 cm³ bloed. Deze hoeveelheden bloed werden vereenigd en gecentrifugeerd. De bovenstaande heldere vloeistof destilleerden wij bij een druk van 1 mm kwik, waarbij de temperatuur van het waterbad 25° C bedroeg en de ontvanger werd gekoeld in vast CO₂. Van het distillaat bepaalden wij het deuteriumgehalte door het evenals een vaste stof in een zuurstofstroom te verbranden, daarna te destilleeren, enz. (zie hoofdstuk II).

Het deuteriumgehalte van het lichaamsvocht bleek te zijn 0,03 ± 0,01 atoomprocent:

valtijd voor oplossing	x = 179 sec.
" " "	1a = 193 "
" " "	2a = 95 "

De lichaamsgewichten en de gewichten van de uitgenomen tumoren waren:

Rat no. 1:	Gewicht 230 g.	Gewicht van de tumor	32 g
" " 2:	" 260 g.	" " " "	65 g
" " 3:	" 230 g.	" " " "	17 g
" " 4:	" 200 g.	" " " "	25 g
" " 5:	" 225 g.	" " " "	40 g
" " 6:	" 280 g.	" " " "	100 g

15) F. B. Osborne en L. B. Mendel, J. Biol. Chem. 15, 311 (1913).

Behalve de tumoren werden ook de levers van de proefdieren uitgenomen. De tumoren werden zooveel mogelijk bevrijd van necrotisch weefsel.

Tumoren en levers maalden wij vervolgens met behulp van een Latapie-molen. He totale gewicht van het gemalen materiaal bedroeg respectievelijk 197 g en 46 g.

Voor de isoleering van het glutaminezuur uit deze weefsels werd volgens de in ons laboratorium gebruikelijke wijze te werk gegaan. Aangezien in vele laboratoria bij de isoleering van dl-glutaminezuur uit tumoren experimenteele moeilijkheden zijn ondervonden, lijkt het wenschelijk de door Kögl en Erxleben en ook door ons gevolgde werkwijze zoo minitieuus mogelijk te beschrijven.

Om zeker te zijn dat het te isoleeren glutaminezuur zich oorspronkelijk in eiwitverband had bevonden, was het in de eerste plaats noodzakelijk, een fractioneering toe te passen, waardoor wij laagmoleculaire celbestanddeelen zoo goed als volledig uit het uitgangsmateriaal verwijderden.

Daartoe werden de weefselmassa's met de zesvoudige gewichtshoeveelheid 0,9 procentige NaCl-oplossing en een weinig toluol geschud en daarna gedurende 24 uur in de ijskast gezet. Door centrifugeeren scheidde wij het onoplosbare gedeelte af en waschten dit achtereenvolgens tweemaal uit met water, tweemaal met alcohol en eenmaal met aether. Het drogen geschiedde in vacuum boven P_2O_5 .

Aan de, het oplosbare gedeelte bevattende, NaCl-oplossing voegden wij het vier- tot vijfvoudige volume 96 procentige alcohol toe en lieten dit mengsel 24 uur in de ijskast staan. Het neerslag, bestaande uit de oplosbare eiwitten, werd weer door centrifugeeren afgescheiden, waarna werd uitgewasschen, eerst met 75 procentige alcohol, daarna met 96 procentige alcohol en tenslotte met aether. Gedroogd werd op dezelfde wijze als bij het onoplosbare gedeelte.

Voor al het uitwasschen met water, alcohol en aether dient met groote zorgvuldigheid te geschieden, daar anders de kans bestaat dat NaCl in de neerslagen achterblijft. Dit NaCl werkt zeer storend bij de isoleering van het dl-glutaminezuur.

Het totale gewicht van het gedroogde tumorweefsel (oplosbaar + onoplosbaar gedeelte) bleek te bedragen 18 g, dat van het gedroogde weefsel der levers 8 g.

Dit materiaal werd vervolgens met zuur gehydrolyseerd.

Hiertoe verhitten wij de stof gedurende zeven uur tot juist koken met de drievoudige gewichtshoeveelheid 37 procentig zoutzuur. Na afkoelen werd het hydrolysaat met een gelijk volume gedestilleerd water verdund en gefiltreerd. Om het zoutzuur zooveel mogelijk te verwijderen werd het filtraat vervolgens eenige malen met gedestilleerd water in vacuüm drooggedampt.

Het residu, een bruine stroop, losten wij op in de tienvoudige hoeveelheid water, waarna wij de oplossing bij kamertemperatuur schudden met een overmaat gepoederd Cu_2O ter verwijdering van de aanwezige humusstoffen¹⁶⁾. Het cuprooxyde werd hierbij in een tijdsverloop van tien minuten portiesgewijze aan de oplossing toegevoegd, totdat de roode kleur ervan onveranderd bleef. Daarna werd het neerslag afgezogen en het filtraat aangezuurd met weinig 4 n zoutzuur en verzadigd met H_2S om de Cu-ionen neer te slaan. De laatste bewerking geschiedde door gedurende $\frac{3}{4}$ uur met een flinke snelheid H_2S in te leiden. Door filtratie verkregen wij een min of meer gele, heldere oplossing, welke wij na eventueel opkoken met een weinig kool (om de gele kleur te verwijderen) in vacuüm concentreerden tot een middelmatig viskeuse stroop. Deze stroop werd met behulp van een pipet overgebracht in een erlenmeyer van het twee- tot drievoudige volume, waarna bij 0°C tot verzadiging zoutzuurgas werd ingeleid. Wij entten met een enkel kristalletje l-, d- en dl-glutaminezuur-hydrochloride en sloten de erlenmeyer met een kurk af. Na minstens vier dagen staan in de ijskast werd het gekristalliseerde glutaminezuur-HCl met behulp van een glasfilter scherp afgezogen, gewasschen met weinig ijskoud geconcentreerd zoutzuur en gedroogd in vacuüm boven vast NaOH.

Tengevolge van de viscositeit van de moederloog is het afzuigen van het kristallisaat een zeer tijdroovende bezigheid. Bovendien kan het voorkomen, dat de stroop niet zonder meer van de kristal-massa is te scheiden. De oorzaak hiervan is, dat tegen het einde van de bewerking in de op het glasfilter liggende kristal-brij scheuren ontstaan, welke verder afzuigen nutteloos maken. In een dergelijk geval voegden wij aan de kristal-massa eenige druppels gecon-

16) Vgl. E. Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, Bd. II, 492 (1910).

centreerd zoutzuur toe en roerden met een glasstaafje tot weer een egale kristalbrij het filter bedekte, waarna het afzuigen werd voortgezet. Zoo noodig herhaalden wij deze bewerking. Het eindresultaat was, dat wij een zuiver witte massa, bestaande uit zeer kleine kristallen, verkregen.

De moederloog werd verder ingedampt, bij 0°C opnieuw met zoutzuurgas verzadigd en na enten weer minstens vier dagen in de ijskast gezet, waardoor een tweede hoeveelheid kristallen kon worden geïsoleerd.

Meestal volstonden wij met twee kristallisaten. Slechts in die gevallen, waarbij achteraf bleek, dat te weinig dl-glutaminezuur-HCl was gekristalliseerd, isoleerden wij een derde en desnoods een vierde hoeveelheid. De gezamenlijke kristallisaten werden vervolgens uit zoo weinig mogelijk 20 procentig zoutzuur omgekristalliseerd. Werkten wij met partiëel geracemiseerd glutaminezuur, dan werd hierbij een verlies van hoogstens 15 procent toegestaan. Het omkristalliseeren met grootere verliezen heeft namelijk tot gevolg, dat een te groot gedeelte van het aanwezige dl-glutaminezuur-HCl verloren gaat. Wij voerden de bewerking op de volgende wijze uit. De stof werd met zoo weinig 20 procentig zoutzuur in een erlenmeyertje tot juist koken verhit, dat pas na voorzichtig druppelsgewijze zoutzuur toevoegen kon worden bereikt, dat een bij het kookpunt verzadigde oplossing van glutaminezuur-HCl in 20 procentig zoutzuur werd verkregen. We entten weer met l-, d- en dl-glutaminezuur-hydrochloride en zetten de oplossing minstens 24 uur in de ijskast. Van het verkregen product bepaalden wij na het drogen de specifieke draaiing.

Waren wij bij de opwerking uitgegaan van normaal weefsel, waaruit dus uitsluitend l(+)-glutaminezuur kon worden verkregen, dan kristalliseerden wij daarna nog eenmaal om, hetgeen in de regel voldoende bleek om een absoluut zuivere stof in handen te krijgen. Anders was het echter, wanneer wij uitgingen van tumorweefsel, omdat hierbij een partiëel geracemiseerd glutaminezuur werd verkregen. Daar wij zoowel het deuteriumgehalte van het l(+)- als van het d(-)-glutaminezuur wenschten te bepalen, dienden wij om te zien naar een middel om de beide antipoden te scheiden. De bestaande methoden om dl-aminozuren in de optische antipoden te splitsen, zijn echter niet eenvoudig en de verliezen, welke er bij optreden, zijn groot.

Een weg uit de moeilijkheden vonden wij als volgt:

Door gefractioneerde kristallisatie werd een scheiding teweeggebracht tusschen l(+)- en dl-glutaminezuur-HCl. Dit ging betrekkelijk eenvoudig in zijn werk. Daar wij de draaiing van het kristallisaat hadden bepaald, kenden wij de hoeveelheid dl-glutaminezuur, die er in aanwezig was. Met behulp van de waarde voor de oplosbaarheid van het dl-glutaminezuur-HCl konden wij dan berekenen hoeveel cm³ 20 procentig zoutzuur wij moesten gebruiken om deze hoeveelheid bij 0°C juist in oplossing te houden. Wij namen 25 tot 30 procent minder dan deze berekende hoeveelheid en losten de stof hierin op. Daarna werd met l(+)-glutaminezuur-HCl geënt en de oplossing in de ijskast gezet. Het l(+)-glutaminezuur en meestal ook een klein gedeelte van het dl-glutaminezuur kristalliseerde nu uit. Het verkregen product leverde na eenmaal omkristalliseeren uit 20 procentig zoutzuur zuiver l(+)-glutaminezuur-HCl. De oplossing van het dl-glutaminezuur werd ingedampt tot een klein volume en ter kristallisatie 24 uur in de ijskast gezet. Zoo noodig kristalliseerden wij daarna nog eenmaal uit zoutzuur om.

