Over de zoogenaamde thrombosine van Lilienfeld

Over de zoogenaamde Thrombosine van Lilienfeld.

C. D. CRAMER.

OVER DE ZOOGENAAMDE THROMBOSINE

VAN

LILIENFELD.

OVER DE ZOOGENAAMDE THROMBOSINE VAN LILIENFELD.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

Doctor in de Geneeskunde

AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS

DR. C. A. PEKELHARING,

Hoogleeraar in de Faculteit der Geneeskunde,

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

TE VERDEDIGEN

op **WOENSDAG 20 JANUARI 1897**, des namiddags te 4 uren,

DOOR

CORNELIS DIDERICUS CRAMER,

Geneesheer te Heukelum,

GEBOREN TE AMSTERDAM.

UTRECHT,

C. H. E. BREIJER.

1897.

Typ. Zuid-Hollandsche Boek- en Handelsdrukkerij.

Aan

mijne moeder en aan de nagedachtenis

van mijnen vader.

In de allereerste plaats wensch ik een woord van dank te richten tot U, Hooggeleerde PEKELHARING, *Hooggeachte Promotor, die mij als leermeester en niet minder als promotor met raad en daad bijstondt bij het begin en het einde mijner Academische studiën.*

Dat de wetenschappelijke leiding, die ik bij de samenstelling van dit proefschrift zoo ruimschoots van U heb mogen genieten, mij ook na het verlaten der Academie steeds ten goede moge komen!

Ook U, Professoren en Lectoren der medische en philosophische faculteit, betuig ik mijn dank voor het onderwijs, dat ik van U heb ontvangen.

De gedachte aan de hulpvaardige belangstelling, die ik van U, MIDDELVELD VIERSEN, *gedurende den tijd, dien ik in het physiologisch laboratorium doorbracht, heb ondervonden, vervult mij steeds met dankbaarheid.*

HOOFDSTUK I.

'tIs een tweetal jaren geleden, dat *Leon Lilienfeld* zijne belangrijke en veelomvattende verhandeling „Ueber Blutgerinnung" publiceerde. [1]) Hierin geeft hij een historisch overzicht van de verschillende theorieën (vooral die van de school van Dorpat), die over het gecompliceerde vraagstuk der stolling van het bloed zijn opgebouwd, en verrijkt vervolgens, in verband met zijne vroegere mededeelingen [2]) en aan de hand van nieuwe experimenten, de wetenschap met eene hypothese, die de geschiedenis der stollingsleer eene nieuwe phase scheen te doen intreden. Daar ik in de volgende bladzijden wensch stil te staan bij een gedeelte dier hypothese, wil ik in korte trekken de ontwikkelingsgeschiedenis en den hoofdinhoud zijner theorie mededeelen.

---

1) Zeitschrift für Physiologische Chemie, Bd. XX. Heft 1 en 2.

2) Leon Lilienfeld, Zur Chemie der Leukocyten, Bd. XVIII. Heft 5 en 6. S. 473 ff.

Leon Lilienfeld, Weitere Beiträge zur Kenntniss der Blutgerinnung. Verhandl. d. phys. Gesellschafft. Sitzung vom 21 Juli 1893.

Rauschenbach [1]) en *Grohmann* [2]), leerlingen van *Alexander Schmidt*, toonden aan, dat dierlijk protoplasma (lymphkliercellen, ettercellen, lymphoïde cellen uit pericardiale en peritoneale vloeistof van 't paard, roode bloedlichaampjes van den vogel, gistcellen, spermatozoën, protozoën) en plantaardig protoplasma (schimmels en splijtzwammen) in koud gefiltreerd paardenbloed stolling veroorzaakt, en dat het water-extract dier cellen proplastische vloeistoffen doet stollen.

Uit deze onderzoekingen bleek niet aan welk gedeelte dezer samengestelde stoffen het vermogen moest toegeschreven worden om uit fibrinogeen fibrine te doen ontstaan.

Lilienfeld onderzocht dit voor de leukocyten. In zijne verhandeling „Zur Chemie der Leukocyten" [3]) toont hij aan, dat de celkern der lymphocyten (uit thymus en lympklieren) hoofdzakelijk bestaat uit nucleohiston, eene verbinding van histon (een eiwitbasis) en leukonucleïne. De leukonucleïne is weer te splitsen in een eiwitstof en adenylzuur. Ter verduidelijking wil ik het schema, zooals het in hoofdtrekken 't eerst door *A. Kossel* en *A. Neumann* [4]) is aangegeven en eenigszins gewijzigd door *Lilienfeld* is overgenomen, laten volgen:

---

1) Rauschenbach, Ueber die Wechselwirkungen zwischen Protoplasma und Blutplasma. Inaug-Diss., Dorpat 1882.

2) W. Grohmann, Ueber die Einwirkung des zellenfreien Blutplasmas auf einige pflanzliche Mikro-organismen. Inaug-Diss. Dorpat 1884.

3) Zeitschrift für Phys. Chem., Bd. XVIII. Heft 5 u. 6.

4) Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft XXVII, S. 2215.
Zeitschrift für Physiol. Chemie, Bd. XX. Heft 1 u. 2, S. 106.

Nucleohiston		
opl. in water, wordt gesplitst door behandeling met HCl of $Ba(OH)_2$ of $Ca(OH)_2$ in		
Histon een eiwitbasis	en Leukonucleïne, een zuur, opl. in minerale zuren, wordt gesplitst door sterke alkaliën in	
	eiwit en	adenylzuur (nucleïnezuur), wordt ontleed door verhitten met minerale zuren onder vorming van org. stoffen (adenine, thymine laevulinezuur) en phosphorzuur [1].

Het nucleohiston werd door *L.* op de volgende wijze verkregen: de lymphocyten worden met water uitgetrokken, het in water opgeloste nucleohiston wordt door azijnzuur gepraecipiteerd en ter verdere zuivering opgelost in verdund alkali en weer gepraecipiteerd door azijnzuur. Door deze zuivering eenige malen te herhalen verkreeg *L.* eene nucleohiston-oplossing, waarmede hij reageerde op:

1°. koud gefiltreerd paardebloed,
2°. proplastische vloeistoffen ($MgSO_4$-plasma, trans- en exsudaten),
3°. liquor peritoneï et pericardii (fibrinogene vloeistoffen),
4°. zuivere fibrinogeenoplossing,
5°. peptonplasma.

1) Later heeft *Kossel* den naam adenylzuur weer opgegeven, en daarvoor den naam «thymusnucleïnezuur» in de plaats gesteld. (Zeitschrift für Physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 77.

Hoewel het niet altijd uitvoerbaar is, willen we ons toch zooveel mogelijk beperken tot de experimenten, die met de naar de methode van *Hammarsten* bereide zuivere fibrinogeenoplossing genomen zijn, daar deze met 't oog op het te behandelen vraagstuk van het meeste gewicht zijn.

Het bleek nu, dat de nucleo-histon-oplossing het vermogen bezat in koud gefiltreerd paardebloed (zoo niet te veel wordt toegevoegd) en in peptonplasma de stolling te bevorderen, in proplastische en fibrinogene vloeistoffen de stolling te vertragen, terwijl het op eene zuivere fibrinogeen-oplossing geen merkbare werking vertoonde.

Het verschil in reactie deed *L.* vermoeden, dat het nucleohiston te splitsen zou zijn in twee componenten, die verschillende werking op de bovengenoemde vloeistoffen zouden uitoefenen.

In het hierboven vermelde schema zien we, dat het nucleohiston zoowel door HCl als door $Ba(OH)_2$ en $Ca(OH)_2$ te splitsen is in leukonucleïn en histon. Ook is het nucleohiston te splitsen door het te behandelen met kokend water, met alkaliën of met kunstmatig maagsap. [1]) De leukonucleïne waarmede *L.* experimenteerde, bereidde hij op de volgende wijze: bij nucleohiston werd verdund zoutzuur (0,8 %) [2]) gevoegd,

---

1) l. c. S. 114.

2) L. verkrijgt zijn 0,8% HCl door bij 1000 cm^3 H_2O 8 cm^3 rookend HCl te voegen. Daar het meest geconcentreerde zoutzuur van den handel 42,9% HCl bevat (15° C.) zal de sterkte zijner zoutzuur-oplossing hoogstens 0,34% geweest zijn. Maar van een eenigszins nauwkeurige bepaling der sterkte is in zijne verhandeling geen sprake.

hierbij gaat het histon in oplossing, terwijl de leukonucleïne onopgelost achterblijft. Door herhaald extraheeren, oplossen in verdund alkali, en praecipiteeren met zuur, behandelen met alcohol en aether, kan de leukonucleïne zuiver verkregen wordeu. De leukonucleïne is oplosbaar in overmaat van HCl en onoplosbaar, tenminste zeer moeilijk oplosbaar, in water.

L. gebruikte neutrale, door analyse gecontroleerde praeparaten. Het bleek nu, dat de leukonucleïne geen invloed uitoefende op proplastische en fibrinogene vloeistoffen, en evenmin uit eene zuivere fibrinogeen-oplossing fibrine deed ontstaan. De stolling-vertragende eigenschap van het nucleohiston op proplastische en fibrinogene vloeistoffen mag dus aan het andere splitsingsproduct n.l. histon toegeschreven worden, wat zeer duidelijk blijkt uit eene reeks van proeven door *L.* genomen. [1])

Vóórdat we de verdere ontleding van de leukonucleïne nagaan, zullen we, terwille van het causaal verband, eerst eenige belangrijke feiten bespreken, die het uitgangspunt vormen der nieuwe hypothese.

Het trof *L.*, dat in alle vloeistoffen, waarin zich fibrinogeen bevindt, na toevoeging van nucleïne-substantie, een praecipitaat gevormd werd, en tevens, dat nucleohiston, na behandeling van $Ca(OH)_2$ en $Ba(OH)_2$ [1])

1) l. c. S. 136—138.

2) Voegt men bij eene nucleohiston-oplossing een weinig kalkwater, dan wordt het nucleohiston gesplitst; de kalkverbinding van histon praecipiteert en de nucleïne blijft in oplossing; bij toevoeging van meer kalkwater heeft de omgekeerde reactie plaats, daar in overmaat van kalkwater de nucleïne onoplosbaar en de kalkverbinding van histon oplosbaar is. Ook barytwater splitst het nucleohiston en wel zóódanig, dat het barytzout van nucleïne praecipiteert en het histon als baryumzout in oplossing blijft.

in proplastische en fibrinogene vloeistoffen en in eene zuivere fibrinogeen-oplossing stolling veroorzaakte.

