

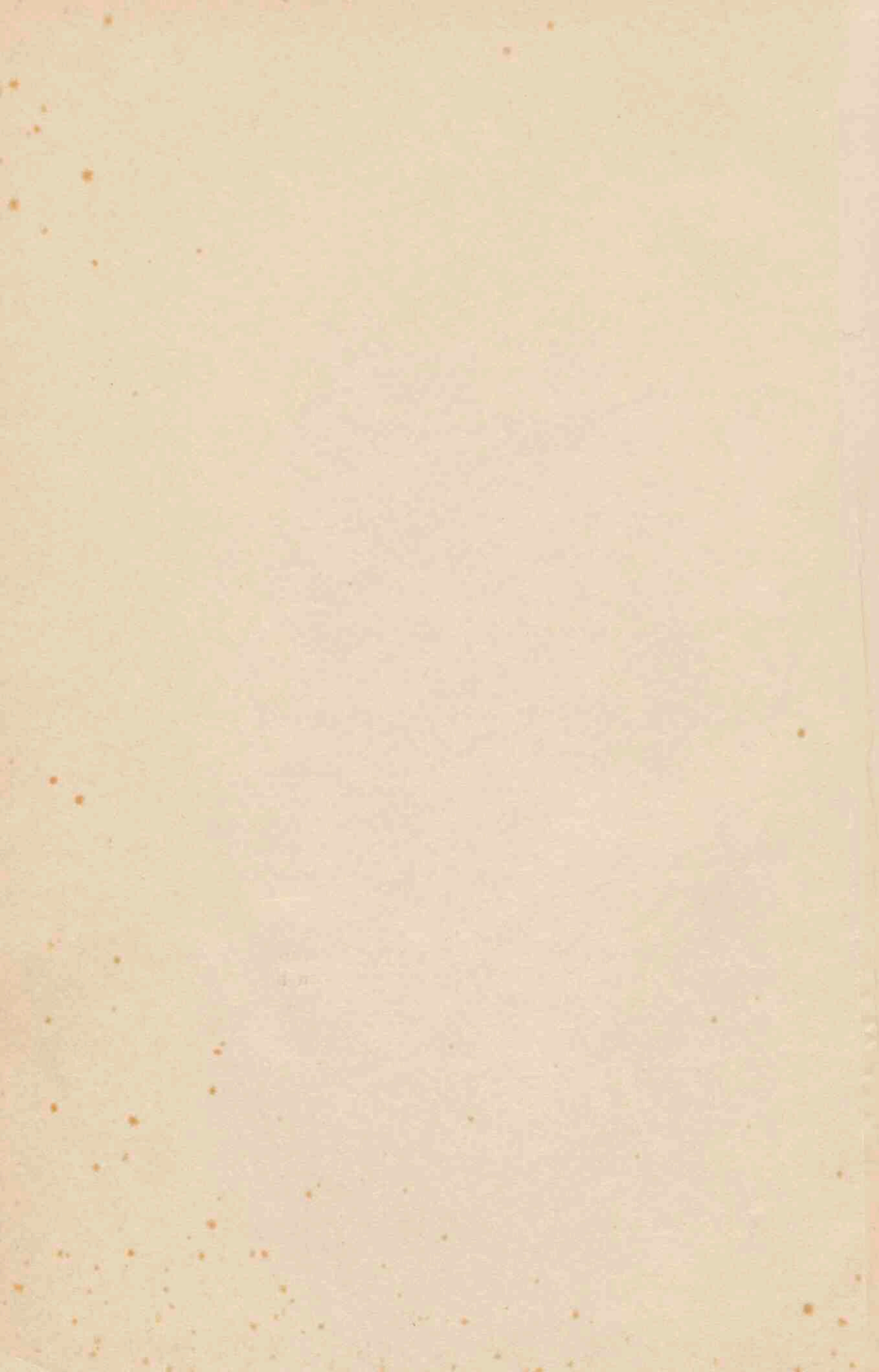


Onderzoekingen over het serumbilirubine

<https://hdl.handle.net/1874/321188>

Onderzoekingen over het
Serumbilirubine





ONDERZOEKINGEN OVER HET SERUMBILIRUBINE.

Diss. Utrecht 1935

Onderzoekingen over het Serumbilirubine

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT
TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR
MAGNIFICUS DR. C. W. VOLLGRAFF, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN
SENAAT DER UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE OP DINSDAG 19 NOVEMBER
1935 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

HENRI ARTHUR PHILIP HARTOG
ARTS
GEBOREN TE NIJMEGEN

KEMINK EN ZOON N.V. - OVER DEN DOM - UTRECHT

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Onderzoekingen over het Serumbilirubine

PROEF-SHIFT

De afwijking van het normale bilirubinegehalte in het serum kan een gevolg zijn van een toename van de productie of van een afname van de afvoer. De afwijking kan ook het gevolg zijn van een toename van de afvoer van bilirubine uit het lichaam. De afwijking kan ook het gevolg zijn van een toename van de afvoer van bilirubine uit het lichaam. De afwijking kan ook het gevolg zijn van een toename van de afvoer van bilirubine uit het lichaam.

1912

DE WETenschappelijke Uitgeverij

1912

Amsterdam

De afwijking van het normale bilirubinegehalte in het serum kan een gevolg zijn van een toename van de productie of van een afname van de afvoer. De afwijking kan ook het gevolg zijn van een toename van de afvoer van bilirubine uit het lichaam. De afwijking kan ook het gevolg zijn van een toename van de afvoer van bilirubine uit het lichaam.

AAN MIJN OUDERS

UNIVERSITY OF TORONTO LIBRARY

Bij de voltooiing van mijn proefschrift dank ik U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren en Docenten der Geneeskundige en Philosophische Faculteit der Utrechtsche Universiteit voor het van U genoten onderwijs.

In de eerste plaats ben ik U, Hooggeleerde H i j m a n s v a n d e n B e r g h, Hooggeachte Promotor, grooten dank verschuldigd voor de jaren, die ik onder Uw leiding heb mogen doorbrengen. Ik ben U dankbaar voor de steun en belangstelling, die mij het bewerken van dit proefschrift mogelijk hebben gemaakt.

Maar nog meer ben ik U erkentelijk voor datgene, wat ik van U leeren mocht, zoowel aan het ziekbed als daarbuiten. Het zijn jaren, die ik mij steeds zal herinneren en die tot de aangenaamste van mijn studietijd hebben behoord.

Het was zeer leerzaam voor mij onder U, Hooggeleerde d e L a n g e n te hebben mogen werken. Uw uitgebreide kennis en aangename omgang heb ik ten zeerste bewonderd.

Hooggeleerde B o u m a n, den korten tijd, dien ik in Uw kliniek werkzaam was, behoud ik in aangename en dankbare herinnering.

U, zeer ervaren B r e s t e r en zeergeleerde H u l s t, dank ik voor de voortreffelijke wijze, waarop ge mij steeds met raad en daad gesteund hebt.

Zeergeleerde M u l l e r en zeergeleerde G r o t e p a s s dank ik voor de uren, die wij samen op het laboratorium doorbrachten. Hun raad, doch niet minder hun bemoediging, waren mij bij mijn werk onontbeerlijk.

Zeergeleerde v a n d e r H o e d e n, bij U ben ik nooit tevergeefs om hulp komen vragen. Op de U eigen aangename wijze hebt ge mij die steeds verschaft.

Waarde S c h o u t e n, Uw heldere uiteenzettingen van physische problemen zijn mij van groot nut geweest; aan onze samenwerking denk ik met genoegen terug.

In het bijzonder dank ik U, mijnen mede-assistenten van nu, maar ook van vroeger, voor den prettigen geest waarin wij samenwerkten.

Met velen Uwer bonden mij vriendschapsbanden uit mijn studententijd, met andere ontstonden zulke in deze jaren.

Geachte Mejuffrouw van Omme en Geachte Mejuffrouw van Arkel, U dank ik voor de vele chemische bepalingen, waarbij gij mij steeds welwillend hebt geholpen.

Waarde Verhoef, hartelijk dank voor het vervaardigen der teekeningen en voor Uw technische hulp, die ik zoo vaak moest inroepen.

INHOUD.

	Blz.
De diazoreactie	1
Quantitatieve bepaling van het serum bilirubine	23
Over de adsorptie van bilirubine aan het eitwitneerslag	42
De bestudeering der diazoreactie met den bicolorimeter	69
Reactieconstante van het bilirubine	89
De oxydatiesnelheid van het bilirubine	96
Samenvatting	100
Summary	103
Literatuur	105

HOOFDSTUK I

De diazoreactie

Het aantoonen van bilirubine in bloed van normale personen is nog niet zoo heel lang met zekerheid mogelijk. Reeds verscheidene schrijvers deelden mede, dat hun dit gelukt was (Aucher, Popper, Lehdorf⁷³). Met eenige waarschijnlijkheid kon het pas door Gilbert⁵⁰) beweerd worden. Deze gaf een methode aan om bilirubine ook in kleine concentraties aan te toonen.

Daar deze methode echter tegelijkertijd een reactie is op luteine, kan ook van Gilbert niet gezegd worden, dat hij in alle gevallen het bilirubine heeft aangetoond.

Het belang van het werk van dezen schrijver en zijn leerlingen moet echter hoog aangeslagen worden, het heeft ongetwijfeld de grondslagen gelegd voor het verder onderzoek op dit gebied.

In 1913 deelde Hijmans van den Bergh mede, dat het diazoreagens van Ehrlich geschikt is om bilirubine in den vorm van een azokleurstof aan te toonen⁶⁹).

Reeds Fr. Pröschner¹¹⁶) had de diazoreactie bestudeerd en het azobilirubine in zuiveren toestand bereid. In zuur milieu is deze stof fraai blauw, in neutrale omgeving rood en na toevoeging van alkali wordt ze groen. Pröschner stelde vast, dat de reactie slechts door bilirubine en niet door biliverdine of andere galpigmenten gegeven wordt.

Inderdaad is deze reactie, met enkele beperkingen, specifiek voor bilirubine en aangezien de schrijver positieve reacties verkreeg bij normale personen kan gezegd worden, dat vanaf dat jaar het bestaan van een physiologische bilirubinaemie is bewezen. Bovendien gelukte het hem uit het serum van normale personen bilirubine in kristallijnen vorm te isoleeren^{70, 71}).

Sindsdien is men er wel algemeen van overtuigd geraakt, dat het serum van den normalen mensch bilirubine bevat. Onder de latere onderzoekers vermeldt slechts de Micheli¹⁰⁴), dat hij niet steeds

en zelfs zelden bilirubine in het serum van normale menschen kan vinden.

De hoeveelheden, die opgegeven worden in het serum onder physiologische omstandigheden aanwezig te zijn, loopen eenigszins uiteen.

De hoeveelheid bilirubine, die in het serum aangetroffen wordt, drukt men in het algemeen in navolging van *Hijmans van den Bergh* uit in eenheden. Onder 1 eenheid wordt verstaan een concentratie aan bilirubine van 1 : 200.000.

Fransche onderzoekers drukken de hoeveelheid bilirubine veelal in de sterkte der verdunning uit en spreken dus van een bilirubinaemie van 1 : 20.000 of 1 : 30.000. Beter is het de concentratie aan te geven, zooals men dat met de meeste andere serumbestanddeelen doet, n.l. in mg %. 1 Eenheid is dus 0,5 mg %.

Hijmans van den Bergh gaf op getallen te vinden van 0,3—0,5 Eenheden. *Herzfeld* en *Haemmerli*⁶²⁾ vonden met de methode van *Gilbert* hogere waarden, n.l. 60 mg per L, hetgeen overeenkomt met 12 E. *Chabrol*, *Charonnat* en *Busser*²²⁾: 3 E. *Sivo*¹²⁰⁾ vond eveneens hogere getallen en meent, dat dit verschil te wijten is aan het feit, dat bij de diazoreactie in haar oorspronkelijken vorm bilirubine met het eiwitneerslag verloren zou gaan. Hij gebruikte daarom een veranderde methode, die later nog besproken zal worden. Het is echter niet aannemelijk, dat het eiwitpraecipitaat een eenigszins belangrijke bron van fouten is. Zooals wij later zullen zien, is dit slechts het geval bij direct reageerende sera. De opgaven van de meeste onderzoekers komen met die van *Hijmans van den Bergh* overeen:

*Bozian*⁵⁶⁾: 0,2 tot 1,5 E.

Haselhorst^{50, 57)} vindt gemiddeld 0,35 E bij vrouwen en 0,5 E bij mannen.

J. Förster en *B. Förster*⁴⁶⁾ verkregen bij normale personen waarden van 0,5 tot 1 E.

*Peter*¹¹³⁾: 0,6 tot 1,2 E.

*Perkin*¹⁰²⁾: 0,1 tot 0,7 E.

*L. Schiff*¹²⁸⁾, vond 1,2 tot 1,8 E.

Ook wij zagen bij normale personen waarden, die naar beneden door 0,3 en naar boven door de 1 E begrensd worden. Vermeld moet echter worden, dat men soms bij personen een belangrijke verhooging van het bilirubinegehalte van het bloed kan vinden, soms gepaard gaande met icterus, zonder dat er verder ziekelijke verschijnselen kunnen worden aangetoond. Vaak worden dergelijke hyperbilirubinaemieën bij meerdere familieleden gevonden. Dit verschijnsel is reeds door Gilbert⁵⁰⁾ beschreven onder den naam van cholémie simple familiale. Dergelijke afwijkingen komen, indien men er op let, vrij vaak voor. Bij eenigen van dergelijke personen, die een duidelijke icterus vertoonden, werd in het bloed een galkleurstofgehalte van 4 E gevonden. De urine bevatte urobiline. De milt was palpabel, maar anaemie, verhooging van het aantal reticulocyten of verminderde resistentie der roode bloedlichaampjes ontbrak, zoodat het beeld toch wel duidelijk van de haemolytische icterus was af te grenzen. Nog onlangs heeft Hijmans van den Bergh een klinische les aan dit onderwerp gewijd⁷⁷⁾, hij gaf het verschijnsel den naam van constitutioneele hyperbilirubinaemie.

J. Bauer en E. Spiegel⁸⁾ vonden bij hun onderzoekingen, dat de bilirubinaemie wel belangrijk uiteenliep bij verschillende normale menschen, maar dat zij bij dezelfde persoon in het verloop van den dag constant blijft. Zoo liepen de nuchtere waarde en de waarden na een rijkelijken maaltijd niet uiteen. Deze bevindingen zijn in tegenstelling met de latere onderzoekingen van E. C. Meyer en H. Knüpfner¹⁰²⁾, en K. Fellingner en R. Pflieger⁸⁸⁾, die bijna steeds hoogere nuchtere waarden vonden dan in het verloop van den dag en, speciaal 4 à 5 uur na den maaltijd, een daling van de bilirubinespiegel waarnamen. Bauer en Spiegel deelen verder de oude opvatting van Gilbert, dat de constitutioneele hyperbilirubinaemie een uiting is van een aangeboren leverzwakte.

Van bijzonder belang is het gebleken, dat het bilirubine, zooals dat onder pathologische omstandigheden in het bloed voorkomt, op twee wijzen met het diazoreagens kan reageeren, n.l. direct, d.w.z. wanneer men het reagens zonder meer bij het serum voegt en indirect, d.w.z. eerst na toevoeging van alcohol. Het bleek, dat de sera van lijders aan icterus tengevolge van verhoogde bloedafbraak (haemolytische icterus) steeds een indirecte reactie gaven en sera

van lijders aan galstuwung of leverbeschadigung op directe wijze reageerden. Eveneens vond men indirect reageerend bilirubine daar, waar bloed locaal afgebroken werd, b.v. in exsudaten of haematomen.

Zoo werd de benaming mechanische icterus gesteld tegenover die van dynamische icterus, d.w.z. icterus door verhoogde bloedafbraak. Op deze wijze werd de diazoreactie een belangrijk diagnostisch hulpmiddel om beide te onderscheiden. Bovendien meende *Hijmans van den Bergh* te moeten vaststellen, dat slechts bij de mechanische icterus bilirubinurie optrad en dat de nier een zekere drempel vormde voor bilirubine. Bilirubinurie werd pas waargenomen, wanneer de hoeveelheid bilirubine in het bloed de concentratie van 4 Eenheden overschreed.

Deze bevindingen en het verschillend reageeren van de galkleurstoffen zijn in het algemeen bevestigd geworden, doch de verklaring ervan heeft tot vele controversen aanleiding gegeven. Bovendien zijn er in den loop der jaren, zij het ook weinige, uitzonderingen waargenomen op den regel, dat bij afsluitingsicterus een directe reactie en bij haemolytische icterus een indirecte reactie wordt gevonden. Zoo heeft men eenige malen bij duidelijke afsluitingsicterus een indirecte reactie gevonden, terwijl sommigen ook bij haemolytische icterus een directe reactie en zelfs bilirubinurie beweren te hebben waargenomen.

Een der eersten, die de bevindingen van *Hijmans van den Bergh* heeft bevestigd, was *G. Lepehne*⁹⁰⁻⁹²). Hij geeft in een aantal publicaties een overzicht van zijn onderzoekingen. Hij wees er reeds op, dat tusschen beide reacties overgangen bestaan, die het indeelen tot een van beide moeilijk kunnen maken. *Lepehne* voelde daarom de behoefte een uitgebreidere indeeling te maken en sprak slechts van directe reactie, wanneer de maximale kleurintensiteit van het gevormde azobilrubine binnen 30 seconden bereikt werd. Begon de reactie later en wel tusschen de 1 en 15 minuten, dan sprak hij van vertraagd directe reactie. Begon tenslotte de reactie ténstond, doch bereikte zij haar maximale kleurintensiteit pas na langeren tijd, dan sprak hij van diphasische reactie. Vond in het geheel geen reactie plaats zonder dat alcohol toegevoegd was, dan was de reactie zuiver indirect. Ook *Lepehne* nam waar, dat bilirubine slechts in de urine verscheen, wanneer de galkleurstof direct reageerde en de concentratie hooger was dan 4 Eenheden.

Tot diegenen, die uitzonderingen op de regel waarnamen, hoorden in de eerste plaats Schiff en Eliasberg¹²⁸⁾, die zeer merkwaardige mededeelingen daaromtrent deden. Zij vermeldden n.l. een epidemie van catarrhale icterus bij kinderen. Daarbij vonden zij nu van October tot Januari bij alle kinderen een indirecte reactie en na dien laatsten datum bij alle kinderen met catarrhale icterus steeds een directe reactie. Zij staan met deze waarnemingen, die nog steeds niet verklaard zijn, alleen, aangezien bijna alle schrijvers mededeelen bij icterus catarrhalis een directe reactie te hebben gevonden.

In de tweede plaats namen Schiff en Eliasberg een kind waar met congenitale atresie van de galwegen, hetgeen later door de obductie bevestigd werd. Het kind vertoonde sterke geelzucht en bilirubinurie. Het bilirubine in het serum gaf echter steeds de indirecte reactie.

Ook L. Blum¹⁴⁾ maakt melding van een uitzondering. Hij beschrijft 2 gevallen van icterus met directe reactie, waarbij ook bij obductie niets van afsluiting of stuwing in de galwegen te vinden was. In beide gevallen had men te doen met patiënten met een ernstige beschadiging van de lever. In het eerste geval werden septische necrosen in de lever gevonden. In het tweede geval had men blijkbaar te maken met een acute gele leveratrofie. Hoewel dus bij deze ziekten inderdaad geen afsluiting van de galwegen bestond, is de directe reactie in zooverre geheel verklaarbaar, omdat men deze bijna altijd bij ernstige leverbeschadiging vindt. Men heeft in deze gevallen te doen met een zgn. hepatocellulaire icterus. Deze kan men zich voorstellen als een gevolg van de onvoldoende uitscheiding van bilirubine door de lever, dus als een vorm van mechanische icterus. De conclusie van Blum, dat een directe reactie niet steeds op galstuwing wijst, is juist, wanneer men hieronder verstaat galstuwing in de groote galwegen. Dat zijn beide patiënten echter een mechanische icterus hadden, daaraan valt o.i. niet te twifelen.

En tenslotte beschreef Hollós⁶⁴⁾ een geval van weliswaar oorzakelijk niet geheel duidelijke, maar toch klaarblijkelijke mechanische icterus. Hierbij werden in het serum ongeveer 16 E bilirubine gevonden met, naar mededeeling van den schrijver, indirecte reactie. In overeenstemming hiermede bevatte de urine geen galkleurstof.

Zooals wij reeds zeiden worden er ook gevallen van haemolytische

icterus beschreven, waarbij het serum de directe reactie geeft, en soms bilirubinurie voorkomt. Wellicht zijn hierbij gevallen van cholelithiasis, die niet zoo zelden een complicatie van de haemolytische icterus vormt.

Bij gevallen van haemolytische icterus met een sterke bilirubinaemie ziet men soms, wanneer men het reagens bij het onverdunde serum doet, reeds spoedig een licht rose verkleuring optreden, die echter slechts zeer langzaam verder gaat. Wij zijn gewend deze reacties, mede op grond van de curve van het reactieverloop (zie later), tot de indirecte te rekenen. Vermoedelijk zullen hieruit ook een deel der mededeelingen omtrent directe reacties bij haemolytische icterus te verklaren zijn.

Ten slotte vermelden verscheidene schrijvers (Rozendal¹²³) het voorkomen van teekenen van leverbeschadiging bij de ter obductie gekomen gevallen van patiënten met haemolytische icterus. Sommige onderzoekers (o.a. Rosenthal en Holzer¹²²) hebben bilirubinurie waargenomen bij patiënten, lijdende aan haemolytische icterus, nadat de milt was weggenomen. Het is natuurlijk moeilijk te beoordeelen in hoeverre hier operatie en narcose van invloed waren.

In den nieuweren tijd ontkent ook Chabrol^{20,22}) het bestaan van een onderscheid tusschen een directe en een indirecte reactie. Wanneer hij n.l. de diazoreactie in den vorm van een ringreactie uitvoert, vindt hij steeds een direct, d.w.z. zonder alcoholtoevoeging, optreden van den violetten ring. Het spreekt vanzelf, dat men met het invoeren van de ringreactie de oorspronkelijke uitvoering wel sterk wijzigt. Bovendien schrijft Chabrol voor, een kwartier tot $\frac{1}{2}$ uur met het aflezen van het resultaat te wachten. Doet men dit echter niet, dan is ook bij de reactie volgens Chabrol een duidelijk verschil waar te nemen in de snelheden, waarmee de roode ring ontstaat. Men ziet dezen ring bij directe reacties terstond, doch bij indirecte reacties pas na 10 minuten of langer te voorschijn komen. Op grond van al deze feiten, achten wij de argumenten van Chabrol dan ook niet steekhoudend en het verschillend reageren van het bilirubine met het azoreagens dan ook geenszins weerlegd. Over de voordeelen of nadeelen van zijn methode komen wij nog te spreken.

Een physiologische bilirubinaemie wordt, behalve bij den mensch,

slechts bij het paard en bij pasgeboren dieren gevonden (J. A. Beyers^{12a}).

De verklaring van het verschillend reageeren van het bilirubine is van verschillende zijden gepoogd te geven. Tot op den huidigen dag is het echter nog niet op afdoende wijze gelukt. Hijmans van den Bergh noemde reeds verschillende mogelijkheden: hij veronderstelt, dat de indirecte vorm van de bilirubine gebonden is aan de eiwitten of kolloïden van het serum en dat de alcohol deze binding losmaakt. Aanvankelijk veronderstelde hij, dat bepaalde stoffen, eventueel uit de gal, de directe reactie zouden bewerkstelligen. Door toevoeging van bepaalde stoffen, b.v. galzuren, maar ook andere zwakke zuren, lukt het n.l. een indirect serum direct te doen reageeren. De hoeveelheden, die hiervoor noodig zijn overtreffen echter verre de hoeveelheden, die in het serum aanwezig zijn. Wat de galzuren en galzure zouten betreft, wijst o.a. Chabrol erop, dat zelfs bij volledige afsluiting van de galwegen na een aanvankelijke verhooging in het serum en in de urine, een daling optreedt, zoodat iedere afsluitingsicterus, wanneer de afsluiting blijft bestaan, op den duur overgaat in een z.g. gedissocieerde icterus, waarbij wel de bilirubine in serum en urine, doch niet de galzure zouten verhoogd zijn. De reactie blijft echter steeds direct.

Aschoff⁶⁷) neemt eveneens twee soorten bilirubine aan. Hij stelt voor het indirect reagerende bilirubine I te noemen, tegenover het directe bilirubine II. Hij huldigt de opvatting, welke eigenlijk van Nahunyn afkomstig is, dat het bilirubine I extrahepatisch ontstaat, d.w.z., dat het door het reticulo-endotheliale stelsel gevormd wordt en bij de uitscheiding door de levercellen overgaat in het bilirubine II.

N. W. Elton⁸¹) heeft een soortgelijke theorie ontwikkeld.

A. Adler²) meent de verklaring te moeten zoeken in de verhoogde cholesterinespiegel van het bloed bij mechanische icterus. Bij haemolytische icterus zou men n.l. in het algemeen een verlaagd cholesterinegehalte vinden. Van velerlei kanten is echter op het ontbreken van een samenhang tusschen directe reactie en cholesterinespiegel gewezen. Waarschijnlijk ontstaat de cholesterineverhooging tengevolge van de galstuwung. Het samengaan met de directe reac-

tie is dus begrijpelijk, maar een oorzakelijk verband tusschen beide behoeft daarom niet te bestaan.

S. J. Thannhauser en E. Andersen¹³⁴), die de oorspronkelijke methode van Hijmans van den Bergh gemodificeerd hebben, hebben zich ook bezig gehouden met de verschillende wijze van reageeren van het serumbilirubine. Zij toonden aan, dat door meer nitriet aan het reagens toe te voegen, ook het serum van lijders aan haemolytische icterus tot een directe reactie te brengen was. Doet men dit echter, dan wordt de azo-kleur spoedig door de overmaat van nitriet geoxydeerd en verdwijnt. Ook korte verwarming op een waterbad heeft op de reactie een versnellenden invloed. Na geruimen tijd staan bij 37° wordt echter een aanvankelijk directe reactie, indirect. Waar dus door betrekkelijk kleine veranderingen aan te brengen in de samenstelling van het reagens of in de temperatuur van het milieu het reeds mogelijk is de indirecte en directe reactie in elkaar over te voeren, zijn deze onderzoekers van meening, dat aan de snelheid van reageeren niet te veel diagnostische waarde gehecht kan worden.

Zij hebben verder trachten na te gaan of in vitro galzuren zouten of cholesterine de reactie versnellen. Een versnelling van de reactie trad niet op na toevoeging van cholesterine natrium, mengsels van gal- en vetzuren en niet na toevoeging van kolloidale mengsels van cholesterine en cholesterine-palmitine-zure esters of cholesterine alleen. Zelfs zagen zij na toevoeging van een mengsel van galzuren natrium en vetzuren natrium de oorspronkelijke directe reactie indirect worden.

Rosenthal en Holzer¹²¹) hebben eveneens het verband tusschen den cholesterinespiegel van het bloed en den aard van de diazoreactie trachten na te gaan. Zij vonden geen vast verband tusschen beide bij mechanische icterus. Integendeel, zij namen bij langer bestaande afsluitingsicterus vaak waar, dat de cholesterinespiegel daalde, terwijl de bilirubinespiegel hetzelfde bleef en ook de directe reactie onveranderd bleef voortbestaan. Bij de z.g. dynamische vormen van icterus vonden zij steeds een normaal en niet een verlaagd gehalte aan cholesterine in het bloed. Zij veronderstellen, dat het indirecte bilirubine in het bloed aanwezig is in een bepaalde binding en dat de milt misschien deze binding bewerkstelligt, want zooals gezegd, vonden zij soms, dat na miltexterpatie bij lijders aan haemo-

lytische icterus, het vroegere indirecte bilirubine direct ging reageeren, terwijl ook bilirubinurie soms ging optreden. Het overgaan van indirecte in directe reactie na miltexerpatie namen ook wij waar.

Een geheel andere verklaring geven *Adler* en *Strauss*⁸⁾. Zij meenen, dat het verschillend reageeren van de sera afhankelijk is van de samenstelling van de eiwitten van het serum. In vitro namen zij waar, dat na neerslaan van de globulinen door verzadigd $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de vertraagde reactie versneld werd. Dit was voor hen een aanleiding de samenstelling van het serum, wat de eiwitten betreft, bij lijders aan icterus nader te onderzoeken. Zij vonden nu in het algemeen, in overeenstemming met hun proeven, een verlagging van de globulinenfractie bij mechanische icterus en een verhooging bij dynamische icterus. Hun bevindingen zijn eveneens later tegengesproken. Zij vermoeden, dat de reactie afhangt van de hydratatie van de eiwitten. Alkool b.v. zou een versnellende werking hebben, omdat het de zwellingstoestand van de eiwitten vermindert. In vitro stelden zij vast, dat alle stoffen, die den zwellingstoestand van de eiwitten verminderen, ook de reactie bespoedigen, zooals purinederivaten, ureum en novasurol. In een latere mededeeling toonden zij aan, dat door toevoeging van deze genoemde stoffen, de globulinefractie vermindert, zelfs zou dat het geval zijn na injectie van coffeine of novasurol.

*Leschke*⁹⁾ kon door speciale collodiumfilters met betrekkelijk hooge doorlaatbaarheid het directe bilirubine ultrafilteren, het indirecte echter niet.

*Brulé*¹⁷⁾ bevestigde eveneens het bestaan van twee vormen van reactie, doch ook hij vindt, vooral bij afnemende icterus catarhalis en bij levercirrhose, vele overgangen. Hij wijst op de onderzoekingen van *Blankenhorn*¹³⁾, die het bilirubine steeds grootendeels dialysabel vond, wanneer het direct reageerde. Niet dialysabel werd het serumbilirubine gevonden bij de indirecte en de vertraagde reacties en in die gevallen, waarin ook geen bilirubinurie bestond. *Brulé* meent daarom, dat het indirecte bilirubine aan de eiwitten gebonden is en daardoor niet dialysabel is en niet in de urine verschijnt. Ook bij afnemende icterus zou het bilirubine grootendeels aan de eiwitten gebonden zijn. Daaruit meent *Brulé* ook het feit te kunnen verklaren, dat bij afnemende icterus de bilirubi-

nurie zoo vaak betrekkelijk vroeg verdwijnt. Zooals we later zullen zien, is inderdaad bij afnemende icterus een groot gedeelte van de galkleurstof aan de eiwitten geadsorbeerd. Maar dat het indirecte bilirubine aan de eiwitten gebonden is, staat geenszins vast; het slaat in ieder geval niet met het eiwit neer.

Levi Crailsheim⁹⁴⁾ trachtte door experimenteel onderzoek te bewijzen, dat het indirecte bilirubine inderdaad aan het eiwit van het serum gebonden is. Volgens zijn voorstelling bestaat er dus een bilirubine-eiwit (globuline)-complex. In deze vorm is het bilirubine in het bloed aanwezig. De lever zou dit complex splitsen en uit het eiwit met de cholesterine samen de galzuren opbouwen, terwijl het nu vrij geworden bilirubine in de gal wordt uitgescheiden en in deze vrije vorm de directe reactie geeft. In vitro trachtte Levi Crailsheim hetzelfde te bewerkstelligen door het bilirubine-eiwitcomplex aan de werking van eiwitsplitsende enzymen, b.v. maagsap of pepsine bloot te stellen. Behandelde hij aldus indirecte sera, dan werd de reactie direct. Bovendien nam hij waar, dat hij hogere getallen voor bilirubine in het serum vond, wanneer hij dit serum eerst met proteolytische enzymen behandeld had. Vanuit dit zelfde gezichtspunt trachtte hij nu ook een verklaring te geven voor de verschijnselen, die bij cholaemie optreden. Door de galstuwning namelijk zou het bilirubine-eiwitcomplex niet uitgescheiden worden en in groote hoeveelheden in het bloed aanwezig blijven. Dit eiwit nu, zou de oorzaak zijn van de toxische verschijnselen bij cholaemie. Tegen het bezwaar, dat men juist bij haemolytische icterus, waar men volgens de voorstelling van den schrijver ook een verhooging van het bilirubine-eiwitcomplex zou hebben, nooit verschijnselen van cholaemie waarneemt, brengt hij in, dat hier de vermeerdering slechts langzaam optreedt en dus het lichaam tijd tot gewenning heeft. Toxische verschijnselen zouden slechts voorkomen, wanneer het bloed plotseling „overstroomd” wordt met het complex. We zouden hier aan willen toevoegen, dat bij afsluitingsicterus en cholaemie het bilirubine steeds de directe reactie geeft en dus volgens de opvatting van den auteur reeds van het eiwit bevrijd is, zoodat van een overlading van het bloed met een bilirubine-eiwitverbinding geen sprake kan zijn.

Tenslotte verklaart Levi Crailsheim hieruit ook het voor-

komen van de directe reactie bij ziekten met leucocytose. De groote hoeveelheid proteolytisch ferment, die bij deze ziekten in het bloed aanwezig zou zijn, zou er de oorzaak van worden, dat reeds in de bloedbaan het complex gesplitst wordt.

Het komt ons voor, dat de directe reactie, bij sepsis bijvoorbeeld, ook uit de leverbeschadiging te verklaren is.

Ook de Micheli^{103, 104}) neemt aan, dat het indirecte bilirubine door zijn geringe concentratie en zijn langer verblijf in het serum, aan het eiwit gebonden is. Komen er plotseling groote hoeveelheden bilirubine in de bloedbaan, dan is de reactie volgens zijn meening steeds direct. Men kan echter bij lang bestaande mechanische icterus, b.v. bij levercirrhose, voortdurend hoeveelheden bilirubine in het bloed vinden, die niet grooter zijn dan die, welke bij haemolytische icterus gevonden worden (5 tot 10 E), terwijl in het eene geval steeds een directe, in het andere een indirecte reactie wordt gevonden.

Piotrowski¹¹⁴) neemt aan, dat beide vormen van bilirubine dezelfde structuurformule hebben, maar ook hij veronderstelt, dat het indirecte bilirubine gebonden is aan de eiwitten.

Deze binding is volgens Piotrowski afhankelijk van de hoeveelheid bilirubine en de hoeveelheid eiwit. Voor de directe reactie stelt hij dus niet alleen de vermindering van de globulinen aansprakelijk, zooals Adler en Strauss³) dat doen, maar bovendien de plotselinge vermeerdering van het bilirubinegehalte. Wanneer groote hoeveelheden bilirubine in het serum gevonden worden, zouden deze volgens Piotrowski steeds de directe reactie geven, aangezien er dan in verhouding niet voldoende eiwit aanwezig is, om de galkleurstof te binden. Om deze reden twijfelt hij dan ook aan de waarde van de diazoreactie, wanneer het gaat om de differentiaaldiagnose tusschen mechanische en haemolytische icterus.

C. H. Andrewes^{4, 5}) bevestigde de resultaten van het onderzoek van Hijmans van den Bergh. Ook hij vond voor de uitscheiding van het bilirubine in de urine een drempelwaarde van ongeveer 3,5 E en kon in de urine bij haemolytische vormen van icterus nooit bilirubine aantoonen.

Andrewes vond bovendien, dat uraemische sera, die dus gewoonlijk weinig bilirubine bevatten, met diazoreagens een eigenaar-

dige leerbruine („buff”) kleur geven. Deze reactie vertoont punten van verschil met de diazoreactie: de kleur is niet rood en wordt met alkali rose, terwijl de azokleurstof met alkali groen wordt; bovendien ontstaat ze, zelfs met alcohol, langzaam. Urine geeft de reactie niet, evenmin ureum, urinezuur of kreatinine. Ook het eiwit is de oorzaak niet; wat het wel is, is nog onbekend.

G. A. Harrison en R. J. Bromfield⁵⁵⁾ meenen, dat de oorzaak van deze reactie ligt in een indoxylverbinding. Ook Herzfeld^{60, 61)} vond, dat het diazoreagens met indol reageert. Dezelfde reactie werd onafhankelijk van Andrewes ook waargenomen en beschreven door F. Chrometzka²⁶⁾. Hij toonde aan, dat de intensiteit van de reactie parallel loopt met de verhooging van de reststikstof. De stof, die de oorzaak is van de reactie, kon ook hij niet vinden.

O. Weltmann en F. Hückel¹⁴⁶⁾ hebben het vraagstuk van de directe en indirecte reactie nog eens van verschillende kanten onderzocht. De hoeveelheid bilirubine geeft niet de doorslag voor het reactieverloop, want ook na verdunning van een direct serum met het serum van een lijder aan chronische nephritis, (dat zeer weinig bilirubine bevat) blijft de reactie even direct. Door verdere proefnemingen vonden deze onderzoekers, dat alcohol de zure werking van het zoutzuur remt en daardoor de dissociatie van het salpeterzuur bevordert. Daar nu van vele kanten er op gewezen is, dat het indirecte bilirubine zeer gevoelig is voor zoutzuur, maar dat door vermeerdering van nitriet (Thannhauser en Andersen) de reactie versneld wordt, zien de schrijvers hierin de verklaring van de werking van den alcohol bij het tot stand komen van de diazoreactie.

De bevindingen van Adler en Strauss³⁾, dat verbindingen van coffeine met natriumbenzoaat of salicylaat eveneens een bevorderende werking op de diazoreactie hebben, werd door hen ook nader onderzocht. Door proeven met de afzonderlijke bestanddeelen toonden zij aan, dat de werking niet, zooals men dacht, aan het coffeine, doch aan de benzoe of salicyl toe te schrijven is. De werking is ook niet te verklaren door de dehydratatie van de eiwitten, zooals Adler en Strauss het voorstellen, want coffeine-natriumbenzoicum maakt indirect bilirubine niet dialysabel. De ge-

noemde stof heeft echter een bufferwerking en zal dus, evenals alcohol, de dissociatie van het salpeterzuur bevorderen ten koste van het zoutzuur. De schrijvers zien dus als kenmerkend verschil tusschen de beide bilirubine-soorten de grootere gevoeligheid van de indirecte voor zoutzuur en de grootere behoefte ervan aan nitriet.