Hierna bepaalden wij zoowel van het l(+)- als van het dl-glutaminezuur het atoompercentage deuterium. Een kleine berekening leverde ons dan het deuteriumgehalte van het d(-)-glutaminezuur.

Van ieder kristallisaat werd steeds de specifieke draaiing bepaald, terwijl de zuiverheid werd nagegaan met behulp van een elementairanalyse *).

Wat betreft de oplosbaarheid van het l(+)- en dl-glutaminezuur-HCl, maakten wij gebruik van de reeds eerder in ons laboratorium gevonden waarden¹⁷⁾.

A. Glutaminezuur uit de levers. Het ruwe kristallisaat uit de levers bedroeg 0,660 g. Na tweemaal omkristalliseeren uit een ruime hoeveelheid 20 procentig zoutzuur hielden wij over 0,324 g. Hiervan was de draaiing:

*) Deze analyses werden uitgevoerd door den heer P. J. Hubers te Amsterdam. De stoffen werden van te voren in vacuum boven P₂O₅ bij kamertemperatuur gedroogd.

17) F. Kögl, H. Erxleben en A. M. Akkerman, Z. physiol. Chem. 261, 141 (1939).

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,56 \cdot 100}{4,94} = + 31^{\circ},6 *$$

Deze draaiing komt overeen met die van zuiver l(+)-glutaminezuur.

C—H—N-Analyse **)

4,487 mg stof: 5,32 mg CO₂, 2,19 mg H₂O
 4,942 mg stof: 0,329 cm³ N₂ (23°, 771 mm)
 C₅H₉O₄N.HCl(183,5) ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64
 gev. C 32,34 H 5,46 N 7,79

Het deuteriumgehalte bleek te zijn 0,03 ± 0,01 atoomprocent:

0,170 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl
 onverdund verbrand
 valtijd voor oplossing x = 175,5 sec.
 " " " 1a = 189,7 "
 " " " 2a = 94,8 "

B. Glutaminezuur uit de tumoren. Het ruwe kristallisaat bedroeg 2,115 g. Na eenmaal omkristalliseeren uit zoo weinig mogelijk 20 procentig zoutzuur hielden wij over 1,793 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,20 \cdot 100}{5,00} = + 24^{\circ},0$$

Deze draaiing wijst op een gehalte aan d(—)-glutaminezuur van $\frac{31,7 - 24,0}{31,7} \cdot 50 = 12 \%$.

Door gefractioneerde kristallisatie werd dit product gescheiden in l(+)- en dl-glutaminezuur-HCl.

De opbrengst aan l(+)-glutaminezuur-HCl bedroeg na tweemaal omkristalliseeren uit een ruime hoeveelheid 20 procentig zoutzuur 0,850 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,59 \cdot 100}{5,02} = 31^{\circ},7$$

*) De specifieke draaiingen werden bepaald voor 5 procentige oplossingen van het vrije glutaminezuur in 9 procentig zoutzuur.

**) Bij deze elementairanalyses geven kleine atoompercentages deuterium, zooals die voorkomen in het door ons geïsoleerde glutaminezuur, afwijkingen, welke ver binnen de proeffouten liggen.

C—H—N-Analyse

4,355 mg stof: 5,18 mg CO₂, 2,10 mg H₂O
 4,701 mg stof: 0,315 cm³ N₂ (23°, 771 mm)
 ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64
 gev. C 32,44 H 5,40 N 7,84

De deuteriumanalyse gaf een gehalte aan deuterium van 0,04 ± 0,01 atoomprocent:

0,190 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl
 onverdund verbrand
 valtijd voor oplossing x = 180 sec.
 " " " 1a = 201 "
 " " " 2a = 95,8 "

De opbrengst van het dl-glutaminezuur-HCl na tweemaal omkristalliseeren was 0,264 g.

$$[\alpha]_D = \frac{0 \cdot 100}{5,09} = 0^\circ$$

C—H—N-Analyse

4,291 mg stof: 5,11 mg CO₂, 2,13 mg H₂O
 4,719 mg stof: 0,313 cm³ N₂ (23°, 771 mm)
 ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64
 gev. C 32,48 H 5,55 N 7,76

De deuteriumanalyse gaf als waarde 0,02 ± 0,01 atoomprocent D:

0,170 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl
 onverdund verbrand
 valtijd voor oplossing x = 183 sec.
 " " " 1a = 190,3 "
 " " " 2a = 95,8 "

Uit het deuteriumgehalte van het l(+)- en dl-glutaminezuur kunnen wij dat van het d(-)-glutaminezuur berekenen.

Stel het deuteriumgehalte van dit laatste is x atoomprocent, dan is:

$$50x + 50 (0,04 \pm 0,01) = 100 (0,02 \pm 0,01)$$

$$x = 0 \pm 0,03$$

Aan de beschreven voedingsproef ging een, ter orienteering uitgevoerd, overeenkomstig onderzoek vooraf met gedeutereerd

l(+)-glutaminezuur (7,4 atoomprocent D) en gedeutereerd d(-)-glutaminezuur (7,5 atoomprocent D). In beide was het deuterium door een uitwisselingsreactie ingevoerd (zie hoofdstuk II).

Ongetwijfeld is het door uitwisseling verkregen gedeutereerde glutaminezuur, als gevolg van het feit dat de D-atomen niet stabiel in de stof zijn gebonden, minder geschikt om het voor voedingsproeven te gebruiken. Vooral is dit het geval, wanneer men op zichzelf staande gevolgtrekkingen van quantitative aard uit het onderzoek wil maken. Daar onze voedingsproeven echter in de eerste plaats tot doel hadden eventueel bestaande verschillen in de stofwisseling van l- en d-glutaminezuur aan te toonen, meenden wij over het bezwaar van het niet volkomen stabiel gebonden zijn van de deuteriumatomen te kunnen heenstappen.

De resultaten waren:

A. Bij toevoeging aan het diët van gedeutereerd l(+)-glutaminezuur

Deuteriumgehalte van het l(+)-glutaminezuur uit de levers $0,07 \pm 0,03$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de tumoren $0,07 \pm 0,02$ atoomprocent, van een mengsel bestaande uit 52 procent dl-glutaminezuur en 48 procent l(+)-glutaminezuur uit de tumoren $0,05 \pm 0,02$ atoomprocent.

B. Bij toevoeging aan het diët van gedeutereerd d(-)-glutaminezuur

Deuteriumgehalte van het l(+)-glutaminezuur uit de levers $0,06 \pm 0,02$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de tumoren $0,05 \pm 0,02$ atoomprocent, van een mengsel bestaande uit 40 procent dl- en 60 procent l(+)-glutaminezuur uit de tumoren $0,03 \pm 0,02$ atoomprocent.

Men ziet uit de resultaten van de drie proefseries, dat de waarden voor het deuteriumgehalte van het geïsoleerde glutaminezuur zeer klein zijn. Verder zijn in eenzelfde proef de onderlinge verschillen van l- en d-vorm zoo gering, dat zij practisch binnen de proeffouten vallen. Wij moeten daarom bij het maken van gevolgtrekkingen zeer voorzichtig te werk gaan (zie hoofdstuk VI).

HOOFDSTUK IV

D₂O-PROEF BIJ RATTEN MET BENZOPYREEN-TUMOREN

Vijf ratten met goed ontwikkelde benzopyreen-tumoren werden subcutaan geïnjecteerd met zooveel D₂O *) dat het gehalte aan deuterium van het lichaamsvocht daardoor op een atoompercentage van $\pm 1,5$ werd gebracht.

Bij de berekening van de hiervoor benodigde hoeveelheid namen wij aan dat het gewicht van het in totaal aanwezige lichaamswater tweederde bedroeg van het lichaamsgewicht van de rat¹⁸⁾, zoodat per 100 g gewicht 1 cm³ D₂O ($d \frac{20}{4} = 1,10505$) werd ingespoten.

Om het gehalte van 1,5 atoomprocent gedurende de proeftijd op peil te houden, waren de dieren vrij water te drinken, dat 2,5 atoomprocent deuterium bevatte.

Als voedsel werd het normale stalvoer, bestaande uit een mengsel van drie gewichtsdeelen mais, twee gewichtsdeelen tarwe en een gewichtsdeel haver, ad libitum toegediend.

Het diermateriaal en de nadere gegevens van de proef zijn in het volgende overzicht beschreven.

Rat 52 ♂ (geboren: 26-10-'40)

27-1-'41: Subcutaan geïnjecteerd met $\frac{1}{2}$ cm³ olijfolie waarin opgelost 10 mg benzopyreen.

18-6-'41: Tumor ter grootte van een mandarijn. Gewicht van het dier 150 g. Te 10 u. ingespoten met 1,5 cm³ D₂O.

25-6-'41: Rat des morgens dood in de kooi gevonden. Gewicht 152 g. Gewicht van de tumor 52 g. Geen metastasen. Geen postmortale veranderingen van de organen waar te nemen; de dood moet dus pas kort geleden zijn ingetreden.

*) Rekening houdende met de physiologische omstandigheden werd in het D₂O per 100 g, 0,9 g NaCl opgelost.

18) G. L. Bertram, Diss. Amsterdam, 1939.

Rat 47 ♀ (geboren: 19-10-'40)

- 27-1-'41: Subcutaan geïnjecteerd met benzopyreen.
 18-6-'41: Tumor ter grootte van een walnoot. Gewicht van het dier 170 g. Te 10 u. ingespoten met 1,7 cm³ D₂O.
 25-6-'41: Rat des morgens te 10 u. gedood en 1 cm³ bloed genomen. Gewicht van het dier 170 g. Gewicht van de tumor 25 g. Geen metastasen.

Rat 42 ♂ (geboren: 19-10-'40)

- 27-1-'41: Subcutaan geïnjecteerd met benzopyreen.
 18-6-'41: Tumor ter grootte van een mandarijn. Gewicht van het dier 250 g. Te 10 u. ingespoten met 2,5 cm³ D₂O.
 25-6-'41: Rat des morgens dood in de kooi gevonden. Gewicht 250 g. Gewicht van de tumor 97 g. Geen metastasen. Daar van postmortale veranderingen van de organen zoo goed als niets was te constateeren, kon het dier nog niet lang dood zijn.