Dit blijkt uit de volgende experimenten:

1°. 10 cm^3 zuivere fibrinogeen-oplossing met 10 cm^3 nucleohiston-oplossing (1 %) geeft geene stolling, doch wel een praecipitaat. [1])

2°. 20 cm^3 zuivere fibrinogeen-oplossing met 10 cm^3 leukonucleïne-oplossing (1 %) geeft geene stolling, doch wel een praecipitaat. [2])

3°. 30 cm^3 zuivere fibrinogeen-oplossing met 15 cm^3 van eene 1 % oplossing, die uit nucleohiston door behandeling met $Ca(OH)_2$ verkregen wordt, geeft na 1 uur stolling. [3])

We zien in proef 3, dat de nucleïne-kalk (zie noot pag. 5) de fibrinogeen-oplossing doet stollen en in proef 1 en 2, dat de nucleïne-substantie daarin een praecipitaat teweegbrengt. *Lilienfeld* vermoedde, dat tusschen deze twee reacties een nauw verband moest bestaan. Hij isoleerde het praecipitaat van proef 1 en 2, waschte het af in gedistilleerd water en loste het op in verdund Na_2CO_3. Voegde hij nu bij deze oplossing $CaCl_2$, dan trad, zooals we in de volgende proeven zien, in 30 min. resp. 5 min. stolling in:

1°. 20 cm^3 zuivere fibrinogeen-oplossing met eene 3—4 % nucleohiston-oplossing geeft een praecipitaat, dat, uitgewasschen in gedist. water, in Na_2CO_3 opgelost wordt. 3 cm^3 van deze oplossing geeft met 3 druppels $CaCl_2$ (6 %) in 30 minuten stolling. [4])

---

1) l. c. S. 109.
2) l. c. S. 116.
3) l. c. S. 112.
4) l. c. S. 118.

2°. 30 cm³ zuivere fibrinogeen-oplossing met eene zwak zuur reageerende oplossing van leukonucleïne [1]) geeft een praecipitaat, dat uitgewasschen in gedist. water, in Na_2CO_3 opgelost wordt. 4 cm³ van deze oplossing geeft met 3 druppels $CaCl_2$ (6 %) na 5 min. stolling. [2])

Daar de leukonucleïne, zooals uit de onderzoekingen van *Prof. Kossel* gebleken is, te splitsen is in een eiwitstof en in nucleïnezuur, moest ten slotte nog nagegaan worden of de fibrinogene stof zich tegenover nucleïnezuur op dezelfde wijze verhoudt. Bij het experiment, dat *Lilienfeld* tot dat doel nam, bediende hij zich van het materiaal door *Prof. Kossel* vervaardigd.

> 30 cm³ zuivere fibrinogeen-oplossing met nucleïnezuur geeft een praecipitaat, dat, uitgewasschen in gedist. water, in Na_2CO_3 opgelost wordt. 5 cm³ van deze oplossing met 4 druppels $CaCl_2$ (6 %) stolt in een minuut tot een vasten koek. [3])

Hoe dikwijls *L.* deze proef ook herhaalde „jedes Mal", zegt hij, „setzte mich die schnelle, fast momentane, beinahe explosionsartige Gerinnung des Nucleïnsäure-

---

1) Hier reageert de leukonucleïne-oplossing zwak zuur, waarschijnlijk door het zoutzuur, waarin het opgelost is en daar zoutzuur in eene zuivere fibrinogeen-oplossing ook een praecipitaat teweeg brengt, dat, afgewasschen in Na_2CO_3 opgelost met $CaCl_2$ stolling geeft is het de vraag in hoeverre de leukonucleïne hier op het fibrinogeen werkt. Dezelfde vraag kan herhaald worden in de straks volgende proef, waar *L.* experimenteert met nucleïnzuur; hoe deze oplossing bereid wordt en hoe zij reageert wordt door L. niet vermeld. Hij gebruikt hier het door *prof. Kossel* bereide materiaal.

2) l. c. S. 118.

3) l. c. S. 119.

niederschlages, den man aus Fibrinogen gewinnt mit Kalksalzen in Erstaunen. [1])

Lilienfeld stelt voor het praecipitaat, dat de nucleïne-substanties (nucleohiston, leukonucleïne, nucleïnezuur) in de fibrinogeen bevattende vloeistoffen doen ontstaan „thrombosine" [2]) te noemen, een naam, die het specifieke van de stof ten opzichte van de stolling van het bloed schijnt te moeten uitdrukken. De fibrine, die gevormd wordt door $CaCl_2$ te voegen bij de in Na_2CO_3 opgeloste thrombosine, is dan thrombosine-kalk.

In 't kort kunnen we den inhoud van de hierboven beschreven theorie aldus weergeven: het hoofdbestanddeel van de leukocytenkern is nucleohiston, dat door zijne samenstelling eene stolling-bevorderende en eene stolling-tegengaande werking bezit; de laatste eigenschap verdwijnt door elimineeren van het histon, wat door de werking van kalkhydraat en barythydraat mogelijk is. Zoowel nucleohiston als de respectievelijke splitsingsproducten leukonucleïne en nucleïnezuur doen in eene fibrinogeen-oplossing een praecipitaat ontstaan n.l. thrombosine, dat in water afgewasschen, in Na_2CO_3 opgelost, met $CaCl_2$ fibrine d. w. z. thrombosine-kalk doet ontstaan.

Volgens *Lilienfeld* is het praecipitaat, dat men verkrijgt, wanneer bij eene fibrinogeen-oplossing verdund azijnzuur gevoegd wordt, identisch met thrombosine; we kunnen derhalve het gecompliceerde proces der stolling van het bloed op de volgende, eenvoudige wijze

---

1) l. c. S. 119.

2) Van θρόμβος (τρέφειν = vastmaken), niet te verwarren met thrombin, een technische term, die *Alexander Schmidt* voorstelt te geven aan 't fibrinefirment (zur Blutlehre S. 201).

imiteeren: men praecipiteert door verdund azijnzuur in eene fibrinogeen-oplossing de thrombosine, lost deze, na afgewasschen te hebben in gedist. water, in Na_1CO_3 op en voegt hierbij $CaCl_2$. Er ontstaat dan, volgens *Lilienfeld*, fibrine.

Tegenover en ten deele naast deze hypothese staat die van *Prof. Pekelharing*, die ik, voordat ik nader op de onderzoekingen van *L.* inga, in korte trekken wil uiteenzetten.

Voegt men bij eene zuivere fibrinogeen-oplossing fibrineferment, dan ontstaat er stolling. Het zymogeen van het ferment is een nucleo-proteïde, die afkomstig is van de in het bloed zwevende lichaampjes (vooral leukocyten); het ferment wordt gevormd, doordat de nucleo-proteïde zich verbindt met de kalk van de kalkzouten uit het bloed. Het ferment, dus de nucleo-proteïde-kalkverbinding, staat de kalk aan het fibrinogeen af en is in staat zich, door zich weer opnieuw met kalk te verbinden, tot ferment te regenereeren. In hoeverre het ferment op de fibrinogene stof werkt is onbekend; *prof. P.* vindt het evenals *Hammarsten* niet geheel onwaarschijnlijk, dat er eene splitsing van de fibrinogene stof plaats heeft.

Vergelijken we beide hypothesen dan zien we dat, vóórdat de leukonucleïne gesplitst wordt, ook *Lilienfeld* naast fibrinogeen en kalk een nucleo-proteïde als derde factor ter verklaring der bloedstolling noodig heeft.

Deze derde factor („something else" zooals *Halliburton* [1]) het uitdrukt) schijnt noodzakelijk te zijn voor de werking van kalk op fibrinogeen. Dit „something else" is bij *prof. Pekelharing* nucleo-proteïde, bij *Halli-*

1) Journal of Physiology. Vol. XVII, pag. 143.

burton cel-globluline, [1]) bij *Wright* cel-fibrinogeen, bij *Wooldridge* weefsel-fibrinogeen, bij *Kossel* en *Lilienfeld* nucleohiston (leukonucleïne).

Waar echter door *Kossel* en *Lilienfeld* de leukonucleïne verder gesplitst wordt en waar *L.*, experimenteerend met het eiwitvrije nucleïnezuur, meent eene nieuwe stof (thrombosine) te mogen aannemen en deze als basis gebruikt tot het opbouwen eener nieuwe theorie, dáár wordt het verschil principieel. Het zwaartepunt der hypothese is dus gelegen in het wel of niet aannemen van het bestaan der thrombosine als de uit fibrinogeen gevormde grondstof der fibrine. De ingrijpende hypothese is nog weinig het onderwerp geweest van een critisch onderzoek. 't Eerst is door *Dr. J. J. Frederikse* [2]), waar hij in het vierde hoofdstuk zijner dissertatie de samenstelling der fibrinogene stof behandelt, de voorloopige mededeeling van *L.*, [3]) nl. dat door azijnzuur in eene zuivere fibrinogeen-oplossing een praecipitaat ontstaat, dat, in een weinig alkali opgelost, met $CaCl_2$ stolling geeft, volkomen bevestigd.

Deze voorloopige mededeeling werd een jaar later de basis der nieuwe theorie, en toen stelde *L.* voor het praecipitaat door azijnzuur verkregen thrombosine te noemen.

Herhaaldelijk heb ik mij van de juistheid der bovengenoemde reactie overtuigd, doch ik verschil met *L.*

---

1) Bij nader onderzoek bleek, dat de celglobuline een nucleoproteïde was. Halliburton, Proc. of the phys. soc. 16 Febr. 1895.

2) J. J. Frederikse: Over enkele vraagpunten betreffende fibrine en fibrinogene stof. Diss. Utrecht 1894, pag. 44.

3) Verhandl. der physiol. Gesellsch. Berlin. Sitzung am 21 Juli 1893.

hierin, dat ik het eerste praecipitaat door azijnzuur verkregen nog geen thrombosine, het tweede praecipitaat door $CaCl_2$ verkregen nog geen fibrine noem. En ik meen hiertoe gerechtigd te zijn, daar de kalkverbinding van de stof die *L.* thrombosine noemt, eigenschappen vertoont, die de echte fibrine niet bezit. Voegt men nl. bij het praecipitaat, na toevoeging van eenige druppels $CaCl_2$ verkregen nog meer $CaCl_2$ dan lost de thrombosine-kalk geheel op, in tegenstelling met fibrine, die in overmaat van $CaCl_2$ slechts zeer weinig in oplossing overgaat. Ook na toevoeging van 0,2% NaCl lost de thrombosine-kalk op, wat fibrine niet doet. Dit verschil in reactie vormde het uitgangspunt mijner onderzoekingen. Voor dat we echter op meerdere gronden het bewijs willen leveren, dat thrombosine-kalk en fibrine niet identisch zijn, willen we eerst nagaan in hoeverre het praecipitaat door azijnzuur uit eene zuivere fibrinogeen-oplossing verkregen als eene nieuwe stof mag beschouwd worden. *Lilienfeld*, die zelf voorstelt het praecipitaat thrombosine te noemen, geeft geen enkel bewijs waarom zijne thrombosine van fibrinogeen verschilt; wat *Schäfer* [1]) aanleiding gaf tot de volgende opmerking: „I fail to find any evidence in *Lilienfeld's* paper, that thrombosin is different from fibrinogen". En niet alleen, dat hij het bewijs tot aanneming van een verschil mist, hij is zelfs geneigd thrombosine en fibrinogeen voor hetzelfde chemische lichaam te houden en wel op grond van de volgende proef: praecipiteert men in eene zuivere fibrinogeen-oplossing het fibrinogeen door keukenzout en lost men het fibrinogeen, na

1) Experiments on the conditions of coagulation of fibrinogen. E. A. Schäfer, Proc. of the phys. soc. 16 March 1895.

afgewasschen te hebben in gedist. water, op in verdund Na_2CO_3, dan geeft ook deze oplossing met $CaCl_2$ een praecipitaat; dit kan geen thrombosine-kalk, doch zou fibrinogeen-kalk moeten zijn. Herhaaldelijk heb ik 't zelfde resultaat verkregen, men moet echter ceteris paribus meer fibrinogeen in de verdunde soda oplossen en meer kalk toevoegen, dan dit bij de zoogenaamde thrombosine 't geval is, om dezelfde reactie te verkrijgen. De fibrinogene stof loste ik bij gedeelten bij 37° C. in de Na_2CO_3 op en voegde zoolang de stof toe, totdat geen oplossing meer plaats had. In de 0,1% Na_2CO_3 was dus het fibrinogeen ad maximum (37° C.) opgelost. Een gedeelte van deze oplossing:

1°. met eenige druppels gesatureerde $CaCl_2$ geeft spontaan eene coagulatie en masse,

2°. met $CaCl_2$ (1%) geeft geen praecipitaat,

3°. verdund met gelijk volume, gedist. water en daarna met eenige druppels gesat. $CaCl_2$ geeft geen pracipitaat.

