



# Bijdrage tot de kennis van het haemolytisch systeem

<https://hdl.handle.net/1874/274800>

d 192

6 Jul 1921

**BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN  
HET HAEMOLYTISCH SYSTEEM**



Diss.  
Utrecht  
1921

**J. KOOPMAN**







BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN  
HET HAEMOLYTISCH SYSTEEM

VERBODEN TOEGANG TOT DE KUNSTEN VAN  
HET NEDERLANDSCHE SYSTEEM

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT



1394 5229

*Diss. Utrecht 1921*

# BIJDRAGE TOT DE KENNIS VAN HET HAEMOLYTISCH SYSTEEM

---

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD  
VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-  
UNIVERSITEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN  
RECTOR MAGNIFICUS DR. W. VOGELSANG, HOOGLEE-  
RAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBE-  
GEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER  
UNIVERSITEIT, TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE  
FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP  
WOENSDAG 6 JULI 1921, DES NAMIDDAGS TE 5 UUR,

DOOR

JIM KOOPMAN, ARTS,  
GEBOREN TE ROTTERDAM

---







*Aan mijn Schoonmoeder.*



De gewoonte om aan een proefschrift een enkel woord van dank te laten voorafgaan volg ik gaarne.

U, Hooggeleerde Eykman, geldt dit in de eerste plaats, niet slechts voor Uw welwillendheid om als mijn promotor te willen optreden, maar bovenal voor het vele wat ik van U heb kunnen leeren. Uw nimmer onaangenaam treffende kritiek, Uw hulpvaardigheid, de aangename gemoedelijke toon, die op Uw laboratorium heerscht, dat alles is reden te over voor mijn dankbaarheid.

U, Professor Pekelharing, dank ik voor de mij geschonken gelegenheid om mij in Uw laboratorium met physiologisch-chemisch werk bezig te houden.

Voor alles echter een woord van dank aan U, waarde Steensma. Als ik ooit in onze wetenschap iets zal bereiken, zal ik dit voor een zeer groot deel aan U te danken hebben. Uw veelomvattende kennis, Uw soms verbluffende handigheid bij het experimenteren, Uw humane wijze van omgaan met ieder die in Uw laboratorium werkzaam is, hebben de jaren dat ik onder Uwe leiding werkte, onvergetelijk gemaakt. Al was het slechts om deze reden, dan nog zou het voor mij een genoegen zijn te promoveeren, omdat het mij de gelegenheid verschaft U openlijk te danken voor het vele dat ik onder Uwe leiding heb kunnen leeren en de aangename wijze waarop dit geschiedde.

Nog één naam mag ik niet voorbijgaan. Ook aan U, overste Hagen, een woord van dank. Gij waart één dier weinige chefs van militaire hospitalen, die hun officieren van

gezondheid niet als luitenants maar als jongere collega's beschouwen. Wij, officieren van gezondheid, waren Uwe assistenten, gij de directeur. De besprekingen die gij met ons aan het ziekbed of aan de sectietafel hield, waren doorwerkt als een klinisch college en steeds uiterst leerzaam en belangrijk. Hoe dikwijls wist gij ons niet door een enkele opmerking verbaasd te doen staan over Uw groote kennis, en in de ziekenzaal, in het laboratorium, bij een sectie of operatie, steeds merkten wij hoe veelomvattend die kennis was.

Ten slotte mijn dank aan allen die tot mijn opleiding hebben bijgedragen en aan de Heeren Van der Walle en Vitringa, die mij tijdens het bewerken van dit proefschrift zoo vaak behulpzaam waren.

## INLEIDING.

Het verloop van de geschiedenis der immuniteitsleer is zeer merkwaardig. Begonnen met enkele eenvoudige feiten te constateeren, is de immuniteitsleer geleidelijk steeds gecompliceerder geworden. Geen onderwerp op dit gebied, hoe klein ook, of er zijn ter verklaring steeds een aantal (en vaak is dat aantal niet gering) theorieën opgesteld, die niet zelden elkander lijnrecht tegenspreken. Menig onderzoeker van naam heeft in dezen strijd een veer en soms zelfs wel eens meer veeren gelaten en vooral de oudere publicaties over immuniteitsvraagstukken geleken soms meer op een wit-, blauw- of groenboek van één of ander mogendheid, die in oorlog zijnde, de schuld op iedereen behalve zich zelf tracht te wentelen, dan op werkelijk wetenschappelijk werk. Wie deze uitdrukking overdreven vindt sla b.v. Abderhalden's „Abwehrfermente" er maar eens op na. Toch kunnen we uit deze oneenigheden één belangrijk besluit trekken, n.l. dat de immuniteitsvraagstukken zeker samengestelder zijn dan men wel eens gemeend heeft. Terwijl nu sommige punten der serologie met veel, ja zelfs kermisachtige reclame den volke kond gedaan, al weer aan het verdwijnen zijn (ook hier denk ik aan de Abwehrfermente, waarin zeker iets moois zit, maar waarbij wat minder geestdrift geen kwaad gedaan had), zijn er te midden van de tallooze theorieën, feitjes, kibbelarijtjes der immuniteitsleer enkele belangrijke hoogtepunten, die van groote beteekenis mogen worden geacht. Ik denk hier wel in de allereerste plaats aan de reactie van Bordet en Gengou: aan de complement-binding. Waar het aantal boeken en boekjes, dat zich met deze reactie bezig houdt, groot is, geloof ik te kunnen volstaan met daarnaar te verwijzen, wat de geschiedenis van dit vraagstuk betreft. Bordet en Gengou vonden dat, indien antigeen en het daarbij behoorend specifieke antilichaam wor-

den tezamen gebracht, het in het mengsel aanwezig complement wordt gebonden. Hier zij mij eerst een korte opmerking veroorloofd. In deze studie zal herhaaldelijk sprake zijn van complement. Ik ben mij bewust, mij hiermede niet geheel juist uit te drukken. Sinds de onderzoekingen van Ferrata en Brand is er twijfel gerezen of men het recht heeft, het complement als één enkele stof te beschouwen. Het is Ferrata gelukt het complement in twee stukken, door hem eind- en middenstuk genoemd, te splitsen. Het schijnt, dat niet beide stukken, doch slechts het middenstuk bij de complement-binding betrokken is.

Ik zal voorloopig kortweg van complement spreken, en het middenstuk eindstuk vraagstuk voor een afzonderlijk hoofdstuk bewaren.

De vraag of er één of vele complementen zijn, is voor mijn onderwerp zonder belang; immers het complement, dat bij de reactie van Bordet en Gengou een rol speelt, is het z.g. haemolytische complement; andere eventueel verschillende complementen kunnen we rustig, als niet ter zake dienende, voorbijgaan.

Bij samentreffen van antigeen, antilichaam en complement wordt dus dit laatste gebonden. Het komt er nu slechts op aan, een wijze te vinden om dit proces binnen onze waarneming te brengen. Ascoli heeft hiervoor zijn meiestagminreactie aangegeven. Weichardt bedacht de epiphaninereactie. Beiden hebben weinig opgang gemaakt, waaraan de gecompliceerdheid van de epiphaninereactie en de moeilijkheid om een bruikbaar antigeen voor de meiestagminreactie te krijgen wel schuld zullen hebben. De epiphaninereactie heb ik nimmer uitgevoerd, doch de meiestagminereactie is, mits met zorg verricht, bruikbaar. Een andere door Streng aangegeven methode, om in plaats van het haemolytisch systeem gebruik te maken van de conglutinatiereactie van runderserum schijnt wel bruikbaar doch moeilijk af te lezen te zijn. Er is nog een mogelijkheid om in sommige gevallen het samentreffen van antigeen en antilichaam aan te toonen, n.l. het aantoonen van „Abwehrfermente”. Waarom zou men bij de zwangerschapreactie volgens Abderhalden niet het in de bloedbaan dringende placentaewit als antigeen en de Abwehrfermente als antilichaam kunnen beschouwen. Zelfs in de immuniteits-

leer in engeren zin zou deze techniek beteekenis hebben. Ik herinner slechts aan de onderzoeken van Krimm (1) en Ammenhäuser (2), die konden aantonen, dat in het bloed van tuberculoselijders „Abwehrfermente” tegen uit tuberkelbacillen bereid eiwit voorkwamen.

De geheele techniek der „Abwehrfermente”, dialyseeren, optische methoden, het werken met gekleurde substraten, de thans zoo actueele methode van Kottmann, zouden dus misschien in aanmerking kunnen komen om een reactie tusschen antilichaam en antigeen aan te toonen. Al deze methoden zijn echter verdrongen door als indicator het z.g. haemolytisch systeem te gebruiken. Hierover later.

Eerst wil ik even op de vraag ingaan of de complementbinding iets op zich zelf staand is of slechts een bijzonder geval van een algemeen geldenden regel. Men heeft zich namelijk wel het complement als een ferment voorgesteld en getracht de complementbinding te vervangen door de binding van andere fermenten. De eerste, die trachtte het complement met andere fermenten te vergelijken, was Hailer (3), die vaststelde, dat er groote verschillen in adsorbeerbaarheid tusschen complement en leb (dat eveneens door schudden inactief wordt) bestonden, Ehrlich beschouwt het complement als een Verdauungsferment.

Nu wijst Lange (4) er op, dat ook verschillende fermenten onderling een zeer verschillende adsorbeerbaarheid vertoonen. Hij heeft getracht door samenbrenging van antigeen en antilichaam ptyaline en andere diastatische fermenten te doen binden, doch zijn uitkomsten zijn niet zeer sprekend.

Nog andere vragen kan men zich met betrekking tot deze kwestie stellen. Zoo heeft Gramenitzki (5) gevonden dat sommige plantaardige fermenten, die door verhitting onwerkzaam zijn geworden, gedeeltelijk kunnen regenereren. Ik (6) kon dit voor ptyaline doch niet voor pancreatine bevestigen. Bezit nu het complement ook regeneratie vermogen? Hierover bestaat een publicatie van Brooks (7), die vond dat zoowel het door licht als door warmte voor het grootste deel geïnactiveerd complement voor een belangrijk deel ( $\pm \frac{1}{3}$ ) kan gereactiveerd worden, iets wat ook Gramenitzki heeft opgemerkt.

Ik heb nu zoo nauwkeurig mogelijk de techniek van Brooks



gevolgd doch ben nimmer in staat geweest een spoor van regeneratie waar te nemen. Ook dit kan dus m.i. niet voor het fermentkarakter van het complement pleiten.

Ook Schmidt laat zich in een recente publicatie (11) in de geest van mijn uitkomsten over de complement-regeneratie uit.

Ook Kisz (8) en Scheller (9) hebben het fermentkarakter van het complement aangenomen. Kaup (10) heeft hen daaraan aangevallen en voor hun onderzoekingen een geheel andere verklaring gegeven.

Zoo pleit b. v. de afhankelijkheid der intensiteit van de werking van het complement van het zoutgehalte van de vloeistof vóór de fermentnatuur van dit lichaam. Er tegen pleit dat men het complement in twee onwerkzame stukken kan splitsen, iets wat zoover ik weet bij geen ander ferment bekend is. Landsteiner en Ehrlich (12) hebben op de mogelijkheid gewezen dat het complement een lipoidachtig lichaam zou zijn, althans kunnen lecithine en sommige lipoiden soms de rol van het complement overnemen. Ook Brooks heeft zich in dien zin uitgelaten. Men heeft zelfs gesproken van kunstmatige complementen en Liebermann en Fenyvessy hebben kunnen aantonen dat een mengsel van inactiefserum en zeep een aantal complement-eigenschappen heeft (12a); Zoo verliest een dergelijk mengsel door licht, door zuren of alkalien zijn complementachtige kwaliteiten. Er zijn echter verschillen, die het onmogelijk maken, kunstmatig en natuurlijk complement te identificeeren. Zoo wordt het kunstmatig complement tijdens het bewaren werkzamer.

Uitgemaakt is de fermentnatuur van het complement dus nog allerminst en het vervangen van het complement door andere fermenten in de practische immuniteitsleer mag zeker nog niet als geoorloofd worden beschouwd,

Als indicator voor de complementbinding gebruiken we dus het haemolytische systeem. Dit bestaat uit bloedlichaampjes van één diersoort, uit een amboceptor die bereid wordt door bij een tweede dier bloedlichaampjes van het eerste in te spuiten en het serum van dit zoo voorbereide dier te inactiveren en uit complement.

Het haemolytisch systeem berust op een door Belfanti en Carbone in 1898 ontdekt feit, dat bloedserum van paarden, bij welke konijnen-bloedlichaampjes waren ingespoten, in vitro

haemolytisch op konijnen-bloedlichaampjes werkt. Wordt zulk paardenbloed ook in zeer kleine dosis bij konijnen ingespoten dan gaan de dieren zeer snel te gronde. Bordet toonde hetzelfde aan voor guineesche biggetjes, die met konijnen-erythrocyten waren ingespoten, Het is nu gebleken, dat voor het verkrijgen van haemolyse in vitro de aanwezigheid van versch serum noodzakelijk is en dat verhitting der componenten gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op 56 graden het optreden van de haemolyse onmogelijk maakt. In onze hedendaagsche nomenclatuur uitgedrukt: De immuunhaemolysinen werken niet, dan bij tegenwoordigheid van complement.

Door het aanwenden van het technisch eenvoudig te beheerschen haemolytisch systeem als indicator, heeft de complementbindingsreactie een groote praktische beteekenis gekregen. Men denke slechts aan de typhusreactie van Bordet en Gengou (die het echter tegenover de zoo eenvoudige agglutinatiereactie niet heeft kunnen uithouden); aan de reactie van Weinberg ter herkenning van echinococcose en last not least aan de helaas te populair geworden en misschien al te veel vertrouwde reactie van Wassermann. Voor tal van andere ziekten heeft men de complementbindingsmethode als diagnosticum beproefd. Voor de tuberculose is de litteratuur zeer omvangrijk. In ons land hebben vooral Ruitenga en Hekman zich hiermede bezig gehouden. Voor het ontdekken van ingewandswormen is de methode toegepast en door sommigen bruikbaar bevonden. Voor het determineeren van microörganismen heeft ze naast de agglutinatie groote waarde.

Ja, zelfs voor de diagnose der zwangerschap en voor de bestudeering der functie van de klieren met inwendige afscheiding heeft men van de complementbinding gebruik gemaakt. Het behoeft wel niet gezegd te worden, dat in al deze gevallen de bereikte uitkomsten omgekeerd evenredig waren met de hooggespannen verwachtingen. Vooral sinds gebleken is, dat de reactie van Wassermann zeker geen specifieke antigeen-antilichaam reactie is, is de neiging om alles en nog wat met de complementbinding te onderzoeken wel wat bekoeld, maar, en dit staat wel vast, de methode heeft belangrijke praktische beteekenis. Ik schreef zoo juist, dat het haemolytisch systeem technisch eenvoudig te behandelen is,

Echter, zoo eenvoudig is de zaak niet of er zijn wel enkele opmerkingen over te maken. Ik wilde dit hier bespreken en zal in ieder hoofdstuk na een kort overzicht over de litteratuur mijn eigen onderzoekingen vermelden.

Ik stel me voor achtereenvolgens te behandelen;

- I. De bloedlichaampjes en de amboceptor.
- II. Het complement.
- III. Het inactiveren.
- IV. Is het complement een samengesteld lichaam?
- V. Quantitatieve verhoudingen in het haemolytisch systeem.

## HOOFDSTUK I.

### De bloedlichaampjes en de amboceptor.

Daar deze twee bestanddeelen onafscheidelijk bijeen hooren, is het gewenscht ze te zamen te bespreken. Theoretisch is het natuurlijk mogelijk ieder haemolytisch systeem te nemen, dat men wil. Hier nu zijn reeds zeer belangrijke aanmerkingen op te maken. Zoo bevatten de sera van verschillende dieren normaalhaemolysinen tegen verschillende roode bloedlichaampjes.

Door mij zijn onderzocht bloedlichaampjes van het schaap, het konijn, de cavia en den mensch, en bloedserum van schaap, konijn, varken, cavia en mensch.

