



Enkele toepassingen van histologische en microchemische methoden van vitamine-C-onderzoek

<https://hdl.handle.net/1874/360640>

A. g. m. 192, 1942

ENKELE TOEPASSINGEN VAN
HISTOLOGISCHE EN MICRO-
CHEMISCHE METHODEN VAN
VITAMINE C-ONDERZOEK

H. E. HENKES

ht

2



ENKELE TOEPASSINGEN
VAN HISTOLOGISCHE EN MICROCHEMISCHE
METHODEN VAN VITAMINE C-ONDERZOEK

Diss. Utrecht 1942

ENKELE TOEPASSINGEN VAN
HISTOLOGISCHE EN MICROCHEMISCHE
METHODEN VAN VITAMINE C-ONDERZOEK

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR
IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT
TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN WAARNEMEND
RECTOR MAGNIFICUS L. VAN VUUREN, HOOG-
LEERAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN EN
WIJSBEGEERTE, VOLGENS BESLUIT VAN DEN SE-
NAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE TE VERDE-
DIGEN OP DINSDAG 16 JUNI 1942 TE 4 UUR N.M.

DOOR

HAROLD EDGAR HENKES

GEBOREN TE SCHEVENINGEN

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3480 7721



N.V. DRUKKERIJ M. WYT & ZONEN, ROTTERDAM

INHOUD

Inleiding	blz. 1
Hoofdstuk 1: Het vitamine C; zijn belangrijkste chemische en fysische eigenschappen	„ 4
Hoofdstuk 2: Het aantonen van het vitamine C	„ 6
Hoofdstuk 3: Verschijnsel van Zilva-Jacobson: depotvorming van ascorbinezuur in de epitheelcellen van het darm- kanaal na subcutane injectie	„ 18
Hoofdstuk 4: Koolhydraatstofwisseling en vitamine C	„ 36
Hoofdstuk 5: Bestaat er bij normaal gevoede caviae een verband tusschen het vitamine C- en het glycogeengehalte van de lever?	„ 42
Hoofdstuk 6: Wordt het vitamine C op dezelfde wijze in een glycogeenrijke als in een glycogeenarme lever op- geslagen?	„ 45
Hoofdstuk 7: Beschouwing over het varicerend vitamine C-gehalte van verschillende gedeelten van de lever. Wat is „normale voeding“?	„ 59
Hoofdstuk 8: Microchemische vitamine C-bepaling	„ 63
Samenvatting	„ 80
Résumé	„ 83
Literatuur	„ 87

*H*oogleraren, Lectoren en Docenten van de Medische en Natuur-Philosophische Faculteit; ik gevoel behoefte U mijn oprechten dank te betuigen voor de wijze, waarop gij tot mijn wetenschappelijke vorming hebt bijgedragen, al beteekent het voltooiën van dit proefschrift voor mij nog niet het afscheid van de Utrechtsche Alma Mater.

Hooggeleerde Boeke, Hooggeachte Promotor, 4 jaren geleden steltet gij Uw laboratorium voor mij open en in dien tijd ben ik tot het besef gekomen welk een voorrecht mij te beurt gevallen is, op Uw laboratorium te mogen werken in een spheer, die welhaast ideaal genoemd mag worden. Gij waart het ook, die mij steeds hebt voorgelielden mijn onderzoekingen aangaande het vitamine C niet als geeindigd te beschouwen na de bekroning door de Faculteit, maar ze uit te breiden en neer te leggen in een proefschrift, dat Gij thans voor U hebt liggen. Nog lang hoop ik het voorrecht te hebben op Uw laboratorium te werken.

Zeergeleerde Berkelbach van der Sprenkel, het laatste jaar waart gij mijn mentor in de beste beteekenis; niet alleen op wetenschappelijk gebied mocht ik profiteeren van Uw critische zin, maar ook Uw vaderlijke zorg, die Gij — gelukkigerwijze — ook tot mij uitstreklet, heeft mij vaak over vele laagtepunten heen geholpen, waarvoor ik U niet dankbaar genoeg kan zijn. Ik prijs mij gelukkig, wanneer ik nog jaren van Uw hulp en samenwerking zal kunnen profiteeren.

Zeergeleerde Akkeringa, met groote erkentelijkheid denk ik terug aan den tijd, dat gij mij onderricht hebt in de beginselen van de histologische techniek, waarvan ik nu nog steeds de vruchten pluk.

Zeergeleerde Van Eekelen, U en Uw medewerkers ben ik dank verschuldigd voor de wijze, waarop Gij mij hebt ingeleid in het chemische vitamine C-onderzoek.

Geleerde Hulk en Zeergeleerde Bekker, de moeite, die Gij genomen hebt om mij van wege het Rijks Instituut voor de

Volksgezondheid van voldoende dier-materiaal te voorzien, heb ik buitengewoon op prijs gesteld.

Hooggeleerde Vening Meinesz, Uw onderricht in het gebruik van de planimeter heeft veel bijgedragen tot het verkrijgen van goede resultaten bij het microchemisch onderzoek.

Zeergeleerde Tausk, dat gij zoo welwillend zijt geweest mij door de N.V. Organon van het benodigde vitamine C te voorzien, heb ik ten zeerste op prijs gesteld.

Zeergeachte mejuffrouw De Looze, op deze plaats maak ik met groote erkentelijkheid gewag van Uw hulp op chemisch en histologisch gebied, welke mij het onderzoek veel heeft verlicht.

Van Doorne en Buisman, beiden hebt Gij in belangrijke mate bijgedragen tot de resultaten in dit proefschrift vastgelegd; de eerste door het vervaardigen van de mooie microfoto's, de tweede door het maken van bijna het geheele instrumentarium en door het verlenen van de technische hulp in den loop van het onderzoek.

De Bouter, erkentelijk ben ik ook U voor het keurige teekenwerk, dat Gij verzorgdet.

Voor de nauwgezette wijze, waarop Frida en Johan de proefdieren verzorgd hebben en dagelijks de verschillende dieeten hebben klaargemaakt, heb ik niets dan lof.

INLEIDING

Dit proefschrift is te beschouwen als een directe voortzetting van de beantwoording van de prijsvraag, in 1939 uitgeschreven door de Rijksuniversiteit te Utrecht. De Faculteit der Geneeskunde verlangde daarbij een histologisch onderzoek naar het voorkomen van vitamines in lichaamscellen bij verschillende voedingstoestanden. Het antwoord op deze prijsvraag — door de Faculteit de bekroning met de gouden medaille waardig gekeurd — is verwerkt in deze dissertatie, waarbij echter ter contrôle van de histologische resultaten macro- en microchemische bepalingen van het vitamine C werden ingelascht. De resultaten, verkregen bij het microchemisch vitamine C-onderzoek, zijn vastgelegd in het laatste hoofdstuk.

De geschiedenis van de scheurbuik — en daarmee verbonden die van het vitamine C — is zoo oud als die van de beschaving. Er wordt meegedeeld, dat reeds Hippocrates de scheurbuik kende; in zijn geschriften spreekt hij van een ziekte, welke gekarakteriseerd is door veelvuldige bloedingen en zweren aan het tandvleesch. De eerste nauwkeurige beschrijvingen van dit ziektebeeld komen in de 13e eeuw voor. Men meende — en deze opvatting was tot in de vorige eeuw algemeen verbreid — met een infectieziekte te doen te hebben. Toch vermoedde een Fransch arts, Venette, reeds in 1671, dat de scorbut samenhang met een gebrek aan versche groenten in de voeding, maar zijn opvatting werd, ondanks de waarnemingen, die anderen in de volgende eeuwen deden, geen gemeengoed. Reeds vroeg was bij de zeevarende volkeren de anti-scorbutische werking van bepaalde kruiden en vruchten (sinaasappel) bekend, vooral dank zij de bemoeiingen van Hollandsche en Engelsche scheepsartsen, waarbij vooral de naam van James Lind dient te worden genoemd. Toch eischte de scheurbuik onder de zeelieden nog langen tijd ontelbare slachtoffers. Ook op het land echter, in tijden van hongersnood en oorlog, was de sterfte aan deze gevreesde ziekte groot; zelfs in den vorigen Wereldoorlog en wel hoofdzakelijk aan het Oostelijk front, was de mortaliteit ten gevolge van de scorbut nog zeer hoog.¹⁾

¹⁾ ten deele naar: „les Vitamines”, Randoïn & Simonnet, Paris 1932.

In het begin van deze eeuw is men de scorbut experimenteel gaan bestudeeren; in 1907 gelukte het Holst en Fröhlich door eenzijdige voeding met graan bij caviae typische verschijnselen van scorbut op te wekken; zij konden deze symptomen onderdrukken door het toevoegen van groenten, vruchten en extracten hiervan. In 1912 bracht Funk deze antiscorbutische stof onder in de groep der vitamines als vitamine C. De naam „vitamine” is slecht gekozen; beter is het, van „bijkomstige voedingsstof” te spreken, welke term Hopkins (eveneens in 1912) invoerde. Met dat al duurde het toch nog tot 1918 vóórdát algemeen aangenomen werd, dat de scorbut een deficiëntieziekte was.

Langen tijd leverden pogingen, het vitamine C zuiver te isoleeren, geen resultaat op. Intusschen gelukte het Szent-Györgyi in 1928 uit de bijnierschors van het rund en uit een aantal plantaardige stoffen (o. a. uit het nationale product van zijn land, de paprika) een stof te isoleeren met sterk reduceerende eigenschappen. Hij noemde deze stof hexuronzuur. Reeds eenige jaren voordien was komen vast te staan, dat de werkzame antiscorbutische extracten, die men had weten te bereiden, een sterk reduceerend vermogen bezaten. Szent-Györgyi besloot in 1932 een onderzoek in te stellen, in hoeverre dit hexuronzuur antiscorbutisch werkzaam was. Inderdaad wezen experimenten op caviae uit, dat een dagelijksche dosis van ongeveer 1 mg caviae tegen scorbut kon behoeden. Hiermede werd waarschijnlijk gemaakt, dat het hexuronzuur identiek was met het vitamine C, welke overeenstemming later ook chemisch bewezen werd. De naam hexuronzuur werd toen gewijzigd in ascorbinezuur.

In latere jaren gelukte het ook om het vitamine C, het ascorbinezuur dus, synthetisch te bereiden. (Reichstein; Haworth). Een jaar later, in 1934, is de behandeling van de scorbut en alle toestanden, waarbij men met een latent vitamine C-gebrek te doen meende te hebben — een toestand van hypovitaminosis C — begonnen met het toedienen van synthetisch bereid ascorbinezuur. Dit synthetische vitamine C heeft geheel en al dezelfde werkzaamheid als het natuurlijke product, al heeft men in dit opzicht nog weleens getwijfeld. Men meende nl., dat er voor de opname en het vastleggen van het vitamine C nog een co-vitamine noodig zou zijn, dat wèl in de bekende

natuurlijke bronnen van het vitamine C zou voorkomen, maar niét in het synthetisch bereide product. De onderzoekingen van Scheunert en Reschke (ref. Voeding 15, 1941) hebben deze opvatting ten overvloede nogmaals weerlegd.

Wat de functie van het vitamine C in het dierlijk organisme betreft, het mechanisme van het vitamine is nog niet nauwkeurig bekend. Wel neemt men aan, dat het vitamine C als oxydo-reductie-systeem dienst doet en als zoodanig bij de stofwisseling van de cel een belangrijke rol speelt. Verder wordt het vitamine C beschouwd als een anti-infectieus vitamine; symptomen van een avitaminosis of een hypovitaminosis C zouden bestaan in een verminderd weerstandsvermogen tegen infecties; bij verschillende infectieziekten, welke met koorts verlopen, wordt dan ook door sommigen groote doses ascorbinezuur toegediend.

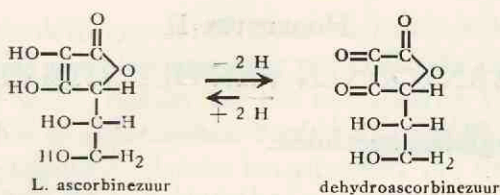
HOOFDSTUK I.

HET VITAMINE C; ZIJN BELANGRIJKSTE CHEMISCHE EN PHYSISCHE EIGENSCHAPPEN

Het ligt allerminst in mijn bedoeling, hier een volledig overzicht te geven van alle chemische en fysische eigenschappen van het vitamine C; slechts bij die eigenschappen, die van direct belang zijn geweest in den loop van dit onderzoek, wil ik hier stilstaan. Voor een uitgebreide studie over het vitamine C zij hier verwezen naar het werk van H. Vogel, *Chemie und Technik der Vitaminen*; Stuttgart, 1940.

Het vitamine C of linksdraaiend ascorbinezuur is zeer gevoelig voor oxydatie; deze wordt sterk bevorderd door katalyse van zware metalen, vooral door sporen koper. De ascorbinezuur-oplossing, bereid in vaten, welke geen sporen koper afgeven, is echter zelfs tegen O_2 vrij bestendig. De oxydatie van het ascorbinezuur wordt geremd door vele stoffen; vooral de SH-verbindingen, o. a. glutathion en cysteine zijn hierbij belangrijk. Dit geldt zoowel voor de plantenwereld, waar oxydatie in de cellen op deze wijze voorkomen wordt als voor dierlijke weefsels, waar we deze stoffen, die de oxydatie tegengaan, vooral aantreffen in de lever en de bijnier. In dit laatste orgaan — en dan speciaal in het merg — zijn deze stoffen bij het histochemisch vitamine C-onderzoek bekend als „substances inhibitrices”, omdat de zilvernitraat-reactie negatief kan zijn, terwijl er toch zooveel ascorbinezuur aanwezig is, dat de reactie bij afwezigheid dier stoffen zeker positief uit zou vallen. Vooral de critiek op deze methode bedient zich gaarne van dit argument. (Zie hierover Hoofdstuk 2).

Vooraf het reduceerend vermogen van het linksdraaiend ascorbinezuur is belangrijk; dit is zóó sterk, dat alleen het glutathion in vivo het ascorbinezuur in dit opzicht kan overtreffen. Hierbij wordt het vitamine C geoxydeerd tot dehydroascorbinezuur; deze reactie is omkeerbaar. Door reduceerende stoffen, o. a. H_2S , kan het dehydroascorbinezuur weer gereduceerd worden tot het l-ascorbinezuur. Ook in vivo is dit mogelijk, waardoor het ascorbinezuur als een oxydo-reductie-systeem is te beschouwen.



Bij deze reactie is de pH van belang; in alcalisch milieu gaat de oxydatie irreversibel verder.

Van dit sterke reductievermogen maken we gebruik bij de chemische bepaling; bij de titratie volgens Tillmans wordt de kleurstof — 2,6 dichloorphenolindophenol — gereduceerd tot de leucovorm. Ook de zilvernitraat-reactie, waarop het histologisch aantoonen van het ascorbinezuur berust, is gebaseerd op dit sterke reduceerende vermogen van ascorbinezuur. In zuur milieu is het vitamine C in staat de AgNO_3 -oplossing in het donker te reduceeren tot metallisch zilver. Volgens Fink (1) kan ook H_2S een aangezuurde AgNO_3 -oplossing in donker reduceeren, maar in vivo komt deze verbinding niet voor. Hierop zal bij de bespreking van de zilvernitraat-methode nog nader worden ingegaan.

Van de fysische eigenschappen, die vooral voor mij van belang waren, noem ik de gemakkelijke oplosbaarheid in water en alcohol. De oplosbaarheid neemt af met de toeneming van het aantal C-atomen in het alcohol-molecuul. Onoplosbaar is het ascorbinezuur in aether, chloroform en benzol.

Het ascorbinezuur bezit een absorptiespectrum in neutraal milieu dat gelegen is bij $265\text{ m}\mu$; dit verschuift met de pH van de oplossing; is de pH kleiner dan 3, dan ligt het spectrum bij $245\text{ m}\mu$.

Hiervan maakt de spectrografische bepalingsmethode gebruik.

HOOFDSTUK II

HET AANTOONEN VAN HET VITAMINE C

A. De biologische methode.

Hierbij wordt de te onderzoeken stof (b.v. orgaan of weefsel-extract) als vitamine C-bron toegevoegd aan het vitamine C-looze dieet van caviae. Deze methode kan preventief, dan wel therapeutisch worden gebruikt. In het eerste geval wordt aan caviae op vitamine C-loos dieet een bekende hoeveelheid van de te onderzoeken stof gegeven en er wordt nagegaan, hoe groot de minimum hoeveelheid is, welke nog gewichtstoename geeft. Bij de therapeutische methode bepaalt men de minimum hoeveelheid, die aan caviae op C-loos dieet opnieuw gewichtsvermeerdering geeft. (Caviae op vitamine C-loos dieet lopen namelijk sterk in gewicht achteruit, wanneer deze voeding eenigen tijd geduurd heeft.)

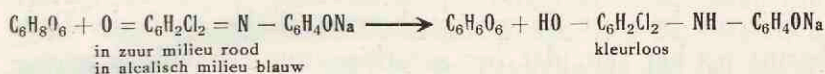
De biologische methode bezit groote nadeelen; in de eerste plaats de lange duur van de proeven en in de tweede plaats zijn fijne kwantitatieve bepalingen niet mogelijk. Wel geeft Moll (2) aan, dat op deze wijze zeer goed verschil te vinden is tusschen 0,25 en 0,5 mg C dagelijks toegediend aan de proefdieren, maar de chemische bepalingen bereiken toch een veel hooger grad van nauwkeurigheid. Bovendien zijn er altijd individueele verschillen te vinden bij de caviae, welke voor deze biologische bepalingen gebruikt worden.

