

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser **IX**, 3.

EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER

OVER

FORSKELLIGE ELEKTROLYTERS IND-
FLYDELSE PAA DIFTERITOKSINETS OG
DET ANTIDIFTERISKE SERUMS STABI-
LITETS- OG NEUTRALISATIONSFORHOLD

MED SÆRLIGT HENBLIK PAA

REAKTIONSHASTIGHEDEN IMELLEM TOKSIN
OG ANTITOKSIN

AF

S. SCHMIDT

(STATENS SERUM-INSTITUT)



KØBENHAVN

HØVEDKOMMISSIONÆR: ANDR. FRED. HØST & SØN, KGL. HOF-BOGHANDEL
BIANCO LUNOS BOGTRYKKERI A/S

1930

Pris: Kr. 5.50.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskabs videnskabelige Meddelelser udkommer fra 1917 indtil videre i følgende Rækker:

Historisk-filologiske Meddelelser,
Filosofiske Meddelelser,
Mathematisk-fysiske Meddelelser,
Biologiske Meddelelser.

Hele Bind af disse Rækker sælges 25 pCt. billigere end Summen af Bogladepriserne for de enkelte Hefter.

Selskabets Hovedkommissionær er *Andr. Fred. Høst & Søn*, Kgl. Hof-Boghandel, København.

Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab.

Biologiske Meddelelser **IX**, 3.

EKSPERIMENTELLE UNDERSØGELSER

OVER

FORSKELLIGE ELEKTROLYTERS IND-
FLYDELSE PAA DIFTERITOKSINETS OG
DET ANTIDIFTERISKE SERUMS STABI-
LITETS- OG NEUTRALISATIONSFORHOLD

MED SÆRLIGT HENBLIK PAA

REAKTIONSHASTIGHEDEN IMELLEM TOKSIN
OG ANTITOKSIN

AF

S. SCHMIDT

(STATENS SERUM-INSTITUT)



KØBENHAVN

HOVEDKOMMISSIONÆR: ANDR. FRED. HØST & SØN, KGL. HOF-BOGHANDEL
BIANCO LUNOS BOGTRYKKERI A/S

1930

Nærværende Arbejde belønnes med
Det kgl. Danske Videnskabernes Selskabs Guldmedalje.

FORORD

Dette arbejde danner en foreløbig afslutning paa en række undersøgelser over toksiners og antitoksiners egenskaber, som paabegyndtes i 1922, og som delvis er udført i samarbejde med min udmærkede lærer og chef, Dr. THORVALD MADSEN, hvem jeg herved bringer min varmeste tak for den store interesse og for den enestaaende støtte han paa alle maader stedse har vist mig. En del af de elektrometriske brintionmaalinger er udført paa Carlsberg Laboratoriet. Saavel laboratoriets Direktør, Hr. Professor S. P. L. SØRENSEN, som hans medarbejdere, Fru Professorinde S. P. L. SØRENSEN, Dr. LINDERSTRØM-LANG og Cand. HAUGAARD er jeg megen tak skyldig for deres elskværdige gæstfrihed og vejledning, samt for lejligheden til at stifte bekendtskab med Carlsberg Laboratoriets arbejdsmetoder, hvilket paa mange maader er kommet mig tilgode under mit arbejde.

Cand. pharm. Frøken FJORD NIELSEN og Frøken ELSE STEENBERG takker jeg for deres udmærkede hjælp i laboratoriet.

Forfatteren.

INDHOLDSFORTEGNELSE

| | Side |
|--|------|
| Indledning | 5 |
| Eksperimentel Del | 14 |
| 1. Brintionkoncentrationens indflydelse paa stabiliteten af toksin og antitoxin | 17 |
| a) Forsøg med toksin | 17 |
| b) Forsøg med antitoxin | 48 |
| 2. Forskellige saltes indflydelse paa stabiliteten af toksin og anti- toksin | 62 |
| a) Forsøg med toksin | 62 |
| b) Forsøg med antitoxin | 74 |
| 3. Elektrolyternes indflydelse paa reaktionshastigheden imellem toksin og antitoxin | 80 |
| a) Forsøg in vitro | 88 |
| I. Brintionkoncentrationens indflydelse | 88 |
| II. Forskellige saltes indflydelse | 90 |
| b) Kontrolforsøg udførte paa dyr | 115 |
| I. Kontrolforsøg over brintionkoncentrationens indflydelse | 115 |
| II. Kontrolforsøg over forskellige saltes indflydelse | 117 |
| 4. Teoretiske betragtninger | 128 |
| 5. Sammenfattende oversigt | 135 |
| 6. Literaturfortegnelse | 139 |

INDLEDNING

Skønt antigener og antistoffer har været kendt i omkring en menneskealder, ved vi ikke væsentligt mere om deres sammensætning nu end for 30—40 aar siden. Vi maa nøjes med at karakterisere dem ved angivelse af deres virkninger paa den dyriske organisme og ved deres forhold til hinanden indbyrdes.

Foreløbig maa studiet af disse stoffers natur ogsaa ske ved eksperimenter i de to nævnte retninger, idet tiden næppe er moden for nøjere undersøgelse af deres kemiske konstitution.

Den vanskelighed, som først af alle stiller sig i vejen for eksperimentatoren, der vil forsøge at isolere de virk-somme bestanddele af antigen- og antistofopløsninger bunder i, at begge elementer er relativt instabile. De mister deres karakteristiske egenskaber, hvis de udsættes for højere temperaturer; som regel har en kortvarig opvarmning til 60—70° en fatal virkning i saa henseende. Noget lignende finder sted ved indvirkning af forskellige grundstoffer eller kemiske forbindelser (f. eks. klor, jod, syrer, alkalier o. s. v.). Systematiske undersøgelser herover findes der alligevel forholdsvis faa af. Undersøgelser, hvis resultater kaster et vist lys over disse problemer, er oftest blevet udført med specielle formaal for øje. Saaledes har forsøg paa at finde vel

egnede antiseptika, eventuelt konserverende substanser, for antigen- eller antistofopløsninger nu og da givet interessante, men meget spredte oplysninger i saa henseende. Det samme gælder om de forskellige forsøg, der i tidens løb er blevet udført i den hensigt at fremstille »rene« antigen- eller antistoffer.

I almindelighed antager man, at saavel antigenerne som antistofferne er proteiner, eller bestaar af forbindelser med saadanne. Grunden til denne opfattelse er, at det hidtil ikke er lykkedes med sikkerhed at fremstille proteinfri forbindelser, som besidder henholdsvis antigen- eller antistofkarakter. Det mangler ganske vist ikke paa angivelser i litteraturen af, at saadanne forsøg skulde være lykkedes, men eksperimenterne har aldrig kunnet staa for en kritisk efterprøvning. Imidlertid afgiver det faktum, at man ikke har kunnet fremstille proteinfri forbindelser, der opfører sig som antigen- eller antistoffer efter min mening ikke nogen solid basis for en slutning angaaende disse elementers mulige proteinkarakter. Det er i denne forbindelse interessant at bemærke, at man stedse har hævdet og endnu paastaar (selv i de nyeste haand- og lærebøger over immunitet kan denne anskuelse forefindes), at differiantitoksinet er »knyttet til« den globulinfraktion af serum, der sædvanligvis benævnes pseudoglobulin, og at det ikke kan skilles herfra. Det er ganske vist godtgjort, at antitoksin ved udsaltning med f. eks. natrium eller ammoniumsulfat hovedsagelig findes i pseudoglobulinfraktionen, medens euglobulinerne og albuminet kun indeholder spor heraf.¹ Men

¹ Dette afhænger iøvrigt meget af det enkelte serums bygning og af den maade, hvorpaa saltfældningen foretages. Nogen skarp grænse imellem euglobulin og pseudoglobulin findes som bekendt ikke (S. P. L. SØRENSEN).

dette siger jo kun, at antitoksinet har fældningsgrænser, der ligger nær ved pseudoglobulinets. De sidste aars undersøgelser har nu vist, at antitoksinet endog meget let kan fjernes fra serumglobulinerne. Ved simpel blanding af antidifterisk serum og det specifikke toksin i passende mængdeforhold faar man dannet et fint, fnugget bundfald, som indeholder alt toksinet og alt antitoksinet, der fandtes i de to opløsninger; men kvantitativt udgør bundfaldet kun en ringe brøkdel af de forhaandenværende proteinstoffer.

Difterigiften er uden tvivl et af de bedst undersøgte af alle antigene stoffer. Ligeledes har man blandt antistofferne i særlig grad haft opmærksomheden henvendt paa difteri-antitoksinet.

Indtil for faa aar siden foregik undersøgelser over disse to stoffers stabilitets- og neutralisationsforhold stedse under anvendelse af dyr (marsvin, kaniner). Dette satte naturligvis hurtigt en grænse for forsøgenes udstrækning, ligesom man her maatte regne med noget usikre forsøgsresultater paa grund af dyrenes individuelle forskelligheder. Af denne grund er nøjagtigheden man opnaar ved saadanne undersøgelser i høj grad afhængig af, hvor mange individer der benyttes til de enkelte forsøg. Man vil faa et begreb om disse forhold ved at læse i en af EHRlich's afhandlinger over kvantitative toksin- og antitoksinbestemmelser, at der til en nøjagtig fastlæggelse af d. m. m.¹ for et toksin er anvendt over hundrede marsvin.

Disse omstændigheder medførte imidlertid ogsaa, at man tidligere i maaske for høj en grad hæftede sin opmærksomhed ved toksinets giftegenskaber og kun i mindre udstrækning tog hensyn til den antitoksinneutraliserende og den antigene evne. Herved opstod der et vist ensidigt syn

¹ Se side 10.

paa mange forhold, som undertiden blev tydet urigtigt, og om hvilke der først er skabt den fornødne klarhed, efter at man, takket være RAMON's betydningsfulde arbejder, nu er i stand til at studere difteritoksinets og difteriantitoksinets egenskaber ved hjælp af den af ham indførte fysisk-kemiske toksin-antitoxin-reaktion. Men netop med de talrige eksperimentelle vanskeligheder for øje, som klarlægelsen af disse problemer frembyder, maa man erkende ikke alene den grundighed og taalmodighed, som de forskere (ROUX & YERSIN, BEHRING & KITASATO, EHRLICH, ARRHENIUS & MADSEN, MORGENROTH, KRAUS), der i slutningen af forrige og begyndelsen af dette aarhundrede udførte de store, banebrydende arbejder over toksiners og antitoksiners egenskaber, var i besiddelse af, men ogsaa de vigtige resultater, deres undersøgelser frembragte, resultater, som i alt væsentligt er blevet bekræftet gennem de sidste aars eksperimenter udførte uden medvirkning af den dyriske organisme, selv om man maaske nu vil være tilbøjelig til at tyde dem paa en anden maade end da.

Inden jeg gaar over til den eksperimentelle del af mit arbejde, skal jeg kort gennemgaa difteritoksinets og det antidifteriske serums vigtigste egenskaber samt med faa ord omtale neutralisationsprocessen imellem toksin og antitoxin.

Difteritoxin.

Naar man i daglig tale bruger benævnelsen difteritoxin, mener man sædvanligvis hermed en bouillon, hvori der har vokset difteribaciller, og som derved har faaet toksiske og antigene egenskaber.

Toksinets vigtigste egenskaber er følgende:

1) Det er i stand til at forgifte (dræbe) mennesker og visse dyr, naar det indføres i organismen uden om fordøjelseskanalen. Ved sektion af difteriforgiftede dyr kan der paavises bestemte, konstant optrædende, patologisk-anatomiske forandringer (ROUX & YERSIN).

2) Naar difteritoksin indføres i organismen, dannes et specifikt antitoksin, som lader sig paavise i det behandlede dyrs blod (serum) (BEHRING & KITASATO).

3) Difteritoksin ophæver virkningen af difteriantitoksin, en proces, der kan finde sted in vitro (EHRlich).

4) Ved indvirkning af difteritoksin paa difteriantitoksin dannes under visse omstændigheder en præcipitation (udfugning), der indeholder saavel toksinets som antitoksinets virksomme principer (RAMON).

Toksinets tre førstnævnte egenskaber har været kendt og studeret saa at sige siden dets opdagelse (1888), medens udfugningsevnen først paavistes 1922.

Difteriantitoksin.

Ved difteriantitoksin forstås undertiden det virksomme stof i serum af difteriimmuniserede dyrs blod, men ofte bruges denne benævnelse ogsaa om selve det antidifteriske serum. For at undgaa misforstaaelser, vil jeg saa vidt muligt søge at holde de to betegnelser adskilt ved kun at benytte ordet antitoksin om det virksomme princip i antidifterisk serum.

Antitoksinets specifikke egenskaber er følgende:

1) Difteriantitoksin virker beskyttende og helbredende overfor difteriforgiftningen.

2) Det er i stand til in vitro at neutralisere difteritoksin, hvorved der kan opstaa en præcipitation (udfnugning).

For paa en bekvem maade at karakterisere toksinets og antitoksinets immunologiske egenskaber, har man indført forskellige korte betegnelser (enheder). Antitoksinet tjener som basis for maalingen, idet man antog dette for at være mere stabilt end toksinet.

Enheder for Antitoksin.

1) En antitoksinenhed (*AE*) er en af EHRlich een gang for alle bestemt fastsat (men vilkaarlig valgt) mængde antitoksin (nemlig den mængde der netop neutraliserede $100 \times d. m. m.$ ¹ af en tilfældig diftergift som EHRlich arbejdede med).

2) En bindingsenhed (*BE*) udgør $1/200$ af en *AE*.

Enheder for Toksin.

3) Mindste dræbende dosis (*dosis minima mortalis* eller *lethalis*, *d. m. m.*, *d. m. l.*) er den mængde af et givet toksin angivet i cm^3 , som ved subkutan injektion dræber et marsvin paa 250 g i løbet af 4—5 døgn.

4) L_0 (*limes nul*) er den maksimale toksinmængde, angivet i cm^3 , som, blandet med 1 *AE*, ved subkutan injektion paa et marsvin, der vejer 250 g, ikke fremkalder hverken lokale eller almene symptomer paa difteriforgiftning.

5) En bindingsenhed = $1/200 L_0$.

6) L_+ , $L_?$ (*limes plus*, *limes død*) er den mængde af et givet toksin, angivet i cm^3 , som, blandet med 1 *AE*, efter subkutan injektion dræber et marsvin paa 250 g i løbet af 4—5 døgn.

¹ Se nedenfor.

7) En antigenenhed (= 1 immuniseringsenhed = IE) er den mængde af et givet toksin, angivet i cm^3 , som, blandet med 1 AE , først giver udfnugning. Denne størrelse benævnes undertiden L_f .

8) K_f betegner for et givet toksin (serum) det antal timer (minuter), som ved en nærmere angiven temperatur foreløber fra det tidspunkt, da toksin og antitoxin er bragt i kontakt og til titerudfnugningens indtræden.

9) K_n angiver den tid, som hengaar fra det øjeblik, hvor toksin og antitoxin bringes i kontakt, til neutralisationsprocessen har naaet ligevægtsstadiet.

De seks første betegnelser skyldes EHRlich. RAMON har inført begrebet »antigenenhed«¹, der af GLENNY & OKELL kaldes L_f ². Udtrykkene K_f og K_n er foreslaaet af S. SCHMIDT.

¹ I anledning af RAMON's definition af antigenenheden, turde det maaske være af betydning at henlede opmærksomheden paa TH. MADSEN & S. SCHMIDT's undersøgelser, som viser, at det ikke er ligegyldigt, hvilket serum, der anvendes til indstilling af toksinet. Ganske enkelte sera fnugger ikke ud, og hos en vis procentdel findes en uoverensstemmelse imellem *in vitro* og *in vivo*-titreringsresultaterne. MADSEN & SCHMIDT anbefaler derfor at titrere et større antal sera, som stammer fra forskellige individer, baade efter EHRlich's og efter RAMON's metode, for paa grundlag af de saaledes opnaaede resultater at udvælge et særligt velegnet serum som standard. RAMON's definition vil da faa følgende udtryk: Ved en antigenenhed forstås den mængde af et givet toksin, udtrykt i cm^3 , som, blandet med 1 AE af et nærmere bestemt, til udfnugningsforsøg særlig egnet, standardserum, først viser udfnugning.

² Forkortelsen L_f (limite of flocculation) er maaske ikke helt logisk, da udfnugningen i en toksin-antitoxinblanding fremtræder som et optimum. L_f er derfor ikke en »grænseværdi« i samme forstand som L_0 og L_f' , men repræsenterer samtidig den maksimale og den minimale toksinmængde, som under de givne omstændigheder reagerer med antitoxin.

GLENNY og hans medarbejdere, der i udstrakt grad benytter den saakaldte »intrakutan«-metode til toksin-antitoxinmaalinger har til dette brug indført forskellige andre værdier til karakterisering af toksinets specifikke egenskaber. Da jeg imidlertid ikke har benyttet den af disse forskere udarbejdede teknik ved mine forsøg, skal jeg ikke omtale deres definitioner nærmere.

Reaktionen imellem Toksin og Antitoksin.

Toksin og antitoksin forener sig *in vitro*. Hvad der nærmere finder sted, ved man ikke. Forholdet minder en del om neutralisationsprocessen imellem en syre og en base, hvorfor de fleste forskere ogsaa har været tilbøjelige til at opfatte foreningen af toksin og antitoksin som en kemisk proces. Andre har søgt at forklare reaktionen som en fysisk eller fysisk-kemisk adsorption og fra enkelte sider foreligger den antagelse, at der baade skulde ske en adsorption og finde en kemisk binding sted. Denne sidste opfattelse vil maaske være den sandsynligste.

EHRlich mente, at neutralisationen imellem toksin og antitoksin forløb paa lignende maade som reaktionen imellem en stærk syre og en stærk base, altsaa momentant. Hvis en af bestanddelene var til stede i overskud, da maatte dette befinde sig i fri tilstand ved siden af det dannede toksin-antitoksinkompleks, der derfor stedse skulde have en konstant sammensætning. Nu havde EHRlich ganske vist paavist, at en bestemt toksinmængde altid kræver en konstant mængde antitoksin til sin neutralisation, men han viste yderligere, at antitoksinet, hvis det tilsattes til toksin i smaa portioner ad gangen, da virker paa den maade, at de først tilsatte kvanta neutraliserer mere toksin end beregnet, medens forholdet for de senere tilføjede portioner er omvendt. Tilbereder man f. eks. en toksinopløsning saaledes, at 1 cm³ indeholder 100 gange den mængde toksin, som er nødvendig til at dræbe et marsvin paa 250 g, og man samtidig fortynder noget antidifterisk serum i et saadant forhold, at 1 cm³ netop neutraliserer 1 cm³ toksinfortynding, da skulde man i følge EHRlich's antagelse ved sammenblanding af 1 cm³ toksin- og 0,5 cm³ serumfor-

tynding faa et produkt, som indeholder $50 \times d. m. m.$ Udføres forsøget, viser det sig, at blandingen maaske kun indeholder 30 dræbende doser. Tilsætter man nu yderligere $0,15 \text{ cm}^3$ serumfortynding neutraliseres igen mere toksin end beregnet o. s. v. (EHRlich's fænomen). Man kan ikke forud sige noget om, hvordan et saadant forsøg vil forløbe; dette afhænger af det anvendte toksins beskaffenhed.

Imidlertid, hvis man til en given mængde antitoxin sætter en bestemt toksinmængde, da vil man opnaa to forskellige slutresultater, hvis man i eet tilfælde indfører hele toksinmængden paa en gang, og i det andet tilfælde tilsætter den samme mængde fordelt i to eller flere portioner, saaledes at der hengaar en vis tid imellem tilsætningen af de forskellige toksinmængder. Har man indstillet de to opløsninger som før, vil man i første fald faa en neutral blanding, ved den sidste forsøgsanordning opstaar derimod en opløsning, der er giftig (DANITZ 1902).

Disse tilsyneladende indviklede forhold er som nævnt blevet tydet paa forskellig maade af de forskere, der har arbejdet med toksin-antitoxin-reaktionen. Som bekendt er der fremsat tre¹ forskellige teorier om antitoxinets virkning paa toksin:

- 1) EHRlich's teori, som hænger nøje sammen med den ligeledes af EHRlich opbyggede »Sidekædetæori«.
- 2) ARRHENIUS & MADSEN's teori om gyldigheden af massevirkningsloven for toksin-antitoxin-processen.
- 3) Den BORDET'ske adsorptionshypotese.

Jeg skal senere diskutere disse tre forskellige opfattelser med henblik paa mine egne forsøgsresultater.

¹ Der findes ganske vist i litteraturen nævnt flere andre forklaringer paa processen, men disse stemmer i saa ringe grad med de eksperimentelle fakta, at de ingen interesse frembyder.

EKSPERIMENTEL DEL

Førend jeg gaar over til at meddele resultaterne af mine undersøgelser, skal jeg kort omtale de benyttede toksin- og antitoxinopløsninger.

Naar talen er om at undersøge indvirkningen af fremmede stoffer paa toksin og antitoxin, er det naturligvis vigtigt at erindre, at saavel giftbouillonens som immunserumet kun indeholder relativt smaa mængder af de virksomme principer. I det sædvanlige toksin findes jo bouillonens proteiner i mere eller mindre nedbrudt tilstand, desuden en del salte (først og fremmest natriumklorid, fosfater o. s. v.). Jeg har derfor prøvet at rense den raa gift og først undersøgt, hvilke metoder, der i tidens løb er blevet anvendt. Af saadanne er der angivet mange forskellige: Udsaltning med f. eks. natrium eller ammoniumsulfat og paafølgende dialyse (NICOLLE, CÉSARI & DESBAINS), fældning med calciumklorid, som med bouillonens fosfater giver bundfald af calciumfosfat, hvorpaa en del toksin adsorberes (ROUX & YERSIN, senere ABT), eller med zinkklorid og paafølgende udrystning med ammoniumkarbonatopløsning (BRIEGER & BOER); endvidere fældning med alkohol efter forudgaaende inddampning (BRIEGER, FRÄNKEL, WASSERMANN & PROSKAUER), o. s. v. I den nyere tid er særlig fældning med syrer (eddikesyre, saltsyre) blevet anvendt

(WATSON & LANGSTAFF, WATSON & WALLACE). Af disse metoder har jeg tidligere prøvet fældning med ammonium-sulfat, alkoholfældning og tilsætning af syre til opnaaelse af en passende brintionkoncentration, hvorved en del toksin udfældes af giftboullonen. Jeg har imidlertid ikke fundet nogen af dem praktisk anvendelige til mit formaal, som var at fremstille et rensset toksin, der i saa høj grad som muligt havde beholdt det raa toksins karakteristiske egenskaber. Oftest blev nemlig ikke alene giftigheden, men i særlig grad den udfnuggende funktion kendelig nedsat eller endog fuldstændig destrueret ved rensningsprocessen.

Jeg har derimod med fordel benyttet fældning med aluminiumhydroksyd¹ fremstillet efter WILLSTÄTTERS metode (til rensning af enzymer). Det er muligt ad denne vej at fjerne store mængder af de i den raa giftbouillon indeholdte nedbrudte proteiner, som ledsager toksinet, og samtidig at erholde toksinopløsninger, der i deres forhold til antitoxin udviser de samme egenskaber som det raa toksin. I særdeleshed er det en stor Fordel, at toksinets udfnuggende funktion ikke influeres i nogen væsentlig grad under adsorptionen eller elueringsprocessen². Yderligere kan man ved denne metode, naar der anvendes en passende teknik, i nogen grad undgaa de store toksintab (ofte indtil 50—60 %), der som regel ellers maa regnes med ved rensning af diftergift.

Jeg har dog til alle de orienterende forsøg benyttet det raa toksin, dels fordi rensningen dog altid medfører et større eller mindre tab (10—25 %) og dels, fordi det var af betydning for mig at faa at vide, hvor store forskellig-

¹ Aluminiumsalte (Aluminiumsulfat & Kaliumaluminiumsulfat) har tidligere været anvendt i samme øjemed (BRIEGER).

² Se LINDERSTRØM-LANG & SCHMIDT, Carlsberg Laboratoriets Medd. 1930.

heder det raa og det rensede toksin udviste overfor de indgreb, mine forsøg medførte.

Det vilde naturligvis have været hensigtsmæssigt til alle forsøgene at anvende en og samme toksinblanding. Dette har jeg imidlertid kun kunnet gennemføre for det rensede toksins vedkommende, da jeg ikke disponerede over tilstrækkelig store toksinmængder (der er ialt til forsøgene medgaaet over 100 liter giftbouillon). Fremstilling af toksin er endnu en vanskelig ting og kun relativt stærke toksiner egner sig til forsøg af denne art, fordi reaktionshastigheden imellem toksin og antitoxin i saa høj grad afhænger af toksinstyrken. Forsøgene med raa giftbouillon er derfor foretaget med prøver udtaget under den rutinemæssige fremstilling af toksin til immunisering.

Med hensyn til antitoxinet, da gælder til en vis grad her lignende forhold som for toksinet. Antitoxinet er ganske vist i det store og hele et mere stabilt stof. Det kan f. eks. taale betydelig højere temperatur inden det destrueres med nogenlunde stor hast¹. Dette gælder dog kun den toksinneutraliserende funktion, thi udfnugningsfunktionen er mere instabil her end hos toksinet. Dette konstateres bl. a., naar man forsøger at rense antidifterisk serum. De rensede produkter (pseudoglobulin) viser ofte en betydelig ringere udfnugningsevne end det friske serum. Da man ved de hidtil kendte metoder dog langt fra kan opnaa en tilsvarende rensning som for toksinets vedkommende, har jeg kun til et par enkelte forsøgsrækker anvendt rensed pseudoglobulin, og iøvrigt benyttet friskt antidifterisk serum.

¹ Imidlertid synes forholdet imellem destruktionshastigheden og temperaturen at være forskellig for toksin og antitoxin. Ti medens antitoxinsvækkelsen, skønt den sker meget langsomt, ved temperaturer i nærheden af 0° alligevel finder sted med maalelig hast, kan toksinopløsninger bevare baade deres antigene og deres udfnuggende egenskaber uforandret i adskillige aar, naar de opbevares ved lav temperatur (0—5° C.).

1. Brintionkoncentrationens Indflydelse paa Stabiliteten af Toksin og Antitoksin.

a. Forsøg med Toksin.

Forsøgs metodik.

Maalingerne af saavel toksin som af antitoksin er i de fleste tilfælde foretaget ved den af Ramon angivne udfnugningsmetode. Følgende teknik har været anvendt. Til et konstant toksinrumfang 10 cm³ sattes vekslende mængder difteriimmunserum. Efter omhyggelig omrystning anbragtes toksin-antitoksinblandingerne i et vandbad af 40°. Det iagttoges, at vandet i badet kun dækkede ca. $\frac{1}{3}$ af vædskesøjlen i reagensglassene, som indeholder toksin-antitoksinblandingerne. Herved forøges cirkulationen i vædskan og titerudfnugningen, hvormed jeg betegner den først optrædende udfnugning (*floculation initiale, précipité indicateur* efter RAMON), bliver tydeligere. Hvis, som det i enkelte tilfælde sker, to blandinger fnugger ud paa samme tid, da udregnedes titeren af middelværdien af de to serumdoser. Der er ved afmaalingen af serum benyttet en række med en saadan kvotient, at forskellen imellem serumdoserne svarede meget nær til 10%. Efter min erfaring kan man kun undtagelsesvis opnaa en større nøjagtighed. Afmaales serum efter en kvotientrække, svarende til en forskel af f. eks. 5% eller mindre, da vil man i de fleste tilfælde kun opnaa, at flere blandinger fnugger ud paa een gang. En vanskelighed fremkommer i de tilfælde, hvor et toksin ved opvarmning eller som følge af andre indflydelser mister sin evne til at fnugge ud med serum. Jeg har da hjulpet mig ved at blande det partielt destruerede toksin med lige dele frisk toksin af kendt styrke. Herved vil det som oftest være muligt at faa et paalideligt udtryk for destruktionsgraden af det behandlede toksin, idet den antitoksinneutraliserende egenskab af dette summeres til det friske toksins. Hvis saaledes et toksin, som oprindeligt indeholder 10 antigenenheder pr. cc. opvarmes indtil halvdelen af antigenværdien er destrueret, da vil det, naar det blandes med lige dele af det uopvarmede toksin ved udfnugningsforsøg vise en titer svarende til 5 enheder pr. cc. (blandings titer = 7,5 enheder pr. cc.). Men resultaterne vil naturligvis blive mindre nøjagtige ved blandingsmetoden, og unøjagtigheden stiger med destruktionsgraden. For at faa en vis kontrol paa mine in-vitro-forsøgsresultater har jeg foretaget enkelte bestemmelser ved hjælp af marsvin. Der er

her bestemt L_T -værdien og ikke d. m. m., thi ifølge EHRLICH's omfattende undersøgelse, som jeg ved talrige tidligere forsøg har kunnet bekræfte, er usikkerheden ved en L_T -bestemmelse langt ringere end ved bestemmelse af d. m. m. Jeg har stedse indsprøjet mindst to marsvin med samme dosis grundet paa dyrenes individuelle resistensforskelligheder. I tabellerne er der i stedet for de absolute L_f - og L_T -værdier anført antallet af henholdsvis L_f - og L_T -doser pr. cm^3 toksin (i lighed med hvad der sædvanligvis benyttes ved værdibestemmelser af immunserumet, hvor antitoxinindholdet altid angives i AE pr. cm^3 serum).

Med hensyn til K_f -værdierne, da refererer disse sig stedse til henholdsvis toksiner og sera, som ikke forud før titreringen er opblandet med de tilsvarende friske stoffer. Thi naar serum eller toksin mister deres udfnuggende evne antager de samtidig den ejendommelige karakter at virke hæmmende paa udfnugningsprocessen imellem frisk toksin og frisk serum. I de tilfælde, hvor »blandings«metoden er benyttet, har jeg derfor ikke angivet udfnugningstiden ved K_f , men benyttet betegnelsen $K_f(h)$ for dermed at antyde, at den værdi, der er opnaaet, er resultatet af to processer, nemlig den tendens som det friske antitoksiske serum har til at forene sig under udfnugning og den hæmmende effekt, der udoes af det partielt destruerede produkt.

Da der ved sammenblanding af toksiner og i særdeleshed af sera, som viser store indbyrdes aviditetsforskelle undertiden optræder interessante fænomener, har jeg omtalt disse forhold lidt nærmere (Side 34).

At saavel syrer som baser formaar at destruere difteritoxin blev allerede iagttaget for mange aar siden (ROUX & YERSIN, TH. MADSEN). ROUX & YERSIN og senere MORGENROTH viste endvidere, at difteritoxin, som under indvirkning af syre er blevet uvirksomt, genvinder sine toksiske egenskaber, naar den tilsatte syre neutraliseres med alkali. WALBUM & DERNBY bekræftede forsøgene, men fandt dog, at reaktionen kun er delvis reversibel, idet et med syre behandlet toksin ikke efter syrens neutralisation genvinder hele sin oprindelige giftighed. En mere eksakt undersøgelse af disse forhold er først blevet muliggjort, efter at

S. P. L. SØRENSEN gennem sine banebrydende arbejder har angivet metoder til at bestemme en vædskes nøjagtige surhedsgrad eller alkalinitet (brintionkoncentration).

WALBUM undersøgte ved hvilke brintionkoncentrationer toksinet er mest stabilt og fandt ved den af ham benyttede forsøgsanordning (tilsætning af forskellige mængder syre og base til raa giftbouillon, bestemmelse af blandingeres p_H og opbevaring af toksinopløsningerne ved 37° i 6 døgn), at toksin sønderdeles fuldstændigt, naar brintionkoncentrationen er større end hvad der svarer til $p_H = 5,5$ eller mindre end svarende til $p_H = 9,3-10,0$. Ved $p_H = 7,2-7,6$ skulde toksinet være stabilest. WALBUM's forsøg omfatter alene toksiciteten, ikke toksinets antigene egenskaber¹. Jeg har derfor fortrinsvis haft min opmærksomhed henvendt paa den sidstnævnte funktion. Forsøgene omfatter flere toksiner og er udført ved forskellige temperaturer, dog fortrinsvis ved $37^\circ-40^\circ$.

1ste Forsøgsrække.

| | |
|-------------------------------|---|
| Toksin A ²⁷ | Serum 717 ($18\frac{1}{2}$ 28) |
| $L_f = 6,3$ pr. cm^3 | 140 AE pr. cm^3 |
| $p_H = 8,8$ (18° C.) | $K_f = 0^{\text{h}} 45$ (40° C.). |

Ved tilsætning af mælkesyre og natriumhydroksyd fremstilledes blandinger, hvis brintionkoncentration svarede til $p_H = 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0$. Af hver blanding tilberedtes 0,5 liter, som deltes i to lige store portioner. Den ene del henstilledes ved almindelig temperatur ($18-20^\circ$) udelukket fra lyset, den anden anbragtes i termostat ved 37° . Som antiseptikum benyttedes toluol. Straks efter til-

¹ Udfnugningsfunktionen paavistes først, da WALBUM havde offentliggjort sine Undersøgelser.

sætningen af syre og natron foretoges en titrering. Da brintionkoncentrationen af toksinbouillon ændres med temperaturen (WALBUM) har jeg anført korrektioner for p_H -værdierne af de blandinger, som opbevaredes i termostat ved 37° . p_H bestemtes kolorimetrisk efter S. P. L. SØRENSEN'S metode. Maalingerne ved 37° foretoges i et vandbad af glas, hvori der var anbragt en Walpoles komparator. Til sam-

Tabel I, der viser destruktionen af difteritoksin under for-

| p_H | 5,0 | (5,0) | 5,5 | (5,5) | 6,0 | (5,9) | 7,0 | (6,8) |
|---------------------|------------|-------|-------------------------------|-------|---|-------|---|-------|
| Titrerings- dato | | | | | | | | |
| $^{3/7}$ 28 | ? ∞ | | 6,3 (0 ^h 20) ... | | 6,3 (0 ^h 50) ... | | 6,3 (0 ^h 45) ... | |
| $^{3/8}$ — | | | ? (∞) ? (∞) | | 6,3 (1 ^h 15) 4,3 (1 ^h 10) | | 6,3 (0 ^h 50) 4,9 (0 ^h 50) | |
| $^{3/10}$ — | | | | | 4,9 (1 ^h 30) 3,5 (1 ^h 10) | | 6,3 (0 ^h 50) 3,9 (0 ^h 50) | |
| $^{3/11}$ — | | | | | 2,6 (1 ^h 45) | | 3,9 (1 ^h) | |

I øverste vandrette rubrik angiver chifrene i parentes p_H ved 37° . I de lodrette kolonner findes opført de paagældende L_f -værdier og i parentes K_f . De første lodrette rubriker omfatter alt-saa resultaterne af destruktionen ved 18° ; de sidste oplyser om forløbet af den samme proces ved 37° . De opførte L_f -værdier skal forstaaes som antallet af antigenenheder pr. cm³ giftbouillon. Ved $p_H = 5$ kan reaktionen ikke finde sted. Den udfnuggende evne synes her destrueret. En blanding, hvis brintionkoncentration svarer til $p_H = 5,5$, reagerer vel straks efter syretilsætningen, men ikke en maaned senere. Forsøgene viser iøvrigt, at brintionkoncentrationsændringerne skal være store før destruktionen af toksinet tager fart.

Den alkaliske reaktion synes i særdeleshed at indvirke paa toksinets udfnugningsevne, smlgn. destruktionen ved p_H 8,7 og p_H 5,9. Ved p_H 6,8—7,8 kan der ske en ret betydelig destruktion af toksinets antigene evne, uden at udfnugningsfunktionen herved influeres i væsentlig grad.

De to prøver mærket »kontrol« bestod af den oprindelige giftbouillon uden tilsætning af syre eller natron. Til den ene var

menligning benyttede jeg de af WALBUM udarbejdede tabeller, som stemte godt med mine egne forsøgsresultater, skønt den bouillon jeg har anvendt (Martinbouillon) afviger en hel del i sammensætning fra WALBUM's substrat til toksinproduktion.

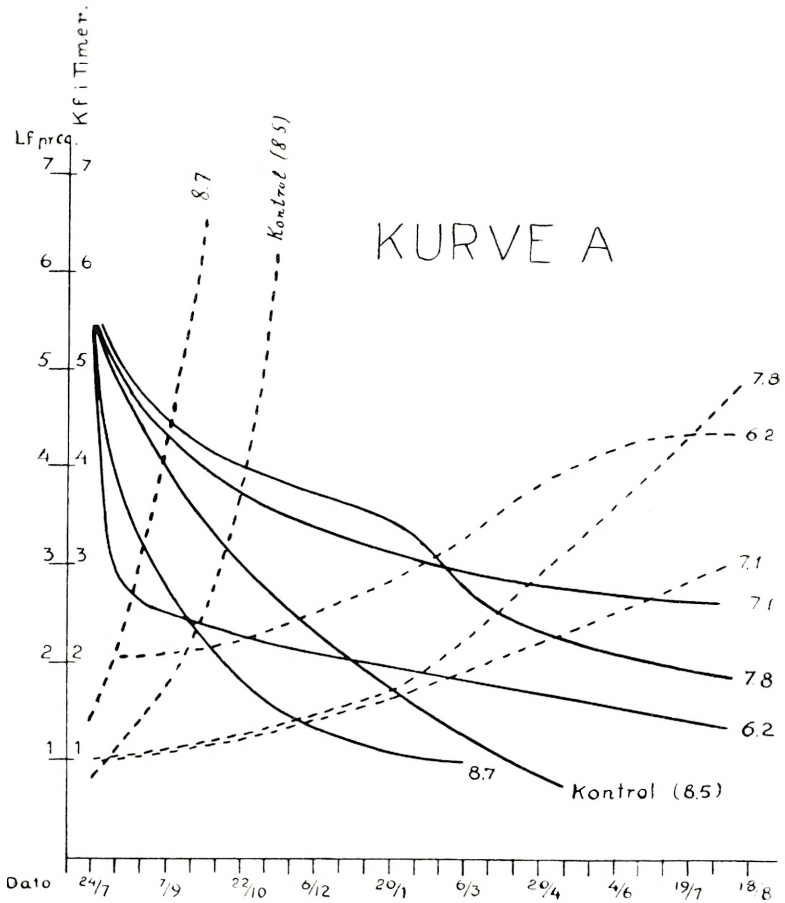
Det benyttede immunserum, hvoraf jeg havde et større forraad, opbevaredes under forsøgene i frosset tilstand (ved

skellig brintionkoncentration ved temperaturerne 18° og 37° C.

| 8,0 | (7,8) | Kontrol (toluol) 8,8 | (8,6) | Kontrol (kinosol) 8,8 | (8,6) | 9,0 | (8,7) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 6,3 (0 ^h 45) | ... | 6,3 (0 ^h 45) | ... | 6,3 (0 ^h 50) | ... | 6,3 (0 ^h 55) | ... |
| 6,3 (0 ^h 45) | 4,9 (0 ^h 45) | 6,3 (1 ^h) | 5,25 (0 ^h 58) | 6,3 (1 ^h) | 5,25 (0 ^h 58) | 6,3 (1 ^h) | 4,1 (1 ^h 30) |
| 6,3 (0 ^h 45) | 3,9 (0 ^h 45) | 6,3 (1 ^h 05) | 3,9 (2 ^h 05) | 6,3 (1 ^h 05) | 3,9 (2 ^h 05) | 6,3 (1 ^h 05) | 2,9 (3 ^h) |
| ... | 3,9 (1 ^h 15) | ... | 3,5 (2 ^h 30) | ... | 3,5 (2 ^h 30) | ... | 2,2 (3 ^h 30) |

sat kinosol i en mængde af 0,5 ‰. Iøvrigt benyttedes toluol som antiseptikum. Kinol har i de senere aar faaet en ret stor udbredelse som et brugbart antiseptikum for toksin (i stedet for toluol) og serumopløsninger (til erstatning af de hidtil benyttede præparater: fenol og trikresol). Kinol (angives at bestaa af dioksykinolin) besidder den fordel fremfor fenol og kresol, at det ikke denaturerer serumproteiner, hvorfor jeg har anvendt det ved forsøg over antitoksinets destruktion. Et indhold af 0,25—0,5 ‰ vil som regel være tilstrækkelig til at hindre bakterievækst, og serums udfnuggende egenskaber lider intet ved kinoltilsætningen, hvorimod fenol nedsætter toksinets og antitoksinets udfnugningsevne betydeligt. Kun maa man tage i betragtning, at en kinolopløsning reagerer stærkt surt (jeg maalte saaledes en 10 ‰ opløsning af kinol i dest. vand elektrometrisk og fandt $p_H = 3,2$). Hvis man derfor arbejder med stødpudefattige opløsninger, f. eks. rensede og dialyserede toksiner eller sera, da vil selv smaa mængder kinol være i stand til at ændre brintionkoncentrationen betydeligt.