Vergelijken we deze waarneming met die van *Lilienfeld*, dan is, de saturatie der reagentia buiten rekening gehouden, het verschil alleen gelegen in het praecipiteeren der fibrinogene stof door keukenzout en het neerslaan der thrombosine door azijnzuur. Daar dus het verschil in reactie wegvalt en door *Lilienfeld* geen ander argument is gegeven om een verschil aan te nemen, houden we voorloopig met *Schäfer* een verschil tusschen thrombosine en fibrinogeen voor niet aangetoond. Het is ook inderdaad niet geoorloofd een praecipitaat of zelfs een coagulum zonder nader onderzoek fibrine te noemen; als men eene bij 37° C. zoo sterk mogelijk geconcentreerde fibrinogeen-oplossing in Na_2CO_3 bij kamertemperatuur overschenkt,

dan verkrijgt men, evenals bij langzame afkoeling, eene verandering van aggregatietoestand, die 't aspect der stolling vertoont.

Ook het volgend experiment geeft weing steun aan de opvatting van *L.*, dat thrombosine chemisch verschilt van fibrinogeen.

Het praecipitaat door verdund azijnzuur verkregen uit een drievoudig gezuiverde fibrinogeen-oplossing, die met $CaCl_2$ geen stolling geeft, wordt, na afgewasschen te zijn in gedist. water, opgelost in verdund Na_2CO_3. Bij deze oplossing, die met $CaCl_2$ terstond een praecipitaat (thrombosine-kalk) geeft, wordt een gelijk volume verzadigde keukenzout-oplossing gevoegd. Het nu ontstane praecipitaat wordt in water opgelost; deze oplossing geeft stolling met fibrineferment (*Schmidt*) en geen praecipitaat met $CaCl_2$. Deze laatste oplossing vertoont dus duidelijk de kenmerken eener zuivere fibrinogeen-oplossing, terwijl het volgens *L.* eene (in verdund keukenzout opgeloste) thrombosine-oplossing is. We zien hier dus, dat het fibrinogeen, al is het reeds eenmaal volgens *L.* door azijnzuur tot thrombosine gereduceerd, weer de eigenschappen van fibrinogeen herkrijgt, zoo het ten laatste maar uit zijne oplossing door keukenzout wordt gepraecipiteerd en opgelost wordt in eene zwakke zoutsolutie.

Het bovenstaande experiment wijst dus eerder op identiteit van, dan op een verschil tusschen beide stoffen. Het verschil in reactie is mijns inziens toe te schrijven aan de heterogene media, waarin de fibrinogene stof zich bevindt. Immers het is zeer wel mogelijk, dat het azijnzuur het fibrinogeen zoo arm mogelijk aan zout (NaCl) maakt en dat het, in verdund Na_2CO_3 opgelost, door $CaCl_2$ gepraecipiteerd wordt, doordat het fibrino-

geen zich met kalk verbindt. Maken we nu de fibrinogene stof, nadat ze gepraecipiteerd is door azijnzuur en opgelost is in Na_2CO_3 weer rijker aan zout (NaCl) door ze te praecipiteeren met eene gesatureerde keukenzoutsolutie, dan verbindt ze zich, nadat ze in water is opgelost, niet meer met kalk.

Zoo de werking van het azijnzuur op de fibrinogene stof gelegen is in het zout-arm maken, dan zal het fibrinogeen, dat door dialyse gepraecipiteerd wordt, dezelfde eigenschap moeten vertoonen.

Uit 't volgende blijkt, dat dit werkelijk 't geval is. Dialyseeren we eene drievoudig gezuiverde fibrinogeenoplossing tegen gedistilleerd water, dan zet zich het fibrinogeen vlokkig af; lossen we deze vlokken op in zeer verdund Na_2CO_3 dan krijgen we ook een praecipitaat met $CaCl_2$. Ook de volgende waarneming bevestigt onze onderstelling. Eenige vlokken thrombosine worden in een zwakke keukenzoutsolutie (0,7 %) waarbij een spoortje Na_2CO_3 is gevoegd, opgelost. In deze oplossing werd niet door $CaCl_2$, wel door fibrineferment stolling verkregen.

Al zouden de boven beschreven experimenten voldoende zijn om tegenover *Lilienfeld* een gelijkheid van thrombosine met fibrinogeen aan te nemen, het kwam mij toch wenschelijk voor beide stoffen te analyseeren, daar eene eventueele overeenstemming in samenstelling den grootsten steun zou geven aan de meening, dat thrombosine en fibrinogeen als één stof moeten beschouwd worden. In het volgende hoofdstuk deel ik de résultaten der analysen mede.

HOOFDSTUK II.

Uit de serieën van quantitatieve analysen, die *Hammarsten* genomen heeft van verschillende eiwitstoffen van het bloed, bleek, dat het stikstof-gehalte nog meer dan het koolstof- en waterstofgehalte varieerde. Zoo vond hij voor het stikstofgehalte van fibrine 16,91, van fibrinogeen 16,66, en van fibrineglobuline 16,06 % [1]). Nemen we nu aan, zooals de meeste experimentatoren op dit gebied voor de fibrineglobuline geneigd zijn te doen, dat de fibrineglobuline een splitsingsproduct is van fibrinogeen en veronderstellen we met *Lilienfeld*, dat de thrombosine ook een splitsingsproduct is van fibrinogeen, dan mogen we, waar een verschil in N-gehalte tusschen fibrineglobuline en fibrinogeen van 0,6 % bestaat, a priori ook een verschillend gehalte aan stikstof tusschen thrombosine en fibrinogeen verwachten. Dit bleek echter niet het geval te zijn, zooals we straks zullen zien.

Eerst willen we eene korte beschrijving geven van de wijze, waarop eene zuivere fibrinogeen-oplossing bereid werd en van de verschillende bewerkingen, die de gezuiverde stof onderging, vóórdat ze aan eene analyse onderworpen werd. Steeds werd door mij runderbloed gebruikt.

Drie liter bloed werd onder flink schudden in 30 cm³ kaliumoxalaat (1 %) opgevangen. In zes gedeelten werd dit bloed, na gezeefd te zijn, gedurende 2½ uur

1) Hammarsten, Lehrbuch der phys. Chemie, 3e Aufl. S. 107.

gecentrifugeerd. Het plasma werd afgeheveld en bedroeg meestal het derde gedeelte van de geheele hoeveelheid bloed. Uit het heldere plasma werd het fibrinogeen door het dubbele volume gesatureerde keukenzout-oplossing gepraecipiteerd. Het fijnvlokkige fibrinogeen zette zich, na twee minuten gecentrifugeerd te zijn, op den bodem en soms gedeeltelijk aan de oppervlakte af. De cohaesie en de adhaesie met het vat was groot genoeg om de vloeistof snel te kunnen afschenken. Het achterblijvende fibrinogeen loste door het daaraan hangende zout gemakkelijk in gedistilleerd water op; in de geel gekleurde oplossing werd nu het fibrinogeen door een gelijk volume gesat. NaCl-oplossing neergeslagen. De fibrinogene stof vormde zich tot eene geleiachtige klomp, die door middel van glazen staven uitgeperst en overgebracht werd in gedist. water. Het achterblijvend praecipitaat werd door middel van de centrifuge verzameld, evenals bij de eerste praecipitatie.

De derde zuivering geschiedde op dezelfde wijze als de tweede. Hoe vaker het fibrinogeen gezuiverd werd, des te moeilijker loste het op. Bij de praecipitatie en in mindere mate bij het oplossen van de stof in gedist. water, ging steeds een gedeelte verloren. Op deze wijze verkreeg ik in korten tijd eene oplossing, die alle eigenschappen bezat, welke *Hammarsten* aan eene zuivere fibrinogeen-oplossing stelt. Steeds werd op een gedeelte van de oplossing met $CaCl_2$ (1 %) gedurende 12 uur bij 37° C. gereageerd. Gebeurde het een enkele maal dat er eenige stolling ontstond, dan werd de oplossing voor de vierde, ja soms voor de vijfde maal gezuiverd, totdat de reactie negatief was. Bij al mijne experimenten en analysen heb ik fibrinogeen-oplossingen ge-

bruikt, die op de hierboven beschreven wijze zijn bereid en geen stolling met $CaCl_2$ gaven.

Vóórdat de fibrinogene stof en de thrombosine voor de analyse gebruikt konden worden, ondergingen zij de volgende bereiding. Uit de eene helft van eene drie- of meervoudig gezuiverde oplossing werd door dialyse tegen gedist. water de fibrinogene stof gepraecipiteerd, uit de andere helft werd, door voorzichtig bijvoegen van verdund azijnzuur (1 %), de thrombosine neergeslagen. Zoowel de fibrinogene stof als de thrombosine ondergingen vervolgens dezelfde bewerkingen: na de praecipitatie werden ze afgewasschen in gedistilleerd water en gebracht in alcohol van 96 %, daaronder met glazen staafjes uitgeplozen, vervolgens uitgewasschen in aether en gedroogd bij 37° C. De gedroogde stof werd nu op een agaten mortier tot poeder fijngewreven en op een gehard filter gebracht. Nu werd, om de stof zoo arm mogelijk aan zout te maken, zóólang alcohol van 70 % doorgefiltreerd, totdat in 't filtraat geen chloor door zilvernitraat kon aangetoond worden. Daarna werd de stof uitgewasschen met alcohol van 97 %, absoluten alcohol en ten slotte met aether. De aldus bewerkte stof werd zoolang in 't oliebad bij 110° C. gedroogd totdat het gewicht constant bleef.

Daar het te verwachten is, dat, zoo er verschil in samenstelling bestaat, het stikstofgehalte dit het meest zou doen uitkomen, bepaalde ik eerst naar de methode van *Kjeldahl* van beide stoffen het N-gehalte. De stof (200—400 mgr.) werd met 10 cm^3 H_2SO_4 en 0,400 gr. kwikoxyde langzaam ontleed tot de vloeistof wit van kleur was geworden; vervolgens overgebracht in eene distilleerkolf waarbij 80 cm^3 kaliloog (1,34 %) 40 cm^3 zwavelkalium en eenige stukjes zink gevoegd

werd. Door verwarming werd de vrijkomende ammoniak overgedistilleerd en opgevangen in $\frac{1}{4}$ n H_2SO_4. Door titratie met $\frac{1}{4}$ n kaliloog werd de hoeveelheid gebonden $\frac{1}{4}$ n H_2SO_4 bepaald. Als indicator werd methyloranje gebruikt.

