



Over de bepaling van den osmotischen weerstand der roode bloedlichaampjes

<https://hdl.handle.net/1874/283037>

A 192.1925

**OVER DE BEPALING
VAN DEN OSMOTISCHEN
WEERSTAND DER ROODE
BLOEDLICHAAMPJES.**

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUMIVERSITEIT
UTRECHT.

G. K. SCHOEP.

s.
ht
2

*Diss. Utrecht 1925*¹

OVER DE BEPALING VAN DEN
OSMOTISCHEN WEERSTAND DER
ROODE BLOEDLICHAAMPJES.

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUMVERSITEIT
UTRECHT.

*Aan mijne Ouders
en mijne aanstaande Vrouw.*

Bij het voltooiën van dit proefschrift is het mij een aangename plicht U, Hoogleeraren, Oud-Hoogleeraren en Docenten, van wie ik eerst te Amsterdam en daarna te Utrecht het onderwijs heb ontvangen, mijn dank te betuigen voor de opleiding, die ik van U genieten mocht.

Daarbij ben ik in het bijzonder U, Hooggeleerde HIJMANS VAN DEN BERGH, Hooggeachte Promotor, zeer veel dank verschuldigd niet slechts voor de gelegenheid, die Gij mij in Uw laboratorium geboden hebt om mijn onderzoekingen te verrichten, maar ook voor Uw steun en belangstelling, waardoor het mij mogelijk was mijn werk te voleindigen.

Jegens U, Zeergeleerde MULLER, voel ik mij zeer verplicht voor de hulp, die Gij mij steeds, waar het noodig was, geschonken hebt.

Ook U, Zeergeleerde HEKMAN, dank ik hier met name voor de leiding, die ik zoowel in practisch als in wetenschappelijk opzicht van U gedurende mijn assistentschap in het Gemeente-Ziekenhuis aan den Bergweg te Rotterdam ontvangen heb.

Een woord van eerbiedigen dank aan mijn Ouders, die mij tot mijn studie in staat gesteld hebben, meen ik ook hier niet te mogen verzwijgen,

Tenslotte breng ik mijn welgemeenden dank aan allen, die mij bij het bewerken van dit proefschrift op eenigerlei wijze behulpzaam zijn geweest.

INLEIDING.

Nog steeds spelen de roode bloedlichaampjes in dien tak der physische chemie, die zich in het bijzonder met het vraagstuk der levensverschijnselen bezighoudt, een rol van beteekenis. Ze zijn daarom voor de onderzoekingen, die daarbij te pas komen, zoo uitermate geschikt, omdat ze als vrije, zelfstandige cellen aan alle kanten toegankelijk zijn voor invloeden, die men op hen wil laten inwerken. Daarbij komen nog twee belangrijke dingen: in de eerste plaats, dat de membraan der erythrocyten, in tegenstelling met de stijve cellulosemembraan van de meeste plantencellen, die vaak voor een groot deel de inwendige veranderingen in de cel maskeert, veel subtieler is, als ook, dat het roode bloedlichaampje reeds betrekkelijk spoedig zijn roode kleurstof afgeeft, waardoor men èn in de vormverandering van de erythrocyten èn in het uittreden van de haemoglobine twee belangrijke hulpmiddelen bezit om tot een juiste waardeering te komen van de beteekenis, die het experiment in een bepaald geval heeft.

Menigvuldig zijn dan ook de proefnemingen, die de physische chemie met de erythrocyten genomen heeft. Reeds in het begin van haar ontwikkeling, toen zij de osmotische eigenschappen van het levend organisme begon te bestudeeren, stonden deze cellen in het middelpunt van haar belangstelling. Later, toen het vraagstuk van de permeabiliteit aan de orde kwam, bewezen de erythrocyten weer belangrijke hulpdiensten. En nu in den laatsten tijd de vraag aan de orde is, of en

in hoeverre de physiologische werkingen van de ionen op de cellen teruggebracht kunnen worden tot vraagstukken van colloïd-chemischen aard, zijn het andermaal de roode bloedlichaampjes, die voor de physische chemie een geschikt uitgangspunt vormen ter nadere bestudeering van deze vraag.

Het is bekend, hoe vooral de onderzoeken over de osmotische eigenschappen van de cel van beteekenis voor de kliniek zijn geworden. In de jaren 1886 en 1887 verklaarde HAMBURGER de haemolyse in zoutoplossingen van een bepaalde verdunning, als een gevolg van het verschil in osmotischen druk tusschen den inhoud van de roode bloedlichaampjes en de hen omgevende zoutoplossing. En daarmee zijn de onderzoeken over de z.g. osmotische resistentie der erythrocyten in de kliniek begonnen. Men verstaat daaronder het vermogen dier cellen om hun haemoglobine vast te houden in een zoutoplossing, die een lageren osmotischen druk heeft dan de inhoud dezer cellen. De nadruk valt in deze uitdrukking vooral op het woord osmotisch. In tegenstelling met de haemolyse tengevolge van mechanische en thermische invloeden en van haemolytische giften, waarbij ook van een resistentie der erythrocyten tegenover deze schadelijke factoren sprake is, heeft men hier te doen met een haemolyse, die, als zij optreedt, uitsluitend gevolg is van een verschil in osmotischen druk.

Om de grootte van deze osmotische resistentie aan te duiden, werd die concentratie van de keukenzout-oplossing (met welke oplossing verreweg de meeste proeven genomen zijn) als maat opgegeven, waarbij het bloed zijn haemoglobine nèt nog niet afstaat. Evenwel, de erythrocyten van éénzelfden bloeddruuppel bezitten niet alle dezelfde resistentie en daarom werd als punt van vergelijking de osmotische resistentie van de minst resistente erythrocyten aangenomen.

Vele onderzoekers hebben nagegaan, of er ook bepaalde ziekten zijn, waarbij de osmotische resistentie in vergelijking met die, welke als normaal opgegeven wordt, steeds in dezelfde mate verschilt. Daarbij had men de bedoeling, zoowel om een nieuw diagnostisch hulpmiddel in handen te krijgen als om het inzicht in de pathologie van zulk een ziekte te vermeerderen. Verschillende min of meer belangrijke feiten zijn daarbij aan het licht gekomen; maar geen van deze alle waren van dien aard, dat ze voor het bovenomschreven doel bevredigend waren. Zelfs ten opzichte van het eerst door MINKOWSKI beschreven ziektebeeld, dat onder den naam van haemolytischen icterus thans algemeen bekend is en waarbij CHAUFFARD in 1907 een verminderde minimum-resistentie als pathognomonisch meende te mogen aangeven, waardoor een tijdlang in deze eigenschap het wezen dezer aandoening gezien werd, moest men voorzichtiger met deze conclusies worden.

Immers, er zijn gevallen, die zich klinisch volkomen als haemolytische icterus voordoen, en waarbij toch een volledig normale resistentie bestaat; zelfs zou bij sommige gevallen volgens KAGAN resistentievermeerdering voorkomen. En, wat het wezen der ziekte betreft, na het wegnemen van de milt ziet men een gunstige verandering optreden en de bloedarmoede aanmerkelijk teruggaan, terwijl de resistentiewaarden ongeveer gelijk blijven.¹⁾

HAMBURGER heeft dan ook meermalen de opmerking gemaakt²⁾, dat de talrijke bepalingen van de resistentiewaarden, die men voor klinische en pharmacologische doeleinden had

¹⁾ Aangehaald uit O. NAEGELI. *Blutkrankheiten und Blutdiagnostik*, 1923, 4de druk, bl. 63.

²⁾ O.a. in *Osmot. Druck und Ionenlehre I*, 1902, pag. 359—394 en *Osmot. Druck und Ionenlehre und ihre Bedeutung für die Physiologie und die Pathologie des Blutes*, 1912, pag. 14 en 15.

uitgevoerd, weinig vruchtbaar geweest zijn. Twee oorzaken stelt hij daarvoor aansprakelijk.

Allereerst kunnen de waarden, die de verschillende onderzoekers gevonden hebben, slechts zelden met elkaar vergeleken worden, omdat er geen eenheid in de methode van onderzoek bestaat en de wijze, waarop gewerkt is, vaak niet nauwkeurig is aangegeven. Zoo vonden CHAUFFARD en RENDU ¹⁾ voor den gezonden mensch een minimumresistentie van 0.42 % tot 0.38 % NaCl, terwijl MAY ²⁾ daarvoor een waarde van 0.48 % tot 0.46 % NaCl opgeeft.

De andere reden ligt, volgens HAMBURGER, in het feit, dat men zich bij zijn onderzoekingen te weinig afvraagt, wat men feitelijk bepaalt. Zonder zich een nauwkeurige voorstelling van de structuur der roode bloedlichaampjes te vormen, zou een groot deel van de onderzoekers in de onderstelling geleefd hebben, dat de bepaling van de osmotische resistentie gelijk stond met de bepaling van den weerstand der membraan. Maar HAMBURGER betwist ten stelligste de meening, dat, wanneer twee roode bloedlichaampjes hun haemoglobine bij eenzelfde concentratie van een keukenzoutoplossing beginnen te verliezen, dit een bewijs daarvoor is, dat beide membranen even resistent zijn. Naast de resistentie van de membraan spelen bij dit proces nog twee andere factoren een rol. In de eerste plaats moet rekening gehouden worden met het volumen van de eigenlijke wateraantrekkende vloeistof, die zich tusschen de mazen van het stroma bevindt. Hoe grooter het volumen van dit stroma is, des te kleiner zal het volumen van de wateraantrekkende vloeistof in het bloedlichaampje zijn en daardoor zal ook de absolute toename van het volumen van het bloedlichaampje in zijn geheel, na

¹⁾ *Presse Médicale*, 1907, No. 45.

²⁾ E. MAY. *Etudes sur les résistances globulaires*, 1914.

inwerking van een bepaalde hypotonische zoutoplossing, ten achter staan bij die, waar de bovengenoemde verhoudingen omgekeerd zijn. Maar zoo bezien, zal bij een gelijke resistentie van beide membranen in het eerste geval de haemoglobine later uittreden dan in het tweede.

Verder kan ook de osmotische druk in het eene bloed-lichaampje met dien van het andere verschillen. Ook hierdoor wordt een conclusie omtrent de resistentie van de membraan bemoeilijkt.

Voor HAMBURGER is de osmotische resistentie dan ook een functie van drie grootheden: 1^o. van den osmotischen druk van de intraglobulaire vloeistof; 2^o. van de verhouding van de intraglobulaire vloeistof tot het stroma der cel; 3^o. van de resistentie van de membraan.

Maar ook aan de juistheid van de meening, dat het uittreden van de haemoglobine in een hypotonische keukenzoutoplossing naast de twee laatstgenoemde factoren beheerscht wordt door bepaalde osmotische verhoudingen, is twijfel ontstaan. Bij de bestudeering van het vraagstuk van de permeabiliteit van het levend organisme vond de physische chemie, dat verschillende plantencellen, micro-organismen en waterdiertjes slechts in dat geval voor zouten impermeabel zijn, wanneer niet één zout in de oplossing aanwezig is, maar verschillende zouten, die dan overeenkomstig de samenstelling van het oorspronkelijk levensmilieu met elkaar gemengd moeten zijn.

Tegenover de enkelvoudige zoutoplossingen vertoonen deze cellen daarentegen een, wel is waar geen groote, maar toch duidelijke permeabiliteit, die voor het eene zout weer anders is dan voor het andere.

Dit merkwaardig verschijnsel kon niet volgens de „lipoidtheorie” van OVERTON verklaard worden. Het bleek

evenwel, dat er merkwaardige overeenkomsten bestaan tusschen den invloed, dien deze zouten op bovengenoemde cellen uitoefenen, en de veranderingen, die zij bij bepaalde stoffen in colloïdalen toestand te weeg brengen. Deze overeenkomst kwam zoowel aan den dag met betrekking tot den invloed van de zouten afzonderlijk als van hun mengsels. Dit leidde tot de gevolgtrekking, dat ook de celmembraan in veel gevallen gevormd wordt door stoffen, die zich in colloïdalen toestand bevinden. Al naar het zout en al naar de mengsels van deze zouten, zullen de colloïden van de membraan een bepaalde verandering ondergaan en daardoor wordt tevens de doorlaatbaarheid geregeld ¹⁾).

Ook ten opzichte van de roode bloedlichaampjes zijn deze opvattingen aannemelijk gemaakt. Ook hier zou de membraan uit colloïden gevormd worden en zouden deze onder invloed van de ionen staan. Vooral de onderzoekingen van HÖBER ²⁾ zijn in dit verband van belang. Hij vond dat, wanneer men de bloedlichaampjes van verschillende dieren suspendeerde in zoutoplossingen, waarvan de osmotische druk slechts een weinig hypotonisch was ten opzichte van het roode bloedlichaampje, er op den duur haemolyse optreedt. En deze haemolyse bleek bij het eene zout sneller op te treden dan bij het andere, hoewel de osmotische druk van al die zoutoplossingen gelijk was. Op deze wijze vond hij de volgende volgorde voor de anionen, wat hun haemolytische kracht betreft:

$\text{SO}_4, \text{Cl}, \text{Br}, \text{NO}_3, \text{J}$

en voor de kationen

$\text{Li}, \text{Na}, \text{Cs}, \text{Rb}, \text{K}.$

¹⁾ Zie HÖBER. *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*, 5de druk. 1923.

²⁾ HÖBER. *Biochem. Zeitschr.* Bd. 14, pag. 209—216, 1908.

De conclusie nu, die HÖBER uit deze proefnemingen getrokken heeft, en de gronden, waarop hij deze conclusie bouwde, heeft hij in zijn „*Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*” 5de druk (1924) pag. 590 aldus samengevat: „Weil diese Kationenreihe ausser im Gebiet der Physiologie nur noch bei den hydrophil-kolloïden Zustandsänderungen bekannt ist, weil ferner die Anionenreihe der Physiologie häufig in der Kolloïdchemie auftritt, und weil schliesslich die Untersuchungen über die Permeabilität der Blutkörperchen für die neutralen Alkalisalze zu der Annahme drängen, dass die Blutkörperchenoberfläche für deren Kationen normalerweise undurchlässig ist, so habe ich den beschriebenen Hämolyseversuchen die Deutung gegeben, dass durch die Neutralsalze der Alkalien im Lauf der längeren Einwirkung bei schwacher Hypotonie zunächst die aus Kolloïden bestehende Plasmahaut aufgelockert wird, und dass von da aus die Aufquellung weitergreift, so dass infolge der Strukturzerstörung das Hämoglobin in Freiheit gesetzt wird und herausdiffundiert”.

Zoo blijkt dus, dat, volgens deze beschouwing, het uittreden der haemoglobine in een hypotonische keukenzout-oplossing niet uitsluitend beheerscht wordt door osmotische verhoudingen, maar dat ook gedacht moet worden aan den invloed van het Na-zout op de colloïden der membraan, waardoor dit uittreden wordt begunstigd. MAY gaat in zijn „*Etudes sur les résistances globulaires*” zelfs zóó ver, dat hij aan den osmotischen druk de essentieele beteekenis bij het tot stand komen van de haemolyse in het gedistilleerde water en de hypotonische zoutoplossingen ontzegt. „*Cette conception a fait place à celle de la perméabilisation à l'eau de la paroi globulaire. Le problème se ramène à l'étude des conditions, qui favorisent ou qui empêchent l'imbibition cellulaire par*

l'eau" (pag. 9). Naar MAY's opvatting mag men dus feitelijk niet meer spreken van een *osmotische* resistentie.

BRINKMAN heeft evenwel in zijn proefschrift „*Résistance osmotique et phosphatides du sang. Nouvelles méthodes quantitatives (1922)*” het oude begrip van osmotische resistentie opnieuw naar voren gebracht en wel door de bezwaren, die tegen de keukenzout-oplossing in dit verband worden aangevoerd, te ondervangen door de samenstelling van een vloeistof, waarin de invloed van het Na-zout door het Ca-zout gecompenseerd wordt. Het uittreden der haemoglobine zou in deze oplossing louter het gevolg zijn van verschil in osmotischen druk.

En met deze oplossing vond BRINKMAN enkele merkwaardige feiten, die bij het gebruik van de keukenzout-oplossing niet waargenomen worden. Deze feiten zoowel als de verklaring daarvan achtte hij ook voor de kliniek van groot belang. Daar zijn nieuwe oplossing evenwel van dien aard is, dat ze voor klinisch gebruik te veel tijd kost, gaf hij een andere oplossing aan, die eenvoudiger van samenstelling is en dezelfde resultaten zou geven.

De bedoeling van de onderzoeken, die hier beschreven zullen worden, was na te gaan, in hoeverre deze laatste oplossing voor de kliniek van belang is.

Wat de indeeling van mijn proefschrift betreft, in het eerste hoofdstuk zal ik in het kort den gedachtengang van BRINKMAN bij de samenstelling van zijn oorspronkelijke oplossing weergeven, waarbij dan tevens de feiten, die hij en andere onderzoekers gevonden hebben, ter sprake zullen komen en de verklaring, die hij van deze feiten gegeven heeft. In hoofdstuk II beschrijf ik dan mijn eigen onderzoeken, terwijl in hoofdstuk III een bespreking van de verkregen resultaten zal volgen.

HOOFDSTUK I.

De onderzoeken over de osmotische resistentie volgens BRINKMAN.

Als basis voor zijn beschouwingen over de osmotische resistentie der roode bloedlichaampjes dienen voor BRINKMAN de volgende vier stellingen, die hij op grond van de nieuwere onderzoeken als juist aanvaardt.

- 1°. Het roode bloedlichaampje bevat electrolyten en andere opgeloste stoffen, die een aanmerkelijken osmotischen druk kunnen uitoefenen.
- 2°. Het wordt omgeven door een membraan, die min of meer semipermeabel is.
- 3°. Deze membraan ontstaat door een plaatselijke concentratie van stoffen, die afkomstig zijn van den celinhoud en de hem omgevende vloeistof en die de oppervlaktespanning verlagen van het grensvlak van bloedlichaampje en suspensievloeistof. Als zoodanig bevat deze membraan een groote hoeveelheid lipoïden.
- 4°. De membraan wisselt dus al naar den celinhoud en haar omgeving en wordt specifiek beïnvloed door de haar omgevende opgeloste electrolyten.

Op grond van deze vier gezichtspunten handhaaft BRINKMAN nu eenerzijds de mogelijkheid om de osmotische resistentie te bepalen, maar verwerpt hij anderzijds de keukenzout-oplossing als middel om dit doel te bereiken. De aanwezigheid van een enkel kation, i. c. het Na-ion, in deze oplossing maakt haar voor bovengenoemde bepaling on-

geschikt. Immers, colloïdchemische onderzoekingen hebben geleerd, dat de toestand, waarin hydrophiele colloïden verkeerden, al naar de aanwezigheid van het ééne kation of van het andere, aan wisseling onderhevig is. Sommige kationen bevorderen het vermogen van deze colloïden om water op te nemen, terwijl andere dit proces tegengaan en zelfs de afgave van water in de hand werken. Gaat men dus uit van de opvatting, dat de membraan gevormd wordt door stoffen, die in colloïdalen toestand verkeerden, dan ligt het voor de hand ook aan te nemen, dat het Na-ion de membraan niet onaangetast zal laten. En daar dit ion een z.g. lyotropen invloed heeft, d.w.z. dat het het opnemen van water door de colloïden bevordert, zal het de vervloeiing van de membraan in de hand werken en daardoor de resistentiebepaling onzuiver maken. Zoowel de doorlaatbaarheid voor verschillende stoffen, als ook de weerstand van de membraan hangt met de sterkte van de hydratatie der membraan ten nauwste samen.

Om deze hydratatie te voorkomen zal het dus noodig zijn zulk een combinatie van vertegenwoordigers der beide bovengenoemde ionengroepen te vinden, waarin het ééne ion het ander in zijn werking opheft en de oorspronkelijke toestand van de membraan gehandhaafd blijft.

Experimenteel is de haemolyseerende invloed van de physiologische keukenzout-oplossing ook aangetoond. In de „Inleiding” werd reeds op de onderzoekingen van HÖBER gewezen. Verschillende andere onderzoekers bevestigden dit feit. Zoo vond SNAPPER¹⁾, dat bloedlichaampjes, die met een isotonische glucoseoplossing van 4% gewassen waren, dezelfde resistentie tegenover hypotonische keukenzout-oplossingen hebben, als die, welke niet gewassen waren.

¹⁾ *Biochem. Zeitsch.* Bd. 43, pag. 266 (1912).

Daarentegen hadden bloedlichaampjes, die met een keukenzout-oplossing van 0.9% gewassen waren, een lagere resistentie tegenover hypotonische oplossingen dan die, welke dit proces niet ondergaan hadden. De verklaring van dit feit zocht SNAPPER evenwel in verstoring van het osmotisch evenwicht. Maar ook hij wees er op, hoe toevoeging van 0.1% CaCl_2 bij de keukenzout-oplossing van 0.9% de resistentie op de oorspronkelijke hoogte hield.

Trouwens, het proefondervindelijk onderzoek had reeds den eisch van een menging van bepaalde ionen voor het handhaven van de verschillende functies van het organisme leeren kennen. SYDNEY RINGER was de eerste die dit vond voor de werking van het kikvorschenhart. En later zijn ook voor andere organen de vereischte combinaties van ionen gevonden.

Als antagonist van het Na-ion was reeds sedert lang het Ca-ion bekend. Het was HÖBER, die de eigenschap van het Ca in het bevorderen van de consolidatie en stabiliteit bij colloïdale systemen, (welke eigenschap tegengesteld is aan die van de alkalizouten, welke in sommige gevallen de wateropname bevorderen), in nauw verband bracht met haar physiologische werking.¹⁾ Dit antagonisme toonde BRINKMAN ook met betrekking tot de roode bloedlichaampjes aan.²⁾ Zoo zag hij bijv. dat, wanneer de hypotonische keukenzout-oplossingen 0.020% CaCl_2 6 aq. (een physiologische hoeveelheid) bevatte, de resistentie van de roode bloedlichaampjes tegenover deze hypotonische oplossingen veel grooter was dan in het geval, waarbij de keukenzout-oplossingen onvermengd waren.

¹⁾ BAYLISS. *Principles of general physiology*, 1920, pag. 215.

²⁾ *Biochem. Zeitschr.* 95, pag. 101. 1919.

De nieuwe oplossing zou dus naast de Na-ionen ook Ca-ionen moeten bevatten.

Nog een tweede bezwaar had BRINKMAN tegen het gebruik van de keukenzout-oplossing voor de bepaling der osmotische resistentie. Wil men in de z.g. resistentiecurve de zuivere weerspiegeling vinden van de verhouding der roode bloedlichaampjes onderling, wat hun osmotische resistentie betreft, (men heeft immers in één en hetzelfde bloed erythrocyten van verschillende resistentie), dan zou de curve, die met de keukenzout-oplossingen bepaald is, daartoe geen gelegenheid bieden. Immers leerde een proef van BRINKMAN,¹⁾ dat de intensiteit van de haemolyse in een hypotonische keukenzout-oplossing geenszins evenredig is met het aantal roode bloedlichaampjes, die deze hypotonie niet kunnen verdragen. In een hypotonische keukenzout-oplossing, die nog geen volledige haemolyse geeft, verliezen niet alle erythrocyten, die tegen deze oplossing niet bestand zijn, hun haemoglobine, maar slechts een gedeelte daarvan.

De verklaring van dit feit zoekt BRINKMAN in de werking van de Ca-ionen, die vrij gekomen zijn uit de reeds gehaemolyseerde bloedlichaampjes en die de andere nog niet gehaemolyseerde erythrocyten, welke een zelfde osmotische resistentie hebben, tegen deze hypotonische keukenzout-oplossing beschut. Een heel geringe concentratie van Ca-ionen, zooals die b.v. in een oplossing van 0.001% CaCl_2 6 aq. aanwezig is, een concentratie, die bij de haemolyseproeven volgens BRINKMAN zeker bereikt wordt, oefent reeds een duidelijken invloed op de resistentie uit.

Ten slotte stelde BRINKMAN als derde voorwaarde voor een oplossing, die geschikt is voor de bepaling der

¹⁾ BRINKMAN. Dissertatie, pag. 14.

osmotische resistentie, een concentratie van de H-ionen, die overeenkomt met die van het bloed en die bovendien ook gedurende het onderzoek constant blijft. Ook de concentratie van de H-ionen speelt een rol in het tot stand komen der haemolyse. Met een zuivere keukenzout-oplossing is het onmogelijk de concentratie dezer ionen gelijk te maken aan die van het bloed.

Aan de nieuwe oplossing moet dus de eisch gesteld worden, dat niet slechts de Ca-ionen naast de Na-ionen in een physiologische hoeveelheid aanwezig zijn, maar ook, dat hun concentratie gedurende de resistentiebepalingen constant blijft. Hetzelfde geldt eveneens voor de concentratie der H-ionen.

Bij de samenstelling nu van de oplossing, die aan de bovengenoemde eischen voldoet, sloot BRINKMAN zich aan bij de verhoudingen, zooals die volgens hem in het bloed aanwezig zijn. Naar aanleiding van de onderzoekingen van RONA en TAKAHASKI¹⁾ over het verband van de oplosbaarheid van het CaCO_3 met de p_h van de oplossing, kwam hij op grond van verdere overwegingen tot de conclusie, dat de door de bovengenoemde onderzoekers voor het CaCO_3 gevonden vergelijking $\text{Ca} = K \frac{\text{H}}{\text{HCO}_3}$ ook voor de concentratie van de Ca-ionen in het bloed geldt en dat deze concentratie evenals die van de H-ionen door een bufferstelsel gereguleerd wordt. Dit beteekent dus, dat de concentratie der Ca-ionen in het bloed binnen bepaalde grenzen slechts aan weinig veranderingen onderhevig is. Waar nu ook de concentratie der H-ionen in het bloed

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.* Bd. 49, pag. 370.

nauw samenhangt met de vergelijking $H = K \frac{CO}{HCO_3}$, zullen zoowel de koolzuurspanning als de concentratie van de HCO_3 -ionen de concentratie der H- en Ca-ionen regelen. Door dus te maken, dat in een oplossing, waarin Ca-ionen aanwezig zijn, de spanning van het koolzuur en de concentratie der HCO_3 -ionen een physiologische waarde hebben en deze die waarde gedurende het onderzoek behouden, is het mogelijk ook de concentratie van deze Ca-ionen op een physiologische hoogte te brengen en deze onafhankelijk van de Ca-zouten te doen zijn.

Op deze grondslagen bouwend, kreeg BRINKMAN een vloeistof van de volgende samenstelling: NaCl 0.7%, $NaHCO_3$ 0.2%, KCl 0.01%, $CaCl_2$ 6 aq. 0.02%, terwijl door deze vloeistof zoolang CO_2 geleid werd, tot de concentratie van de H-ionen $0.45 \cdot 10^{-7}$ bedroeg, een concentratie, die overeenkomt met die van het bloed bij een koolzuurspanning, zooals die in de longalveoli aanwezig is. In deze oplossing zijn dan aanwezig 30 mgr vrije Ca-ionen per Liter, wat een hoeveelheid is, die overeenkomt met die, welke ook in het heldere serum of in het ultrafiltraat gevonden wordt.