÷ 15° C.); det nødvendige kvantum tøedes umiddelbart forinden målingerne. Bestemmelsen af L_f - og K_f -værdierne skete ved blanding af et konstant toksinrumfang (10 cm³) med vekslende serummængder (se under »Forsøgsmetodik«).



Destruktion af difteritoksin ved 37° C.

De fuldt optrukne kurver viser, hvorledes L_f -værdien formindskes, efterhaanden som toksinet bliver ældre. De punkterede kurver angiver den samtidige stigning af reaktionstiderne. Tallene vedføjet udfor hver kurve viser opløsningens p_H .

Tabel II (Kurve A),
visende brintionkoncentrationens betydning for stabiliteten
af difteritoksin ved temperatur 37°.

| p_H | 5,5 | | 6,2 | | 7,1 | | 7,8 | | 8,5 (Kontrol) | | 8,7 | |
|-----------------------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|-------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|
| Titrerings- dato | L_f pr. cm^3 | K_f | L_f pr. cm^3 | K_f | L_f pr. cm^3 | K_f | L_f pr. cm^3 | K_f | L_f pr. cm^3 | K_f | L_f pr. cm^3 | K_f |
| $^{24}/_7$ 1928..... | 5,15 (3h ²⁰) | | 5,15 (2h ¹⁵) | | 5,56 (1h) | | 5,56 (1h) | | 5,56 (0h ⁵⁰) | | 5,56 (1h ²⁵) | |
| $^{25}/_7$ — | 0? ∞ | | 3,1 (2h ¹⁰) | | 5,0 (1h ⁰⁵) | | 5,0 (1h) | | 5,0 (1h) | | 4,2 (1h ³⁰) | |
| $^{11}/_8$ — | | | 2,8 (2h ⁰⁵) | | 4,5 (1h) | | 4,5 (1h) | | 4,5 (1h ¹⁰) | | 3,7 (2h ¹⁵) | |
| $^2/_10$ — | | | 2,4 (2h ¹⁰) | | 4,1 (1h ⁰⁵) | | 4,3 (1h ¹⁰) | | 3,5 (2h ³⁵) | | 2,2 (6h ⁴⁵) | |
| $^{10}/_{11}$ — | | | 2,25 (2h ²⁰) | | 3,7 (1h ²⁵) | | 3,9 (1h ²⁰) | | 2,7 (6h ²⁰) | | 1,4 (2h ⁴) | |
| | | | | | | | | | $K_f(h)$ | | $K_f(h)$ | |
| $^{14}/_{12}$ — | | | 2,25 (2h ¹⁵) | | 3,36 (1h ⁵⁵) | | 3,7 (1h ⁴⁵) | | 2,6 (1h ²⁵)* | | 1,2 (1h ⁴⁰)* | |
| $^{15}/_1$ 1929..... | | | 2,1 (2h ¹⁰) | | 3,2 (1h ⁴⁰) | | 3,5 (1h ⁴⁰) | | 1,8 (1h ²⁰)* | | 1,2 (1h ³⁵)* | |
| $^{15}/_2$ — | | | 2,0 (3h ⁰⁵) | | 3,1 (1h ⁴⁰) | | 3,1 (2h) | | 1,3 (1h ²⁵)* | | 1,0 (1h ⁴⁰)* | |
| $^6/_3$ — | | | 1,9 (3h) | | 2,8 (2h ⁰⁵) | | 2,5 (2h ²⁵) | | 1,3 (1h ⁴⁵)* | | 1,0 (1h ⁴⁰)* | |
| $^6/_5$ — | | | 1,9 (4h) | | 2,8 (2h ¹⁰) | | 2,4 (3h ⁰⁷) | | 0,8 (1h ⁵⁰)* | | | |
| $^{14}/_8$ — | | | 1,5 (4h ²⁰) | | 2,7 (3h) | | 1,8 (4h ⁴⁵) | | | | | |

Resultaterne i dette forsøg stemmer i alt væsentligt med dem, som er meddelt i det foregaaende. Man vil bemærke den relativt hurtige destruktion af toksinets udfnuggende evne i de alkaliske blandinger. Vi ser altsaa af denne tabel, at et toksin p_H ca. 7 ved at opbevares i over et aar ved 37° mister ca. halvdelen af sin antitoksinneutraliserende evne og samtidig bliver reaktionstiden overfor antitoksin tre gange saa stor. De blandinger, som er mærket * titreredes ved opblanding med lige dele toksin, idet reaktionstiden paa nærværende tidspunkter var blevet saa stor, at den almindelige titreringsteknik ikke lod sig anvende. Disse værdier er derfor $K_f(h)$ (se »Forsøgsmetodik«).

2den Forsøgsrække.

Toksin 103²⁷

Serum som i foregaa-

$L_f = 5,56$ pr. cm^3

ende forsøg

$p_H = 8,7$ (18° C.)

$K_f = 0^{h 50}$ (40° C.)

Først bestemtes hvor store mængder saltsyre og natron der skulde tilsættes til 10 cm^3 toksin for at opnaa blan-

dinge, hvis brintionkoncentration svarede til anførte p_H -værdier.

| p_H | cm ³ n/10 HCl ell. n/10 NaOH til 10 cm ³ toksin | Indikator |
|-------|--|---------------|
| 5,5 | 4,5 cm ³ n/10 HCl | metylrødt |
| 6,0 | 4,03 - - - | klorfenolrødt |
| 7,0 | 2,88 - - - | fenolrødt |
| 8,0 | 1,65 - - - | — |
| 9,0 | 0,41 - - NaOH | fenolftalein |

Derpaa fremstilledes en liter af hver blanding ved til-sætning af de beregnede mængder 5n HCl og 5n NaOH. Brintionkoncentrationen bestemtes kolorimetrisk ved 37° som i foregaaende forsøg. p_H af de forskellige blandinger er, maalt ved 37°: 5,5; 6,2; 7,1; 7,8; 8,7. p_H af kontrolblandingen (d. v. s. den oprindelige giftbouillon) = 8,5 ved 37°. Efter titrering henstilledes blandingerne som før ved 37°, hvorpaa titreringen gentoges med passende tids mellemrum.

3die Forsøgsrække.

De to første forsøgsrækker maa nærmest betragtes som værende af orienterende art, idet de stærkt sure blandinger ikke blev neutraliseret med natron forinden opblandingen. Reaktionens udebliven i disse tilfælde tillader derfor ingen slutning angaaende destruktionsgraden af toksinet.

Hertil anvendtes et betydeligt stærkere toksin; substratet, som var benyttet til fremstillingen var som tidligere Martinbouillon, men der var denne gang yderligere tilsat 0,5 % pepton Witte og 0,2 % glykose. Ligeledes anvendtes et nyt serum (no. 782); dette havde imidlertid omtrent samme K_f -værdi og samme titer som det, der benyttedes til de to foregaaende forsøg.

Toksin 35²⁸ Serum no. 782 (¹⁸/₁₀ 28)
 $L_f = 9,6$ pr. cm^3 Styrke = 160 AE pr.
 $L_f = 8,0$ - - - cm^3
 d. m. m. = 500 - - - $K_f = 0^{\text{h} 25}$
 $p_H = 8,33$

Ved tilsætning af nedenstaaende mængder n/10 HCl og n/10 NaOH til 10 cm^3 toksin opnaaedes blandinger, hvis brintionkoncentration svarede til de anførte p_H -værdier.

| p_H | cm^3 n/10 ell. n/10 NaOH til 10 cm^3 toksin | Indikator |
|-------|---|---------------------|
| 5,0 | 4,8 cm^3 n/10 HCl | som i foreg. forsøg |
| 6,0 | 3,3 - - - | - - - - |
| 7,0 | 1,9 - - - | - - - - |
| 8,0 | 0,8 - - - | - - - - |
| 9,0 | 1,3 - - NaOH | - - - - |
| 10,0 | 3,9 - - - | tymolftalein |

Titrationen fandt sted ved 18° med benyttelse af de samme indikatorer som tidligere nævnt. Forsøgene udførtes ved to forskellige temperaturer, 0° og 37° C. Toksinet havde temp. 0°, da syre- og natronmængderne (5/n opløsninger) blev sat til. Af hver blanding fremstilledes to liter, hvoraf den ene blev staaende i kælderen, medens den anden stilledes i termostat ved 37° C..

Bestemmelserne af p_H for de færdige blandinger gav følgende værdier:

| 0° | p_H | 37° | 0° | p_H | 37° |
|------|-------|-----|-------------|-------|-----|
| 5,4 | | 5,3 | 9,1 | | 8,5 |
| 6,5 | | 6,3 | 9,9 | | 9,1 |
| 7,55 | | 7,2 | Kontrol 8,6 | | 8,0 |
| 8,5 | | 7,9 | | | |

Tabel III, hvori er anført L_f -, K_f - og L_f' -værdierne¹ for en række opbevarede

| Titrerings- dato | | $p_H = 5,4$ | 6,5 | | | 7,55 | | |
|---------------------|---------|-------------|-----------------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------------|
| | | | L_f pr.cm ³ | K_f | L_f' pr.cm ³ | L_f pr.cm ³ | K_f | L_f' pr.cm ³ |
| 24/10 | 1928... | | 8,9 | (0h ²⁷) | 8,0 | 9,6 | (0h ²⁵) | 8,0 |
| 25/10 | — ... | | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 26/10 | — ... | | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 27/10 | — ... | | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 31/10 | — ... | | 8,9 | (0h ²⁷) | 8,0 | 9,6 | (0h ²⁷) | 8,0 |
| 14/11 | — ... | | .. | .. | 7,0 | .. | .. | .. |
| 6/12 | — ... | | 8,9 | (0h ²⁹) | > 6 | 9,6 | (0h ²⁶) | .. |
| 3/1 | 1929... | | 8,0 | (0h ³⁰) | 6,0 | .. | .. | .. |
| 9/2 | — ... | | 8,0 | (0h ³⁵) | .. | .. | .. | .. |
| 6/3 | — ... | | 8,0 | (0h ³⁵) | .. | .. | .. | .. |
| 5/5 | — ... | | 8,0 | (0h ³⁵) | 6,0 | 9,6 | (0h ²⁵) | 8,0 |
| 14/8 | — ... | | 8,0 | (0h ³⁶) | 6,0 | 9,6 | (0h ²⁵) | 8,0 |

¹ Tabellen angiver ikke de virkelige L_f - og L_f' -værdier, men antallet af hen-

Maaleresultaterne er samlet i tabellerne III og IV. Foruden L_f er ogsaa L_f' -værdierne bestemt ved forsøg med marsvin efter EHRLICH's metode; hertil anvendtes internationalt standardserum fra Institutet i Frankfurt.

Tabel III viser, at toksinets antigene evne er meget stabil ved 0°, selv om brintionkoncentrationen varierer betydeligt. I virkeligheden er destruktionshastigheden ringe imellem $p_H = \text{ca. } 5,5$ — $p_H = \text{ca. } 10,0$.

Grunden til at der ingen in-vitro-resultater findes opført for den blanding, hvis p_H var 5,4 er at disse ikke var tilforladelige (se nærmere nedenfor). Med hensyn til spørgsmaalet om, hvorvidt p_H i alle tilfælde umiddelbart før titreringen burde være ført tilbage til den oprindelige værdi (udgangstoksinets p_H), da er hertil at sige at dette formelt set naturligvis vilde have været rigtigt, men gennem tid-

titreringer af difteritoksin, der med en forskellig brintionkoncentration ved 0° C.

| 8,5 | | | 8,6 Kontrolprøve | | | 9,1 | | | 9,9 | | |
|------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| L_f pr. cm ³ | K_f | L_f' pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f' pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f' pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f' pr. cm ³ |
| 9,6 | (0 ^h 23) | 8,0 | 9,6 | (0 ^h 25) | 8,0 | 9,6 | (0 ^h 31) | 8,0 | 9,6 | (0 ^h 35) | 8,0 |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 28) | .. |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 23) | .. |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 26) | .. |
| 9,6 | (0 ^h 25) | 8,0 | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 37) | 8,0 | 9,6 | (0 ^h 25) | 7,0 |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 30) | > 6,0 |
| 9,6 | (0 ^h 25) | .. | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 35) | .. | 9,6 | (0 ^h 30) | > 6,0 |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 35) | .. | 8,9 | (0 ^h 35) | > 6,0 |
| .. | .. | .. | 9,6 | (0 ^h 25) | > 7 | .. | .. | .. | 8,8 | (0 ^h 40) | > 6 |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 9,6 | (0 ^h 24) | 7,5 | 9,6 | (0 ^h 26) | 7,5 | 9,2 | (0 ^h 36) | 7,5 | 8,8 | (0 ^h 35) | 6 |
| 9,6 | (0 ^h 27) | 7,5 | 9,6 | (0 ^h 29) | 7,5 | 9,0 | (0 ^h 37) | 7,5 | 8,8 | (0 ^h 38) | 6,5 |

holdsvis L_f - og L_f' -doser pr. cm³.

ligere udførte forsøg havde jeg ikke kunnet paavise nogen forskel paa titeren, selv om p_H varierede (fra ca. 6 til ca. 9). Ved fremstilling af anatoksiner, hvor jeg har undersøgt brintionkoncentrationens betydning for omdannelsen af toksinet og ved indstilling af testtoksin til maalebrug har jeg ofte ændret toksinets p_H ; men titeren holdt sig til trods herfor uforandret. RAMON (og BAYNE-JONES) har ligeledes angivet, at svingninger i miljøets brintionkoncentration ikke influerer paa udfnugningsreaktionen. Jeg føler mig derfor overtydet om, at mine resultaters nøjagtighed ikke lider under, at jeg i nogle tilfælde har undladt at føre p_H tilbage til udgangsværdien. (Se endvidere forsøgene med det rensede toksin side 84 og tabel XXIV, der viser stabiliteten af toksin-antitoksinkomplekset i forhold til toksinstabiliteten.)

Tabel IV, hvori er anført L_f -, K_f - og L_f^+ -værdierne for en række opbevarede

| Titrerings- dato | $p_H = 5,3$ | | | 6,3 | | | 7,2 | | |
|---------------------|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------------|
| | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ |
| 24/10 1928... | 6,4 | (0 ^h 43) ¹ | < 8 | 8,9 | (0 ^h 22) | 8,0 | 9,6 | (0 ^h 25) | 8,0 |
| 25/10 — ... | 2,0 | (0 ^h 45) ¹ | 2 | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 26/10 — ... | 0 | (0 ^h 45) ¹ | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 27/10 — ... | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. |
| 31/10 — ... | .. | .. | 0 | 8,0 | (0 ^h 39) | < 7 > 5 | 8,9 | (0 ^h 25) | 8,0 |
| 14/11 — ... | .. | .. | .. | 7,2 | (0 ^h 29) | > 5 | 8,9 | (0 ^h 26) | 7,0 |
| 6/12 — ... | .. | .. | .. | 6,9 | (0 ^h 33) | > 5 | 8,0 | (0 ^h 23) | > 5 |
| 7/1 1929... | .. | .. | .. | 6,7 | (0 ^h 35) | > 5 | 8,0 | (0 ^h 30) | > 5 |
| 9/2 — ... | .. | .. | .. | 6,0 | (0 ^h 43) | .. | 7,5 | (0 ^h 30) | > 5 |
| 6/3 — ... | .. | .. | .. | 5,9 | (0 ^h 42) | 5,0 | 7,5 | (0 ^h 33) | .. |
| 5/5 — ... | .. | .. | .. | 5,9 | (0 ^h 45) | 4,5 | 6,8 | (0 ^h 33) | 5 |
| 14/8 — ... | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 6,7 | (0 ^h 47) | 4,5 |

¹ Titration foretaget ved opblanding med lige dele frisk toksin. De anførte Marsvin, stor infiltration paa 4. døgn, vægttab.

Forsøg med en toksinblanding paa p_H 5,4. En ny portion fremstilledes paa samme maade som ovenfor. Straks efter syretilsætningen udtoges en prøve; denne neutraliseredes med NaOH (til p_H 8,3) og titreredes direkte (d. v. s. uden opblanding med frisk toksin) overfor serum. Herved fandtes titeren 8,5, hvilket viser, at der var foregaaet en kendelig destruktion i de faa sekunder, der hengik imellem syretilsætningen og den paafølgende neutralisation med base. Samtidig var K_f -værdien steget til det dobbelte. Herefter sker svækkelsen af den antigene evne langsomt, men udfnugningsevnen paavirkes stærkt, saa at

titreringer af difteritoksin, der under forskellig brintionkoncentration ved 37° C.

| 7,9 | | | 8,0 Kontrolprøve | | | 8,5 | | | 9,1 | | |
|------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|--|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^+ pr. cm ³ |
| 9,6 | (0 ^{h23}) | 8,0 | 9,6 | (0 ^{h25}) | 8,0 | 9,6 | (0 ^{h31}) | 8,0 | 9,6 | (0 ^{h35}) | 8,0 |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | $K_f(h)$ | | |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 7,2 | (0 ^{h36}) ¹ | .. |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 6,4 | (0 ^{h35}) ¹ | .. |
| .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | .. | 6,4 | (0 ^{h42}) ¹ | .. |
| 8,9 | (0 ^{h26}) | 7,0 | .. | .. | .. | 8,0 | (0 ^{h48}) | 6,5 | 4,8 | (0 ^{h54}) ¹ | < 6 |
| 8,9 | (0 ^{h26}) | 6,5 | .. | .. | .. | 7,2 | (1 ^{h04}) | 5,0 | 3,2 | (1 ^{h26}) ¹ | d. m. m. 1 cm ³ |
| 8,9 | (0 ^{h27}) | > 5 | .. | .. | < 6 | 5,0 | (2 ^{h13}) | 3,0 | 0 | (2 ^{h07}) ¹ | d. m. m. 2 cm ³ |
| 8,9 | (0 ^{h25}) | > 5 | .. | .. | .. | 3,2 | (5 ^{h14}) | < 2 | .. | .. | .. |
| 8,9 | (0 ^{h35}) | 5,0 | 6,3 | (0 ^{h55}) | < 5 > 4 | 3,2 | (18 ^h) | d. m. m. ² 1 cm ³ | .. | .. | .. |
| 6,7 | (0 ^{h44}) | .. | 6,4 | (1 ^h) | .. | 3,2 | (1 ^h) | .. | .. | .. | .. |
| 6,4 | (0 ^{h47}) | .. | 5,4 | (1 ^{h2}) | .. | 1,2 | (1 ^{h20}) | d. m. m. ² 2 cm ³ | .. | .. | .. |
| 5,3 | (1 ^{h11}) | 3,0 | 4,5 | (2 ^{h55}) | 1,5 | .. | .. | 0 | .. | .. | .. |

tider er derfor $K_f(h)$.

toksinet reagerer langsommere og langsommere jo længere tid det har været under indflydelse af syren.

Resultaterne, som findes opført her (se tabel V), viser altså, at toksin kun sønderdeles med relativt ringe hastighed ved 0°, selv om p_H ligger i nærheden af 5. Yderligere viser forsøgene, at udfnugningsevnen, som altid i høj grad ned sættes under indflydelse af syren, i hvert fald for en del kan regenereres igen, naar der neutraliseres, og den neutraliserede blanding faar lov at henstaa i nogen tid ved 0° C. Her staar vi altsaa overfor en delvis reversibel proces. Derimod viser det sig, at den antigene evne ikke re-

Tabel V,
som viser destruktionen af difteritoksin ved p_H 5,4
(temp. 0° C.).

| a) Titreringsdato | L_f pr. cm ³ | K_f | L_f^t pr. cm ³ | b) Titreringsdato | L_f pr. cm ³ | K_f |
|-------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------|
| | | | < 7 > 5 | | | |
| 8/1 29..... | 8,5 | (0h ⁵⁰) | | 11/1 29..... | 8,0 | (0h ⁵⁰) |
| 10/1 —..... | 8,0 | (3h) | .. | 14/1 —..... | 7,3 | (1h ⁴⁰) |
| 12/1 —..... | 8,0 | (4h ³⁰) | .. | 18/1 —..... | 7,3 | (2h ³⁰) |
| 17/1 —..... | 8,0 | (6h ²⁰) | .. | 11/2 —..... | 7,3 | (2h) |
| 9/2 —..... | 7,6 | ($> 8^h$) | < 3 | | | |
| | | ($< 16^h$) | > 1 | | | |
| 6/3 —..... | 7,2 | ($> 8^h$) | .. | 8/3 —..... | 7,2 | (1h ¹⁵) |
| | | ($< 16^h$) | | | | |
| 5/5 —..... | 7,2 | (15h) | | | | |

Ved disse forsøg neutraliseredes toksinet forinden titreringen. Der udførtes to bestemmelser, en straks efter neutralisationen og en anden i den neutraliserede prøve, som havde henstaaet 24 (i nogle tilfælde 48 timer) ved 0°. De sidste resultater findes i tabellen til højre og er anført ud for de tilsvarende første titreringer. Til titreringen 10/1 29 tabel a) svarer saaledes titreringen 11/1 29 i tabel b). I sidste tilfælde har prøven blot efter neutralisationen med NaOH henstaaet 24 timer ved 0°, o. s. v.

genereres, fordi brintionkoncentrationen atter ændres til den oprindelige værdi. Af tabel III erfarer man, at L_f^t -værdierne ikke ændres proportionalt med forandringer af L_f . De første angiver jo til en vis grad, hvor vidt processen toksin \rightarrow toksoid er fremskredet. Denne proces forløber altsaa hurtigt, naar p_H er under ca. 5,5. Det er i virkeligheden denne reaktion, som de forskere, der tidligere har beskæftiget sig med disse forhold, har maalt, og ikke, som det jævnlige angives toksinets »destruktion«.

Det er interessant at sammenholde resultaterne af tabel IV, med dem, der tidligere er meddelt (tabel I og II). Sammenligner vi f. eks. tabel II og tabel IV, vil vi bemærke, at det stærke toksin er langt mere stabilt end det

svage. Om dette nu skyldes forskellen i titer eller ligger i substratets varierende sammenhæng skal jeg ikke kunne sige; man kan jo desværre ikke fremstille stærke eller svage toksiner efter behag. Imidlertid viser resultaterne, at man skal være varsom med at drage alment gyldige slutninger af forsøg, som er udført med et enkelt toksin; dog er forholdet imellem destruktionsgrad og brintionkoncentration i det store og hele det samme i de forskellige tilfælde. Derfor mener jeg ogsaa, at man gennem de tre forsøgsrækkeks resultater faar et nogenlunde godt overblik over brintionkoncentrationens indflydelse paa toksinets stabilitetsforhold. At toksin, naar det opbevares ved temperaturer i nærheden af 0° , er meget stabilt, har jeg paa forskellig maade kunnet godtgøre. Kort tid efter RAMON's første meddelelse om udfnugningsreaktionen imellem toksin og antitoxin (1922—23) foretog jeg nogle maalinger af forskellige toksinprøver, dels testtoksiner til maalebrug, dels rester af toksin, som for ca. 30 aar siden (slutningen af forrige og begyndelsen af dette aarhundrede) var blevet benyttet af ARRHENIUS og MADSEN til reaktionshastighedsforsøg. Fra tid til anden har jeg gentaget maalingerne over en periode af 6—7 aar og har stadig fundet samme L_f og K_f -værdier. Yderligere har jeg ved at sammenligne den oprindelige toksicitet paa enkelte af de 25—30 aar gamle toksiner med de fundne L_f og K_f -værdier kunnet beregne (naturligvis kun tilnærmelsesvis), at der i den lange tid kun er foregaaet ubetydelige ændringer.¹

¹ Et godt eksempel paa hvor stabil et toksins udfnuggende egenskab kan være, naar toksinet opbevares ved lav temperatur, afgiver et af de nævnte toksiner, der var fremstillet 1901. Dets oprindelige giftighed svarede til en d. m. m. af $0,003 \text{ cm}^3$, den øjeblikkelige giftighed fandtes = $0,02 \text{ cm}^3$. Den antigene evne bestemtes til 5 enheder pr. cm^3 og K_f -værdien var = med 1 h 25 min. Samtidig bestemtes K_f -værdien paa et

Af tabel I fremgaar det, at toksin ved almindelig temperatur holder sig uforandret, i hvert fald i tre maaneder, naar p_H ligger imellem 7 og 9. Dette stemmer godt med de erfaringer, jeg har gjort i løbet af de 6—7 aar, jeg har arbejdet med udfnugningsreaktionen. Det testtoksin, som benyttes til de rutinemæssige maalinge af difteriserum, bliver opbevaret i laboratoriet, uden at der iagttages forsigtighedsregler af nogen art. Det kan her henstaa adskillige maaneder igennem udsat for fuldt dagslys (nu og da direkte sollys) uden at ændres kendeligt. Toksinopløsninger er altsaa i virkeligheden mere stabile end antitoksiske sera, der, selv om de opbevares ved 0° , mister noget af deres antitoksinindhold i løbet af nogle maaneder. I betragtning af dette forhold vilde det vel egentlig være mere praktisk at benytte toksinet og ikke, som man hidtil har gjort, antitoksinet som standard for maalinge. EHRLICH valgte i sin tid antitoksinet ifølge den antagelse, at dette skulde være mere stabilt end toksin. Imidlertid er tilberedning af standardserum (nøjagtig afmaaling, indtørring i vakuum over fosforpentoksyd, opbevaring ved $\div 10-15^\circ$) en ret besværlig og omstændelig procedure, medens toksinet altid kan anvendes som saadant, og kan opbevares i flydende tilstand, især naar man for en sikkerheds skyld indstiller brintionkoncentrationen paa p_H ca. 7.

Med hensyn til destruktionshastigheden af toksin ved brintionkoncentrationer, der ligger uden for det allerede nævnte omraade, da har jeg kun i ringe grad foretaget undersøgelser herover, idet mine forsøg først og fremmest frisk fremstillet toksin (1929), hvis antigene værdi ogsaa svarede til 5 enheder. K_f fandtes her = 1 h 20 min. Dette viser altsaa, at det næsten 30 aar gamle toksin i løbet af den lange periode hverken har mistet noget af sin antigene eller sin udfnugningsevne, skønt giftigheden er aftaget stærkt.

har haft til opgave at klarlægge reaktionshastighedsforholdene. Allerede ved p_H 5¹ forløb udfnugningsreaktionen med de hidtil undersøgte toksiner enten slet ikke eller paa uregelmæssig maade, og det samme var tilfældet med p_H ca. 10 og derover.

Da jeg i en del tilfælde (som omtalt i kapitlet »Forsøgsmetodik«), hvor toksinets udfnugningsevne var stærkt nedsat eller helt ødelagt, har maattet foretage titreringerne ved at opblende det partielt destruerede toksin med lige dele friskt toksin og senere har benyttet en lignende fremgangsmaade ved titrering af antidifterisk serum, som ved forskellige indgreb helt eller delvis havde mistet sin reaktionsevne, skal jeg nærmere beskrive en saadan titrering af blandede toksiner og blandede sera, der undertiden giver anledning til teoretisk interessante fænomener.

RENAUX og senere RAMON & GRASSET har paavist, at antidifterisk serum som, grundet paa længere tids opbevaring, eller som efter en kortvarig opvarmning til temperaturer omkring 60° eller derover, helt eller delvis har mistet sin udfnuggende egenskab, alligevel kan titreres *in vitro*, nemlig hvis det inden toksintilsætningen blandes op med en passende portion frisk antidifterisk serum. Opvarmes f. eks. et serum en à to timer til ca. 60°, vil det ofte herved have mistet evnen til at reagere med toksin under præcipitationsdannelse. Antitoksinet vil derimod i mange tilfælde forblive praktisk talt upaavirket af opvarmningen, hvilket man let kan overbevise sig om ved at foretage en titrering paa marsvin. Blander man nu et saadant serum,

¹ Er p_H mindre end 5,0 naas snart det isoelektriske punkt for toksinbouillonens proteiner, der da fælder ud som et fnugget bundfald, hvorved større eller mindre toksinmængder rives med. Paa dette forhold beror de tidligere nævnte toksinrensningemetoder (f. eks. WATSON & WALLACE, WATSON & LANGSTAFF).

som ikke mere er i stand til at give udfnugning med f. eks. lige dele frisk antidifterisk serum (serum af ikke-immuniserede dyr har ingen virkning), da vil blandingen være i stand til at give udfnugning ved tilsætning af toksin, og præcipitationen optræder i den blanding, man skulde vente efter totalindholdet af antitoxin. Hvis man altsaa ved opvarmning destruerer udfnugningsevnen hos et serum, der indeholder 400 *AE* pr. cm^3 og man derpaa blander det med et friskt serum paa 600 *AE* pr. cm^3 , da vil man forudsat at opvarmningen ikke har medført nogen destruktion af antitoxinet finde titeren for blandingen = 500 *AE* pr. cm^3 . RAMON anbefaler denne teknik til titrering af f. eks. rensede sera, hvilket undertiden ved rensningsprocessen helt eller delvis mister udfnugningsevnen.

Ved at efterprøve de af RENAUX & RAMON offentliggjorte forsøg har jeg imidlertid fundet, at forholdet ikke er saa simpelt, som de angiver. Ved sammenblanding af serumprøver stammende fra forskellige individer og af varierende antitoxininhold fandt jeg i en hel del tilfælde en titer, som stemte godt med den beregnede. Men undertiden var der betydelige afvigelser mellem den kalkulerede og den fundne antitoxinværdi. Nedenstaaende forsøg, hvortil er anvendt tre forskellige sera af forskellig reaktionstid vil belyse forholdet nærmere.

Med hensyn til sagens rent praktiske side, da viser disse forsøg tydeligt, at man kan komme ud for at faa sine forsøgsresultater belastet med endog meget grove fejl ved kritikløst at anvende den af de to nævnte forskere foreslaaede titreringsmetode. Teoretisk set er dette forhold imidlertid overordentlig interessant. Hvis man betragter tabellen, kan man vel næppe tolke resultaterne paa anden maade end ved at antage, at hurtigt reagerende sera i visse til-

Tabel VI,

der viser titreringen af blandinger bestaaende af serum fra forskellige individer og med varierende K_f -værdier.

Toksin 103. a) Serum 754; 95 AE pr. cm^3 ; $K_f = 0^{\text{h}17}$
 $L_f = 6,0$ pr. cm^3 b) Serum 717; 140 AE pr. cm^3 ; $K_f = 0^{\text{h}50}$
 c) Serum 737; 105 AE pr. cm^3 ; $K_f = 8^{\text{h}}$

| Blandingens sammensætning | AE pr. cm^3 | | K_f | |
|--------------------------------------|----------------------|--------|------------------|------------------|
| | beregnet | fundet | beregnet | fundet |
| 1) 1 del 754 + 1 del 717 | 117,5 | 125,0 | $0^{\text{h}33}$ | $0^{\text{h}30}$ |
| 2) 1 del 754 + 1 del 737 | 100 | 55,0 | $4^{\text{h}09}$ | $1^{\text{h}10}$ |
| 3) 2 dele 754 + 1 del 737 | 98,3 | 71,0 | $2^{\text{h}50}$ | $0^{\text{h}40}$ |
| 4) 4 dele 754 + 1 del 737 | 97,0 | 78,0 | $1^{\text{h}50}$ | $0^{\text{h}30}$ |
| 5) 9 dele 754 + 1 del 737 | 96,0 | 88,0 | 1^{h} | $0^{\text{h}20}$ |
| 6) 1 del 717 + 1 del 737 | 122,5 | 120 | $4^{\text{h}25}$ | $2^{\text{h}20}$ |
| 7) 1 del 754 + 1 del 717 + 1 del 737 | 113,3 | 105 | $3^{\text{h}02}$ | 1^{h} |

Titringstekniken var den samme, som jeg hele tiden har anvendt: 10 cm^3 toksin + vekslende serumængde; temp. 40°C .

fælde formaar at bemægtige sig hele den i en given blanding tilstedeværende toksinmængde, uanset at der samtidig forefindes betydelige antitoksinmængder, hvis affinitet til toksinet ganske vist er langt ringere. At det hænger saaledes sammen, ser man bl. a. af, at blandingen af de to sera 754 og 717, hvor forskellen paa K_f -værdierne ikke er saa udpræget, giver en titer, der ikke ligger langt fra den beregnede. Det samme gælder blandingen, som bestaar af prøverne 717 og 737. Fænomenet træder først tydeligt frem, naar affinitetsforskellen imellem de to reagerende sera er tilstrækkelig stor; man kan da fremstille blandinger, hvor antitoksinet med den mindre affinitet ikke deltager i reaktionen (forsøg 4 og 5). Denne blanding opfører sig i virkeligheden som om det hurtigt reagerende serum var fortyndet med vand eller med ikke antitoksinholdigt serum i stedet for immunserum.

Jeg har dernæst prøvet, hvorledes blandinger af forskellige toksiner forholdt sig. Som det var at vente er forholdene her mindre indviklede. TH. MADSEN og S. SCHMIDT har nemlig paavist, at K_f -værdien for et toksin først og fremmest er afhængig af dettes antigenværdi udtrykt i L_f -enheder.¹ Jo stærkere toksinet er, desto mindre er K_f -værdien. Dog er forholdet ikke rent omvendt proportionalt, hvilket følgende sammenligning imellem to toksiner viser:

| | L_f pr. cm^3 | K_f |
|-----------------|-------------------------|-------------------------------------|
| Toksin I | 8,0 | $0^{\text{h} 35}$ |
| Toksin II | 32,0 | <u>$0^{\text{h} 05}$</u> |

Toksin II er fire gange saa stærkt som toksin I, men K_f er 7 gange saa lille.

Jeg har prøvet blandinger af en hel del toksiner over for et og samme serum. Herved fik jeg stedse god overensstemmelse imellem de beregnede og de fundne L_f -værdier. Derimod viste det sig, at K_f -værdien stedse var lavere, end man skulde vente:

| | L_f pr. cm^3 | K_f |
|---|-------------------------|---|
| Toksin XXX ²⁸ | 9,4 | $0^{\text{h} 35}$ |
| Toksin XXXIII ²⁸ | 6,3 | 1^{h} |
| 1 del toksin XXX + 1 del toksin XXXIII | 7,84 (ber. 7,85) | $0^{\text{h} 40}$ (ber. $0^{\text{h} 47}$) |

Dette forsøg stemmer altsaa med det ovenfor omtalte. Forholdet er senere nærmere undersøgt gennem mere omfattende forsøg.²

¹ Om dette gælder ligegyldigt hvilket substrat, der anvendes til toksinfremstillingen, eller ej kan ikke siges med sikkerhed. De af MADSEN & SCHMIDT benyttede toksiner havde alle Martinbouillon som basis. Zeitschr. f. Immunforsch. 1930, **65**, 367.

² TH. MADSEN & S. SCHMIDT: Die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen

Destruktionsforsøg foretaget ved højere temperatur.

Til denne forsøgsserie har jeg benyttet mig af blandingsmetoden til titreringen af toksinets antigenværdi. Jeg maatte anvende et andet toksin, da jeg ikke havde mere af toksin 35, som benyttedes til de foregaaende forsøg. Imidlertid bestod dette toksin (A^{28}) af en blanding af flere toksiner, hvorved man kan regne, at mulige forskelligheder er blevet udlignet. Styrken var 8,8 L_f -enheder pr. cm^3 , altsaa ca. 10 % lavere end for toksin 35. Forsøgene udførtes ved 50°, 55° og 60°, og der benyttedes samme serum til titreringen som tidligere (No. 782). Brintionkoncentrationen indstillede saaledes, at p_H var = 7,0 ved 50°. Jeg gik frem paa følgende maade: 27 cm^3 toksin afmaalttes i et langt, snævert reagensglas, som anbragtes i et stort, vel isoleret, med termoregulator og motoromrører forsynet vandbad, der blev opvarmet med gas. Det iagttoges, at temperaturen ikke forandrede sig over 0,1° C. under forsøgene. Vædsken i glasset omrørtes med et ganske tyndt termometer, indtil temperaturen var den samme som i vandet udenfor. Saa udtoges den første prøve (betegnet 0^h i tabellen). Jeg benyttede det samme glas til alle forsøgene, idet det rensedes imellem hver prøve. Denne fremgangsmaade kunde maaske synes omstændelig, men jeg opnaaede langt mere konstante resultater end ved opvarmning af en større mængde toksin paa en gang og paafølgende udtagning af prøver.

Efter at være fjernet fra vandbadet afkøledes prøverne i isvand til ca. 20°, hvorpaa de straks blev blandet med Diphtheritoxin u. -antitoxin und ihre Bedeutung für die Heilkraft des antidiphtherischen Serums (Zeitschr. f. Immunforsch. 1930, 65, 357).

J. R. MØRCH & S. SCHMIDT: Sur la relation entre le pouvoir antigène intrinsèque et la vitesse de flocculation entre toxine et antitoxine (under trykning).

lige dele frisk toksin, der i forvejen var afmaalt i smaa kolber. Alle prøverne titreredes derpaa samtidig.

