



De eiwitstoffen der glandula thymus

<https://hdl.handle.net/1874/253328>

A 40192

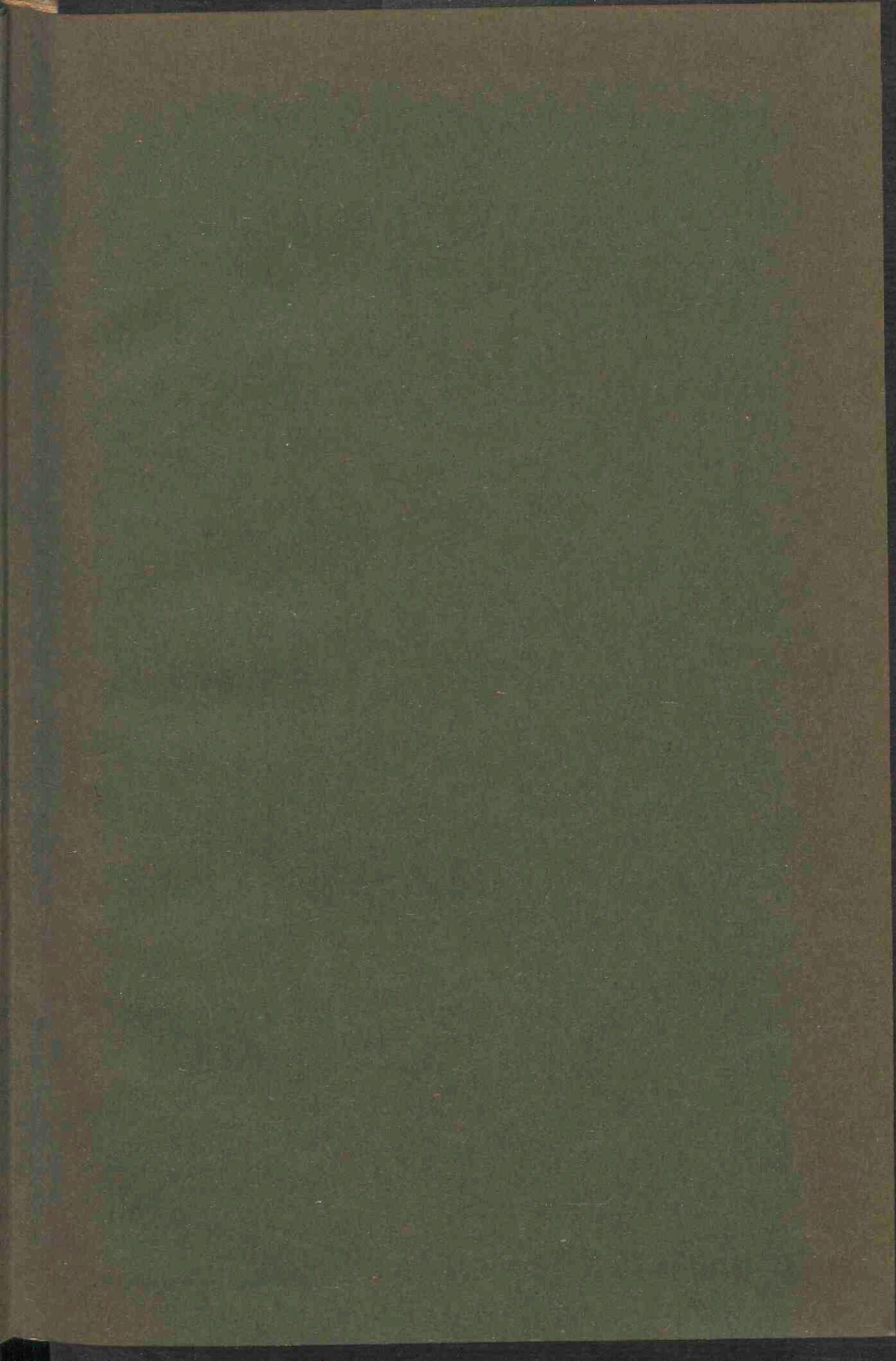
Med. 21 Dec 1900

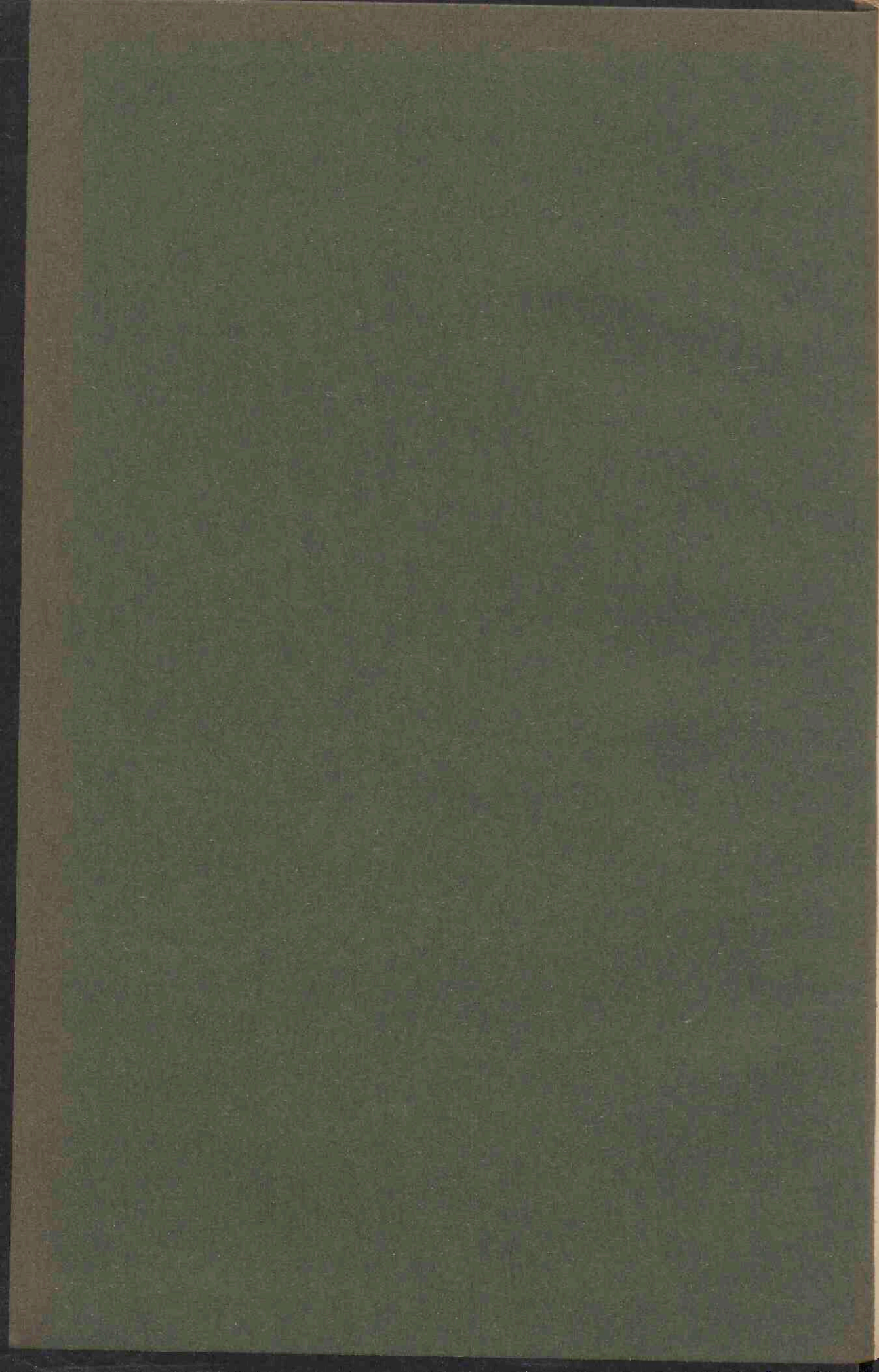
W. HUISKAMP.

DE EIWITSTOFFEN
DER GLANDULA THYMUS.

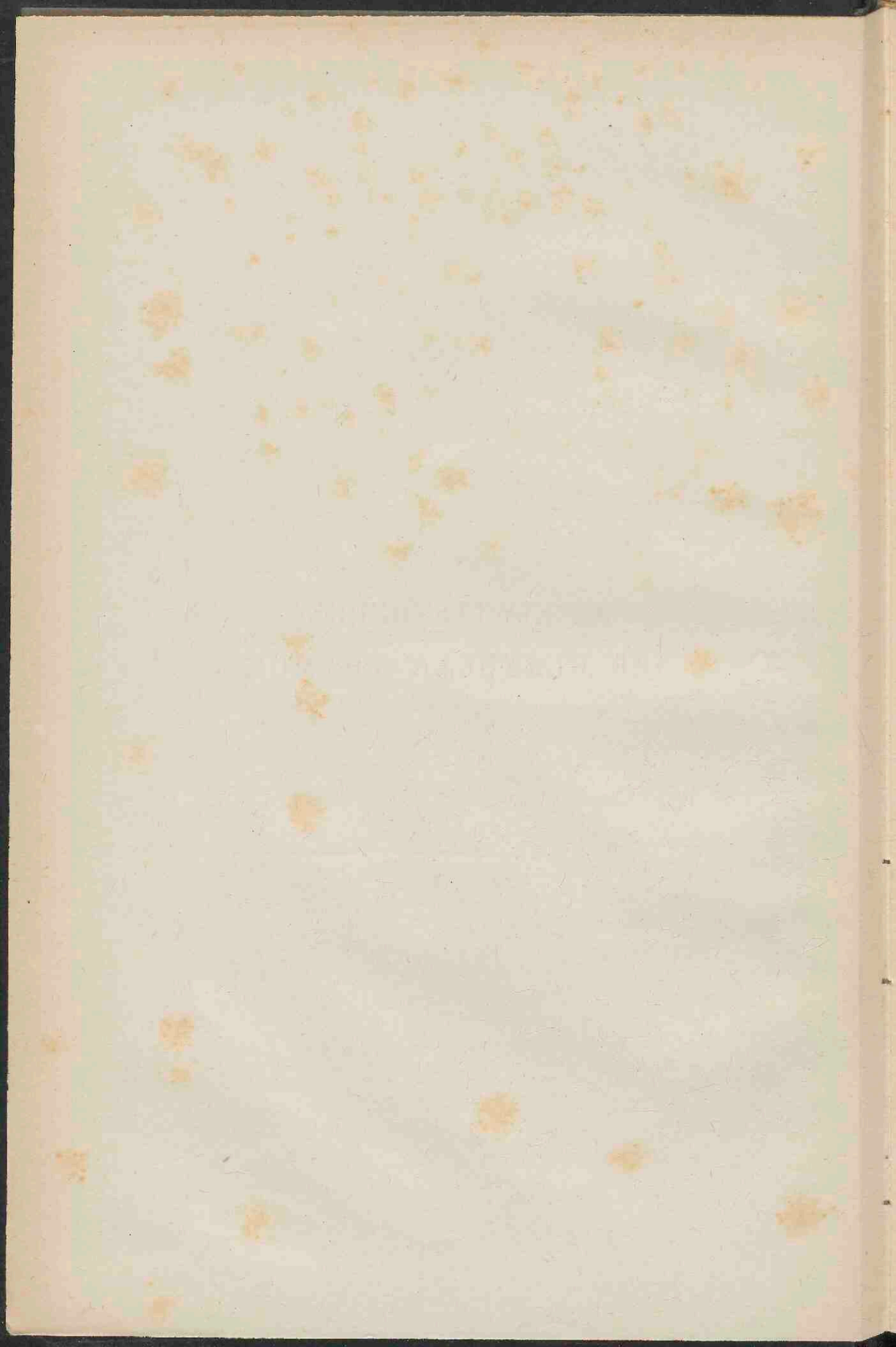
UTRECHT
C. H. E. BREIJER
1900.

A. qu.
192





DE EIWITSTOFFEN
DER GLANDULA THYMUS.



DE EIWITSTOFFEN
DER GLANDULA THYMUS.

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

Doctor in de Geneeskunde

aan de Rijks-Universiteit te Utrecht,

NA MACHTIGING VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

Dr. W. KAPTEIJN,

Hoogleeraar in de Faculteit der Wis- en Naturkunde,

VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT

TEGEN DE BEDENKINGEN VAN

DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE

TE VERDEDIGEN

op *Vrijdag 21 December 1900,*

des namiddags te 2 uren,

DOOR

WILLEM HUISKAMP,

geboren te Eerbeek.



UTRECHT

C. H. E. BREIJER

1900.

PROEFSCHEIJT
VAN DE
PROFESSOR

DE RECHTEN IN DE
GEGENSTANDEN

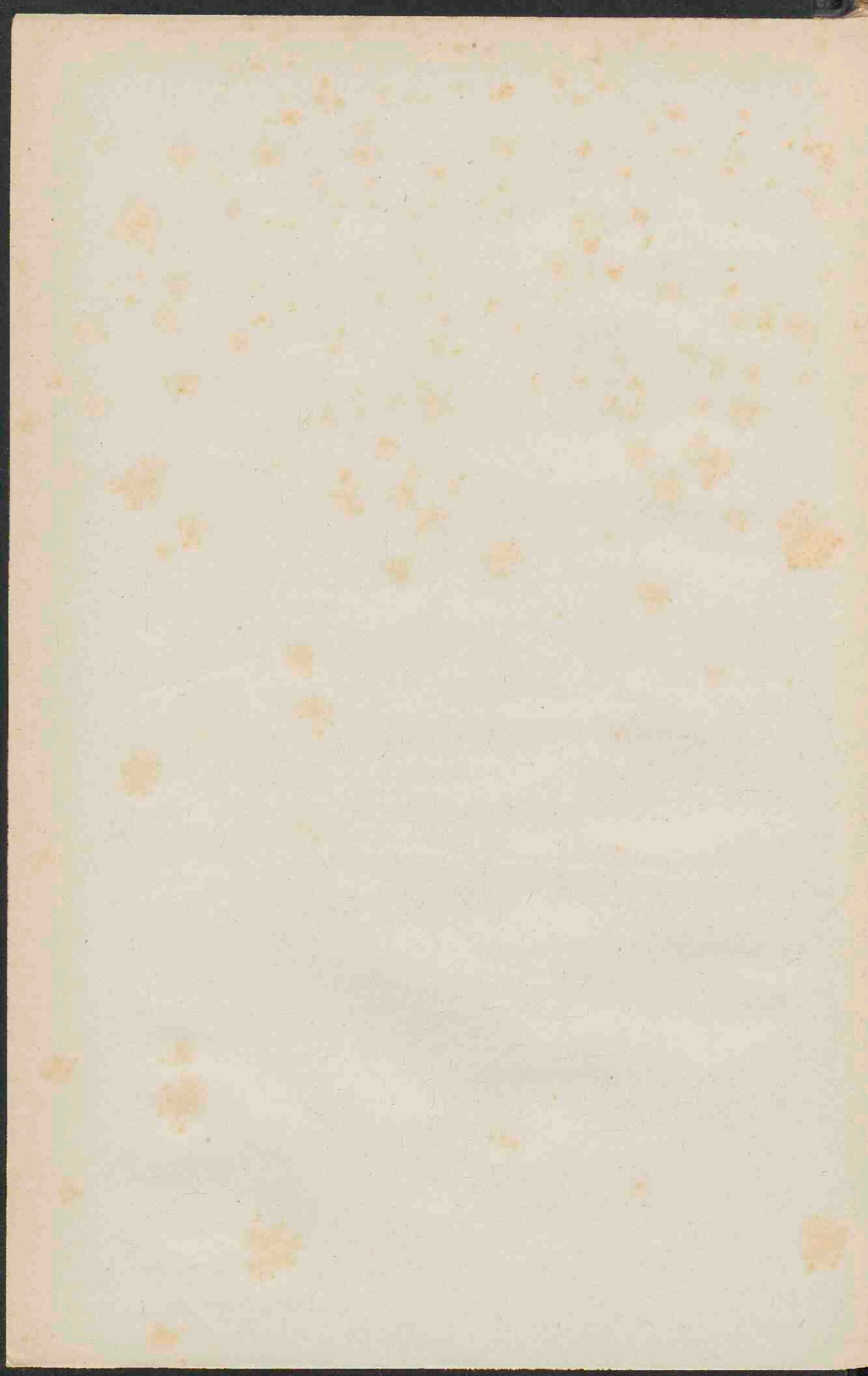
DE RECHTEN IN DE
GEGENSTANDEN

DE RECHTEN IN DE
GEGENSTANDEN



WILHELM HUBER

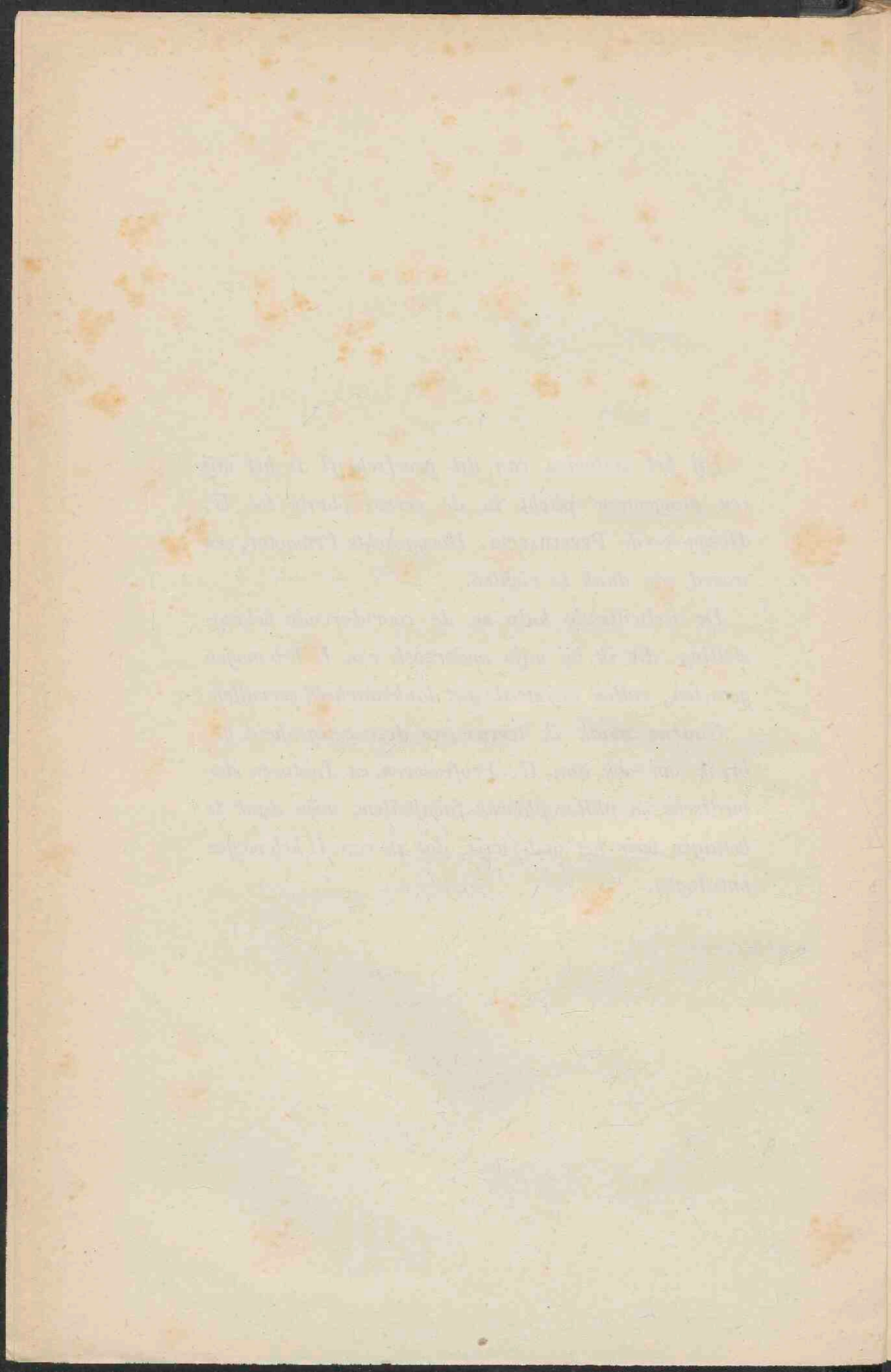
Aan mijn vader.