Hieronder volgen eenige tabellen van enkele onderzoekingen:

versch caviaserum onverdund.	schapenerythr. 5 %.	phys. Na Cl.
1.—	0.5	1.—
0.8	0.5	1.2
0.6	0.5	1.4
0.4	0.5	1.6
0.2	0.5	1.8
0.1	0.5	1.9

Nadat het mengsel 2 uur bij 37° had gestaan, was er totale haemolyse in het 1e tot in het 4e buisje en beginnende haemolyse in het 5e buisje aan te toonen.

Bij dezelfde opstelling, waarin het onverdunde versche caviaserum was vervangen door onverdund versch serum van andere dieren, was de uitkomst na 2 uur verblijf bij 37°, als volgt:

Varkensserum Tot. Haemolyse in 4e buisje, beginnende in het 5e.

Konijnenserum Tot. Haemolyse in 2e buisje, beginnende in het 3e.

Menschelijkserum Tot. Haemolyse in 1e buisje, beginnende in het 2e.

We kunnen dus vaststellen, dat voor schapenroodebloedlichaampjes in alle door mij onderzochte sera normaal-haemolysinen voorkomen. Zijn deze normaal-haemolysinen aan het complement gebonden of van de hoeveelheid complement afhankelijk? Het eerste lijkt me niet aannemelijk. Het is volkomen waar, dat cavia en varken de hoogste complimenttiter van de door mij onderzochte dieren vertoonen. Echter is de hoeveelheid menschelijk complement belangrijk grooter dan de hoeveelheid complement in het konijnenserum. Ik meen dus, dat de hoeveelheid normaal-amboceptoren onafhankelijk van de hoeveelheid complement is. Wel is complement noodig voor de werking dezer normaal-amboceptoren. Geinactiveerd varkens- of caviaserum lost nimmer schapenbloedlichaampjes op, in welke dosis het ook wordt toegevoegd.

Nu komt echter een aardig feit aan het licht. Voegt men bij 0.5 cc. schapenbloedemulsie 0,5 cc. geinactiveerd varkensserum en 1 cc. phys. zoutoplossing, dan is 0.2 cc. versch caviaserum voldoende om in 2 uur totale haemolyse te verkrijgen. Deze door mij eenige malen herhaalde proef wijst er dus op, dat het normale varkensserum thermostabile stoffen bevat, die in staat zijn de schapenbloedlichaampjes te sensibiliseeren.

Kunnen deze normaal-amboceptoren een rol spelen?

Wij zagen dat minstens 0.4 c.M. caviaserum noodig is om binnen twee uur haemolyse te verwekken. Bij de oorspronkelijke reactie van Wassermann maakt men gebruik van  $\frac{1}{2}$  cc. der 10% verdunning, dus een 8 maal kleinere hoeveelheid. Ook bij modificaties der quantitatieve reactie van Wassermann worden geen hoeveelheden gebruikt, die tot verwarring aanleiding zouden kunnen geven,

Ik heb nu verder nagegaan, hoe andere roode bloedlichaampjes zich tegenover verschillende sera gedragen.

Voor menselijke roode bloedlichaampjes vond ik het volgende:

Versch caviaserum onverdund.	mensch. erythrocyten 5 %.	phys. Na Cl.
1	0.5	1
0.8	0.5	1.2
0.6	0.5	1.4
0.4	0.5	1.6
0.2	0.5	1.8
0.1	0.5	1.9

Na 2 uur in de stoof bij 37° te zijn geweest, vertoonde het eerste buisje een begin van haemolyse. Dezelfde proeven met konijnen- en varkensserum vielen geheel negatief uit. Normaal-amboceptoren tegen menselijke bloedlichaampjes zijn in de onderzochte sera dus praktisch niet aanwezig. Misschien zou dus het gebruik van een haemolytisch systeem met menselijk erythrocyten een voordeel opleveren. We zullen dadelijk zien, dat dergelijke systemen beproefd zijn, doch niet aan de verwachtingen voldaan hebben.

De normaal-haemolysinen tegen roode bloedlichaampjes van het konijn gedragen zich wederom geheel anders.

Versch caviaserum onverdund.	erythrocyten v. h. konijn. 5 %.	phys. Na Cl.
1	0.5	1
0.8	0.5	1.2
0.6	0.5	1.4
0.4	0.5	1.6
0.2	0.5	1.8
0.1	0.5	1.9

Na 2 uur in de stoof bij 37° te zijn geweest vertoonde het 1e buisje beginnende haemolyse. De normaal amboceptoren gaan niet parallel met de hoeveelheid complement. Dit wordt bewezen door het feit, dat, indien in plaats van caviaserum, varkensserum werd gebruikt, totale haemolyse in de eerste buisjes optrad.

Menschenserum was daarentegen niet in staat konijn-erythrocyten tot haemolyse te brengen.

Ten slotte heb ik gewerkt met cavia-erythrocyten.

Versch varkensserum.	cavia-erythr. 5%	phys. Na Cl.
1	0.5	1
0.8	0.5	1.2
0.6	0.5	1.4
0.4	0.5	1.6
0.2	0.5	1.8

Na 2 uur vertoonden de eerste vier buisjes totale haemolyse. Hetzelfde werd verkregen, indien het varkensserum door menschenserum en zelfs door runderserum werd vervangen. Daarentegen gaf konijnenserum slechts totale haemolyse in de eerste twee buisjes.

We zien dus, dat erythrocyten van de cavia het minst gewenscht zijn om in het haemolytisch systeem te worden gebruikt.

In de litteratuur vindt men een aantal publicaties.

Bauer (13) maakt het zich op dit gebied al bijzonder gemakkelijk, daar hij het geheele haemolytische systeem vermijdt en gebruik maakt van de in het menschenbloed aanwezige normaal-amboceptoren tegen schapenbloedlichaampjes.

Terwijl vroeger deze reactie veel succes heeft gehad (Henrichs, Cross en Volk, Bering) hebben Hügel en Ruete (14) gevonden, dat de hoeveelheden normaal-amboceptor in menschelijk serum niet standvastig genoeg is om de reactie betrouwbaar te maken.

Ook Stern (15) vindt de reactie soms onbetrouwbaar. Trouwens de methode is in een zeer belangrijke groep gevallen volslagen onbruikbaar en wel bij pas geboren, waarbij, zooals Boas in zijn boek „die Wassemannsche Reaktion” mededeelt, normaal-amboceptoren nimmer voorkomen.

Noguchi (16) heeft de roode bloedlichaampjes van het schaap en de daarbij behorende amboceptoren vervangen door menschenbloedlichaampjes. Voor de reactie van Wassermann schijnt dit haemolytisch systeem volmaakt onbruikbaar te zijn. Het oordeel van Sleswijk (17) en van Plaut is althans zeer ongunstig.

Tschernogubow (18) gebruikt bloedlichaampjes van de cavia

en maakt gebruik van de normaal amboceptoren van mensche-lijk serum. In de litteratuur is men het er vrijwel eenstemmig over eens, dat dit haemolytisch systeem voor de reactie van Wassermann althans, niet aan te bevelen is.

Roode bloedlichaampjes van een os en een konijnenamboceptor daarentegen zijn het eerst gebruikt door Ballner en Decastello (19). Browning en Mc Kenzie (20) zijn er niet zeer tevreden mede. Daarentegen heeft Wang (21) er zeer fraaie uitkomsten mede gekregen.

Herhaaldelijk schijnt bij het gebruik van dit haemolytisch systeem een positieve reactie van Wassermann in niet syphilitische sera voor te komen. Op een ander bezwaar van dit haemolytisch systeem kom ik dadelijk bij de bespreking van het complement nog terug. Volgens Meijer zou dit systeem ook daarom minder bruikbaar zijn, omdat het caviaserum, dat als complement wordt gebruikt, sterk haemolytisch ten opzichte van roode bloedlichaampjes van het rund zoude werken. Ik heb herhaaldelijk caviaserum op erythrocyten van het rund doen inwerken doch nimmer veel van de door Meijer bedoelde haemolytische werking bespeurd.

Detre (22) gebruikt een haemolytisch systeem met roode bloedlichaampjes van het paard. De litteratuur hierover is klein. Het systeem schijnt voor de reactie van Wassermann bruikbaar te zijn.

Roode bloedlichaampjes van het konijn worden gebruikt door Foix (23). Hij volgt de techniek van Bauer in zooverre hij geen specifieke amboceptor doch de normaal-amboceptoren tegen konijnen-bloedlichaampjes in menschenbloed gebruikt. Indien het waar is, dat er in mensenserum normaal-amboceptoren tegen konijnenerythrocyten voorkomen, dan is de hoeveelheid zoo gering, dat het mij althans nimmer gelukt is hun bestaan aan te toonen. De methode van Foix heeft geen navolgers gehad. Ik heb althans geen opgaven hierover gevonden.

We zien dus, dat erythrocyten van alle mogelijke dieren zijn beproefd. Men heeft algemeen den amboceptor bereid door bij konijnen de betrokken bloedlichaampjes in te spuiten. De voorliefde voor het konijn zal wel daaruit te verklaren zijn, dat het een gemakkelijk te hanteeren laboratoriumdier

is, dat betrekkelijk dikwijls een amboceptor met goeden titer levert. Boven de cavia is het te verkiezen door zijn mindere gevoeligheid voor anaphylaxie. Dit neemt echter niet weg, dat, indien men bij herhaalde intraveneuse bloedinjectie niet uiterst zorgvuldig en langzaam inspuit, plotseling onder krampachtige bewegingen de dood kan optreden. Ik heb dit zelf één keer medegemaakt. Het is echter niet te ontkennen, dat de cavia veel gevoeliger is voor herhaalde eiwitinspuitingen van dezelfde diersoort.

Toch zijn er ook enkele pogingen in het werk gesteld om het konijn als leverancier van amboceptor door andere dieren te vervangen.

Maslakowetz en Liebermann (24) hebben inplaats van amboceptor en complement normaal serum van het varken gebruikt. Zooals wij reeds vroeger zagen bevat het varkensserum een niet onaanzienlijke hoeveelheid normaal-amboceptoren tegenover schapen-roodebloedlichaampjes. Boas heeft de methode nagewerkt en vindt de hoeveelheid amboceptor te varieerend en te gering om bruikbaar te zijn. Ik heb de methode zelf niet uitgevoerd, doch mijn bepalingen wijzen veeleer op de voldoende hoeveelheid natuurlijke amboceptoren, zooals Maslakowetz en Liebermann die zagen, dan op de variabiliteit, die Boas opgeeft. Indien intusschen bij de complementbindingsreactie het varkensserum een eigen remming geeft, zooals Boas mededeelt, dan is deze methode daarmee natuurlijk veroordeeld.

Tot slot wijs ik nog eens op een ingenieus idee van Rubinstein (25), die amboceptor gebruikt, bereid door caviae te immuniseeren tegen schapenerythrocyten. Zijn amboceptor kan dan tegelijkertijd als complement gebruikt worden.

Mijn bezwaar tegen deze methode is de moeilijkheid om caviae te injecteeren onder vermindering van een anaphylactischen shock.

Het is mij niet bekend of de methode reeds door anderen beproefd is.

Ik vond er niets over in de door mij geraadpleegde literatuur.

Het gebruik van hondenmaagsap (Mankiloff 26) van chloras kalicus (Brieger en Renz 27) en van kiezelzuur (Landsteiner



28) in plaats van amboceptor heeft evenmin als de methode van Portmann die gedestilleerd water (!) als amboceptor gebruikt, navolgers gevonden.

Nog een algemeene vraag moet hier besproken worden. Peyton, Rous en Turner (29) en Brooks (30), hebben er nadruk op gelegd dat men zoo vaak de weerstand der roode bloedlichaampjes tegen haemolyse vermindert door de behandeling die men hen laat ondergaan en het is zeker niet ondenkbaar dat door het centrifugeeren der roode bloedlichaampjes, zooals dit in de serologie zoo vaak geschiedt, die weerstand verandert. Zij verwerpen de physiologische zoutoplossing en gebruiken een zoutmengsel van de volgende samenstelling:

Chloornatrium . . . . .	80
Chloorkalium . . . . .	2
Chloorcalcium . . . . .	2
Watervrij natriumbicarbonaat .	10
Monobasisch natriumphosphaat.	5
Gedestilleerd water tot 10 Liter.	

Hieraan wordt 1 % citras natricus en 0.125 % gelatine toegevoegd, Begaat men nu inderdaad een fout door dit gecompliceerde voorschrift niet te volgen en door met een gewone oplossing van 0.85 % keuzenzout te werken? Ik heb getracht deze vraag eenvoudig op te lossen door den weerstand tegen haemolyse te meten op de wijze, die wij in de kliniek gewoon zijn toe te passen. Men mengt dus de bloedlichaampjes met zoutoplossing van verschillende sterkte en ziet bij welke verdunning haemolyse ontstaat. Ook de methode van Liebermann en Fillinger (31) heb ik toegepast. Hierbij wordt 1 druppel versch bloed met 5 cc, 0.5 % zoutoplossing voorzichtig geschud en na 2 minuten 5 cc. van een 1.5 % oplossing van Na Cl. toegevoegd. Haemolyse mag dan niet of slechts in zeer geringe mate ontstaan. Het bleek me nu dat inderdaad het wasschen en centrifugeeren een niet onbelangrijke invloed op den weerstand der roode bloedlichaampjes had.

Toen ik de litteratuur hierover doorzocht; kwam ik de publicatie van Snapper (32) tegen, die reeds in 1912 volkomen dezelfde uitkomsten kreeg. Sinds dien tijd heb ik de bovengenoemde oplossing van Peyton Rous gebruikt, indien ik met

schapenbloedlichaampjes werkte, en tevens parallel proeven met de gewone zoutoplossing uitgevoerd. Groote verschillen echter heeft dit niet opgeleverd en de besluiten, die ik eerst uit mijn onderzoekingen met physiologische Na Cl, oplossing heb getrokken, heb ik, nadat ik met de oplossing van Peyton Rous heb gewerkt, niet behoeven te herzien.

---

## HOOFDSTUK II.

### Het complement.

Als complement, de thermolabiele component van het serum, wordt in de complementbindingsreactie bijna steeds gebruik gemaakt van versch caviaserum, dat misschien wel het gemakkelijkst verkregen wordt door de technisch eenvoudige hartpunctie. Vreest men hiermede dieren aan haemopericard te verliezen (een onaangename gebeurtenis, die zeker niet zoo heel zeldzaam is), dan kan men bijna steeds voldoende bloed uit het oor krijgen, door er een klein randje af te knippen en met een klein, speciaal ervoor geconstrueerd, pompje, bloed uit het oor te zuigen. Andere meer samengestelde methoden om bloed uit carotis of vena femoralis te verkrijgen, heb ik niet beproefd. Het opgevangen bloed wordt daarna eenige minuten in de stoof geplaatst, de bloedkoek met een platina naaldje van den wand los gemaakt en daarna gedurende ongeveer 10 minuten met ongeveer 3000 omwentelingen gecentrifugeerd.

De reden, waarom men cavia serum bij voorkeur als complement gebruikt, zal wel hierin liggen, dat de complementaire werking van caviaserum zeer sterk is. Een belangrijke vraag is de hoeveelheid complement in het serum van de cavia. Zeer vaak is deze vraag opgeworpen en de meeningen hierover zijn tegenstrijdig, Boas beweert b. v. dat al mogen er kleine schommelingen in het complement-gehalte van verschillende caviae mogelijk zijn, de complementtiter bij de verschillende dieren toch nagenoeg constant is. Pohlmann (33)

beweert, dat de hoeveelheid complement de meest variabele factor is, die bij de uitvoering der reactie van Wassermann een rol speelt. Terloops zij hier opgemerkt, dat niet alleen de hoeveelheid, doch ook de bindbaarheid van het complement voor de praktische uitvoering der complementbindingsreactie van groot belang is. Voor de kennis van het haemolytisch systeem is deze vraag minder belangrijk.