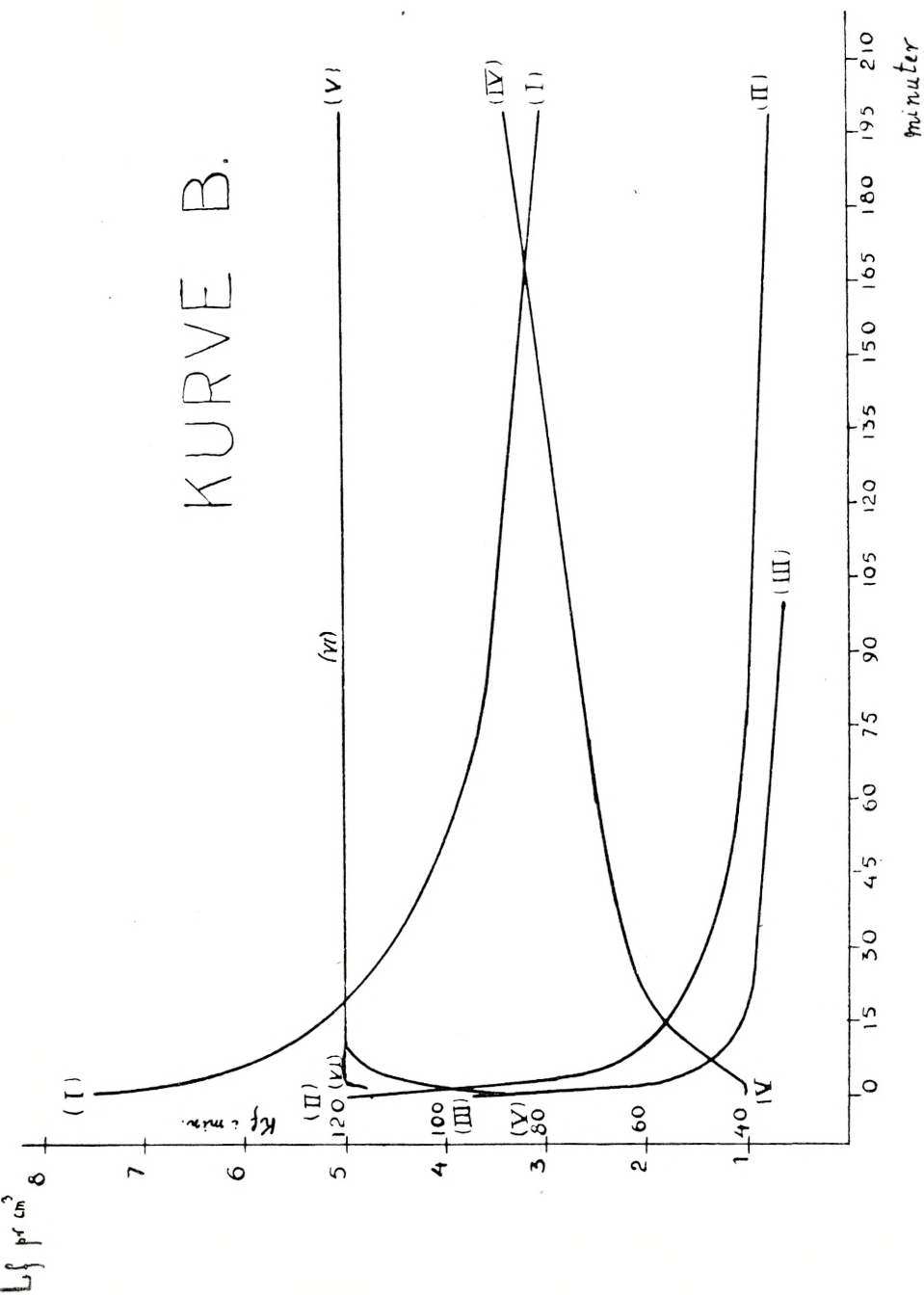
Tabel VII (Kurve B)

viser destruktionshastigheden af difteritoxin ved temperaturerne 50° , 55° og 60° C.

| a) 50° | | | b) 55° | | | c) 60° | | |
|-----------------|----------------------------|-------------------|-----------------|----------------------------|-------------------|-----------------|----------------------------|-------------------|
| Min. | L_f pr. cm^3 | $K_f(h)$ | Min. | L_f pr. cm^3 | $K_f(h)$ | Min. | L_f pr. cm^3 | $K_f(h)$ |
| 0..... | 7,52 | 0 ^h 40 | 0..... | 4,96 | 1 ^h 25 | 0..... | 3,68 | 1 ^h 55 |
| 1..... | 7,04 | 0 ^h 40 | 1..... | 3,68 | 1 ^h 40 | 1..... | 2,56 | 1 ^h 55 |
| 2..... | 6,72 | 0 ^h 40 | 2..... | 3,04 | 1 ^h 45 | 1,5.... | 2,08 | 1 ^h 55 |
| 5..... | 6,24 | 0 ^h 45 | 3..... | 2,72 | 1 ^h 45 | 2,5.... | 1,76 | 2 ^h |
| 10..... | 5,44 | 0 ^h 55 | 5..... | 2,40 | 1 ^h 55 | 4..... | 1,6 | 2 ^h |
| 25..... | 4,80 | 1 ^h | 10..... | 1,92 | 2 ^h | 6..... | 1,44 | 2 ^h |
| 50..... | 4,00 | 1 ^h 10 | 20..... | 1,68 | 2 ^h | 10..... | 1,2 | 2 ^h |
| 100..... | 3,52 | 1 ^h 10 | 30..... | 1,44 | 2 ^h | 15..... | 1,12 | 2 ^h |
| 200..... | 3,04 | 1 ^h 30 | 50..... | 1,12 | 2 ^h | 25..... | 0,96 | 2 ^h |
| | | | 100..... | 0,88 | 2 ^h | 40..... | 0,88 | 2 ^h |
| | | | 200..... | 0,80 | 2 ^h | 60..... | 0,80 | 2 ^h |
| | | | | | | 100..... | 0,64 | 2 ^h |

Ved alle titreringer er det partielt destruerede toksin forinden serumtilsætningen blandet op med lige dele frisk toksin.

Af de i tabellen opførte resultater ser man, at saavel toksinets antigene evne som udfnugningsfunktionen paa- virkes desto stærkere jo højere temperaturen er. Ved 50° er den udfnuggende funktion ikke totalt destrueret, selv efter 200 minutters forløb (første kolonne i tabellen angiver hvor mange minutter toksinet har været opvarmet til den paagældende temperatur). Ved 55° er destruktionshastigheden af den udfnuggende evne derimod total efter 10 minutters forløb og ved 60° efter kun 2,5 min. Det vil ses, at K_f herefter forbliver konstant. Ligesom ved de tidligere forsøg over destruktionshastigheden af toksin ved forskellig brintionkoncentration (særlig for de alkaliske blandingers vedkommende) opstaar her forandringer i det opvarmede toksin, der giver sig til



Destruktion af difteritoksin (p_H ca. 7) ved højere temperaturer.

Kurverne 1, 2 og 3 viser destruktoren af toksinets antigene evne ved temperaturerne henholdsvis 50, 55 og 60°. Kurverne 4, 5 og 6 angiver forandringen af toksinets udførelseshastighed overfor antitoksin ved de samme temperaturer.

kende ved, at dette nedsætter det friske toksins affinitet til antitoksin. Reaktionen mellem frisk toksin og serum forløber paa 30 minutter ved 40° C. Blandes toksinet forinden med lige dele fysiologisk saltvand eller med lige dele af den bouillon, som benyttes til toksinfremstillingen, da forhales K_f til 1^h . Den forhalende virkning, som ophedet toksin udøver paa reaktionen, er afhængig af blandingsforholdet, jo mere opvarmet toksin, der tilsættes, desto større bliver K_f . Men virkningen er ogsaa afhængig af den temperatur, som toksinet har været udsat for. Jo højere denne har været desto større er den hæmmende effekt.¹

Det omtaltes under forsøgene over brintionkoncentrationens betydning for toksindestruktionen, at toksin, hvis udfnugningsevne var betydeligt nedsat (f. eks. et saadant, som havde staaet et stykke tid ved p_H ca. 5,5), delvis kunde genvinde denne igen, naar det efter at p_H var ført tilbage til den oprindelige værdi fik lov at henstaa yderligere i 24—48 timer. Noget lignende er tilfældet med toksin, som ved opvarmning har faaet evnen til at forhale toksin-antitoksinreaktionen; den hæmmende effekt bliver mindre, naar toksinet efter at være afkølet opbevares nogen tid ved lavere temp. (0°).

400 cm^3 (B^{28} ; $L_f = 7,6$ — $8,0$ pr. cm^3 , $p_H = 7,9$) opvarmedes i et vandbad paa 55° C. under kraftig omrøring med

¹ GLENNY & WADDINGTON har paavist, at tilsætning af autoklaveret toksoid til anatoksin virker nedsættende paa dettes immuniserende evne (prøvet paa marsvin). Der synes med andre ord at være en ret intim sammenhæng imellem et toksins antigene evne og dets affinitet til antitoksin. RAMON har paavist, at af to anatoksiner, som har samme specifikke antigenindhold, men hvis affinitet til antitoksin er forskellig, vil det som besidder den mindste K_f -værdi vise sig bedst egnet til immunisering (af heste). SDRDOVSKI og CHALAPINA har gjort samme erfaring ved vaccination af mennesker med anatoksin (Centralbl. f. Bakt. (Orig.) 1927, 101, 350.

et termometer. Efter 15 minutters forløb havde vædsken i kolben naaet 55° , og den toges nu ud og afkøledes straks i isvand. Portionen deltes i to dele, hvoraf den ene straks blandedes med lige dele frisk toksin, hvorimod den anden opbevaredes ublandet. Begge portioner titreredes straks og opbevaredes derpaa under toluol ved 0° . Titreringen gentoges hver 24. time. L_f -værdien gælder for blandinger af friskt og af partielt destrueret toksin. Selv om forholdet her langt fra er saa udpræget som ved de tidligere omtalte forsøg, er der dog ingen tvivl om, at der sker en ændring i reaktionstiden, men ejendommeligt nok kun for den portions vedkommende, som opbevaredes ublandet. Der er lige saa lidt her som ved de færrige forsøg tale om en regeneration af den een gang destruerede antigene evne. Tværtimod synes svækkelsen at fortsættes ganske langsomt.

Tabel VIII,

visende forandringen i reaktionshæmmende effekt hos opvarmet toksin.

| Titring | 1) Toksin, som henstod ublandet ved 0° | | 2) Blandingen af opvarmet og af frisk toksin opbevaret ved 0° | |
|------------------------|---|------------------------------|--|----------------|
| | IE pr. cm^3 | $K_f(h)$ | IE pr. cm^3 | $K_f(h)$ |
| straks..... | 5,2 | 2 ^h | 5,36 | 2 ^h |
| 24 ^h | 5,12 | 2 ^h | 5,12 | 2 ^h |
| 48 ^h | 5,12 | 1 ^h ⁴⁵ | 5,12 | 2 ^h |
| 72 ^h | 4,96 | 1 ^h ³⁰ | 4,96 | 2 ^h |
| 96 ^h | 4,64 | 1 ^h ³⁰ | 4,96 | 2 ^h |
| 120 ^h | 4,64 | 1 ^h ²⁵ | 4,96 | 2 ^h |
| 144 ^h | 4,64 | 1 ^h ²⁵ | 4,96 | 2 ^h |

Ved forsøg 1) blandedes umiddelbart før titreringen med lige dele frisk toksin.

Vi har altsaa af det foregaaende set, at saavel toksinets udfnuggende som dets antigene evne stærkt nedsættes ved en kortvarig opvarmning til 50° og derover. Ved 55° — 60°

mister toksinet saa at sige momentant sin evne til at reagere med serum under præcipitationsdannelse. Herefter skulde man vel forvente, at udfnugningsreaktionen imellem toksin og antitoxin vilde berøres af denne omstændighed. Mest sandsynlig vilde den antagelse være, at reaktionen forløb uregelmæssigt ved temperaturer over 50° under dissociation af komplekset *TA*. RAMON omtaler i sine undersøgelser, at reaktionen kan finde sted ved 55 — 56° , endda med større hast end ved 20° eller 37° , medens den ved 60 — 65° atter aftager i hastighed, og at der nu kræves mindre mængder serum til fremkaldelse af titerudfnugning.¹ Arbejder man med endnu højere temperatur, over 65° , da forløber processen uregelmæssigt og »reaktionen mister sin betydning«.

Tabel IX,

visende reaktionstiderne for en række forskellige toksiner overfor eet enkelt serum (No. 377).

| | M_{II}^{24} | M_{IV}^{24} | M_A^{25} | M_{III}^{25} | M_V^{25} | M_{VII}^{25} |
|------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Tp. | ($p_H = 8,6$) | ($p_H = 8,2$) | ($p_H = 8,4$) | ($p_H = 8,5$) | ($p_H = 8,3$) | ($p_H = 8,4$) |
| | <i>Kf</i> | <i>Kf</i> | <i>Kf</i> | <i>Kf</i> | <i>Kf</i> | <i>Kf</i> |
| $0^\circ \dots$ | 30 ^h | 30 ^h | 21 ^h | 17 ^h | — | 48 ^h |
| $3^\circ \dots$ | 25 ^h | 25 ^h | 14 ^h | 13 ^{h 30} | 30 ^h | 33 ^h |
| $5^\circ \dots$ | 20 ^h | 21 ^h | 11 ^h | 10 ^{h 30} | — | 26 ^h |
| $11^\circ \dots$ | 15 ^h | 14 ^h | 8 ^{h 30} | 8 ^h | 26 ^h | 20 ^h |
| $14^\circ \dots$ | 12 ^h | 9 ^h | 7 ^h | 8 ^h | 22 ^h | 17 ^h |
| $17^\circ \dots$ | 10 ^h | 5 ^{h 30} | 5 ^{h 30} | 7 ^h | 18 ^h | 14 ^{h 30} |
| $25^\circ \dots$ | 6 ^h | 3 ^{h 15} | 4 ^{h 20} | 4 ^h | 11 ^h | 11 ^{h 50} |
| $30^\circ \dots$ | 4 ^h | 2 ^{h 15} | 2 ^{h 30} | 2 ^{h 15} | 8 ^h | 8 ^h |
| $35^\circ \dots$ | 2 ^h | 1 ^{h 45} | 1 ^{h 40} | 1 ^{h 30} | 5 ^h | 5 ^{h 45} |
| $40^\circ \dots$ | 1 ^h | 1 ^{h 05} | 1 ^{h 25} | 1 ^h | 3 ^{h 30} | 4 ^h |
| $45^\circ \dots$ | <u>0^{h 45}</u> | 0 ^{h 55} | 1 ^h | 0 ^{h 55} | 2 ^{h 40} | 2 ^{h 30} |
| $50^\circ \dots$ | <u>0^{h 45}</u> | 0 ^{h 45} | 0 ^{h 45} | 0 ^{h 50} | <u>1^{h 35}</u> | 1 ^{h 55} |
| $55^\circ \dots$ | <u>1^{h 15}</u> | <u>0^{h 30}</u> | 0 ^{h 40} | 0 ^{h 30} | <u>1^{h 45}</u> | <u>1^{h 30}</u> |
| $60^\circ \dots$ | 1 ^{h 15} | <u>0^{h 45}</u> | <u>0^{h 30}</u> | <u>0^{h 55}</u> | 2 ^{h 45} | 2 ^h |
| $65^\circ \dots$ | ∞ | 0 ^{h 45} | 0 ^{h 40} | 1 ^{h 45} | 7 ^{h 30} | 2 ^{h 35} |
| $70^\circ \dots$ | ∞ | 2 ^{h 45} | 1 ^{h 30} | ∞ | ∞ | ∞ |

¹ Overensstemmende med antagelsen af en partiel destruktion af toksin.

Dette punkt forekommer mig at være af en ikke uvæsentlig interesse, hvorfor jeg har udført nogle forsøgsrækker ved forskellige temperaturer: 1) med eet serum overfor forskellige toksiner, 2) med eet toksin og forskellige sera. Tabellerne IX og X viser forsøgsresultaterne.

Tabel X,

visende reaktionstiden af en række forskellige sera overfor eet toksin (M_B^{24} , $p_H = 8,4$).

| Tp. | Serum No. | | | | | |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 469 | 472 | 478 | 480 | 483 | 486 |
| | K_f | K_f | K_f | K_f | K_f | K_f |
| 0° | 30 ^h | 28 ^h | 31 ^h | 49 ^h | 54 ^h | 65 ^h |
| 3° | 25 ^h | 19 ^h | 27 ^h | 31 ^h | 48 ^h | 53 ^h |
| 5 ^h | 19 ^h | 16 ^h | 20 ^h | 25 ^h | 39 ^h | 48 ^h |
| 11° | 13 ^h | 9 ^h | 16 ^h | 17 ^h | 31 ^h | 35 ^h |
| 14 ^h | 10 ^h | 6 ^h | 12 ^h | 13 ^h | 23 ^h | 26 ^h |
| 17° | 6 ^h | 5 ^h ₃₀ | 10 ^h | 11 ^h ₃₀ | 18 ^h | 22 ^h |
| 25° | 3 ^h ₃₀ | 3 ^h ₁₅ | 5 ^h ₄₅ | 9 ^h | 9 ^h ₄₅ | 14 ^h |
| 30° | 3 ^h ₁₅ | 2 ^h ₄₅ | 4 ^h ₁₅ | 7 ^h | 7 ^h ₃₅ | 10 ^h |
| 35° | 2 ^h ₅₀ | 2 ^h ₃₀ | 3 ^h ₁₅ | 4 ^h ₃₀ | 6 ^h | 8 ^h ₃₀ |
| 40° | 2 ^h ₂₀ | 1 ^h ₃₅ | 2 ^h ₅₀ | 3 ^h ₁₀ | 4 ^h ₃₀ | 5 ^h ₅₀ |
| 45° | 2 ^h ₀₅ | 1 ^h | 2 ^h ₂₅ | 2 ^h ₄₀ | 3 ^h ₃₀ | 4 ^h ₁₅ |
| 50° | 1 ^h ₅₀ | 0 ^h ₄₅ | 2 ^h ₀₅ | 2 ^h ₂₀ | 2 ^h ₄₅ | 4 ^h ₃₀ |
| 55° | 1 ^h ₃₀ | 0 ^h ₄₀ | 1 ^h ₅₀ | 2 ^h | 2 ^h ₃₅ | 5 ^h |
| 60° | 1 ^h ₄₅ | 0 ^h ₂₀ | 2 ^h ₃₀ | 2 ^h ₂₀ | 3 ^h ₁₀ | 7 ^h ₃₀ |
| 65° | 2 ^h ₃₀ | 1 ^h ₃₀ | 2 ^h ₄₀ | 5 ^h ₁₀ | ∞ | ∞ |
| 70° | ∞ | 3 ^h ₅₀ | ∞ | ∞ | ∞ | ∞ |

Resultaterne af disse forsøg falder ikke helt sammen med dem angivet af RAMON. Først maa jeg bemærke, at titerudfugningen optraadte paa samme sted, hvad enten temperaturen var høj eller lav. Som man vil se, er det i enkelte tilfælde lykkedes, at opnaa reaktion selv ved saa høj en temperatur som 70°. Ved 65° kan man i de fleste tilfælde faa processen til at forløbe. I tabel X findes to sera (no. 483 og 486), som heller ikke reagerer ved 65°. Af disse har det ene sin laveste K_f -værdi ved 45°, det andet

ved 55° C. Begge sera er langsomt reagerende. Derimod viser det serum, som giver reaktion ved 70° sig at reagere hurtigst helt oppe ved temp. 60° . Det er i det hele taget hurtigt reagerende. Af tabel IX fremgaar det, at der ogsaa, om end i mindre grad, er forskel paa toksinerne. Da RAMON har benyttet almindeligt toksin, hvis p_H gennemsnitlig ligger omkring 8,3—8,4, indstillede jeg ikke toksinerne paa samme brintionkoncentration, men benyttede dem som de var. Imidlertid varierer p_H jo ikke saa meget, at dette kan være aarsagen til de forskelligheder, der findes imellem dem. Da p_H bliver mindre, naar temperaturen stiger, vil stabiliteten af toksinerne forøges herved; løseligt kan man anslaa den gennemsnitlige værdi af p_H for de anførte toksiner til at ligge imellem 7,5 og 8,0 (ved 50°), altsaa i nærheden af det omraade, hvor toksinets stabilitet er størst.

Med hensyn til antitoxinets stabilitet ved højere temperatur, da har undersøgelser af TH. MADSEN & WALBUM vist, at destruktionsen allerede ved 65° sker temmelig hurtigt, saaledes at serum ved at udsættes for denne temperatur efter 30 minutters forløb har mistet omkring 20 % af sit antitoxinindhold. Er temperaturen 70° andrager svækkelsen i samme tidsrum 60—70 % (!). Heri er endda ikke medregnet den svækkelse, der foregaar under opvarmningen fra 20° til henholdsvis 65° og 70° , saa tallene bliver i hvert fald lidt større endnu.

Dette vil altsaa i virkeligheden sige, at reaktionen imellem toksin og antitoxin kan finde sted ved temperaturer, der ligger langt over dem, hvor de enkelte komponenter destrueres med stor hast. Komplekset toksin-antitoxin er altsaa mere stabilt end de to bestanddele, som indgaar deri. Da netop de langsomt reagerende

sera er dem, der først viser sig ude af stand til at reagere med toksinet, efterhaanden som temperaturen bliver højere, tyder dette paa, at antitoksinet ikke naar at faa bundet toksinet, førend dette er blevet paavirket saa stærkt af varmen, at det mister sin reaktionsevne. Vi har set, at kun enkelte sera reagerer ved 70° , men hvis man lader blandingen af toksin-serum staa i nogen tid,¹ inden den udsættes for den høje temperatur, da vil man ogsaa med langsommere reagerende sera være i stand til at faa reaktionerne til at forløbe. Den høje temperatur formaar altsaa ikke at spalte det en gang dannede kompleks.

Selve bundfaldet, som dannes ved toksin-antitoxin-reaktionen, er i høj grad stabilt. Jeg har prøvet at fraskille saadanne bundfald, vaske dem omhyggeligt med destilleret vand og derpaa efter opslemning i fys. saltvand at opvarme til 60° i 1 time. Her skulde man med den erfaring vi har om stabiliteten af toksin og antitoxin kunne faa største delen af toksinet destrueret og opnaa at frigøre antitoksinet, der ikke paavirkes synderligt ved denne temperatur. Jeg har imidlertid ved en paafølgende titrering (paa marsvin) af saadant behandlet bundfald kun kunnet paavise relativt smaa antitoxinmængder, i hvert fald langt fra den mængde, man skulde vente. RAMON har forsøgt at frigøre antitoksinet af bundfaldet ved at behandle dette med fortyndet syre, hvorved det gaar i opløsning. Efter hans angivelse kan man paa denne maade opnaa en dissociation af forbindelsen med paafølgende destruktion af toksinet; antitoksinet, der bliver tilbage, skulde være meget virksomt i forhold til den tilstedeværende proteinmængde. Jeg har ikke kunnet bekræfte RAMON's resultater. Ved at benytte S. P. L. SØRENSEN's stødpudeblandinger bestemte jeg med hvilken

¹ Afhænger af reaktionshastigheden imellem de to bestanddele.

brintionkoncentration bundfaldet var stabilt. Anvendtes blandinger hvis p_H var mindre end 3,0 og større end 10,3¹ opløstes bundfaldet fuldstændigt. Men ved opvarmning af disse opløsninger til 60° i en time lykkedes det mig ikke at faa regenereret større mængder antitoksin, hvilket er let forstaaeligt, da antitoksinet selv er instabilt under disse omstændigheder.

Som bekendt har ARRHENIUS & MADSEN og senere MADSEN og hans elever gennem en lang række arbejder over forskellige processer vedrørende antigeners og antistoffers forhold vist, at adskillige af disse reaktioner (destruktion af toksin og antitoksin, reaktionen antistof: antigen o. fl. a.) forløber med en saadan regelmæssighed, at de let lader sig beregne efter lignende formler, som simple kemiske processer. I mange tilfælde er overensstemmelsen mellem de eksperimentelt fundne og de beregnede værdier overordentlig god. Jeg har derfor undersøgt, om de af mig omtalte forsøg (svækkelsen af toksin, reaktionshastighedens afhængighed af temperaturen) skulde vise saa store regelmæssigheder, at man kunde beregne resultaterne ved hjælp af en simpel formel. Dette var imidlertid ikke tilfældet, hvilket maaske kunde forundre, da man jo paa forhaand maatte vente sig en større regelmæssighed ved forsøg udført in vitro (de fleste af MADSEN og hans medarbejders forsøg var foretaget paa dyr). Imidlertid maalte de nævnte forskere for toksinets vedkommende kun en enkelt egenskab, nemlig giftigheden; hos serum bestemtes den toksinneutral-

¹ GLENNY & WADDINGTON har paavist, at en opvarmning til 80° i en time af toksoid-antitoksin-bundfald bevirker en forøgelse af dettes antigenes evne. Dette kan næppe forklares paa anden maade end ved at antage en større destruktion af antitoksin end af toksoid. Nu er her anvendt toksoid (anatoksin), medens jeg (ligesom RAMON) benyttede toksin, hvilket vanskeliggør en direkte sammenligning.

liserende egenskab, og ved reaktionshastighedsmaalinger af processen imellem toksin og antitoxin var det overskuddet af fri gift i en given blanding af partielt mættet toksin, der toges hensyn til.

Benyttes derimod udfnugningsreaktionen kommer der yderligere en faktor ind, nemlig selve den udfnuggende egenskab. Naar man derfor paa en eller anden maade (f. eks. ved opvarmning) delvis destruerer enten toksin eller antitoxin, paavirkes disse substanser paa en dobbelt maade, og det man maaler bliver da resultatet af mindst to, maa-ske endda flere processer. Hertil kommer at den udfnug-gende funktion under visse forhold er langt mere instabil end henholdsvis antigen- og antitoksinfunktionen; ved titre- ringen maa man da tage sin tilflugt til »blandings«metoden, som er omtalt i kapitlet »Forsøgsmetodik«. Herved forøges, som nævnt, resultaternes usikkerhed.

Bestemmelserne af forholdet imellem temperaturen og udfnugningstiden maa nødvendigvis være behæftet med meget store fejl. For at bestemme K_f nøjagtigt maa man nemlig helst, saaledes som jeg har omtalt det tidligere, indrette vandhøjden i vandbadet, saa at vædskesøjlen i reagensglassene kun delvis er dækket. Hvis glassene er helt neddyppet i vandet, da vil cirkulationen inde i vædsken blive mindre og den allerførste udfnugning ikke fremtræde saa skarpt. De to bestanddele, toksin og serum skulde i forvejen være opvarmet til den temperatur, som man ønsker at foretage bestemmelse ved. Men dette umuliggøres for de højere temperaturers vedkommende grundet paa tok- sinets instabilitet. Jeg har derfor til mine forsøg valgt den fremgangsmaade at henstille toksin og serum ved de paa- gældende temperaturer (fra 0° — 20°) et døgn inden blan- dingen foregik. For de temperaturer, der ligger imellem

25°—70° er blandingen af toksin og serum foretaget ved alm. laboratorietemperatur, hvorpaa glassene straks stilledes i et vandbad, der havde den ønskede temperatur. Herved fremkommer altsaa en fejl, idet der hengaar et stykke tid, inden temperaturen inde i glassene er den samme som i vandbadet. Hensigten med forsøgene har heller ikke været at faa rede paa relationen imellem temperaturen og reaktionshastigheden, men nærmere at paavise den interessante forskel, der findes imellem stabiliteten af komplekset $T:A$ og de enkelte komponenter.

b. Forsøg med Antitoksin.

Hertil er fortrinsvis benyttet et stærkt serum stammende fra hest no. 788 (aarel. $18\frac{1}{2}$ 29). Enkelte forsøgsrækker er udført med dette serum i form af »renset« pseudoglobulin. Dette sidste fremstilledes ved udsaltning med ammoniumsulfat (HOMERS metode). Styrken af det oprindelige serum var 1700 AE pr. cm^3 og totalproteinindholdet 9,84 %. De ved hjælp af ammoniumsulfat udfældede og derpaa dialyserede pseudoglobuliner¹ indeholdt 1200 AE pr. cm^3 med et proteinindhold paa 4,95 %. 1 AE »vejer« altsaa henholdsvis 0,0578 mg og 0,0412 mg. Rensningen er saaledes ikke paafaldende stor, men det viste sig ved forforsøg, at dette var det højeste, der kunde opnaas under bevarelse af serums udfnuggende evne og uden altfor stort antitoksintab.

¹ Efter S. P. L. SØRENSEN kan man ikke ved de hidtil kendte metoder fremstille rent pseudoglobulin, hvilket ogsaa stemmer godt med de erfaringer, jeg har gjort angaaende rensede pseudoglobuliner fra differiiimmunsera. Selv ved gentagne udsaltninger faar man produkter, hvis immunologiske egenskaber tyder paa, at ikke alt euglobulin er fjernet.

Til nogle af forsøgene er der benyttet et serum fra en tidligere aareladning af samme hest ($^{25/10}$ 28). De forskellige sera opbevaredes under forsøgene ved $\div 15^{\circ}$ C. i tilsmeltede ampuller.

1ste Forsøgsrække.

Serum 788 ($^{25/10}$ 28) 1600 AE pr. cm^3 .

Serum fortyndedes 1:10 med fys. saltvand, derpaa tilsattes forskellige mængder saltsyre og natron for at opnaa blandinger af de ønskede brintionkoncentrationer. Der blev fremstillet 50 cm^3 af hver blanding; 50 cm^3 serumfortynding krævede følgende mængder syre og natron for at opnaa en brintionkoncentration svarende til de anførte p_H -værdier.

Brintionkoncentrationen af:

| | | | | | p_H | Indikator |
|-------------------|-----------------|-------|-----------------------|-------------|-------|-------------|
| 50 cm^3 | serumfortynding | + 0,7 | cm^3 n/l-HCl | svarede til | 4,0 | metylorange |
| 50 | - | — | + 0,25 | - | — | — |
| 50 | - | — | + 0,14 | - | — | — |
| 50 | - | — | + 0,028 | - | — | — |
| 50 | - | — | + 0,02 | - | NaOH | — |
| 50 | - | — | + 0,11 | - | — | — |
| 50 | - | — | + 0,32 | - | — | — |

Da maalingen af brintionkoncentrationen skete kolorimetrisk, kan resultaterne være behæftet med en fejl (»proteinfejl«). Dog maa det erindres, at proteinindholdet i virkeligheden er ringe (mindre end 1 %), idet serumet anvendtes i fortyndet tilstand. Imidlertid betragter jeg alligevel af denne grund dette forsøg som blot orienterende og anfører derfor ikke titreringsresultaterne i detaljer. Ved de senere forsøg er brintionkoncentrationen bestemt baade kolorimetrisk og elektrometrisk.

Tekniken var iøvrigt den samme som ved undersøgelsen af toksinet: Maaling af styrken straks efter syre-base-tilsætningen, opbevaring af blandingerne ved 40° , gentagelse af antitoksinbestemmelsen *in vitro* med passende tids mellemrum. Til titreringerne anvendtes alm. toksin ($L_f = 8,0$ pr. cm^3 ; $p_H = 7,0$). Af dette havde jeg et større forraad, saa at alle serumtitreringer er foretaget med det samme toksin. Det almindelige toksin er jo rigt paa stødpude, hvorfor jeg ikke fandt det nødvendigt at neutralisere serumprøverne forinden maalingen. Serummængderne er smaa i forhold til toksinrumfanget (ca. 1 del serum til 20 dele toksin); derfor blev serumet ført tilbage til neutral reaktion ved simpel fortynding med toksinet (kolorimetrisk bestemmelse af blandingerne i hvert enkelt tilfælde).

Resultatet af denne forsøgsrække var følgende:

De blandinger, hvis p_H var mindre end 7,0 ændredes saaledes, at K_f -værdierne blev mindre jo længere tid de henstod ved 40° . For de alkaliske blandingers vedkommende var forholdet derimod omvendt. Reaktionshastigheden blev mindre og mindre (d. v. s. K_f blev større). Det samme var tilfældet med den blanding, hvis brintionkoncentration svarede til $p_H = 4,0$. Blandingerne observeredes en maaned igennem. Antitoksinsvækkelse kunde kun paavises i de blandinger, hvor p_H var større end 8,0 incl. Efter udfnugningen at dømme skulde man ganske vist faa det indtryk, at titeren ogsaa ændredes i blandingerne, hvis p_H var henholdsvis 6,0 og 5,0; men kontrollforsøg paa marsvin viste, at dette ikke var tilfældet. Den blanding, hvis brintionkoncentration svarede til $p_H = 5,0$, udviste et ejendommeligt forhold, idet den straks efter syretilsætningen reagerede betydelig langsommere end kontrollfortyndingen (serum + saltvand); efter en times henstand var reaktionstiden

yderligere forøget, men da der var forløbet 24 timer var K_f mindre end ved første titrering og efter 48 timer var reaktionstiden kun det halve af serums oprindelige reaktionstid. Ved yderligere henstand formindskedes K_f stadig, saa at serumet efter at have henstaaet en maaned under de ovenfor nævnte forsøgsbetingelser reagerede omtrent 10 (!) gange saa hurtigt, som før brintionkoncentrationsændringen fandt sted.

Denne ejendommelige effekt forekom det mig at være af betydelig interesse at faa undersøgt nærmere. Det har nemlig vist sig, at antitoksinet, naar det er udsat for indflydelse af forskellige fysiske eller kemiske faktorer stedse taber i reaktionsevne; dets affinitet til toksin, saaledes som den giver sig tilkende ved den hastighed, hvormed udfnugningen i en bestemt blanding af de to bestanddele finder sted, nedsættes. Dette finder f. eks. sted, naar serum bliver tilstrækkelig gammelt; selv om temperaturen er lav foregaar denne proces; men den fremskyndes stærkt ved opvarmning. Som vi senere skal se, vil tilsætningen af forskellige fremmede stoffer ofte være i stand til yderligere at akcelerere destruktionshastigheden af antitoksinets udfnugningsevne. Til nærmere bestemmelse af den brintionkoncentration ved hvilken antitoksinets udfnugningshastighed overfor toksin forøges, fremstilledes serumfortyndinger (100 cm³ af hver) hvis brintionkoncentrationer svarede til henholdsvis $p_H = 4,5$, $p_H = 5,0$, $p_H = 5,5$.

Brintionkoncentrationen af:

| | | | | | |
|------------------------------------|---------|-----------|-------------|-----------|------------------|
| 10 cm ³ serumfortynding | + 0,063 | n-HCl | svarede til | p_H | 4,5 ¹ |
| 10 - - - - - | + 0,057 | - - - - - | - - - - - | - - - - - | 5,0 |
| 10 - - - - - | + 0,037 | - - - - - | - - - - - | - - - - - | 5,5 |

¹ p_H blev senere, da forsøget var afsluttet, kontrolleret elektrometrisk. Herved fandtes værdierne: 4,55, 4,70 og 5,67.

Straks efter tilsætningen af syre titreredes blandingerne, hvorpaa de henstilledes ved 40° C. Samtidig fremstilledes en opløsning af serum i fys. saltvand (1 + 9); denne, der havde $p_H = 7,3$ (fenolrødt) tjente som kontrol. Tabellen (No. XI) viser resultatet af forsøgene.

Tabel XI,
visende antitoksinets stabilitet ved forskellig brintionkoncentration (temp. 40° C.).

| Serumfor- tyndin- gens p_H | (umiddelbart efter syretilsætningen). | | | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | $7/3$ 29 | $8/3$ 29 | $11/3$ 29 | $27/3$ 29 | $10/4$ 29 | $16/4$ 29 | $1/5$ 29 |
| 4,55 | 160 (1 ^h 15) | 135 (0 ^h 35) | 120 (0 ^h 10) | 105 (0 ^h 05) | 85 (0 ^h 04) | 85 (0 ^h 04) | 70 (0 ^h 03) |
| 4,70 | 160 (1 ^h 15) | 140 (0 ^h 50) | 120 (0 ^h 17) | 105 (0 ^h 06) | 95 (0 ^h 05) | 90 (0 ^h 05) | 70 (0 ^h 04) |
| 5,67 | 160 (1 ^h 15) | 150 (1 ^h) | 120 (0 ^h 20) | 110 (0 ^h 15) | 100 (0 ^h 07) | 100 (0 ^h 07) | 85 (0 ^h 06) |
| Kontrol | 160 (0 ^h 45) | 160 (1 ^h) | 160 (1 ^h 05) | 160 (1 ^h 25) | 150 (1 ^h 45) | 150 (1 ^h 45) | 150 (2 ^h 10) |

Den første kolonne angiver serums antitoksintiter i AE pr. cm^3 . Tallene i parentes K_f ved 40° C.

Medens kontrolblandingen svækkes ubetydeligt (ca. 10%), tiltager reaktionstiden for denne blandings vedkommende, saa at K_f efter knap to maaneders forløb er steget til den tredobbelte værdi. For de tre andre blandinger synker K_f meget stærkt og naar i det mest udprægede tilfælde en værdi, der er 15 gange mindre end det oprindelige serums. Samtidig forskydes udfnugningspunktet. At der ikke er tale om en virkelig antitoksinsvækkelse overbeviste jeg mig om ved at foretage en kontrolbestemmelse paa marsvin. Alle tre blandinger gav her en titer paa ca. 160 enheder. Men ogsaa paa anden vis kan det godtgøres, at den ovenfor nævnte forskydning af udfnugningspunktet ikke svarer til en tilsvarende formindskelse af titeren. Den $27/3$ udtoges en prøve af den blanding, hvis brintionkoncentration svarede til $p_H = 5,0$; der neutraliseredes med natron til p_H

= 7,5, hvorefter styrken bestemtes. Herved fandtes titeren 120 *AE* og ikke 105, som ved den foregaaende bestemmelse. K_f var samtidig steget til 0^{h15} . Den neutraliserede blanding henstilledes derpaa ved 40° og titreredes atter den $^{10/4}$ og den $^{16/4}$. Herved fandtes i begge tilfælde en titer paa 150 *AE*, og reaktionstiden var ligeledes ens, nemlig 1^h . Processen er altsaa reciprok. Saavel titer som reaktionstid stiger igen, naar p_H føres tilbage til den oprindelige størrelse.

Som nævnt udførtes forsøgene med fortyndede serumopløsninger. Jeg undersøgte dernæst, hvorledes det ufortyndede serum opførte sig. Virkningen af syren var her analog med den, der paavistes ovenfor, kun skete processen her endnu hurtigere. Jeg har bestemt hastigheden af begge processer ved følgende forsøg: 50 cm^3 ufortyndet serum opvarmedes til 40°C . og blandedes med 0,58 cm^3 5/n-HCl ($p_H = \text{ca. } 5$)¹. Derpaa foretoges straks en titrering, idet en lille portion serum udtoges og fortyndedes med 9 dele fys. saltvand. Den store portion serum stilledes i termostat ved 40°C ., og titreringen gentoges til de i tabel XII anførte tider.

Da blandingen havde staaet ved 40° i 24 timer neutraliseredes en del heraf (til p_H 7,5), hvorefter denne, der stadig opbevaredes ved 40°C ., paa samme maade titreredes med forskellig tids mellemrum (tabel XIII).

Hvordan skal man nu forklare denne ejendommelige proces? Først og fremmest er det interessant at se, at selve udfnugningsfænomenet skifter karakter, naar antitoksinet

¹ Det var lidt vanskeligt at bestemme p_H nøjagtigt ved kolorimetrisk maaling; dette skyldes muligvis, at der til serumet var sat kinosol, hvilket giver en grøn farve. Den elektrometriske kontrolbestemmelse viste en p_H -værdi af 4,46.