G. A. C o l l i n s o n en F. S. F o w w e a t h e r²⁶⁾ namen waar, dat het uit de gal geïsoleerde bilirubine de indirecte reactie geeft. Daar het volgens de onderzoekingen van H. F i s c h e r waarschijnlijk 2 carboxylgroepen bevat, kunnen er zouten van het bilirubine gevormd worden. Deze zouten bleken inderdaad de directe reactie te geven en ook verder de eigenschappen van het directe bilirubine uit het serum, b.v. wat oplosbaarheid betreft, te bezitten. C o l l i n s o n en F o w w e a t h e r nemen daarom aan, dat het directe bilirubine als alkalizout van het indirecte in het plasma aanwezig is. Door toevoeging van verdunde alkali aan indirect serum kan men de reactie direct maken. In het serum is echter de reactie niet zoo alkalisch, dat het bilirubine als natrium- of kaliumzout aanwezig kan zijn. De onderzoekers veronderstellen daarom, dat dit zout het ammoniumzout zou zijn. Ook toevoeging van ammoniak zou de indirecte reactie direct maken. Ter ondersteuning van hun theorie voeren zij aan:

1. Dat gal meer ammoniak bevat dan bloed;
2. Dat de alkaliteit van het serum voldoende is om het bestaan van ammoniumzouten van bilirubine mogelijk te maken;
3. Dat in vitro bij verwarming van (direct reageerend) ammonium-bilirubinaat de reactie indirect wordt, hetgeen overeenkomt met het feit, dat direct serum na verwarming overgaat in indirect.

Alles tezamen genomen is dus hun theorie zoo, dat de lever bij de desamineering van aminozuren ammoniak vormt en dit ammoniak gebonden aan het bilirubine van het serum in de gal uitscheidt.

D. T. D a v i e s en E. C. D o d d s²⁸⁾ vonden, dat zuur bilirubine, mits opgelost in een bufferoplossing, zoodat door toevoeging van het azoreagens de pH. niet te laag wordt, de directe reactie geeft. In zuivere oplossingen of in exsudaten doet de toevoeging van het reagens de pH. snel en sterk dalen, zoodat een directe koppeling niet mogelijk is. Toch kan hierin echter de verklaring van de indirecte reactie niet gelegen zijn, want zoowel icterische als normale

sera hebben een gelijke bufferwerking voor het azoreagens. Zij stelden toen verder vast, dat biliverdine de indirecte reactie geeft en veronderstelden daarom, dat het indirecte bilirubine een oxydatieproduct is van het directe in de richting van biliverdine. Deze verklaring is echter door hen niet verder aannemelijk gemaakt. Biliverdine zelf komt in ieder geval niet in de versche sera voor en geeft trouwens met azoreagens pas na vele uren een reactie, die eigenlijk niet met de indirecte reactie vergeleken kan worden.

W. Morell Roberts¹²⁰⁾ bestreed de opvatting van Collins en Fowweather, dat het directe bilirubine het ammoniumzout van het indirecte zou zijn. Door toevoeging van zuur kan men namelijk de directe reactie niet indirect maken, terwijl een ammoniumzout toch wel ontleed zou zijn geworden. Wel vertraagt toevoeging van zuur de reactie, maar pas wanneer de pH. zoo laag wordt, dat koppeling met het reagens niet meer plaats kan vinden. Een echt indirect, d.w.z. in chloroform oplosbaar pigment, ontstaat niet. Toevoeging van ammoniak versnelt volgens dezen onderzoeker de reactie slechts schijnbaar. Er ontstaat een oranje tint, die ook optreedt, wanneer men ammoniak toevoegt aan normaal serum met reagens. En tenslotte nam hij waar, dat ammoniumbilirubinaat, opgelost in serum, slechts een vertraagde reactie gaf.

C. E. Newman¹⁰⁹⁾ wees er eveneens op, dat de directe reactie, die na toevoeging van ammonium optreedt, slechts schijnbaar direct is. De bruine kleur, die optreedt is niet te vergelijken met die, welke men ziet bij de diazoreactie. Ook vond hij, dat biliverdine niet de oorzaak kan zijn van de indirecte reactie, want behalve, dat het groen is, geeft het met reagens pas een reactie na 12 tot 24 uur; bovendien is het onoplosbaar in chloroform, hetgeen het indirecte bilirubine wel is. Newman komt tot de conclusie, dat de twee bilirubines eenigszins verschillende verbindingen zijn. Hij onderscheidt 4 soorten bilirubine:

1. Het vrije zure, uit gal bereide, bilirubine, dat volgens hem identiek is met:
2. Het indirecte bilirubine.
3. Het directe bilirubine en
4. Het alkalibilirubine, dat wel een directe reactie geeft, doch in de

natuur niet voorkomt en dus slechts een kunstproduct is, dat met alkali uit 1. of 2. gemaakt kan worden.

Steenhout en Bouckaert¹³¹) gingen na, wanneer bij de zuivere bereiding van bilirubine uit gal de directe reactie indirect wordt. Dit is het geval na de zuivering met alcohol. Zij besluiten hieruit, dat de directe reactie het gevolg is van bestanddeelen uit de gal, die bij afsluitingsicterus in het bloed aanwezig zijn.

E. Forrai en R. Sivo⁴⁴) konden geen bilirubine ultrafiltreeren, noch het directe, noch het indirecte. Beide schijnen dus aan de kolloïden gebonden te zijn. Het gelukte deze binding los te maken door toevoeging van coffeïno-benzoicum natrium.

Uitvoerige onderzoeken werden verricht door L. Paterni¹²¹). Deze wees nog eens op de onafhankelijkheid van den graad der bilirubinaemie en de snelheid der reactie. Toch zegt hij nimmer een hoogere indirecte bilirubinaemie gevonden te hebben dan 3,6 E. Ook hij kon, in tegenstelling met Collinson en Fowweather²⁶), door toevoeging van ammoniak niet een indirecte reactie direct maken. Toevoeging van ammoniak geeft een, volgens Paterni, lichtroze kleur, die niet te vergelijken is met de azokleur. Evenmin kon hij de reactie bespoedigen door toevoeging van natriumglycocholaat of natriumtaurocholaat. Hij komt tot de slotsom, dat de galzure zouten en de ammoniumzouten geen rol spelen bij het tot stand komen van de directe reactie.

T. Maeda en T. Morishima⁸⁹) vonden, evenals Davies en Dodds, dat in vitro de snelheid van het verloop van de diazo-reactie afhangt van de waterstofionenconcentratie. Hoe hooger de waterstofionenconcentratie was, des te langzamer verliep de reactie. Het verband tusschen beide is in een hyperbool uit te drukken. Dit komt dus ook overeen met de bevindingen van Collinson en Fowweather, die bij hoogere alkaliniteit van het serum een directe reactie waarnamen.

N. Sofue¹²⁰) meent, dat het serum van lijdens aan haemolytische icterus remmende stoffen bevat. Bracht hij namelijk bilirubine in substantie of bereid uit serum van patiënten met haemolytische icterus in een direct reagerend serum, waaruit het bilirubine eerst door de inwerking van licht verwijderd was, dan reageerde het oorspronkelijke indirecte bilirubine direct. Sofue deelt ver-

der mede, dat deze remmende stof in de stromata aanwezig en daaruit o.a. te extraheeren is met alcohol en chloroform. Dergelijke proeven werden ook door ons verricht, maar konden niet bevestigd worden. Het oorspronkelijke indirecte bilirubine bleef ook in „direct” serum indirect reageeren.

Sofue meent, dat de hoeveelheid bilirubine in het serum een belangrijke rol speelt bij het verloop van de reactie. Hoewel de hoeveelheid bilirubine, zooals later zal blijken, wel van invloed is op de snelheid, waarmee de reactie verloopt, is deze invloed toch niet zoo groot, dat het verschil in reageeren hieruit alleen verklaard kan worden. Reeds Hijmans van den Bergh heeft hierop gewezen. Men neemt herhaaldelijk, b.v. bij afnemende afsluitingsicterus, een bilirubinaemie waar van 1,5 E. met vrijwel volkomen directe reactie en aan den anderen kant vonden wij bij een patiënt met traumatische haematothorax in het pleurapunctaat een hoeveelheid bilirubine van 14 E. met indirecte reactie.

Hayashi⁸⁸⁾ beschreef de proeven van Sofue¹³⁰⁾, die in het serum van lijders aan haemolytische icterus een, de reactie remmende, stof meent aangetoond te hebben, welke stof in de stromata aanwezig zou zijn. Hayashi stelt zich voor, dat bij de haemolytische icterus door de haemolyse veel van die stof vrij komt en aldus de reactie vertraagt. Toevoeging van stromata aan direct serum remt de reactie; dat dit niet ligt aan het toegevoegde eiwit toonde hij aan, doordat toevoeging van eiwit alléén, geen remmende werking heeft. De alcohol, die men noodig heeft om bij indirect reagerende sera een koppeling tusschen reagens en bilirubine te bereiken, zou er toe dienen de eiwitten neer te slaan en daarmee ook de stromata. De reactiesnelheid hangt dus volgens Hayashi af van twee factoren: de hoeveelheid bilirubine en de hoeveelheid stromastof.

U. de Castro¹⁹⁾ heeft de proeven van Sofue en Hayashi nagedaan en zag, dat wel kleine hoeveelheden direct bilirubine opgelost in sera, afkomstig van patiënten met haemolytische icterus, of in normale sera indirect reageerden, doch dat grootere hoeveelheden de directe reactie bleven geven. Dit komt dus wel overeen met de opvatting van Hayashi, doch er zou ook uit kunnen blijken, dat alle sera een wat remmende werking bezitten. Overigens neemt ook de Castro het bestaan aan van twee verschillende bilirubines.

Het directe bilirubine zou volgens hem ontstaan uit het indirecte als schakel in de keten van verbindingen, die ontstaan bij de afbraak van haemoglobine.

J. P. Mc Gow an⁵¹⁾ meent, dat bij icterus met indirecte bilirubine een verlaagde alkalireserve een oorzakelijke rol zou spelen. Men kan hierin een overeenstemming vinden met de onderzoeken van Collinson en Fowweather, die eveneens verband vonden tusschen de alkaliniteit van het serum en de reactiesnelheid. Mc Gow an onderzocht varkens, die leden aan een bepaalde vorm van anaemie door tekort aan ijzer; deze anaemie gaat soms gepaard met icterus. Steeds vond hij een verlaagde alkalireserve bij dieren met een indirecte reactie in het serum. Toevoeging van een bufferoplossing, die dus de alkalireserve verhoogt, deed de reactie direct worden. Collinson en Fowweather vonden ook, dat toevoeging van alkali de reactie versnelt. Of de verlaagde alkalireserve de oorzaak is van de indirecte reactie, blijft twijfelachtig. De verschillen in alkalireserve, die Mc Gow an mededeelt, zijn niet groot en ook bij gezonde personen loopen de waarden nogal uiteen (50—70 vol. %).

Tenslotte wijdt deze onderzoeker eenige woorden aan de bij varkens waargenomen icterus. Deze kan volgens hem slechts door een stoornis in de leveruitscheiding veroorzaakt zijn geworden en dus zou dit dan weer een uitzondering op den regel beteekenen, dat een indirecte reactie wijst op een icterus door verhoogde bloedafbraak. Het is ons uit de mededeelingen van Mc Gow an niet duidelijk, dat hier niet een haemolytische icterus aanwezig is geweest. De schrijver voert als bewijs, dat er een stoornis in de leveruitscheiding bestond, aan, dat in de kleine galwegen veel galpigment werd gevonden, dat dus tot obstructie geleid zou moeten hebben. Dit vinden van veel galpigment bewijst echter nog geen blokkade, aangezien men ze ook bij haemolytische icterus vindt (Eppinger).

G. Monasterio¹⁰⁷⁾ geeft als zijn meening te kennen, dat alcohol de reactie versnelt door de temperatuursverhoging van het mengsel, die ze veroorzaakt en doordat zij het contact tusschen serum en reagens vergemakkelijkt. Het eerste is in overeenstemming met de ervaring, dat een korte verwarming de reactie directer maakt. De schrijver vestigt er ook de aandacht op, dat een reactie

soms indirect kan lijken, als er weinig bilirubine aanwezig is. Ook wij zagen vaak, dat een aanvankelijk direct serum, wanneer het sterk verdund werd, een meer vertraagde, in den zin van een diphasische, reactie ging geven.

G. Hunter⁶⁷⁾ nam waar, dat kunstmatig bilirubine, in chloroform opgelost, niet reageert met het azoreagens. Ook in alcohol opgelost reageert het slechts langzaam. Dit was dus eenigszins in strijd met de mededeeling van Hijmans van den Bergh⁶⁸⁻⁷¹⁾, die bilirubine in chloroform oploste, deze oplossing indampte en het residu in alcohol oploste, welke oplossing de directe reactie gaf. Hijmans van den Bergh verzuimde echter mee te deelen, dat bij de indamping toch nog een weinig chloroform aanwezig bleef en inderdaad, wanneer men het bilirubine in een weinig chloroform oplost en deze oplossing aan den alcohol toevoegt, dan verloopt de reactie direct. Hunter beschouwt daarom het indirecte bilirubine, in het serum aanwezig, als opgelost in een middel, dat ook in alcohol oplosbaar is en gelooft dus niet, dat dit bilirubine aan de eiwitten of de kolloïden gebonden is. Wat het directe bilirubine betreft, ook hij gelooft, evenals Collinson en Fowweather, dat dit aanwezig is als een natriumhydrogeen bilirubinaat.

Chabrol²²⁾ paste de diazoreactie, zooals reeds gezegd werd, toe in den vorm van een ringreactie. Met nadruk wijst hij erop, dat als men de diazoreactie volgens zijn voorschrift uitvoert, de verschillen tusschen directe en indirecte reactie wegvallen, want dat ook het zgn. indirecte bilirubine binnen het kwartier reageert. Chabrol schijnt dan ook aan het onderscheid tusschen directe en indirecte reactie niet veel waarde te willen hechten.

B. Varela, E. Apolo en C. Viana¹³⁸⁾ zijn de eersten, die in sera de hoeveelheden direct en indirect bilirubine afzonderlijk hebben bepaald. De interessante methode, die zij daartoe hebben uitgewerkt, wordt nog afzonderlijk besproken. Reeds nu willen we er op wijzen, dat dit geen verband houdt met hetgeen Weltmann en Jost¹⁴⁴⁾ hebben gedaan en die onder indirect bilirubine in hun publicaties verstaan, de hoeveelheid bilirubine, die gevonden wordt, nadat het serum met alcohol onteiwit is. Varela en zijn medewerkers vonden geen vaste verhouding tusschen direct en indirect bilirubine, welke verhouding zij „l'index de la bilirubine du sang" noe-

men. Ook bij dezelfde ziekten en dezelfde patiënten wisselt deze index sterk. Opmerkenswaardig is het, dat zij bij catarrhale icterus, behalve een sterke verhooging van het directe bilirubine, ook een verhooging van het indirecte vonden. Dit zou er dus op wijzen, dat er bij deze ziekte, behalve de beschadiging van de lever, ook een verhoogde haemolyse plaats vond. Zij vervaardigden curven van het gehalte der beide bilirubines in het verloop der catarrhale icterus, waarbij bleek, dat de directe galkleurstof nog maanden in het serum verhoogd kan zijn, hetgeen overeenkomt met de ervaring, dat de reactie in het serum nog lang de directe kan blijven.

M. J e n k e ⁷⁹⁾ kon door de identiteit van bilirubine en haemotidine vast te stellen nogmaals de extrahepatische galkleurstofvorming bewijzen. Tegelijkertijd beschrijft hij een geval van haemolytische icterus, waarbij van tijd tot tijd schijnbaar bilirubinurie optrad. De urine had namelijk een bierbruine kleur en ook het schuim was geel gekleurd. Bij nader onderzoek bleek echter de kleurstof in de urine geen bilirubine te zijn: bij de proef van G m e l i n ontstond geen groene verkleuring. Met diazoreagens ontstond pas na uren een verkleuring. De kleurstof was verder niet extraheerbaar met chloroform en zeer gevoelig voor zuurstof en alkali. J e n k e gaf aan deze stof de naam van haemorubine en meende hierin een der langgezochte tusschenstoffen gevonden te hebben, die bij de afbraak van haemoglobine tot bilirubine gevormd worden.

A c é l e n G o l d g r u b e r ¹⁾ geven na een kort overzicht van de toentertijd heerschende opvattingen, de resultaten weer van hun eigen experimenten. Nogmaals bewijzen zij de onafhankelijkheid van de samenstelling der bloedeiwitten en de snelheid der reactie. Hetzelfde kon gezegd worden van de cholesterinespiegel van het bloed. Bijzondere aandacht hebben zij besteed aan de galzuren in het bloed. Inderdaad vonden zij, wanneer de galkleurstof de directe reactie gaf, vrijwel steeds een verhooging van de galzuren. (Bepalingen volgens Aldrich en Bledsoe). Het gelukte hen echter evenmin als aan P a t e r n i ¹¹¹⁾ om door toevoeging van taurocholzure natrium of glycocholzure natrium aan indirecte sera, directe reacties te verkrijgen. In de hoop de toestand, zooals die in vivo is, nader te kunnen komen, isoleerden zij daarom de galzure zouten uit de gal en voegden deze aan de sera toe, echter evenmin met succes. Na decholine

injecties bij proefpersonen zagen zij soms de reactie wel direct worden, helaas waren de resultaten niet steeds dezelfde. Tenslotte vonden ook zij de onafhankelijkheid van de hoeveelheid bilirubine in het serum en de reactiesnelheid. Zij beschouwen de verhooging van de galzure zouten in het bloed als gecoördineerd met de directe icterus, zonder dat tusschen beide een causaal verband bestaat.

W. J. Griffith en G. Kaye⁵³⁾ vonden dat het werkelijke zuivere bilirubine, wanneer men het oplost in serum, de indirecte reactie geeft. Het gelukte hen uit gal een pigment te isoleeren, zij het ook niet in zuivere toestand, dat opgelost in serum de directe reactie gaf. Ook verder vertoonde dit „direct-reactionpigment” veelal dezelfde eigenschappen als het bilirubine, dat bij afsluitingsicterus in het bloed voorkomt en zij beschouwen beide dan ook als identiek.

F. Scott Fowweather¹²⁷⁾ heeft, na de litteratuur vanaf Davies en Dodds (1927) te hebben gerefereerd, mededeelingen gedaan over onderzoekingen, die hij in navolging van Collinson en Fowweather verrichte over de zouten van het bilirubine. In tegenstelling met wat genoemde onderzoekers vonden, vertoonen volgens Scott Fowweather de zouten van het kristallijne indirecte bilirubine niet steeds een directe reactie. De schrijver neemt daarom aan, dat zowel van het indirecte bilirubine (A), als van het directe bilirubine (B) zouten bestaan, die op dezelfde wijze reageeren. Bij passage door de lever meent hij, dat uit bilirubine A, bilirubine B ontstaat en hieruit weer de zouten van B. Bij mechanische icterus zouden deze zouten van B in het bloed circuleeren. Evenals Küster⁸⁸⁾ beschouwt hij het bilirubine A als een ketoverbinding en bilirubine B als een enolverbinding. Oplossing in alcohol bevordert het ontstaan der enolvorm.

G. Dominici en G. Marengo²⁹⁾ stelden nogmaals vast:

1. dat slechts aceton de alcohol bij de diazoreactie kan vervangen.
2. Dat door toevoeging van allerlei colloïdale oplossingen als zetmeel en ovalbumine, die dus het bilirubine eventueel kunnen binden, de reactie niet vertraagd wordt.
3. Dat door staan bij 37° de directe reactie in de indirecte overgaat.
4. Alle beide bilirubinesoorten dialyseerbaar zijn door een 4½ % collodiumfilter, hetgeen dus in tegenpraak is met de onderzoekingen van M. A. Blankenhorn¹³⁾, die het bilirubine slechts dialysabel vond, wanneer er ook bilirubinurie

bestond, dus in het algemeen bij direct reageerende sera. 5. Dat de globulinefractie niet in verband staat met de reactiesnelheid.

K. Takeshita¹⁸³) vond evenmin verband tusschen globulinefractie en directe reactie. Hij onderzocht verder of en zoo ja, door toevoeging van welke stoffen aan het serum de reactie direct te maken is. Galzuren, cholesterine, bestraalde gal, extracten uit konijnenlevers, pepsine, minerale zuren, basen en zouten, alkoholen met stijgende aantallen C-atomen, aromatische zuren, halogenen zijn alle zonder werking. Monocarbonzuren, purinelichamen en barbituurzuurverbindingen hebben een geringe versnellende werking. Ook kon geen verband tusschen de waterstofionenconcentratie en de reactie worden waargenomen.

Julesz en Winkler⁸¹) vergeleken het bilirubinegehalte van het bloed en van het weefselvocht (cantharidenblaas) en vonden tusschen beide een vast verband: beide gaven dezelfde reactie. Het cholesterinegehalte liep echter sterk uiteen, zoodat dus een verband tusschen de cholesterine spiegel en de reactie niet kan worden aangenomen.

G. Ferrari⁴⁰) meent, dat in vitro de diazoreactie versneld wordt door stoffen, die het bilirubine oplossen.

G. Favilli⁸⁶) onderzocht experimenteele afsluitingsicterus en experimenteele haemolytische icterus, die veroorzaakt werd door de toediening van toluyleendiamine. Hij vond bij beide vormen overgangen naar de directe reactie en meent op grond van deze proeven, dat de diazoreactie geen waarde heeft als differentiaaldiagnosticum tusschen hepatische of extrahepatische icterus. Zooals onder andere Chabrol²⁰) later ook heeft vastgesteld echter, is toluyleendiamine niet alleen een bloedgift, doch veroorzaakt het ook leverbeschadiging. Het is dus zeer begrijpelijk, dat Favilli bij zijn met dit vergift behandelde dieren, ook wel eens directe reacties vond.

Vatten wij thans de literatuur samen, dan moet er op gewezen worden, dat de directe en de indirecte reactie in vitro in elkaar over te voeren zijn. In het algemeen bevordert het toedienen van alkali aan het serum de directe reactie. Hetzelfde kan bereikt worden door het serum gedurende korten tijd te verwarmen of door het toevoegen van zwakke zuren aan het serum of meer nitriet aan het reagens. Sterk zuur maken van het serum vertraagt de reactie, doordat de kop-

pelings met het reagens dan niet meer plaats kan vinden. Door het serum langeren tijd te laten staan, wordt de reactie eveneens indirect.

In vivo heeft men in de samenstelling van het bloed niet zulke constante afwijkingen kunnen vinden, dat daardoor het verschil in reactie verklaard zou kunnen worden. De verhooging van de galzuren en het cholesterine en de veranderde eiwitsamenstelling geven daarom geen verklaring van de directe reactie, terwijl ook proeven in vitro het onwaarschijnlijk gemaakt hebben, dat zij een rol spelen. De opvatting, dat de graad van de bilirubinaemie de reactiesnelheid geheel bepaalt, wordt door de waarnemingen, die men dagelijks in de kliniek opdoet, wel weerlegd; dat de hoeveelheid bilirubine op de reactiesnelheid van invloed is, is echter begrijpelijk. Waar dus van de chemische eigenschappen van het directe en indirecte bilirubine en van de factoren, die voor het verloop van de reactie aansprakelijk zijn, zoo weinig bekend is, zou men zich kunnen afvragen of men wel het recht heeft tusschen beide een onderscheid te maken en er een zoo groote beteekenis voor de diagnose aan te hechten. We zouden hierop het antwoord van G. A. H a r r i s o n willen aanhalen: „On the whole yes, for it stimulated thought and has been to much help to the physician and therefore to the patients, but it has led to innumerable publications, many of which may turn out to be of little interest.”

Door het feit dat de indirecte en de directe reactie in elkaar zijn over te voeren is het bestaan van twee modaliteiten van bilirubine o.i. geenszins onwaarschijnlijk gemaakt. Want bij het bestudeeren van twee stoffen, waarvan men redenen heeft om te vermoeden, dat ze verschillen, zal men moeten trachten de punten van verschil duidelijker tot uiting te brengen, doch niet ze te doen vervagen.

Ondanks het feit, dat uitzonderingen op den door H i j m a n s v a n d e n B e r g h vastgestelden regel zijn waargenomen, kan men zeggen, dat de indirecte reactie slechts voorkomt bij icterus, die op een verhoogde bloedafbraak berust en dat dus de diazoreactie, mits in haar principe volgens de oorspronkelijke methode uitgevoerd, haar differentiaal diagnostische waarde heeft behouden.

HOOFDSTUK II

Quantitatieve bepaling van het serum bilirubine.

Methoden tot bepaling van het bilirubine in het serum zijn reeds lang in gebruik. Wanneer men afziet van de spectrophotometrische methode, die in de kliniek voor het dagelijksch gebruik weinig ingang heeft gevonden, kan men ze indeelen naar drie principes: de eerste is het oxydeeren van bilirubine tot een gekleurd afbraakproduct; de tweede is de vergelijking van de gele kleur van het serum met een bepaalde gele standaardvloeistof en de derde het vormen van een gekleurde verbinding van het bilirubine met behulp van het azoreagens.

Het oxydatie-principe is reeds lang in gebruik. Men kon hier wel bilirubine kwalitatief mee aantoonen, doch quantitatieve schattingen werden er aanvankelijk niet mede uitgevoerd.

A. Gilbert⁵⁰⁾ is vermoedelijk de eerste geweest, die, op dit principe gebaseerd, een bruikbare methode uitdacht, waarmede men quantitatieve bepalingen kon verrichten. De methode is een z.g. „reaction limite”, d.w.z., dat nagegaan wordt bij welke verdunning van het serum een bepaalde reactie nog optreedt. Is de gevoeligheid van de reactie vooraf vastgesteld, dan kan men uit de verdunning de sterkte van het serum berekenen.

De uitvoering zij hier in het kort beschreven: Er wordt een kunstmatige eiwitoplossing bereid, waarmede men in een reeks buisjes opeenvolgende verdunningen van het serum maakt. Bij ieder buisje wordt nu het reagens gevoegd, dat bestaat uit acidum nitricum en nitras natricus. Op den bodem der buisjes komt nu een wit eiwitneerslag, dat zich naar het nitriet toe geel kleurt. Tusschen deze gele en de witte zône verschijnt, wanneer bilirubine in voldoende hoeveelheid aanwezig is, een blauwe ring. Volgens Gilbert bevat het buisje, waarin nog juist een blauwe ring aanwezig is, bilirubine in een verdunning van 1 : 40.000. De vaststelling, in welk buisje nog een blauwe ring waarneembaar is, is natuurlijk onder-

hevig aan een subjectieve fout. Vandaar, dat Chabrol en Deval²⁰⁾ de gevoeligheid van de reactie hooger vonden, n.l. 1 : 50.000. In ieder geval is Gilbert de eerste geweest, die onderzoeken van quantitatieven aard heeft gedaan over de sera van gezonden, zoowel als zieken.

In de Fransche klinieken is deze methode langen tijd in gebruik geweest, ook al heeft o.a. Scheel¹²⁴⁾ erop gewezen, dat de reactie niet specifiek is, aangezien ook luteine tot het vormen van den blauwen ring aanleiding kan geven. De meeste onderzoekers waren van meening, dat het luteine bij den mensch zeer zelden en dan nog in zeer geringe hoeveelheden in het serum zou voorkomen en dus geen belangrijke bron van fouten kon vormen. Van verscheidene zijden is erop gewezen, dat onder bepaalde omstandigheden het menschelijk serum aanzienlijke hoeveelheden luteine kan bevatten.

Fouchet²⁰⁾ heeft eveneens een methode bedacht, die in de kliniek ingang heeft gevonden. Ook hij maakt gebruik van het oxydatieproces. Hij slaat n.l. het eiwit met trichloorazijnzuur neer, waarna ferrichloride als oxydans toegevoegd wordt. Het gevolg is, dat een groen-blauw gekleurd neerslag ontstaat, waarvan de kleur met die van een reeks standaardkleuren vergeleken kan worden. De gevoeligheid bedraagt volgens Fouchet 1 : 15.000. Het spreekt vanzelf, dat men met deze methode slechts een gedeelte van het totale bilirubine in het bloed bepaalt, n.l. de fractie, die met het eiwit neergeslagen wordt. Zooals later vermeld zal worden, is deze fractie van zeer uiteenlopende grootte, zelfs bij dezelfde patiënt en bij dezelfde ziekten. De methode kan dus noch op nauwkeurigheid, noch op gevoeligheid aanspraak maken, maar werd in den tijd, waarin zij uitgedacht werd (1918) veel gebruikt.

In 1913 publiceerden Hijmans van den Bergh en Snapper⁶⁸⁾ de diazoreactie, waarbij gebruik gemaakt werd van het azoreagens van Ehrlich om het bilirubine aan te toonen, doordat het hiermede een roode verbinding, azobilirubine, vormt, welke stof als typische eigenschappen heeft, dat de kleur in zuur milieu blauw en in alkalische omgeving groen wordt. Deze reactie is ongetwijfeld met enkele onbeteekenende uitzonderingen (zie Herzfeld⁶¹⁾) specifiek voor bilirubine in het bloed, terwijl ook de

gevoeligheid, die van alle andere reacties overtreft en ongeveer 1 : 800.000 bedraagt. De uitvoering van deze methode is zoo algemeen bekend, dat de nadere vermelding ervan hier achterwege kan blijven. Dat aan deze methode in haar oorspronkelijken vorm groote onnauwkeurigheden verbonden waren, ontging reeds de auteurs niet. Als voornaamste bezwaren golden, dat, althans bij direct reageerende sera, een groote hoeveelheid bilirubine met het eiwitneerslag meegesleept werd en dus verloren ging, zoodat de waarden, die men vond, te laag moesten zijn. *Hijmans van den Bergh* wees erop, dat men dit bezwaar kon verminderen door de sera aanzienlijk te verdunnen, zoodat met alcohol geen neerslag meer ontstond. Vaak werd dan echter de kleur van het azobilirubine te zwak en ook bleef de vloeistof lichtelijk troebel, hetgeen de aflezing niet gemakkelijker maakte. Het tweede bezwaar was de moeilijkheid van het vinden van een goede vergelijkingsvloeistof. Aanvankelijk gaf *Hijmans van den Bergh* aan te gebruiken een oplossing van kunstmatig bilirubine van 1 op 200.000, welke hoeveelheid hij *1 E* noemde. Deze oplossing van bilirubine is echter moeilijk houdbaar en daarom niet te gebruiken, aangezien het telkens opnieuw vervaardigen ervan omslachtig en kostbaar is. Hij gebruikte daarom vervolgens een aetherische oplossing van ferri-rhodanide. De kleur van deze stof verschilt echter niet onbelangrijk van die van azobilirubine en werd daarom later ⁷⁴⁾ vervangen door een oplossing in water van cobaltsulfaat (2,14 g CoSO_4 zonder aq. per L). Deze standaardoplossing, hoewel geenszins ideaal van kleur, is tot nu toe vrijwel algemeen in gebruik bij hen, die de diazoreactie toepassen.

De methode werd het eerst gemodificeerd door *S. J. Thannhauser* en *E. Andersen* ¹⁸⁴⁾. Deze trachten het bezwaar, dat bilirubine met het eiwitneerslag verloren gaat, te ondervangen, door aan het serum niet eerst de alcohol, doch eerst het azoreagens toe te voegen. Bij direct reageerende sera ontstaat dan het azobilirubine, welke stof zeer goed oplosbaar is in alcohol, zoodat bij toevoeging van alcohol wel het eiwit neerslaat, doch de azobilirubine in oplossing blijft. Inderdaad moet deze modificatie van de oorspronkelijke reactie als een groote verbetering beschouwd worden, ook al hebben o.a. *Weltmann* en *Jost* ¹⁴³⁾ er later op gewezen, dat ook bij deze methode

een gedeelte van het bilirubine nog verloren gaat. De tweede modificatie, die genoemde schrijvers invoerden, was het toevoegen van zuur aan de alcoholische oplossing van azobilirubine, waardoor de oorspronkelijke roode kleur in een blauwe overgaat. Deze blauwe kleur is niet alleen constanter, maar ook intensiever dan de oorspronkelijke roode. Inmiddels is dit laatste niet steeds als een voordeel te beschouwen, aangezien het daardoor soms noodzakelijk is de sera sterk te verdunnen, waardoor de fout van de bepaling groter wordt. Als vergelijkingsvloeistof gebruiken ook *Thannhauser* en *Andersen* een oplossing van kunstmatig bilirubine. Later werd ook gebruikt een oplossing van indigoblauw. De uitvoering is in het kort als volgt: 2 cc. serum + 1 cc. reagens. Wachten tot de maximale kleurintensiteit is bereikt. Toevoeging van 5,8 cc. 96 % alcohol en 2 cc. verzadigd ammonium sulfaat. Centrifugeeren, 0,9 cc. filtraat + 0,1 cc. geconcentreerd zoutzuur. De verdunning bedraagt 1 op 5. Op deze wijze uitgevoerd, geeft de methode aanzienlijk hoogere waarden dan de diazoreactie in haar oorspronkelijken vorm.

Ook de onderzoeken van *Vogl en Zins*¹⁴¹) wijzen erop, dat met het eiwitneerslag groote hoeveelheden bilirubine verloren gaan. Hun methode, die erop berust, in navolging van *Fouchet*, het eiwit met trichloorazijnzuur neer te slaan, welk neerslag aan de lucht of bij verwarming groen kleurt, toont vooral bij afnemende icterus soms bilirubine in pathologische hoeveelheden aan, terwijl de diazo-reactie dan reeds weer normale getallen aangeeft, blijkbaar, doordat er meer bilirubine met het eiwitneerslag meegaat, dan er in de alcohol achterblijft. Zooals wij later zullen zien, is dit steeds bij afnemende icterus met een directe reactie het geval. Het nadeel van de methode, die bilirubine aantoonst in het eiwitneerslag, is dan ook, dat zij geen bilirubine aantoonst met indirecte reactie, aangezien deze niet of nauwelijks met het eiwit neerslaat. Inderdaad berichten *Vogl en Zins*, dat het hun niet gelukt is bij normale personen bilirubine in het serum aan te toonen, terwijl zij over gevallen van haemolytische icterus niets bericht hebben.

J. Murakami en *H. Nishida*¹⁰⁸) bevestigden de resultaten van *Hijmans van den Bergh* en vonden eveneens, dat

de gevoeligheid van de diazoreactie grooter is, dan die van Vogl en Zins.

K. Franke⁴⁷⁾ paste een oud reagens op bilirubine toe om dit in de urine aan te toonen. Na toevoeging van methyleenblauw aan bilirubinehoudende urine ontstaat n.l. een groene kleur.

Roch⁴⁸⁾ heeft er echter op gewezen, dat de groene kleur het gevolg is van een menging van de kleur van methyleenblauw en de gele kleur van bilirubine.

Reeds vroeger heeft G. Haselhorst⁵⁶⁾ deze methode onderzocht en eveneens aangetoond, dat het methyleenblauw geen reagens op bilirubine is. Hij raadde aan als vergelijkingsvloeistof voor de diazoreactie te nemen een alcoholische oplossing van Bordeauxrood, terwijl de kleuren vergeleken werden in een toestelletje, dat overeenkomst vertoonde met de haemoglobinometer van Sahli.

In 1928 heeft Haselhorst⁵⁷⁾ nog eens verslag gedaan over de ervaringen met zijn bilirubinometer, welke gunstig luiden.

Ook E. de Micheli¹⁰³⁾ wijst op de moeilijkheid de kleuren te vergelijken van azobilirubine en ferrirhodanide en meent, dat de colorimeter volgens Haselhorst de vergelijking gemakkelijker maakt.

Kapsinow⁸²⁾ nam waar, dat urine, die bilirubine bevatte, met Obermayers reagens (wanneer hij dit voor de indicanreactie gebruikte) een groene kleur gaf. Deze kleur was natuurlijk het gevolg van de aanwezigheid van biliverdine, dat door oxydatie uit de bilirubine ontstaat.

Ook op serum heeft deze auteur de reactie toegepast en volgens hem heeft zij een vrij groote gevoeligheid, hoewel deze, zooals uit de berekeningen blijkt, niet zoo groot is als de diazoreactie.

Herzfeld⁶⁰⁾ bewees, dat de diazoreactie niet geheel specifiek is voor bilirubine, aangezien ook indol en pyrrol de diazoreactie geven. Het is dus mogelijk, dat hierdoor fouten in de bilirubinometrie ontstaan. Hij voert daarom een reactie in, waarbij hij gebruik maakt van het reagens van Hammett (salpeterzuur en zoutzuur), dat bilirubine tot biliverdine oxydeert. Van het serum wordt een reeks verdunningen gemaakt en aan iedere verdunning een zekere hoeveelheid reagens toegevoegd. Men gaat na bij welke verdunning nog een groene verkleuring waarneembaar is. Begrijpe-

lijkerwijze is de persoonlijke fout bij het aflezen groot. Herzfeld zelf geeft op, dat men met zijn reactie nog 0,016 mgr bilirubine kan aantonen.