Het tijdsbezwaar is in den loop van de jaren echter belangrijk verminderd, sedert Höjer in 1926 de tandontwikkeling van de caviae op vitamine C-loos dieet in het geding bracht. Het bleek namelijk, dat vitamine C-gebrek vroegtijdige degeneratie geeft van de odontoblasten. Dit proces is reversibel; bij C-toediening worden de odontoblasten weer normaal van vorm en zetten ze weer volwaardige dentine af. Later bleek het aan Key en Elphick (1931), dat reeds na 14 dagen C-loos dieet in de transversale coupes van de wortels der snijtanden duidelijke veranderingen te zien konden zijn.

B. Chemische vitamine C-bepalingen.

Het meest gebruikt wordt wel de titratie van het vitamine C met 2.6. dichloorphenolindophenol, welke me-

thode ik zelf ook toegepast heb. Deze methode, welke afkomstig is van Tillmans en welke later door verschillende auteurs geperfectionneerd werd, bestaat uit het extraheeren van het vitamine C uit het te onderzoeken weefsel door een 10% trichloorazijnzuur-oplossing en daarna het titreeren van het ascorbinezuur met behulp van het reagens tevens indicator 2.6 dichloorphenolindophenol:



In plaats van het trichloorazijnzuur gebruikte ik een 5% metafosforzuur-oplossing, zulks op aanraden van Dr. van Eekelen, daar dit het beste nu bekende extractiemiddel voor ascorbinezuur is.

Er is veel critiek geleverd op de methode door verschillende auteurs, welke hier op neer komt, dat de methode niet specifiek zou zijn; verschillende stoffen (waaronder cysteïne, glutathion, ergothioneïne) kunnen het reagens ook reduceeren. Om een belangrijk deel van deze SH-verbindingen te elimineeren, maakten Emmerie en Van Eekelen gebruik van een precipitatie met mercuri-acetaat, gevolgd door een reductie met H₂S. Speciaal voor bloed en urine onderzoek is dit van belang; voor C-bepalingen in orgaanextracten was het niet noodig gebruik van deze methodiek te maken, omdat het gehalte aan deze storende stoffen zoo laag geacht kan worden te zijn, dat ze op de bepaling geen invloed uitoefenen.

De micro-titratie van het vitamine C, zooals deze ontworpen is door Glick, is in wezen een gewone dichloorphenolindophenol-titratie; de titratie-techniek en de apparatuur verschilt echter sterk. Hierop wordt in Hoofdstuk 8 nader ingegaan.

De methyleenblauw-methode van Martini-Bonsignore berust op het feit, dat bij intensieve belichting van een ascorbinezuur-oplossing de oxydo-reductie-potentiaal kleiner wordt, speciaal bij aanwezigheid van fotodynamische stoffen; een methyleenblauwoplossing wordt dan bij intensieve bestraling gereduceerd tot de leucovorm wanneer ascorbinezuur aanwezig is.

Methode van Bezssonoff: de beide enolische OH-groepen geven een violette kleur in tegenwoordigheid van het

monomolybdofosforwolframaamzuur. De methode is niet geheel specifiek; ook verschillende andere stoffen geven reductie van het reagens.

Hiernaast zijn er nog verschillende andere chemische methoden in gebruik, welke echter alle minder specifiek zijn.

C. Physische methode.

Hiertoe behoort de spectrophotometrische methode. Deze berust op het feit, dat het ascorbinezuur een absorptiespectrum bezit, dat gelegen is bij 265,0—241,0 m μ , afhankelijk van de pH oplossing. Ook andere stoffen, die als oxydo-reductie systeem kunnen optreden, hebben een spectrum, dat in het ultraviolet gelegen is o. a. reducton, redoxine en dioxymaleïnezuur. Het maximum van deze spectra valt echter niet samen met dat van het absorptiespectrum van ascorbinezuur.

D. Histochemische methode.

Hierop wil ik dieper ingaan, omdat op deze methodiek een belangrijk deel van de gevonden resultaten berust.

Onbewust heeft Renaud in 1893 in zijn „Traité d'Histologie pratique" als eerste de histochemische vitamine C-reactie opgemerkt; hij spreekt n.l. van een zilverkleuring waarbij geen sprake is van een secundaire physische of chemische reductie. Ook later is het reduceerend vermogen van cytoplasma en mitochondriën ten opzichte van het zilvernitraat opgemerkt, maar een verklaring wist men er niet van te geven.

Pas met de mededeeling van Szent-Györgyi (3), dat de schors van de bijnier zilvernitraat kan reduceeren, terwijl het merg ongekleurd blijft, begint het histologisch vitamine C-onderzoek. Met Bourne in 1933 (4) wordt dit onderzoek echter pas stelselmatig ingevoerd; vooral Fransche onderzoekers, met name Giroud en Leblond hebben zich intensief bezig gehouden met deze methodiek.

Giroud publiceerde in 1934 de eerste resultaten van zijn zilvernitraat-methode, welke belangrijk specifiekier geworden was, dank zij het gebruik van een aangezuurde zilvernitraat-oplossing. Met andere zilvermethoden heeft deze methodiek weinig gemeen. Hiervan moet ze goed gescheiden worden, omdat deze reacties alle gebruik maken van het zilver-

hydroxyde, wat zeer gemakkelijk te reduceeren is. Het essentieele onderscheid ligt dus in het feit, dat bij de reactie van Giroud het reduceerend vermogen van het ascorbinezuur dermate groot is, dat het in staat is, het zilvernitraat in het donker, zelfs in een *zuur* milieu te reduceeren, waartoe het vitamine C practisch alleen in staat is.

Giroud maakt gebruik van een aangezuurde 10 % oplossing van zilvernitraat, waarvan de p_H ongeveer 3 is, maar zijn wijze van werken verschilt aanmerkelijk van die, welke ik volgde. Giroud (5) injecteert bij het pas gedoodde dier het zilvernitraat in de thoracaal aorta; dit dient geheel in het donker te geschieden. Na 10—15 minuten wast hij het overgebleven zilvernitraat weg met veel aq. dest. Hierna worden de orgaanstukjes ingesloten in paraffine volgens de gewone techniek en pas na het snijden worden de coupes ontdaan van de laatste zilversporen door naspoelen in een thiosulfaat-oplossing. Het bezwaar van deze wijze van werken ligt vooral in het feit, dat vaatspasmen de reactie in bepaalde gebieden van het te onderzoeken orgaan kunnen belemmeren.

Techniek van de zilvernitraat-reactie

Practischer is de modificatie, waar Tonutti (6) zich van bedient. Deze methodiek heb ik steeds gevolgd, al bracht ik ook eenige wijzigingen in de tijden aan.

1. afspoelen van het weefselstukje in een isotonische laevulose-oplossing (5,4 %);
2. het weefsel wordt 20 minuten tot $\frac{1}{2}$ uur in een 10 % $AgNO_3$ -oplossing, waaraan 2 druppels ijsazijn per cc zijn toegevoegd, gelegd;
3. uitspoelen in aq. dest. gedurende $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$ uur (water ververschen);
4. het weefselstukje komt nu $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$ uur in een 3 % $Na_2S_2O_3$ -oplossing;
5. uitspoelen in aq. dest. gedurende $\frac{1}{4}$ tot $\frac{1}{2}$ uur;
6. insluiten van het weefselstukje via de alcoholen enz. in paraffine.

Het inwerken van het zilvernitraat, evenals het uitspoelen met thio, moet geheel in het donker geschieden. De tijd, ge-

durende welke het zilvernitraat inwerkt, verlengde ik zelf tot 1—3 uur. Ook het uitspoelen van het niet gereduceerde zilvernitraat in het thiosulfaat liet ik eenzelfde tijd duren; doet men dit niet, dan zijn de verkregen preparaten niet lang houdbaar. Fink (1) verlengt zelfs de tijden voor het zilvernitraat tot 12—24 uur en voor het thiosulfaat tot 5—10 uur. Groot gevaar voor verwarring tusschen de zilverkorrels, ontstaan ten gevolge van de vitamine C-reactie en de reductie in den loop der tijden ontstaan door onvoldoende uitwasschen van het niet gebruikte zilvernitraat, bestaat er niet; deze laatste zijn steeds bruin-geel van kleur en kunnen alleen in de micro-foto's tot foutieve conclusies leiden. Aanvankelijk kleurde ik de verkregen coupes na met kernechtrood; voor het maken van micro-foto's is deze werkwijze echter ten eene male ongeschikt (het rood wordt immers in het fotografisch beeld als zwart of grijs afgebeeld) wanneer geen panchromatisch materiaal gebruikt wordt. Ik gebruikte dan ook een blauwe contrastkleuring; goede resultaten verkreeg ik met een contrastkleuring van Wasserblau 0,1 % gecombineerd met toluidineblauw 0,3 % als kernkleuring of de combinatie Wasserblauhaematoxyline van Ehrlich (kleurtijden bedroegen voor het eerste 2 minuten, voor het laatste 1 minuut).

Ook van een 1 % aangezuurde goudchloride-oplossing heb ik gebruik gemaakt, zoals Tonutti en Plate; alleen voor bepaalde organen heeft deze werkwijze eenige voordeelen; voor de meeste weefsels is het gebruik van de 10 % zilvernitraat-oplossing verkieslijker, omdat dit reagens tevens het weefsel eenigszins fixeert.

Specificiteit van de reactie.

De specificiteit van deze methode is door vele auteurs in twijfel getrokken. Inderdaad is deze ook niet absoluut, als is deze specificiteit in vergelijking met andere reagentia zeer groot. De zuurgraad is hier belangrijk; een alcalische zilvernitraat-oplossing is zeer onstabiel; deze kan door vele stoffen gereduceerd worden. Gebruiken we een neutrale oplossing, dan hebben we reeds te doen met een belangrijk meer specifiek reagens, maar de aangezuurde zilvernitraat-oplossing is het meest specifiek voor ascorbinezuur. De reactie is alleen positief

bij normale dieren, die vitamine C kunnen synthetiseeren (als het gehalte tenminste hoog genoeg is) en bij dieren, die scorbout kunnen krijgen, alleen wanneer deze voldoende vitamine C met hun voeding krijgen toegediend. De reactie verdwijnt volkomen bij caviae op vitamine C-loos dieet en keert weer terug na toediening van natuurlijk of synthetisch vitamine C.

Onder de weinige stoffen, die het zilvernitraat bij pH van ong. 3 in het donker toch kunnen reduceeren, moeten de melaninekorrels van de epidermiscellen genoemd worden, maar dit is niet van practische beteekenis.

Substances inhibitrices.

Van veel meer belang is het feit, dat de reactie negatief kan zijn in een weefsel, waarin met andere methoden een C-gehalte is aangetoond, zeker in staat reductie van het zilvernitraat te bewerkstelligen. Als eersten maakten Harris en Ray (7) van dit feit gebruik om critiek op de zilvernitraatmethode uit te oefenen. Zij merkten op, dat de lever en het merg van de bijnier — beide weefsels zijn betrekkelijk rijk aan vitamine C — geen reactie te zien geven onder normale omstandigheden. Zoowel Bourne (8) als Huszak (9) hebben getracht hiervoor een verklaring te geven. Bourne meende aanvankelijk te doen te hebben met de reversibel geoxydeerde vorm van het vitamine C (het dehydroascorbinezuur), met welke bedoeling hij dan ook deze reversibel geoxydeerden vorm weer trachtte te reduceeren met H_2S , terwijl Huszak andere stoffen aansprakelijk stelde voor deze negatieve reactie. Hij zag dat een trichloorazijnzuur-extract van het merg, toegevoegd aan een ascorbinezuuroplossing, geen zilvernitraatreactie te zien gaf. Na precipitatie van deze de reactie belemmerende stoffen met looacetaat verscheen de reactie echter wel. Vooral glutathion en andere SH-verbindingen zijn door verschillende auteurs voor dit phenomeen aansprakelijk gesteld. We hebben hier weer te doen met die stoffen, die — zooals ik reeds in Hoofdstuk 1 gezegd heb — de oxydatie van het ascorbinezuur tegengaan.

Anti-oxydantia.

Deze anti-oxydantia, zooals ik ze wil noemen, hebben echter ook algemeene beteekenis; ook de oxydatie van het vitamine C

aan de lucht wordt tegen gegaan. Dit is voor mij van groot belang geweest bij de micro-titratie-methode van Glick; hierbij hebben we te maken met versch gesneden coupes, waarvan het ascorbinezuur-gehalte zoo min mogelijk achteruit mag loopen, voordat de coupes in het extractiemiddel komen.

Ook bij het verdwijnen van het vitamine C uit de weefsels na den dood spelen deze anti-oxydantia een groote rol; dank zij deze stoffen loopt het C-gehalte slechts langzaam achteruit, doordat steeds slechts een gering gedeelte van het vitamine C in de irreversibel geoxydeerde vorm overgaat en zodoende voor de bepaling te loor gaat. Giroud (10) geeft een verlies van ongeveer 10 % in 24 uur; in 48 uur zou het verlies niet meer dan 25 % bedragen. Mouriquand en Viennois (11) geven aan, dat het verlies gemiddeld iets hooger ligt, n.l. na 24 uur 25 %, na 48 uur 38 % en na 72 uur 58 %. Histochemisch kan de zilvernitraatreactie volgens hen zelfs positief in de bijnier blijven tot 96 uur na den dood.

Peters en Martin (12) besluiten uit een zeer uitgebreid proefdiermateriaal (zij gebruikten meer dan 100 honden) tot geen verlies in de eerste 6 uur na den dood, wanneer de bijnieren in situ gelaten zijn, terwijl het dier bij een temperatuur van 12° C bewaard wordt. Het C-verlies bedraagt in 27 uur ongeveer 50 %; worden de proefdieren echter bij 25—35° C bewaard, dan is het vitamine C in 27 uur geheel verdwenen.

Ook Yavorski (13) geeft weinig afwijkende cijfers; zijn materiaal is echter afkomstig van ziekenhuis-autopsieën; binnen 24 uur zag hij hoogstens een verlies van 10 % optreden. Worden de organen na den dood in de ijskast bewaard, dan is het verlies aan vitamine C nog veel geringer: Glick en Biskind (14) vermeldden, dat zij geen verlies vonden in runderbijnieren, wanneer deze gedurende 1—2 dagen bij een temperatuur van —5° C bewaard werden. Zelfs 4 dagen post mortem zou volgens deze onderzoekers het gehalte niet achteruit geloopt zijn.

Intracellulaire localisatie van het vitamine C.

Hierover is veel geschreven en gestreden, maar eigenlijk weten we hier niets van; immers alleen de reactie van het vitamine C met het zilvernitraat kunnen we waarnemen, maar

of het vitamine C zich ook inderdaad intra vitam bevond op de plaatsen, waar we de zilverkorreltjes zien, is allerm minst zeker. Misschien moeten we deze zilver-reactie zien als punten, waar het vitamine C — al of niet tengevolge van de reactie met het zilvernitraat — gecondenseerd is. Deze overweging geldt tenminste, als we aannemen, dat het ascorbinezuur zich diffuus in het celplasma bevindt en dat er dus primair geen directe binding zou bestaan tusschen de stof C en bepaalde celstructuren. Vaak zien we immers een korreling optreden, die ons typisch herinnert aan de mitochondriën, het z.g. „aspect mitochondrial”. Een ander type, dat volgens Giroud (5) speciaal in het bijniermerg, de darmtractus en de geslachtsklieren zou voorkomen, is het impregnatietype-Golgi-net. Verder zijn er in vele cellen overgangsvormen te vinden. De opvatting van Järvi (15) en Hirsch (16) hieromtrent is, dat het vitamine C primair in opgelosten toestand, dus diffuus in het protoplasma aanwezig is en dat pas later het ascorbinezuur vastgelegd wordt in het Golgi-net.

Pfuhl (17) richt zich tegen het aannemen van een binding tusschen het vitamine C en protoplasmatische- of paraprotoplasmatische celstructuren; volgens hem zijn er vele aanwijzingen tegen een granulaire opstapeling van het vitamine C in de cellen, o. a. de snelle werking van het vitamine in het organisme, de gemakkelijke extraheerbaarheid en uitscheidbaarheid en het geringe chemische weerstandsvermogen; allemaal factoren, die alleen te rijmen zijn met een voorkomen van het ascorbinezuur in opgelosten toestand in de cellen. Aantoonbaar is het vitamine C in dezen toestand niet (Järvi meent, dat het ook mogelijk is, dat het vitamine in de reversibel geoxydeerden vorm in het plasma aanwezig is); alleen de onregelmatig verdeelde neerslagen, die we vaak in een niet zeer breede impregnatiezône in de preparaten aantreffen, wil hij beschouwen als een reactie van het ascorbinezuur, dat in opgelosten toestand in het weefsel aanwezig is en dat uit de binnendringende fixatie-vlocestof zilverdeeltjes vrijmaakt. De sterkte van deze vage neerslagen correspondeert volgens Pfuhl namelijk met het vitamine C-gehalte van de organen. Deze onregelmatige zilverneerslagen zijn steeds door de Fransche onderzoekers genegeerd en moeten ook bij de beoordeeling van de preparaten buiten beschouwing gelaten worden.

Pfuhl geeft verder vele voorbeelden, waaruit hij wil bewijzen, dat de zilverkorrels, die we zien bij de histochemische methode, uitsluitend bestaande celstructuren zijn zooals pigmentgranula, secretie-korrels en lipoiddruppels, welke alleen zichtbaar zijn geworden door een tijdelijke overstroming met ascorbinezuur, waardoor ze zelf een sterk reducerend vermogen krijgen en waardoor de zilver-reactie dan positief uitvalt. Tijdens de scorbut valt de zilvernitraat-reactie negatief uit, maar de celstructuren zijn nog aanwezig en met andere histologische methoden aantoonbaar, alleen het reductievermogen van de granula — hetzij direct door het vitamine C hierop overgedragen, hetzij van het vitamine C zelf afkomstig, dat op de granula gecondenseerd is — is verdwenen.

Negatief is de reactie steeds in de kern, evenals in de nucleoli en de chromosomen.