Bij het voltooien van dit proefschrift is het mij een aangename plicht in de eerste plaats tot U, Hooggeleerde PEKELHARING, Hooggeachte Promotor, een woord van dank te richten.

De welwillende hulp en de voortdurende belangstelling, die ik bij mijn onderzoek van U heb mogen genieten, zullen mij steeds met dankbaarheid vervullen.

Gaarne maak ik tevens van deze gelegenheid gebruik om ook aan U, Professoren en Lectoren der medische en philosophische faculteiten, mijn dank te betuigen voor het onderwijs, dat ik van U heb mogen ontvangen.



INLEIDING.

Door de onderzoekingen aangaande de stolling van het bloed, in de eerste plaats die van *Wooldridge*, is de aandacht gevestigd op de eiwitachtige bestanddeelen van de thymusklier. Men vond, dat uit dit orgaan, door uittrekken met water, eene groote hoeveelheid eiwit verkregen kon worden, dat, door azijnzuur neergeslagen, althans in hoofdzaak tot de groep der Nucleoproteiden bleek te behooren.

Lilienfeld ¹⁾ heeft deze eiwitstoffen nader onderzocht en kwam tot het besluit, dat verreweg het grootste deel daarvan bestond uit een nucleoproteide, waaraan hij den naam gaf van nucleohiston. Daarnaast vond hij nog een ander nucleoproteide, dat, in tegenstelling met het nucleohiston, gemakkelijk oplosbaar bleek te zijn in verdunde zuren. Een ander verschil tusschen deze twee stoffen vond *Lilienfeld* hierin, dat, terwijl het laatstgenoemde nucleoproteide eerst door de werking van pepsine en zoutzuur in eiwit en nucleine gesplitst wordt, deze splitsing bij het nucleohiston reeds door verdund zoutzuur alleen bewerkstelligd wordt. Hier wordt dus de verandering van de eiwitcomponent door pepsine vermeden.

Bij de splitsing met verdund zoutzuur blijft de nucleine onopgelost en gaat de eiwitcomponent in oplossing over.

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. XVIII, S. 473.

Dit eiwit kan dan door toevoeging van ammoniak tot alkalische reactie, worden neergeslagen; hierin en ook in andere eigenschappen, o. a. de elementaire samenstelling, vertoonde het overeenkomst met het door *Kossel* in het stroma van de roode bloedlichaampjes van de gans ontdekte histon. *Lilienfeld* beschouwde daarom het genoemde eiwit als een histon en gaf aan het nucleoproteide, waaruit het verkregen werd, den naam nucleohiston.

Het nucleohiston werd door *Lilienfeld* bereid door de thymus fijn te hakken en met water te extraheeren, waardoor het eiwit in oplossing overgaat; uit dit waterig extract, dat door filtreeren van vaste bestanddeelen bevrijd werd, kon vervolgens het nucleohiston door middel van azijnzuur worden neergeslagen. Voor verdere zuivering werd dit neerslag opgelost in water met een weinig natriumcarbonaat en weer gepraecipiteerd met azijnzuur.

De eigenschappen van het nucleohiston zijn volgens *Lilienfeld* de volgende: het is onoplosbaar in benzol, aethyl- en methylalcohol, chloroform, aether en azijnzuur; oplosbaar in ijsazijn, geconcentreerd zoutzuur en salpeterzuur, natriumcarbonaat, natronloog, ammonia en voorts in keukenzout- en magnesiumsulfaatoplossing in 't bijzonder in tegenwoordigheid van een weinig azijnzuur. Uit zijne neutrale oplossing wordt het nucleohiston gepraecipiteerd door: azijnzuur, minerale zuren, (in overmaat hiervan lost het op) alcohol, platinachloride, zilvernitraat en sublimaat; door eene verzadigde magnesiumsulfaatoplossing wordt het echter niet neergeslagen.

Lilienfeld vond voor de elementaire samenstelling van het nucleohiston:

C	=	48.46	°/o
H	=	7.00	°/o
N	=	16.86	°/o
P	=	3.025	°/o
S	=	0.701	°/o

Zooals reeds opgemerkt is, kan door verdund zoutzuur het nucleohiston gesplitst worden in nucleine en histon. De zoo verkregen nucleine is volgens *Lilienfeld* oplosbaar in overmaat van zoutzuur, in tegenstelling met de nucleine, die door pepsine-zoutzuur uit nucleohiston kan bereid worden.

Behalve door zoutzuur en pepsine-zoutzuur kan, naar *Lilienfeld* mededeelt, het nucleohiston ook nog op andere wijzen gesplitst worden en wel:

1°. door kokend water, waarbij de verkregen nucleine in water, in waterigen alcohol en in verdunde minerale zuren oplosbaar is.

2°. door Ca (OH)_2 , waardoor eerst het histon geprecipiteerd wordt; bij verdere toevoeging van kalkwater lost dit echter weer op en slaat de nucleine neer.

3°. door Ba (OH)_2 , waarbij dadelijk de nucleine precipiteert.

4°. door het nucleohiston op te lossen in matig sterk alkali (b.v. 10 °/o natronloog) en daarmee eenige uren te laten staan. De nucleine kan daarna door zuren worden neergeslagen. Deze nucleine is onoplosbaar in water, oplosbaar in overmaat van zoutzuur.

Uit de resultaten van het chemisch en microscopisch onderzoek der lymphocyten leidt *Lilienfeld* af, dat het nucleohiston in 't bijzonder in de kernen dezer cellen voorkomt. Later ¹⁾ deelde de genoemde onderzoeker

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie Bd. XX, S. 89.

eene reeks van proeven mede over de werking van nucleohiston op vloeistoffen, die fibrinogeen bevatten en kwam daarbij tot het besluit, dat het nucleohiston niet in staat is, het fibrinogeen in deze vloeistoffen te doen stollen, maar dat het integendeel de stolling belemmert.

Werd echter het nucleohiston vooraf gesplitst met baryt- of kalkwater, dan was de daardoor verkregen nucleine, na neutralisatie van het $\text{Ba}(\text{OH})_2$ resp. $\text{Ca}(\text{OH})_2$, wel in staat stolling te weeg te brengen. *Lilienfeld* verklaart dit door aan te nemen, dat in het nucleohiston de nucleine het eigenlijke stolling veroorzakende agens is, terwijl het histon de stolling tegengaat. Wordt nu alleen de nucleine gebruikt, zooals in bovenstaand geval, dan komt de stolling tot stand.

Wanneer de nucleine zoo werd bereid, dat ze niet met baryum- of calciumzout vermengd was, b.v. bij de bereiding met 0.8 % HCl , dan veroorzaakte ze geene stolling, doch deed in de fibrinogeenhoudende vloeistof een groot neerslag ontstaan, volgens *Lilienfeld* een splitsingsproduct van het fibrinogeen, door hem thrombosine genoemd ('t andere splitsingsproduct scheen eene albumose te zijn).

Deze thrombosine zou dan zonder verdere hulp van de nucleine, alleen door toevoeging van calcium- of baryumzouten in fibrine overgaan, welke fibrine niets anders als eene verbinding van de thrombosine met calcium of baryum zou zijn. Was dus in de fibrinogeenoplossing geen calcium- of baryumzout aanwezig, dan bleef het bij de praecipitatie van thrombosine en fibrine werd niet gevormd. Hieruit werd het volgens *Lilienfeld* duidelijk, waarom nucleine met $\text{Ba}(\text{OH})_2$ of $\text{Ca}(\text{OH})_2$

verkregen wel, die met 0.8 % HCl ¹⁾ bereid, geene stolling veroorzaakte.

Ook bij toevoeging van nucleohiston aan de fibrino-geenhoudende oplossingen zag *Lilienfeld* een praecipitaat van thrombosine optreden, dat eveneens in staat was met calcium- of baryumzouten fibrine te vormen.

Dat echter eene nucleohistonoplossing zonder calcium- of baryumzouten de stolling zelfs tegen kan gaan, is, naar de meening van *Lilienfeld*, 't gevolg daarvan, dat het nucleohiston histon bevat; hij vond n.l. dat histon in staat was, zoowel extra- als intravasculair de stolling te belemmeren of te beletten. Intravasculair ingespoten was het nucleohiston steeds in staat stolling te veroorzaken, daar het volgens *Lilienfeld* in het bloed in nucleine en histon gesplitst wordt. De nucleine veroorzaakt dan eene gedeeltelijke stolling van het bloed, terwijl het histon de rest van het bloed vlocibaar houdt, waardoor *Lilienfeld* tevens de z.g. negatieve phase verklaard achtte.

Behalve nucleohiston en nucleine zijn, volgens *Lilienfeld*, ook het nucleinezuur, uit nucleohiston bereid, en azijnzuur in staat om uit fibrinogeen thrombosine af te splitsen; deze thrombosine leverde met calciumzouten zelfs bijzonder snel fibrine.

Door de onderzoekingen van *Schäfer* ²⁾, *Hammarsten* ³⁾

1) Naar het schijnt, heeft *Lilienfeld*, ofschoon hij spreekt van 0.8 % HCl, eene zwakkere oplossing van zoutzuur gebruikt. Althans hij vermeldt, (l. c. Bd. XX, S. 114) dat hij het nucleohiston, om het te splitsen, behandelde met eene oplossing van 8 c. c. rookend zoutzuur op 1000 c. c. water; dat is dus 0.2 à 0.3 % HCl.

2) Proc. Physiol. Soc., 1895; Journ. of Physiol. Vol. XVII, p. XVIII.

3) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 333.

en *Cramer* ¹⁾ werd de onhoudbaarheid van de stollings-theorie van *Lilienfeld* aangetoond.

Cramer bewees, dat het neerslag, met azijnzuur uit fibrinogeen verkregen, ('t welk volgens *Lilienfeld* een splitsingsproduct van fibrinogeen is en met calcium-zouten typische fibrine levert) in eigenschappen en samenstelling volkomen overeenstemde met fibrinogeen, dat daarentegen de verbinding van thrombosine met calcium, welke *Lilienfeld* als typische fibrine beschouwde, in eigenschappen en samenstelling belangrijk van de met fibrineferment gemaakte fibrine verschilde en als eene verbinding van fibrinogeen met calcium moest opgevat worden.

Aan den anderen kant toonde *Hammarsten* aan, dat zuivere, door middel van fibrineferment verkregen fibrine, zoo weinig calcium bevat, dat de voorstelling volgens welke fibrine eene calciumverbinding zou zijn, niet houdbaar is. Hiermede verviel dus ook de opvatting van fibrine als eene thrombosine-calciumverbinding.

Lilienfeld komt in zijn onderzoek niet meer terug op het nucleoproteide, dat hij naast het nucleohiston nog in het thymusextract gevonden had. Toch was het zoo goed als zeker, dat bij zijne bereiding van het nucleohiston, n.l. door praecipitatie met azijnzuur, ook dit nucleoproteide mee neergeslagen werd, zoodat op deze wijze het nucleohiston niet zuiver te verkrijgen was. Een nieuw onderzoek over dit onderwerp, waarbij zoo mogelijk een middel moest gevonden worden om het nucleohiston en het andere nucleoproteide van elkaar te scheiden, scheen dus niet overbodig.

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 74.

Toen mijn onderzoek hierover reeds grootendeels afgehoopen was, verschenen over hetzelfde onderwerp twee publicaties, n.l. van *Bang* ¹⁾ en van *Malengreau* ²⁾. Ook door hen werd er op gewezen, dat bij de praecipitatie van het nucleohiston met azijnzuur het andere nucleoproteide mee neergeslagen werd.

In zijn onderzoek komt *Bang* tot het besluit, dat het nucleohiston als zoodanig, d. w. z. als verbinding van nucleïne met histon in het thymusextract niet voorkomt.

Hij begon, om dit aan te toonen, de thymus te extraheeren met 0.9 % keukenzoutoplossing, waarin, zooals bleek, wel het nucleoproteide, doch niet het nucleohiston oploste. Nadat aldus het nucleoproteide verwijderd was, werd de thymus met water uitgetrokken, waarin nu het nucleohiston oploste. Dit extract werd met keukenzout verzadigd, waardoor een neerslag ontstond, dat deels in water oploste; deze oplossing bevatte vrij histon, doch geen nucleohiston, daar ze met azijnzuur geen, met ammonia wel een neerslag gaf. Uit het niet in water oplosbare gedeelte kon door extractie met 0.8 % HCl ook histon verkregen worden, echter in zeer geringe hoeveelheid. Hetgeen bij deze extractie met 0.8 % HCl onopgelost achterbleef, was volgens *Bang* geen nucleïne.

Het filtraat van het door verzadiging met keukenzout in het thymusextract verkregen neerslag werd gedialyseerd, waardoor weer een praecipitaat ontstond; dit praecipitaat loste op in water, werd uit de oplossing in water door minerale zuren neergeslagen,

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. XXX, S. 508.

2) La Cellule, t. XVII, 2e fascicule, p. 393.

bevatte phosphorus en xanthinebases en gaf geene biureetreactie. Door 0.9 % keukenzout werd het praecipitaat, wanneer het in water opgelost was, gedeeltelijk weer neergeslagen; het loste dan bij toevoeging van meer keukenzout, tot ongeveer 2 %, weer op. Ook andere zouten, b.v. ammoniumsulfaat, hadden dezelfde werking.

Bang hield deze stof voor nucleinezuur. In het thymusextract scheen dus nucleinezuur voor te komen en voorts, zooals reeds gevonden was, vrij histon. *Bang* meende nu, dat het nucleohiston niets anders was als een mengsel van nucleinezuur en histon. Toch kan in het thymusextract het histon niet door middel van ammoniak worden aangetoond; dit is volgens *Bang* het gevolg daarvan, dat het nucleinezuur de praecipitatie van het histon met ammoniak tegengaat.

Nucleinezuur en histon worden elk afzonderlijk door azijnzuur niet neergeslagen; uit het thymusextract kan evenwel nucleohiston, dat nucleinezuur en histon bevat, met azijnzuur gepraecipiteerd worden. *Bang* verklaart deze tegenstrijdigheid aldus: wanneer nucleinezuur en eiwit te zamen in oplossing zijn, veroorzaakt azijnzuur een neerslag, dat zoowel het nucleinezuur als het eiwit bevat; in het thymusextract is nu nucleinezuur naast eiwit ('t histon) in oplossing; door azijnzuur ontstaat dus een praecipitaat, waarin nucleinezuur en histon beide voorkomen.

Histon praecipiteert eiwitstoffen; in het thymusextract komen, behalve het histon, nog andere eiwitstoffen voor; het was dus vreemd, dat deze door het histon niet neergeslagen werden; *Bang* vond echter, dat het aanwezige nucleinezuur de praecipitatie van de eiwitstoffen door het histon, tegenging.

Door *Kossel* werden eenige opmerkingen gemaakt naar aanleiding van het onderzoek van *Bang*.¹⁾ Hij wees er op, dat al kon *Bang* het histon, eene basische stof, en het nucleïnezuur, een lichaam met zure eigenschappen, afzonderlijk uit het thymusextract bereiden, dit geen bewijs was, dat deze stoffen in het thymus-extract niet tot nucleohiston vereenigd waren, te meer omdat de verzadiging met keukenzout, welke *Bang* bij zijne bereidingsmethode aanwendde, geen indifferent middel was ten opzichte van nucleinenbevattende stoffen.

Malengreau vond, dat door ammoniumsulfaat het nucleoproteide uit het thymusextract reeds eerder neergeslagen werd, dan het nucleohiston. Hij maakte hiervan gebruik, om op de volgende wijze het nucleohiston van het nucleoproteide te scheiden.

In het thymusextract werd met azijnzuur een neerslag veroorzaakt, dat uitgewasschen werd en vervolgens afgefiltreerd; in het filtraat was nog eenig eiwit aanwezig; het praecipitaat werd nu opgelost met natriumcarbonaat of natronloog en weer met azijnzuur gepraecipiteerd en zoo vervolgens, totdat in het filtraat geen eiwit meer aanwezig was. Ten slotte werd het neerslag weer in natriumcarbonaat of natronloog opgelost.

Het bleek nu, dat, wanneer deze oplossing voor 30 à 45 % met ammoniumsulfaat verzadigd werd, het nucleoproteide neersloeg, terwijl het nucleohiston eerst gepraecipiteerd werd, wanneer de vloeistof voor 56 à 72 % met ammoniumsulfaat verzadigd was.

Malengreau vond verder, dat het nucleoproteide bij behandeling met 1 % HCl een histon leverde, dat echter verschilde van dat, hetwelk uit nucleohiston

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. XXX, S. 520.

kon verkregen worden; het histon uit het nucleoproteide werd uit zijne oplossing door ammoniumsulfaat reeds neergeslagen, wanneer de vloeistof voor 45 % of zelfs minder met ammoniumsulfaat verzadigd was; het histon uit nucleohiston had meer ammoniumsulfaat noodig om gepraecipiteerd te worden; de vloeistof moest hiervoor n.l. minstens voor 55 % met ammoniumsulfaat verzadigd zijn. Over de relatieve hoeveelheden van het nucleoproteide en het nucleohiston, zooals deze in het thymusextract voorkomen, merkt *Malengreau* op, dat deze hoeveelheden ongeveer even groot zijn.

Zowel in het nucleohiston als in het nucleoproteide vond hij adenine en guanine. Het phosphorusgehalte van het nucleoproteide bedroeg bij benadering 0.5 %, dat van het nucleohiston ongeveer 4.5 %.

De invloed van verdunde zoutoplossingen op het nucleohiston.

Voegt men bij het waterig thymusextract, ¹⁾ dat door centrifugeeren van vaste bestanddeelen bevrijd is, eene oplossing van calciumchloride, dan ontstaat, wanneer de hoeveelheid van het toegevoegde Ca Cl_2 juist gekozen wordt, een groot neerslag. Dit neerslag laat zich gemakkelijk afcentrifugeeren en is in geringe overmaat van zouten, ook van calciumchloride, oplosbaar; in water lost het minder goed op; gemakkelijk lost het echter, ofschoon met opalescentie, in water op, wanneer daaraan een weinig verdunde ammoniak toegevoegd wordt, zoo, dat de alkalische reactie met lakmoespapier even zichtbaar wordt. De hoeveelheid calciumchloride, die toegevoegd moet worden om een zoo groot mogelijk neerslag te verkrijgen, bedraagt één c.c. 10 % Ca Cl_2 op 100 c.c. van het extract, dat daardoor dus een gehalte van ± 0.1 % aan calciumchloride verkrijgt; er kan echter, zonder dat het neerslag merkbaar oplost, calciumchloride toegevoegd worden tot een gehalte van ongeveer 0.5 %.

Wordt minder dan één c.c. 10 % Ca Cl_2 op 100

1) Waar in het vervolg sprake is van thymusextract, is bedoeld een extract, bereid door 150 à 200 gram kalfsthymus, van het aanhangende vet bevrijd en fijngehakt, 15 tot 18 uren met 500 à 600 c. c. water uit te trekken.

c.c. vloeistof gebruikt, dan blijft de praecipitatie onvolledig, terwijl bij een gehalte van meer dan 0.5 % Ca Cl_2 er eveneens eene onvolledige praecipitatie plaats heeft, daar 't neerslag in overmaat van calciumchloride oplost.

Het was nu de vraag, of het verkregen neerslag uit nucleohiston bestond; de groote hoeveelheid van het praecipitaat, evenals de onoplosbaarheid in azijnzuur, maakten dit reeds waarschijnlijk.