Een merkwaardige opvatting omtrent het gebruik van cavia-serum als complement vind men bij Sonntag (34). Deze is overtuigd dat verschillende normale caviae een vrij standvastige hoeveelheid complement leveren. Echter vindt hij, dat hij bij het gebruik van een mengsel van sera van eenige caviae een minder goed complement krijgt, dan bij het gebruik van een enkele cavia. Sonntag zelf vindt dit niet waarschijnlijk; ik evenmin. Ik heb eenige keeren drie caviae gepunteeerd en de titer bepaald van het complement van ieder serum afzonderlijk en van het mengsel. Verschillen van betekenis heb ik nooit waargenomen. Berczeller (35) vindt het complementgehalte niet constant en raadt daarom aan, serum van minstens vijf caviae te mengen, iets wat meer voor de hand ligt dan de bevindingen van Sonntag.

Een in de litteratuur algemeen voorkomende opgave is, dat het caviaserum zelf haemolytisch kan gaan werken, indien het dier herhaaldelijk bloed levert. Toen ik begon met deze onderzoeken, waren er vrij vele caviae op het laboratorium, zoodat de dieren niet zoo vaak aan de beurt kwamen voor hartpunctie. Later is dit aantal tijdelijk afgenomen en ten slotte leverden de dieren soms driemaal per week 5 cM. bloed. Toch is noch mij, noch een der andere onderzoekers, die op het laboratorium werkten, iets van haemolytische werking van het caviaserum gebleken.

Trouwens haemolytische werking van het caviaserum in de gebruikelijke dosis is ook in zeldzame gevallen bij dieren, die voor de eerste maal bloed leverden, gevonden.

Gierke (36) waarschuwt tegen het gebruik van het serum van met tuberculose geïnfecteerde dieren, dat volgens hem haemolytisch zou werken. Ik heb 3 caviae, die met tuberculose materiaal voor onderzoek waren geënt en waar bij den dood tuberculeuse afwijkingen werden gevonden, onderzocht.

Alle drie leverden resp. 1 week, 14 dagen na injectie en eenige uren voor den dood een volmaakt bruikbaar complement. Hieruit volgt tevens, dat het niet altijd waar is, dat bij zwaar zieke caviae het complement verdwijnt. Men is nu echter nog allerminst gerechtigd hieruit te besluiten, dat men ook voor de practische toepassing der reactie van Wassermann zich niet verder behoeft te bemoeien met den gezondheidstoestand van de caviae. Het schijnt n.l. dat het bloed van tuberculeuse dieren niet zelden positieve reactie van Wassermann geeft. Dit geldt eveneens van het bloed van zwangere dieren, dat, zooals Stern vond en ik bevestigen kan, een bruikbaar complement levert, doch dat volgens velen voor de reactie van Wassermann onbruikbaar is omdat het zelf de haemolyse zou remmen bij deze reactie. (Ledermann, Pohlmann).

Wat nu de titer van het complement aangaat, deze is ook volgens mijn ervaring tamelijk constant. Toch is het mij wel eens een enkele maal overkomen, dat een dier, dat gewoonlijk een goed bruikbare complement leverde, plotseling zonder eenige naspeurbare oorzaak op een goeden dag een serum leverde met slechts geringe complementaire eigenschappen. Eenige dagen later was het serum dan weer geheel normaal.

Intusschen meen ik toch, dat men in het algemeen het complement-gehalte als constant kan beschouwen.

Een van de bezwaren van het gebruik van versch cavia-serum als complement is dat dit zeer slecht bewaard kan worden. Men vindt algemeen aangegeven, dat na een verblijf van 2 dagen in de ijskast het complement onwerkzaam is. Deze tijdsduur is m.i. zelfs nog vrij optimistisch gekozen. Het is mij eenige malen overkomen, dat serum, dat 's morgens om 8 uur was bereid, den avond van den volgenden dag onbruikbaar was. Dit klopt niet met een onderzoek van Bigger (37) aan wien het bij steriel werken gelukte het complement langer te bewaren. Hij vond dan dat bij  $1.5^{\circ}$  in 920 uur 75 % van het complement teloor ging. Bij zeer lage temperaturen schijnt het complement zeer bestendig te zijn. In vloeibare lucht afgekoeld, blijft het geruimen tijd werkzaam. (Lüdke) (38).

Friedberger (39) heeft een methode aangegeven om het

complement te conserveeren. Hij bereidt dit door de zoutconcentratie van het serum te verhoogen tot 4 ‰. Het serum kan dan zelfs geruimen tijd bij 37° bewaard worden zonder aan werkzaamheid te verliezen.

Voor het gebruik moet het dan door verdunning met gedestilleerd water weer op zijn oorspronkelijke concentratie worden gebracht. Een andere wijze van conserveeren is het drogen van serum. Hecht heeft deze methode nagewerkt en bruikbaar bevonden. Ook voor menschelijk serum is ze te gebruiken.

Ronchese (40) heeft een middel aangegeven om het complement gedurende 5 dagen te bewaren. Hij voegt bij 1 c. c. serum 40 mgr. natriumfluoride. Het bezwaar tegen deze methode is, behalve den nu niet zoo bijzonder langen tijd van conserveering, ook nog gelegen in het door vroegere onderzoekingen van Ronchese met Lantenois (41) gebleken feit, dat fluornatrium vaak zuur reageert. Dit vermindert de complementaire werkzaamheid of het heft deze geheel op. Nu kan men wel op zuiverheid van het zout gaan letten of nauwkeurig neutraliseeren, de eenvoud van de methode wordt er niet door verhoogd.

Trouwens ook het keukenzout, zooals dat voor conserveering en zooals het in het algemeen voor de immuniteitsreacties wordt gebruikt, behoort aan bepaalde eischen van zuiverheid te voldoen. De b. v. in Duitschland officineele physiologische zoutoplossing welke o. a. 0.015 ‰ soda moet bevatten, werkt haemolytisch en is dus niet te gebruiken.

De beste methode voor het conserveeren van complement schijnt de methode van Rhamy te zijn (42). Deze maakt een oplossing van 10 ‰ natriumacetaat in physiologische zoutoplossing en voegt nu bij 4 deelen caviaserum 6 deelen van deze oplossing. Op deze wijze schijnt het complement zeer langen tijd behouden te blijven.

We komen nu tot een ander punt, n.l. de vraag, in hoeverre het mogelijk is, serum van andere diersoorten als complement te gebruiken. In de litteratuur zijn hiervoor verschillende dieren beproefd.

Het dichtst bij de caviae staat de rat, die, zooals ik ondervonden heb, een alleszins bruikbaar complement oplevert.

De dieren zijn echter niet gemakkelijk te houden en bijzonder moeilijk te hanteeren. Reinhardt en Oeller (43) gebruiken met goed succes complement van hamsters, welke dieren in Duitschland onder oorlogsomstandigheden gemakkelijker te verkrijgen waren dan caviae.

Een vrij aanzienlijke litteratuur bestaat over het gebruik van mensenserum als complement. Dit levert natuurlijk een belangrijke vereenvoudiging van de reactie van Wassermann, omdat dan het te onderzoeken serum tegelijkertijd als complement kan dienst doen.

Hecht, die, zooals boven reeds gemeld is, de in menschelijk serum voorkomende normaal-haemolysinen tegen schapenroodebloedlichaampjes gebruikt, bezigt tevens het serum als complement. Boas en vele anderen (litt. bij Boas) hebben deze reactie beproefd en onbruikbaar bevonden. Margaretha Stern (44) gebruikt eveneens menschelijk complement bij de complement-binding. Lichtelijk humoristisch doet het aan te lezen, dat zij haar eigen reactie niet vertrouwt en aanraadt, deze vooral steeds door de origineele reactie te controleeren. Wozu der Lärm? kan men zich met Mephistopheles afvragen. Hier interesseert ons minder de bruikbaarheid van menschencomplement voor de reactie van Wassermann; in de eerste plaats is het ons te doen om de eigenschappen van menschelijk complement te leeren kennen. We stuiten dan weer op dezelfde vraag als bij de caviae. Is deze hoeveelheid bij één zelfde persoon en bij verschillende individuen constant? Mandelbaum (45, 46) die bijzonder fraaie onderzoekingen over het menschelijk complement heeft verricht, meent dit bevestigend te kunnen beantwoorden, wat hem niet belet (47) de Wassermann-reactie met cavia-complement uit te voeren. Jousset en Paraskevopoulos (48) en Bertin (49) vinden de hoeveelheid complement in menschelijk serum zoo uiterst veranderlijk, dat zij het onmogelijk achten, het ter vervanging van cavia-complement te gebruiken. Daarentegen vinden Backmann en Jacoboëus (50) de hoeveelheid complement bij eenzelfde individu constant; zij vinden ook, dat de hoeveelheid complement bij verschillende personen weinig uiteenloopt. Deze laatste onderzoekingen zijn bevestigd door Chahanier, Bétancês en Lebert (51).

Zij vonden de hoeveelheid complement nagenoeg onafhankelijk van het gebruik van voedsel. Deze hoeveelheid verdwijnt als men het serum laat staan. De snelheid van verdwijnen is bij verschillende personen verschillend. Dit verschil is echter niet typisch voor bepaalde ziekte-toestanden. Hier bevinden de schrijvers zich in flagranten tegenspraak met Mandelbaum (45), die vond, dat bij sommige ziekten (chronische infecties, scarlatina, syphilis) het complement veel sneller verloren gaat dan bij normale personen. De verklaring, die Mandelbaum van dit merkwaardige verschijnsel geeft, is de volgende:

In het serum komen bepaalde, uit polynucleaire leucocyten stammende stoffen voor, die het verdwijnen van het complement trachten te beletten. Mandelbaum noemt deze stoffen socinen en hij neemt aan, dat bij genoemde ziekten de vorming der socinen gestoord is. De juistheid dezer verklaring wil ik niet bespreken. Het door Mandelbaum gevonden verschijnsel kan ik echter allerminst bevestigen.

Herhaaldelijk heb ik het complement-gehalte van zieken tegenover schapenbloedlichaampjes onderzocht. Ik heb bij gezonden, bij lijders aan alle mogelijke ziekten (tuberculose van verschillende organen en in verschillende stadia, syphilis, ziekten der verschillende buikingewanden, ziekte van Basedow, struma, enz.) de snelheid, waarmede het complement, bewaard bij 0°, verdween, vrijwel gelijk gevonden. Zonder twijfel zijn hier individueele verschillen, maar deze komen evengoed bij zieken als bij gezonden voor.

Ook de hoeveelheid complement is bij gezonden en zieken vrijwel gelijk, alleen vond ik herhaaldelijk eenige dagen vóór den dood, dat het complement afnam en ten slotte niet meer was aan te toonen; dit komt bij de meeste uiteenloopende ziekten voor. Den invloed van voedselopneming heb ik herhaaldelijk bij mijn bloed nagegaan. Mijn complement-gehalte was steeds even hoog, indien de venapunctie nuchter, na het ontbijt of na den hoofdmaaltijd geschiedde.

Hoewel ik mij dus geheel schaar aan de zijde van diegenen, die beweren, dat de hoeveelheid complement in menschelijk serum als constant mag worden beschouwd, kan ik mij niet uitlaten over de wenschelijkheid om de Wassermann-reactie

met menschelijk serum uit te voeren. Hierover heb ik geen ervaring.

Ten slotte is nog een complement van beteekenis geworden, n. l. het complement van het varken. Reeds voor dat mij de bovengenoemde onderzoekingen van Maslakowetz en Liebermann (2) bekend waren, was mij het groote complementgehalte van varkensserum opgevallen.

Toch heeft Boas misschien gelijk als hij de reactie van Maslakowetz niet aanbeveelt. Zij vervangen n. l. amboceptor en complement door normaal varkensserum. De verkregen uitkomsten kloppen n. l. lang niet altijd met die van de Wassermann-reactie. Waar het niet de Wassermann-reactie als zoodanig betreft, zal ik hier niet op ingaan, doch dit hoofdstuk besluiten met een tabel betreffende de hoeveelheid complement tegenover gesensibiliseerde erythrocyten van het schaap bij verschillende diersoorten. De buisjes, waarin complete haemolyse is opgetreden, zijn met h aangegeven.

Complement.	Schape- erythrocyten.	Ambo- ceptor.	Phys NaCl.
cavia 1 : 10 1 cc	0.5	1	— h
„ 1 : 10 0.8	0.5	1	0.2 h
„ 1 : 10 0.6	0.5	1	0.4 h
„ 1 : 10 0.4	0.5	1	0.6 h
„ 1 : 10 0.2	0.5	1	0.8
konijn 1 : 10 1.—	0.5	1	—
„ 1 : 10 0.8	0.5	1	0.2
mensch 1 : 10 1.—	0.5	1	—
„ 1 : 10 0.8	0.5	1	0.2
varken 1 : 10 1.—	0.5	1	0.—h
„ 1 : 10 0.8	0.5	1	0.2 h
„ 1 : 10 0.6	0.5	1	0.4 h
„ 1 : 10 0.4	0.5	1	0.6 h

Amboceptor titer 1 : 4500 werd gebruikt in verdunning 1 : 2000.

Hieruit volgt nu, dat de cavia en het varken bovenaan staan (met rat en hamster) wat complementgehalte betreft.

Verdunt men nu het serum van mensch en konijn niet, dan is ook hierin complement tegenover gesensibiliseerde schapenbloedlichaampjes aantoonbaar.



Onverdund serum.	Schapen- erythrocyten.	Ambo- ceptor.	Phys NaCl.
konijn 1.—	0.5	1	— h
„ 0.8	0.5	1	0.2 h
„ 0.6	0.5	1	0.4 h
„ 0.4	0.5	1	0.6
„ 0.2	0.5	1	0.8
mensch 1.—	0.5	1	— h
„ 0.8	0.5	1	0.2 h
„ 0.6	0.5	1	0.4 h
„ 0.4	0.5	1	0.6 h
„ 0.2	0.5	1	0.8

Menschelijk serum bezit dus iets meer complementaire werking dan konijnenserum; dit verschil is herhaaldelijk gevonden. Eén ding staat wel vast, n.l. dat, behalve misschien het varkensserum, geen der onderzochte sera het caviaserum in het haemolytisch systeem in ongeveer dezelfde dosis kunnen vervangen.

### HOOFDSTUK III.

#### Het inactiveren.

Onder het inactiveren verstaat men het vernietigen van de complementaire werkzaamheid van een serum.

Voorloopig wil ik hier geheel terzijde laten de meest eenvoudige vorm van inactiveren, hierin bestaande, dat men het serum lang genoeg laat staan, hetzij bij 37°, bij kamertemperatuur of in de ijskast. Ook het inactiveren door ultraviolette stralen moet onbesproken blijven.

Eveneens zullen hier niet worden besproken die methoden, waarbij de inactivering op chemische wijze tot stand komt. Zoo zou men ieder proces, waarbij de splitsing in eind- en middenstuk tot stand komt, als inactivering kunnen betitelen (doorleiden van CO<sub>2</sub>, toevoeging van gedestilleerd water of verdund zuur). Practisch blijven dan twee manieren over. Inactiveren door warmte en inactiveren door schudden.

Het resultaat van beide methoden is niet hetzelfde. Tusschen het serum voor en na de inactivering door verwarming is gewoonlijk weinig verschil te zien. Bij het inactiveren door schudden ontstaat daarentegen een duidelijk, niet zelden zelfs een dik neerslag.

Dat wij na het inactiveren door verhitting geen veranderingen zien, geeft ons natuurlijk geenszins het recht te beweren, dat die veranderingen er niet zijn. Het hoofddoel van mijn onderzoek is geweest die veranderingen op te sporen. Tevens heb ik daarbij het inactiveringsproces iets nauwkeuriger nagegaan.

Het inactiveren door verwarming gaat uit van het reeds lang bekende feit, dat door verhitting van serum gedurende 30 minuten op  $56^{\circ}$  de complementaire werking verloren gaat.

Reeds dadelijk rijst de vraag, wat er nu geschiedt, indien men den tijd of de temperatuur gaat variëren en of inderdaad na verhitting gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^{\circ}$  de geheele complementaire werking verdwenen is.