De toevoeging van het KCl in een concentratie van 0.01% geschiedde om de balanceering volkomen te maken. De totale concentratie van de Ca-zouten is betrekkelijk onverschillig, mits de concentratie van het $CaCl_2$ 6 aq. minstens 0.015% bedraagt.

Deze vloeistof bleek ongeveer isotonisch met het serum te zijn; de hypotonische oplossingen werden verkregen door uitsluitend het gehalte aan NaCl te verminderen. De concentraties van het $NaHCO_3$, KCl, $CaCl_2$ 6 aq., H_2CO_3 en de p_h bleven dus voor alle oplossingen gelijk.

Met deze vloeistof werkend, vond BRINKMAN, dat ze

bij normaal bloed in tweeërlei opzicht een ander resultaat gaf dan de gewone keukenzoutoplossing.

In de eerste plaats nam hij waar, dat de met deze oplossing verkregen resistentiecurve, welke curve de onderlinge verhouding der erythrocyten met betrekking tot hun osmotische resistentie weergeeft¹⁾, een S-vorm vertoonde en dus in drie deelen uiteenviel.

Aan dit feit geeft BRINKMAN de volgende beteekenis: het eerste onderste gedeelte van de curve (10 à 15% van het geheel) wordt gevormd door de minst resistente roode bloedlichaampjes en deze zouden identiek zijn met de oudste erythrocyten. Het laatste bovenste gedeelte (5 à 10% van het geheel) wordt gevormd door de bloedlichaampjes met de grootste resistentie. Dit deel zou dan overeenkomen met de bloedlichaampjes, die nog heel jong zijn en pas het beenmerg hebben verlaten. Tenslotte ligt tusschen deze beide deelen het grootste gedeelte (80 à 90% van het geheel), dat gevormd wordt door de bloedlichaampjes van „middelbaren” leeftijd.

Het zou dus mogelijk zijn zich uit deze resistentiecurve een beeld te vormen van het percentage oude en jonge bloedlichaampjes in het bloed en daarmee van den aanmaak en afbraak dezer bloedcellen. Met de keukenzout-oplossing verkrijgt men zulk een curve evenwel niet. Daar heeft deze meer den vorm van een rechte lijn. Maar er is reeds op gewezen, waarom BRINKMAN de eerste curve meer in overeenstemming met de verhoudingen in het bloed acht dan de tweede. Een steun voor deze opvatting vond hij bovendien nog daarin, dat een bepaling van de resistentie van de erythrocyten van het rund in het verdunde ultrafiltraat

¹⁾ Zie over de bepaling van deze curve Hoofdstuk II.

van runderbloed en van de erythrocyten van het paard in het ultrafiltraat van het paardenserum precies dezelfde resistentiecurve te zien gaf, als de bepaling in BRINKMAN's nieuwe oplossing.

Het andere merkwaardige verschijnsel, dat BRINKMAN met deze oplossing waarnam, was, dat, als hij de erythrocyten enkele malen met deze vloeistof waschte, de resistentie van deze cellen duidelijk toenam. Het bleek, dat de resistentiecurve van deze gewassen bloedlichaampjes in de graphische voorstelling, niet, zooals dat met de keukenzout-oplossing het geval is, naar links, maar naar rechts verplaatst was, in den zin dus van een resistentievermeerdering.

De verklaring van dit feit zocht BRINKMAN in de aanwezigheid van een haemolytischen invloed, welke door het wassen van de oppervlakte der erythrocyten verwijderd wordt. Deze invloed wordt ook door het wassen met een keukenzout-oplossing van 0.9% verwijderd, maar de vermeerdering der resistentie, die van het wassen het gevolg is, wordt daar weer opgeheven door den resistentieverminderenden invloed van de keukenzout-oplossing zelf.

Op grond van nadere onderzoeken en overwegingen kwam BRINKMAN verder tot de conclusie, dat deze haemolytische invloed afkomstig is van de phosphatiden in het bloed, welke stoffen een onderdeel uitmaken van de z.g. lipoïden. Deze phosphatiden ¹⁾ zijn oorspronkelijk in het serum aanwezig, maar ze worden in sterke mate door de

¹⁾ „Men kan verschillende phosphatiden onderscheiden, die, wat hun chemische samenstelling betreft, vooral goed bekend zijn geworden sedert de onderzoeken van LEVENE (1921); toch weten we niet precies, hoe de samenstelling der phosphatiden van het bloed is; vroeger sprak men van lecithine, maar het is niet onmogelijk, dat het de voorkeur verdient een deel daarvan terug te brengen tot den vorm van de cephaline”. BRINKMAN. Dissert., pag. 41.

oppervlakte van de cel geadsorbeerd, zoodat ze in actieven vorm in het bloedplasma niet meer voorkomen. Ze oefenen een langzaam haemolyseerenden invloed uit.

Zoo beschouwd geeft dus de curve van de gewasschen roode bloedlichaampjes een beeld van den toestand dezer bloedcellen, zooals hij is zonder den invloed van de haemolyseerende lipoiden, en is het daarom van beteekenis, zoowel de resistentiecurve van de gewasschen als van de ongewasschen bloedlichaampjes te bepalen. In de curve der ongewasschen cellen komen dan vooral de haemolytische invloeden aan den dag, terwijl de curve van de gewasschen cellen een beeld geeft van de resistentie der erythrocyten, zooals die is, ontdaan van seruminvloeden, dat wil dus volgens BRINKMAN zeggen, zooals zij uit het beenmerg komen. In deze laatste curve weerspiegelt zich dan het duidelijkst de sterkte van de regeneratie der bloedcellen. Tenslotte geeft een vergelijking van de curven der gewasschen en ongewasschen roode bloedlichaampjes een inzicht in de sterkte van de haemolytische invloeden.

Zoo kreeg de bepaling der osmotische resistentie door bovengenoemde onderzoekingen een breedere basis dan tot nu toe het geval geweest was. Ook ten opzichte van klinische vraagstukken bood zij nieuwe mogelijkheden. Er was evenwel aan de oplossing van BRINKMAN één bezwaar verbonden, dat haar voor klinische doeleinden ongeschikt maakte. Zoowel het bereiden als het bewaren van deze geëquilibreerde oplossing vraagt veel oplettendheid en geduld, omdat het van zoo groote beteekenis is, dat het koolzuurgehalte steeds constant blijft, daar hiervan de concentratie van de H- en Ca-ionen afhankelijk is. Om het ontwijken van het koolzuur tegen te gaan is het noodzakelijk, dat de vloeistoffen onder vloeibare paraffine bewaard worden en

moet de resistentiebepaling zelf geschieden in buisjes, die volledig gevuld zijn en voorzien van goed afsluitende glazen stoppen. Daarenboven is het noodzakelijk, dat dagelijks de concentratie der H-ionen van de verschillende verdunningen door middel van neutraalrood gecontroleerd wordt.

BRINKMAN heeft daarom getracht in deze oplossing een bufferstelsel in te schakelen, dat de spanning van het CO_2 gedurende langeren tijd constant zou kunnen houden. Hij koos daartoe een mengsel van secundair en primair fosphaat en wel in een verhouding van 5.6 mol tot 1 mol. De p_h van deze oplossing bedraagt 7.55. Het gelukte hem door de invoeging van dit mengsel volkomen dezelfde resultatente bereiken, als met zijn oorspronkelijke geëquilibreerde oplossing. Toch bleek ook deze oplossing niet aan het beoogde doel te beantwoorden. Het bovengenoemde bufferstelsel ontvouwt haar werking het zwakst juist bij een neutrale reactie en de verdunning moet in dit geval met het oog op den vereischten osmotischen druk van de vloeistof tamelijk groot zijn, zoodat maar gedurende enkele dagen de invloed van dit buffermengsel merkbaar is.

In denzelfden tijd nu, dat BRINKMAN naar een vloeistof van eenvoudiger samenstelling zocht, vond HAMBURGER¹⁾, dat een oplossing van Na_2SO_4 10 aq. geheel en al dezelfde resultaten gaf als die van BRINKMAN. De aandacht van HAMBURGER was daarom op het Na_2SO_4 gevallen, omdat hij reeds vroeger daarmee de permeabiliteit van de roode bloedlichaampjes voor de anionen bestudeerd had.²⁾ Bij dit onderzoek was hij tot de conclusie gekomen, dat in een isotonische keukenzout-oplossing de bloedlichaampjes hun oorspronkelijke samenstelling niet behouden; er heeft

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.* Bd. 129, pag. 163, 1922.

²⁾ Zie HAMBURGER, *Osmotischer Druck und Ionenlehre I*, pag. 237.

een uitwisseling plaats tusschen het éénwaardige Cl-ion van de omgevende vloeistof en de tweewaardige ionen van den inhoud der bloedlichaampjes, vooral van de $\text{HPO}_4^{''}$ -ionen. Daar echter voor ieder tweewaardig ion, dat uittreedt, 2 chloorionen in de plaats moeten komen en ieder ion, onverschillig, of het één- of tweewaardig is, hetzelfde wateraantrekkend vermogen bezit, zal de aldus veranderde inhoud van het bloedlichaampje meer water kunnen aantrekken dan de oorspronkelijke inhoud en dientengevolge de haemoglobine eerder kunnen uittreden. Bij het Na_2SO_4 heeft zoo iets evenwel niet plaats. Hoewel ook hier van een uitwisseling van anionen sprake is, wordt een tweewaardig anion steeds door een tweewaardig SO_4 -ion vervangen, waardoor het wateraantrekkend vermogen van het bloedlichaampje onveranderd blijft.

Reeds daarom beschouwde HAMBURGER het Na_2SO_4 als meer indifferent tegenover den inhoud van het bloedlichaampje dan het NaCl. En op de vraag, of het Na-ion van het Na_2SO_4 ook geen lyotropen invloed uitoefent, antwoordt HAMBURGER, dat dit wel het geval zal zijn, maar dat men anderzijds denken moet aan een neutraliseerenden invloed van het tweewaardig $\text{SO}_4^{''}$ -ion. Verder moet men hier ook denken aan de bijzondere beteekenis van de electrostatische wateraantrekking van dit ion. Een verdere verklaring van het feit, dat een Na_2SO_4 oplossing dezelfde resultaten geeft als de geëquilibreerde zoutoplossing, geeft HAMBURGER evenwel niet. Hij constateert slechts dit meer toevallig, dan langs theoretischen weg gevonden feit.

Maar ook aan de Na_2SO_4 oplossing kleeft een gebrek. Zelfs het Na_2SO_4 „pro analyse” reageert soms zuur, waarschijnlijk door het Na HSO_4 . Men ziet dan de roode bloedlichaampjes een bruinachtige kleur aannemen door verandering

van de haemoglobine. Het is daarom noodig er voor te zorgen, dat de oplossing met een kleine hoeveelheid van een Na HCO_3 oplossing van 5 % wordt geneutraliseerd. Als indicator moet neutraalrood gebruikt worden. Dit heeft voor de kliniek reeds bezwaren. Daarenboven is het in dit geval noodzakelijk het koolzuur van de lucht van de oplossingen, die bewaard worden, verwijderd te houden. Onbelemmerd toetreden van dit gas kan op den duur de concentratie der H-ionen weer veranderen.

Daarom zocht BRINKMAN tenslotte naar een eenvoudige oplossing, wier concentratie van H-ionen gemakkelijk gelijk te maken was aan die van het bloed en op die hoogte gehouden kon worden en die tevens de in dit opzicht noodzakelijke punten van overeenkomst met het $\text{Na}_2 \text{SO}_4$ bezat. Hij merkte op, dat men in plaats van het SO_4^{2-} -anion ook een ander tweewaardig anion zou kunnen gebruiken en wel het HPO_4^{2-} -ion. Volgens HOFMEISTER en PAULI heeft het HPO_4^{2-} -ion ongeveer denzelfden invloed op de genuïne hydrophielcolloïde eiwitlichamen als het SO_4^{2-} -ion en volgens PORT wordt ook de haemolyse door deze beide ionen ongeveer in gelijke mate beïnvloed¹⁾.

Daarom kwam BRINKMAN er toe gebruik te maken van het mengsel van phosphaten, zooals dat sedert SÖRENSEN (1909) in de physiologie in gebruik gekomen was bij de colorimetrische bepaling van de concentratie der H-ionen. Dit mengsel bestaat uit een primair en een secundair fosphaat n.l. het $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ en het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq.. Te samen opgelost, gedraagt zich het primaire fosphaat als een zwak zuur en het secundaire fosphaat als het zout van dat zuur. Daardoor wordt een bufferstelsel gevormd en de eigenaardigheid van

¹⁾ Zie HÖBER, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*, 1923, pag. 594.

zulk een stelsel is, dat zijn p_h practisch bepaald wordt door de verhouding van de moleculaire concentratie van het vrije zuur, resp. base, tot die van het zout van dat zuur, resp. base. De concentratie van de H-ionen is dus voor wat het mengsel van het zuur en zijn zout betreft, nog aanmerkelijk kleiner dan die van dat zwakke zuur alleen. Door nu telkens de verhouding van het zwakke zuur tot zijn zout anders te nemen, is het mogelijk een reeks van oplossingen te maken, die alle een andere p_h bezitten, terwijl hun waterstofgetallen betrekkelijk weinig onderling verschillen en niet ver van dat van de neutrale reactie verwijderd zijn. Voor wat het fosphaatmengsel van SÖRENSEN betreft, men kan daarmee oplossingen samenstellen, wier p_h ligt tusschen 5.29 en 8.04¹⁾. Waar men nu uit de mengverhoudingen nauwkeurig de p_h van deze verschillende oplossingen kan vinden, kunnen deze oplossingen met behulp van verschillende indicatoren als vergelijkingsvloeistoffen dienst doen voor een nauwkeurige bepaling van het waterstofgetal van de een of andere vloeistof, dat ook in de buurt van de neutrale reactie ligt. Voornamelijk voor dat doel worden deze fosphaatmengsels in de physiologie gebruikt.

Een ander gevolg van de verhoudingen in het bufferstelsel is, dat de p_h van zulk een oplossing binnen bepaalde grenzen onafhankelijk is van den graad der verdunning, terwijl als derde gevolg genoemd moet worden het vermogen van dit stelsel om den invloed van kleine hoeveelheden sterk zuur of base op de concentratie der H-ionen aanzienlijk te temperen, waardoor deze slechts een heel geringe, soms niet noemenswaardige verandering ondergaat. Ook hierin verschilt zulk een oplossing dus aanmerkelijk met wat bij sterke zuren en

¹⁾ KOLTHOFF. *Der Gebrauch von Farbenindikatoren*, 2e Aufl. 1923, pag. 119.

basen waar te nemen valt. Immers, in het geval van een sterk zuur heeft reeds de toevoeging van een kleine hoeveelheid van de een of andere sterke base een aanzienlijke verschuiving van de p_h tengevolge.

Het gebruik van de phosphaten volgens SÖRENSEN stelt dus in staat een oplossing te bereiden, wier p_h ongeveer gelijk is aan die van het bloed en bovendien betrekkelijk aan weinig veranderingen onderhevig is. Waar nu zulk een oplossing ook nog voor een vierde gedeelte uit HPO_4 -ionen bestaat, welke ionen, zooals reeds hierboven meegedeeld is, wat hun invloed op de colloïden en de roode bloedlichaampjes betreft, zooveel overeenkomst met de SO_4 -ionen vertoonen, daar meende BRINKMAN aan deze phosphaatoplossing boven de natriumsulfaatoplossing van HAMBURGER de voorkeur te mogen geven.

Wat de bereiding der verschillende phosphaatoplossingen betreft, SÖRENSEN verkreeg deze door equimolaire oplossingen van $KH_2 PO_4$ en $Na_2 HPO_4$ 2 aq. in verschillende verhoudingen te mengen. De verhouding, die BRINKMAN voor zijn oplossing gebruikte, was die van $8\frac{1}{2}$ $Na_2 HPO_4$ 2 aq. en $1\frac{1}{2}$ $KH_2 PO_4$. Men verkrijgt daardoor een vloeistof, wier p_h 7.55 bedraagt.¹⁾ Deze is dus een weinig meer naar den alkalischen kant verschoven dan die van het bloed en die van de geëquilibreerde zoutoplossing. Het gereduceerde waterstofgetal van het bloed²⁾ bedraagt gemiddeld 7.36³⁾ en die van BRINKMAN's oorspronkelijke oplossing 7.35.

¹⁾ KOLTHOFF. l.c., pag. 119.

²⁾ Dit is de p_h van het bloed bij een koolzuurspanning van 40 mm. De koolzuurspanning van het arterieele bloed schommelt tusschen 35 en 45 mm. Daarom stelde HASSELBALCH voor, de p_h van het bloed steeds bij 40 mm. te bepalen, om zodoende een vast punt voor vergelijking van de p_h 's van verschillend bloed te verkrijgen. De p_h van het bloed is immers grootendeels afhankelijk van de spanning van het CO_2 .

³⁾ HÖBER. *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*, pag. 133.

Om nu verder uit te maken, hoe groot de concentratie van het Na_2HPO_4 2 aq. en het KH_2PO_4 in deze fosphaat-oplossing moet zijn om haar isotonisch met het bloed te mogen noemen, ging BRINKMAN uit van equimolaire oplossingen van beide phosphaten; hij vermengde deze in een verhouding van $8\frac{1}{2}$ en $1\frac{1}{2}$; en vervolgens zocht hij door verdunning van deze laatste vloeistof die concentratie te vinden, waarbij het volumen der roode bloedlichaampjes precies gelijk bleef aan dat, hetwelk zij in het bloedplasma bezaten. Het bleek, dat de vloeistof, die dit resultaat gaf en daarom door BRINKMAN isotonisch met de roode bloedlichaampjes genoemd werd, 16.30 gr. Na_2HPO_4 2 aq. en 2.18 gr. KH_2PO_4 per liter bevatte. Of in andere verhoudingen uitgedrukt: menging van 0.108 molaire standaardoplossingen van Na_2HPO_4 2 aq. en KH_2PO_4 in een verhouding van $8\frac{1}{2}$ en $1\frac{1}{2}$ geeft eveneens de gevraagde isotonische vloeistof. De vriespuntsverlaging van deze oplossing bedraagt $-0^\circ.46$.

De resultaten, die BRINKMAN met deze fosphaat-oplossing verkreeg, waren volkomen gelijk aan die met de geëquilibreerde zoutoplossing of het ultrafiltraat verkregen.

Het is dan ook met deze fosphaatoplossing, dat BRINKMAN vele van zijn onderzoekingen verricht heeft.

Vóór ik er evenwel toe overga deze onderzoekingen mee te deelen, is het noodzakelijk, dat ik vooraf een nadere uiteenzetting geef van de factoren, welke naar BRINKMAN's meening de grootte van de osmotische resistentie bepalen. Pas in verband met en in het licht van deze beschouwingswijze wordt de opzet van deze onderzoekingen en ook de verklaring van de resultaten daarvan duidelijk. Reeds wees ik er op, dat BRINKMAN de vermeerdering der osmotische resistentie toeschreef aan de verwijdering van de phosphatiden

van de oppervlakte der roode bloedlichaampjes. Een meer nauwkeurige analyse nu van het vraagstuk der osmotische resistentie bracht hem er toe tegenover den haemolytischen invloed van de phosphatiden de werking van de cholesterine te stellen. Beide stoffen behooren tot de lipoiden, maar zoowel in physisch-chemisch, als in biologisch opzicht zijn ze als antagonisten van elkaar te beschouwen en wel zóó, dat de phosphatiden de actieve rol spelen, terwijl de cholesterine hun invloed tegengaat. In het lichaam zou zich dan ook een evenwicht tusschen deze beide lipoiden instellen en BRINKMAN wijst er op, hoe onderzoekers als TERROINE, BLOOR, WACKER en HUECK bewezen hebben, dat het organisme steeds met groote hardnekkigheid dit evenwicht tracht te handhaven, wat vooral bij hongeren en bij een sterk eenzijdige cholesterine-, resp. lecithinevoeding tot uiting komt.

Ook met betrekking tot de bestanddeelen van de cel wijzen enkele proefnemingen in de richting van een constante verhouding tusschen cholesterine en phosphatiden. Het waren MAYER en SCHAEFFER, die bij verschillende organen van verschillende diersoorten de verhouding $\frac{\text{cholesterine}}{\text{vetzuur}}$ (onder vetzuur vatten deze onderzoekers samen de vetzuren van de vetten, van de phosphatiden en van de cholesterineesters) bepaalden en daaraan den naam van „coefficient lipocylique” gaven. Zij kwamen daarbij tot de slotsom, dat men bij de verschillende weefsels van een „constante lipocylique” kon spreken.

Dit alles deed BRINKMAN besluiten, dat het vraagstuk van de osmotische resistentie moet teruggebracht worden tot het vraagstuk van de grootte van de verhouding $\frac{\text{cholesterine}}{\text{phosphatiden}}$ in de roode bloedcel. Een vermindering van de normale

osmotische resistentie is dan gevolg van een vermeerdering van den invloed van de phosphatiden, hetzij doordat de phosphatiden van het bloed vermeerderd zijn en de cholesterine niet in evenredigheid daarmee, hetzij doordat de cholesterine verminderd is, zonder dat daarmee een evenredige vermindering van de phosphatiden gepaard gaat. Het omgekeerde geldt, als de osmotische resistentie vermeerderd is.

Zoo kwam BRINKMAN er toe uit de roode bloedlichaampjes de cholesterine en de phosphatiden afzonderlijk te extraheeren. Hij deed dit volgens een methode, die grootendeels overeenkomt met die, welke BANG¹⁾ aangeeft voor de quantitative bepaling der lipoïden. Vervolgens werd het extract, dat de phosphatiden bevatte, ingedampt en de overblijvende rest in de isotonische geëquilibreerde zoutoplossing geëmulgeerd en wel zóó, dat wanneer b.v. de oorspronkelijke hoeveelheid bloed, waaruit de phosphatiden geextraheerd waren, 3 cm³ bedragen had, eveneens 3 cm³ van de isotonische zoutoplossing ter bereiding van de emulsie gebruikt werd. Het bleek nu, dat een hoeveelheid van 10 mm³ van dat bloed door 1½ cm³ van zulk een emulsie tot haemolyse gebracht kon worden. Mengde BRINKMAN daarentegen vooraf beide extracten en maakte hij daarvan op de bovengenoemde wijze eveneens een emulsie, dan verkreeg hij een vloeistof, waarin de haemolytische werking van de phosphatiden was opgeheven en waarin men slechts de oorspronkelijke osmotische resistentie van die bloedlichaampjes kon aantonen.

Dit feit bevestigde dus BRINKMAN's conclusie, dat ieder bloedlichaampje een hoeveelheid aan phosphatiden bezit, die voldoende is om het in korten tijd tot haemolyse te brengen.

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.* 91, pag. 86 en 235.

Maar de aanwezigheid van de cholesterine tempert deze haemolytische werking.

De bovengenoemde methode stelde bovendien nog in staat om quantitatief het haemolytisch vermogen van de phosphatiden te bestudeeren. Door het maken van verschillende oplossingen van de oorspronkelijke phosphatiden-emulsie in steeds toenemende verdunning, kan men nagaan, bij welke verdunning voor het eerst geen haemolyse meer optreedt.

Van de verhouding $\frac{\text{cholesterine}}{\text{phosphatiden}}$ zal het dan afhangen, of

deze emulsie meer of minder verdund moet worden om haar haemolytisch vermogen op te heffen.

Met eenige voorbeelden toont BRINKMAN dan vervolgens aan, hoe verschil in osmotische resistentie gepaard gaat met een verschil in den haemolytischen invloed van het extract, dat de phosphatiden bevat.

Zoo zou dus de bepaling van de osmotische resistentie ons vooral bij de bloedziekten een inzicht geven in de rol, die de lipoiden bij deze ziekten spelen. Dat ze een rol spelen, werd reeds door verschillende onderzoekers (MAY, GORHAM en MEYERS, DENIS) gevonden. BRINKMAN trachtte dit bovendien nog te bewijzen door kunstmatig bijproefdieren het evenwicht tusschen de beide lipoiden te verbreken en na te gaan wat daarvan het gevolg was. Hij spoot daartoe dezen dieren gedurende enkele dagen een bepaalde hoeveelheid lecithine intraveneus in, terwijl hij hun voedsel gaf, dat practisch geen cholesterine bevatte. Inderdaad zag hij nu een groote destructie van de bloedcellen optreden, die tenslotte zoo erg werd, dat de urine haemoglobine bevatte. Deze haemolytische anaemie bleek verder gekenmerkt te zijn door een aanzienlijk verminderde resistentie, een sterk uitgesproken anisocytose, door polychromatophilie, sterke

urobilinurie en een duidelijk vermeerderde kleurindex. Diende hij nu de lecithine in geringere concentratie en over een langer tijdsverloop toe, dan was de vermindering der resistentie in het begin wel sterk, maar later ging deze voor een groot deel weer terug en bood de resistentiecurve het beeld van een versterkte afbraak en aanmaak van de roode bloedcellen, zooals men dat soms bij gevallen van pernicieuse anaemie aantreft. Daarbij kwam er ook een sterke anisocytose, polychromatophilie en een matige urobilinurie voor den dag.

Uit al deze verschijnselen maakte BRINKMAN op, dat de quantitative en qualitatieve veranderingen van de lipoïden van het bloed een belangrijke rol spelen bij het tot stand komen en het verloop van de pernicieuse anaemie.

Dit nauwe verband nu, dat BRINKMAN tusschen de osmotische resistentie en de lipoïden van het bloed ziet, werd eenerzijds ter verklaring van enkele merkwaardige feiten, met de fosphaatoplossing verkregen, aangevoerd, terwijl het anderzijds uitgangspunt was om de waarde van de resistentiecurve voor het aantoonen van een verhoogde neiging tot haemolyse van het bloed te doen uitkomen.

Wat het eerste betreft, reeds in zijn proefschrift deelt BRINKMAN enkele onderzoeken mede over den invloed van de milt op de osmotische resistentie van de erythrocyten. Zijn medewerkers BOLT en HEERES ¹⁾ berichten daarover uitvoeriger. Zij vonden, dat de osmotische resistentie van de miltbloedlichaampjes aanzienlijk lager was dan die van de bloedlichaampjes uit de art. carotis. Daaruit concludeerden zij, dat de roode bloedlichaampjes in de milt worden voorbereid voor de vernietiging, die ook reeds gedeeltelijk in het

¹⁾ *Ned. Tijdschr. v. Geneesk. II*, pag. 2259, 1922.

orgaan zelf plaats heeft. Het meest merkwaardige evenwel, dat deze onderzoekers waarnamen, was, dat de met de geëquibreerde zoutoplossing gewasschen miltaderbloedlichaampjes deze resistentiedaling niet vertoonden. Dit zou bewijzen, dat het aangrijpingspunt der haemolyseerende functie van de milt gelegen is in de oppervlaktelaag der erythrocyten. En het lag het meest voor de hand voor deze onderzoekers, deze verandering toe te schrijven aan een daling van de verhouding cholesterine phosphatied. Het bewijs, dat zulk een verandering inderdaad mogelijk is, vonden zij in de verhoogde resistentie der miltbloedlichaampjes tegenover saponine. Hieruit mag een verhoogd cholesterinegehalte van het bloedlichaampjesoppervlak worden afgeleid. KURT MEYER o.a. had gevonden, dat het weerstandsvermogen van een rood bloedlichaampje t.o.v. saponine een goede maat is voor zijn cholesterinegehalte en dat dit uitsluitend daardoor wordt bepaald. De milt zou dus een quantitatieve verandering van de cholesterine teweeg brengen. Evenwel moet dan volgens de theorie, daar de verhouding cholesterine phosphatied in de milt verlaagd wordt, tegelijkertijd een vermeerdering van de hoeveelheid of werkzaamheid van het phosphatied plaats hebben, die de cholesterinevermeerdering nog overtreft, wat door deze onderzoekers evenwel niet is aangetoond.