Door blinde proeven en N-bepalingen van stoffen, welker stikstofgehalte bekend is (ureum) overtuigde ik mij van de betrouwbaarheid der reagentia. In de nu volgende analysen vermelden we de hoeveelheid aschvrije stof met de daarbij behoorende aschbepaling en de hoeveelheid $\frac{1}{4}$ n H_2SO_4, die door de vrijkomende NH_3 gebonden werd.

Daar steeds uit het plasma van slechts drie liter runderbloed het fibrinogeen werd bereid en daar vrij veel fibrinogeen door de herhaalde zuivering verloren ging, was het mij niet altijd mogelijk uit ééne hoeveelheid zoowel eene N-bepaling van fibrinogeen en thrombosine als eene aschbepaling van beiden te verrichten. Dit was wel het geval met de eerste bepaling. De tweede en derde analyse zijn verricht met stoffen, die uit verschillende hoeveelheden bloed verkregen zijn, met dien verstande, dat uit elke zuivere fibrinogeen-oplossing de helft gebruikt werd tot bereiding van de fibrinogene stof, de andere helft tot vorming van de thrombosine. De vierde analyse is gedaan van afzonderlijke hoeveelheden. Ik laat hier de resultaten der proeven volgen:

Fibrinogeen.

	aschvrije stof	gebonden $\frac{1}{4}$nH_2SO_4	stikstof	stof voor aschbep.	asch
1	0,3663 gr.	17,25 cm³	16,48 %	0,2893 gr.	0,345 %
2	0.3033 „	14,2 „	16,38 „	0,2793 „	0,393 „
3	0,3111 „	14,6 „	16,42 „		
4	0.2752 „	12,875 „	16,37 „	0,2163 „	0,231 „

Thrombosine.

	aschvrije stof	gebonden $\frac{1}{4}nH_2SO_4$	stikstof	stof voor aschbep.	asch
1	0,3193 gr.	15,05 cm³	16,49 %	0,298 gr.	0,268 %
2	0,3198 „	14,9 „	16,31 „	0,2981 „	0,369 „
3	0,3225 „	15,0 „	16,27 „		
4	0,4337 „	20,2 „	16,30 „	0,8315 „	0,56 „

Vergelijken we beide tabellen, dan zien we, dat tegenover een gemiddeld stikstofgehalte van 16,41 % voor 't fibrinogeen een gemiddeld stikstofgehalte van 16,34 % voor de thrombosine staat, een verschil dus van 0,07 %. Dit geringe verschil bevestigt onze meening, dat beide stoffen als identisch moeten beschouwd worden.

De eerste nauwkeurige stikstofbepalingen van fibrinogeen zijn verricht door *Hammarsten* [1]). Hij paste de methode van *Dumas* [2]) toe en verkreeg als resultante van 15 waarnemingen, die tusschen 16,45 en 16,84 % variëeren, een gemiddelde van 16,66 % N. Het laagste N-gehalte, dat *Hammarsten* vond, nl. 16.45 %, is dus gelegen onder mijn hoogste waarneming; het is dus wel mogelijk, dat ons verschil gelegen is binnen de fouten der waarneming, hoewel de mogelijkheid van een specifiek verschil tusschen runder- en paarden-

1) Archiv für die Ges. Phys. d. M. und Th. Bd. XXII, S. 473.

2) *Salkowski* en *Hahn* hebben met caseïne uit koemelk beide methoden met elkander vergeleken en kwamen tot de conclusie, dat volgens de methode van *Kj.* $\frac{1}{20}$ minder N gevonden werd dan volgens de methode *Dumas*. *Munk* vond echter, dat, als men, zooals door *Wilfarth* is aangegeven, behalve het zwavelzuur ook nog kwik (hetzij als metaal, hetzij als oxyde) bij de stof voegt en dan minstens één uur laat koken, dan hetzelfde N-gehalte verkregen werd als bij de methode van *Dumas*. (Archiv für Anat. u. Phys. His. und du B. Reymond 1895. Heft 5 u. 6).

fibrinogeen ('t materiaal van *Hammarsten*) niet uit te sluiten is, daar *Hammarsten* zich, wat fibrine betreft, aldus uit: „und es ist sehr wohl möglich, dass das Fibrin verschiedener Thierarten eine ungleiche Zusammensetzung haben kann" [1]).

Bij een zoo groote overeenstemming in stikstofgehalte was het wel te verwachten, dat de koolstof- en waterstof-bepalingen van fibrinogeen en thrombosine eveneens eene gelijkheid zouden vertoonen, temeer daar het C- en H-gehalte van de eiwitstoffen van het bloed onderling kleinere verschillen vertoonen dan het N-gehalte. Op de boven beschreven wijze werd uit het runderbloedplasma eene zuivere fibrinogeen-oplossing bereid, waarvan de eene helft gebruikt werd tot vorming van de fibrinogene stof, de andere helft tot vorming van de thrombosine.

De verbranding geschiedde op de volgende wijze: in het eene eind van een te voren onder doorvoering van zuurstof uitgegloeide en met zuivere zuurstof gevulde verbrandingsbuis werd over een lengte van 6 cm. verwarmd koperoxyde gebracht, de daarop volgende 5 cm. werd met een afgewogen hoeveelheid van de zorgvuldig gedroogde stof gevuld, nadat deze eerst met verwarmd koperoxyde was vermengd op een in de vlam gedroogden koperen trechter, welke op de verbrandingsbuis was geplaatst. De opening van dezen trechter kon gesloten worden door een koperen plaatje, zoodat de vermenging goed kon plaats hebben.

Door 't plaatje weg te duwen met een uitgegloeide koperen spatel kon 't mengsel in de buis gebracht worden. De trechter werd zorgvuldig nagespoeld met

1) Arch. f. d. ges. Ph. d. M. u. Th. Bd. XXII. S. 480.

verwarmd koperoxyde, evenzoo de spatel. De volgende 12 cm. werden door denzelfden trechter gevuld met verwarmd koperoxyde. Ten slotte werd de buis met eene bij 110° C. verwarmde gereduceerde rol kopergaas gevuld. Steeds werd een dag te voren het koperoxyde in een stroom van zuurstof uitgegloeid en het kopergaas gereduceerd. Onder het doorvoeren van een constanten, langzamen zuurstofstroom had de verbranding van voren naar achteren geleidelijk plaats. 't Water werd opgevangen in een u-buisje met sterk H_2SO_4, 't koolzuur in een kaliapparaatje, waarin eene kalioplossing van 30 %; daarachter bevond zich een u-buisje met vaste kali. De rij absorptietoestelletjes, die vóór de verbranding met zuivere zuurstof waren gevuld, werd voor de veiligheid gesloten door een u-buisje met chloorcalcium. De duur der verbranding was ongeveer 3 à 4 uur. De caoutchouckurken en de verbindingsbuisjes der absorptieapparaten werden in een exsiccator bewaard.

De resultaten mijner zes elementair-analysen laat ik volgen.

Fibrinogeen.

aschvrije stof	gewichtstoeneming zwavelzuur	kali	asch	koolstof	waterstof
0,4637 gr.	0,277 gr.	0,8418 gr.	0,38 %	49,51 %	6,65 %
0,3951 „	0,2612 „	0,7377 „	0,25 „	50,92 „	7,361 „
0,3914 „	0,2564 „	0,7416 „		51,67 „	7,29 „

Thrombosine.

aschvrije stof	gewichtstoeneming zwavelzuur	kali	asch	koolstof	waterstof
0,4044 gr.	0,2720 gr.	0,7565 gr.	0,34 %	51,01 %	7,49 %
0,3929 „	0,2657 „	0,7281 „	0,306 „	50,54 „	7,53 „
0,3512 „	0,2398 „	0,6656 „		51,68 „	7,603 „

Vergelijken we ook hier weer de gemiddelden, dan staat tegenover een koolstofgehalte van 50,7 % voor 't runderfibrinogeen een C-gehalte van 51,08 % voor de thrombosine en wat het waterstofgehalte betreft, is de percentverhouding der gemiddelden 7,1 : 7,54. — Een verschil dus van 0,38 voor de koolstof en van 0,44 voor de waterstof. Op grond van dit zestal C en H bepalingen mogen we wel, evenals we dit bij de N-bepalingen deden, tot de gelijkheid van beide stoffen besluiten.

In de verhandeling, waarin *Hammarsten* de resultaten zijner stikstofbepalingen publiceert, deelt hij tevens mede de uitkomsten zijner koolstof en waterstof-analysen. Uit een vijftiental verbrandingen verkreeg hij als gemiddelde voor de koolstof 52,93 % (met een maximum van 53,17 en een minimum van 52,47) en voor de waterstof 6,9 % (maximum 7,13, minimum 6,72).

Ook hier is het niet onmogelijk, dat het verschil in percentage toe te schrijven is aan de verschillende soort van fibrinogeen, evenals we dit bij de N-bepalingen onderstelden.

De hierboven vermelde resultaten der analysen leveren dus veeleer een bewijs voor de identiteit dan voor een verschil der beide stoffen. Er is dus niet de minste reden het praecipitaat, verkregen door bij eene thrombosine-oplossing in Na_2CO_3 kalk te voegen, fibrine te noemen; méér reden bestaat er, de thrombosine-kalk als eene kalkverbinding van fibrinogeen te beschouwen.

De totale oplosbaarheid van het kalk-praecipitaat in overmaat van $CaCl_2$ en in NaCl, zooals we in het vorige hoofdstuk aantoonden, deed ons reeds vermoeden, dat de thrombosine-kalk van *Lilienfeld* iets anders was als fibrine. Uit een zevental analysen van *Ham-*

marsten bleek, dat het C- en H-gehalte van paardenbloedfibrine nagenoeg overeenkomt met dat van het fibrinogeen van dezelfde soort, doch dat hier het N-gehalte niet onaanzienlijk verschilt. Terwijl hij voor het stikstofgehalte van fibrinogeen 16,66 % vond, verkreeg hij voor dat van fibrine 16,91 % (max. 17,02 — min. 16,85); een verschil dus van 0,25 %. Het scheen mij derhalve in de allereerste plaats noodig het stikstofgehalte van thrombosine-kalk te bepalen, en bleek, dan, dat dit niet hooger was dan 16,41 %, het N-gehalte van runder-fibrinogeen (pag. 18), dan was een krachtig bewijs geleverd, dat thrombosine-kalk geen fibrine is.

Evenals bij de vorige N-bepalingen werd ook hier de methode van *Kjeldahl* toegepast.

Op de volgende wijze werd de thrombosinekalk bereid: bij eene drievoudig gezuiverde runderfibrinogeen-oplossing, die met $CaCl_2$ gedurende 12 uur bij 37° C. bewaard geen stolling gaf, werd druppelsgewijze verdund azijnzuur (1 %) toegevoegd. Het fijnvlokkige praecipitaat, dat bij de eerste druppels ontstond, verdween na eenig schudden spoedig, na toevoeging van meer azijnzuur bleef het. Het praecipitaat vormde een geleiachtige klomp, die gemakkelijk uit de vloeistof te nemen was en werd, na afgewasschen te zijn in gedist. water, in 0,1 % Na_2CO_3 gebracht, waarin het, nadat het door glazen staafjes was uitgeplozen, langzaam oploste. Door decanteeren werden de onopgeloste stukjes verwijderd. Uit deze oplossing werd de thrombosine gepraecipiteerd door $CaCl_2$ (1 %); ook hier verdween het praecipitaat door de eerste druppels verkregen na flink schudden, toevoeging van meerdere druppels deed een blijvend praecipitaat ontstaan. Dit praecipitaat werd afge-

wasschen in gedist. water, uitgeplozen onder alcohol van 97 %, gewasschen in aether en, na gedroogd te zijn bij 37° C., in een agaten mortier fijngewreven.