Rat 43 ♂ (geboren: 19-10-'40)

- 27-1-'41: Subcutaan geïnjecteerd met benzopyreen.
 18-6-'41: Tumor ter grootte van een mandarijn. Gewicht van het dier 180 g. Te 10 u. ingespoten met 1,8 cm³ D₂O.
 25-6-'41: Rat des morgens dood in de kooi gevonden. Gewicht 155 g. Gewicht van de tumor 57 g. Geen metastasen. Behalve een blauwgroene verkleuring van de lever, geen postmortale veranderingen waar te nemen. Ook hier moet de dood dus pas kort geleden zijn ingetreden.

Rat 95 ♀ (geboren: 19-10-'40)

- 15-3-'41: Subcutaan geïnjecteerd met benzopyreen.
 18-6-'41: Tumor ter grootte van een mandarijn. Gewicht van het dier 135 g. Te 10 u. ingespoten met 1,35 cm³ D₂O.
 25-6-'41: Rat des morgens te 10 u. gedood en ± 1 cm³ bloed genomen. Gewicht 125 g. Gewicht van de tumor 24 g. Geen metastasen.

Het feit, dat drie van de vijf ratten juist op de dag dat de proef zou worden afgebroken, 's ochtends dood in de kooi werden gevonden, zal daarmee samenhangen, dat de betreffende tumoren

reeds zeer groot waren, terwijl als bijkomstige omstandigheid waarschijnlijk de gedurende de proefdagen heerschende hoge zomertemperatuur een rol heeft kunnen spelen.

De van rat 47 ♀ en rat 95 ♀ genomen hoeveelheden bloed werden vereenigd en gecentrifugeerd. De bovenstaande heldere vloeistof werd bij een druk van 1 mm kwik gedestilleerd (temperatuur van het waterbad 25° C; ontvanger gekoeld in vast CO₂). Het destillaat diende als uitgangsstof voor een normale bepaling van het deuteriumgehalte (zie hoofdstuk II).

De lichaamsvloeistoffen bleken $1,42 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium te bevatten:

nulstand interferometer	=	29
waarde voor oplossing x	=	300,5
" " " 5	=	293
valtijd voor oplossing x	=	41,6 sec.
" " " 5	=	42,6 "
" " " 6	=	37,5 "

Bij alle proefdieren werd de tumor en de lever uitgenomen, waarbij de tumoren zooveel mogelijk werden ontdaan van necrotisch weefsel.

Zoowel de tumoren als de levers maalden wij daarna goed fijn. Het totale gewicht van de gemalen tumoren bedroeg 150 g, dat van de gemalen levers 28 g. Na fractioneeren en drogen waren deze gewichten respectievelijk 13 g en 4 g (oplosbaar + onoplosbaar gedeelte).

A. Glutaminezuur uit de levers. Het ruwe kristallisaat bedroeg 0,350 g. Na tweemaal omkristalliseeren uit een ruime hoeveelheid 20 procentig zoutzuur hielden wij over 0,151 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,60 \cdot 100}{5,05} = + 31^{\circ},7$$

C—H—N-Analyse

4,669 mg stof:	5,55 mg CO ₂ ,	2,32 mg H ₂ O
4,586 mg stof:	0,297 cm ³ N ₂	(22°, 754 mm)
C ₅ H ₉ O ₄ N.HCl(183,5)	ber.	C 32,70 H 5,50 N 7,64
	gev.	C 32,42 H 5,56 N 7,44

De deuteriumanalyse gaf een gehalte aan deuterium van 0.45 ± 0.02 atoomprocent:

0,1102 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl verbrand	
met 0,0674 g niet-gedeutereerd glutaminezuur-HCl	
valtijd voor oplossing x = 113,3 sec.	
" " " 2 = 97,6 "	
" " " 1 = 198,3 "	

B. Glutaminezuur uit de tumoren. Het ruwe kristallisaat uit de tumoren bedroeg 1,490 g. Na eenmaal omkristalliseeren uit 20 procentig zoutzuur hielden wij over 1,250 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,26 \cdot 100}{4,98} = + 25^{\circ},3$$

Deze draaiing komt overeen met de aanwezigheid in het kristallisaat van 10 % d(—)-glutaminezuur.

Door toevallige omstandigheden gelukte het ons niet een volledige scheiding van l- en dl-glutaminezuur te bewerkstelligen. Er kristalliseerde namelijk bij deze bewerking te weinig l-glutaminezuur-HCl uit. Door de overblijvende vloeistof steeds verder in te dampen, waardoor steeds meer van de rechtsdraaiende component kon worden verwijderd, verkregen wij tenslotte een oplossing, waaruit na concentreeren 0,203 g glutaminezuur-HCl uitkristalliseerde. Hiervan bedroeg de draaiing:

$$[\alpha]_D = \frac{+ 0,16 \cdot 100}{5,02} = + 3^{\circ},19$$

Dit komt overeen met een gehalte van 45 % d(—)-glutaminezuur.

C—H—N-Analyse

4,335 mg stof: 5,17 mg CO₂, 2,14 mg H₂O

4,354 mg stof: 0,282 cm³ N₂ (22°, 754 mm)

ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64

gev. C 32,53 H 5,52 N 7,44

De deuteriumanalyse van dit mengsel gaf voor het atoompercentage D de waarde $0,27 \pm 0,01$:

0,181 g gedeuteerd glutaminezuur-HCl	
onverdund verbrand	
valtijd voor oplossing	$x = 113,3 \text{ sec.}$
" " "	$2' = 127,2 \text{ " } ^*)$
" " "	$2 = 96,9 \text{ "}$

Het bij de scheiding verkregen l(+)-glutaminezuur-hydrochloride werd eenmaal uit 20 procentig zoutzuur omgekristalliseerd. Opbrengst 0,633 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,60 \cdot 100}{5,06} = 31^\circ,6$$

C—H—N-Analyse

4,220 mg stof:	5,04 mg CO ₂ ,	2,08 mg H ₂ O
4,660 mg stof:	0,309 cm ³ N ₂ (23°, 754 mm)	
	ber. C 32,70	H 5,50 N 7,64
	gev. C 32,57	H 5,51 N 7,59

De deuteriumanalyse gaf als waarde $0,44 \pm 0,01$ atoomprocent:

0,182 g gedeuteerd glutaminezuur-HCl	
onverdund verbrand	
valtijd voor oplossing	$x = 91,4 \text{ sec.}$
" " "	$2 = 98,1 \text{ "}$
" " "	$3 = 65,9 \text{ "}$

Uit het deuteriumgehalte van het mengsel en dat van het l(+)-glutaminezuur kan het deuteriumgehalte van het d(—)-glutaminezuur worden berekend. Stel het atoompercentage deuterium van dit laatste is x, dan geldt:

$$45x + 55 (0,44 \pm 0,01) = 100 (0,27 \pm 0,01)$$

$$x = 0,06 \pm 0,03$$

Verder zij nog een ter orienteering uitgevoerde proef vermeld, welke aan de bovengenoemde voorafging. Bij deze werd het zware water tien dagen in plaats van zeven dagen toegediend. Helaas is deze proef bij de opwerking van het dl-glutaminezuur verongelukt, zoodat slechts de waarde voor de l-vorm kon worden bepaald:

Deuteriumgehalte van het lichaamsvocht $1,42 \pm 0,01$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de lever $0,49 \pm 0,01$ atoom-

*) Ijkoplossing 2' werd later bijgemaakt en bevatte 0,19 gewichtsprocent D₂O.

procent en van het l(+)-glutaminezuur uit de tumor $0,48 \pm 0,01$ atoomprocent.

Parallel aan het beschreven onderzoek werd in ons laboratorium door mej. Dr. H. E r x l e b e n de volgende nog niet gepubliceerde proef uitgevoerd:

Van elf ratten met benzopyreen-tumoren werd het deuteriumgehalte van het lichaamsvocht gedurende twaalf dagen op $\pm 1,5$ atoomprocent gehouden. Daarna werd uit de tumoren l(+)- en d(-)-glutaminezuur, uit de levers l(+)-glutaminezuur geïsoleerd en op het gehalte aan deuterium onderzocht. De verkregen resultaten waren:

Deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistof $1,63 \pm 0,01$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de lever $0,51 \pm 0,01$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de tumor $0,51 \pm 0,01$ atoomprocent en van het d(-)-glutaminezuur uit de tumor $0,23 \pm 0,03$ atoomprocent.

Terwijl wij bij de, in het voorafgaande hoofdstuk behandelde, voedingsproeven slechts een minimaal verschil in het deuteriumgehalte van de l- en d-glutaminezuurbouwstenen van het tumoreiwit hebben gevonden, zien wij bij de D₂O-proeven een karakteristiek onderscheid optreden. De d-antipode bevat minder stabiel gebonden deuterium dan de l-vorm. Bij de proeftijd van zeven dagen is het deuteriumgehalte zelfs vrijwel nihil, bij de langere proefduur van twaalf dagen omstreeks de helft van het gehalte van de l-vorm.

De beteekenis van deze resultaten zal in hoofdstuk VI worden besproken.

HOOFDSTUK V

D₂O-PROEF BIJ EEN KONIJN MET BROWN-PEARCE-TUMOREN

1. Voorbereidende proeven

Het leek ons wenschelijk na te gaan, of de bij de drinkproeven bij ratten met benzopyreen-tumoren verkregen resultaten ook bij een andere diersoort, respectievelijk een ander type van tumor, zouden optreden. Hiervoor kwam in de eerste plaats in aanmerking de *Brown-Pearce*-tumor van konijnen, welke in ons laboratorium by het tumoronderzoek reeds herhaaldelijk dienst deed. Aangezien echter een konijn de behoefte aan water voor verreweg het grootste gedeelte kan bevredigen met het in het normale stalvoer (gras, wortels, kool e.d.) aanwezige vocht, is het niet mogelijk de D₂O-drinkproef bij een konijn analoog aan die bij ratten uit te voeren. Wij dienden dus naar een andere methode te zoeken om het D₂O-gehalte van het lichaamsvocht te verhoogen.

Het lag voor de hand dit op deze wijze te doen, dat bij een konijn een bepaalde hoeveelheid D₂O werd ingespoten, waarop dan van tijd tot tijd door nieuwe injecties van D₂O er voor werd gezorgd, dat de deuteriumconcentratie niet beneden een bepaalde waarde kwam. Doordat het ingespoten D₂O zich met het geheele lichaamsvocht mengt, zal het deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistoffen, tengevolge van de uitscheidingen, slechts geleidelijk tot de normale waarde dalen. Wij moesten nagaan met welke snelheid dit gebeurt, respectievelijk hoeveel D₂O telkens na een bepaald aantal uren diende te worden ingespoten.