Extra-cellulair is het vitamine C ook histochemisch aan te toonen, o. a. in kraakbeen; in bloedplasma is de reactie negatief, alleen de cellige elementen vertoonen een positieve reactie.

Gereduceerde en reversibel-geoxydeerde vorm van het ascorbinezuur.

Een ander bezwaar van de zilvernitraat-methode is, dat slechts de gereduceerde vorm van het ascorbinezuur aantoonbaar is. In het bloedplasma b.v. krijgen we nooit eenige reactie te zien, terwijl toch het gehalte, vooral na een ascorbinezuur-injectie, dermate hoog is, dat de reactie zeker positief zou uitvallen, wanneer we in een cel met een dergelijk vitamine C-gehalte te doen hadden. Men zou kunnen aannemen, dat het ascorbinezuur echter in reversibel geoxydeerden vorm in het plasma aanwezig is, maar Van Eekelen (18) deelt mede, dat dezen vorm, in het plasma althans, niet voorkomt. In welken toestand het ascorbinezuur in de bloedlichaampjes aanwezig is, is volgens Van Eekelen moeilijk uit te maken. De negatieve reactie van het plasma moet dus, ook wanneer de C-spiegel hoog genoeg is in het bloed, worden toegeschreven aan het ontbreken van structuren, die, zooals Pfuhl zich dat voorstelt, de reducerende eigenschappen van het vitamine C overnemen en een positieve reactie te voorschijn roepen.

In weefsels heeft Bourne (19) getracht den reversibel geoxydeerden vorm met H_2S weer te reduceeren; hij zag na deze bewerking echter geen merkbare versterking van de histologische reactie. Hieruit concludeerde hij een volkomen overwicht van den gereduceerden vorm in de weefsels over den reversibel geoxydeerden vorm. Toch is dit later gebleken, niet geheel waar te zijn; onder bepaalde omstandigheden vinden we ook in weefsels, waar anders practisch alleen de gereduceerde vorm voorkomt, een belangrijk percentage van het ascorbinezuur reversibel geoxydeerd. Dit komt volgens Ratsimamanga (20) voor bij caviae, die vermoeid zijn; het C-gehalte van de bijnierschors is sterk gedaald, terwijl 25 % van het corticale vitamine C in den reversibel geoxydeerden vorm aanwezig is.

Voor de cellige bestanddeelen van het bloed liggen de verhoudingen echter anders; een belangrijk deel van het ascorbinezuur is hierbij steeds reversibel geoxydeerd.

Coupekleuring van het ascorbinezuur.

In den loop van dit onderzoek, speciaal bij de microtitratie van het ascorbinezuur heb ik getracht ook het vitamine C direct in de verse coupe aan te toonen. Het was de bedoeling naast de getitreerde coupes (zie hierover Hoofdstuk 8) ook coupes te laten zien, welke met zilvernitraat behandeld waren, om dan een goede vergelijking te kunnen maken tusschen het ascorbinezuur, dat chemisch met de microtitratie-methode aantoonbaar was en het ascorbinezuur, dat met de zilvernitraatreactie aangetoond werd. Het normale procedé, waarbij de coupes onmiddellijk na het opplakken in het donker in zilvernitraat gebracht werden, leverde geen resultaten op. Er stonden nu drie mogelijkheden open: 1. het vitamine C was reeds irreversibel geoxydeerd aan de lucht; 2. het was reversibel geoxydeerd tot dehydroascorbinezuur; 3. er waren in de coupes stoffen aanwezig, die de reactie tegengingen.

Was het eerste het geval, dan had ook de chemische titratie van het vitamine C in de coupes, die op dezelfde wijze behandeld werden, negatief moeten zijn. Dit was allermintst zoo; ik kan dan ook met een zekerheid grenzende waarschijnlijkheid aannemen met een reversibele oxydatie van het ascorbinezuur te doen te hebben, want de derde mogelijkheid vervalt, omdat

hetzelfde weefsel, maar dan als één stuk behandeld, met zilvernitraat fraaie histologische beelden geeft.

Om nu dit reversibel geoxydeerde vitamine C weer te reduceeren, heb ik gepoogd de methodiek te volgen, welke Bourne hiervoor geeft, n.l. reductie met H_2S en uitdrijven hiervan door middel van een N_2 -stroom. Hiermee komt men echter met een versche coupe in een vicieuse cirkel terecht. Immers, de coupe mag niet uitdrogen, dus moet dit procedé in een vochtige atmosfeer of in een vloeistof gebeuren. Water, verzadigd met H_2S komt niet in aanmerking, omdat het ascorbinezuur zeer gemakkelijk hierin oplost; bovendien bleek het H_2S zeer moeilijk volkomen uit te wasschen te kunnen worden, waardoor het H_2S gemakkelijk, wanneer de coupe — op het objectglas geplakt — in het zilvernitraat gebracht was, in staat bleek te zijn ook in het donker het zilver-reagens te reduceeren. In plaats van een korreling in de cellen van metallisch zilver, vrijgemaakt door het reduceerend vermogen van het ascorbinezuur, kreeg ik nu een fraaie zilverspiegel op het objectglas, te danken aan het sterk reduceerend vermogen van resten van de zwavelwaterstof, welke nog aanwezig waren in de coupe. Tot nu toe is het mij niet gelukt om goede resultaten met de vitamine C-coupekleuring te bereiken. Of het snijden en opplakken van de versche coupe in een stikstofatmosfeer en direct hierop het uitvoeren van het gewone zilvernitraat-procedé verbetering kan brengen, dient nog nader te worden onderzocht.

In dit hoofdstuk zijn verschillende bezwaren en eigenaardigheden van de histochemische methode van vitamine C-onderzoek behandeld; voor een goed begrip van zaken wil ik nogmaals de punten van verschil tusschen de chemische en de histochemische methoden naast elkaar stellen: de chemische methode is zeer fijn quantitatief, toont zoowel den gereduceerden, als den reversibel geoxydeerden vorm van het ascorbinezuur aan;

de histochemische methode geeft de vermoedelijke verdeling van het vitamine C in de cel weer; is slechts semi-quantitatief (sterke reactie — veel korrels; zwakke reactie en negatieve reactie) bezit een drempelwaarde (welke voor de lever althans volgens mijn proeven, ligt bij ongeveer 25 mg C per 100 gram) en toont alleen l-asc. het ascorbinezuur aan.

Tot slot wil ik nog op een modificatie van de histochemische methode wijzen, welke door Harde en Wolff (21) toegepast is. Deze onderzoekers extraheerden het te onderzoeken weefsel met methylalcohol, voegden daarna 0,4 % zilvernitraat-oplossing toe, terwijl tenslotte de verkregen oplossingen, waarin bij aanwezigheid van ascorbinezuur metallisch zilver wordt afgezet, met een standaardschaal vergeleken werden. Deze methodiek, welke ook niet meer dan semi-quantitatief genoemd mag worden, verifieerden zij met de chemische titratiemethode van Tillmans, waarbij — volgens de auteurs — goede overeenstemming bereikt werd.

HOOFDSTUK III.

VERSCHIJNSEL VAN ZILVA-JACOBSON: DEPOTVORMING VAN ASCORBINEZUUR IN DE EPITHEELCELLEN VAN HET DARMKANAAL NA SUBCUTANE INJECTIE.

Alvorens de onderzoekingen te bespreken, welke Zilva en Jacobson over de resorptie en het opslaan van het ascorbinezuur in de epitheelcellen van den darm hebben verricht, wil ik eerst enige aandacht schenken aan het proefdier-materiaal. Ik maakte bij dit onderzoek gebruik van caviae en muizen; de eerste zijn wat hun C-voorziening betreft, afhankelijk van het vitamine C-gehalte van hun voedsel; zij kunnen dus het ascorbinezuur niet zelf synthetiseeren. Volgens Giroud verkeerden de mensch en de aap in hetzelfde geval (22). De muis is echter onafhankelijk van de vitamine C-voorziening van zijn voedsel; dit dier dekt dus zijn C-behoefte uit zijn synthese.

Aanvankelijk stond deze synthese-mogelijkheid niet voor mij vast; dit was een gevolg van onvolledige en vaak tegenstrijdige berichten, vooral in de oudere literatuur. Van der Walle (23) geeft in zijn proefschrift aan, dat Eijckman in 1906 experimenteel scorbut wist te verwekken bij konijnen; Spruyt en Donath (24) noemen alleen de rat, de hond en het konijn bij die dieren, die het vitamine C zouden kunnen synthetiseeren. Om nu hieromtrent zekerheid te verkrijgen, voedde ik muizen met een vitamine C-loos dieet afkomstig van Van der Walle. Dit bestaat uit haver, zemelen en melk (zemelen om gebrek aan anti-neuritisches vitamine B₁ te voorkomen en de melk om de vitamine A-behoefte te dekken). De melk werd een uur gekookt om het aanwezige vitamine C te vernietigen. Nadat de muizen 3 weken op dit dieet geleefd hadden, onderzocht ik histologisch het vitamine C-gehalte van ileum en lever.

In de epitheelcellen van het ileum was een fijne korreling te zien van het ascorbinezuur. Fraai was het afbuigen van deze laag van korrels om de bekerzellen heen waar te nemen om daarna weer tot het oorspronkelijke niveau terug te keeren.

Ook in de lever is een duidelijke korreling waar te nemen; zeer duidelijk teekenen de endotheelcellen zich af met hun

duidelijke, grove korreling. Ook Giroud (25) met zijn medewerkers vermelden, dat de endotheelcellen meer vitamine C bevatten, dan de levercellen.

Vergelijken we nu echter deze resultaten met die, welke ik verkreeg na een histologisch onderzoek van muizen op normaal dieet (groenvoeder, brood en melk), dan blijkt het, dat er praktisch geen verschil bestaat tusschen deze 2 groepen muizen. Ook bij de muizen welke normaal, dus niet vitamine C-loos gevoerd werden, vond ik bij verschillende dieren een duidelijke korreling in de darmepitheelcellen. De hoeveelheid vitamine C van het darmepitheel hangt geheel af van den voedingstoestand, waarin het dier bij zijn dood verkeert, vandaar dat ik bij andere normale muizen geen positieve reactie vond. Ook in de lever van deze normale muizen was een fraaie levercelkorreling te vinden; deze was niet overal even sterk; immers het vitamine C-gehalte varieert in de verschillende delen van de lever belangrijk. Ook Giroud (26) wijst op het zeer wisselende gehalte aan vitamine C. Zelf heb ik dit bij muizen en caviae onder verschillende dieeten chemisch kunnen bevestigen; de resultaten daarvan zullen in Hoofdstuk 7 nader worden toegelicht.

Drie mogelijkheden bleven er dus open:

1. het dieet was, althans zooals ik het verstrekke, niet C-vrij;
2. De muis kan het ascorbinezuur zelf synthetiseeren en
3. de combinatie van deze twee mogelijkheden.

Om nu met zekerheid uit te maken, met welke mogelijkheid ik hier te doen had, voedde ik 2 caviae met dit dieet. Na ruim 3 weken is de beweeglijkheid van de dieren veel geringer geworden; klinische verschijnselen van scorbut doen zich echter nog niet voor. Dit klopt al niet met wat Mouriquand, Weill en Simon mededeelen (27); volgens hen treden de eerste waarneembare symptomen van scorbut op na 18 tot 23 dagen. Pas na 47 dagen hebben zich duidelijk verschijnselen van scorbut ontwikkeld: groote magerheid en abnormale gevoeligheid; speciaal pijn, opgewekt door druk op het onderste gedeelte van het femur, zooals Mouriquand en Coeur (28) beschrijven. Bij de obductie valt direct op de groote bloedingen aan de basis van het rechter femur en bloedingen aan de ribkraakbeenderen.

Met de zilvernitraat-reactie heb ik gepoogd nog ascorbinezuur ergens in het organisme aan te toonen; dit is inderdaad

niet gelukt. De „phase dystrophique”, zooals Mouriquand (29) dit stadium aanduidt, was dus hier bereikt. Volgens hem gaat deze phase in na den 24en tot den 26en dag en duurt zij tot 30 à 35 dagen, waarna het dier sterft. Dit stadium blijkt hier pas bereikt te zijn na 47 dagen dieet. Wat de kans betreft om de dieren in dit stadium in leven te houden, zegt Mouriquand dat dit bijna steeds gelukt door ascorbinezuur-injecties, wanneer de diarrhee, zooals hier, nog niet zijn intrede deed.

Uit deze proefnemingen blijkt wel, dat het dieet-Van der Walle, zooals ik dat althans aan de proefdieren toediende, niet vitamine C-vrij was. Van der Walle geeft zelf echter ook aan om de melk 1 uur te verhitten op 120°, dus niet normaal 1 uur lang koken. Het dieet heb ik in het latere onderzoek nog wel gebruikt, waarbij ik evenwel de melk door water verving.

De meeste proefnemingen werden evenwel verricht met gebruik maken van het vitamine C-looze dieet van Randoin en Lopez-Lomba, dat ik beschreven vond door Randoin en Michaux (30).

De procentueele samenstelling is de volgende:

witte boonenmeel	83
gedroogd biergist	3
botervet	5,5
calciumlactaat	5
natriumchloride	1,5
filtreerpapier	2

In den loop van het onderzoek veranderde ik het botervet in boter, daar deze volgens Wolff (31) geen aantoonbare hoeveelheden vitamine C bevat. Gedurende het laatste jaar was ik echter genoodzaakt de boter om begrijpelijke redenen geheel weg te laten. Randoin vermeldt als bijzonderheid, dat het dieet steeds door caviae tot aan hun dood met smaak wordt genuttigd. Helaas moest ik aanvankelijk de waarheid van deze opmerking in twijfel trekken; de caviae denken er niet aan om het voedsel op de wijze, waarop ik het toedien, op te eten. Tenslotte vond ik in de oorspronkelijke publicatie van Lopez-Lomba en Randoin (32) eenige nadere aanwijzingen omtrent de bereiding van het dieet: „nous avons soin de faire cuire pendant une heure notre farine de haricots avec la quantité

minima d'eau". Hierna blijkt ook, dat de caviae met groote smaak dit dieet verorberen.

Op dit dieet werden nu de proeven over een mogelijke C-synthese bij de muis voortgezet. Als resultaten vond ik na 1 tot 4 weken voortgezet dieet chemisch noch histologisch eenige achteruitgang in het C-gehalte van de organen der onderzochte dieren. Wel was er een duidelijk histologisch verschil in het ascorbinezuur-gehalte van lever en ileum tusschen deze muizen op dieet-Randoin en de dieren op het dieet-Van der Walle, zooals ik dat toegediend had. Nu was de levercel-korreling maar gering, terwijl de reactie in de epitheelcellen van het ileum steeds bij alle dieren negatief was.

Uit de resultaten van deze proeven, n.l. het constante vitamine C-gehalte, zoowel bij chemische als histologische bepalingen van de organen van muizen op het vitamine C-looze dieet van Randoin, meen ik dan ook te mogen concluderen tot een synthese van het ascorbinezuur door de muis.

Een nadere bestudeering van het verschijnsel, dat het eerst door Zilva (33) beschreven is en dat later door Jacobson uitvoerig behandeld is, leek mij niet van belang ontbloomt. Jacobson (34) zag het verband tusschen de resorptie en het opslaan van het vitamine C in de epitheelcellen van den darm en de andere bekende depôts van het ascorbinezuur. Zoowel bij toedienen van vitamine C per os als bij het *subcutaan* inspuiten van vitamine C zag Jacobson na korten tijd een sterke ophooping van het ascorbinezuur in de darmepitheelcellen. Hij diende aan caviae zonder vitamine C-reserve één enkele dosis van 50 mg ascorbinezuur per os of parenteraal toe en zag dan na ca. 1 uur een maximum aan ascorbinezuur terug in het darmepitheel; dit maximum valt volgens Jacobson voor de lever en de schors van de bijnier pas na 4 uur. Hij concludeert tot een depotfunctie van het darmepitheel, speciaal van het ileum en zegt dan verder: „Ce dépôt est fourni principalement par le sang ou par les liquides tissulaires et garde un certain équilibre par rapport aux dépôts d'acide ascorbique de l'organisme.” Enkele uren na de injectie is al het ascorbinezuur uit de epitheelcellen weggevoerd naar de andere depots.

Deze depotfunctie, die Jacobson toekent aan het darmepitheel leek mij niet zoo aannemelijk. Ik kan mij moeilijk voorstellen, dat de bloedvoorziening of de vloeistofstroom in de

weefsels naar de darmepitheelcellen in staat zou zijn het feit te verklaren, dat in ca. 1 uur een dergelijke sterke ophooping in de epitheelcellen tot stand zou kunnen komen. Ik vroeg mij af of we hier wellicht te doen hadden met een gastro- of entero-enterale kringloop van het ascorbinezuur, waarbij het vitamine C dan b.v. in de maag of het duodenum afgescheiden zou worden om dan later weer geresorbeerd te worden en wel in hoofdzaak door de cellen van het ileum. Hierna wordt het ascorbinezuur gewoon afgevoerd via de bloedbaan naar de depots, die wij kennen en wel in de eerste plaats naar de lever en de bijnieren.

Om deze gedachtengang nu aan de practijk te toetsen, trachtte ik het ascorbinezuur in de weefsels van caviae te localiseeren, vóórdat het maximum teruggevonden wordt in het darmepitheel. Het onderzoek geschiedde met een tweetal caviae, welke beiden 12 dagen lang vitamine C-loos gevoerd werden. Veilig kan worden aangenomen dat de reactie van de weefsels met het zilvernitraat dan negatief is. Volgens Giroud (5) is dit het geval na 9 dagen vitamine C-loos dieet, wanneer het gehalte van de bijnierschors gedaald is tot 10 à 15 mg C per 100 gram weefsel. Enkele jaren vroeger geeft Giroud c.s. (in 1934; 35) op, dat de reactie reeds na 5 dagen practisch negatief is op enkele kleine celeilandjes na, gelegen in de zona reticularis van de bijnierschors.