L. Frigyer⁴⁸⁾ vergeleek de methoden van Hijmans van den Bergh en Herzfeld. Hij komt tot de conclusie, dat de eerste het gevoeligste is, doch dat de laatste waarschijnlijker uitkomsten geeft bij sterke icterus. Het verschil moet wel in de fout liggen, die het eiwitneerslag veroorzaakt, doordat het veel bilirubine bevat. Bij geringe graden van icterus en vooral bij icterus, waarbij het serum de indirecte reactie geeft, speelt deze adsorbtie geen groote rol en zijn de uitkomsten van beide methoden vrijwel gelijk. De schrijver vestigt er echter de aandacht op, dat ook de methode van Herzfeld verre van nauwkeurige resultaten geeft.

E. Meulengracht^{100, 101)} paste een zeer eenvoudige methode toe om het bilirubinegehalte van het bloed te schatten. Hij vergeleek daartoe de kleur van het serum met die van een andere gele oplossing. Aanvankelijk gebruikte hij een ferrioplossing. Later, aangezien die beter houdbaar was, een oplossing van kaliumbichromaat van 1 op 10.000. Ten onrechte nam hij aan, dat de gele kleur van het serum steeds alleen door bilirubine veroorzaakt wordt en dat luteïne bij den mensch geen rol speelt. Ook ging hij het verband na tusschen bilirubinaemie en bilirubinurie. Hoewel hij waarnam, dat bilirubinurie pas optreedt, wanneer de bilirubinaemie een behoorlijke waarde heeft bereikt en er dus vermoedelijk een drempelwaarde bestaat voor bilirubine in de nier, kon hij een nader verband tusschen beide niet leggen; natuurlijk ook, omdat hem het verschil tusschen het indirecte en het direct reagerende bilirubine moest ontgaan. Hoewel dus de methode, zooals vanzelf spreekt, geen specifieke reactie is, is deze tot op den huidigen dag door zijn buitengewone eenvoudigheid nog in algemeen gebruik.

Meulengracht heeft later zijn methode en die van Hijmans van den Bergh nog eens aan critiek onderworpen, doch zegt niet te gelooven, dat de luteïnaemie een foutenbron kan zijn. De methode van Hijmans van den Bergh heeft als grootste nadeel de eiwitadsorbtie van het bilirubine. Meulengracht vestigde er reeds de aandacht op, dat de hoeveelheid bilirubine, die met het eiwit neerslaat, sterk wisselt. Volgens zijn mee-

ning hangt dit samen met den tijd, waarin de bilirubine in het bloed blijft. Bij plotselinge afsluiting wil het hem voorkomen, dat er weinig, bij langer bestaande icterus veel bilirubine met het eiwit neerslagen wordt.

J. Förster⁴⁵⁾ heeft getracht de methode van Meulengracht te verbeteren door niet de kleur van het serum, doch de kleur van het alcoholfiltraat te vergelijken. Zeer terecht wijst hij er n.l. op, dat de uitvoering van de methode Meulengracht bemoeilijkt of zelfs onmogelijk kan worden, wanneer haemolyse optreedt of wanneer het serum sterke opalescentie vertoont. Deze bezwaren verdwijnen, wanneer men met het alcoholfiltraat werkt. Omdat het serum hierbij echter sterk verdund wordt (1 op 4), ont-eiwit Förster niet met alcohol, doch met kleurlooze aceton (1 op 1). Het bezwaar van de methode Meulengracht, dat luteine stoort, blijft echter bestaan, terwijl er als nieuw bezwaar bijkomt, dat ook hier bilirubine met het eiwitneerslag verloren zal gaan. Resultaten van deze modificatie zijn medegedeeld door J. Förster en B. Förster⁴⁶⁾. Zij vonden in den loop van één week slechts minimale wisselingen bij denzelfden persoon, terwijl nuchter de bilirubinespiegel meestal iets hooger was. Na een maaltijd konden zij echter niet steeds een duidelijke verlaging waarnemen.

A. Bernheim¹²⁾ heeft de methode van Meulengracht toegepast bij allerlei ziekten. Het getal, dat aangeeft hoeveel maal sterker het serum is dan de vergelijkingsvloeistof (kaliumbichromaat 1 op 10.000), noemt zij de icterus-index. Deze benaming en met haar dus de methode Meulengracht heeft sindsdien in de Amerikaanse literatuur veel ingang gevonden.

Uit vergelijkingen van de oplossing van kaliumbichromaat met een oplossing van kunstmatig bilirubine in verdunde loog, is ons gebleken, dat de icterus-index overeenkomt met 0,4 E bilirubine.

Mededeelingen over de toepassing van de icterus-index volgens A. Bernheim in de kliniek zijn o.a. gedaan door H. P. Maue⁸⁷⁾, G. W. Milroy¹⁰⁸⁾ en Hubbard en Allisson⁶⁵⁾.

N. W. Elton⁸²⁾ heeft de icterus-index vergeleken met de bilirubinewaarden, die met de diazo-reactie verkregen worden. Bij een direct reageerend serum komt een bepaalde icterus-index overeen met een veel geringere hoeveelheid bilirubine dan bij een indi-

rect reageerend serum. Hieruit besluit de schrijver, dat het directe bilirubine het serum intensiever kleurt dan het indirecte.

Ons lijkt het ook mogelijk, dat de eiwit-adsorptie van het directe bilirubine een rol speelt en dat daardoor bij een bepaalde icterus-index een lager gehalte aan direct bilirubine gevonden wordt, dan dat bij een indirect serum het geval zou zijn. In dit laatste geval gaat immers geen bilirubine met het eiwitneerslag verloren.

In ieder geval blijkt hieruit, dat de icterus-index geen zekere maat voor den graad van de bilirubinaemie is.

G. Piotrowski¹¹⁵) geeft een kort overzicht van de tot dusverre gebruikte methoden n.l. de directe vergelijking van de serumkleur, de oxydatie en de diazo-reactie's. Hij vergelijkt onder deze laatste de uitvoering volgens Hijmans van den Bergh, Haselhorst en Thannhauser en prefereert de laatste.

J. W. Mc Nee en Ch. S. Keefer⁹⁹) pasten de methode van Thannhauser toe voor de directe en de oude methode volgens Hijmans van den Bergh voor de indirecte reactie. Als vergelijkingsvloeistof gebruikten zij de waterige oplossing van cobaltsulfaat. Zij deelen hun resultaten en gunstige ervaringen mede.

Walter¹⁴²) heeft eveneens de methode van Meulengracht lichtelijk gemodificeerd. Hij gebruikt n.l. een andere vergelijkingsvloeistof: 10 cc. kaliumbichromaat 1 : 10.000 met 0,2 cc. oplossing van orange-poirier 1 : 10.000. Verder gebruikt hij in plaats van het serum het oxalaat-plasma, omdat men op die manier minder last heeft van haemolyse. Hij geeft een correctie aan voor de berekening op totaal bloed. Ook hij drukt de waarde van de kleur van het serum uit, zooals A. Bernheim dat doet, doch spreekt niet van „icterus-index”, maar van „indice biliaire plasmatique”.

N. Fiessinger en H. Walter^{41, 42}) geven een korte opsomming van de tot 1928 gebruikte methoden. Zij beschouwen de diazoreactie als de methode der keuze en geven aan bij welke ziekten het verrichten van deze reactie nut kan hebben.

E. Enriques en R. Sivo³⁸) hebben getracht het bezwaar, dat zooveel bilirubine met het eiwit neerslaat, te ondervangen door geen alcohol, doch coffeine toe te voegen. Zij voeren de reactie aldus uit: 0,5 cc. serum en 0,5 cc. 20 % coffeino natrium benzoicum en 0,2 cc. reagens. Zij vinden getallen, die aanzienlijk hooger liggen

dan die, welke met de diazo-reactie in den ouden vorm werden gevonden. Dit is niet verwonderlijk voor de directe sera, doch zij worden ook verschillen van 20 % en meer bij indirecte reacties (haemolytische icterus werd niet onderzocht) en zelfs bij normale sera. Zij trekken uit deze laatste bevindingen de conclusie, dat ook bij directe en normale sera een gedeelte van het bilirubine met het eiwit wordt neergeslagen. Wij betwijfelen de juistheid van deze uitspraak, temeer daar ons gebleken is, dat de kleur, die men verkrijgt bij deze methode, niet gemakkelijk met die van de standaardvloeistof te vergelijken is.

L. Jendrassik en A. Czike⁷⁶⁾ hebben eveneens het coffeine toegepast om het bilirubine met het azoreagens te laten reageren. De uitvoering van de reactie wijkt een weinig van die van Enriques en Sivo af. Zij luidt in het kort als volgt: 2 cc. serum en $\frac{1}{2}$ cc. 50 % coffeinonatrium benzoicum en 1 cc. reagens (10 cc. Ehrlich A en 0,1 cc. Ehrlich B). Na 5 tot 10 min. wordt het filtraat verder verdund met 60 % alcohol.

Weltmann¹⁴³⁾ heeft op andere wijze getracht de fout, die door de eiwitadsorbtië ontstaat, te verbeteren. Hij vestigt er de aandacht op, dat, wanneer men de bepaling volgens Thannhauser uitvoert, er een grofvlokkig neerslag ontstaat, dat toch nog een gedeelte van het azobilirubine, dat van tevoren gevormd is, meesleept. Hij voegt daarom niet, zooals Thannhauser, eerst het azoreagens en dan den alcohol toe, doch mengt deze beide en voegt hieraan het serum en vervolgens iets ammoniumsulfaat in substantie toe. Op deze manier toont hij aan hoogere waarden te krijgen dan met de methode van Thannhauser, dus waarden, die dichter bij de werkelijke moeten liggen. Bovendien voert hij als voordeel aan, dat zijn methode zoowel op het directe als op het indirecte serum is toe te passen, terwijl Thannhauser zijn methode slechts op directe sera kan toepassen en voor indirecte sera nog de oorspronkelijke uitvoering gebruikt. Overigens vergelijkt ook Weltmann de kleur van het azobilirubine in zuur milieu.

De reactie wordt als volgt uitgevoerd: $\frac{1}{2}$ cc. reagens (of bij zwakke sera 0,3 cc.) wordt bij 3,9 cc. (resp. 4,1 cc.) 96 % alcohol gevoegd. Hierbij wordt 1 cc. serum gedaan, geschud en 5 min. ge-

wacht tot de maximale koppeling bereikt is. Nu wordt nog een mespunt gepulveriseerd magnesiumsulfaat toegevoegd, 2 min. geschud en gefiltreerd. Bij 0,9 cc. filtraat wordt 0,1 cc. geconcentreerd zoutzuur gedaan. De verdunning bedraagt 1 : 6.

N. Fiessinger, V. Jourdain en D. Touissoul⁴³⁾ voeren als bezwaar van de methode van Weltmann¹⁴³⁾ aan, dat zij bij sterke icterus na toevoeging van HCl een te intensieve blauwe kleur kregen, zoodat de vloeistof aanzienlijk verdund moest worden. Hierdoor neemt de nauwkeurigheid van de methode natuurlijk af. Bij zwakke oplossingen is daarentegen de vloeistof soms te weinig gekleurd om een aflezing mogelijk te maken. Dit laatste kan men echter van de diazoreactie in het algemeen zeggen, zoodat van verschillende zijden erop gewezen is, dat men de hypobilirubinaemieën beter kan bestudeeren met de methode Meulengracht.

M. Chiray en F. Thiebaut²³⁾ wijzen op de moeilijkheden die men ondervindt bij het colorimetreeren van de azokleurstoffen. Noch de aetherische oplossing van ferrirhodanide, noch de cobaltsulfaatoplossing geven goed te vergelijken kleuren. Zij hebben daarom een apparaatje geconstrueerd waardoor het mogelijk is een standaardoplossing van bilirubine langeren tijd te bewaren en dus steeds op gemakkelijke wijze als vergelijkingsvloeistof te kunnen gebruiken.

U. de Castro¹⁸⁾ beschrijft een methode om het directe en het indirecte bilirubine apart te bepalen. Het indirecte bilirubine wordt n.l. geëxtraheerd uit het serum met chloroform, het directe wordt bepaald doordat wordt nagegaan, hoeveel Sabatini's reagens (zoutzuur en natriumnitriet) noodig is om het te oxydeeren, zoodat de diazoreactie wegblijft.

H. Shay en E. Schloss¹²⁸⁾ bespreken de moeilijkheid, de 4 vormen van reactie, die Lephene onderscheidt n.l. de directe, de vertraagd directe, de diphasische en de indirecte reactie, te herkennen. Zij vestigen er de aandacht op, dat zelfs bij de volkomen directe reactie vrijwel nooit aan den eisch van Lephene voldaan wordt, dat de maximum kleurintensiteit binnen 30 seconden bereikt is. Ook zij vonden, dat met de modificatie volgens Thannhauser hogere waarden verkregen worden, dan met de oorspronke-

lijke methode. In het algemeen vonden zij lagere waarden in het plasma dan in het serum.

M. S. Nichols en J. Warren Jackson¹¹⁰⁾ gaven een verbeterde standaard aan voor bilirubinebepaling. In plaats van de oorspronkelijk aangegeven waterige oplossing van cobaltsulfaat, gebruiken zij een oplossing van zoutzure cobaltsulfaat, die zij in gesloten ampullen bewaren. De sterkte van deze oplossing wordt vastgesteld door vergelijking met kunstmatig bilirubine en op dezelfde wijze wordt door de vergelijking met de ampullen, de sterkte van de te onderzoeken sera bepaald. We konden ons er zelf van overtuigen, dat inderdaad de kleur van het zoutzure cobaltsulfaat beter vergelijkbaar is met die van het geazoteerde serum, dan de gewone neutrale oplossing.

G. Hunter⁶⁰⁾ paste bij de bepaling een bufferoplossing toe om beter vergelijkbare kleuren te verkrijgen. Hij ontdekte, dat de volgens de oorspronkelijke beschrijving van Hijmans vanden Bergh samengestelde standaardoplossing van bilirubine geen 1 : 200.000 gram bilirubine bevatte, maar 1 : 250.000. Immers aangegeven werd, dat 0,05 mg bilirubine opgelost werd in 12,5 cc. en niet in 10 cc. alcohol met reagens. De waarden, die in de literatuur in eenheden zijn aangegeven, zijn dus 20 % te hoog. Ook I. M. Rabinowitch¹¹⁷⁾ heeft nog eens op deze fout de aandacht gevestigd. Het is tenslotte merkwaardig, dat de opmerksaamheid van de onderzoekers er niet eerder op gevestigd is. Hunter meent verder, dat een oplossing van 1,9 gr Cobaltsulfaat in 100 cc. water een goede standaard is en dat een standaard van 2,14 gr, zoals Hijmans vanden Bergh en Mc. Nee aangaven, te hoog is.

E. Chabrol, R. Charonnat en A. Busson²¹⁾ vergeleken de reacties van Fouchet en Hijmans vanden Bergh. Zij zijn zeer critisch ten opzichte van deze laatste: terwijl waterige oplossingen van bilirubine goed vergelijkbare kleuren gaven, vonden zij in eiwithoudende bilieus een rose-gele kleur, die de vergelijking moeilijk maakt. Bovendien werden door hen in evenredige verdunningen geen evenredige hoeveelheden bilirubine teruggevonden.

B. Varela en J. Esculier¹³⁷⁾ hebben de methode van de Castro¹⁸⁾ om het directe en het indirecte bilirubine apart te

bepalen, verbeterd door het serum niet een keer, doch herhaaldelijk met chloroform te extraheeren. Met de diazoreactie bepaalden zij aldus de indirecte bilirubinehoeveelheid. Het directe bilirubine bepaalden zij op andere wijzen als de *Castro* het deed, n.l. uit de geëxtraheerde rest van het serum werd ook door middel van de diazoreactie de bepaling verricht. In een latere publicatie hebben *B. Varela* en *P. Recante*¹³⁹⁾ nog een vereenvoudiging van deze methode meegedeeld. De uitvoering is als volgt: 1 cc. serum wordt met 2 cc. 12 % natriumsulfaat gemengd en dit mengsel met 5 cc. chloroform geschud en gecentrifugeerd. De chloroform wordt afgepipetteerd, waarna het serum nogeens geëxtraheerd wordt door chloroform en zoonoodig nog meerdere malen tot het chloroform geen gele kleur meer vertoont. Deze wordt vervolgens op een waterbad van 80° ingedampt. De droge rest wordt opgelost in 0,2 cc. chloroform, 1,7 cc. alcohol 96 % en 0,1 cc. reagens. Na 10 minuten kan men deze vloeistof colorimetreeren. De verdunning bedraagt 1 op 2. Het directe bilirubine wordt bepaald door bij de rest van het serum 0,4 cc. reagens te voegen, te mengen, aan te vullen met 96 % alcohol tot 10 cc., na eenige minuten nog eens 0,2 cc. reagens toe te voegen en te filtreeren. De verdunning bedraagt voor direct bilirubine 1 op 10. De resultaten van de gescheiden bepaling der bilirubine zijn door ons elders besproken.

Ook *W. Kerppola*^{84, 85)}, die de chemische eigenschappen van bilirubine uitvoerig heeft bestudeerd, heeft een chloroform-extractiemethode aangegeven, die het mogelijk maakt, zowel het directe als het indirecte bilirubine, gescheiden te bepalen. Het indirecte bilirubine extraheert ook hij met chloroform, nadat het daarin oplosbaar is gemaakt door toevoeging van zuur. De hoeveelheid galkleurstof in de extracten bepaalt hij òf met de diazoreactie, òf door de gele kleur van het chloroform direct te vergelijken met een vergelijkingsvloeistof. Van al deze chloroformextractmethoden kan men zeggen, dat, zoo ze al exacte waarden geven, ze veel te omslachtig zijn voor het dagelijksch gebruik in de kliniek. Bovendien vertoonen ze, althans uitgevoerd volgens de methode van *Kerppola* de fout, dat ze de lipochromen mee opnemen in het chloroform-extract. Wil men echter de waarden van het directe en indirecte bilirubine gescheiden leeren kennen, dan stellen slechts deze methoden

daartoe instaat. Die van Varela¹³⁸⁾ lijkt ons uit eigen ervaring de eenvoudigste.

F. D. White¹⁴⁶⁾ paste in navolging van Nichols en Jackson het zoutzure cobaltsulfaat toe en vond, dat hiermee goede resultaten bereikt werden. Hij paste, evenals Hunter, een bufferoplossing toe om de maximale koppeling te verkrijgen. Vervolgens berekende hij nauwkeuriger de verdunning bij de methode van Thannhauser en paste deze berekening toe. Hij meent op deze manier betere uitkomsten te verkrijgen. Ook hij geeft aan, dat met de oorspronkelijke methode lagere waarden verkregen worden. In een latere publicatie¹⁴⁷⁾ heeft White de icterusindex van het serum vergeleken met die van het filtraat na onteiwitting met alcohol, welke hij de „residual icterusindex” noemt. De verhouding tusschen icterusindex en residual icterusindex noemt hij de „Icteric ratio”. Deze waarde vond hij bij normale personen en bij lijdens aan haemolytische icterus 1, hetgeen dus zeggen wil, dat bij deze personen geen bilirubine met eiwitneerslag verloren gaat. Hooger dan 1 is zij echter bij obstructie- en toxische icterus. In deze icteric ratio meent hij dus tusschen de eerste en de laatstgenoemde vormen van icterus een differentiaaldiagnosticum te hebben.

G. Daddi²⁷⁾ gebruikt voor de diazoreactie een wat gewijzigd reagens, n.l. kaliumisoparanitrodiazobenzol opgelost in een 5 tot 10 % formalineoplossing tot een sterkte van 1 : 1000 tot 1 : 5000. Dit reagens geeft met bilirubine een rose kleur; volgens de auteurs reageeren alle sera hiermee direct.

F. Ferranti en G. Pisani³⁹⁾ hebben met succes het reagens van Daddi toegepast.

G. Dominici en G. Marengo²⁹⁾ vergeleken de verschillende modificaties van de methode van Hijmans van den Bergh (Thannhauser, Weltmann en Jost, Jendrassik), die van Weltmann en Jost geeft de hoogste waarde. Die van Jendrassik en Hijmans van den Bergh komen vrij goed met elkaar overeen. De waarden van Thannhauser liggen tusschen die van Weltmann en Jendrassik in.

E. H. Bensly²¹⁾ is het opgevallen, dat de verschillen die men vindt wanneer men de methode van Thannhauser en Hij-

mans van den Bergh vergelijkt, bijzonder groot zijn bij afnemende icterus. Blijkbaar gaat dan juist veel bilirubine met het eiwit verloren. Voor het vaststellen van de z.g. latente icterus zijn beide methoden even gevoelig.

V. J. Kazakov⁸³⁾ doet de kwalitatieve proef volgens Vogel en Zins¹⁴¹⁾ waarbij een eiwitneerslag met trichlorazijnzuur wordt veroorzaakt en de quantitative proef volgens Herzfeld⁶⁰⁾ (oxydatie met Hammersten's reagens). Serum wordt dus verdund in een reeks dusdanig, dat de grootste verdunning kleurloos is en vervolgens wordt bij iedere verdunning in een buisje 1 cc. 20 % trichlorazijnzuur gedaan. Nagegaan wordt nu, welk residu zich nog aan de lucht groen kleurt. Aangezien de oplossing, waarin dit plaats vindt, volgens mededeeling van den auteur 1,56 mgr % bilirubine bevat, kan men uit de verdunning de hoeveelheid galkleurstof in het oorspronkelijke serum berekenen.

M. Laemmer en J. Beck⁸⁰⁾ meenen de totale hoeveelheid bilirubine het beste als volgt te kunnen bepalen: 0,5 cc. serum en 0,25 cc. reagens, 2 minuten wachten, toevoegen van 0,25 cc. verzadigd ammoniumsulfaat, schudden en centrifugeren. Zij lezen tenslotte door toevoeging van zoutzuur in sterk zuurmilieu de waarde af.

C. E. May, R. Martindale en W. F. Boyd⁸⁹⁾ isoleerden het bilirubine uit waterige oplossingen door het neer te slaan met bariumchloride en natriumbifosfaat of trifosfaat en dit neerslag vervolgens te azoteeren. Zij probeerden daartoe een reeks azoverbindingen. Ook zij stelden nogmaals vast, dat biliverdine de diazoreactie niet geeft.

E. Chabrol, R. Charonnat en A. Busson²²⁾ voerden de diazoreactie als ringreactie uit en wel in den ouden vorm van Gilbert als „reaction limite”. In het kort beschreven wordt de reactie als volgt uitgevoerd: het serum wordt in een reeks buisjes verdund met 15 % magnesiumsulfaat, b.v. serum 1 : 20, 2 : 20, 3 : 20, 4 : 20 en op deze verdunningen wordt het MgSO₄ 19 : 20, 18 : 20, 17 : 20, 16 : 20 reagens gebracht. Wanneer men nu, zooals Chabrol voorschrijft, 15 minuten wacht, kan men nagaan bij welke verdunning nog een roode ring waarneembaar is. Dit buisje bevat, naar de schrijvers hebben vastgesteld, 2 mg % bilirubine. Al naargelang van de sterkte van het serum zal men dus meer of minder

sterke verdunningen van het serum moeten maken om de „diazoreaction limite” te vinden. Heeft men eenmaal een groot aantal bepalingen met de methode gedaan, dan zal men, afgaande op de kleur van het serum, weten, welke verdunning men ongeveer moet maken, maar zoolang men deze ondervinding nog niet heeft, is het maken van de groote reeks verdunningen, vooral bij wat sterkere sera, een zeer omslachtig werk. Afgezien van dit bezwaar is de reactie zeer eenvoudig uit te voeren en geeft ze exacte resultaten. De overwegingen, waartoe ze aanleiding geeft wat betreft het onderscheid tusschen directe en indirecte reactie, hebben we reeds eerder besproken. Men kan erover van meening verschillen wat de voorkeur verdient: een colorimetrische bepaling of de ringreactie. Chabrol zelf zegt, dat men het eerder eens kan worden over het verschijnen van den rooden ring, dan over de gelijkheid van 2 kleuren. Wij zijn geneigd dit te bevestigen daar waar het de diazoreactie betreft, een reactie, waarbij het vergelijken van de kleuren van azobilirubine en cobaltsulfaat steeds zoo bijzonder moeilijk was. Sinds echter de aflezing in monochromatisch licht is ingevoerd⁷⁶⁾ en men dus nog slechts de intensiteit van eenzelfde kleur hoeft te vergelijken, schijnt ons de colorimetrische bepaling de voorkeur te verdienen.

Vergelijking tusschen de methoden van Hijmans van den Bergh en Grotepass en van Chabrol.

diagnose	reactie	Hijmans v. d. Bergh— Grotepass	Chabrol
lues hepatitis	direct	6 E.	6 E.
gezonde persoon	indirect	0,3	0,5
idem	„	0,3	0,4
cholelithiasis	direct	4	4
constitutioneele hyperbil.	indirect	2,7	2,9
pancreas-ca	direct	28	26
Cholelithiasis?	indirect	3,2	3,3
haemolytische icterus	indirect	11	9,6
pernicieuze anaemie	indirect	2,8	2,2

De twee groote bezwaren van de oorspronkelijke methode *Hijmans van den Bergh* n.l. het groote verlies aan bilirubine met het eiwitneerslag en de slechte vergelijkbaarheid van de kleuren in de colorimeter zijn in een modificatie, die de auteur in 1934 met *W. Grotepass*^{75, 76}) beschreven heeft, vrijwel overwonnen. De schrijvers bevelen n.l. aan, de colorimetrie in monochromatisch licht te verrichten. Wanneer van de verschillende geazoteerde bilirubineoplossingen (directe, indirecte en kunstmatige) met behulp van een bufferoplossing bij dezelfde pH. absorptiecurven gemaakt worden, blijken deze ongeveer hetzelfde verloop te hebben en in het gebied van de maximale extinctie (520—546 $\mu\mu$) samen te vallen. Met behulp van een groen filter, dat slechts stralen tusschen deze golflengten doorlaat (Zeissfilter S 53), kan men de kleuren van geazoteerde sera en een standaardoplossing van bilirubine vergelijken. Evengoed als door een standaardvloeistof kan men het licht op constante wijze door een vast tralierooster laten verzwakken. Met de op die manier verkregen constante intensiteit groen kan men evengoed de azobilirubine vergelijken. Wanneer men van een dergelijke colorimeter of liever photometer, met behulp van oplossingen van kunstmatig bilirubine van bekende sterkten een ijkingscurve maakt, kan men via deze curve direct den afgelezen stand van de colorimeter in de sterkte van de te onderzoeken vloeistof herleiden. In het kort uitgedrukt hoeft men bij de beschreven wijze van werken slechts 2 intensiteiten van dezelfde kleur te vergelijken, hetgeen de bepaling gemakkelijker en eenvoudiger maakt.

Onafhankelijk van deze schrijvers, bevelen ook *A. Krupski* en *F. Almasy*⁸⁷) aan, de sterkte van het blauwe azobilirubine in monochromatisch licht te meten. Men moet dan gebruiken het filter S 57 van *Zeiss* of *Schott* OG2.

De tweede verbetering, die beschreven wordt, is de vermindering van een eiwitneerslag. Reeds vroeger had *Hijmans van den Bergh* hiervoor aanbevolen het directe serum met physiologisch water sterk te verdunnen. Doet men dit, dan krijgt men bijna steeds troebele oplossingen, terwijl bij niet sterke sera dikwijls de verdunning de kleur zoö aanzienlijk doet verzwakken, dat de bepaling daardoor onmogelijk wordt. De schrijvers vonden, dat, wanneer men het serum met 50 % alcohol verdunt, er althans bij een juiste onder-

linge verhouding van alcohol, serum en reagens, geen troebeling ontstaat. Daar de colorimetrie, zooals gezegd, in monochromatisch licht bij een bepaalde pH. moet worden verricht, wordt ook een bufferoplossing toegevoegd (buffer van Mc. Ilvaine, pH. 6,6). De uiteindelijke uitvoering wordt nu als volgt gedaan:

1 cc. serum en 2 cc. reagens mengen en 5 minuten in donker laten staan; aanvullen met aq. dest. tot 5 cc. en met bufferalkohol (90 deelen alcohol 50 % en 10 deelen Mc. Ilvains buffer) aanvullen tot 10 cc. Na 15 minuten is de koppeling volledig en kan de colorimetrische bepaling verricht worden.

De verdunning bedraagt 1 : 10.

De beschreven modificatie is alleen te gebruiken voor direct reagerende sera, voor de indirecte wordt de bepaling volgens de oorspronkelijke methode verricht, maar de aflezing van den colorimeter kan in monochromatisch licht verricht worden. Hoewel deze modificatie als een groote verbetering te beschouwen is en de verkregen waarden de totale hoeveelheid direct bilirubine in het serum uitdrukken, zijn er nog enkele bezwaren aan verbonden. Voor de aflezing in monochromatisch licht kan men niet den colorimeter van Authenrieth gebruiken, doch moet men de beschikking hebben over den veel kostbaarder colorimeter van Klette. Bovendien moet voor iederen colorimeter met rooster een ijkingscurve gemaakt worden, wat voor hen, die geen geoefende chemici zijn, een omvangrijk en moeilijk werk beteekent. Over eenigen tijd zullen echter colorimeters met ijkingscurve door de fabriek worden afgeleverd. En tenslotte is de verdunning (1 : 10) er de oorzaak van, dat de kleur bij de geringere graden van icterus soms te zwak is om in monochromatisch licht te worden afgelezen.

Uit bijgaande tabellen blijkt, dat de methode van Hijmans van den Bergh en Grotepass hoogere waarden geeft dan die van Thannhauser en Andersen of die van Weltmann en Jost. Met de eerst genoemde zijn de verschillen echter niet bijzonder groot. Wat de methode van Weltmann en Jost betreft, deze geeft weliswaar hoogere uitkomsten van de oorspronkelijke methode van Hijmans van den Bergh, doch de getallen zijn veel (tot 50 %) lager dan die, welke met de nieuwe methode gevonden worden. De verschillen zijn vooral groot bij de sera met

directe reactie. Dan is het neerslag, dat op het filter achterblijft, ook intensief rood gekleurd. Voor de indirect reageerende sera geeft de methode van **Weltmann** en **Jost** overeenkomstige uitkomsten met die van **Hijmans van den Bergh**, doch dit is in verband met het ontbreken van eiwitadsorptie bij indirecte reactie niet anders te verwachten. Dat de **Weltmann** en **Jost**, zooals de auteurs pretendeeren, het totale bilirubine in het serum aantoont, kan echter als weerlegd beschouwd worden.

Vergelijking tusschen de methoden van **Hijmans van den Bergh**, **Grotepass** en **Thannhauser** en **Andersen**.

diagnose	Hijmans v. d. Bergh— Grotepass	Thannhauser —Andersen
Cholelithiasis	12,5 E.	11,7 E.
Ca van het pancreas	53.	48.
Idem post oper.	10,5	8,2
Ca van de galblaas	10,2	13,6
Lues hepatis	8,4	7,7
Idem	6,2	3,9
Cholelithiasis	6,2	3,4
Cardiale icterus	6,2	5,4
Leverabces	6.	4,6
Idem	4,1	3,4
Idem	3,9	1,9
Idem	3.	1,3
Icerus e causa ignota	5,8	4,1
Cholelithiasis	4,7	4,7
Idem	3,8	3,6
Idem	3,2	2,2
Catarrhale icerus	3,8	3,5

Vergelijking tusschen de methoden van Weltmann en Jost
en Hijmans vanden Bergh-Grotepass.

Diagnose	Hijmans v. d. Bergh- Grotepass	Oorspr. Hijmans v. d. Bergh	Weltmann en Jost
<i>Sera met directe reactie</i>			
Levercirrhose	24,4	9,1	12
Decompensatio cordis	8,8	1,6	2,6
Catarrhale icterus	3,5	1,2	1,8
"	24.	12,2	16,4
"	31.		15,8
"	17,6	6,5	10,6
"	8,2	1,5	4.
"	7,5	1,3	3,6
Galsteenen	2.	0,3	0,6
Leverlues	6,2	3,5	3,4
<i>Sera met indirecte reactie.</i>			
Haemolytische icterus		10,96	10,5
" (bloed uit miltvene)		20,5	16.
Zelfde geval (bloed uit armvene)		13,2	11,9
Pleurapunctaat		1,2	1,1
Decompensatio cordis		1,5	1,5
Constitutioneele Hyperbilirubinaemie		2,4	2,7
Diabetes		1,2	0,9
Decompensatio cordis		2,1	2,3
Idem		1,5	1,2

HOOFDSTUK III

Over de adsorptie van bilirubine aan het eiwitneerslag

Reeds *Hijmans van den Bergh* had er op gewezen, dat het directe bilirubine zich van het indirecte onderscheidt, doordat o.a. na de onteiwitting met alcohol het neerslag geel gekleurd is, d.w.z. bilirubine bevat, terwijl dit bij het indirecte bilirubine niet het geval is. Zooals we gezien hebben berust een gedeelte van de methoden tot bepaling van het bilirubine in het bloed op oxydatie van dit geel gekleurde neerslag. Het spreekt vanzelf, dat men met deze methoden slechts een gedeelte van het totale bilirubine bepaalt, doch dit bezwaar zou zoo groot niet zijn, wanneer het steeds een constante fractie betrof. Men heeft feitelijk steeds aangenomen, dat de hoeveelheid bilirubine, die neerslaat met het eiwit, ongeveer evenredig is met de totale hoeveelheid in het bloed aanwezige galkleurstof en er zich verder niet mee bezig gehouden. Slechts enkele onderzoekers (*Meulengracht*, *White*, *Bensley*) hadden opgemerkt, dat het neerslag toch wel veel geler was bij afdan bij toenemende icterus of hadden gezien, dat juist bij afnemende icterus zich groote verschillen gingen voordoen tusschen de uitkomsten van bepaalde methodes, zooals die van *Herzfeld* en de oorspronkelijke methode van *Hijmans van den Bergh*. De eerste, die systematisch het verband heeft nagegaan tusschen den graad der eiwitadsorptie van het bilirubine en den klinischen toestand van den patiënt, was *P. Wiemer*¹⁴⁸). Hij onderzocht van vele icterische sera de hoeveelheid bilirubine, wanneer die langs den directen weg werd bepaald en de hoeveelheid bilirubine, die in het serum gevonden wordt na onteiwitting met alcohol, dus volgens de oorspronkelijke methode. De verhouding tusschen beide getallen noemde *Wiemer* de bilirubine-index (niet te verwarren met den icterusindex van *A. Bernheim*). De bilirubine-index bedraagt b.v. 1, wanneer de directe waarde en die, verkregen na alcoholontewitting (door *Wiemer* ten onrechte de indirecte waarde

genoemd), gelijk zijn. Hij vond nu, dat de bilirubine-index bij verschillende sera sterk wisselde, maar slechts schijnbaar zonder eenige regelmaat. Bij afsluiting der groote galwegen is de bilirubine-index (B.I.) n.l. des te lager, naarmate het serum korter na het ontstaan van de afsluiting onderzocht wordt, steeds is de B.I. echter hooger dan 1, d.w.z. dat bij afsluitingsicterus altijd een gedeelte van de gal-kleurstof aan het eiwit geadsorbeerd is. Zoodra echter de oorzaak van de afsluiting opgeheven wordt, stijgt de B.I. en wel des te sneller en hooger, naarmate deze oorzaak vollediger opgeheven wordt. De B.I. kan daarbij waarden van 10 bereiken. Geleidelijk daalt de B.I. dan weer met het geheel verdwijnen van den verhoogden bilirubine-spiegel in het bloed.

Hoe komt het, dat bij afnemende icterus een zoo groot gedeelte van het bilirubine, tot 90 % toe, aan het eiwit geadsorbeerd is? Volgens de voorstelling van *Wiemer* bestaat er in het bloed een evenwicht tusschen de bilirubine, die in het plasma werkelijk opgelost is en die, welke aan de eiwitten geadsorbeerd is. De galzuren verhoogden wellicht de oplosbaarheid van bilirubine. Vandaar, dat volgens *Wiemer* bij beginnende afsluiting, als er ook veel galzuren in het bloed teruggestuwd zijn, het bilirubine grootendeels in oplossing en voor een klein gedeelte slechts aan de eiwitten geadsorbeerd is. Daalt echter bij afnemende icterus de spiegel van de galzure zouten in het bloed, dan zal omgekeerd de oplosbaarheid van het bilirubine afnemen en de eiwitadsorptie verhoogd worden.

Afgezien van het feit, dat deze veronderstelling van *Wiemer* nog bewezen moet worden, zijn er verschillende argumenten tegen in te brengen: bij chronische afsluitingsicterus is het bekend, dat de aanvankelijke verhooging van de galzuren in het bloed kan verdwijnen en de reactie van *Hay* in de urine negatief kan worden, zonder dat de icterus afneemt. Er ontstaat een ictère dissocié, zooals de *Franschen* het noemen. De eiwitadsorptie vonden wij bij chronische afsluitingsicterus soms wel langzaam iets toenemend, doch een zóó sterke stijging als optreedt, zoodra de afsluiting opgeheven wordt, namen we daarbij nooit waar. Zeer gering is ook de adsorptie bij haemolytische icterus, dus daar, waar juist geen verhooging bestaat van de galzuren in het bloed. Door toevoeging van galzuur aan het serum, konden wij in den graad der adsorptie aan het eiwit, geen verande-

ring brengen. Het zou nog kunnen zijn, dat door het langer verblijf van het bilirubine in het bloed, de eiwitadsorptie toeneemt. Dit werd reeds door *Wiemer* onwaarschijnlijk gemaakt. Bewaart men het serum in de ijskast, dan stijgt de adsorptie niet. Deze stijgt, doch gering, wanneer men het serum eenige dagen bij 37° bewaart.