Vooreerst werd door verbranding van de stof met kaliumnitraat en natriumcarbonaat aangetoond, dat het neerslag phosphorus bevatte. Voorts levert het praecipitaat, wanneer het met 0.8 % HCl (0.8 gram HCl in 100 gram van de oplossing) behandeld wordt, eene groote hoeveelheid histon; het hiervoor gebruikte nucleohiston werd op de volgende wijze bereid.

Het met calciumchloride verkregen neerslag werd afgecentrifugeerd en opgelost in water na toevoeging van een paar druppels verdunde ammoniak, ¹⁾ daarna werd de oplossing gefiltreerd en weer neergeslagen met calciumchloride, 't praecipitaat afgecentrifugeerd en gemengd met 0.8 % HCl , waarmede het eenige uren in aanraking bleef. De nucleine blijft dan gepraecipiteerd, terwijl het histon in het zoutzuur oplost.

Dat de gepraecipiteerd gebleven stof werkelijk nucleine is, blijkt daaruit, dat ze eiwitreacties geeft (behalve de reactie van Adamkiewicz), phosphorus bevat

1) Om in dit geval eene goede oplossing te verkrijgen is het aan te bevelen, het nucleohiston met zoo weinig mogelijk calciumchloride neer te slaan, daar het praecipitaat des te beter in water oplost, naarmate het minder calciumchloride bevat; ik heb daarom slechts zooveel Ca Cl_2 toegevoegd, dat de vloeistof daarvan 0.1 % bevatte, wat voor eene volledige praecipitatie voldoende is.

en onoplosbaar is in zuren, ook in azijnzuur, terwijl er eene groote hoeveelheid purinebases, hoofdzakelijk adenine, uit te verkrijgen is. In verdunde ammoniak is deze nucleïne oplosbaar en kan dan door azijnzuur weer neergeslagen worden.

Het histon is, zooals gezegd, in het zoutzuur opgelost; door ammoniak kan het daaruit echter niet volledig neergeslagen worden, maar wel, wanneer de zoutzure oplossing vooraf gedialyseerd is. De reden hiervan is de volgende. Voegt men bij de oplossing in 0.8 % HCl, ammoniak, dan ontstaat in de vloeistof eene niet onbelangrijke hoeveelheid ammoniumchloride; ik vond nu, dat ammoniumchloride in staat was, de praecipitatie van het histon te belemmeren. Ook keukenzout, calciumchloride en andere zouten oefenden dezelfde werking uit; in overeenstemming hiermede kon dan ook het histon, dat met ammoniak neergeslagen was, door toevoeging van ammoniumchloride in voldoende hoeveelheid geheel weer opgelost worden.

Bang ¹⁾ vermeldt, dat ammoniumzouten in het algemeen de praecipitatie van de histonen door ammoniak bevorderen. 't Is mij niet duidelijk geworden, waaraan het is toe te schrijven, dat ik hier een tegengesteld resultaat verkreeg.

Wanneer de zoutzure oplossing van histon gedialyseerd is tot ongeveer neutrale reactie, dan kan het histon door ammoniak gepraecipiteerd worden en lost in overmaat hiervan niet op; ook door natronloog en natriumcarbonaat kan het histon neergeslagen worden, maar het is dan in overmaat volkomen oplosbaar.

De identiteit van het met calciumchloride in het

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd 27, S. 468.

thymusextract verkregen neerslag, met nucleohiston wordt ten slotte nog bewezen door de later te beschrijven elementaire analyses, welke in zooverre met die van *Lilienfeld* overeenstemmen, als ze een betrekkelijk hoog stikstof- en phosphorusgehalte, daarentegen een vrij laag koolstofgehalte als resultaat opleverden.

Ik moet hier dadelijk bijvoegen, dat het nucleoproteide, dat naast het nucleohiston in het thymusextract voorkomt, door calciumchloride slechts voor een klein deel wordt neergeslagen, zoodat het nucleohiston, dat twee maal met calciumchloride is gepraecipiteerd, als vrij wel van nucleoproteide gereinigd kan beschouwd worden; in het vervolg zal dit nog nader aangetoond worden.

Waarop berust nu de praecipitatie van het nucleohiston door Ca Cl_2 ?

Het lag voor de hand, het door calciumchloride neergeslagen nucleohiston als eene calcium-verbinding te beschouwen, zooals dit o. a. het geval is bij de caseïne in de melk, maar met dit onderscheid, dat het caseïne-calcium in overmaat van Ca Cl_2 of andere zouten onoplosbaar is, terwijl het nucleohiston-calcium in overmaat zeer gemakkelijk oplost en alleen bij een gering zoutgehalte gepraecipiteerd blijft.

Toch scheen het wenschelijk te onderzoeken, of het met calciumchloride neergeslagen nucleohiston inderdaad eene calciumverbinding was; de mogelijkheid was n.l. niet uitgesloten, dat men hier te doen had met eene moleculaire verbinding van nucleohiston met Ca Cl_2 of ook, dat er volstrekt geene verbinding met calcium of met calciumchloride aanwezig was, maar dat het nucleohiston eenvoudig in calciumchloride van eene zekere, vrij geringe concentratie onoplosbaar was.

Hiertoe werd de volgende proef genomen. In het van vaste bestanddeelen bevrijde thymusextract werd het nucleohiston geprecipiteerd met azijnzuur; het neerslag werd daarna, ter verwijdering van phosphorzuur, uitgewasschen met water en vervolgens opgelost in water met zoo weinig mogelijk ammoniak. Uit deze oplossing werd door toevoeging van calciumchloride het nucleohiston weer neergeslagen; 't neerslag werd daarop onder alcohol gebracht. Daar alcohol ongeveer 12 % Ca Cl_2 oplost en de in het neerslag aanwezige vloeistof slechts 0.1 % Ca Cl_2 opgelost bevatte, was dit een zeer geschikt middel om het nucleohiston van het overtollige calciumchloride te bevrijden; 't neerslag werd dus met alcohol uitgewasschen tot de afgefiltreerde alcohol geen calciumchloride meer bevatte. Het nucleohiston werd hierna onder aether gebracht en gedroogd.

In de asch van de aldus bereide stof, die dus geen vrij kalkzout bevat, vindt men altijd eene groote hoeveelheid calcium, waaruit blijkt, dat het nucleohiston, hetzij aan calcium, hetzij aan Ca Cl_2 gebonden was. Wanneer het eerste 't geval was en het met Ca Cl_2 neergeslagen nucleohiston dus als eene calciumverbinding beschouwd moest worden, dan kon men deze verbinding vergelijken met een zout, waarin het metaal door het calcium, de zuurrest door het nucleohiston vertegenwoordigd was en 't was dan tevens waarschijnlijk, dat sterkere zuren in staat zouden zijn dit calciumzout te ontleden, zoodat b. v. bij extractie met niet al te zwak azijnzuur, calciumacetaat in het filtraat moest gevonden worden, terwijl het nucleohiston onopgelost op het filter bleef. Het filtraat zou dus met kaliumoxalaat eene kalkreactie moeten geven, daarentegen met zilvernitraat geen chloorreactie. Was echter het nucleohiston ver-

bonden met Ca Cl_2 , dan zou bij extractie met azijnzuur in het filtraat, zoo er ontleding plaats had, Ca Cl_2 aanwezig moeten zijn; het filtraat zou dus zoowel eene kalk- als eene chloorreactie moeten geven, of geen van beide.

Het bleek nu, dat bij extractie met 5 % azijnzuur, het filtraat eene sterke kalkreactie, doch geen spoor van chloorreactie gaf, waarmee alzoo aangetoond was, dat het met calciumchloride neergeslagen nucleohiston gebonden was aan calcium en dus zeer waarschijnlijk als een calciumzout beschouwd moest worden.

Hetzelfde resultaat werd verkregen door het nucleohiston direct uit het thymusextract neer te slaan met calciumchloride; voor verdere zuivering werd het opgelost in water met een paar druppels verdunde ammoniak en de oplossing, om het mogelijk gevormde tricalciumphosphaat te verwijderen, geruimen tijd gecentrifugeerd; de vloeistof werd vervolgens afgegoten zonder dat van het geringe bezinksel iets medeging, de oplossing daarna weer met calciumchloride neergeslagen, het praecipitaat met alcohol uitgewasschen, onder aether gebracht en gedroogd. Bij extractie van deze stof met 5 % azijnzuur geeft het filtraat ook eene sterke kalkreactie, daarentegen geen chloorreactie.

Evenals de gewone calciumzouten kan kaliumoxalaat ook het nucleohiston-calcium ontleden, zooals de volgende proef bewijst.

In 't thymusextract werd het nucleohiston gepraecipiteerd met calciumchloride; het neerslag werd opgelost in water met een paar druppels verdunde ammoniak en de oplossing gefiltreerd. Daarna werd bij het filtraat kaliumoxalaat gevoegd in eenige overmaat, zoodat het meer dan voldoende was, om al het calcium

als calciumoxalaat neer te slaan. Het mengsel bleef 24 uur staan, om het calciumoxalaat zoo volledig mogelijk te doen praecipiteeren. Vervolgens werd het twee maal door een prop samengeperst filtreerpapier ¹⁾ daarna nog eens door een zeer dicht, aschvrij filter gefiltreerd; in het filtraat waren nu microscopisch geen calciumoxalaat kristallen meer te ontdekken; het bevatte echter nog vrij veel kaliumoxalaat, daar bij toevoeging van Ca Cl_2 onder het microscoop talrijke kristallen van calciumoxalaat verschenen.

Om na te gaan of het nucleohiston in deze oplossing nog calcium bevatte, werd het neergeslagen met twee maal het volumen alcohol en aether; het neerslag werd afgefiltreerd en gedroogd; 't gewicht van de bij 110° gedroogde stof bedroeg 0.437 gram; deze hoeveelheid werd gekookt met ongeveer 10 c.c. 10 % azijnzuur, waardoor het calcium, zoo het nog aanwezig was, als calciumacetaat moest oplossen. Bij het koken loste het nucleohiston niet op; het werd dus afgefiltreerd en bij het filtraat werd kaliumoxalaat gevoegd, nadat de zure reactie met ammoniak afgestompt was. Na 24 uren was er geen neerslag van calciumoxalaat ontstaan; een uiterst gering bezinksel had zich gevormd, waarin echter microscopisch geen calciumoxalaat-kristallen te ontdekken waren. Wanneer het calcium door het kaliumoxalaat niet aan het nucleohiston onttrokken was, zou (daar volgens de quantitatieve bepalingen het met calciumchloride neergeslagen nucleohiston ongeveer $1\frac{1}{3}$ % Calcium bevat) een praecipitaat van ongeveer 18 milligram calciumoxalaat hebben moeten ontstaan.

1) Zie Onderz. Physiol. Laborat. Utrecht, 4de Reeks, Dl. IV, blz. 171.

Zooals reeds opgemerkt werd, is de verbinding van nucleohiston met calcium, in overmaat van calciumchloride zeer goed oplosbaar; de oplossing wordt merkbaar bij een gehalte van ± 0.6 ‰ aan calciumchloride; bevat de vloeistof ongeveer 2 ‰ CaCl_2 , dan is alles weer opgelost.

Behalve calciumchloride bezitten ook andere zouten van de alkali- en aardalkalimetalen het vermogen om, bij een bepaald gehalte aan zout, nucleohiston neer te slaan.

BaCl_2 praecipiteert bij een gehalte van 0.1 ‰ het nucleohiston, evenals CaCl_2 volkomen; het neerslag is oplosbaar in overmaat van zouten (in 5 ‰ BaCl_2 lost het geheel op) en eenigszins ook in water, zeer goed oplosbaar in water bij zeer zwak alkalische reactie. Bij behandeling met 0.8 ‰ HCl levert het neerslag histon.

Mg SO_4 slaat het nucleohiston bij een gehalte van 0.2 ‰ ook meestal volkomen neer; dikwijls evenwel ontstaat eerst eene volledige praecipitatie, wanneer men het extract eenige uren met het magnesiumsulfaat laat staan. Het magnesium-nucleohiston is iets beter in water oplosbaar dan het baryum- en calcium-nucleohiston. Bij een gehalte van ruim 2 ‰ Mg SO_4 is het neerslag weer geheel opgelost.

Met natriumchloride ontstaat altijd slechts eene gedeeltelijke praecipitatie; laat men het extract wat langer staan met het keukenzout, dan vermeerdert het neerslag niet; het best wordt het nucleohiston gepraecipiteerd, wanneer zooveel keukenzout wordt toegevoegd, dat de vloeistof een gehalte van 0.9 ‰ NaCl krijgt; dit is opmerkelijk in zooverre als bij dat gehalte het mengsel isotonisch is met de in het lichaam voorkomende

vloeistoffen. Het natrium-nucleohiston vormt een kleverig neerslag, dat zeer goed oplosbaar is in water, zonder dat toevoeging van ammoniak noodig is; vooral wanneer men het met water vermengde neerslag eenigen tijd bij 37° C. zet, ontstaat eene heldere blauwachtige oplossing. Wordt aan deze oplossing NaCl toegevoegd, tot het gehalte daaraan $\pm 0.9 \%$ bedraagt, dan slaat het natrium-nucleohiston weer neer, terwijl bij een gehalte van 2 à 2½ % NaCl het geheele neerslag weer opgelost is. Het koolstof- en waterstofgehalte stemt met dat van het calcium-nucleohiston overeen.

Bij behandeling met verdund zoutzuur wordt ook het natrium-nucleohiston ontleed in nucleine en histon; het hiervoor gebruikte nucleohiston was uit het thymusextract door keukenzout gepraecipiteerd, daarna in water opgelost en weer door 0.9 % NaCl neergeslagen, waardoor tevens het nucleoproteide, dat, zooals ook *Bang* vond, in 0.9 % NaCl oplost, voldoende verwijderd werd; bovendien lost het nucleoproteide in 0.8 % HCl op, zoodat de nucleine uit natrium-nucleohiston verkregen, geen nucleoproteide meer bevat. De eiwitreacties, welke deze nucleine geeft zijn dus niet afkomstig van als verontreiniging aanwezig nucleoproteide en het wordt daardoor zeker, dat men met nucleine en niet met nucleinezuur te doen heeft.

Om het histon, uit natrium-nucleohiston door middel van 0.8 % HCl verkregen, aan te toonen, bleek het ook nu weer noodig de histonoplossing te dialyseeren; eerst daarna ontstaat er met ammoniak een groot neerslag. Door het dialyseeren wordt de reactie neutraal, terwijl het histon in oplossing blijft.

Behalve de reactie met ammoniak bezit de gedialyseerde vloeistof ook de andere eigenschappen van eene histonoplossing; zoo worden b.v. kippeneiwit en fibrinogeen er door gepraecipiteerd. Met salpeterzuur ontstaat een neerslag, dat bij verwarming oplost. Bij behandeling met Millon's reagens ontstaat geen of althans een gering rood neerslag, doch de geheele vloeistof neemt eene vrij donkere roode kleur aan. Het is niet noodig het histon met het reagens van Millon te koken; de roode kleur ontstaat, hoewel zeer langzaam (b.v. in 24 uren) even goed of zelfs beter bij kamertemperatuur. Wordt met Millon's reagens gekookt, dan bestaat er veel kans, dat de reactie niet gegeven wordt, vooral, wanneer niet zeer weinig van het reagens gebruikt wordt.

Kaliumchloride en ammoniumchloride gedragen zich ten opzichte van nucleohiston evenals natriumchloride.

Met natriumsulfaat en kaliumsulfaat ontstaat in het thymusextract een geringer neerslag dan met natriumchloride.

Uit het bovenstaande blijkt dus, dat de alkaliverbindingen van het nucleohiston in water oplosbaar zijn en alleen bij een zeker gehalte van de vloeistof aan alkalizout in meerdere of mindere mate neerslaan; de aardalkaliverbindingen zijn in water veel minder oplosbaar en geheel onoplosbaar in soluties van 0.1 % der aardalkalizouten.

Voor het neerslaan van nucleohiston met 0.9 % NaCl of met andere alkalizouten is het noodig van versch materiaal uit te gaan; wanneer de thymus meer dan 24 uren oud is, ontstaat in den regel een geringer neerslag; de toevoeging van chloroform, dat dikwijls gebruikt wordt om rotting tegen te gaan, schijnt de

praecipitatie van het nucleohiston door alkalizouten ook eenigszins te hinderen; men doet dus het best het thymusextract voor rotting te beschutten door het bij lage temperatuur te plaatsen.

Ik heb getracht na te gaan, hoe groot de concentratie van de verschillende alkalizouten moet zijn om een zoo volledig mogelijk praecipitaat te veroorzaken. Dit geschiedde op de volgende wijze.

De fijngehakte thymus werd met water uitgetrokken en in het extract werd door toevoeging van keukenzout tot $\pm 0.9\%$ het nucleohiston gepraecipiteerd. Het neerslag werd afgecentrifugeerd en in water opgelost; om zoo weinig mogelijk keukenzout in de oplossing te houden werden de centrifugeerglaasjes, terwijl het neerslag er nog in was, met gedistilleerd water even uitgespoeld ten einde het aan den wand van het glas hangende 0.9% NaCl te verwijderen; het praecipitaat lost, wanneer het uitspoelen slechts kort duurt, niet merkbaar op. Daarna werd het neerslag met ongeveer het twintigvoudige volumen gedistilleerd water vermengd, waarin het na eenigen tijd geheel oploste; de oplossing werd gefiltreerd. Het filtraat vertoonde slechts eene uiterst geringe blauwachtige opalescentie en bevatte zeker niet meer dan 0.05% NaCl.

Van deze oplossing werd nu een bepaald aantal cubieke centimeters (6 of 12) afgemeten en in een reageerbuisje gebracht. Vervolgens werd druppelsgewijze de alkalizoutsolutie van bekende sterkte (meestal eene bij 15° geheel of half verzadigde oplossing) toegevoegd, totdat door toevoeging van meer zout het neerslag niet vermeerderde.

De eerste druppels veroorzaken een neerslag, dat bij voorzichtig omschudden weer oplost; de vloeistof is

iets sterker opaliseerend geworden; door den voorlaatsten druppel wordt in den regel eerst het buisje ondoorzichtig; wordt dan nog een druppel toegevoegd, dan ontstaat, althans wanneer men NaCl, KCl, NH_4Cl of $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$ voor de praecipitatie gebruikt, een grofvlokkig, kleverig neerslag, dat vrij snel bezinkt; het inbrengen van meer zout vermeedert daarna het neerslag niet, hetgeen juist omdat het praecipitaat grofvlokkig is en bezinkt, nauwkeurig waar te nemen is. Bij de praecipitatie met Na_2SO_4 , K_2SO_4 of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is het neerslag meestal niet zoo groot, en bezinkt het niet zoo snel; toch is ook hier met voldoende nauwkeurigheid te zien, wanneer de juiste hoeveelheid zout is toegevoegd.

Bij deze proeven werd steeds hetzelfde druppelapparaat gebruikt; de grootte van de druppels was te voren nauwkeurig bepaald. Uit het aantal toegevoegde druppels en de bekende sterkte van de zoutsolutie kon dan berekend worden, hoeveel procent zout het mengsel in het reageerbuisje bevatte. Men vindt op deze wijze de geringste hoeveelheid zout, welke het meest volledige neerslag geeft.

Voor eenige zoutoplossingen vond ik aldus de volgende concentraties. (Het gehalte van hoogstens 0.05 % Na Cl, dat in de nucleohistonoplossing aanwezig was, is buiten rekening gelaten).

NaCl	= 0.88 %
KCl	= 1.13 "
NH_4Cl	= 0.84 "
$\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$	= 1.31 "
Na_2SO_4	= 1.42 "
K_2SO_4	= 1.60 "

De concentraties voor NaCl, KCl, NH_4Cl en

$C_2H_3O_2Na$ zijn ongeveer isotonisch met de lichaamsvloeistoffen; de getallen voor Na_2SO_4 en K_2SO_4 wijken echter belangrijk daarvan af.