De beide caviae werden gedood 20, respectievelijk 30 minuten nu de subcutane injectie van 50 mg ascorbinezuur. De resultaten waren de volgende:

maag,
duodenum
en ileum De cavia, welke na 20 *minuten* gedood werd, vertoonde in maag duodenum en ileum geen spoor ascorbinezuur. In de lever vond is hier en daar zwart gekleurde endotheelcellen, terwijl ook de erythrocyten een duidelijke reactie vertoonden; deze waren óf gekorrelt, óf egaal zwart. Er was geen korreling van de levercellen zelf waar te nemen. In de nier is een fraaie korreling te zien in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde; geen reactie vertoonen de cellen van de tubuli contorti van de 2e orde en de glomerulus zelf; wel is in de glomeruli een reactie van de erythrocyten te zien. Aanvankelijk meende ik hierdoor af te wijken van hetgeen Giroud en Leblond mededeelen, n.l. een negatieve reactie van de glomerulus. Later bleek

mij echter, dat mijn waarnemingen toch met die van hen overeenstemden; Giroud en Leblond (36) zeggen n.l.: „the glomeruli do not show any reaction; only a few stained red blood corpuscles may be observed in the capillaries of the glomeruli.” De reactie van de ^{bijnier} is negatief; dit is dus wel een bewijs, dat de vitamine C-reserve van deze caviae verbruikt is gedurende de 12 dagen vitamine C-vrije voeding.

Bij de cavia, die gedood werd 30 *minuten* na de subcutane injectie van 50 mg ascorbinezuur was de reactie van ^{maag, duodenum en ileum} maag, duodenum en ileum wederom geheel negatief; nergens waren in de epitheelcellen eenige zilvergranula te zien. Een ander beeld in vergelijking met de eerste cavia vertoonde de lever. Ik vond een fijne korreling in de levercellen; om de kernen is een ^{lever} „korfje” van fijne granula te zien, terwijl ook verder in de cellen wat granula voorkomen. We hebben te doen met een typische impregnatie van het Golgi-net, zooals Giroud dat beschrijft, alleen komt dit type meestal niet in de levercellen voor. We zien dit type speciaal optreden bij kleuring van het ^{nier} ^{bijnier} bijniermerg, de darmtractus en de geslachtsklieren (37). In de nier vinden we weer dezelfde reactie: een sterke korreling in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde, terwijl de reactie van de glomeruli en van de tubuli contorti van de 2e orde negatief is. Bloedvat-endotheliën en erythrocyten geven weer de gewone positieve reactie te zien. In de ^{bijnier} bijnier is nu, speciaal in de schors, een fijne korreling te zien; duidelijk is ook weer de reactie van de erythrocyten in de bloedvaten.

Bezien we nu de resultaten, die uit dit bescheiden diermateriaal zijn te destilleeren, dan moet vastgesteld worden, dat geen feiten gevonden werden, die op eenigerlei wijze eenigen grond zouden kunnen verleenen aan de hypothese over een gastro- of entero-enterale kringloop van het vitamine C. Zoowel in de lever als in de bijnier zijn de eerste sporen van het ingebrachte ascorbinezuur na een half uur zichtbaar; weliswaar wordt het in kleine hoeveelheden in deze organen terug gevonden, maar de gegevens, die Jacobson verstrekt, wijzen erop, dat deze hoeveelheid na dezen tijd snel toeneemt. In de nier kon, wat de uitscheiding betreft, geen verandering geconstateerd worden tusschen de beide caviae; in beide gevallen was de ascorbinezuur-uitscheiding reeds in vollen gang.

Een uitgebreidere studie over het verschijnsel van Zilva-

Jacobson vond bij muizen plaats. Hiermede in verband onderzocht ik 13 witte muizen op het ascorbinezuur-gehalte van hun verschillende organen met behulp van de zilvernitraat-reactie. Alle dieren werden gehouden op het vitamine C-looze dieet van Randoin. Vrijwel alle dieren werden gedood door middel van de chloroformnarcose.

Ik injecteerde bij deze muizen steeds 5 mg ascorbinezuur subcutaan onder de rughuidplooi. De dieren werden gedood 1½, 6, 14, 20, 23, 26, 30, 35, 45 minuten en 1 en 3 uur na het toedienen van het ascorbinezuur. Als vergelijkingsmateriaal dienden muizen op dieet Randoin, die evenwel niet ingespoten werden en die gedood werden in den loop van dit onderzoek. Deze dieren werden op geheel dezelfde wijze onderzocht op het ascorbinezuur-gehalte van hun verschillende organen.

Allereerst volgt hier het resultaat van het histologisch onderzoek, verricht bij de niet ingespoten muizen:

darmtractus In de geheele darmtractus was geen spoor ascorbinezuur aan te toonen; slechts een enkele erythrocyt gaf een positieve reactie.

lever In de lever was wat ascorbinezuur aanwezig in de levercellen; de korreling was echter niet algemeen en niet bij alle onderzochte dieren even sterk (de korreling is afhankelijk van de voedingstoestand, waarin het dier bij zijn dood verkeert). In de endotheelcellen van de bloedvaten en in de erythrocyten was het ascorbinezuur duidelijk aantoonbaar; de leverendotheliën hadden minder sterk gereageerd.

nier In de nier was een zeer fijne korreling te zien in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde. Deze korreling is afkomstig van de normale uitscheiding van het ascorbinezuur, dat in het organisme gesynthetiseerd wordt. Ook de erythrocyten in de glomeruli en in de bloedvaten van de nier vertoonden duidelijk eenige reactie. De **bijnier** was intensief gekorrelt; de korreling van het merg was zeer fijn; die van de schors was veel grover. Duidelijk was te zien, dat de korreling van de zona glomerulosa minder intensief was dan van de andere schorslagen.

Het is noodzakelijk, nu eenige aandacht te wijden aan het feit, dat — niettegenstaande hetgeen meegedeeld is in Hoofdstuk 2 — ik steeds een positieve bijniermerg-reactie vond bij muizen. Immers, door de meeste auteurs (o. a. Giroud, Leblond) wordt vermeld, dat het merg niet reageert met zilvernitraat of

dat er pas een positieve reactie optreedt na neerslaan door lood-acetaat van de stoffen, die de reactie belemmeren (Huszak). Wel vermeldt Westergaard (38) in 1934 terloops dat hij een korreling zag in het merg, maar Giroud maakt in zijn monographie van een positieve reactie geen melding. Ik zelf meende deze positieve reactie toe te moeten schrijven aan de wijze van dooden van het proefdier (n.l. de chloroformnarcose). Inderdaad vond ik in een recente mededeeling van Fink (1) deze zelfde meening verkondigd.

Een verklaring voor dit feit hebben verschillende auteurs trachten te geven, Bourne (39) meende te doen te hebben met een overgaan van het reversibel geoxydeerde vitamine C in zijn gereduceerden vorm, terwijl Tonutti (6) de reactie interpreteert als te wijten aan een sterke vitamine C-deponeering in het merg ten gevolge van een psychische schrikwerking. De Ludany (40) meende juist te doen te hebben met een vrijmaken van het vitamine C uit de organen, die hieraan het rijkste zijn, ten gevolge van adrenaline-uitstorting in het merg na de emotie. Hij meende n.l. een verhoogd C-gehalte in het bloedplasma aan te kunnen toonen. Huszak weet de positieve reactie aan het elimineeren van de blokkeerende stoffen, normaliter in het merg aanwezig. Giroud (41) slaagde erin, de meening van De Ludany althans te weerleggen; ondanks minutenlange elektrische prikkeling van bijnieren van de kat, kon hij geen verhoogd vitamine C-gehalte van het merg aantonen.

Vrijwel algemeen wordt de verklaring, welke Huszak voor het verschijnsel geeft, tegenwoordig aangenomen; bewezen is zijn opvatting allerminst.

Volgt hier thans het histologisch onderzoek van de weefsels van de muis, welke gedood werd $1\frac{1}{2}$ minuut na het inspuiten van 5 mg ascorbinezuur.

In maag, duodenum en ileum was het ascorbinezuur niet histologisch aantoonbaar.

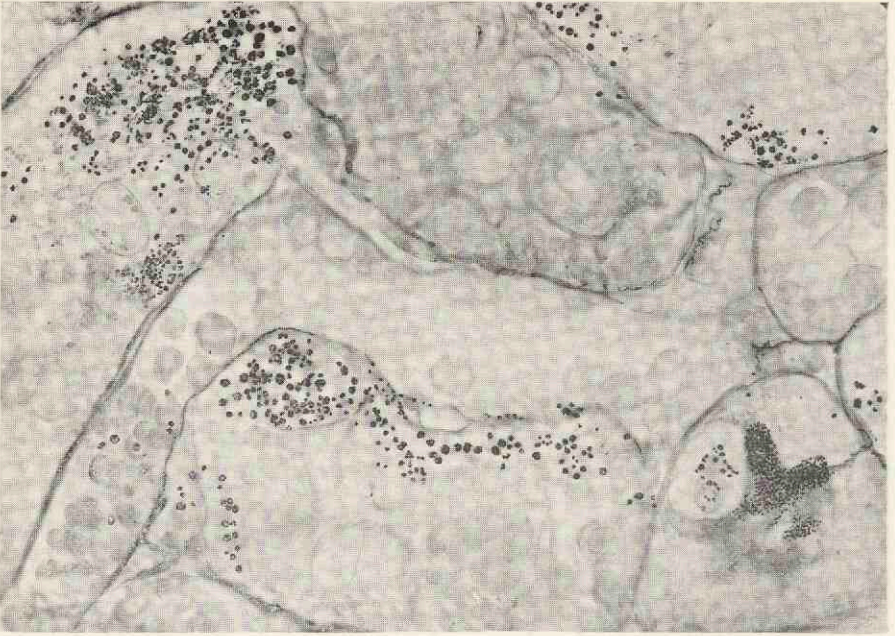
maag,
duodenum
en ileum

In de lever vinden we hier en daar een zwakke levercel-korreling; de endotheliën zijn eveneens slechts gedeeltelijk gekleurd, alleen de erythrocyten geven een duidelijke reactie.

lever

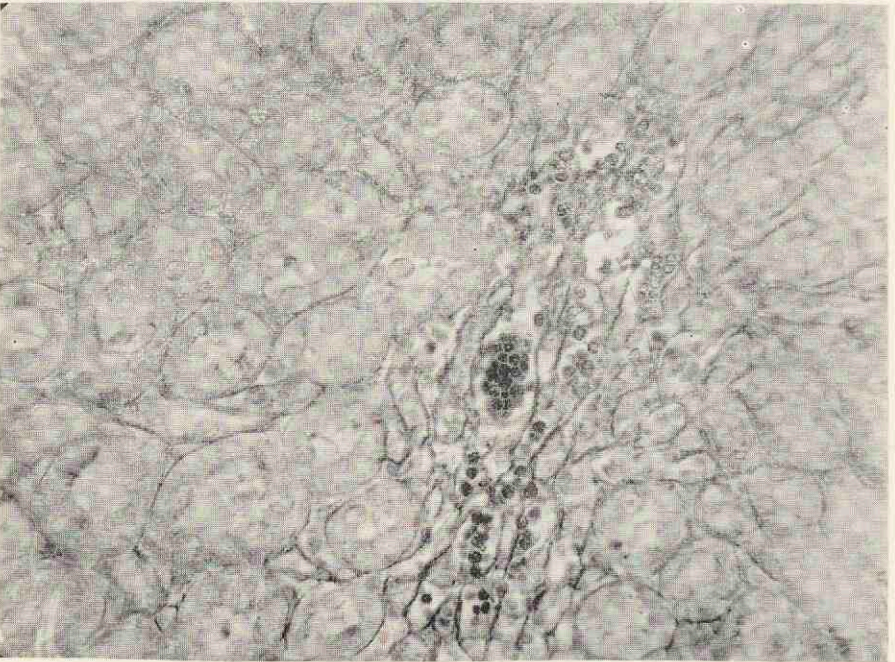
In de nier zien we nu reeds een sterke korreling optreden in sommige cellen van de tubuli contorti van de 1e orde. Erythrocyten zijn meest zwart gekleurd. In andere cellen van de tubuli contorti 1e orde is de korreling nog zeer fijn.

nier



Afbeelding 1

Nier van een muis op dieet Randoïn, gedood 1½ minuut na subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur. Sterke reactie in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde. Vergr. 600 X.



Afbeelding 2

Nier van een muis op dieet Randoïn, gedood 1½ minuut na subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur. Geen reactie in cellen van het opstijgend deel van de lis van Henle, wel in het afdalende deel. Sterke reactie van de erythrocyten in de mergvaten. Vergr. 600 X.

In de bijnier zien we geheel dezelfde reactie, zooals bij de bijnier muizen, die niet ingespoten waren: intensieve schors- en mergkorreling.

Conclusie: De uitscheiding van het ascorbinezuur is reeds in gang $1\frac{1}{2}$ minuut na de *subcutane* injectie van het vitamine C. Volgens Giroud en Leblond (36) vinden we het ascorbinezuur reeds 1 minuut na de *intraveneuse* injectie in de nier terug.

Een histologisch onderzoek van een muis, gedood 6 *minuten* na de subcutane injectie leverde het volgende op:

In maag, duodenum en ileum ontbrak elk spoor van een maag, duodenum, ileum reactie, welke aan het vitamine C zou zijn toe te schrijven.

In de lever was hier en daar een uiterst fijne korreling te lever zien; deze was zeer waarschijnlijk het gevolg van het normale vitamine C-gehalte van de lever en niet toe te schrijven aan het met de injectie ingebrachte ascorbinezuur. Eenige reactie van de endothelcellen binnen de levereilandjes en er buiten is, evenals een kleuring van de erythrocyten, waar te nemen.

Enkele cellen van de tubuli contorti 1e orde vertoonen een nier zeer grove en intensieve korreling; de andere cellen van de tubuli contorti 1e orde vertoonen hier en daar de fijne korreling, die ook zonder injectie in de nier is te zien. Ook is weer duidelijk de positieve zilver-reactie van de erythrocyten en van de endotheliën te zien.

In de bijnier vinden we het gewone beeld van de intensieve bijnier schors- en mergkorreling.

Conclusie: In het histologisch beeld is na 6 minuten geen verandering waar te nemen in vergelyk met den toestand na $1\frac{1}{2}$ minuut.

Onderzoek na 14 *minuten* leverde het volgende op:

In de maag was geen vitamine C aantoonbaar, evenmin als maag, duodenum, ileum in het duodenum en het ileum.

In de lever was slechts een zwakke reactie te zien: hier en lever daar wat endothelcel-korreling; levercelkorreling was niet waar te nemen.

De nier gaf wederom hetzelfde beeld te zien; grove en nier intensieve korreling in vele cellen van de tubuli contorti van de 1e orde. Dit wijst op een sterke uitscheiding van het ascorbinezuur via de nieren. Wel dient men hierbij te bedenken, dat de uitscheiding van het ascorbinezuur geschiedt via de glomeruli, dus niet via de tubuli contorti van de 1e orde. De aanwezigheid

van het ascorbinezuur in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde zou volgens Leblond (42) toe te schrijven zijn aan een re-absorptie of aan een passieve opstapeling van het ascorbinezuur uit het bloed, zooals we dat zien in het darmepitheel bij het subcutaan inspuiten van ascorbinezuur.

bijnier Ook de bijnier vertoont geheel hetzelfde beeld.

Conclusie: geen verandering is in den toestand opgetreden.

Hierna onderzocht ik een muis, die 20 *minuten* na de subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur gedood werd.

maag In de maag zag ik in de fundus eenige korreling in de epitheelcellen. Aanvankelijk twijfelde ik aan de diagnose vitamine C, maar de resultaten van het onderzoek van muizen, gedood 23 en 26 *minuten* na de injectie bevestigden dit toch wel.

duodenum In de epitheelcellen van het duodenum zien we een fijne
ileum korreling; in het ileum is deze echter veel intensiever. Dit beeld is bijzonder fraai.

lever In de lever zien we nog hetzelfde beeld, dat reeds eerder beschreven is; slechts hier en daar een fijne levercelkorreling, terwijl de endotheelcellen en de erythrocyten eveneens slechts op enkele plaatsen gekleurd zijn.

nier In de nier zien we het bekende beeld: sterke korreling door het vitamine C in de tubuli contorti van de 1e orde, geen korreling in de tubuli contorti van de 2e orde en de glomeruli. Erythrocyten en endotheliën van de bloedvaten vertoonen hier en daar eenige reactie.

bijnier Wederom vertoont de bijnier hetzelfde histologische beeld: schors- en mergkorreling, terwijl evenmin als vroeger een korreling of zwartkleuring van de erythrocyten valt waar te nemen.

Conclusie: Na 20 *minuten* reeds is het verschijnsel van Zilva-Jacobson bij muizen waar te nemen. De depôt-functie is niet beperkt tot het ileum, maar maag en duodenum nemen er aan deel, zij het dan ook, dat het aandeel van de maag slechts gering is.

Een histologisch onderzoek werd vervolgens na 23 *minuten* verricht.

maag In de maag was het ascorbinezuur duidelijk in de epitheelcellen van cardia en fundus aanwezig.

duodenum In het duodenum waren hier en daar de epitheelcellen sterk
ileum gekorrelt, terwijl daarentegen de korreling in het ileum alge-

meen en zeer intensief was. Speciaal viel het op, dat in de bekerzellen vaak van een ophooping van granula gesproken kon worden; ik vond dit eveneens vermeld door Vetter (43), hij meende echter te doen te hebben met een bijzondere kleurbaarheid van de jonge granula, die in het slijm van de cellen voorkomen.