Wat deze laatste vraag aangaat, wordt vrij algemeen in Duitschland en Frankrijk aan het verhitten gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^{\circ}$  vastgehouden. Enkele onderzoekers noemen  $56^{\circ}$ — $60^{\circ}$  als inactiveringstemperatuur. Ook in Amerika wordt op dezelfde wijze geïnactiveerd (Craig (52).) Daarentegen wordt in een „Report of the Special Committee upon the Standardization of Pathological Methods” over de waarde van de reactie van Wassermann een inactiveren gedurende 10 minuten voldoende geacht. Terloops merk ik hier op, dat enkele Deutsche onderzoekers zelfs met een half uur verwarmen niet tevreden zijn. Ik heb deze vraag tamelijk uitvoerig onderzocht en ben hierbij tot zeer verrassende resultaten gekomen.

De techniek was eenvoudig. In een waterbad van  $56^{\circ}$  (of andere temperatuur) werden een aantal ongeveer even groote reageerbuisjes geplaatst, welke ieder een gelijke hoeveelheid versch caviaserum bevatten. Na bepaalde tijden werden de buisjes uit het waterbad verwijderd en onmiddellijk in ijs geplaatst. Na afloop van de proef werd dan de complement-titer van de verschillende buisjes bepaald.

Nimmer duurde een proef zoo lang, dat men redelijkerwijze

kon aannemen, dat b.v. de hoeveelheid complement in het eerste buisje zou zijn verminderd in den tijd tusschen het beëindigen der verhitting van dit en van het laatste buisje.

Behalve de tijden van verhitting heb ik den invloed van eenige andere temperaturen nagegaan. Hier treft mij ongetwijfeld het verwijt, dat het aantal door mij onderzochte combinaties gering is.

Toch meen ik, dat de steeds in gelijken zin uitvallende uitkomsten mij het recht geven enkele conclusies te trekken. Bovendien worde niet vergeten, dat voor dergelijke onderzoekingen zeer veel serum noodig is en dat dit vooral bij kleinere dieren niet gemakkelijk te krijgen is.

Van iedere groep onderzoekingen vermeld ik slechts 1 reeks.

#### Verhitting op 56°.

Roode bloedl. schaap 5%.	Amboceptortiter 1:10000 gebruikt In verdunning 1:2000.	Caviaserum 1 min. op 56° 1:10.	Caviaserum phys NaCl.
0.5	1	1	0.—h
0.5	1	0.8	0.2 h
0.5	1	0.6	0.4 h
0.5	1	0.4	0,6 h
0.5	1	0.2	0.8
0.5	1	0.1	0.9

Dezelfde proef werd nu uitgevoerd met caviaserum, dat niet verhit was en dat gedurende 2, 3, 4 en 5 minuten verhit was. De haemolyse werd na een uur (37°) beoordeeld.

Nu bleek, dat haemolyse was opgetreden:

Bij versch serum: In 1e, 2e en 3e buisje.

Bij serum verhit ged. 1 minut: In 1e, 2e, 3e en 4e buisje.

" " " " 2 minuten: In alle buisjes.

" " " " 3 " : In 1e, 2e, 3e en 4e buisje.

" " " " 4 " : Alleen in 1e buisje.

" " " " 5 " : Geen haemolyse.

We zien hier dus het merkwaardige, door herhaaldelijk onderzoek bevestigde feit, dat door kort verhitten caviaserum hyperactief wordt en wel met een maximum bij verhitting gedurende 2 minuten op 56°.

Hier nu moet een ding bedacht worden, n.l. dat het eenigen tijd duurt, voordat de inhoud der buisjes een bepaalde temperatuur heeft aangenomen. Deze tijd bedroeg voor de door mij gebruikte buisjes en hoeveelheden  $\pm 1\frac{1}{2}$  minuut. Tellen we dus desnoods de verhitting gedurende 1 minuut niet mede (hoewel het dan nog vreemd blijft, dat in die minuut de werkzaamheid stijgt), dan blijft toch het maximum van een verhitting tot  $56^\circ$  gedurende  $\frac{1}{2}$  minuut bestaan.

Dezelfde proeven zijn nu genomen door caviaserum tot  $50^\circ$  te verhitten. De opstelling was weer geheel dezelfde als in bovenstaande tabel.

Haemolyse was opgetreden bij:

Versch serum	1—3 buisje
Verhit 10 min.	1—3 „
„ 15 „	1—2 „
„ 17 „	1—3 „
„ 20 „	1—4 „
„ 23 „	alle buisjes
„ 27 „	„ „
„ 30 „	1—2 buisje
„ 1 uur	1—2 „
„ $2\frac{1}{2}$ „	geen haemolyse.

De merkwaardige inzinking bij verhitting op 15 minuten heb ik herhaaldelijk waargenomen; deze is echter niet constant. Of het aan een of andere speciale eigenschap van sommige sera ligt, weet ik niet.

Ten slotte vermeld ik dezelfde onderzoeking bij verhitting op  $48^\circ$ . Hier lag een maximum van werkzaamheid bij verhitting gedurende drie kwartier. Na  $2\frac{1}{2}$  uur werd nog het eerste buisje haemolytisch.

Het is dus mogelijk en zelfs waarschijnlijk, dat ook bij lagere temperaturen eerst een verhoogde werkzaamheid ontstaat alvorens het complement te niet gaat. Intusschen beschik ik niet over voldoende caviae om dit te beproeven.

Indien men tracht konijnen- of mensenserum complementrijker te maken door korte verhitting, dan gelukt dit inderdaad. Echter is de toeneming veel geringer dan bij de cavia. Ook

bij het varken is deze toeneming, hoewel zeker aanwezig, onbeteekenend.

Hoe moet deze toeneming verklaard worden? Eerst moet dus worden uitgemaakt of zij inderdaad van het complement afhankelijk is. Het zou n.l. mogelijk kunnen zijn, dat door kortdurende verhitting normaalhaemolysinen geactiveerd werden. Om dit te onderzoeken was het voldoende na te gaan volgens de op bladzijde 6 beschreven techniek of door kortdurende verhitting het aantal normaalamboceptoren in het caviaserum toenam. Dit bleek niet het geval te zijn.

Een andere mogelijkheid is, dat het serum naast het complement een anti-complement bevat, dat door verhitting b.v. gedurende  $\pm 25$  minuten op  $50^\circ$  vernietigd wordt. Men kan b.v. beproeven het complement te binden en onderzoeken of de overblijvende vloeistof anti-complementaire eigenschappen bezit. Hierbij komt een belangrijk bezwaar. We zagen n.l. reeds vroeger, dat bij het samentreffen van antigeen en anti-lichaam ook andere stoffen dan het complement gebonden kunnen worden, o.a. zouden fermenten hun werkzaamheid op deze wijze verliezen.

Houdt men dus bij een complement-bindingsreactie een anti-complementaire vloeistof over, dan kan dit iets bewijzen; is dat niet het geval, dan kan het anti-complement evenals het complement gebonden zijn.

Een andere methode is, dat men serum door schudden inactiveert en daarna onderzoekt of de geschudde vloeistof anti-complementair werkt. Zoo ja, dan is het bestaan van een anti-complement waarschijnlijk gemaakt.

Beide onderzoekingen zijn door mij herhaaldelijk verricht. Ik heb beproefd of de vloeistof, die ik kreeg door bij een positieve reactie van Wassermann de bloedlichaampjes af te centrifugeeren anti-complementair werkte, doch zonder succes. Evenmin kon ik een duidelijk anti-complementaire werking van geschud serum aantonen. Ik kon dus niet het bestaan van anti-complement aantonen.

Dit nu is in overeenstemming met de litteratuur. Loewit en Bayer (53) hebben bij konijnen normaal caviaserum ingespoten en dan gezien dat het serum van zulk een konijn,

indien het werd samengebracht met caviaserum, de complementaire werkzaamheid van het caviaserum vernietigde. Deze proeven bewijzen echter niet het bestaan van een anti-complement in dit mengsel; immers bij het samen komen van caviaserum en caviaantiserum zal complement gebonden worden. Loewit zelf ontkent dan ook het bestaan van anti-complement of houdt het voor onbewezen.

Merkwaardig is in dit verband nog, gelijk Dold (54) opmerkt, dat sera bij het inactiveren troebeler worden, doch nadat ze eerst gedurende eenige oogenblikken opgehelderd zijn.

Ook over het inactiveren door langdurig krachtig schudden bij 37° zijn enkele opmerkingen te maken. Het is reeds geruimen tijd bekend, dat verdund serum sneller inactief wordt dan onverdund.

Toch werkte ik alleen met dit laatste om over onderling vergelijkbare resultaten te beschikken. Het is noodig buizen van niet te kleinen inhoud te nemen en hier slechts weinig serum in te schudden.

Is de hoeveelheid vloeistof te groot in verhouding tot den inhoud van de buis, dan gelukt het inactiveren niet. Gelukt dit wel, dan is na afloop van het schudden in de vloeistof een min of meer volumineus neerslag ontstaan. Ik heb nog nimmer een publicatie hierover gelezen, waarin niet vermeld staat: er ontstaat een neerslag van globulinen. Waarom dit neerslag uit globulinen zou bestaan, is me onbekend.

Globulinen lossen op in verdunde oplossingen van neutrale zouten en in verdunde loog; uit alkalische oplossingen worden zij door CO<sub>2</sub> neergeslagen, doch zijn oplosbaar in overmaat. Het neerslag, dat bij het schudden ontstaat, is daarentegen op geen enkele wijze op te lossen. Het is dus meer dan twijfelachtig of men het recht heeft van globulinen te spreken. Nog een opmerking over het verband tusschen door warmte en door schudden geïnactiveerd serum.

Kashiwaraba (zie later) en Ritz (55) beweren dat het soms mogelijk is door samenvoeging van beide inactieve sera een actief serum te verkrijgen. Dit is mij nimmer gelukt, zoodat ik de juistheid dier bewering in twijfel meen te moeten trekken.

Ik heb nu nagegaan wat er gebeurt indien men door

warmte geïnactiveerd serum schudt. Steeds heb ik tegelijk in het zelfde bad 2 buisjes (dichtgesmolten) van gelijken inhoud geschud; het eene bevatte het niet verhitte, het andere juist evenveel, verhit serum. De resultaten zijn als volgt: Het geïnactiveerde runderserum geeft een dik neerslag, dat echter in tegenstelling met het neerslag in het actieve, geschudde serum tot een klompje samenbalt. Bij het geïnactiveerd konijnenserum ontstaat een veel dikker neerslag dan bij het actieve, geschudde. Wordt daarentegen serum van mensch, cavia of varken eerst door warmte geïnactiveerd en daarna geschud, dan blijft in tegenstelling met het niet verwarmde de neerslagvorming uit. Dit kan niet verklaard worden door aan te nemen, dat bij het inactiveeren door hitte het globuline is ontleed. Indien n.l. zulk geïnactiveerd serum eerst wordt geschud en daarna tegen stroomend water wordt gedialyseerd, ontstaat een neerslag, dat alle typische globuline-reacties vertoont, evenals dit bij dialyse van geheel ander serum het geval is.

Indien men de complementaire werkzaamheid van cavia-serum verhoogt door 25 minuten op 50° te verwarmen en dit serum daarna schudt, wordt het eveneens geïnactiveerd onder vorming van een neerslag.

Bij het inactiveeren door schudden zien we zeer grove veranderingen in het serum optreden. Welke veranderingen ontstaan er bij het inactiveeren door verwarmen?

Om dit na te gaan heb ik onderzocht voor en na de verwarming:

- A. De oppervlaktespanning.
- B. De brekingsindex.
- C. Het electricch geleidingsvermogen.
- D. Het soortgelijk gewicht.
- E. Het chloorgehalte.
- F. De zuurgraad.
- G. Het ultramicroscopisch beeld.

Zooals aan het einde van dit hoofdstuk nader zal worden besproken is er aanleiding te denken aan de mogelijkheid om de inactiveering als een coagulatie op te vatten. Om dit nader te toetsen heb ik verschillende sera voor en na het inacti-

veeren snel gecentrifugeerd (1 uur met 3000 toeren) en dan de bovengenoemde waarden voor onderste en bovenste vloeistoflagen afzonderlijk vastgesteld. Alleen de oppervlaktespanning is niet op deze wijze bepaald, omdat hiervoor te veel serum noodig zou zijn geweest.

## A. DE OPPERVLAKTESPANNING.

De methoden om de oppervlaktespanning van een vloeistof te bepalen zijn talrijk. Men vindt ze uitvoerig behandeld bij Freundlich (56).

Voor biologische doeleinden komen hoofdzakelijk twee methoden in aanmerking. De eerste, welke de oppervlaktespanning bepaalt met den capillarimeter van Traube (57), schijnt bruikbaar te zijn. Daarentegen vereischt zij een zoo buitengewoon zorgvuldige behandeling, dat men zich bij iedere afwijking afvraagt, of de gevonden uitkomst betrouwbaar is of dat men misschien weer een fout gemaakt heeft.

Zeer veel eenvoudiger is het werken met den stalagmo-meter, waarvoor men het oorspronkelijk instrument van Traube of den gewijzigden door Steensma aangegeven vorm kan gebruiken. Ik werkte steeds met het toestelletje van Traube. De methode berust op het feit, dat indien men vloeistof uit een capillaire buis laat druppelen, het druppelgewicht evenredig is met de oppervlaktespanning. Ostwald (58) wijst er op, dat men eigenlijk het gewicht van den hangenden druppel behoort te bepalen, waarvoor hij dan ook een methode aangeeft.

Nu is echter de verhouding tusschen het gewicht van hangende en afvallende druppels constant (5 : 4) en kan men dus volstaan met den afgevallen druppel te wegen. Ook kan men nagaan hoeveel druppels een bepaald volume bevat.

Practisch komt het hier op neer, dat men nu of een aantal druppels weegt, of den stalagmometer tot een merk vult en dan het aantal druppels telt. Ik heb beide methoden, doch vooral de eerste gebruikt.

Nu bepaalt men op deze wijze niet de absolute oppervlaktespanning doch, indien, zooals voor dit onderwerp, alleen de



vraag moet beantwoord worden of de oppervlaktespanning door een bepaalde werking verandert, is dit ons onverschillig. Over de oppervlaktespanning van het bloedserum bij gezonden en zieken heb ik een mededeeling gedaan op het XVIIe Natuur- en Geneeskundig Congres en verwijs daarvoor naar de Handelingen.

Ook deelde ik daar reeds mede, dat ik meende, dat menschelijke sera na inactiveren een verlaagde oppervlaktespanning verkrijgen.

Ongeveer 14 dagen na deze mededeeling is een publicatie verschenen van Boenheim (59), die, onafhankelijk van mijn mededeelingen, tot het zelfde resultaat komt.

Brooks (60) vond overeenstemmend dat bij inactivering door ultravioletlicht de oppervlaktespanning van het serum daalt. Onlangs vond ik dat ook vóór mijne onderzoekingen, de verlaagde oppervlaktespanning na inactiveren reeds door Kisch en Rementi (61) is vastgesteld. Deze onderzoekingen waren mij tijdens mijn werk onbekend. Zij bevestigen ook geheel mijn uitkomsten.

Een verlaagde oppervlaktespanning zou kunnen ontstaan door een verhoogd eiwitgehalte, daar eiwit één dier groepen van stoffen is, die de oppervlaktespanning verlagen. Het ligt dus voor de hand om de verlaging van de oppervlaktespanning, die bij het inactiveren optreedt, toe te schrijven aan verdamping van water en dus relatieve eiwitvermeerdering. Boenheim heeft met deze mogelijkheid geen rekening gehouden. Ik heb mijn sera steeds in dichtgesmolten buisjes verwarmd en deze niet geopend, alvorens zeker te kunnen zijn, dat het verhitte serum weer op kamertemperatuur was gekomen.

Inderdaad bleek nu, dat dan niet alle sera na inactivering in oppervlaktespanning verminderden. Voor een aantal ziekten heb ik dit in mijn reeds bovengenoemde voordracht uiteengezet, doch ook sommige diersoorten en wel voornamelijk de complementarmere behielden voor en na het verhitten nagenoeg dezelfde oppervlaktespanning.