Het vrije nucleohiston, dat ontstaat, wanneer b.v. eene oplossing van calcium-nucleohiston met niet al te zwak azijnzuur wordt behandeld, (waardoor het calcium er aan onttrokken wordt) is onoplosbaar in water; men kan het door azijnzuur veroorzaakte neerslag met water uitwasschen, totdat het waschwater volkomen neutraal reageert; van het praecipitaat blijkt dan niets in het water opgelost te zijn. Dikwijls vertoont het waschwater bij de laatste uitwasschingen eene uiterst geringe opalescentie; er is dan evenwel zoo weinig eiwit in de vloeistof aanwezig, dat salpeterzuur geen troebelheid veroorzaakt en de xanthoproteïne reactie met de versterking door ammoniak slechts zeer zwak is. Wanneer eene zoo geringe hoeveelheid eiwit nog eene zichtbare opalescentie veroorzaakt, dan is dit eiwit waarschijnlijk niet opgelost, doch zoo fijn verdeeld, dat het door centrifugeeren of filtreeren niet geheel te verwijderen is; en al mocht deze meening onjuist zijn en dus een spoor van het vrije nucleohiston in water oplossen, dan is de hoeveelheid hiervan toch te gering om in aanmerking te komen.

Volgens de opvatting, dat het calcium-nucleohiston een zout is, moet, nadat het calcium door azijnzuur er aan onttrokken is, het nucleohiston als zuur overblijven.

Dat nu het op bovenstaande wijze van azijnzuur bevrijde neerslag werkelijk een zuur is, kan gemakkelijk daardoor aangetoond worden, dat het alkalien b. v. ammoniak bindt. Voegt men n. l. bij het in water gesuspenderde neerslag een weinig verdunde ammoniak,

dan blijft de reactie neutraal, terwijl van het praecipitaat een deel oplost; ook bij verdere toevoeging van ammoniak blijft de reactie neutraal, tot het geheele neerslag opgelost is. Er heeft zich blijkbaar het ammoniumzout van het nucleohiston gevormd, dat in water zeer gemakkelijk oplost. Neemt men, als controlevloeistof eene hoeveelheid van het laatste waschwasser, even groot als die, waarin het praecipitaat gesuspendeerd was en voegt daaraan evenveel ammoniak toe, als noodig was, om het neerslag op te lossen, dan blijkt deze vloeistof met lakmoespapier of met phenolphthaleine sterk alkalisch te reageeren.

Daar dus het vrije nucleohiston in water onoplosbaar is, terwijl zijne verbindingen met aardalkalien daarin weinig oplosbaar zijn, is het zeer waarschijnlijk, dat in het waterig thymusextract het nucleohiston als alkalizout voorkomt, welke verbinding zeer gemakkelijk in water oplost.

Bij de praecipitatie van het nucleohiston uit het thymusextract met calciumchloride wordt, zooals aangetoond is, het calciumzout gevormd. Het calcium blijkt alzoo het alkalimetaal uit zijne verbinding met nucleohiston te kunnen verdrijven. Men moet zich dus voorstellen, dat b. v. uit nucleohiston-natrium + CaCl_2 gevormd wordt nucleohiston-calcium + 2NaCl ; het nucleohiston-calcium praecipiteert dan, niet alleen omdat het op zich zelf reeds minder oplosbaar is, dan de natriumverbinding, maar vooral ook omdat het in zoutsoluties van geringe concentratie onoplosbaar is.

Evenals calciumchloride kunnen, hoewel dit niet onmiddellijk aangetoond is, waarschijnlijk ook baryum- en magnesiumzouten de alkalimetalen uit hunne verbinding met nucleohiston verdrijven.

Voor de oplosbaarheid van de zouten van het nucleohiston kan dus de volgende tabel gegeven worden:

Alkalizouten	{	oplosbaar in water meer of minder onoplosbaar in zeer verdunde alkalizoutsoluties (voor NaCl ongeveer 0.9 ‰) oplosbaar in overmaat van zouten.
Magnesiumzout	{	vrij goed oplosbaar in water onoplosbaar in 0.1—0.3 ‰ MgSO_4 oplosbaar in overmaat van zouten.
Calciumzout	{	weinig oplosbaar in water onoplosbaar in 0.1—0.5 ‰ CaCl_2 oplosbaar in overmaat van zouten.
Baryumzout	{	weinig oplosbaar in water onoplosbaar in 0.1—1.8 ‰ BaCl_2 oplosbaar in overmaat van zouten.
Zware metaal- zouten	{	onoplosbaar in water oplosbaar in zoutsoluties.

Daar het histon een basisch lichaam is, is het waarschijnlijk, dat de zure eigenschappen van het nucleohiston aan de nucleine gebonden zijn.

Lilienfeld beschouwde het nucleohiston als een zuur zout, waarin het histon de plaats van het metaal bij gewone zouten innam. Met deze opvatting stemt overeen, dat de nucleine in staat is zich met metalen te verbinden. Men bereidt hiertoe de nucleine op de gewone wijze door nucleohiston neer te slaan met azijnzuur en het praecipitaat 12 tot 18 uren met 0.8 ‰

HCl te laten staan; het neerslag wordt daarna met water uitgewasschen en vervolgens opgelost in water met een weinig alkali; de reactie behoeft hierbij niet alkalisch te worden; uit deze oplossing kan de nucleïne door toevoeging van niet al te geringe hoeveelheden alkali- of aardalkalizouten neergeslagen worden. Het neerslag lost in overmaat van deze zouten niet op.

De door calcium-, baryum- of magnesiumzouten geprecipiteerde nucleïne is oplosbaar in alkaliën, onoplosbaar in water; door uitwasschen met water kan dus bv. de met CaCl_2 neergeslagen nucleïne van overtollig CaCl_2 bevrijd worden. In de asch van de op deze wijze van CaCl_2 bevrijde nucleïne vindt men dan eene groote hoeveelheid calcium, waaruit blijkt, dat de met CaCl_2 neergeslagen nucleïne eene calciumverbinding is.

Volgens eene andere methode, nl. door het nucleohiston te splitsen met $\text{Ba}(\text{OH})_2$ of $\text{Ca}(\text{OH})_2$, verkreeg *Lilienfeld* de baryum- resp. calciumverbinding van de nucleïne.

Wanneer de met 0.8 % HCl bereide nucleïne opgelost wordt door middel van natronloog, ontstaat het natriumzout; voegt men aan deze oplossing natriumchloride in niet te geringe hoeveelheid toe, dan precipiteert het nucleïne-natrium; door uitwasschen met water kan het neerslag langzamerhand weer opgelost worden. Hieruit blijkt dat de verbinding van nucleïne met natrium oplosbaar is in water, doch onoplosbaar in zouten; het eenige verschil met nucleohiston-natrium is, dat deze laatste verbinding in overmaat van zouten oplost. Hetzelfde geldt voor de kalium- en ammoniumverbindingen.

Wordt de met 0.8 % HCl bereide nucleïne in water met een weinig alkali opgelost en vervolgens met

CaCl_2 gepraecipiteerd, dan ontstaat, zooals aangetoond is, de calciumverbinding. Ook hier is dus, evenals bij het nucleohiston, het calcium in staat het alkali-metaal uit zijne verbinding met nucleine te verdrijven.

Door zuren, b.v. 0.8 % HCl, wordt de verbinding van nucleine met calcium ontleed, zoodat, na voldoende uitwasschen met 0.8 % HCl in de asch van de nucleine geen calcium meer aan te toonen is.

Wij hebben gezien, (blz. 8) dat *Bang* uit het thymus-extract ook eene stof heeft verkregen, die bij een gehalte van ± 0.9 % keukenzout neersloeg, door 2 % NaCl weer opgelost werd, dus in dit opzicht overeenkomt met het door 0.9 % NaCl gepraecipiteerde nucleohiston.

De methode, volgens welke *Bang* deze door hem als nucleinezuur beschouwde stof verkreeg, was de volgende.

Na verwijdering van het nucleoproteide door extractie met 0.9 % NaCl, werd de thymus met water uitgetrokken en het extract met keukenzout verzadigd. Het hierdoor gevormde praecipitaat werd afgefiltreerd en het filtraat gedialyseerd, waardoor dan het nucleinezuur neersloeg.

Men kan, om het nucleinezuur te verkrijgen, volgens *Bang*, ook direct in het waterig thymus-extract, door toevoeging van keukenzout tot een gehalte van 0.9 %, een neerslag veroorzaken; men filtreert dit af, lost het op in water en verzadigt de oplossing met keukenzout. Er ontstaat hierdoor weer een neerslag, dat afgefiltreerd wordt; uit het filtraat kan dan het nucleinezuur door alcohol neergeslagen worden.

Volgens deze laatste methode praecipiteert *Bang* het thymus-extract dus direct door 0.9 % NaCl. Dit neerslag bestaat ongetwijfeld uit nucleohiston; in het voor-

gaande is aangetoond, dat uit het door 0.9 % NaCl veroorzaakte praecipitaat histon en nucleïne te verkrijgen zijn en is er op gewezen, dat het koolstof- en waterstofgehalte overeenstemt met dat van op andere wijzen verkregen nucleohiston. Dit nucleohiston lost *Bang* op in water en verzadigt de oplossing met keukenzout; uit het filtraat van het daardoor gevormde neerslag kan nu, volgens hem, nucleïnezuur door alcohol gepraecipiteerd worden. Van het nucleohiston is dus door de verzadiging met keukenzout nucleïnezuur afgesplitst, op welke mogelijkheid door *Kossel* opmerkelijk gemaakt is, of ook het door alcohol verkregen neerslag was geen nucleïnezuur.

Dat *Bang* uit deze stof door extractie met zoutzuur geen histon verkreeg, bewijst niet, dat er geen histon in aanwezig was, daar de histonoplossing door *Bang* niet gedialyseerd werd, (daarvan blijkt althans uit zijne beschrijving niets) hetgeen in dit geval evenwel noodzakelijk is.

Door middel van zoutzuur kon *Bang*, naar hij zegt, in het algemeen slechts weinig histon uit het thymus-extract verkrijgen, hetgeen ik daaraan toeschrijf, dat de histonoplossingen niet gedialyseerd werden.

Het is verder opmerkelijk, dat de stof, die *Bang* als nucleïnezuur beschouwt, door 0.9 % NaCl gepraecipiteerd wordt en dan in 2 % NaCl weer oplost, daar ook het nucleohiston deze eigenschap bezit.

Men zou dus geneigd zijn het nucleïnezuur van *Bang* voor nucleohiston te houden, wanneer deze niet uitdrukkelijk vermeldde, dat de stof meer dan 8 % phosphorus bevatte, geene biureetreactie gaf en uit zijne oplossing niet door azijnzuur neergeslagen werd. Daar ik geene gelegenheid had, mij met de mededeelin-

gen van *Bang* nader bezig te houden, meen ik voorloopig te moeten aannemen, dat door verzadiging met keukenzout nucleinezuur van het nucleohiston wordt afgesplitst.

Het voornaamste besluit, waartoe *Bang* komt, is, dat in het thymusextract geen nucleohiston voorkomt, doch slechts een mengsel van nucleinezuur en histon.

Dat door azijnzuur uit het thymusextract zoowel het histon als het nucleinezuur neergeslagen wordt, verklaart *Bang* daaruit, dat eiwitstoffen, die met nucleinezuur samen in oplossing zijn, door azijnzuur geprecipiteerd worden, waarbij het nucleinezuur mee neergeslagen wordt. Men vat deze praecipitatie gewoonlijk zoo op, dat het nucleinezuur zich met het eiwit tot nucleine of nucleoproteide verbonden heeft, welke beide door azijnzuur neergeslagen worden. Is deze verklaring juist, dan moet ook in het thymusextract het nucleinezuur met het histon verbonden zijn, daar azijnzuur slechts deze verbinding neerslaat.

Nu zijn er echter nog andere methoden om het nucleohiston te precipiteeren, bv. door middel van calciumchloride; was de opvatting van *Bang* juist, dan zou hiervoor geene verklaring te vinden zijn; men zou zich nog kunnen voorstellen, dat het nucleinezuur door calciumchloride als calciumverbinding neergeslagen werd; het histon echter wordt, naar ik mij overtuigd heb, door 0.1 % Ca Cl_2 niet geprecipiteerd.

Het nucleinezuur verhindert volgens *Bang* de praecipitatie van eiwitstoffen door histon en dit is dan ook, naar hij meent, de reden, waarom het in het thymusextract voorkomende histon daaruit geen eiwit kan neerslaan. Men kan zich echter op de volgende wijze er van overtuigen, dat deze meening onjuist is. Eene zekere hoeveelheid histon wordt opgelost in 0.2 %

HCl; de oplossing wordt gedialyseerd, tot de reactie neutraal is geworden. (Om zeker te zijn, dat de reactie neutraal was, heb ik de histonoplossing nog \pm 18 uren gedialyseerd, nadat met lakmoespapier geene zure reactie meer was aan te toonen). Het histon blijft bij de dialyse opgelost. Wordt een weinig van deze oplossing aan het thymusextract toegevoegd, dan ontstaat er dadelijk een neerslag. Uit welke eiwitstoffen dit neerslag bestaat, heb ik niet nader onderzocht; wel heb ik gevonden, dat eene neutrale oplossing van HCl-histon in staat is in eene oplossing van natriumnucleohiston en ook in die van het nucleoproteide uit het thymusextract een neerslag te veroorzaken.

De overige in het thymusextract voorkomende eiwitstoffen.

Het door *Lilienfeld* ontdekte nucleoproteide wordt door calciumchloride slechts voor een deel neergeslagen. Wanneer de thymus 24 uren met water wordt uitgetrokken, dan kan het nucleohiston door 0.1 % calciumchloride volkomen worden geprecipiteerd. In het filtraat van dit neerslag is het grootste deel van het nucleoproteide in oplossing aanwezig en kan daaruit door azijnzuur of zoutzuur neergeslagen worden. Nucleohiston is echter in het filtraat niet meer aanwezig, daar het met azijnzuur of zoutzuur verkregen neerslag in overmaat van deze zuren geheel oplost; voorts kan uit de met azijnzuur neergeslagen stof door middel van 0.8 % HCl geen histon verkregen worden. Door digestie met pepsine verkrijgt men uit deze stof, wanneer ze in 0.2 % HCl opgelost is, een neerslag van nucleine. Het phosphorusgehalte van dit nucleoproteide bedraagt ongeveer 1 %, terwijl het van de purinebases, evenals het nucleohiston, voornamelijk adenine bevat.

Wanneer het nucleohiston door calciumchloride neergeslagen is, lost het in het filtraat aanwezige nucleoproteide in den regel moeielijk in overmaat van azijnzuur op; daarentegen is het reeds in 0.1 % HCl volkomen oplosbaar. Het met azijnzuur neergeslagen nucleoproteide kan in water, na toevoeging van een weinig ammoniak, tot ongeveer neutrale reactie, opge-

lost worden. Praecipiteert men nu nogmaals met azijnzuur, dan lost het neerslag veel gemakkelijker in overmaat hiervan op.

Wanneer voor de oplossing van het met azijnzuur gepraecipiteerde nucleoproteide niet te veel water gebruikt wordt, dan kan door calciumchloride weer een deel van het nucleoproteide worden neergeslagen; bij het nucleohiston werd hiervoor 0.1 % CaCl_2 gebruikt, daar dit reeds voldoende was om alle nucleohiston te praecipiteeren; voor de praecipitatie van het nucleoproteide is het beter iets meer calciumchloride b.v. tot 0.2 of 0.3 %, toe te voegen; het neerslag is dan in den regel iets grooter, doch steeds zeer onvolledig.

Wat oplosbaarheid betreft, komt het door calciumchloride neergeslagen nucleoproteide ongeveer overeen met het calcium-nucleohiston; het is n.l. in overmaat van CaCl_2 of andere zouten oplosbaar en ook in water bij toevoeging van een paar druppels verdunde ammoniak. Wanneer het bij deze zeer zwak alkalische reactie opgelost is, dan ontstaat door toevoeging van CaCl_2 niet opnieuw een neerslag, doch hoogstens eene opalescentie. Het nucleoproteide blijkt alzoo bij neutrale reactie door CaCl_2 voor een deel neergeslagen te worden, bij zeer zwak alkalische reactie zoo goed als in het geheel niet meer.

Wanneer dus nucleohiston uit het thymusextract bereid wordt, door dit twee maal met 0.1 % CaCl_2 neer te slaan, geschiedt er met het nucleoproteide het volgende.

Bij de eerste praecipitatie wordt een klein gedeelte neergeslagen, terwijl het grootste deel opgelost blijft, vooreerst omdat CaCl_2 het nucleoproteide altijd zeer onvolledig neerslaat en in de tweede plaats omdat

0.1 % CaCl_2 niet het gehalte is, waarbij in eene oplossing van het nucleoproteide het grootste praecipitaat ontstaat; zooals reeds gezegd is, verkrijgt men met 0.2 of 0.3 % CaCl_2 een iets grooter neerslag.

Wanneer nu het met CaCl_2 verkregen neerslag, dat dus voor verreweg het grootste gedeelte uit nucleohiston bestaat, in water met een weinig ammoniak wordt opgelost en de oplossing weer wordt gepraecipiteerd met CaCl_2 , dan blijft bij deze geringe alkalische reactie ook de rest van het nucleoproteide opgelost; in het filtraat komt dan ook steeds een weinig nucleoproteide voor, dat met azijnzuur of zoutzuur kan neergeslagen worden en in overmaat van deze zuren oplost.

Door tweemaal met 0.1 % CaCl_2 te praecipiteeren kan dus het nucleohiston van het nucleoproteide gescheiden worden.

Een bruikbaar middel om te zien of het nucleohiston al of niet van nucleoproteide bevrijd is, vormt de reactie van Millon. Het nucleoproteide geeft nl. deze reactie sterk, het nucleohiston zwak. Het thymusextract of het daaruit met azijnzuur verkregen neerslag, geven nog eene vrij sterke reactie. Wordt eens met CaCl_2 gepraecipiteerd, dan geeft het neerslag reeds eene veel geringere reactie, terwijl deze na eene tweede praecipitatie met CaCl_2 nog iets verminderd is; slaat men het nucleohiston nu voor de derde maal met calciumchloride neer, dan is de roode kleur bij behandeling met Millons reagens niet merkbaar meer afgenomen; deze reactie wordt dus door het nucleohiston zelf gegeven en is niet het gevolg van de aanwezigheid van nog eene rest van het nucleoproteide; in overeenstemming hiermede geeft ook het met NaCl driemaal gepraecipiteerde nucleohiston nog eene zwakke reactie

van Millon, ofschoon 0.9 % keukenzout het nucleoproteide niet neerslaat en driemaal met 0.9 % NaCl gepraecipiteerd nucleohiston dus vrij zeker als zuiver te beschouwen is. Daar overigens het histon de reactie van Millon geeft, was dit voor het nucleohiston reeds van te voren waarschijnlijk. Ook de xanthoproteïne-reactie is bij het nucleoproteide sterker dan bij het nucleohiston.

Het nucleoproteide is verder van het nucleohiston te onderscheiden door de reactie van Adamkiewicz; deze wordt door het nucleoproteide gegeven, door het nucleohiston niet. Voegt men echter vooraf aan het nucleohiston α -naphthol toe, dan komt de reactie van Adamkiewicz wel tot stand. Gebruikt men in plaats van α -naphthol thymol, dan wordt de kleur karmijnrood. Nucleohiston geeft dus wel de reactie van Molisch, doch het bevat te weinig aromatische groepen om de reactie van Adamkiewicz te geven; in overeenstemming hiermede is de reactie van Millon slechts zwak bij het nucleohiston, sterk bij het nucleoproteide.

BaCl₂ praecipiteert het nucleoproteide ongeveer zooals CaCl₂. Magnesiumsulphaat geeft een geringer neerslag, terwijl alkalizouten in het geheel geen invloed hebben; op deze laatste eigenschap berust de scheiding van nucleohiston en nucleoproteide, zooals *Bang* die aangeeft; volgens zijne methode wordt de thymus, vóór de extractie met water, uitgetrokken met 0.9 % NaCl, waardoor het nucleoproteide oplost, terwijl het nucleohiston gepraecipiteerd blijft.