In de lever was histologisch gezien, nog geen verandering opgetreden; een fijne levercelkorreling was hier en daar te zien; de endotheelcellen, evenals de erythrocyten, waren hier en daar zwart gekleurd. lever

Het histologisch beeld van de nier vertoonde geen verandering ten opzichte van de eerder onderzochte dieren. nier

Geheel hetzelfde beeld als vroeger vertoonde de bijnier. bijnier

Conclusie: Na 23 minuten is de depôtfunctie van het darmkanaalepitheel in volle werking getreden. Het ileum vervult hierbij de belangrijkste rol, in mindere mate doet het duodenum mee en in nog mindere mate speelt het epitheel van de maag hierbij een rol. Opmerkelijk is het verschil in ascorbinezuurgehalte van de epitheelcellen van het duodenum en die van het ileum. In het duodenum is hier en daar een enkele cel te zien, die duidelijk korrels bevat, terwijl in het ileum vrijwel alle cellen sterk gekorrelt waren.

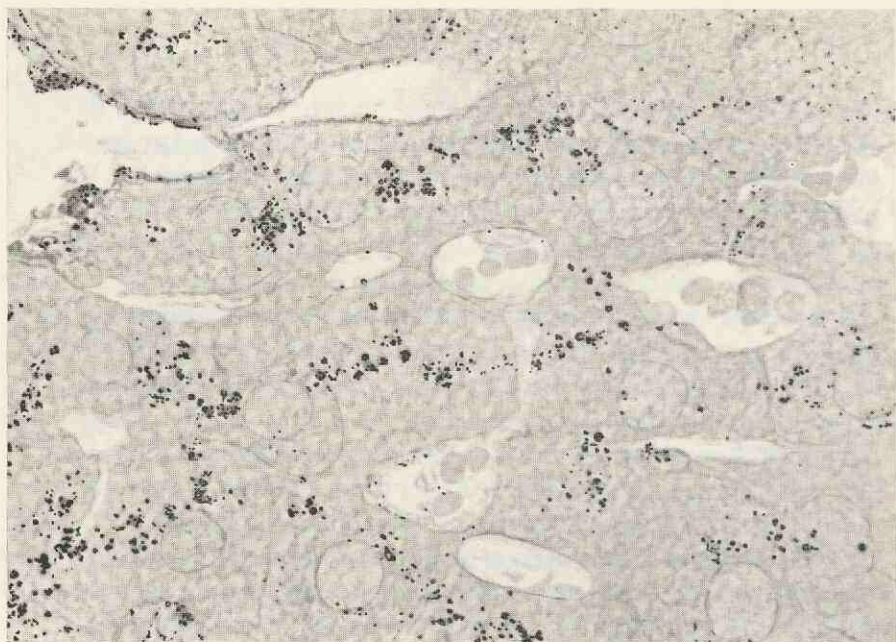
Een onderzoek, ingesteld 26 *minuten* na de subcutane injectie van het ascorbinezuur, leverde de volgende resultaten op:

In de maag is eenige korreling door ascorbinezuur in de epitheelcellen te zien; de erythrocyten in de bloedvaten geven, evenals de endotheliën, een positieve reactie met het zilvernitraat te zien. maag

In het duodenum is een fijne intensieve korreling te zien van ascorbinezuur. Ook in het stroma van de darmvlok is veel ascorbinezuur-korreling waar te nemen. duodenum

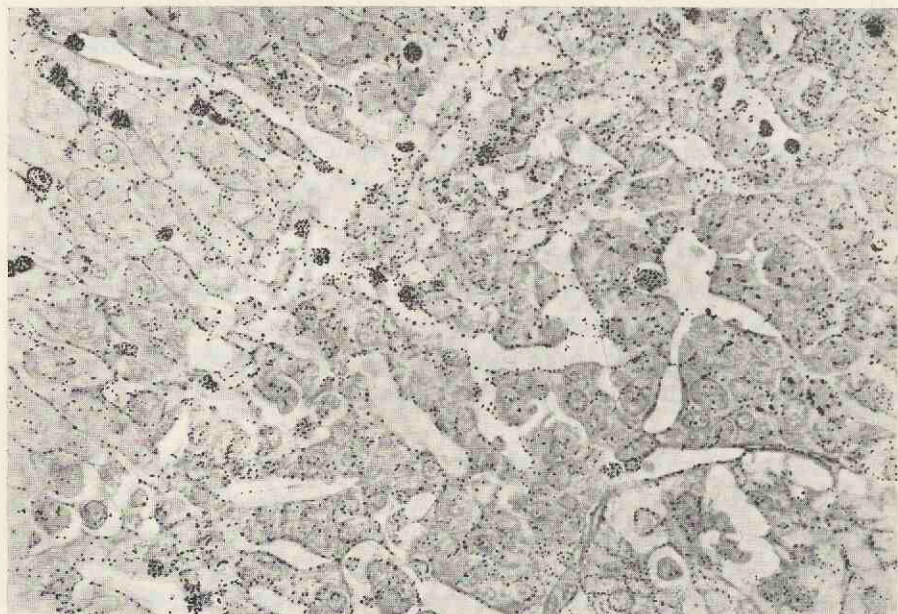
In het ileum lijkt mij de korreling minder intensief; evenals in het duodenum zijn in de bekerzellen zilvergranula te vinden. ileum

In de lever zijn de eerste sporen van de groote vitamine C-toevoer te vinden. We zien n.l., hoe om een tak van de vena portae de levercellen een hooger gehalte aan ascorbinezuur bevatten dan in de rest van het preparaat. Over het algemeen zijn de erythrocyten zwak gekorrelt of egaal van tint. Endotheelcelkleuring is slechts hier en daar aanwezig. lever



Afbeelding 3

Lever van een muis op dieet Rando, gedood 26 minuten na subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur. Beginnende vitamine C-toevoer aan de levercellen, waardoor de sterkste opbooiing van het ascorbinezuur te vinden is in de cellen, gelegen om een bloedvat. Vergr. 600 \times .



Afbeelding 4

Bijnier van een muis op dieet Rando, gedood 30 minuten na de subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur. Normale schors- en mergreactie. Erythrocyten met een zeer hoog ascorbinezuurgehalte, welke sterk gereageerd hebben, in de schorslagen te zien; de reactie van de erythrocyten in het merg is veel geringer. Vergr. 600 \times .

In de nier is geen verschil waar te nemen; de uitscheiding nier van het ascorbinezuur gaat rustig verder.

In de bijnier vinden we hetzelfde beeld als bij de vroeger bijnier onderzochte dieren.

Conclusie: Dit onderzoek na 26 minuten toont aan, dat de depôtvorming voor het darmkanaal reeds minder gaat worden, speciaal wat maag en ileum betreft; voor het duodenum geldt echter, dat na 26 minuten de opgeslagen hoeveelheid iets grooter is geworden. De korreling in de bekerzellen is echter verminderd. In de lever vinden we een belangrijke verhooging van het ascorbinezuurgehalte; we zien duidelijk hoe reeds binnen het $\frac{1}{2}$ uur het ingespoten ascorbinezuur de lever bereikt. Hierna vermeerdert de hoeveelheid ascorbinezuur steeds, wat ook in de preparaten van levers van later gedooide dieren tot uitdrukking komt.

Onderzoeken we een muis 30 *minuten* na het subcutaan inspuiten van 5 mg ascorbinezuur, dan zien we, dat de reactie in het maagdarmkanaal sterk verminderd is.

In de maag is het ascorbinezuur niet meer aantoonbaar. maag

Practisch is de reactie in het duodenum, evenals in het ileum, duodenum negatief; slechts enkele zilvergranula konden in de preparaten ileum worden waargenomen.

In de lever is de korreling in de cellen sterker geworden; lever slechts weinig endotheelcellen zijn gekleurd.

In de nier is de hoeveelheid ascorbinezuur, welke aantoonbaar is in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde, nog zeer aanzienlijk; wel is het aantal cellen, dat de zeer grove korreling van vitamine C bevatte, afgenomen. In sommige cellen van de tubuli contorti van de 1e orde zien we de korreling als een dun streepje aan den kant van het lumen van de kern verlopen. nier

In de bijnier zien we de bekende schors- en mergkorreling; bijnier de eerste grof, de laatste fijn. Tusschen de cellen van de schors is een groote hoeveelheid sterk met ascorbinezuur beladen erythrocyten te zien. Deze sterk beladen erythrocyten ontbreken echter in het merg van de bijnier. Wel komen in het merg enkele lichtgekorrelde erythrocyten voor; het meerendeel is in het merg echter ongekleurd.

Wat is hiervan nu de verklaring? We moeten deze sterk beladen erythrocyten toch waarschijnlijk zien als de dragers van het subcutaan toegediende ascorbinezuur. Dat deze sterk

reageerende erythrocyten echter *geheel* ontbreken in het merg, zou het gevolg kunnen zijn van het voorkomen van „substances inhibitrices” in het merg, waardoor de reactie niet positief zou kunnen uitvallen. Dit is echter hoogst onwaarschijnlijk en wel vanwege het feit, dat de positieve reactie, die ik steeds bij deze dieren vond, o. a. wordt toegeschreven aan het elimineeren van deze blokkeerende stoffen (Huszak; zie enkele bladzijden terug). Bovendien komen deze stoffen in de mergcellen voor en niet in de bloedsinus, welke tusschen de mergcellen gelegen zijn. Ik meen hier dan ook te doen te hebben met een normale afgifte van het vitamine C door de erythrocyten aan de schorscellen, waarbij vooral de reticularis een groote rol speelt, aan welke schorslaag we dan ook een belangrijke depôtfunctie moeten toekennen; het merg zou als zoodanig van weinig beteekenis zijn.

Conclusie: Na 30 minuten is practisch al het ascorbinezuur uit de epitheelcellen van het darmkanaal weggevoerd naar de andere depôts; de reactie is negatief geworden.

We zien dus, dat deze sterke verhooging van het ascorbinezuurgehalte in de darmepitheelcellen bij de muis veel vroeger valt dan bij de cavia.

In de lever neemt het gehalte steeds toe, terwijl nu ook de bijnier den grooten stroom van het ascorbinezuur te verwerken krijgt.

Een histologisch onderzoek, verricht bij een muis, welke gedood werd 45 *minuten* na de injectie van het ascorbinezuur, leverde de volgende resultaten op:

maag, duode-
num en ileum In maag, duodenum en ileum was geen spoor van het ascorbinezuur meer te vinden.

lever In de lever valt direct een sterke levercelkorreling op; de endotheelcellen zijn maar weinig gekleurd. De erythrocyten in de bloedvaten zijn meest zwart van kleur.

nier In de nier zien we, dat de korreling in de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde veel minder grof geworden is: het maximum van de uitscheiding is al voorbij.

bijnier De korreling in de bijnier is zoowel in de schors als in het merg zeer intensief; het beeld van de rijk met ascorbinezuur beladen erythrocyten is verdwenen; zij hebben het vitamine C afgestaan aan de schorscellen van de bijnier.

Conclusie: Zie hierboven.

Dooden we een muis 1 uur na de subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur, dan vinden we histologisch de volgende resultaten:

In de maag-darmtractus is geen spoor van het ingebrachte ascorbinezuur meer te vinden.

In de lever vinden we hetzelfde beeld als reeds vroeger beschreven werd, alleen is het sterker ontwikkeld. Nog steeds is in de cellen rond een tak van de vena portae een sterkere ophooping van het ascorbinezuur waar te nemen, al is het gehalte van de rest van de lever ook zeer aanzienlijk geworden. Algemeen is een levercelkorreling in de lever te zien; de ophooping van het ascorbinezuur in de cellen rond de bloedvaten is echter nog intensiever. Op andere plaatsen in het preparaat zien we in het bijzonder rond de venae centrales zwart gekleurde erythrocyten, die de bloedcapillairen rond de levercellen in de naaste omgeving van het centrale vat opvullen. Ik meen hier te doen te hebben eenerzijds met erythrocyten, die een hooger gehalte aan ascorbinezuur bezitten (waarschijnlijk dus afkomstig van de ascorbinezuurinjectie), terwijl anderzijds rekening gehouden moet worden met een gemakkelijker doordringen van het reagens via de vaten van de lever, waardoor de reactie van de erythrocyten in de vaten wat sterker kan zijn. In de lever vinden we in het algemeen slechts enkele gekleurde endotheelcellen. Op enkele plaatsen vinden we evenwel een overwegende endotheelcelkleuring. De verklaring voor deze afwijkende wijze van deponeren van het ascorbinezuur moet naar mijn meening gezocht worden in het feit, dat op die plaatsen de levercellen niet in staat zijn het ascorbinezuur op te slaan, waardoor we een sterke ophooping en daarmee een sterke kleuring van de endotheel- (en Von Kupffer-)cellen krijgen. Ik meen dat hiermee in verband staat het glycogeen gehalte van de levercellen ter plaatse, in zoverre, dat een levercel, die een bepaalde hoeveelheid glycogeen bevat, het ascorbinezuur kan opslaan, in tegenstelling met de levercellen, die geen of te weinig glycogeen bevatten en die het ascorbinezuur daarom niet kunnen opslaan. Bij kleuring op glycogeen volgens Best, zijn in deze preparaten van muizen op het vitamine C-looze dieet van Randoin ook steeds cellen te vinden, die geen glycogeen bevatten. Voor de uitwerking van dit idee zie men Hoofdstuk 6.

nier, bijnier Noch de nier, noch de bijnier vertoonen een duidelijk histologisch verschil met vroeger; in de nier is de uitscheiding nog steeds in vollen gang, terwijl de bijnier een sterke korreling vertoont; zwaar beladen erythrocyten zijn niet meer te vinden in de schors. Sterk is de korreling vooral in de zona reticularis.

Conclusie: Na 1 uur zien we dat het ascorbinezuurgehalte van de lever nog steeds sterk toeneemt; het vitamine C-gehalte van de bijnier is zeer hoog, een toename is, histologisch althans, niet meer te constateeren.

Een histologisch onderzoek, verricht bij een muis, welke 3 uur na de subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur gedood werk, leverde de volgende histologische resultaten op:

In maag, noch duodenum of ileum was ook maar een spoor van het geïnjiceerde ascorbinezuur terug te vinden. Ook de reactie van bloedvat-endotheliën en erythrocyten is negatief geworden.

lever Algemeen is in de lever èn een sterke korreling van de endotheelcellen, èn een fijne levercelkorreling aanwezig. Sterke reactie van de erythrocyten in de bloedvaten.

nier Nog steeds is het beeld van de nier weinig veranderd; de uitscheiding van het ingebrachte ascorbinezuur gaat nog steeds door.

bijnier Ook in de bijnier is histologisch geen verandering in het ascorbinezuurgehalte aan te toonen.

Conclusie: De endotheelcelkleuring in de lever is na 3 uur algemeen geworden. Of hieruit de conclusie getrokken mag worden, dat het aanbod van ascorbinezuur aan de levercellen te groot geworden is om alles in de levercellen op te slaan, zoodat het teveel geborgen moet worden in de endotheel- (en eventueel de Von Kupffer-) cellen, durf ik niet te beweren. Met de mogelijkheid van deze veronderstelling dient evenwel rekening te worden gehouden.

Algemeene conclusies uit dit onderzoek.

Overzien we de resultaten van deze dierproeven, dan komen we tot de conclusie, dat het verschijnsel van Zilva-Jacobson ook bij muizen waarneembaar is.

Het ascorbinezuur is in de darmtractus (maag, duodenum en ileum) reeds 20 minuten na de subcutane injectie

aan te toonen; een half uur na de inspuiting is de reactie alweer negatief.

In de lever vinden we de eerste sporen van het ascorbinezuur reeds terug na 26 minuten;

voor de bijnier valt dit tijdstip iets later; daar kunnen we na een half uur een groote hoeveelheid ascorbinezuur aantoonen, dat aangevoerd is door de erythrocyten.

In de nier blijkt de uitscheiding van het ingespoten ascorbinezuur reeds na 1½ minuut in vollen gang te zijn.

De resultaten zijn in onderstaand schema bijeengebracht.

Bestudeering van het *verschijnsel van Zilva-Jacobson* bij muizen op dieet-Randoin. Subcutane injectie van 5 mg ascorbinezuur.

Reactie van:

muis gedood	maag	duodenum	ileum	lever	nier	bijnier
na 1½ min.	—	—	—	∴	+∴	+
„ 6 min.	—	—	—	∴	++	+
„ 14 min.	—	—	—	∴	++	+
„ 20 min.	∴	∴	+	∴	++	+
„ 23 min.	+	∴	+	∴	++	+
„ 26 min.	∴	+	+	+	+∴	+
„ 30 min.	—	—	—	+	+	++
„ 35 min.	—	—	—	+	+	++
„ 45 min.	—	—	—	++	+	++
„ 1 uur	—	—	—	++	+	++
„ 3 uur	—	—	—	++	+	++

— = negatieve, ∴ = zwakke, + = positieve reactie.

KOOLHYDRAATSTOFWISSELING EN VITAMINE C

Onderzoekingen hebben aangetoond, dat er een verband bestaat tusschen het vitamine C en de koolhydraatstofwisseling. Hierbij blijkt de lever een belangrijke rol te spelen.

Over den invloed welke de bloedsuikerspiegel en het glycogeen gehalte van de lever en spieren ondervinden ten gevolge van het vitamine C-gehalte van de verschillende weefsels, is in de litteratuur allerm minst eenstemmigheid bereikt.

Ik wil beginnen met een overzicht te geven over de litteratuur, welke ik over dit onderwerp gevonden heb.