Daartoe werd een normaal konijn, gewicht 1440 g, intraveneus ingespoten met 10 cm³ van een 0,9 procentige NaCl-oplossing in D₂O ($d_{4}^{20} = 1,10505$). De injectie geschiedde in twee keer; beide malen werd 5 cm³ ingespoten, met een tusschentijd van een half uur.

Zoals men ziet, werd in tegenstelling tot de rattenproef de injectie bij het konijn intraveneus gegeven. Ongetwijfeld is voor het dier de intraveneuse injectie met D₂O gevaarlijker dan de sub-

cutane. Dat wij haar desondanks hebben toegepast, is gelegen in het feit, dat bij inspuiting in de bloedbaan het D_2O zich snel over het geheele lichaam verspreidt. Men zal bij een nadere bestudering van de volgende bladzijden direct inzien, dat wij dit voor onze proefnemingen juist noodig hadden.

Na de injecties werd van het dier op bepaalde tijden $\pm 1 \text{ cm}^3$ bloed genomen. Dit bloed behandelden wij op de reeds eerder beschreven wijze, waarna het verkregen mengsel van H_2O en D_2O op het deuteriumgehalte werd onderzocht.

Het deuteriumgehalte bleek te bedragen:

2 uur na de laatste inspuiting $0,88 \pm 0,01$ atoomprocent:

valtijd voor oplossing x	=	57,1 sec.
" " " 3	=	66,7 "
" " " 4	=	51,7 "

24 uur na de laatste inspuiting $0,77 \pm 0,01$ atoomprocent:

valtijd voor oplossing x	=	62,1 sec.
" " " 3	=	66,5 "
" " " 4	=	51,5 "

72 uur na de laatste inspuiting $0,58 \pm 0,01$ atoomprocent:

valtijd voor oplossing x	=	72,6 sec.
" " " 2	=	95,6 "
" " " 3	=	65,4 "

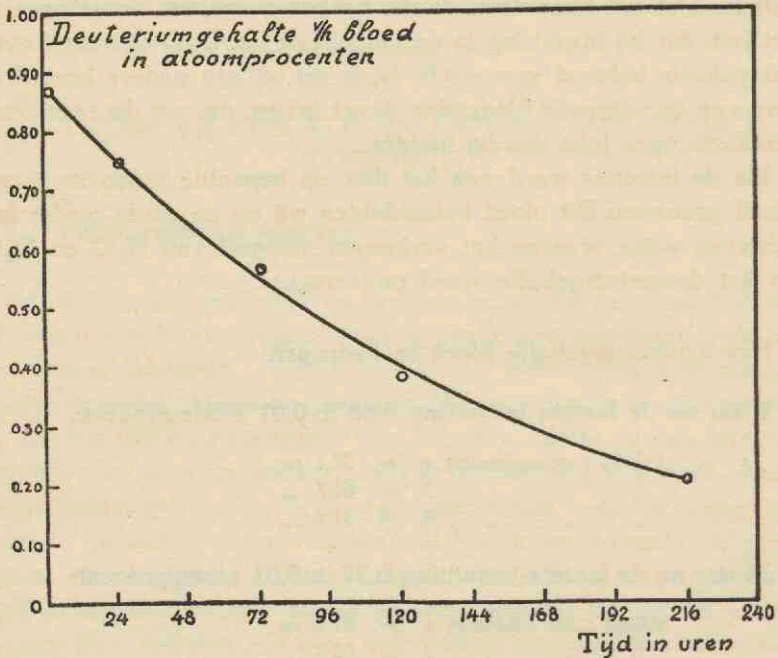
120 uur na de laatste inspuiting $0,38 \pm 0,01$ atoomprocent:

valtijd voor oplossing x	=	91 sec.
" " " 2	=	95,6 "
" " " 3	=	65,4 "

216 uur na de laatste inspuiting $0,21 \pm 0,01$ atoomprocent:

valtijd voor oplossing x	=	120,8 sec.
" " " 1	=	192,7 "
" " " 2	=	94,5 "

De resultaten, samengevat in een grafiek, leveren de volgende figuur:



Door de vijf gevonden punten is, zooals men ziet, een nagenoeg vloeiende lijn te trekken; m.a.w. de afneming van het deuteriumgehalte van het bloed, of juist van het bloedvocht, vindt volkomen regelmatig plaats.

Hoe wij met behulp van deze grafiek kunnen berekenen, in de eerste plaats de hoeveelheid D_2O , die wij bij een willekeurig konijn moeten inspuiten om een bepaald gehalte aan deuterium van het lichaamsvocht te verkrijgen, en verder de hoeveelheid D_2O , die wij om de 24 uur moeten inspuiten om dit deuteriumgehalte op de gewenschte waarde terug te brengen, zullen wij in de volgende paragraaf behandelen.

Eerst is het noodzakelijk nog een tweede moeilijkheid te bespreken, die zich bij de rattenproef niet voordeed. Bij de ratten kunnen wij, daar de benzopyreentumoren zich direct onder de huid bevinden, eenvoudig op het oog de aanwezigheid en tevens de grootte van de tumor vaststellen. Dit is echter bij de konijnen anders. Immers de Brown-Pearce-tumor is een buitengewoon kwaad-

aardige entumor. Zij wordt geënt door een suspensie van een omentummetastase in de testes te injecteren. Indien de enting aanslaat, zijn de organen van het konijn reeds na weinige weken als het ware doorzaaid met metastasen. Al naar gelang het orgaan, dat het meest door deze dochtergezwollen wordt getroffen, blijven de dieren kortere of langere tijd in leven, echter zelden langer dan 6 weken. Voor ons doel waren alleen konijnen te gebruiken, welke bij het begin van de proef kleine metastasen in het omentum hadden, omdat slechts deze gedurende de proeftijd van een week een voldoende hoeveelheid gemakkelijk uit te nemen tumormateriaal leverden. De moeilijkheid berust nu daarop, dat de kleine omentummetastasen niet te palpeeren zijn; zoodra de gezwollen op deze wijze wel zijn vast te stellen, heeft het dier nog maar een korte tijd te leven. De eenige mogelijkheid die overbleef, was om door middel van een operatie de aanwezigheid van kleine omentummetastasen te constateeren. De desbetreffende operaties werden uitgevoerd door den heer F. W. Klaarenbeek. Nadat enkele proefoperaties aan konijnen met Brown-Pearce-tumoren bevredigend waren verlopen, stonden eenige dieren ter beschikking, welke de vereischte kleine omentummetastasen bezaten. Wij kozen het dier, dat de meest gezonde indruk maakte.

2. De eigenlijke D₂O-proef

Het konijn, waarmede wij het onderzoek uitvoerden, woog 2600 g.

Bij de voorbereidende proeven was o.a. gebleken, dat bij een konijn met een gewicht van 1440 g, ingespoten met 10 cm³ D₂O, het deuteriumgehalte van het bloedvocht na 2 uur 0,88 atoomprocent bedroeg en na 24 uur 0,77 atoomprocent.

Nu namen wij aan, dat het deuteriumgehalte van het bloedvocht, 2 uur na de laatste inspuiting, gelijk is aan het deuteriumgehalte van het lichaamsvocht *). Hieruit volgt dan dat, wilden wij op dezelfde manier bij een konijn van 2600 g na 2 uur het deuteriumgehalte van het lichaamsvocht gebracht zien op een atoomper-

*) Dit zou bij een subcutane injectie zeker niet het geval zijn.

centage l, wij het dier dienden in te spuiten met $\frac{2600}{1440} \cdot \frac{1}{0,88} \cdot 10 = 20,5 \text{ cm}^3 \text{ D}_2\text{O}$.

Verder was bij de voorbereidende proeven gebleken, dat het atoompercentage deuterium van het bloedvocht van 2 uur tot 24 uur na de laatste inspuiting, dat is dus in 22 uur, daalde van 0,88 tot 0,77, hetgeen overeenkomt met een daling van 13 procent. Door een ruwe berekening vinden wij voor het tijdvak vanaf de laatste inspuiting tot 24 uur daarna een daling van $\frac{24}{22} \cdot 13 = 14$ procent. Met andere woorden: om het atoompercentage deuterium van het lichaamsvocht op peil te houden, moesten wij telkens 24 uur na een injectie inspuiten $\frac{14}{100} \cdot 20,5 = 2,8 \text{ cm}^3 \text{ D}_2\text{O}$.

Wij zullen nu een gedetailleerde beschrijving geven van proefdier en proefomstandigheden:

Konijn 10 ♂, serie 2 (geboren Februari '41)

- 16-9-'41: Rechter testikel ingespoten met 1 cm^3 tumorsuspensie, afkomstig van een omentummetastase van Brown-Pearce-konijn 2, serie 2.
- 26-9-'41: In rechter testikel tumor palpabel.
- 29-9-'41: Eerste operatie onder lokaal-anaesthesie met 0,5 procentige novocaine-adrenaline-oplossing in physiologische NaCl-oplossing. Hiervan gebruikt 18 cm^3 .
Operatieverslag: Mediaansnede ter lengte van 8 cm, 4 cm onder de processus xyphoideus. In de buikholte geen vrij vocht aanwezig. In het omentum en in de lever bevonden zich enkele metastasen ter grootte van een luciferskop. In de milt en nieren geen knobbeltjes te voelen. Serosa glad en glanzend. Buikwand in lagen gesloten met catgut en agraves. Konijn maakte het goed.
- 3-10-'41: In de buikholte geen knobbeltjes te palpeeren.
Gewicht van het dier 2600 g.
Tweede operatie onder lokaal-anaesthesie met 0,5 procentige novocaine-adrenaline-oplossing in physiologische NaCl-oplossing. Hiervan gebruikt 18 cm^3 .

Operatieverslag: Oude wondnaden losgeknipt. In de buikholte geen vrij vocht aanwezig. In het omentum een reeks knobbeltjes ter grootte van erwt tot hazelnoot (geschat gewicht 10 g). In de lever een enkele metastase ter grootte van een erwt. Alleen in de linker nier enkele knobbeltjes gepalpeerd.

Overgegaan tot intraveneuse injectie met D_2O : Te $17\frac{1}{2}$ u. intraveneuse injectie met $20,5\text{ cm}^3 D_2O$ in rechter oorvene.