Uit het nucleoproteide is, naar ook *Bang* opmerkt, met 0.8 % HCl geen histon te verkrijgen; het nucleoproteide lost in 0.8 % HCl op; laat men deze oplossing staan dan ontstaat geen neerslag van nucleïne en men

kan door vermindering van de zure reactie met alkali het nucleoproteide weer praecipiteeren; in verdunde ammoniak lost het neerslag vervolgens weer op. Het praecipitaat ontstaat dus reeds bij de zwak zure reactie, waarbij het nucleoproteide neerslaat; het is alzoo geen histon.

Dialyseert men de oplossing van het nucleoproteide in 0.8 % of 0.2 % HCl, dan slaat, zoodra de reactie te zwak zuur wordt, het nucleoproteide neer en lost, wanneer door de verdere dialyse de reactie neutraal wordt, niet op. Het neerslag is geen histon, daar het in ammoniak oplost. Ook in het filtraat van het neerslag geeft ammoniak geen praecipitaat.

Wanneer het nucleoproteide eenigen tijd in vrij sterk zuur, b.v. 5 à 10 % azijnzuur of 1 à 2 % zoutzuur opgelost geweest is en daarna door toevoeging van ammoniak weer neergeslagen wordt, dan gebeurt het dikwijls, dat het neerslag zelfs in overmaat van ammoniak niet oplost; men zou kunnen meenen in dit geval met histon te doen te hebben; toch schijnt mij dit niet zoo te zijn. Vooreerst is het neerslag ook zoo goed als onoplosbaar in zuren; verder ontstaat het praecipitaat bij de zwak zure reactie, waarbij het nucleoproteide neerslaat en in de derde plaats is het praecipitaat veel moeilijker in kaliloog oplosbaar dan histon. Het nucleoproteide blijkt dus door het zuur, waarin het opgelost was, zoodanig veranderd te zijn, dat het, na praecipitatie door vermindering van de zure reactie, onoplosbaar is geworden.

Door verzadiging met magnesiumsulfaat wordt het nucleoproteide neergeslagen.

Zooals reeds vroeger beschreven is, heeft *Malengreau* de gefractioneerde praecipitatie met ammoniumsulfaat

als middel toegepast om het nucleoproteide en het nucleohiston te scheiden.

De resultaten van *Malengreau* wijken in drie opzichten belangrijk van de mijne af.

Door nucleohiston en nucleoproteide met CaCl_2 van elkaar te scheiden, verkrijgt men eene hoeveelheid nucleoproteide, die veel geringer is, dan die van het nucleohiston; (3.5 à 4 deelen nucleohiston tegen één deel nucleoproteide) daarentegen zijn deze hoeveelheden volgens de methode van *Malengreau*, althans naar schatting, ongeveer evengroot. In de tweede plaats verkreeg *Malengreau* uit het nucleoproteide een histon.

Het is mogelijk dat deze twee resultaten met elkaar in verband staan. *Malengreau* zegt, dat het zeer moeilijk is het nucleoproteide geheel van nucleohiston gezuiverd te krijgen; wanneer nu bij het neerslaan van het nucleoproteide door de oplossing bijna half te verzadigen met ammoniumsulfaat reeds eene zekere hoeveelheid nucleohiston mee neergeslagen wordt, zal niet alleen de hoeveelheid van het praecipitaat grooter zijn dan wanneer alleen het nucleoproteide gepraecipiteerd werd, maar er zal door 1 % HCl ook histon uit het neerslag te bereiden zijn; het uitwasschen van het neerslag met ammoniumsulfaatoplossing zal het nucleohiston, wanneer het eenmaal neergeslagen is, zeker niet weer doen oplossen.

Van het histon, dat *Malengreau* uit het nucleoproteide verkreeg, geeft hij geene nauwkeurige beschrijving; het werd bereid door het nucleoproteide te vermengen met 1 % HCl; na 24 uren was eene groote hoeveelheid van het histon opgelost; dit werd dan met ammoniumsulfaat gepraecipiteerd. Daar nu het nucleoproteide oplosbaar is in 1 % HCl, is het mogelijk, dat hetgeen

in het zoutzuur oploste voor een deel nucleoproteide was ; hiermee stemt overeen, dat het histon uit het nucleoproteide bij dezelfde concentratie van ammoniumsulfaat praecipiteert als het nucleoproteide zelf.

Malengreau vond in de derde plaats voor het phosphorusgehalte van het nucleoproteide ongeveer 0.5 % terwijl het door calciumchloride van nucleohiston gescheiden nucleoproteide ongeveer 1 % phosphorus bevat. Waaraan dit verschil is toe te schrijven, kan ik niet zeker zeggen; alleen wil ik op het volgende opmerkzaam maken.

Wanneer men het nucleoproteide volgens de methode van *Malengreau* met ammoniumsulfaat praecipiteert, dan lost het neerslag in water op; de oplossing is evenwel opaliseerend en het praecipitaat lost niet gemakkelijk op; slaat men deze oplossing nog eens met ammoniumsulfaat neer, dan kan het neerslag niet meer met water opgelost worden; ook in zuren is het dan weinig oplosbaar. Ook wanneer het nucleoproteide eenmaal met ammoniumsulfaat wordt gepraecipiteerd en dan daarmede wordt uitgewasschen, gaat het in een moeilijk oplosbaren vorm over. Het nucleoproteide schijnt dus door het ammoniumsulfaat veranderd te worden, zooals dit, naar we gezien hebben, ook het geval is, wanneer het in matig sterk zuur opgelost geweest is. Het is niet onmogelijk, dat bij deze verandering ook het phosphorusgehalte niet hetzelfde is gebleven. Uit de proeven van *Bang* moet, zooals reeds opgemerkt werd, als waarschijnlijk afgeleid worden, dat door verzadiging met keukenzout van het nucleohiston nucleinezuur afgesplitst wordt; misschien heeft iets dergelijks plaats wanneer het nucleoproteide met ammoniumsulfaat wordt neergeslagen.

Voorts moet er op gewezen worden, dat de analyses van *Malengreau* niet zeer nauwkeurig kunnen zijn. De te analyseeren stof werd, naar hij zegt, na behandeling met alcohol en met aether niet volkomen gedroogd; bovendien kon het phosphorusgehalte niet direct bepaald worden, maar moest wegens de onbekende hoeveelheid ammoniumsulfaat in de stof, langs een omweg afgeleid worden uit het koolstofgehalte, dat hij vond.

Lilienfeld vermoedde, dat het nucleohiston in de kern van de thymuscellen voorkomt, het nucleoproteide in het cytoplasma. De kern neemt in deze cellen het grootste gedeelte van het volumen in; het is dus waarschijnlijk, dat hieruit ook het nucleohiston afkomstig is, dat de hoofdmassa van de eiwitstoffen in het thymusextract uitmaakt.

Daar calciumchloride in het bijzonder het nucleohiston neerslaat, heb ik nagegaan, of microscopisch veranderingen in de thymuscellen waren te zien, wanneer onder het dekglas 0.1 % CaCl_2 werd toegevoegd; dit bleek het geval te zijn; de kern wordt n.l. zeer scherp zichtbaar en korrelig. Wordt daarentegen water of eene sterke zoutsolutie toegevoegd, dan lossen de kernen geheel op.

Deze waarneming komt dus met het vermoeden van *Lilienfeld* overeen.

Wordt de fijngehakte thymus korten tijd b. v. 1 à 2 minuten met water geschud en daarna dadelijk de vloeistof afgefiltreerd, dan vindt men in het filtraat alleen nucleoproteide; dit wijst er op, dat deze nucleoproteide in de buitenste laag van de thymuscellen dus in het cytoplasma voorkomt.

Bang is van meening, dat het nucleoproteide niet

in de thymuscellen zelf, maar in de intercellulaire vloeistof voorkomt; wegens de betrekkelijk groote hoeveelheid nucleoproteïde, die het thymusextract bevat, acht ik deze meening, althans met betrekking tot de levende thymus, onwaarschijnlijk.

Wanneer uit het thymusextract het nucleohiston en het nucleoproteïde verwijderd zijn, blijft in de resteerende vloeistof nog eiwit achter. Men praecipiteert, om dit eiwit te verkrijgen het nucleohiston met CaCl_2 ; uit het filtraat wordt het nucleoproteïde met azijnzuur neergeslagen en het neerslag door filtreren of centrifugeeren afgescheiden; het filtraat wordt dan geneutraliseerd met verdunde ammoniak; (voegt men hierbij te veel ammoniak toe, dan ontstaat een neerslag van tricalciumphosphaat).

Wordt het geneutraliseerde filtraat met magnesiumsulfaat verzadigd, dan ontstaat een gering praecipitaat, dat misschien voor eene globuline gehouden moet worden, misschien evenwel ook niets anders is als een gedeelte van het nucleoproteïde, wanneer de praecipitatie met azijnzuur niet geheel en al volledig is geweest. Wanneer het door verzadiging met magnesiumsulfaat verkregen neerslag opgelost wordt in water en daarna gedialyseerd, dan ontstaat in de gedialyseerde oplossing met azijnzuur of zoutzuur een praecipitaat, dat in overmaat van zuur oplost.

Door het verzadigen met magnesiumsulfaat wordt niet al het eiwit uit de vloeistof verwijderd; een vrij groot gedeelte blijft opgelost en is waarschijnlijk eene albumine. Deze albumine en de mogelijk aanwezige globuline zijn waarschijnlijk voor het grootste deel afkomstig uit de intercellulaire vloeistof. *Bang* vermeldt eveneens het voorkomen van eene albumine en eene globuline in het thymusextract.

Voor de relatieve hoeveelheden, waarin de eiwitstoffen in het thymusextract voorkomen, heb ik de volgende cijfers verkregen.

160 gram thymus werd twee maal met \pm 500 c.c. water geextraheerd; aan hetgeen daarna nog van het thymusweefsel over was, werd, door de vloeistof er gedeeltelijk uit te persen, ongeveer de consistentie van de fijngehakte thymus gegeven; het gewicht hiervan bedroeg 42 gram; de thymus was dus door de extractie met water ongeveer 118 gram in gewicht afgenomen.

Uit de beide extracten werden nu verkregen:

Calcium-nucleohiston: 9.807 gram = 69.4 %

Nucleoproteide : 2.644 gram = 18.7 %

Overige eiwitstoffen : 1.685 gram = 11.9 %

(deze laatsten werden door coaguleeren bij zwak zure reactie afgescheiden). Dit is dus te samen 14.136 gram eiwitstoffen op 118 gram thymus; de thymus bevat dus ongeveer 12 % in water oplosbare eiwitstoffen.

De elementaire samenstelling van het nucleohiston en van het nucleoproteide uit de thymuscellen.

Daar *Lilienfeld* zijne analyses deed van het neerslag, dat door azijnzuur in het thymusextract kan worden veroorzaakt, hetwelk bestaat uit een mengsel van nucleohiston en nucleoproteide, was het te verwachten, dat de cijfers, die voor de samenstelling van het zuivere nucleohiston zouden gevonden worden, afweken van die, welke *Lilienfeld* opgeeft. Dit bleek ook het geval te zijn.

In de eerste plaats zal ik de voor het nucleohiston verkregen resultaten beschrijven.

Het voor de analyses gebruikte nucleohiston werd op de volgende manieren bereid.

A. Calcium-nucleohiston.

Uit het thymusextract neergeslagen door 0.1 % CaCl_2 ; het praecipitaat werd opgelost in water bij zeer zwak alkalische reactie, (door toevoeging van ammoniak) vervolgens gefiltreerd en weer neergeslagen met 0.1 % CaCl_2 ; het neerslag werd daarna driemaal met alcohol, vervolgens driemaal met aether uitgewasschen en ten slotte bij 110°C . gedroogd.

B. Magnesium-nucleohiston.

Uit het thymusextract neergeslagen met 0.2 % MgSO_4 , het neerslag werd opgelost in water met een

spoor ammoniak; de oplossing werd gefiltreerd en weer geprecipiteerd met 0.2 % MgSO_4 . Daarna werd het neerslag driemaal met alcohol, vervolgens driemaal met aether uitgewassen en bij 110°C . gedroogd.

C. Natrium-nucleohiston.

Uit het thymusextract geprecipiteerd door 0.9 % NaCl ; het neerslag werd daarna opgelost in water en nog tweemaal met keukenzout geprecipiteerd. Vervolgens werd het driemaal met alcohol en driemaal met aether uitgewassen en bij 110°C . gedroogd.

Koolstof- en waterstofbepalingen.

a. Calcium-nucleohiston, praeparaat I.

1) 0.4382 gram droge stof leverde:

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.7270 \text{ gr. CO}_2 = 45.253 \% \text{ C} \\ 0.2530 \text{ gr. H}_2\text{O} = 6.413 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

1.0345 gr. droge stof leverde 0.0725 gr. asch; het aschgehalte van dit praeparaat bedroeg dus 7.008 %. Berekent men het koolstof- en waterstofgehalte op de aschvrije stof, dan vindt men:

$$48.663 \% \text{ C en } 6.896 \% \text{ H.}$$

2) 0.3447 gr. droge stof leverde:

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.5735 \text{ gr. CO}_2 = 45.373 \% \text{ C} \\ 0.2042 \text{ gr. H}_2\text{O} = 6.585 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

Op de aschvrije stof berekend wordt het hier gevonden koolstof- en waterstofgehalte:

$$48.800 \% \text{ C en } 7.083 \% \text{ H.}$$

b. *Natrium-nucleohiston.*

0.3744 gr. droge stof leverde :

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.6099 \text{ gr. CO}_2 = 44.418 \% \text{ C} \\ 0.2180 \text{ gr. H}_2\text{O} = 6.464 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

0.4015 gr. droge stof leverde 0.0369 gr. asch; het aschgehalte van dit praeparaat bedroeg dus 9.191 %.

Berekent men het koolstof- en waterstofgehalte op de aschvrije stof, dan vindt men:

$$48.922 \% \text{ C en } 7.124 \% \text{ H.}$$

Het vrij hooge aschgehalte van het calcium-nucleohiston moet daaruit verklaard worden, dat het calcium in de asch als calciumsulfaat, calciumphosphaat en voor een deel misschien ook als calciumcarbonaat aanwezig is; bovendien bedroeg het aschgehalte van het door extractie met azijnzuur van calcium bevrijde nucleohiston nog 1.719 %.

Het was van belang te weten, of het Ca-Nucleohiston, waarvan de bovenstaande analyses waren gedaan, ook vrije aschbestanddeelen bv. CaCl_2 , NaCl of tricalciumphosphaat bevatte. Verontreiniging met NaCl of CaCl_2 kon wegens de bereidingsmethode en het uitwasschen met alcohol buitengesloten worden. Werd het praeparaat met alcohol geextraheerd, de alcohol afgefiltreerd en tot droog toe uitgedampt, dan kon, na uitspoelen van het uitdampschaaltje met water, in dit water met kaliumoxalaat, ook na 24 uren, geen calcium worden aangetoond. Het thymusextract bevat volgens *Lilienfeld* zure phosphaten; men mag aannemen, dat er ook neutrale phosphaten in voorkomen; bij de eerste praecipitatie met CaCl_2 worden deze laatsten neergeslagen;

wanneer nu het praecipitaat, dat altijd eenige vloeistof (en dus opgeloste zure phosphaten) en CaCl_2 bevat, wordt opgelost in water bij zeer zwak alkalische reactie, dan kan er weer een gering neerslag van tricalciumphosphaat ontstaan. Daarom werd de oplossing vóór de tweede praecipitatie met CaCl_2 gefiltreerd. Hoewel het hierdoor ook onwaarschijnlijk werd, dat het praeparaat met calciumphosphaat verontreinigd was, heb ik dit toch op de volgende wijze nader onderzocht.

0.8028 gr. droge stof werd vermengd met 5 % azijnzuur. Na eenigen tijd werd het mengsel door een aschvrij filter gefiltreerd; uit het filtraat werd het calcium (afkomstig van het calcium-nucleohiston) neergeslagen met kaliumoxalaat; nadat dit neerslag afgefiltreerd was, werd het filtraat alkalisch gemaakt en magnesiमितuor toegevoegd; er ontstond nu slechts een uiterst gering, voor nauwkeurige weging niet vatbaar neerslag van tripelphosphaat. Het werd evenwel afgefiltreerd en gewogen als magnesiumpyrophosphaat, waarbij 0.4 milligram $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ gevonden werd. Het praeparaat van calcium-nucleohiston was dus practisch vrij van tricalciumphosphaat te noemen.

In het natrium-nucleohiston kan alleen NaCl als verontreiniging voorkomen, daar deze door den alcohol er niet voldoende uitgewasschen wordt; aan eene geringe hoeveelheid NaCl in het praeparaat, is het dan ook waarschijnlijk toe te schrijven, dat het koolstof- en waterstofgehalte van de aschhoudende stof iets geringer gevonden werd dan bij het calcium-nucleohiston; daarentegen zijn de resultaten, wanneer ze op de aschvrije stof berekend worden, vrijwel gelijk.

Lilienfeld vond bij zijne analyses van het nucleohiston gemiddeld 48.46 % C en 7.00 % H.

Hoewel hij het niet uitdrukkelijk zegt, moet uit zijne beschrijving opgemaakt worden, dat hij deze getallen berekend heeft op de aschhoudende stof. Deze cijfers zijn belangrijk hooger dan die, welke ik gemiddeld voor het calcium-nucleohiston vond, n.l. 45.313 % C en 6.499 % H.

Het verschil kan niet alleen aan de verontreiniging van het praeparaat van *Lilienfeld* met nucleoproteïde worden toegeschreven, wanneer men in aanmerking neemt, dat het thymusextract ongeveer vier gewichtsdeelen nucleohiston tegen één gewichtsdeel van het nucleoproteïde bevat, welke verhouding in het met azijnzuur verkregen neerslag ongeveer dezelfde moet zijn. Volgens mijne bepalingen bevat het nucleoproteïde ongeveer 50 % koolstof op de aschhoudende stof; berekent men nu het koolstofgehalte van een mengsel van 4 deelen nucleohiston en één deel nucleoproteïde, dan vindt men 46.25 % C, wat met de uitkomst van *Lilienfeld* nog een verschil van 2.21 % maakt. De oorzaken van dit verschil zijn, naar ik meen, de volgende.

In de eerste plaats was het door mij gebruikte nucleohiston eene calciumverbinding en had dus een iets hooger moleculairgewicht dan het door *Lilienfeld* met azijnzuur geprecipiteerde, waardoor het koolstofgehalte natuurlijk iets lager wordt. Het verschil, hierdoor teweeggebracht, kan echter geen 2.21 % bedragen, daar het calciumgehalte van het calcium-nucleohiston slechts ruim 1.3 % bedraagt; toch zou het nucleohiston, wanneer het van calcium bevrijd was, ongeveer 0.6 % koolstof meer bevatten, waar door het verschil van 2.21 % op 1.61 % wordt teruggebracht.

In de tweede plaats is het mogelijk, dat het volgens

Lilienfeld bereide nucleohiston, behalve het nucleoproteïde nog ander eiwit als verontreiniging bevat; wordt n.l. het thymusextract met azijnzuur gepraecipiteerd, dan is de hoeveelheid eiwit in het filtraat gering en bedraagt zeker geen 11.9 % van de totale hoeveelheid eiwit in het thymusextract; (Zie blz. 40) bij eene tweede praecipitatie met azijnzuur is de hoeveelheid eiwit in het filtraat nog veel geringer. Het azijnzure neerslag sleept dus ander eiwit mede en is moeilijk daarvan te reinigen; het is nu mogelijk, dat dit eiwit eenigen invloed heeft gehad op het koolstof- en waterstof gehalte van het praeparaat.