De stof werd vervolgens op een filter gebracht en zoolang met alcohol van 70 % gewasschen, totdat met ammoniumoxalaat geen kalk, met zilvernitraat geen chloor meer aan te toonen was. Daarna werd de stof uitgewasschen met alcohol van 97 %, absoluten alcohol, aether en ten slotte bij 110° C. in 't oliebad gedroogd, totdat het gewicht constant bleef.

Een overzicht der vier stikstofbepalingen van de op deze wijze bereide thrombosine-kalk laten we hier volgen.

Thrombosine-kalk.

	aschvrije stof	gebonden $\frac{1}{4}nH_2SO_4$	stikstof	stof voor aschbepal.	asch
1	0,2771 gr.	12,825 cm³	16,19 %	0,1931 gr.	5,59 %
2	0,2638 „	12,225 „	16,22 „		
3	0,2641 „	12,4 „	16,43 „	0,2832 „	5,04 „
4	0,2936 „	13,8 „	16,45 „		

We verkrijgen dus voor het gemiddeld stikstofgehalte van thrombosine-kalk 16,32 %; eene waarde, die zelfs iets beneden het N-gehalte van fibrinogeen en dus ver beneden het betrekkelijk hooge N-gehalte van fibrine staat. De hypothese van *Lilienfeld*, dat de verbinding van kalk met thrombosine fibrine mag genoemd worden kan door ons dus niet gedeeld worden. Daar we, op grond van onze vorige onderzoekingen het recht meenen te hebben thrombosine identisch te verklaren met fibrinogeen, gelooven we, dat de fibrine van *Lilienfeld* een kalk-verbinding is van fibrinogeen.

Opmerkelijk is hier het hooge aschgehalte der throm-

bosine-kalk. Terwijl *Hammarsten* [1]) als gemiddelde van 5 bepalingen een aschgehalte van 0,564 % voor fibrine (paard) vond en *Frederikse* [2]) voor runderfibrine 0,8 % (als gemiddelde van 7 bepalingen) is hier het aschgehalte 5,31 %.

Het te hooge aschgehalte is dus een argument te meer, de thrombosine-kalk geen fibrine te noemen.

Zooals we zagen werd door langzame toevoeging van $CaCl_2$ de thrombosine, in $NaCO_3$ opgelost, gepraecipiteerd; de toevoeging van kalk geschiedde zoolang, totdat geen praecipitaat meer gevormd werd. Den volgenden dag bleek nu, dat in de vloeistof, waaruit door middel van de centrifuge alle thrombosine-kalk was verwijderd, zich een praecipitaat had gevormd, soms zoo sterk, dat het den vorm van het glas, waarin de oplossing zich bevond, had aangenomen en zich voordeed als een groot coagulum.

Een aschbepaling van dit praecipitaat leverde 1,16 % op, een percentage ver beneden de waarde, die we voor de vier bovenvermelde thrombosine-kalk praeparaten vinden, doch te hoog voor fibrine. De langzamere vorming schijnt dus van invloed te zijn op het aschgehalte, 't zij dat bij de eerste vorming de fibrinogene stof (thrombosine *L*) zich met meer kalk verbindt, 't zij dat meer kalk mechanisch wordt meegepraecipiteerd.

Op grond der bovengenoemde analysen mogen we wel tot eene gelijkheid in samenstelling tusschen fibrinogeen en thrombosine besluiten. Het scheen mij

---

1) Archiv f. d. ges. Phys. d. M. u. d. Th. Bd. XXII. S. 481.
2) l. c. pag. 39 en 41.

intusschen van belang beide stoffen ook met betrekking tot eene physische eigenschap nl. het polarisatievermogen met elkaar te vergelijken. Wij zullen echter aan de beschrijving van dit deel van het onderzoek een kort overzicht laten voorafgaan van hetgeen omtrent deze eigenschap bekend is van de andere eiwitstoffen van het bloed, nl. de serumglobuline en serumalbumine.

HOOFDSTUK III.

Nadat *Biot* ontdekt had, dat aan verschillende organische stoffen, o. a. de opgeloste eiwitstoffen, de eigenschap toegeschreven kan worden het polarisatievlak naar links te draaien, trachtten *Bouchardat* en *Becquerel* [1]) van deze eigenschap gebruik te maken om eene nieuwe methode tot quantitatieve eiwitbepaling intevoeren. In dien tijd waren echter de polarisatie-apparaten zóó ondoelmatig, dat zij geene betrouwbare resultaten verkregen voor de gekleurde eiwit-oplossingen, die zij onderzochten.

Dit was wel het geval toen *Hoppe-Seyler* [2]) acht jaar later gebruik maakte van den saccharimeter van *Soleil*, verbeterd door *Ventzke*; hij raadde, zoowel wegens de snelheid, waarmede de proeven te nemen zijn, als om de vrij nauwkeurige benadering der te vinden waarden, deze methode tot quantitatieve eiwitbepaling ten

---

1) Compt. rend T. 28, pag. 625. Nov. 1849.

2) Virchow's Archiv. Bd. XI. 1857. pag. 547.

sterkste aan. *Hoppe-Seyler* onderzocht het draaiend vermogen van menschen- en runderserum, eiwithoudende urine en hydrocele-vloeistof, beschouwde al deze vloeistoffen als albuminehoudende media, en concludeerde uit zijne experimenten, dat de albumine 't polarisatievlak even sterk naar links draait als de druivensuiker dit naar rechts doet, zoodat, door een verdeelde schaal aan den polarimeter te bevestigen, door den clinicus op eene eenvoudige en weinig tijdroovende wijze het eiwitgehalte der genoemde vloeistoffen (vooral urine) kon bepaald worden.

Liborius [1]) heeft in eene uitvoerige studie de toenmaals bekende quantitatieve methoden tot eiwitbepaling (van *Scherer*, *Berzelius*, *Häbler*, *Hoppe-Seyler*, *Méhu*) onderling vergeleken en duidelijk aangetoond, dat de circumpolarisatie-methode van *H. S.* minder betrouwbaar is, dan de methode van *Scherer* en *Berzelius*. Vooreerst zijn de onderlinge verschillen te groot ten opzichte van het geringe eiwitgehalte, dat de te onderzoeken vloeistoffen bezitten; daarenboven bevinden zich in ééne vloeistof stoffen, die een verschillend draaiend vermogen bezitten en een derde bezwaar is, dat ééne bepaling te veel tijd en oefening kost om eenigszins betrouwbaar genoemd te worden — argumenten op grond waarvan *L.* veronderstelt, dat de methode van *H. S.* nooit eene algemeene toepassing zal vinden. Dit heeft de geschiedenis der physiologische chemie dan ook bewezen; we zien, dat bij quantitatieve eiwitbepalingen de voorkeur aan de andere methoden wordt gegeven, totdat in 1880 *Léon Frédéricq* de methode van

---

1) *Dr. Paul Liborius.* Beiträge zur quantitativen Eiweissbestimmung. Deutsches Archiv für klinische Medicin, Bd. X, S. 319.

H. S. in eere trachtte te herstellen door ze toe te passen bij het bepalen van de hoeveelheid albuminoïden in 't bloedserum. *Frédéricq* kon zich namelijk door contrôleproeven van de waarde der circumpolarisatie overtuigen, daar toen de serumglobuline en serumalbumine afzonderlijk te isoleeren en dus quantitatief te bepalen waren [1]), en daar van beiden het specifiek draaiend vermogen bekend was. We komen hierop straks nader terug. We willen eerst nagaan wat bekend is van het specifiek draaiingsvermogen van serumglobuline. In navolging van *Dénis* [2]) verkreeg *L. Frédéricq* [3]) zijne serumglobuline oplossing door saturatie van bloedserum met NaCl of met $MgSO_4$; de gepraecipiteerde serumglobuline werd opgelost in gedistill. water, wat door het aanhangende zout gemakkelijk geschiedt. Deze praecipitatie door zout en oplossing in water werd 4 à 5 maal herhaald. Van 10 soms 20 cm^3 dezer aldus gezuiverde serumglobuline-oplossing werd door middel van den polaristrobometer van *Wild* het rotatievermogen bepaald. Als gemiddelde van 6 waarnemingen, waarvan het gemiddeld eiwitgehalte 4,2588 % was, verkreeg *Frédéricq* —47,8°. De hoeveelheid eiwit werd bepaald door een gedeelte der oplossing te doen coaguleeren door verwarming (met of zonder toevoeging van alkohol); nadat, door uitloogen, de zouten zooveel mogelijk verwijderd waren, werd van het eiwitgehalte het aschgehalte afgetrokken.

---

1) Ueber die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfates zur Trennung und quantitativen Bestimmung von Serumalbumin und Globulinen. *Olof Hammarsten.* Zeitschrift für Phys. Ch. Bd. S. 467.

2) Memoire sur le sang. 1859. pag. 184.

3) Recherches sur les substances albuminoïdes du serum sanguin par *Léon Frédéricq.* Archives de Biologie, tome I, pag. 457.

De vrij zuivere oplossing der serumglobuline, de niet onbelangrijke draaiing (gemiddeld —2,4°), de overeenstemmende resultaten in verband met het zeer uiteenloopend gehalte aan eiwit (1,739—11,3177 %) waarborgen de betrouwbaarheid om —47.8° als het specifiek draaiingsvermogen van serumglobuline in eene zwakke zoutsolutie aan te nemen.

Een enkele opmerking zou ik hieraan willen toevoegen. *Frédéricq* deed het eiwit coaguleeren en trok, na het ingedampt te hebben, het coagulum met gedistill. water uit. Beter zou het geweest zijn, zoo hij het coagulum eerst verkoold en dáárna herhaaldelijk met kokend water uitgeloogd had, daar in dit geval het zout beter geëxtraheerd was. *Frédéricq* vindt daarom een te hoog eiwitgehalte, 't gevolg hiervan is, dat zijne gevonden waarde voor $[\alpha]_D$ iets te klein is. Eene andere bedenking is: dat het serumglobuline uit het bloedserum verkregen nooit zuiver, doch steeds verontreinigd is met lecithine of fibrineferment [1]), dus met twee stoffen, die eveneens het polarisatievlak naar links draaien. Beter zou het geweest zijn, zoo hij zijne serumglobuline-oplossing bereid had uit fermentvrije transsudaten, bv. uit hydrocele-vloeistof, waaruit *Haas* zijne oplossingen bereidde.

In eene „voorloopige mededeeling" van *Mörner* [2]) die noch door hemzelven, noch door anderen uitgewerkt of bevestigd is geworden, zien we, dat uit de serum-

---

1) *Olof Hammarsten.* Lehrburch der phys. chemie, 3te Aufl., S. 105.