Tabel XII (Kurve C),

der viser ændringen af antitoksinets K_f -værdi og af titerudfnugningen, naar antitoksisk serum i uførtynnet tilstand

ved p_H 5 udsættes for en temp. af 40° C.

| Titring efter: | 0 ^h | 0 ^h 30 | 1 ^h | 2 ^h | 4 ^h | 8 ^h | 24 ^h | 48 ^h | 96 ^h | 192 ^h |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| AE pr. cm^3 | 140 | 140 | 140 | 120 | 105 | 95 | 85 | 70 | 70 | 70 |
| K_f | 0 ^h 50 | 0 ^h 45 | 0 ^h 40 | 0 ^h 35 | 0 ^h 15 | 0 ^h 08 | 0 ^h 04 | 0 ^h 03 | 0 ^h 03 | 0 ^h 02 |

Titerudfnugningen forskydes her noget straks efter syretilsætningen, og udfnugningshastigheden fortales mindre, end naar der anvendes fortyndet serum. Derpaa tager processen fart, saa at K_f allerede efter 24 timer er 10 gange mindre end før syretilsætningen (0^h45). Samtidig synes serum at have mistet halvdelen af sit antitoksin.

har været udsat for en indvirkning af brintioner. Det oprindelige serum udmærkede sig ved at give en distinkt reaktion med en let aflæselig titerudfnugning. Dette forhold varierer nemlig stærkt for forskellige sera, men som almindelig regel kan man sige, at jo hurtigere et serum reagerer med toksin, desto større tilbøjelighed viser udfnugningen til at optræde i flere blandinger paa en gang, saa at titer-

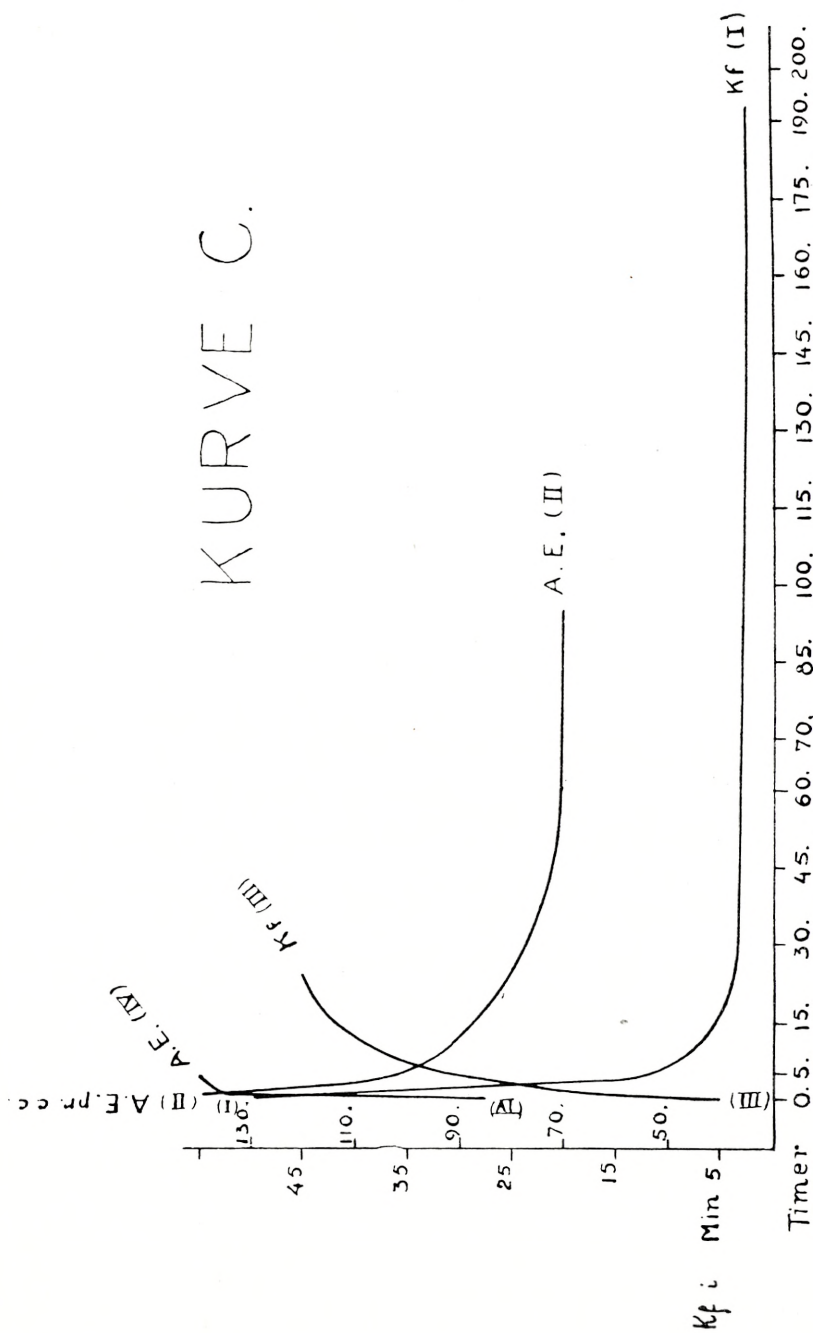
Tabel XIII (Kurve C),

der viser, hvorledes K_f -værdien og titerudfnugningen atter ændres, naar antidifterisk serum, hvis antitoksin har været

under indflydelse af brintioner (p_H ca. 4,46) ved temp. 40° , neutraliseres til p_H 7,5 og derpaa vedblivende udsættes for temp. 40° .

| Titring efter: | 0 ^h | 0 ^h 05 | 0 ^h 10 | 0 ^h 25 | 1 ^h | 2 ^h | 4 ^h | 8 ^h | 24 ^h | 48 ^h | 96 ^h | 192 ^h |
|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| AE pr. cm^3 | 85 | 95 | 105 | 120 | 130 | 135 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 | 140 |
| K_f | 0 ^h 05 | 0 ^h 08 | 0 ^h 10 | 0 ^h 14 | 0 ^h 18 | 0 ^h 20 | 0 ^h 35 | 0 ^h 35 | 0 ^h 45 | 0 ^h 45 | 0 ^h 45 | 0 ^h 45 |

Processen løber nu den modsatte vej. Saa vel titer som reaktionstid stiger betydeligt, indtil de oprindelige værdier er naaet. Man vil bemærke, at hastigheden af den sidste proces er større end af den første.



Indvirkning af brintioner paa difteriantitoksin (p_H ca. 4,5) ved 40° .

Kurverne 1 og 2 viser forskydningen af udføgningspunktet og forøgelsen af udføgningshastigheden overfor toksin; kurverne 3 og 4 viser, hvorledes processen efter neutralisation af syren løber den modsatte vej.

udfnugningen derved bliver vanskeligere at bestemme nøjagtigt. De hurtigt reagerende sera danner endvidere meget store voluminøse fnug, medens disse for meget langsomt reagerende seras vedkommende kan være ganske fine, nærmest mindende om smaa sandpartikler. Imellem disse to ekstremer findes alle overgange. Endvidere udviser de hurtigt reagerende sera efter TH. MADSEN og S. SCHMIDT'S undersøgelser den ejendommelighed, at antitoksintiteren bestemt *in vitro* ligger betydeligt lavere end titeren bestemt paa marsvin efter EHRLICH. For de meget langsomt reagerende seras vedkommende er forholdet omvendt. Den største gruppe sera er middelhurtigt reagerende ($K_f = \frac{1}{2}$ —1 time ved 40° og med anvendelse af et toksin paa 8—10 *IE*), og her findes overensstemmelse imellem *in vitro* og *in vivo*-maalingerne. Det til forsøgene benyttede serum viste netop en saadan overensstemmelse. Men af tabellen ser man, at titeren *in vitro* bliver mindre samtidig med at K_f -værdien synker under indvirkningen af brintionerne. Det er med andre ord lykkedes, ved simpelt hen at ændre miljøets brintionkoncentration, at fremstille et serum med lignende egenskaber som de naturligt hurtigt reagerende sera. Nu var det imidlertid muligt, at den ovenfor nævnte reaktion beroede paa noget helt andet, at den ikke var specifik. Jeg prøvede til undersøgelse heraf at blande serum med forskellige vædsker, som ikke indeholdt difteritoksin, nemlig 1) saltvand, 2) Martinbouillon, som benyttes til toksinfremstilling, 3) tetanustoksin, 4) toksin fremstillet af scarlatinastreptokokker. I intet af tilfældene fremkom der udfnugning. Samtlige blandinger holdt sig klare i flere døgn. Reaktionen er altsaa specifik; den finder kun sted imellem difteritoksin og difteriimmunserum. Jeg titrerede dernæst en halv snes forskellige difteritoksiner, hvis L_f -

værdier laa imellem 0,5 og 18 pr. cm^3 under anvendelse af det med syre behandlede serum. Herved opnaaede jeg samme værdier for L_f , som naar jeg benyttede det ubehandlede serum. Men ogsaa forholdet imellem de forskellige K_f -værdier var det samme som for det ubehandlede serum, de svage toksiner reagerede relativt langsomt og reaktionshastigheden steg efterhaanden som toksinernes antigene værdi blev større. Saaledes reagerede det svageste toksin ($L_f = 0,5$) paa 1 time og det stærkeste ($L_f = 18$) paa mindre end 1 minut (!), naar der anvendtes syrebehandlet serum. Titreringen overfor det tilsvarende friske serum gav værdierne henholdsvis 16 timer og 20 minutter.

Der kan altsaa ingen tvivl være om, at reaktionen virkelig er et udtryk for en proces imellem præcipitinogen fra difteribouillon og præcipitin fra difteriimmunserumet. Den adskiller sig imidlertid alligevel i væsentlig grad fra de almindelige toksin-antitoxinreaktioner. Et serum, som under indflydelse af brintioner (p_H ca. 5) er blevet hurtigt reagerende formaar ogsaa — i modsætning til ubehandlede sera — at fremkalde udfnugning med toksiner, som har været udsat for højere temperatur, eller for indvirkning af brint- resp. hydroksylioner i saa lang tid, at ethvert spor af toksin, saaledes som det giver sig tilkende ved de hidtil benyttede paavisningsmetoder er forsvundet. Da det lod sig gøre »kunstigt« at fremstille hurtigt reagerende sera, laa den antagelse nær, at saadanne maatte være særlig godt egnede til titrering af partielt destruerede toksiner, idet man her skulde have mulighed for at følge processens forløb til et mere fremskredet stadium, uden at det var nødvendigt at anvende »blandings«metoden, der som nævnt giver ret usikre resultater. Derfor foretoges nogle forsøg ved op-hedning af toksin til 60° , hvor destruktionsgraden af saavel ud-

fnugningsevnen som af antigenfunktionen sker ret hurtigt. Imidlertid viste det sig, at toksiner, som havde været opvarmet til 60° i f. eks. en time, naar der titreredes med det syrebehandlede serum, opførte sig ganske som de tilsvarende ikke opvarmede gifte. Titeren var den samme, kun var reaktionstiden ubetydelig forhalet. Jeg prøvede dernæst at opvarme toksinet til højere temperaturer (100° indtil 1 time og 127° indtil $\frac{1}{2}$ time). Atter her benyttedes en række toksiner af forskellig styrke. Da forsøgsresultaterne var overensstemmende, skal kun et enkelt eksempel anføres.

200 cm^3 toksin XIX²⁹ ($L_f = 8,0 \text{ pr. cm}^3$) autoklaveredes i $\frac{1}{2}$ time ved $1\frac{1}{2}$ atmosfæres overtryk (svarende til temp. 127°). Efter afkøling til stuetemp. foretoges en titrering med serum 788 (^{25/10} 1928), som havde staaet en maaned udsat for temp. 40° ved $p_H = 5$. Herved fandtes:

$$\begin{aligned} L_f &= 8,0 \text{ pr. cm}^3 \\ K_f &= 1^{\text{h}10} \end{aligned}$$

(Det ubehandlede toksin reagerede paa 1 minut). Resten af det autoklaverede toksin stilledes i kælderen ved 0° .

24 timer senere foretoges en ny titrering:

$$\begin{aligned} L_f &= 8,0 \text{ pr. cm}^3 \\ K_f &= 0^{\text{h}40} \end{aligned}$$

Yderligere foretoges en bestemmelse efter en uges forløb:

$$\begin{aligned} L_f &= 8,0 \text{ pr. cm}^3 \\ K_f &= 0^{\text{h}15} \end{aligned}$$

Reaktionshastigheden nedsættes betydeligt ved autoklaveringen, men i lighed med hvad jeg tidligere har fundet

(findes omtalt under destruktionsforsøgene med toksin udført ved forskellig temp. og varierende brintionkoncentration), stiger den atter, naar toksinet efter ophedningen faar lov at henstaa ved lavere temp. i nogen tid.

Endelig har jeg prøvet at titrere nogle af de toksinblandinger, som benyttedes ved undersøgelsen over brintionkoncentrationens betydning for toksinets stabilitet. I nogle af dem var toksinet helt destrueret (f. eks. i den blanding, hvis p_H var = 5), i andre var destruktionsgraden kun partiel. Alligevel reagerede de alle med det nævnte serum, som om de var i besiddelse af deres oprindelige antigene evne.

Difterigiftbouillon indeholder altsaa et, ikke tidligere iagttaget, overfor højere temperaturer, og over for syrer og alkalier resistent præcipitino-gen.

Om sammenhængen mellem den almindelige toksin-antitoxin reaktion (RAMON'S udfnugningsfænomen) og den ovenfor omtalte proces tør jeg i øjeblikket ikke udtale mig nærmere.

Imidlertid, allerede de hidtil opnaaede resultater giver anledning til en nærmere overvejelse over naturen af processen imellem antigener og antistoffer i det hele taget, da toksin-antitoxin-reaktionen kun er at betragte som et særtilfælde af den almindelige proces, der forløber, naar immunstoffer paavirker deres respektive antigener, og næppe er væsensforskellig fra reaktionen mellem f. eks. bakterier og agglutinin, hæmolysiner og antihæmolysiner, o. s. v.

2den forsøgsrække.

Denne er udført med rensed serum (788 ¹⁸/₂ 29). Fremstillingen af dette serum er tidligere omtalt. Det bestod

Tabel

visende ændringer i antitoksinindhold og udfnugningsevne hos rensket
skellig brintion-

| Sammensætning af standardblanding | Serumfortyndingens ¹ p_H | |
|--|---------------------------------------|----------------------|
| | kol. | elektr. ² |
| 3,33 dele citrat + 6,67 dele HCl (2,27)..... | ca. 3 | 2,51 (2,60) |
| 4,75 dele citrat + 5,25 dele HCl (3,52)..... | ca. 4 | 3,56 |
| Ren citrat (4,95)..... | 5,0 | 4,95 (4,95) |
| 1,2 sek. fosf. + 8,8 prim. fosf. (6,0)..... | 6,0 (5,7) | 5,76 (5,85) |
| 7,2 sek. fosf. + 2,8 prim. fosf. (7,2)..... | 7,1 | 7,04 (7,06) |
| 0,75 sek. fosf. + 0,25 prim. fosf. (8,39)..... | 7,9 | 7,71 (7,81) |
| 7,2 glycin + 2,8 NaOH (9,62)..... | 9,1 | 9,37 (8,3) |
| 4,9 glycin + 5,1 NaOH (11,56)..... | 10,0 | 10,45 (8,53) |

¹ Til alle blandinger sattes 1 ‰ kinosol.

² Med hensyn til brintionmaalingerne gælder følgende: Hvis p_H var lavere end hvad der kan bestemmes med metylrødt, fremkom helt andre farver, naar indikatorerne (metylorange, bromfenolblaat) sattes til de blandinger, som indeholdt serum end for de rene stødpudeblandingers vedkommende. Da den elektrometriske bestemmelse ikke voldte vanskelighed (der opnaaedes hurtigt konstant potential), regner jeg ikke med de kolorimetrisk bestemte værdier. De tal, som staar i parentes i kolonnen, der indeholder de elektrometriske p_H -værdier, angiver blandingerens p_H ved forsøgets slutning, d. v. s. efter henstand ved 40° i 30 døgn, medens de foran anførte værdier er resultatet af en bestemmelse foretaget straks efter tilberedningen. p_H kan altsaa ikke holdes konstant i de stærkt alkaliske blandinger (over p_H 9). Titreringsresultaterne af

hovedsageligt af pseudoglobulin. Nogle forforsøg overbeviste mig om, at det indeholdt saa lidt stødpude, at brintionkoncentrationen ikke kunde holdes konstant under forsøget (en alm. fortynding i saltvand (1 del serum + 9 dele fys. saltopløsning, der straks efter fremstillingen havde en brintionkoncentration svarende til p_H ca. 7,3) viste ved en

XIV a,

 serum 788 ($18\frac{1}{2}$) under indflydelse af en temp. paa 40° C. ved for-
 koncentration.

| Antal Døgn ved 40° C. | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------|
| 0 Døgn | | 1 Døgn | | 10 Døgn | | 20 Døgn | | 30 Døgn | | |
| AE pr. cm ³ | <i>K_f</i> | AE pr. cm ³ | <i>K_f(h)</i> | AE pr. cm ³ | <i>K_f</i> | AE pr. cm ³ | <i>K_f</i> | AE pr. cm ³ marsvin | AE pr. cm ³ | <i>K_f</i> |
| 100 | 2h ¹⁶ | 0 | 2h ²² ³ | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| | | | <i>K_f</i> | | | | | | | |
| 120 | 1h ⁵⁰ | 100 | 0h ³⁵ | 90 | 0h ¹⁵ | 80 | 0h ¹³ | 110 | 71 | 0h ¹² |
| 120 | 1h | 120 | 1h ⁴⁰ | 120 | 2h ³⁰ | 110 | 2h ³⁹ | 110 | 100 | 2h ⁴⁵ |
| 120 | 0h ⁵⁴ | 120 | 1h | 120 | 1h ²³ | 110 | 1h ³⁴ | 110 | 105 | 1h ³⁰ |
| 120 | 0h ⁵⁵ | 120 | 0h ⁵⁸ | 120 | 1h ²¹ | 110 | 1h ⁵⁴ | 110 | 105 | 2h ¹³ |
| 120 | 0h ⁵⁵ | 120 | 0h ⁵⁵ | 120 | 1h ³⁵ | 110 | 3h ²² | 110 | 100 | 4h ²⁰ |
| | | | | | <i>K_f(h)</i> | | <i>K_f(h)</i> | | | |
| 120 | 0h ⁵⁸ | 120 | 1h | 105 | 1h ³³ ⁴ | 82 | 2h ⁵⁶ ⁴ | 71—75 | 75 | 4h ²⁵ |
| 120 | 1h | 110 | 1h ³⁰ | 80 | 3h ⁵⁰ ⁵ | 50 | 5h ³⁰ ⁵ | 50 | | ingen reakt. |

disse kan derfor ikke sammenlignes med de øvrige. Den kolorimetrisk bestemmelse foretoges ved 40° , medens den elektrometriske maaling skete ved 18° . Naar der derfor er saa stor en forskel paa p_H -værdierne bestemt ved henholdsvis den kolorimetrisk og den elektrometriske metode for de blandinger, som er tilberedt med glycin-natron, maa man tage i betragtning, at p_H af glycin-natron-blandinger bliver mindre, naar temperaturen stiger.

³ Blandet forinden titreringen med lige dele frisk serum. Maaling paa marsvin gav en titer paa < 19 AE.

⁴ $\bar{a}\bar{a}$ frisk serum. Titrering af det rene serum gav 100 AE og $K_f = 5$ h⁴⁵.

⁵ Blandet med $\bar{a}\bar{a}$ frisk serum.

maaling foretaget 14 dage senere en p_H -værdi paa ca. 8,2). Jeg benyttede derfor i dette tilfælde en noget ændret forsøgsteknik: 1 del serum fortyndedes med 9 dele af en stødpudeblanding (efter S. P. L. SØRENSEN), hvis brintionkoncentration laa i nærheden af den ønskede og efter serumtilsætningen bestemtes p_H af blandingen, baade kolorimetrisk

Tabel

visende indvirkningen af brintioner (p_H 4,02 og p_H 4,55)

| Stødpudeopløsning | Serumfortyndingens ² p_H | | Antal | | |
|---|---------------------------------------|---------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | kol. | elektr. | 0 | 1 | 2 |
| 5,5 cm ³ citrat + 4,5 cm ³ HCl (3,94)... | ? ¹ | 4,02 | 120 1 ^h 18 | 100 0 ^h 58 | 85 0 ^h 40 |
| 7 cm ³ citrat + 3 cm ³ HCl (p_H 4,44)... | 4,3 | 4,45 | 120 1 ^h 08 | 115 1 ^h 58 | 115 1 ^h 19 |

¹ Kunde ikke maales kolorimetrisk.

² Som antiseptikum tilsattes 1 ‰ kinosol.

og elektrometrisk. Saavel stødpudeopløsningen som serumet opvarmedes til 40° inden sammenblandingen fandt sted. Den øvrige del af forsøget udførtes efter samme princip som tidligere beskrevet. Som kontrol foretoges en enkelt titrering paa marsvin. I det store og hele genfandtes her lignende destruktionsforhold som for det naturlige serums vedkommende.¹

2. Forskellige saltes indflydelse paa stabiliteten af toksin og antitoxin.

a. Forsøg med toksin.

Til rensning af difteritoxin har man særlig tidligere benyttet udfældning med visse salte og paafølgende dia-

¹ Ved at undersøge en række forskellige seras forhold overfor indvirkningen af brintioner fandt jeg, at ikke alle lige hurtigt opnaar en forøget reaktionsevne. Det synes ogsaa, som om den brintionkoncentration, ved hvilken fænomenet træder tydeligst frem, varierer fra et serum til et andet. Men det er i alle de undersøgte tilfælde lykkedes mig at fremkalde effekten; undertiden steg K_f -værdien meget stærkt straks efter syretilsætningen og blev først efter længere tids indvirkning mindre end for det ubehandlede serum.

XIV b,

paa rensat antidifterisk serum 788 ($18/2$) ved temp. 40° C.døgn ved 40° C.

| 3 | 4 | 5 | 7 | 11 | 19 | 23 |
|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---|---|
| 70 0 ^h 32 | 70 0 ^h 28 | 65 0 ^h 27 | 60 0 ^h 21 | 60 0 ^h 19 | 56 0 ^h 14 (ca. 100) ³ | 45-50 0 ^h 09 (ca. 100) |
| 100 1 ^h | 80 0 ^h 49 | 75 0 ^h 44 | 75 0 ^h 34 | 70 0 ^h 24 | 70 0 ^h 17 (> 100) | 65 0 ^h 14 ($\begin{matrix} > 100 \\ < 120 \end{matrix}$) |

³ Tallene i parentes angiver titreringer udført paa marsvin.

lyse. Dette forudsætter, at toksin i hvert fald til en vis grad maa være stabilt overfor disse stoffer. BUCHNER har allerede i 1893 vist, at en tilsætning af neutralsalte til toksin forøgede dets termoresistens. Rundt om i literaturen kan man finde spredte undersøgelser over indvirkningen af forskellige salte (særlig af tunge metaller) paa difteritoksin, men da de tunge metalleres forbindelser selv i ret smaa koncentrationer giver udfældninger med giftbouillon (ofte under dannelse af basiske salte, hvorpaa et større eller mindre toksinkvantum adsorberes), har jeg kun beskæftiget mig med saadanne forbindelser som kunde opløses i denne uden at fremkalde udskilninger, idet den af mig anvendte maaleteknik ellers ikke kan benyttes, og forholdene i det hele taget i saadanne tilfælde bliver meget indviklede. De forskere, som tidligere beskæftigede sig med spørgsmaalet, tog kun hensyn til toksinets giftegenskaber; de anvendte forbindelser var undertiden saadanne, som ved opløsning i vand fraspaltede henholdsvis brint- eller hydroksylioner (neurin) (til brintionkoncentrationen tog man intet hensyn, idet de fleste undersøgelser er gjort før S. P. L. SØRENSEN'S arbejder fremkom). Af disse grunde

skal jeg ikke omtale de ældre arbejder nærmere; de har kun ringe interesse i forbindelse med mine egne forsøg.

Til en foreløbig orientering over virkningen af forskellige salte paa difteritoksinet fremstillede jeg med alm. giftbouillon, som basis, opløsninger indeholdende forskellige noget tilfældigt valgte forbindelser, foreløbig kun natrium-salte.

1ste Forsøgsrække.

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| Toksin T^{28} | Serum No. 717 ($18/2$ 28) |
| $p_H = 7,0$ | 140 AE pr. cm^3 |
| $L_f = 6,3$ | K_f v. $40^\circ = 0^{h50}$ |
| $L_t = 4,0$ | |

} pr. cm^3

Der fremstilledes 200 cm^3 af hver blanding, svarende til et indhold af 0,25 mol. med hensyn til salt.¹ Straks efter opløsningen af saltet titreredes blandingerne, hvorefter de henstilledes i termostat ved 37° ; titreringen gentoges derpaa med passende tids mellemrum. Resultaterne af forsøget er samlet i tabel XV, der viser, at salicylationen virker stærkest af alle de undersøgte forbindelser. Ogsaa benzoationens effekt er fremtrædende. Derimod er de to fede syrrers anioner uden betydning for destruktions evne af toksinets antigene evne. Salpetersyrlingen er jo et stærkt reducerende stof, kloroversyren virker iltende. Disse egenskaber er sandsynligvis ansvarlige for den betydelige anti-gendestruerende virkning, som er iagttaget for disse to forbindelsers vedkommende. De almindelige neutralsalte af uorganiske syrer har kun ringe betydning i den her benyttede koncentration (0,25 mol.). L_t angiver nærmest pro-

¹ Opløsningernes styrke var ikke helt 0,25 mol., fordi den beregnede mængde salt blev opløst i fulde 200 cm^3 toksin. Rumfanget udmaalt nøjagtigt efter opløsningen af saltet, og der toges da ved titreringen hensyn til Rumfangsførelsen.

Tabel XV,
visende forskellige elektrolyters indflydelse paa stabiliteten
af difteritoksin (ved 37°).

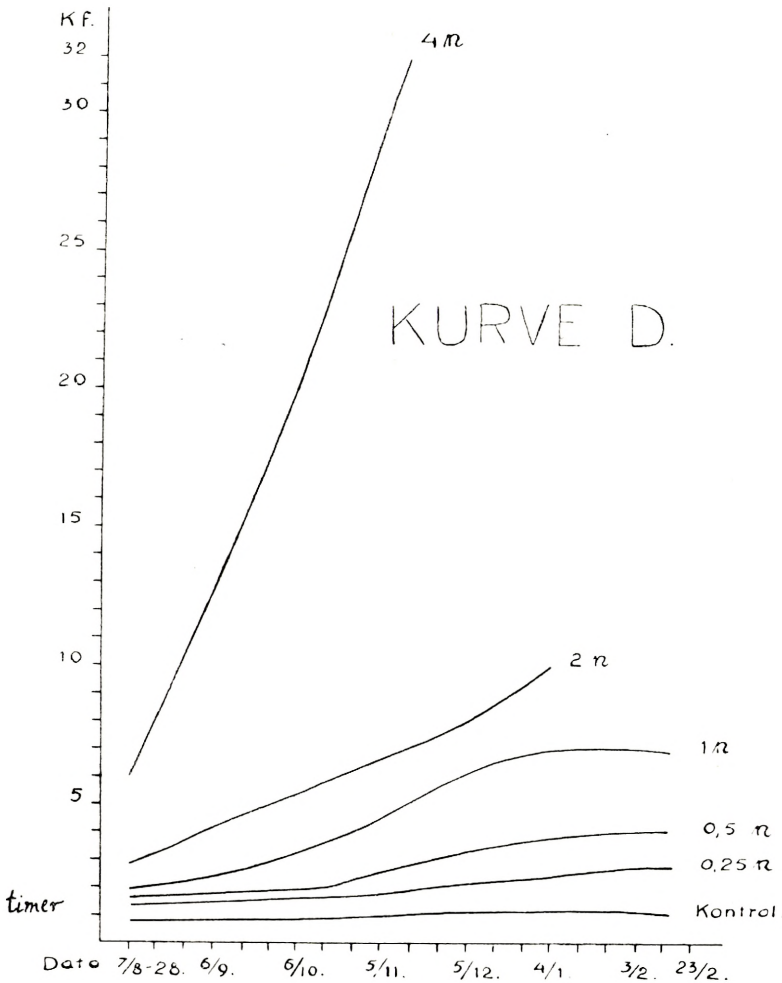
| Forbindelse | Titreringsdato | | | |
|--|--|---|---------------------------------|------------------------------------|
| | salt- mængde i gram til 200 cm ³ toksin | ¹⁴ / ₈ 28 (straks efter salt- tilsæt- ningen) | ¹ / ₁₀ 28 | ⁹ / ₁₁ 28 |
| Kontrol | 0 | 6,3 (0 ^{h50}) | 5,6 (0 ^{h55}) | 4,9 (1 ^{h10}) <u>3,5</u> |
| NaF | 2,1 | 6,3 (1 ^h) | 5,6 (1 ^{h05}) | 4,9 (1 ^{h25}) <u>3,5</u> |
| NaCl | 2,9 | 6,3 (1 ^{h28}) | 5,6 (1 ^{h30}) | 4,3 (2 ^{h05}) <u>3,5</u> |
| NaBr | 5,1 | 6,3 (1 ^{h42}) | 5,25 (2 ^{h35}) | 4,3 (3 ^{h05}) <u>2,8</u> |
| NaJ | 7,5 | 6,3 (2 ^{h23}) | 4,6 (6 ^h) | 3,9 (6 ^{h10}) <u>2,2</u> |
| NaJO ₃ | 9,9 | 6,3 (1 ^{h30}) | 4,9 (4 ^h) | 3,9 (4 ^{h45}) <u>1,6</u> |
| NaNO ₂ | 3,45 | 6,3 (1 ^{h21}) | 4,3 (5 ^{h45}) | 3,0 (10 ^h) <u>0</u> |
| NaNO ₃ | 4,25 | 6,3 (1 ^{h33}) | 5,6 (2 ^{h20}) | 4,3 (2 ^{h45}) <u>2,2</u> |
| NaClO ₃ | 5,3 | 6,3 (1 ^{h35}) | 5,6 (2 ^{h15}) | 4,3 (2 ^{h20}) <u>2,8</u> |
| NaClO ₄ ·H ₂ O | 7,0 | 6,3 (2 ^h) | 4,3 (5 ^{h40}) | 3,5 (6 ^h) <u>2,0</u> |
| NaSCN·2 H ₂ O | 5,85 | 6,3 (2 ^{h15}) | 4,9 (5 ^{h30}) | 3,9 (6 ^{h10}) <u>2,5</u> |
| HCOONa·H ₂ O | 4,3 | 6,3 (1 ^{h05}) | 5,6 (1 ^{h30}) | 4,9 (1 ^{h55}) <u>3,5</u> |
| CH ₃ COONa·3 H ₂ O | 6,8 | 6,3 (0 ^{h56}) | 5,6 (1 ^{h15}) | 4,9 (1 ^{h40}) <u>3,5</u> |
| C ₆ H ₅ COONa | 7,2 | 6,3 (2 ^{h40}) | 3,5 (6 ^h) | - - <u>2,0</u> |
| C ₆ H ₄ $\left\{ \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{COONa}^1 \end{array} \right.$ | 8,0 | 6,3 (5 ^h) | 0 | - - <u>0</u> |

I første rubrik (under titreringsresultaterne) er angivet toksinstyrken udtrykt i L_f -enheder pr. cm³. K_f -værdierne findes i parenteser ved siden af. Den sidste kolonne med de understregede tal indeholder L_T -værdierne (pr. cm³), bestemt paa marsvin.

¹ Orto-forbindelse.

cessen toksin → toksoid; der findes dog en ret god overensstemmelse imellem L_f - og L_T -værdierne. Egentlig vilde det være mere rationelt at bestemme L_0 -værdierne; men dette har ikke kunnet lade sig gøre, fordi saltindholdet i toksinet fremkaldte ødem paa injektionsstedet, hvorefter det var vanskeligt at bestemme, om lokalvirkningen skyldtes

difteritoksinet eller det indeholdte salt. Ogsaa paa udfnugningsfunktionen virker salicylationen kraftigst, ligesom der i det hele taget findes en vis proportionalitet imellem ionernes virkning paa toksinets to forskellige funktioner.



Indvirkning af NaCl i forskellige koncentrationer paa difteritoksin.

Kurverne angiver de ændringer, der finder sted i toksinets udfnugningshastighed overfor antitoksin under indvirkning af NaCl i koncentrationer svarende til 0,25—4n-opløsninger.

Tabel XVI (Kurve D),
visende indvirkningen af natriumklorid i vekslende koncentrationer paa difteritoksin.

| Opløsningens normalitet m. h. t. NaCl | Titreringsdato | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 7/8 28 efter salttilsæt- ningen | 8/10 28 | 13/11 28 | 8/12 28 | 5/1 29 | 19/2 29 | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ |
| 0 (Kontrol)..... | 6,3 | 4,0 | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ | L_f pr. cm ³ |
| 0,05 | 6,3 | 4,0 | 5,6 | > 3,5 | 4,9 | 3,5 | 4,6 | > 3,1 | 4,3 | 3,0 | 4,3 |
| 0,1 | 6,3 | 4,0 | 5,6 | > 3,5 | 4,9 | 3,5 | 4,6 | > 3,1 | 4,3 | 3,0 | — |
| 0,25 | 6,3 | 4,0 | 5,6 | > 3,5 | 4,9 | 3,5 | 4,6 | > 3,1 | 4,3 | 3,0 | 3,9 |
| 0,5 | 6,3 | 4,0 | 5,6 | > 3,5 | 4,6 | 3,5 | 4,6 | > 3,1 | 4,3 | 3,0 | 3,9 |
| 1,0 | 6,3 | 4,0 | 6,3 | > 3,5 | 5,25 | 3,5 | 5,75 | 2,8 | 5,1 | 2,8 | 3,9 |
| 2,0 | 6,3 | 4,0 | 6,3 | > 3,5 | 6,3 | 3,5 | 5,6 | 2,8 | 5,6 | 2,8 | 4,8 |
| 4,0 | 7,0 | 4,0 | 7,0 | 2,5 | 7,0 | 1,6 | — | 1,25 | — | 1,16 | — |
| 0 (Kontrol)..... | K_f 0h 52 | K_f 0h 55 | K_f 1h 05 | K_f 1h 10 | K_f 1h 15 | K_f 1h 10 | K_f 1h 10 | K_f 1h 10 | K_f 1h 10 | K_f 1h 10 | K_f 1h 10 |
| 0,05 | 1h | 1h 25 | 1h 40 | 1h 50 | 2h 05 | 2h 15 | 2h 30 | 2h 45 | 3h 00 | 3h 15 | 3h 30 |
| 0,1 | 1h 25 | 1h 40 | 1h 50 | 2h 05 | 2h 20 | 2h 35 | 2h 50 | 3h 05 | 3h 20 | 3h 35 | 3h 50 |
| 0,25 | 1h 40 | 1h 55 | 2h 10 | 2h 25 | 2h 40 | 2h 55 | 3h 10 | 3h 25 | 3h 40 | 3h 55 | 4h 10 |
| 0,5 | 1h 50 | 2h 05 | 2h 20 | 2h 35 | 2h 50 | 3h 05 | 3h 20 | 3h 35 | 3h 50 | 4h 05 | 4h 20 |
| 1,0 | 2h 05 | 2h 20 | 2h 35 | 2h 50 | 3h 05 | 3h 20 | 3h 35 | 3h 50 | 4h 05 | 4h 20 | 4h 35 |
| 2,0 | 2h 15 | 2h 30 | 2h 45 | 3h 00 | 3h 15 | 3h 30 | 3h 45 | 4h 00 | 4h 15 | 4h 30 | 4h 45 |
| 4,0 | 5h 55 | 6h 10 | 6h 25 | 6h 40 | 6h 55 | 7h 10 | 7h 25 | 7h 40 | 7h 55 | 8h 10 | 8h 25 |

* Tabellens øverste del omfatter L_f og L_f -værdierne (pr. cm³ toksin) bestemt med forskellig tids mellemrum, angiver altsaa destruktionen af toksinets giftfunktion og antagene evne. Nedenfor findes opført de respektive reaktionstider.

Med anvendelse af samme toksin og serum har jeg foretaget et forsøg over virkningen af natriumklorid i vekslende koncentrationer. Fremgangsmaaden ved tilberedningen af blandingerne og maalingerne var her den samme som i foregaaende forsøg; opløsning af saltet i toksinet, henstilling ved 37° , titrering med forskellig tids mellemrum o. s. v.

I mindre koncentrationer har natriumklorid altsaa ingen nævneværdig indflydelse paa toksinets stabilitet; derimod virker det, naar der anvendes store koncentrationer, konserverende, d. v. s. destruktionshastigheden af den antigene funktion nedsættes. Ved en koncentration svarende til 4,0 normal, kan der ikke paavises nogen toksinsvækelse endnu efter tre maaneders forløb, men helt ned til koncentrationen 1 normal gør saltvirkningen sig gældende. Naar der udfør koncentrationen 4 normal er anført en højere L_f -værdi end for kontrolltoksinet, da skyldes dette naturligvis ikke, at toksinet er blevet »stærkere«, men at udfnugningspunktet er forskudt, saa at der kræves en større serumængde til neutralisationen. Dette fænomen ses hyppigt i blandinger, som indeholder store saltmængder og optræder ogsaa, naar der anvendes andre salte (f. eks. NaJ). Virkningen af saltet paa toksinets udfnugningsfunktion er proportional med saltkoncentrationen. Processen toksin \rightarrow toksoid influeres kun af de store saltkoncentrationer, hvilket ses af de i tabellen anførte L_{\pm} -værdier. Den omdannelse af toksin til toksoid, som fremkaldes (eller i hvert fald fremskyndes) ved tilstedeværelsen af store klornatriummængder synes at være irreversibel — i modsætning til den proces, som foregaar under invirkning af brintioner —, ti dialyserer man saltet fra, da ændres L_{\pm} -værdien ikke, processen løber altsaa ikke tilbage igen, fordi saltet fjernes. Hvis dette derimod ikke har faaet lov at indvirke for

længe paa toksinet, da vil man ved dialyse kunne genvinde toksinet i samme skikkelse som før salttilsætningen. Der kræves altsaa temmelig lang indvirkning af saltet, før man kan paavise nogen større ændring i forholdet toksin—toksoid.

2den forsøgsrække.

| | |
|------------------------|---|
| Toksin B ²⁸ | Serum 782 (¹⁸ / ₁₀ 28) |
| $p_H = 7,2$ | 160 AE pr. cm ³ |
| $L_f = 7,6$ | } pr. cm ³ K_f ved 40° 0 ^h 30 |
| $L_t = 7,0$ | |

Af hver af de nedennævnte blandinger fremstilledes 0,5 liter, hvorefter forsøgstekniken var den samme som tidligere omtalt. Saltkoncentrationen svarede til 0,25 mol. Brintionkoncentrationen bestemtes kolorimetrisk, hvorved der kan være fremkommet en ringe saltfejl¹ jeg mener imidlertid,

¹ Dengang disse forsøg blev udført havde jeg ikke lejlighed til at foretage elektrometriske bestemmelser af brintionkoncentrationen. Senere har jeg sammenlignet p_H -værdierne for nogle toksinopløsninger med indhold af forskellige salte, maalt baade kolorimetrisk og elektrometrisk. Som det fremgaar af nedenstaaende tabel er forskellen selv ved store saltkoncentrationer kun ringe:

| | | | | p_H | | |
|-------------------------------------|-----|---|---|---------|----------|-------------|
| | | | | kolori- | elektro- | Indikator |
| | | | | metr. | metr. | |
| Toksinopløsn. uden tilsætn. af salt | | | | 8,4 | 8,4 | } fenolrødt |
| — | med | — | - NaCl (konc. 4 n) | 8,2 | 8,16 | |
| — | — | — | - KCl (- 0,5 -) | 8,4 | 8,29 | |
| — | — | — | - - (- 1,0 -) | 8,4 | 8,36 | |
| — | — | — | - - (- 2,0 -) | 8,4 | 8,39 | |
| — | — | — | - - (- 3 -) | 8,4 | 8,4 | |
| — | — | — | - NH ₄ Cl (- 4 -) | 7,3 | 7,35 | |
| — | — | — | - MgCl ₂ (- 3 -) | 7,5 | 6,99 | |
| — | — | — | - NaBr (- 3 -) | 8,2 | 8,12 | |
| — | — | — | - NaJ (- 2 -) | 8,2 | 8,12 | |
| — | — | — | - (NH ₄) ₂ SO ₄ (- 4 -) | 7,7 | 7,51 | |

Kun for magniumforbindelsens vedkommende er saltfejlen betydelig.

De elektrometriske bestemmelser er foretaget med en brintelektrode under anvendelse af en kalomel elektrode som standard; som mellemvædske benyttedes en 3,5 n kaliumkloridopløsning.