Hier volgen eenige der gevonden resultaten:

Diersoort:	Gewicht 10 druppels versch serum in grammen.	Gewicht 10 druppels serum $\frac{1}{2}$ uur op $56^{\circ}$ .
Mensch	1.115	1.056
"	1.118	1.072
"	1.116	1.094
"	1.106	1.051
Cavia	1.080	1.061
"	1.047	1.020
"	1.124	1.048
"	1.056	1.028
Varken	1.109	1.087
"	1.111	1.082
"	1.119	1.094
"	1.099	1.072
Rund	1.121	1.086
"	1.119	1.114
"	1.098	1.099
"	1.108	1.083
Konijn	1.105	1.108
"	1.101	1.099
"	1.098	1.094
"	1.109	1.114

Bij het konijn is dus de invloed van het inactiveeren op de oppervlaktespanning niet aan te toonen; bij het rund is deze invloed inconstant. Bij de andere dieren is ze echter duidelijk. Proeven, genomen met citraatplasma in plaats van serum, leverden geen resultaat op, omdat het citraatplasma bij de inactiveering steeds een neerslag gaf.

Enkele keeren heb ik serum eenigen tijd steriel bewaard en dan onderzocht, hoeveel de oppervlaktespanning vóór en na het inactiveeren bedroeg.

Als voorbeeld diene de volgende proef:

Normaal menshenserum:

Gewicht 10 druppels	1.106	} verschil 0.055
" 10 " $\frac{1}{2}$ uur op $56^{\circ}$	1.051	

Het serum blijft bij kamertemperatuur ( $16^{\circ}$ ) bewaard.

2e bepaling, 5 uur na de eerste:		
Gewicht 10 druppels	1.109	} verschil 0.067
„ 10 „ 1/2 uur op 56°	1.042	
3e bepaling, 48 uur na de eerste:		
Gewicht 10 druppels	1.119	} verschil 0.164
„ 10 „ 1/2 uur op 56°	0.955	
4e bepaling, 120 uur na de eerste:		
Gewicht 10 druppels	1.101	} verschil 0.182
„ 10 „ 1/2 uur op 56°	0.919	

Uit deze proef volgt, dat bij bewaren van serum het verschil voor en na het verhitten grooter wordt. Zelfs bij konijnenserum treedt onder deze omstandigheden een duidelijk verschil op. Dat dus het verminderen van oppervlaktespanning niet samen hangt met de hoeveelheid complement staat wel vast. We zien n.l., dat alleen tijdens bewaren de oppervlaktespanning onveranderd blijft, terwijl zooals bekend is het complement-gehalte belangrijk afneemt.

Dezelfde proeven heb ik uitgevoerd met andere tijden en andere temperaturen. De resultaten zijn steeds in dezelfde richting. Ik zal dus geen verdere cijfers geven.

## B. BREKINGSINDEX.

Voor het bepalen van den brekingsindex maakt men gebruik van den refractometer. Het door mij aangewende toestel was de z.g. dompelrefractometer van Zeiss, waarbij ik steeds van het hulpprisma gebruik maakte. Dit toestel is zeer eenvoudig, mits men slechts op de temperatuur let. Indien men, zooals in mijn geval, slechts de indices van twee stoffen (geactiveerd en geïnactiveerd serum) behoeft te vergelijken, valt, als men de bepalingen onmiddellijk na elkaar doet, ook deze factor weg. A priori was niet te verwachten, dat men veel verschil zou vinden tusschen den brekingsindex van actief en van inactief serum.

Deze index moge een goede maat zijn om de hoeveelheid eiwit in een vloeistof te bepalen, om ons eenige inlichtingen te geven over den toestand, waarin dit eiwit zich bevindt, is zij allerminst geschikt. Hiervan maakt men zelfs wel practisch gebruik.

Robertson (62) heeft er een methode op gebouwd om trypsine te bepalen. Hij bepaalt den brekingsindex van een caseïneoplossing en laat daarna de te onderzoeken trypsineoplossing inwerken. Na afloop hiervan is de brekingsindex gelijk gebleven. Nu slaat men de onverteerde caseïne neer en bepaalt den brekingsindex van het heldere filtraat. Het verschil tusschen deze indices is natuurlijk een maat voor de hoeveelheid gevormde splitsingsproducten. Ook Schorer (63) heeft een methode ter bepaling van pepsine, uitgaande van dit principe, aangegeven.

Ik heb verschillende eiwitoplossingen (album. ovorum siccum; caseïne; verdunde sera) verhit tot verschillende temperaturen, zelfs gekookt, zoodat er dikke troebelingen ontstonden. Steeds bleek de verhitting zonder invloed op den brekingsindex. Natuurlijk, indien men een dik neerslag krijgt en dit affiltreert neemt de brekingsindex belangrijk af. Ook bij het schudden van serum heeft men hetzelfde. Schudt men serum zoodanig, dat geen neerslag ontstaat (hetzij doordat het betrokken serum inactief is, hetzij dat de verhouding tusschen de grootte der buis en de hoeveelheid serum ongunstig is), dan is de brekingsindex na het schudden geheel gelijk aan die vóór het schudden. Ontstaat er daarentegen een neerslag, dan neemt de brekingsindex af. Centrifugeert men dit serum langen tijd, zoodat de troebelingen neerslaan, dan vermindert de brekingsindex nog meer.

Voorbeeld: Brekingsindex van een konijnenserum 1.37055.

Brekingsindex na 4 uur schudden bij 37° 1.34650.

Id. id. na 1 uur met 3000 toeren centrifugeeren 1.34612.

Daarentegen is er bij het onwerkzaam worden van serum door verhitten bij geen der door mij onderzochte sera iets van een constante verandering van den brekingsindex te bespeuren. De enkele malen, dat ik iets dergelijks meende waar te nemen, bleek steeds, dat ik een der buisjes langen tijd in de hand had gehouden, zoodat de temperatuur veranderd was. Ik heb nu beproefd of het mogelijk was door de dieren in andere omstandigheden te brengen een verschil tusschen de brekingsindices vóór en na het inactiveren te voorschijn te roepen.

Ik had n.l. gevonden bij mijn onderzoekingen over opper-

vlaktespanningen, dat bij sommige zieken het verschil tusschen oppervlaktespanning van het serum vóór en na het inactiveren verdwijnt.

Misschien zou het dus ook mogelijk zijn omgekeerd een verschil in brekingsindex te voorschijn te roepen.

Litteratuur heb ik over het onderwerp niet gevonden. Er is echter een vrij uitgebreide literatuur over de normale brekingsindex van het serum van verschillende diersoorten. (Botazzi (64) en Vernes en Marchadier (65).) Uit die litteratuur volgt o.a., dat menschelijk serum door verschillende voeding één veranderden brekingsindex kan vertoonen; sterk zweeten en vochtverlies op andere wijzen zou de brekingsindex doen stijgen. Bij dieren zou deze waarde veel standvastiger zijn. Over den invloed van verhitte op den brekingsindex van het serum heb ik niets gevonden. Alleen Reisz heeft proeven gedaan over den brekingsindex van pathologische cerebrospinaalvloeistoffen voor en na koken en dan verschillen gevonden. Hij geeft zelf aan, dat in al deze gevallen de hoeveelheid eiwit zeer belangrijk verhoogd was en dat dus het verschil onstaat door het neerslaan van de pathologische eiwitten. Ik heb nu den invloed van verschillende voeding bij mijzelf en bij eenige konijnen nagegaan.

Vasten gedurende 24 uur had bij mijzelf geen merkbaren invloed op den brekingsindex, terwijl voor en na inactivering deze waarde gelijk bleef. Bij een konijn, dat gedurende 40 uren vastte, bleek een belangrijke stijging van den brekingsindex te bestaan. De brekingsindex bij onze konijnen schommelde tusschen 1.34575 en 1.34687.

In vele tientallen waarnemingen heb ik nimmer daarbuiten liggende waarden gevonden. Bij het konijn, dat gedurende 40 uren gevast had, was de brekingsindex gestegen tot 1.35113. Werd dit serum gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^{\circ}$  verhit, dan ontstond een daling van den brekingsindex tot 1.35021. Werd nu het dier 30 cc physiologische zoutoplossing interperitoneaal ingespoten dan daalde de brekingsindex na 2 uren tot 1,34650 en bleef voor en na inactiveren gelijk.

Deze proef was bij verschillende konijnen steeds positief.

Laat men een konijn hongeren doch geeft men het dier water, dan blijft de brekingsindex onveranderd. Ten over-

vloede merk ik nog op, dat bij het inactiveren steeds iedere verdamping werd vermeden.

Verder heb ik bij mijzelf den invloed van verschillend voedsel nagegaan en het onderzoek verricht na maaltijden van verschillende samenstelling. Een invloed heb ik niet waargenomen. In het algemeen heeft dus het inactiveren doorverwarming geen invloed op den brekingsindex. Met het inactiveren door bewaren is het al niet anders. Indien serum steriel wordt opgevangen en aldus bewaard, behoudt het onveranderd zijn brekingsindex. Maar steriliteit is zelfs niet eens noodig. Ik heb serum van konijnen en caviae gedurende drie maanden niet steriel in de ijskast en ook bij kamertemperatuur bewaard, maar ondanks het feit, dat deze laatste sera beschimmeld waren en een walgelijken geur verspreidden, bleef de brekingsindex onveranderd.

Ten slotte nog een proefreeks. Indien men sera gedurende 25 minuten op  $50^{\circ}$  verhit blijft eveneens de brekingsindex onveranderd.

Neemt men nu drie buisjes resp. met versch. geïnactiveerd en gedurende 25 minuten op  $50^{\circ}$  verwarmd serum en centrifugeert deze gedurende één uur met 3000 omwentelingen, dan blijft ook na afloop van het centrifugeeren de brekingsindex onveranderd. Gaat men dan de brekingsindex der bovenste en onderste lagen in het centrifugebuisje na, dan blijkt deze overal gelijk te zijn. Op de beteekenis hiervan kom ik nog terug.

### C. HET ELECTRISCH GELEIDINGSVERMOGEN.

Het geleidingsvermogen der onderzochte sera heb ik bepaald met de brug van Wheatstone, daarbij de techniek volgend zooals deze door Kohlrausch is aangegeven. Voor sommige onderzoekingen is deze techniek niet geheel ideaal. Wanneer kleine hoeveelheden vloeistof ter beschikking staan, moet men zijn toevlucht nemen tot kleinere weerstandsvaten, die het nadeel hebben, dat het niet mogelijk is de telefoon geheel tot zwijgen te brengen; men moet dus instellen op een toonminimum, wat niet altijd even gemakkelijk is. Er is nu een methode bekend, waarmede het gelukt in één druppel serum

het electricch geleidingsvermogen te bepalen (Bromberg 66). Deze bepaling vereischt echter een afzonderlijk instrumentarium; ik heb mij dus aan Kohlrausch'sche techniek gehouden, doch heb mijn meeste waarnemingen gedaan met sera, waarvan grootere hoeveelheden konden worden gebruikt (rund en varken). Toch zijn ook het serum van cavia, konijnen en menschen onderzocht. Het geleidingsvermogen van een dierlijke vloeistof in het algemeen hangt van verschillende factoren af, n. l. van de ionenconcentratie, van den aard en de concentratie der niet-electrolyten, van het aantal in de vloeistof gesuspendeerde deeltjes, die zelf niet geleidend zijn, en van den aard der colloïden. Vooral deze laatste factor is zeer belangrijk, daar de colloïden door adsorptie van electrolyten een grooten invloed kunnen uitoefenen.

Bugarozky en Tangl (67) hebben een regel opgesteld, die zegt, dat ieder percent eiwit in bloedserum den weerstand met  $2\frac{1}{2}$  % doet afnemen. Noemt men dus  $x$  het eiwitpercentage dan is het gecorrigeerde geleidingsvermogen

$$K_c = K \frac{100 + 2.5 x}{100}$$

waarin  $K$  het gevonden geleidingsvermogen van het serum aangeeft.

Tegen deze berekening teekent echter Botazzi in het handboek van Neuberg protest aan. Immers de formule houdt geen rekening met ureum, suiker, vet, lipoiden, kreatine en andere stoffen, die onder pathologische omstandigheden zeker zoodanig vermeerderd kunnen zijn, dat de weerstand belangrijk beïnvloed wordt.

Wil men nu een vergelijking maken tusschen het geleidingsvermogen van verhit en onverhit serum, dan moet men op één bron van fouten letten.

Bij het verhitten verandert het koolzuurgehalte van het bloed.

Dat deze factor een rol kan spelen zullen we nog zien bij de bespreking van de reactie van het serum. Of hij bij de bepalingen van den weerstand een rol speelt lijkt mij twijfelachtig. Ik heb n. l. dubbel-bepalingen uitgevoerd, met sera verhit onder omstandigheden, waarbij de mogelijkheid van koolzuurontwijking tot een minimum was gereduceerd (over

de techniek later) en met sera, verhit zonder eenige voorzorg. Ik heb nooit verschillen in geleidingsvermogen kunnen aantoonen.

De litteratuur over het geleidingsvermogen van bloedserum is reeds zeer uitgebreid. Een goede bespreking vindt men in het handboek van Neuberg en vooral in de Biochemische Arbeitsmethoden van Abderhalden. Hier moge met het allervoornaamste volstaan worden.

Bugarozky en Tangl bepaalden het geleidingsvermogen van het serum bij paard, hond, rund, varken, schaap en kat en vonden tamelijk uiteenlopende waarden. Zij deden ook bepalingen bij den mensch en vonden bij verschillende individuen eveneens verschillende waarden.

Viola onderzocht bij een volmaakt gezonden man op gelijke uren van verschillende dagen bij volmaakt gelijke levenswijze en dieet het geleidingsvermogen van het serum en vond zelfs dan op verschillende dagen niet onbelangrijke verschillen.

Frei (68), die zeer uitgebreide onderzoekingen heeft ingesteld over verschillende physisch-chemische eigenschappen van het bloedserum bij paarden, heeft ook den invloed van immunisatie op het geleidingsvermogen bestudeerd. Indien er eenige invloed te bespeuren is, dan is deze uiterst gering. Frei berekent, dat het gemiddeld geleidingsvermogen van normaal paarden-serum ongeveer 0.5 % hooger is dan bij immune dieren. Alvorens nu mijn eigen onderzoek te beschrijven, is het misschien gewenscht na te gaan of a priori veranderingen van den weerstand door inactiveren zijn te verwachten.

Dit nu lijkt mij zeker niet onmogelijk. Het adsorptievermogen van colloïden voor electrolyten hangt samen met de temperatuur.

Verondersteld, dat bij 56° een beginnende coagulatie plaats heeft, dan zal ook het adsorptievermogen van dat eitwit, ook na afkoeling, een andere zijn dan voor de verhitting. Er zullen dus ionen kunnen vrijkomen, die de geleidbaarheid doen stijgen. Indien de veronderstelde coagulatie inderdaad bestaat, dan is ook de beïnvloeding van het electrisch geleidingsvermogen op mechanische wijze door de ontstane eitwitdeeltjes niet onmogelijk.

Zooals ik reeds mededeelde, werkte ik met de opstelling van Kohlrausch. De weerstand werd steeds bepaald bij 37°,



steeds werd eenzelfde weerstandsvat en dezelfde elektroden gebruikt. Voor iedere bepaling werden steeds snel achtereens 5 á 7 aflezingen bij verschillende weerstanden gedaan en het gemiddelde als uitkomst genomen.

Het bleek mij nu in de eerste plaats bij een groot aantal bepalingen, dat bij verschillende individuen steeds een verschillend geleidingsvermogen van het serum wordt gevonden. Bij alle onderzochte sera van varken, rund, konijn, cavia en ook bij mijn eigen serum waren steeds groote schommelingen aanwezig. Pogingen om de grenzen te vinden van de normale schommelingen heb ik niet gedaan.

Zij lagen niet in mijn doel; trouwens voor de door mij onderzochte dieren zijn deze waarden in de litteratuur te vinden. Alleen voor de cavia heb ik ze niet aangetroffen; het zou me echter om voor de hand liggende redenen toch niet mogelijk zijn geweest, hier over een voldoende aantal waarnemingen te beschikken.

Ik vermeld hier alleen eenige cijfers, die den weerstand voor en na het inactiveeren toelichten. Als steeds geef ik slechts de uitkomsten van één bepaling.