In 1925 constateerden Randoin en Michaux (30) reeds, dat de glycogeenreserve in de lever tijdens de scorbut van de cavia niet zoo groot was als normaal, al verdween niet al het glycogeen uit de lever met het verdwijnen van het ascorbinezuur uit dit orgaan. Wel stemmen zij in, met de waarnemingen van Mouriquand c.s. (44), n.l. dat de bloedsuikerspiegel van deze caviae constant bleef. In 1936 bestreed Altenburger (45) deze opvatting; hij zag in het verloop van den scorbut eerst een hyper-, maar in de latere stadia een hypoglycaemie optreden. Altenburger zag ook, net als Randoin en Michaux, een duidelijke vermindering van het glycogeen gehalte van de lever bij scorbut-caviae. Ook omgekeerd lukte het hem om bij caviae op vitamine C-loos dieet het glycogeen gehalte van de lever weer op te voeren, wanneer hij aan het glucose-houdend voedsel tevens extra vitamine C toevoegde.

Hieruit blijkt duidelijk, dat voor een hoog glycogeen gehalte van de lever ook een flinke dosis van de stof C noodig is.

Ook bij normaal gevoede caviae bleek het hem, dat bij extra C-toediening het leverglycogeen gehalte hooger werd.

Ook Duffau (46) en Ratsimamanga (47) zagen het glycogeen gehalte van lever en spieren stijgen naarmate het ascorbinezuur gehalte toenam. Ratsimamanga neemt een mogelijke tusschenkomst van de bijnierschors in deze processen aan; hij zegt o. a.: „c'est une intervention possible au niveau de la cortico-surrénale dont on sait l'importance dans le travail". Hij zag n.l. bij cortine- en ascorbinezuur-toediening een sterke verhooging van het glycogeen gehalte en betere arbeidsprestaties optreden.

Enkele jaren geleden zag Acerad (48) geen daling van het bloedsuikergehalte na intraveneuse injectie van groote doses vitamine C, zulks in tegenstelling tot Stoicescu en tot Stepp, die wél een dergelijke daling meenden waar te nemen. Van recente datum is de mededeeling van Stöger (81), die bij het overdoen van deze proeven de onderzoeken van Stepp wél kon bevestigen. Hij wijst er echter op, dat de resultaten pas positief uitvallen, wanneer het vroeger bestaande vitamine C-deficit door groote doses ascorbinezuur is opgevuld.

Alvorens nu mijn eigen waarnemingen over het verband tusschen het C-gehalte en het glycogeen gehalte van de lever van muizen hier weer te geven, wil ik eerst de waarnemingen vermelden, welke anderen omtrent een mogelijke vitamine C-synthese uit bepaalde suikers deden, omdat mijn proeven ook in dit opzicht van eenige waarde zijn. Eenstemmigheid bestaat er ook op dit gebied allerminst.

Guha en Ghosh (49) vonden bij ratten een verhooging van het ascorbinezuurgehalte van verschillende organen, waaronder de lever, bij intraveneuze injectie van mannose; deze onderzoeken werden door anderen niet bevestigd. Von Euler (50), Hawthorne en Harrison (51) en nog verschillende andere auteurs zagen n.l. geen verhooging van het vitamine C-gehalte onder toediening van mannose.

Andere auteurs trachtten het probleem van een anderen kant te benaderen; Hopkins, Slater en Millikan (52) zagen bij ratten een vermindering van het vitamine C-gehalte van de organen optreden, wanneer aan het voedsel geen suikers meer werden toegediend. Ook Zilva (53) bevestigde dit; deze auteur zag bij ratten pathologische veranderingen optreden (oedemen van den darm; leverdegeneratie) die op een ongunstige verandering van het ascorbinezuurgehalte van de organen wezen. Mentzer en Urbain (54) deden deze proeven over, maar konden geen duidelijke verlaging van het ascorbinezuurgehalte in lever en darmwand van de ratten constateeren; ook pathologische veranderingen traden bij de proefdieren niet op. Zij nemen dan ook aan, dat koolhydraten van geenerlei belang zijn bij de synthese van het vitamine C. Negatief zou ook de invloed zijn van het vitamine A op veranderingen van het vitamine C-gehalte in weefsels bij de rat. (Randoin, Giroud en Leblond (55).)

Muselin (56) met medewerkers toonde aan, dat de vitamine C-uitscheiding op verschillend samengesteld vitamine C-looze dieeten bij ratten zeer sterk uiteen loopt. Met Longenecker (57) komt hij dan ook tot de conclusie, dat het niet waarschijnlijk is, dat uit deze zoo verschillende stoffen, die de dieeten samenstelden, direct het vitamine C ontstaat, maar dat we vermoedelijk met een stimulatie van de ascorbinezuur-synthese te doen hebben, door de vorming van intermediaire stofwisselingsproducten.

Het leek mij niet van belang ontbloeit, te trachten na te gaan, hoe het ascorbinezuur-en het glycogeen-gehalte verandert bij muizen op vitamine C-loos dieet, waarin eenerzijds heel veel, anderzijds zoo min mogelijk koolhydraten voorkomen en om tevens de gevonden waarden met een groep contrôle-dieren, welke eveneens C-loos gevoed werden, te controleeren.

De glycogeenbepalingen geschieden volgens Good, Kramer en Somogyi (58), waarbij na de hydrolyse van het glycogeen de gevormde glucose bepaald werd volgens Schoorl (59) met behulp van het reagens van Luff.

Ik gebruikte bij het onderzoek 3 groepen muizen, alle op vitamine C-loos dieet.

Groep A: muizen op *eiwit*-dieet, bestaande uit $\frac{2}{3}$ deel gelatine en $\frac{1}{3}$ deel caseïne. 7 proefdieren.

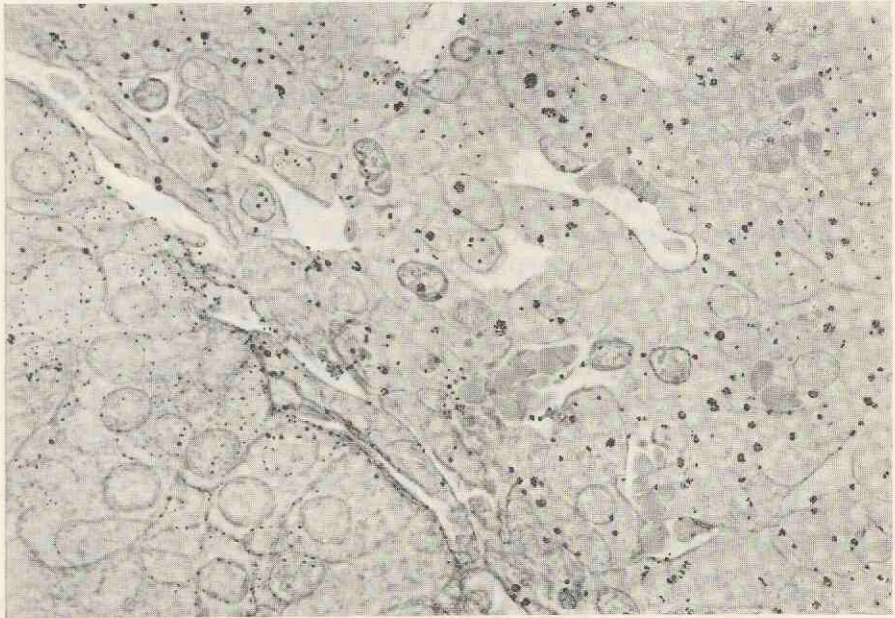
Groep B: muizen op *normaal* dieet, dat zoowel vet, eiwit als koolhydraten bevat; hiertoe gebruikte ik het dieet-Randoin. 7 proefdieren.

Groep C: muizen op een bij uitstek *koolhydraat*-rijk dieet, bestaande uit het dieet-Randoin, waaraan toegevoegd dagelijks 0,6 cc 45% glucose-oplossing, binnengebracht per maagsonde. 4 proefdieren.

Eitwitmuizen

De muizen uit groep A, welke gedurende 2 tot 4 dagen op dit dieet geleefd hadden, hierna kortweg „*eiwitmuizen*” genoemd, vertoonden allen bij het histologisch onderzoek slechts in de bijnier een duidelijke reactie met zilvernitraat; de normale schors- en mergkorreling was daar aanwezig.

Chemisch was er geen verschil aan te toonen in het vitamine C-gehalte van de organen van dieren, welke 2, dan wel dieren, die 4 dagen op dit eiwit-dieet geleefd hadden.



Afbeelding 5

Bijnier van een muis op eiwit-dieet vitamine C-reactie. Grove korreling van de schorslagen; de korreling in de mergcellen is fijn. Vergr. $\pm 900 \times$.

In de lever was bij histologisch onderzoek geen korreling in ^{lever} de levercellen waar te nemen; slechts enkele endotheelcellen vertoonden een positieve reactie. Het chemisch onderzoek met de micro-titratie volgens Glick en Biskind uitgevoerd, leverde een gehalte van 18—28 mg/100 gram lever op, met een gemiddelde van 21,5 mg C.

De glycogeenkleuring volgens Best gaf praktisch geen glycogeen meer te zien; ook chemisch lukte het mij niet glycogeen aan te toonen. Dat er in deze levers in het geheel geen glycogeen aanwezig zou zijn, is echter niet goed aan te nemen; de uitkomsten van de verschillende bepalingen vielen echter alle binnen het gebied van de blanco-titraties: het ware misschien beter te zeggen: het glycogeen-gehalte is kleiner dan 20 mg per 100 gram, gevonden bij de bepaling, welke het sterkste van het gemiddelde afweek.

In de nier was, zoals gewoonlijk, een zwakke korreling in ^{nier} de cellen van de tubuli contorti van de 1e orde te zien.

Randoinmuizen Het histologisch onderzoek van de „*Randoin-muizen*”, muizen dus uit Groep B, welke enkele weken op dit dieet geleefd hadden, leverde de volgende resultaten op: in de **nier** de gewone sterke reactie; in de nier dezelfde zwakke reactie als steeds.

lever In de lever vond ik een duidelijke, niet algemeene levercelkorreling, bij de ene muis wat meer dan bij de andere. De kleuring van enkele endotheelcellen en hier en daar van de erythrocyten was in alle preparaten waar te nemen. Chemisch vitamine C-onderzoek leverde een vitamine C-gehalte op, dat varieerde tusschen 24 en 40,5 mg ascorbinezuur per 100 gram lever, met een gemiddelde van 31,5 mg.

Het glycogeen-gehalte volgens Best was tamelijk hoog; chemisch varieerde het tusschen 81 en 935 mg glycogeen per 100 gram lever.

Suikermuizen Het histologisch onderzoek van de organen van de muizen uit groep C gaf het volgende resultaat te zien:

Behalve in de **nier**, kon ook in de lever van een duidelijke reactie van het ascorbinezuur gesproken worden.

lever In de lever van de verschillende muizen kwam een behoorlijke levercelkorreling voor; het sterkste verschil leverde echter bij deze muizen het hoogere gehalte van de endotheelcellen: zelfs bij enkele proefdieren waren deze vrijwel algemeen gekleurd.

Ook chemisch was het gehalte aan ascorbinezuur in de levers van deze suikermuizen wat hooger dan van de muizen op dieet-Randoin, n.l. 29—39 mg vitamine C, met een gemiddelde van 35 mg per 100 gram lever.

Het glycogeen-gehalte was hoog, te oordeelen naar de kleuring volgens Best; ook chemisch waren de gevonden waarden hooger dan die uit groep B, n.l. 73—2413 mg glycogeen per 100 gram lever.

Conclusies uit dit onderzoek.

Naast een duidelijk verschil in ascorbinezuur-gehalte met de micro-titratie aangetoond tusschen de muizen uit de drie groepen, valt ook het histologische verschil op, dat er tusschen deze groepen bestaat. Het is een gelukkige omstandigheid, dat

de drempelwaarde van de zilvernitraat-reactie ligt bij 20—30 mg vitamine C per 100 gram lever; het blijkt dan dat:

- lever C-gehalte van de *eiwitmuis*: géén levercelkorreling; enkele endotheelcellen gekleurd;
- lever C-gehalte van de *Randoimuis*: wat levercelkorreling, hier en daar endotheelcellen gekleurd;
- lever C-gehalte van de *suikermuis*: levercelkorreling, veel endotheelcellen gekleurd.

Een overzicht over de chemische bepalingen geeft het volgende staatje:

	lever C-geh. (mg per 100 g)		lever glycogeen-geh. (mg per 100 g)	
	(uitersten)	(gemiddeld)	(uitersten)	(histolog. Best)
Groep A . . .	18—28	21,5	niets	niets
Groep B . . .	24—40,5	31,5	81— 935	hoog
Groep C . . .	29—39	35	73—2413	hoog

Uit dit onderzoek blijkt wel, dat het zeer waarschijnlijk is, dat het vitamine C-gehalte van de lever van de muis afhankelijk is van het glycogeen-gehalte. We kunnen zeggen:

„Wanneer geen ascorbinezuur toegediend wordt (dus zonder injecties en op een vitamine C-vrij dieet), is het gehalte aan ascorbinezuur van de lever toch afhankelijk van het glycogeen-gehalte van de levercellen: is de lever glycogeen-vrij, dan zien we geen korreling van het vitamine C in de cellen; is de lever glycogeen-rijk, dan zien we een duidelijke korreling in de levercellen en een kleuring van de endotheelcellen, welke algemeen is.”

Door dit onderzoek worden de waarnemingen van Hopkins, Slater en Miklikan zoowel chemisch als histologisch bevestigd.

Ook de waarnemingen van Altenburger kloppen met de resultaten van dit onderzoek. Altenburger ging echter uit van het ascorbinezuurgehalte, dat hij bij zijn proeven liet variëren, terwijl het koolhydraatgehalte van het voedsel gelijk bleef; in dit onderzoek werd uitgegaan van een door het dieet verkregen varierende glycogeen-gehalte, waarbij verandering in het ascorbinezuurgehalte van de lever werd opgemerkt.

HOOFDSTUK V.

BESTAAT ER BIJ NORMAAL GEVOEDE CAVIAE EEN VERBAND TUSSCHEN HET VITAMINE C- EN HET GLYCOGEEN-GEHALTE VAN DE LEVER?

In aansluiting aan hetgeen in Hoofdstuk 4 is beschreven, heb ik mij afgevraagd, of er ook bij normale caviae een verband bestaat tusschen het vitamine C-gehalte en het glycogeen-gehalte van de lever.

Oogenschijnlijk is de overeenkomst met de proefopstelling in Hoofdstuk 4 groot, alleen wordt deze proef genomen met ander diermateriaal, n.l. caviae.

Toch moeten we wel bedenken, dat het organisme van de cavia — een dier dat afhankelijk is wat zijn vitamine C-voorziening betreft, van zijn voeding — geheel anders is dan dat van de muis of de rat, die immers het ascorbinezuur zelf kunnen synthetiseeren. Wel heeft Altenburger (45) een dergelijke proef genomen: aan 2 groepen normaal gevoede caviae diende hij peroraal 2,5 g glucose toe, terwijl 1 groep tevens 200 mg ascorbinezuur ontving. De dieren werden 4 uur later gedood. Hij vond een gering verschil in lever-glycogeen tusschen beide groepen; 8,3 % glycogeen voor de dieren, welke alleen glucose kregen tegen 10,5 % glycogeen voor de dieren, welke naast glucose ook nog het extra vitamine C kregen toegediend. De cijfers zijn niet zeer overtuigend. Ik heb getracht eenzelfde werking van het ascorbinezuur te vinden bij het cavia-materiaal, waarover ik de beschikking had.

Opstelling van de proef.

Het diermateriaal omvatte 2 groepen caviae, beide op dezelfde wijze gevoed. Het dieet bestond uit mangelwortelen en hooi (beide ad lib.). Het ascorbinezuurgehalte van de wortelen is gering (ik zelf vond een gehalte van ± 1 mg C per 100 gram), zoodat de dieren aan den rand van een scorbuut leefden; het ascorbinezuur-gehalte van de weefsels van deze dieren getuigt hier trouwens wel van. Giroud geeft in zijn Protoplasma-Monographie voor de scorbuut-cavia een lever C-gehalte van 3,3 mg per 100 gram; voor de bijnier vermeldt hij een vitamine C-gehalte van 6,3 mg.

In dit opzicht meen ik, dat mijn proefopstelling beter is dan die van Altenburger; immers het ideaal is om de caviae op een dieet te zetten, dat net voldoende C bevat om de behoefte van de dieren te dekken; volgens Moll (2) is $1\frac{1}{2}$ —2 mg C per dag noodig voor de cavia, om volkomen vrij van pathologische verschijnselen te blijven, terwijl de dieren op $\frac{1}{2}$ mg C per dag nog wel in leven blijven, maar wel aan pathologische afwijkingen onderhevig zijn.

Kunnen we de caviae een dergelijk dieet geven, dan zijn deze dieren ook te vergelijken met de muis of de rat op dieet-Randoin; dieren dus, welke wel op een C-loos dieet leven, maar hun vitamine C-behoefte dekken door zelfsynthese.

Helaas waren er aan de proefopstelling, zooals ik die gebruikte, ook bezwaren verbonden, welke ik niet geheel kon verhelpen. De proefdieren, waarover ik de beschikking had, waren afkomstig van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en hadden negatief gereageerd op het inspuiten van materiaal, dat eventueel tuberkelbacillen bevatte. Deze caviae zijn dan bij hun dood na 2 maanden te beschouwen als volkomen gezonde dieren. Uit practische overwegingen was het evenwel niet mogelijk om de dieren op een dieet te zetten, dat ik hierboven als het meest ideale schetste. Nu waren de dieren vrij om hetzij meer glycogeen-houdende en/of meer ascorbinezuur-houdende bestanddeelen van hun voedsel te gebruiken, terwijl ook de hoeveelheid voedsel niet steeds constant was voor de verschillende dieren; allemaal factoren, die op de resultaten van de proef hun stempel wel moesten drukken.

Groep A: caviae op wintervoer, waaraan toegevoegd 30—50 mg ascorbinezuur subcutaan 4—7 dagen lang.
7 proefdieren.

Groep B: caviae op wintervoer, zonder extra vitamine C.
11 proefdieren.