- 4-10-'41: Konijn maakte het goed.
Te $17\frac{1}{4}$ u. $\pm 1\text{ cm}^3$ bloed genomen I
Te $17\frac{1}{2}$ u. intraveneuse injectie met $2,8\text{ cm}^3 D_2O$.
- 5-10-'41: Konijn maakte het goed. Gewicht 2465 g.
Te $17\frac{1}{2}$ u. $\pm 1\text{ cm}^3$ bloed genomen II
Te $17\frac{3}{4}$ u. intraveneuse injectie met $2,8\text{ cm}^3 D_2O$.
- 6-10-'41: Konijn vertoonde nog steeds goede eetlust. Gewicht 2420 g.
Te $17\frac{1}{2}$ u. $\pm 1\text{ cm}^3$ bloed genomen III
Te $17\frac{3}{4}$ u. intraveneuse injectie met $2,8\text{ cm}^3 D_2O$.
- 7-10-'41: Konijn vertoonde slechte eetlust. Gewicht 2320 g.
Te 16 u. $\pm 1\text{ cm}^3$ bloed genomen IV
Te $17\frac{1}{2}$ u. intraveneuse injectie met $2,8\text{ cm}^3 D_2O$.
Te 19 u. $\pm 1\text{ cm}^3$ bloed genomen V
- 8-10-'41: Gewicht van het dier 2320 g.
Te $17\frac{1}{2}$ u. $\pm 1\text{ cm}^3$ bloed genomen VI
Te $17\frac{3}{4}$ u. intraveneuse injectie met $2,8\text{ cm}^3 D_2O$.
- 9-10-'41: Gewicht 2270 g. Geen bloed afgenomen; toestand van het dier te slecht.
Te $18\frac{1}{2}$ u. spontaan overleden.
Sectie direct na de dood verricht. Operatiewond goed aan het genezen.
In de vrije buikholte ongeveer 100 cm^3 helder bloederig vocht.
Hiervan $\pm 2\text{ cm}^3$ genomen VII
Omentum vertoonde langs de groote curvatuur knobbels, samen ter grootte van een appel en met een gewicht van 100 g.
Verder werden metastasen waargenomen in rechter

zaadstreng, regionale lymphklieren, nieren, lever, peritoneum, diaphragma en longen.

Primaire tumor in rechter testikel was, op een kleine perifere zône na, necrotisch.

Milt was vrij van metastasen.

Naast de 100 g tumorweefsel van de omentummetastasen werd 130 g spierweefsel uitgenomen. Aanvankelijk hadden wij het voornemen om, evenals bij de rattenproef, voor de bepaling aan normaal weefsel de lever te gebruiken. Daar deze echter zeer veel metastasen bevatte, was dit onmogelijk.

De deuteriumanalysen van het bloedvocht leverden op:

I. $0,88 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

valtijd voor oplossing x = 55,2 sec.

" " " 3a = 60,1 "

" " " 4a = 48,7 "

II. $0,94 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

nulstand interferometer = 27

waarde voor oplossing x = 208

" " " 4a = 240

valtijd voor oplossing x = 53,0 sec.

" " " 3a = 61,0 "

" " " 4a = 48,8 "

III. $1,04 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

nulstand interferometer = 27

waarde voor oplossing x = 234

" " " 4a = 241

valtijd voor oplossing x = 50,1 sec.

" " " 4a = 49,0 "

" " " 3a = 60,9 "

IV. $1,04 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

nulstand interferometer = 27

waarde voor oplossing x = 236

" " " 4a = 243

valtijd voor oplossing x = 50,1 sec.

" " " 4a = 48,7 "

" " " 3a = 60,6 "

V. $1,26 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

nulstand interferometer	=	28
waarde voor oplossing x	=	261
" " " 5a	=	293
valtijd voor oplossing x	=	44,5 sec.
" " " 5a	=	40,7 "
" " " 4a	=	49,2 "

VI. $1,12 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

valtijd voor oplossing x	=	47,8 sec.
" " " 4a	=	48,9 "
" " " 5a	=	40,7 "

VII. $1,08 \pm 0,01$ atoomprocent deuterium:

nulstand interferometer	=	28
waarde voor oplossing x	=	239
" " " 4a	=	239,5
valtijd voor oplossing x	=	49,3 sec.
" " " 4a	=	49,1 "

Het is duidelijk, dat het deuteriumgehalte van het lichaamsvocht, als gevolg van de telkens na 24 uur toegediende D_2O -injecties, maximum- en minimumwaarden zal vertoonen. De onder I, II, III, IV, VI en VII genoemde atoompercentages deuterium zijn bepaald van bloed (bij VII van buikvocht), dat van het konijn werd genomen ongeveer 24 uur na een inspuiting met D_2O , juist vóór een nieuwe injectie. Deze percentages geven dus minimumwaarden van het deuteriumgehalte van het lichaamsvocht aan.

De voorbereidende proeven leerden ons, dat het deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistoffen in 24 uur een daling ondergaat van omstreeks 14 procent. Berekenen wij nu met behulp van dit gegeven uit de eerste gevonden minimumwaarde de maximum-

waarde, dan vinden wij hiervoor $\frac{100}{86} \cdot 0,88 = 1,02$ atoomprocent

D (I'), hetgeen overeenkomt met 1,13 gewichtsprocent D_2O . Het laatste percentage geeft het D_2O -gehalte van het lichaamsvocht aan na de injectie met $20,5 \text{ cm}^3$ „zware physiologische keukenzoutoplossing” op het oogenblik, dat de hierin voorkomende $22,3 \text{ g } D_2O$ zich gelijkmatig over de lichaamsvloeistoffen hebben verdeeld.

Stel nu dat de totale hoeveelheid lichaamsvocht van het konijn is x gram, dan geldt:

$$\frac{22,3}{x + 22,3} = \frac{1,13}{100}$$

$$x = 1951$$

De totale hoeveelheid lichaamsvloeistof bedraagt dus 1951 g of drievierde van het lichaamsgewicht van het konijn.

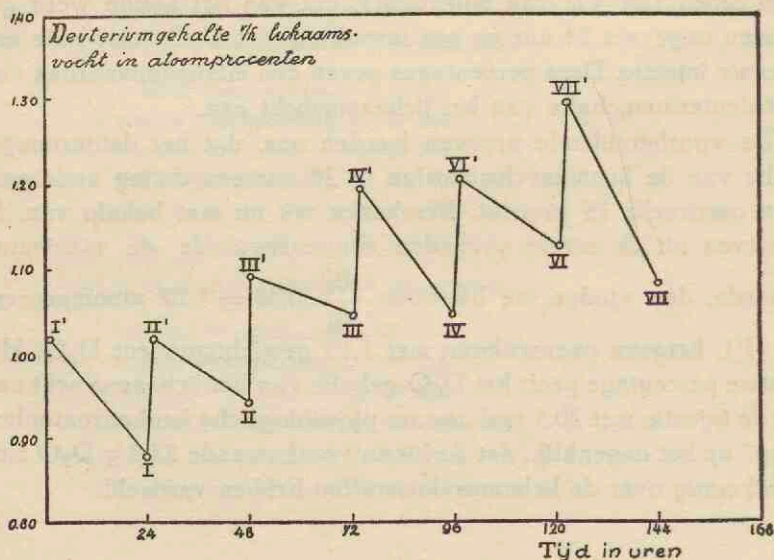
24 Uur na de eerste injectie werd een kleinere hoeveelheid „zware physiologische NaCl-oplossing” ingespoten, namelijk $2,8 \text{ cm}^3$, bevattende 3,05 g D_2O . Deze insputing heeft een verhoging van het deuteriumgehalte der lichaamsvloeistoffen tot gevolg

van $\frac{3,05}{\frac{3}{4} \cdot 2600} = 0,16$ gewichtsprocent D_2O of 0,14 atoomprocent D.

Het deuteriumgehalte wordt hiermede dus $0,88 + 0,14 = 1,02$ atoomprocent (II').

Berekenen wij op dezelfde manier de overige maxima, dan vinden wij achtereenvolgens 1,09 (III'), 1,19 (IV'), 1,20 (VI') en 1,28 atoomprocent D (VII'). De experimenteel gevonden maximumwaarde van 1,26 atoomprocent D (V) ligt iets hoger dan het berekende maximum (1,20 atoomprocent D).

In de volgende figuur is het verloop van het deuteriumgehalte der lichaamsvloeistoffen schematisch voorgesteld:



Voor de latere berekeningen namen wij als deuteriumgehalte van het lichaamsvocht van het konijn het gemiddelde van alle gevonden minima en de daaruit berekende maxima; dit bedroeg 1,08 atoomprocent.

Tumoren en spieren werden, na gemalen, gefractioneerd en gedroogd te zijn, op de gewone wijze verder opgewerkt. Het gewicht van de gemalen tumoren en spieren bedroeg voor het drogen respectievelijk 95 g en 120 g, na het drogen respectievelijk 11 g en 20 g (oplosbaar + onoplosbaar gedeelte).

A. Glutaminezuur uit de spieren. Het ruwe kristallisaat bedroeg 2,030 g. Na tweemaal omkristalliseeren uit een ruime hoeveelheid 20 procentig zoutzuur hielden wij over 1,319 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,58 \cdot 100}{4,99} = + 31^{\circ},7$$

C—H—N-Analyse

4,807 mg stof: 5,72 mg CO₂, 2,32 mg H₂O

3,438 mg stof: 0,231 cm³ N₂ (23°, 771 mm)

C₅H₉O₄N.HCl (183,5) ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64

gev. C 32,45 H 5,40 N 7,86

De deuteriumanalyse gaf als waarde 0,06 ± 0,01 atoomprocent D:

0,180 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl

onverdund verbrand

valtijd voor oplossing x = 162 sec.

" " " 1a = 190 "

" " " 2a = 95,3 "

B. Glutaminezuur uit de tumoren. Het ruwe kristallisaat bedroeg 1,343 g. Na eenmaal omkristalliseeren uit zoo weinig mogelijk 20 procentig zoutzuur verkregen wij 1,110 g. De draaiing hiervan was:

$$[\alpha]_D = \frac{+ 0,94 \cdot 100}{5,07} = + 18^{\circ},5$$

Dit komt overeen met een gehalte aan d(-)-glutaminezuur van 20,8 %.

Door gefractioneerde kristallisatie scheidde wij deze stof daarna in l(+)- en dl-glutaminezuur.