Diersoort.	Weerstand in versch serum.	Weerstand 20 min. op 50°.	Weerstand 30 min. op 56°.
Cavia	105.62	105.48	105.42
Varken	102.48	102.48	102.57
Rund	108.42	108.46	108.38
Konijn	102.64	102.58	102.48
Mensch	102.68	102.60	102.59

Van de a priori verwachte verandering van den electricen weerstand blijkt dus niets. Zeer merkwaardige uitkomsten heb ik twee malen bij een konijn gehad, dat gedurende 24 uur uitsluitend water had gekregen, doch dat geen voedsel had ontvangen.

Weerstand versch serum.	Id. na 20 minuten op 50°.	Id. na 30 minuten op 56°.
103.28	106.40	102.39
104.85	106.32	102.99

Nog even wordt hier opgemerkt, dat bij bovenstaande waarneming de weerstandscapaciteit van het gebruikte vat

buiten beschouwing is gelaten. Dit kon daarom geschieden, omdat steeds dezelfde electroden en hetzelfde vat werden gebruikt.

Ik heb nu het serum van het rund, varken en mensch herhaaldelijk gedurende een uur met 3000 omwentelingen per seconde gecentrifugeerd om daarna te bepalen of het misschien mogelijk zou zijn een verschil in weerstand tusschen onderste en bovenste lagen aan te toonen. De gevonden verschillen zijn te inconstant en te gering om er eenige waarde aan te kunnen hechten. Meestal was zelfs in het geheel geen verschil waar te nemen.

Tot slot nog even de vraag, welken invloed het inactiveeren door schudden op het geleidingsvermogen heeft. Deze proeven zijn genomen met bloed van caviae, varkens en konijnen. Indien deze sera gedurende 4 uren bij  $37^{\circ}$  worden geschud en daarna tot helderheid worden gecentrifugeerd, dan blijkt de heldere vloeistof een grooteren weerstand aan den electricischen stroom te bieden dan de oorspronkelijke, gelijk uit onderstaand tabelletje blijkt.

	versch.	geschud.
Cavia	105.18	107.32
Varken	103.49	106.18
Konijn	103.41	106.92

Zeer verwonderlijk is dit eigenlijk niet, althans indien men aan de waarschijnlijkheid denkt, dat het ontstane neerslag wel een aantal zouten zal hebben meegesleurd.

#### D en E. HET SOORTGELIJK GEWICHT EN HET CHLOORGEHALTE.

Over beide kan ik zeer kort zijn; het soortgelijk gewicht heb ik bepaald met de methode van Hammerschlag, het chloorgehalte volgens Volhardt-Dénigès.

Geen van beide veranderen door verhitting.

Langdurig sterk centrifugeeren laat ze onbeïnvloed.

Na hetgeen over den electricischen weerstand is medegedeeld, was het ook moeilijk anders te verwachten,

## F. DE ZUURGRAAD.

De vraag, of de zuurgraad van het serum door verhitting wordt veranderd, is herhaaldelijk gesteld en verschillend beantwoord.

Michaelis (69) mat b.v. de waterstofionen-concentratie, met behulp van de gasketen, in serum voor en na het inactiveren en vond deze na inactiveren geringer dan daarvoor. Davidson (70) vond geen verschillen en schrijft de uitkomsten van Michaelis daaraan toe, dat deze geen maatregelen nam om het ontsnappen van koolzuur te voorkomen.

Het is dus gewenscht het serum zoodanig te inactiveren, dat het koolzuurgehalte vóór en na het inactiveren gelijk is. In principe is de eenvoudigste methode daartoe die van Höber (71), die het serum geheel van koolzuur bevrijdt alvorens er mede te experimenteren. Intusschen valt het werken volgens Höber in de practijk niet mede.

Een zeker minder voldoende maar blijkens de uitkomst toch niet geheel onbruikbare methode heb ik toegepast. Aan de capillair van een picnometer wordt een klein stukje zuigslang verbonden, die met een klemkraan kan gesloten worden. Daarna wordt het geheel met serum gevuld tot ook het slangetje vol is, de klemkraan gesloten en het geheel verhit en niet geopend alvorens het opnieuw de kamertemperatuur heeft aangenomen. Om nu den zuurgraad van het serum te bepalen, komt practisch slechts één methode in aanmerking, n.l. het bepalen van de waterstofionen-concentratie door middel van de gasketen.

Ik ben niet in de gelegenheid geweest dergelijke bepalingen te verrichten, maar de uitkomsten der ruwe oriënteerende proeven door mij verricht, maakt eigenlijk het verrichten van fijnere onderzoekingen niet noodig. De indicatorenmethode van Sörensen is onbruikbaar voor het meten van den zuurgraad in het serum, omdat de eiwitten storend werken. In mijn geval was het me echter minder te doen om de juiste zuurgraad te weten, dan wel om eventueele veranderingen op het spoor te komen. Dank zij de welwillendheid van Prof. Schoorl. en diens assistent Dr. Kolthof heb ik enkele van die bepalingen verricht. Het bleek, dat neutraalrood een bijzonder

goede indicator voor dit doel is. Tusschen verhit en onverhit serum van cavia, konijn en rund bleek nimmer eenig verschil te bestaan. Werd de verhitting in een gewone dichtgesmolten buis uitgevoerd dan was wel degelijk een verschil waar te nemen, zoodat de zuurgraad van het verhitte serum grooter scheen dan van het onverhitte. Het neutraalrood nam dan een meer gele tint aan na toevoeging van het onverhitte dan van het verhitte serum.

Hoewel het verschil niet sterk is, was het toch steeds zoo duidelijk, dat iemand, die wist waar het om ging en wien twee buisjes, het eene met actief, het andere met inactief serum, getoond werden, steeds correct aanwees, welk actief was en welk niet.

De verklaring van Davidson lijkt dus, zoover uit deze ruwe proeven iets mag worden besloten, juist. Ten overvloede moge opgemerkt worden dat Brooks in zijn meermalen genoemde onderzoekingen bij photoinactivering evenmin een verschil van waterstofionen-concentratie zag ontstaan. Verder is nog nagegaan of, indien serum verhit werd terwijl het ontwijken van koolzuur werd belet, toch inactivering optrad. Dit bleek inderdaad het geval te zijn.

## G. HET ULTRAMICROSCOPISCH BEELD.

Het ultramicroscoop is enkele malen aangewend om immuniteitsreacties te bestudeeren. Hoofdzakelijk in de syphilisdiagnostiek heeft het een rol gespeeld, dank zij een mededeeling van Jacobsthal (72). Hij vond, dat syphilitisch serum in tienmalige verdunning bij vermenging met een uittreksel uit een syphilitische lever een eigenaardig ultramicroscopisch beeld, voornamelijk uit onregelmatige vormsels bestaande, vertoonde. Normale sera vertoonden dit beeld niet. Dit schijnt werkelijk herhaaldelijk juist te zijn. (Brack en Hidaka) (73); ook Peyre (74) vindt bepaalde verschillen. Zoo beweert hij in normale sera nooit een korreling te hebben waargenomen, die bij syphilis wel zou voorkomen. Toch is de methode volgens Boas en Thomson niet te vertrouwen omdat ook in normale sera een overeenkomstig ultramicroscopisch beeld kan optreden. Terecht heeft indertijd Wolff bij een debat over de griep er nogeens voor

gewaarschuwd vooral niet te veel op een ultramicroscopisch beeld te vertrouwen, omdat zoo gemakkelijk verwarring met kunstproducten mogelijk is (75).

Toen ik begon om te trachten een verschil te zien tusschen actieve en inactieve sera, had ik wel eenige hoop, dat het gelukken zou op deze wijze iets verder te komen. Het was mij n.l. opgevallen, dat inactieve sera meestal iets troebeler zijn dan actieve. Ook Dold (l. c.) heeft dit later opgemerkt. Hij vond met de agglutinoscoop verschillen tusschen geïnactiveerd en versch serum van de cavia, het konijn, het varken en de menschen, welke vooral bestaan in het optreden van een eerst homogene, later niet meer homogene troebeling. Bij serum van het rund, het schaap en het paard waren deze verschillen eveneens te zien. De hoop dat wij met het ultramicroscop meer zouden zien, is niet verwezenlijkt.

Het ultramicroscopisch beeld van het serum is volkomen hetzelfde vóór en na het activeeren. Men ziet n.l. een homogene massa waarin hier en daar enkele kleine bolletjes gelegen zijn. Ook door langdurig te centrifugeeren wordt geen verschil in het onderste laagje verkregen. Dit nu was, na al wat er over het centrifugeeren van colloïden bekend was, wel te verwachten. Zoo gelukte het b.v. Bechholt (76) door langdurig centrifugeeren met 6000 omwentelingen collargol te scheiden in een grovere en een fijnere suspensie. Friedenthal (77) heeft centrifugen geconstrueerd, die 20.000 tot 100.000 omwentelingen in de seconde maken en waarmede het gelukt de caseïne uit de melk te slingeren en enkele colloïden quantitatief te scheiden. Ook is het mogelijk op deze wijze bacterieën uit te slingeren en zoo een oplossing te steriliseeren.

Een centrifuge met een dergelijke verbazende snelheid stond echter niet tot mijn beschikking.

Ook door centrifugeeren van het verdunde serum, waaraan een weinig alkali is toegevoegd om de zuurgraad van het serum niet te veel te doen veranderen, gelukt het niet een verschil waar te nemen tusschen actieve en inactieve sera.

Vatten wij de uitkomsten onzer proeven samen dan volgt, dat bij het inactiveeren door hitte (en door stralen volgens Brooks) de oppervlaktespanning wordt beïnvloed en verder

niets en de vraag is dus of het op grond van deze gegevens mogelijk is zich een oordeel te vormen over den aard van het inactiveerings-proces. In de eerste plaats kan men zich voorstellen, dat bij de verhitting een stolling, een denaturering van eiwit plaats heeft en de vraag is dus hoe de verschillende onderzochte waarden zich gedragen indien een eiwitoplossing wordt verhit totdat het optreden van stolling duidelijk begint te worden.

Ik heb mijn onderzoekingen uitgevoerd met serum verdund met aq. dest. Hierbij mag de temperatuur niet zoo hoog worden opgevoerd, dat een vlokkig neerslag ontstaat.

Ik kreeg o. a. de volgende resultaten:

#### Runderserum 1 : 10.

(gen. 10 druppels).	Versch	Verhit tot 60°	tot 70°	tot 80°	tot 90°
Oppervlaktespanning	0.543	0.531	0.519	0.516	0.502
Brekingsindex	1.33628	1.33628	1.33628	1.33590	1.33590
Electr. weerstand.	864.2	862.6	884.7	889.7	914.6

#### Konijnenserum 1 : 10.

	Versch	Verhit tot 60°	tot 70°	tot 80°	tot 90°
Oppervlaktespanning	0.584	0.562	0.551	0.536	0.506
Brekingsindex	1.33551	1.33551	1.33551	1.33551	1.33513
Electr. weerstand.	842.8	840.6	860.0	864.4	872.8

Deze proeven zijn vaak herhaald, ook met andere verdunningen.

Men ziet, dat bij verhitting de oppervlaktespanning daalt, terwijl de brekingsindex zelfs bij verhitting tot 80°, waarbij de vloeistof melkachtig wordt, behouden blijft.

Daarentegen wordt de weerstand voor den electrischen stroom niet onbeduidend verhoogd. Hierbij moet opgemerkt worden, dat bij 70° reeds duidelijk stolsels optreden, zoodat men om de invloed van verhitting op de weerstand na te gaan, alleen de verhitting tot 60°, waarbij ook reeds troebeling ontstaat, mag mederekenen. Het blijkt nu, dat bij deze temperatuur het geleidingsvermogen nog onveranderd blijft. De physische veranderingen, die bij het inactiveeren optreden,

beantwoorden dus aan de veranderingen, die bij beginnende coagulatie worden gezien.

Toch moet nog even aan een andere mogelijkheid worden gedacht.

Indien een eiwithoudende vloeistof aan een peptische vertering wordt onderworpen, daalt de oppervlaktespanning; bij trypsinewerking is de invloed nog fraaier waar te nemen. Daarentegen blijft de refractrometische waarde onveranderd, een feit, waarop, gelijk we reeds zagen, een aantal methoden voor pepsine- en trypsinebepaling zijn gebaseerd.

Ik kon me eveneens overtuigen, dat het elektrische geleidingsvermogen geen verandering ondergaat. Ik heb dus nog even de mogelijkheid onder de oogen gezien, dat inactiveren van serum op een of ander autolytisch proces berust, dat bij  $\pm 56^\circ$  zijn optimum heeft. Dit nu is zeker niet het geval zooals uit het volgende blijkt: Ieder, die gewerkt heeft volgens de methode van Abderhalden weet, dat menschelijke sera bij dialyse meestal sporen van ninhydrinpositieve stoffen leveren. Onder sommige omstandigheden, vooral bij cachexie, resorptie van exsudaten en transudaten, etteringen, groote bloedingen kan het aantal dezer stoffen belangrijk stijgen. Indien men echter venaepunctie doet bij een nuchter gezond individu, dan is het serum meestal zóó arm aan ninhydrinpositieve stoffen, dat deze practisch niet in aanmerking komen. Wil men een contrôle hebben dan kan men naast de ninhydrinreactie nog de minder gevoelige biureetreactie uitvoeren. Het is mij nimmer gelukt om in een dergelijk aan ninhydrinpositieve stoffen arm serum na inactivering bij dialyse ninhydrinpositieve stoffen aan te toonen. Ik heb deze proeven gedaan zoowel met mijn eigen bloed als met het bloed van nuchtere caviae en konijnen. Indien bij inactivering de autolyse een rol speelde zou men een andere uitkomst mogen verwachten.

Het wezen van het inactiveringsproces is hiermede dus allermintst opgelost. Alleen meen ik het waarschijnlijk te hebben gemaakt, dat bij inactivering door warmte eiwit denatureering een rol speelt, terwijl ik geheel in het midden moet laten op welke wijze dit geschiedt.

## HOOFDSTUK IV.

## De samengestelde bouw van het complement.

Tot nu toe hebben wij van het complement als van een bepaalde chemische stof gesproken en ons niet verder de vraag voorgelegd of het complement al dan niet uit verschillende stoffen is opgebouwd.

De onderzoekingen van Ferrata (78) hierover zijn klassiek geworden. Hij vond dat het mogelijk is door dialyse (dus door verandering van de zoutconcentratie van het medium) of door toevoeging van zwakke zuren (b.v.  $\text{CO}_2$ ) een neerslag te doen ontstaan. Indien het neerslag van de bovenstaande vloeistof wordt gescheiden en wederom opgelost dan bezit dit geen complementwerking. De bovenstaande vloeistof bezit deze evenmin. Samen vormen ze echter weer volwaardig complement. Ferrata besloot hieruit dat het complement in twee stukken was uiteen gevallen en noemde het neergeslagen deel middenstuk en het opgeloste deel eindstuk. Deze onderzoekingen zijn zeer vaak bevestigd (zie o.a. Leschly 79, Brand 80, Lieffmann 81, Sachs en Altmann 82) maar de verklaring wordt nog niet algemeen aangenomen. Zoo neemt b.v. Dean (83) allerminst het bestaan van een middenstuk in het neerslag aan en houdt het geheele eindstuk-middenstukvraagstuk voor een kwestie van adsorptie. Dit nu raakt de verklaring, maar laat het feit onaangetast. De door Ferrata waargenomen verschijnselen bestaan dus zeker en wij zullen na hebben te gaan, welke eigenschappen beide fracties hebben.

Zijn ze beiden onbestendig tegen verhitting, of is de thermolabiliteit aan één der beide fracties gebonden. Ook hierover bestaan verschillende meeningen.

Volgens Ferrata is slechts het eindstuk, volgens Brand zijn zoowel eind- als middenstuk thermolabiel. Marks (84) en Husler (85) beschouwen het eindstuk als thermolabiel, het middenstuk zou door verhitting op  $56^\circ$  geleidelijk vernietigd worden. Ik heb hierover een reeks van onderzoekingen verricht. In de meeste gevallen werd het complement geplitst door dialyse in sommigen ook door doorleiding van koolzuur.