Resultaten:

	lever C-gehalte (mg per 100 g)		lever glycogeen-gehalte (mg per 100 g)	
	(uitersten)	(gemiddeld)	(uitersten)	(gemiddeld)
Groep A	7,61—17,82	13,55	130—1783	673
Groep B	1,20— 3,30	2,22	23—8944	2111

We zouden dus, zoo op het eerste gezicht kunnen aannemen, dat er geenerlei verband bestaat tusschen het ascorbinezuur- en

het glycogeen-gehalte van de lever bij normaal gevoede caviae, ware het niet dat hier met 2 factoren rekening gehouden moet worden. In de eerste plaats zijn er bezwaren aan de niet-ideale proefopstelling verbonden, welke bezwaren ik hierboven uiteen heb gezet en in de tweede plaats is er het feit, dat ik slechts 30—50 mg ascorbinezuur per cavia toediende in tegenstelling tot Altenburger, die bij zijn caviae 200 mg ascorbinezuur per oraal inbracht.

We moeten ons dan ook voorstellen, dat den invloed, die het glycogeen-gehalte ondervindt van het ascorbinezuurgehalte van de lever, niet zeer groot is, zoodat dezen invloed pas duidelijk wordt, wanneer groote doses C worden toegediend.

Omgekeerd blijkt de invloed van het glycogeen-gehalte op het ascorbinezuurgehalte van de lever ook pas duidelijk te worden, wanneer dit glycogeen-gehalte sterk wordt gevarieerd, zooals de proeven in het vorige hoofdstuk aangetoond hebben.

HOOFDSTUK VI.

WORDT HET VITAMINE C OP DEZELFDE WIJZE IN EEN GLYCOGEENRIJKE ALS IN EEN GLYCOGEEN-ARME LEVER OPGESLAGEN?

Naar aanleiding van hetgeen in de vorige hoofdstukken, met name in Hoofdstuk 4 gevonden werd, besloot ik een onderzoek in te stellen naar het deponeren van het vitamine C in levers van muizen, welke koolhydraatrijk, en muizen, welke koolhydraatarm gevoed werden.

Een verdere vraagstelling was: is er ook in andere organen, welke wij als vitamine C-depôts kennen, verschil waar te nemen? Verder vroeg ik mij af: Verdwijnt het vitamine C-depôt uit een lever, die rijk aan glycogeen is, even snel als uit een lever, die geen glycogeen bevat; beide zonder verdere voedseltoediening? Hoe staat het in dit geval met de andere depôts van het ascorbinezuur?

Ik richtte de proef op de volgende wijze in:

De muizen werden in 2 groepen ingedeeld;

Groep A: Muizen op dieet-Randoin, waaraan toegevoegd aanvankelijk 2 maal daags 0,4 cc $66\frac{2}{3}\%$ sacch. alb. oplossing, later vervangen door 1 maal daags 0,45 % glucose-oplossing, zonder dat de uiteindelijke resultaten eenige verandering hebben ondergaan; „suikermuizen”.

Groep B: Muizen op dieet-Randoin, echter zonder witte boonen; hiervoor in de plaats komt een mengsel van $\frac{2}{3}$ gelatine en $\frac{1}{3}$ caseïne. Het dieet voor deze muizen wordt dus bij uitstek eiwitrijk en koolhydraatarm; „eiwitmuizen”.

Volgens Wheeler (60) verliezen muizen, uitsluitend gevoerd met het gelatine-caseïne mengsel in 21 dagen geen gewicht. Ook bij maandenlange proefnemingen waren volgens hem de levenscondities van muizen, die op deze wijze gevoed werden, niet minder dan wanneer zij normaal voedsel toegediend kregen. Helaas ontbreekt een nauwkeurige aanduiding omtrent het bereiden van het dieet in de publicatie van Wheeler. Het beste resultaat leverde nog het dieet, gekookt met

wat water aan de muizen voor te zetten; worden de gelatine en caseïne in poedervorm aan het dieet van Randoin toegevoegd, dan eten de muizen hier in het geheel niet van. De langste levensduur van de muizen, levend op het dieet, dat de dieren gekookt werd voorgezet, was echter slechts 5 dagen.

Wanneer de *suikermuizen* 6 dagen op dit dieet geleefd hebben, wordt aan een 5-tal muizen 5 mg ascorbinezuur toegediend. Aan een deel der proefdieren werd deze 5 mg ascorbinezuur per os, aan de meerderheid subcutaan gegeven; het resultaat dier beide wijzen van toediening was identiek. Na het toedienen kregen de proefdieren geen eten meer.

3 muizen worden gedood 4 uur, 1 muis 24 uur en 1 muis 2 dagen na het toedienen van het ascorbinezuur; dit geschiedt telkenmale door middel van de chloroformnarcose.

Suikermuizen
gedood 4 uur
na 5 mg C.

Een histologisch onderzoek, ingesteld naar het ascorbinezuur-gehalte van maag, duodenum, ileum, lever, nier en bijnier en het glycogeen-gehalte van de lever leverde de volgende resultaten op:

In maag, duodenum en ileum was het ascorbinezuur niet aan te toonen.

lever In de lever is over het algemeen slechts een zwakke reactie van de levercellen zelf waar te nemen; alleen om de bloedvaten is deze reactie sterker. De reactie van erythrocyten en endotheliën is sterk in de verschillende preparaten. Bij een tweetal muizen bepaalde ik ook chemisch het ascorbinezuur-gehalte van de lever; ik vond beide keeren een gehalte van 51 mg C per 100 gram lever.

In de lever is met de glycogeenkleuring volgens Best (methode Arndt; Romeis 13 A. 897) veel glycogeen aan te toonen; chemisch vond ik in 1 geval 92 mg glycogeen per 100 gram lever.

nier In de nier is in de epitheelcellen van enkele tubuli contorti van de 1e orde een grove korreling te zien; op andere plaatsen vinden we een zwakke korreling in deze epitheelcellen.

De erythrocyten en de endotheelcellen zijn in de nier gekorrelt of zwart gekleurd.

bijnier De reactie van de schors en van het merg is sterk; we zien een grove schorskorreling (wat minder in de zona glomerulosa) en een fijne tot zeer fijne mergcel-korreling. De bijnierreactie is dezelfde als die, welke wij reeds vroeger leerden kennen.

Een histologisch onderzoek van de weefsels van de muis, welke 24 uur na het toedienen van 5 mg ascorbinezuur gedood werd, leverde het volgende op:

Suikermuis
gedood 24 uur
na 5 mg
ascorb.zuur

In de lever is de celkorreling algemeener; de reactie in de lever over het geheel is echter belangrijk afgenomen; dit klopt met de chemische vitamine C-bepaling, n.l. 40 mg per 100 gram.

Het glycogeen gehalte van de lever van deze muis bedroeg slechts 37 mg glycogeen.

De muis, welke gedood werd 2 dagen na de ascorbinezuur-toediening, vertoonde bij histologisch onderzoek met het zilvernitraat nog een fraaie reactie van de lever; een vrij intensieve levercelkorreling kon worden waargenomen. Hier en daar waren nog endotheelcellen en erythrocyten in het preparaat gekleurd.

Suikermuis
gedood 2 dagen
na 5 mg
ascorb.zuur

lever

Ook de reactie van Best kon bij dit dier nog vrij wat glycogeen aantoonen.

In enkele tubuli contorti van de 1e orde zijn nog sterk gekorrelde epitheelcellen te vinden; de meeste cellen bevatten echter zeer weinig ascorbinezuur. De endotheelcellen en de erythrocyten geven hier en daar een positieve reactie te zien. In de bijnier treffen we het gewone beeld van de intensieve schors- en mergkorreling aan; de korreling van de schors is grof, die van het merg is fijn.

nier

bijnier

Als vergelijkingsmateriaal dienen nu 4 muizen uit groep B, die dus eenigen tijd op een zeer eiwitrijk en koolhydraatarm dieet geleefd hebben. Aan deze muizen wordt nu ook 5 mg ascorbinezuur toegediend; 2 muizen worden gedood 4 uur, 1 muis 24 uur en 1 muis 2 dagen na deze ascorbinezuurgift.

Onderzoeken we de muizen, welke 4 uur later gedood werden op het ascorbinezuurgehalte van hun verschillende organen, dan verkrijgen we de volgende resultaten:

Eiwitmuizen
gedood 4 uur
na 5 mg C.

In maag, duodenum of ileum is geen spoor van het ingebrachte ascorbinezuur terug te vinden.

In de lever is de reactie van het ingebrachte ascorbinezuur niet erg sterk; slechts hier en daar is een enkele endotheelcel gekleurd. Op enkele plaatsen is bij één van de onderzochte dieren — bij de andere muis wat algemeener — een fijne levercelkorreling te vinden. Bij kleuring van weefselcoupes op glycogeen volgens Best, blijkt het dat de lever niet geheel glycogeen-vrij is, ondanks het koolhydraat-vrije dieet.

lever

Chemische ascorbinezuur-bepaling leverde een gehalte op van 47 mg ascorbinezuur per 100 gram; een gehalte dat ongeveer gelijk is aan dat van de lever van de suikermuizen, welke op dezelfde wijze behandeld werden, wat het toegediende vitamine C aangaat.

Chemische glycogeen-bepaling in de lever van één der dieren leverde geen duidelijk glycogeen-gehalte op; de uitkomsten vielen weer binnen het gebied van de blanco-bepalingen.

nier In de nier vinden we slechts in enkele tubuli contorti-cellen een duidelijke korreling. De erythrocyten in de bloedvaten zijn gekorrelt of zwart gekleurd.

bijnier In de bijnier treffen we weer hetzelfde beeld aan: grove korreling in de schors en een fijne, maar intensieve korreling in het merg van de bijnier.

Eiwitmuis
gedood 24 uur
na 5 mg
ascorb.zuur

De muis, welke 24 uur na het toedienen van het ascorbinezuur gedood werd, vertoonde in de lever een vrij sterke reactie met zilvernitraat; de levercelkorreling is wat algemeener geworden in de verschillende lever-preparaten, welke ik van dit dier maakte. De reactie van endotheelcellen en erythrocyten is wat verminderd, al is de reactie plaatselijk soms nog zeer sterk. Chemisch vond ik een lever-ascorbinezuurgehalte van 45 mg; dit is dus weinig minder dan gevonden werd bij de eiwitmuis, die eenzelfde dosis ascorbinezuur toegediend kreeg, maar gedood werd na 4 uur.

Ook bij deze muis was het glycogeen-gehalte practisch gelijk nul.

Eiwitmuis
gedood 2 dagen
na 5 mg C.

Een onderzoek, ingesteld naar de organen van de eiwitmuis, die gedood werd 2 dagen na het toedienen van het ascorbinezuur, gaf de volgende resultaten te zien:

lever In de lever zien we weinig verschil met de muis, die na 24 uur gedood werd, alleen is de korreling van de levercellen verminderd, evenals de reactie van endotheliën en erythrocyten.

nier In de tubuli contorti van de 1e orde is in de epitheelcellen nu een uitermate fijne korreling te vinden; de grove korreling is geheel uit de cellen verdwenen. We kunnen hieruit concluderen, dat het ingebrachte ascorbinezuur vóór dezen tijd practisch geheel is uitgescheiden.

bijnier De bijnier verraadt een minder sterke reactie dan we waarnamen bij de eiwitmuis, die na 4 uur gedood werd. De schors-

korreling is wat minder grof geworden. In één bijnier vind ik op de grens van merg en schors, in de aan het merg grenzende cellen van de zona reticularis een buitengewoon sterke op-
hooping van ascorbinezuur. Deze is slechts aan één zijde van het preparaat waar te nemen, maar door alle coupes heen te vervolgen. Ik meen hieraan geen bijzondere beteekenis toe te moeten kennen.

Vergelijken we nu de uitkomsten van het onderzoek van de verschillende suikermuizen met elkaar, dan treft ons eigenlijk alleen het duidelijke histologische verschil, dat de levers ons bieden. De levercelkorreling is duidelijk algemeener geworden tusschen 4 uur en 2 dagen na het toedienen van het ascorbinezuur; chemisch is het ascorbinezuurgehalte echter in dien tijd gedaald, terwijl hiermede parallel de afnemende reactie van erythrocyten en endotheelcellen verliep.

Vergelijking
suikermuizen

Vergelijken we de preparaten van de eiwitmuizen met elkaar, dan blijkt de zilvernitraat-reactie weinig veranderd te zijn tusschen 4 uur en 2 dagen na het toedienen van het ascorbinezuur. De levercel-korreling, na 24 uur wat toegenomen, was veel geringer weer bij de muis, welke pas na 2 dagen gedood werd. Chemisch bleef het ascorbinezuur-gehalte — tot 24 uur althans — vrijwel gelijk.

Vergelijking
eiwitmuizen

Ook de bijnieren vertoonen een duidelijk verschil in ascorbinezuur-gehalte; de reactie is na 2 dagen veel geringer geworden wat de schors aangaat; in het merg is weinig verandering te zien.

Vergelijken we nu de resultaten van de onderzoekingen, verricht bij de suikermuizen, welke gedood werden 4 uur na het inbrengen van het ascorbinezuur met die van de eiwitmuizen, die na denzelfden tijd gedood werden, dan zien we histologisch gesproken geen verschil in het ascorbinezuur-gehalte van de verschillende organen, inclusief de lever. Bij de verklaring hiervan zou de theorie niet opgaan, die verderop in dit hoofdstuk wordt uitgewerkt, n.l. deze, dat de depôtfunctie voor het ascorbinezuur van de levercel, die geen of zeer weinig glycogeen bevat (dus op een eiwitdieet), nihil of zeer sterk verminderd is. We moeten echter in het oog houden, dat de lever van de eiwitmuizen, gekleurd volgens Best, niet geheel glycogeen-vrij was en dat er dus alle kans bestond op wat levercelkorreling.

Vergelijking
eiwit- met
suikermuizen

Aan den anderen kant is het te begrijpen, dat slechts weinig levercelkorreling aangetroffen werd in de lever van de suikermuizen, daar de toegediende hoeveelheid ascorbinezuur niet buitengewoon groot was en de levercelkorreling zoodoende in de eerste 4 uur nog niet algemeen kòn zijn. Ook bleek het ascorbinezuurgehalte van de levers van deze groepen muizen zeer weinig uiteen te loopen.

Een vergelijking tusschen de suiker- en de eiwitmuis, welke beide gedood werden na 24 uur, leverde voor de lever ook slechts weinig punten van verschil op; de levercelkorreling is wat algemeener bij de suikermuis; de endotheelcelkleuring treedt meer bij de eiwitmuis op den voorgrond. Chemisch loopen de ascorbinezuur-gehalten slechts weinig uiteen.

Bij de vergelijking van de uitkomsten van het onderzoek van de suiker- en van de eiwitmuis, die na 2 dagen gedood werden, treft ons echter wel degelijk een duidelijk histologisch verschil. Bij de suikermuis trof ik een intensieve, vrijwel algemeen voorkomende celkorreling aan, terwijl bij de eiwitmuis slechts hier en daar een fijne korreling in de levercellen voorkwam.

Hier zien we dus, dat de depôtfunctie van de lever bij muizen op twee geheel verschillende dieeten (koolhydraat- en eiwit-dieet) een geheel andere is. Oe opslag van het ascorbinezuur in de levercellen zelf is m.i. wederom afhankelijk van het glycogeenhalte van de levercel:

suikermuis gedood na 2 dagen: lever nog vrij glycogeenrijk —
practisch algemeene celkorreling;

eiwitmuis gedood na 2 dagen: spoor glycogeen nog aantoonbaar — hier en daar een zeer fijne levercelreactie.

Terwijl na 4 uur in de beide levers practisch geen verschil was aan te toonen (het ascorbinezuurgehalte was ook practisch gelijk) blijkt het dat na 2 dagen het vitamine C wel is vastgehouden door de glycogeenrijke lever, terwijl het daarentegen practisch niet is vastgelegd in de glycogeenarme lever.

Dit houdt evenwel niet in, dat de vraagstelling: verdwijnt het vitamine C-depôt uit een lever, die geen of zeer weinig

glycogeen bevat (lever van de eiwitmuis) sneller, dan uit een lever, die glycogeenrijk is (lever van een suikermuis)? positief beantwoord moet worden.

Daartoe zou het noodig zijn, dat het maximum van het ascorbinezuurgehalte van de lever ook inderdaad valt na 4 uur (zooals dat volgens Jacobson bij de cavia het geval is), terwijl tevens het gehalte aan ascorbinezuur dan juist in de levers van beide soorten muizen gelijk zou moeten zijn.

Eenzelfde reeks proeven doe ik met suiker- en eiwitmuizen, die nu echter 15 mg ascorbinezuur toegediend krijgen; van de suikermuizen werden er 3 na 4 uur gedood, 1 na 24 uur, terwijl de laatste muis van deze groep nog 2 dagen na het toedienen van het ascorbinezuur in leven bleef.

Een histologisch onderzoek, ingesteld naar het ascorbinezuurgehalte van maag, duodenum, ileum, lever, nier en bijnier en het glycogeengehalte van de lever, organen van een suikermuis, die gedood werd 4 uur na het toedienen van het ascorbinezuur, leverde de volgende resultaten op:

Suikermuizen
gedood 4 uur
na 15 mg C.

In maag, duodenum en ileum was het niet mogelijk enig ascorbinezuur aan te toonen.

In de lever was op sommige plaatsen een sterke kleuring van de endotheelcellen te zien; in de bloedvaten bevonden zich erythrocyten, die gekorrelt waren, terwijl ook geheel zwart gekleurde erythrocyten voorkwamen. Op vele plaatsen valt echter het meest op de intensieve (om de bloedvaten zelfs zéér intensieve) korreling in de levercellen zelf (zie foto 7). Chemisch komt hiermee ook een hoog ascorbinezuurgehalte van 69 mg per 100 gram overeen.