En wat het tweede betreft, bij zijn onderzoek, of een verhoogde neiging tot haemolyse ook tot uiting komt in de resistentiecurve, bracht BRINKMAN eerst langs experimenteelen weg deze verhoogde neiging tot haemolyse tot stand en dat niet met behulp van vergiften, die op zeer gecompliceerde wijze werken, maar door het verbreken van het evenwicht cholesterine:phosphatiden. Het proefdier kreeg voedsel,

dat nòch vetten, nòch lipoïden bevatte. Gedurende 3 dagen werd het intraveneus lecithine ingespoten. Daardoor ontstond een anaemie, welke van haemolytischen aard was, omdat aan het eind van deze drie dagen haemoglobinurie en haemoglobinaemie optraden, terwijl reeds eerder urobilinurie was waargenomen.

De resistentiecurven, in het verloop van deze drie dagen bepaald, weerspiegelden deze steeds toenemende neiging tot haemolyse. Eerst verminderde de osmotische resistentie van dat gedeelte van het bloed, dat oorspronkelijk reeds het minst resistent was. Vervolgens trad ook bij de andere bloedlichaampjes de haemoglobine eerder uit dan vóór de proefneming het geval was, tot tenslotte reeds haemolyse ontstond, als de bloedlichaampjes in de isotonische oplossing gesuspenderd werden.

Op deze wijze werd dus BRINKMAN's opvatting over den samenhang tusschen de osmotische resistentie en een verhoogde neiging tot haemolyse bevestigd.

Tenslotte lichtte BRINKMAN de beteekenis van de resistentiecurve met betrekking tot het aantoonen van een regeneratie der erythrocyten op de volgende manier toe. Aan een jong konijn werd 40 cm³ bloed ontnomen. Na drie dagen bleek het aantal roode bloedcellen weer gelijk te zijn aan het oorspronkelijke aantal. Er had dus een volkomen regeneratie plaats gehad. En dit kwam ook in de resistentiecurve tot uiting. In de eerste plaats was de resistentie 3 dagen na het bloedverlies voor alle bloedlichaampjes toegenomen. Maar daarenboven bleek het bovenste gedeelte van de resistentiecurve, dat, zooals SNAPPER ¹⁾ aantoonde, door de jonge bloedcellen gevormd wordt, aanmerkelijk meer

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.* Bd. 43, pag. 256, 1912.

uitgesproken te zijn dan vóór het bloedverlies het geval was. Vooral gold dit voor de gewasschen erythrocyten. Dit feit komt dus overeen met BRINKMAN's opvatting, dat de resistentiecurve van de gewasschen roode bloedlichaampjes het zuiverst het beeld weergeeft van de erythrocyten, zooals zij uit het beenmerg komen, nog onbeïnvloed door de verhoudingen, die er in het bloed bestaan.

Na het bovenstaande zal het duidelijk zijn, dat de resistentiecurve volgens BRINKMAN bepaald, ons een antwoord kan geven op de volgende drie vragen:

- 1° hoe groot de neiging tot haemolyse van het bloed en van de verschillende erythrocyten in het bloed is;
- 2° hoe groot de haemolytische invloed van het serum op de erythrocyten is;
- 3° hoe groot de regeneratie dezer bloedcellen is.

Het bovenstaande geeft den inhoud weervan BRINKMAN's beschouwingen, verschenen in 1922. Maar in 1923 komt hij van zijn opvattingen omtrent den haemolytischen invloed van de phosphatiden terug¹⁾. Het bleek hem achteraf, dat het haemolyseerend extract, uit de roode bloedlichaampjes met vetoplosmiddelen verkregen, geen phosphatiden bevatte maar hogere vetzuren. Deze hebben dus een sterk haemolytisch vermogen. Toch blijkt hiervan in het normale bloed niets. Daar is deze werking opgeheven. BRINKMAN acht het zeer waarschijnlijk, dat dit zijn oorzaak daarin heeft, dat de vetzuren in normaal bloed als calciumzeepen worden gebonden. Daardoor wordt hun capillaire activiteit aanzienlijk verminderd en daarmee zou het verdwijnen van het haemolytisch vermogen gepaard gaan. Slechts het sterk onverzadigde

¹⁾ Verslagen v. d. gewone Vergadering der wis- en natuurkundige afdeeling v. d. Kon. Akad. van Wetensch. Deel XXXII. No. 1. 1923.

linoleenzuur behoudt zijn vermogen om ook als calciumverbinding de oppervlaktespanning van het serum te verlagen. En met deze eigenschap gaat ook een haemolytisch vermogen gepaard. Een intramusculaire injectie van linoleenzuur bij het proefdier veroorzaakte in korten tijd een chronische haemolytische anaemie, waarvan het roode bloedbeeld alle kenmerken van de pernicieuse anaemie vertoonde.

Het linoleenzuur is een stof, die in de biochemie der vet- en fosphatiedstofwisseling voorkomt en BRINKMAN acht het zeer goed mogelijk, dat juist dit zuur ook in het normale bloed circuleert. Vetzuren met twee dubbele bindingen kon hij in de vetzuurfractie nog niet aantoonen, maar wel de zuren met drie en vier dubbele bindingen, waaronder het linoleenzuur behoort. Aan deze vetzuren, i.c. het linoleenzuur, meent BRINKMAN een groote beteekenis als physiologisch haemolyticum te moeten toeschrijven. Van groot belang acht hij het dan ook na te gaan, hoe het met het voorkomen van deze stof bij de ernstige haemolytische anaemieën gesteld is.

Door deze onderzoeken is dus de hypothese, dat er een nauw verband bestaat tusschen haemolyse en de verhouding cholesterine foutief gebleken. Dit werd nog bevestigd door fosphatiden

de waarneming van BRINKMAN, dat een lecithinepreparaat, dat door nieuwere methoden werkelijk gezuiverd was, geen haemolytische eigenschappen vertoonde en dat de haemolytische werking der handelslecithine, ook als deze door de gebruikelijke acetonprecipitatie gezuiverd is, aan verontreinigingen, vermoedelijk aan het linoleenzuur, moet worden toegeschreven.

Maar ook van andere zijde zijn enkele resultaten van de eerste onderzoeken van BRINKMAN niet bevestigd. VAN PAASSEN¹⁾ kon geen inactivering van het haemoly-

¹⁾ *Nederl. Maandschr. v. Geneesk.* Jaargang XII, No. 3, 1924.

seerend extract uit de roode bloedlichaampjes verkrijgen; wel trad de haemolyse, zoo beide extracten bij elkaar gevoegd werden, vertraagd op, maar in het extract, dat de cholesterine zou bevatten, trad, na emulgeering in phosphaat-oplossing, ook steeds, behalve sterke agglutinatie der erythrocyten, een geringe haemolyse op. Bovendien vond hij, dat het haemolyseerend extract door toevoeging van een spoor serum geheel onwerkzaam werd, zoodat het moeilijk is zich een belangrijken invloed van deze stoffen in vivo voor te stellen.

In tegenstelling verder met wat BRINKMAN van menschen bloed bericht, kon VAN PAASSEN deze haemolyseerende stoffen ook uit het serum extraheeren in bijna even groote concentratie als uit de roode bloedlichaampjes.

Tenslotte kon VAN PAASSEN ook niet in gevallen van pathologisch toegenomen haemolyse en van abnormaal verlaagde osmotische resistentie eenigerlei toename van deze haemolytische stoffen vaststellen. Zelfs vond hij in enkele gevallen van familiären icterus, waar een sterke daling der resistentie bestond, dat zulk een haemolytisch extract aanzienlijk minder werkzaam was dan bij de contrôle van het bloed van een normaal individu.

Ook bij al zijn gevallen van pernicieuse anaemie miste hij een toename van deze haemolyseerende stoffen.

En wat het linoleenzuur betreft, de haemolyse, door deze stof veroorzaakt, bleek niet door een resistentieverlaging te worden ingeleid.

Dit laatste feit toont duidelijk aan, hoe er tenslotte ook geen verband bestaat tusschen de osmotische resistentie en het linoleenzuur, dat BRINKMAN als een physiologisch haemolyticum beschouwt en waarvan hij het niet onwaarschijnlijk acht, dat het bij de ernstige haemolytische anaemieën een rol van beteekenis speelt.

Intusschen is het duidelijk, hoe door deze laatste onderzoeken geen kritiek geleverd is op BRINKMAN's bepaling van de osmotische resistentie. Slechts zijn verklaring van de vermeerdering dier resistentie door het wasschen der erythrocyten in de isotonische oplossing en de uitwerking daarvan, bleek op losse gronden te berusten. Maar al werd daardoor de waarde van zijn nieuwe oplossingen met betrekking tot het vraagstuk van de physiologische en pathologische haemolyse aanzienlijk verminderd, toch bleven zij hun beteekenis met betrekking tot de bepaling van de osmotische resistentie behouden, daar de opzet van hun samenstelling georiënteerd was naar de nieuwste inzichten in de vraagstukken van de physische chemie der levende cel. Dit deed hen stellen boven de tot nu steeds gebruikte keukenzout oplossing en hen als meer physiologisch beschouwen.

Enkelen hebben BRINKMAN's resultaten met zijn nieuwe oplossingen gecontroleerd. Wat de geëquilibreerde zout-oplossing betreft, STRASSER¹⁾ kon daarmee geen duidelijke resistentievermeerdering door het wasschen aantoonen. VAN PAASSEN²⁾ daarentegen gelukte dit wel. Hij acht het dan ook twijfelachtig, of, gezien STRASSER's opgaven, deze wel de juiste waschvloeistof gebruikt heeft. En wat de fosphaatoplossing betreft, ook daarmee kon VAN PAASSEN BRINKMAN's resultaten bevestigen. Tevens heeft hij bij enkele ziekten, voornamelijk bij die van het bloed, de resistentiecurven met behulp van de fosphaatoplossing bepaald. Op de waarde en den uitslag van deze bepalingen en van die van BRINKMAN zal ik in hoofdstuk II terug komen bij de vergelijking van mijn resultaten met die van deze beide onderzoekers. Toch zij hier VAN PAASSEN's

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 134, pag. 541.

²⁾ VAN PAASSEN, l.c. pag. 118.

conclusie omtrent de waarde van BRINKMAN's wijziging in de bepaling van de osmotische resistentie vermeld. Hij vindt, dat door deze wijziging de bepaling van de osmotische resistentie aan beteekenis en juistheid van uitvoering heeft gewonnen. Maar z.i. heeft ze niet gegeven, wat er van verwacht werd nl. om tot een betere kennis van de processen te komen, die zich in normale en ziekelijke toestanden met de erythrocyten afspelen.

Ook mijn doel was het de beteekenis van de fosphaat-oplossing voor de kliniek te bestudeeren. Daartoe was het in de eerste plaats noodig de resultaten van BRINKMAN te controleeren en physiologische waarden vast te stellen.

Ik ben daartoe begonnen mij te stellen op het standpunt van BRINKMAN, dat hij in 1922 innam, nl. dat de vermeerdering der resistentie door het wasschen gevolg is van het verwijderen van haemolytische invloeden van het serum. Van uit dat gezichtspunt heb ik zijn proeven nagewerkt.

HOOFDSTUK II.

Eigen onderzoek.

§ 1. *Het bereiden van de phosphaatoplossing.*

De phosphaatoplossing, die volgens BRINKMAN isotonisch is met de roode bloedlichaampjes van den mensch, bevat 16.30 gr. $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. en 2.18 gr. $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ per Liter.

Het lag voor de hand in plaats van het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. te gebruiken. Het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. is namelijk moeilijk te verkrijgen, het moest uit Duitschland bij aparte bestelling betrokken worden, terwijl het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. in den handel steeds voorradig is. Een eenvoudige berekening leert, hoeveel grammen $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. equivalent zijn met de 16.30 gr. $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. en deze berekening gaf als resultaat een hoeveelheid van 32.80 gr.. Op deze wijze meende ik de gevraagde oplossing te kunnen samenstellen. Maar bij de contrôle, of deze oplossing klopte met die, welke BRINKMAN bereid had, vond ik een duidelijk verschil. In plaats van een vriespuntsverlaging van $0^{\circ}.46$, zooals opgegeven was, bleek de Δ $-0^{\circ}.478$ te zijn. Herhaalde proefnemingen bevestigden dit feit. De bepalingen werden met het apparaat van BECKMANN verricht. De wijze, waarop dit geschiedt, vindt men in HAMBURGER's *Osmotischer Druck und Ionenlehre*, Deel I, pag. 89.

Het gevonden verschil bracht me er toe de beide zouten nader te onderzoeken. Het $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ geeft, als het in een hoeveelheid van 2.18 gr. per Liter opgelost is, een vriespunts-

verlaging van $0^{\circ}.0575$, zooals men uit het bovengenoemde werk van HAMBURGER (Deel I, pag. 88) berekenen kan. Een dubbelbepaling wees uit, dat in dit zout de oorzaak van het verschil niet te zoeken was. Ik vond een Δ van $-0^{\circ}.062$, een waarde, die practisch gelijk is aan die, welke verwacht werd. Daarentegen gaf het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. afwijkende getallen. Hier moest een Δ van $-0^{\circ}.402$ gevonden worden. En onze waarnemingen schommelden tusschen $-0^{\circ}.42$ en $-0^{\circ}.43$.

Vermoedelijk had het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. dus een lager watergehalte dan opgegeven was. Het bleek mij achteraf, dat dit verwacht kon worden. Het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. en ook het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 7 aq., dat eveneens overal in den handel is, verweeren aan de lucht en kunnen daarom niet constant zijn. 't Was dan ook om deze reden, dat SÖRENSEN¹⁾ voor zijn studies over de enzymen het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. gebruikte, dat bij een gewone temperatuur en een gewonen vochtigheidstoestand van de lucht geen veranderingen ondergaat.

Nu is het natuurlijk mogelijk om de moeilijkheden, die het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. en het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 7 aq. bieden, te overwinnen. In het onderhavige geval kan men dit doen door gebruik te maken van de methode der cryoscopie. Men gaat b.v. uit van het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, dat als $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq. in den handel is. Dit zout wordt van te voren goed gemengd en fijn gemaakt, omdat men anders slechts de bovenste lagen neemt, die meer verweerd zijn dan de onderste en daardoor in hun gehalte aan kristalwater met deze verschillen. Van dit goed gemengde zout neemt men dan 38.6 gram, een hoeveelheid, die overeenkomt met 0.108 mol $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 12 aq.. Is nu het watergehalte van het door ons gebruikte $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ werke-

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 21, pag. 170.

lijk gelijk aan dat, hetwelk is opgegeven, dan bedraagt de vriespuntsverlaging van deze oplossing $0^{\circ}.46$. Is daarentegen, wat te verwachten is, de Δ grooter, dan kan men door verschillende verdunningen te maken tenslotte die verdunning uitvinden, die noodig is om de gezochte Δ te verkrijgen. Deze verdunde oplossing bevat dan het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ in een concentratie van 0.108 mol per L. In het vorige hoofdstuk ¹⁾ is uiteengezet, hoe men door het mengen van twee standaardoplossingen, waarvan in de een het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$, in de andere het $\text{KH}_2 \text{PO}_4$ in een concentratie van 0.108 mol per Liter aanwezig zijn, in een verhouding van $8\frac{1}{2} : 1\frac{1}{2}$ de gevraagde isotonische oplossing bereiden kan. Op deze wijze is het mogelijk het beoogde doel te bereiken.

Waar evenwel deze vriespuntsbepalingen niet gemakkelijk zijn en een groote mate van nauwkeurigheid en geoefendheid vragen, omdat zij hier niet als contrôle maar als basis voor de bereiding der gevraagde zoutoplossing dienst moeten doen, kan men ook op andere wijze te werk gaan en wel door het $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ 2 aq. zelf te bereiden. SÖRENSEN ²⁾ raadt aan het gewone secundaire natriumphosphaat in dunne lagen op papier uit te spreiden en het zooveel mogelijk tegen stof beschut, bij gewone kamertemperatuur te laten liggen. Als men dan dagelijks goed omroert en de na eenige dagen ontstane klompjes stuk stoot, zou de verweering na 8 tot 14 dagen tot stand zijn gekomen. Toch moet men rekening houden met den vochtigheidstoestand van de lucht. Is deze hoog, dan wordt de verweering sterk vertraagd, een ervaring, die ik zelf ook opgedaan heb. Is evenwel dit proces, naar 't schijnt, eenmaal afgeloopen, dan weegt men op een stuk papier 100 gr. van het zout tot op 0.1 gr. nauwkeurig en

¹⁾ Pag. 28 en 29.

²⁾ *Biochem. Zeitschr.*, Bd. 21, pag. 170.

controleert, door het na eenige dagen opnieuw te wegen, of het Na_2HPO_4 den eindtoestand bereikt heeft. Ten slotte moet dit door een andere proef nog bevestigd worden. Nadat het zout gedurende 24 uren bij een temperatuur van 100° en een druk van 20—30 mm gedroogd is, wordt het voorzichtig, het best met behulp van een blaasvlam, in een platina kroesje uitgegloeid, tot het gewicht constant blijft. Het totale gewichtsverlies moet dan $25.28 \pm 0.1\%$ bedragen. Men gebruike voor deze proef ongeveer 5 gr.

Het bezwaar van deze methode schuilt evenwel in de moeilijkheid om het zout gedurende de verweering vrij van stof te houden en in de onzekerheid, hoelang dit verweeringsproces duren zal. 'n Vluggere methode geeft KOLTHOFF ¹⁾ aan. Deze krystalliseert het Na_2HPO_4 12 aq. driemaal om en droogt het dan in den exsiccator boven chloorcalcium tot constant gewicht.

Om te waarschuwen voor de klippen, die bij het secundair fosphaat dreigen, meende ik mijn ervaringen met dit zout en de wijze, waarop vergissingen voorkomen kunnen worden, iets uitvoeriger te moeten meedeelen.

Tenslotte heb ik het Na_2HPO_4 2 aq. uit Duitschland ontvangen. En daarmee zijn de onderzoekingen, die hier zullen volgen, alle verricht. Dr. P. MULLER was zoo vriendelijk na te gaan, of het Na_2HPO_4 2 aq., dat ik zoowel van KAHLBAUM als van SUCHARDT ontvangen had, werkelijk op elke molecule secundair fosphaat 2 moleculen water bevatte. Dit bleek inderdaad het geval te zijn. Hij vond het Na_2HPO_4 respect. als $\text{Na}_2\text{HPO}_4 2.01 \text{ aq.}$ en als $\text{Na}_2\text{HPO}_4 2.03 \text{ aq.}$.

Het oplossen van de zouten bood geen moeilijkheden, als men het gedistilleerd water vóór dien wat verwarmd had.

¹⁾ I. M. KOLTHOFF, l. c., pag. 116.

Ter contrôle, of mijn oplossing goed was, stond mij de opgave van BRINKMAN ten dienste, dat zijn phosphaat-oplossing een Δ van $-0^{\circ},46$ heeft. 'n Dubbelbepaling met het toestel van BECKMANN gaf tot uitslag een vriespuntsverlaging van $0^{\circ},458$ en $0^{\circ},461$, waarden, die met die van BRINKMAN overeenstemmen.

Tenslotte zond ik een willekeurig monster van mijn bereide phosphaatoplossing naar Dr. I. M. KOLTHOFF, die zoo vriendelijk was de H-ionen concentratie van deze oplossing te bepalen. Hij vond $p_h = 7.55$, een waarde, die gelijk is aan die, welke verwacht werd (zie pag. 28).

Mijn phosphaatoplossing mocht dus als identiek met die van BRINKMAN beschouwd worden.

§ 2. *Haematocrietbepalingen.*

Thans kwam de vraag aan de orde, of de aldus verkregen oplossing het volumen van de roode bloedlichaampjes onveranderd laat. Hiervan hangt volgens den schrijver het antwoord af op de vraag, of de oplossing isotonisch is met de bloed-elementen of niet.

Dit antwoord is met behulp van den haematocriet te vinden. Maar de haematocriet van den eenen onderzoeker is niet gelijk aan dien van den anderen. GRIJNS en EYKMAN werkten op een andere manier en met een ander apparaat dan KOEPPE, terwijl HEDIN ook weer zijn eigen wijze van werken had.

Mij stonden ter beschikking de buisjes van HAMBURGER. Teekeningen daarvan treft men aan in het meer genoemde werk van dezen onderzoeker (Deel I, pag. 379 en 380). Het zijn trechtervormige buisjes, waarvan het onderstuk een capillair is. Dit onderstuk is in 100 gelijke deelen gecalibreerd,

heeft een lengte van ongeveer 50 mm. en een inhoud van precies 0.04 cc.. Het bovenste deel is trechtervormig en heeft een inhoud van ongeveer $2\frac{1}{2}$ —3 cc.. De geheele lengte van het buisje bedraagt ongeveer 10 cm.. De buisjes waren reeds vroeger betrokken van den amanuensis van het physiologisch laboratorium te Groningen, den heer J.J. BOOM, die ze tevens geijkt had. In onderscheiding met het capillaire buisje van HEDIN, waaraan deze laatste den naam van haematocriet gaf, noemt HAMBURGER zijn trechtervormig buisje chonohaematocriet.

Ik ging nu als volgt te werk. Het bloed werd verkregen door een venapunctie en dat wel van die patienten in de kliniek, van wie verwacht mocht worden, dat de samenstelling van hun bloed geen afwijkingen vertoonde. Vervolgens werd dat bloed gedefibrineerd, om daarna door een papieren filter van fibrinepropjes gezuiverd te worden. Het afmeten had door middel van een capillairpipet plaats. Aan den eenen kant was deze van een scherpe punt voorzien. Aan het andere uiteinde was een gummislangetje bevestigd. Het bloed werd dan opgezogen tot de streep, die op de pipet was aangebracht. Hoeveel bloed men daarbij opzoog, was onverschillig, als maar steeds dezelfde hoeveelheid verkregen werd, daar het op een vergelijking en niet op de absolute hoeveelheid aankwam. En de opgezogen hoeveelheid was steeds van dien aard, dat de bloedlichaampjes geheel in het capillair gedeelte der buisjes konden worden opgenomen. Twee van dergelijke pipetten stonden mij ten dienste, die ik afwisselend gebruikte.

Voordat het bloed afgemeten werd, moest het eerst nog goed omgeschud worden om een gelijkmatige suspensie der erythrocyten te verkrijgen. Pas daarna had het afmeten plaats, wat met groote nauwkeurigheid moest

geschieden. HAMBURGER ¹⁾ raadt daartoe aan het bloed eerst tot iets boven de streep op te zuigen, daarna de pipet horizontaal te houden, de punt met een gaasje af te drogen en den stand van het bloed boven een stuk wit papier als ondergrond te beoordeelen. Komt het bloed nu boven de streep, dan kan men met een drogen vinger net zoolang aan de punt van de pipet tippen tot de streep bereikt is.

Maar ook het brengen van deze afgemeten hoeveelheid in den chonohaematocriet vereischte groote zorg. In den chonohaematocriet, die diende ter bepaling van het volumen van de erythrocyten in hun oorspronkelijken toestand, was geen vloeistof aanwezig. In den anderen daarentegen bevond zich steeds 2 cc. van de te onderzoeken oplossing. Door de pipet nu verticaal boven den chonohaematocriet te houden kon ik het bloed zeer langzaam daaruit doen vloeien, een methode, die te verkiezen is boven het uitblazen, omdat hoe langzamer het uitstroomen geschiedt, des te minder bloed aan den wand van de pipet blijft hangen. Slechts het laatste gedeelte, dat door de capillair wordt vastgehouden, moest heel voorzichtig worden uitgeblazen.

Er bleef evenwel altijd een laatste heel klein restje van het bloed om de punt van de pipet hangen. Was er vloeistof in den chonohaematocriet, dan kon men dit restje makkelijk verwijderen door de punt daarin om te roeren, maar zoo er geen vloeistof aanwezig was, ging dit niet. Toch was het dan mogelijk dit restje grootendeels in het buisje in te brengen door de punt heel voorzichtig langs den glazen wand te wrijven onmiddellijk boven het niveau van het reeds aanwezige bloed. Door nu voorzichtig contact te maken tusschen dit restje en het niveau van het bloed,

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.* Band 1. 1906.

werden alle bloedlichaampjes bij het centrifugeeren uitgeslingerd.

Vervolgens werd om een volledige vermenging van de erythrocyten te verkrijgen, de chonohaematocriet enkele malen tusschen duim en vinger heen en weer bewogen. De duim, die dit buisje van boven afsluit, moet droog en goed schoon zijn.

Een half uur lang werd deze suspensie daarop aan zichzelf overgelaten, opdat de bloedlichaampjes gelegenheid zouden hebben met hun omgeving in osmotisch evenwicht te komen. Ebonieten dekseltjes verhinderden het invallen van stof en voorkwamen later bij het centrifugeeren mogelijke verdamping.

De centrifuge, die gebruikt werd, maakte 3000 omwentelingen per 1'.

Voor verdere bijzonderheden omtrent deze methode verwijs ik naar het artikel van HAMBURGER in het *Biochem. Zeitschr.* Bd. 1. 1906.

Op deze wijze heb ik de volumina van de roode bloedlichaampjes in hun oorspronkelijk milieu en in de fosphaat-oplossing met elkaar vergeleken. Bepalingen met verschillend bloed werden verricht met den volgende uitslag.

Bl. I	beteekent	het	volumen	van	de	bloedlichaampjes	in	hun	*natuurlijke omgeving.
Bl. II	„	„	„	„	„	bloedlichaampjes	in	de	phosphaatoplossing gesuspendeerd.
Bl. III	„	„	„	„	„	bloedlichaampjes	in	de	Na Cl oplossing van 0.9 % gesuspendeerd.