Het eindstuk werd afgegoten en het middenstuk in physiologische zoutsolutie opgelost. Het zou nu het eenvoudigste zijn, middenstuk en eindstuk te verhitten en combinaties van verhitte en onverhitte fracties te onderzoeken maar zoo eenvoudig is de zaak niet. Het blijkt n.l. dat het middenstuk de onhebbelijke gewoonte heeft plotseling te verdwijnen, zoodat het herhaaldelijk voorkomt dat reeds voor het verhitten middenstuk en eindstuk te zamen geen complement opleveren. Reeds was ik van plan dit deel van het onderzoek op te geven, toen ik kennis maakie met een publicatie van Hecker (86). Ook hem was n.l. het verdwijnen van het middenstuk opgevallen. Het bleek hem dat dit verdwijnen echter slechts schijnbaar is en dat, indien men eerst de vloeistof, waarin het middenstuk aanwezig is, met den amboceptor samen brengt, dit mengsel in staat is het eindstuk vast te leggen. Zoo bleek mij ook dat, wanneer men roode bloedlichaampjes van het schaap, amboceptor en de vloeistof, die het middenstuk bevat had samen gebracht, de bloedlichaampjes, ge-„persensibiliseerd” waren, volgens de nomenclatuur van Michaelis en Skwirsky (87). Van deze gegevens kon ik gebruik maken om de thermolabiliteit van de complementfracties te bestudeeren.

Ik laat een protocol volgen :

Caviaserum titer 0.09; gedurende 15 uren tegen stroomend water gedialyseerd. Daarna wordt de vloeistof zeer kort gecentrifugeerd; het bovenstaande afgegoten; het neerslag in physiologische zoutsolutie opgelost. Beide vloeistoffen worden nu in twee deelen verdeeld. Noemen wij het middenstuk en eindstuk M en E dan krijgen we dus 4 buizen; 2 M en 2 E.

Nu wordt van M en E ieder een buisje gedurende 30 minuten op  $56^{\circ}$  verwarmd zoodat we krijgen M, M<sub>1</sub> (verwarmd) E en E 1.

Nu blijkt :

0.5 cc. rdbldl + 1 cc. amboceptorverduunning + 0.09 Complement: haemolyse.

0.5 cc. rdbld + 1 cc. amboceptorverduunning + 0.09 cc. M + 0.09 cc. E: haemolyse.

0.5 cc. rdbld + 1 cc. amboceptorverduunning + 0.09 cc. M<sub>1</sub> + 0.09 cc. E: geen haemolyse.

0.5 cc. rdbl + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.09 cc. M + 0.09 cc. E: ged. haemolyse.

0.5 cc. rdbl + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.5 cc. M + 0.09 cc. E: haemolyse.

Hieruit volgt dus dat het cavia-eindstuk door verhitting gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^\circ$  onwerkzaam wordt en dat het middenstuk eveneens zijn werkzaamheid verliest, maar zeer veel langzamer als het eindstuk. Het middenstuk blijkt tegen een verhitting van 1 uur bij  $56^\circ$  niet bestand te wezen. Zeer merkwaardig is nu, wat blijkt bij kortdurende verhitting. Wanneer men het eindstuk gedurende 5 minuten bij  $56^\circ$  verhit, is de werkzaamheid al duidelijk verminderd, bij een verhitting gedurende één kwartier is deze verdwenen. Het middenstuk neemt echter gedurende de eerste 5 minuten in werkzaamheid toe.

Ik noem thans gedurende 5 minuten op  $56^\circ$  verhitte fracties  $M_5$  en  $E_5$  en vermeld de volgende proef:

Titer van het complement 0.07.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08 complement: haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08 M + 0.08 E: haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08  $M_5$  + 0.08  $E_5$ : gedeelt. haemolyse,

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08  $M_5$  + 0.08 E: haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.06  $M_5$  + 0.08 E: haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.05  $M_5$  + 0.08 E: gedeelt. haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.04  $M_5$  + 0.08 E: geen haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.06 M + 0.08 E: geen haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08 M + 0.08  $E_5$ : sporen haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08 M + 0.1  $E_5$ : gedeelt. haemolyse.

0.5 cc. rdbl. + 1 cc. amboceptorverdunding + 0.08 M + 0.14  $E_5$ : haemolyse.

We zien hier dus de toeneming der werkzaamheid van het middenstuk bij korte verhitting.

Er is nog een andere methode mogelijk om de thermosen-sibiliteit der verschillende complementfracties te bestudeeren. We gaan hierbij uit van het feit dat midden- en eindstuk, ieder van een ander diersoort, samen een bruikbaar complement kunnen vormen. Dit vraagstuk is vooral door Van Looveren (88) bestudeerd. Deze vond o.a. dat het middenstuk van het varken en het eindstuk van de cavia samen een bruikbaar complement kunnen vormen, iets wat ik bevestigen kan. Ritz (89) heeft n.l. gevonden dat het serum van witte muizen uitsluitend middenstuk bevat, doch dat het door toevoeging van eindstuk van de cavia een volledig complement kan leveren. Het werken met serum van witte muizen heeft natuurlijk het bezwaar dat men vele dieren moet opofferen voor men een behoorlijke hoeveelheid serum tot zijn beschikking heeft.

Een voordeel is echter dat men niet behoeft te dialyseeren om het middenstuk te verkrijgen en dat de schijnbare verdwijning van het middenstuk, zooals die bij de oplossing van middenstuk in zoutsoluties voorkomt, in het serum nimmer wordt waargenomen.

Verwarmt men nu het wittemuizenserum gedurende  $1/2$  uur op  $56^\circ$ , dan is de hoeveelheid middenstuk slechts weinig afgenomen; na 1 uur zijn nog sporen aan te toonen; na 70 minuten is geen middenstuk meer aanwezig. Het is mij echter niet gelukt door kort durende verhitting een toeneming van de werkzaamheid van het middenstuk te krijgen.

Toch is deze toeneming geen monopolie van het caviaserum. Ook voor het varken kon ik haar aantonen, zoowel indien ik uitsluitend varkensserum als de combinatie varken-cavia volgens Van Looveren gebruikte.

Het volgende voorbeeld is hiervan het bewijs:

Varkenscomplement: titer 0.1.

We noemen wederom het eindstuk E, het middenstuk M, het gedurende  $1/2$  uur op  $56^\circ$  verhitte eindstuk en middenstuk  $E_{30}$  resp.  $M_{30}$  en het gedurende 5 minuten verhitte eindstuk en middenstuk  $E_5$ , resp.  $M_5$ .

	0.12	varkensserum	haemolyse.
	0.1	M + 0.1 E	„
	0.1	M + 0.3 E <sub>30</sub>	geen haemolyse.
0.5 schapen- erythrocyten +	0.1	M + 0.1 E <sub>5</sub>	„ „
	0.2	M + 0.1 E	„ „
	0.3	M + 0.1 E	haemolyse.
1 cc. ambocep- torverdun- ning +	0.1	M + 0.1 E <sub>5</sub>	geen haemolyse.
	0.1	M + 0.2 E <sub>5</sub>	haemolyse.
	0.08	M <sub>2</sub> + 0.1 E	„
	0.06	M <sub>2</sub> + 0.1 E	gedeeltelijke haemolyse.
	0.05	M <sub>2</sub> + 0.1 E	geen haemolyse.
	0.08	M + 0.1 E	„ „

Ook hier dus weer een toeneming van de werkzaamheid van het middenstuk. De invloed van verhitting op de deelen van het complement is dus wel zeker. Gelukt het nu ook de beide stukken door schudden te inactiveren? Dit is inderdaad het geval. Zoowel geschud eindstuk als geschud middenstuk zijn onwerkzaam. Hierbij doet zich nu het verrassende feit voor dat geschud middenstuk + actief eindstuk of geschud eindstuk + actief middenstuk een volwaardig complement kunnen leveren.

Geschud eindstuk en geschud middenstuk geeft echter tezamen geen complement-werking meer. Dit is het eerst door Kashiwabura (90) aangetoond.

Ik heb dit nagewerkt en juist gevonden. Er is nog een feit aan het licht gekomen, wat ik in de litteratur niet heb gevonden: Bij het schudden van één fractie verdwijnt het vermogen om met de andere fractie van een ander diersoort complement te geven. Zoo geeft geschud caviamiddenstuk + versch eindstuk van de cavia wel een complement-werking; daarentegen is een mengsel van geschud caviamiddenstuk en versch varkenseindstuk onwerkzaam.

Nog twee punten heb ik nader onderzocht. In de eerste plaats heb ik nagegaan of het mogelijk was veranderingen in de oppervlaktespanning bij verhitting van eind- en middenstuk afzonderlijk aan te toonen, ook hier heb ik kunnen vinden, dat bij verhitting de oppervlakte-spanning zoowel

van eind- als van middenstuk afneemt, hoewel in verschillende mate.

Ik geef het volgende voorbeeld:

Gewicht 10 druppels varkensserum 1.106 gram.

Gewicht 10 druppels inactief varkensserum 1.081 gram.

Een hoeveelheid van dit serum wordt gedurende 12 uur tegen stroomend water gedialyseerd. Daarna wordt het bezinsel (middenstuk) gedurende 2 minuten afgecentrifugeerd, het eindstuk afgegoten en het middenstuk in 10 cc. 0.9 % NaCl opgelost.

Van beide oplossingen wordt een deel gedurende  $\frac{1}{2}$  uur op  $56^\circ$  verwarmd ( $M_{30}$  en  $E_{30}$ ) en een deel gedurende 5 minuten op  $56^\circ$  ( $M_5$  en  $E_5$ ).

We krijgen nu de volgende cijfers:

Gewicht 10 druppels	M	E	$M_5$	$E_5$	$E_{30}$	$M_{30}$
	1.138	1.121	1.133	1.119	1.102	1.126

We zien hier dus toeneming van de oppervlakte-spanning door de splitsing ten opzichte van het oorspronkelijke serum. Voor het eindstuk is dit wel aan globuline-verlies te wijten hoewel de zoutarmoede van de vloeistof wel een gedeeltelijk compenseerende rol zal spelen. Voor het middenstuk is de toeneming wel aan de hoeveelheid NaCl toe te schrijven.

We zien verder dat bij verwarming de oppervlaktespanning van beide fracties onmiddellijk afneemt en niet bij korte verwarming toeneemt, zoals misschien de toeneming van de werkzaamheid van het middenstuk zou kunnen doen gelooven. Tevens volgt uit bovengenoemde cijfers dat het middenstuk een langzamer daling der oppervlaktespanning vertoont dan het eindstuk, iets wat ik steeds, ook bij andere zouthoeveelheden, heb kunnen vinden.

Tot slot nog een enkel woord over de regeneratie. Deze komt volgens mijn onderzoekingen bij de gesplitste fracties, indien deze door verhitting geheel of gedeeltelijk onwerkzaam zijn gemaakt, niet voor. De reeds vroeger vermelde proeven van Graminitzki, die voor sommige fermenten juist zijn, kan ik voor de complementfracties evenmin als voor het complement bevestigen.

Omgekeerd schijnen de geschudde fracties wel tot een zekere regeneratie in staat te zijn, zoals zou kunnen volgen uit het reeds

vermelde feit dat een geschudde fractie en een ongeschudde andere fractie samen een complement kunnen vormen. Van een restitutio ad integrum is echter geen sprake. Immers fracties van een andere diersoort zijn niet meer in staat een complement te leveren, evenmin als twee geschudde fracties.

Ik mag misschien dit hoofdstuk eindigen met de opmerking dat het werken met eind- en middenstuk eigenlijk een werken met zeer vele onbekende factoren is.

Is het niet mogelijk dat bij de dialyse het complement in het geheel niet gesplitst wordt en dat een inactivering door precipitatie waarmede de colloïden met complementaire werking worden medegesleurd, plaats vindt? Men zou nog even goed kunnen aannemen dat het voor de complementwerking noodig is dat de door het precipitaat meegesleurde stof slechts in een bepaald medium (hier het eindstuk) bij een zekere zoutconcentratie zijn werking ontvouwt!

De kwestie is voorloopig niet te beslissen.

---

## HOOFDSTUK V.

### Quantitatieve verhoudingen in het haemolytisch systeem.

Ook over de quantitatieve verhoudingen in het haemolytisch systeem heerscht nog allerminst eenstemmigheid. Kaup (10) heeft in zijn belangrijke monografie getracht de kwestie nauwkeurig te onderzoeken en tot vaste uitkomsten te geraken.

Daar mijn uitkomsten niet steeds geheel met de zijne overeenstemmen, wil ik eerst in het kort mededeelen, welke de uitkomsten van Kaup zijn. Zij zijn in de volgende regels vast te leggen.

1. Bij een constante voldoende hoeveelheid complement is de benodigde hoeveelheid amboceptor evenredig met de hoeveelheid roode bloedlichaampjes.

2. Bij een constante voldoende hoeveelheid amboceptor is de hoeveelheid benodigd complement onafhankelijk van de hoeveelheid roode bloedlichaampjes.

3. Om een bepaalde hoeveelheid erythrocyten op te lossen is de hoeveelheid complement afhankelijk van de hoeveel-

heid amboceptor en wel zoo, dat er minder complement noodig is, naarmate er meer amboceptor aanwezig is.

4. Het is onverschillig, in welke verdunning complement en amboceptor reageeren. Alleen de absolute hoeveelheid complement en amboceptor zijn van beteekenis; hun concentratie is zonder belang.

Om den eersten regel te toetsen heb ik eenige proeven uitgevoerd, waarvan het volgende een voorbeeld is.

*1e reeks:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000 (titer 1/6000)	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	0.8	0.5	1
0.4	0.6	0.5	1
0.6	0.4	0.5	1
0.8	0.2	0.5	1
0.9	0.1	0.5	1
1.—	—	0.5	1

*2e reeks:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 10%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	0.8	0.5	1
0.4	0.6	0.5	1
0.6	0.4	0.5	1
0.8	0.2	0.5	1
0.9	0.1	0.5	1
1.—	—	0.5	1

*3e reeks:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 20%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	0.8	0.5	1
0.4	0.6	0.5	1
0.6	0.4	0.5	1
0.8	0.2	0.5	1
0.9	0.1	0.5	1
1.—	—	0.5	1

In de eerste rij trad totale haemolyse op na 2 uur tot en met 0.2 cc. amboceptor; in de tweede rij tot en met 0.4 cc., terwijl in de derde rij de haemolyse met 0.6 cc. amboceptor niet volledig was. Dit klopt dus geheel met den eersten regel van Kaup.

Wat den tweeden regel aangaat, stemmen mijn uitkomsten niet geheel met die van Kaup overeen. Volgens Kaup zou n.l., indien voldoende amboceptor aanwezig is, een hoeveelheid complement iedere hoeveelheid bloedlichaampjes kunnen oplossen. Ditzelfde is ook beweerd door Scheller (91). Daarentegen beweert Leschly, dat een hoeveelheid complement benodigd voor een aantal roode bloedlichaampjes hoogstens de dubbele hoeveelheid roode bloedlichaampjes kan oplossen. Uit mijn proeven volgt, dat ik dichter bij de meening van Leschly sta dan bij die van Kaup en Scheller.

*1e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	1	0.5	0.8
0.4	1	0.5	0.6
0.6	1	0.5	0.4
0.8	1	0.5	0.2
0.9	1	0.5	0.1

*2e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 10%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	1	0.5	0.8
0.4	1	0.5	0.6
0.6	1	0.5	0.4
0.8	1	0.5	0.2
0.9	1	0.5	0.1

*3e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 15%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	1	0.5	0.8
0.4	1	0.5	0.6
0.6	1	0.5	0.4
0.8	1	0.5	0.2
0.9	1	0.5	0.1



*4e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 25%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	1	0.5	0.8
0.4	1	0.5	0.6
0.6	1	0.5	0.4
0.8	1	0.5	0.2
0.9	1	0.5	0.1

Na  $2\frac{1}{2}$  uur was er complete haemolyse in de eerste rij in de eerste 4 buisjes; in de tweede en de derde rij eveneens. In de vierde rij was nergens haemolyse opgetreden. Ik meen uit deze gelijk uitgevallen proeven te mogen besluiten, dat eenzelfde hoeveelheid complement niet meer dan het driedvoudig aantal bloedlichaampjes kan oplossen.