De opbrengst aan l(+)-glutaminezuur-HCl bedroeg na eenmaal omkristalliseeren 0,482 g.

$$[\alpha]_D = \frac{+ 1,62 \cdot 100}{5,09} = + 31^{\circ},8$$

C—H—N-Analyse

4,594 mg stof: 5,46 mg CO₂, 2,22 mg H₂O

4,239 mg stof: 0,277 cm³ N₂ (21°, 777 mm)

ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64

gev. C 32,41 H 5,41 N 7,76

Deuteriumanalyse: 0,37 ± 0,01 atoomprocent D:

0,175 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl

onverdund verbrand

valtijd voor oplossing x = 94,2 sec.

" " " 2a = 94,4 "

De opbrengst aan dl-glutaminezuur-HCl na tweemaal omkristalliseeren bedroeg 0,297 g.

$$[\alpha]_D = \frac{0 \cdot 100}{5,12} = 0^{\circ}$$

C—H—N-Analyse

4,218 mg stof: 5,00 mg CO₂, 2,04 mg H₂O

4,610 mg stof: 0,306 cm³ N₂ (23°, 771 mm)

ber. C 32,70 H 5,50 N 7,64

gev. C 32,33 H 5,41 N 7,77

Deuteriumanalyse: 0,19 ± 0,01 atoomprocent D:

0,180 g gedeutereerd glutaminezuur-HCl

onverdund verbrand

valtijd voor oplossing x = 127 sec.

" " " 1a = 194 "

" " " 2a = 95,5 "

Stel het deuteriumgehalte van het d(-)-glutaminezuur is x atoomprocent, dan geldt:

$$50x + 50(0,37 \pm 0,01) = 100(0,19 \pm 0,01)$$

$$x = 0,01 \pm 0,03$$

Een geheel overeenkomstige door mej. Dr. H. Erxleben uitgevoerde en nog niet gepubliceerde proef leverde de volgende resultaten:

Gemiddeld deuteriumgehalte van het lichaamsvocht $0,97 \pm 0,01$ atoomprocent, deuteriumgehalte van het l(+)-glutaminezuur uit de spieren $0,05 \pm 0,01$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de lever $0,38 \pm 0,01$ atoomprocent, van het l(+)-glutaminezuur uit de tumoren $0,35 \pm 0,01$ atoomprocent en van het d(-)-glutaminezuur uit de tumoren $0 \pm 0,03$ atoomprocent.

HOOFDSTUK VI

SLOTBESCHOUWING

Vóór de bespreking van onze resultaten dienen wij ons eerst met de gegevens en conclusies bezig te houden, welke door andere auteurs op dit nog zeer nieuwe gebied zijn beschreven.

In het jaar 1938 deelde Ussing¹⁹⁾ de volgende proef mede. Een rat kreeg met het normale voer een mengsel van gedeute-reerde aminozuren. Dit mengsel was bereid door caseïne met een oplossing van geconcentreerd H_2SO_4 in zwaar water 24 uur op $170^\circ C$ te verhitten. Verondersteld werd, dat hierbij deuterium vooral op de α -plaats van de — door deze bewerking ten deele geracemiseerde — aminozuren werd ingevoerd. Uit het deuterium-gehalte van een leverproteïne fractie werd berekend, dat na een proeftijd van drie dagen tenminste tien procent van de leverproteïnen nieuw was gevormd, terwijl voor het spierweefsel dit percentage 2,5 bedroeg.

Ongeveer gelijktijdig verschenen de eerste mededeelingen van Schoenheimer en zijn medewerkers over de studie van de proteïnestofwisseling met behulp van isotopen. Deze auteurs konden hierbij steunen op hun rijke ervaringen, die zij hadden opgedaan bij het onderzoek over de stofwisseling van vetten en steroïden met behulp van deuterium. In het kader van deze reeks van publicaties verscheen als veertiende mededeeling²⁰⁾ de beschrijving van proeven, waarbij de lichaamsvloeistoffen van muizen o.a. gedurende tien dagen op een bepaald percentage aan D_2O (1,5 atoomprocent D) werden gehouden. Na afloop van de proef hebben de auteurs een proteïne fractie uit een mengsel van de weefsels gehydrolyseerd, waaruit zij tien aminozuren isoleerden. Hiervan werd het deuteriumgehalte bepaald. De resultaten zijn in de volgende tabel samengevat:

19) H. H. Ussing, *Nature* 142, 399 (1938).

20) G. L. Foster, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.* 125, 13 (1938).

Opneming van deuterium in aminozuren langs biologische weg

	Aan C gebonden H atomen	Deuteriumgehalte van de aminozuren	Deuterium per molecuul aminozuur	"Carbon-bound H actually exchanged"
Glycine	2	0,15 ± 0,02	0,5	23
Leucine	10	0,08 ± 0,01	0,7	7
Lysine-HCl . . .	9	0,00 ± 0,02	0,0	0
Tyrosine	7	0,08 ± 0,02	0,6	7
Proline	7	0,16 ± 0,02	1,0	14
Arginine-HCl . .	7	0,06 ± 0,02	0,6	9
Histidine	5	0,20 ± 0,02	1,3	26
Glutaminezuur .	5	0,37 ± 0,01	2,2	44
Asparaginezuur.	3	0,24 ± 0,04	1,1	37
Cystine	6	0,09 ± 0,03	0,7	12

Zooals men ziet, bevatten alle geïsoleerde aminozuren — behalve lysine — deuterium. In verband met ons onderzoek is het van belang, er op te wijzen, dat verder werd aangetoond, dat het deuteriumgehalte van het glutaminezuur het hoogst is. De auteurs leggen er de nadruk op, dat althans bij enkele aminozuren het deuteriumgehalte in het lichaam zeker hooger was, omdat bij de opwerking niet alleen deuterium van de carboxyl- en aminogroepen volledig, maar ook semilabiel gebonden D-atomen aan koolstof ten deele door H-atomen zijn vervangen.

In de laatste kolom vindt men de percentages "carbon-bound H actually exchanged". Deze getallen zijn het resultaat van een berekening, welke wij voor het glutaminezuur willen toelichten. Van de negen H-atomen van glutaminezuur zijn er vijf aan koolstof gebonden. Indien een H-atoom aan de uitwisseling deelneemt, zal het deuteriumgehalte van het geïsoleerde glutaminezuur, aannemende dat het glutaminezuur geen bijzondere voorkeur voor een van de isotopen protium en deuterium vertoont²¹⁾, bedragen:

$$\frac{\text{D-gehalte van het medium}}{\text{aantal H-atomen in glutaminezuur}} = \frac{1,5 \text{ atoomprocent}}{9} = 0,17 \text{ atoomprocent}$$

21) R. Schoenheimer en D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 114, 381 (1936).

Gevonden werd 0,37 atoomprocent D. Van de vijf aan C gebonden H-atomen zijn er dus $\frac{0,37}{0,17} = 2,2$, dat wil zeggen 44 procent, werkelijk uitgewisseld. Deze waarde — die wij voor het verdere betoog noodig hebben — geeft dus het percentage weer van de maximaal mogelijke deuterium-opneming.

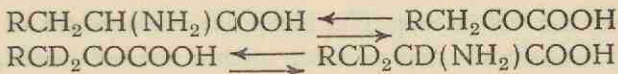
Nu doet zich de vraag voor, op welke wijze de uitwisseling van H- tegen D-atomen in het organisme tot stand komt. Hiervoor zijn twee mechanismen denkbaar, namelijk chemische reacties, die ook in vitro bekend zijn, of de werking van bijzondere enzymen, welke de in vitro stabiel aan C gebonden H-atomen labiliseeren.

Stekol en Hamill²²⁾ hebben beweerd, dat proteolytische enzymen een dergelijke labiliseering veroorzaken; hun experimentele gegevens konden echter door Foster, Keston, Rittenberg en Schoenheimer²³⁾ niet worden bevestigd. De laatstgenoemde auteurs wijzen, behalve op tal van ervaringen bij hun onderzoek over steroïden, vooral op het feit, dat lysine in laatstgenoemde proef deuteriumvrij kon worden geïsoleerd. Het is natuurlijk zeer moeilijk te bewijzen dat dergelijke enzymen inderdaad niet bestaan, maar hun aanwezigheid mag wel als zeer onwaarschijnlijk worden beschouwd.

Als de andere mogelijkheid voor de invoering van D-atomen hebben wij chemische reacties genoemd, welke ook uit proeven in vitro bekend zijn. Schoenheimer en zijn medewerkers wijzen hierbij op het feit dat aminozuren in het organisme volgens talrijke ervaringen gemakkelijk oxydatief gedesamineerd kunnen worden, terwijl de daarbij gevormde keto-zuren omgekeerd weer een reductieve aminering kunnen ondergaan. Nu is het bekend dat keto-verbindingen — eventueel via de enolvorm — ook in vitro heel gemakkelijk de H-atomen op de β -plaats tegen D-atomen kunnen uitwisselen. Ook de reductieve aminering kan tot opneming van aan C gebonden deuterium leiden:

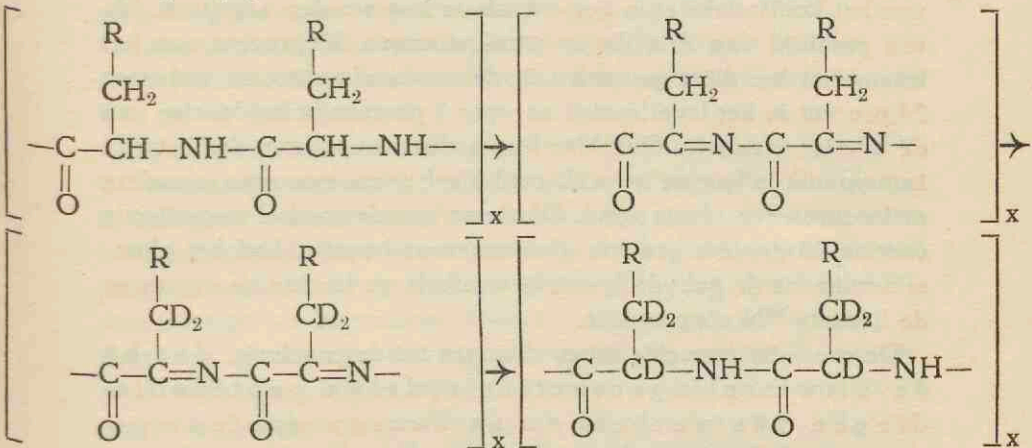
22) J. A. Stekol en W. H. Hamill, *J. Biol. Chem.* 120, 531 (1937).

23) G. L. Foster, A. Keston, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.* 124, 159 (1938).