2) Reducirende Substanz aus dem Globulin des Blutserums. Originalmittheilung von *K. A. H. Mörner* (Centralbl. f. Phys. 1893, N°. 20, S. 581).

globuline door koken met een verdund mineraal zuur een stof verkregen wordt, die eene alkalische koperoplossing reduceert [1]). Of nu de serumglobuline een glucoproteïde of eene verbinding van een globuline en een glucoproteïde is, is nog geheel onzeker. In het laatste geval moet de serumglobuline als een complex van minstens twee eiwitstoffen beschouwd worden en heeft het sp. draaiend vermogen van serumglobuline, dat *Frédéricq* vond, slechts eene betrekkelijke waarde. Bij den vooruitgang der analytische chemie kan dit het lot zijn van vele stoffen, die tot nu toe als stoffen sui generis beschouwd zijn (o. a. fibrinogeen).

Zoolang echter de ontdekking van *Mörner* nog geene bevestiging gevonden heeft, en de fouten, bij de waarnemingen van *Frédéricq* aangetoond, zoo gering zijn, mogen we veilig voor $[\alpha]_D$ van de serum-globuline —47,8° aannemen.

De tweede eiwitstof van het bloed, die we met 't oog op het specifiek draaiend vermogen wenschen te bespreken, is de serumalbumine. Zooals we hierboven zagen (pag. 27) meende *Hoppe-Seyler*, toen hij den polarisator dienstbaar wilde maken tot het quantitatief bepalen van eiwit, dat de dierlijke vloeistoffen, die hij voor dit doel onderzocht, als eiwitstof serumalbumine bevatten. De later gebleken foutieve onderstelling, dat het eiwit zijner oplossingen alleen albumine was, geven aan zijne gevonden waarde voor $[\alpha]_D$ —56° slechts eene historische beteekenis.

---

1) Ook andere eiwitstoffen o a. serumalbumine (paard) en fibrinogeen (paard) werden op deze eigenschap onderzocht, doch met een negatief resultaat.

Evenals *Liborius* kwam ook *Heynsius* [1]) tot de overtuiging, dat van deze optische eigenschap geen gebruik mocht gemaakt worden tot het quantitatief bepalen van eiwit, doch wél om den aard der eiwitverbindingen te leeren kennen. *Heynsius* nam daartoe, met samenwerking van de H.H. *van Leeuwen* en *Kolff*, een tweetal experimenten om het draaiend vermogen van onveranderd koe- en paardenserum te bepalen; zij vonden —51,3° en —49,5°.

Daar deze proeven genomen zijn met oplossingen die nog een andere eiwitstof dan serumalbumine bevatten, hebben de resultaten slechts in zooverre waarde voor het te behandelen vraagstuk, dat *Heijnsius* uit deze proeven de conclusie trok, dat de door *H. S.* gevonden waarde voor het specifiek draaiingsvermogen van serumalbumine te hoog is.

Hoewel de korte mededeeling van *Heijnsius* slechts eene voorloopige was, is van zijne hand sedert dien tijd niets meer over dit onderwerp gepubliceerd.

Eenige jaren later is door *Hermann Haas* [2]) het sp. draaiingsvermogen bepaald eener serumalbumine-oplossing, die op de volgende wijze bereid werd. Bij 15 liter ascitesvloeistof werden 10 volumina water gevoegd en hierdoor werd koolzuur gevoerd. De vloeistof werd gefiltreerd, en door haar te laten bevriezen, gebracht op een volume van 300 cm³.

---

1) Over het soortgelijk draaiingsvermogen van eiwitverbindingen *A. Heynsius*. Onderzoekingen gedaan in het physiologisch laboratorium der Leidsche Hoogeschool. Derde deel, pag. 206.

2) Ueber das optische und chemische Verhalten einiger Eiweisssubstanzen, ins besondere der dialysirten Albumine von *Dr. Hermann Haas*. Archiv für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere. Bd. XII. 1876.

De serumalbumine-oplossing wordt daarna gedialyseerd om ze zoo arm mogelijk aan zout te maken. Met den polaristrobometer van *Wild* deed *Haas* een drietal waarnemingen, waarvan er een —56° en de twee anderen —62° opleverden.

Het gering aantal waarnemingen in verband met de uiteenloopende resultaten, stemt ons tot voorzichtigheid eene gevolgtrekking uit de gevonden waarden te maken, temeer daar *Haas* zelf er bij opmerkt, dat de drie oplossingen zich verschillend tegenover water en zuren gedroegen, dus niet aan elkaar gelijk waren [1]).

Evenals voor de serumglobuline zijn ook door *Frédéricq* [2]) betrouwbare bepalingen voor de serumalbumine verkregen. Hij bereidde zijne oplossingen op de volgende wijze: bloedserum van 't paard wordt door verzadiging met magnesiumsulfaat bevrijd van paraglobuline; de gefiltreerde vloeistof wordt tot 40 à 50° C. verwarmd, bij welke temperatuur de grootste hoeveelheid serumalbumine neerslaat, maar de oplosbaarheid in water en zwakke zoutoplossingen behoudt. Nadat de serumalbumine in water opgelost is, wordt deze zuivering 4 à 5 maal herhaald. Uit drie bepalingen verkreeg *Frédéricq* als gemiddelde voor $[\alpha]_D$ van de serumalbumine van het paard —57,3°.

Het bleek, dat bij de methode, die *Frédéricq* gebruikte tot het maken zijner serumalbumine-oplossing steeds serumglobuline in oplossing bleef, daarom bereidde *Starke* [3]), die dezelfde experimenten herhaalde, zijne oplossingen als volgt: uit serum van het paard en uit

---

1) l. c. pag. 404.

2) Archives de Biologie, tome I.

3) *Starke*. Maly's Jahresbericht f. Thierchemie, 1881.

hydrocele-vloeistof wordt door verzadiging met $MgSO_4$ bij 30° C. de paraglobuline verwijderd; uit 't filtraat wordt de serumalbumine door verzadiging met Na_2SO_4 bij 40° C. gepraecipiteerd en gefiltreerd, waarna het praecipitaat wordt opgelost in water. Deze bewerking wordt 3 à 4 maal herhaald, na de laatste zuivering wordt de oplossing gedialyseerd. Met den polaristrobometer van *Wild* vond *Starke* voor de draaiing van serumalbumine uit een transsudaat van den mensch —62,6° à 64,59° en voor serumalbumine van het paardenbloed —60,05°.

De resultaten, waartoe *Starke* komt, doen *Hammarsten* [1]) vermoeden, dat de albumine uit de hydrocele-vloeistof niet identisch is met die uit het paardenbloedserum, vooral daar beide eiwitstoffen een verschillend zwavelgehalte bezitten [2]).

We toonden aan (pag. 27), hoe de quantitatieve bepaling van eiwitstoffen door middel van de circumpolarisatiemethode van *Hoppe-Seyler* o. a. door *Liborius* is afgekeurd en sedert dien tijd bijna geheel in de vergetelheid is geraakt. Nadat het echter mogelijk was geworden zuivere serumglobuline- en serumalbumineoplossingen te verkrijgen, en nadat van beide stoffen de specifieke draaiing bepaald was, trachtte *Frédéricq* na te gaan of de draaiing veroorzaakt door de twee serumeiwitstoffen gelijk was aan de som der draai-

1) *Maly's* Jahresbericht ueber die Fortschritte der Thier-Chemie Bd. XI, S. 19.

2) Waar *Hammarsten* in Bd. XI van *Maly's* Jahresbericht de studie van *Starke* refereert, deelt hij eenige analysen mede van beide soorten van albumine. Een tweetal S-bepalingen van serumalbumine van 't paard leverde gemiddeld 1,79 %. Drie S-bepalingen van serumalbumine van den mensch gaven gemiddeld 2,28 %.

ingen welke teweeggebracht worden door de serumglobuline en serumalbumine, wier quantiteit door praecipitatie bepaald was.

Dit bleek vrijwel het geval te zijn. Drie experimenten met serum van 't rund, paard en konijn gaven door middel van circumpolarisatie 7,407, 8.49 en 5,478 gr. per 100 cm^3 serum, terwijl door middel van praecipitatie met alcohol rep. 7,4275, 8,5776 en 5,35 gr. gevonden werd. De circumpolarisatiemethode was door *Frédéricq* weer in eere hersteld en „la methode imaginée par *Hoppe-Seyler* ne mérite plus le discrédit, où elle était tombée" [1]).

Evenals *Frédéricq* dit gedaan had voor het serum van 't paard, rund en konijn, wilde hij ook door circumpolarisatie de hoeveelheid albuminoïden van hondenbloedserum bepalen [2]). De contrôleproeven door praecipitatie met alcohol leverde een hooger gehalte aan eiwit dan de bepalingen door circumpolarisatie verkregen. Nadat hij zich er van overtuigd had, dat geene dextrogyre stoffen aanwezig waren, bleek de onderstelling juist, dat de serumalbumine van hondenbloed niet identisch was met die, welke hij uit de andere bloedsoorten had bereid. De serumalbumine van hondenbloed was minder laevogyr, daar hij in plaats van —57,3° nu —44° kreeg als gemiddelde van vijf waarnemingen.

Substitueerde hij deze waarde (—44°) in plaats van (—57,3°) bij zijne quantitatieve eiwitbepalingen dan bleek, dat de circumpolarisatie-methode volkomen betrouwbaar was.

Vermeldden we, dat *Hammarsten* op grond zijner

---

1) l. c. pag. 471.

2) Maly's Jahresbericht f. Thier-Chemie. Band. X, S. 172.

S-bepalingen en op grond der waarnemingen van *Starke*, de serumalbumine van 't paard voor niet identisch hield met de serumalbumine van transsudaten van den mensch, de onderzoekingen van *Frédéricq* geven aan die meening een hechten steun, daar *Fr.* langs indirecten weg vond, dat het specifiek draaiingsvermogen van serumalbumine verschillend was van dat van de andere bloedsoorten, waarmee hij experimenteerde.

Het aannemen eener heterogeniteit tusschen de serumalbuminen van verschillende bloedsoorten is vooral belangrijk in verband met de nu volgende onderzoekingen over het sp. dr.vermogen der fibrinogene stof, die we nu als derde eiwitstof van het bloed zullen bespreken.

De eerste waarneming van het specifiek draaiend vermogen van fibrinogeen is verricht door *Hermann.* [1])

In aansluiting aan de onderzoekingen van *Hasebroek*, die waarnam, dat bij digestie van fibrine door trypsine een tweetal eiwitstoffen in oplossing overgingen, onderzocht *Hermann* welke die twee stoffen waren. Hij bevestigde de waarneming van *Otto*, dat de eiwitstof die bij 72—75° C. coaguleerde paraglobuline of een daarmee althans na verwante eiwitstof was. De bij 52—54° C. coaguleerende eiwitstof bleek de eigenschappen der globulinen te bezitten met de coagulatie-temperatuur van fibrinogeen en myosine.