Eene directe aanwijzing, dat bij de praecipitatie met azijnzuur allerlei stoffen mee neergeslagen worden, heeft men daarin, dat ook de bruine kleurstof van het thymusextract door het azijnzure neerslag wordt meegesleept; het praecipitaat is daardoor eenigszins bruin gekleurd, het filtraat is waterhelder. Daarentegen is het door CaCl_2 neergeslagen nucleohiston wit, terwijl het filtraat dezelfde bruine kleur vertoont als het oorspronkelijke extract. Nu is het waar, dat door de latere behandeling met alcohol en aether het azijnzure neerslag volkomen van de bruine kleurstof bevrijd kan worden; dit is echter, wanneer het neerslag met eiwit verontreinigd is, voor dit eiwit zeker niet het geval.

In de derde plaats bestaat de mogelijkheid, dat het koolstof- en waterstofgehalte door *Lilienfeld* werkelijk iets te hoog gevonden werd; eene koolstof- en waterstofbepaling; die ik gedaan heb van een praeparaat, dat volkomen volgens de methode van *Lilienfeld* bereid was, gaf als resultaat: 47.178 % C en 6.842 % H. Het aschgehalte van het praeparaat bedroeg 2.527 %, zoodat men, wanneer het koolstof- en waterstofgehalte

op de aschvrije stof berekend wordt, vindt: 48.406 % C en 7.021 % H.

Lilienfeld vond gemiddeld 48.46 % C en 7.00 % H. Wanneer dus *Lilienfeld* het koolstof- en waterstofgehalte ook berekend heeft op de aschvrije stof, wat uit zijne beschrijving echter niet af te leiden is, dan stemmen de resultaten nagenoeg volkomen overeen. Zijn de cijfers van *Lilienfeld* daarentegen berekend op de aschhoudende stof, dan bestaat er een verschil van 1.282 % C.

Daar het koolstof- en waterstofgehalte van de volgens *Lilienfeld* bereide stof afhankelijk is van de meerdere of mindere zuiverheid van het praeparaat, heb ik hierover geene nadere bepalingen gedaan.

Stikstof-bepalingen.

Deze werden gedaan volgens Kjeldahl. De stof werd met een mengsel van 500 c.c. sterk zwavelzuur en 100 grm. P_2O_5 onder toevoeging van een druppel kwikzilver gekookt. De ammoniak werd opgevangen in $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 . Als indicator bij het titreeren diende methyloorange. Er werden steeds dezelfde en zoo mogelijk ook dezelfde hoeveelheden vlocistoffen, die voor de bepaling noodig zijn, gebruikt. Drie vooraf uitgevoerde blinde proeven gaven ongeveer hetzelfde resultaat; gemiddeld werd 0.8 c.c. $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 verbruikt; hiermede is bij de opgave van de cijfers voor het verbruikte $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 rekening gehouden.

a. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat I.

0.4120 gr. droge stof verbruikte voor de neutralisatie van het ammoniak: 20.1 c.c. $\frac{1}{4}$ n- H_2SO_4 . Het stikstofgehalte is dus 17.075 %.

Daar het aschgehalte van dit praeparaat 7.008 % bedraagt, wordt het stikstofgehalte, berekend op de aschvrije stof: 18.363 %.

b. *Magnesium—nucleohiston.*

0.4583 gr. droge stof verbruikte voor de neutralisatie van het ammoniak 22.05 c.c. $\frac{1}{4}$ n— H_2SO_4 . Het stikstofgehalte is dus 16.839 %.

0.4366 gr. droge stof leverde 0.0376 gr. asch; het aschgehalte van dit praeparaat bedroeg dus 8.383 %. Berekent men het stikstofgehalte op de aschvrije stof, dan vindt men 18.379 %.

Het magnesium-nucleohiston bevat waarschijnlijk eene geringe hoeveelheid $Mg SO_4$, daar dit bij het uitwasschen met alcohol niet voldoende wordt opgelost. In overeenstemming hiermede is het stikstofgehalte te laag, wanneer het op de aschhoudende stof berekend wordt; het stemt daarentegen zeer goed overeen met dat van het calcium-nucleohiston, wanneer beide op de aschvrije stof worden berekend.

Lilienfeld vond voor het stikstofgehalte van zijne stof 16,86 %, dus 0.22 % minder dan voor het calcium-nucleohiston gevonden werd; bij het beoordeelen van dit verschil is weer in aanmerking te nemen, dat het praeparaat van *Lilienfeld* verontreinigd was met nucleoproteide, waarschijnlijk ook met ander eiwit en voorts, dat zijn nucleohiston geen calciumverbinding was.

Phosphorus bepalingen.

Hiervoor werd de stof geoxydeerd met salpeterzuur

en zwavelzuur, volgens de door *Neumann* ¹⁾ aangegeven methode. Het vrijgekomen phosphorzuur werd neergeslagen door molybdeenmengsel, waaraan ammoniumnitraat toegevoegd was, vervolgens, na oplossing, op de gewone wijze met magnesiainmixtuur geprecipiteerd en als magnesiumpyrophosphaat gewogen.

a. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat I.

1) 0.4069 gr. droge stof leverde:

$$0.0550 \text{ gr. Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 3.775 \text{ } \frac{\circ}{\circ} \text{ P.}$$

Daar het aschgehalte van dit praeparaat 7.008 $\frac{\circ}{\circ}$ bedraagt, wordt het phosphorus gehalte, berekend op de aschvrije stof 4.039 $\frac{\circ}{\circ}$.

2) 0.4067 gr. droge stof leverde:

$$0.0529 \text{ gr. Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 3.633 \text{ } \frac{\circ}{\circ} \text{ P.}$$

Berekend op de aschvrije stof wordt dit 3.888 $\frac{\circ}{\circ}$.

b. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat II.

0.4071 gr. droge stof leverde:

$$0.0560 \text{ gr. Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 3.842 \text{ } \frac{\circ}{\circ} \text{ P.}$$

0.4919 gr. droge stof leverde 0.0388 gr. asch; het aschgehalte van dit praeparaat bedraagt dus 7.888 $\frac{\circ}{\circ}$. Het phosphorusgehalte wordt dus, berekend op de aschvrije stof, 4.145 $\frac{\circ}{\circ}$.

Gemiddeld werd dus voor het calcium-nucleohiston een phosphorusgehalte gevonden van 3.750 $\frac{\circ}{\circ}$, berekend op de aschhoudende stof.

Op blz. 44 is reeds gezegd, dat het gehalte van het calcium-nucleohiston, praeparaat I, aan vrije phosphaten

1) Archiv. f. Anat. und Physiol. (Physiol. Abth). 1900, S. 159.

uiterst gering was. Op dezelfde wijze als daar is aangegeven, werd uit 0.3991 gr. van het calcium-nucleohiston, praeparaat II, slechts eene onweegbare hoeveelheid tripelphosphaat verkregen. Intusschen is het mogelijk, dat hierdoor de resultaten van de phosphorusbepalingen iets te hoog zijn; de fout blijft echter ver beneden 0.1 % en het verschil ligt dus binnen de grenzen van de toevallige fouten.

Lilienfeld vond gemiddeld 3.025 % P voor zijne stof; houdt men in het oog, dat deze voor ongeveer $\frac{1}{5}$ gedeelte uit nucleoproteide bestond, dat volgens mijne bepalingen ± 1 % P bevat, dan komen de door *Lilienfeld* en door mij gevonden resultaten vrij goed overeen.

Zwavelbepalingen.

De stof werd hierbij vooraf met salpeterzuur geoxydeerd, zooals door *Hammarsten* aangegeven is ¹⁾; hierbij werd evenwel de volgende modificatie aangebracht. In plaats van de stof in een bekerglas op het waterbad met salpeterzuur te verhitten, werd ze in een Kjeldahlkolfje met salpeterzuur boven eene kleine vlam zacht gekookt, terwijl, door voortdurend salpeterzuur toe te laten druppelen, gezorgd werd, dat de hoeveelheid salpeterzuur (± 10 c.c.) ongeveer constant bleef en er dus geen gevaar was voor ontwijken van zwavelzuur; wanneer de oxydatie zoo ver gevorderd was, dat geen roode dampen meer ontweken, werd het salpeterzuur voorzichtig tot op 6 à 7 cM³ ingedampt. Daarop werd zooveel natriumcarbonaat in het kolfje gebracht dat de kleur der vloeistof bruin werd en de reactie alkalisch geworden was; de vloeistof werd nu in een platinakroes gebracht

1) Zeitschr. f. Physiol. Chemie, Bd. 7, S. 227, Bd. 9, S. 273.

en verbrand. De asch werd opgelost in water en de oplossing tweemaal met eene groote overmaat van zoutzuur tot droog toe uitgedampt.

De oxydatie van het nucleohiston, zoowel als van het nucleoproteide met salpeterzuur geschiedt op deze wijze binnen enkele uren, terwijl de vloeistof niet spat en daardoor dus geen bezwaren worden veroorzaakt.

a. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat I.

0.8437 gr. droge stof leverde:

$$0.0308 \text{ gr. BaSO}_4 = 0.501 \text{ } \frac{\text{‰}}{\text{‰}} \text{ S.}$$

Daar het aschgehalte van dit praeparaat 7.008 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$ bedraagt, wordt het zwavelgehalte, berekend op de aschvrije stof 0.539 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$.

b. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat II.

0.7992 gr. droge stof leverde:

$$0.0301 \text{ gr. BaSO}_4 = 0.517 \text{ } \frac{\text{‰}}{\text{‰}} \text{ S.}$$

Daar het aschgehalte van dit praeparaat 7.888 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$ bedraagt, wordt het zwavelgehalte, berekend op de aschvrije stof 0.562 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$.

Het calcium-nucleohiston bevat dus gemiddeld **0.509** $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$ S, berekend op de aschhoudende stof.

Het nucleoproteide bevat, zooals later zal worden beschreven, 1.19 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$ S. *Lilienfeld* vond voor zijne stof: 0.701 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$ S; wanneer hiervan $\frac{1}{5}$ gedeelte nucleoproteide was, dan stemmen de resultaten zeer goed overeen.

Calciumbepalingen.

Hiervoor werd het calcium-nucleohiston goed gemengd met 5 $\frac{\text{‰}}{\text{‰}}$ azijnzuur; nadat het mengsel 1 à 2 uren

gestaan had, werd gefiltreerd door een aschvrij filter. Het filter met de stof werd met 5 % azijnzuur nagespoeld, totdat in het filtraat met kaliumoxalaat ook na 24 uur geen kalkreactie meer ontstond. Het bleek hierbij, dat reeds na tweemaal uitwasschen de laatste sporen calcium uit de stof verdwenen waren.

Het filter werd dus tweemaal achtereen met 5 % azijnzuur uitgewasschen, terwijl het derde waschwasser als controlevloeistof diende en met kaliumoxalaat, na afstomping van de zure reactie, ook na 24 uur geen neerslag meer gaf. Om te zien of al het calcium uit de stof verdwenen was, werd deze bij elke bepaling met het aschvrije filter verbrand; de asch werd uitgekookt met zoutzuur; nadat deze vloeistof alkalisch gemaakt was met ammoniak en daarna zwak zuur met azijnzuur, werd ze gefiltreerd; het filtraat gaf met kaliumoxalaat na 24 uur geen neerslag.

Men zou het calcium-nucleohiston ook direct hebben kunnen verbranden, om daarna de asch in zoutzuur op te lossen en in deze vloeistof de hoeveelheid calcium te bepalen. Eenige bepalingen op deze wijze gedaan, stemden echter niet overeen, terwijl het calciumgehalte steeds veel te laag werd gevonden; de reden hiervan is, dat de asch van het calcium-nucleohiston ook bij langdurig koken met zoutzuur slechts voor een deel oplost; hierdoor kan natuurlijk een gedeelte van het calcium in de asch opgesloten en onopgelost blijven.

a. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat I.

0.8028 gr. droge stof leverde:

0.0151 gr. CaO = 1.844 % Ca.

b. *Calcium-nucleohiston*, praeparaat II.

0.3991 gr. droge stof leverde:

$$0.0074 \text{ gr. CaO} = 1.324 \text{ } \% \text{ Ca.}$$

Bij de phosphorusbepalingen is er reeds op gewezen, dat deze praeparaten slechts eene uiterst geringe hoeveelheid phosphaat bevatten, dat waarschijnlijk als calciumphosfaat aanwezig was. Om, met het oog hierop, nog eene controlebepaling voor het calciumgehalte te hebben, werd calcium-nucleohiston op de volgende wijze bereid: het thymusextract werd met azijnzuur gepraecipiteerd; het praecipitaat werd, om het phosphorzuur te verwijderen, tweemaal met eene ruime hoeveelheid water uitgewasschen en daarna opgelost in water met zoo weinig mogelijk ammoniak. Uit deze oplossing werd het nucleohiston neergeslagen met calciumchloride; het neerslag werd met alcohol uitgewasschen totdat de wasch alcohol geen calciumchloride meer bevatte, daarna onder aether gebracht en gedroogd. In deze stof was, omdat ze slechts eenmaal met CaCl_2 neergeslagen was, waarschijnlijk nog een weinig nucleoproteide aanwezig; het zal echter later blijken, dat het nucleoproteide een calciumgehalte heeft, dat binnen de waarnemingsfouten gelijk is aan dat van het nucleohiston; zoodat deze geringe hoeveelheid nucleoproteide geene afwijking kon doen ontstaan.

Het calciumgehalte werd weer door extractie met 5 % azijnzuur bepaald.

0.7563 gr. droge stof leverde:

$$0.0142 \text{ gr. CaO} = 1.341 \text{ } \% \text{ Ca.}$$

Bij de vorige calciumbepalingen werd gevonden: 1.344 en 1.324 $\%$ Ca, welke cijfers met het bovenstaande zeer goed overeenstemmen, zoodat de mogelijke verontreiniging van de twee calcium-nucleohiston-prepareaten met calciumphosphaat te gering is geweest om invloed op de bepalingen te hebben. Bij de berekening is voor het atoomgewicht van calcium 40 genomen.

Gemiddeld werd dus voor het calciumgehalte gevonden: **1.336** $\%$ Ca.

N a t r i u m b e p a l i n g .

Op blz. 23 is reeds gezegd, dat het mogelijk is, het met azijnzuur neergeslagen nucleohiston met water uit te wasschen tot het waschwater neutraal reageert. Door toevoeging van alkali kan het neerslag dan weer opgelost worden, zonder dat de reactie alkalisch wordt; was de hoeveelheid alkali, b. v. natronloog, die voor de oplossing noodig was, bekend, dan kon daaruit het natriumgehalte van het natrium-nucleohiston worden berekend.

Deze hoeveelheid heb ik op de volgende wijze getracht te bepalen.

Uit het thymusextract werd het nucleohiston geprecipiteerd met calciumchloride; het neerslag werd opgelost in water met een paar druppels verdunde ammoniak en daarna weer geprecipiteerd met verdund azijnzuur, waardoor de calciumverbinding van het nucleohiston ontleed wordt. Het neerslag werd met gedistilleerd water uitgewasschen tot de reactie van het waschwater neutraal was geworden; om zeker te zijn, dat de reactie neutraal was, werd nog eens met eene ruime hoeveelheid water uitgewasschen, nadat met lakmoespapier geen

zure reactie meer in het waschwater was aan te toonen. Het praecipitaat werd daarna in een gewogen bekerglas gebracht en met gedistilleerd water gemengd tot een volumen van 225 c.c. Vervolgens werd uit eene buret $\frac{1}{10}$ n—NaOH toegevoegd onder omroeren van het mengsel. Als indicator, om aan te toonen, wanneer de reactie alkalisch werd, diende een druppel phenolphthalcine; de hoeveelheid van het neerslag, die nog onopgelost is kan ongeveer als maatstaf daarvoor dienen, hoeveel van het alkali nog toegevoegd moet worden. De alkalische reactie ontstond na toevoeging van 17.3 c.c. $\frac{1}{10}$ n—NaOH. Met gevoelig lakmoespapier werd tevens nog het alkalisch worden van de vloeistof gecontroleerd. In 225 c.c. van het laatste waschwater werd de roode kleur met phenolphthaleine zichtbaar na toevoeging van 0.15 c.c. $\frac{1}{10}$ n—NaOH; voor het oplossen van het nucleohiston was dus verbruikt 17.15 c.c. $\frac{1}{10}$ n—NaOH. Deze oplossing werd nu in het vooraf gewogen bekerglas tot droog toe ingedampt en vervolgens bij 110° op constant gewicht gebracht. Uit de gewichtsvermeerdering van het glas bleek, dat er 2.4902 gr. natrium-nucleohiston in aanwezig was (de geringe hoeveelheid, die verloren was gegaan, doordat een paar malen lakmoespapier in de vloeistof was gedoopt, is buiten rekening gelaten, evenzoo het droge gewicht van den druppel phenolphthaleine).

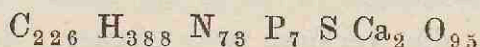
2.4902 gr. natrium-nucleohiston bevatte dus zooveel natrium als aanwezig is in 17.15 c.c. $\frac{1}{10}$ n—NaOH; dat is alzoo 39.445 milligram. Het natrium-nucleohiston bevat dus 1.584 % natrium. Dit gehalte komt overeen met 1.374 % calcium, terwijl bij de directe calciumbepalingen 1.336 % Ca werd gevonden.

Voor de samenstelling van het calcium-nucleohiston werd dus gemiddeld gevonden:

C	=	45.313	%
H	=	6.499	"
N	=	17.075	"
P	=	3.750	"
S	=	0.509	"
Ca	=	1.336	"

Daar de bepalingen van het calciumgehalte zeer overeenstemmende resultaten opleverden, zijn deze geschikt voor het berekenen van het moleculairgewicht van het nucleohiston. Onderstelt men, dat het nucleohiston één atoom calcium bevat, dan wordt het moleculairgewicht 2987. Uit het zwavelgehalte kan evenwel afgeleid worden, dat het ware moleculairgewicht aan een veelvoud van dit getal moet beantwoorden; bij een moleculairgewicht van 5974 komt 0.509 % S ongeveer overeen met één atoom zwavel.

Met het getal 5974 als grondslag wordt de verhoudingsformule van het nucleohiston:



Het is wel mogelijk dat het molecuul nucleohiston bovendien ijzer bevat. In dit geval zou alleen het cijfer voor de zuurstof in deze verhoudingsformule wijziging ondergaan.

De samenstelling van het nucleoproteide verschilt vrij aanzienlijk van die van het nucleohiston. Voor de elementaire analyse werd het nucleoproteide op de volgende wijze bereid.

Nadat uit het thymusextract het nucleohiston met calciumchloride was neergeslagen, werd uit het filtraat het nucleoproteide gepraecipiteerd met azijnzuur; het neerslag werd vermengd met ongeveer half zooveel water als waarin het vóór de praecipitatie met azijnzuur was opgelost en daarna door toevoeging van zoo weinig mogelijk ammoniak opgelost; de oplossing werd gefiltreerd; uit deze oplossing kon door calciumchloride een gedeelte worden neergeslagen; het neerslag werd afgecentrifugeerd en met alcohol uitgewasschen, totdat de waschalcohol geen CaCl_2 meer bevatte; daarna werd het praecipitaat onder aether gebracht en gedroogd. Het aldus verkregen praeparaat zal in het vervolg met den naam van calcium-nucleoproteide worden aangeduid.

Dat gedeelte van het nucleoproteide, dat bij de praecipitatie met CaCl_2 opgelost bleef, werd weer neergeslagen met azijnzuur; het neerslag, dat altijd grooter was dan het met CaCl_2 verkregen praecipitaat, werd met alcohol en aether uitgewasschen en gedroogd.

Koolstof- en waterstofbepalingen.

a. *Calcium-nucleoproteide*, praeparaat I.

0.4018 gr. droge stof leverde:

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.7357 \text{ gr. CO}_2 = 49.925 \% \text{ C} \\ 0.2564 \text{ gr. H}_2\text{O} = 7.093 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

0.4942 gr. droge stof leverde 0.0187 gr. asch.

Het aschgehalte van dit praeparaat bedroeg dus 3.784 %.