Deze verklaring staat ontegenzeggelijk op een veel reëelere basis dan de hypothetische H-labiliserende enzymen. Zij impliceert echter, dat de uitwisselingsreacties aan de vrije aminozuren plaats zullen moeten hebben, een moeilijkheid welke Schoenheimer en zijn medewerkers in de desbetreffende publicatie niet discussiëren.

Wil men een soortgelijk mechanisme voor de in eiwitverband aanwezige aminozuren aannemen, dan zouden als tusschenproduct „dehydropeptidasen” moeten optreden:



Dit mechanisme is op zich zelf niet denkbeeldig, aangezien Bergmann en zijn medewerkers²⁴⁾ in de nier een dehydropeptidase konden aantoonen, welke slechts gedehydrateerde dipeptiden splitst.

Meer recente onderzoeken van Schoenheimer en zijn medewerkers leeren echter, dat men met de hier door ons geopperde mogelijkheid van het intermediaire optreden van dehydropeptide-structuren niet uitkomt. Schoenheimer, Ratner en Rittenberg²⁵⁾ voerden namelijk een volwassen rat tien dagen lang een gewoon dieet, waaraan echter was toegevoegd dl-tyrosine, ge-

24) M. Bergmann en H. Schleich, Z. physiol. Chem. 205, 65 (1932).

25) R. Schoenheimer, S. Ratner en D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 127, 333 (1939).

merkt met het ^{15}N isotoop. Het bleek dat reeds na tien dagen tenminste 8 procent van het tyrosine uit het voedsel in de proteïnen was ingebouwd. Zeer merkwaardig is echter het resultaat, dat het uit de proteïnen van de rat geïsoleerde glutaminezuur, asparaginezuur, histidine, arginine en ook de amidestikstof ^{15}N bevatte. In lysine werd geen ^{15}N gevonden; daarentegen moet het isotoop wel in een deel van de niet geïsoleerde aminozuren aanwezig zijn geweest. In het jaar 1939 verscheen van dezelfde auteurs een publicatie over voedingsproeven met l(—)-leucine²⁶). Dit aminozuur was nu niet alleen met ^{15}N maar ook met D-atomen gemerkt, zoodat het lot van de aminogroep en onafhankelijk daarvan ook het lot van het koolstofskelet in het organisme kon worden nagegaan. Na een proeftijd van drie dagen werd minstens 32 procent van het leucine uit het diëet gevonden in de proteïnefracties, en wel voor 24 procent in het leverleucine en voor 7 procent in het leucine van de overige weefsels. Ook hier kwam dus naar voren, dat het ^{15}N isotoop niet in leucine gelocaliseerd bleef, maar eveneens in andere aminozuren een plaats vond. Ofschoon het als voedsel toegediende caseïne 20 procent gewoon glutaminezuur bevatte, had het glutaminezuur uit de gehydrolyseerde weefsels op leucine na verreweg de hoogste ^{15}N concentratie.

De zoo juist vermelde feiten dwingen tot de conclusie, dat bij de uitwisselingsreacties tijdelijk peptidebindingen zijn verbroken en daarna opnieuw gevormd. „It has been shown that nitrogenous groupings of tissue proteins are constantly involved in chemical reactions; peptide linkages open, the amino acids liberated mix with others of the same species of whatever source, diet, or tissue. This mixture of amino acid molecules, while in the free state, takes part in a variety of chemical reactions: some reenter directly into vacant positions left open by the rupture of peptide linkages; others transfer their nitrogen to deaminated molecules to form new amino acids”. Deze conclusie van de Amerikaansche auteurs geeft een inzicht in de dynamiek van de weefselproteïnen zooals men die tot dusverre nauwelijks kon voorspellen.

26) R. Schoenheimer, S. Ratner en D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 130, 703 (1939).

Terwijl de hierboven woordelijk aangehaalde slotzinnen suggereren, dat de auteurs aan een partieele vernieuwing van bouwsteenen denken: „vacant positions left open by the rupture of peptide linkages”, hebben zij in dezelfde publicatie als andere mogelijkheid ook de volledige afbraak van de proteïnen tot de bouwsteenen en daarop volgende resynthese genoemd. A. E. Braunstein²⁷⁾ merkt hiertoe op, dat hij de laatstgenoemde mogelijkheid meer waarschijnlijk acht.

Voorloopig zal aan een van deze twee mogelijkheden geen voorkeur mogen worden gegeven. Wanneer wij een beeld zouden willen gebruiken, komt de kwestie hierop neer, dat bij een huis op vele plaatsen baksteenen worden uitgebroken en door nieuwe vervangen; in het andere geval zal het geheele gebouw worden gesloopt, waarna uit de brokstukken en nieuw materiaal wederom een huis wordt geconstrueerd.

Bij de gewone stofwisseling ter instandhouding van het leven is verbruik en toevoer een noodzakelijk verschijnsel; op zich zelf is ook het verslijten en weer aanmaken van gecompliceerde lichaamsbestanddeelen zooals bijvoorbeeld haemoglobine enz. een proces, dat de biochemie reeds lang kent. Door de onderzoekingen met isotopen als indicatoren hebben wij nu echter geleerd, dat de constante vernieuwing een veel algemeener en veel sneller verloopend verschijnsel is, dan men zich tot nu toe dacht. Het merkwaardigste is, dat deze processen in het geheele organisme optreden, zonder dat het histologisch onderzoek daarvan iets kan waarnemen. Het gebruikte beeld van het slopen en weer opbouwen van een huis schiet te kort in de taak het verschijnsel nader tot ons begrip te brengen. Men kan het morphologisch beeld van organismen of van weefsels beter vergelijken met dat van een sierfontein, waarbij de met het oog zichtbare constante vorm eveneens onder voortdurende vernieuwing van de stof tot stand komt.

Reeds in hun eerste mededeeling over de chemie der tumoren hebben Kögl en Erxleben op de beteekenis van de voort-

27) A. E. Braunstein, *Enzymologia* 7, 34 (1939).

durende organische vernieuwing voor het kankervraagstuk ge-
wezen²⁸⁾). De sindsdien elders opgedane ervaringen bij normale
weefsels hebben dit inzicht nog verdiept, waardoor het voor de
hand lag om de nieuwe methodiek ook voor het onderzoek van
tumorweefsels te gebruiken.

In de eerste plaats was het van belang na te gaan of gedeute-
reerd l- en d-glutaminezuur, dat met het voedsel wordt toegediend,
de weg naar de proteïnen van het tumorweefsel vindt. Weliswaar
moet hierbij onmiddellijk op een principieel verschil met andere
voedingsproeven worden gewezen. De door Schoenheimer
en zijn medewerkers als voeding toegediende aminozuren l-tyrosine
en l-leucine behooren tot de zoogenaamde onontbeerlijke
aminozuren; volgens de definitie van Rose²⁹⁾ zijn dat die
aminozuren, welke door het dierlijk organisme niet met de voor de
normale groei vereischte snelheid kunnen worden gesynthetiseerd.
Het glutaminezuur behoort echter tot de ont-
beerlijke aminozuren, d.w.z. dat het door het dierlijk
organisme in de benodigde hoeveelheid en in de vereischte tijd
zelf wordt geproduceerd. Dit verschil brengt met zich mede, dat
wij van te voren bij toediening van gemerkt l(+)-glutaminezuur
minder duidelijke resultaten kunnen verwachten, dan bij een ont-
beerlijk aminozuur. Immers wij kunnen ons voorstellen, dat ont-
beerlijke aminozuren evenals vitaminen door de plaatsen, waar zij
benodigd zijn, gretig worden aangetrokken. In tegenstelling daar-
mede zal het glutaminezuur in de weefsels zelf geproduceerd
worden, waarvoor het door de koolhydraatstofwisseling geleverde
 α -ketoglutaarzuur als uitgangsmateriaal dient.

Inderdaad toonden onze proeven, dat na voeding met gedeute-
reerd l(+)-glutaminezuur (7,4 atoomprocent D) het l-glutamine-
zuur uit de lever en dat uit de benzopyreen-tumoren van ratten
slechts 0,07 atoomprocent deuterium bevat. Na afsluiting van ons
werk kregen wij een publicatie van Ussing³⁰⁾ in handen, waarin
voedingsproeven met gedeutereerd glutaminezuur bij normale ratten

28) F. Kögl en H. Erxleben, Z. physiol. Chem. 258, 57 (1939), blz.
88 en 89.

29) W. C. Rose, Physiol. Rev. 18, 109 (1938).

30) H. H. Ussing, C. 1942, I, 377.

worden beschreven. Ook deze auteur vond, dat het na afloop uit de lever geïsoleerde glutaminezuur zoo goed als geen deuterium bevatte.

Ten opzichte van het gevoederde d(—)-glutaminezuur was het resultaat van te voren moeilijk te voorspellen. In het jaar 1940 hebben Ratner, Schoenheimer en Rittenberg³¹⁾ voedingsproeven met door D en ¹⁵N gemerkt d(+)-leucine, dus de niet-natuurlijke antipode, beschreven. Zooals op grond van andere ervaringen uit de literatuur te verwachten was, bleek het organisme van de rat in staat te zijn het niet-natuurlijke leucine via het α -keto-zuur tot het natuurlijke leucine te invertieren. Zou nu het d-glutaminezuur voor de tumorcellen bij wijze van spreken ook een „onontbeerlijk aminozuur” zijn en gretig worden opgenomen? Uit onze proef kan men berekenen, dat het d(—)-glutaminezuur uit de tumorproteïnen na de toediening van gedeutereerd d-glutaminezuur (7,5 atoomprocent D) eveneens slechts weinig of geen deuterium heeft opgenomen. Dit leidt tot de conclusie, dat ook het d-glutaminezuur in de tumorcellen zelf wordt gesynthetiseerd. Aangezien met de mogelijkheid te rekenen valt, dat in plantaardige proteïnen ook een klein percentage aan d-glutaminezuurbouwsteenen voorkomt³²⁾, was het mogelijk dat dergelijke proteïnen voor de kankerlijders niet onbedenklijk zijn. Onze proeven geven echter geen aanleiding, dat een dergelijke vrees gegrond zou zijn.