Tabel
visende forskellige natriumsaltes indflydelse paa

| Forbindelse | salt- mængde i 0,5 liter | opløs- ningens pH | ²⁴ / ₁₁ 28 straks efter saltets til- sætning | ³⁰ / ₁₁ 28 | ¹⁹ / ₁₂ 28 |
|---|-----------------------------------|---------------------------|---|--|--|
| Kontrol | 0 | 7,2 | 7,6 (0 ^h 30) | 7,6 (0 ^h 30) <u>7,0</u> | 7,2 (0 ^h 29) <u>6,25</u> |
| NaF | 5,25 | 7,4 | 7,6 (0 ^h 34) | 7,6 (0 ^h 43) <u>7,0</u> | 7,2 (0 ^h 49) <u>6,25</u> |
| NaCl | 7,3 | 7,2 | 7,6 (0 ^h 46) | 6,8 (0 ^h 49) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 47) <u>6,25</u> |
| NaBr | 12,85 | 7,2 | 7,6 (0 ^h 54) | 6,8 (0 ^h 55) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 59) <u>6,25</u> |
| NaJ | 18,75 | 7,3 | 7,6 (1 ^h 05) | 6,8 (1 ^h 20) <u>7,0</u> | 6,0 (1 ^h 28) <u>6,25</u> |
| NaNO ₂ | 8,6 | 7,4 | 7,6 (0 ^h 46) | 6,8 (0 ^h 50) <u>6,25</u> | 5,3 (1 ^h 04) < 5 |
| NaNO ₃ | 10,6 | 7,3 | 7,6 (0 ^h 50) | 6,8 (0 ^h 57) <u>6,25</u> | 6,8 (0 ^h 59) <u>6,25</u> |
| NaClO ₃ | 13,3 | 7,2 | 7,6 (0 ^h 44) | 6,8 (0 ^h 50) <u>7,0</u> | 6,4 (1 ^h) <u>6,25</u> |
| NaClO ₄ ·H ₂ O | 17,55 | 7,5 | 7,6 (1 ^h 12) | 6,0 (1 ^h 30) <u>6,0</u> | 4,7 (2 ^h 14) ^{<5} >3,1 |
| Na ₂ SO ₃ ·7 H ₂ O | 31,5 | 7,6 | 7,6 (1 ^h 58) | 6,8 (3 ^h) <u>5,5</u> | 4,9 (4 ^h 56) < 5 |
| Na ₂ S ₂ O ₃ ·5 H ₂ O | 31,0 | 7,5 | 7,6 (1 ^h 02) | 6,8 (1 ^h 13) <u>6,25</u> | 6,8 (1 ^h 38) <u>4,5</u> |
| Na ₂ SO ₄ ·10 H ₂ O | 40,25 | 7,1 | 7,6 (0 ^h 43) | 6,8 (0 ^h 55) <u>6,25</u> | 6,8 (0 ^h 53) <u>5,5</u> |
| Na ₂ CrO ₄ ·10 H ₂ O | 42,75 | — ² | 7,6 (2 ^h 05) | 6,8 (2 ^h 25) — ⁴ | 4,7 (7 ^h 36) — |
| NaH ₂ PO ₂ ·H ₂ O | 13,25 | 7,2 | 7,6 (0 ^h 36) | 6,8 (0 ^h 45) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 45) <u>6,25</u> |
| Na ₄ P ₂ O ₇ ·10 H ₂ O | 55,75 | 8,5 | — ³ | 5,3 (1 ^h 50) <u>7,0</u> | 3,75 (4 ^h 55) <u>6,25</u> |
| NaSCN·2 H ₂ O | 14,6 | 7,4 | 7,6 (1 ^h 35) | 6,8 (1 ^h 40) <u>7,0</u> | 4,7 (2 ^h 19) <u>3,1</u> |
| HCOONa·H ₂ O | 10,75 | 7,1 | 7,6 (0 ^h 46) | 7,6 (0 ^h 48) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 48) <u>6,25</u> |
| CH ₃ COONa·3 H ₂ O | 17,0 | 7,1 | 7,6 (0 ^h 40) | 7,6 (0 ^h 40) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 39) <u>6,25</u> |
| C ₂ H ₄ $\left\{ \begin{array}{l} \text{COONa} \\ \text{COONa} \end{array} \right. \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 33,75 | 7,3 | 7,6 (0 ^h 40) | 6,8 (0 ^h 50) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 50) <u>5,5</u> |
| CHOH·COONa | 28,75 | 7,2 | 7,6 (0 ^h 44) | 7,6 (0 ^h 55) <u>7,0</u> | 7,6 (0 ^h 59) <u>6,25</u> |
| CHOH·COONa·2 H ₂ O | | | | | |
| CH ₂ ·COONa | | | | | |
| COH·COONa | 44,6 | 7,1 | 7,6 (0 ^h 43) | 7,6 (0 ^h 48) <u>7,0</u> | 6,8 (0 ^h 49) <u>6,25</u> |
| CH ₂ ·COONa·5,5 H ₂ O | | | | | |
| C ₆ H ₅ COO Na | 18,0 | 7,3 | 7,6 (1 ^h 30) | 5,3 (2 ^h) <u>5,0</u> | 3,75 (3 ^h 28) > 3,1 |

¹ d-vinsyre.

² Vanskelig at bestemme paa grund af kromationens stærke farve.

³ Ingen bestemmelse, da saltet opløstes saa langsomt. 1. maaling foretaget ³⁰/₉ 28.

at det er berettiget at se bort herfra, idet vi af de tidligere forsøg har set, at der skal meget store brintionkoncentrationsændringer til for at toksinets stabilitetsforhold berøres heraf.

XVII,
stabiliteten af differitoksinets egenskaber.

| $^{25}/_1$ 29 | $^{24}/_2$ 29 | $^{25}/_3$ 29 | $^{21}/_5$ 29 | $^{31}/_8$ 29 |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|--|---|
| 6,9 (0h ³⁵) <u>5,5</u> | 6,1 (0h ³⁵) | 6,1 (0h ³⁵) | 5,4 (0h ³⁵) <u>4,0</u> | 4,5 (0h ⁵⁰) <u>3,5</u> |
| 6,8 (0h ⁴⁸) <u>5,5</u> | 6,8 (0h ⁵⁰) | 6,4 (0h ⁴⁸) | 5,4 (0h ⁵⁵) <u>4,0</u> | 4,2 (0h ⁵⁵) <u>2,8⁶</u> |
| 6,8 (0h ⁴⁷) <u>5,5</u> | 6,1 (0h ⁵⁰) | 5,9 (1h) | 4,5 (1h ¹⁰) <u>4,0</u> | 3,5 (1h ⁵⁵) <u>2,8</u> |
| 6,0 (1h ⁰³) <u>5,5</u> | 5,6 (1h ¹⁰) | 5,6 (1h ¹⁹) | 4,5 (1h ³⁰) <u>4,0</u> | 3,4 (2h ²⁵) <u>2,5</u> |
| 5,36 (1h ³⁵) < <u>3,1</u> | 4,5 (2h ¹⁰) | 4,2 (2h ³²) | 3,0 (1h ¹⁰) ⁵ <u>2,5</u> | 3,0 (1h ²⁵) ⁵ <u>1,6</u> |
| 4,5 (0h ⁵⁰) ⁵ < <u>2,5</u> | 2,4 (0h ⁵⁵) ⁵ | 2,0 (1h ⁰³) ⁵ | 1,25 (1h ²⁵) ⁵ < <u>1,0</u> | 0,8 (1h ⁴⁰) ⁵ <u>0</u> |
| 5,2 (1h ⁰⁵) < <u>5</u> | 5,3 (1h ¹⁰) | 4,9 (1h ³⁵) | 4,2 (1h ³⁵) <u>3,1</u> | 3,0 (2h ⁴⁸) <u>2,5</u> |
| 6,0 (1h) < <u>5,5</u> | 5,6 (0h ⁵⁷) | 5,6 (1h ¹⁰) | 4,3 (1h ²⁷) <u>4,0</u> | 3,5 (2h ²⁰) <u>2,0</u> |
| 3,3 (3h ¹⁵) <u>2,8</u> | 2,5 (6h ¹⁰) | 2,6 (1h ²⁰) ⁵ | 1,0 (1h ⁴⁶) ⁵ <u>1,0</u> | 1,0 (1h ⁵²) ⁵ <u>0</u> |
| 1,6 (2h ¹⁵) ⁴ <u>1</u> | 1,3 (2h ⁰⁵) ⁴ | 0,99 (3h ¹⁰) ⁵ | < <u>1</u> | <u>0</u> |
| 5,6 (1h ³⁵) <u>3,1</u> | 4,0 (2h ³⁵) | 4,0 (3h ¹³) | 2,0 (1h ¹⁵) ⁵ < <u>2</u> | 1,4 (1h ³⁰) ⁵ < <u>1</u> |
| 6,7 (0h ⁵⁵) <u>5,0</u> | 6,7 (0h ⁵⁵) | 6,4 (1h ⁰²) | 5,0 (1h ⁰³) <u>3,1</u> | 4,0 (1h ³²) <u>2,2</u> |
| 1,9 (4h ⁴⁵) ⁵ — | 1,0 (4h ¹⁰) ⁵ | 0,9 (4h ⁴⁰) ⁵ | 0,4 (4h ³⁰) ⁵ | 0 ⁶ |
| 6,7 (0h ⁴⁵) <u>5,5</u> | 6,7 (0h ⁵⁰) | 6,4 (0h ⁴⁸) | 5,0 (0h ⁵⁰) <u>4,0</u> | 4,0 (1h ³⁵) <u>2,8</u> |
| 1,9 (2h ²⁰) ⁵ <u>3,1</u> | 1,0 (2h ⁴⁰) ⁵ | 0,99 (2h ⁴⁸) ⁵ | 0,4 (2h ⁴⁰) ⁵ <u>0</u> | |
| 3,0 (4h ⁰⁵) <u>2,2</u> | 2,4 (6h ¹⁰) | 2,6 (1h ⁴⁰) ⁵ | | 0,6 |
| 6,9 (0h ⁴⁷) <u>5,5</u> | 6,4 (0h ⁴⁸) | 6,0 (0h ⁵⁷) | 5,1 (0h ⁵⁵) <u>4,0</u> | 3,7 (1h ²⁰) <u>2,5</u> |
| 6,7 (0h ⁴⁹) <u>5,5</u> | 6,4 (0h ⁴⁵) | 6,0 (0h ⁵⁵) | 5,0 (1h) <u>3,1</u> | 4,0 (1h ¹⁰) <u>2,8</u> |
| 6,9 (0h ⁵⁰) 5,0 | 6,8 (0h ⁵⁴) | 6,4 (0h ⁵⁶) | 4,3 (1h ¹⁸) 2,8 | 3,5 (2h ⁰²) <u>2,0</u> |
| 6,9 (0h ⁵⁷) <u>5,5</u> | 6,4 (0h ⁵²) | 6,4 (0h ⁵⁷) | 5,0 (1h ⁰⁸) <u>3,5</u> | 4,2 (1h ⁴⁰) <u>2,8</u> |
| 6,9 (0h ⁵²) <u>5,5</u> | 6,9 (0h ⁵⁵) | 6,4 (0h ⁵⁷) | 5,0 (1h ⁰⁷) <u>3,5</u> | 4,8 (1h ²⁴) <u>2,8</u> |
| 2,5 (5h ²⁵) < <u>1,6</u> | | | < <u>1,0</u> | <u>0</u> |

⁴ Ingen bestemmelse, da kromationen virker giftigt paa den dyriske organisme.

⁵ Titrering foretaget ved opblanding med lige dele frisk toksin [Kf(h)].

⁶ Vædsken dialyseret inden prøven paa marsvin.

I tabel XVII findes en samlet oversigt over forsøgsresultaterne. Disse stemmer i det store og hele godt overens med dem der opnaaedes ved det første forsøg. Der er

Tabel
visende virkningen af salicylsurt

| Opløsningens molaritet | 25/11 28 | 26/11 28 | 27/11 28 | 28/11 28 |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0,001..... | 7,6 (0h ²⁵) | 7,6 (0h ³⁰) | 7,2 (0h ³¹) | 6,8 (0h ³⁵) |
| 0,01..... | 7,6 (0h ³⁵) | 7,6 (0h ⁴⁰) | 6,8 (0h ⁴⁰) | 6,8 (0h ⁴⁰) |
| 0,1..... | 7,6 (1h) | 7,2 (0h ⁵⁵) | 6,8 (1h ¹⁵) | 6,0 (1h ³⁰) |

her medtaget lidt flere forbindelser, f. eks. natriumkromat, der viser en udpræget toksindestruerende virkning, ligeledes saltene af et par oksysyrer (d-vinsyre og citronsyre). Ingen af disse har dog nogen indflydelse paa hastigheden af destruktionsprocessen.

3die forsøgsrække.

Denne omfatter en undersøgelse over indvirkningen af alkalimetallernes klorider paa toksinstabiliteten. Da natriumkloridets virkning i de smaa koncentrationer var ringe, valgte jeg her koncentrationen 1 mol. Fremgangsmaaden var som tidligere, og der benyttedes samme toksin og serum som ved 2den forsøgsrække. En tabellarisk opstilling af forsøgsresultaterne viste, at indvirkningen paa udfnugningshastigheden for disse forbindelsers vedkommende er omvendt proportionalt med kationernes atomtal. Forskellen imellem virkningen af de forskellige salte er kun lidet udpræget.

Virkingen af salicylsurt natron paa destruktionshastigheden af difteritoksin.

Det blev tidligere nævnt, at det salicylsure natron var det stærkest virkende af de undersøgte forbindelser. Jeg har derfor undersøgt virkningen af dette stof for sig selv i forskellige koncentrationer. Jeg anvendte samme toksin

XVIII,

natron paa difteritoksin ved 37°.

| $4/_{12}$ 28 | $13/_{12}$ 28 | $20/_{12}$ 28 | $4/_{1}$ 29 | $29/_{1}$ 29 | $20/_{2}$ 29 |
|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 6,8 (0h ³¹) | 6,8 (0h ³⁵) | 6,4 (0h ³⁵) | 6,0 (0h ³⁵) | 6,0 (0h ³⁵) | 5,9 (0h ³⁵) |
| 6,4 (0h ⁴⁰) | 6,0 (0h ⁴⁰) | 6,0 (0h ⁴⁰) | 6,0 (0h ⁴⁰) | 6,0 (0h ⁴⁰) | 4,9 (0h ³⁸) |
| 5,25 (1h ³⁵) | 4,5 (7h) | 3,9 (1h ⁵⁵) | 3,0 (4h) | | |

og serum som ved de to sidste forsøgsserier og fremstillede blandinger, hvis saltkoncentration svarede til 0,001 — 0,01, 0,1 mol. Der fremstilledes 0,5 liter af hver blanding, ligesom forsøgstekniken ikke afveg fra den sædvanlige. I tabel XVIII er titreringsresultaterne samlet. Virkningen er overordentlig udpræget. Ved en koncentration svarende til 0,1 mol. svækkes toksinet omkring 50 % i løbet af en maa-
ned og den udfnuggende funktion er paa dette tidspunkt totalt destrueret. Men selv ved saa ringe koncentrationer som 0,01 og 0,001 mol. gør saltets virkning sig gældende (smlgn. svækkelsen af toksinet uden tilsætning af nogen art, tabel XVII).¹

¹ Denne overraskende virkning af salicylsyre's forbindelser paa difteritoksin er i virkeligheden overordentlig interessant set fra et medicinsk synspunkt. Salicylpræparater finder som bekendt en udstrakt anvendelse ved en hel del sygdomme, »hovedpine«, »forkølelser« o. fl. a. Ved en bestemt lidelse er salicylterapien endda at betragte som et næsten specifikt middel, nemlig ved febris rheumatica (»gigtfeber«). Denne sygdoms etiologi er ganske vist ikke fastlagt, men man er dog tilbøjelig til at antage, at sygdommen skyldes en streptokokinfektion. At visse streptokokker er toksinproducerende vides nu med sikkerhed, f. eks. scarlatinastreptokokker. Muligvis beror da salicylpræparaternes helbredende virkning derpaa, at de afsondrede bakteriegifte destrueres (der kræves jo som bekendt en energisk og vedvarende behandling for at opnaa en sikker virkning).

I den nyeste tid har man ogsaa forsøgt at helbrede lungebetændelse fremkaldt af pneumokokker med salicylsurt natron, der da i form af en vandig opløsning indsprøjtes intravenøst paa patienterne. Det an-

Foruden de allerede omtalte forbindelser, har jeg undersøgt virkningen af propionsyrens, kapronsyrens, glykolsyrens, mælkesyrens natriumsalte, samt af monoklor-, diklor- og trikloreddikesurt natron. Natriumpropionat havde kun en ringe virkning, kapronsurt natron virkede lidt stærkere, hvorimod natriumglykolat og natriumlaktat ingen som helst effekt udøvede paa destruktionshastigheden af toksin. Tri-kloreddikesurt natron formaaede i en koncentration svarende til 0,25 mol. totalt at destruere saavel toksinets toksiske som antigene evne ved indvirkning i en maaned. Virkningen af monoklor- og dikloreddikkesyrens salte var derimod ikke videre udpræget.

b) forsøg med antitoksin.

Af de talrige forsøg, der i tidens løb er gjort i den hensigt at rense antitoksin, fremgaar det, at de almindelige neutralsalte af uorganiske syrer, f. eks. natriumklorid, natrium- og ammoniumsulfat, ikke i væsentlig grad virker antitoksindestruerende. De to sidste salte benyttes i stor udstrækning til »koncentrering« af immunsera, idet man ved en fraktioneret udfældning søger at befri serumet for en saa stor del af albumin og euglobulin som muligt, disse to fraktioner indeholdende kun smaa mængder af de terapeutisk virksomme stoffer. Det angives ogsaa, at salte virker konserverende paa antitoksin; saaledes tilberedes det difteristandardserum, der udsendes fra Frankfurter-Instituttet, at det ved denne behandling skal være lykkedes at bringe mortaliteten ned fra omkring 20—50 % til ca. 4 %. Forsøgene er gjort i de franske kolonier i Afrika, hvor pneumokokinfektionerne er særlig ondartede blandt den indfødte befolkning (COUDY & POPOFF: Traitement de la pneumonie par des injections intraveineuses de salicylate de soude, Académie de Médecine. 16. Juli 1929).

Saa vidt mig bekendt har man ikke hidtil forsøgt en salicylterapi ved difteri.

tudet, ved opløsning af indtørret serum i en blanding bestaaende af lige dele glycerin og 10 % kogsaltopløsning. I en saadan opløsning kan antitoksinet holde sig uforandret i to maaneder, naar temperaturen er lav (nær ved 0°). Med hensyn til saltenes betydning for antitoksinets udfnuggende evne da foreligger der mig bekendt ingen egentlige undersøgelser herover. RAMON omtaler dog et sted, at »rensed« sera ikke eller kun meget vanskeligt giver udfnugning med toksin, hvorfor han til titrering af saadanne anbefaler benyttelsen af den ovenfor nævnte »blandings« metode.

Jeg har til mine forsøg anvendt forskellige sera af varierende antitoksinindhold.

1ste forsøgsrække.

Denne foretoges med et svagt serum, no. 786 (²³⁻²⁴/10 28), indeholdende 210 AE pr. cm³. De beregnede saltmængder opløstes i det ufortyndede serum, hvorpaa blandingerne straks titreredes. Derpaa henstilledes de ved 40° C., og titreringen gentoges med forskellig tids mellemrum, idet der stedse benyttedes et og samme toksin (8 IE pr. cm³) til bestemmelsen.

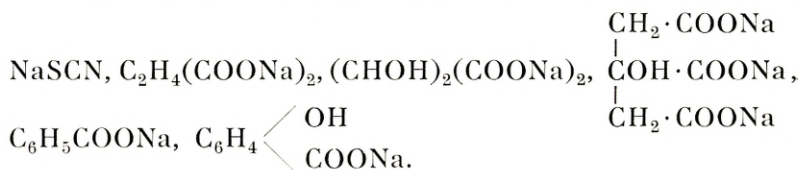
Forsøg med natriumklorid.

Der fremstilledes opløsninger svarende til følgende koncentrationer 0,1 — 0,25 — 0,5 — 1,0 — 2,0 — 4,0 normal. Alle opløsninger var klare straks efter fremstillingen undtagen den, hvis koncentration svarede til 4-normal, som var let opalescerende. I denne blanding udskiltes efter 24 timers henstand et bundfald (af euglobulin), der frafiltreredes før anden titrering. Titeren formindskedes ubetydeligt (ca. 5 %).

Forsøget viste, at saltet ikke virker destruerende paa antitoksinet, men at udfnugningsevnen nedsættes mere og mere desto større saltmængder serumet indeholder. Jeg har udført lignende forsøg med natriumbromid og natriumjodid og fundet tilsvarende forhold. Kun var virkningen her langt større. Natriumbromid var saaledes i stand til helt at destruere udfnugningsevnen, naar det i en koncentration svarende til 2-normal fik lov at indvirke paa serum i en uge.¹ Samme resultat fremkaldte natriumjodid i en koncentration svarende til 1 normal opløsning. Endnu kraftigere virkede benzoesurt, salicylsurt og kanelurt natron. Der synes altsaa at være et vist sammenhæng imellem saltenes virkning paa toksinets og virkningen paa antitoksinets udfnuggende funktion.

2den forsøgsrække.

Til denne benyttedes et stærkere serum, nemlig no. 788 (¹⁸/₂ 29). Styrken var = 1700 AE pr. cm³. Der blev fremstillet 50 cm³ af hver blanding indeholdende følgende forbindelser i koncentrationer svarende til 1 normal opløsning: NaF, NaCl, NaBr, NaJ, NaClO₃, NaClO₄, NaNO₂, NaNO₃, Na₂SO₄, Na₂CrO₄, Na₂S₂O₃, HCOONa, CH₃COONa,



Blandingerne tilberedtes paa følgende maade: De nødvendige mængder salt opløstes i en passende mængde vand, og opløsningen fortyndedes til 45 cm³. Til disse,

¹ Til sammenligning tjener, at natriumklorid — selv i en konc. svarende til 4-normal — ikke formaaede at destruere udfnugningsfunktionen totalt efter 2 maaneders indvirkning.

40° varme opløsninger sattes 5 cm³ serum ligeledes opvarmet til 40°. Efter omrystning titreredes, hvorpaa blandingerne stilledes i termostat ved 40°, og titreringen gentoges efter henholdsvis 1 uges og 1 maanedes forløb. Tabel XIX viser forsøgsresultaterne.

Tabel XIX,

visende forskellige natriumsaltes indvirkning paa difteri-antitoksin ved 40° C.

| Forbindelse | ⁵ / ₄ 29 straks efter salttilsætningen | | ¹² / ₄ 29 | | ⁵ / ₅ 29 | |
|---|--|---------------------|---------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------|
| | AE pr. cm ³ | K _f | AE pr. cm ³ | K _f | AE pr. cm ³ | K _f |
| Kontrol..... | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁵) |
| NaF..... | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (1h ²⁰) |
| NaCl..... | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁸) | 170 | (1h ³⁸) |
| NaCl (2n)..... | 170 | (0h ⁵⁰) | 170 | (0h ⁵⁸) | 170 | (1h ⁴⁸) |
| NaCl (4n)..... | 170 | (0h ⁵⁵) | 170 | (1h ⁵⁸) | 170 | (3h ²⁵) |
| NaBr..... | 170 | (0h ⁵⁰) | 170 | (0h ⁵⁰) | 170 | (1h ⁰⁶) |
| NaJ..... | 170 | (0h ⁵⁵) | 170 | (7h) | ingen reakt. | |
| NaClO ₃ | 170 | (0h ⁵⁰) | 170 | (1h ²⁰) | 170 | (4h ⁰⁵) |
| NaClO ₄ | 170 | (0h ⁵⁸) | 120 | (2h ¹⁰) | ingen reakt. | |
| NaNO ₂ | 170 | (0h ⁵⁰) | 50 | (6h) | — | |
| NaNO ₃ | 170 | (0h ⁵⁰) | 170 | (1h ²⁵) | 170 | (3h ¹⁶) |
| Na ₂ SO ₄ | 170 | (0h ⁵⁵) | 170 | (0h ⁵⁵) | 170 | (0h ⁵⁵) |
| Na ₂ CrO ₄ | 170 | (1h ⁰³) | 170 | (1h ³⁰) | ingen reakt. | |
| Na ₂ S ₂ O ₃ | 170 | (0h ⁵³) | 170 | (1h ²⁵) | — | |
| NaSCN..... | 170 | (1h) | 170 | (4h) | — | |
| HCO ONa..... | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁷) |
| CH ₃ COO Na..... | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁵⁶) |
| CHOH·COONa..... | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁵³) |
| CHOH COO Na..... | | | | | | |
| CH ₂ COO Na..... | | | | | | |
| COH·COO Na..... | 170 | (0h ⁴³) | 170 | (0h ⁴⁵) | 170 | (0h ⁴⁸) |
| CH ₂ COO Na..... | | | | | | |

Man ser, at saltene af svovlsyre, myresyre, eddikkesyre, vinsyre, citronsyre ingen væsentlig betydning udøver paa serums udfnuggende evne. Derimod har alle de øvrige en mere

eller mindre destruerende effekt. Den udfnuggende evne ødelægges fuldstændigt, naar antitoksinet en maaned er udsat for indvirkningen af følgende salte i koncentrationer svarende til 1-normal opløsning: NaJ, NaClO₄, NaNO₂, NaNO₃, Na₂CrO₄, Na₂S₂O₃, NaSCN. Jeg har nu foretaget et tilsvarende forsøg med anvendelse af det samme serum men i form af rensed pseudoglobulin (se ovenfor, side 48).

Ved et orienterende forsøg med det rensede serum erfarede jeg, at stødpudeindholdet her var for ringe til at p_H kunde holde sig konstant under opbevaringen. Det viste sig nemlig, at en frisk tilberedt opløsning (10 %) af serum i frisk udkogt fys. saltvand, som straks efter tilberedningen havde en brintionkoncentration svarende til $p_H = \text{ca. } 7,3$ efter en uges henstand ved 40° C. viste en p_H -værdi paa ca. 8,2. Jeg valgte af denne grund følgende fremgangsmaade: Serumet opvarmedes til 40° C. Derpaa afmaaltes 5 cm³, som fortyndedes med 45 cm³ af den paagældende saltopløsning (ligeledes 40° C.), der indeholdt 10 % af en fosfat-stødpudeblanding paa p_H 6,97 (6 dele sekundært og 4 dele primært fosfat). Opløsningens brintionkoncentration bestemtes elektrometrisk efter forsøgets slutning, og det viste sig, at p_H , naar undtages et tilfælde, nemlig den opløsning som indeholdt kromat (maaske er den elektrometriske maaling endda her af tvivlsom værdi) laa i nærheden af 7. Svingningerne i brintionkoncentrationen var i hvert fald saa ringe, at dette ikke kan influere paa forsøgsresultaterne. Disse, der findes i tabel XX, falder i det store og hele sammen med dem, der er meddelt i det foregaaende forsøg.

Den sidste kolonne i tabellen, hvis tal er understregede indeholder resultaterne af antitoksintitreringer udført paa marsvin. Det vil ses, at der ikke findes overensstem-

Tabel XX,
visende forskellige natriumsaltes indvirkning paa rensat
antidifterisk serum ved 40° C.

| Forbindelse | salt- mængde i 50 cm ³ | pH | | 19/6 29 straks efter til- blandingen | 20/6 29 | 19/7 29 | |
|---|--|-------|---------------|--|-------------------------|---------------------------------------|----------------|
| | | kol. | elektr. | | | AE pr. cm ³ | K _f |
| Kontrol | 0 | 6,7 | 7,08 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 110 (1 ^h 57) | 110 |
| NaF | 2,1 | 7,12 | 7,5 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 110 (1 ^h 08) | 100 |
| NaCl | 2,9 | 6,4 | 6,86 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 110 (2 ^h 02) | 110 |
| NaBr | 5,1 | 6,4 | 6,75 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 38) | 110 (2 ^h 03) | 110 |
| NaJ | 7,5 | 6,0 | 6,4 | 120 (1 ^h 40) | 120 (1 ^h 43) | 70 (2 ^h 50) ¹ | 100 |
| NaClO ₃ | 5,3 | 6,6 | 7,18 | 120 (1 ^h 30) | 120 (1 ^h 38) | 110 (2 ^h) | 110 |
| NaClO ₄ ·H ₂ O | 7,0 | 6,2 | 6,64 | 120 (1 ^h 35) | 120 (1 ^h 40) | 70 (4 ^h 20) ¹ | 100 |
| NaNO ₂ | 3,4 | 7,4 ? | ikke maalt | 115 (1 ^h 25) | ingen reakt. | 0 (2 ^h 50) ¹ | 0 |
| NaNO ₃ | 4,2 | 6,3 | 6,52 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 110 (1 ^h 45) | 110 |
| Na ₂ SO ₄ ·10 H ₂ O | 8,0 | 6,5 | 6,86 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 110 (1 ^h 33) | 110 |
| Na ₂ CrO ₄ ·10 H ₂ O | 8,5 | 8,4 ? | (8,77) | 120 (1 ^h 50) | 120 (1 ^h 55) | 32 (10 ^h) ¹ | 50 |
| Na ₂ S ₂ O ₃ ·5 H ₂ O | 6,2 | 6,2 | 6,4 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 35) | 60 (3 ^h 30) | 90 |
| NaSCN·2 H ₂ O | 5,85 | 6,4 | 6,77 | 120 (1 ^h 25) | 120 (2 ^h 50) | 70 (3 ^h 45) ¹ | 90 |
| HCOONa·H ₂ O | 4,3 | 6,3 | 6,77 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 110 (1 ^h 38) | 110 |
| CH ₃ COONa·3 H ₂ O | 6,8 | 6,7 | 7,31 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 05) | 105 (2 ^h 45) | 105 |
| CHOH·COONa | 5,75 | 6,5 | 6,94 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 25) | 115 (1 ^h 38) | 110 |
| CHOH·COONa·2 H ₂ O | | | | | | | |
| CH ₂ COONa | | | | | | | |
| COH·COONa | 5,95 | 6,5 | 7,17 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 35) | 100 (1 ^h 46) | 100 |
| CH ₂ COONa·5·5 H ₂ O | | | | | | | |
| C ₆ H ₅ COONa | 7,2 | 6,4 | 6,88 | 120 (1 ^h 25) | 120 (1 ^h 55) | 70 (2 ^h 45) ^{1 2} | 100 |

¹ Disse titreringer udførtes ved opblanding med lige dele frisk serum [K_f(h)].

² En titrering uden tilblanding med frisk serum gav værdien 100 AE (K_f = 9^b).

melse imellem *in vitro*- og *in vivo*-værdierne i de tilfælde, hvor serums udfnuggende evne var gaaet tabt, og hvor maa-lingen derfor er foretaget ved opblanding med frisk serum. *In vitro*-værdierne er stedse betydeligt lavere end *in vivo*-resultaterne. Dette minder meget om det tidligere beskreyne forhold, hvor blandinger af to sera med forskellig K_f -værdi giver lavere titer *in vitro*, end man skulde vente efter antitoksinindholdet. Det synes altsaa, som om det friske serum, takket være sin større affinitet til toksinet, formaar at bemægtige sig en saa stor del, at det langsomt reagerende produkt kun finder en vis brøkdel af den til fuldstændig neutralisation ækvivalente mængde. Direkte antitoksindestruerende virker egentlig kun forbindelserne af: salpetersyrling og kromsyre. Salicylsurt natron, der havde en særdeles kraftig toksindestruerende effekt er undersøgt for sig selv. Som tabellen (XXI) viser, formaar dette stof ogsaa at destruere antitoksinet, men hertil kræves betydelig større koncentrationer. Reaktionshastigheden influeres allerede ved nærværelse af Na-salicylat i en koncentration svarende til 0,05 normal; men en tydelig svækkelse af antitoksinet finder først sted, naar koncentrationen af saltet er = 0,5 normal. Det er ejendommeligt, at titeren *in vitro* og titeren *in vivo* her stemmer nøjagtig overens, skønt det salicylsure natron har fremkaldt en saa stærk hæmmende virkning hos det behandlede antitoksin, at dette for at give udfnugning maa blandes op med 2 dele frisk serum.

3. Elektrolyternes betydning for reaktionen mellem toksin og antitoksin.

Til disse undersøgelser har jeg fortrinsvis benyttet et toksin, som var rensat ved hjælp af aluminiumhydroksyd

Tabel XXI,
visende antitoksinets stabilitet i opløsninger af Na-salicylat
af forskellig Koncentration (temp. 40° C.).

| Opløsningens normalitet | ²¹ / ₆ 29 24 timer efter tilberedning | | ²³ / ₆ 29 | | ¹ / ₇ 29 | | ⁸ / ₈ 29 | | AE pr. cm ³ (marsvin) |
|----------------------------|---|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| | AE pr. cm ³ | K _f | AE pr. cm ³ | K _f | AE pr. cm ³ | K _f | AE pr. cm ³ | K _f | |
| 0,05 | 120 | (1 ^h 35) | 120 | (1 ^h 50) | 110 | (1 ^h 55) | 110 | (3 ^h 05) | <u>110</u> |
| 0,1 | 120 | (1 ^h 35) | 120 | (1 ^h 55) | 110 | (2 ^h 05) | 110 | (4 ^h) | <u>110</u> |
| 0,25 | 110 | (2 ^h 10) | 110 | (2 ^h 15) | 110 | (2 ^h 50) | 100 | (2 ^h 2 ^h) | <u>100</u> |
| 0,5 | ∞ | | | K _f (h) | | | | | |
| | | | 97 | (3 ^h 50) ¹ | 64 | (4 ^h 55) | 45 | (4 ^h 55) | <u>45</u> |

¹ Titreret ved opblanding med to dele frisk serum [K_f(h)].

(WILLSTÄTTER'S metode til rensning af enzymer). Forskellige prøver af toksin, alle fremstillet af Martin-bouillon, hvis styrke varierede imellem 7 og 12 enheder (ialt anvendtes omkring 80 liter raa giftbouillon), inddampedes i flade emaljerede bakker, der var anbragt i et tørreskab. Ved hjælp af en kraftig ventilator blæstes en kontinuerlig luftstrøm, der ved at passere en radiator blev opvarmet til 30° C., hen over vædskeoverfladen. Da vædsken var indampet til ca. ¹/₁₀ af sit oprindelige rumfang, hældtes indholdet af bakkerne, hvorpaa der foretoges en dialyse, som fortsattes indtil en udtagen prøve efter ophedning til kogning forblev klar ved tilsætning af nogle draaber kalciumkloridopløsning. Toksinopløsningen var saaledes tilstrækkelig befriet for fosfater, til at adsorptionen kunde finde sted. Denne foregik ved sammenblanding af 80 dele toksinopløsning og 20 dele aluminiumhydroksyd. Efter centrifugering vaskedes bundfaldet to gange med destilleret vand, hvorpaa der elueredes, ligeledes to gange, med en opløs-

ning af sekundært natriumfosfat (S. P. L. SØRENSEN'S stødpudeopløsning til kolorimetrisk brintionmaaling). Til første elution anvendtes et rumfang fosfat-opløsning svarende til det oprindelige toksinrumfang, anden elution blev foretaget med et halvt saa stort rumfang. Udbyttet var noget forskelligt efter de forskellige toksinopløsninger, som benyttedes. I bedste fald opnaaedes at faa adsorberet ca. 80 % af den toksinmængde, som fandtes i den raa giftbouillon. Det viste sig ved nogle orienterende forsøg, at stærkere toksinopløsninger end saadanne, hvis styrke svarede til 30—35 AE pr. cm³ ikke med fordel lod sig anvende til adsorption, idet der med samme mængde aluminiumhydrok-sydsol ikke adsorberedes mere virksomt stof af en toksinopløsning indeholdende 80 IE pr. cm³ end af en opløsning, som kun indeholdt 30—40 IE pr. cm³. Derfor fortyndedes toksinopløsningerne stedse ned til en styrke svarende til omkring 30 IE pr. cm³. Anden elution indeholdt som regel 3—4 gange mindre virksomt stof end første elution. De forskellige elutioner blandedes sammen og inddampedes som ovenfor beskrevet til ca. $\frac{1}{10}$ af det oprindelige rumfang. Derpaa henstilledes blandingerne ved 0° i to døgn, hvorpaa den klare vædske hældtes fra de udskilte fosfatkrystaller. Denne vædske indeholdt 200 IE pr. cm³; der fortyndedes med vand indtil indholdet svarede til 80 IE pr. cm³. Saa tilsattes toluol og opløsningen opbevaredes ved 0°.

Det rensede toksins egenskaber.

Som nævnt er rensningsprocessen ikke foretaget paa een gang. Jeg havde nemlig ikke hele toksinportionen til min raadighed ved forsøgets begyndelse, men benyttede den fremgangsmaade at udtage et vist antal liter af de toksinpræparationer, som fremstilledes til immunisering af

heste. Ikke alle toksiner egner sig imidlertid for forsøgene. Jeg har kun benyttet saadanne, hvis styrke var mindst 7 enheder. Af denne grund har de forskellige opløsninger svinget temmelig stærkt hvad angaar forholdet imellem toksinindhold og proteinmængde. Et enkelt eksempel kan dog give en forestilling om den opnaaede rensning; kvælstoffet bestemtes efter Kjeldahl:

| Opløsning | mg tørstof pr. Lf-enhed | mg N pr. Lf-enhed |
|--|----------------------------|----------------------|
| Inddampet raa giftbouillon | 3,0 | 0,32 |
| Samme efter dialyse | 0,75 | 0,11 |
| Renset toksin (elution) ¹ | 0,3 | 0,02 |
| Samme efter dialyse | 0,1 | 0,014 |
| Restopløsning | 3,8 | 0,51 |

Jeg har ikke forsøgt at reabsorbere det een gang rensede produkt. Grunden hertil er først og fremmest den, at det saa er nødvendigt atter at dialysere elutionerne indtil største delen af fosfationerne er forsvundne. Men herved forøges i høj grad instabiliteten af toksinet. Allerede de fosfatholdige elutioner er langt fra saa stabile som den raa gift, hvilket de nedenstaaende forsøg viser. De er imidlertid stabile ved lav temperatur; men rensed og dialyseret toksin ændrer selv opbevaret ved 0° sin udfnuggende egenskab. Den ovenfor nævnte prøve reagerede straks efter, at den var udtaget af dialysehætten paa 1/2 time, men efter 24 timers henstand fremkom reaktionen under samme forsøgsbetingelser først efter en times forløb.² Med hensyn til

¹ Til dialyse af toksinopløsninger har jeg i udstrakt grad benyttet mig af den teknik, som anvendes paa Carlsberglaboratoriet; det gjaldt nemlig om, at rumfanget ikke blev forøget under dialysen, hvilket kan undgaas ved at man foretager denne under vacuum (27 cm Hg.).

² Inden titreringen fortyndedes det dialyserede toksin med fys. saltvand, da udfnugningen ellers ikke finder sted.

fosfatindholdet i den benyttede toksinopløsning, da har jeg beregnet dette til at svare til ca. $m/15$. Opløseligheden af sekundært fosfat angives at være omkring 2,5 ved 0° . Da vædsken, som hældtes fra krystallerne var mættet ved 0° , vil den færdige toksinopløsning altsaa indeholde ca. 1% sekundært fosfat (hvilket svarer meget nær til S. P. L. SØRENSEN'S stødpudeopløsning). Da toksinet ved maalingerne benyttedes i form af en 10% opløsning vil denne saaledes være ca. $m/150$ med hensyn til fosfat, hvilket var i stand til at holde p_H konstant under forsøgene. L_f -værdien (80 IE pr. cm^3) holdt sig konstant og K_f -værdien (1^{h30} overfor serum 788 $^{18/2}$ 29) steg kun ubetydeligt (til 1^{h45-50}) i løbet af den periode forsøgene varede, ca. 5 maaneder. p_H af den fortyndede toksinopløsning bestemtes elektrometrisk til 7,88.¹

Stabiliteten af det rensede toksin.

Af de tidligere meddelte forsøg fremgaar det, at toksinet, som findes i den raa giftbouillon, er ret stabilt, selv ved en temperatur af $37-40^\circ$. Den hurtige destruktion begynder først, naar temperaturen naar ca. 50° C.

50 cm^3 rensed toksin (ikke dialyseret) henstilledes i termostat ved 40° og maales med to forskellige sera (788 af en styrke paa 1700 AE pr. cm^3 og 782, hvis titer var = 160 AE pr. cm^3). Samtidig bestemtes L_f og d. m. m. ved hjælp af marsvin. Resultaterne heraf findes i tabel XXII.

Man vil se, at svækkelsen her foregaar med stor hast. Efter 24 timers forløb er henved halvdelen af toksinet forsvundet. Efter en uges henstand er mere end to tredjedele

¹ Toksinet befriedes forinden maalingen for største delen af toluolet, derpaa gennemluftedes opløsningen i 24 timer med brint for at faa resten fjernet. Toluol har ord for at »forgifte« elektroderne. Maalingen i de saaledes behandlede prøver voldte som regel ingen vanskelighed; der opnaaedes hurtigt konstant potential.

Tabel XXII,
visende stabiliteten af rensed toksin ved 40°.

| Antal timer ved 40° C. | Titring med | | L_T pr. cm ³ | d. m. m. pr. cm ³ |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | 788 | 782 | | |
| 0..... | 80 (0h ³⁵) | 80 (0h ²⁵) | 55 | 110 |
| 24..... | 47,6 (3h) | 48,2 (2h ¹⁵) | 26 | 65 |
| 48..... | 30,06 (3h) | 33,0 (2h ³⁰) | 18 | 45 |
| | | $K_f(h)$ | | |
| 144..... | 25,4 (1h ¹⁵) | 25,4 (1h) ¹ | 14 | 35 |

¹ Maalingen skete ved opblanding med lige dele frisk toksin [$K_f(h)$].

De første rubriker angiver L_f - og K_f -værdierne pr. cm³, maalt med de to forskellige sera. Derefter følger L_T og d. m. m., ligeledes udtrykt pr. cm³.

destrueret. Endnu hurtigere svækkes dog det rensede og dialyserede toksin. Dette, som straks efter dialysen indeholdt 76 enheder pr. cm³, svækkedes saa hurtigt ved 40°, at titeren efter 24 timers forløb var sunket til 14 enheder, efter 48 timer til 8 IE; efter 144 timers forløb fandtes kun 2,5 enhed pr. cm³.