Het koolstof- en waterstofgehalte, berekend op de aschvrije stof, wordt alzoo: 51.900 % C en 7.369 % H.

b. *Calciumnucleoproteide*, praeparaat II.

0.4076 gr. droge stof leverde:

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.7427 \text{ gr. CO}_2 = 49.706 \% \text{ C} \\ 0.2744 \text{ gr. H}_2\text{O} = 7.483 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

0.4202 gr. droge stof leverde 0.0174 gr. asch; het aschgehalte van het praeparaat bedraagt dus 4.141 %, zoodat men voor het koolstof- en waterstofgehalte, berekend op de aschvrije stof, vindt:

$$51.844 \% \text{ C en } 7.804 \% \text{ H.}$$

c. *Nucleoproteide met azijnzuur neergeslagen*,
praeparaat I.

0.3555 gr. droge stof leverde:

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.6518 \text{ gr. CO}_2 = 50.004 \% \text{ C} \\ 0.2315 \text{ gr. H}_2\text{O} = 7.235 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

0.4145 gr. droge stof leverde 0.0134 gr. asch; het aschgehalte van het praeparaat bedraagt dus 3.233 %, waardoor het koolstof- en waterstofgehalte, berekend op de aschvrije stof, wordt:

$$51.675 \% \text{ C en } 7.477 \% \text{ H.}$$

d. *Nucleoproteide met azijnzuur neergeslagen*,
praeparaat II.

0.3875 gr. droge stof leverde:

$$\left\{ \begin{array}{l} 0.7128 \text{ gr. CO}_2 = 50.168 \% \text{ C} \\ 0.2486 \text{ gr. H}_2\text{O} = 7.123 \% \text{ H} \end{array} \right.$$

0.3945 gr. droge stof leverde 0.0118 gr. asch; het

aschgehalte van dit praeparaat bedroeg dus 2.991 %.

Het koolstof- en waterstofgehalte, berekend op de aschvrije stof, wordt alzoo:

51.716 % C en 7.348 % H.

Voor het calcium-nucleoproteide werd dus gemiddeld gevonden: (berekend op de aschhoudende stof)

49.816 % C en 7.288 % H

Voor het met azijnzuur neergeslagen nucleoproteide werd een koolstof- en waterstofgehalte gevonden van gemiddeld:

50.086 % C en 7.179 % H.

Het koolstofgehalte van het calcium-nucleoproteide is dus iets lager dan dat van het [met azijnzuur geprecipiteerde nucleoproteide; dit stemt overeen met de voorstelling, dat het eerste eene calciumverbinding is, terwijl deze verbinding bij het met azijnzuur neergeslagen nucleoproteide geheel of althans grootendeels ontleed zal zijn. Dat hetzelfde verschil niet bij de waterstof wordt waargenomen, is het gevolg van het abnorm hooge waterstofgehalte, dat bij de bepaling b. gevonden werd en dat waarschijnlijk is toe te schrijven aan het gebruik, bij de analyse, van niet voldoende uitgegloeid loodchromaat.

Stikstofbepalingen ¹⁾

a. Calcium-nucleoproteide, praeparaat I.

0.4085 gr. droge stof verbruikte voor de neutralisatie

1) Volgens Kjeldahl, zooals bij het nucleohiston is opgegeven.

van het ammoniak: 18.5 c.c. $\frac{1}{4}$ n— H_2SO_4 . Het stikstofgehalte is dus 15.851 $\%$. Daar het aschgehalte van dit praeparaat 3.784 $\%$ bedraagt, wordt het stikstofgehalte, berekend op de aschvrije stof: 16.476 $\%$.

b. *Nucleoproteide met azijnzuur neergeslagen,*
praeparaat I.

0.4671 gr. droge stof verbruikte voor de neutralisatie van het ammoniak: 21.5 c.c. $\frac{1}{4}$ n— H_2SO_4 . Het stikstofgehalte is dus 16.110 $\%$.

Het aschgehalte van dit praeparaat bedroeg 3.233 $\%$.

Op de aschvrije stof berekend, wordt dus het stikstofgehalte: 16.648 $\%$.

Het stikstofgehalte is bij het calcium-nucleoproteide lager dan bij het met azijnzuur gepraecepiteteerde nucleoproteide, wat althans weer voor een deel daaraan mag worden toegeschreven, dat het eerste eene calciumverbinding is.

Phosphorusbepalingen 1).

a. *Calcium-nucleoproteide*, praeparaat I.

0.9463 gr. droge stof leverde:

$$0.0319 \text{ gr. Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0.941 \%$$
 P.

Berekend op de aschvrije stof, wordt het P-gehalte 0.976 $\%$.

b. *Nucleoproteide met azijnzuur neergeslagen,*
praeparaat I.

1.0551 gr. droge stof leverde:

$$0.0365 \text{ gr. Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0.966 \%$$
 P.

1) Uitgevoerd, zooals bij het Nucleohiston beschreven is.

Berekend op de aschvrije stof wordt het P-gehalte 0.997 %.

Het phosphorusgehalte van het calcium-nucleoproteide zal natuurlijk iets hooger moeten zijn dan dat van het met azijnzuur neergeslagen nucleoproteide. Dit verschil blijkt echter bij berekening (het calcium-nucleoproteide bevat ongeveer 1.34 % Calcium) zoo gering te zijn, dat het geheel binnen de waarnemingsfouten valt. Men kan dus uit de beide bovenstaande bepalingen als het gemiddeld phosphorusgehalte van het nucleoproteide aangeven: **0.954** % P.

Zwavelbepalingen 1).

a. Calcium-nucleoproteide, praeparaat I.

0.7836 gr. droge stof leverde:

$$0.0703 \text{ gr. BaSO}_4 = 1.232 \% \text{ S.}$$

Berekend op de aschvrije stof wordt het S-gehalte 1.281 %.

b. Nucleoproteide met azijnzuur neergeslagen, praeparaat I.

0.8468 gr. droge stof leverde:

$$0.0706 \text{ gr. BaSO}_4 = 1.145 \% \text{ S.}$$

Berekend op de aschvrije stof wordt het S-gehalte 1.183 %.

Evenals bij de phosphorusbepalingen valt ook hier het theoretisch verschil, dat tusschen het zwavelge-

1) Uitgevoerd volgens de methode, die bij het nucleohiston beschreven is.

halte van het calcium-nucleoproteide en dat van het met azijnzuur neergeslagen nucleoproteide moet bestaan, geheel binnen de waarnemingsfouten.

Als gemiddeld zwavelgehalte van het nucleoproteide kan dus worden opgegeven **1.188** % S.

Calciumbepalingen.

Om het calciumgehalte te bepalen werd het nucleoproteide in een porseleinen kroes verbrand. De asch loste gemakkelijk op bij koken met zoutzuur. De vloeistof werd nu alkalisch gemaakt met ammoniak, daarna zwak zuur met azijnzuur, vervolgens gefiltreerd en het filter met gedistilleerd water uitgewasschen. Het calcium werd met kaliumoxalaat neergeslagen en als CaO gewogen.

a. *Calcium-nucleoproteide*, praeparaat I.

0.4942 gr. droge stof leverde:

$$0.0092 \text{ gr. CaO} = 1.330 \% \text{ Ca.}$$

b. *Calcium-nucleoproteide*. praeparaat II.

0.4202 gr. droge stof leverde:

$$0.0079 \text{ gr. CaO} = 1.343 \% \text{ Ca.}$$

Gemiddeld werd dus gevonden: **1.337** % Ca, welk cijfer zoo goed als geheel overeenstemt met het gehalte, dat voor het calcium-nucleohiston werd gevonden, n.l. 1.336 %.

De samenstelling van het calcium-nucleoproteide is dus gemiddeld:

C	=	49.816	%
H	=	7.288	"
N	=	15.851	"
P	=	0.954	"
S	=	1.188	"
Ca	=	1.337	"

terwijl het calcium-nucleohiston bleek te bestaan uit:

C	=	45.313	%
H	=	6.499	"
N	=	17.075	"
P	=	3.750	"
S	=	0.509	"
Ca	=	1.336	"

Het calciumgehalte van het nucleoproteide kan ook weer dienen ter berekening van het moleculair gewicht.

Bevat het nucleoproteide één atoom calcium, dan wordt het moleculair gewicht 2980.

Wanneer het molccuul twee atomen zwavel bevat, dan moet dit getal verdubbeld worden. De verhoudingsformule van het nucleoproteide wordt dan met het getal 5960 als grondslag:



terwijl voor die van het nucleohiston gevonden is:



**Het vermogen van het nucleohiston en het nucleoproteïde
uit het thymusextract om als fibrineferment
te werken.**

Lilienfeld geeft aan, dat het met azijnzuur neergeslagen nucleohiston niet in staat is, in fibrinogeenhoudende vloeistoffen stolling te veroorzaken. Wel kan het nucleohiston volgens hem uit het fibrinogeen thrombosine afsplitsen, dat, door zich met calciumzouten te verbinden, in fibrine overgaat.

Nadat echter *Hammarsten* had aangetoond, dat fibrine geen calciumverbinding is en *Cramer* de identiteit van thrombosine met fibrinogeen had bewezen, was het zeker, dat de calciumzouten niet op de door *Lilienfeld* aangegeven wijze tot de stolling medewerkten.

Aan den anderen kant was door *Arthus* en *Pagès* aangetoond, dat calciumzouten voor het stollingsproces noodzakelijk waren.

Reeds vóór *Lilienfeld* zijne theorie over de stolling opstelde, had prof. *Pekelharing* ¹⁾ gevonden dat de kalkzouten voor de vorming van het fibrineferment uit het zymogeen noodig waren. Hij vatte het ferment op als eene kalkverbinding van het zymogeen en stelde vast, dat het zymogeen uit het bloed een nucleoproteïde was. Voorts toonde hij aan, dat ook andere nucleopro-

1) Onderz. Physiol. Laborat. te Utrecht, vierde reeks, deel I, p. 77 en II, p. 1.

teiden, o. a. de door azijnzuur uit het thymusextract neergeslagen stof, in staat waren om met behulp van kalkzouten stolling te veroorzaken, zonder kalkzouten echter geene merkbare verandering in fibrinogeen te weeg brachten. Het in de thymus aanwezige zymogeen scheen dus ook weer, door zich met calcium te verbinden, in ferment te kunnen overgaan.

De meening, dat de nucleoproteïden uit de thymus zich met calcium kunnen verbinden is, na hetgeen in de vorige bladzijden is aangetoond, niet meer te betwijfelen.

Zooals gezegd, was door prof. *Pekelharing* reeds gevonden, dat deze verbinding als fibrineferment kan werken.

Bij eene herhaling dezer proeven, die ik ondernam om de beteekenis van de calciumzouten nader te onderzoeken, bleek het, dat voor de werking der nucleoproteïden uit thymus een bepaald gehalte aan calciumzout als optimum te beschouwen is.

Ten bewijze hiervan dienen de volgende met hetzelfde thymusextract en hetzelfde fibrinogeen genomen proeven, waarbij in een reageerbuisje steeds 2 c.c. van het extract gemengd werden met 4 c.c. fibrinogeen oplossing, die met CaCl_2 alléén niet stolde; daarna werden verschillende hoeveelheden CaCl_2 toegevoegd. De mengsels werden in een waterbad van 37° geplaatst.

- | | | |
|----|---|---|
| a. | 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen | } geene stolling |
| b. | 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
2 druppels 1 % CaCl_2
(1 druppel = 0.06 c.c.) | } Na 2 uren is 't mengsel nog vloeibaar, na \pm 18 uren is een gering stolsel ontstaan. |

c. 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
1 druppel 10 0/0 CaCl₂ } Volkomen stolling
na 1¹/₂ uur.

d. 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
3 druppels 10 0/0 CaCl₂ } Stolling na 2 uren.

e. 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
5 druppels 10 0/0 CaCl₂.

Na 3 uren is het mengsel nog volkomen vloeibaar;
na \pm 18 uren bleek een niet zeer vast stolsel aanwezig te zijn.

f. 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
8 druppels 10 0/0 CaCl₂ } Het mengsel
blijft
vloeibaar.

g. 2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
12 druppels 10 0/0 CaCl₂ } Het mengsel
blijft
vloeibaar.

Dat in de laatste twee gevallen het niet de verhooging van het zoutgehalte was, welke de stolling tegenhield, blijkt nog uit de volgende proef.

2 c.c. extract
4 c.c. fibrinogeen
1 druppel 10 0/0 CaCl₂
4 druppels verzadigde
keukenzoutoplossing } stolling
na \pm 3 uren.

Uit het volumen van de gebruikte mengsels en de bekende hoeveelheden CaCl_2 , welke toegevoegd werden, kan men berekenen, dat de stolling door middel van het thymusextract het best geschiedt bij een gehalte van 0.1 à 0.3 % CaCl_2 , dat bij een gehalte van \pm 0.5 % CaCl_2 de stolling sterk vertraagd wordt en bij een gehalte van \pm 0.8 % CaCl_2 geheel achterwege blijft.

Bij de bovenbeschreven proeven werd het onveranderde thymusextract gebruikt; ik heb nu ook voor het nucleohiston en het nucleoproteide afzonderlijk het vermogen om stolling te veroorzaken, onderzocht.

Wordt het nucleohiston tweemaal gepraecipiteerd met 0.1 % CaCl_2 en een weinig van het neerslag gevoegd bij eenige c.c. fibrinogeen, dan lost het door het keukenzoutgehalte van het fibrinogeen op en na korteren of langeren tijd treedt de stolling in; maar ook hier bleek het weer, dat de stolling sneller en zekerder voor den dag kwam, wanneer het gehalte aan CaCl_2 in het mengsel ongeveer 0.1 % bedroeg.

De beste manier om het nucleohiston als fibrineferment te laten werken is dus deze, dat men het met 0.1 % CaCl_2 praecipiteert, daarna iets van het neerslag vermengt met de fibrinogeenoplossing en vervolgens zooveel CaCl_2 toevoegt, dat het mengsel \pm 0.1 % CaCl_2 bevat. (De geringe hoeveelheid CaCl_2 , die te gelijk met het nucleohiston in het mengsel gebracht wordt, kan, wanneer althans niet te veel nucleohiston gebruikt wordt, verwaarloosd worden.)

Wanneer het nucleohiston uit het thymusextract wordt neergeslagen door middel van CaCl_2 en uit het filtraat het nucleoproteide wordt gepraecipiteerd met azijnzuur, dan kan dit, na oplossing in water met zoo weinig

mogelijk ammoniak, met behulp van calciumzouten stolling veroorzaken; ook hier bleek eene concentratie van ± 0.1 % CaCl_2 in de stollingsvloeistof de meest gewenschte te zijn.

Na hetgeen gezegd is over het vermogen van het thymusextract en de daaruit verkregen nucleoproteiden om als fibrineferment te werken, blijkt dat deze werking het best plaats heeft bij een gehalte van 0.1 tot 0.3 % CaCl_2 ; dit is juist de concentratie van CaCl_2 , waarbij het nucleohiston volkomen en het nucleoproteide althans zooveel mogelijk uit eene overigens zoutvrije oplossing gepraecipiteerd worden; daarentegen begint de stollende werking aanmerkelijk te verzwakken bij een gehalte van 0.5 % CaCl_2 , de concentratie, waarbij het nucleohiston in eene overigens zoutvrije oplossing nog juist gepraecipiteerd blijft of misschien ook al begint op te lossen.

Bij een gehalte van ± 0.8 % of meer CaCl_2 komt de stolling niet tot stand; bij dit gehalte is het nucleohiston in eene overigens zoutvrije oplossing althans voor een deel weer opgelost.

Door prof. *Pekelharing* werd het fibrineferment uit bloed bereid door het uit 't met water verdunde bloedserum te praecipiteeren met azijnzuur; er werd zooveel azijnzuur toegevoegd, dat de serumglobuline weer oplostte; het ferment, een nucleoproteide, blijft dan nog gepraecipiteerd en kan in water met een spoor alkali opgelost worden.

Ik heb nagegaan of uit de zoo verkregen oplossing het nucleoproteide met CaCl_2 te praecipiteeren is; dit bleek het geval te zijn; evenals het nucleohiston praecipiteert het nucleoproteide uit bloed 't best bij een gehalte van 0.1 % CaCl_2 . Het neerslag was nu in

water na toevoeging van een paar druppels verdunde ammoniak oplosbaar. Uit deze oplossing kan het nucleoproteide weer door CaCl_2 worden neergeslagen. Het neerslag lost op in 0.2 % HCl en geeft bij behandeling met pepsine en zoutzuur een praecipitaat.

In overmaat van CaCl_2 lost het nucleoproteide uit bloed iets gemakkelijker op dan het nucleohiston. Het begint n.l. reeds op te lossen in 0.3 à 0.4 % CaCl_2 en is in 0.8 % CaCl_2 geheel weer opgelost.

BaCl_2 en MgSO_4 kunnen het nucleoproteide even goed als CaCl_2 doen neerslaan. Ook NaCl veroorzaakt een praecipitaat.

Om te onderzoeken of het met CaCl_2 neergeslagen nucleoproteide eene calciumverbinding was, heb ik deze op de volgende wijze bereid.

Bloedserum werd met twee volumina water verdund; daarna werd het nucleoproteide neergeslagen met azijnzuur; het neerslag werd opgelost in water met zoo weinig mogelijk ammoniak. De oplossing werd gefiltreerd. Uit het filtraat werd het nucleoproteide gepraecipiteerd met CaCl_2 ; het praecipitaat werd in water met een paar druppels verdunde ammoniak opgelost en de oplossing weer gefiltreerd. Hierna werd het nucleoproteide voor de tweede maal met CaCl_2 neergeslagen; het neerslag werd met alcohol uitgewasschen, totdat de waschalcohol geen CaCl_2 meer bevatte, daarna werd het onder aether gebracht en gedroogd. In de asch van de gedroogde stof is eene groote hoeveelheid calcium aanwezig. Het met CaCl_2 neergeslagen nucleoproteide moet dus als eene calciumverbinding worden opgevat.

Evenals bij het nucleohiston, heeft het gehalte aan calciumzouten ook invloed op het vermogen van het

nucleoproteide uit bloedserum om stolling te veroorzaken.

Om dit aan te toonen werd de volgende proef genomen.

900 c.c. runderbloed werden opgevangen in 100 c.c. 10 % CaCl_2 ; het bloed bleef nu vloeibaar; het had een gehalte aan CaCl_2 van ongeveer 1 % . De totale hoeveelheid zout in dit bloed was dus ongeveer 1.9 % ; bij dit zoutgehalte is het bloed overigens nog zeer goed in staat te stollen. Om hiervan evenwel zeker te zijn werden 900 c.c. bloed van hetzelfde rund opgevangen in 30 c.c. verzadigde keukenzoutoplossing, die met water tot 100 c.c. aangevuld waren. Dit bloed stolde op de gewone wijze, ofschoon het een even groot procentgehalte aan zout bevatte als het in CaCl_2 opgevangen bloed. Van dit laatste werden nu de bloedlichaampjes afgecentrifugeerd; op deze wijze werd een CaCl_2 -plasma verkregen, dat spontaan niet stolde, doch wel bij verdunning met water. Door eene overigens werkzame oplossing van Schmidt's ferment kon het CaCl_2 -plasma niet tot stolling gebracht worden.

Door toevoeging van verschillende hoeveelheden water aan het plasma in reageerbuisjes, werd nu de geringste verdunning gezocht, waarbij het plasma nog stolde. De buisjes werden in een waterbad van 37° geplaatst.

- | | | | |
|----|---------------|---|--------------------------------------|
| a. | 3 c.c. plasma | } | geene stolling |
| | 1 c.c. water | | |
| b. | 3 c.c. plasma | } | geringe stolling na \pm 14 uren |
| | 2 c.c. water | | |
| c. | 3 c.c. plasma | } | vrij goede stolling na \pm 14 uren |
| | 3 c.c. water | | |

- d. 3 c.c. plasma }
 6 c.c. water } finke stolling na \pm 14 uren
- e. 3 c.c. plasma }
 9 c.c. water } na een kwartier is een stevig
 stolsel ontstaan
- f. 3 c.c. plasma }
 12 c.c. water } finke stolling na een kwartier.