Door middel van de optische eigenschap der eiwitstoffen trachtte *Hermann* uit te maken of het splitsingsproduct van fibrine identisch was met fibrinogeen of

---

1) Ueber die Verdauung des Fibrins durch Trypsin durch Dr. *August Hermann.* Zeitschrift f. phys. Chemie. Bd. XI, pag. 508.

met myosine dan wel als eene zelfstandige stof moest beschouwd worden. Het was hem onmogelijk de bij 55° C. coaguleerende stof van de andere eiwitstof te isoleeren daar òf beide eiwitstoffen praecipiteeren òf, als een der stoffen afzonderlijk neersloeg, deze hare oplosbaarheid verloor. Hij berekende daarom de specifieke draaiing door middel der circumpolarisatiemethode d. w. z. hij bepaalde eerst de draaiing en het eiwitgehalte der oplossing, die beide eiwitstoffen bevatten; verwarmde daarna de oplossing tot 60° C., filtreerde het coagulatie-praecipitaat af en bepaalde vervolgens weer de draaiing en het eiwitgehalte van het filtraat. Uit het verschil der beide waargenomene draaiingen en der waarden, welke hij voor het gehalte aan eiwit verkregen had, kon het specifiek draaiingsvermogen van de bij 52—54° C. coaguleerende eiwitstof berekend worden. Met het polarisatie-apparaat van *Lippich* deed hij twee experimenten, die de volgende resultaten opleverden.

I. vóór de coagulatie $[\alpha]_D = -0{,}7020°$,
na de coagulatie $[\alpha]_D = -0{,}5015°$,
eiwit op 100 dln. vóór de coagulatie 1,7479,
eiwit op 100 dln. na de coagulatie 1,2103.

De globuline-oplossing bevatte dus 0,5376 gram. org. stof op 100 cm³ met een draaiing van 0,2005°, waaruit men krijgt voor $[\alpha]_D$ —37,30°.

II. vóór de coagulatie $[\alpha]_D = 0{,}4115$,
na de coagulatie $[\alpha]_D = 0{,}175°$,
eiwit op 100 dln. vóór de coagulatie 4,3060,
eiwit op 100 dln. na de coagulatie 3,6614.

Uit deze gegevens krijgt men voor $[\alpha]_D$ —36,69°.

Voor het gemiddelde der beide waarnemingen, vindt *Hermann* dus voor $[\alpha]_D$, van de globuline in onderzoek

—37,0°. Ter vergelijking moest nu nog de specifieke draaiing van eene zuivere fibrinogeen-oplossing bepaald worden. Hij bereidde deze op de wijze, zooals ze door *Hammarsten* is aangegeven. Hoewel dit volgens zijne beschrijving met zeer veel moeilijkheden gepaard ging, gelukte het hem toch uit 20 à 30 liter paardenbloed, na drievoudige zuivering en na filtratie door dierlijke kool, eene volkomen heldere, in NaCl opgeloste fibrinogeen-oplossing te verkrijgen. Hij verkreeg $[\alpha]_D = -44,77°$. De oplossing bevatte 1,9209 gr. vaste stof en 1,5945 gr. zout. Bij de aschbepalingen, die parallel genomen zijn, heeft *Hermann* beide malen iets verloren, zoodat de gevonden hoeveelheid organische stof te hoog en dientengevolge de waarde voor het specifiek draaiingsvermogen van 't fibrinogeen uit 't paardenbloed iets te laag is berekend. Het resultaat van deze ééne waarneming is dus dat $[\alpha]_D > -44,77°$.

We zien dus, dat de sp. draaiing van de fibrinogeen-oplossing vrij aanmerkelijk verschilt van die van het digestie-product van fibrine en toch vindt *Hermann* een identiteit van beide stoffen waarschijnlijk.

De bepalingen van het draaiend vermogen van het verteringsproduct van fibrine hebben dus al zeer weinig waarde, daar *Hermann* vooreerst geen enkel bewijs levert, dat de globuline, die bij 52—54° C. stolt, fibrinogeen zou zijn (nergens komt H tot een stellige uitspraak) en ten tweede omdat de globuline-oplossing niet alle eigenschappen vertoont, die eene zuivere fibrinogeen-oplossing wel bezit (o. a. stolt zij niet na toevoeging van fibrineferment).

Een zevental jaren later werd door *Mittelbach* [1])

---

1) Zeitschrift f. phys. Chemie. Bd. XIX, S. 289.

het specifiek draaiingsvermogen van fibrinogeen onderzocht. Hij ontneemt aan de proeven van *Hermann* alle waarde, daar, volgens hem, vóór de ontdekking van *Arthus* (ontkalking), de methode om spontaan niet stollende fibrinogeen-oplossingen te bereiden onvoldoende was. Zoo dit het geval was, dan zou dit argument alleen kunnen gelden voor de derde zijner fibrinogeen-oplossingen, hoewel *Hermann* nooit eenige last van stolling ondervond.

Onzes inziens schrijft *Mittelbach* ten onrechte de andere waarde voor $[\alpha]_D$, die hij vindt voor 't fibrinogeen, hieraan toe; we zullen straks zien met welken anderen factor bij de bepaling van het specifiek draaiingsvermogen van de fibrinogene stof rekening moet gehouden worden. Evenals *Hermann* ging ook *Mittelbach* uit van paardenbloed, daar hieruit, door het snel en volledig zinken der bloedlichaampjes, het plasma het gemakkelijkst te verkrijgen was. Uitgaande van 10 à 20 liter, deed hij bij het verkregen plasma een gelijk volume verzadigde steenzout-oplossing, de drijvende fibrinogeen werd met de hand uit de vloeistof genomen, uitgeperst en in eene 2—3 % steenzout-oplossing opgelost. Deze bewerking werd 2 à 3 maal herhaald. Zoo noodig, dan werd de oplossing vóór de bepaling eerst gefiltreerd. De oplossing was meestal niet rijker dan 0,5 % aan fibrinogeen, een gehalte dat volgens *Mittelbach* niet grooter mag zijn, daar anders de opalescentie eene juiste waarneming onmogelijk maakt. De hoek van draaiing werd met een 2 dm. buis door middel van den polarimeter van *Lippich* bepaald; hiermee kon afgelezen worden tot eene nauwkeurigheid van 0,005°.

Mittelbach deed vier bepalingen, die opleverden voor $[\alpha]_D$ resp. —50,6°, —51,5°, —53,9°, —54,1°, voor het

eiwitgehalte 0,2048, 0,2886, 0,5322, 0,2914 % en voor het zoutgehalte 1,045, 1,141, 2,251, 2,409 %.

Nemen we van de drie serieën de gemiddelde, dan verkreeg hij voor de specifieke draaiing van fibrinogeen van paardenbloedplasma —52,5° met een eiwitgehalte van 0,329 % en een aschpercentage van 1,711. Een belangrijk verschil dus met de waarnemingen van *Hermann*. Hoewel om de bovengenoemde redenen weinig waarde aan de bepalingen van *H.* mag toegekend worden, is het verschil toch zoo groot, dat ik meende, dat een nader onderzoek gewenscht was, vooral omdat het fibrinogeen van runderbloed nog niet op die eigenschap onderzocht was.

Het runderfibrinogeen werd op de beschreven wijze (pag. 15) bereid. Met een gedeelte der oplossing werd steeds gedurende 12 uur bij 37° C. met $CaCl_2$ gereageerd; was de reactie negatief, dan werd de oplossing, even voordat zij aan de proef onderworpen werd, gefiltreerd. De opalescentie van de oplossing was meestal zoo sterk, dat ik, den polarimeter van Laurent gebruikende, de volle lichtsterkte moest aanwenden om de twee helften van het gezichtsveld even sterk verlicht te zien. De kleinste buis, die mij ten dienste stond, was 2 dm. lang. Ter bepaling van den draaiingshoek werd de buis eerst gevuld met gedistilleerd water om het 0-punt vast te stellen; vervolgens werd de buis met de te onderzoeken vloeistof gevuld en werden, mede door een assistent, een viertal aflezingen verricht, waarvan het gemiddelde genomen werd.

Om het gehalte aan zout en organische stof te bepalen werd de volgende weg ingeslagen: van de heldere, gefiltreerde oplossing werden 50 cm^3 in eene platinaschaal op een waterbad uitgedampt, vervolgens zoolang

verhit bij 110° C., totdat het gewicht constant bleef. Daarna werd de inhoud der schaal voorzichtig verkoold en het zout door water uitgeloogd; dit water, dat door een aschvrij filter werd gefiltreerd om het verkoolde eiwit terug te houden, was soms kleurloos, meestal echter eenigszins lichtbruin gekleurd. Het filter en 't verkoolde eiwit werden in de platinaschaal verbrand. Vervolgens werd in dezelfde platinaschaal het water, dat de uitgeloogde zouten bevatte, uitgedampt en werd de schaal zoodanig verhit, dat zij nauwelijks rood werd. Het gewicht der uitgedampte fibrinogeen-oplossing, verminderd met het gewicht dat de zouten opleverde, geeft ons het gewicht aan eiwit per 50 cm³ der fibrinogeen-oplossing.

In de volgende tabel geeft de eerste rubriek aan de hoeveelheid eiwit in 100 cm³, de tweede het zoutpercentage der oplossing, de derde de waargenomen draaiing en de vierde de gevonden waarde voor het specifiek draaiingsvermogen.

	eiwit	zout	waargenomen draaiing	$[\alpha]_D$
1	0,426 gr.	1,362 %	—18′	—35,2°
2	0,4144 „	1,752 „	—18′	—36,19°
3	0,3178 „	1,415 „	—14′	—36,5°
4	0,2646 „	1,819 „	—12′	—37,7°

Het gemiddelde der vier bepalingen is dus —36,8° terwijl *Mittelbach* —52,5° vond. Daar mijne wijze van waarnemen geheel analoog is met die van *Mittelbach*, is het niet onmogelijk dat het aanmerkelijk verschil aan het verschil in herkomst van het fibrinogeen toe te schrijven is; hij toch ging uit van paardenbloed en mijne experimenten zijn met runderbloed genomen. Om

dit vermoeden te toetsen vond ik het wenschelijk ceteris paribus een proef met paardenbloed-fibrinogeen te verrichten. Ook hier ging ik uit van slechts 3 liter paardenbloed, dat in kalium-oxalaat was opgevangen. De bereiding der zuivere fibrinogeen-oplossing had plaats op dezelfde wijze als die van runderbloed-fibrinogeen. Nadat, na de laatste zuivering, de oplossing gefiltreerd was, bleek, dat de heldere fibrinogeen-oplossing veel minder opalesceerend was dan de runderfibrinogeen-oplossing, zoodat de bepaling met eene geringe lichtsterkte kon plaats hebben. In tegenstelling van de runderfibrinogeen-oplossing kon de vloeistof, waarin zich het paardenfibrinogeen bevond, langer blijven staan zonder dat de fibrinogene stof zich aan het glas afzette,

Een ander verschil is gelegen in de wijze, waarop het fibrinogeen uit zijne oplossing praecipiteert; het paardenfibrinogeen is veel geleiachtiger dan het runderfibrinogeen, terwijl het eerste spoediger en in relatief grootere hoeveelheid in gedist. water oplost.

Het eiwit- en zoutgehalte der oplossing werd op dezelfde wijze bepaald als bij de andere bepalingen.

We laten het resultaat hier volgen:

eiwit	zout	waargenomen draaiing	$[\alpha]_D$
0,808 gr.	3,7442 %	—49′	—50,5°

Zooals we zagen kreeg *Mittelbach* —52,5° als gemiddelde van vier bepalingen, waarvan de laagste —50,6° was, zoodat de overeenstemming voldoende is om de techniek der proefneming buiten rekening te laten bij de beoordeeling der gevonden waarden.