For at undersøge, om instabiliteten af det rensede toksin skulde skyldes et for ringe saltindhold eller eventuelt andre i den raa giftbouillon tilstedeværende bestanddele fremstilledes følgende opløsninger af det rensede toksin.

- 1) en 10 % opløsning i destilleret vand.
- 2) - — — - fys. saltvand.
- 3) - — — - 1-norm. NaCl-opl.
- 4) - — — - 2- — —
- 5) - — — - 4- — —
- 6) - — — - Martinbouillon ($p_H = 7,4$).
- 7) - — — - difteritoksin ($L_f = 17,8$; $p_H = 8,3$).

Disse blandinger henstilledes under toluol ved 40° og maalttes efter 24 timers forløb. Herved fandtes en titer sva-

rende til samme grad af destruktion som i ovenstaaende forsøg, hvor den ufortyndede toksinopløsning benyttedes. Det lykkedes altsaa ikke ved denne fremgangsmaade at »rekonstruere« et toksin med lignende stabilitetsforhold som den raa giftbouillon. Der maa følgelig under rensningsprocessen være foregaaet en forandring af selve toksinets forhold overfor varmeindvirkning. At der ligeledes er sket en stærk omdannelse af toksin til toksoid ved rensningen af toksin ses af, at det rensede toksin kun indeholder 1100 dræbende doser pr. cm^3 , skønt L_f -værdien svarer til 80. Den teoretiske giftværdi af et saa stærkt toksin vilde svare til omkring 5—6000 simple giftenheder pr. cm^3 .

Nu undersøgte stabiliteten af restopløsningen paa lignende maade. De forskellige restopløsninger fra adsorptionsforsøgene blandedes sammen. Størstedelen af denne blanding benyttedes til immunisering¹ af heste, medens en mindre del inddampedes til ca. $\frac{1}{10}$ af sit oprindelige rumfang. Herved opstod et meget tyktflydende, mørktfarvet produkt, som indeholdt 76 enheder pr. cm^3 , altsaa en styrke som meget nær svarede til det rensede toksins. Derimod var giftigheden af restopløsningen tre gange saa stor, hvilket tyder paa, at det særlig er under elueringsprocessen, at omdannelsen toksin \rightarrow toksoid er gaaet for sig. Svækkelsen af restopløsningen ses af tabel XXIII.

Restopløsningen er saaledes betydelig mere instabil end raa giftbouillon, men stabilere end toksin-elutionen. Jeg

¹ At restopløsningen fra adsorptionsforsøgene uden videre kan anvendes til immunisering af heste, betyder i virkeligheden at denne rensningsmetode sikkert vil have muligheder for at lade sig udnytte i stor stil i praksis, dels til rensning af toksin til immunisering af heste og dels til rensning af difterivaccine (anatoksin). Ved de tidligere benyttede rensningsmetoder fremkommer der store tab af det virksomme stof (i reglen 40—50 %), medens man ved rationel udnyttelse af adsorptionsmetoden næsten vil kunne undgaa disse.

Tabel XXIII,
visende stabiliteten ved 40° C. af »restopløsning« fra toksinadsorptionsforsøg.

| Antal timer ved 40° C. | Titring med | | L_f pr. cm ³ | d. m. m. pr. cm ³ |
|------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | 788 | 782 | | |
| 0..... | 76 (0 ^h 25) | 76,3 (0 ^h 20) | 62 | 350 |
| 24..... | 59,5 (0 ^h 35) | 57,4 (0 ^h 30) | 50 | 280 |
| 48..... | 52,7 (0 ^h 35) | 51,3 (0 ^h 35) | 45 | 200 |
| 144..... | 45,0 (1 ^h 40) | 44,6 (0 ^h 45) | 35 | 170 |

har dernæst undersøgt, hvorvidt en simpel dialyse af en toksinopløsning ændrer stabiliteten af det virksomme stof. Hertil benyttedes et toksin, hvis stabilitetsforhold tidligere var undersøgt, hvilket muliggør en direkte sammenligning. Det drejer sig om toksin-B²⁸, som benyttedes til forsøgene over saltens indflydelse paa toksinstruktionen. Af disse forsøg (tabel XVII) vil man se, at der efter en maanedes forløb ikke kunde paavises nogen svækkelse af toksinets antigene evne. 1½ liter af dette toksin dialyseredes i en kolloidiumhætte under vakuum (27 cm Hg), indtil rumfanget var = 100 cm³. L_f -værdien af det dialyserede produkt fandtes = 120 IE pr. cm³, hvilket viser, at der intet toksin var forsvundet under dialysen. Af den dialyserede prøve fremstilledes forskellige opløsninger, som henstilledes i termostat ved 40° i 24 timer, hvorpaa de titreredes. Titringen gav følgende resultat:

| | 1) ufortyndet toksin | 2) 10 % opl. i dest. vand | 3) 10 % opl. i saltvand | 4) 10 % opl. i Martin- bouillon |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| L_f pr. cm ³ | 88 | 8,8 | 8,8 | 8,8 |
| K_f | 0 ^h 35 | 0 ^h 50 | 0 ^h 45 | 0 ^h 45 |

Endelig har jeg undersøgt et toksin paa ca. 30 IE, fremstillet ved inddampning af forskellige prøver af raa

giftbouillon med paafølgende dialyse og fortynding med dest. vand (en portion af det toksin, som benyttedes til adsorptionsforsøgene):

| Antal timer ved 40° | L_f pr. cm^3 | K_f |
|---------------------|-------------------------|---------------------|
| 0 | 29 | 0 ^{h 05} * |
| 24 | 24 | 0 ^{h 08} |
| 48 | 21 | 0 ^{h 09} |
| 72 | 21 | 0 ^{h 11} |
| 96 | 19 | 0 ^{h 10} |
| 144 | 18 | 0 ^{h 15} |

* Ved titreringen anvendtes uforyndet toksin, derfor den lille K_f -værdi.

Dette viser, at allerede en simpel dialyse gør toksinet mindre stabilt, dog langt fra saa instabilt som adsorptionsprocessen.

a. Forsøg in vitro.

I. Brintionkoncentrationens indflydelse paa reaktionen $T + A \rightarrow TA$.¹

Til forsøgene anvendtes rensat toksin og serum 788 (¹⁸/₂ 29). Serumfortyndingerne afmaalttes i en række reagensglas, der i forvejen var anbragt i vandbadet (40°). Hertil sattes 9 cm^3 af en stødpudeblanding (se tabellen), der ligeledes var opvarmet til 40°. Til sidst — for at undgaa svækkelse — afmaalttes een cm^3 rensat toksinopløsning i hvert glas, hvorpaa blandingen rystedes. p_H bestemtes kolorimetrisk i glasvandbadet som tidligere beskrevet. I tabel XXIV er resultaterne samlet.

Man ser, at der skal finde meget store variationer sted i miljøets brintionkoncentration førend udfnugningspro-

¹ T = toksin; A = antitoxin; TA = toksin-antitoksinkompleks.

Tabel XXIV,
visende brintionkoncentrationens indflydelse paa udfnugningsprocessen imellem toksin og antitoksin.

| Stødpudeblandingsens sammensætning | p_H | | Indikator | serum-dosis som først giver udfnugning | K_f ved 40° |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------|--|-------------------------------|
| | før serumtoksintilsætningen | efter sammenblandingen | | | |
| 7 dele citrat + 3 dele HCl | 4,44 | 4,5 | Metylrødt | 0,031 cm ³ | 6h ³⁶ ¹ |
| ren citratopløsning | 4,95 | 4,95 | | 0,045 — | 5h ⁰⁸ |
| 9,7 dele citrat + 0,3 dele NaOH ... | 5,0 | 5,05 | | 0,045 — | 2h ²⁶ |
| 8 — — + 2 — — ... | 5,3 | 5,5 | | 0,045 — | 0h ⁴⁰ |
| 6,9 — — + 3,1 — — ... | 5,6 | 5,8 | | 0,045 — | 0h ³² |
| 0,5 — sek. + 9,5 dele prim. fosf. . | 5,58 | 5,9 | Klorfenolrødt | 0,045 — | 0h ³⁵ |
| 6 — — + 4 — — ... | 6,97 | 7,0 | Fenolrødt | 0,045 — | 0h ³⁵ |
| 9,5 — — + 0,5 — — ... | 8,04 | 8,01 | | 0,045 — | 0h ⁴⁸ |
| 7,8 — glycin + 2,2 dele NaOH ... | 9,41 | 9,0 | Fenolftalein | 0,045 — | 1h ²⁰ |
| 6,5 — — + 3,5 — — ... | 9,79 | 9,5 | | 0,045 — | 2h ¹⁰ |
| 5,1 — — + 4,9 — — ... | 11,06 | 10,0 | Tymolftalein | — | ∞ ² |

¹ Ved blandinger, hvis p_H var væsentlig lavere, fremkom i løbet af faa minutter uspecifik udfældning (af toksinets proteinstoffer) i alle glassene paa een gang.

² Ingen reaktion selv efter 48 timers henstand ved 40° C.

cessen mellem toksin og antitoksin influeres. Selv ved p_H 5 og p_H 9 kan reaktionen foregaa paa normal vis, d. v. s. udfnugningspunktet er ikke forskudt, hverken til den ene eller den anden side, kun reaktionstiden er forhalet en del. Ved p_H 4,5 sker tydelig nok en partiel destruktion af toksinet, idet der her kræves omtrent 30 % mindre serum til neutralisation end normalt. Forsøgene afgiver en yderligere bekræftelse paa, at komplekset *TA* er langt mere stabilt end de to komponenter, som indgaar deri. Ved p_H ca. 4 fælder toksinet ud, hvilket formodentlig skyldes, at man her har naaet de indeholdte proteiners isoelektriske punkt.

II. Forskellige saltes indflydelse paa reaktionen imellem toksin og antitoxin.

Til de fleste forsøg anvendtes serum 788 ($18\frac{1}{2}$ 29). Dette serum havde den fordel, at det formaaede at reagere med toksinopløsninger, som indeholdt meget smaa saltmængder — betydelig mindre end hvad der svarer til fys. kogsaltopløsning. De fleste sera vil ellers i saadanne tilfælde give udskilning (af euglobulin); der dannes da paa denne maade udfnugninger og bundfald, som undertiden bestaar af euglobulin blandet med den specifikke toksin-antitoxinudfældning; *TA*-reaktionen »maskeres« herved, bliver umulig at aflæse sikkert.

Forsøgstekniken var følgende: Serumfortyndingen (10%) i fys. NaCl) afmaales i en række glas, som regel benyttes følgende fem doser: 0,56 — 0,50 — 0,45 — 0,40 — 0,35 cm³. Derpaa tilsattes et par cm³ destilleret vand, samt den paagældende mængde salt. Af saltene var i forvejen tilberedt opløsninger af passende styrke. Saa fortyndedes med destilleret vand til et totalrumfang af 9 cm³. Efter omhyggelig blanding tilføjedes 1 cm³ rensset toksinopløsning (80 *IE*) til hvert glas. Det endelige rumfang udgjorde saaledes 10 cm³.

Eks.:

| 10 % serum- fortynding | dest. vand | NaJ opl. ¹ | toksinopl. 80 <i>IE</i> pr. cm ³ | Endelige rumfang |
|---------------------------|----------------------|-----------------------|--|---------------------|
| 0,56 cm ³ | 6,94 cm ³ | 1,50 cm ³ | 1 cm ³ | 10 cm ³ |
| 0,50 - | 7,00 - | 1,50 - | 1 - | 10 - |
| 0,45 - | 7,05 - | 1,50 - | 1 - | 10 - |
| 0,40 - | 7,10 - | 1,50 - | 1 - | 10 - |
| 0,35 - | 7,15 - | 1,50 - | 1 - | 10 - |

¹ Tilberedt i en saadan styrke, at 1 cm³ indeholdt 1 g salt.

Disse blandinger er altsaa alle 1-norm. med hensyn til NaJ. Saltkoncentrationerne indstilledes stedse saaledes, at de svarede til bestemte normaliteter af hensyn til sammenligningen af virkningerne hos forskellige forbindelser. Umiddelbart efter toksintilsætningen sattes blandingerne i vandbad ved 40° . Reaktionen aflæstes paa sædvanlig maade. De i tabellerne opførte tal angiver for serums vedkommende den dosis som fremkalder titerudfugningen.

Reaktionsforløbet i et miljø, som indeholder mindre saltmængde end svarende til fysiologisk saltopløsning.

1 cm³ rensat toksin + 9 dele destilleret vand forbruger 0,045 cm³ serum 788 ($18\frac{1}{2}$ 29) til sin mætning. K_f -værdien er = 1^{h30} ved 40° . Hvis der fortyndes med fysiologisk kogsaltopløsning i stedet for med dest. vand, da forbruges samme mængde serum til neutralisation af toksinet, men K_f -værdien er i dette tilfælde = 0^{h35} . I første tilfælde indeholder opløsningen altsaa natriumfosfat i en mængde svarende til ca. $\frac{1}{150}$ mol. Dertil kommer den ringe natriumkloridmængde, som tilføjes gennem serumtilsætningen. Denne er dog for lille til at have nogen indflydelse i dette tilfælde. Klornatriummængden i fysiologisk kogsalt svarer omtrent til en 0,15 mol. opløsning. Dette vil sige, at elektrolytindholdet i det ene tilfælde er ca. 5 gange saa lille som i det andet. Med andre ord, K_f -værdien stiger til ca. det tredobbelte, naar miljøets saltkoncentration formindskes omkring 5 gange. For at undersøge reaktionen i et saltfrit miljø, foretoges følgende forsøg: a) 100 cm³ toksinopløsning dialyseredes i en kolloidumhætte skiftevis under vakuum og ved alm. tryk. Herved opnaaedes, at rumfanget forblev omtrent uforandret. Efter dialyse i tre døgn, i hvilke der skiftedes vand 2 à 3 gange daglig, var toksinopløsningen saa saltfri,

at der hverken kom kloridreaktion (kogning med salpetersyre og tilsætning af sølvnitrat) eller fosfatreaktion (kogning og tilsætning af CaCl_2). b) 10 cm^3 serum 788 ($18\frac{1}{2}$) fortyndedes med 90 dele dest. vand og dialyseredes ligeledes i tre døgn. En udtagen prøve kogtes med salpetersyre, filtreredes og tilsattes sølvnitrat. Herved fremkom ingen kloridreaktion. Euglobulinbundfaldet frafiltreredes, og den klare vædske anvendtes til forsøgene. De to dialyserede opløsninger, toksin og serum, titreredes først overfor henholdsvis frisk serum og frisk toksin. Herved viste det sig, at ingen af komponenterne havde mistet deres reaktions-evne under dialyseringsprocessen. Der fremstilledes nu en række blandinger bestaaende af dialyseret toksin (1 cm^3), destilleret vand (9 cm^3) samt serumfortynding i forskellige mængder (0,56 \rightarrow 0,31 cm^3). Efter 24 timers henstand ved 40° C. var alle blandinger endnu klare. Derpaa tilsattes natriumklorid i en mængde svarende til konc. 0,15 *n*. Nogen tid efter begyndte det midterste glas at blive svagt opalescerende og efterhaanden (i løbet af $2\frac{1}{2}$ —3 timer) udskiltes typiske toksin-antitoksinfug, der senere samlede sig til et bundfald af det sædvanlige karakteristiske udseende. En anden række blandinger udskilte efter ca. 30 timers forløb — uden forudgaaende salttilsætning ganske smaa kornagtige partikler, der sandsynligvis bestod af euglobulin, ti samme fænomen fremkom (paa noget kortere tid) i blandinger bestaaende af serum + destilleret vand. Dette stemmer godt med S. P. L. SØRENSEN'S tidligere nævnte undersøgelser, hvorefter de to globulinfraktioner, euglobulin og pseudoglobulin danner en slags gensidig »opløsning«. Ved dialysen har man altsaa kun faaet frembragt en ligevægt imellem de to stoffer ved den givne koncentration. Yder-

ligere fortynding giver derfor anledning til en ny fradisso-
ciation af euglobulin.

Hvad nu processen $T + A \rightarrow TA$ angaar, da kunde det foran nævnte forsøg jo tyde paa, at denne slet ikke havde fundet sted, før saltet blev tilsat.¹ Hvis de to bestanddele allerede havde forenet sig, skulde man vel vente, at udfnugningsprocessen straks var kommet i gang, saasnart den nødvendige elektrolytkoncentration var til stede. Det er tidligere vist af S. SCHMIDT, at toksin og antitoksinopløsninger, som reagerer meget trægt overfor hinanden, under visse forhold kan opføre sig paa lignende maade som overmættede, eller underafkølede vædsker. Hvis man f. eks. blander toksin med et antitoksin af ringe affinitet og henstiller blandingen ved lav temperatur (i nærheden af 0°), da kan denne stundom holde sig klar i flere døgn, selv om de to komponenter findes i det for udfnugningsreaktionen optimale forhold. Men anbringes en saadan blanding i vandbad (40°), da indtræder reaktionen ofte i løbet af faa minutter, ja endog paa faa sekunder. Her er der da tydelig nok foregaaet en binding imellem toksin og antitoksin, men udfnugningsprocessen har manglet den nødvendige indledning for at komme i gang. Til nærmere bestemmelse af forholdet i en blanding bestaaende af dialyseret toksin og dialyseret antitoksin, fremstilledes flere

¹ Det er interessant at sammenligne disse forsøg med dem BORDET udførte over agglutinationsfænomenet. Her viste det sig nemlig, at agglutinationen ikke finder sted i et saltfrit miljø. Af BORDET's forsøg fremgaar det, at man ved at vaske agglutinerende bakterier med destilleret vand og derpaa opslemme dem heri opnaar en fin suspension, som ikke klumper sammen igen. Tilsættes nu til denne suspension 0,7 % natriumklorid, da fremkommer en réagglutination, men denne finder ikke sted saa hurtigt som i en blanding, hvori der fra begyndelsen har været salt tilstede.

serier af blandinger, som anbragtes i vandbad, hvorpaa der med forskellig tids mellemrum tilsattes saa meget natriumklorid, at opløsningens koncentration svarede til 0,15 *n*. Udfnugningstiden bestemtes for de forskellige serier. Resultaterne findes i tabel XXV.

Tabel XXV,

visende udfnugningshastigheden i blandinger af toksin og antitoxin, som har henstaaet forskellig lang tid ved 40°, inden der tilsattes salt.

| Henstand ved 40° inden salttilsætningen | K_f | Henstand ved 40° inden salttilsætningen | K_f |
|---|------------------|---|------------------|
| 0 min | 1h ¹ | 2h | 1h ³⁰ |
| 5 — | 1h | 4h | 1h ⁴⁵ |
| 15 — | 1h ⁰⁵ | 8h | 2h ¹⁵ |
| 30 — | 1h ¹⁵ | 24h | 3h |
| 1h | 1h ²⁰ | | |

¹ Dette forsøg foretoges to dage efter at toksinet var udtaget af dialysehætten. Det havde i mellemtiden staaet i kælderen, men alligevel er dets udfnuggende evne aftaget, saa at K_f -værdien nu næsten er dobbelt saa stor som ved første maaling, der fandt sted straks efter dialysen.

Resultaterne viser, at processen ikke fremskyndes, fordi blandingerne henstaar i nogen tid ved 40°, før tilsætningen af saltet sker. Tværtimod, K_f -værdien bliver større og større jo længere tid, der forløber, hvilket tyder paa, at toksinets udfnuggende evne angribes, skønt der er antitoxin til stede. Man maa vel forestille sig, at der sker en slags forening af de to stoffer, men at denne sker meget langsomt og ufuldstændigt i det saltfattige miljø. Nu er opløsningerne ikke helt fri for elektrolyter; til dialysen er anvendt almindeligt destilleret vand, som dog indeholder spor af salte (fra glasbeholderen), desuden ogsaa lidt kulsyre ($p_H =$

Tabel XXVI,
visende indvirkningen af halogenernes natriumsalte paa
processen $T + A \rightarrow TA$.¹

| Opløsnin- gens nor- malitet | NaF | NaCl | NaBr | NaJ |
|-----------------------------------|---|--|--|---|
| ca. 5 | | 0,05 cm ³ (7 ^{h30}) | | |
| 4 | | 0,05 - (4 ^{h30}) | | |
| 3 | | 0,0475 - (3 ^{h20}) | ingen reaktion | |
| 2 | | 0,045 - (2 ^{h05}) | 0,050 cm ³ (10 ^h) | ingen reaktion |
| 1 | | 0,045 - (1 ^{h10}) | 0,050 - (2 ^{h05}) | 0,05 cm ³ (11 ^{h30}) |
| 0,75 | 0,045 cm ³ (0 ^{h35}) | - - - | - - - | - - - |
| 0,5 | 0,045 - (0 ^{h35}) | 0,045 - (0 ^{h40}) | 0,045 - (1 ^{h05}) | 0,045 - (2 ^h) |
| 0,25 | 0,045 - (0 ^{h25}) | 0,045 - (0 ^{h35}) | 0,045 - (0 ^{h43}) | 0,045 - (1 ^{h05}) |
| 0,1 | 0,045 - (0 ^{h35}) | 0,045 - (0 ^{h33}) | 0,045 - (0 ^{h36}) | 0,045 - (0 ^{h40}) |
| 0,05 | 0,045 - (0 ^{h45}) | 0,045 - (0 ^{h35}) | 0,045 - (0 ^{h40}) | 0,045 - (0 ^{h55}) |
| 0,025 | 0,045 - (0 ^{h55}) | 0,045 - (0 ^{h45}) | 0,045 - (0 ^{h50}) | 0,045 - (1 ^h) |
| 0,01 | 0,045 - (1 ^{h15}) | 0,045 - (1 ^h) | 0,045 - (1 ^h) | 0,045 - (1 ^{h15}) |
| Kontrol | 0,045 - (1 ^{h30}) | | | |

Iste kolonne angiver den serumængde, udtrykt i cm³, som fremkaldte titerudfugning; chifrene i parentes er udfugnings-tiderne.

¹ Tidligere forsøg har vist, at kun store p_H -ændringer har indflydelse paa toksin-antitoxinprocessen. Det gjaldt derfor kun om at konstatere, om saltene i de benyttede koncentrationer kunde forandre miljøets p_H saa meget, at den observerede reaktionshæmmende effekt kunde skyldes brintionkoncentrationsændringen alene eller muligvis være resultatet af denne og saltvirkningen. Som nedenstaaende tabel viser, er saltenes indflydelse paa brintionkoncentrationen saa lille, at effekten alene maa tilskrives saltene. p_H af de forskellige opløsninger blev bestemt baade kolorimetrisk og elektrometrisk. Der er dog kun for NaCl's vedkommende foretaget maalinge af alle de anvendte koncentrationer. Hvad de andre forbindelser angaar er p_H bestemt i 2 koncentrationer, nemlig i 0,1 n samt i den maksimale koncentration.

| | Koncent. af opl. | p_H kolor. | p_H elektr. |
|------|---------------------|-----------------|------------------|
| NaF | 0,1 n | 7,75 | 7,63 |
| — | 0,75 - | 7,4 | 7,27 |
| NaCl | 0,05 - | 7,9 | 7,77 |

Noten fortsættes næste Side.

ca. 6). Men sandsyligheden taler for, at processen $T + A \rightarrow TA$ nærmer sig ∞ , efterhaanden som elektrolytkoncen-

| | Koncent. af opl. | P_H kolor. | P_H elektr. |
|---|---------------------|--------------------|-------------------------------------|
| NaCl | 0,1 <i>n</i> | 7,9 | 7,77 |
| — | 0,25 - | 7,8 | 7,68 |
| — | 0,5 - | 7,75 | 7,57 |
| — | 1 - | 7,7 | 7,45 |
| — | 2 - | 7,6 | 7,23 |
| — | 3 - | 7,55 | 7,30 |
| — | 4 - | 7,5 | 7,24 |
| NaBr | 0,1 - | 7,9 | 7,77 |
| — | 3 - | 7,25 | 7,08 |
| NaJ | 0,1 - | 7,8 | 7,72 |
| — | 2 - | 7,45 | 7,46 |
| NaNO ₂ | 0,1 - | 7,8 | (konst. potent. kunde ikke opnaas). |
| — | 3 - | 7,3 | — — — — — |
| NaNO ₃ | 0,1 - | 7,85 | 7,63 |
| — | 3 - | 7,4 | 7,13 |
| NaClO ₃ | 0,1 - | 7,8 | 7,74? |
| — | 2 - | 7,4 | (konst. potent. kunde ikke opnaas). |
| NaClO ₄ | 0,1 - | 7,75 | 7,74? |
| — | 2 - | 7,4 | (konst. potent. kunde ikke opnaas). |
| Na ₂ SO ₄ | 0,1 - | 7,85 | 7,78 |
| — | 1 - | 7,7 | 7,43 |
| Na ₂ CrO ₄ | | ingen bestemmelser | foretaget. |
| C ₆ H ₅ COONa | 0,1 - | 7,8 | 7,71 |
| — | 1 - | 7,25 | 7,26 |
| C ₆ H ₄ $\left\{ \begin{array}{l} \text{OH} \dots\dots \\ \text{COONa} \dots\dots \end{array} \right\}$ | 0,1 - | 7,7 | 7,65 |
| — | 0,5 - | 6,8 | 6,94 |
| C ₆ H ₅ CH : CHCOONa | 0,1 - | 7,7 | (konst. potent. kunde ikke opnaas). |
| — | 0,5 - | 7,5 | (— — — — — |
| LiCl | 0,1 - | 7,75 | 7,84 |
| — | 3 - | 7,25 | 7,01 |
| NH ₄ Cl | 0,1 - | 7,3 | 7,41 |
| — | 3 - | 6,4 | 6,24 |
| KCl | 0,1 - | 7,8 | 7,84 |
| — | 3 - ca. 8,5 | | 8,61 |
| RbCl | | | ikke maalt |
| CsCl | | | ikke maalt |
| KF | 0,1 - | 7,85 | 7,96 |
| — | 1,5 - ca. 8,5 | | 8,66 |

Noten fortsættes næste Side.

trationen nærmer sig 0. Som de følgende forsøg skal vise, vil et lignende resultat opnaas, hvis elektrolytkoncentrationen forøges ud over en vis grænse.

1ste forsøgsrække.

Denne omfatter virkningen af halogenernes natriumsalte, undersøgt i forskellige koncentrationer, under anvendelse af den nylig beskrevne teknik.

Titreringsresultaterne er opført i tabel XXVI, der giver et godt indblik i elektrolytvirkningen.

Man vil se, at K_f -værdierne stiger indtil saltkoncentrationerne naar 0,1 normal (for NaF indtil 0,25 n). Herefter aftager de atter og nærmer sig mere og mere ∞ . Forskellen i de forskellige saltes virkning træder først tydeligt frem ved de store koncentrationer. Virkningen er ringest for F^{\ominus} , derpaa følger Cl^{\ominus} , Br^{\ominus} og J^{\ominus} . Der findes altsaa en tydelig sammenhæng imellem hæmmende virkning og atomtal. Med stigende atomtal tiltager ionens affekt.

| | Koncent. af opl. | P_H kolor. | P_H elektr. |
|--|---------------------|-----------------|------------------|
| KBr | 0,1 n | 7,8 | 7,79 |
| — | 3 - | 7,45 | 7,32 |
| KJ | 0,1 - | 7,8 | 7,79 |
| — | 2 - | 7,45 | 7,36 |
| LiBr | 0,1 - | 7,9 | 7,80 |
| — | 2 - | 7,35 | 6,95 |
| LiJ | 0,1 - | 7,9 | 8,96 |
| — | 1 - | ca. 9,5 | 9,06 |
| MgCl ₂ | 0,1 - | 7,55 | 7,44 |
| — | 2 - | 6,8 | 6,43 |
| Mg(NO ₃) ₂ | 0,1 - | 7,35 | 7,31 |
| — | 2 - | 6,2 | 5,94 |
| Mg(ClO ₃) ₂ | 0,1 - | 7,5 | 7,54? |
| — | 1 - | 7,7 | 7,27? |
| MgSO ₄ | 0,1 - | 7,55 | 7,39 |
| — | 1 - | 7,0 | 6,63 |

2den forsøgsrække omfattende virkningen af nogle andre natriumsalte af uorganiske syrer.

a) salte af monovalente syrer.

b) salte af divalente syrer.

Disse undersøgelseres resultater findes i tabel XXVII.

Tabel XXVII,

visende virkningen af forskellige natriumsalte af uorganiske syrer paa processen $T + A \rightarrow TA$.

a) salte af monovalente syrer.

| Opløsningens normalitet | NaNO ₂ | NaNO ₃ |
|-------------------------|---|--|
| 3..... | 0,05 cm ³ (4h ³⁰) | 0,05 cm ² ($\begin{matrix} > 12^h \\ < 24^h \end{matrix}$) |
| 1..... | 0,05 — (1h ⁵⁰) | 0,045 — (2h ⁵⁰) |
| 0,5..... | 0,045 — (0h ⁵²) | 0,045 — (1h ¹⁵) |
| 0,25..... | 0,045 — (0h ³⁰) | 0,045 — (1h ⁰⁵) |
| 0,1..... | <u>0,045 — (0h³⁰)</u> | <u>0,045 — (0h⁵⁰)</u> |
| 0,05..... | 0,045 — (0h ⁴⁵) | 0,045 — (1h ⁰⁵) |
| | NaClO ₃ | NaClO ₄ |
| 2,0..... | 0,050 cm ³ (8h ³⁰) | ingen reaktion |
| 1,0..... | 0,050 — (2h ³⁵) | 0,050 cm ³ ($\begin{matrix} > 12^h \\ < 24^h \end{matrix}$) |
| 0,5..... | 0,045 — (1h ²⁵) | 0,045 — (8h) |
| 0,3..... | 0,045 — (1h) | 0,045 — (2h ⁰⁶) |
| 0,1..... | <u>0,045 — (0h⁵⁰)</u> | <u>0,045 — (1h⁰⁵)</u> |
| 0,05..... | <u>0,045 — (1h)</u> | <u>0,045 — (1h¹⁰)</u> |

b) Salte af divalente syrer.

| | Na ₂ SO ₄ | Na ₂ CrO ₄ |
|-----------|---|---|
| 2..... | uspec. udfældn. | |
| 1..... | 0,045 cm ³ (1h ⁰²) | 0,050 cm ³ (4h ⁵⁵) |
| 0,5..... | 0,045 — (0h ⁵⁰) | 0,045 — (3h) |
| 0,25..... | <u>0,045 — (0h⁴⁰)</u> | 0,045 — (1h ³⁵) |
| 0,1..... | <u>0,045 — (0h⁴⁵)</u> | <u>0,045 — (1h⁰⁵)</u> |
| 0,05..... | 0,045 — (0h ⁵⁵) | 0,045 — (1h ²⁰) |

Skønt salpetersyrligt natron virkede stærkt destruerende saavel paa toksin som paa antitoxin, staar dets reaktions-

hæmmende effekt dog betydelig tilbage for natriumnitratet. Derimod virker natriumperklorat langt kraftigere end natriumklorat. Sulfation har en meget ringe virkning sammenlignet med den ligeledes divalente kromation. Af de tidligere omtalte organiske syrers natriumsalte, har jeg ikke her beskæftiget mig med de fede syrers forbindelser, da disse ingen nævneværdig betydning havde for reaktionshastigheden. Derimod er der undersøgt virkningen af benzoesyre, salicylsyre og kanelisyrens natriumsalte.

Virkningen af disse forbindelser viste sig at være paa-faldende stor. Stærkest virker kanelisyrens salt; det kanelisure natron er i det hele taget det stof, der — af de forbindelser jeg har undersøgt — har vist den kraftigste indflydelse paa udfnugningsprocessen imellem toksin og antitoxin. Som tidligere omtalt virkede det ogsaa meget stærkt destruerende paa toksinet. Kanelsurt natron har under betegnelsen »Hetol« været anvendt en overgang i tuberkulose-terapien, ligesom det eksperimentelt er vist, at man ved injektioner af dette salt formaar at stimulere antistofdannelsen i den dyriske organisme.

Ved at gennemgaa de forskellige tabeller over resultaterne af virkningen af forskellige natriumsalte vil man se, at den koncentration, hvor reaktionshastigheden har sit maksimum varierer meget lidt fra een forbindelse til en anden. Denne »optimale« koncentration ligger i nærheden af, hvad der svarer til 0,1 normal opløsning. Kun for saltene af de aromatiske syrer synes den at ligge nærmere ved 0,05 normal; men disse forbindelser virker i det hele taget paa en lidt anden maade; det er f. eks. ikke muligt, ligegyldigt hvordan man saa end varierer koncentrationerne af disse salte at naa ned til K_f -værdier, som ligger lavere end 1 time. Sandsynligvis er processen her mere kompli-

ceret, idet der sikkert sker en direkte destruerende virkning af henholdsvis toksinets og antitoxinets udfnugningsfunktioner. At udrede dette forhold nærmere er imidlertid meget vanskeligt, fordi en blanding af toksin og antitoxin viser andre stabilitetsforhold end de enkelte komponenter.

3die forsøgsrække.

Virkningen af alkalimetallernes klorider paa processen $T + A \rightarrow TA$.

Ved sammenligning af de tre første forbindelsers virkning finder man en tydelig aftagen med stigende atomtal. K- og Na-ionerne udviser dog omtrent den samme effekt. I lavere koncentrationer er kaliumionens hæmmende indflydelse ganske vist lidt mere udpræget end natriumionens, men forskellen forsvinder med stigende koncentrationer,

Tabel XXVIII,
visende indvirkningen af alkalimetallernes klorider paa processen $T + A \rightarrow TA$.

| Opløsningens normalitet | LiCl | NH ₄ Cl | NaCl | KCl |
|-------------------------|--|--|--|---|
| 3..... | ingen reaktion | ingen reaktion | 0,0475 cm ³ (3 ^{h20}) | 0,050 cm ³ (3 ^{h10}) |
| 2..... | 0,05 cm ³ (9 ^{h30}) | 0,05 cm ³ (5 ^{h45}) | 0,045 — (2 ^{h05}) | 0,050 — (2 ^{h10}) |
| 1..... | 0,045 — (2 ^h) | 0,05 — (2 ^h) | 0,045 — (1 ^{h10}) | 0,045 — (1 ^{h45}) |
| 0,5..... | 0,045 — (0 ^{h55}) | 0,045 — (0 ^{h55}) | 0,045 — (0 ^{h45}) | 0,045 — (1 ^h) |
| 0,25..... | 0,045 — (0 ^{h50}) | 0,045 — (0 ^{h37}) | 0,045 — (0 ^{h35}) | 0,045 — (0 ^{h45}) |
| 0,1..... | 0,045 — (0 ^{h45}) | 0,045 — (0 ^{h35}) | 0,045 — (0 ^{h33}) | 0,045 — (0 ^{h40}) |
| 0,05..... | 0,045 — (0 ^{h55}) | 0,045 — (0 ^{h55}) | 0,045 — (0 ^{h35}) | 0,045 — (0 ^{h50}) |

| Opløsningens normalitet | RbCl | CsCl |
|-------------------------|---|---|
| 1..... | 0,050 cm ³ (2 ^{h05}) | 0,050 cm ³ (2 ^h) |

saa at reaktionshastigheden endda er lidt større i 3-normal KCl-opløsning end i en blanding indeholdende natriumklorid i samme koncentration. Den optimale koncentration er ens for alle fire forbindelser (0,1 normal). Saltene af de to sjældne metaller, rubidium og cæsium, hvis virkning kun er undersøgt i en koncentration (grundet paa disse stoffers kostbarhed), kommer i samme kategori som litium- og ammoniumforbindelserne.

4de forsøgsrække.

Virksomheden af halogenernes kaliumforbindelser.

Forholdene er her analoge med dem, som fandtes ved anvendelse af de tilsvarende natriumforbindelser. Ved at sammenligne virksomheden af kaliumbromid og -jodid med virksomheden af natrium-bromid og -jodid fandtes, at der praktisk talt ikke er nogen forskel. I en koncentration svarende til 2 norm. virker saaledes natriumforbindelsen lidt stærkere end den tilsvarende forbindelse af kalium.

5te forsøgsrække.

Virksomheden af litium-klorid-bromid og -jodid.

En tabellarisk sammenstilling af forsøgsresultaterne viste samme rækkefølge her som ved natrium- og kaliumforbindelserne, hvad angaar sammenhængen imellem anionernes atomtal og hæmmende virksomhed paa toksin-antitoxinudfugningen. Litiumjodid er den stærkest virkende forbindelse blandt de undersøgte halogenforbindelser af alkali-metallerne.

6te forsøgsrække.

Undersøgelse af nogle divalente kationers
virksomhed.

Virksomheden af kalciumgruppens forbindelser har jeg ikke undersøgt i detaljer, fordi kationerne af disse salte reagerer

med fosfationerne i toksinet under dannelse af tungtopløselige forbindelser, hvorpaa en del toksin adsorberes. Det var derfor nødvendigt først at dialysere toksinet, indtil dette indeholdt en saa ringe mængde fosfationer, at opløselighedsproduktet af disse og de paagældende metalioner ikke overskrides ved sammenblandingen. Men som ovenfor nævnt er et saadant toksin instabilt; den udfnuggende evne ændres meget hurtigt ved henstand, hvorved det bliver vanskeligt at arbejde med dette stof. Jeg har derfor ikke ment, at de opnaaede resultater var nøjagtige nok til at kunne sammenlignes med dem, hvor det fosfatholdige toksin er anvendt. Imidlertid synes der kun at være en ringe forskel paa virkningen af de tre forskellige ioner: Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} . Eksempelvis skal anføres K_f -værdierne for blandinger af dialyseret toksin og serum, hvor saltkoncentrationen svarede til en 1-normal opløsning.

| forbindelse | CaCl_2 | BaCl_2 | SrCl_2 |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| serumdosis som fremkaldte titerudfnugning | 0,045 cm ³ | 0,045 cm ³ | 0,045 cm ³ |
| K_f | 3 ^{h 40} | 3 ^{h 30} | 3 ^{h 20} |

7de forsøgsrække.

Virkningen af nogle magniumforbindelser er derimod nøjere undersøgt. Tabel XXIX viser virkningen af nogle forskellige magniumsalte.

Det fremgaar af denne forsøgsrækkes resultater, at magniumionen udøver en langt stærkere virkning end de undersøgte monovalente kationer; den virker ogsaa kraftigere end de divalente ioner: Ca^{++} , Ba^{++} og Sr^{++} .

Overensstemmende med hvad der findes for alkalimetallernes forbindelser har sulfationen en svagere virkning end kloridionen, og denne staar igen tilbage for nitrationen.

Tabel XXIX,
visende indflydelsen af forskellige magniumsalte paa pro-
cessen $T + A \rightarrow TA$.

| Opløsningens normalitet | MgCl ₂ | Mg(NO ₃) ₂ | Mg(ClO ₃) ₂ | Mg(SO ₄) ₂ |
|-------------------------|---|---|---|--|
| 2..... | ingen reaktion | ingen reaktion | | 0,05 cm ³ (1 ^h ₄₅) |
| 1..... | 0,050 cm ³ (5 ^h ₄₅) | 0,050cm ³ ($\begin{matrix} >12^h \\ <24^h \end{matrix}$) | ingen reaktion | 0,050 — (1 ^h ₃₀) |
| 0,5..... | 0,045 — (1 ^h ₃₀) | 0,045 — (2 ^h ₅₅) | 0,045cm ³ ($\begin{matrix} >12^h \\ <24^h \end{matrix}$) | 0,045 — (1 ^h) |
| 0,25..... | 0,045 — (0 ^h ₅₀) | 0,045 — (0 ^h ₃₇) | 0,045 — (1 ^h ₂₅) | 0,045 — (0 ^h ₃₅) |
| 0,1..... | 0,045 — (0 ^h ₂₅) | 0,045 — (0 ^h ₃₀) | 0,045 — (0 ^h ₃₅) | 0,045 — (0 ^h ₃₀) |
| 0,05..... | 0,045 — (0 ^h ₂₈) | 0,045 — (0 ^h ₄₀) | 0,045 — (0 ^h ₄₀) | 0,045 — (0 ^h ₃₅) |
| 0,025..... | 0,045 — (0 ^h ₃₃) | 0,045 — (1 ^h) | 0,045 — (0 ^h ₅₅) | 0,045 — (0 ^h ₄₅) |
| 0,01..... | 0,045 — (0 ^h ₅₇) | | | |

Det viser sig med andre ord, at hvis een anion virker stærkere end en anden i forbindelse med een kation, da vil den ogsaa udøve en kraftigere effekt i forbindelse med en anden kation. Dette tyder paa, at elektrolyternes virkning paa reaktionen mellem toksin og antitoxin skyldes de frie ioner og ikke de udissoциerede molekyler. Da man imidlertid kender saa lidt til den egentlige natur af selve reaktionen imellem toksin og antitoxin, vil det næppe være muligt paa nuværende tidspunkt at komme til klarhed over, hvori elektrolyternes virkning egentlig bestaar.