I.	Na ½ uur.	Na 1 uur.	Na 1½ uur.
Bl. I	73	72	72
Bl. II	71	70	70

II.	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	
Bl. I	62	$61\frac{1}{2}$	61	
Bl. II	59	$57\frac{1}{2}$	$57\frac{1}{2}$	
Bl. III	62	61	61	
III.	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	Na $1\frac{3}{4}$ uur.
Bl. I	61+	61	60+	60+
Bl. II	59+	$58\frac{1}{2}$	58+	58+
Dubbelbepaling met de iets grootere pipet.				
Bl. I	$69\frac{1}{2}$	69	$68\frac{1}{2}$	$68\frac{1}{2}$
Bl. II	$67\frac{1}{2}$	67	$66\frac{1}{2}$	$66\frac{1}{2}$
Bl. III	69	$68\frac{1}{2}$	$68\frac{1}{2}$	$68\frac{1}{2}$
IV.	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	Na $1\frac{3}{4}$ uur.
Bl. I	64	63	63	63
Bl. II	61	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$
Bl. III	64	63	63	63
Dubbelbepaling met dezelfde pipet.				
Bl. I	63+	$62\frac{1}{2}$	$62\frac{1}{2}$	
Bl. II	61	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$	
Bl. III	63	$62\frac{1}{2}$	$62\frac{1}{2}$	
V.	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	
Bl. I	$67\frac{1}{2}$	67	67	
Bl. II	$66\frac{1}{2}$	66	66	
Bl. III	68	$67\frac{3}{4}$	$67\frac{3}{4}$	

Deze bepalingen doen zien, dat in de volgens BRINKMAN isotonische fosphaatoplossing de roode bloedlichaampjes een kleiner volumen innemen dan in hun oorspronkelijk milieu; de oplossing zou dus een weinig hypertonisch t.o.v. het bloedserum zijn. Daar evenwel de mogelijkheid bestond, dat er bij het vervaardigen van de fosphaatoplossing ongemerkt een vergissing was begaan, besloot ik een nieuwe oplossing te maken. Bl. IIa duidt dan het volumen in deze nieuw bereide oplossing aan.

VI.	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{4}$ uur.
Bl. I	62	62	62
Bl. II	60	60	60—
Bl. IIa	60	60	60—

Dit resultaat bevestigde dus onze gedachte, dat de z.g. isotonische fosphaatoplossing iets hypertonisch is.

Tevens blijkt uit deze proefnemingen, dat een NaCl oplossing van 0.9 % het volumen der erythrocyten onaangetast laat. Alleen in geval V lijkt de keukenzout-oplossing hypotonisch t.o.v. het serum. Vermoedelijk heeft het bloed hier een hooger osmotischen druk dan in de vorige gevallen. Het verschil tusschen het volumen der bloedlichaampjes in de keukenzoutoplossing en in de fosphaatoplossing komt evenwel overeen met dat, hetwelk in de meeste gevallen gevonden werd, n.l. een verschil van ± 2 streepjes. Op deze wijze trad het onderscheid in invloed op de erythrocyten toch ook aan den dag.

Mijn plan was om de fosphaatoplossing op een keukenzoutoplossing van 0.9 % in te stellen. Daardoor zou het mogelijk zijn later een meer nauwkeurige vergelijking van beide oplossingen te verkrijgen. Om dit plan ten uitvoer te brengen moest eerst uitgezocht worden, welke hypertotonische keukenzoutoplossing dezelfde getallen geeft als de fosphaatoplossing. Voor de hand lag met een keukenzoutoplossing van 0.95 % te beginnen.

Bl. IV duidt het volumen van de bloedlichaampjes in deze laatste oplossing aan.

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	Na $1\frac{3}{4}$ uur.
Bl. II	60	58 $\frac{1}{4}$	58+	58
Bl. IV	59	58	58	58

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	Na $1\frac{3}{4}$ uur.
Bl. II	61	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$
Bl. IV	61	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$	$60\frac{1}{2}$

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.	Na $1\frac{3}{4}$ uur.
Bl. II	59+	$58\frac{1}{2}$	58+	58+
Bl. IV	59+	$58\frac{1}{2}$	58+	58+

2e bepaling met grootere pipet.

Bl. II	$67\frac{1}{2}$	67	$66\frac{1}{2}$	$66\frac{1}{2}$
Bl. IV	$67\frac{1}{2}$	67	$66\frac{1}{2}$	$66\frac{1}{2}$

Het bleek dus, dat wat haar invloed op het volumen van de roode bloedlichaampjes aangaat, een keukenzoutoplossing van 0.95 % overeenkomt met de fosphaatoplossing. Door deze laatste nu van 90 op 95 te verdunnen, mocht ik thans verwachten die oplossing verkregen te hebben, die aan de gestelde eischen voldoet.

Bl. V duidt het volumen van de bloedlichaampjes in de fosphaatoplossing aan, die van 90 op 95 verdund is.

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.
Bl. III	63	$62\frac{1}{2}$	$62\frac{1}{2}$
Bl. V	63—	$62\frac{1}{2}$	$62\frac{1}{2}$

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{4}$ uur.
Bl. III	61	61	61
Bl. V	$61\frac{1}{2}$	61	61

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.
Bl. III	$67\frac{1}{2}$	$67\frac{1}{2}$
Bl. V	68	68

	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na $1\frac{1}{2}$ uur.
Bl. III	69	$68\frac{1}{2}$	$68\frac{1}{2}$
Bl. V	$69\frac{1}{2}$	69—	69—

2e bepaling.

Bl. III	$68\frac{1}{2}$	68	68
Bl. V	70+	69	69

	Na 1 uur.	Na 1 $\frac{1}{4}$ uur.	Na 1 $\frac{3}{4}$ uur.	Na 2 uur.
Bl. III	86—	85+	85	85
Bl. V	85	85	84 $\frac{1}{2}$	84 $\frac{1}{2}$
	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na 1 $\frac{1}{2}$ uur.	
Bl. III	64—	63	63	
Bl. V	64 $\frac{1}{2}$	64—	64—	
	Na $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 uur.	Na 1 $\frac{1}{2}$ uur.	Na 1 $\frac{3}{4}$ uur.
Bl. III	65	64 $\frac{1}{2}$	64+	64+
Bl. V	65	64 $\frac{1}{2}$	64	64

Zooals men ziet, zijn de getallen niet alle met elkaar in overeenstemming. Toch zijn de verschillen niet zoo groot dan dat ik daardoor niet zou mogen zeggen, dat, als de fosphaatoplossing volgens de opgave van BRINKMAN van 90 op 95 verdund werd, zij in invloed op het volumen der erythrocyten met de keukenzoutoplossing van 0.9 % nagenoeg overeenkomt. Immers, de afwijkingen, die deze verdunde fosphaatoplossing geeft, zijn niet constant, maar schommelen om de waarden met de keukenzoutoplossing verkregen.

Om bovengenoemde redenen beschouwde ik deze verdunde fosphaatoplossing als isotonisch met de erythrocyten en gebruikte ik haar als waschvloeistof en als uitgangspunt voor mijn verdunningen.

§ 3. Methodiek.

Het was nu mogelijk over te gaan tot de bepaling der resistentiecurven. Daartoe was het in de eerste plaats noodig de verschillende vereischte verdunningen van de fosphaatoplossing te maken. BRINKMAN wijkt van de tot nu toe steeds gevolgde methode af. Immers, het is de gewoonte, de zoutoplossingen zóó te verdunnen, dat er steeds een constant verschil tusschen de opeenvolgende concentraties bestaat. Deze methode laat echter geen verhouding tusschen

al die verschillende concentraties zien. En daarom maakte BRINKMAN, overeenkomstig het principe, dat aan de „physiologische Reihenversuch” ten grondslag ligt, gebruik van de verdunning der opeenvolgende oplossingen volgens een geometrische reeks.

En zoo werden de hypotonische oplossingen bereid door eerst de isotonische oplossing tot op de helft te verdunnen om daarna van deze verdunde oplossing uit een reeks van $0.9 \times \frac{1}{2}$ isotonisch, $(0.9)^2 \times \frac{1}{2}$ isot., $(0.9)^3 \times \frac{1}{2}$ isot., samen te stellen.

Ik ben BRINKMAN in deze methode gevolgd, zoowel om een vergelijking met zijn resultaten te verkrijgen als ook om het voordeel, dat deze methode biedt, daar ze een geringer aantal verdunningen eischt dan anders het geval zou zijn. En dit is niet zonder beteekenis, als men vlug werken moet. Maar in zooverre ben ik van de wijze, waarop BRINKMAN zijn verdunningen maakte, afgeweken, dat ik bij het vervaardigen der verschillende hypotonische oplossingen niet de zuiver geometrische methode gevolgd heb. Want deze is tamelijk omslachtig en biedt veel kansen voor het maken van fouten. Gaat men uit van 1000 cc. van de $\frac{1}{2} \times$ isotonische vloeistof, dan moet men daaruit 900 cc. pipetteeren en in een andere flesch overbrengen. Bij deze 900 cc. worden 100 cc. gedistilleerd water gevoegd. Deze oplossing is dan $\frac{9}{10} \times$ de $\frac{1}{2}$ isotonische oplossing. Vervolgens neemt men hiervan weer 900 cc., die nu op hun beurt met 100 cc. aqua destillata verdund worden. Zoo gaat men dan verder tot de laatste hypotonische oplossing van de reeks samengesteld is.

Het bezwaar is dus hier, dat, wanneer er zich eenmaal een fout in het pipetteeren heeft voorgedaan, deze terugkomt in alle verdere oplossingen. Bovendien sluipen allerlei

onnauwkeurigheden binnen bij het afmeten van dergelijke groote hoeveelheden. Met het gebruik van kleinere quanta (b.v. 100 cc.) komt men echter ook niet veel verder, omdat men dan steeds 10 cc. overhoudt, zoodat men gedwongen is, als men de meest hypotonische oplossing bereid heeft, weer bij het begin aan te vangen om aldus een voldoende hoeveelheid van de verschillende verdunningen in voorraad te krijgen. Maar hiermee zijn de gevaren voor het maken van fouten niet opgeheven en bovendien wordt de methode nog omslachtiger.

Ik heb daarom met behulp van de logarithmentafel de samenstelling van de verschillende verdunningen tot op 0.1 cc. nauwkeurig voor een totale hoeveelheid van 120 cc. uitgerekend (een hoeveelheid, die in de daarvoor gebruikelijke fleschjes gemakkelijk past). Op deze manier zijn mijn verdunningen bereid.

De verschillende hoeveelheden gedistilleerd water en half isotonische fosphaatoplossing, noodig voor het maken der hypotonische oplossingen, volgen hieronder. Daarnaast heb ik het percentage aan NaCl aangegeven, dat in de verschillende verdunningen aanwezig zou zijn, indien een oplossing van 0.9% NaCl op de bovengenoemde wijze zou worden verdund. Volgens onze bepalingen kwam de fosphaatoplossing, naar de aangifte van BRINKMAN bereid, maar daarna van 90 op 95 verdund, in haar beteekenis voor het volumen der roode bloedlichaampjes met een NaCl oplossing van 0.9% overeen. Men kan dus nu den invloed van de verdunningen van beide oplossingen met elkaar vergelijken en daarom zet ik hier de sterkte van de hypotonische oplossingen, uitgedrukt in het NaCl gehalte, naast de andere getallen neer.

$(10/9)^3 \times \frac{1}{2}$ isot. opl. = 82.4 cc. isot. opl. + 37.6 cc. gedist. water 0.62% NaCl.					
$(10/9)^2 \times$	"	= 74.1 "	"	+ 45.9 "	" 0.56 "
$(10/9) \times$	"	= 66.7 "	"	+ 53.3 "	" 0.50 "
$\frac{1}{2}$	"	= 120 "	$\frac{1}{2}$ isot. opl.		0.45 "
$(9/10) \times \frac{1}{2}$	"	= 108 "	"	+ 12 "	" 0.405 "
$(9/10)^2 \times$	"	= 97.2 "	"	+ 22.8 "	" 0.365 "
$(9/10)^3 \times$	"	= 87.5 "	"	+ 32.5 "	" 0.33 "
$(9/10)^4 \times$	"	= 78.7 "	"	+ 41.3 "	" 0.295 "
$(9/10)^5 \times$	"	= 70.9 "	"	+ 49.1 "	" 0.265 "
$(9/10)^6 \times$	"	= 63.8 "	"	+ 56.2 "	" 0.24 "
$(9/10)^7 \times$	"	= 57.4 "	"	+ 62.6 "	" 0.215 "

Overbodig te zeggen, dat, als deze beide vloeistoffen bij elkaar gebracht werden, er steeds voor moest worden zorg gedragen, dat ze goed met elkaar gemengd werden.

Wat de fleschjes betreft, waarin ik mijn oplossingen bewaarde, deze werden, voordat ik ze in gebruik nam, in navolging van SOMMER¹⁾, gevuld met 5% HCl., eenige dagen in de broedstoof geplaatst, vervolgens herhaaldelijk met aq. dest., waarbij 2 druppels phenolphthaleïne als indicator gevoegd waren, weggezet, om te controleeren, of het glas nog alcali afgaf. Tenslotte werden de fleschjes nog een paar maal met aq. dest. omgespoeld, flink uitgeschud en eindelijk in de broedstoof gedroogd.

Om de verdamping der vloeistof zooveel mogelijk tegen te gaan, sloot ik de oplossingen af met een caoutchouc-stop. De meestal gebruikte glazen stop is voor dit doel niet zoo geschikt.

Tevens werd er steeds nauwkeurig op gelet, of aan den hals van het fleschje of aan de stop zich geen kristalletjes gevormd hadden, iets wat gemakkelijk gebeuren kan, als bij het pipetteeren een druppel aan den hals is blijven hangen. Deze verdampt dan met het gevolg, dat er een kristalletje ontstaat. Dit kan in de vloeistof vallen en zoo dit zich

¹⁾ SOMMER. Dissertatie, pag. 30.

telkens herhaalt, bestaat de mogelijkheid, dat de verdunning geconcentreerder wordt dan aangegeven is. Als voorzorgsmaatregel werden daarom, nadat de benodigde hoeveelheid vloeistof uit het fleschje genomen was, de hals en de stop afgeveegd en mochten zich dan toch nog enkele kristalletjes gevormd hebben, dan werden deze vóór het gebruik der oplossing heel voorzichtig weggenomen.

Om de 12 à 14 dagen werden de oude oplossingen door nieuwe vervangen.

BRINKMAN geeft in zijn dissertatie niet aan de wijze, waarop hij gewerkt heeft. Hij verwijst daartoe naar een beschrijving van HAMBURGER in het „Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden, herausgegeben von Prof. Dr. E. Abderhalden.” Het bleek mij evenwel, dat deze beschrijving nog niet uitgekomen was. Maar wijlen Prof. HAMBURGER was zoo vriendelijk mij hiervan een proefdruk te geven en ook Dr. BRINKMAN bleek zoo bereidwillig mij mondeling de noodige inlichtingen te verstrekken.

BRINKMAN's methode kwam dan op het volgende neer. Twee reeksen van een tiental zoogenaamde buisjes van WASSERMANN werden in een rekje geplaatst. Alle buisjes van de eerste reeks werden met de isotonische waschvloeistof gevuld; in die van de tweede reeks werden 2 cc. van de verschillende hypotonische oplossingen gedaan. Daarop werd bij alle buisjes 0.02 cc. bloed gevoegd met behulp van de pipet van SAHLI. De pipet werd met de punt in de vloeistof gebracht en daarop werd het bloed voorzichtig in de vloeistof geblazen. Was dit afgelopen, dan werd het buisje omgeschud, zoodat de erythrocyten zich gelijkmatig in de oplossing verdeelen konden. Het bloed werd onmiddellijk uit den vingertop verkregen.

Hierna liet men de buisjes gedurende 5 minuten staan,

waarna ze drie minuten lang gecentrifugeerd werden. De reeks der buisjes voor directe haemolyse is dan klaar. HAMBURGER spreekt in dit geval van secundaire haemolyse.

Wat de andere buisjes betreft, waarin zich de isotonische zoutoplossingen bevonden, uit deze werd met behulp van een waterstraalzuigpomp de bovenstaande vloeistof weggezogen. Daarop werden de bloedlichaampjes in een nieuwe isotonische zoutoplossing gesuspenderd en andermaal door centrifugeeren op den bodem der buisjes gebracht. Deze wijze van doen herhaalde men dan enkele keeren, al naar de malen, dat men de erythrocyten wilde wasschen. Werd de isotonische oplossing voor de laatste maal weggezogen, dan moest dit zeer nauwkeurig geschieden, daar zoo min mogelijk vloeistof mocht achterblijven.

Vervolgens werden de hypotonische oplossingen in een hoeveelheid van 2 cc. bij de gewasschen bloedlichaampjes gebracht. En daarop was de behandeling geheel gelijk aan die bij de eerste reeks. Aan deze haemolyse gaf HAMBURGER den naam van primaire haemolyse.

De sterkte van de haemolyse werd colorimetrisch volgens ARRHENIUS en MADSEN¹⁾ bepaald. Deze methode bestaat daarin, dat een bepaalde hoeveelheid bloed met een bepaalde hoeveelheid water in dezelfde verhouding als waarin de verschillende oplossingen in de buisjes van WASSERMANN tot het ingebrachte bloed staan, gebracht wordt, waardoor alle erythrocyten hun kleurstof verliezen. De sterkte van deze haemolyse stelt men dan op 100%. Verdunt men vervolgens een deel van deze roode vloeistof b.v. met een gelijke hoeveelheid water, dan krijgt men een vloeistof, die 50% van de oorspronkelijke concentratie van de haemoglobine bevat.

¹⁾ *Zeitschr. für physik. Chem.* 44 (1903).

Op deze wijze kan men vloeistoffen met verschillende concentraties van de haemoglobine bereiden. En die verschillende kleurschakeeringen kan men dan vergelijken met die, welke in de hypotonische oplossingen ontstaan zijn, waardoor het mogelijk is de sterkte der haemolyse in procenten uit te drukken. Als standaardoplossing, die de 100% haemolyse vertoont, diende in ons geval een vloeistof van 20 cc. aqua destillata, waarin 0.20 cc. bloed gebracht was.

Toen ik deze methode zelfstandig trachtte toe te passen, stuitte ik op enkele bezwaren en moeilijkheden. De eerste moeilijkheid was het verkrijgen van de benodigde hoeveelheid bloed uit den vingertop. Het nauwkeurig afmeten met de pipet van SAHLI vraagt altijd eenigen tijd en moet men dit twintig maal herhalen, dan is het noodig of zulk een prik te geven, dat het bloed langen tijd blijft stroomen, of herhaaldelijk te prikken. Maar geen van beide methoden bevredigt en daarom moest ik er van afzien het bloed direct van den vinger op te zuigen.

Het meest voor de hand lag het bloed zóó op te vangen, dat het niet stolt, zoodat men rustiger werken kan en lang niet zulk een bloedbad krijgt. Het defibrineeren kwam niet in aanmerking. De bloedlichaampjes worden daardoor min of meer beschadigd en ook weet men niet, welke physisch-chemische verandering de membraan ondergaat gedurende het stollingsproces. Ook de zouten, die het Ca neerslaan, zooals de oxalaten, de fluoriden, de citraten meende ik niet te mogen gebruiken. Hetzelfde was het geval met de andere neutraal-zouten, die slechts in een sterke concentratie de stolling verhinderen. Immers, het was er mij om te doen invloeden van allerlei ionen zoover mogelijk van het bloed verwijderd te houden en dat op dezelfde gronden als waarop BRINKMAN de isotonische

keukenzoutoplossing voor zijn onderzoek ongeschikt achtte. VAN PAASSEN ¹⁾ beschouwt evenwel, naar het schijnt, het kaliumoxalaat als betrekkelijk indifferent, daar hij het te onderzoeken bloed verkreeg door venapunctie met een droge naald, waarbij ± 8 cc. in 2 cc. 2% kaliumoxalaatoplossing werd opgevangen. Wel acht hij het van belang de resistentie-bepaling spoedig na het opvangen van het bloed te verrichten.

Ook het gebruik van hirudine leek mij voor het doel, waartoe ik de bloedlichaampjes noodig had, ongeschikt.

Ik gaf daarom de voorkeur aan het opvangen van het bloed in een paraffineblokje, waarin een uitholling was gemaakt. In een omgeving van paraffine stolt het bloed immers aanmerkelijk langzamer, mits de wand van die omgeving schoon is en vrij van oneffenheden. En nu had ik het voordeel, dat geen andere stoffen bij het bloed gemengd behoeften te worden om stolling te voorkomen.

Voor het verkrijgen van de benodigde hoeveelheid bloed desinfecteerde ik eerst den vinger, liefst ring- of middenvinger van de linkerhand, daar deze meestal het minst vereelt zijn. Daarna werd de vinger eenige minuten in warm water gehouden, dat een temperatuur had, die nog net verdragen kon worden. Was de vingertop goed hyperaemisch, dan droogde ik hem flink af en vervolgens werd met de naald van FRÄNKEL een diepe prik gegeven. In de meeste gevallen stroomde het bloed dan uit den vinger en kon ik de benodigde hoeveelheid gemakkelijk in het paraffineblokje opvangen. Ik maakte daarbij de ervaring, dat bloed, hetwelk spontaan uit den vinger stroomt, aanmerkelijk minder spoedig stolt dan dat, hetwelk men door uitknijpen of door kunstmatige stuwung verkrijgt.

¹⁾ VAN PAASSEN. l.c. pag. 123.

Toch moet er ook in deze omstandigheden vlug gewerkt worden. De pipet van SAHLI bleek hierbij niet te voldoen. Het tippen met den vinger aan het uiteinde van de pipet om het bloed precies tot de streep te brengen, voor het geval men daarvan iets teveel opgezogen heeft, gaf hier geen resultaat, omdat deze pipet meestal aan het onderste gedeelte wat wijder uitloopt, waardoor men dan vaak ineens te veel bloed bij deze manier van werken meeneemt. Daarom gebruikte ik dezelfde capillaire pipet, die mij reeds bij de haematocrietbepalingen ten dienste stond en die voorzien was van een scherpe punt. Natuurlijk werd deze pipet nu op 0.020 cc. geijkt. Hiermee was het na eenige oefening mogelijk vlug en zeer nauwkeurig telkens de benoodigde hoeveelheid bloed af te meten. Door voorzichtig blazen werd dan het bloed in de buisjes gebracht. Opdat er niets in de pipet zou blijven hangen, werd 2 à 3 maal iets van de oplossing opgezogen en dit weer in het buisje uitgeblazen.

In dit verband zij vermeld, dat VAN PAASSEN ¹⁾ op een andere wijze het bloed in de verschillende oplossingen brengt. Hij meet de hoeveelheid bloed niet nauwkeurig af, maar laat in ieder buisje uit dezelfde druppelpipet 2 druppels van het te onderzoeken bloed vallen.

Om het afmeten van het bloed niet al te gehaast te maken, pipetteerde ik niet dadelijk bij het begin de vereischte hoeveelheden af van de bloedlichaampjes, die gewassen moesten worden, zooals HAMBURGER dat aangeeft, maar volgde ik een afwijkende methode, die mij ook uit ander oogpunt boven de eerste te verkiezen lijkt. Behalve dat het telkens bewerken en centrifugeeren van al die buisjes veel tijd kost, biedt de zoo juist genoemde werkwijze ook nog

¹⁾ VAN PAASSEN. l.c., pag. 122.

een groote kans om onnauwkeurige waarden te krijgen. Het is toch niet uitgesloten, dat door het telkens wegzuigen van de bovenstaande isotónische vloeistof er steeds een zeker aantal roode bloedlichaampjes mee worden verwijderd. Is dit niet bij de eerste keeren het geval, dan dreigt dit gevaar toch bij de laatste maal, als men de isotonische oplossing heel scherp van de bloedlichaampjes moet scheiden. En is men te voorzichtig, dan blijft soms weer te veel vloeistof achter, zoodat de later toegevoegde hypotonische oplossing daardoor te veel in sterkte verandert. Mijn ervaring was steeds, dat de totale haemolyse van de op deze wijze gewasschen bloedlichaampjes 85 à 90% was, vergeleken met die van de ongewasschen bloedlichaampjes.

Ook hierom volgde ik dus een andere methode. Zoodra de prik gegeven was, ving ik 15 à 20 druppels bloed op in een centrifugeerbuis, die ongeveer 20 cc. van de isotonische zoutoplossing bevatte. Het bloed moest vlug stroomen om het ontstaan van kleine stolsels tegen te gaan. Eenmaal in de groote vloeistofmassa aangeland, was de kans daartoe practisch uitgesloten. Door het omkeeren van deze centrifugeerbuis kon een gelijkmatige suspensie van de erythrocyten verkregen worden. Al naardat ik nu in de gelegenheid was om tot het wasschen der bloedlichaampjes over te gaan, bleven deze korter of langer tijd, meest 1 à 2 uur, in de zoutoplossing gesuspendeerd. Daarna centrifugeerde ik deze suspensie gedurende 2 à 3 minuten, terwijl ik de electrische centrifuge met halve kracht liet draaien om de bloedlichaampjes zoo min mogelijk te beschadigen. De bovenstaande vloeistof werd dan weer met behulp van de waterstraalzuigpomp, waaraan ik een pipet met scherpe punt bevestigd had, verwijderd. Dit herhaalde ik al naar de keeren, dat er gewasschen moest worden. Ik volgde indit opzicht BRINKMAN

en hield mij aan driemaal wasschen. Moest de isotonische oplossing voor de laatste maal verwijderd worden, dan centrifugeerde ik iets langer. Een tamelijk nauwkeurige scheiding van vloeistof en bloedlichaampjes kon thans gemakkelijk worden bereikt, omdat het in deze omstandigheden betrekkelijk onverschillig is, of er enkele erythrocyten mee weggezogen worden. Door schudden zorgde ik er voor een gelijkmatige suspensie van de bloedlichaampjes te verkrijgen. Tenslotte werd de deze gewasschen erythrocyten op dezelfde wijze in de hypotonische oplossingen gebracht als de ongewasschene.

Natuurlijk kon door deze bewerking de standaardkleur van de ongewasschen bloedlichaampjes niet meer tegelijk dienst doen voor de gewasschene. Deze moest thans van beide afzonderlijk gemaakt worden. Dit geschiedde door met behulp van een pipet van MACLEAN, die volgens de opgave op 0.200 cc. ingesteld is, iets, wat we bij ijking konden bevestigen (de afwijking bedroeg 1 à 1½%) 0.200 cc bloed af te meten en dit te brengen in een hoeveelheid gedistilleerd water van 20 cc., die ook met een geijkte pipet afgemeten was. De vloeistof, die hierdoor ontstond, was evenwel in de meeste gevallen troebel en daarom centrifugeerde ik haar gedurende enkele minuten, waardoor zij helder werd.

HAMBURGER geeft op de bloedlichaampjes gedurende 5 minuten in de hypotonische oplossingen gesuspendeerd te laten. VAN PAASSEN ¹⁾ hecht aan dien tijd niet veel, daar volgens hem een tijd, langer dan 5 minuten, geen verschil in uitslag oplevert. Ik heb mij in dit opzicht aan geen tijd gehouden. De buisjes met de hypotonische oplossingen, waarin zich de gewasschen bloedlichaampjes bevonden, werden bijna geregeld na een half uur gecentrifugeerd. Voor

¹⁾ VAN PAASSEN. l.c., pag. 122.

de ongewasschen bloedlichaampjes liep deze tijd nog al eens uiteen, van een half uur tot uiterlijk drie uur.

Ook hier geschiedde het centrifugeeren met groote voorzichtigheid. De centrifuge liet ik weer gedurende 2 minuten met halve kracht draaien.