Wij vonden hetzelfde:

v.E. 5 Febr.	directe methode	6,9 E.	B.I. 3,8.
	indirecte methode	1,8 E.	
na 24 uur bij 37°	directe methode	6,7 E.	B.I. 3,9
	indirecte methode	1,7 E.	
na 6 dagen bij 37°	directe methode	4,4 E.	B.I. 3.
	indirecte methode	1,48 E.	

Zoals men ziet, daalt na langer verblijf in de broedstoof, zooals gewoonlijk, het bilirubinegehalte van het serum, doch de adsorptie blijft vrijwel gelijk.

O. Weltmann en *Jost*¹⁴⁴) hebben dezelfde waarnemingen gedaan als *P. Wiemer*. Het totale bilirubinegehalte bepalen deze schrijvers met een door hen aangegeven modificatie van de methode van *Thannhauser*¹³⁴). De hoeveelheid bilirubine na alcoholonteiwitting wordt ook door hen volgens de oorspronkelijke methode van *Hijmans van den Bergh* bepaald. De hoeveelheid bilirubine, die aan het eiwit geadsorbeerd is, drukken zij uit in procenten van de totale hoeveelheid (Adsorptionswert A.W.). Zij stelden in de eerste plaats hetzelfde vast als *Wiemer*: toeneming van de afsluiting, daling van de A.W., afneming van de afsluiting, stijging van de A.W..

Voor de wisselingen van de adsorptie van het bilirubine aan de eiwitten in het verloop van een ziekte met afsluitingsicterus geven de schrijvers een geheel andere verklaring, dan *Wiemer* dit deed. Zij stelden zich voor, dat bij afsluiting van de galwegen een gedeelte van het bilirubine, dat in het bloed opgehoopt wordt, in de weefsels overgaat en dat bij opheffing van de afsluiting allereerst het bilirubine, dat in het bloed aanwezig was zonder dat het met de weefsels in contact kwam, uit de bloedbaan verdwijnt en dat daarna de weefsels het door hen vastgehouden bilirubine weer afgeven. Dit laatste

bilirubine zou door zijn verblijf in de weefsels van eigenschappen veranderd zijn en nu een sterke adsorptie aan de bloedeiwitten gaan vertoonen. Daar dus bij afnemende icterus het bloed grotendeels bilirubine, afkomstig van het weefsel, bevat, zal ook de adsorptie sterk gestegen zijn. Bij chronische afsluitingsicterus vonden *Weltmann* en *Jost* adsorptiewaarden van 30 tot 50 %, hetgeen met onze bevindingen overeenkomt. Zoo meenden zij, dat bij het indirecte bilirubine in principe hetzelfde adsorptieverschijnsel zich voordoet. Bij icterus met indirecte reactie komen echter belangrijke wisselingen in de bilirubinaemie niet voor, vandaar, dat ook de adsorptie weinig wisselt. Bovendien, zoo zeggen de schrijvers, zal door de hoeveelheid bilirubine, die in het bloed aanwezig is, slechts weinig contact met de weefsels plaats vinden. Bereikt echter een haemolytische icterus een belangrijke hoogte met sterke wisselingen, dan zou men eveneens een toeneming van de A.W. kunnen zien. Bij wijze van voorbeeld geven de schrijvers de curve van een patiënt met endocarditis en insufficiëntia cordis. Zij nemen aan, dat de icterus hierbij van haemolytischen oorsprong is. Helaas geven zij geen bijzonderheden over den aard van de reactie van het serum. Uit het feit, dat de urine bilirubine bevatte, meenen we echter te mogen besluiten, dat dit geval er een was met directe reactie. Wij zagen, ook bij sterke haemolytische icterus (15 E.), nimmer eenige eiwitadsorptie van beteekenis blijkens het witgekleurde neerslag en zouden zelfs willen zeggen, dat het al dan niet bestaan van een adsorptie van belang is voor de differentieel-diagnose tusschen direct en indirect bilirubine. Tenslotte hebben *Weltmann* en *Jost* de eiwitadsorptie in verband trachten te brengen met de drempelwaarde van het bilirubine. Zij namen waar, dat bij afnemende icterus het serum nog vrij veel bilirubine bevat, terwijl toch bilirubinurie ontbrak. De drempelwaarde van 4 E, die *Hijmans van den Berg* indertijd vaststelde, gaat dus blijkbaar niet steeds op. De schrijvers meenen, dat de mate van eiwitadsorptie van groote beteekenis is voor het ontstaan van bilirubinurie: is deze adsorptie groot, dan ontbreekt volgens hen bilirubinurie, ook al overschrijdt de totale hoeveelheid bilirubine in het serum de 4 E. Wellicht kan slechts het niet geadsorbeerde bilirubine de nieren passeeren. Uit hun getallen zou men echter kunnen afleiden, dat op dezen regel vele uitzonderingen voorkomen. Zoo geven zij een geval, waar-

bij de totale hoeveelheid bilirubine 10 E bedroeg, doch de hoeveelheid niet geadsorbeerde galkleurstof nauwelijks te bepalen was. Hierbij bestond echter bilirubinurie. De schrijvers redden zich uit deze moeilijkheden door aan te nemen dat in de eerste plaats bij albuminurie ook geadsorbeerd bilirubine in de urine overgaat en in de tweede plaats, dat bij cardiale icterus er een bijzonder hooge drempel in de nier bestaat als gevolg van de chronische stuwung. In het geheel onverklaard blijft het ontbreken van bilirubinurie bij haemolytische icterus, dus daar, waar juist een eiwitadsorptie vrijwel ontbreekt.

Wanneer men de getallen, die *Weltmann* en *Jost* verzamelde, om de drempelwaarde vast te stellen, nagaat, dan ziet men, dat de meeste van deze getallen met een drempelwaarde van 4 E (wat de totale hoeveelheid bilirubine betreft) wel overeenkomen, doch dat deze drempelwaarde in sommige gevallen wordt overschreden. Juist in deze gevallen zou het ons interesseeren of de reactie in het serum direct of indirect was, doch zooals gezegd, ontbreken hieromtrent aanwijzingen. De geringe hoeveelheid adsorptie, die blijkbaar in sommige van genoemde gevallen bestaat, doet ons vermoeden, dat de reactie voor het overschrijden van den drempel een verklaring zou kunnen geven, aangezien bij indirecte reactie van het serum toch practisch nooit bilirubinurie wordt gezien. De schrijvers wijzen er nog op, dat de A.W. voor het stellen van de prognose van belang kan zijn. Stijging van de A.W. is veelal het eerste teeken van afnemen van de icterus, daar, waar de huidskleur nog geen veranderingen vertoont, of de totale hoeveelheid bilirubine met de gebruikelijke methode bepaald, nog niet duidelijk daalt.

N. Fiessinger, *V. Jourdain* en *D. Toissoul*⁴³⁾ hebben de proeven van *Weltmann* en *Jost* herhaald. Zij vergeleken de methode van deze schrijvers¹⁴⁶⁾ met die van *Hijmans van den Bergh* en van *Jendrassik*. In het algemeen gaven de methoden van *Weltmann* en *Jost* en *Jendrassik* dezelfde resultaten. De oude methode gaf lagere getallen. Bij directe bilirubinaemieën met lagen spiegel en bij indirecte bilirubinaemieën gaf daarentegen de oude methode hogere waarden, dan die van *Weltmann* en *Jost*. Soms was met de methode van de laatsten in het geheel geen bilirubine meer aan te toonen, terwijl dit nog wel het geval was met die van *Hijmans van den*

Bergh. Bij sterkere bilirubinaemieën is de blauwe kleur in het alkalische milieu soms zoo sterk, dat verdund moet worden. De groote verdunning veroorzaakt een onnauwkeurigheid bij de colorimetrische bepaling, hetgeen Fiessinger als een nadeel van de methode van Weltmann en Jost ziet. Ook wij vonden, dat wanneer men de aflezing deed in het neutrale milieu, de getallen van Weltmann en Jost geenszins, zooals zij beweerden te doen, de totale bilirubine weergaven, maar niet onbelangrijk lager liggen dan die, welke men met de methode van Hijmans van den Bergh en Grotepass vindt.

Wat de eiwitadsorptie betreft, ook Fiessinger en zijn medewerkers namen een stijging waar, zoodra de afsluiting van de groote galwegen opgeheven wordt. Merkwaardigerwijze wijken de getallen, die zij geven, sterk af van die van Weltmann en Jost en Wier. Bij beginnende afsluiting vinden zij n.l. 0 % adsorptie. Bij afnemende icterus stijgt de adsorptie tot 50 %, een enkele maal tot 75 %. Vooral de eerste getallen zijn wel geheel in tegenspraak met de bevindingen van de eerstgenoemde onderzoekers en die van ons. 0 % adsorptie vonden wij nooit bij directe icterus. Bij beginnende afsluiting is de adsorptie meestal, zoodra de bilirubine in het serum verhoogd is en de directe reactie geeft, grooter dan 0 %. Weltmann en Jost geven op als getallen, die zij in het begin van een afsluiting vonden: 10 tot 50 %. Ook wij vonden dergelijke waarden. Dat Fiessinger en zijn medewerkers soms geen adsorptie vonden bij zijn gevallen van afsluitingsicterus, moet wel aan de door hen gebruikte techniek tot bepaling van het totale bilirubine liggen. Deze techniek vermeldden zij echter niet. Om dezelfde reden is het niet duidelijk waarom zij bij afsluitingsicterus met de methode van Hijmans van den Bergh hogere waarden vonden dan met die van Weltmann en Jost of Jendrassik. Bijna alle onderzoekers hebben het omgekeerde vastgesteld.

Zij toonden ook aan, dat de adsorptie niet toeneemt door verdunning van het icterische serum met physiologisch water of met serum van normale personen of door het serum te bewaren bij 37°. Deze feiten werden ook door ons vastgesteld. Fiessinger ziet ook verband tusschen de adsorptie aan de eiwitten en de reactie van het bilirubine. Neemt b.v. een catarrhale icterus af, dan stijgt de adsorptie-

waarde, terwijl met het afnemen van de icterus vaak een diphasische reactie gaat optreden. Men neemt dus tegelijkertijd een verhoogde adsorptie en een vertraging van de reactie waar. De schrijvers gelooven daarom, dat tusschen beide een oorzakelijk verband bestaat. Fiessinger neemt aan, zooals Weltmann en Jost dat ook deden, dat bij afnemende icterus het bilirubine uit de weefsels (bilirubine de retour) het bilirubine in het bloed (bilirubine d'aller) overtreft. Het bilirubine de retour zou de indirecte reactie geven en er daardoor de oorzaak van zijn, dat bij afnemende icterus de reactie eerst diphasisch en tenslotte indirect wordt. Op dezelfde wijze verklaart hij de indirecte reactie onder physiologische omstandigheden en ook bij haemolytische icterus als het gevolg van het langdurige contact van het serumbilirubine met de weefsels. Ook hier komt volgens zijn opvatting slechts bilirubine de retour in het bloed voor. Het lijkt ons, dat zij, evenals trouwens enkele andere onderzoekers, geen scherp onderscheid maken tusschen het indirect reageerende bilirubine (bilirubine dissimulée) en het aan het eiwit geadsorbeerde bilirubine. Men stelt zich inderdaad voor, dat het indirecte bilirubine aan het eiwit gebonden is en daarom niet met het azoreagens reageert. Misschien, dat de alcohol deze binding verbreekt. Geheel anders is het met het directe bilirubine. Dit reageert *in zijn geheel* met het reagens. Toevoeging van alcohol doet echter met het eiwit een gedeelte van het bilirubine neerslaan. Bij indirect reageerende sera slaat met het eiwit bijna geen of in het geheel geen bilirubine neer. Er bestaat dus een groot verschil tusschen het indirecte en het aan het eiwit geadsorbeerde, doch direct reageerende bilirubine. De waarneming, dat bij afnemende icterus de reactie soms vertraagd wordt, is juist, d.w.z. de reactie wordt somtijds diphasisch, doch deze diphasische reactie is, naar ook uit de geregistreerde curve blijkt, een directe reactie. Verband tusschen reactiesnelheid en adsorptiegraad konden wij nooit vaststellen. Ook al vonden wij een adsorptie van meer dan 90 %, dan toch nog was de reactie volkomen direct. De indirecte reactie heeft wellicht als meest typisch kenmerk het ontbreken van een eenigszins belangrijke eiwitadsorptie.

Ook V. Jourdain⁸⁰⁾ heeft zich met het vraagstuk van de eiwitadsorptie beziggehouden. Hij heeft tevens nog eens den samenhang tusschen de cholesterinespiegel van het bloed, het eiwitspectrum

en de diazoreactie nagegaan. Hij kon nog eens bevestigen, dat een samenhang tusschen de samenstelling van het plasma en de snelheid van de diazoreactie niet bestaat, iets wat aanvankelijk door sommige onderzoekers (o.a. *Adler* en *Strauss*) beweerd werd.

Dat met het stijgen van de bilirubinaemie de reactie direct wordt, is een opvatting, die eveneens door vele onderzoekers gehuldigd wordt, doch door *Jourdain* weerlegd werd. Voegde hij aan serum een oplossing van bilirubine in soda toe, welke oplossing direct reageert, dan bleef deze oplossing van alkalisch bilirubine in serum tot in sterke verdunningen de directe reactie geven. *Jourdain* neemt, met vele anderen, twee chemisch verschillende soorten bilirubine aan. Hij wijst op de onderzoeken van *Griffith* en *Kaye*⁵³), die chemische verschillen vonden tusschen het bilirubine uit de direct reagerende sera en het, door toevoeging van alkali aan kunstmatig bilirubine, direct reagerend gemaakte bilirubine.

Wat de eiwitadsorptie betreft, bevestigt hij de fenomenen, die *Wiemer* en *Weltmann* en *Jost* het eerst hebben waargenomen. Dat hij, zooals reeds in de publicatie met *N. Fiessinger* vermeld werd, in gevallen, waarbij de intensiteit van de icterus weinig wisselde, doch de reactie direct was, meestal 0% adsorptie vond, verbaast ons. Hij vestigt er verder zeer terecht de aandacht op, dat de vertraagde reactie, die men vaak bij afnemende icterus waarneemt, tegelijk met de sterke verhooging van de adsorptie aan de eiwitten, een geheel andere beteekenis heeft, dan de indirecte reactie bij haemolytische icterus. Zooals gezegd, maken *Weltmann* en *Jost* en ook *Fiessinger* tusschen beide geen groot onderscheid. Bij de echte, indirect reagerende sera, is de adsorptie juist zeer laag. Om dezelfde reden verwerpt *Jourdain* ook de veronderstelling van *Weltmann* en *Jost*, dat in de normale sera het bilirubine de indirecte reactie geeft, omdat het met de weefsels zoo langdurig in contact geweest is. Wanneer het juist is, dat het indirecte bilirubine aan de eiwitten gebonden is, dan is deze binding van geheel anderen aard, dan die van het bilirubine de retour met het eiwit.

Wij hebben bij een groot aantal patiënten de hoeveelheid aan het eiwit geadsorbeerde bilirubine nagegaan. Wij deden dit op de volgende wijze: de totale hoeveelheid in het serum aanwezige bilirubine bepaalden wij met de methode, aangegeven door *Hijmans van*

den Bergh en Grotepass. Ongetwijfeld geeft deze methode, daar vorming van eiwitneerslag geheel vermeden wordt, waarden, die als de juiste beschouwd moeten worden. Van hetzelfde serum werd een bepaling gedaan volgens de oorspronkelijke methode, d.w.z. na

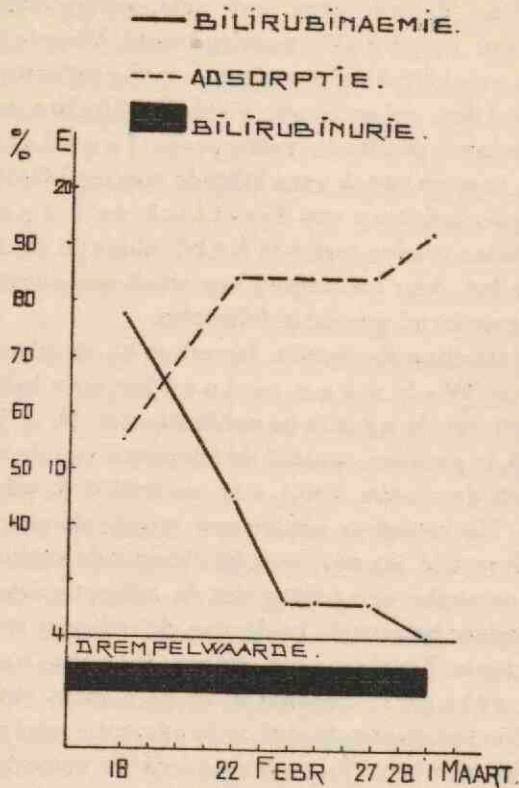


Fig. 1

onteiwitting met alcohol. Beide colorimetrische aflezingen werden verricht in monochromatisch licht, zooals dat vroeger beschreven is. Slechts een enkele maal, als de geazoteerde serumvloeistof te zwak gekleurd was, hebben wij, om vroeger reeds vermelde redenen, de bepalingen niet in monochromatisch licht, doch in een colorimeter van *Authenriet* met cobaltsulfaat als vergelijkingsvloeistof verricht. We hebben de adsorptie slechts nagegaan bij sèra met directe of

althans met diphasisch of vertraagd directe reactie. Bij de indirecte sera worden immers belangrijke wisselingen in den bilirubinespiegel van het bloed in het algemeen niet aangetroffen. Ook is de methode van *Hijmans van den Bergh en Grotepass* op indirecte sera niet uitvoerbaar. Er blijkt nu, dat bij alle directe sera, in welk stadium wij ze ook onderzochten, een gedeelte van het bilirubine aan

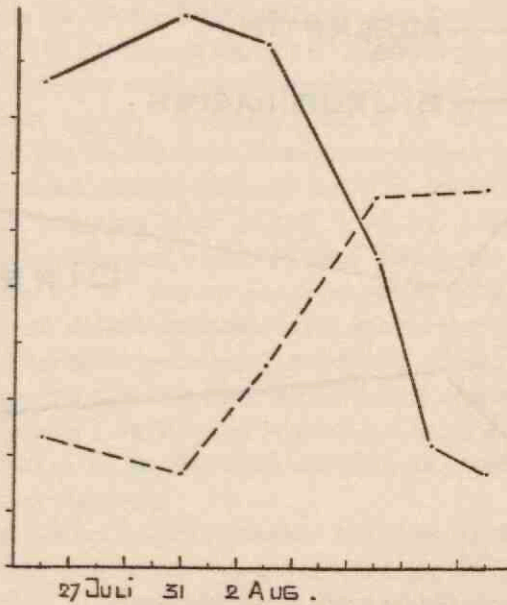


Fig. 2

het eiwit geadsorbeerd is. De waarden, die wij bij deze adsorptie vonden, zijn in het algemeen niet onbelangrijk hooger dan die, welke door de in den aanvang van het hoofdstuk genoemde schrijvers gegeven worden. We schrijven dit toe aan het feit, dat deze onderzoekers met hun methode toch nog niet het totale bilirubine in het bloed bepaalden. Inderdaad geven de methoden van *Thannhauser* en *Weltmann* en *Jost* lagere uitkomsten, dan de methode van *Hijmans van den Bergh en Grotepass*. Soms zijn de verschillen betrekkelijk gering, doch soms vrij aanzienlijk (zie blz. 41). Bij toenemende icterus was het ons slechts zelden mogelijk het serum zeer vroegtijdig te onderzoeken. Meestal toch komen de patiënten met

reeds uitgesproken icterus in het ziekenhuis. Bij catarrhale icterus, die zich overigens juist zoo goed voor de bestudeering van de adsorptie leent, is dat wel bijna steeds het geval. Een enkele maal zagen wij icterus onder onze oogen in het ziekenhuis ontstaan bij eenige patiënten met carcinoom van den kop van het pancreas of met een steen in de ductus choledochus, die aanleiding gaven tot afsluiting van de

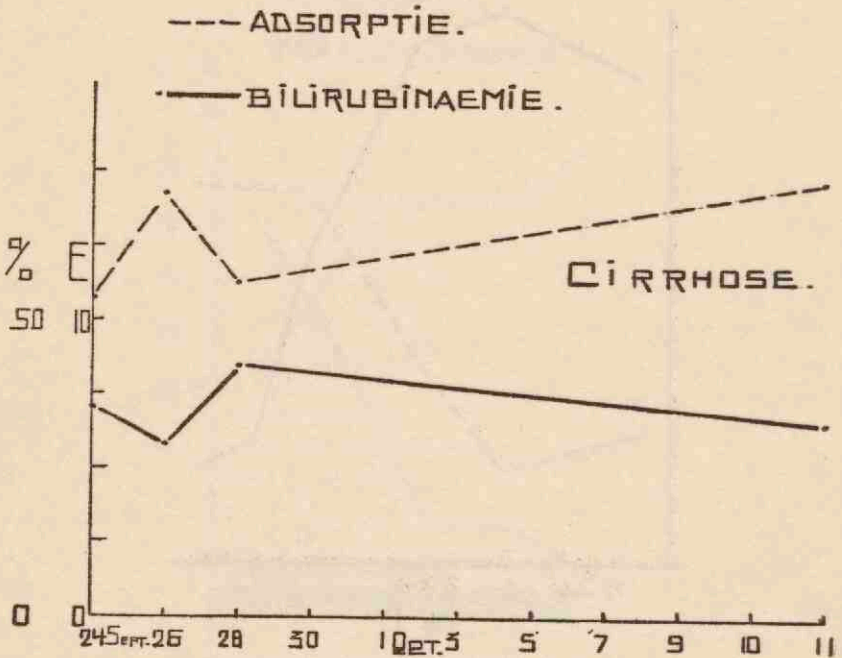


Fig. 3

ductus choledochus. Maar ook in deze gevallen was de bilirubinespiegel van het bloed, tengevolge van de snel toenemende icterus, reeds bij het eerste onderzoek aanzienlijk verhoogd. We vonden bij beginnende toenemende icterus een percentage adsorptie van minstens 30 tot 50 %. Bij verder toenemende icterus, zooals in het genoemde geval van carcinoma van het pancreas, nam de adsorptie, die aanvankelijk ongeveer 40 % bedroeg, geleidelijk af (Fig. 5). Bij patiënten met chronische icterus, waarbij de bilirubinespiegel weinig van hoogte wisselt, zooals b.v. bij de gevallen van levercirrhose, leverabces of

leverlues (Fig. 3, 7), bleef de adsorptie vrijwel constant en schommelde tusschen de 50 of 60 %. Wanneer het juist is, dat het geadsorbeerde bilirubine het bilirubine uit de weefsels (de retour) is, dan is dit geval van 50 % wel te begrijpen. Er zal bij deze chronische gevallen een evenwicht bestaan tusschen het uit de lever in de bloedbaan teruggestuwde, niet geadsorbeerde bilirubine en de uit de weefsels naar het bloed terugstroomende wel geadsorbeerde galkleurstof. Namen, zooals we dat herhaalde malen zagen, de verschijnselen van afsluiting toe, dan daalde ook prompt de adsorptiegraad, hoewel deze daling nooit bijzonder sterk was. Nam daarentegen de bilirubinaemie af, dan volgde parallel daarmee, vooral in den aanvang, een sterke stijging van de adsorptie. Daarbij vonden ook wij, dat de hoeveelheden geadsorbeerd bilirubine 80 tot 90 % van de totale hoeveelheden konden bedragen (Fig. 1, 2, 6, 9, 10, 12, 13). Op den duur daalde de adsorptiegraad weer. Of deze daling zoo sterk was als *Weltmann* en *Wiemer* aangeven weten wij echter niet. Met het afnemen van de bilirubinaemie werd het tenslotte onmogelijk de hoeveelheden bilirubine nauwkeurig te bepalen. Zooals wij reeds eerder hebben gezegd, werd de kleur bij de directe methode tengevolge van de verdunning 1 op 10, vaak te zwak om nog een goede alezing mogelijk te maken en na alkoholontewitting was vaak geen afleesbare kleur meer aanwezig.

Zeer typisch is het verband tusschen adsorptiegraad en bilirubinespiegel tot uiting gekomen in het geval van een patiënt met de ziekte van *Weil* (Fig. 4). Aanvankelijk, in den aanvang der ziekte, daalde met het toenemen van de icterus de adsorptie van 50 tot 30 %. Toen de geelzucht na eenige dagen afnam, volgde een sterke toename van de adsorptie van 30 tot 60 %. De patiënt kreeg echter, nog voor hij genezen was, een recidief, met hooge koorts en toenemende icterus. Daarmede ging gepaard een nieuwe daling van de adsorptie van 60 tot 30 %, tot de patiënt genas en met de snel afnemende icterus de adsorptie van 30 tot 60 % steeg.

Ook wij hebben nagegaan of, zooals *Weltmann* en *Jost* meenen, verband bestaat tusschen de eiwitadsorptie en het al dan niet optreden van bilirubinurie.

Reeds *Hijmans van den Bergh* meende vast te kunnen stellen, dat voor de uitscheiding van bilirubine door de nier een drem-

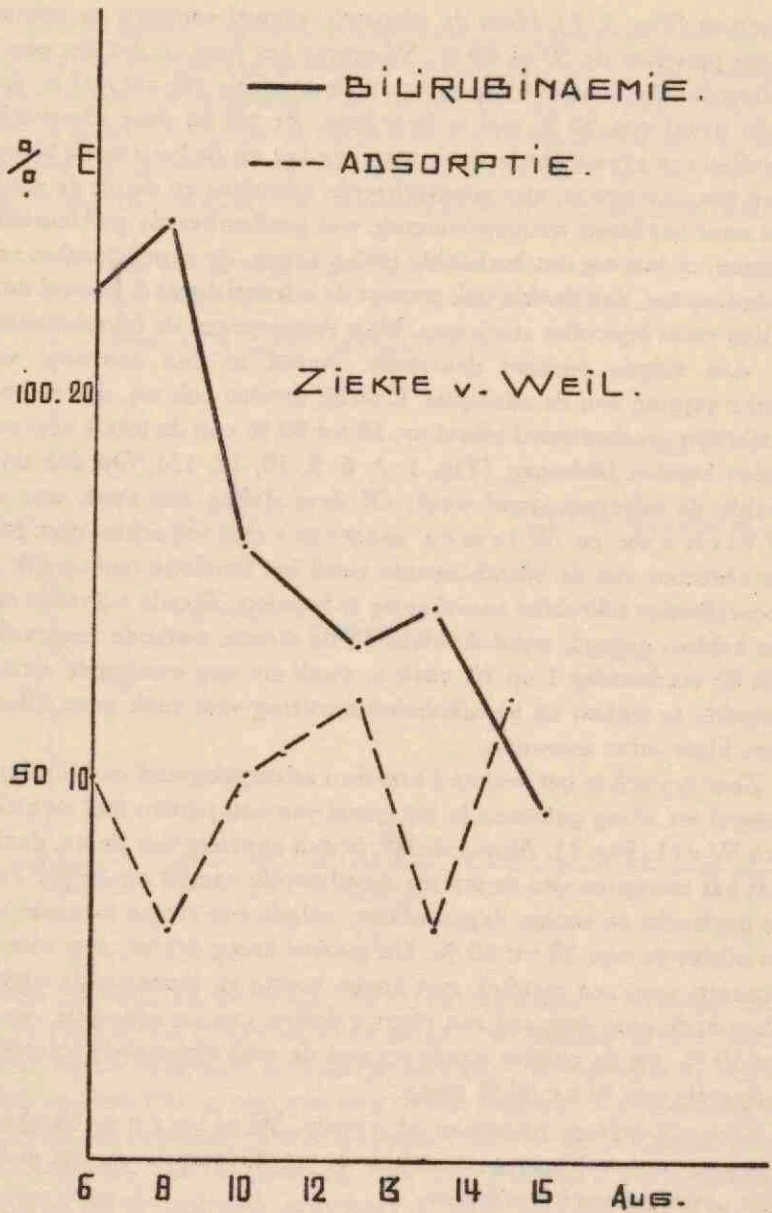


Fig. 4

— BILIRUBINAEMIE.

--- ADSORPTIE.

CA. $\frac{1}{4}$ PANCREAS.

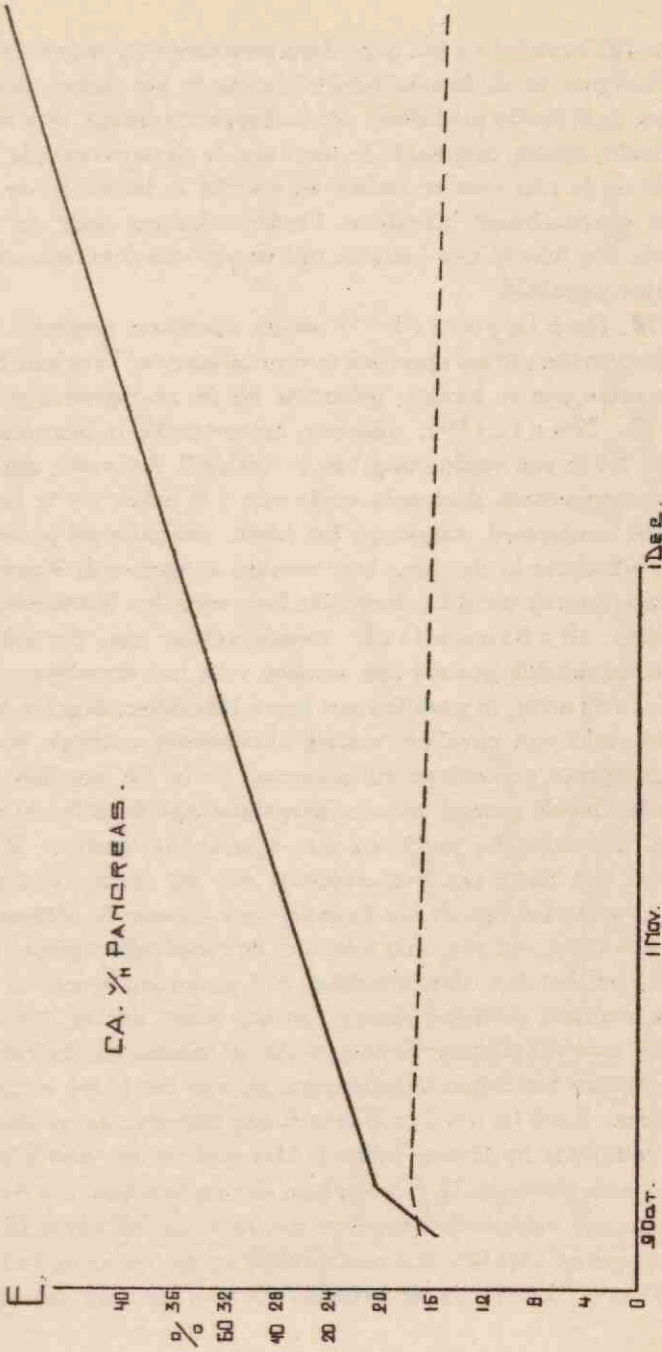


Fig. 5

pelwaarde bestond en dat deze drempelwaarde bij ongeveer 4 E. lag. Het leek ons, nu de hoeveelheid bilirubine in het serum, sinds we de nieuwe modificatie gebruiken, zooveel meer bedraagt, dan men vroeger dacht, nuttig, nogmaals te trachten de drempelwaarde van bilirubine in de nier vast te stellen en daarbij te letten op de hoeveelheden geadsorbeerd bilirubine. Onderzoekingen naar de drempelwaarde zijn juist in den laatsten tijd vooral van Amerikaansche zijde opnieuw ingesteld.

I. M. Rabinowitch¹¹⁷⁾ stelde allereerst nogeens vast, dat de diazoreactie vrijwel specifiek is voor bilirubine. Teneinde bilirubine in de urine aan te toonen, gebruikte hij de zeer gevoelige methode van G. Hunter^{66a)}, waarmee het mogelijk is bilirubine aan te toonen tot in een verdunning van 1 : 660.000. Hij vond, dat de algemeen aangenomen drempelwaarde van 4 E zeker als te hoog moet worden beschouwd, aangezien het bleek, dat zelfs bij patiënten met 0,4 E bilirubine in de urine kon worden aangetoond. Vooral bij afnemende icterus werd bij dergelijke lage waarden bilirubinurie waargenomen. Rabinowitch toonde verder aan, dat albuminurie niet aansprakelijk gesteld kan worden voor het verschijnen van bilirubine in de urine, in gevallen met lagen bilirubinespiegel in het bloed. In een reeks van gevallen, waarin albuminurie ontbrak, vond hij in een evengroot percentage bilirubinurie, als in die gevallen met albuminurie. Zooals gezegd, werden dergelijke lage waarden in het bloed vooral gevonden bij patiënten met afnemende icterus. Rabinowitch ziet hierin een overeenkomst met het gedrag van de bloedsuiker, aangezien ook de nierdrempel voor glucose bij afnemende glycosaemie lager zou zijn, dan wanneer de bloedsuikerspiegel stijgende is. Hoewel het feit, dat bilirubine niet gevonden wordt in de urine onder normale omstandigheden, ervoor pleit, dat er een drempelwaarde voor dit pigment bestaat, wijst het vinden van bilirubine in de urine bij een zoo lagen bilirubinespiegel van het bloed eerder op het tegendeel. Rabinowitch gelooft dan ook niet, dat er een drempel voor bilirubine in de nier bestaat. Het niet vinden van bilirubinurie bij normale personen, is volgens hem slechts te wijten aan het ontbreken van een voldoende gevoelige methode om bilirubine in de urine aan te toonen. Het lijkt ons niet moeilijk op de opvatting van Rabinowitch kritiek uit te oefenen. Ook al zou een zeer gevoelige

— BILIRUBINAEMIE.

--- ADSORPTIE.

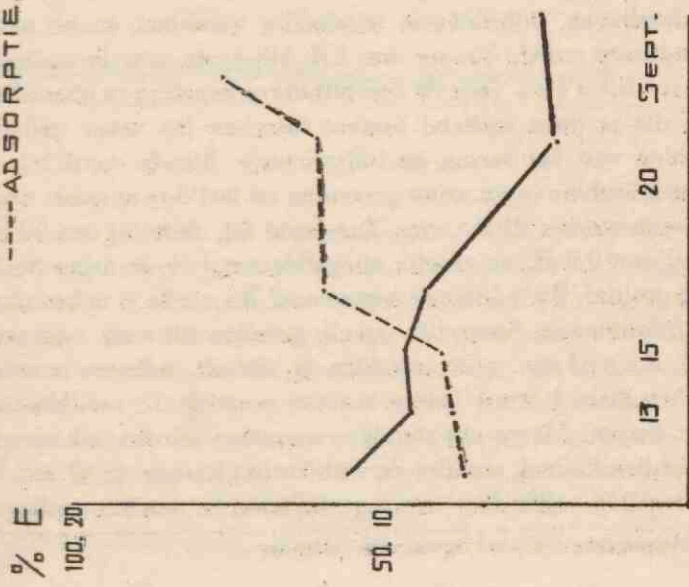


Fig. 6

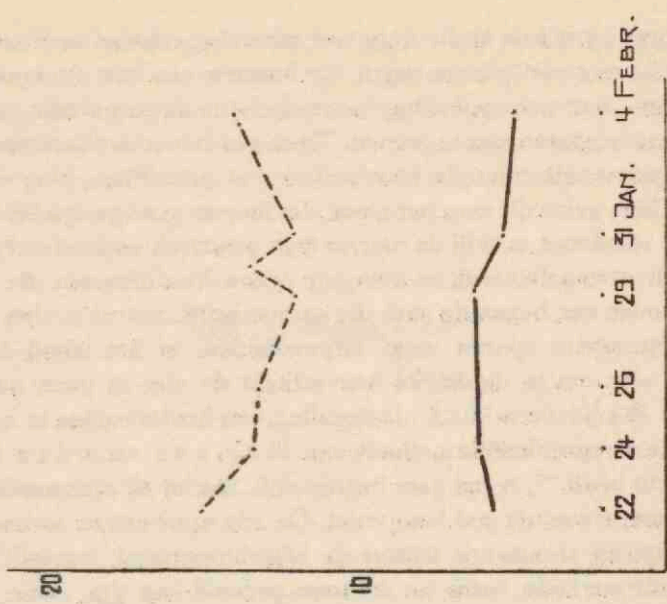


Fig. 7

methode bilirubine in de urine van normale personen aantonen, dan zou dat nog niet pleiten tegen het bestaan van een drempelwaarde. Immers, met zeer gevoelige methode is in de urine ook normaliter glucose in sporen aan te toonen. Toch wordt aan het bestaan van een drempelwaarde voor de bloedsuiker niet getwijfeld. Nog typischer misschien geldt dit voor het eiwit, dat in zeer geringe sporen in iedere urine voorkomt, terwijl de nier er toch practisch ondoorlaatbaar voor is. Als drempelwaarde zouden wij willen kwalificeeren die waarde, waaboven een bepaalde stof, die aanvankelijk niet of slechts in nauw waarneembare sporen werd uitgescheiden, in het bloed aanwezig moet zijn, om in duidelijke hoeveelheid de nier te gaan passeeren. Daar *Rabinowitch* de bepaling van het bilirubine in het serum met de oorspronkelijke methode van *Hijmans van den Bergh* verricht heeft*), is het zeer begrijpelijk, dat hij bij afnemende icterus de drempelwaarde zoo laag vond. De adsorptiecurven maken duidelijk, dat bij afnemende icterus de bilirubinespiegel, bepaald volgens de oude methode, reeds tot de norm gedaald kan zijn, maar, bepaald volgens de nieuwe modificatie, de drempelwaarde nog duidelijk kan overschrijden.