Til alle de hidtil omtalte forsøg er der anvendt et og samme serum (788 ¹⁸/₂ 29). Iøvrigt er det ligegyldigt, hvilket serum der benyttes, ti saltenes betydning for reaktionen gaar stadig i samme retning, virkningen retter sig imidlertid efter affiniteten imellem toksin og antitoxin i det givne tilfælde. Der skal saaledes en større elektrolytkoncentration til at forhindre udfnugningen imellem toksin og antitoxin, hvis affiniteten imellem de to stoffer er stor, end hvis re-

aktionen i forvejen forløber trægt. Jeg har foretaget nogle forsøg med et meget hurtigt reagerende serum (754 $^{27/7}$ 28). Forskellen imellem de benyttede serumdoser var her større, fordi dette serums reaktionstid er saa lille, at udfnugningen fremkommer i flere blandinger paa een gang, hvis serum-mængderne kun varierer lidt. Til de tidligere forsøg afpipetteredes serumopløsningen efter følgende kvotientrække: 1,0 — 0,89 — 0,80 — 0,71 — 0,63 — 0,56 — 0,50 cm^3 , o. s. v., i dette tilfælde benyttedes en række med betydelig større kvotient ($\sqrt[9]{10}$): 1,0 — 0,77 — 0,60 — 0,46 — 0,36 — 0,28 cm^3 , o. s. v. Dette serum var i modsætning til det forrige meget tilbøjeligt til at give udfældning af euglobulin, naar saltkoncentrationen i miljøet formindskedes eller forøgedes stærkt. Det var derfor ikke muligt her at foretage en titrering overfor det rensede toksin, uden i forvejen at tilsætte ekstra salt.¹

¹ Hvad angaar denne større eller mindre tilbøjelighed til at give udfældning af euglobulin i stærkt saltfattige eller meget saltrigt miljø, da udskiller de immunsæra, som har en lille K_f -værdi ogsaa hurtigere euglobulin end dem, hvis K_f -værdi er stor. Som eksempel skal nævnes et par sammenlignende forsøg foretaget dels med serum 754 og dels med serum 789. (K_f -værdierne af disse to sera var henholdsvis $0^{\text{h}10}$ og $5^{\text{h}50}$, hvorimod antitoxininholdet omtrent var det samme). 1 cm^3 serum sattes til 9 cm^3 klornatriumopløsning af nedenstaaende koncentrationer. Blandingerne anbragtes i vandbad ved 40° , og forsøget aflæstes som en »Ramon'sk Reaktion« (tydelige fnug = positiv reaktion):

| Opløsningens normalitet: | Reaktionen fremkom efter: | |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------|
| | 1) no. 754 | 2) no. 789 |
| 5..... | $0^{\text{h}10}$ | $1^{\text{h}30}$ |
| 4..... | 3^{h} | ∞ |
| 3..... | ∞ | ∞ |
| 2..... | ∞ | ∞ |
| 1..... | ∞ | ∞ |
| 0,5..... | ∞ | ∞ |
| 0,25..... | ∞ | ∞ |
| 0,1..... | ∞ | ∞ |
| 0,05..... | 24^{h} | ∞ |
| 0,025..... | 4^{h} | 24^{h} |
| 0,01..... | 2^{h} | 3^{h} |
| 0 (d. v. s. rent dest. vand)..... | moment. udfældn. | 3^{h} |

Virksomheden af halogenernes natriumsalte (\div NaF).

Forsøgsresultaterne findes opførte i tabel XXX.

Ligesom ved de tidligere forsøg tillægger den hæmmende effekt med stigende atomtal hos anionen; man vil samtidig

Tabel XXX,

visende virksomheden af halogenernes na-salte (\div NaF) paa processen $T + A \rightarrow TA$ ved anvendelse af et meget hurtigt reagerende serum.

| Opløsningsnormalitet | NaCl | NaBr | NaJ |
|----------------------|--|---|--|
| 3..... | 1,3—1,0 cm ³ (0 ^h 15) ¹ | 0,77cm ³ ($\begin{matrix} >12^h \\ <24^h \end{matrix}$) ² | ingen reaktion |
| 2..... | 1,0 — (0 ^h 34) | 0,77 — (3 ^h 20) | 0,77cm ³ ($\begin{matrix} >12^h \\ <24^h \end{matrix}$) |
| 1..... | 0,77 — (0 ^h 28) | 0,77 — (1 ^h) | 0,77 — (2 ^h 30) |
| 0,5..... | 0,77 — (0 ^h 20) | 0,77 — (0 ^h 35) | 0,77 — (1 ^h) |
| 0,25..... | 0,77 — (0 ^h 14) | 0,77 — (0 ^h 20) | 0,77 — (0 ^h 27) |
| 0,1..... | 0,77 — (0 ^h 10) | 0,77 — (0 ^h 14) | 0,77 — (0 ^h 15) |
| 0,05..... | 1,0—0,77 — (0 ^h 08) | 0,77 — (0 ^h 10) | 0,77 — (0 ^h 10) |
| 0,025..... | 1,3—1,0 — (0 ^h 07) | 1,0—0,77 — (0 ^h 08) | 1,0—0,77 — (0 ^h 08) |
| 0,01..... | 1,3—1,0 — (0 ^h 05) | 1,0—0,77 — (0 ^h 08) | 1,0—0,77 — (0 ^h 05) |
| 0,005..... | 1,3—1,0 — (0 ^h 05) | | |
| 0..... | moment. udfældn. af euglobulin | | |

¹ Euglobulinudfældning og T: A-reaktionen løber sammen.

² Ved konc. svarende til 4,0 normal udebliver reaktionen.

bemærke, at der i dette tilfælde skal større saltkoncentrationer til at forhindre udfældningen end ved anvendelsen af serum no. 788, hvis K_f -værdi var 3 gange saa stor. Det samme er tilfældet, naar der tilsættes magnesiumklorid; derimod virker salicylsurt natron ogsaa ved nærværelse af det hurtigt reagerende serum meget kraftigt, saa at udfældningsreaktionen ved konc. 0,5 norm. ikke finder sted. Som tabel XXXI, hvori findes resultaterne af natriumsalicylatets og magnesiumkloridets virkning, viser, stiger kurven for virk-

Tabel XXXI,

visende virkningen af natriumsalicylat og af magnesiumklorid paa processen $T + A \rightarrow TA$ med anvendelse af et meget hurtigt reagerende serum.

| Opløsningens normalitet | $C_6H_4 \begin{cases} OH \\ COONa \end{cases}$ | MgCl ₂ |
|-------------------------|---|---|
| 3 | | ingen reaktion |
| 2 | | 0,77 cm ³ (5 ^h 30) |
| 1 | | 0,77 — (2 ^h 10) |
| 0,5 | ingen reaktion | 0,77 — (1 ^h 45) |
| 0,4 | 0,77 cm ³ ($\begin{matrix} > 12^h \\ < 24^h \end{matrix}$) | |
| 0,3 | 0,77 — (1 ^h 20) | |
| 0,25 | | 0,77 — (0 ^h 22) |
| 0,2 | 0,77 — (0 ^h 35) | |
| 0,1 | 0,77 — (0 ^h 17) | 0,77 — (0 ^h 10) |
| 0,05 | 0,77 — (0 ^h 11) | 1,0—0,77 — (0 ^h 08) ¹ |
| 0,025 | 1,0—0,77 — (0 ^h 07) ¹ | |

¹ Ikke specifik reaktion.

ningen af salicylationer meget stærkt og pludseligt fra konc. 0,3 *n* hvor *K_f*-værdien kun er 1^h20 til konc. 0,4 *n*, til hvilken svarer en værdi, der ligger højere end 12 timer.

Sammenlignes virkningen af MgCl₂ ved anvendelse af serum no. 754 med virkningen, naar der benyttes serum no. 788 (toksinet er det samme i de to tilfælde), da vil man se, at reaktionstiderne for blandinger indeholdende en saltmængde, der svarer til konc. 1,0 normal, er henholdsvis 2^h10 og 5^h45. Serum no. 754 formaar endnu at fremkalde udfnugning i et miljø, hvis saltkoncentration svarer til 2 normal, medens serum no. 788's *K_f*-værdi under disse omstændigheder er ∞.

For at faa et overblik over virkningen af forskellige ioner under saa ensartede forsøgsbetingelser som muligt,

har jeg gjort nogle forsøg, hvor der kun er anvendt to forskellige koncentrationer af hvert salt. Herved har jeg kunnet udføre hele forsøget paa en enkelt dag. Det maa nemlig stadig erindres, naar der er tale om forsøg af denne art, at selv smaa ændringer i forsøgsbetingelserne (større svingninger i lufttemperaturen f. eks.), hvilke næppe trods al omhu kan undgaas, kan influere paa K_f -værdien. Dette ses særligt, naar man arbejder med hurtigt reagerende sera, hvis udfugningstid er meget lille (10 minutter eller derunder). Jeg har ialt udført fire forsøgsrækker (a, b, c, d). Der er hele tiden benyttet samme serum (788 $^{18/2}$), men forskellige toksiner: a) rensat toksin, b) toksinholdig restopløsning fra adsorptionsforsøgene, c) et friskt, stærkt toksin (17,8 IE pr. cm^3), samt d) samme toksin i dialyseret tilstand.

Virkningen af følgende forbindelser undersøgte for koncentrationer svarende til 0,25 og 0,5 normale opløsninger: NaF, NaCl, NaBr, NaJ, NaJO₃, NaNO₂, NaNO₃, NaClO₃, NaClO₄, Na₂SO₄, Na₂CrO₄, NaSCN, HCOONa, CH₃COONa, CH₃CH₂COONa, CH₂OH · COONa, CH₃CHOHCOONa, CH₂COONa
 $\begin{array}{l} | \\ CH_2COONa \end{array}$, C₆H₅COONa, C₆H₄ $\begin{array}{l} \diagup OH \\ \diagdown COONa \end{array}$, C₆H₅CH : CH · COONa.

Sammenstiller man de opnaaede forsøgsresultater tabelarisk da viser det sig, at forholdene varierer en hel del alt efter de anvendte toksiner, hvilket næppe maa forundre, naar man betænker hvor uensartede forskellige toksiner kan være med hensyn til sammensætning (forskellig nedbrydningsgrad af de i bouillonon tilstedeværende protein-stoffer, varierende indhold af salte, o. s. v.). Det vil næppe være muligt at opnaa ensartede forsøgsresultater, før end man er i stand til at arbejde med veldefinerede stoffer.

Selv om de paa forskellig vis »rensed« toksiner vel er befriet for bouillonens salte, samt for største delen af de mere eller mindre nedbrudte proteinstoffer, er der sikkert meget langt igen, før man kan fremstille virkelig rene toksiner. Hvad angaar antitoksinets renfremstilling, da er de metoder, man i øjeblikket disponerer over endnu mere ufuldkomne end dem, der finder anvendelse til rensning af toksin, idet man stedse faar antitoksinet i forbindelse med globulin. Et andet spørgsmaal er imidlertid: Hvorledes reagerer de »rene« antigen- og antistofopløsninger med hinanden? Det er i denne forbindelse interessant, at toksinet, som indeholdes i restopløsningen fra adsorptionsforsøgene, er i besiddelse af en større affinitet til antitoksin end det toksin, som findes i fosfatelutionen. Dette er ejendommeligt, da restopløsningen indeholder langt flere uspecifike, toksinet ledsagende stoffer, hvilke efter min erfaring nærmest skulde virke hæmmende paa reaktionen.

De forsøg, som hidtil er meddelt, beviser strengt taget kun, at forskellige elektrolyter har en stor betydning for udfnugningsfænomenet, som finder sted i en blanding af difteritoksin og antitoksin i bestemte mængder. Naar jeg alligevel noget i flæng har benyttet betegnelserne udfnugningshastighed og reaktionshastighed, da er dette sket med fuldt overlæg. Der kan efter det foregaaende ikke herske tvivl om, at ikke blot udfnugningsprocessen, men ogsaa selve »neutralisationsprocessen« mellem toksin og antitoksin i høj grad er afhængig af miljøets elektrolytkoncentration. I virkeligheden er udfnugningen næppe en proces for sig men skyldes, at der omkring »neutralisationspunktet« af en eller anden grund dannes saa store molekyllagglomerater, at disse bliver synlige for det blotte øje. Fænomenet minder i denne henseende meget om det, der finder sted

imellem kolloide metalopløsninger, som har en modsat elektrisk ladning. Efter BILTZ's undersøgelser er det saaledes muligt at »titrere« guldindholdet af en guldsol ved til et konstant rumfang af denne at sætte vekslende mængder af f. eks. kolloidalt zirkoniumhydroksyd. Naar de to opløsninger er til stede i bestemte mængder, dannes en udfnugningszone, idet først en enkelt blanding fnugger ud og derpaa nogle af de blandinger, hvor indholdet af henholdsvis den positivt eller den negativt ladede forbindelse er umiddelbart større eller umiddelbart mindre end den i den optimale blanding.

Et vist overskud af henholdsvis den ene eller den anden substans forhindrer udfældningen, ganske som det er tilfældet ved toksin-antitoksinreaktionen. Man er vistnok ikke helt klar over, om der for de kolloide metalsaltopløsningers vedkommende finder en forening af molekyler sted i de blandinger, som ikke giver synlig reaktion. Jeg har derimod kunnet paavise, at noget saadant er tilfældet for blandinger af toksin og antitoksin, i hvert fald hvis antitoksinet er til stede i overskud. Jeg har endvidere paavist, at reaktionshastigheden imellem toksin og antitoksin i saadant partielt mættede blandinger er den samme, som hvis de to bestanddele er til stede i de mængder, hvori de netop gensidig ophæver hinandens virkning. Naar derfor en given blanding af toksin og antitoksin giver udfnugning paa et tidligere tidspunkt end en hvilken som helst anden blanding, der er tilberedt paa samme tid men i andre indbyrdes mængdeforhold, da betyder dette ikke, at reaktionshastigheden imellem toksin og antitoksin i første tilfælde er større. Hvis man var i besiddelse af tilstrækkeligt udviklede optiske hjælpemidler, vilde man sandsynligvis i alle blandinger kunne se toksin-antitoksin-komplekset. Til støtte

for denne antagelse tjener en række undersøgelser over elektrolytternes virkning ved fraktioneret mætning af differantitoksin.

1) Til vekslende mængder serum (788, $18\frac{1}{2}$ 29) sattes 9 cm^3 saltvand samt 1 cm^3 rensat toksin. Blandingerne stilledes i vandbad ved 40° . Udfnugningen fremkom i den blanding, som indeholdt $0,045\text{ cm}^3$ serum. $K_f = 0^h$ ³⁵.

2) Samme forsøg, men toksinet sattes til i to portioner ($0,5\text{ cm}^3 + 0,5\text{ cm}^3$). Mellem første og anden toksintilsætning forløb: a) 5 min., b) 15 min., c) 30 min., d) 60 min., blandingerne stod ved 40° fra det øjeblik den første toksindosis var tilsat. Toksinet neutraliserede henholdsvis: $0,050$ — $0,053$ — $0,056$ og $0,056\text{ cm}^3$ serum. Altsaa, naar første del af processen har naaet ligevægtsstadiet inden den sidste toksinportion tilsættes, da neutraliseres ca. 20% mere serum, end hvis hele toksinmængden indføres paa en gang.

Forsøget blev nu gentaget, men inden første toksinportion bragtes i kontakt med antitoksinet tilsattes saa meget natriumjodid til hver blanding, at koncentrationen svarede til en 1-normal opløsning. Rumfanget udgjorde 5 cm^3 . Blandingerne anbragtes i vandbad, hvorpaa der efter henholdsvis 5 — 15 — 30 — 60 minutters forløb yderligere tilsattes $0,5\text{ cm}^3$ toksin og efter omrystning $4,5\text{ cm}^3$ destilleret vand. Blandingerne rystedes atter og stilledes i vandbadet igen. Reaktionen fremkom for alle opløsningernes vedkommende i den blanding, som indeholdt $0,045\text{ cm}^3$ serum. Blandingerne opfører sig altsaa nu, naar der er tilsat jodnatrium, som om hele toksinmængden blev indført paa een gang. Saltet har med andre ord forhindret toksinantitoksinbindingen. Denne finder først sted, naar elektrolytkoncentrationen ved fortynding med destilleret vand bringes ned til det halve af den oprindelige størrelse.

Til sammenligning af forskellige saltes virkning foretoges nedenstaaende forsøg, hvor rumfanget under første del af processen blev holdt paa 2 cm³ i stedet for 5 cm³ som i det tidligere forsøg. Herved opnaar man, at reaktionen forløber hurtigere, idet det endelige rumfang, naar anden toksinportion var tilsat, bragtes op til 10 cm³. Imidlertid vil første del af processen ogsaa forløbe hurtigere, da koncentrationen af toksin og antitoxin er større. Et forsøg foretaget uden tilsætning af salt viser, at reaktionen allerede efter 10 minutters forløb er i ligevægt (tabel XXXII).

Tabel XXXII,
visende reaktionshastigheden ved fraktionel mætning af antitoxin, hvor rumfanget efter tilsætning af første toksinfraktion holdes paa 2 cm³.

| 10 % serumfortynding | saltvand | toksin 1. fraktion | 2. toksinfraktion (0,5 cm ³) tilsættes efter | | | | |
|----------------------|----------|---------------------|--|----|----|----|------------------------|
| | | | 5 | 10 | 20 | 40 | 80 min. henst. v. 40°. |
| 0,71 | 0,79 | 0,5 cm ³ | .. | .. | .. | .. | .. |
| 0,63 | 0,87 | — | .. | .. | .. | .. | .. |
| 0,56 | 0,94 | — | + | + | + | + | + |
| 0,50 | 1,0 | — | + | .. | .. | .. | .. |
| 0,45 | 1,05 | — | .. | .. | .. | .. | .. |

Efter tilsætning af sidste toksinfraktion fortyndedes med saa meget fys. saltvand, at totalrumfanget udgjorde 10 cm³.

+ betyder positiv reaktion.

Reaktionshastigheden er altsaa i dette tilfælde saa stor, at processen løber til ende paa 10 min. Til forsøgene over saltenes indflydelse har jeg derfor benyttet en bindingstid paa 10 minutter. Forsøgsbetingelserne var som i kontrolforsøget, kun med den ændring at der i stedet for fys. saltvand tilsattes saa meget af de nedenstaaende forbindelser, at blandingerne saltkoncentration svarede til en 1-normal

opløsning. Efter 10 minutters henstand ved 40° tilsattes anden toksinfraction, og rumfanget kompletteredes med destilleret vand til 10 cm³.

De forbindelser, hvis virkning paa udfnugningsprocessen i følge de tidligere meddelte forsøg er ringe, formaar heller ikke under disse omstændigheder at udøve nogen væsentlig indflydelse. Hvis et salt derimod har en stærk hæmmende effekt, naar det tilsættes til en blanding, hvor toksin og antitoxin er til stede i ækvivalente mængder, da vil det ogsaa i den partielt mættede blanding gøre sin virkning gældende. Naar virkningen af f. eks. NaJ i dette sidste forsøg

Tabel XXXIII,

visende forskellige saltes betydning (konc. = 1 norm.) for reaktionshastigheden imellem toksin og antitoxin i en partielt mættet blanding.

| forbindelse | serumdosis som først giver udfnugning | <i>K_f</i> |
|--|---------------------------------------|----------------------|
| NaCl..... | 0,053 cm ³ | 0h20 |
| NaBr..... | 0,050 — | 0h20 |
| NaJ..... | 0,050 — | 0h30 |
| NaNO ₂ | 0,053 — | 0h24 |
| NaNO ₃ | 0,050 — | 0h30 |
| NaClO ₃ | 0,050 — | 0h30 |
| NaClO ₄ | 0,050 — | 6h30 |
| Na ₂ SO ₄ | 0,053 — | 0h19 |
| Na ₂ CrO ₄ | 0,050 — | 0h38 |
| C ₆ H ₄ $\left\{ \begin{array}{l} \text{OH} \\ \text{COONa} \end{array} \right.$ | — | ∞ |

er mindre end ved det ovenfor omtalte, da skyldes dette, at reaktionshastigheden imellem toksin og antitoxin, som nævnt, stiger, naar koncentrationen af de to stoffer forøges.

Ved at forøge NaJ-koncentrationen til to normal, opnaaedes omtrent samme resultat som i den fortyndede opløsning, idet toksinet nu kun neutraliserede 0,047 cm³ serum, samtidig steg K_f -værdien til 4 timer. Saltene af kloroversyren og salicylsyren har aabenbart formaaet at angribe toksinets udfnuggende evne; efter tilsætningen af sidste fraktion toksin fortyndedes til 10 cm³, hvorved den endelige koncentration af salt bliver 0,2 normal. Denne udøver kun en forholdsvis ringe indflydelse paa K_f ; der maa derfor under den første inkubation, hvor koncentrationen svarede til 1-normal opløsning være sket en sekundær proces imellem salt og toksin resp. serum. Før den blandings vedkommende, som indeholder natriumsalisylat, er den hæmmende effekt endda saa udpræget, at udfnugningen udebliver.

Vi har altsaa set, at man ved at forøge miljøets elektrolytkoncentration kan forhindre fremkomsten af det saakaldte DANITZ'ske fænomen eller den binding imellem toksin og antitoxin, som ellers under sædvanlige betingelser finder sted i en partielt mættet antitoxinopløsning. Ganske det samme kan opnaas ved at formindske elektrolytkoncentrationen i en toksin-antitoxinblanding. Hvis man saaledes foretager et forsøg mage til det, hvis resultater findes opført i tabel XXXII, men i stedet for saltvand anvender destilleret vand til fortyndingen og samtidig benytter de tidligere omtalte dialyserede toksin- og serumopløsninger, da vil toksinet give udfnugning med den samme mængde antitoxin, ligegyldigt om man lader processen forløbe paa een gang eller der foretages en fraktioneret mætning (ved deling af toksinrumfanget i to eller flere portioner).

Efter de foreliggende eksperimenter maa det vel antages, at de to virkninger som elektrolyterne udøver paa

processen imellem toksin og antitoxin, altsaa den akcelererende og den hæmmende effekt, er resultatet af to forskellige egenskaber hos de paagældende forbindelser. Ellers er det ejendommeligt, at der er saa ringe forskel paa de koncentrationer, hvori de forskellige salte skal være til stede, for at reaktionen kan forløbe med maksimalhastighed. Sammenligner man f. eks. virkningen af Cl^{\pm} og J^{\pm} , da findes der ved de smaa koncentrationer ingen forskel, denne fremtræder først tydeligt, naar saltkoncentrationerne kommer op omkring 0,5—1,0 normal. I det hele taget er der kun ringe forskel paa reaktionshastigheden i saltkoncentrationer svarende til 0,05—0,25 normale, ligegyldigt hvilken forbindelse der saa anvendes (med undtagelse af enkelte stoffer, der virker meget stærkt destruerende paa toksin eller antitoxin, f. eks. saltene af visse aromatiske syrer). Derfor tænkte jeg mig muligheden af, at saltenes akcelererende virkning maaske ikke var ejendommelig netop for elektrolyter, men at der var tale om et osmotisk fænomen, saaledes som man ser det ved hæmolyseforsøg, f. eks. Man skulde da kunne erstatte elektrolyterne med ikke dissocierede forbindelser ligesom ved hæmolyse. Blodlegemer er som bekendt stabile ogsaa i opløsninger, der i stedet for klornatrium indeholder en passende mængde druesukker, det gælder blot om at vædskens osmotiske tryk svarer til blodets. Nogle forsøg, som jeg udførte med forskellige udissocierede forbindelser viser imidlertid, at forholdet her er anderledes. Tabellen no. XXXIV indeholder resultaterne af forsøg med druesukker, rørsukker, glycerin og uretan.

Den akcelererende virkning udebliver altsaa, naar der ikke findes elektrolyter i miljøet. I det hele taget viser virkningen af disse stoffer ikke nogen lighed med elektrolyternes

Tabel XXXIV,
visende betydningen af forskellige ikke dissocierede forbindelser for processen $T + A \rightarrow TA$.

| opløsningsmolaritet | Glykose | Sakkarose | Glycerin | Uretan |
|---------------------|--|--|---|---|
| 1,0 | 0,05 cm ³ (3 ^{h15}) | 0,05 cm ³ (3 ^{h25}) | 0,047 cm ³ (2 ^{h30}) | 0,050 cm ³ (2 ^h) |
| 0,5 | 0,045 — (2 ^{h30}) | 0,045 — (2 ^{h55}) | 0,045 — (2 ^h) | 0,045 — (1 ^{h55}) |
| 0,25 | 0,045 — (2 ^{h20}) | 0,045 — (2 ^{h35}) | 0,045 — (1 ^{h55}) | 0,045 — (1 ^{h55}) |
| 0,1 | 0,045 — (1 ^{h50}) | 0,045 — (2 ^{h05}) | 0,045 — (2 ^{h10}) | 0,045 — (1 ^{h45}) |
| 0,05 | 0,045 — (1 ^{h50}) | 0,045 — (1 ^{h50}) | 0,045 — (2 ^{h04}) | 0,045 — (1 ^{h50}) |

virkning. I store koncentrationer er der ganske vist en vis hæmmende effekt, men forholdet imellem koncentration og virkning er væsentlig anderledes. Der findes ikke den bratte stigning af hæmningskurven, som ses for elektrolytternes vedkommende.

b) Kontrollforsøg udførte paa dyr.

Det har ikke været muligt i alle tilfælde at kontrollere de ret omfattende in vitro forsøg paa dyr. Jeg har alligevel foretaget nogle enkelte forsøg paa kaniner og marsvin; resultaterne af disse bekræfter, som vi skal se, forsøgsresultaterne opnaaet ved hjælp af udfnugningsreaktionen.

I. Kontrollforsøg over brintionkoncentrationens indflydelse paa reaktionen mellem toksin og antitoxin.

Grundet paa det rensede toksins instabilitet lod det sig ikke gøre at foretage egentlige neutralisationsforsøg til bestemmelse af reaktionshastigheden ved 40°. Thi ganske vist er ogsaa den antigene funktion instabil ved denne temperatur, men komplekset $T:A$ er stabilt. Ved forsøg

in vivo maa man imidlertid ogsaa regne med processen toksin \rightarrow toksoid, og det viste sig ved nogle foreløbige undersøgelser, at denne for det rensede toksins vedkommende foregaar med alt for stor hastighed ved 40° , til at man kan foretage neutralisationsforsøg. Derfor anvendtes følgende teknik: En L_T -dosis rensat toksin blandedes med vekslende mængder af serum no. 788 (i opløsning 1:500 i fys. saltvand). Sammenblandingen foretoges i glas, der indeholdt 4 cm³ stødpudeblanding af forskellig p_H . L_T af toksinet var = 0,03 cm³, mængden af serumfortyndingen var gennemsnitlig 0,4 cm³ (= 0,0008 cm³ rent serum svarende til ca. 0,00008 g protein). Disse mængder af toksin og serum indeholder saa lidt protein, at p_H af en standardopløsning ikke ændres maaleligt (kolorimetrisk).¹ Stødpudeblandingerne p_H svarer saaledes til hele blandingens brintionkoncentration. Afmaalingen af de forskellige vædsker skete i følgende orden: 1) serumfortynding, 2) stødpudeblanding, 3) toksinopløsning. Toksinet, der er det mindst stabile, tilsattes umiddelbart forinden blandingen indsprøjtedes intravenøst paa kaniner à 2000 grams vægt.

Resultaterne er anført i tabel XXXV.

En sammenligning af dette forsøgs resultater med dem, som fremkom ved det tilsvarende forsøg in vitro, viser at der saavel i de stærkt sure som i de stærkt alkaliske vædsker foregaar en partiel destruktion af udfnugningsfunktionen, men samtidig en omdannelse af toksin til toksoid. En forhalet reaktionstid for processen $T + A \rightarrow TA$ maa ved dyreforsøg (kaniner) give sig tilkende ved at der kræves mere serum til neutralisation af toksinet; dette er ogsaa tilfældet for de blandinger, hvor p_H er 9 og 10. Ved

¹ Farven af stødpudeblandingen ændredes heller ikke ved toksin-serumtilsætningen.

Tabel XXXV,
visende brintionkoncentrationens indflydelse paa reaktionen
imellem toksin og antitoxin (maaling ved intravenøs in-
jektion paa kaniner).

| Stødpudeblandings sammensætning | p_H | neutralise- rende serum- dosis |
|---|-------|--------------------------------------|
| 5,5 cm ³ citrat + 4,5 cm ³ HCl | 3,94 | 0,31 cm ³ ¹ |
| ren citratblanding | 4,95 | 0,40 — |
| 1 cm ³ sek. fosf. + 9 cm ³ prim. fosf. | 5,90 | 0,40 — |
| 6 — — — + 4 — — — | 6,97 | 0,40 — |
| 9,5 — — — + 0,5 — — — | 8,04 | 0,40 — |
| 8,5 — borat + 1,5 — HCl | 9,00 | 0,45 — |
| 6,0 — glycin + 4 — NaOH | 10,14 | 0,45 — |
| 5,1 — — + 4,9 — — | 11,06 | 0,31 — ¹ |
| Kontrollforsøg (fortynding med kulisyrefrit saltvand) | 7,5 | 0,40 — |

¹ Toksinet partielt destrueret.

p_H 11 er destruktoren af toksin tydelig, ligesom ved p_H ca. 4. Derimod forløber reaktionen normalt ved p_H ca. 5. Naar in vitro forsøgene her viser en forstørret K_f -værdi, da kan dette altsaa ikke tydes som en virkelig nedsættelse af reaktionshastigheden mellem toksin og antitoxin, men maa bero paa at toksinets udfnuggende evne under brintionernes indvirkning er blevet nedsat.

II. Kontrollforsøg over forskellige salttes indvirkning paa processen $T + A \rightarrow TA$.¹

Jeg har her undersøgt natriumkloridets virkning i forskellige koncentrationer, samt virkningen af natriumbromid

¹ PICK og SCHWARZ synes at være de eneste, der hidtil har undersøgt spørgsmaalet om saltenes virkning paa toksin-antitoxinreaktionen. Deres ret omfattende forsøg udmunder i den — det kunde synes overraskende — slutning, at reaktionen ikke influeres selv af betydelige

og natriumjodid i en koncentration svarende til 1-normal opløsning.

Herved viste det sig, at natriumkloridets hæmmende virkning først blev mærkbar, naar koncentrationen svarede til en 4-normal opløsning. Derimod virkede baade NaBr og NaJ i koncentrationer svarende til 1-normal opl.

| saltindhold: | neutraliserende serumdosis |
|---------------------|----------------------------|
| 1,0 <i>n</i> — NaCl | 0,40 cm ³ |
| 2,0 <i>n</i> — — | 0,40 — |
| 4,0 <i>n</i> — — | 0,45 — |
| 1,0 <i>n</i> — NaBr | 0,45 — |
| 1,0 <i>n</i> — NaJ | 0,45 — |

Jeg prøvede dernæst hvordan en saltfri blanding, d. v. s. en blanding af dialyserede toksin- og antitoxinopløsninger forholdt sig. Som man skulde vente krævedes der mere serum til at neutralisere en bestemt mængde toksin, naar der ikke tilsættes salt:

To $L_{\frac{1}{2}}$ -doser renset toksin krævede til neutralisation 0,25 cm³ serumfortynding, naar opløsningen før injektionen indeholdt NaCl i en mængde svarende til 0,15 *n*-opl. Hvis mængder salt i miljøet. Grunden til, at disse to forskere ingen virkning har kunnet spore er simpelthen den, at de til deres forsøg har anvendt marsvin og den almindelige EHRLICH'ske teknik. Man maa have lov at forundres over dette, da MORGENROTH allerede i 1904, altsaa ca. 5 aar før PICK & SCHWARZ's arbejde fremkom, havde paavist, at marsvin ikke egner sig til bestemmelse af reaktionshastigheden imellem toksin og anti-toksin, naar der anvendes subkutan indsprøjtning. Hvis man med fordel vil anvende marsvin, da maa toksinblandingerne indsprøjtes intrakardialt som MORGENROTH gjorde det, eller der bør anvendes en fraktioneret mætning af antitoxinet, hvorved det er muligt at maale hastigheden af processen, der finder sted i den partielt mættede antitoxinblanding, hvilken fremgangsmaade jeg selv har benyttet efter at have godtgjort, at reaktionshastigheden er ens, hvad enten toksin er til stede i underskud eller i en med toksinet ækvivalent mængde. PICK & SCHWARZ's resultater skyldes altsaa anvendelsen af en mangelfuld teknik.

der intet salt tilsattes krævedes $0,35 \text{ cm}^3$ serumfortynding, altsaa ca. 45 % mere.

Da hvert forsøg fordrer ca. 15 kaniner har jeg ikke gennemprøvet virkningen af flere salte paa denne maade.

I stedet for har jeg foretaget nogle forsøg paa marsvin over saltenes virkning paa en partielt mættet antitoksinopløsning. I virkeligheden giver disse forsøg de samme oplysninger som forsøg paa kaniner, idet som tidligere omtalt, reaktionshastigheden er ens, hvad enten toksin og antitoksin blandes i ækvivalente mængder, eller det sidste er til stede i overskud. Marsvin er tilmed nok saa bekvemme at arbejde med som kaniner. Da det ved benyttelse af denne teknik imidlertid er nødvendigt at lade blandingen af toksin og antitoksin henstaa til binding har jeg ikke benyttet det rensede toksin alene, men en kombineret tilsætning af dialyseret anatoksin, som er stabilt og af rensed toksin. Anatoksinet benyttedes da til 1ste del af processen, hvor blandingen udsattes for 40° , medens det rensede toksin først tilsattes, naar den partielt mættede blanding havde naaet ligevægtsstadiet. Forsøgsteknikken var følgende:

To AE (Frankfurter Standardserum) blandedes med følgende mængder anatoksin: $0,46 - 0,36 - 0,28 - 0,21 - 0,17 - 0,13 - 0,10 \text{ cm}^3$. Efter omhyggelig omrystning tilsattes straks $0,03 \text{ cm}^3$ ($= L_7$) rensed toksin og efter at rumfanget i alle glassene var bragt op til 4 cm^3 ved tilsætning af fys. saltvand indsprøjtedes blandingen subkutant paa marsvin af 250 grams vægt. Resultatet ses i tabel XXXVI.

En enhed neutraliserer herefter ca. $0,36 \text{ cm}^3$ anatoksin, naar indsprøjtningen paa dyrene finder sted straks efter at de to bestanddele er bragt i kontakt.

Tabel XXXVI,

visende anatoksinets antitoksinneutraliserende evne, naar blandingen indsprøjtes straks efter tilberedningen.

| cm ³ anatoksin | Observation | |
|----------------------------|--|----------------|
| 0,46 cm ³ | + 4 ^{1/2} | ... |
| 0,36 — | + 3 ^{1/2} | L ₇ |
| 0,28 — | lever, vægttab, stor infiltration | ... |
| 0,21 — | lever, intet vægttab, lille infiltration | ... |
| 0,17 — | lever, tiltager i vægt, ubetyd. infiltr. | ... |
| 0,13 — | — — — — ingen — | L ₀ |
| 0,10 — | — — — — — — | ... |

Der udførtes derpaa et lignende forsøg, men saaledes, at blandingerne af anatoksin og antitoksin henstilledes ved 40° i 24 timer; umiddelbart forinden injektionen fandt sted tilsattes som før 0,03 cm³ rensed toksin.

Dette forsøg viser, at der kun skal halvt saa meget anatoksin til at neutralisere en AE, naar dette faar lov til at

Tabel XXXVII,

visende anatoksinets antitoksinneutraliserende evne, naar blandingen indsprøjtes efter forudgaaende inkubation i 24 timer ved 40° C.

| cm ³ anatoksin | Observation | |
|----------------------------|--|----------------|
| 0,46 cm ³ | + 1 ^{1/2} | ... |
| 0,36 — | + 1 ^{1/2} | ... |
| 0,28 — | + 1 ^{1/2} | ... |
| 0,21 — | + 2 ^{1/2} | ... |
| 0,17 — | + 2 ^{1/2} | L ₇ |
| 0,13 — | lever, intet vægttab, lille infiltration | ... |
| 0,10 — | lever, tiltager i vægt, ingen — | L ₀ |

indvirke paa antitoksinet i tilstrækkelig lang tid, som naar processen afbrydes ved at injektionen af blandingen sker straks efter at de to elementer er bragt i kontakt. Man vil tillige bemærke et interessant faktum, nemlig at forskellen paa L_7 og L_0 er vidt forskellig i de to tilfælde.

Regner man med totalmængden af toksin + toksoid, da vil L_7 -værdien, naar injektionen finder sted straks efter antitoksintilsætningen, forholde sig til L_0 -værdien som 2,77:1; hvis processen derimod har naaet ligevægt inden injektionen foretages, da forholder de to størrelser sig som 1,7:1. Som bindingstid valgte jeg 24 timer, men i de allerfleste tilfælde vil en blanding af toksin og antitoxin være

Tabel XXXVIII,
visende reaktionshastigheden imellem anatoksin og anti-
toksin ved 40°.

| Ana- toksin | Bindingstid | | | | | |
|----------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | 1h | 2h | 4h | 8h | 24h | 48h |
| 0,36 cm ³ | + 2 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} |
| 0,28 — | + 2 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} |
| 0,21 — | + 3 ^{1/2} | + 2 ^{1/2} | + 2 ^{1/2} | + 2 ^{1/2} | + 2 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} |
| 0,17 — | lev., væggt. lille infilt. | lev., væggt. lille infilt. | lev., aftag. stærkt i vægt, stor infiltr. | + 2 ^{1/2} | + 2 ^{1/2} | + 1 ^{1/2} |
| 0,13 — | lev., norm. | lev., norm. | lev., konst. vægt ubet. infiltr. | lev., taberi vægt, mid- del inf. | lev., lille inf., ringe vægttab | lev., ringe vægttab, midd. inf. |
| 0,10 — | lev., norm. | lev., norm. | lev., norm. | lev., norm. | lev., norm. | lev., norm. |

kommet i ligevægt før. Som forsøget, hvis detaljer findes angivet i tabel XXXVIII viser er processen dog løbet til ende langt før, nemlig i hvert fald efter 8 timers forløb.

Yderligere henstand bevirker ingen videre neutralisation. I tabel XXXIX findes opført resultatet af et forsøg, hvor der anvendes en bindingstid af 24 timer, men i dette tilfælde indeholdt opløsningen klornatrium i en mængde svarende til koncentrationen 4-normal. I de foregaaende forsøg var natriumkloridkoncentrationen den samme som i fys. kog-saltopløsninger (ca. 0,15 normal).

Tabel XXXIX,
visende natriumkloridets indvirkning paa en partielt mættet
antitoksinopløsning.

| Anatoksin | Observation | |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 0,46 cm ³ | + 1 ¹ / ₂ | ... |
| 0,36 — | + 3 ¹ / ₂ | ... |
| 0,28 — | lever | ... |
| 0,21 — | — | ... |
| 0,17 — | — | ødem paa injektionsstedet og vægttab |
| 0,13 — | — | ... |
| 0,10 — | — | ... |

Resultatet er altsaa her det samme som hvis antitoksin-anatoksinblandinger straks var blevet tilsat en L_7 -dosis af det rensede toksin. Saltkoncentrationen har været tilstrækkelig til at forhindre bindingen imellem anatoksin og antitoksin. Vægttabet og ødemet, der iagttages hos de overlevende dyr skyldes saltindholdet i blandingen og er ikke en toksinvirkning. Efter forsøgets slutning blev dyrene nemlig dræbt og der kunde ved den paafølgende sektion ikke paavises de karakteristiske tegn paa en difteriforgiftning. Indsprøjter man saltopløsninger hvis konc. svarer til de ovennævnte, da vil der paa injektionsstedet fremkomme et ret udbredt ødem (ikke infiltration, som ved en difterigift-

indsprøjtning), som efterhaanden overgaar til store nekrotiske saar, der først heles efter lang tids forløb (flere uger); samtidig ser man jævnlig dyrene tabe i vægt.