Wat de bepaling van den graad der haemolyse betrof, ookdaarinbenikvande door HAMBURGER en BRINKMAN aangegeven werkwijze afgeweken. Door gebruik te maken van de methode van ARRHENIUS en MADSEN opent men de kans op het maken van fouten. Eerste vereischte is, dat alle buisjes van WASSERMANN een even groote doorsnee hebben, daar een dikke vloeistoflaag een donkerder kleur geeft dan een, die dunner is. Bovendien mag de glassoort niet de minste afwijkende tint vertoonen. Deze twee voorwaarden, die steeds gesteld moesten worden, gevoegd bij het feit, dat de graad der haemolyseschatting tusschen een paar aangegeven grenzen moest geschieden en een eenigszins nauwkeurige bepaling reeds practisch onmogelijk wordt bij een haemolyse boven de 70%, zoodat men dan reeds de haemolyse moet gaan schatten aan het sediment van de nog ongedeerde bloedlichaampjes, dit alles deed mij besluiten den colorimeter van AUTENRIETH te gebruiken. De wig van dit toestel werd met de standaardkleuroplossing gevuld en door het overschenken van de gekleurde hypotonische oplossing in het trogje kon de graad der haemolyse bepaald worden. Vooraf was de colorimeter geijkt voor de wig en het trogje, zoodat voor elk cijfer van de schaal de daaraan beantwoordende sterkte van de kleur in procenten gevonden kon worden.

Op deze manier was het mogelijk tot 90 % toe den graad der haemolyse nauwkeurig aan te geven. Moeilijk werd het boven de 95 % een nauwkeurige differentiatie te

maken. Toch was dit ook noodig, daar bij een colorimetrische aflezing van 100 % de haemolyse vaak nog niet totaal was, wat bleek uit het ringetje („le stade annulaire” van MAY)¹⁾, dat op den bodem van het buisje zich bevond. Bij microscopisch onderzoek vond ik, dat deze ringetjes nog roode bloedlichaampjes bevatten, al is de vorm van deze laatste door de hypotonische oplossing veranderd. Al naar de dikte van dit ringetje schatte ik de sterkte der haemolyse op waarden tusschen 95 en 100 % gelegen.

Ook beneden de 10 % was het niet steeds mogelijk den graad der haemolyse met den colorimeter nauwkeurig te vinden. Dan maakte ik gebruik van de methode van ARRHENIUS en MADSEN. De volgende mengsels werden in de buisjes van WASSERMANN gemaakt en de sterkte van hun kleur vergeleken met die van de zwakste hypotonische oplossingen.

0.25 cm ³ standaardkleuropl.	+	10 cm ³ water :	gehalte aan haemoglobine	2.5%
0.25 „ „	+	5 „ „ :	„ „	5%
0.25 „ „	+	3 „ „ :	„ „	7.5%
0.25 „ „	+	2.25 „ „ :	„ „	10%

Tenslotte nog iets over de reiniging van de buisjes van WASSERMANN. Na afloop van het onderzoek werden ze flink met gewoon leidingwater uitgespoeld. Daarna werd dit nog eens enkele malen herhaald met gedestilleerd water en vervolgens werden de buisjes in de broedstoof gedroogd. Eenmaal in de week had er bovendien een groote schoonmaak plaats. Gedurende een nacht liet ik ze dan in chroomzuur liggen om allerlei mogelijke vettige bestanddeelen van het glas te verwijderen.

¹⁾ E. MAY. *Etudes sur les résistances globulaires*, 1914, pag. 27.

§ 4. Resultaten van het onderzoek.

a. De waarde van de resultaten van het onderzoek.

Het eerste doel, dat ik mij thans stelde, was te onderzoeken, in hoeverre mijn wijze van werken nauwkeurig was. Daartoe begon ik met het maken van dubbelbepalingen. Maar deze dubbelbepalingen deed ik in het begin niet bij verschillende personen, maar ik beperkte mij tot één individu met de bedoeling, om naast de contrôle op eigen onderzoekingen, ook nog een antwoord te krijgen op de vraag, of de resistentiecurve van een normaal persoon gedurende zekeren tijd constant blijft of wel wisselend is. Uit tweeërle oogpunt was deze vraag belangrijk. Was de resistentiecurve bij een normaal individu een wisselende grootheid, dan was het misschien mogelijk in het licht van de hypothese van BRINKMAN een samenhang te vinden tusschen resistentie en samenstelling van het bloed. Maar tevens had deze vraag beteekenis voor een latere vergelijking van het bloed van gezonde en zieke personen. Zoo heeft men met de keukenzoutoplossing zulk een resistentieverandering bij den haemolytischen icterus gevonden. EPPINGER en GÄNSSLEN¹⁾ beschrijven gevallen van haemolytischen icterus, waarbij de resistentie iets toeneemt, als de patient sterker icterisch wordt.

Voor dit onderzoek gebruikte ik mijn eigen bloed.

Den uitslag van een achttal bepalingen gedurende een tijdsverloop van 18 dagen vindt men in bijlage I.

Beschouwen we nu in de eerste plaats paarsgewijze de verschillende dubbelbepalingen, dan blijkt, dat deze onderling tamelijk goed met elkaar overeenstemmen. Schakelen we reeks V uit, dan is bij een haemolyse van meer dan 10% een variatiebreedte van 5% naar boven en naar beneden

¹⁾ Dtsch. Arch. für klin. Medizin, Bd. 140, pag. 215.

zeker ruim gekozen, zoodat wanneer we b.v. bij een enkelbepaling een haemolyse van 65% zouden vinden, we met tamelijk groote zekerheid mogen zeggen, dat de haemolyse tusschen 60 en 70% ligt. De juistheid van deze opvatting wordt bevestigd door wat na verloop van eenigen tijd, nadat het eerste achttal bepalingen verricht was, twee enkelbepalingen van hetzelfde bloed, die voor andere doeleinden gemaakt werden, te zien gaven. In bijlage I vindt men deze twee reeksen (reeksen IX en X) alleen voor de ongewasschen bloedlichaampjes naast de dubbelbepalingen afgedrukt en daaruit ziet men, hoe de resultaten van deze enkelbepalingen veel overeenkomst vertoonen met die, welke de dubbelbepalingen geven.

In mijn verder onderzoek bleef ik steeds steekproeven met dubbelbepalingen nemen ter contrôle, of ik juist werkte. Toch maant hetgeen reeks V leert tot groote voorzichtigheid. Pas later vond ik een verklaring van deze afwijking.

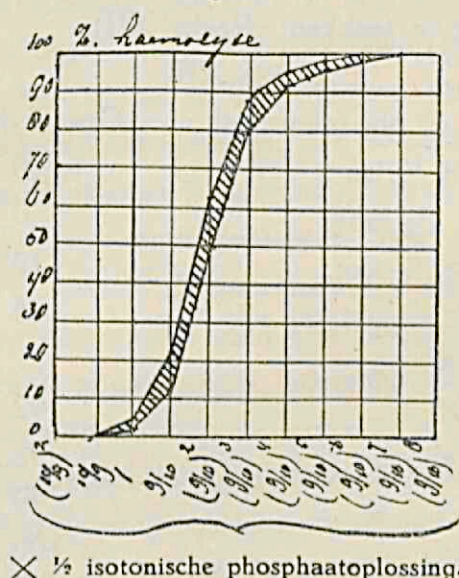
In de tweede plaats mag uit deze tabellen met groote waarschijnlijkheid geconcludeerd worden, dat de hypotonische phosphaatoplossingen zeker gedurende 14 dagen hun zelfde concentratie behouden. Immers, hoewel de eene serie soms veel met de andere verschilt, loopen deze verschillen niet parallel met het ouder worden der oplossingen.

b. De resultaten van het onderzoek der ongewasschen bloedlichaampjes.

Houden we ons nu eerst bezig met de ongewasschen bloedlichaampjes. Het valt op, hoe de verschillende reeksen onder elkaar afwijkingen vertoonen en hoe een vermeerderde of verminderde neiging tot haemolyse zich over een heele reeks uitstrekt, wat het duidelijkst bij de hypotonische oplossingen van middelmatige sterkte aan den dag treedt. De

series IV, V en VII vormen samen een groep tegenover de series II, III, VI en X, welke laatste een iets verhoogde neiging tot haemolyse aan den dag leggen. De beide andere reeksen nl. I, VIII en IX vormen daarentegen een overgang tusschen deze beide groepen. De uiterste begrenzings van deze verschillen worden het zuiverst door VI en VII bepaald. Figuur 1 laat de variatiebreedte uitkomen.

Figuur 1.



Een dergelijk verschil vond ik later ook nog bij een ander persoon, zooals onderstaande tabel leert. (Reeks XI, zie ook figuur 4.)

Reeks XI.

Concentratie v. d. fosphaatopl.	Graad der haemolyse.	
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	2%	5%
$(9/10)^2 \times$ "	16 "	25 "
$(9/10)^3 \times$ "	51 "	69 "
$(9/10)^4 \times$ "	89 "	94 "

Concentratie v. d. fosphaatopl.	Graad der haemolyse.	
$(9/10)^5 \times \frac{1}{2}$ isot.	96%	98%
$(9/10)^6 \times$ „	99%	99 „
$(9/10)^7 \times$ „	100%	100 „

Maar bij een derde, bij wien ik ook tweemaal op verschillende tijden de resistentiecurve der ongewassen bloedlichaampjes bepaalde, trof ik dit verschil in slechts heel lichten graad aan, maar dat is van te weinig beteekenis om er conclusies uit te trekken. (Reeks XII).

Reeks XII.

Concentratie v. d. fosphaatopl.	Graad der haemolyse.	
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	1%
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	10%	15 „
$(9/10)^2 \times$ „	45 „	48 „
$(9/10)^3 \times$ „	81 „	84 „
$(9/10)^4 \times$ „	92 „	95 „
$(9/10)^5 \times$ „	98 „	99 „
$(9/10)^6 \times$ „	99 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „

Toch is wat deze tabellen leeren voldoende om een vraagteeken te plaatsen achter wat VAN PAASSEN¹⁾ concludeerde. Hij was n.l. in de gelegenheid bij een patient met een verworven haemolytischen icterus meerdere resistentiebepalingen te doen en hij vond nu, dat de curven niet veel uiteenliepen. Maar toch hecht hij waarde aan het feit, dat in de perioden, waarin de patient sterker icterisch was, de resistentie iets was toegenomen. VAN PAASSEN geeft hier geen getallen of verdere aanwijzingen en daarom lijkt het mij, nog afgezien van de vraag, of deze verschuiving

¹⁾ VAN PAASSEN. l.c., pag. 131.

van de curven werkelijk als een resistentievermeerdering is op te vatten, toch twijfelachtig, of, gezien onze resultaten bij normale personen, het verschijnsel, dat VAN PAASSEN waarnam, met de phosphaatoplossing als iets typisch in dit geval voor den haemolytischen icterus mag worden opgevat.

En misschien werpen onze uitkomsten ook nog eenig licht omtrent de reden, waarom VAN PAASSEN¹⁾ bij 14 lijders aan pernicieuse anaemie, bij wie hij meerdere malen resistentiebepalingen verrichtte om den invloed van het verloop van het lijden te bestudeeren, niet vond, wat hij verwachtte, n.l. de vermeerdering van de resistentie gedurende een intermissie. Want de schrijver kon geen constante afwijking waarnemen; bij sommige patienten bleef de curve zoowel in een tijdperk, waarin de patient sterk anaemisch was, als in een intermissie (waarin men een resistentievermeerdering zou verwachten) bijna geheel normaal met hoogstens wat vertraagde haemolyse.

Wat ons nu verder in fig. 1 opvalt, is, dat deze curve een verdeeling in 3 fracties toelaat, waarvan de middelste het grootst is. Ook de curven van de drie andere door ons onderzochte normale personen bevestigen de indeeling, die BRINKMAN vond, daar de eerste fractie 10 à 15%, de tweede 80 à 90% en de derde 5 à 10% van het geheel uitmaakt (zie pag. 21).

In fig. 2 heb ik de breedte weergegeven, waarbinnen de resistentiecurven van deze 4 personen en van mijzelf vallen. Het is interessant deze te vergelijken met de breedte, die VAN PAASSEN vond als uitslag van zijn onderzoek bij 10 normale individuen. (fig. 3). In dezelfde figuur is ook

¹⁾ VAN PAASSEN, l.c., pag. 136.

dan ziet men, hoe èn de resultaten van deze beide schrijvers met elkaar gecombineerd èn die door mij verkregen, dwingen tot het aannemen van een grootere variatiebreedte dan VAN PAASSEN vastgesteld heeft. En dat niet alleen naar links maar ook naar rechts, omdat de uiterste rechtergrens van mijn variatiebreedte die van VAN PAASSEN nog overtreft, hoewel mijn hypotonische oplossingen in vergelijking met de zijne hypotonisch waren. Trouwens, deze onderzoeker is toch ook één geval tegengekomen, dat ver buiten de door hem vastgestelde variatiebreedte viel. Bij een, wat zijn bloedconstellatie betreft, schijnbaar normaal individu werd een haemolyse waargenomen, die voor de ongewassen bloedlichaampjes pas bij $(9/10)^2 \times \frac{1}{2}$ isotonische en voor de gewassen bij $(9/10)^3 \times \frac{1}{2}$ isotonische fosphaat-oplossing begon op te treden. Dit betrof een patiente met verschijnselen van zware enteroptose en hyperaciditeit van het maagsap. Met aarzeling beschouwt VAN PAASSEN dit als een normaal geval, daar hij de mogelijkheid openlaat, dat de hyperaciditeit hypercholesterinaemie ten gevolge had en daardoor de resistentieverhooging veroorzaakte. De cholestérine in het bloed is evenwel niet bepaald. In het licht evenwel van de conclusies, waartoe we juist gekomen zijn, lijkt mij de resistentiecurve van deze persoon zeker binnen de normale grenzen te vallen.

Gezien nu èn de groote variatiebreedte, die in normale gevallen mogelijk is en die veel grooter blijkt te zijn dan VAN PAASSEN aannam, èn de schommelingen in de resistentiecurven, die ook bij normale personen voorkomen (zie fig. 1 en fig. 4), is het moeilijk met VAN PAASSEN uit de resultaten, die hij bij zijn onderzoek van 14 gevallen van pernicieuse anaemie verkreeg, de slotsom te trekken, dat bij de meesten de resistentie van het meerendeel der

erythrocyten iets was verhoogd, terwijl de beginhaemolyse normaal was, en deze feiten min of meer te plaatsen naast hetgeen de meeste onderzoekers berichten over een toename der „resistentiebreedte” bij de pernicieuse anaemie, d. w. z. een vervroeging of normaal zijn der beginhaemolyse en verlating der totale haemolyse. En ook zijn m. i. de conclusies, die uit de curven van fig. 10 en fig. 11 in het artikel van VAN PAASSEN getrokken worden, nl. dat in twee gevallen van bovengenoemde ziekte, waarop beide figuren betrekking hebben, de resistentie duidelijk hooger is, naarmate de patient zich in een betere conditie bevindt, in verband met wat wij vonden, niet geheel gerechtvaardigd.

Tenslotte kwam de vraag aan de orde, of de „échelle chromatique” ook zou blijven bestaan, indien de keukenzoutoplossing evenals de fosphaatoplossing volgens een geometrische reeks verdund werd. Een keukenzoutoplossing van 0.9 % mocht ik als isotonisch beschouwen met mijn verdunde fosphaatoplossing (zie pag. 52). Ik gebruikte voor het bereiden dier hypotonische oplossingen het chemisch zoo zuiver mogelijke NaCl van KAHLBAUM, dat vóór het afwegen telkens uitgedroogd werd. Dezelfde voorzorgen als bij de bereiding der fosphaatoplossingen werden ook hier in acht genomen.

De fig. 4, 5, 6 en 7 geven de uitkomsten van dit onderzoek, bij vier verschillende gezonde personen gedaan. Van hetzelfde bloed was tegelijkertijd een resistentiebepaling met de keukenzout- en fosphaatoplossing verricht. Fig. 4 geeft bovendien de resistentiecurven weer, bepaald met de fosphaatoplossing op twee verschillende dagen. (Zie pag. 67).

Fig. 4.

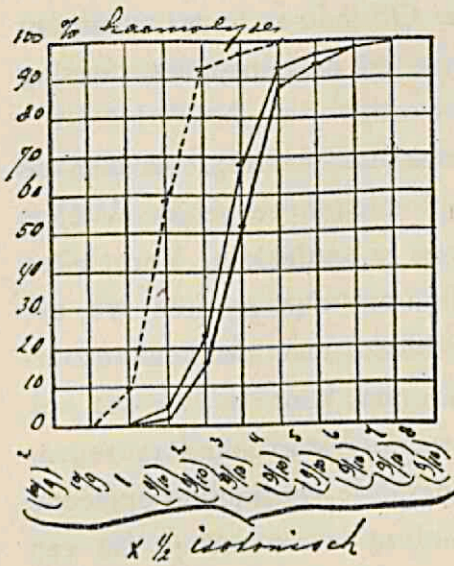


Fig. 5.

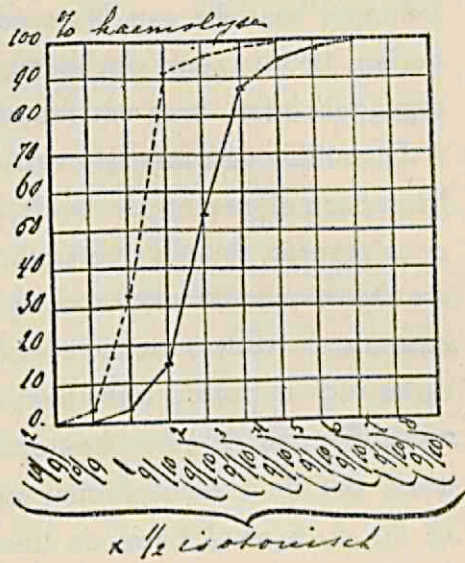


Fig. 6.

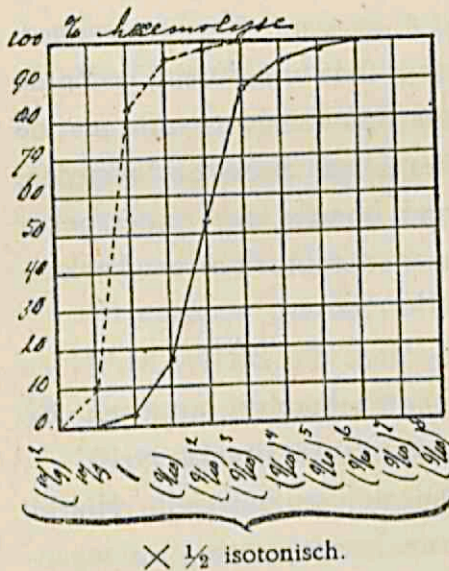
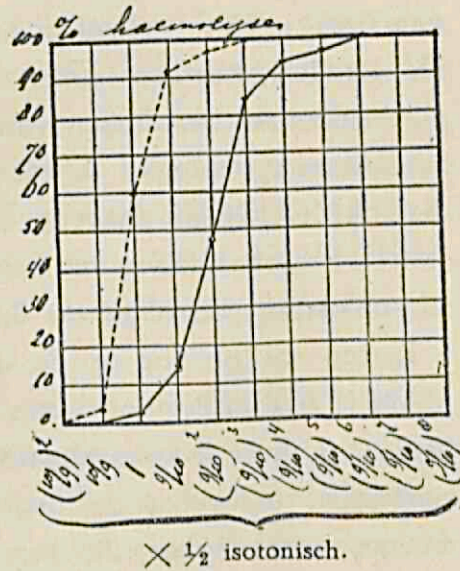


Fig. 7.



$\times \frac{1}{2}$ isotonisch.

$\times \frac{1}{2}$ isotonisch.

..... resistentiecurve bepaald met de Na Cl-oplossing.

———— " " " " phosphaatoplossing.

Men ziet, hoe er ook bij de keukenzoutoplossing een verdeling in drie fracties mogelijk is, maar ook, hoe deze toch minder is uitgesproken dan bij de phosphaatoplossing.

De curven van de eerste oplossing verlopen veel steiler, „vlugger” dan die van de tweede. Of van een ander standpunt bezien, het is, alsof de haemolyse bij de fosphaatoplossing tegengehouden, wat vertraagd wordt.

Ditzelfde verschijnsel valt ook in het oog, als men de beginhaemolyses bij de beide oplossingen vergelijkt. Wel is er in zekeren zin een overeenkomst te ontdekken. Vergelijken we fig. 4 met de drie andere figuren, dan merken we op, dat, als de resistentie van een bloed met de keukenzoutoplossing bepaald, aan den hoogen kant is, we dit ook aantreffen bij de fosphaatoplossing. Maar daar staat tegenover, dat de haemolyse niet bij dezelfde verdunning optreedt. In fig. 5, 6 en 7 komt de haemolyse te voorschijn bij een keukenzoutoplossing van 0.50%, bij de fosphaatoplossing, als haar sterkte overeenkomt met een keukenzoutoplossing van 0.45%. Het verschil in fig. 4 is van denzelfden aard. De getallen daar zijn immers resp. 0.45% en 0.405%. En de juistheid onzer bepalingen van de minimumresistentie met de keukenzoutoplossingen wordt bevestigd door de waarden, die HAMBURGER daarvoor vond. Immers, deze onderzoeker stelt de beginhaemolyse van het menschenbloed bij een keukenzoutoplossing van ongeveer 0.50%.¹⁾

Letten we nu nog op de waarden, die BRINKMAN en VAN PAASSEN voor hun beginhaemolyse opgeven. Bij beiden is het de fosphaatoplossing ter sterkte $9/10 \times 1/2$ isotonisch, in welke de beginhaemolyse optreedt. Hierbij moeten we bedenken, dat hun standaardoplossing, in tegenstelling met de mijne, onverdund bleef. In vergelijking nu met de keukenzoutoplossing van 0.9%, die we ook als isotonisch beschouwen, geeft dan de fosphaatoplossing bij

¹⁾ HAMBURGER. *Osmotischer Druck und Ionenlehre I*, pag. 362.

hen pas een haemolyse in een oplossing, die met een keukenzoutoplossing van 0.405% overeenkomt, Hier is dus het verschil tusschen deze beide oplossingen nog grooter.

Resumeerend, vonden we dus bij de resistentiebepalingen der ongewassen bloedlichaampjes, verricht met de fosphaatoplossingen, het volgende:

- 1°. De resistentiecurve van één en denzelfden persoon is geen constante grootheid, maar is aan wisseling onderhevig. Deze wisseling is van dien aard, dat niet de vorm verandert, maar dat er een verschuiving van de curve in haar geheel, hetzij naar rechts, hetzij naar links, plaats vindt (zie fig. 1).
- 2°. De resistentiecurven van verschillende gezonde personen laten onderling ook een duidelijk verschil zien. Ook hier openbaart dit verschil zich nagenoeg niet in den vorm, maar in de plaats, welke deze curven in de graphische voorstelling innemen. De variatiebreedte, die ik voor deze curven bij 5 gezonde personen vond, is aanmerkelijk grooter dan die, welke VAN PAASSEN bij 10 normale personen vond. (Vergelijk fig. 2 met fig. 3.)
- 3°. Er treedt een duidelijk verschil aan den dag tusschen de resistentiecurven van normale personen, bepaald met de fosphaatoplossingen, en die, welke met de keukenzoutoplossingen bepaald zijn. Dit verschil openbaart zich zoowel in den vorm als in de plaats, die de curven in de graphische voorstelling innemen. De vorm van de keukenzoutcurven is steiler dan die van de fosphaatcurven en de plaats, die de fosphaatcurven innemen ten opzichte van de NaCl curven is aanzienlijk

naar rechts verplaatst. Dit beteekent, dat de keukenzout-oplossing aanmerkelijk eerder haemolyse teweeg brengt dan de phosphaatoplossing.

Ik zal thans nog niet de vraag bespreken, of deze feiten gevolgtrekkingen toelaten. Daarvoor zal het eerst noodig zijn na te gaan, welke onze resultaten met betrekking tot de gewassen bloedlichaampjes zijn.

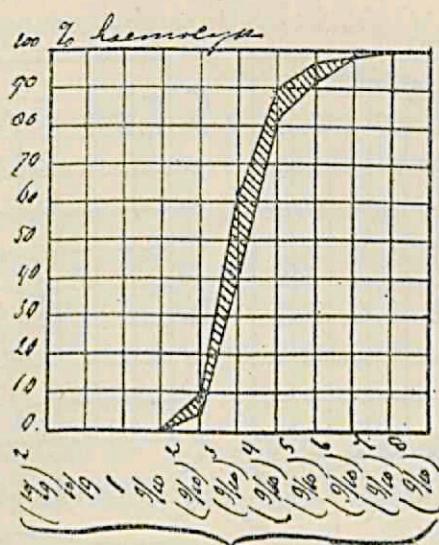
c. De resultaten van het onderzoek der gewassen bloedlichaampjes.

Richten we onze aandacht nog eenmaal op bijlage I en gaan we thans na, wat de reeksen der resistentiebepalingen van de gewassen bloedlichaampjes, bij een en denzelfden persoon een aantal achtereenvolgende dagen verricht, op zichzelf beschouwd en in verband met de resultaten bij de ongewassen bloedlichaampjes verkregen, ons leeren.

Wat de dubbelbepalingen betreft, zij er weer op de afwijkingen gewezen, die bij reeks V aan den dag treden. De beide partners geven hier verschillen te zien, zooals die bij de andere niet voorkomen. Het is evenwel merkwaardig dat bijna de geheele reeks V^2 hogere getallen geeft dan V^1 . Het is, alsof de bloedlichaampjes bij de tweede bepaling spoediger haemolyse gaven dan bij de eerste. In het licht van wat ik later vond is misschien een verklaring van deze afwijking mogelijk.

Verder blijkt, dat ook hier de reeksen, met elkaar vergeleken, ongelijk zijn, hoewel dezelfde regelmaat te ontdekken valt, n.l. dat een kleinere of hogere graad van haemolyse niet beperkt blijft tot een onderdeel van de reeks, maar zich over de geheele linie uitstrekt. Bij de sterkere hypotonische oplossingen komen deze verschillen dan weer niet zoo duidelijk aan den dag.

Fig. 8.

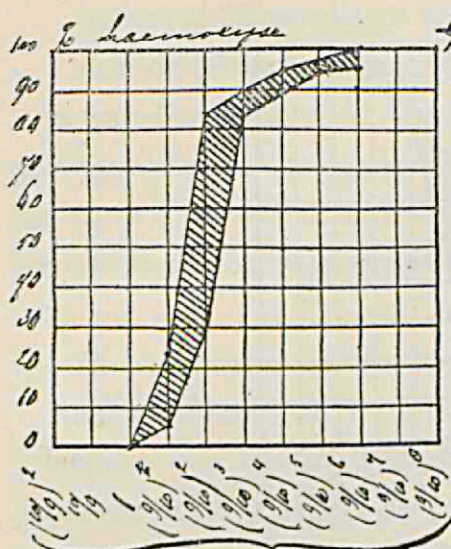


× 1/2 isotonische phosphaatoplossing.