Opmerkenswaard is hier het verschil in eiwitgehalte. Terwijl *Mittelbach* gemiddeld 0,3292 % eiwit krijgt en zelfs den raad geeft geen sterkere oplossing te nemen dan 0,5 %, daar anders de opalescentie te sterk en de draaiingshoek dus te onzeker te bepalen is, hebben we hier eene oplossing van 0,808 %, die, vooral in vergelijking met de runderfibrinogeen-oplossing, zeer weinig opalesceert en wier draaiingshoek met geringe lichtsterkte te meten was.

Daar ik, om eene zoo zoutarm mogelijke fibrinogeen-oplossing te verkrijgen, bij de laatste praecipitatie de fibrinogene stof eerst in gedistilleerd water afwaschte en dan in gedistilleerd water oploste, en daar het afspoelwater steeds vrij sterk opalesceerde, hoe kort de fibrinogene stof er ook in was, is het wel mogelijk, dat dit van eenigen invloed is geweest.

Het zoutgehalte mijner oplossing is nagenoeg in evenredigheid met dat der oplossing van *Mittelbach*.

Uit het voorafgaande blijkt voldoende, dat de twee fibrinogeen-oplossingen zoowel chemisch als physisch verschillende eigenschappen vertoonen. We zijn dan ook geneigd, evenals wij dit gedaan hebben voor de serumalbumine-oplossingen, afkomstig van verschillende dieren, ook voor fibrinogeen-oplossingen aan te nemen, dat er tusschen 't fibrinogeen van 't paard en 't rund een specifiek verschil bestaat.

Met een enkel woord willen we terugkomen op de experimenten van *Hermann* over het specifiek draaiingsvermogen van 't verteringsproduct van fibrine. Hij vond voor $[\alpha]$ van 't digestieproduct $-37{,}0^\circ$, en het gemiddelde mijner bepalingen was $-36{,}8^\circ$ eene merkwaardige overeenstemming dus.

Hoewel de oplossing van 't digestieproduct niet alle

eigenschappen bezit, welke aan eene zuivere fibrinogeen-oplossing moeten gesteld worden, wijst toch de overeenkomst in draaiingsvermogen en in stollingstemperatuur wel op verwantschap van dit product met de fibrinogene stof. Uit zijne verhandeling blijkt nergens van welk dier zijne fibrine afkomstig is, en daar runderfibrine 't gemakkelijkst in groote hoeveelheid is te verkrijgen, is het alleszins waarschijnlijk, dat hij runderfibrine gebruikt heeft; dit is daarom des te waarschijnlijker, omdat hij bij het bereiden zijner zuivere fibrinogeen-oplossing wel vermeldt, dat hij paardenbloed als materiaal gebruikte.

In hoofdstuk I en II hebben we gemeend op grond der chemische reacties en der elementair analysen de identiteit van thrombosine met fibrinogeen te moeten aannemen. Nu wij in dit hoofdstuk gezien hebben, dat niet alleen verschillende soorten van eiwitstoffen, doch zelfs eiwitstoffen, die tot één groep behooren onderling een verschillend draaiend vermogen bezitten, vond ik het zeer gewenscht de door *Lilienfeld* ontdekte eiwitstof met het oog op die eigenschap te onderzoeken. Is thrombosine werkelijk 't zelfde als fibrinogeen, dan moet, zoo beide eiwitstoffen aan één bloedsoort ontleend zijn, de thrombosine-oplossing in Na_2CO_3 dezelfde waarde voor $[\alpha]_D$ opleveren als de fibrinogeen-oplossing in Na_2CO_3. 't Is immers een bekend feit [1]), dat het

---

1) Zie Archiv für die ges. Physiologie d. M. u. d. Th. Bd. XII, S. 378.

oplossingsmiddel een invloed uitoefent op het draaiend vermogen, zoodat ik de resultaten, verkregen met de thrombosine-oplossing in Na_2CO_3 niet kon vergelijken met mijne gevonden waarde voor het draaiingsvermogen van eene fibrinogeen-oplossing in zwakke keukenzoutsolutie; daarom bereidde ik tevens eene fibrinogeen-oplossing in Na_2CO_3 van dezelfde sterkte.

De thrombosine-oplossing in 0,1 % Na_2CO_3 werd op dezelfde wijze verkregen als we op pag. 23 beschreven hebben. De fibrinogeen-oplossing in Na_2CO_3 werd bereid als volgt: uit een driemaal gezuiverde fibrinogeen-oplossing werd het fibrinogeen gepraecipiteerd door een gelijk volume gesatureerde keukenzoutoplossing. Het gepraecipiteerde fibrinogeen werd afgewasschen in gedistilleerd water en bij gedeelten opgelost in 0,1 % Na_2CO_3. Beide oplossingen kunnen in vergelijking met eene fibrinogeen-oplossing in zwakke zoutsolutie langen tijd blijven staan, voordat ze troebel wordt. De lichtblauw opalesceerende vloeistoffen werden, voordat ze in de 2 dm. buis van den polarimeter werden gebracht, eerst gefiltreerd, daar steeds eenige stukjes eiwitstof onopgelost bleven.

We zullen hier, met dezelfde indeeling als bij de fibrinogeen bepalingen, onze resultaten laten volgen:

Fibrinogeen.

	eiwit	zout	waargenomen draaiing	$[\alpha]_D$
1	0,4814 gr.	1.7876 %	—27′	—46,7°
2	0,2246 „	1,3414 „	—12′	—44,5°
3	0.4004 „	1,6106 „	—22′	—45,7°
4	0,5918 „	2,284 „	—32′	—45,06°

Thrombosine.

	eiwit	zout	waargenomen draaiing	$[\alpha]_D$
1	0,2884 gr.	0,143 %	—16′	—46,2°
2	0,4084 „	0,206 „	—22′	—44,8°
3	0,5898 „	0,223 „	—32′	—45,2°
4	0,4872 „	0,2356 „	—27′	—46,1°

Voor de fibrinogeen-oplossing in Na_2CO_3 vinden we dus —45,4° en voor de thrombosine-oplossing —45,5°. Deze treffende overeenstemming in eene physische eigenschap als 't draaiend vermogen is, bevestigt de opvatting, dat de zoogenaamde thrombosine niets anders is als fibrinogeen. Het gemiddeld eiwitgehalte op 100 deelen fibrinogeen en thrombosine-oplossing in Na_2CO_3 is nagenoeg 't zelfde, ze staan tot elkaar als 0,4245 : 0,4434.

Het zoutgehalte toont echter een zeer belangrijk verschil; vinden we gemiddeld voor de thrombosine-oplossing slechts 0,2019, voor de fibrinogeen-oplossing is het 1,7309 gram op 100 dln. der oplossing. Dit groote verschil bevestigt dus duidelijk ons vermoeden (pag. 13), dat de reactie, die 't azijnzuur in eene zuivere fibrinogeen-oplossing teweeg brengt, bestaat in het praecipiteeren der fibrinogene stof zóódanig, dat zoo weinig mogelijk zout wordt medegenomen.

NASCHRIFT.

Nauwelijks was de beschrijving mijner onderzoekingen voltooid, of eene verhandeling van *Olof Hammarsten*, getiteld: „Ueber die Bedeutung der löslichen Kalksalze für die Faserstoffgerinnung" verscheen in de laatste aflevering van het „Zeitschrift für phys. Chemie" [1]).

Zooals de titel reeds aanwijst, behandelt *Hammarsten* in deze studie voornamelijk de vraag in hoeverre en op welke wijze de kalkzouten voor de fibrinevorming noodig zijn. De resultaten zijner experimenten waren niet in overeenstemming te brengen met de theorie van *Lilienfeld*, die, de werking van 't fibrineferment bij de stolling van het bloed ontkennende, de fibrine beschouwt als eene kalkverbinding van thrombosine.

Hammarsten meent op grond van de oplosbaarheid der thrombosine-kalk in overmaat van $CaCl_2$ en in NaCl, en op grond, dat gedialyseerd fibrinogeen ook na oplossing in alkali met kalk een geleiachtig praecipitaat geeft, en dat, door keukenzout te voegen bij eene thrombosine-oplossing in Na_2CO_3, de praecipitatie door toevoegen van kalk verhinderd wordt, dat throm-

1) Bd. XXII, Heft 4 u. 5.

bosine hetzelfde is als fibrinogeen. Dat kalk de zoogenaamde thrombosine praecipiteert, wordt ook volgens *Hammarsten* veroorzaakt, doordat in de oplossing te weinig keukenzout aanwezig is. Voorzoover *Hammarsten* de thrombosine bespreekt, komt hij dus op grond der chemische reacties, die ik in hoofstuk I beschreven heb, tot dezelfde conclusie als ik.

STELLINGEN.

I.

De door *Edinger* ontwikkelde theorie omtrent slijtage van het zenuwstelsel is alleen toepasselijk op de beroepsneurosen.

II.

Vooral wat de organo-therapie (suppletie-therapie) betreft, gaat de praktijk de wetenschap te ver vooruit.

III.

De urethritis gonorrhoïca behandele men volgens de methode van *Janet* met uitspoelingen van permanganas kalicus.

IV.

Operatief ingrijpen bij tuberculeuse coxitis is alleen geoorloofd in de zwaartste gevallen, en indien functioneele stoornissen zijn ontstaan tengevolge van vergroeiingen.

V.

Bij de operatieve behandeling der trigeminus-neuralgie is de intracranieele methode van *Krause* te verkiezen boven de methode van *Thiersch*.

VI.

De meening van *Aeby*, dat de arteria pulmonalis een beslissenden invloed uitoefent op den vorm van den bronchiaalstam is onjuist.

VII.

In 't algemeen is bij de vaginale uterus-exstirpatie de ligatuur boven de forcipressuur te verkiezen.

VIII.

De ruptura perineï complicata moet volgens de methode van *Lawson-Tait* behandeld worden.

IX.

Ten onrechte wordt de retinitis proliferans als eene modificatie der retinitis haemorrhagica beschouwd.

X.

Keratitis interstitialis is geen bewijs van congenitale lues.

XI.

Het specifiek draaiingsvermogen van fibrinogeen is afhankelijk van de diersoort.

XII.

De fibrine van *Lilienfeld* is eene kalkverbinding van fibrinogeen.

XIII.

De veelkernige reuzencellen van het beenmerg dragen ten onrechte den naam van osteoklasten.

XIV.

De lymph wordt gevormd door filtratie en niet door secretie.

XV.

Woronin schrijft aan de tactiele gevoeligheid der leucocyten een veel te groote beteekenis toe.

XVI.

Ten onrechte verklaart *Metschnikoff* de ontsteking geheel en al door het verschijnsel der phagocytose.

XVII.

Elk medicus ijvere in zijne omgeving voor verplichte keuring van alle vee, dat voor de con-

sumptie gebruikt wordt; de keuring, zooals ze nu geschiedt, is onvoldoende.

XVIII.

De voorziening in de behoefte aan geneeskundige hulp op het platte land zal 't beste geschieden door eene reorganisatie in de akademische opleiding, waarbij theorie en praktijk scherper gescheiden worden.