Ved de følgende forsøg har jeg derfor ændret forsøgsteknikken noget. Jeg benyttede her et stærkere serum (788 $^{15/2}$), hvorved der kan arbejdes med et mindre totalrumfang under bindingsprocessen, saa at saltmængderne ogsaa kan formindskes. Standardserumet indeholder kun ti enheder pr. cm^3 og er opløst i en stærk glycerinholdig vædske, som vanskeliggør en nøjagtig afmaaling, hvorfor det stedse fortyndes i forholdet 1 : 10 før brugen.

Serum no. 788 fortyndedes i forholdet 1 : 250, hvorefter bestemtes, hvormed der skulde til af denne fortynding til at neutralisere 0,5 cm^3 anatoksin baade ved øjeblikkelig injektion og efter binding i 1 time.

Der neutraliseredes i dette tilfælde 20 % mere antitoksin, naar blandingen anatoksin + serum henstod 1 time ved 40° end naar den indsprøjtedes frisk tilberedt. Forskellen er altsaa her langt mindre udpræget end ved anvendelse af Frankfurter Standardserum. Grunden er ikke den, at processen i sidste tilfælde ikke er løbet til ende, ti et forsøg, hvor bindingstiden var 24 timer gav samme resultat.

Hvis opløsningen indeholder natriumjodid i en mængde svarende til konc. 1-normal, da foregaar ingen binding.

Jeg har dernæst undersøgt virkningen af en række forskellige salte paa denne proces og dertil benyttet en konstant bindingstid paa en time. Blandingerne svarede i alle tilfælde til en 1-normal opløsning af paagældende salt.

Som tabel XL viser har de undersøgte forbindelser en mere eller mindre udtalt virkning paa processen. Med undtagelse af NaCl og Na_2SO_4 , hvis virkning ved forsøgene in vitro har tilkendegivet sig som svag, da formaar de alle

Tabel

visende forskellige saltes indflydelse paa reaktionen i en partielt

| Serummængder | Kontrolblanding | | 1-nor- | |
|----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | før binding | efter binding | NaCl | NaBr |
| 0,50 cm ³ | lever | lever | lever | lever |
| 0,45 — | — | † 2 ¹ / ₂ | — | — |
| 0,40 — | — | † 1 ¹ / ₂ | { døende 5. døgn } | — |
| 0,35 — | { døende 5. døgn } | † 1 ¹ / ₂ | | |
| 0,31 — | † 2 ¹ / ₂ | † 1 ¹ / ₂ | † 1 ¹ / ₂ | † 2 ¹ / ₂ |

helt at forhindre den binding imellem toksin og antitoxin som ellers finder sted, naar en saadan blanding udsættes for 40° i en time.

Hvis man gaar den modsatte vej — formindsker elektrolytkoncentrationen i det miljø, hvori toksin og antitoxin forefindes — da vil man opnaa et lignende resultat som naar elektrolytkoncentrationen er stor: reaktionshastigheden nedsættes.

Vi har set ovenfor, at der i et saltfrit medium kræves mere antitoxin til at neutralisere en bestemt toksinmængde end hvis foreningen af de to bestanddele foregaar under tilstedeværelse af en vis mængde klorнатrium (f. eks. injektion paa kaniner).

At reaktionshastigheden, naar der kun er spor af salt tilstede i hvert fald forløber med uhyre langsomhed ses af, at den ovennævnte forskel paa de til toksin-neutralisation nødvendige antitoxinmængder i de to tilfælde ogsaa kan konstateres, naar man indsprøjter blandingen subkutant paa marsvin.

Af den dialyserede serumopløsning (No. 788) kræves

XL,

mættet antitoksinopløsning, temp. 40; bindingstid = 1^h.

male opløsninger af:

| NaJ | NaN ₃ | NaClO ₃ | NaClO ₄ | Na ₂ SO ₄ | C ₆ H ₄ $\begin{cases} \text{OH} \\ \text{COONa} \end{cases}$ |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|---|
| lever | lever | lever | lever | lever | lever |
| — | — | — | — | — | — |
| — | — | — | — | — | — |
| } † 3 ^{1/2} | { døende | døende | syg, stort | } † 2 ^{1/2} | { syg, stærkt |
| † 2 ^{1/2} | { 5. døgn | 5. døgn | vægttab | † 1 ^{1/2} | { vægttab |
| | † 1 ^{1/2} | † 2 ^{1/2} | † 2 ^{1/2} | | † 3 ^{1/2} |

saaledes 0,22 cm³ til neutralisation af 2 L_f-doser dialyseret toksin. Sattes derimod salt til blandingen NaCl i en mængde svarende til 0,15 n umiddelbart før injektionen, da formaar 0,18 cm³ serumopl. at frembringe samme effekt.

Det her benyttede serum er i sig selv ret hurtigt reagerende ($K_f = 0^{\text{h } 35}$). Ved anvendelse af et langsomt reagerende ($K_f = 5^{\text{h } 06}$), kunde et lignende forhold iagttages; der forbrugtes 20 % mere serum til neutralisation af toksinet i det saltfri miljø end i det saltholdige.

Disse forsøg viser, at affiniteten er meget ringe i opløsninger, hvor der ikke er salt tilstede, thi det er meget sjældent¹ at finde et serum, som viser nogen titerforskel ved anvendelse af marsvin, naar der i det ene tilfælde indsprøjtes en frisk tilberedt blanding med toksin og i det andet en saadan som har henstaaet til binding kortere eller længere tid. Som MORGENTROTH først viste udøver Marsvinets subkutane væv en ejendommelig ikke nærmere op-

¹ Et saadant er dog omtalt af S. SCHMIDT: Zeitschr. f. Immunitätsforschung 1928, 59, 82, og et lignende tilfælde findes beskrevet af TH. MADSEN & SCHMIDT (ovenfor citerede arbejde).

Tabel XLI A,

visende neutralisationsforholdene imellem dialyseret serum og anatoksin, naar blandingen indsprøjtes straks efter tilberedningen.

| Serumdosis | Observation |
|----------------------------|--------------------------------------|
| 0,25 cm ³ | lever, normal. |
| 0,22 — | — ringe vægttab, ubetydelig infiltr. |
| 0,20 — | + 2 ¹ / ₂ |
| 0,18 — | + 2 ¹ / ₂ |
| 0,16 — | + 1 ¹ / ₁ |

klaret akcelererende indflydelse paa reaktionshastigheden imellem toksin og antitoksin.

At der under disse omstændigheder heller ikke foregaar nogen binding i en partielt mættet antitoksinopløsning viser forsøget, hvor resultaterne findes i tabellerne XLI A og B.

Der er her benyttet dialyseret serum (No. 788) dialyseret anatoksin (som ovenfor) og dialyseret, rensset toksin. 0,5 cm³ anatoksin blandedes med de i tabellen anførte serumdoser, hvorefter der tilsattes en *L_p*-dosis rensset toksin

Tabel XLI B,

samme forsøg som findes i Tabel XLI A, men blandingen af antitoksin og anatoksin henstaar 1 time ved 40° inden injektion finder sted.

| Serumdosis | Observation |
|----------------------------|--------------------------------------|
| 0,25 cm ³ | lever, normal. |
| 0,22 — | — intet vægttab, ubetydelig infiltr. |
| 0,20 — | + 3 ¹ / ₂ |
| 0,18 — | + 2 ¹ / ₂ |
| 0,16 — | + 1 ¹ / ₂ |

i det ene tilfælde umiddelbart efter anatoksintilsætningen, i det andet tilfælde derimod først efter at blandingen havde henstaaet 1 time ved 40° C. Som tabellen viser er resultatet ens for begge forsøgenes vedkommende. Naar der ikke er elektrolyter tilstede i en passende mængde foregaar bindingen af toksin og antitoxin ikke.

Det fremgaar af de forsøg, hvor der er anvendt anatoxin (toksoid) at dette er i stand til at bemægtige sig antitoksinet, saa at en senere tilføjet portion toksin bevirker at blandingen bliver giftig. Imidlertid, hvis man først tilsætter toksinet og derpaa anatoksinet, da kan man under visse omstændigheder opnaa samme resultat. Jeg skal anføre et eksempel i saa henseende.

1 AE (Frankfurter Standardserum) blandedes med en L_0 -dosis rensat toksin ($= 0,025 \text{ cm}^3$). Der fremstilledes 12 ensartede blandinger, idet der benyttedes to dyr til hver dosis. De to blandinger tjener som kontrol for, at vi virkelig er i besiddelse af en til L_0 svarende toksinmængde (denne grænseværdi var tidligere bestemt). Til de andre blandinger sattes dialyseret anatoxin C^{29} ($L_f = 6,8 \text{ pr. cm}^3$)¹ — det samme som er benyttet til saltforsøgene — i vekslende mængder. Derpaa kompletteredes med fys. saltvand til et totalrumfang af 4 cm^3 , hvorpaa blandingen indsprøjtedes paa marsvin. Resultaterne findes i tabel XLII. Med andre ord, vi har ved tilsætning af et toksoid, som i sig selv er ugiftigt, til en ligeledes ugiftig blanding af tok-

¹ Det er ligegyldigt af hvad art det benyttede toksoid er. Jeg har udført lignende forsøg med et toksoid, som var fremstillet ved henstilling af toksin ved 37° i et aar (der tilsattes ikke formol). Resultatet var det samme som ovenfor.

Jeg overbeviste mig ligeledes om, at dette forhold ikke er karakteristisk for difterigiften alene, men at tetanustoxin (-anatoxin) udviser samme egenskaber, naar de under tilsvarende omstændigheder bringes i kontakt med antitoxin.

Tabel XLII,
visende virkningen af anatoksin paa en ugiftig toksin-anti-
toksinblanding.

| Serumdosis | Observation |
|---------------------------------|--|
| 0 Kontrol | lever, tiltager i vægt, ingen infiltr. |
| 0 — | — — — — — |
| 0,046 cm ³ | — — — — — lille infiltr. |
| 0,046 — | — — — — — |
| 0,10 — | + 3 ¹ / ₂ |
| 0,10 — | + 2 ¹ / ₂ |
| 0,22 — | + 2 ¹ / ₂ |
| 0,22 — | + 3 ¹ / ₂ |
| 0,46 — | + 1 ¹ / ₂ |
| 0,46 — | + 1 ¹ / ₂ |
| 1,00 — | + 1 ¹ / ₂ |
| 1,00 — | + 1 ¹ / ₂ |

sin og antitoksin realiseret en udpræget toksisk opløsning. Dette kan kun forklares ved at antage, at anatoksinet — til trods for det giftige toksins tilstedeværelse — alligevel reserverer sig den det tilkommende mængde antitoksin.

4. Teoretiske Betragtninger.

Som bekendt opstillede EHRLICH en meget indviklet teori til forklaring af difterigiftens forskellige egenskaber. Af betydning for dette arbejde er EHRLICH's opfattelse af de i difterigiftbouillon tilstedeværende ugiftige forbindelsers natur: toksoiderne. Disse stoffer dannes, saaledes som EHRLICH først eksperimentelt har vist det, ved omdannelse af toksin gennem en iøvrigt ikke nærmere kendt proces. Men EHRLICH mente desuden, at der ogsaa primært, d. v. s. i selve kulturen under bakteriernes vækst, dannedes sub-

stanser, der ikke viste nogen akut giftvirkning, men som alligevel formaaede at neutralisere antitoksin. Disse hypotetiske elementer benævnte EHRLICH toksoner, og de skulde efter hans anskuelse være ansvarlige for de sent optrædende lammelser, der temmelig konstant fremkommer hos forsøgsdyr, som bliver behandlet med toksin-antitoksinblandinger, hvori der endnu findes et ringe giftoverskud, som ikke formaar at virke akut dræbende. Toksonerne, hvis affinitet til antitoksin skulde være mindre end det egentlige toksins, kunde overgaa til toksonoider, hvorved de mistede deres evne til at fremkalde de ovenfor nævnte lammelser. Toksoniderne havde derimod ofte samme affinitet til antitoksinet som de toksinmodifikationer (EHRLICH mente som bekendt, at det ogsaa var nødvendigt at antage flere forskellige stoffer, der havde giftkarakter) de var opstaaet af, men stundom kunde omdannelsen dog være ledsaget af en »aviditets«ændring. Skønt MADSEN i sin tid paaviste, at inframortelle difterigift-doser formaaede at fremkalde den »EHRLICH'ske »tokson«virkning er antagelsen af toksonernes eksistens dog langt fra forladt. H. SCHMIDT og W. SCHOLTZ, der i den nyeste tid har offentliggjort en serie interessante arbejder over difteritoksin og -antitoksin, er saaledes tilbøjelige til at mene, at difteribacillerne alene producerer tokson, der ved en dispersitetsgradsændring omdannes til toksin og videre til toksoid. GLENNY og hans medarbejdere derimod antager kun to modifikationer, toksin og toksoid, men mener at toksoiderne har ringere affinitet til antitoksin end toksinerne. Som bekendt har WALBUM og senere DERNBY og WALBUM fremsat den hypotese, at difterigiften ikke dannes ved direkte sekretion af bacillerne, men at proteolytiske enzymer i disse nedbryder peptonerne i bouillonon til »protoksiner«;

fortsættes nedbrydningen da dannes toksiske stoffer (den egentlige difterigift), hvis »destruktion« også skulde skyldes de proteolytiske enzymer.

S. SCHMIDT har tidligere fremsat følgende opfattelse af giftdannelsen og giftdestruktionen. Difteribacillerne danner kun een gift, difterigiften. Naar der selv i en ganske ung kultur ikke findes den teoretiske forskel mellem værdierne L_f , L_0 og $L_{\frac{1}{2}}$ (nemlig 1 x d. m. m.) da beror dette paa, at en del af den først dannede gift omdannes til ugiftige produkter efter skemaet toksin \rightarrow toksoid. I de første døgn stiger nemlig som bekendt brintionkoncentrationen i en kultur; der afsondres kun smaa giftmængder, saalænge væksten af bakterierne er i sin begyndelse. Det dannede toksin befinder sig altsaa i stærkt fortyndet tilstand og i svagt sur vædske, d. v. s. under omstændigheder, der fremskynder omdannelsen til toksoid. Efterhaanden som væksten af bakterierne tager fart produceres større og større toksinmængder og samtidig synker brintionkoncentrationen. Naar kulturen er ca. 8—10 dage gammel hører toksinproduktionen op, p_H er nu som regel omkring 8—8,5, hvilket atter favoriserer processen toksin \rightarrow toksoid.

Vi har omtalt, at EHRLICH begrundede sin antagelse af toksonerne eksistens med: 1) at de lammelser, som difterigiften fremkalder hos forsøgsdyrene fortrinsvis fremkom i partielt mættede toksinopløsninger, hvor toksinet grundet paa sin store affinitet skulde have bemægtiget sig alt antitoksinet, saa at den giftmodifikation der havde en ringere affinitet til antitoxin befandt sig i fri tilstand og 2) at der selv i ganske unge kulturer kan paavises stoffer, som besidder en antitoxinneutraliserende virkning uden samtidig at udvise giftgenskaber. Vi har nu set, at de to eksperimentelt foreliggende fakta kan tydes paa anden maade.

Hvad angaar spørgsmaalet om, hvorvidt difterigiften bestaar af flere stoffer, hvis affinitet til antitoksinet er forskellig, da er der, saavidt min erfaring gaar, intet som tyder herpaa. Som allerede EHRLICH selv paaviste det, varierer forholdet L_T/L_0 stærkt for forskellige toksiner og det samme er tilfældet med forholdet L_T/L_f . Jo større dette sidste forhold er desto mere »tokson« skulde giften altsaa indeholde, men da dette jo har en ringere affinitet til antitoksinet maatte man forvente, at der kunde paavises en forskel paa reaktionshastigheden overfor antitoksin hos to toksiner hvis L_T/L_f -forhold er forskelligt. Ved undersøgelse af en række toksiner tilberedt over en periode af flere aar, har jeg imidlertid ikke kunnet paavise noget saadant. Reaktionshastigheden imellem toksin og antitoksin er først og fremmest afhængig af toksinets styrke (TH. MADSEN & S. SCHMIDT, J. R. MØRCH & S. SCHMIDT). Men ogsaa den af GLENNY og hans medarbejdere hævdede paastand, at toksoiderne skulde have en ringere affinitet til antitoksin end toksinerne modsiges af mine forsøg. Toksoiderne dannes af toksinerne. Men denne proces behøver ikke at være ledsaget af en aviditetsændring, hvilket mine forsøg over destruktion af toksin har vist. Om K_f -værdien ændres eller ej er i første række bestemt af opløsningens brintionkoncentration. Naar anatoksiner reagerer langsommere end de toksiner, de er fremstillet af, da skyldes dette formolindholdet. Formalin og andre aldehyder virker nedsættende paa reaktionshastigheden ved sin blotte tilstedeværelse i en toksin-antitoksin-blanding og toksinets K_f -værdi nedsættes ingenlunde altid yderligere ved at det omdannes til anatoksin. De i dette arbejde sidst omtalte forsøg afgiver dog det mest slaaende bevis for, at toksoider ikke har mindre affinitet til antitoksin end toksiner. Man maatte snarere

være tilbøjelig til den omvendte slutning, da anatoksinet ved forsøgene tilsættes efter at toksinet er bragt i kontakt med antitoksinet. I det hele taget vil i en given blanding af antitoksin, toksin og toksoid det sidste stof først bindes til antitoksin. Toksinet er det, der neutraliseres til sidst. Paa dette forhold beror jo hele princippet i EHRLICH's maalemetode. Omdannelsen toksin \rightarrow toksoid er netop ikke ledsaget af tilsvarende ændring i toksinets bindene egenskaber. Værdien L_0 svinger i virkeligheden meget lidt, naar et toksin opbevares ved lav temperatur.

Der er af disse grunde ingen anledning til at opretholde en distinktion imellem de to modifikationer: toksin og toksoid hvad angaar forholdet til antitoksin, thi der kan ikke paavises nogen forskel paa en proces imellem antitoksin og toksin og en reaktion imellem antitoksin og toksoid. Afgiftningen er forsaavidt et fænomen, der ikke har noget at gøre med bindingen. Hvorfor ophæves toksinets gift-egenskaber da, naar det bringes i kontakt med tilstrækkelig store antitoksinmængder vil man uvilkaarlig spørge? Dette kan efter min mening forklares ved at antage, at ligevægten mellem toksin og toksoid forskydes efterhaanden som toksoidet bindes til antitoksin. Enhver toksinopløsning bestaar af egentlig toksin og toksoid i et forhold, som er nærmere bestemt af de fysiske og kemiske faktorer, der under de givne omstændigheder udøver deres indflydelse paa processen toksin \rightarrow toksoid, herunder temperaturen, brintionkoncentrationen, fortyndingsgraden, indholdet af forskellige kemiske forbindelser, o. s. v. Vi ved, at processen toksin \rightarrow toksoid ved passende variationer af brintionkoncentrationen, kan bringes til snart at løbe i den ene snart i den anden retning (ROUX & YERSIN, MORGENROTH, DERNBY & WALBUM).

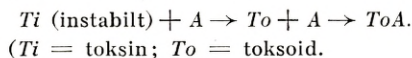
Ved ophedning af toksin fremskyndes processen toksin \rightarrow toksoid, medens der ved tilsætning af peptonbouillon til toksin sker en akceleration af den omvendte proces toksoid \rightarrow toksin, o. s. v. Bindingsprocessen derimod er ikke under alle omstændigheder reversibel, men kan ledes paa en saadan maade, at den bliver det (f. eks. ved at man varierer elektrolytindholdet). Antager man nu, at antitoksinet kun forbinder sig med toksoid (vi har set at antitoksinet, naar der baade er toksin og toksoid tilstede, da udvælger sig det sidste) da vil der ved foreningen ske en forskydning af ligevægten, hvorved processen toksin \rightarrow toksoid fremskyndes. Efterhaanden som bindingen imellem antitoksin og toksoid skrider frem omdannes mere og mere toksin og blandingen ender med at blive ugiftig. At en dissociation af komplekset TA medfører dannelse af fri gift er ogsaa let forstaaelig, thi det ved spaltningen frigjorte toksoid vil delvis omdannes til toksin efter ligningen toksoid \rightarrow toksin og i en udstrækning, som bestemmes af de ovennævnte fysiske og kemiske faktorer.

Antager man saaledes, at toksin-antitoksinreaktionen er resultatet af to processer,¹ saa staar det tilbage at forklare

¹ Konsekvensen af den her skitserede hypotese bliver altsaa, at det egentlige toksin ikke direkte er i stand til at forene sig med antitoksinet, men at det for at opnaa denne egenskab først maa omdannes til toksoid. Paa denne maade vil man ogsaa let kunne forklare virkningen af antitoksinet in vivo. Antages det, at der i blodet hos forgiftede dyr cirkulerer en større eller mindre mængde diftergift, da vil dette altsaa være til stede dels som egentligt toksin og dels som toksoid, idet de to stoffer er i ligevægt med hinanden, men indføres nu antitoksin, da vil dette bemægtige sig det tilstedeværende toksoid, hvilket har tilfølge, at ligevægten mellem toksoid og toksin forskydes. En del toksin overgaar til den ugiftige modifikation, der da straks adsorberes af antitoksinet o. s. v.; paa denne maade vil efterhaanden alt toksin omdannes til toksoid, hvorved forgiftningen af organismen standser. Men det er naturligvis klart, at antitoksinet ikke formaar at udbedre de skader, som toksinet allerede har hidført, hvilket ogsaa stemmer med de velkendte for-

disses natur. Selve bindingsprocessen viser som tidligere nævnt stor lighed med en adsorptionsreaktion imellem to kolloide metaller, hvis partikler er modsat ladet. Om naturen af processen toksin \rightarrow toksoid kan man paa nuværende tidspunkt næppe have nogen begrundet mening. Maa-ske drejer det sig om en fysisk-kemisk tilstandsændring af molekylerne (H. SCHMIDT & W. SCHOLZ antager en dispersitetsgradsændring), men muligvis er processen af kemisk natur, beroende f. eks. paa en intramolekylær omlejring. Man kender jo fra kemien eksempler paa, at smaa ændringer i et molekyles sammensætning i væsentlig grad kan forandre et stofs egenskaber.

Det DANITZ'ske fænomen ser jeg mig ikke i stand til at forklare. Mine forsøg har dog godtgjort, at fænomenet intet har at gøre med toksinets giftfunktion. Det bestemmes udelukkende af foreningen imellem toksoid og antitoxin, er uafhængigt af forholdet toksin/toksoid i det benyttede toksin. Derfor kan denne ejendommelige proces ikke forklares ved aviditetsforskelligheder hos de forskellige toksinmodifikationer, saaledes som EHRlich mente og heller ikke gennem antagelsen af en forskydning af forholdet imellem toksin og toksoid, hvilken opfattelse i den nyeste tid er fremsat af H. SCHMIDT og W. SCHOLZ. ARRHENIUS og MADSEN's teori kan ogsaa vanskelig bringes i fuld overensstemmelse med processen, der foregaar i en partielt mættet antitoxinopløsning, da reaktionen netop i dette tilfælde ikke er reversibel. ARRHENIUS har imidlertid senere ment at hold: jo længere tid, der hengaar inden en forgiftet organisme tilføres antitoxin, desto ringere chance vil man have for at ophæve toksinets ødelæggende virkninger. Skematisk udtrykt forløber toksin-antitoxin-processen altsaa paa følgende maade:



kunne finde paralleler til denne proces i reaktioner mellem visse organiske forbindelser. BORDET, der opfatter toksin-antitoksinreaktionen som en adsorption (hvilket imidlertid ingen forklaring giver paa afgiftningen af toksinet) har anført en tilsyneladende bestikkende forklaring paa det DANITZ'ske fænomen. Han sammenligner processen, der foreløber i en partielt mættet antitoksinopløsning med det, der sker, naar smaa stykker filterpapir bringes ned i en farveopløsning. Hvis man dypper et stort stykke papir i vædsken, da vil der adsorberes mindre farve, end hvis papiret i forvejen klippes i mindre stykker, der et efter et bringes ned i farveopløsningen. BORDET synes imidlertid at glemme, at det saakaldte Danitz'ske fænomen kun optræder, naar toksinet fraktionsvis sættes til antitoksinet og ikke, naar det omvendte finder sted. Sætter man en bestemt mængde antitoksin til toksin, da vil der neutraliseres lige meget, hvad enten antitoksintilsætningen sker paa een gang eller i mindre portioner. Ganske vist neutraliserer de først tilsatte antitoksin-portioner relativt mere toksin end de sidste, men endresultatet bliver det samme. Hvis BORDET's forklaring holdt stik maatte man vel antage, at resultatet skulde blive det samme, hvad enten toksinet sættes til antitoksinet eller omvendt.

5. Sammenfattende Oversigt.

1. Stabiliteten af difteritoksinets antigene og udfnuggende evne er i høj grad afhængig af temperaturen og brintionkoncentrationen. Ved 0° foregaar destruktionsen meget langsomt, hvis p_H ligger imellem ca. 5,5 og ca. 10. Ved p_H ca. 5,5 nedsættes toksinets udfnuggende evne stærkt, men den kan delvis regenereres, naar brintionkoncentratio-

nen atter ændres til den oprindelige værdi, og toksinet derpaa faar lov at henstaa 24—48 timer ved 0° .

Ved 20° er stabilitetsforholdene væsentligst de samme indenfor et brintionkoncentrationsomraade svarende til p_H -zonen 6,0—9,0. Ved 37° er destruktionen af saavel den antigene som af den udfnuggende evne betydelig, naar p_H er mindre end ca. 6,5 og større end ca. 8,5. I alkalisk miljø er udfnugningsfunktionen mindre stabil end hvis reaktionen er sur. Ved p_H 7,0 (6,5—7,5) er toksindestruktionen mindst.

Ved temperatur omkring 50° angribes toksinets udfnuggende egenskab stærkt. Ved 55 — 60° sker der en total destruktion i løbet af faa minutter selv ved p_H ca. 7 og samtidig ødelægges toksinets antigene egenskab meget hurtigt, saaledes at største delen er destrueret efter 1 times forløb. Toksin, som er behandlet paa denne maade, virker hæmmende paa udfnugningsprocessen imellem frisk toksin og antitoxin, men denne egenskab aftager, naar toksinet efter ophedningen faar lov at henstaa nogen tid ved 0° .

2. Reaktionen mellem toksin og antitoxin kan finde sted ved temperaturer og ved brintionkoncentrationer, hvor de enkelte komponenter er instabile. Komplekset $T:A$ er altsaa mere stabilt end de bestanddele, som indgaar heri.

3. Antitoxinet destrueres med ringe hastighed (ved 40°), hvis p_H er større end ca. 3,5 og mindre end ca. 8. Udfnugningsevnen nedsættes stærkt, naar p_H er større end ca. 7,5. Herved opnaar antitoxinet (ligesom toksin) den egenskab at kunne virke hæmmende paa udfnugningen imellem friskt antitoxin og toksin. Hvis antitoxin opbevares ved 40° i et miljø, hvis brintionkoncentration svarer til p_H ca. 4—5, da forøges dets udfnuggende evne meget betydeligt. Ændres derpaa miljøets brintionkoncentration til den oprindelige værdi (p_H ca. 7), da stiger antitoxinets K_f -værdi meget

hurtigt til den samme størrelse, som det havde, før indvirkningen af brintionerne fandt sted.

4. Antitoksin, som under indflydelse af brintioner har opnaaet en forøget affinitet til toksin, er ogsaa i stand til at give udfnugning med toksinopløsninger, som ved ophedning eller ved ændring af brintionkoncentrationen har mistet saavel deres antitoksinneutraliserende som udfnuggende egenskab maalt overfor frisk serum. Reaktionen er specifik, d. v. s. den finder kun sted med difteritoksin og ikke med f. eks. tetanus- eller skarlatinatoksin.

5. Forskellige kemiske forbindelser (elektrolyter) virker destruerende paa difteritoksin. Nogle indvirker fortrinsvis paa toksinets udfnuggende evne (herunder særlig neutral-salte af stærke uorganiske syrer) uden i væsentlig grad at forøge destruktionshastigheden af toksinets antigene funktion. Salte af visse aromatiske syrer medfører derimod i løbet af kort tid en total destruktion.

6. Saltenes indflydelse paa antitoksinets destruktion er som regel kun ringe. I et meget saltrigt miljø nedsættes dog udfnugningsevnen stærkt.

7. Stabiliteten af dialyserede toksinopløsninger og særlig af saadanne fremstillet ved adsorption af raa giftbouillon med aluminiumhydroksydsol og paafølgende eluering med natriumfosfat, er langt ringere end af almindelig raa difterigift. De mere eller mindre »rensede« toksiner kan ikke stabiliseres igen ved opbevaring i saltopløsninger, bouillon eller raa giftbouillon.

8. Renset toksin formaar at give udfnugning med antitoksin ved 40° , naar p_H er fra ca. 5,0—ca. 9,5. Reaktionshastigheden er omtrent den samme inden for et brintionkoncentrationsomraade svarende til p_H 5,5— p_H 8,5. Jo mere p_H afviger fra disse værdier, henholdsvis imod den sure og imod den alkaliske side, desto større bliver K_f .

9. I meget saltfattige opløsninger foregaar reaktionen imellem toksin og antitoxin yderst langsomt, i helt saltfrit miljø sandsynligvis slet ikke. Efterhaanden som saltkoncentrationen gøres større, synker baade K_f og K_n indtil et vist punkt, der for de fleste saltes vedkommende ligger omkring hvad der svarer til en 0,1 normal opløsning. Ved yderligere forøgelse stiger disse værdier atter stærkere og stærkere imod ∞ .

10. I en partielt mættet antitoxinopløsning forløber reaktionen med samme hastighed, som naar toksin og antitoxin er tilstede i ækvivalente mængder. Elektrolyternes indflydelse er ogsaa den samme i de to tilfælde.

11. Der er foretaget en række forsøg paa dyr (kaniner, marsvin), til kontrollering af de resultater, som er opnaaet ved forsøgene *in vitro*. Herved viste der sig en saa god overensstemmelse, saa at det maa være berettiget af udfugningsprocessen at drage visse slutninger angaaende reaktionen imellem toksin og antitoxin.

12. De ældre teorier over toksinets konstitution og over naturen af toksin-antitoxin-reaktionen er diskuteret. Der er fremsat et forsøg paa at forklare afgiftningen af toksin under indvirkningen af antitoxin, gaaende ud paa at dette sidste ikke direkte »neutraliserer« toksinet, men at der foregaar en omlejring efter processen toksin \rightarrow toksoid.

LITERATURFORTEGNELSE

Anvendte Forkortelser:

- Ann. Pasteur = Annales de l'Institut Pasteur.
 Arch. f. Hyg. = Archiv für Hygiene.
 Ber. d. deutsch. chem. Ges. = Bericht der deutschen chemischen Gesellschaft.
 Biochem. Journ. = The Biochemical Journal.
 Biochem. Zschr. = Biochemische Zeitschrift.
 C. R. Acad. Sci. = Comptes Rendus des Séances de l'Academie des Sciences.
 C. R. S. B. = Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie.
 D. m. W. = Deutsche medizinische Wochenschrift.
 Festskr. 1902 = Festskrift ved Indvielsen af Statens Seruminstitut 1902.
 Journ. of Path. = The Journal of Pathology and Bacteriology.
 Klin. Jb. = Klinisches Jahrbuch.
 Medd. Carlsb. Lab. = Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet.
 Zbl. f. Bakt. (orig.) Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten, Originale.
 Zschr. f. Hyg. = Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten.
 Zschr. f. Immun. Forsch. — Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.

- ABT, G. *Annal. Pasteur*, 1928, **42**, 1336.
 ARRHENIUS, S. *Immunochemie*, Leipzig 1907.
 — & MADSEN, TH *Festskr. 1902*.
 BORDET, J. *Annal. Pasteur*, 1899, **13**, 225.
 — — — 1903, **17**, 161.
 BUCHNER, H. *Arch. f. Hyg.* 1893, **17**, 138.
 DANITZ, J. *Ann. Pasteur*, 1902, **16**, 331.
 DERNBY, K. G. & WALBUM, L. E. *Bioch. Zschr.* 1923, **138**, 505.
 DREYER, G. & MADSEN, TH. *Festskr. 1902*.

- EHRlich, P. D. m. W. 1891, **32**, 976 & **44**, 1218.
— — 1898, **38**, 597.
— Klin. Jb. 1898, **6**, 299.
- FRIEDBERGER, E. Zbl. f. Bakt. (Orig.) 1901, **30**, 336.
- GLENNY, A. T. & ALLEN, K. Journ. of Path. 1921, **24**, 61.
— & OKELL, C. C. Journ. of Path. 1924, **27**, 187.
— , POPE, C. G. & WADDINGTON, HILDA. Journ. of Path. 1925, **28**, 279.
- GLENNY, A. T. & WADDINGTON, H. samme, 1928, **31**, 403.
- LINDERSTRØM-LANG, K. Medd. Carlsb. Lab. 1923, **15**, No. 4.
- MADSEN, TH. Experimentelle Studier over Difterigiften, Disputats, København 1896.
- MADSEN, TH. & SCHMIDT, S. Zschr. f. Immun. Forsch. 1930, **65**, 357.
— & WALBUM, L. E. Meddelelser fra Statens Serum-institut, 1917, **9**, 1.
- MØRCH, J. R. & SCHMIDT, S. Zschr. f. Immun. Forsch. (under tryk-ning).
- MORGENROTH, J. Zschr. f. Hyg. 1904, **48**, 177.
- PICK, E. P. & SCHWARZ, O. Biochem. Zschr. 1909, **17**, 491.
- RAMON, G. Ann. Pasteur, 1923, **37**, 1001.
— & GRASSET, E. C. R. S. B. 1926, **2**, 436.
- RENAUX, E. C. R. S. B. 1924, **1**, 964.
- ROUX, E. & YERSIN, A. Ann. Pasteur, 1888, **2**, 629.
— — — — 1889, **3**, 273.
— — — — 1890, **4**, 385.
- SCHMIDT, H. & SCHOLZ, W. Arch. f. Hyg. 1926, **96**, 172.
- SCHMIDT, S. Ann. Pasteur, 1928, **42**, 63.
— C. R. Acad. Sci. 1927, **185**, 1080.
- SØRENSEN, S. P. L. Enzymstudier II (Medd. Carlsb. Lab. 1908. 8).
— Medd. Carlsb. Lab. 1925, **15**, No. 11.
— — — — 1926, **16**, No. 8.
— & LINDERSTRØM-LANG, K. Medd. Carlsb. Lab. 1924, **15**, No. 6.
- WATSON, A. F. & LANGSTAFF, ELSIE. Bioch. Journ. 1926, **20**, 763.
- WALBUM, L. E. Studier over Dannelsen af de bakterielle Toxiner. Disputats, København 1922.
- WILLSTÄTTER, R., KRAUT, H. & ERBACHER, O. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 1925, **58**, 2448.

BIOLOGISKE MEDDELELSER

UDGIVNE AF

DET KGL. DANSKE VIDENSKABERNES SELSKAB

6. BIND (KR. 18,10):

Kr. Ø.

1. LUNDBLAD, O.: Zur Kenntniss der Quellenhydracarinen auf Møens Klint nebst einigen Bemerkungen über die Hydracarinen der dortigen stehenden Gewässer. Mit 7 Tafeln und 5 Textfiguren. 1926 5.00
2. BØRGESSEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. II. Phæophyceæ. 1926 ... 6.00
3. OSTENFELD, C. H.: The Flora of Greenland and its Origin. 1926 3.35
4. FIBIGER, JOHANNES and MØLLER, POUL: Investigations upon Immunisation against Metastasis Formation in Experimental Cancer. With 5 plates. 1927 2.75
5. LIND, J.: The Geographical Distribution of some Arctic Micromycetes. 1927 1.50
6. BØRGESSEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. III. Rhodophyceæ. Part 1. Bangiales and Nemalionales. 1927 4.50
7. LINDHARD, J.: Nogle Undersøgelser over den respiratoriske Kvotient under kortvarigt Muskelarbejde. 1927 1.00

7. BIND (KR. 14,85):

1. RAUNKJER, C.: Dominansareal, Artstæthed og Formationsdominanter. 1928 1.75
2. PETERSEN, C. G. JOH.: On some Biological Principles. 1928 ... 2.00
3. VIMTRUP, BJ.: Undersøgelser over Antal, Form, Bygning og Overflade af Glomeruli i Nyren hos Mennesker og nogle Pattedyr. 1928 1.30
4. BENSLEY R. R. og VIMTRUP, BJ.: Undersøgelser over de Rouget'ske Cellers Funktion og Struktur. En Metode til elektiv Farvning af Myofibriller. 1928 1.00
5. THOMSEN, OLUF: Die Erblichkeit der vier Blutgruppen des Menschen, beleuchtet durch 275 Nachkommenschaftsindividuen in 100 AB (IV)-Ehen (nebst 78 Kindern, von denen nur der eine (AB)-Elter bekannt ist). 1928 1.00
6. KROGH, A. and HEMMINGSEN, A. M.: The Assay of Insulin on Rabbits and Mice. 1928 0.70
7. JOHNSON, J. W. S.: L'Anatomie mandchoue et les Figures de Th. Bartholin, étude d'iconographie comparée. 1928 2.00
8. KEMP, TAGE: Om Kromosomernes Forhold i Menneskets somatiske Celler. 1929 1.75
9. WEIS, FR.: Fysiske og kemiske Undersøgelser over danske Hedejorder. Med særligt Henblik paa deres Indhold af Kolloider og Kvælstof. With a Resumé in English. 1929 8.25

8. BIND (KR. 14,95):

1. BØRGESEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. III. Rhodophyceæ. Part II. Cryptonemiales, Gigartinales and Rhodymeniales. Les Mélobésiées par M^{me} Paul Lemoine. Avec 4 planches. 1929. 4.50
2. THOMSEN, OLUF og KETTEL, KARSTEN: De menneskelige Isoagglutininers og tilsvarende Blodlegemereceptorers Styrke i forskellige Levealdre. Med 1 Tavle. 1929 1.60
3. KRABBE, KNUD H.: Recherches sur l'existence d'un œil pariétal rudimentaire (le corpuscule pariétal) chez les mammifères. Avec 11 planches (22 figures). 1929 2.80
4. ROSENINGE, L. KOLDERUP: Phyllophora Brodiæi and Actinococcus subcutaneus. With one plate. 1929 2.40
5. THOMSEN, OLUF og KETTEL, KARSTEN: Kvantitative Undersøgelser over de menneskelige Isoagglutiner Anti-A og Anti-B. 1929 0.65
6. MADSEN, TH. et SCHMIDT, S.: Toxine et antitoxine diphtériques. 1930 2.00
7. LUNDBLAD, O.: Die Hydracarinien der Insel Bornholm. Mit 9 Tafeln und 1 Textfigur. 1930 5.00
8. LINDHARD, J. and MÖLLER, JENS P.: On the Origin of the Initial Heat in Muscular Contraction. 1930 1.00

9. BIND (under Pressen):

1. BØRGESEN, F.: Marine Algæ from the Canary Islands, especially from Teneriffe and Gran Canaria. III. Rhodophyceæ. Part III. Ceramiales. 1930 7.50
2. OSTENFELD, C. H. and SYRACH LARSEN, C: The species of the Genus Larix and their geographical distribution. With 35 illustrations and 8 maps. 1930 5.00
3. SCHMIDT, S.: Eksperimentelle Undersøgelser over forskellige Elektrolyters Indflydelse paa Difteritoksinets og det antidifteriske Serums Stabilitets- og Neutralisationsforhold med særligt Hensyn paa Reaktionshastigheden imellem Toksin og Antitoksin. 1930 5.50