Uit deze proeven blijkt, dat de grens van verdunning waarbij het plasma stolt, ligt tusschen één en twee c.c. water op 3 c.c. plasma, dus bij een gehalte aan CaCl_2 van ongeveer 0.75 à 0.6 % CaCl_2 , terwijl bij een gehalte van 0.25 en 0.2 % CaCl_2 zeer snel stolling ontstaat.

Ook hier ziet men dus, dat de stolling het snelst en het best tot stand komt bij dat gehalte aan CaCl_2 , waarbij het nucleoproteide uit bloedserum uit eene overigens zoutvrije oplossing neergeslagen wordt. Bij een gehalte van 0.75 % CaCl_2 , waarbij het door calciumchloride neergeslagen nucleoproteide zoo goed als geheel opgelost is, blijft de stolling achterwege.

Men heeft wel betwijfeld of het fibrineferment inderdaad een nucleoproteide is en gemeend, dat het misschien eene stof was, waarmede het nucleoproteide voortdurend verontreinigd was. Uit de bovenstaande proeven volgt, dat zoowel het nucleohiston als het nucleoproteide uit bloed zich ten opzichte van kleinere en grootere hoeveelheden CaCl_2 gedragen op eene wijze, die volkomen vergelijkbaar is met de wijze waarop het fibrineferment zich gedraagt bij toevoeging van kleinere of grootere hoeveelheden CaCl_2 .

Wanneer in eene overigens zoutvrije oplossing van nucleohiston of van het nucleoproteide geen calciumzout

aanwezig is, dan veroorzaken zij geene stolling. Bij een zeer gering gehalte aan CaCl_2 praecipiteeren ze gedeeltelijk en veroorzaken eene langzame of geringe stolling; bij een iets hooger gehalte aan CaCl_2 n.l. 0.1 à 0.3 % CaCl_2 worden ze het volledigst gepraecipiteerd en ontstaat ook snel een stevig stremsel.

Bij een gehalte van 0.5 à 0.6 % CaCl_2 blijft het nucleohiston nog even gepraecipiteerd of lost misschien reeds op en is het nucleoproteide zeker voor een groot deel weer opgelost; de stolling komt nu langzaam tot stand. Bij een gehalte van 0.8 % CaCl_2 is het nucleoproteide geheel, het nucleohiston althans voor een groot deel weer opgelost en blijft de stolling geheel achterwege.

Vangt men het bloed op in eene oplossing van CaCl_2 , om door verdunning na te gaan, bij welk gehalte van CaCl_2 het fibrineferment uit het bloed stolling kan veroorzaken, dan is het noodig de proeven te doen met het plasma.

Wordt n.l. bloed in eene CaCl_2 oplossing opgevangen, zoó dat het ongeveer 1 % CaCl_2 bevat, dan blijft het wel 12 tot 24 uren vloeibaar, doch stolt ten slotte toch. De reden hiervan zal waarschijnlijk daarin gelegen zijn, dat langzamerhand meer en meer van het nucleoproteide uit de bloedlichaampjes vrijkomt, waardoor de gelegenheid tot vorming van ferment gunstiger wordt.

Gebruikt men voor de stollingsproeven het niet van bloedlichaampjes bevrijde bloed, dan kan alleen aangetoond worden, dat de stolling bij verdunning sneller geschiedt dan in het onverdunde bloed.

Door prof. *Pekelharing* werd aangetoond, dat verdund magnesiumsulfaatplasma 't welk spontaan niet stolde, door toevoeging van fibrineferment, dus door de calcium-

verbinding van het nucleoproteide tot stolling gebracht kan worden. Hij leidde hieruit af, dat er in het Mg SO_4 -plasma geen ferment aanwezig was; wanneer bloed opgevangen werd in Mg SO_4 oplossing, dan werd het vrijkomende nucleoproteide volgens hem door het Mg SO_4 verhinderd zich met het calcium te verbinden. Deze meening wordt nog nader bevestigd door de bovenbeschreven waarneming, dat magnesiumsulfaat het nucleoproteide evengoed neerslaat als calciumchloride, dat dus de magnesiumverbinding even gemakkelijk schijnt tot stand te komen als de calciumverbinding.

Men moet zich dus voorstellen, dat bij het opvangen van bloed in eene Mg SO_4 oplossing, het vrijkomende nucleoproteide zich, wegens de groote overmaat van magnesiumzout ten opzichte van de minimale hoeveelheden calciumzout in het bloed, alleen verbindt met magnesium, welke verbinding niet als ferment werkt.

Wanneer deze meening juist is, moet ook baryumchloride de stolling van het bloed kunnen beletten en moet het BaCl_2 -plasma ook na verdunning niet stollen. Dit is inderdaad het geval.

Wordt een liter bloed opgevangen in 100 c.c. van eene verzadigde oplossing van BaCl_2 , dan stolt het niet. Nadat de bloedlichaampjes afgecentrifugeerd zijn, kan het BaCl_2 -plasma verdund worden zonder dat het stolt.

Door toevoeging van CaCl_2 kan men het verdunde BaCl_2 -plasma doen stollen, zooals dit ook met het verdunde Mg SO_4 -plasma het geval is.

De beste stolling ontstaat in het verdunde BaCl_2 -plasma ook weer, wanneer het mengsel 0.1 tot 0.5 % CaCl_2 bevat, zooals uit de onderstaande proeven blijkt.

gehalte van 0.5 % of meer van deze zouten bevatte. *Horne* gebruikte bij zijne proeven het bloed zelf, niet het daaruit te verkrijgen plasma.

Men ziet, dat het door hem aangegeven gehalte van 0.5 % aardalkalizout, waarbij de stolling belemmerd wordt, althans wat het calciumchloride betreft, zeer goed overeenstemt met mijne resultaten, waaruit ook blijkt, dat bij een gehalte van 0.5 % CaCl_2 de stolling sterk vertraagd wordt.

STELLINGEN.

I.

Het protoplasma bezit niet, zooals *Bütschli* meent, eene met schuim overeenkomende structuur.

II.

Bij de kerndeeling wijken de kernlissen uiteen, doordat de spoeldraden, waaraan zij bevestigd zijn, langer worden.

III.

Het is waarschijnlijk, dat in het lichaam uit vet koolhydraat kan ontstaan.

IV.

De electriche verschijnselen, die aan de zenuw kunnen waargenomen worden, laten zich geheel verklaren, wanneer men aanneemt, dat de zenuw een onvolkomen geïsoleerde geleider, een z.g. kerngeleider is.

II

V.

De theorie van *Verworn* omtrent de oorzaken van de beweging van het levende protoplasma is onjuist.

VI.

De meening van *Asher*, volgens welke de afscheiding van lympe gedeeltelijk door filtratie, gedeeltelijk door secretie geschiedt, is als juist te beschouwen.

VII.

De bouw van de lever, zooals deze door *Hering* beschreven wordt, komt, wat den loop der bloedvaten betreft, niet met de waarnemingen aan microscopische praeparaten overeen.

VIII.

De door immigratie gevormde gastrula is als het oorspronkelijke gastrulatype te beschouwen.

IX.

De beteekenis van den pulsus intermittens kan uit de door physiologen aangaande de hartswerking vastgestelde feiten opgehelderd worden.

X.

Leucaemie is eene infectieziekte, veroorzaakt door protozoen.

XI.

Het pigment, dat bij Morbus Addisonii gevormd wordt, is uit het bloed afkomstig.

XII.

Het haemorrhagisch infarct van de long ontstaat, zooals *Cohnheim* aannam, doordat bloed uit de vena pulmonalis terugstroomt.

XIII.

Het in den loop van verschillende ziekteprocessen gevormde amyloid is eene stof, die uit het bloed in de weefsels wordt afgezet.

XIV.

De theorie van *Tscherning* over het mechanisme van de accommodatie is onjuist.

XV.

De behandeling van lupus met Röntgenstralen is niet te verkiezen boven de behandeling met den thermocauter.

XVI.

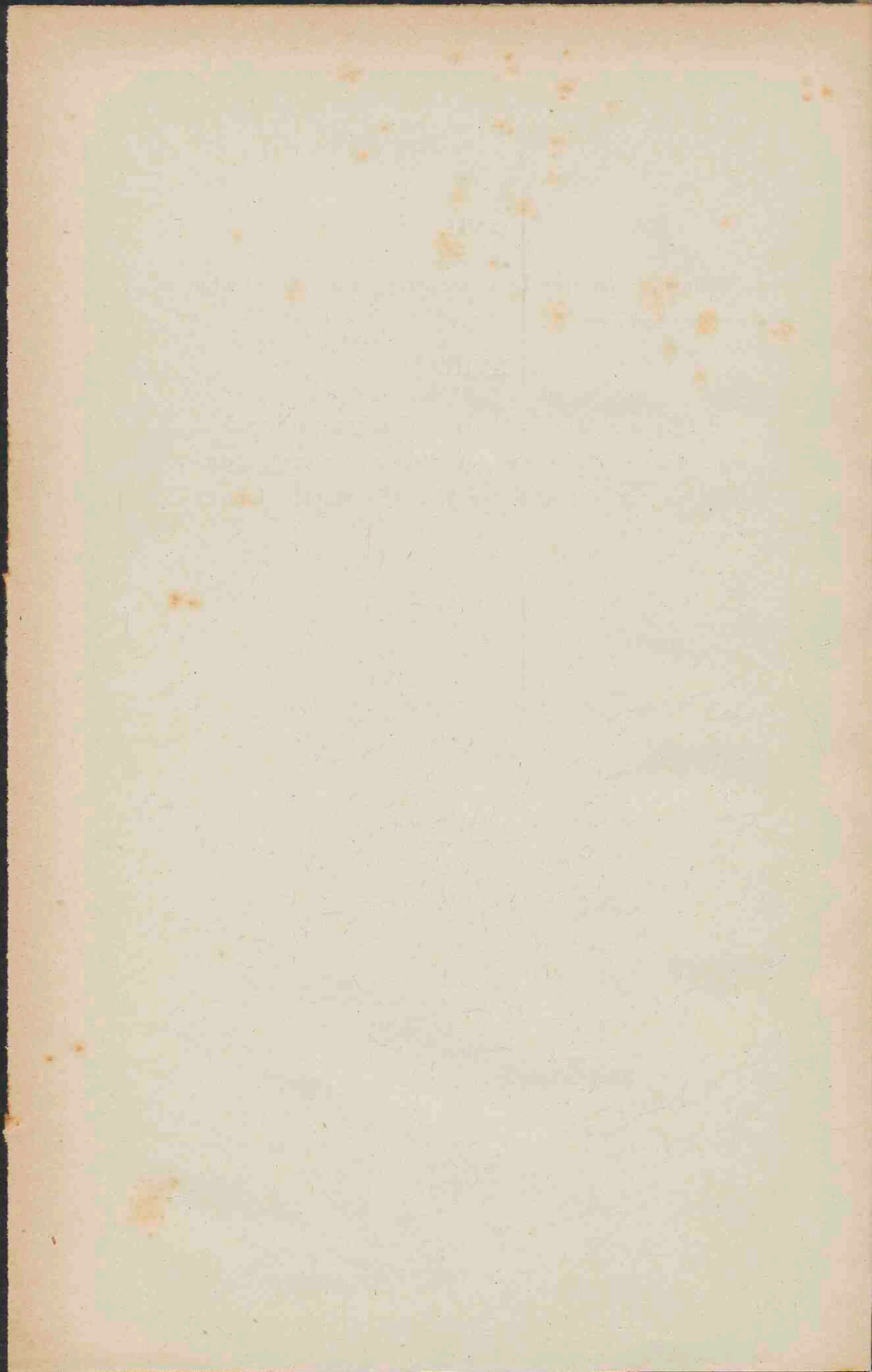
Voor het steriliseeren van catgut is de door *Elsberg* (Centrbl. f. Chirurgie, 1900, S. 537.) aangegeven methode het meest aan te bevelen.

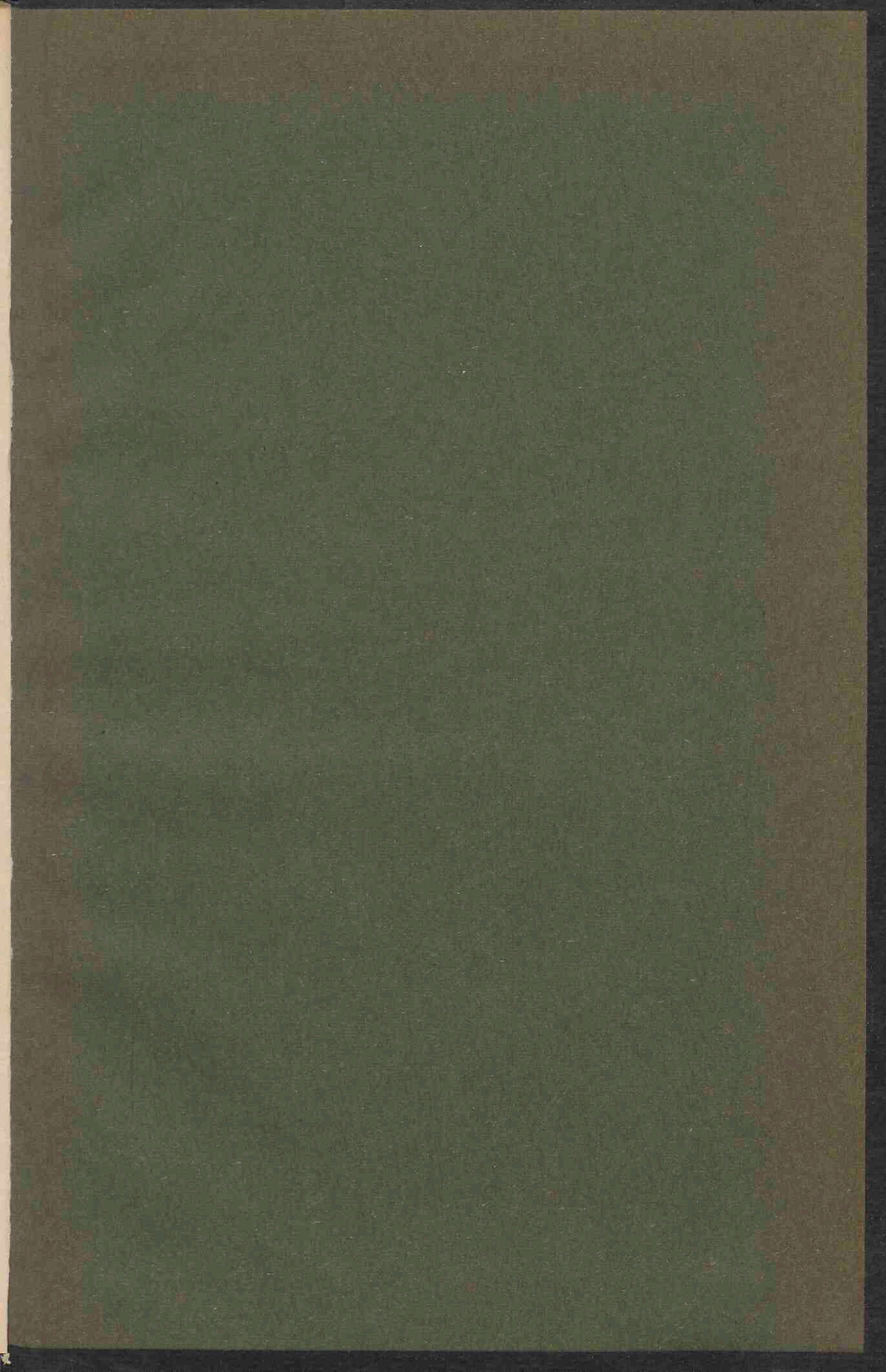
XVII.

Eclampsia puerperalis is het gevolg van eene retentie van leucomainen.

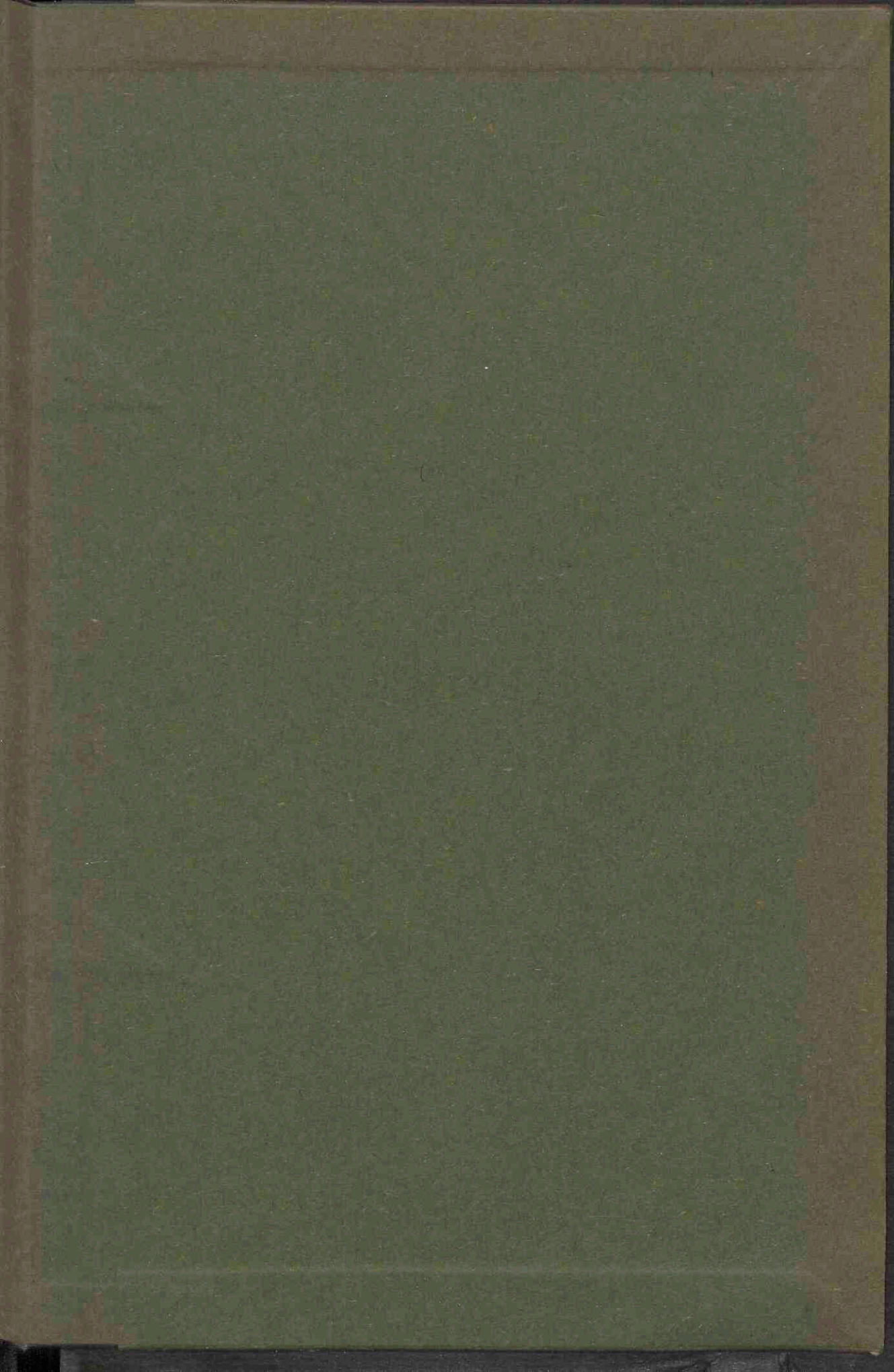
XVIII.

Het is wenschelijk, dat schoolbanken zoo ingericht zijn, dat ze afwisselend tot zitten met voorste steunpunt en tot zitten met achterste steunpunt kunnen dienen.









A