Schoenheimer en zijn medewerkers wijzen er op, dat bij hun proefnemingen het leucine, dat slechts op de α -plaats door isotopen is gemerkt, geringe waarde zou bezitten, omdat in dit geval de isotope atomen door de desamineering verdwijnen. Het door ons gevoerde dl-glutaminezuur was door deuteriereing van α -ketoglu-taarzuur in ammoniakale oplossing bereid en zal de deuteriumatomen voor een groot deel op de α -plaats hebben opgenomen. Dit speelt echter voor onze probleemstelling geen rol, daar wij niet bij het lot van het koolstofskelet zijn geïnteresseerd; zoodra het d(—)-glutaminezuur door oxydatieve desamineering in α -ketoglu-taarzuur

31) S. Ratner, R. Schoenheimer en D. Rittenberg, J. Biol. Chem. 134, 653 (1940).

32) Vgl. F. Kögl en H. Erxleben, Z. physiol. Chem. 264, blz. 112 noot 11 (1940).

overgaat is het asymmetriecentrum opgeheven en zijn de verdere omzettingen voor ons zonder belang geworden.

Een ander bezwaar, dat tegen onze proef zou kunnen worden ingebracht, is de mogelijkheid dat het dl-glutaminezuur door het lichaam van de ratten niet wordt geresorbeerd. Tegen een uitscheiding in urine en faeces pleit echter het nog niet vermelde resultaat, dat de lichaamsvloeistoffen van de ratten na afloop van de proef 0,03 atoomprocent deuterium bevatten. Dit wijst er op, dat het gedeutereerde glutaminezuur in het lichaam wordt omgezet en men zou zelfs kunnen aannemen, dat de kleine atoompercentages D, welke in de glutaminezuurbouwsteen zijn gevonden, indirect door het iets verhoogde deuteriumgehalte van de lichaamsvloeistof worden veroorzaakt.

Terwijl de voedingsproeven geen karakteristiek verschil tusschen de l- en de d-glutaminezuurbouwsteen lieten zien, hebben wij bij de in hoofdstuk IV en V beschreven proeven wel degelijk een opvallend onderscheid tusschen de twee antipoden kunnen constateeren.

Bij de twee in ons laboratorium uitgevoerde proeven met *Brown-Pearce*-konijnen werd een in de literatuur nog niet beschreven techniek toegepast. In een voorproef met een normaal konijn werd geconstateerd, dat een over een half uur geprotraheerde injectie van 10 cm³ „zware physiologische keukenzoutoplossing” goed wordt verdragen en dat hierna het D₂O-gehalte van het lichaamsvocht dagelijks omstreeks veertien procent daalt. Bij de konijnen met *Brown-Pearce*-tumoren werd dienovereenkomstig dagelijks een bepaalde hoeveelheid D₂O bijgespoten, zoodat wij gedurende de proeftijd van een week steeds met een tusschen 0,88 en 1,28 atoomprocent schommelend deuteriumgehalte werkten. Daarenboven moesten wij om experimenteele redenen, die in hoofdstuk V zijn genoemd, ons voor de eigenlijke proef er van overtuigen, dat de konijnen voor de inspuiting met D₂O inderdaad kleine metastasen in het omentum bezaten. Deze bleken dan na afloop van de proef inderdaad te zijn gegroeid tot vrij groote gezwellen.

R. *Schoenheimer* en zijn medewerkers hebben bij hun, in deze dissertatie reeds uitvoerig beschreven, proeven gevonden, dat de proteïnen van de verschillende organen, respectievelijk weef-

sels, zeer verschillende hoeveelheden aan isotopen opnemen. De auteurs vergeleken de „relatieve chemische activiteit" van de verschillende proteïnen en vonden, dat de serumproteïnen bij de uitwisseling de hoogste activiteit vertoonen; de inwendige organen (darmwand, lever, nier, hart, milt, testis) zijn iets minder actief. Spier en huid toonen naar verhouding een geringe activiteit. Uit onze proeven bij tumordragende dieren blijkt, dat de uitwisseling van de H-atomen tegen D-atomen bij de l-glutaminezuurbouwsteen van de tumoren even groot is als bij die van de lever. In overeenstemming met het bovenvermelde resultaat van de Amerikaanse auteurs vonden ook wij bij het l-glutaminezuur uit het spierweefsel een veel kleiner deuteriumgehalte. Wanneer wij uitgaan van het feit, dat van de negen H-atomen van glutaminezuur vijf stabiel — dus aan C — zijn gebonden, dan laat zich volgens de op blz. 49 beschreven wijze berekenen, dat in de spieren 10 procent en in de tumor 62 procent van de theoretisch mogelijke uitwisseling van H-, respectievelijk D-atomen heeft plaats gehad. Houden wij er rekening mede, dat van de genoemde vijf H-, respectievelijk D-atomen van glutaminezuur slechts drie de hydrolyse practisch zonder uitwisseling kunnen doorstaan, dan komen wij bij de tumor zelfs tot 100 procent van de theoretisch mogelijke uitwisseling.

Het is een verrassend nieuw feit, dat het d-glutaminezuur uit de Brown-Pearce-tumoren bij deze proeven vrijwel geen deuterium bevat; om misverstand te voorkomen moeten wij er echter direct aan toevoegen: geen stabiel gebonden deuterium, daar labiel gebonden D-atomen bij de hydrolyse van de proteïnen door uitwisseling verloren gaan. Uit dit resultaat zijn verschillende conclusies te trekken, welke tot nieuwe experimenten aanleiding gaven en eerst in latere publicaties van ons laboratorium zullen worden gediscussieerd. Hier kan reeds op één conclusie worden gewezen, die voor het algemeene vraagstuk van belang is. Zooals in de inleiding kort werd vermeld, zijn verschillende auteurs in andere laboratoria er niet in geslaagd dl-glutaminezuur uit de hydrolysaten van tumorproteïnen te isoleeren. Zij meenden daarom de positieve resultaten van ons laboratorium door een min of meer toevallige racemisatie van het l-glutaminezuur te kunnen verklaren. Afgezien van het feit, dat verschillende andere onderzoekers bij koken van l-glutaminezuur met geconcentreerd zoutzuur gedurende de voor

de hydrolyse gebruikelijke tijd practisch geen racemisatie vonden³³), wordt de mogelijkheid van een secundaire racemisatie door onze nieuwe resultaten op onafhankelijke wijze weerlegd. Immers uit een l-glutaminezuur met stabiel gebonden D-atomen zou bij de racemisatie een dl-glutaminezuur moeten ontstaan met hetzelfde D-gehalte. Daaruit zien wij, dat reeds in het lichaam een verschil tusschen de l- en d-bouwsteen bestaat. Dit kan uiteraard slechts tot stand komen, indien de bij de uitwisseling in vivo een rol spelende biochemische reacties bij de beide antipoden niet identiek verlopen.

De in hoofdstuk IV beschreven drinkproeven bij ratten met benzopyreen-tumoren hebben getoond, dat tusschen de twee diersoorten en de twee typen van tumoren (de entumor en het door een cancerogene koolwaterstof verkregen gezwel) geen principieel verschil bestaat. Bij de zeven dagen durende drinkproef die op ratten met benzopyreen-tumoren werd toegepast, bevatte het d-glutaminezuur in tegenstelling tot de l-vorm eveneens nauwelijks deuterium. Het is zeer interessant, dat bij de twaalf dagen durende tweede proefserie ook in de d-vorm deuterium werd gevonden, hier echter ook minder dan in de l-bouwsteen; er was in de d-vorm 26 procent, in de l-vorm 57 procent van de theoretisch mogelijke uitwisseling opgetreden. Vermoedelijk zal bij een nog langere duur van de proef het verschil in deuteriumgehalte van de beide antipoden hoe langer hoe kleiner worden, totdat tenslotte bij een proeftijd van bijvoorbeeld drie tot vier weken beide bouwsteen en hetzelfde percentage deuterium zullen aanwijken.

33) K. Kögl en H. Erxleben, *Z. physiol. Chem.* 264, 202 (1940); E. Abderhalden en O. Böhm, *Z. physiol. Chem.* 266, 41 (1940); A. C. Chibnall, M. W. Rees, E. F. Williams en E. Boyland, *Biochem. J.* 34, 285 (1940).

INHOUD

	Blz.
I. Inleiding	1
II. Gedeutereerd glutaminezuur	11
1. De bepaling van het deuteriumgehalte	11
2. Gedeutereerd l(+)- en d(-)-glutaminezuur	14
3. Gedeutereerd dl-glutaminezuur	17
III. Voedingsproeven met gedeutereerd glutaminezuur bij ratten met benzopyreen-tumoren	21
IV. D ₂ O-proef bij ratten met benzopyreen-tumoren	30
V. D ₂ O-proef bij een konijn met B r o w n - P e a r c e-tumoren	36
1. Voorbereidende proeven	36
2. De eigenlijke D ₂ O-proef	39
VI. Slotbeschouwing	48

STELLINGEN

I

Er bestaat een essentiëel verschil in de stofwisseling van l(+)- en d(-)-glutaminezuur in tumorproteinen.

II

De verklaring, welke de Bruyn geeft voor het E_J -verloop van een AgJ-sol met amicronen bij toevoegen van $Ce(NO_3)_3$, is in tegenspraak met zichzelf.

H. de Bruyn, Diss. Utrecht, 1938.

III

Voor het onderzoek op faecaalverontreiniging van drinkwater biedt de door Gärtner uitgewerkte methode ten opzichte van de gebruikelijke methodiek zekere voordeelen.

K. Gärtner, Z. Hyg. 122, 661 (1940).

IV

De proeven van Münzberg over de aard der binding in de aromatische kern zijn ook met starre dubbele bindingen te verklaren. De berekende gemiddelde tijden voor het verspringen van de dubbele bindingen hebben dus weinig beteekenis.

F. K. Münzberg, Z. phys. Chem. B 33, 23, 39 (1936).

V

Uit de onderzoekingen van Lunde, Kringstad en Jansen mag men niet besluiten, dat het pantotheenzuur identiek is met de „anti-grijs haar” factor B_x .

G. Lunde, H. Kringstad en E. Jansen, Naturwissenschaften 29, 62 (1941).

D. W. Woolley, C 1941, I, 915; J. Biol. Chem. 136, 113 (1940).

VI

De structuurformule, welke Dutt en Thorpe geven voor het α -dimethylsuccinylfluorescine, volgt niet uit de door hen uitgevoerde afbraak met KOH.

S. Dutt en J. F. Thorpe, J. Chem. Soc. 125, 2524 (1924).

VII

Uit de proeven van Karrer, Geiger en Bretscher volgt, dat vitamine A₂ een volkomen hypothetische stof is.

P. Karrer, A. Geiger en E. Bretscher, Helv. 24, 161E (1941).

19