Evenmin als den tweeden kan ik den derden regel van Kaup geheel bevestigen. Wanneer men volgens Kaup de hoeveelheid amboceptor varieert en de benodigde hoeveelheid complement bepaalt of omgekeerd, en men nu de hoeveelheid amboceptor op de abscis en de hoeveelheid complement op den ordinaat van een coördinatenstelsel uitzet, dan zou een gelijkzijdige hyperbool ontstaan. Wordt nu een der twee factoren zeer groot dan nadert de curve tot zijn asymptoot, d.w.z. dan wordt het minimum van de benodigde hoeveelheid van de andere zoo klein, dat het constant mag worden geacht. De afhankelijkheid van amboceptor en complement van elkander geldt dus slechts binnen bepaalde grenzen.

Hier volgt het verslag van een desbetreffende proef:

*1e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
0.9	1	0.5	0.1
1.1	0.8	0.5	0.1
1.3	0.6	0.5	0.1
1.5	0.4	0.5	0.1
1.7	0.2	0.5	0.1
1.8	0.1	0.5	0.1

*2e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
0.7	1	0.5	0.3
0.9	0.8	0.5	0.3
1.1	0.6	0.5	0.3
1.3	0.4	0.5	0.3
1.5	0.2	0.5	0.3
1.6	0.1	0.5	0.3

*3e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
0.5	1	0.5	0.5
0.7	0.8	0.5	0.5
0.9	0.6	0.5	0.5
1.1	0.4	0.5	0.5
1.3	0.2	0.5	0.5
1.4	0.1	0.5	0.5

*4e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
0.3	1	0.5	0.7
0.5	0.8	0.5	0.7
0.7	0.6	0.5	0.7
0.9	0.4	0.5	0.7
1.1	0.2	0.5	0.7
1.2	0.1	0.5	0.7

*5e rij:*

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
0.1	1	0.5	0.9
0.3	0.8	0.5	0.9
0.5	0.6	0.5	0.9
0.7	0.4	0.5	0.9
0.9	0.2	0.5	0.9
1	0.1	0.5	0.9

## 6e rij:

Phys. NaCl.	Amboceptor 1/1000	Erythrocyten 5%	Complement 1/10
—	1	0.5	1
0.2	0.8	0.5	1
0.4	0.6	0.5	1
0.6	0.4	0.5	1
0.8	0.2	0.5	1
0.9	0.1	0.5	1

In de eerste rij was na 2 uur geen haemolyse opgetreden; in de tweede rij evenmin; in de derde rij in het eerste buisje; in de vierde rij ook in het tweede buisje; in de vijfde rij tot in het vijfde buisje; in de zesde rij totale haemolyse in alle buisjes. In getallen uitgedrukt:

bij 1 cc amboceptor behoort 0.5 cc complement.

„ 0.8 „ „ „ 0.7 „ „  
 „ 0.2 „ „ „ 0.9 „ „  
 „ 0.1 „ „ „ 1 „ „

Men kan nu fijnere verdeelingen gaan gebruiken en inplaats van in 1/10 cc in 1/100 cc gaan afmeten om te zien of b.v. de sprong tusschen 4e en 5e rij nog tot een geleidelijk verloop is terug te brengen. Deze proef heb ik slechts eenmaal genomen, doch geen bijzondere regelmaat kunnen ontdekken.

De vierde regel van Kaup, welke zegt, dat de quantitatieve verhoudingen in het haemolytisch systeem onafhankelijk zijn van de totale hoeveelheid vloeistof kan ik bevestigen. Het doet er voor het verloop van een haemolyse niet toe of meer of minder physiologische zoutsolutie wordt toegevoegd. Dit is nu en dan tegengesproken (Kisz en Scheller, aangehaald bij Kaup); ik meen echter, dat in dit geval Kaup volkomen gelijk heeft.

Uit vorenstaande beschouwingen blijkt nog eens weer, welk een voortreffelijk indicator we aan het haemolytisch systeem hebben voor de herkenning van de binding van complement. Echter ook in het betrekkelijk eenvoudige vraagstuk als de haemolyse zijn nog tal van onopgeloste punten, die op verklaring wachten.

## SAMENVATTING.

---

Als amboceptor is de gebruikelijke, bestaande uit geïnactiveerd serum van konijnen, die met bloedlichaampjes van het schaap zijn voorbehandeld, aan te bevelen.

Het complement wordt het beste gebruikt in den vorm van versch serum van cavia of rat event. van het varken.

Bij het inactiveeren van het complement door warmte of schudden ontstaat een verlaging van de oppervlaktespanning zonder dat verdere physische veranderingen worden waargenomen.

Bij het verwarmen van complementhoudend serum verdwijnt dit complement, nadat het aanvankelijk in werkzaamheid is toegenomen.

Indien we aannemen dat het complement uit een eind- en middenstuk is opgebouwd, dan is de toeneming dier werkzaamheid wel alleen aan een toeneming in activiteit van het middenstuk te wijten.

Voor volledige haemolyse is bij constante voldoende hoeveelheid complement de benodigde hoeveelheid amboceptor evenredig met de hoeveelheid roode bloedlichaampjes.

Een hoeveelheid complement, benodigd om een bepaalde hoeveelheid roode bloedlichaampjes tot oplossing te brengen, kan slechts hoogstens de drievoudige hoeveelheid bloedlichaampjes haemolyseeren.

Een afhankelijkheid tusschen de voor haemolyse benodigde hoeveelheid complement en amboceptor bestaat slechts binnen bepaalde grenzen.

Alleen de absolute hoeveelheid amboceptor en complement is voor de haemolyse van belang. Hun concentratie heeft geen invloed op het verloop der reactie.

---

## LITTERATUUR.

---

1. *Krimm*. Russki Wratsch 1913, n<sup>o</sup> 43.
2. *Ammenhäuser*. Münch. med. Wschr. 1914, n<sup>o</sup> 39.
3. *Hailer*. Arbeiten aus den Reichs Gesundheitsamt 1908, blz. 277.
4. *Lange*. Biochem. Zschr. Bd. 95, blz. 46.
5. *Graminitzki*. Biochem. Zschr. Bd. 38, blz. 501.
6. *Koopman*. Internat. Zschr. f. physikal. chem. Biol. 1915, Bd. 2, blz. 266.
7. *Brooks*. Journ. of med. research 1920, Vol. 41, p. 411.
8. *Kisz*. Aangehaald bij Kaup. Kritik der Wa. R., blz. 43.
9. *Scheller*. Aangehaald bij Kaup. Kritik der Wa. R., blz. 43.
10. *Kaup*. Kritik der Wa. R., blz. 45.
11. *Schmidt*. Zschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 31, S. 42.
12. *Landsteiner en Ehrlich*. Zbl. f. Bakt. Bd. 45, S. 247.
- 12a. *Liebermann en Fenyvessy*. B. Klin. W. 1908, S. 1270.
13. *Bauer*. D. m. W. 1908, S. 698.  
— B. klin. W. 1908, S. 834.  
— W. klin. W. 1908, S. 1259.  
— D. m. W. 1909, S. 432.
14. *Hügel en Ruete*. M. m. W. 1910, S. 79.
15. *Stern*. B. kl. W. 1909, n<sup>o</sup> 11.
16. *Noguchi*. Journ. of Amer. med. Assoc. 1909, p. 1532.  
— Serumdiagnosis of Syphilis Philadelphia 1910.
17. *Sleeswijk*. D. m. W. 1910, n<sup>o</sup> 26.
18. *Tschernogubow*. D. m. W. 1909, n<sup>o</sup> 15.
19. *Ballner en Dacastello*. D. m. W. 1908, n<sup>o</sup> 45.
20. *Browning en Mc. Kenzie*. Lancet 1909, n<sup>o</sup> 4474.
21. *Wang*. Journ. of Path. and Bacter. 1919, Vol. XXIII p. 15.
22. *Detre*. W. kl. W. 1906, n<sup>o</sup> 21.
23. *Foix*. C. R. des Soc. de Biol. 17 juillet 1909.
24. *Maslakewetz en Liebermann*. Zbl. f. Bakt. 1908, blz. 379.
25. *Rubinstein*. C. R. Soc. Biol., 10 Mei 1919.
26. *Manviloff*. Zbl. f. Bakt. B. 67. H. 5.
27. *Brieger en Renz*. D. m. W. 1909, n<sup>o</sup> 50.
28. *Landsteiner*. Zschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 14 H. 1.
29. *Peyton Rous en Turner*. Proc. Soc. Exp. Biol. 1915, p. 122.
30. *Brooks*. Journ. of med. research. Vol. 40 blz. 399.

31. *Liebermann en Fillinger*. D. m. W. 1912 blz. 462.
32. *Snapper*. Bioch. Zschr. Bd. 43 blz. 266.
33. *Pohlmann*. Die Technik der Wa. R. München 1917.
34. *Sonntag*. Die Wa. R. Berlin 1917.
35. *Berczeller*. W. kl. W. 1918, n<sup>o</sup> 42; id. Die Wa. R. Berlin 1919.
36. *Gierke*. D. m. W. 1913 n<sup>o</sup> 5.
37. *Bigger*. Journ. of Path. and Bact. XXII p. 323.
38. *Lüdke*. M. m. W. 1905, blz. 2065.
39. *Friedberger*. B. kl. W. 1907, n<sup>o</sup> 41.
40. *Ronchese*. C. R. Soc. Biol. 1 mars 1919.
41. *Ronchese en Lantenois*. C. R. Soc. Biol. 6 juillet 1918.
42. *Rhamy*, Journ. Amer. med. Assoc. 22 Sept. 1917.
43. *Rheinhardt en Oeller*. M. m. W. 1916, n<sup>o</sup> 39 (Feldarzt Beil).
44. *M. Stern*. Zschr. f. Immunitätsforsch. Bd. 1, 43.
45. *Mandelbaum*. M. m. W. 1916, n<sup>o</sup> 29.
46. ——— M. m. W. 1917, n<sup>o</sup> 9.
47. ——— M. m. W. 1918, n<sup>o</sup> 11.
48. *Jousset en Parastevopoulos*. C. R. Soc. Biol. 3 juill. 1919.
49. *Bertin*. C. R. Soc. Biol. 30 avril 1910.
50. *Backmann en Jacobeus*. C. R. Soc. Biol. 23 oct. 1909.
51. *Chabanier, Bétancés en Lebert*. Arch. Med. experim. 1918, Tome XXVIII, n<sup>o</sup> 1.
52. *Craig*. The Wassermann Test. London 1918.
53. *Loewit en Bayer*. Arch. f. Exp. Path. Bd. 69, blz. 330.
54. *Dold*. D. m. W. 1920, n<sup>o</sup> 3.
55. *Ritz*. Zschr. f. Immunitätsforschung Bd. 15, S. 145.
56. *Freundlich*. Kapillarchemie, Leipzig 1909.
57. *Traube*. Physikalische Chemie, Leipzig 1904.
58. *Ostwald Luther*. Hand und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemische Messungen.
59. *Boenheim*. Bioch. Zschr. 1919, Bd. 94, S. 174.
60. *Brooks*. Journ. of General Physiol. Vol, III, p. 185.
61. *Kisch en Remerk*. Intern. Zschr. f. physik-chem. Biol. Bd. 1, bldz. 354.
62. *Robertson*. Journ. of Biol. Chem. Vol. XII, p. 23.
63. *Schorer*. Inaug. Diss. Bern. 1908 (niet geraadpleegd).
64. *Botazzi* in Neuberg's Handboek „Der Harn“ Berlin 1911.

65. *Vernes en Marchadier*. C. R. Soc. Biol. 22 févr. 1919.
  66. *Bromberg*. Functioneel onderzoek bij chirurg. nieraan-  
doeningen. Diss. Amsterdam, 1913.
  67. *Bugarszky en Tangl*. Pflügers. Arch. Bd. 68, blz. 389.
  68. *Frei*. Zschr. f. Infektionskrankheiten der Haustiere. Bd. 9,  
S. 363 und 446.
  69. *Michaelis en Rona*. Bioch. Zschr. Bd. 27, S. 38.
  70. *Davidson*. Aangehaald bij Michaelis.
  71. *Höber*. D. m. W. 1917, n<sup>o</sup> 18.
  72. *Jacobsthal*. M. m. W. 1909, n<sup>o</sup> 48.
  73. *Bruck en Hidaka*. Zschr. f. Immunitätsforschung. Bd.  
8, S. 476.
  74. *Peyre*. C. R. Soc. Biol. 19 mars 1921.
  75. *Wolff*. Tijdschrift voor Geneeskunde 1919, II, blz. 550.
  76. *Bechhold*. Die Kolloide in der Biologie und Mediz. p. 6.
  77. *Friedenthal*. Berichte der Deutschen Chem. Gesellsch.  
Bd. 44, p. 906.
  78. *Ferrata*. B. kl. W. 1907, n<sup>o</sup> 13.
  79. *Leschly*. Zschr. f. Immunitätsforschung. Bd. 25, blz. 44.
  80. *Brand*. B. kl. W. 1909, S. 2097.
  81. *Liefmann*. M. med. W. 1909, S. 2097.
  82. *Sachs en Altmann* in het Handboek van Kraus en  
Levaditi, Bd. 2, blz. 969.
  83. *Dean*. Journ. of Path. and Bacter. Bd. 27, blz. 193.
  84. *Marks*. Journ. of Experim. Medicine, Bd. 13, S. 590.
  85. *Husler*. Zschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 15, S. 157.
  86. *Hecker*. Arbeiten aus dem Institut. exp. Therapie, Frank-  
furt, H. 3, 1907.
  87. *Michaelis en Skwirsky*. B. Kl. W. 1910, S. 139.
  88. *Van Looveren*. Zschr. f. Immunitätsforschung Bd. 16, S. 377.
  89. *Ritz*. Zschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 9, S. 321.
  90. *Kashwabura*. Zschr. f. Immunitätsforschung, Bd. 17, S. 21.
  91. *Scheller*. Zbl. f. Bakteriolog. 1910, S. 120.
-

# STELLINGEN.

---

---

## I.

Complement is geen ferment.

## II.

Het staat niet vast dat complement uit eind- en middenstuk bestaat.

## III.

De proeven van Bolton en Miyagawa over gastrolytisch serum zijn waardeloos (Journ of Pathol, Vol. 23, blz. 462).

## IV.

Diabetes insipidus wordt niet door een lijden van de hypophysis veroorzaakt.

## V.

De behandeling der niertuberculose is in de eerste plaats inwendig.

## VI.

Aceton is geen bestanddeel der normale urine.



## VII.

De bewering van Molhart, Pottenger e.a. dat de slokdarm slechts parasymphatisch geïnnerveerd is, is niet vol te houden.

## VIII.

De door Bolten verdedigde verklaring der vasotropho-neurosen als sympathicushypotonieën, is niet waarschijnlijk,

## IX.

Het onderzoek van de ontlasting op verborgen bloed is voor de maagzweer-diagnose zonder beteekenis,

## X.

De interstitieele puberteitsklier van Steinach bestaat niet.

## XI.

Bij epilepsie is schildkliertoediening als regel gecontraindiceerd.

## XII.

Er zijn gevallen van dysmenorrhoe, waarin de intrauterine stiftbehandeling, zooals die o.a. door Selhorst is verdedigd, nuttig is.

## XIII.

Sclerodermie is tuberculose,

## XIV.

Men heeft nog geen recht de rachitis als een avitaminose te beschouwen.

## XV.

Er bestaat geen rechtstreeksch verband tusschen interne secretie en vorming van tegenstoffen.

## XVI.

De meening van Marfori, dat de lymphklieren een inwendige afscheiding hebben, is door niets bewezen.

## XVII.

In de ziekenfondsen behoort huisarts zoowel als specialist per verrichting gehonoreerd te worden.

## XVIII.

De specialisten- en huisartsen-organisaties in de Nederl. Maatschappij ter Bevordering der Geneeskunde behooren zoo snel mogelijk te verdwijnen.

---