Op deze wijze is het ook weer mogelijk een variatiebreedte voor de gewasschen bloedlichaampjes bij één individu vast te stellen (fig. 8). En deze blijkt ongeveer even groot te zijn als die bij de ongewasschen bloedlichaampjes (fig. 1). Maar tevens valt in fig. 8 op, hoe de resistentiecurven steiler verlopen, iets wat ook aan den dag komt bij vergelijking van deze curven met de variatiebreedten, die VAN PAASSEN voor de ongewasschen en gewasschen roode bloedlichaampjes, door hem bij verschillende personen verricht, opgeeft. (Vergelijk fig. 3 met fig. 9). Alleen het allerlaatste gedeelte der curven van de gewasschen roode bloedlichaampjes is bij VAN PAASSEN minder steil dan dat van de ongewasschen erythrocyten, iets, wat bij mij niet het geval is. (Fig. 8).

De curve, die BRINKMAN voor de gewasschen roode bloedlichaampjes gevonden heeft, is daarentegen minder steil dan die van de ongewasschen erythrocyten (zie fig. 10).

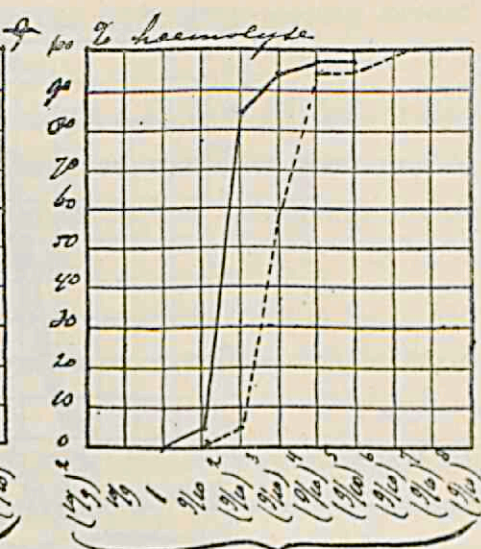
Fig. 9.



× $\frac{1}{2}$ isotonische fosphaatopl.

Variatiebreedte van de resistentiecurven van de gewassen erythrocyten bij 10 personen bepaald, volgens VAN PAASSEN.

Fig. 10.



× $\frac{1}{2}$ isotonische fosphaatopl.

De resistentiecurven volgens BRINKMAN, bij een normaal individu.

— ongewassen bloedlichaampjes.
 gewassen

Evenals bij de ongewassen bloedlichaampjes kunnen we ook bij deze resistentiecurven drie groepen onderscheiden. De eerste groep omvat die reeksen, waarbij de getallen der resistentiecurven in vergelijking met de andere aan den lagen kant zijn. In de tweede groep vallen de reeksen, die juist het tegenovergestelde vertoonen, terwijl de derde groep als schakel tusschen de beide andere is te beschouwen. In onderstaande tabel heb ik de reeksen, al naardat ze tot één van de drie groepen behooren, bij elkaar gerangschikt, met uitzondering van reeks V. Om een vergelijking te maken heb ik daaronder die reeksen der ongewassen bloedlichaampjes geplaatst, die in dit opzicht overeenkomst met de gewassene vertoonen.

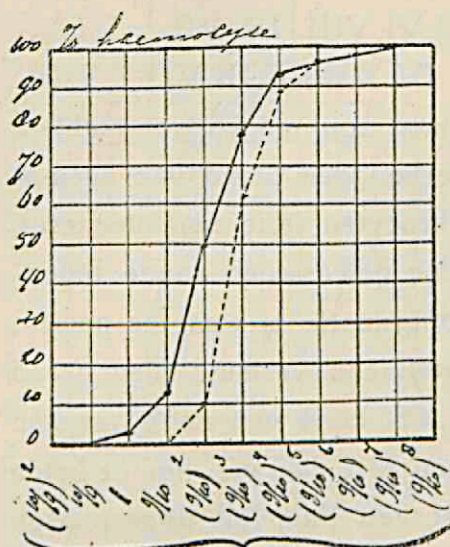
	Groep I	Groep II	Groep III
Gewasschen bloedlichaampjes	II, VI, VIII.	IV, VII.	I, III.
Ongewasschen „	IV, VII.	II, III, VI.	I, VIII.

Deze tabel leert, dat, wat men zou mogen verwachten, niet bewaarheid wordt. Een verhoogden graad van haemolyse bij de ongewasschen erythrocyten treft men niet terug in de overeenkomstige reeks der gewasschen roode bloedlichaampjes. En dezelfde discongruentie is waar te nemen, als de ongewasschen erythrocyten een verminderden graad van haemolyse vertoonen. Ja, zelfs bij 4 van de 7 gevallen n.l. bij de reeksen II, IV, VI en VII zien we, hoe de beide onderdeelen van de reeks juist een duidelijk uitgesproken tegenstelling met elkaar vormen. Slechts de resistentiecurven van reeks I vallen in éézelfde groep.

Een verder verschil met de ongewasschen erythrocyten levert de resistentievermeerdering der gewasschen roode bloedlichaampjes, een feit, dat overeenkomt met wat door BRINKMAN gevonden is. Gaan we evenwel nauwkeuriger onze getallen na, dan blijkt, dat het verschil tusschen de resistentie der gewasschen en ongewasschen erythrocyten, zooals de tabel reeds deed zien, bij eenzelfde individu niet constant is. Het kleinste en grootste verschil, dat ik tusschen de ongewasschen en gewasschen erythrocyten vond, heb ik in de fig. 11 en 12 aangegeven. Tevens leert een vergelijking der fig. 11 en 12 met de fig. 10 en fig. 3 en 9 dat in mijn geval de beginhaemolyse door het wasschen sterker naar rechts is verschoven dan dit bij BRINKMAN en VAN PAASSEN het geval is.

Het meest kenmerkende van wat ons tot nog toe de resistentiecurven der gewasschen roode bloedlichaampjes, bij één persoon op achtereenvolgende dagen verricht, in vergelijking met de tegelijkertijd bepaalde resistentiecurven

Fig. 11.



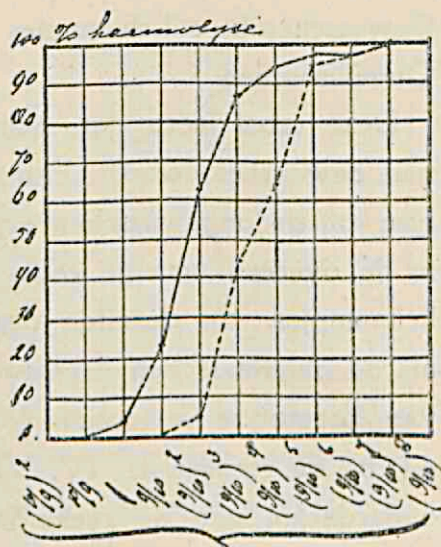
× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Kleinste verschil tusschen de resistentiecurven van de gew. en ongew. bloedlich. bij mij zelf gevonden.

— ongewassen bloedlichaampjes.

..... gewassen

Fig. 12.



× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Grootste verschil tusschen de resistentiecurven van de gew. en ongew. bloedlich. bij mij zelf gevonden.

— ongewassen bloedlichaampjes.

..... gewassen ..

der ongewassen erythrocyten te zien gaven, is dus het volgende.

- 1°. Er treedt door het wassen van de erythrocyten een aanzienlijke verschuiving van de resistentiecurven naar rechts op. Deze verschuiving vond ik, zoowel voor de beginhaemolyse als voor de curve zelf, grooter dan die, welke BRINKMAN en VAN PAASSEN als normaal opgeven. (Vergelijk fig. 11 en 12 met fig. 10, en fig. 3 en 9).
- 2°. De resistentiecurven der gewassen erythrocyten hebben een steiler verloop dan die van de ongewassene.
- 3°. De resistentiecurve der gewassen erythrocyten is evenmin als die van de ongewassene bij een en het zelfde individu een constante grootheid. Ze is op achtereenvolgende dagen aan wisseling onderhevig, niet

wat haar vorm betreft, maar met betrekking tot haar plaats in de graphische voorstelling. Nu eens is ze meer, dan weer minder naar rechts verschoven.

- 4°. Deze wisselingen in de resistentiecurven der gewasschen erythrocyten loopen niet parallel met die van de ongewasschen erythrocyten, zoodat, wanneer de resistentiecurve van de ongewasschen bloedlichaampjes wat meer naar rechts verschoven is, geen overeenkomstige verschuiving naar rechts van de gewasschen bloedlichaampjes valt waar te nemen.
- 5°. Daardoor is het niet mogelijk bij eenzelfde normalen persoon een resistentievermeerdering door het wasschen op te geven, die voor dien persoon constant is. Reeds bij een normaal individu is de grootte van de resistentievermeerdering aan schommelingen onderhevig.

d. Onderzoek naar den invloed van de isotonische phosphaat-oplossing en isotonische keukenzoutoplossing op de bloedlichaampjes.

Voor al het onder sub 2, 4 en 5 genoemde trok mijn aandacht. Voor ik tot verder onderzoek overging, wilde ik daarover klaarheid hebben. Vierderlei verklaring was mogelijk.

In de eerste plaats moest ik er rekening mee houden, dat ik misschien te groote waarde gehecht had aan al die verschillen. We hebben hier immers met biologische en niet met chemische factoren te maken. Bovendien konden onmerkbaar kleine stolseltjes de oorzaak van de afwijkingen zijn. En daarom zou het overweging kunnen verdienen de methode van onderzoek minder subtiel te maken, waardoor er allicht meer overeenstemming tusschen de verschillende resultaten te verkrijgen zou zijn. Maar mijn dubbelbepalingen waren van dien aard, dat de resultaten

van elke reeks voor zichzelf als juist aanvaard mochten worden, zoodat de verschillen, die een vergelijking met de resultaten, op andere dagen verkregen, opleverden, als reëel konden worden erkend.

In de tweede plaats konden de oogenschijnlijk tegenstrijdige uitkomsten bij de gewasschen en ongewasschen erythrocyten toegeschreven worden aan bepaalde biologische invloeden en zou het misschien mogelijk zijn een verklaring daarvan te geven, berustend op de hypothesen van BRINKMAN. Hoe verleidelijk dit echter ook was, niet eerder mocht dit gebeuren, vóórdat de twee andere verklaringsmogelijkheden op hun juistheid onderzocht waren.

Immers de kans bestond ook, dat door het zooveel bewerking kostende wasschen allerlei invloeden van buiten zich hadden doen gelden. Ik had deze echter zooveel mogelijk uitgeschakeld, zooals de beschrijving van mijn wijze van werken laat zien. Vooral op het centrifugeeren lette ik nauwkeurig. Ik deed dit zoo voorzichtig mogelijk steeds volgens hetzelfde schema en gebruikte daarvoor altijd denzelfden tijd.

Toch konden de afwijkingen bij de gewasschen roode bloedlichaampjes nog worden toegeschreven aan het feit, dat de suspensie der roode bloedlichaampjes in de isotonische oplossing vóór de resistentiebepaling in het eene geval meer verdund is dan in het andere, daar het onmogelijk is een suspensie te verkrijgen, die dezelfde „dichtheid” heeft. Om nu toch te controleeren, hoe de „dichtheid” der verschillende suspensies zich op de verschillende dagen verhiel, vergeleek ik steeds de standaardkleur van de ongewasschen erythrocyten, die practisch constant is en die ik op 100% stelde, met die van de gewasschene. Het bleek nu, dat de getallen voor deze laatste schommelden tusschen de 80 en 100%, verschillen, die zich wel niet op de resistentiecurven zullen doen gelden.

Deze gedachte werd bevestigd door het feit, dat reeksen, die een suspensie van gelijke dichtheid bezaten, toch groote verschillen met betrekking tot de resistentiecurven gaven. Zoo bedroeg de standaardkleur voor reeks VII 93%, die voor reeks II 92%, en toch vormen de resistentiecurven de beide uiterste polen van de variatiebreedte.

Tenslotte moest ik de mogelijkheid onder de oogen zien, dat de afwijkende resultaten hun oorsprong te danken hadden aan veranderingen, die de isotonische fosphaat-oplossing bij de erythrocyten zou kunnen teweeg brengen, afgezien van haar invloed gedurende het wasschen. Als deze veronderstelling juist was, mocht ik verwachten, dat het korter of langer in aanraking zijn van de roode bloedlichaampjes met deze vloeistof een duidelijk merkbaar verschil zou opleveren. Tot nog toe had ik in dit opzicht nooit nauwkeurig op den tijd gelet. Nadat ik het bloed in de isotonische fosphaatoplossing opgevangen had, liet ik het in de meeste gevallen zeker niet langer dan een uur, meest ongeveer een half uur, in deze vloeistof verkeereren. Daarna ging ik tot het wasschen over en werkte ik verder volgens het aangegeven schema zonder onderbreking af.

Het kwam er dus thans op aan uit te maken, of de tijd ook een rol speelde bij de verschillen, die de resistentiecurven onderling te zien geven. Ik gebruikte daartoe in het begin weer mijn eigen bloed. Achtereenvolgens werden de resistentiecurven bepaald van de ongewasschen roode bloedlichaampjes, van de bloedlichaampjes, die zoo spoedig mogelijk, nadat het bloed opgevangen was, gewasschen werden en van die, welke korter of langer tijd met de isotonische oplossing in aanraking waren geweest, vóór ze gewasschen werden. De reeksen XIII, XIV en XV hebben op dit onderzoek betrekking.

Reeks XIII.

Concentratie der fosphaatopl.	Graad der haemolyse.		
	a	b	c
$(10/9)^3 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0
$(10/9) \times$ „	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	4%	0	0
$(9/10) \times \frac{1}{2}$ isot.	20 „	0	?
$(9/10)^2 \times \frac{1}{2}$ „	52 „	1%	54%
$(9/10)^3 \times$ „	84 „	34 „	93 „
$(9/10)^4 \times$ „	96 „	79 „	96 „
$(9/10)^5 \times$ „	98 „	93 „	99 „
$(9/10)^6 \times$ „	99 „	99 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „	100 „

a = ongewasschen bl. lich.

b = bl. lich., die direct gewasschen zijn.

c = bl. lich., die $\pm$ na 5 uur gewasschen werden.

Reeks XIV.

Concentratie der fosphaatopl.	Graad der haemolyse.			
	a	b	c	
$(10/9)^2 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0
$(10/9) \times$ „	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	4%	0	0	0
$9/10) \times \frac{1}{2}$ isot.	20 „	0	12%	12%
$(9/10)^2 \times$ „	52 „	4%	77 „	76 „
$(9/10)^3 \times$ „	84 „	19 „	93 „	94 „
$(9/10)^4 \times$ „	96 „	74 „	97 „	99 „
$(9/10)^5 \times$ „	98 „	94 „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$ „	99 „	99 „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „	100 „	100 „

a = ongewasschen bl. lich. (overgenomen van reeks XIII)

b = gewasschen bl. lich., die direct gewasschen zijn.

c = „ „ „ „ na $\pm 3\frac{1}{2}$ uur „ „

Reeks XV.

Concentratie der fosfaatopl.	Graad der haemolyse.		
	a	b	c
$(10/9)^2 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0
$(10/9) \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	4 ⁰ / ₀	0	0
$(9/10) \times \frac{1}{2}$ isot.	15 ..	0	12 ¹ / ₂ ⁰ / ₀
$(9/10)^2 \times$..	55 ..	4 ⁰ / ₀	72 ..
$(9/10)^3 \times$..	80 ..	25 ..	89 ..
$(9/10)^4 \times$..	91 ..	83 ..	99 ..
$(9/10)^5 \times$..	98 ..	94 ..	100 ..
$(9/10)^6 \times$..	99 ..	99 ..	100 ..
$(9/10)^7 \times$..	100 ..	100 ..	100 ..

a = ongewasschen bl. lich.

b = gewasschen bl. lich., die direct gewasschen zijn.

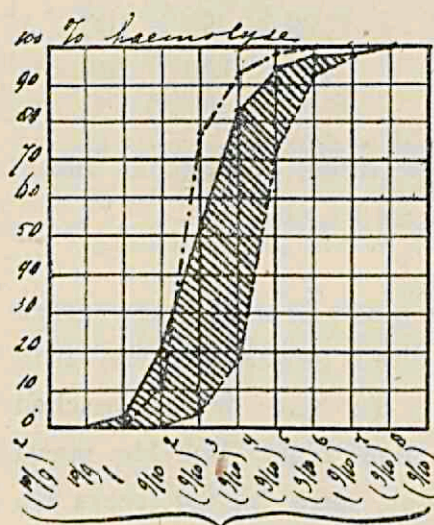
c = gewasschen bl. lich., die na 3¹/₂ uur

Vergelijken we nu in de eerste plaats de resistentiewaarden van de bloedlichaampjes, die direct gewasschen zijn (b in de bovenstaande reeksen) met die van de gewasschen bloedlichaampjes uit bijlage I, dan blijkt, hoe de meest naar rechts verschoven curve uit deze bijlage (reeks II), wat de grootste helft van de reeks betreft, duidelijk links staat t.o.v. de hoogste waarde van de eerstgenoemde groep (reeks XIIIb) iets wat ook, hoewel minder sterk, in de tweede kleinste helft aan den dag treedt.

We mogen dus zeggen, dat het wasschen van de erythrocyten direct, nadat ze in de fosfaatoplossing opgevangen zijn, een nog grootere verschuiving naar rechts te zien geeft dan we tot nog toe hadden gevonden. In fig. 13 heb ik het grootste verschil, dat ik tusschen de resistentiekrommen van de ongewasschen en gewasschen bloedlichaampjes bij

mij zelf aantrof, weergegeven. Vergelijk ik dit verschil met dat, hetwelk BRINKMAN opgeeft (fig. 10), dan ziet men hoe dit verschil bij mij aanmerkelijk grooter is. En ook de afstand, waarbinnen volgens VAN PAASSEN alle resistentiecurven zoowel van de ongewassen als van de gewassen erythrocyten van 10 normale personen vallen (fig. 14), blijft duidelijk kleiner dan die van fig. 13. Slechts in zooverre is er overeenkomst, dat ook bij VAN PAASSEN het verschil tusschen beide curven naar boven toe minder wordt.

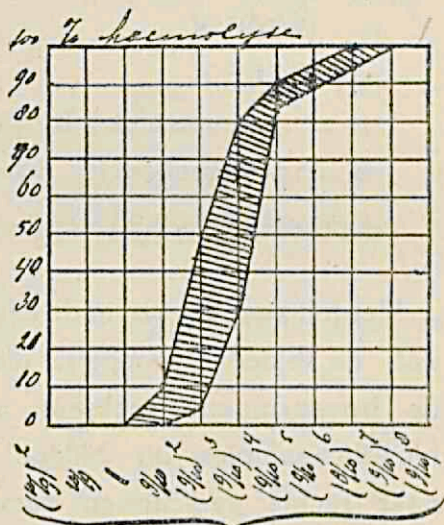
Fig. 13.



× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Gearceerde gedeelte is de grootste resistentievermeerdering door mij bij één persoon gevonden.

Fig. 14.



× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Binnen het gearceerde gedeelte vallen alle resistentiecurven zoowel van de ongew. als van de gew. bloedlich., door VAN PAASSEN bij 10 normale personen gevonden.

— resistentiecurve ongewassen erythrocyten.

..... resistentiecurve erythrocyten, die direct na 't opvangen gewassen zijn.

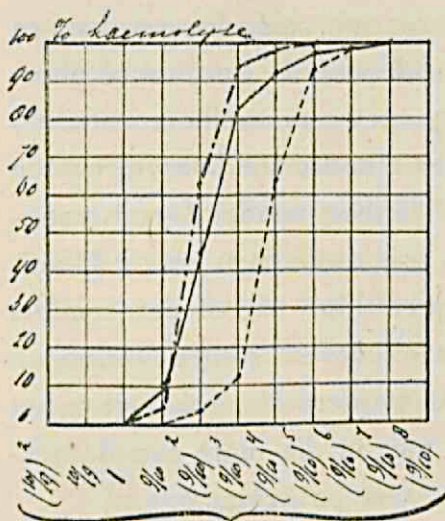
..... resistentiecurve erythrocyten, die na $\pm 3\frac{1}{2}$ uur gewassen zijn.

Deze vergelijkingen manen ons thans reeds tot voorzichtigheid omtrent de conclusies, die BRINKMAN uit zijn proeven trekt. Ik kom daar evenwel later op terug. Want

er valt iets meer op en dat is, hoe de resistentiecurven van de bloedlichaampjes, welke langen tijd met de isotonische vloeistof in aanraking zijn geweest, in vergelijking met die, welke direct gewasschen zijn, een duidelijke verschuiving naar links hebben ondergaan, zóóver zelfs, dat ze de resistentiecurven der ongewasschen erythrocyten kruisen (zie als voorbeeld fig. 13). Alleen de beginhaemolyse blijft hier in vergelijking met de rest der curve iets achter. Ook is het merkwaardig op te merken, hoe de resistentiecurven in het laatste geval weer steiler, minder gekromd verlopen dan die van de direct gewasschen roode bloedlichaampjes.

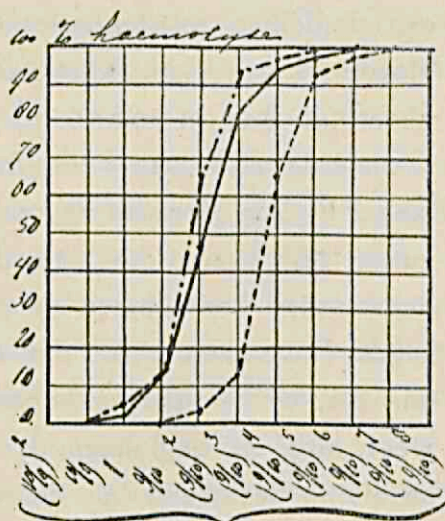
Bij enkele andere personen heb ik nagegaan, of ik hetzelfde verschijnsel kon waarnemen. De verschillende resistentiecurven bij hen verkregen vindt men in de figuren 15—18. De krommen der figuren 15 en 16 zijn van één zelfde persoon, op verschillende dagen bepaald.

Fig. 15.



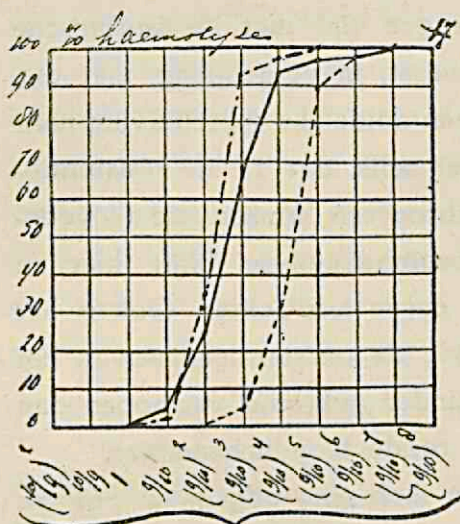
× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Fig. 16.



× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Fig. 17.



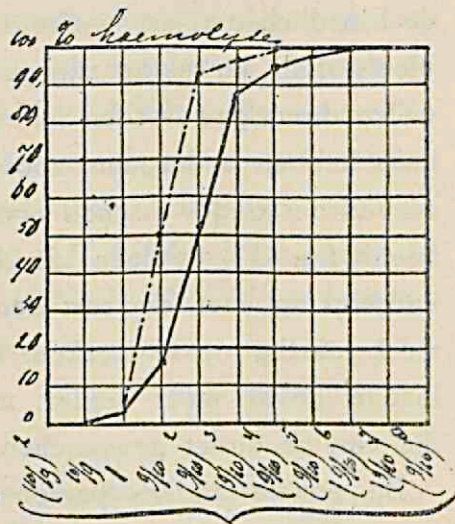
× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

— resistentiecurve ongewassen erythrocyten.

..... resistentiecurve erythrocyten, die direct na opvangen gewassen zijn.

- . - . - . resistentiecurve erythrocyten, die na ± 4 uur gewassen zijn.

Fig 18.



× $\frac{1}{2}$ isotonische phosphaatopl.

Men ziet ook hier dezelfde merkwaardige uitkomsten nl. een duidelijke resistentievermeerdering, als de gewassen bloedlichaampjes zoo kort mogelijk met de isotonische phosphaatoplossing in aanraking zijn geweest, welke resistentievermeerdering echter weer afneemt, naarmate de erythrocyten langer in deze vloeistof verkeer hebben, zoodat de resistentiecurve zelfs vóór die van de ongewassen roode bloedlichaampjes kan komen te liggen (fig. 16) of deze anders snijdt. Bovendien blijkt, dat deze curven steiler verlopen dan die, welke vroeger bepaald werden. En ook hier is het weer, alsof de beginhaemolyse niet in die mate aan de verschuiving deelneemt, als de rest van de kromme.

Toen ik dit gevonden had, wilde ik nagaan, of deze verandering van de resistentiecurven, welke verandering dus

afhankelijk bleek te zijn van den tijd, gedurende welken de erythrocyten met de isotonische phosphaatoplossing in aanraking waren geweest, iets specifieks was voor deze vloeistof of ook voorkwam bij de isotonische keukenzoutoplossing. Hierbij deed zich dus de vraag voor, of de isotonische keukenzoutoplossing, na verloop van denzelfden tijd, een gelijken invloed op de erythrocyten uitoefent als de isotonische phosphaatoplossing. Bij deze laatste immers loopt de eerst optredende resistentievermeerdering na verloop van tijd weer aanmerkelijk terug. Dit kan zijn oorzaak in de vloeistof zelf hebben, doordat ze slechts een oogenblik zuiver physiologisch werkt in het verwijderen van de haemolytische invloeden van het bloed, terwijl ze kort daarop toch ongewenschte veranderingen teweeg brengt. Maar ook is het mogelijk, dat andere oorzaken, onafhankelijk van de oplossing b.v. het afsterven der bloedcellen of fouten in de techniek, het terugloopen van de resistentievermeerdering verklaren. Was dit laatste het geval, dan zou zulk een eigenaardige verschuiving van de resistentiecurven ook met groote waarschijnlijkheid bij de keukenzoutoplossing verwacht mogen worden. En deze resistentievermindering zou dan minstens even groot, zoo niet grooter moeten zijn, dan die, welke tusschen de direct met de phosphaatoplossing gewasschen erythrocyten en die, welke pas na eenigen tijd gewasschen werden, aan den dag treedt, omdat in het eerste geval behalve de aan beide gemeenschappelijke factoren, die de resistentievermindering geven, bovendien de invloed van het Na-ion zich doet gelden.

Om evenwel een vast punt van vergelijking te hebben, was het noodzakelijk te weten, na hoeveel tijd de groote teruggang van de resistentievermeerdering ongeveer tot staan komt. Daartoe liet ik enkele porties bloed van ééNZelfde individu verschillend

lang met de isotonische fosphaatoplossing in aanraking, vóór ik tot het wasschen en de bepaling der resistentiecurven overging. De twee onderstaande tabellen (reeksen XVI en XVII) hebben betrekking op de resultaten, bij mijn eigen bloed verkregen.

Reeks XVI.

Sterkte der fosphaatoplossing.	Graad der haemolyse.			
	a	b	c	d
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	70%	100%	120%
$(9/10)^2 \times$ „	40%	71 „	74 „	76 „
$(9/10)^3 \times$ „	19 „	93 „	92 „	93 „
$(9/10)^4 \times$ „	74 „	97 „	97 „	99 „
$(9/10)^5 \times$ „	94 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$ „	99 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „	100 „	100 „

a = direct gewasschen erythrocyten.

b = erythrocyten, die na verblijf van $1\frac{1}{4}$ uur in isot. phosph. opl. gewasschen werden.

c = erythrocyten, die na verblijf van $2\frac{1}{4}$ uur in isot. phosph. opl. gewasschen werden.

d = erythrocyten, die na verblijf van $3\frac{1}{4}$ uur in isot. phosph. opl. gewasschen werden.