*E. H. Bensley*¹⁰⁾ onderzocht de urine bij patiënten met directe reactie lager dan 4 E, aangezien het toch wel vaststond, dat bij waarden daarboven, bilirubinurie regelmatig voorkomt en bij patiënten met indirecte reactie hooger dan 1 E. Hij geeft aan, de methode van *Thannhauser* voor de kwantitatieve bepaling te gebruiken. Hij vond, dat er geen verband bestaat tusschen het totale gehalte aan bilirubine van het serum en bilirubinurie. Steeds werd bij directe reactie bilirubine in de urine gevonden en wel des te meer, naarmate de reactie sterker direct was. Zoo vond hij, zelfs bij een bilirubinespiegel van 0,9 E, de reactie op galkleurstof in de urine herhaalde malen positief. Bij indirecte reactie vond *Bensley* in het algemeen geen bilirubinurie, hoewel in enkele gevallen dit toch waargenomen werd. *Bensley* wijst er echter op, dat als indirecte reactie door hem beschouwd werd iedere reactie, waarbij de roodkleuring na 30 sec. begon. Als gevolg van deze opvatting werden ook reacties als indirect beschouwd, waarbij de verkleuring binnen de 60 sec. begon. Ongetwijfeld zullen hier dus z.g. diphasische reacties onder vallen.

*) Persoonlijke mededeeling aan den schrijver.

zoals men die bij afnemende icterus vaak vindt en die o.i. grotendeels directe geacht moeten worden. Zijn conclusie luidt, dat het optreden van bilirubinurie afhangt van den aard van het bilirubine in het serum, direct of indirect, en dat voor het directe bilirubine geen drempelwaarde bestaat. In deze laatste gevolgtrekking sluit hij zich dus bij Rabinowitch aan.

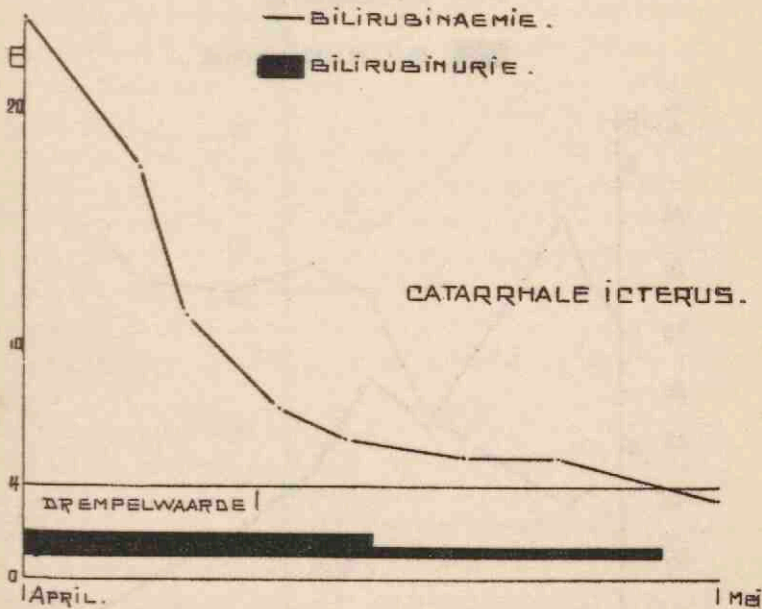


Fig. 8

Wij onderzochten in het algemeen slechts direct reagerende sera om de drempelwaarde vast te stellen. Bij indirect reagerende sera hebben wij nooit bilirubinurie waargenomen, ook al steeg de bilirubinespiegel tot betrekkelijk hooge waarde. Zoo namen wij nog kort geleden een geval van haemolytische icterus waar, waarbij de bilirubinaemie 14,5 E bedroeg, zonder dat de urine galkleurstoffen bevatte. Het ontbreken van bilirubinurie schijnt ons een essentieel kenmerk te zijn van de dynamische icterus, d.w.z. van de gevallen van icterus, waarbij de reactie in het serum indirect is. In de sera werd het totale gehalte aan bilirubine vastgesteld volgens de methode van H i j m a n s

van den Bergh en Grotepass. In de urine hebben wij getracht de galkleurstoffen aan te toonen met de reactie van Huppert-Salkowski. Deze reactie, waarbij in de urine een neerslag van bariumcarbonaat veroorzaakt wordt, welk neerslag de bilirubine

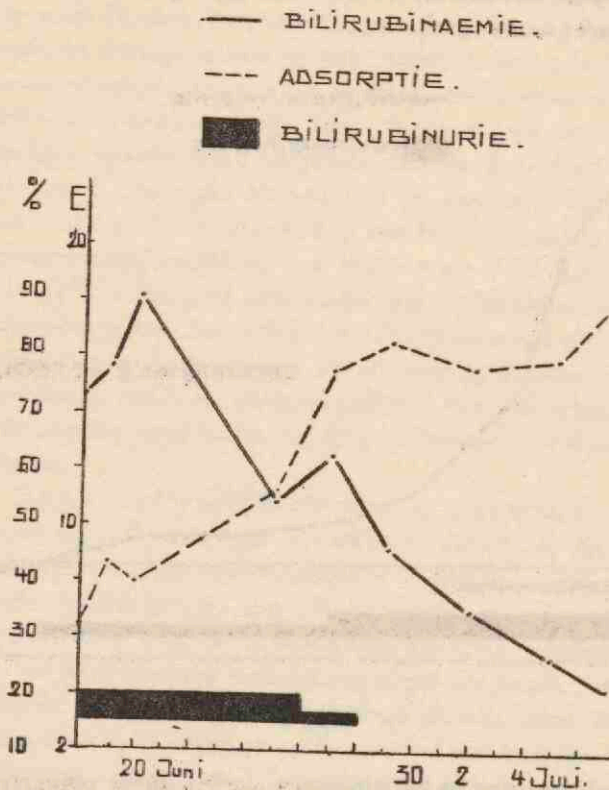


Fig. 9

meesleept, lijkt ons zeer gevoelig. Vooral, wanneer het neerslag in een kleine hoeveelheid zoutzure alcohol wordt opgelost in een wit mortiertje, kan, ook al is er slechts een geringe hoeveelheid bilirubine in de urine aanwezig, toch na toevoeging van 0,5 % natriumnitriet de optredende groenkleuring duidelijk worden waargenomen. Het is mogelijk, dat er gevoeliger methoden bestaan om bilirubine in de urine aan te toonen, wellicht dat dergelijke methoden zelfs bij nor-

male personen positieve uitkomsten zouden geven. Om vroeger uiteengezette redenen achten wij voor het bestudeeren van de drempelwaarde een zoo verfijnde methodiek niet noodzakelijk. Het is bekend, dat onderzoekingen naar de drempelwaarde van het bilirubine in zoverre gemakkelijk zijn, dat de bilirubinespiegel van het bloed slechts langzaam schijnt te dalen of te stijgen. Althans schijnt de spiegel in

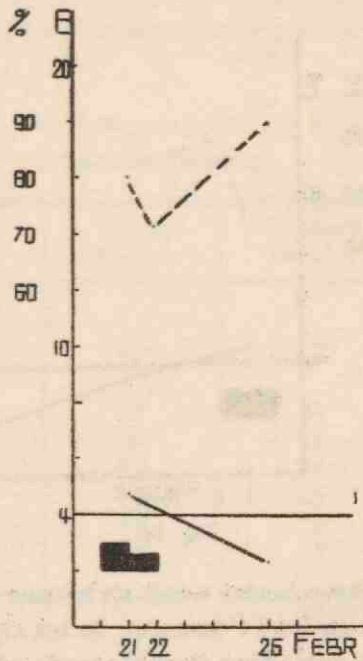


Fig. 10

het verloop van meerdere uren weinig verandering te vertoonen. Dit zal wel daaraan liggen, dat bij afnemende icterus de weefsels haar bilirubine aan het bloed afstaan of omgekeerd bij toenemende icterus het bilirubine uit het bloed opnemen en dus min of meer als „buffer” fungeeren.

Hoe het ook zij, men meent in het algemeen te kunnen aannemen, dat het bilirubinegehalte van het bloed op zekeren dag en de urine van dienzelfden dag wel aan elkaar beantwoorden. Reeds B e n s l e y

vroeg zich af of dit ook opgaat voor snel af- en toenemende icterus en ook wij zijn daarom niet geheel zeker van de waarde van de in de tabel genoemde waarnemingen, waar, bij een bilirubinespiegel van resp. 9 en 11 E, geen bilirubine in de urine aangetroffen werd (Fig. 9). Beide gevallen betroffen patiënten met catarrhale icterus, die snel afnam en waarbij in overeenstemming hiermede een hooge adsorptiegraad bestond. Wellicht dat toch dit geadsorbeerde bilirubine minder

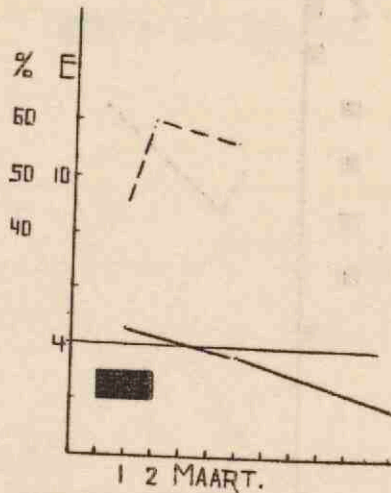


Fig. 11

goed door de nier uitgescheiden wordt als het niet geadsorbeerde, zooals *Weltmann* en *Jost* meenden. In het algemeen toonen echter onze cijfers geen duidelijken invloed van de adsorptie aan (Fig. 1, 8, 10, 11, 13). We konden vaststellen, dat in het algemeen bij daling van den bilirubinespiegel van het bloed beneden de 4 E, gal-kleurstof uit de urine verdwijnt. Het spreekt vanzelf, dat dit getal van 4 E slechts een globale waarde voorstelt. Het is aan te nemen, dat individueele verschillen bestaan, terwijl ook de methodiek een fout van enkele tienden Eenheden met zich brengt. Wanneer we zien hoe groote verschillen er bestaan tusschen de uitkomsten van de oorspronkelijke methode en de door ons gebruikte methode, dan is het merkwaardig, dat we desalniettemin weer de drempelwaarde op 4 E moeten vaststellen.

We vermelden in achterstaande tabellen de door ons gevonden waarden. In het algemeen hebben wij bij de patiënten bij wie de icterus toenam of verminderde, dagelijks de urine op bilirubine onderzocht, terwijl op regelde tijden ook de bilirubine in het bloed werd bepaald. Daar, waar de icterus of bilirubinurie duidelijk afnam, werd dagelijks onderzoek van het bloed verricht. Gevallen, waarbij de icterus, tijdens het toenemen, de drempelwaarde overschrijdt, zijn zeer zelden waar te nemen. De meeste gevallen, waarbij de drempelwaarde bepaald werd, waren patiënten met afnemende icterus.

Gevallen, waarbij de bilirubinespiegel in het bloed om en nabij de drempelwaarde ligt.

Diagnose	Totaal bilirubine	Niet geads. bilirub.	Bilirub. in urine
Afnemende icterus bij leverlues	9,3	1,7	—
Afnemende catarrhale icterus	6,5	3,6	—
Idem, ander geval	11,1	0,8	—
Cardiale icterus	8,8	1,6	pos.
Catarrhale icterus	8,5	3,5	pos.
Cholelithiasis	4,5	1,6	pos.
Leverabces	4,8	1,5	pos.
Vergiftiging met een abortivum	5,9	3,3	pos.
Catarrhale icterus	4,8	1,9	pos.
Galsteenen	5,2	0,6	pos.
Catarrhale icterus	5,2	1,2	spoor
Biliaire pneumonie	3,7	2,1	spoor
Decompens. cordis	4,2	—	spoor
Catarrhale icterus	3,5	1,2	—
Cholelithiasis	3,5	—	—
Idem, ander geval	4,2	1,2	—
Cholelithiasis	4	0,4	—
Idem, ander geval	3,4	1,5	—
Catarrhale icterus	2,3	0,9	—
Cholelithiasis	2,3	0,3	—

Bij eenige van deze patiënten was het verloop als volgt:

Diagnose	Totaal bilirubine	Niet geads. bilirub.	Bilirub. in urine
1. Pat. G. Catarrhale icterus			
19 Sept.	8,5	3,5	pos.
20 "	7	—	pos.
24 "	2,3	0,3	—
2. Pat. V. Ziekte van WEIL			
20 Aug.	8,8	3,4	pos.
27 "	4,5	—	spoor
4 Sept.	2,25	—	—
3. Pat. H. Cholelithiasis			
27 Febr.	5,2	0,6	pos.
1 Maart	4	0,4	—
4. Pat. R. Cholelithiasis			
1 Maart	4,5	2,5	pos.
2 "	4	1,6	pos.
5 "	3,4	1,5	—
5. Pat. B. Catarrhale icterus			
21 Febr.	4,75	1,9	pos.
22 "	4,2	1,2	—
6. Pat. V. Catarrhale icterus			
24 Maart			spoor
25 "			spoor
26 "	3,5	1,2	—
7. Pat. S. Catarrhale icterus			
24 April	5,2	0,2	spoor
1 Mei	3,5	0,6	—

De hoge waarden met bilirubinurie of de zeer lage waarden zonder bilirubinurie hebben wij vanzelfsprekend in de tabel niet vermeld.

Tenslotte zouden wij nog willen terugkomen op de opmerkingen van N. Fiessinger⁴⁸⁾ over het verband tusschen reactie en adsorptiegraad. Bij afnemende icterus namen ook wij, gelijk we reeds

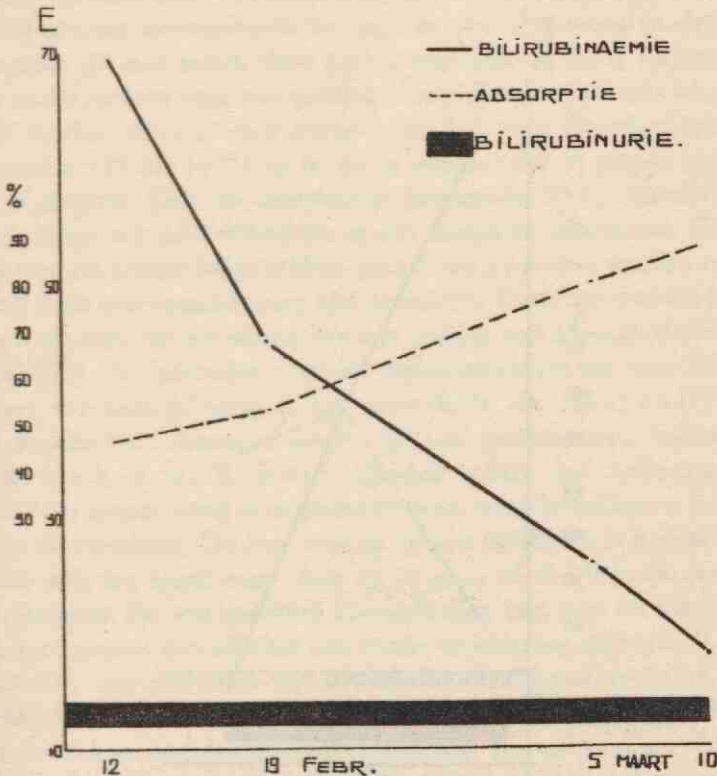


Fig. 12

meer dan eens deden opmerken, een zeer groote adsorptiegraad waar, doch de reactie bleef steeds direct, al was dan ook vaak de reactie niet zoo prompt direct meer als in den aanvang. Het is ook begrijpelijk, dat, naarmate er meer bilirubinemoleculen in het serum aanwezig zijn, de ontwikkeling der roode kleur sneller zal geschieden. Maar zelfs al daalde de bilirubinespiegel tot bij de 1 E, dan nog bleef de reactie, zij het ook diphasisch in den zin van L e p e h n e, direct.

Pas nadat de patiënt langeren tijd zijn icterische tint had verloren en er een normale bilirubinespiegel van het bloed bestond, werd de reactie volkomen indirect.

Bestaat er verband tusschen bilirubinurie en dialysabiliteit van het serumbilirubine?

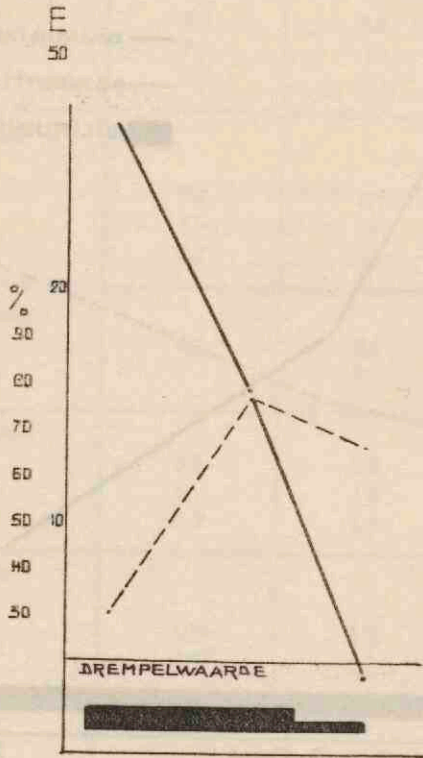


Fig. 13

C. F. Hoover en M. A. Blankenhorn⁶³⁾ vonden het serumbilirubine tegenover gedestilleerd water dialysabel, wanneer er bilirubinurie bestond. Niet dialysabel vonden zij het in die gevallen, die wij thans dynamische icterus zouden noemen (haemolytische icterus en perniciose anaemie). Zij dialyseerden door collodiumzakjes. In een latere mededeeling heeft Blankenhorn noemens deze bevindingen bevestigd¹³⁾. Niet dialysabel vond hij het bilirubine in

gevallen van haemolytische icterus en in de gevallen met directe reactie, waarbij bilirubinurie ontbrak. Blijkbaar beschouwt hij het passeeren van de galkleurstof door de nier als een dialysatieproces.

M. Brulé, H. Garban en Ch. Weismann¹⁷⁾ hebben de proeven van Blankenhorn en zijn medewerkers herhaald en konden de resultaten van deze onderzoekers bevestigen.

Des te meer verwonderde het ons, dat wij er nimmer in slaagden bilirubine uit het serum door collodiumzakjes te laten dialyseeren. We onderzochten sera van patiënten met afsluitingsicterus of catarhale icterus, bij wie zeer hooge waarden voor de bilirubinaemie bestonden (25 tot 30 E) en de urine galkleurstof in groote hoeveelheden bevatte. Ook na dialyseeren gedurende 24 tot tweemaal 24 uur konden wij geen bilirubine in het dialysaat aantoonen. Zoowel sera met als zonder belangrijken graad van adsorptie werden onderzocht, doch een verschil werd niet gevonden. Evenmin was het bilirubine dialysabel uit het serum van een patiënt met haemolytische icterus (12 E). We gebruikten zoowel collodiumzakjes van verschillende dikten, vervaardigd volgens het voorschrift, dat Zainel¹⁴⁹⁾ in zijn proefschrift daarvoor geeft, als ook perkamenten hulzen van Schleicher en Schüll. Zoodra echter het collodiumfilter maar voor sporen eiwit doorgankelijk was, werd bilirubine in het dialysaat aantoonbaar. De zeer geringe sporen bilirubine in het dialysaat neemt men het beste waar door na te gaan of de vloeistof een gele tint vertoont. Bij wat grootere hoeveelheden ziet men na toevoeging van het reagens met alcohol een roode verkleuring optreden. De bevindingen, dat bilirubine niet de collodiummembraan passeert, maar dit slechts doet, wanneer de membraan voor eiwit doorgankelijk is, komen overeen met de onderzoekingen van Bendien en Sapper⁹⁾. Deze vonden, dat bilirubine niet ultrafiltrabel is door collodiumzakjes, doch dat het deze zakjes wel passeert, zoodra ze doorgankelijk voor eiwitten gemaakt zijn. Deze onderzoekers concludeerden daaruit, dat zoowel het indirecte als het directe bilirubine aan het eiwit gebonden is. Het bleek ons echter, dat ook uit galkleurstofhoudende urine de bilirubine niet ultrafiltrabel is, in tegenstelling met urobiline, die wel de collodiummembraan passeert. Daar de onderzochte urines geen eiwit bevatten, kon een binding aan het eiwitmolekuul niet als verklaring gelden voor het niet ultrafiltrabel zijn van

bilirubine. Wellicht is dus het molekuul op zichzelf te groot om het filter te passeeren.

Dialyseerden wij de sera tegenover een mengsel van gelijke deelen water en 96 % alkohol, dan ging zoowel het directe, als het indirecte, bilirubine in het dialysaat over.

Samenvattend kunnen wij dus zeggen, dat het directe bilirubine in het serum gedeeltelijk aan de eiwitten geadsorbeerd is; dat het in het verloop van een afsluitingsicterus wellicht in de weefsels bepaalde veranderingen ondergaat en daardoor voor een grooter gedeelte, soms vrijwel geheel, aan het eiwit geadsorbeerd wordt. Dit geadsorbeerde bilirubine vertoont echter dezelfde eigenschappen als het niet geadsorbeerde en geeft een volkomen directe reactie. Het passeert evengoed de nier, wanneer de spiegel in het bloed die van 4 E overschrijdt en het is evenmin als het indirecte bilirubine of het niet geadsorbeerde directe bilirubine door collodiummembranen dialysabel.

HOOFDSTUK IV

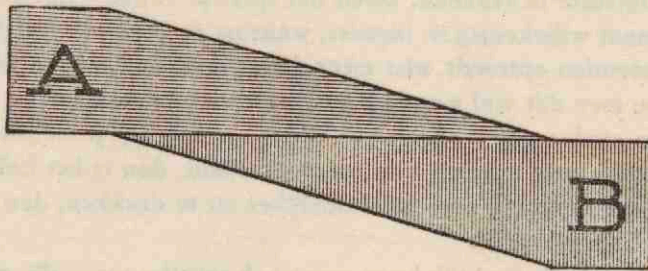
De bestudeering der diazoreactie in den bicolormeter.

Ongetwijfeld is de waarneming van *Hijmans van den Bergh*⁷²⁾, dat er een directe en een indirecte reactie bestaat, van theoretisch standpunt uit bekeken, even belangrijk, als de toepassing van de reactie als zoodanig. In de praktijk echter geeft de onderscheiding van deze beide vormen van de reactie soms tot moeilijkheden aanleiding. Vaak gebeurt het, dat men niet zeker weet of men de reactie direct of indirect moet noemen. Wel heeft *Hijmans van den Bergh* reeds in den aanvang voorgesteld de reactie, waarbij de roode verkleuring binnen de 30 seconden optreedt, direct te noemen en die, waarbij de verkleuring zich na dien tijd ontwikkelt, tot de indirecte te rekenen. Doch het spreekt vanzelf, dat een dergelijke maat willekeurig is; immers, waarom zou een reactie, die b.v. na 35 seconden optreedt, niet meer direct genoemd mogen worden, maar zou men dat wel mogen doen, wanneer de verkleuring enkele seconden eerder opgetreden was? Wanneer men een principieel verschil aan de twee vormen van reactie toekent, dan is het ook wenschelijk een dergelijk verschil duidelijker uit te drukken, dan in een zoo luttel tijdsverschil.

Maar ook in de praktijk komt men vaak reacties tegen die moeilijk bij één van de 2 vormen zijn in te deelen. Zoo heeft men reacties, waarbij de kleursverandering wel terstond na de toevoeging van het reagens zichtbaar wordt, doch de verdere verkleuring zich slechts zeer langzaam ontwikkelt. Deze vorm van reactie werd reeds door *Feigl en Querner*³⁷⁾ de diphasische genoemd. Uit het feit, dat *G. Lepehne* de oorspronkelijke indeeling van 2 vormen van reactie, uitbreidde tot vier (directe-, vertraagd directe-, diphasische- en indirecte reactie) blijkt eveneens, dat bij de praktische interpretatie van de diazoreactie de onderzoekers meermalen in verlegenheid kwamen. Zoo komt het vaak voor, dat de diazoreactie den clinicus geen hulp kan verleen en bij het stellen van de diagnose, daar, waar hij juist voor zijn problemen aan het ziekbed van de

reactie hulp verwacht. Dit is er dan ook voor een deel de oorzaak van, dat vele in hun verwachtingen zijn teleurgesteld en het opgegeven hebben waarde te hechten aan den uitslag der diazoreactie. Prof. H i j m a n s v a n d e n B e r g h heeft daarom met G r o t e p a s s een methode uitgewerkt die in staat stelt het verloop van de reactie te vervolgen en in een curve vast te leggen. De gedachte welke aan deze methode te gronde ligt, is deze: in het verloop van de diazoreactie wordt de gele kleur van het serum, die toch voor het grootste gedeelte aan het bilirubine te danken is, veranderd in de roode kleur van het azobilirubine.

Om dezen overgang colorimetrisch te vervolgen gebruikten zij een instrument, dat in zijn oorspronkelijken vorm aldus was samengesteld. In een der bakjes van een colorimeter van K l e t t of D u b o s q werd het te onderzoeken serum gebracht, waaraan op zeker oogenblik het reagens werd toegevoegd. Het andere bakje werd vervangen door twee holle glazen wiggen, die verschoven konden worden, gelijk bijgaande teekening voldoende duidelijk aangeeft.



De wig A werd gevuld met het te onderzoeken serum, de wig B met een oplossing van azobilirubine, uit dit serum op de gewone wijze vervaardigd. Men begint het stel wiggen zoo te plaatsen, dat het licht door de met serum gevulde wig A gaat, voordat men in het colorimeterbakje het reagens aan het serum toevoegt. De kleur zal dan in beide gezichtsvelden hetzelfde zijn.

Naarmate nu in het bakje de azobilirubinevorming voortschrijdt, zal het wiggenpaar moeten worden verschoven, om in het oculair in beide gezichtshelften gelijkheid van kleur te behouden. Op bepaalde oogenblikken wordt opgeteekend, over welken afstand het wiggenstel verschoven werd; aldus ontstaat de gezochte kromme.

Later werd aldus te werk gegaan:

Onder één der beide bewegelijke cuvetten (A) van een colorimeter van D u b o s q of K l e t t wordt een tweede, iets wijdere

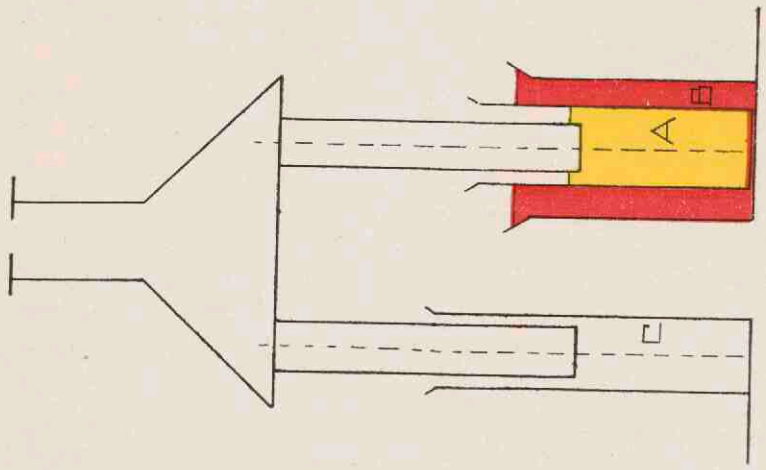


Fig. I.

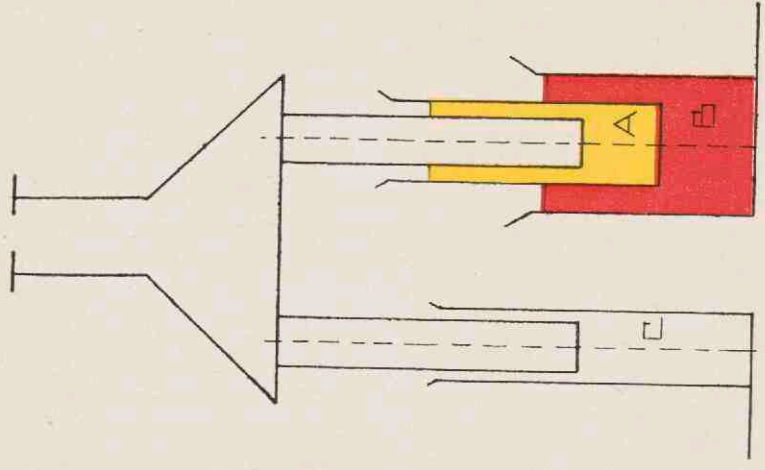


Fig. II.

cuvette (B) aangebracht. Deze cuvette B is onbewegelijk en A kan dus in B dompelen (Fig. 1). In B wordt nu een geazoteerd serum gedaan, in A het niet gediazoteerde serum. Wordt cuvette B zoover mogelijk omlaag gebracht, zooals in Fig. 1 het geval is, dan zal men, door den colorimeter kijkend, aan de rechter zijde slechts een gele kleur waarnemen, want het licht doorloopt aan dien kant slechts het gele, niet gediazoteerde, serum in A.

In den stand van de colorimeter, weergegeven in Fig. 2, neemt men een kleur waar, die bestaat uit een mengsel van rood en geel, want het licht doorloopt eerst de roode vloeistofkolom in B en vervolgens de gele in A.

Staat de colorimeter, zooals aangegeven is in Fig. 3, dan is de waargenomen kleur geheel rood, want het licht doorloopt slechts de vloeistof in B. In den in het eerst genoemden stand, komt de kleur dus overeen met die van niet gediazoteerd serum, in de laatstgenoemde met volledig gediazoteerd serum. De standen, die daar tusschen in liggen en waarvan Fig. 2 een voorbeeld geeft, komen met kleuren, die in het verloop van de diazoreactie optreden, overeen.

De methode wordt nu als volgt uitgevoerd:

Op direct reageerende sera met een behoorlijke sterkte (d.w.z. meer dan 4 E), wordt de diazoreactie gedaan volgens *Hijmans van den Bergh en Grotepass*. Hierbij wordt 1 cc. serum dus tenslotte 10 maal verdund en deze roode oplossing wordt in cuvette B gebracht. Vervolgens verdunt men een andere cc. van het serum tot 8 cc. met physiologisch water. Van dit verdunde serum brengt men gelijke deelen in de beide cuvetten C en A, dus beiderzijds 4 cc. of 2 cc., al naar gelang de cuvetten kunnen bevatten. Vervolgens brengt men de cuvetten A en B aan den eenen kant en C aan den anderen kant op gelijke hoogten, b.v. 30 mm. Kijkt men nu door den colorimeter, dan neemt men links en rechts een gele kleur van gelijke intensiteit waar. Bij C voegt men nu op een zoo nauwkeurig mogelijk vastgesteld moment 1 cc. (heeft men in de cuvette 2 cc. verdund serum gedaan, dan $\frac{1}{2}$ cc.) reagens en bij A, om dezelfde verdunning te houden, 1, resp. $\frac{1}{2}$ cc. physiologisch water. Direct na het toevoegen van het reagens in C, zal zich dus in C de diazoreactie gaan ontwikkelen. Door de cuvette A omhoog te

brengen, kan men voortdurend in den colorimeter rechts en links kleurgelijkheid bewerkstelligen. C blijft daarbij op den beginstand.

Telkens, wanneer een nieuwe kleurgelijkheid is verkregen, wordt de colorimeterstand (van cuvette A dus) afgelezen en tegelijkertijd op de seconde het tijdstip van aflezing genoteerd. Bij snelverlopende reacties doet men het onderzoek het best zoo, dat één persoon waarneemt in den colorimeter en de colorimeterstanden afleest en een andere persoon de standen noteert en met het aflezen den tijd noteert, waarop de aflezing plaats vond. Deze colorimeterstanden komen overeen met de hoogte van de vloeistofkolom in cuvette A en zijn daarom evenredig met de hoeveelheid bilirubine, die percentsgewijze in azobilirubine omgezet wordt. Zet men den tijd af op de abcis, en de colorimeterstanden van 30 tot 0 op de ordinaat, dan verkrijgt men een curve, die de snelheid van de reactie tot uitdrukking brengt.

Bij de indirecte reactie is de gebruikte verdunning anders. Hier neemt men volgens het oorspronkelijke voorschrift 3 cc. serum met 6 cc. alcohol, mengt en centrifugeert dit. Neem 6 cc. filtraat, voeg hieraan toe 0,75 cc. reagens en 1,5 cc. alcohol 96 %, zoodat in deze roode oplossing het serum 4 maal verdund is. Deze (roode) oplossing gaat weer in cuvette B. Het serum wordt nu ook zoo behandeld, dat de uiteindelijke verdunning straks 4 zal bedragen: 1 cc. serum wordt verdund met aqua physiologica tot 3,5 cc. In de cuvetten A en C worden deze hoeveelheden verdund serum gedaan en op een bepaald moment bij A $\frac{1}{2}$ cc. reagens en bij C $\frac{1}{2}$ cc. aqua physiologica gevoegd. Zoowel als men te werk gaat op de eerst beschreven wijze als op de laatste, wordt er zorg voor gedragen, dat het serum in A, B en C op dezelfde wijze verdund is en dus de roode kleurstoffen, die men aan het eind van de proef waarneemt, met elkaar in sterkte overeenkomen.

Zijn de te onderzoeken sera minder in sterkte dan 4 E, dan is in het algemeen bicolorimetrie niet mogelijk, omdat de kleur van het geazoteerde serum te zwak is om een behoorlijke aflezing te kunnen verrichten.

Verder ontstaat niet zelden na toevoeging van het reagens in C een troebeling, die wel aan vetten en vetzuren te wijten zal zijn en die de vergelijking van de kleuren zeer kan bemoeilijken of zelfs

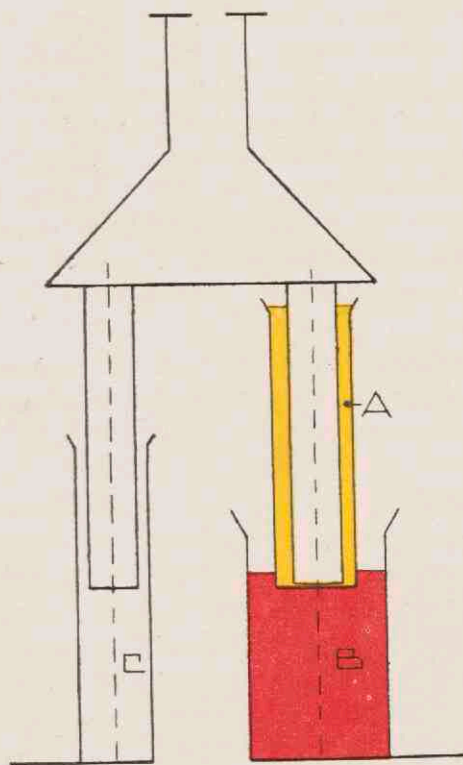


FIG. III.

onmogelijk kan maken. Door het, in nuchteren toestand van den patiënt afgenomen, bloed te gebruiken, kan men het bezwaar dezer troebeling aanzienlijk verminderen.

Eenigen tijd, nadat wij ons toestel in gebruik hadden gesteld, is ons gebleken, dat jaren geleden door Dr. F. C. Gerritsen⁴⁹⁾ zij het voor een ander doel, een toestel volkomen gelijk aan het hier boven genoemde, beschreven is, dat door hem — evenals wij voor ons toestel hadden voorgenomen — bicolorimeter werd genoemd. Het principe was reeds eerder aangegeven door F. J. Gillespie^{49a)}.

We hebben nu, in opdracht van Prof. Hijmans van den Bergh met dezen bicolorimeter een aantal dergelijke curven vervaardigd. Eensdeels van sera afkomstig van patiënten met sterke, ontwijfelbaar mechanische (stuwings)icterus; in de tweede plaats van vloeistoffen, die ontwijfelbaar extrahepatisch gevormd bilirubine bevatten (punctievloeistof uit haematothorax) en van sera van patiënten met zuiver dynamische icterus (pernicieuze anaemie, haemolytische icterus) en tenslotte van sera van patiënten met icterus, die aan verschillende ziekten leden.

Hieronder volgt hoe een dergelijke curve er uit ziet (fig. 15).