Reeks XVII

Sterkte der fosphaatoplossing.	Graad der haemolyse.			
	a	b	c	d
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0

Sterkte der phosphaatoplossing.	Graad der haemolyse.			
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	7%	10%	12%
$(9/10)^2 \times$ „	4%	57 „	67 „	72 „
$(9/10)^3 \times$ „	25 „	95 „	88 „	89 „
$(9/10)^4 \times$ „	83 „	99 „	99 „	99 „
$(9/10)^5 \times$ „	94 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$ „	99 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „	100 „	100 „

a = direct gewasschen erythrocyten.

b = erythrocyten, die na verblijf van 1 uur in isot. phosph.opl. gewasschen werden.

c = erythrocyten, die na verblijf van $2\frac{1}{4}$ uur in isot. phosph.opl. gewasschen werden.

d = erythrocyten, die na verblijf van $3\frac{1}{4}$ uur in isot. phosph.opl. gewasschen werden.

Hoewel reeks XVIb practisch niet met reeks XVI d verschilt en het den schijn heeft, ook in verband met wat we vroeger zagen, alsof de grootste teruggang plaats heeft in het eerste uur, waarin de erythrocyten met de isotonische phosphaatoplossing in aanraking zijn, lijkt het mij het zekerst met het oog op wat reeks XVII leert en in verband met wat de volgende proeven te zien geven, een tijd van 3 à 4 uur als noodzakelijk te beschouwen voor het bereiken van den stilstand in den teruggang der resistentievermeerdering.

Vervolgens ging ik na, of dit verschijnsel, behalve bij mijn eigen bloed, ook bij dat van anderen voorkwam. De reeksen XVI—XIX hebben betrekking op de resultaten bij dezelfde 4 personen verkregen, wier bloed ik steeds gebruikte.

Reeks XVIII.

Sterkte der	Graad der haemolyse.	
phosphaatopl.	a	b
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	25%	25%
$(9/10)^2 \times$ „	80 „	81 „
$(9/10)^3 \times$ „	95 „	95 „
$(9/10)^4 \times$ „	99 „	99 „
$(9/10)^5 \times$ „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$ „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „

a = bl. lich., gewasschen
na $3\frac{1}{4}$ uur.b = bl. lich., gewasschen
na $4\frac{1}{4}$ uur.

Reeks XIX.

Graad der haemolyse.		
a	b	c
0	0	0
0	0	0
0	4%	5%
4%	60 „	62 „
12 „	93 „	93 „
66 „	99 „	99 „
94 „	100 „	100 „
99 „	100 „	100 „
100 „	100 „	100 „

a = bl. lich., die direct
gewasschen zijn.b = bl. lich., gew. na
 $3\frac{1}{4}$ uur.c = bl. lich., gew. na
 $4\frac{1}{4}$ uur.

Reeks XX.

Sterkte der	Graad der haemolyse.	
phosphaatopl.	a	b
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot.	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	55%	48%
$(9/10)^2 \times$ „	95 „	92 „
$(9/10)^3 \times$ „	99 „	99 „
$(9/10)^4 \times$ „	100 „	100 „
$(9/10)^5 \times$ „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$ „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „	100 „	100 „

a = bl. lich., gewaschen
na $2\frac{3}{4}$ uur.b = bl. lich., gewaschen
na $3\frac{3}{4}$ uur.

Reeks XXI.

Graad der haemolyse.	
a	b
0	0
0	0
0	0
38%	35%
90 „	90 „
98 „	98 „
100 „	100 „
100 „	100 „
100 „	100 „

a = bl. lich., gewasschen
na $3\frac{1}{4}$ uur.b = bl. lich., gewasschen
na $4\frac{1}{4}$ uur.

Zooals men ziet, stemmen de resultaten goed met elkaar overeen en mocht ik dus dezelfde uitkomsten verwachten, onverschillig, of de erythrocyten 3 of wel 4 uur in de isotonische fosphaatoplossing vertoefd hadden vóór ze gewasschen werden.

Thans kon ik, nu ik wist, na hoeveel tijd de teruggang van de resistentievermeerdering ongeveer tot staan komt en de storende factoren ongeveer ophouden te werken, er toe overgaan de gedragingen der erythrocyten onder dezelfde omstandigheden, maar nu met betrekking tot de keukenzoutoplossing te bestudeeren.

Opgrond van wat verschillende onderzoekens (SNAPPER¹⁾, SOMMER²⁾, LIEBERMANN en VON FILLINGER³⁾ en BRINKMAN zelf⁴⁾ gevonden hadden, mocht ik aannemen, dat de resistentie der roode bloedlichaampjes van een normaal individu door het direct wasschen met een keukenzoutoplossing van 0.9 % niet vermeerdert, maar zich hoogstens handhaaft of anders afneemt. Ik heb mij daarom beperkt tot een vergelijking van de resistentiecurven der ongewasschen erythrocyten (die dus ongeveer hetzelfde beeld geven als de resistentiecurven afkomstig van de direct met de isotonische keukenzoutoplossing gewasschen erythrocyten) met de curven, verkregen van die erythrocyten, welke even lang als de andere in de isotonische fosphaatoplossing, in de isotonische keukenzoutoplossing verkeerd hadden. Deze proeven zijn bij dezelfde 4 personen verricht, als bij wie ik reeds de resistentiecurven met de fosphaatoplossing bepaald

¹⁾ *Biochem. Zeitschr.* 43, pag. 266.

²⁾ SOMMER, l. c., pag. 35.

³⁾ *Deutsch Med. Wochenschrift*, 1912, No. 10.

⁴⁾ BRINKMAN. Dissertatie, pag. 12.

had en deze bepalingen met de beide vloeistoffen zijn meest op één dag verricht om de vergelijking zoo zuiver mogelijk te maken.

De resultaten, met de keukenzoutoplossing verkregen, waarbij de resistentie natuurlijk met de hypotonische keukenzoutoplossingen bepaald werden het wasschen der erythrocyten ook steeds driemaal plaats vond, zijn te vinden in de reeksen XXII-XXV.

Reeks XXII.				Reeks XXIII.			
Sterkte d. NaCl-oplossing.		Grd. d. haemolyse.		Graad der haemolyse.			
		a	b	c	a	b	c
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot. NaCl-opl.		2%	14%	5%	10%	26%	19%
$\frac{1}{2}$ isot.	„	31 „	81 „	79 „	81 „	80 „	90 „
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	„	91 „	97 „	99 „	97 „	97 „	95 „
$(9/10)^2 \times$	„	98 „	99 „	99 „	99 „	100 „	99 „
$(9/10)^3 \times$	„	99 „	99 „	99 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^4 \times$	„	100 „	100 „	?	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^5 \times$	„	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$	„	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$	„	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
a = ongew. bloedlich.				a = ongew. bloedlich.			
b = bl.lich., gewasschen na 3½ uur.				b = bloedlich., gew. na 3 uur.			
c = bl.lich., gewasschen na 4½ uur.				c = bloedlich., gew. na 4 uur.			

Reeks XXIV.				Reeks XXV.			
Sterkte d. NaCl-oplossing.		Grd. d. haemolyse.		Graad der haemolyse.			
		a	b	c	a	b	c
$10/9 \times \frac{1}{2}$ isot. NaCl-opl.		0	2%	2%	2½%	4%	4%
$\frac{1}{2}$ isot.	„	10%	12 „	15 „	59 „	57 „	55 „
$9/10 \times \frac{1}{2}$ isot.	„	60 „	73 „	69 „	92 „	95 „	95 „

Sterkte d. NaCl-oplossing. Grd. d. haemolyse.				Graad der haemolyse.		
	a	b	c	a	b	c
$(9/10)^2 \times \frac{1}{2}$ isot. NaCl-opl.	95%	97%	99%	99%	99%	99%
$(9/10)^3 \times$ „ „	99 „	100 „	100 „	100 „	99 „	100 „
$(9/10)^4 \times$ „ „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^5 \times$ „ „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^6 \times$ „ „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
$(9/10)^7 \times$ „ „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „	100 „
	a = ongew. bloedlich.			a = ongew. bloedlich.		
	b = bl. lich., gewasschen			b = bl. lich., gewasschen		
	na $3\frac{1}{2}$ uur.			na $6\frac{1}{2}$ uur.		
	c = bl. lich., gewasschen			c = bl. lich., gewasschen		
	na $4\frac{1}{2}$ uur.			na $7\frac{1}{4}$ uur.		

Hoewel er enkele onregelmatigheden in deze proeven te vinden zijn (zoo b.v. in reeks XXII, waar de graad van haemolyse bij $10/9 \times \frac{1}{2}$ isot. NaCl. opl. in de rij c slechts 50% bedraagt, terwijl die in de rij b 14% is, iets, wat zijn oorzaak vermoedelijk in een fout bij het pipetteeren zal hebben, daar de verdere getallen van beide rijen goed met elkaar overeenstemmen), leeren ons de reeksen met betrekking tot de resistentiecurven toch dit, dat een verblijf van $3\frac{1}{2}$ à $4\frac{1}{2}$ uur van de erythrocyten in de isotonische NaCl-oplossing vóór ze gewasschen worden, nauwelijks eenigen invloed uitoefent. Er treedt wel een geringe neiging tot resistentievermindering aan den dag, maar deze is toch van dien aard, dat men daaraan niet al te veel waarde hechten mag. Vooral reeks XXV is in dit opzicht merkwaardig. 't Verblijf van $7\frac{1}{4}$ uur in de NaCl oplossing bleek zonder eenigen noemenswaardigen invloed op de resistentiecurven te zijn.

Toch is het misschien niet zonder beteekenis hierbij nog

te vermelden, dat wel de minimumresistentie door de bovengenoemde behandeling der erythrocyten een duidelijke verandering onderging. Onderstaande tabel doet dit zien.

Minimumresistenties, met de NaCl oplossingen bepaald, van de reeksen XXII-XXV, respect. van de rijen a en c.

	a	c
Reeks XX	bij 0.50% NaCl.	bij 0.52% NaCl.
Reeks XXI	bij 0.52 „ NaCl.	bij 0.54 „ NaCl.
Reeks XXII	bij 0.46 „ NaCl.	bij 0.50 „ NaCl.
Reeks XXIII	bij 0.50 „ NaCl.	bij 0.52 „ NaCl.

Door wat ik nu gevonden had, mocht ik de waarschijnlijkheid zeer groot achten, dat de veranderingen, die de fosphaatoplossing geeft, toegeschreven moeten worden aan deze oplossing zelf en wel in dien zin, dat deze een niet-physiologischen invloed op roode bloedlichaampjes uitoefent. Want wil men de resistentievermeerdering, die door het wasschen met de isotonische fosphaatoplossing optreedt, physiologisch noemen, dan is de teruggang van de resistentievermeerdering na een langdurig verblijf in deze laatste oplossing, zeker geen sterk bewijs voor het physiologisch-zijn van deze vloeistof, iets wat te meer aan den dag treedt, nu bleek, dat de isotonische keukenzout-oplossing de erythrocyten, wat hun resistentiecurven betreft, gedurende langen tijd ongeveer intact laat.

HOOFDSTUK III.

Overzicht en bespreking der verkregen resultaten.

De slotsom, waartoe we na de proefnemingen, vermeld in hoofdstuk II, meenen te mogen komen, is deze, dat, als we de erythrocyten driemaal met de isotonische fosphaatoplossing wasschen, de resistentie van deze bloedcellen, bepaald met de hypotonische fosphaatoplossingen, duidelijk toeneemt. Maar bij deze conclusie bleek een restrictie te behooren. Het is namelijk niet onverschillig, hoe lang de erythrocyten met de isotonische fosphaatoplossing in aanraking zijn. Hoe korter dit het geval is, dus hoe sneller men tot het wasschen na het opvangen van het bloed overgaat, des te grooter is de resistentievermeerdering. Wacht men daarentegen wat langer met deze bewerking, dan blijkt de resistentievermeerdering lang niet zoo groot te zijn. Dit feit openbaart zich in de verandering van de minimumresistentie, in de veel minder uitgesproken verplaatsing naar rechts van de resistentiecurven in hun geheel en in het steiler verloop dier curven. Zelfs kan men na een paar uur wachten geen resistentievermeerdering met het wasschen meer verkrijgen, maar ziet men, wat het verloop van de curve betreft, juist een lichte resistentievermindering. (Zie fig. 15—18).

In deze feiten meen ik voor een deel de verklaring te moeten vinden van de eigenaardige verschillen, die mijn eerste onderzoekingen over het wasschen der erythrocyten te zien gaven en waarbij ik niet nauwkeurig op den tijd

lette, gedurende welken de bloedcellen in de isotonische fosphaatoplossing vertoefd hadden. (Zie pag. 61 en bijlage I, reeks V). Bij deze onderzoeken zagen we immers, dat, wanneer er bij de ongewasschen bloedlichaampjes sprake is van een resistentie, die in vergelijking met die van de vorige dagen verhoogd is, deze eigenaardigheid geenszins tot uiting komt bij de gewasschen erythrocyten. Integendeel, in dit opzicht viel er in het geheel geen regelmaat te ontdekken bij vergelijking van wat de resistentiecurven van de ongewasschen en die van de gewasschen erythrocyten vertoonden. (Zie pag. 79).

Het ligt voor de hand deze merkwaardige verschijnselen alleen aan de fosphaatoplossing toe te schrijven. Het kan haast niet anders, of deze vloeistof oefent op de resistentie der erythrocyten zulk een verzwakkenden invloed uit, dat daardoor de resistentievermeerdering, die anders na het wasschen aan den dag treedt, te niet gedaan wordt. En deze veronderstelling wordt bevestigd door wat ik bij vergelijking met de keukenzout-oplossing vond. (Zie pag. 95). De isotonische fosphaatoplossing is daarom moeilijk als physiologisch met betrekking tot de erythrocyten te beschouwen. Maar daardoor is het tevens onmogelijk met deze vloeistof een zuiver inzicht in de haemolytische invloeden van het serum te krijgen, gesteld dan, dat de hypothese van BRINKMAN juist is, dat deze resistentievermeerdering het gevolg is van het verwijderen dier invloeden van de membraan der erythrocyten. Steeds zal men bij zijn conclusies rekening moeten houden met het feit, dat de isotonische fosphaatoplossing de resistentievermeerdering kan tegengewerkt hebben, ook al is het wasschen zoo snel mogelijk geschied. Dit blijkt o.a. ook uit de volgende proef.

Naar de opvatting van BRINKMAN mag men verwachten,

dat de roode bloedlichaampjes, die eenmaal gewasschen zijn, een minder groote of althans een even groote verschuiving van de resistentiecurve zullen geven, als die, welke driemaal gewasschen zijn. De haemolytische invloeden van het serum zullen in het eerste geval nog niet zoo volkomen verwijderd zijn, als dit in het laatste geval verondersteld mag worden.

Hieronder geef ik nu de getallen van de roode bloedlichaampjes, die dadelijk na het opvangen resp. eenmaal (a) en driemaal (b) gewasschen zijn. Met het oog op wat nog later ter sprake komt, deel ik hier mede, dat de tijd, gedurende welken de erythrocyten in de hypotonische phosphaatoplossingen vertoefden, voor reeks a = één uur en voor reeks b = $\frac{1}{2}$ uur bedroeg, zoodat de hypotonische oplossingen op de erythrocyten, die driemaal gewasschen waren, korter hebben ingewerkt dan op die, welke eenmaal gewasschen waren.

Reeks XXVI.

			a	b
			Graad der haemolyse.	
10/9	×	$\frac{1}{2}$ isot. phosphaatopl.	0	0
		$\frac{1}{2}$ „ „	0	0
(9/10)	×	$\frac{1}{2}$ „ „	0	0
(9/10) ²	×	„ „	4%	18%
(9/10) ³	×	„ „	36 „	76 „
(9/10) ⁴	×	„ „	90 „	94 „
(9/10) ⁵	×	„ „	95 „	97 „
(9/10) ⁶	×	„ „	98 „	98 „
(9/10) ⁷	×	„ „	99 „	99 „

Zooals men ziet, geeft het eenmaal wasschen een grootere resistentievermeerdering dan het driemaal wasschen, een feit, dat na bovengenoemde proeven verwacht kon worden

en nogmaals den eigenaardigen invloed van de fosphaat-oplossing demonstreert.

Uit mijn proeven meen ik dus in de allereerste plaats te mogen concludeeren, dat de fosphaatoplossing, zoo de hypothese van BRINKMAN juist is, geen zuiver inzicht geeft in het door hem aan de orde gestelde probleem van de vermeerdering der resistentie door het wasschen der erythrocyten. En waar nu de isotonische fosphaatoplossing de erythrocyten niet onaangetast laat, mag men ook verwachten, dat de hypotonische fosphaatoplossingen voor de bepaling der osmotische resistentie minder geschikt zijn. Nog afgezien van het feit, dat deze oplossingen zulk een in het oog vallend verschil met de keukenzout-oplossingen geven, zal de resistentiecurve zelf ook niet constant zijn, maar beïnvloed worden door den tijd, gedurende welken de erythrocyten er mede in aanraking geweest zijn. Dit feit wordt gedemonstreerd door de volgende proef bij de ongewasschen bloedlichaampjes (Reeks XXVII). Met ééNZelfde portie bloed werd een dubbelbepaling gedaan. De techniek was in beide gevallen absoluut gelijk; alleen werd het eerste stel buisjes (a) na 35 minuten gecentrifugeerd; bij het tweede (b) werd dit na 4 uur gedaan, nadat eerst nog door voorzichtig omschudden een gelijkmatige suspensie van de roode bloedlichaampjes in de verschillende buisjes verkregen was. Na het centrifugeeren werd in beide gevallen dadelijk de sterkte der haemolyse bepaald.

Eenzelfde proef deed ik bij de roode bloedlichaampjes, die driemaal gewasschen waren. Het eerste stel buisjes (c) werd gecentrifugeerd na 30 minuten; het tweede stel (d) na 2 uur 40 minuten (Reeks XXVIII).

		Reeks XXVII.		Reeks XXVIII.	
		Graad		Graad	
Concentratie der fosphaatopl.		d. haemolyse.		d. haemolyse.	
		a	b	c	d
10/9	$\times \frac{1}{2}$ isot.	0	?	0	0
	$\frac{1}{2}$ isot.	10%	50%	0	0
9/10	$\times$ „	16 „	35 „	0	220%
(9/10) ²	$\times$ „	46 „	84 „	180%	86 „
(9/10) ³	$\times$ „	80 „	93 „	76 „	96 „
(9/10) ⁴	$\times$ „	90 „	98 „	94 „	98 „
(9/10) ⁵	$\times$ „	95 „	99 „	97 „	100 „
(9/10) ⁶	$\times$ „	98 „	100 „	98 „	100 „
(9/10) ⁷	$\times$ „	99 „	100 „	99 „	100 „

Uit beide gevallen is duidelijk, hoe ook de resistentiecurve afhankelijk is van den tijd, gedurende welken de erythrocyten met de hypotonische fosphaatoplossingen in aanraking zijn. En dat dit feit niet aan een te lang staan, maar aan de fosphaatoplossing moet toegeschreven worden, mag hieruit blijken, dat bij de hypotonische keukenzoutoplossingen iets dergelijks niet werd gevonden. SOMMER¹⁾ o.a. heeft nog eens nagegaan den invloed, dien de tijd, gedurende welken men de roode bloedlichaampjes met de hypotonische keukenzoutoplossingen in aanraking brengt, op de resistentie uitoefent. De resultaten, die hij daarbij verkreeg, stemden volkomen met die van vroegere onderzoekers overeen. Hij vond n.l., dat de temperatuur kan varieeren van 0° tot 37°, mits men de oplossing niet langer dan eenige uren laat staan. Bij langer duur der inwerking is het gewenscht niet boven kamertemperatuur te gaan.

¹⁾ SOMMER, l.c., pag. 35.

Dit gedrag van de hypotonische fosphaatoplossingen zou de reden kunnen verklaren, waarom den eenen dag de resistentiecurve in haar geheel wat aan den hoogen kant was, den anderen dag daarentegen verlaagd (zie bijlage I).

Op de vraag, waaraan die resistentie-verzwakkende werking van de fosphaatoplossing te danken is, moet ik het antwoord schuldig blijven. Dit eischt een nauwkeurige analyse van de chemisch-fysische processen, die tusschen de cellen en de hen omringende vloeistof plaats vinden. Wel drong zich tijdens het onderzoek de vraag voortdurend bij mij op, of de resistentie-vermeerderende invloed van de fosphaatoplossing wel alleen te danken is aan het afwasschen der haemolytische stoffen. Telkens kreeg ik den indruk, alsof de fosphaatoplossing in haar eerste aanraking met de erythrocyten de resistentie van deze verhoogt, onafhankelijk van het wasschen. 't Is alsof ze de membraan in het eerst verhardt, maar deze later door processen, die langzamer werken, weer verweekt. Enkele feiten en overwegingen doen n.l. de verklaring van de resistentievermeerdering door BRINKMAN met betrekking tot de fosphaatoplossing in twijfel trekken.

Vergelijken we allereerst de resistentievermeerdering, die BRINKMAN met zijn geëquilibreerde zoutoplossing verkreeg met die, welke wij bij de fosphaatoplossing waarnamen. BRINKMAN meent op grond van theoretische en experimenteele gronden, dat de eerstgenoemde oplossing zoodanig physiologisch is, dat zij indifferent voor de membraan der erythrocyten is. Een resistentievermeerdering, door deze vloeistof tot stand gebracht, kan dus eerder als physiologisch beschouwd worden dan die, verkregen met de fosphaatoplossing, welke van de eerstgenoemde weer is afgeleid. Het is dus van belang de uitkomsten van deze beide vloeistoffen met elkaar te vergelijken. Nu geeft BRINKMAN

slechts één voorbeeld van de resistentievermeerdering ten gevolge van de geëquilibreerde zoutoplossing. Maar waar hij dit als type aangeeft, mag men verwachten, dat dit voorbeeld als beeld van het normale beschouwd kan worden.

Om een vergelijking van de geëquilibreerde zoutoplossing met de fosphaatoplossing mogelijk te maken, stellen we de osmotischekracht van de beide isotonische oplossingen op 100%. We kunnen dan de osmotische kracht van die verdunningen, waarbij de beginhaemolyse optreedt, in procenten van de oorspronkelijke isotonische vloeistof uitdrukken.

Als waarden, met de geëquilibreerde zoutoplossing door BRINKMAN verkregen, berekende ik:

beginhaemolyse ongewassen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 43% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof.

beginhaemolyse gewassen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 37% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof.

Voor de fosphaatoplossing vond ik in de 4 gevallen (fig. 15—18).

- | | | |
|-----|---|---|
| I. | { | beginhaemolyse ongewassen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 50% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| | { | beginhaemolyse gewassen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 40½% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| II. | { | beginhaemolyse ongewassen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 45% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| | { | beginhaemolyse gewassen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 40½% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |

- | | | |
|------|---|---|
| III. | { | beginhaemolyse ongewasschen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 50% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof.
beginhaemolyse gewasschen roode bl.lich, bij een verdunning, overeenkomend met 40½% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| IV. | { | beginhaemolyse ongewasschen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 45% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof.
beginhaemolyse gewasschen roode bl.lich. bij een verdunning, overeenkomend met 36½% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |

Slechts in één geval (II) was de resistentievermeerdering, met behulp van de fosphaatoplossing verkregen, kleiner dan die, behoorend bij de geëquilibreerde zoutoplossing. Voor de rest wijzen alle getallen een duidelijk sterkere resistentievermeerdering door de fosphaatoplossing aan. En dit feit treft daarom, omdat we, indien we de resistentievermeerdering, door de fosphaatoplossing teweeggebracht, beschouwen als gevolg van het afwasschen der haemolytische invloeden, alle reden hadden te verwachten, dat de resistentievermeerdering hoogstens gelijk, maar in elk geval niet in 3 van de 4 gevallen grooter zou zijn dan die als voorbeeld bij de geëquilibreerde zoutoplossing gegeven, daar onze proeven geleerd hebben, dat de fosphaatoplossing de resistentievermeerdering tegenwerkt.

Het is dus opvallend, dat we de resistentievermeerdering, met de fosphaatoplossing verkregen, grooter vonden dan die, welke BRINKMAN voor zijn geëquilibreerde oplossing opgeeft.

In de tweede plaats treft het groote verschil, dat de keukenzout-oplossingen in vergelijking met de in gelijke mate

verdunde fosphaatoplossingen bij de ongewassen erythrocyten te zien geven. Eén blik op de fig. 4 - 7 doet twee dingen aan den dag komen. Ten eerste treedt de minimumresistentie der erythrocyten, met de NaCl-oplossingen bepaald, veel eerder op dan bij de fosphaatoplossingen. Stel ik de osmotische kracht van de beide isotonische oplossingen weer op 100 %, dan krijg ik achtereenvolgens de volgende getallen.

- | | | |
|------|---|--|
| I. | { | beginhaemolyse bij een NaCl-oplossing, overeenkomend met 50% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| | | beginhaemolyse bij een fosphaatoplossing, overeenkomend met 45% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| II. | { | beginhaemolyse bij een NaCl-oplossing, overeenkomend met 55% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| | | beginhaemolyse bij een fosphaatoplossing, overeenkomend met 50% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| III. | { | beginhaemolyse bij een NaCl-oplossing, overeenkomend met 55% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| | | beginhaemolyse bij een fosphaatoplossing, overeenkomend met 50% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| IV. | { | beginhaemolyse bij een NaCl-oplossing, overeenkomend met 55% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |
| | | beginhaemolyse bij een fosphaatoplossing, overeenkomend met 50% van de osmotische kracht van de isot. vloeistof. |

Ten tweede blijkt, dat de NaCl-curven steiler verlopen dan de fosphaatcurven.

De vraag doet zich nu hierbij voor, of dit verschil, dat zoo duidelijk uitgesproken is, uitsluitend gevolg is van de lyotropische werking van het Na-ion, waardoor de haemoglobine eerder uittreedt. Het moge waar zijn, dat het Ca de werking van het Na-ion opheft en dat inderdaad met de geëquilibreerde oplossing de verhoudingen zuiverder gesteld zijn dan dit met de NaCl-oplossing het geval is, voor wat de fosphaat-oplossing betreft is dit principe niet verwerkelijk.