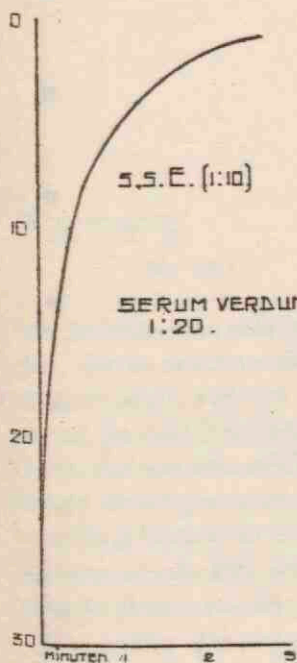


Fig. 14

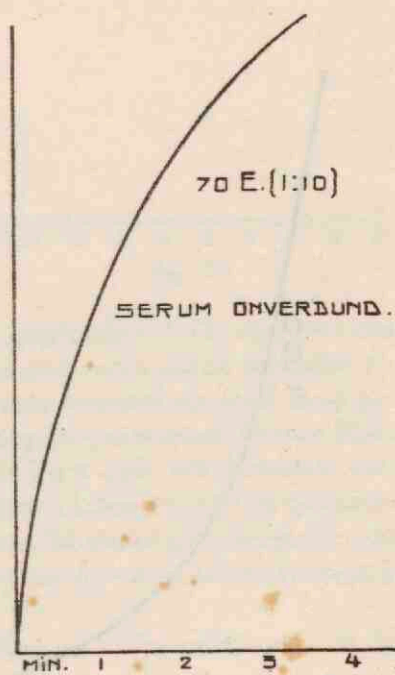


Fig. 15

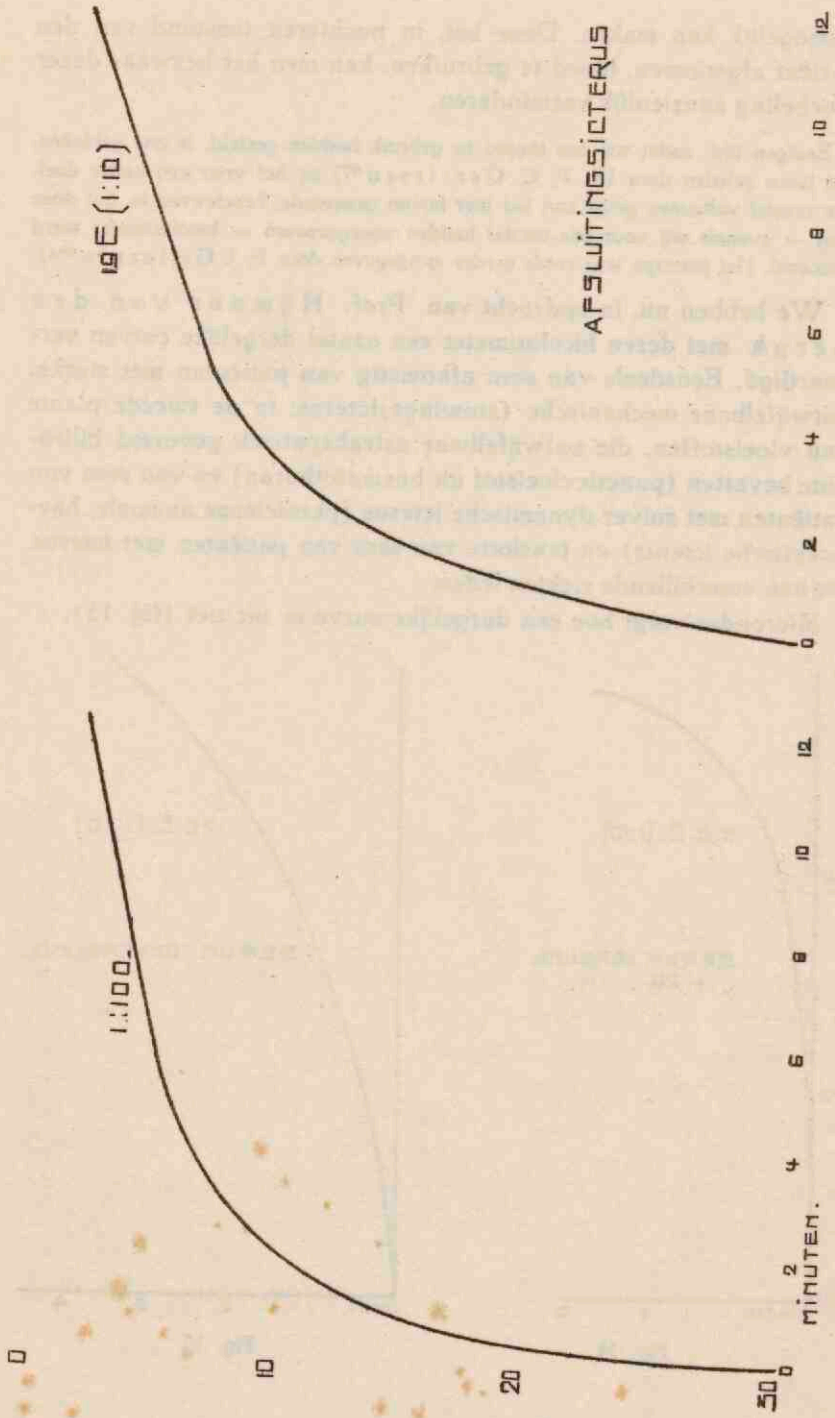


Fig. 16

Fig. 17

AFSLUITINGSICTERUS

Het serum is afkomstig van een ongeveer 60-jarigen man, die sedert eenigen tijd toenemende icterus kreeg, zonder pijn of andere bezwaren. Hij had bij opname in de kliniek een intensief gele kleur. Het serum bevatte 70 Eenheden bilirubine met directe reactie. 40 %

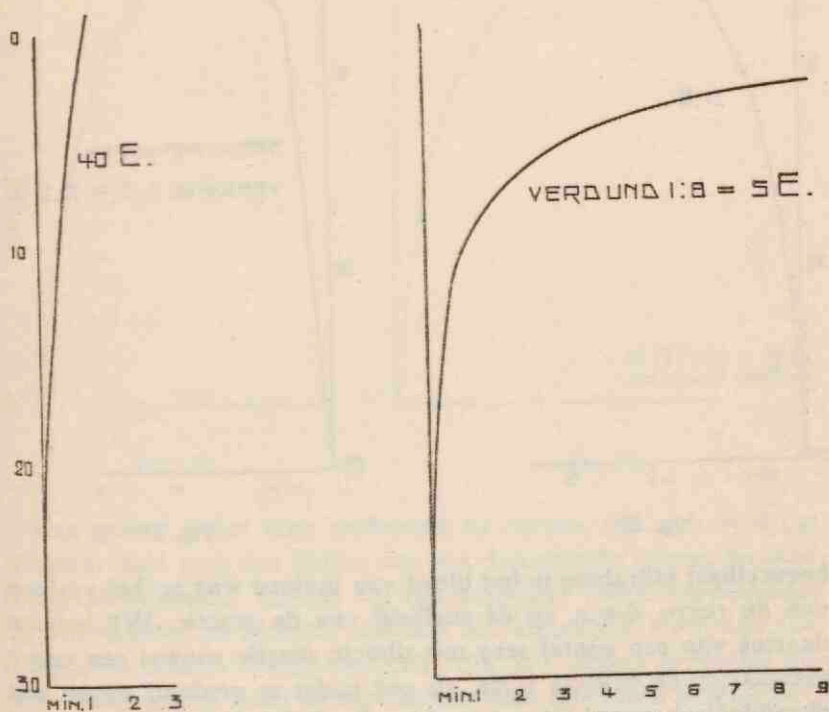


Fig. 18

Fig. 19

van dit bilirubine was aan het eiwit geadsorbeerd. Uit de curve ziet men, dat de reactie volkomen direct was; reeds enkele seconden na het toevoegen van het reagens was de vloeistof intensief rood gekleurd. In ruim 3 minuten was de koppeling maximaal. Hieruit blijkt reeds, dat aan den eisch, die *Lepelne* stelt, wil de reactie volkomen direct genoemd mogen worden, n.l. beginnende en maximale koppeling binnen de 30 seconden, ook bij sterke directe reactie niet voldaan wordt. Het steil verloop van de curve echter is typisch voor de directe reactie.

Het eerste, dat wij getracht hebben te onderzoeken was, of de

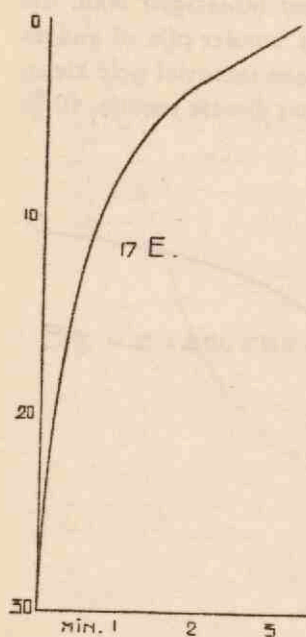


Fig. 20

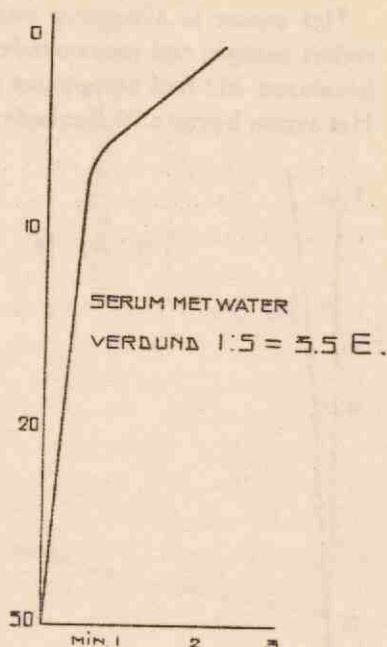


Fig. 21

hoeveelheid bilirubine in het bloed van invloed was op het verloop van de curve, d.w.z. op de snelheid van de reactie. Wij hebben daartoe van een aantal sera met directe reactie zoowel een curve gemaakt op de gewone wijze, als ook nadat ze verdund waren met physiologisch water tot een sterkte, die de bicolorimetrie nog juist mogelijk maakte, dus tot ongeveer 4 E. Zooals uit de curven blijkt (Fig. 14-15, 16-17, 18-19, 20-21) heeft de verdunning geen noemenswaardigen invloed op de reactiesnelheid.

In een andere reeks gevallen hebben wij de sterk icterische sera verdund met een ander serum, dat zeer weinig bilirubine bevatte, dus van patiënten met chronische nephritis of met lever behandelde gevallen van perniciose anaemie. Ook door verdunning met deze sera werd de reactie niet vertraagd (Fig. 22-23 en 24-25).

Voegt men aan een serum, dat zeer weinig bilirubine bevat, wat versche, door middel van duodenaal sondage verkregen, gal toe, dan krijgt men eveneens een typisch directe curve (Fig. 26).

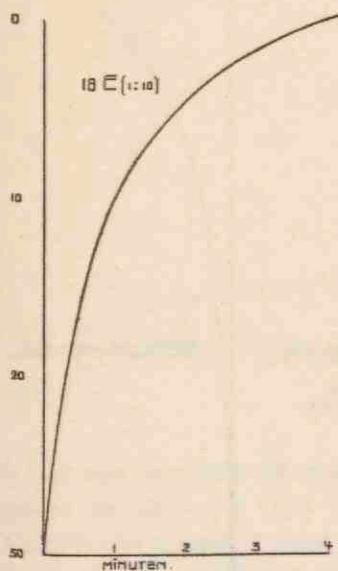


Fig. 22

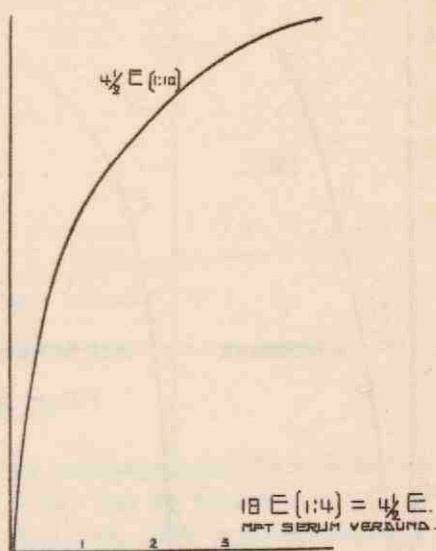
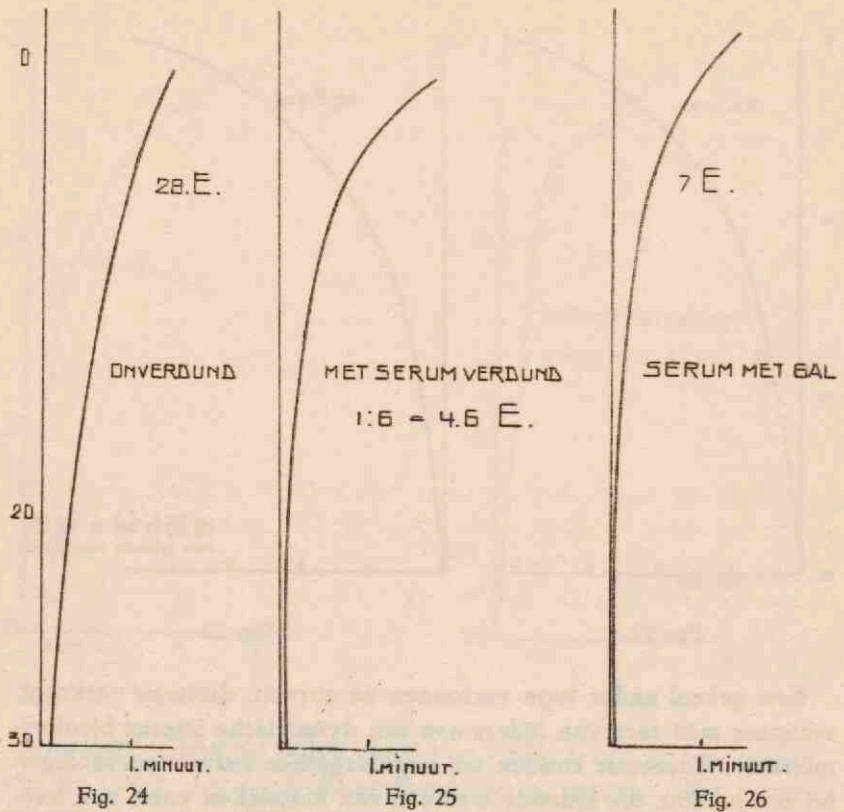


Fig. 23

Een geheel ander type vertoonen de curven, die men verkrijgt, wanneer men sera van lijdens aan een dynamische icterus bicoloretreert. Allereerst konden wij een dergelijke curve vervaardigen bij een patiënt, die lijdende was aan een klassieken vorm van haemolytische icterus. Zooals men ziet (Fig. 27), begint de reactie hier zeer traag, zoodat in de eerste minuten geen duidelijke roodkleuring waarneembaar is. Deze roode verkleuring neemt in den aanvang nog iets toe, maar nam verder niet waarneembaar toe, zoodat na 15 minuten nog slechts een vijfde gedeelte van de maximale koppeling bereikt was.

In de tweede plaats onderzochten wij een patiënt, bij wie na een trauma (messteek) een haematothorax was ontstaan. In het pleura-punctaat, dat uit vloeibaar bloed bestond, werd reeds spoedig na het trauma een verhoogd gehalte aan bilirubine gevonden, dat na eenige weken steeg tot 14 Eenheden. Ondanks dit hooge gehalte aan galkleurstof, was de reactie volkomen indirect (Fig. 28). De bilirubinespiegel van het bloed was nimmer verhoogd.



Van hoe weinig invloed de hoeveelheid bilirubine in het serum is op het uitvallen van de reactie, toont Fig. 29 duidelijk aan. De curve heeft een, voor de indirecte reactie, typisch verloop. De bilirubinespiegel bedroeg 20 Eenheden, een ongewoon hoog getal voor een indirecte reactie. Het bloed was afkomstig uit de miltvene van een patiënt met haemolytische icterus, bij wie miltexcirpatie verricht werd. Het tegelijkertijd uit de armvene afgenomen bloed, bevatte 13 Eenheden bilirubine.

Curven werden verder nog vervaardigd van sera van patiënten met perniciöse anaemie (Fig. 32), constitutioneele hyperbilirubinæmie (Fig. 30), en haemolytische icterus (Fig. 31). In deze laatste gevallen was de verhooging van het bilirubinegehalte van het bloed

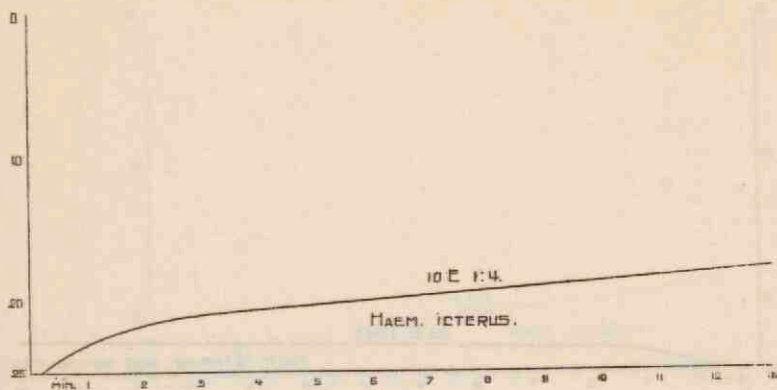


Fig. 27

echter niet zoo sterk als in de beide eerstgenoemde, doch de curven geven het indirecte type goed weer. Dat de bilirubinespiegel op zichzelf van weinig invloed is op de reactie, blijkt nog eens duidelijk, wanneer men een direct serum van 4,6 E (Fig. 25) vergelijkt met een indirect van gelijke sterkte: 4,2 E (Fig. 31).

Bij de parenchymateuze aandoeningen van de lever, waarbij de

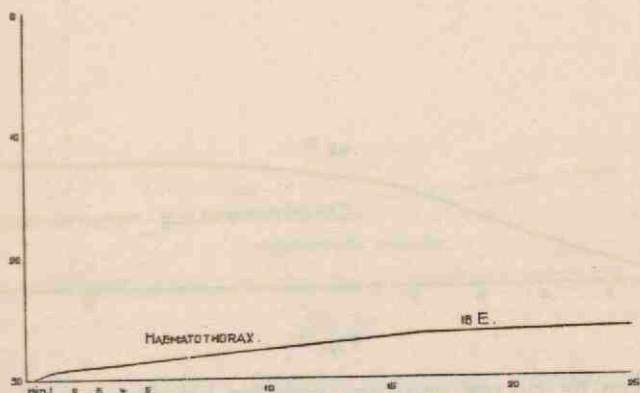


Fig. 28

reactie vaak diphasisch was, vonden we de reactie des te directer, naarmate de bilirubinespiegel sterker verhoogd was. Wellicht heb-

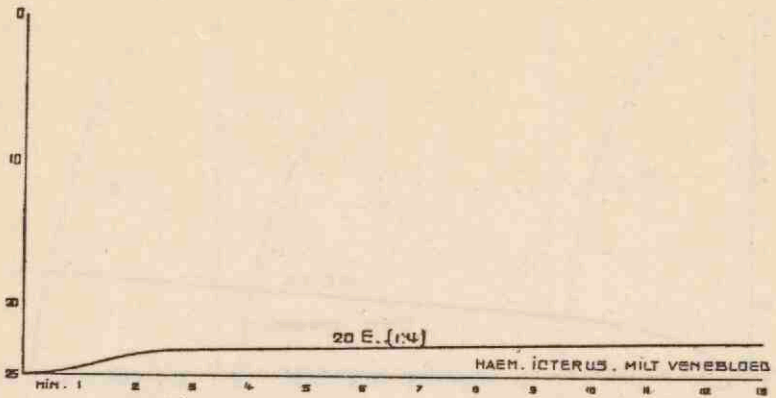


Fig. 29

ben we hier te doen met mengsels van direct en indirect bilirubine. Naarmate de leverbeschadiging en daarmee de stoornis in de leverfunctie sterker is, stijgt ook het bilirubinegehalte van het bloed, welk bilirubine als elke „stuwingsbilirubine” de directe reactie geeft.

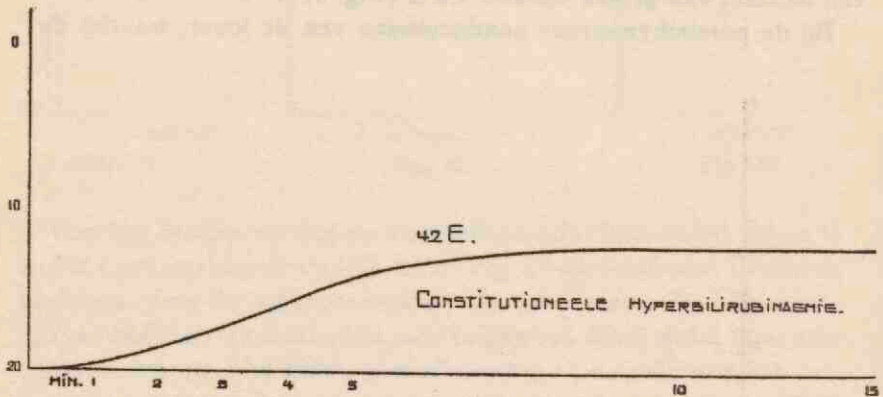


Fig. 30

Zoo geven de curven voor een gedeelte het directe type te zien, d.w.z. de koppeling voltrekt zich grootendeels binnen korten tijd (Fig. 34, 35, 36). Bij het meerendeel van de sera komt het echter niet tot maximale koppeling, wellicht, omdat het gedeelte, dat uit indirect bilirubine bestaat, niet in azobilirubine omgezet wordt.

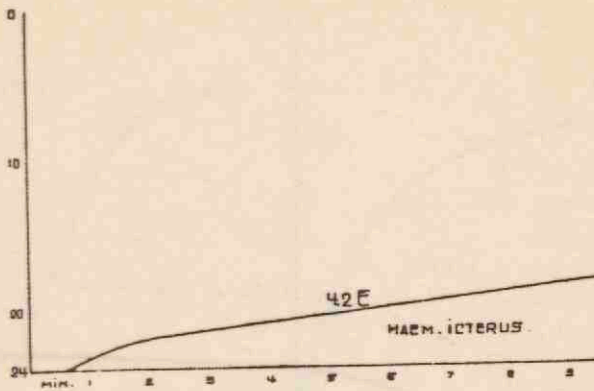


Fig. 31

Zoo ondervond men moeilijkheden met de beoordeeling van het serum van een patiënt, die leed aan hepatitis luetica. De reactie was verhoogd, diphasisch, zoodat men niet wist of ze tot de directe of de indirecte te rekenen viel. Uit de curve (Fig. 33) bleek, dat de reactie

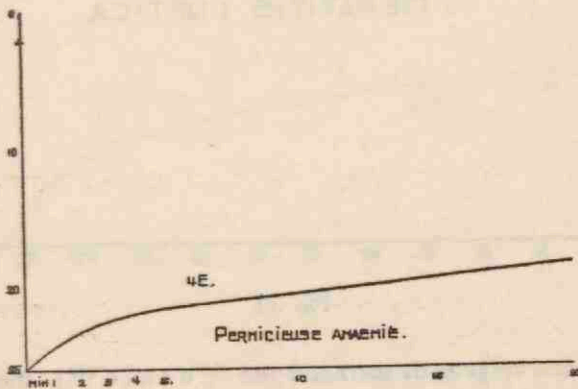


Fig. 32

aanvankelijk snel verliep, doch het 0-punt niet bereikte, m.a.w. niet alle in het serum aanwezige bilirubine werd in azobilirubine omgezet. Na eenigen tijd ging de reactie weer langzaam verder. Dat we in dit geval met een mengsel van direct en indirect bilirubine te doen hadden bleek, toen we de beide fracties afzonderlijk quantita-

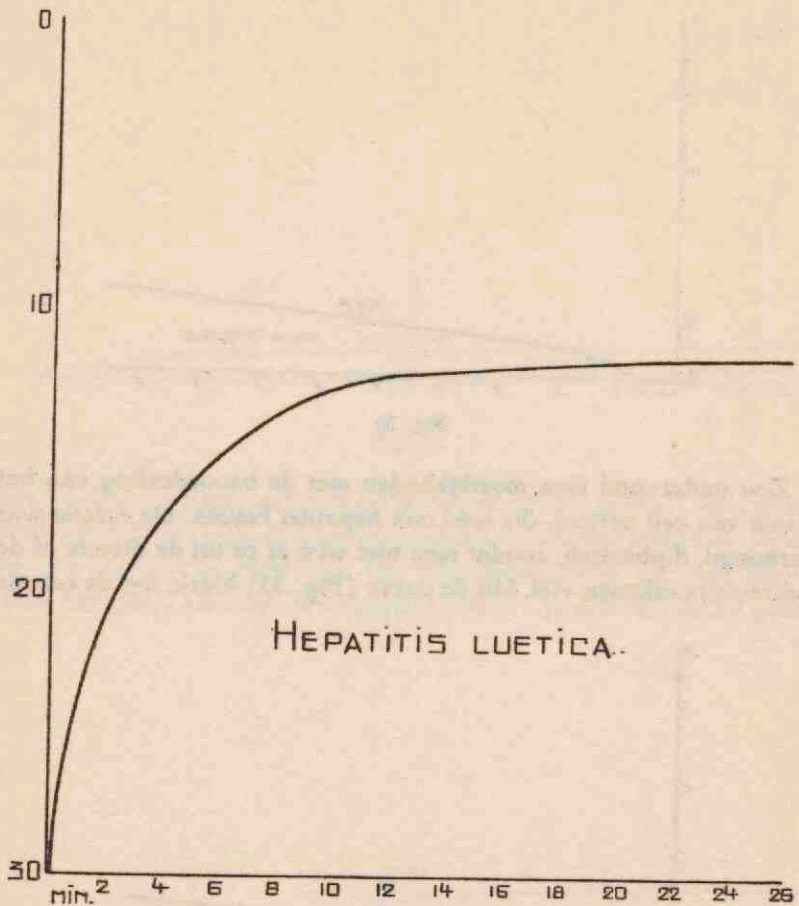


Fig. 33

tief bepaalden volgens de methode van *Varela*¹³⁹, die we reeds eerder vermeld hebben. (Zie pag. 34). Van de totale hoeveelheid van 5 Eenheden was in chloroform oplosbaar 2,7 E. Dit was dus het indirecte bilirubine. 2,3 E was niet in chloroform oplosbaar en reageerde dus direct. We vervaardigden vervolgens een bicolorimetrische curve van een mengsel van gelijke deelen van direct en indirect serum. De curve, die we toen verkregen (Fig. 37), komt met die van den patiënt overeen.

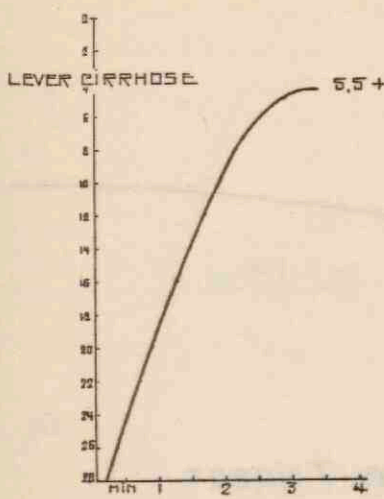


Fig. 34

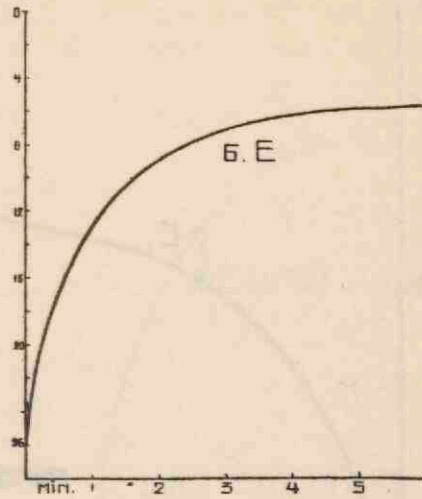


Fig. 35

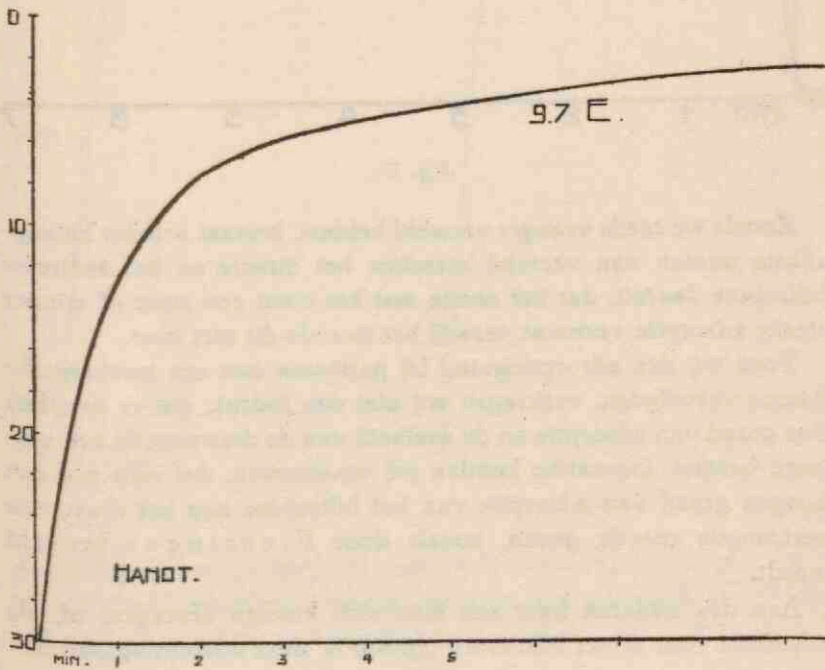


Fig. 36

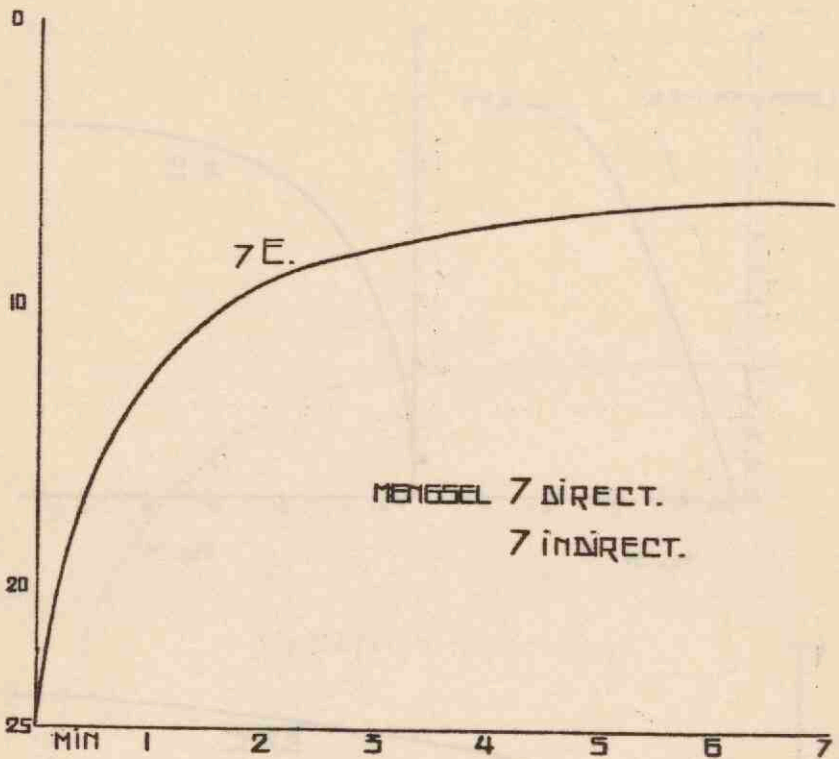


Fig. 37

Zoals we reeds vroeger vermeld hebben, bestaat een der belangrijkste punten van verschil tusschen het directe en het indirecte bilirubine daaruit, dat het eerste met het eiwit een meer of minder sterke adsorptie vertoont, terwijl het tweede dit niet doet.

Toen wij den adsorptiegraad bij patiënten met een mechanische icterus vervolgden, verkregen wij niet den indruk, dat er tusschen den graad van adsorptie en de snelheid van de diazoreactie een verband bestaat. Geenszins konden wij waarnemen, dat sera met een hoogen graad van adsorptie van het bilirubine aan het eiwit, een vertraagde reactie geven, zooals door *Fiessinger* beweerd wordt.

Aan den anderen kant zou men zich kunnen afvragen, of, als adsorptie voor direct bilirubine typisch is, deze adsorptiegraad niet

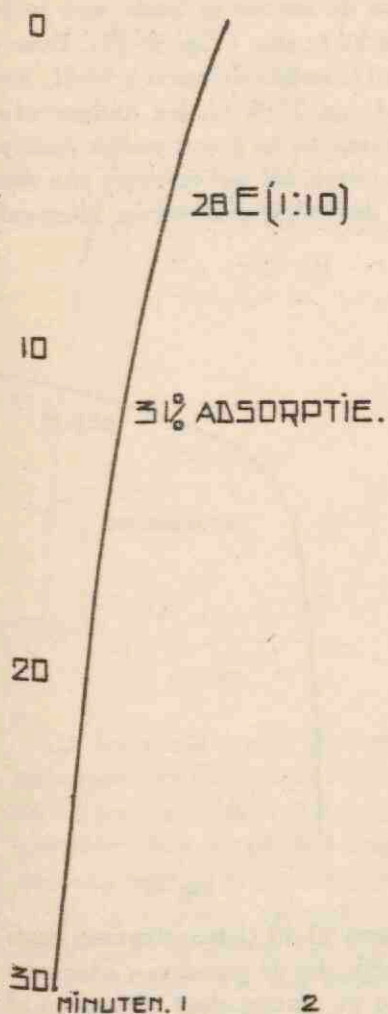


Fig. 38

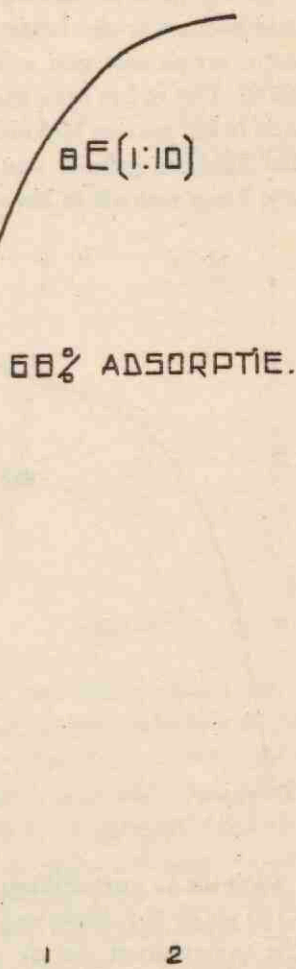


Fig. 39

parallel gaat met de snelheid van de diazoreactie. Daarom hebben wij de bichrometrische curven van sera met verschillende graden van adsorptie onderling vergeleken.

Vergelijkt men een curve, waarbij de adsorptie 31 % bedroeg, met de curve van een ander serum met een dubbel zoo sterke adsorptie, n.l. 68 %, dan is in het verloop van de reactie in beide sera toch eigenlijk geen noemenswaardig verschil te zien (Fig. 38-39). Evenmin bestaat er een belangrijk verschil tusschen de curven 40-41, het eene serum met een adsorptiegraad van 33 % en het andere van 68 %. Dat in het eene serum de diazoreactie toch wat sneller verliep dan in het andere blijktens de steilere curve, zal wel te wijten zijn aan het hoogere gehalte aan bilirubine, dat in dit eene serum viermaal zoo hoog was als in het andere.

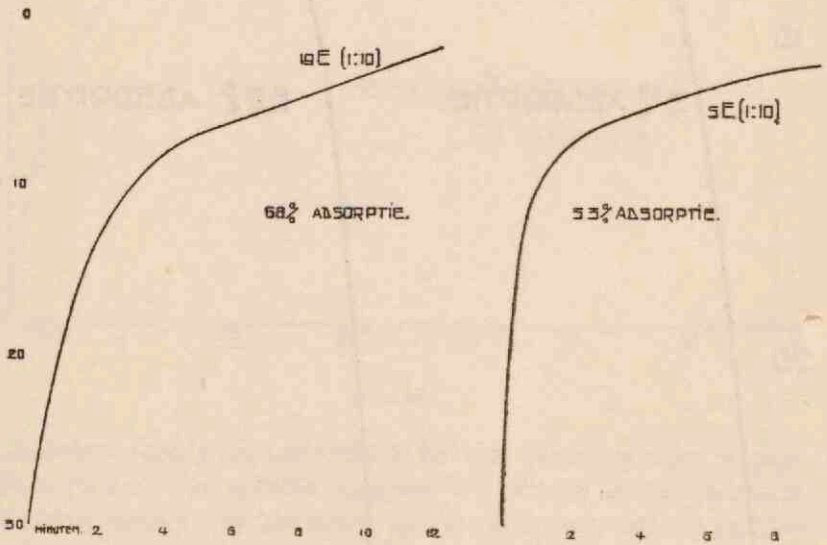


Fig. 40

Fig. 41

Ook uit de vergelijking van de curven 43-43 (adsorptiegraad resp. 30 % en 70 %), blijkt nog eens duidelijk, dat de graad van adsorptie niet samenhangt met de snelheid van de reactie, doch geheel en al bepaald wordt door het stadium, waarin de icterus verkeert, zooals dat vroeger uiteengezet is.

Behalve sera van verschillende patiënten hebben we sera van eenzelfden patiënt, maar in een verschillend stadium van zijn ziekte, onderzocht.

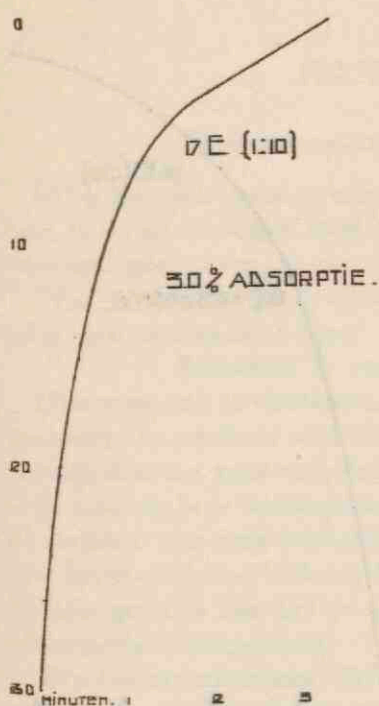


Fig. 42

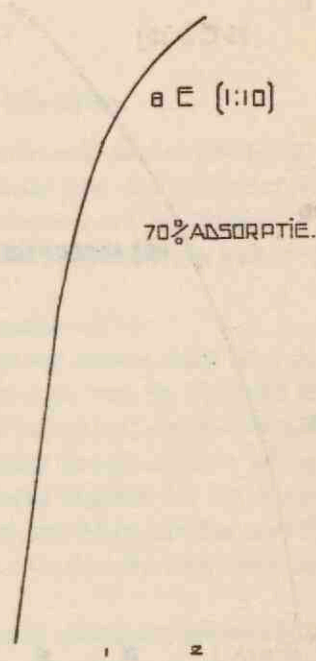


Fig. 43

Bij den reeds eerder genoemden patiënt met sterke icterus tengevolge van een carcinoom van het caput van het pancreas, dat drukte op de ductus choledochus, werd eerst een bichrometrische curve gemaakt, toen de patiënt opgenomen werd. Het bilirubinegehalte bedroeg toen 70 E, waarvan 46 % aan het eiwit geadsorbeerd was.