Terwijl in de verschillende verdunningen van de geëquilibreerde zoutoplossing het Ca-gehalte in alle omstandigheden bij en na de haemolyse door het bufferstelsel op gelijke hoogte wordt gehouden, waardoor nooit een physiologisch te-veel aan Ca-ionen in de vloeistof ontstaat, dat de haemolyse zou kunnen remmen, bevinden zich in de fosphaatoplossing noch zulk een experimenteel bewezen antagonisme van ionen noch zulk een bufferstelsel voor het Ca en staat het diensgevolge in dit opzicht op gelijke lijn met de NaCl-oplossing. De vraag dringt zich hier dan ook weer op: is de vertraagde haemolyse en de S vorm van de resistentiecurven, met de fosphaatoplossing verkregen, te danken aan dezelfde processen als bij de geëquilibreerde zoutoplossing of is hier een haemolyse-vertragende invloed van den kant van de fosphaatoplossing in het spel. In verband hiermee moet gewezen worden op het merkwaardige feit, dat de isotonische fosphaatoplossing een Δ van -0.46° heeft. Handhaaft men nog de oude theorie van den osmotischen druk en stelt men den osmotischen druk van twee verdunde oplossingen aan elkaar gelijk, zoo de vriespuntsverlaging van beide gelijk is, dan zijn bloedserum, dat zijn vriespuntsverlaging bij -0.56° heeft en „isotonische” fosphaatoplossing niet isotonisch, maar

is deze laatste vloeistof hypotonisch ten opzichte van het bloedserum. Maar dan verwondert het, hoe deze hypotonische vloeistof pas haemolyse geeft bij een verdunning, die bij de NaCl-oplossing van 0.9%, wier oorspronkelijke osmotische druk geheel gelijk is aan die van het serum, reeds lang haemolyse gegeven heeft. En ook hier ligt het voor de hand te denken aan de mogelijkheid, dat deze eigenaardigheid van de fosphaatoplossing verklaard moet worden uit een haemolyse-vertragenden invloed.

Door de volgende proef heb ik getracht na te gaan, of inderdaad de isotonische fosphaatoplossing een vertragenden invloed op de haemolyse uitoefent, zonder dat de eventuele vermeerdering der resistentie verklaard kan worden als gevolg van het afwasschen der haemolytische invloeden. Ik ging daarbij als volgt te werk. Eerst ving ik bloed op voor de bepaling van de resistentiecurve der ongewasschen bloedlichaampjes. Daarna ving ik van hetzelfde bloed 20 druppels in het paraffineblokje op, waarin zich reeds 5 druppels van de isotonische fosphaatoplossing bevonden. Om een gelijkmatige suspensie te verkrijgen, roerde ik direct daarop met de pipet dit mengsel om, waarna ik oogenblikkelijk telkens 0.020 cc. van dit mengsel bij de gebruikelijke hoeveelheden hypotonische oplossingen voegde. Vervolgens mengde ik op dezelfde wijze 10 druppels bloed met 10 druppels isotonische fosphaatoplossing. Omdat nu het bloed tot op de helft verdund was en de intensiteit van de roode kleur in de verschillende buisjes, waar haemolyse op zou treden, derhalve aanmerkelijk zwakker zou zijn in vergelijking met de vorige proeven, waarbij het bloed niet of nauwelijks verdund was, en waarbij ik 0.020 cc. van dit mengsel nam, mat ik thans telkens 0.040 cc. af, welke hoeveelheid dan bij de gewone hoeveelheid hypotonische oplossing

gevoegd werd, n.l. 2 cc.. De standaardkleur werd natuurlijk ook op overeenkomstige wijze bereid.

Ten slotte ving ik 10 druppels bloed in 15 druppels isotonische fosphaatoplossing op, welk mengsel op dezelfde wijze behandeld werd als het vorige.

De waarden van de verschillende resistentiecurven vindt men hieronder (Reeks XXIX), evenals de resistentiecurven van het onvermengde bloed en dat wat met 15 druppels fosphaatoplossing gemengd werd (fig. 19). Voor alle 4 de gevallen bedroeg de tijd, gedurende welken de erythrocyten in aanraking waren met de hypotonische fosphaatoplossingen, een half uur.

Reeks XXIX.

Sterkte der fosphaatopl.	Graad der haemolyse.			
	a	b	c	d
10/9 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0
9/10 $\times \frac{1}{2}$ isot.	16%	16%	7%	7%
(9/10) ² $\times$..	45 ..	47 ..	18 ..	16 ..
(9/10) ³ $\times$..	76 ..	79 ..	57 ..	57 ..
(9/10) ⁴ $\times$..	92 ..	92 ..	81 ..	85 ..
(9/10) ⁵ $\times$..	95 ..	95 ..	93 ..	95 ..
(9/10) ⁶ $\times$..	99 ..	97 ..	98 ..	96 ..
(9/10) ⁷ $\times$..	99 ..	99 ..	99 ..	99 ..
(9/10) ⁸ $\times$..	100 ..	100 ..	100 ..	100 ..

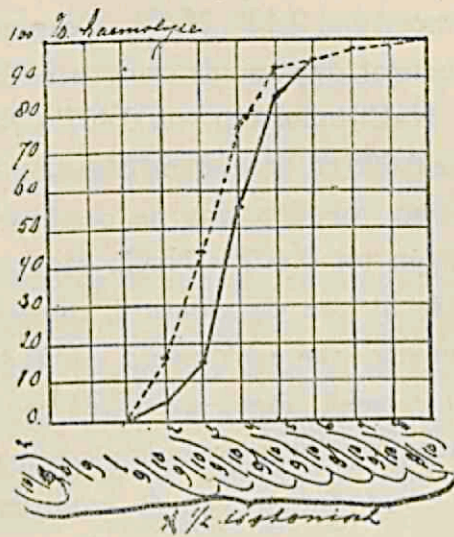
a geeft de waarden aan van het onvermengde bloed.

b geeft de waarden aan van 10 dr. bloed met 5 dr. fosphaatoplossing vermengd.

c geeft de waarden aan van 10 dr. bloed met 10 dr. fosphaatoplossing vermengd.

d geeft de waarden aan van 10 dr. bloed met 15 dr. fosphaatoplossing vermengd.

Fig. 19.



..... curve van het onvermengde bloed.

— curve van 10 dr. bloed met 15 dr. phosphaatoplossing vermengd.

Men ziet, hoe in de beide laatste gevallen (c en d) de getallen duidelijk lager zijn dan in de beide eerste (a en b). En deze verschillen vallen ver buiten de proeffout.

Nu kan men tegen de conclusie, dat dit verschil een gevolg is van den resistentie-vermeerderenden invloed van de isotonische phosphaatoplossing het volgende bezwaar inbrengen. In de beide laatste gevallen ondergaan de verschillende hypotonische oplossingen na het inbrengen van het bloedmengsel meer veranderingen dan in de beide eerste gevallen. Immers, bij de 2 cc. hypotonische vloeistof werd in het 3e geval 0.040 cc. gevoegd, waarvan ± 0.030 cc. isotonische vloeistof was. Dit zal de sterkte van de oplossing iets veranderen, de vloeistof zal nl. minder hypotonisch worden, waardoor de haemolyse niet zoo sterk zal zijn als in de beide eerste gevallen.

Toch kunnen de verschillen niet op deze wijze verklaard worden. De verandering in den osmotischen druk van de vloeistof is slechts heel klein. Nemen we als voorbeeld een

hypotonische fosphaatoplossing, die een osmotische kracht heeft overeenkomend met 0.40% NaCl. Voegen we daar nu bij 0.030 cc. isot. vloeistof, dan zou de osmotische kracht overeenkomen met een NaCl-oplossing van 0.407% NaCl. In andere gevallen, waar we 0.020 cc. onverdund bloed bij 2 cc. van bovengenoemde oplossing voegden, zou de osmotische kracht van 0.40% NaCl stijgen tot 0.402% NaCl. Het verschil tusschen de osmotische kracht van de vloeistof, overeenkomend met 0.407% NaCl en die, overeenkomend met 0.402% NaCl bedraagt 1% en dit verschil mogen we tot de proeffout rekenen.

Maar nog afgezien hiervan, ook uit een ander oogpunt is deze geringe verandering van de hypotonische vloeistof niet in staat het verschil te verklaren. Zoo geven, zooals uit reeks XXIX blijkt, de hypotonische oplossingen van $9/10 \times \frac{1}{2}$ isot. fosphaatoplossing (overeenkomend met een sterkte van 0.405% NaCl) in de beide eerste gevallen denzelfden graad van haemolyse als de hypotonische oplossingen van $(9/10)^2 \times \frac{1}{2}$ isot. fosphaatoplossing (overeenkomend met een sterkte van 0.365% NaCl) in de beide laatste. Het verschil in osmotische kracht van de beide oplossingen bedraagt 10% en dus kunnen de eigenaardige uitkomsten, die ik met het onverdunde en verdunde bloed kreeg, moeilijk verklaard worden uit een verschil in osmotische kracht, die ontstaan zou na toevoeging van respect. 0.020 cc. onverdund en 0.04 cc. verdund bloed bij oplossingen van oorspronkelijk gelijke sterkte, welk verschil slechts 1% bedraagt.

Toch moet toegegeven worden, dat deze proef niet beslissend is, daar de bovengenoemde verschillen nog een gevolg zouden kunnen zijn van een gedeeltelijk afwasschen der haemolytische invloeden, hoewel dit tamelijk onwaarschijnlijk is. Meer wijst deze proef in de richting van den resistentievermeerderenden invloed van de isotonische fosphaatoplossing.

SAMENVATTING.

De bepaling van de osmotische resistentie der roode bloedlichaampjes met de hypotonische keukenzout-oplossingen heeft in de kliniek tot nu toe nòch ter verklaring van pathologische processen nòch als diagnostisch hulpmiddel geheel kunnen voldoen. Daarom trokken de onderzoeken van BRINKMAN onze aandacht, die de keukenzout-oplossing als ongeschikt voor deze bepaling verwierp en een nieuwe oplossing aangaf, welke samengesteld was overeenkomstig de nieuwere physisch-chemische opvattingen. Doordat in de keukenzout-oplossing slechts één kation en wel het Na-ion aanwezig is, dat het opnemen van water door de membraan bevordert, is deze oplossing niet indifferent tegenover het bloedlichaampje zelf. Een zuivere bepaling van de osmotische resistentie zou daardoor onmogelijk zijn.

In de nieuwe oplossing is daarentegen de werking van het Na-ion door de aanwezigheid van zijn antagonist, het Ca-ion, opgeheven, terwijl door de inschakeling van een bufferstelsel de concentratie der Ca-ionen ook gedurende de haemolyse constant blijft. Bovendien wordt door dit bufferstelsel de concentratie der H-ionen ongeveer gelijk aan die van het bloed gehouden. Daardoor zou deze oplossing geen storenden invloed op de erythrocyten uitoefenen en derhalve bij uitstek geschikt zijn tot een zuivere bepaling van den osmotischen weerstand.

Daar evenwel het bewaren en het gebruik van deze oplossing in de kliniek groote bezwaren met zich meebrachten, zocht

BRINKMAN naar een andere oplossing, die voor klinische doeleinden beter dienst kon doen en als zoodanig gaf hij een mengsel aan van primair en secundair fosphaat, de z.g. fosphaatoplossing.

Het meest merkwaardige, dat BRINKMAN waarnam, was de vermeerdering der resistentie door het wasschen der erythrocyten met deze oplossingen. Deze vermeerdering schreef hij toe aan het verwijderen van haemolytische stoffen, die, oorspronkelijk in het bloedserum aanwezig, door de membraan waren geabsorbeerd.

Mijn bedoeling is geweest na te gaan, of en in hoeverre de fosphaatoplossing voor de kliniek van beteekenis was.

Ik ben daarbij tot de volgende conclusies gekomen.

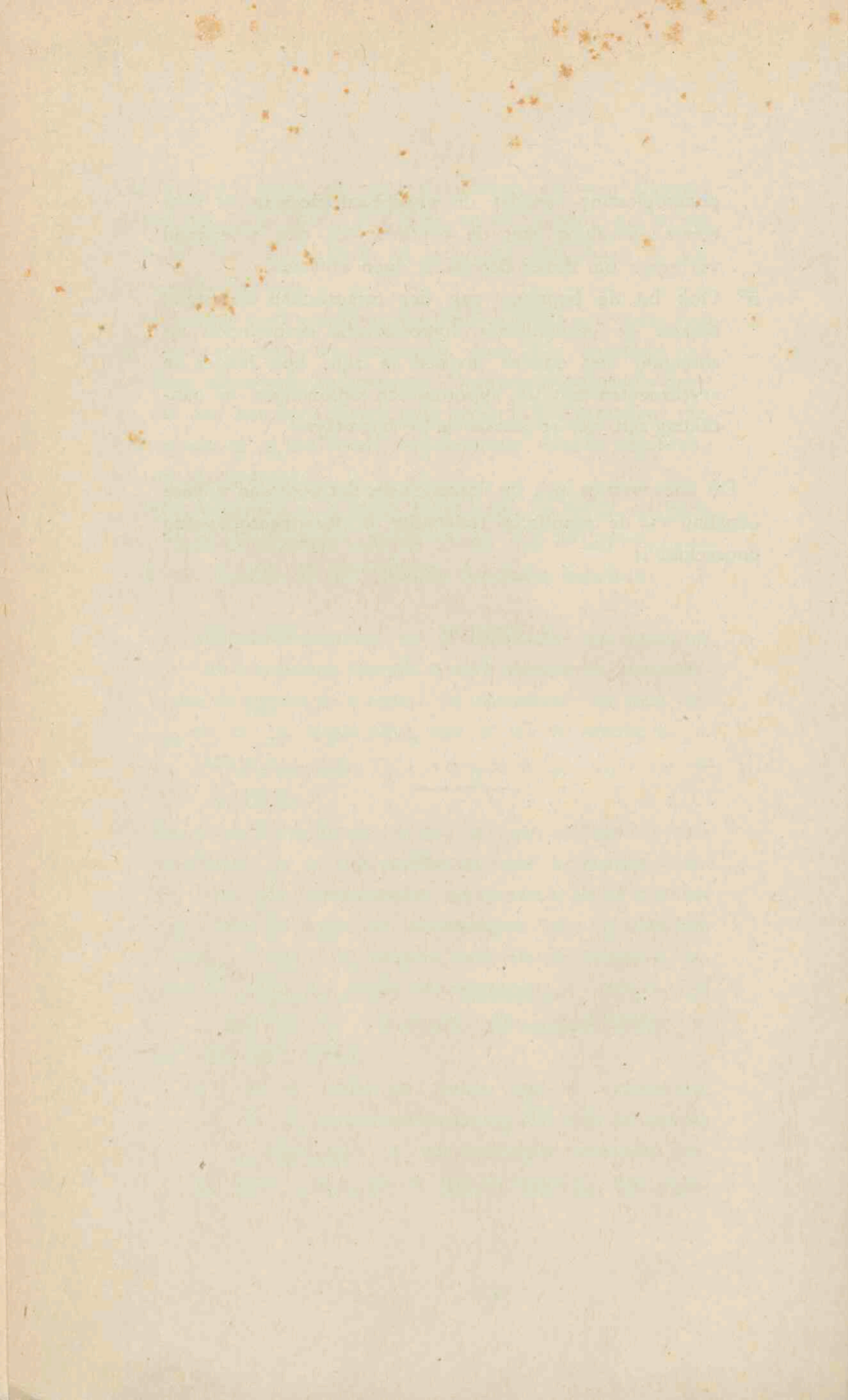
- 1°. De fosphaatoplossing, die BRINKMAN als isotonisch met het bloedserum opgeeft, is iets hypertonisch. Haematocritische bepalingen leerden, dat verdunning van deze oplossing in een verhouding van 90 tot 95 noodig is om de bloedlichaampjes hun oorspronkelijk volumen te doen behouden.
- 2°. De fosphaatoplossing is niet als physiologisch te beschouwen; ze is niet indifferent voor de erythrocyten. De resistentievermeerdering, die optreedt, als de erythrocyten direct, nadat ze opgevangen zijn, gewasschen worden, is niet meer aantoonbaar, als dit wasschen geschiedt, nadat de roode bloedlichaampjes eenigen tijd (1—3 uur) met de isotonische fosphaatoplossing in aanraking zijn geweest.

Zelfs is er gegronde reden om te vermoeden, dat ook de resistentievermeerdering zelf niet het gevolg is van het afwasschen der haemolytische invloeden van de membraan, maar van de directe werking der phos-

phaatoplossing, zoodat de fosphaatoplossing in haar eerste aanraking met de erythrocyten den weerstand verhoogt, om dezen daarna te doen afnemen.

- 3°. Ook bij de bepaling van den osmotischen weerstand blijken de verschillende hypotonische oplossingen als zoodanig niet zonder invloed te zijn; hoe langer de erythrocyten met de hypotonische oplossingen in aanraking zijn, des te sterker is de haemolyse.

Dit alles wettigt m. i. de slotconclusie, dat voor een zuivere bepaling van de osmotische resistentie de fosphaatoplossing ongeschikt is.



BIJLAGE.

Dubbelbepalingen, gemaakt op enkele achtereenvolgende dagen ter vaststelling van den graad der haemolyse van ongewassen en gewassen normale roode bloedlichaampjes van één zelfden persoon met behulp van hypotonische phosphaat-oplossingen.

STERKTE DER HAEMOLYSE.

A. Ongewassen bloedlichaampjes.									
Concentratie der phosphaatoplossing.	I		II		III		IV		
10/9 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	2%	4%	4%	4%	5%	4%	4 $\frac{1}{2}$ %	2 $\frac{1}{2}$ %	
9/10 $\times \frac{1}{2}$ isot.	14 "	17 "	21 "	26 "	20 "	19 "	12 $\frac{1}{2}$ "	16 "	
(9/10) ² $\times$ "	56 "	59 "	60 "	60 "	62 "	62 "	56 "	52 "	
(9/10) ³ $\times$ "	87 "	85 "	88 "	85 "	87 "	89 "	80 "	81 "	
(9/10) ⁴ $\times$ "	95 "	95 "	95 "	95 "	95 "	95 "	93 "	91 "	
(9/10) ⁵ $\times$ "	98 "	98 "	99 "	99 "	97 "	98 "	98 "	98 "	
(9/10) ⁶ $\times$ "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	
(9/10) ⁷ $\times$ "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	

B. Gewassen bloedlichaampjes.									
10/9 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9/10 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(9/10) ² $\times$ "	5%	9%	7 $\frac{1}{2}$ %	5%	5%	4%	8%	11%	
(9/10) ³ $\times$ "	54 "	57 "	44 "	42 "	51 "	48 "	57 "	59 "	
(9/10) ⁴ $\times$ "	86 "	86 "	87 $\frac{1}{2}$ "	86 "	88 "	88 "	90 "	93 "	
(9/10) ⁵ $\times$ "	99 "	99 "	98 "	98 "	99 "	95 "	99 "	99 "	
(9/10) ⁶ $\times$ "	100 "	100 "	99 "	99 "	100 "	99 "	100 "	99 "	
(9/10) ⁷ $\times$ "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	

STERKTE DER HAEMOLYSE.

A. Ongewassen bloedlichaampjes.									
Concentratie der phosphaatoplossing.	V		VI		VII		VIII		
10/9 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	2%	3%	?	4%	1%	3%	4%	2 $\frac{1}{2}$ %	
9/10 $\times \frac{1}{2}$ isot.	12 $\frac{1}{2}$ "	27 $\frac{1}{2}$ "	22%	22 "	11 "	13 "	14 "	17 "	
(9/10) ² $\times$ "	50 "	57 "	62 "	61 "	49 "	52 "	55 "	54 "	
(9/10) ³ $\times$ "	81 "	84 "	89 "	86 "	78 "	79 "	82 "	82 "	
(9/10) ⁴ $\times$ "	93 "	95 "	96 "	95 "	92 "	93 "	94 "	94 "	
(9/10) ⁵ $\times$ "	98 "	98 "	99 "	99 "	98 "	98 "	98 "	98 "	
(9/10) ⁶ $\times$ "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	
(9/10) ⁷ $\times$ "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	

B. Gewassen bloedlichaampjes.									
10/9 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9/10 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	2%	0	0	0	0	0	0	0
(9/10) ² $\times$ "	7 $\frac{1}{2}$ %	15 "	5%	5%	11%	9%	5%	5%	
(9/10) ³ $\times$ "	47 "	59 "	44 "	47 "	63 "	61 "	46 "	43 "	
(9/10) ⁴ $\times$ "	86 "	85 "	85 "	86 "	91 "	90 "	83 "	83 "	
(9/10) ⁵ $\times$ "	99 "	99 "	97 "	97 "	98 "	98 "	92 "	94 "	
(9/10) ⁶ $\times$ "	100 "	100 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	99 "	
(9/10) ⁷ $\times$ "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	100 "	

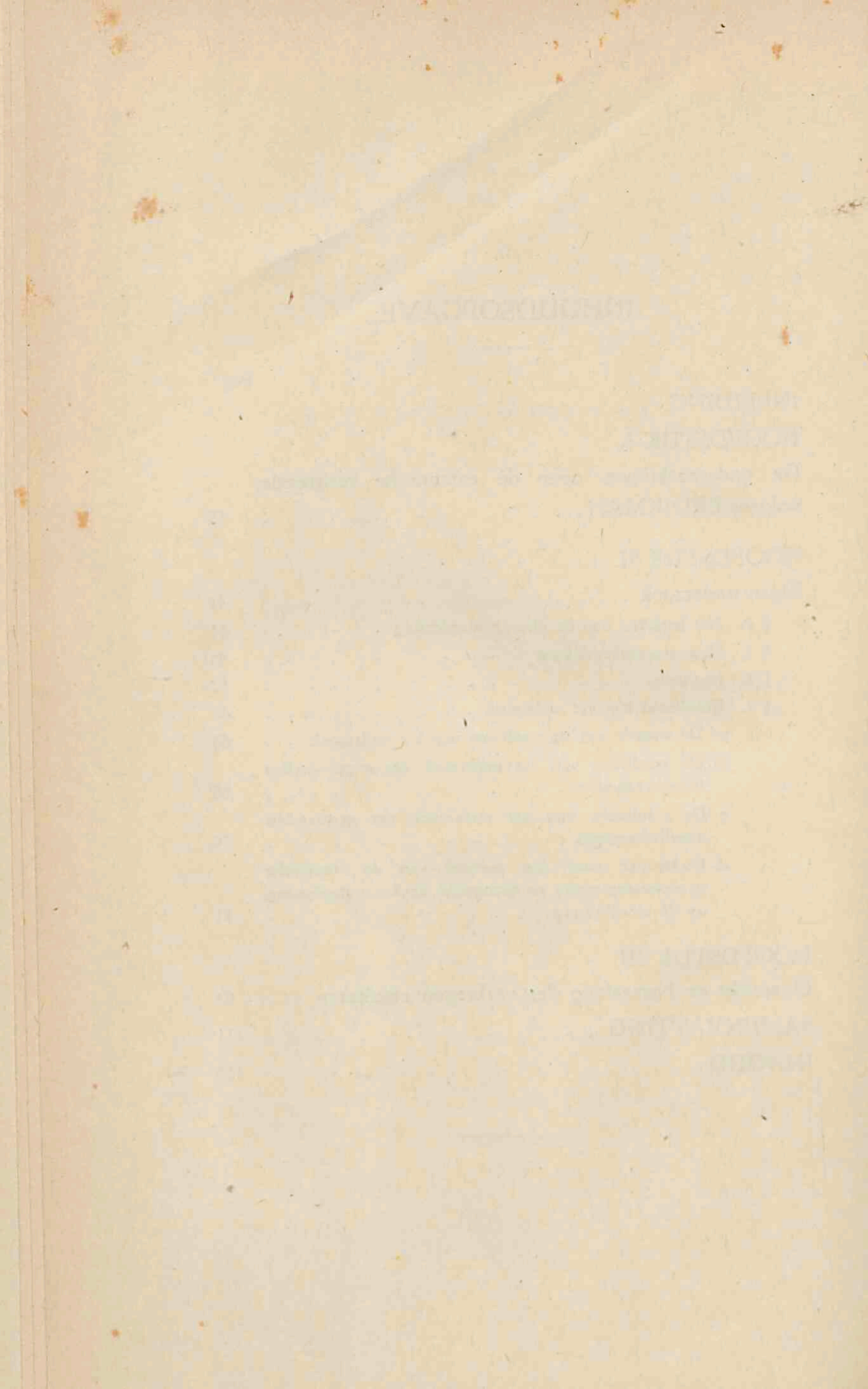
Enkelbepalingen ter vaststelling van den graad der haemolyse van de ongewassen erythrocyten bij denzelfden persoon als hiernaast, maar nu op ongeregelde tijden.

GRAAD DER HAEMOLYSE.

Concentratie der phosphaatoplossing.	IX	X
10/9 $\times \frac{1}{2}$ isot.	0	0
$\frac{1}{2}$ isot.	3%	5%
9/10 $\times \frac{1}{2}$ isot.	16 "	27 "
(9/10) ² $\times$ "	55 "	68 "
(9/10) ³ $\times$ "	88 "	90 "
(9/10) ⁴ $\times$ "	95 "	95 "
(9/10) ⁵ $\times$ "	99 "	99 "
(9/10) ⁶ $\times$ "	100 "	100 "
(9/10) ⁷ $\times$ "	100 "	100 "

INHOUDSOPGAVE.

	Pag.
INLEIDING.	7
HOOFDSTUK I.	
De onderzoekingen over de osmotische resistentie volgens BRINKMAN.	15
HOOFDSTUK II.	
Eigen onderzoek	41
§ 1. Het bereiden van de fosphaatoplossing	41
§ 2. Haematocrietbepalingen	45
§ 3. Methodiek	52
§ 4. Resultaten van het onderzoek	65
a. De waarde van de resultaten van het onderzoek	65
b. De resultaten van het onderzoek der ongewassen bloedlichaampjes	66
c. De resultaten van het onderzoek der gewassen bloedlichaampjes	76
d. Onderzoek naar den invloed van de isotonische fosphaatoplossing en isotonische keukenzoutoplossing op de bloedlichaampjes.	81
HOOFDSTUK III.	
Overzicht en bespreking der verkregen resultaten	97
SAMENVATTING	111
INHOUD	115



STELLINGEN.

I.

De ziekte van BANTI, zooals deze in ons land voorkomt, is een symptomencomplex, dat waarschijnlijk niets met het door BANTI beschreven ziektebeeld te maken heeft.

II.

Bij de ziekte van WEIL, waarbij lever en nier steeds in het middelpunt van de belangstelling hebben gestaan, letten men ook op de functie van het pancreas.

III.

De identiteit van het herpesvirus met het encephalitisvirus staat nog geenszins vast.

IV.

De meegedeelde resultaten van de vaccinbehandeling bij kinkhoest wettigen een nadere toepassing van deze behandeling bij deze kinderziekte.

V.

De onderbinding der vasa deferentia heeft niet de beteekenis, welke daaraan door STEINACH wordt toegeschreven.

VI.

Een na mola-zwangerschap optredende luteïnecyste behoeft niet dadelijk verwijderd te worden.

VII.

Voor de myopiegenese heeft men tot nu toe voornamelijk theorieën opgesteld, waarbij de axiale bulbusverlenging aan verandering der steunweefsels van het oog werd toegeschreven.

Terecht heeft men in den allerjongsten tijd de aandacht gevestigd op de mogelijkheid, dat primaire groei der retina voor het ontstaan der myopie verantwoordelijk is.

VIII.

Het is gewenscht om in de aanhangige besmettelijke ziektenwet het „kenmerk” bij de endemische infectieziekten in den ouden vorm en op de oude wijze te handhaven.