Na de operatie, waarbij een choledocho-gastrostomie verricht werd, nam de icterus duidelijk af. Wij hebben toen wederom een curve gemaakt. Op dat tijdstip bedroeg het bilirubinegehalte 18 E en hiervan was 90 % aan het eiwit geadsorbeerd. Tusschen beide curven bestaat weer geen noemenswaardig verschil (Fig. 44-45). Dat de eerste curve steiler verloopt, wijten we ook nu weer aan het hogere bilirubinegehalte.

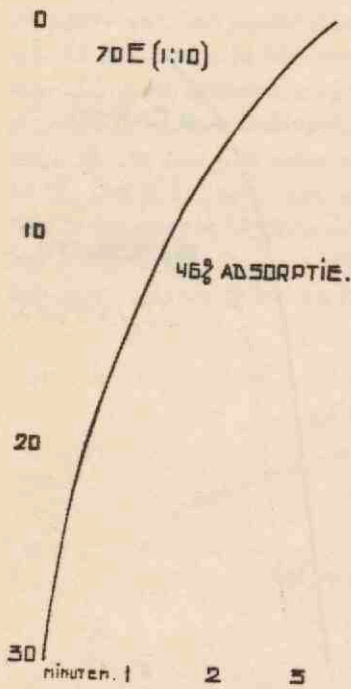


Fig. 44

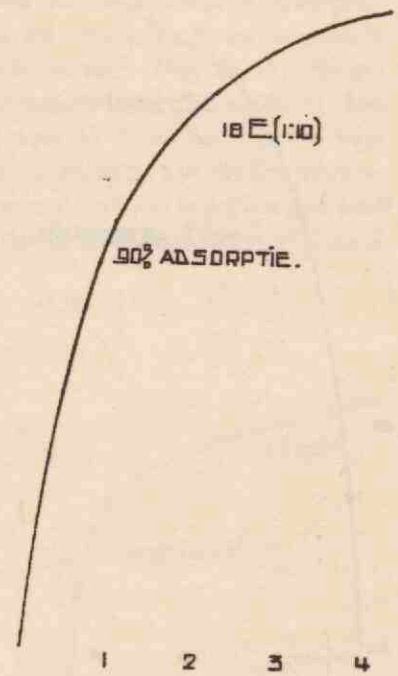


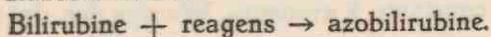
Fig. 45

HOOFDSTUK V

Reactieconstante van het bilirubine.

Het is mogelijk iets meer omtrent de reactiesnelheid van het bilirubine te weten te komen door de, met behulp van den colorimeter, vervaardigde curven, in een wiskundige formule uit te drukken.

Wat geschiedt er bij de diazoreactie? Het reagens bindt zich met bilirubine tot diazobilirubine.



De hoogte van de vloeistof in cuvette B is een directe maat voor de gevormde hoeveelheid azobilirubine. De hoogte van de vloeistof in cuvette A is een maat voor de hoeveelheid bilirubine, die verdwenen is en omgezet is in azobilirubine. Deze laatste hoogte hebben we op de ordinaat van onze bicolorimetrische curve afgezet. Bij het begin van de experimenten bedroeg de hoogte meestal 30 en aan het eind 0. In deze getallen zijn dus de aanwezige concentraties bilirubine op elk oogenblik aangegeven.

We kunnen aannemen, dat het reagens in overmaat aanwezig is en dat dus de concentratie van het reagens in het verloop van de reactie vrijwel hetzelfde blijft. Dan is de hoeveelheid bilirubine (dc), die in een zeker tijdsverloop (dt) in azobilirubine wordt omgezet, evenredig met de concentratie van het bilirubine in het serum (c), en een zekere constante K , de z.g. reactieconstante.

Wiskundig uitgedrukt:

$$\frac{dc}{dt} = -kc$$

$$\frac{dc}{c} = -k dt$$

Geïntegreerd:

$$c = a e^{-kt}$$

waarin a de integratieconstante is en e het grondgetal van de natuurlijke logaritmie.

Wat is nu die a ? Neemt men een oogenblik aan, dat $t = 0$ is, dan is $e^{-kt} = 1$, want $e^0 = 1$.

Daaruit volgt, dat voor een tijd 0, $c = a$, m.a.w.: a stelt voor de concentratie van het bilirubine op een tijd 0, dus de uitgangskoncentratie van het bilirubine.

We stelden reeds voor onze monomoleculaire reactie de formule op:

$$c = a e^{-kt}$$

$$\frac{a}{c} = e^{kt}$$

Logarithme nemen $\log \frac{a}{c} = kt \log e.$

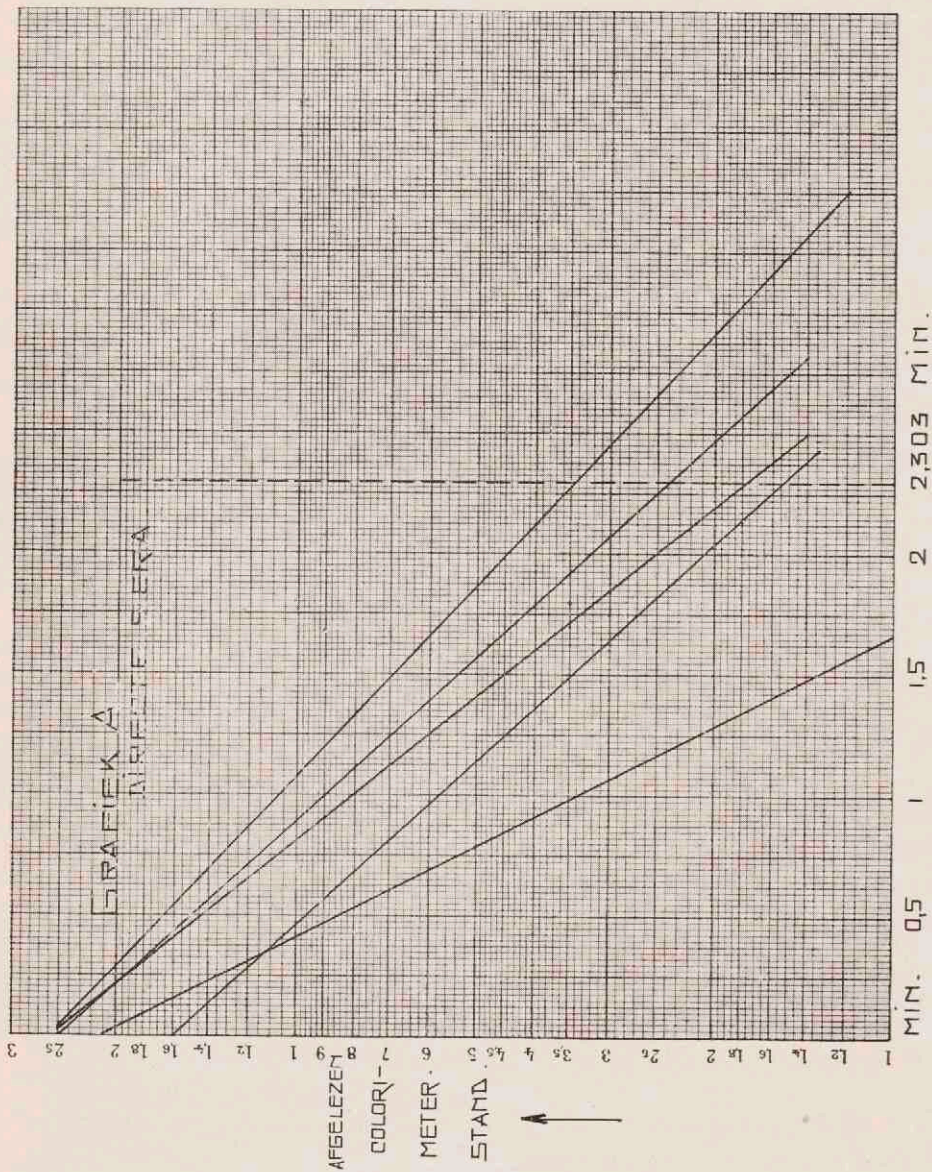
Log e is een constante, k eveneens. We zien dus, dat de logarithme van de concentratieverhouding $\frac{a}{c}$ recht evenredig is met den tijd t .

Zetten we nu c op een logarithmische schaal en t op een gewone lineaire schaal af, dan moeten we, als de formule voor onze bicolormetrische curven opgaat, een rechte lijn krijgen. Uit grafiek A blijkt, dat dit inderdaad het geval is. Het is zonder meer duidelijk, dat de helling der lijnen de snelheid van de reactie aangeeft. Meermalen zagen we echter, dat het punt, overeenkomende met den tijd 0, niet op de rechte lijn lag. Blijkbaar bestaat er hier een fout in de bepaling.

Inderdaad is het moeilijk het juiste tijdstip van het begin der reactie vast te leggen. Herinneren we ons nog eens hoe de bicolormetrische bepaling uitgevoerd wordt. Bij het verdunde serum in cuvette C wordt het reagens gedaan. Er wordt snel gemengd. Dit oogenblik beschouwen wij als het beginpunt, daar reeds bij de eerste aflezing in den colorimeter de reactie in gang is. Het spreekt vanzelf, dat, al naar gelang de menging en het toevoegen van het reagens snel of langzaam plaats vond, ook het oogenblik, waarop de reactie begon, minder nauwkeurig was vast te stellen. Een zekere fout, die we nulpuntsfout zullen noemen, wordt wel steeds gemaakt. In het kort kunnen we dus zeggen, dat we nooit precies weten, wanneer de reactie is begonnen. Vandaar, dat het punt, overeenkomende met den tijd 0, niet steeds op de rechte lijn ligt.

Het blijkt dus, dat de curven voldoen aan de formule:

$$c = a e^{-kt}$$



welke formule aantoont, dat de diazoreactie een monomoleculaire reactie is.

Bepaling van de reactieconstante k .

$$\log \frac{a}{c} = kt \log e$$

$$k = \frac{\log \frac{a}{c}}{t \log e}$$

Kiezen we t zoodanig, dat $t \log e = 1$ is, dan moet $t = \frac{1}{\log e}$ zijn. Dan is

$$k = \log \frac{a}{c}$$

e is het grondgetal der natuurlijke logarithmen = 2,718. Dus we moeten nemen $t = \frac{1}{\log 2,718} = 2,303$ minuten.

Bepalen we dus de concentratie C van het bilirubine op een tijd 2,303 minuten, dan is $k = \log \frac{a}{c}$

a is de beginconcentratie van het bilirubine (op de tijd = 0).

Om de nulpuntsfout te vermijden, moeten we het snijpunt van de rechte lijn met de ordinaat nemen en de zoo gevonden concentratie als de beginconcentratie a beschouwen.

We bepalen K nu als volgt:

We zoeken op de abcis het tijds punt 2,303 min. en trekken van hieruit een vertikale lijn. Deze lijn snijdt de rechte lijn op een bepaald punt, dat overeenkomt met een punt c op de ordinaat. Dit punt geeft de concentratie van bilirubine op den tijd 2,303 minuten aan. De afstand van het eerstgenoemde punt a tot het laatstgenoemde c , geeft op deze logarithmische schaal direct de verhouding $\log \frac{a}{c}$ aan. Is op dit papier de factor 10, dan moet de afstand $a-c$ dus in decimeters gemeten worden.

Samenvattend wordt van een bepaald bilirubineserum de reactieconstante dus als volgt gemeten:

1. Er wordt een bicolorimetrische curve gemaakt.
2. Deze curve wordt overgebracht op logaritmisch papier, waarop op de abcis den tijd en op de ordinaat de concentratie van het bilirubine is afgezet.
3. Op het logaritmische papier wordt eens en vooral een verticale lijn getrokken bij $t = 2,303$ min.
4. Nagegaan wordt, waar deze verticale lijn de rechte snijdt. Dit snijpunt komt overeen met een punt x op de ordinaat.
5. Nagegaan wordt, waar de rechte de ordinaat snijdt. De afstand van dit punt tot punt x , geeft k aan.

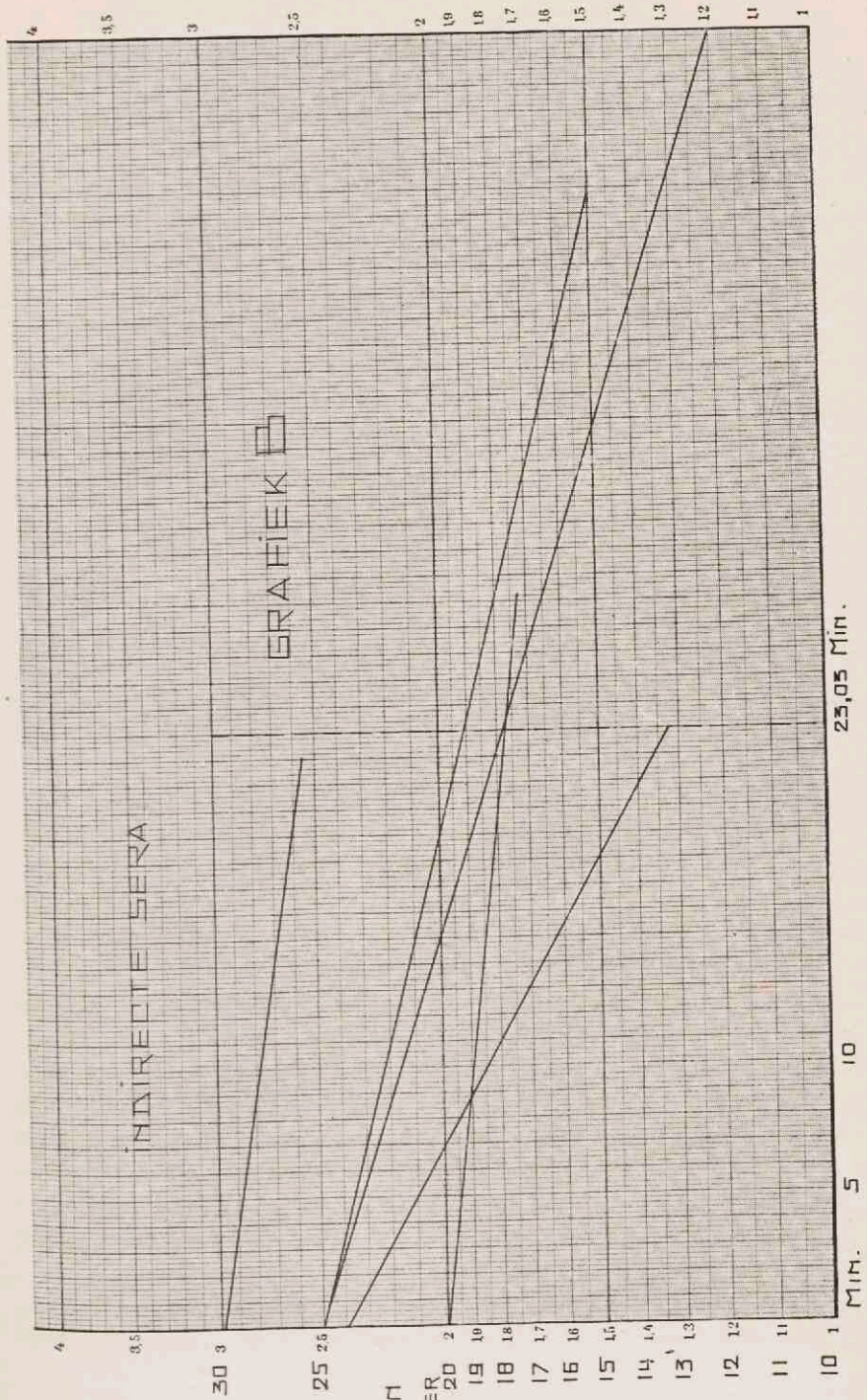
Van direct reagerende sera is het op deze wijze zeer wel mogelijk de k met eenige nauwkeurigheid te bepalen.

We vonden de volgende waarden voor k :

Afsluitingsicterus door carcinoom:	1,05		
" " "	: 0,90		
" " steen	: 1,75		
" " "	: 1,02		

Probeeren we echter bij indirect reagerende sera de reactieconstante van het bilirubine te bepalen, dan gaat dit minder gemakkelijk. De bicolorimetrische curve, uitgezet op logaritmisch papier, geeft hier geen fraaie rechte lijn. Dit is vermoedelijk het gevolg van de onnauwkeurigheid, waarmee bij indirecte sera de bicolorimetrische bepaling moet geschieden. De kleursveranderingen, die bij het uitvoeren van de diazoreactie op indirecte sera volgens de directe methode optreden, zijn n.l. zeer gering en dus niet zoo nauwkeurig waar te nemen als bij indirecte sera. Om zoodanig duidelijke kleursveranderingen te zien optreden, dat een eenigszins nauwkeurige aflezing mogelijk is, moet men de waarnemingen over langeren tijd, liefst uren, uitstrekken. Praktisch kan men dat niet steeds doen, aangezien er soms troebelingen gaan optreden in het mengsel van serum en reagens.

Beschouwen we de waarden, die we voor de reactieconstante door een globale berekening vinden, dan blijken deze waarden



AFGELEZEN

COLORIMETER

STAND - 19



20

18

17

16

15

14

13

12

11

10

1

MIN.

23,95 Min.

INDIRECTE SERA

GRAFIEK B

30

25

3.5

3

2.5

2

1.9

1.8

1.7

1.6

1.5

1.4

1.3

1.2

1.1

1

4

toch wel veel lager te liggen dan die, welke men bij de directe sera vindt. (Grafiek B).

Eenige van dergelijke waarden voor K bedroegen:

<i>Diagnose</i>	<i>K</i>
Pernicieuse anaemie . . .	0,006
Haemolytische icterus . . .	0,012
Idem	0,013
Idem, miltvenebloed . . .	0,025
Pleurapunctaat	0,010

Wanneer we nu eenige van de curven van patiënten met levercirrhose of hepatitis luetica op logaritmisch papier uitzetten, dan zien we, dat de zoo gevonden rechte lijn een knik vertoont (Grafiek C). Zooals we reeds eerder gezegd hebben, vertoont een dergelijke bicolorimetrische curve overeenkomst met curven, die men verkrijgt, wanneer men direct en indirect reageerende sera met elkaar mengt. We veronderstelden daarom, dat sera, zooals die b.v. bij den patiënt met hepatitis luetica gevonden werd, een mengsel van direct en indirect reageerend bilirubine bevatten. Een steun voor deze opvatting vonden we daarin, dat bij de bewerking van het serum volgens *Valera* een gedeelte van het serum met chloroform te extraheren was en dus het karakter van indirect bilirubine had, terwijl een ander gedeelte deze eigenschap miste, hetgeen met de aanwezigheid van direct bilirubine overeenkomt.

Het verloop van de lijn, die men krijgt, wanneer men de bicolorimetrische curve op logaritmisch papier uitzet, geeft een nieuwe steun voor onze opvatting.

Immers, bestaat het serum uit een mengsel van direct en indirect bilirubine, dan zullen, na toevoeging van het reagens, beide beginnen te reageeren, ieder met hun eigen reactiesnelheid. In de eerste minuten is het verloop van de curve het resultaat van de reactie van het directe en indirecte bilirubine samen, waarbij, doordat het directe zooveel sneller reageert, de curve hoofdzakelijk door de reactie van het directe bilirubine bepaald zal worden. Na eenige minuten is echter alle directe bilirubine in azobilirubine omgezet en het verdere verloop van de curve wordt dus hoofdzakelijk bepaald door de reactiesnelheid van het indirecte bilirubine, dat in het serum aanwezig is.

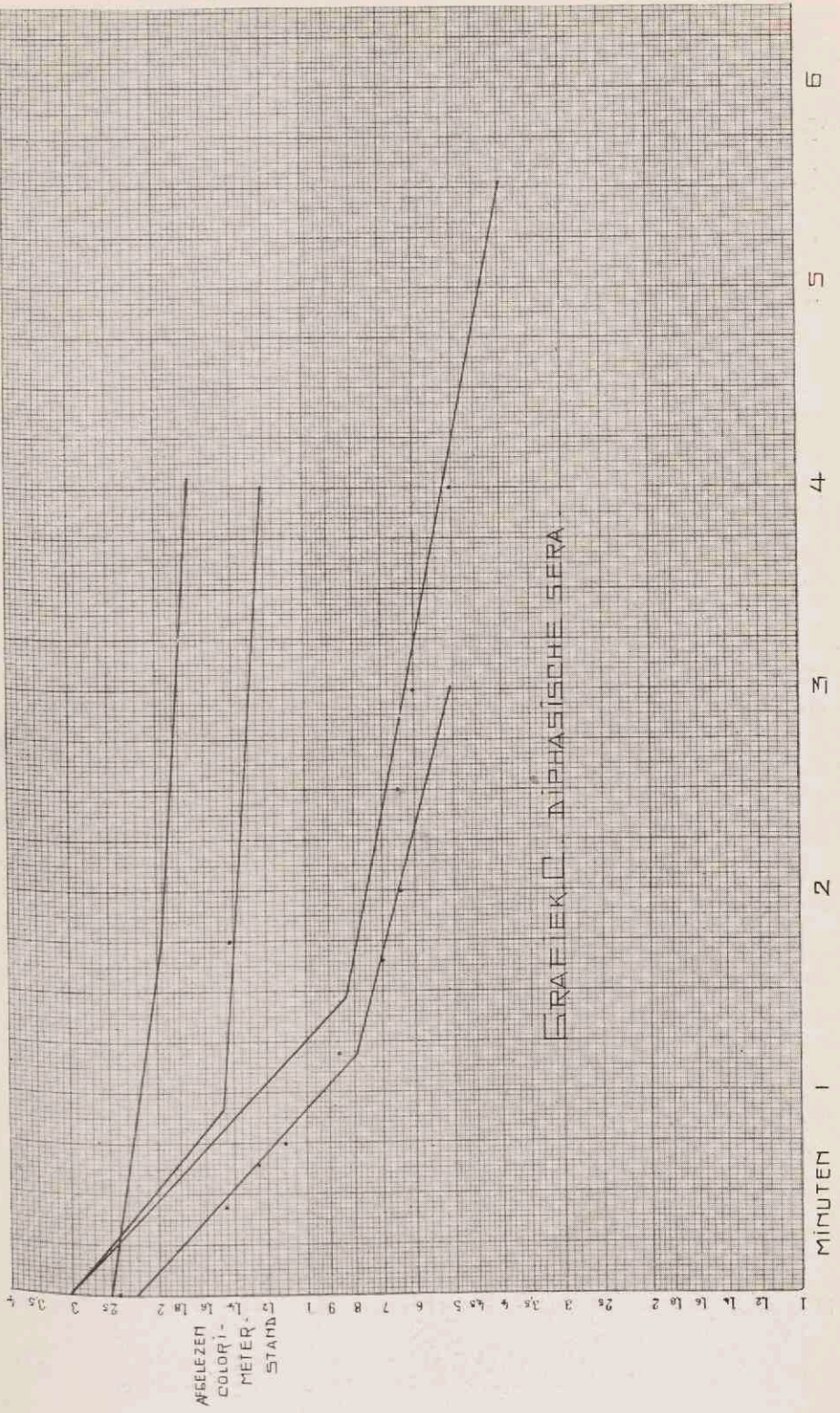
Het snelle verloop van de reactie gaat dus over in een veel langzamer, hetgeen op logaritmisch papier tot uitdrukking komt in een aanvankelijk steile lijn, die met een meer of minder scherpe bocht overgaat in een glooiend verloopende lijn.

Het bleek, dat kunstmatig gemaakte mengsels van direct en indirect bilirubine alle een dergelijke bocht vertoonden, wanneer de bicolorimetrische curven op een logaritmische schaal gebracht werden (Grafiek D). We gelooven dus, dat deze „knik” er op wijst, dat we met mengsels van direct en indirect bilirubine te maken hebben en dus een grafische uitdrukking zijn van het door Feigl en Querner en Lepenne ingevoerde begrip van een diphasische reactie.

Sera, met een behoorlijken graad van bilirubinaemie, waarbij men in twijfel verkeert omtrent den aard van de reactie direct of indirect, ontmoetten wij niet zoo vaak als men op grond van de mededeelingen in de literatuur zou kunnen verwachten. Doet men de kwalitatieve reactie volgens het oorspronkelijk voorschrift, d.w.z. verdunt men het serum eenmaal met physiologisch water en verdeelt men deze vloeistof over 2 buisjes, waarvan men bij één van beide $\frac{1}{4}$ volume reagens doet, dan is het al dan niet optreden van een roode verkleuring zeer goed te beoordeelen. Meestal treedt twijfel op, zoodra men met een zeer geringen graad van bilirubinaemie te doen heeft, zoodat de optredende roode kleur zwak is en dientengevolge ook den tijd van ontstaan moeilijk te bepalen is. Deze twijfel is echter het gevolg van de moeilijk waarneembare kleur en dus niet van het feit, dat de diazo-reactie als zoodanig zich niet beoordeelen laat.

Het genoemde geval van hepatitis luetica was een voorbeeld van een serum met behoorlijke bilirubinaemie (5 E) met een diphasisch verloop van de reactie (Fig. 33). Bij de extractie van het serum met chloroform bleken de hoeveelheden direct en indirect bilirubine zich ongeveer te verhouden als 1 : 1.

Het tweede geval was dat van een patiënte met coronairthrombose, bij wie zich icterus ontwikkelde. De oorzaak van deze icterus was niet duidelijk. Uit de bicolorimetrische curve, die op een logaritmische schaal werd uitgezet, viel af te leiden, dat we vermoedelijk met een mengsel van direct en indirect bilirubine te doen hadden (Fig. C,



GRAFIK. NIPPONISCHE SERA.

ACCELERAZIONE
COLORI
METER
STAND.

1 1.2 1.4 1.6 1.8 2 2.5 3 3.5 4

MINUTEN.

1

2

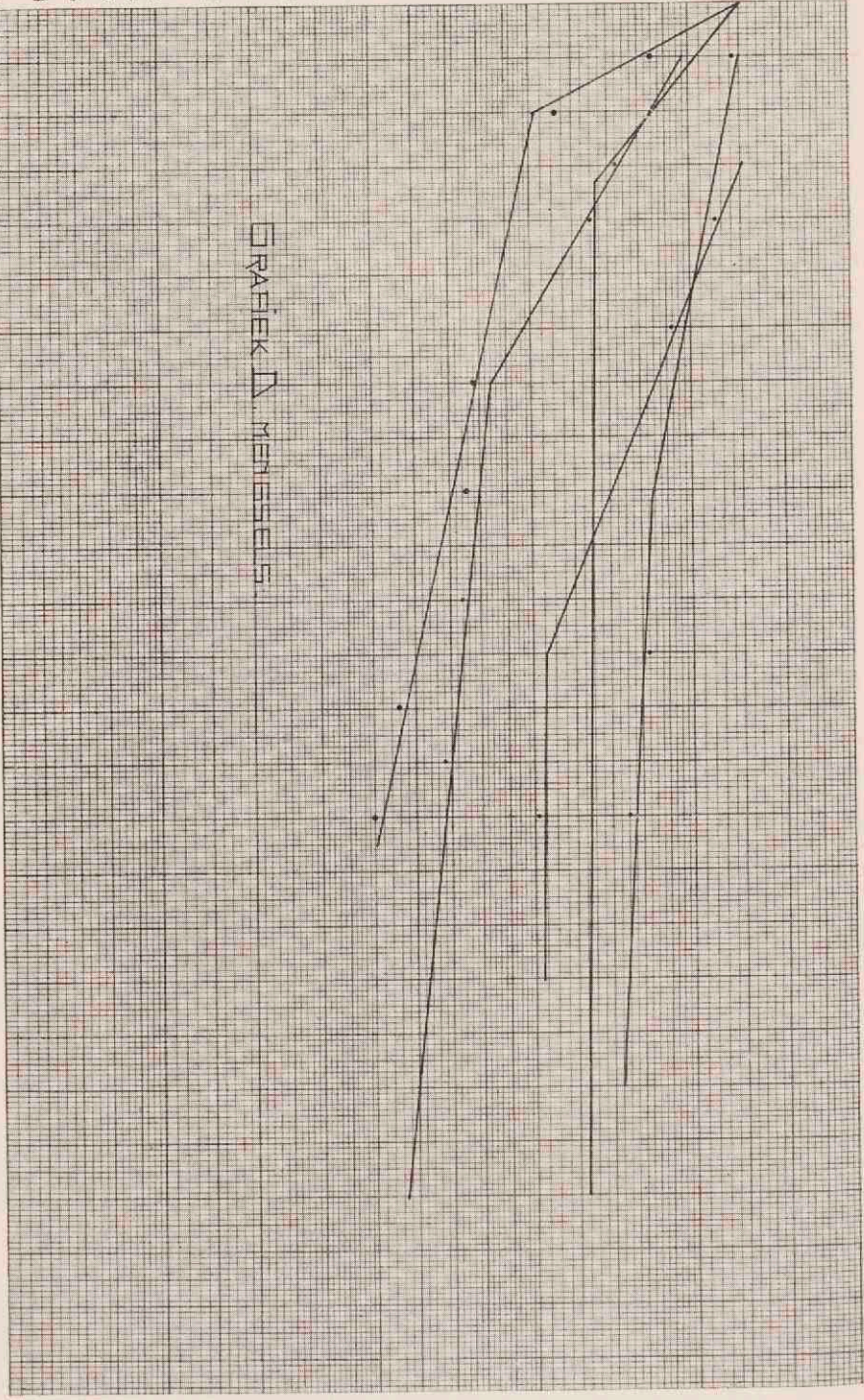
3

4

5

6

□ RAFFIK □ MEMSELS



3e lijn). Uit het serum, dat een sterkte had van 10 Eenheden bilirubine, werd door middel van extractie met chloroform ongeveer 3 Eenheden verkregen, zoodat de verhouding van direct en indirect bilirubine in het serum op 7 : 3 geschat moest worden.

Al kon een nadere analyse van de geknikte logarithmische curve in het aandeel, dat door het directe en indirecte bilirubine geleverd wordt, nog niet worden verricht, toch gelooven wij, dat dit verloop er op wijst, dat de diphasische reactie het gevolg is van het gelijktijdig aanwezig zijn van direct en indirect bilirubine in onderling niet ver uiteenlopende hoeveelheden.

HOOFDSTUK VI

De oxydatiesnelheid van het bilirubine.

We hebben achtereenvolgens de verschillende eigenschappen van het directe en indirecte bilirubine nagegaan.

Het directe bilirubine vertoont een sterke adsorptie aan het serum-eiwit, het indirecte niet.

De reactiesnelheden van beide bilirubines met het diazoreagens loopen aanzienlijk uiteen.

Het directe bilirubine is in chloroform onoplosbaar, het indirecte daarentegen oplosbaar.

De laatste eigenschap, waarin beide verschillen en die we bestudeerd hebben, is de snelheid, waarmee de galkleurstof geoxydeerd wordt.

Reeds uit de eerste mededeelingen over het bilirubine is het bekend, dat het directe bilirubine een sterke neiging tot oxydatie vertoont, welke eigenschap het indirecte bilirubine mist. Laat men het meest directe bilirubine, n.l. gal, aan de lucht bij kamertemperatuur staan, dan treedt na korten tijd een groene verkleuring op, welke bewijst, dat het bilirubine tot biliverdine geoxydeerd is. Men kan ook soms waarnemen, dat direct reageerende sera, die men bij kamertemperatuur laat staan, een groene verkleuring gaan vertoonen. Dit is echter betrekkelijk zeldzaam, aangezien de meeste sera, ook de direct reageerende, bij kamertemperatuur ongeveer 24 uur en in de ijskast meerdere dagen bewaard kunnen worden zonder in galkleurstofgehalte achteruit te loopen. Blijkbaar bevat het serum stoffen, die de oxydatie remmen.

Wil men in serum de verschillen in oxydatiesnelheid aantonen, dan moet men kunstmatige oxydatiemiddelen gebruiken. Het beste is daarvoor geschikt natriumnitriet in een niet te sterke oplossing, b.v. 5 %. Deze stof oxydeert in zuur milieu bilirubine tot biliverdine. Voegt men dus bij een aantal cc. van een direct reageerend serum eenzelfde aantal druppels azijnzuur 6 % en een dubbel zoo groot aan-

tal druppels natriumnitriet toe, dan gaat de gele kleur van het serum vrijwel direct over in een groene. Weldra wordt de biliverdine verder geoxydeerd, want de groene kleur gaat over in een bruin-zwarte.

Zoo op het oog is waar te nemen, dat de groene kleur bij direct reagerende sera eerder en sneller optreedt, dan bij indirect reagerende sera.

— DIRECT SERUM.

--- INDIRECT "

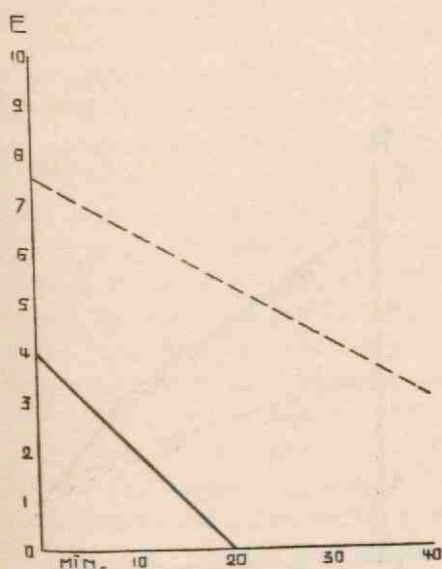


Fig. 46

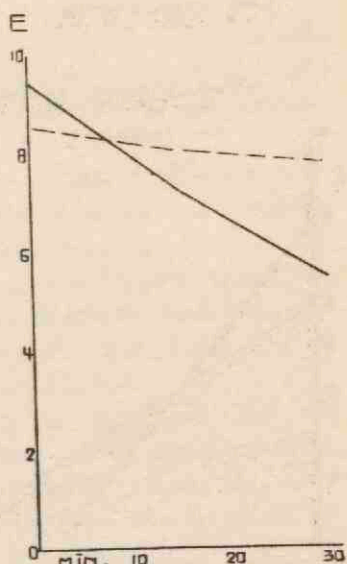


Fig. 47

Een grafische registratie van dit proces zou theoretisch mogelijk zijn door in een spectrophotometer de extinctie te meten in een gebied boven $650 \mu\mu$, in welk gebied een voor biliverdine typische adsorptieband ligt (H e i l m e y e r⁵⁹). Voor een praktische uitvoering is deze methode echter minder geschikt, eensdeels, omdat het eindproduct biliverdine niet constant is, anderdeels, omdat het proces van omzetting van bilirubine in biliverdine te snel verloopt.

Om ons doel te bereiken hebben we daarom:

1e. Niet de hoeveelheid biliverdine gemeten, die zich door oxydatie over eenigen tijd zou vormen, doch — op voorstel van Prof. Hijmans van den Bergh — de hoeveelheid bilirubine, die na eenigen tijd nog overgebleven was, gelijk die door de diazoreactie kon worden aangetoond.

2e. De oxydatie verricht door middel van bestraling met ultraviolet licht.

1. SERUMAFSLUITINGSICTERUS DOOR CHOLELITHIASIS.
2. IDEM. AFNEMENDE ICTERUS.
- 3 en 4. PERN. ANAEMIE.

1. SERUM CHOLELITHIASIS.
2. " P.A.

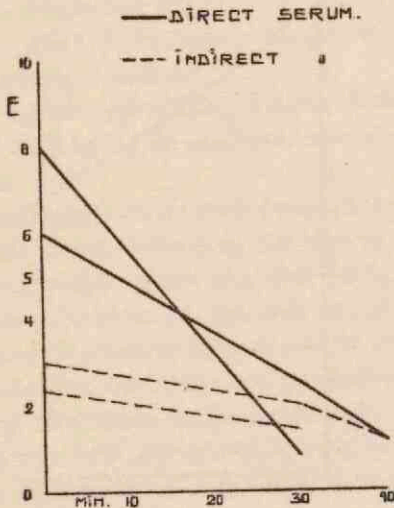


Fig. 48

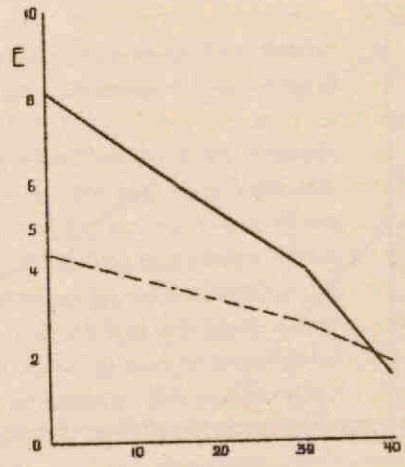


Fig. 49

Stelt men het serum bloot aan de inwerking van ultraviolette stralen, dan ziet men aanvankelijk op het oog niets geschieden. Dat echter het bilirubine na eenigen tijd toch voor een gedeelte geoxydeerd is, blijkt hieruit, dat het gehalte aan deze stof, bepaald met de diazoreactie, verminderd is. Blijkbaar ontstaat door de oxydatie van het bilirubine allereerst een verbinding, die weinig van de eerste verschilt en dezelfde gele kleur geeft, doch niet met het azoreagens reageert.

Pas na langen tijd bestralen begint het serum de groene kleur te ver-
toonen, die er het teeken van is, dat zich biliverdine gevormd heeft.

De proef werd nu als volgt uitgevoerd: We brachten een hoeveel-
heid icterisch serum, ongeveer 5 cc., in een open glazen schaal-
tje en plaatsten dit onder de kwiklamp. Omdat de lamp een aanmerkelijke
hoeveelheid warmte produceert, werd het glazen schaal-
tje in een bak met ijs geplaatst, teneinde de werking van de hitte op bilirubine
te elimineeren. Op gezette tijden namen wij uit het schaal-
tje een wei-
nig serum en bepaalden daarin het gehalte aan galkleurstof. Zooveel
mogelijk werd de oxydatiesnelheid van een direct en van een indirect
bilirubineserum tegelijkertijd bepaald.

Zooals uit de curven te zien is, verloopt de afname van bilirubine,
tengevolge van de oxydatie, veel sneller bij directe, dan bij indirecte
sera. Bij de eerste was meestal na een uur bestraling de diazoreactie,
op een spoor na, negatief geworden.

Wij hebben nagegaan of bij de oxydatie het directe bilirubine wel-
licht overgaat in het indirecte, aangezien sommige onderzoekers,
zooals vroeger vermeld is, het indirecte bilirubine als een oxydatie-
product van het directe beschouwen. Dat dit niet het geval was, bleek
hieruit, dat, nadat het bilirubine volgens de directe methode niet meer
aantoonbaar was, het ook niet meer gevonden kon worden bij de
uitvoering van de diazoreactie in bijzijn van alcohol.

Zou het bilirubine van den directen in den indirecten vorm zijn
overgegaan, dan zou men na de onteiwitting van het serum met alko-
hol nog een positieve diazoreactie hebben moeten vinden. Wanneer
het bilirubine niet geheel uit het serum verdwenen was, reageerde de
rest direct, hetgeen ook door middel van de bicolorimetrie werd vast-
gesteld.

SAMENVATTING.

Het mechanisme van de diazoreactie op bilirubine werd nader onderzocht. Het bleek, dat de twee vormen waarin zich de reactie kan voordoen, de directe en de indirecte reactie, uit praktisch en theoretisch oogpunt van elkaar te onderscheiden zijn. Ongetwijfeld is het op velerlei wijzen mogelijk de indirecte reactie in de directe over te voeren. Ook het omgekeerde kan bewerkstelligd worden. In het algemeen bevorderen de toevoeging van zwakke zuren of van loog of de kortdurende verwarming op het waterbad de directe reactie. De toevoeging van sterke zuren of het gedurende langeren tijd bewaren van het serum bij 37° doet de directe reactie overgaan in een indirecte.

Sommige onderzoekers besluiten hieruit, dat de snelheid van de diazoreactie het gevolg is van het al dan niet aanwezig zijn van bepaalde stoffen in het bloedserum. Het is echter niet met eenige mate van zekerheid gelukt dergelijke stoffen in het serum aan te toonen.

Aan den anderen kant zijn er onderzoekers, die een onderscheid in directe en indirecte reactie niet erkennen, althans aan een dergelijk onderscheid geen waarde hechten, doch de snelheid van de reactie alleen in verband brengen met de hoeveelheid bilirubine, die in het bloed aanwezig is. Deze laatste opvatting meenen wij weerlegd te hebben.

Wij sluiten ons aan bij hen, die meenen dat de directe en indirecte reactie het gevolg zijn van de aanwezigheid van een van twee soorten bilirubine: het directe en indirecte bilirubine. Deze beide bilirubinen zullen zeker chemisch na aan elkaar verwant zijn. Wellicht dat het eene een enolvorm, het andere een ketovorm is van eenzelfde stof (K ü s t e r). Wellicht ook, dat het directe bilirubine in een anderen physico-chemischen toestand in het serum aanwezig is dan het indirecte.

Voor deze laatste opvatting kunnen eenige argumenten aangevoerd worden:

1. Beide bilirubinen vertoonen verschillen in chemische eigenschappen.

<i>direct</i>	<i>indirect</i>
onoplosbaar in chloroform	oplosbaar in chloroform
oplosbaar in water	onoplosbaar in water
oxydeert snel	oxydeert langzaam
adsorptie aan serumeiwit	geen adsorptie aan eiwit
reageert met azoreagens	reageert niet of langzaam met azoreagens

Het verschil in oxydatiesnelheid werd grafisch vastgelegd. Nader bestudeerd werd de adsorptie van de galkleurstof aan het eiwitneerslag. De bevindingen van *Wiemer, Weltman* en *Jost en Jourdain* werden in hoofdzaak bevestigd. Het bleek echter, dat de graad van adsorptie geen invloed heeft op den aard van de diazo-reactie en dat dus de adsorptie aan het eiwitneerslag geen verklaring kan geven voor de indirecte reactie. Evenmin werd verband gevonden tusschen adsorptie en bilirubinurie.

De methode van *Hijmans van den Bergh* en *Grotepass* werd vergeleken met de meest gebruikelijke andere methoden: *Thannhauser* en *Andersen*, *Weltmann* en *Jost en Chabrol*. Het bleek, dat de hoogste waarden met de eerstgenoemde methode gevonden werden en verondersteld mag worden, dat deze methode voor directe sera de totale bilirubinaemie doet kennen.

Met behulp van de methode werd nog eens de drempelwaarde voor bilirubine in de nier bestudeerd. Het bestaan van een dergelijke waarde werd aannemelijk gemaakt en de drempelwaarde van 4 Eenheden ongeveer, werd opnieuw vastgesteld.

Versand tusschen bilirubinurie en dialyseerbaarheid van bilirubine uit het serum werd niet gevonden. In tegenstelling met andere onderzoekers kon bilirubine noch uit directe, noch uit indirecte sera gedialyseerd worden. Het was niet ultrafiltreerbaar of dialysabel uit gal of galkleurstof-houdende urine.

2. Met behulp van de bicolormetrie werd het reactieverloop van de beide modaliteiten van het bilirubine nagegaan. Daarbij bleek, dat het onderscheid in reactiesnelheid in een curve vrij typisch is uit te drukken; dat dus de reactieconstanten van de beide vormen aan-

zienlijk verschillen. Afgeleid werd uit de curven, dat de diazoreactie een monomoleculaire reactie is.

3. Enkele sera, die een zgn. diphasische reactie gaven, werden bestudeerd. Waarschijnlijk werd gemaakt, dat de reacties die deze sera geven, niet het gevolg zijn van overgangen tusschen directe en indirecte reactie, doch van het aanwezig zijn van een mengsel van het directe en indirecte bilirubine.

SUMMARY.

The mechanism of the diazoreaction on bilirubin was studied. This reaction can be direct or indirect. It was found that these two types of reaction differ from a practical and theoretical point of view.

It is undoubtedly possible to convert the indirect reaction into the direct in many ways.

Addition of weak acids or bases, or slight increase of temperature generally accelerates the diazo reaction.

The direct reaction is converted into the indirect by the addition of strong acids or keeping the serum at a temperature of 37° C for a long time.

On account of this phenomenon some investigators have come to the conclusion, that the velocity of the diazoreaction is caused by the presence or absence of certain substances in the serum.

Another group of investigators again, does not acknowledge a difference between the direct and indirect reactions or at least does not consider it of any importance, but tries to explain the the velocity of the reaction from the amount of bile pigment in the blood.

Our experiments have proved this last conception to be entirely wrong and have led us to the conclusion, which is also held by a third group of investigators, that the direct and indirect reactions are due to two corresponding types of bile-pigment, called direct and indirect bilirubin. Possibly the one is an enol and the other a keto-form of the same mother substance (K ü s t e r).

It is also possible, that both forms of the bile pigment are present in the serum in different physico-chemical conditions. The following arguments speak in favor of this last conception.

1. Both types of bilirubin differ in chemical properties:

<i>direct</i>	<i>indirect</i>
insoluble in chloroform.	Soluble in chloroform.
soluble in water.	Insoluble in water.
rapidly oxydized.	slowly oxydized.
adsorption to serumprotein.	no adsorption to serumprotein.
react with azoreagent.	does not react with diazoreagent or slowly.

The difference in oxydation velocity is demonstrated in a graph. Adsorption of the bile pigment to the protein precipitate was studied more in detail. The results of Wiemer, Weltmann and Jost and Jourdain could principally be corroborated.

It has been proved that the degree of adsorption has no effect whatsoever on the character of the diazoreaction, which means that this adsorption cannot explain the indirect reaction.

The method of Hijmans van den Bergh and Grotépass was compared with most of the other current methods: Thannhauser and Andersen, Weltmann and Jost, Chabrol.

The greatest quantities were achieved with the method of Hijmans van den Bergh and Grotépass. Presumably this method gives the total amount of bilirubinemia for specimens of direct sera.

The threshold for bilirubin in the kidney was determined again according to this method. The existence of such a threshold seemed acceptable and its amount of about 4 units was laid down. There appears to be no relation between bilirubinuria and dialysability from the sera.

In contradiction to other investigators, bilirubin could not be dialyzed from direct and indirect sera, neither could it be ultrafiltered or dialyzed from bile or urine, containing bile pigment.

2. By means of bicolorimetry it was possible to time the reaction of both modalities of bilirubin. This has shown, that the difference in reaction velocity can be expressed in a typical graph, indicating therefore, that the constants of reaction for both forms of bile pigment differ very distinctly.

From these curves the conclusion was made, that the diazo-reaction must be a monomolecular one.

3. Some specimens of sera, giving the so-called diphasic reaction were also investigated. The statement is made acceptable that the reaction given by these sera, should not be considered as the result of conversion of the two reactions into one another, but that it should be interpreted as being due to a mixture of direct and indirect bilirubin.

LITERATUUR.

1. D. Acél en C. Goldgruber, Ueber den Mechanismus der Bilirubinreaktion.
Z. Ges. Exptl. Med. 84, 787, (1932).
2. A. Adler, Chemisch-physikalische Untersuchungen an Gallenfarbstoffen und Cholesterin.
Verhandl. deut. Ges. inn. Med. 1922, blz. 72.
3. A. Adler en L. Strauss, Untersuchungen zum Mechanismus der Bilirubinreaktion im Serum bei Erkrankungen des Blutes und der Leber.
I. Verhandl. deut. Ges. inn. Med. 1922, blz. 81.
II. Klin. Woch.schr. 1922 (II), blz. 2285.
III. Klin. Woch.schr. 1923 (I), blz. 932.
Z. ges. exptl. Med. 44, 1 (1925).
4. C. H. Andrewes, A clinical study of van den Bergh's test in jaundice.
Quart. J. Med. 18, 19 (1924).
5. C. H. Andrewes, An unexplained diazo-colour reaction in uraemic sera.
Lancet, 1924 (I), blz. 590.
6. L. Aschoff, Ueber Bildungs- und Ausscheidungsstörungen der Gallenfähigen Substanzen (dyscholie), besonders des Gallenfarbstoffs (Ikterus).
Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 5, 338 (1928).
7. L. Aschoff, Ueber Gallenfarbstoffbildung und Gelbsucht.
Klin. Woch.schr. 1932 (II), blz. 1620.
8. J. Bauer en E. Spiegel, Ueber das Bilirubin im Blute und seine pharmacologische Beeinflussbarkeit.
Deut. Arch. klin. Med. 129, 17 (1919).
9. W. M. Bendien en I. Snapper, Onderzoekingen over de binding van verschillende serumcolloïden met behulp van ultrafiltratie.
Geneesk. Bladen 31^o reeks I, 1933.

10. E. H. B e n s l e y, The renal threshold of bilirubin.
J. Biol. Chem. **103**, 71 (1933).
11. E. H. B e n s l e y, Estimation of plasma bilirubin. A comparative study of the van den Bergh and Thannhauser and Andersen procedures.
J. Lab. Clin. Med. **19**, 1122 (1934).
12. A. R. B e r n h e i m, The icterus index (a quantitative estimation of bilirubinemia.)
J. Am. Med. Assoc. **82**, 291 (1924).
- 12a. J. A. B e y e r s, Urobiline en icterus bij onze plantenetende huisdieren (dissertatie Utrecht 1923).
13. M. A. B l a n k e n h o r n, Acholuric Jaundice.
Ach. Internal Med. **27**, 131 (1921).
14. R. B l u m, Ueber direkte und indirekte Diazoreaktion nach Hijmans van den Bergh.
Med. Klin. 1923 (II), 1608.
15. R. B o t z i a n, Beiträge zum Bilirubingehalt des menschlichen Serums bei Gesunden und Kranken.
Mitt. Gren. Med. Chir. **32**, 549 (1920).
16. K. B r ø c k n e r - M o r t e n s e n, Ueber die Schwankungen im Bilirubingehalt des Serums nach Mahlzeiten.
Ugeskr. Laeg. 1934, blz. 1056; referaat in Kongr. Central Blatt **78**, 307.
17. M. B r u l é, H. G a r b a n e n C h. W e i s m a n n, L'étude de la bilirubine du serum sanguin.
Presse méd. 1922 (II), blz. 986.
18. U g o d e C a s t r o, Neue Methode zur Einzelbestimmung des direkten und indirekten Blutbilirubins.
Z.ges. exptl. Med. **67**, 673 (1929).
19. U g o d e C a s t r o, Sur la conception unitaire et dualiste de la bilirubine du sang.
Presse méd. 1929 (II), blz. 1151.
20. E. C h a b r o l, Les Ictères.
Masson et Cie. 1932.
21. E. C h a b r o l, R. C h a r o n n a t e t A. B u s s o n, Etude comparative des différentes méthodes cholesmimétriques.
Compt.-rend. soc. biol. **107**, 692 (1931).

22. E. Chabrol, R. Charonnat et A. Busson, Le dosage des pigments biliaries du sang; la diazo-reaction limite.
Presse méd. 1932 (I), blz. 193.
23. M. Chiray en F. Thiebaut, Un nouveau procédé de dosage de la bilirubine sanguine par une méthode de Hijmans van den Bergh modifiée.
Presse méd. 1929 (I), blz. 490.
24. F. Chrometzka, I. Ueber die Norm des Bilirubinspiegels des Menschen und die Hyperbilirubinaemie.
Z.ges. exptl. Med. 67, 475 (1929).
25. F. Chrometzka, II. Ueber eine Farbreaktion des Serums bei der Urämie, ihre klinische Bewertung und den ihr zu grunde liegenden Mechanismus.
Z.ges. exptl. Med. 67, 482 (1929).
26. G. A. Collinson en F. S. Fowweather, An explanation of the two forms of bilirubin demonstrated by the van den Bergh reaction.
Brit. Med. J. 1926 (I), blz. 1081.
27. G. Daddi, Della colorazione della bilirubina nei tessuti animali e di un nuovo metodo per colorarla in essi.
Riv. Clin. Med. 34, 78 (1933).
Centr. 71, 611.
28. D. T. Davies en E. C. Dodds, A study on the properties of pure bilirubin and its behaviour towards the van den Bergh reagent.
Brit. J. Exptl. Path. 8, 316 (1927).
29. G. Dominici en G. Marengo, Studi sulla bilirubinaemie.
I. Osservazioni generali intorno allo metodica.
Arch. sci. med. 57, 505 (1933).
30. G. Dominici en G. Marengo, II. Recherche sul meccanismo della reazione diazoica.
Arch. sci. med. 57, 523 (1933).
Centr. 72, 636.

31. Norman W. Elton, The mechanism of jaundice: a working hypothesis.
Am. J. Clin. Path. 5, No. 1, January 1935.
32. Norman W. Elton, Physiology, correlation, and technic of the van den Bergh reaction, icterus index, and quantitative serum bilirubin.
J. Lab. Clin. Med. 7, 1 (1932).
33. E. Enriques en R. Sivo, Neues Verfahren zur Bestimmung des Bilirubingehaltes von Serum und Duodenalsäften.
Biochem. Z. 169, 152 (1926).
34. Z. Ernst en J. Förster, Ueber die Bestimmung des Blutbilirubins.
Klin. Wochschr. 1924 (II), blz. 2386.
35. Z. Ernst en E. Hallay, Untersuchungen über extrahepatogene Gallenfarbstoffbildung an überlebenden Organen.
Biochem. Z. 228, 354 (1930).
36. G. Favilli, Contributo allo studio della reazione di van den Bergh.
Suo meccanismo e valore per la classificazione degli itteri.
Sperimentale 79, (5), 647 (1925).
Centr. 41, 740.
37. J. Feigl und E. Querner, Bilirubinaemie.
Z. ges. exptl. Med. 9, 153 (1919).
38. K. Fellingner en R. Pflieger, Zur Physiologie und Pathologie der Bilirubinaemie.
Wiener Arch. inn. Med. 26, 321 (1935).
39. F. Ferranti en G. Pisani, Il dosaggio della bilirubina nei liquidi dell'organismo col diazoreagente di Daddi.
Riv. Clin. Med. 32, 353 (1931).
Centr. 63, 790 (1931).
40. G. Ferrari, Recherche sulla bilirubinemia.
Clin. Med. Ital. 65, 366 (1934).
Centr. 76, 643.

41. A. Fiessinger en H. Walter, Les procédés modernes de bilirubimétrie sanguine.
Ann. méd. 24, 178 (1928).
42. A. Fiessinger en H. Walter, Nouveaux procédés d'exploration fonctionnelle du foie.
Paris, Masson et Cie. 1934.
43. A. Fiessinger, V. Jourdain, D. Toissoul, Contribution à l'étude de la bilirubine dissimulée en circulation sanguine.
Presse méd. 1929 (II), blz. 1245.
44. E. Forrai en R. Sivo, Physikalisch-chemische Eigenschaften des Bilirubins in Körperflüssigkeiten.
Biochem. Z. 189, 162 (1927).
45. J. Förster, Ueber die normalen Wert des Bilirubingehaltes im Blutserum.
Kl. Wochschr. 1925, blz. 1689.
46. J. Förster en B. Förster, Ueber das Blutbilirubin.
Z. klin. Med. 103, 703 (1926).
47. K. Franke, Methylenblau, ein einfaches sehr empfindliches Reagens zum Nachweis von Bilirubin.
Med. Klin. 1931 (I), blz. 94.
48. L. Frigyer, Ueber vergleichende Bilirubinbestimmungen mit der Methode von E. Herzfeld und Hijmans van den Bergh.
Klin. Wochschr. 1923 (I), blz. 532.
49. F. C. Gerritsen, Enkele opmerkingen over de bepaling van de waterstofionenconcentratie voor biologische doeleinden.
Tijdschr. Verg. Geneesk., nieuwe reeks deel V, blz. 162 (1924).
- 49a. L. J. Gillespie, Colorstandards for the colorimetric measurement of H-ion concentrations.
J. Bact. 6, 399 (1921).
50. A. Gilbert en Herscher, La cholemie normale et pathologique.
Copt. rend. soc. biol. 584, 630 (1903); 55, 1587 (1903); 57, 899 (1905).

51. J. P. Mc Gowan, The alkali-reserve of the blood in relation to the van den Bergh bilirubin test.
Edinburgh Med. J. 37, 28 (1930).
52. E. G. Godfried, The technique to be selected for determination of bilirubin in blood by the diazo-method.
Biochem. J. 29, 1337 (1935).
53. W. J. Griffiths en G. Kaye, A study of the bile pigments in relation to the van den Bergh reaction.
Biochem. J. 24, 1400 (1930).
54. K. Grunenbergh, Ueber die Differenzierung des Serum-bilirubins durch seine Chloroformlöslichkeit.
Z.ges. exptl. Med. 31, 119 (1923).
55. G. A. Harrison en R. J. Bromfield, The cause of Andrewes's diazo-test for renal insufficiency.
Biochem. J. 22, 43 (1928).
56. G. Haselhorst, Eine neue quantitative Bestimmungsmethode von Bilirubin im Blutserum.
Münch. med. Wochschr. 1921 (I), blz. 174.
57. G. Haselhorst, Zur quantitativen Bilirubinbestimmung im Blutserum.
Münch. med. Wochschr. 1928 (I), blz. 1076.
58. H. Hayashi, Etude de la réaction de van den Bergh sur la bilirubine du sang.
Presse méd. 1929 (I), blz. 720.
59. L. Heilmeyer, Medizinische Spektrophotometrie.
G. Fischer, Jena 1933.
60. E. Herzfeld, Ueber eine einfache Bilirubinbestimmungsmethode im Blutserum.
Deut. Arch. klin. Med. 139, 306 (1922).
61. E. Herzfeld, Beiträge zur Methodik von quantitativen Bilirubinbestimmungen.
Biochem. Z. 251, 394 (1932).
62. E. Herzfeld en A. Haemmerli, Die Galle im Stoffwechsel.
Schweiz. Med. Woch.schr. 1924, blz. 141.

63. C. F. Hoover en M. A. Blankenhorn, Dissociated Jaundice.
Arch. Internal Med. 18, 289 (1921).
64. L. Hollós, Indirecte Reaktion des Bilirubins bei mechanischer Gelbsucht.
Klin. Wochschr. 1929 (II), blz. 1455.
65. R. S. Hubbard en C. B. Allison, Comparison of the icteric index and the direct van den Bergh tests.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 26, 438 (1929).
66. G. Hunter, On the determination of bilirubin by the diazoreagents.
Brit. J. Exptl. Path. 11, 407 (1930).
- 66a. G. Hunter, Canad. Med. Assocn. J. 23, 823 (1930).
67. G. Hunter, On the two types of bilirubin diazo reaction in serum, with a hypothesis on the nature of the bilirubin in the serum from haemolytic jaundice.
Brit. J. Exptl. Path. 11, 415 (1930).
68. A. A. Hijmans vanden Bergh en I. Snapper, Die Farbstoffe des Blutserums.
Deut. Arch. klin. Med. 110, 540 (1913).
69. A. A. Hijmans vanden Bergh, I. Snapper en J. J. de la Fontaine Schlüter, Studiën over anhepatische galkleurstofvorming.
Nederl. Tijdschr. Geneeskunde, 1915, I, blz. 811.
Nederl. Tijdschr. Geneeskunde, 1915, I, blz. 900.
Nederl. Tijdschr. Geneeskunde, 1915, I, blz. 1105.
Nederl. Tijdschr. Geneeskunde, 1915, II, blz. 491.
70. A. A. Hijmans vanden Bergh en J. J. de la Fontaine Schlüter, The identification of traces of bilirubin in albuminous fluids.
Koninklijke Akad. Wetenschappen Amsterdam 17, 28 Nov. 1914.
71. A. A. Hijmans vanden Bergh en I. Snapper, Untersuchungen über den Ikterus.
Berl. klin. Wochschr. 24, 1081 (1915).

72. A. A. H ij m a n s v a n d e n B e r g h e n P. M u l l e r,
Ueber eine direkte und indirekte Diazoreaktion auf Bili-
rubin.
Biochem. Z. 77, 90 (1916).
73. A. A. H ij m a n s v a n d e n B e r g h, Die Gallenfarbstoffe
im Blute.
Leiden, 1918.
74. A. A. H ij m a n s v a n d e n B e r g h, De la Bilirubine
dans le plasma sanguin.
Presse méd. I, 441 (1921).
75. A. A. H ij m a n s v a n d e n B e r g h e n W. G r o t e -
p a s s,
I. Verbeterde methode van Bilirubinebepaling.
Nederl. Tijdschr. Geneeskunde 1934 I, blz. 259.
76. II. An improved method for the determination of bilirubin
in blood.
Brit. Med. J. 1934, blz. 1157.
77. A. A. H ij m a n s v a n d e n B e r g h, Haemolytische icte-
rus; constitutioneele hyperbilirubinaemie.
Nederl. Tijdschrift Geneesk. 1933, III, blz. 4429.
78. L. J e n d r a s s i k u n d A. C z i k e, Bestimmung des Blut-
bilirubins.
Deut. med. Wochschr. 1928 (I), blz. 430.
79. M. J e n k e, Ueber die Natur des indirekten Bilirubins
(Hämorubin).
Verhandl. deut. Ges. inn. Med. 1931, blz. 387.
80. V. J o u r d a i n, La bilirubinémie en pathologie hépatique.
Ann. bull. soc. roy. sc. méd. nat. Bruxelles 1932, No. 9-10,
blz. 176.
81. N. J u l e s z e n E. W i n k l e r, Studien über das Serum
und Gewebssaftbilirubin.
Z. ges. exptl. Med. 87, 668 (1933).
82. R. K a p s i n o w, A new test for bile pigments in urine, bile
and blood serum.
J. Am. Med. Assoc. 82, 687 (1924).

83. V. I. Kazakov, Method of determining bilirubin in blood serum.
Sovetskaya Vrachebnaya Gazeta, Leningrad 31 V. '34.
(Zie J. Am. Med. Assoc. 103, 382 (1934)).
84. W. Kerppola, Extraction method for quantitative Determination of bilirubin in different body fluids.
Acta Med. Scand. 50, 277 (1932); 76, 479 (1931).
85. W. Kerppola en E. Leikola, Ueber das Wesen der sog. direkten und indirekten Diazoreaktion und die Anwendung der Reaktionen zur Bestimmung des Bilirubins.
Acta Med. Scand. 76, 479 (1931).
86. Raden S. A. W. Koesoemah, Bijdrage tot de kennis van de bloedbilirubineverhoudingen bij gezonden en zieken in de tropen.
Proefschrift Batavia, 1932.
87. A. Krupski en F. Almasy, Ueber die kolorimetrische Bestimmung des Serumbilirubins und die Lichtextinktion des Azobilirubins.
Biochem. Z. 279, 424 (1935).
88. W. Küster, Beiträge zur Kenntnis der Gallenfarbstoffe.
Z. physiol. Chem. 91, 58 (1914); 94, 136 (1915); 99, 86 (1917).
89. M. Laemmer en J. Beck, Dosage de la bilirubine dans le sang.
Compt. rend. soc. biol. 116, 368 (1934).
90. G. Lepehne, Untersuchungen über Gallenfarbstoff im Blutserum des Menschen.
Deut. Arch. klin. Med. 132, 96 (1920).
91. G. Lepehne, Weitere Untersuchungen über Gallenfarbstoff im Blutserum des Menschen.
Deut. Arch. klin. Med. 135, 79 (1921).
92. G. Lepehne, Pathogenese des Ikterus.
Ergebnisse inn. Med. Kinderheilk. 20, 221 (1921).
93. E. Leschke, Berl. klin. Wochschr. 1921, blz. 848.
94. P. Levi Crailsheim, Theoretische und experimentelle Untersuchungen über Bilirubin und Fibrinogen im Blut.
Z. Ges. Exptl. Med. 32, 468 (1923).

95. T. Maeda en T. Morishima, A contribution to the knowledge of the velocity of Hijmans van den Bergh's reaction.
Japan. J. Gastroenterology 1, 155 (1929).
Centr. 56, 229.
96. F. C. Mann en J. L. Bollman, Jaundice. A review of some experimental investigations.
J. Am. Med. Assoc. 104, 371 (1935).
97. H. P. Maue, The icterus index of the blood serum.
Surgery, Gynecol. Obstet. 34, 752 (1922).
98. C. E. May, R. Martindale, W. F. Boyd, The isolation and detection of bilirubin.
J. Biol. Chem. 104, 255 (1934).
99. J. W. Mc Nee en Ch. S. Keefer, The clinical value of the van den Bergh reaction for bilirubin in blood.
Brit. Med. J. 1925 (II), blz. 52.
100. E. Meulengracht, Die klinische Bedeutung der Untersuchung auf Gallenfarbstoff in Blutserum.
Deut. Arch. klin. Med. 132, 285 (1920).
101. E. Meulengracht, Ein Bilirubinkolorimeter behufs klinischer Bestimmung der Bilirubinmenge im Blute.
Deut. Arch. klin. Med. 137, 38 (1921).
102. E. C. Meyer en H. Knüpfker, Ueber den Einfluss der Nahrungsaufnahme auf den Blutbilirubingehalt.
Deut. Arch. klin. Med. 138, 321 (1922).
103. E. de Micheli en E. Greppi, La ricerca del pigmento biliare nel sangue mediante la diazo reazione.
Valore pratico e significato clinico della prova.
Arch. patol. clin. med. 2, 58 (1923).
Centr. 28, 283.
104. E. de Micheli, Studi sulla bilirubinemia.
Arch. patol. clin. med. 3, 42 (1924).
Centr. 35, 429.
105. G. W. Milroy, The icterus index of the blood serum.
Lancet 1929 (I), blz. 1189.

106. H. G. M o g e n a, The clinical significance of hyperbilirubinaemia.
Lancet 1929, blz. 1187.
107. G. M o n a s t e r i o, Il problema della bilirubina.
Scritti med. in onore Gabli 1, 6 (1930).
Centr. 62, 820.
108. J. M u r a k a m i e n H. N i s h i d a, An examination of bilirubin in the blood serum.
J. Orient. Med. 1923, blz. 68.
109. C. E. N e w m a n, Bilirubin and the van den Bergh reaction.
Brit. J. Exptl. Path. 9, 112 (1928).
110. M. S. N i c h o l s e n J. W a r r e n J a c k s o n, Permanent color standard for bilirubin.
J. Lab. Clin. Med. 15, 672 (1930).
111. L. P a t e r n i, Osservazione ed esperienze sulla reazione di van den Bergh.
Arch. patol. clin. med. 8, 141 (1929).
Centr. 54, 690.
112. F. S. P e r k i n, Blood bilirubin. Estimation and clinical significance.
Arch. Internal Med. 40, 195 (1927).
113. J. R. P e t e r, Gesamtfarbstoff und Bilirubin.
Biochem. Z. 262, 432 (1933).
114. G. P i o t r o w s k i, Diazo-réactions directe et indirecte, leur mechanisme.
Archives des Maladies de l'Appareil Digestif et des Maladies de la Nutrition 15, 798 (1925).
115. G. P i o t r o w s k i, De la bilirubinémie.
Presse méd. 1925 (II), blz. 1222.
116. F r. P r ö s c h e r, Ueber acetophenoazobilirubin.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 29, 411 (1900).
117. I. M. R a b i n o w i t c h, The renal threshold of bilirubin.
J. Biol. Chem. 97, 163 (1932).
118. B. W. R h a m y e n P. H. A d a m s, A new standard for the van den Bergh test.
J. Lab. Clin. Med. 13, 87 (1928).

119. M. Roch, Ueber Methylenblau als Reagens zum Nachweis von Bilirubin.
Med. Klin. 1931 (I), blz. 589.
120. W. Morell Roberts, Observations on the nature of the van den Bergh reaction.
Brit. J. Exptl. Path. 9, 107 (1928).
121. F. Rosenthalen P. Holzer, Beiträge zur Lehre von den mechanischen und dynamischen Ikterusformen.
Deut. Arch. klin. Med. 135, 257 (1921).
122. F. Rosenthalen K. Meyer, Ueber den Reaktions-typus des Gallenfarbstoffes und über die quantitativen Verhältnisse von Bilirubin und Cholesterin im Blut bei verschiedenen Ikterusformen.
Arch. exptl. Path. Pharmakol. 91, 246 (1921).
123. H. M. Rozendaal, M. W. Comfort, A. M. Snell, Slight and latent Jaundice.
J. Am. Med. Assoc. 104, 374 (1935).
124. O. Scheel, Nachweis von Gallenfarbstoff im Blutserum.
Z. kl. Med. 74, 13 (1912).
125. L. Schiff, Serum bilirubin in health and disease.
Arch. Internal Med. 40, 800 (1927).
126. F. R. Schiffen H. Eliasberg, Beobachtungen über den Icterus simplex (catarrhalis) bei Kindern.
Klin. Wochschr. 1922, blz. 1891.
127. F. Scott Fowweather, Bilirubin and the van den Bergh reaction.
Biochem. J. 26, 165 (1932).
128. H. Shayan E. Schloss, The van den Bergh reaction. A comparison of Technics.
J. Lab. Clin. Med. 15, 292 (1929).
129. R. Sivó, Der normale Bilirubinspiegel in menschlichen Seren.
Biochem. Z. 189, 159 (1927).
130. N. Sofue, Studies on the cause of the existence of two types of van den Bergh's reaction on bilirubin.
Japan. J. Med. Sci. IV Pharmacology 3, 137 (1929).
Presse méd. 1929 (I), blz. 720.

131. M. J. Steenhout en J. P. Bouckaert, Sur la signification de la réaction directe de Hijmans van den Bergh. *Compt. rend. soc. biol.* **96**, 438 (1927).
132. K. Takeshita, Beiträge zur Bilirubinreaktion im Blutserum. *Mitt. med. Akad. Kioto* **9**, 750 (1933). *Centr.* **74**, 266.
133. K. Takeshita, Ueber die pathologischen Veränderungen der Serumeiweissfraktionen und die Beziehungen zwischen ihnen und den Bilirubinreaktion im Blutserum. *Mitt. med. Akad. Kioto* **6**, 2953 (1932). *Centr.* **71**, 420.
134. J. S. Thannhauser en E. Andersen, Methodik der quantitativen Bilirubinbestimmung im menschlichen Serum. *Deut. Arch. klin. Med.* **137**, 179 (1921).
135. B. Varela-Fuentes en C. Viana, La bilirubine indirecte éthéro-extractible dans dix serums ictériques différents. *Compt. rend. soc. biol.* **118**, 1518 (1935).
136. B. Varela-Fuentes en C. Viana, Sur la nature de la bilirubine indirecte éthéro-extractible des serums ictériques. *Compt. rend. soc. biol.* **118**, 1520 (1935).
137. B. Varela en J. Esculis, Nouvelle méthode pour la séparation et le dosage des deux bilirubines (directes et indirectes) du serum sanguin. *Compt. rend. soc. biol.* **107**, 884 (1931).
138. B. Varela, E. Apolo en C. Viana, Résultats obtenus avec la nouvelle méthode pour le dosage séparé des bilirubines directe et indirecte dans les serums ictériques. *Compt. rend. soc. biol.* **108**, 1014 (1931).
139. B. Varela-Fuentes en P. Recante, Nouvelle technique simplifiée pour le dosage séparé des deux bilirubines, directe et indirecte, des serums ictériques. *Compt. rend. soc. biol.* **116**, 1193 (1934).

140. B. V a r e l a-F u e n t e s e n C. V i a n a, Die Kurven der direkten und indirekten Bilirubinaemie beim katarrhalischen Ikterus.
Arch. argent enferm. apar. digst. 10, 121 (1935).
Centr. 80, 203.
141. A. V o g l e n B. Z i n s, Eine einfache Methode zum Nachweise pathologischer Bilirubinaemie.
Med. Klin. 1922 (I), blz. 667.
142. H. W a l t e r, L'Indice biliaire plasmatique.
Compt. rend. soc. biol. 94, 660 (1926).
143. O. W e l t m a n n e n F. J o s t, Eine Verbesserung der quantitativen Bilirubinbestimmung.
Med. Klin. 1928 (II), blz. 1125.
144. O. W e l t m a n n e n F. J o s t, Ueber die Adsorption des Bilirubins an das Eiweiss, ihre Bestimmung und klinische Verwertung.
Deut. Arch. klin. Med. 161, 203 (1928).
145. O. W e l t m a n n e n H. H ü c k e l, Untersuchungen über den Mechanismus der direkten und indirekten Bilirubinreaktion.
Med. Klin. 1928 (II), blz. 1393.
146. F. D. W h i t e, On serum bilirubin: I. The diazo reaction as a quantitative procedure.
Brit. J. Exptl. Path. 13, 76 (1932).
147. F. D. W h i t e, On serum bilirubin: II. The relationship between the bilirubin content of serum for different types of jaundice and the icterus index of the serum after removal of proteins.
Brit. J. Exptl. Path. 14, 17 (1933).
148. P. W i e m e r, Ueber die direkte und indirekte Diazoreaktion im Blutserum.
Deut. Arch. klin. Med. 151, 154 (1926).
149. Z a i n a l, Over het ultrafiltreerbare deel van het calcium van het bloedserum onder normale en pathologische omstandigheden.
Proefschrift Amsterdam, 1931.

STELLINGEN.

I.

Bij de bepaling van het bloedsuikergehalte volgens de methode van Hagedorn Jensen onteiwitte men volgens Iwatake en Fujita.

II.

Het diffusibele gedeelte van het serumcalcium is vrijwel geheel in geioniseerde vorm aanwezig.

III.

Het ophthalmoscopische beeld bij patiënten met ziekte van Paget kan wellicht bijdragen tot de verklaring van de pathogenese van deze ziekte.

IV.

Het jodiumgehalte van schildklierpreparaten is geen maatstaf voor hun biologische werkzaamheid.

V.

Het koolhydraatrijke-vetarme dieet voor lijdens aan suikerziekte verdient de voorkeur boven het koolhydraatarme dieet.

VI.

Bij het tot stand komen van de verschijnselen van uraemie kan ook een verhooging van het magnesiumgehalte van het serum een rol spelen.

VII.

Het is wenschelijk tijdens epidemieën van poliomyelitis acuta anterior kinderen actief tegen deze ziekte te immuniseeren.

VIII.

Zijn in het laat-tertiaire stadium der syphilis de liquorreacties positief, dan verdient de koortstherapie ernstige overweging, ook al ontbreken verschijnselen van neuroloes.

IX.

Het *ulcus ventriculi perforatum* behandelde men zoo mogelijk slechts met overhechting van het *ulcus*.

X.

Er bestaan vooralsnog geen redenen *pemphigus vulgaris* en *pemphigus Duhring* als dezelfde ziekte te beschouwen.