Het glycogeengehalte was, volgens Best, hoog; hiermede klopt inderdaad ook de chemische bepaling in de lever van één van de dieren, n.l. 1500 mg glycogeen per 100 gram lever.

De nier vertoont wederom hetzelfde beeld, als reeds vroeger beschreven werd: sterke korreling in sommige cellen van de tubuli contorti van de 1e orde, gekorrelde of egaal zwarte erythrocyten en sterk gekleurde endotheelcellen.

De korreling in de bijnier is, zoowel in de schors als in het merg, zeer intensief; de mergkorreling is zoo fijn en zoo intensief, dat we op sommige plaatsen den indruk krijgen met een egaal grijze cel te doen te hebben.

Het histologisch onderzoek van de lever van de muis, welke

Suikermuis
gedood 24 uur
na 15 gram
ascorb.zuur

24 uur na het toedienen van 15 mg ascorbinezuur gedood werd, leverde het volgende op:

In de lever was de reactie wat minder dan na 4 uur, al was de levercelkorreling nog wat algemeener geworden. Het ascorbinezuurgehalte bedroeg 37 mg per 100 gram; iets minder dus dan ik vond na de toediening van 5 mg ascorbinezuur aan eenzelfde suikermuis onder deze condities.

De coupes van de lever welke op glycogeen volgens Best gekleurd werden, vertoonden nog vrij veel glycogeen; dit klopte ook met de chemische bepaling: ik vond een gehalte van 333 mg glycogeen per 100 mg lever.

Suikermuis
gedood 2 dagen
na 15 mg C.

Een onderzoek naar de organen van de suikermuis, welke gedood werd na 2 dagen, leverde de volgende resultaten op:

In de maag was zoowel in het pylorus- als in het fundusgedeelte nog een korreling van het ascorbinezuur in de epitheelcellen waar te nemen. Ook duodenum en ileum vertoonden nog een positieve reactie in de epitheelcellen; deze was in het duodenum wat sterker dan in het ileum.

lever In de lever was weer een sterke levercelkorreling waarneembaar; niet alleen zien we een netvormige korreling om de kern heen, die ons sterk herinnert aan een impregnatie van het Golgi-net, maar ook door de geheele cel verspreid zijn de granula te vinden. De erythrocyten zijn of gekorrelt of egaal zwart van kleur. Eveneens treffen we een sterke kleuring van de endotheliën van de bloedvaten aan.

nier In sommige cellen van de tubuli contorti van de 1e orde is nog steeds een duidelijke korreling te zien van het ascorbinezuur, waarvan de uitscheiding dus nog niet is afgelopen.

bijnier In de bijnier zien we de gewone schors- en mergkorreling. Als vergelijkingsmateriaal dienden wederom 3 *eiwitmuizen*, welke nu echter ook 15 mg ascorbinezuur kregen toegediend.

2 muizen werden gedood na 4 uur; 1 muis 24 uur na de ascorbinezuur-gift.

Eiwitmuizen
gedood 4 uur
na 15 mg C.

De resultaten, verkregen bij het histologisch onderzoek van de beide muizen, die na 4 uur gedood werden, leverde het volgende op:

In maag, duodenum en ileum was niets van het ingebrachte ascorbinezuur terug te vinden.

lever In de lever zien we in de bloedvaten veel erythrocyten, die duidelijk granula dragen of geheel zwart gekleurd zijn. Op

enkele plaatsen is in beide levers in de levercellen een fijne korreling waar te nemen, terwijl daar ook een kleuring van de endotheelcellen voorkwam. Het meest opvallend echter is het feit, dat in groote gedeelten van de beide preparaten in de lever iedere reactie van de cel met zilvernitraat ontbreekt; we treffen dan echter een buitengewoon sterke korreling van de Von Kupffer-cellen aan, terwijl de endotheelcellen in deze gebieden practisch heel weinig gereageerd hebben (zie foto 6).

Chemisch blijkt echter het gehalte aan ascorbinezuur ondanks dit afwijkende gedrag van de levercellen toch niet laag te zijn; ik vond met de micro-titratie een vitamine C-gehalte van 70 mg per 100 gram lever.

Het glycogeen-gehalte van de levers van deze muizen was, te oordeelen naar de reactie van Best, negatief, op een spoor glycogeen na, wat we practisch altijd wel in enkele cellen aantreffen. Ook chemisch was het glycogeen-gehalte zeer laag; dit bedroeg ten hoogste enkele mg per 100 gram lever.

In de nier vinden we in enkele cellen van de tubuli contorti van de 1e orde een duidelijke korreling van het ascorbinezuur; de erythrocyten in de bloedvaten van de nier en in de glomeruli zijn matig tot sterk vitamine-houdend.

In de bijnier zien we weer dezelfde reactie, die ik hier reeds zoo vaak heb vermeld: intensieve schors- en mergkorreling.

De eiwitmuis, die gedood werd 24 uur na de toediening van de 15 mg ascorbinezuur, vertoonde in de lever eenige levercelkorreling, zooals ik die ook vond bij de muis, die na 4 uur gedood werd, maar de Von Kupffer-cel-korreling, die in die preparaten zoo opviel, ontbrak hier volkomen. Chemisch was het ascorbinezuurgehalte van de lever nog hoog: 55 mg vitamine C per 100 gram lever.

De glycogeenbepaling viel binnen het gebied van de blanco-bepalingen, wat goed overeenkomt met de kleuring volgens Best, waarbij ook geen ascorbinezuur aantoonbaar was.

Vergelijken we nu de uitkomsten van het onderzoek der verschillende suikermuizen met elkaar, dan zien we, dat bij de suikermuis, die gedood werd na 2 dagen, een korreling van het ascorbinezuur te vinden is in het darmkanaal, terwijl deze korreling niet voorkomt in de darmtractus van de muis, die 4 uur na het toedienen van 15 mg ascorbinezuur gedood werd. Ik meen dat deze korreling geen bijzondere beteekenis heeft,

nier

bijnier

Eiwitmuis
gedood 24 uur
na 15 mg
ascorb.zuur

Vergelijking
suikermuizen

maar het gevolg is van de abnormaal groote hoeveelheid ascorbinezuur, die bij deze muis is ingebracht.

In de levers vinden we ook eenig verschil: de uitgebreidheid van de celkorreling zelf nam toe met den tijdsduur, die verliep tusschen het toedienen van het ascorbinezuur en het dooden van het proefdier. Toch is het ascorbinezuurgehalte van de lever veel verminderd in dien tijd.

Vergelijking
eiwitmuizen

Vergelijken we de preparaten van de levers van de beide eiwitmuizen met elkaar, dan valt onmiddellijk het verschil in gedrag van de Von Kupffer-cellen op: alleen na 4 uur zijn deze zeer duidelijk gekorrelt. Ik meen hiervoor zeker het hooge vitamine C-gehalte aansprakelijk te moeten stellen, immers dit bedroeg na 4 uur 70 mg C en na 24 uur nog „maar” 55 mg.

Vergelijking
suiker- met
eiwitmuizen

Bij vergelijking van de resultaten, verkregen bij het onderzoek van de suikermuizen, welke 4 uur na het inbrengen van 15 mg ascorbinezuur gedood werden met de eiwitmuizen, die eveneens 4 uur na het inbrengen van een even groote dosis vitamine C te gronde gingen, vinden we in de levers van deze dieren een zeer duidelijk verschil.

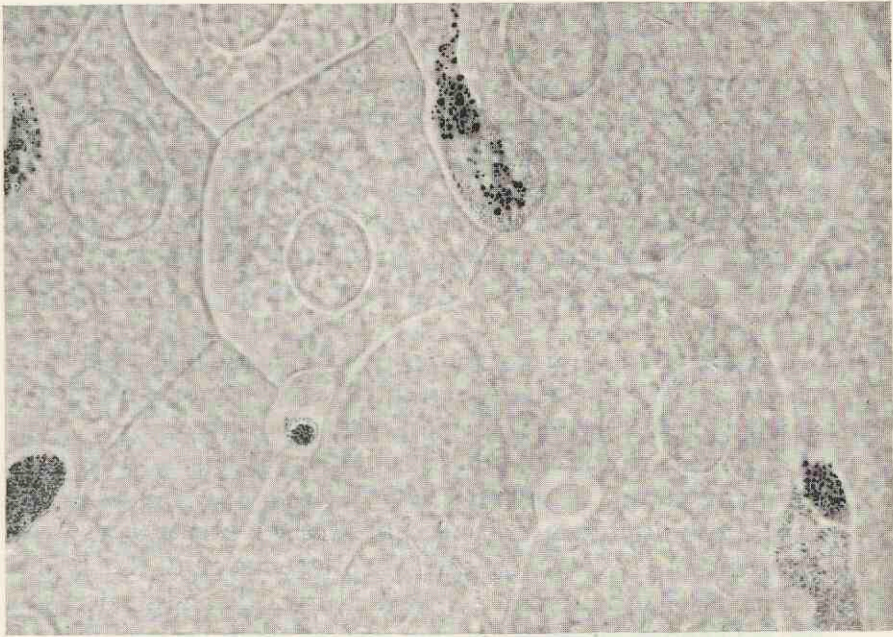
Bij de suikermuizen vinden we een levercelkorreling, die vrijwel geheel ontbreekt in de lever van de eiwitmuizen;

bij de eiwitmuizen valt onmiddellijk een sterke Von Kupffer-cel-korreling op, die niet te vinden is bij de suikermuizen.

Deze verschillen worden duidelijk geïllustreerd door bijgaande foto's.

Vergelijken we de resultaten van het onderzoek van de suiker- en eiwitmuizen, die 24 uur na het toedienen van 15 mg ascorbinezuur gedood werden, dan valt eigenlijk het meeste op, dat het vitamine C-gehalte van de lever van de eiwitmuis veel hooger was dan dat van de suikermuis, n.l. 55 tegenover 37 mg. Eigenlijk verwachtte ik een ascorbinezuurgehalte, dat ongeveer gelijk zou zijn bij deze twee soorten muizen; immers ook na 4 uur was het vitamine C-gehalte practisch gelijk (69 mg tegenover 70 mg voor suiker- en eiwitmuizen na het toedienen van 15 mg ascorbinezuur).

Het is echter zeer goed mogelijk, dat deze bepaling van 37 mg gedaan werd bij de suikermuis in een deel van de lever, dat, wat zijn vitamine C-gehalte aangaat, belangrijk onder het gemiddelde lag. Dit baseer ik op de waarnemingen, welke uit-



Afbeelding 6

Lever van een eiwitmuis, gedood 4 uur na toediening van 15 mg ascorbinezuur. Geen levercelkorreling, zeer sterke korreling van de cellen van Von Kupffer. Vergr. 900 \times .



Afbeelding 7

Lever van een suikermuis, gedood 4 uur na toediening van 15 mg ascorbinezuur. Intensieve levercelkorreling. Von Kupffercellen vertoonen geenerlei reactie. Vergr. 900 \times .

gewerkt zijn in het volgende hoofdstuk. Verschillen van 25—30 % in het C-gehalte tusschen de leverkwabben vormen bij muizen allerminst een uitzondering.

Wel blijkt uit deze vergelijking, dat de *totale* opname-capaciteit van de lever van de eiwitmuis, hoewel deze glycogeenarm is, zeker *niet* minder is; alleen wordt hierbij het ascorbinezuur niet in de levercellen zelf opgeslagen, maar in de endotheelcellen.

De depotfunctie daarentegen van de *levercel*, die geen aantoonbare hoeveelheden glycogeen bevat, blijkt geringer te zijn dan die van de levercel, die rijk is aan glycogeen.

Hiermede wordt een positief antwoord gegeven op de eerste vraag: bestaat er histologisch gesproken verschil bij het opslaan van ascorbinezuur in een lever, die veel glycogeen bevat vergeleken met een lever, die geen of zeer weinig glycogeen bevat?

Het tweede deel van de vraag: is er in de andere organen, die we kennen als ascorbinezuur-depôts eenig verschil waar te nemen? moet evenwel ontkennend beantwoord worden.

Vergelijking
suikermuizen
5 en 15 mg C.

Bij vergelijking van de verschillende resultaten, verkregen bij de onderzoekingen van de diverse suikermuizen, die 5 en 15 mg ascorbinezuur toegediend kregen, dan valt op, dat in de lever steeds de levercelkorreling wat intensiever was bij de dieren, die de grootste hoeveelheid vitamine C kregen toegediend.

Vergelijking
eiwitmuizen
5 en 15 mg C.

Alleen de eiwitmuizen, die 4 uur na de toediening van het ascorbinezuur gedood werden, vertoonden in hun levers een uitgesproken histologisch verschil. Afgezien van de enkele plaatsen, die afwijkend reageeren (n.l. een korreling van de levercellen zelf en geen Von Kupffer-cel-korreling) zag ik in de lever van de „eiwitmuis — 15 mg” de bijzonder intensieve Von Kupffer-cel-korreling, terwijl bij de eiwitmuis, die 5 mg ascorbinezuur toegediend kreeg absoluut niets daarvan bleek.

Is het verschil in gedrag van de Von Kupffer-cellen te wijten aan de abnormaal groote hoeveelheid ascorbinezuur, die ik de tweede maal toediende? Beide resultaten stemmen hierin overeen, dat op enkele plaatsen een levercelkorreling aanwezig was; practisch algemeen vinden we een reactie van de endotheliën (en bij toediening van 15 mg ascorbinezuur ook van de Von Kupffer-cellen), overeenstemmende met een lever, die vrijwel geen glycogeen bevat.

In de literatuur vond ik over het ascorbinezuurgehalte van de cellen van Von Kupffer het volgende:

Bourne deelt mede, dat hij bij de vos geen hooger vitamine C-gehalte in de cellen van Von Kupffer vond, dan in de endotheelcellen van de lever (61).

Van recente datum is de publicatie van Wolf-Heidegger (62) die mededeelt, bij bijnierlooze dieren een buitengewoon hoog ascorbinezuurgehalte van de cellen van Von Kupffer gevonden te hebben; de cellen zitten dan tot in de fijnste uitloopers opgepropt met reduceerende granula. Dezelfde beelden verkreeg hij bij normale dieren, welke groote doses vitamine C kregen toegediend.

Deze mededeeling klopt dus, met wat ik zelf vond; alleen moet er deze restrictie bij gemaakt worden, dat de korreling van de Von Kupffer-cellen alléén optreedt, wanneer het glycogeengehalte van de levercellen zelf gering is, terwijl de hoeveelheid ingebrachte vitamine C dermate groot moet zijn, dat de endotheelcellen niet alles meer kunnen bergen.

Is het nu mogelijk, in een glycogeenrijke lever tóch een korreling in de cellen van Von Kupffer te verkrijgen bij het toedienen van nog grootere doses ascorbinezuur?

Ik koos hiertoe 2 suikermuizen, die beide 4 uur na het toedienen van 30 mg ascorbinezuur gedood werden.

Suikermuizen
gedood 4 uur
na 30 mg C.

Een histologisch onderzoek ingesteld naar het ascorbinezuur-gehalte van maag, duodenum, ileum, lever, nier en bijnier en naar het glycogeengehalte van de lever, gaf het volgende te zien:

In de epitheelcellen van de maag is veel ascorbinezuur opgeslagen, speciaal in de pars pylorica. maag

Ook in het duodenum en het ileum kan van een zeer intensieve korreling in epitheelcellen gesproken worden. In de bekerzellen is op sommige plaatsen weer een ophooping van granula te zien, zooals ik dat reeds eerder beschreef. duodenum
ileum

In de lever is in de cellen om de bloedvaten een zeer intensieve celkorreling te zien. Zeer veel endotheelcellen zijn zwart gekleurd, maar een Von Kupffer-cel-korreling is nergens waar te nemen. lever

De nier vertoont wederom het bekende beeld: in enkele cellen van de tubuli contorti van de 1e orde is een zeer grove en intensieve korreling te zien, te wijten aan het uitgescheiden ascorbinezuur. nier

bijnier De reactie van de bijnier is bijzonder sterk; vooral de zona reticularis bevat zeer veel ascorbinezuur. Ook de reactie van het merg is sterker dan gewoonlijk; vele mergcellen zijn praktisch egaal zwart gekleurd.

Conclusie: Uit dit onderzoek blijkt, dat pas na het toedienen van een buitengewoon groote hoeveelheid ascorbinezuur, (30 mg) na 4 uur een belangrijke deponering van het vitamine plaats vindt in de epitheelcellen van het maag-darmkanaal.

In de lever zien we de celkorreling na het toedienen van 30 mg nog intensiever worden, terwijl het aantal gekleurde endotheelcellen eveneens toeneemt. In de bijnier is een sterke ophooping van het ingebrachte vitamine C in de zona reticularis van de schors te zien; vermoedelijk moeten we dus deze schorslaag beschouwen als het grootste ascorbinezuurdepôt.

Uit hetgeen gevonden is, kan de conclusie getrokken worden, dat het in een glycogeenrijke lever niet lukt om door het toedienen van groote hoeveelheden ascorbinezuur een korreling te verkrijgen van de cellen van Von Kupffer; wel wordt de endotheelcelkleuring nog algemeener in de lever en neemt de korreling van de levercellen nog meer toe.

Samenvatting van hetgeen gevonden is in dit hoofdstuk.

Uit de proeven op muizen, welke eenerzijds koolhydraatrijk, anderzijds koolhydraatloos gevoerd werden, blijkt wel dat de depôtfunctie van de levercel afhankelijk is van het glycogeengehalte van die cel; het lijkt mij waarschijnlijk, dat het deponeren en vastleggen van het ascorbinezuur slechts mogelijk is, wanneer het glycogeengehalte van de cel een bepaalde waarde heeft overschreden.

Tevens werd gevonden, dat wanneer het glycogeengehalte van de lever laag is door een koolhydraatloos dieet, het ascorbinezuur bij het toedienen van een abnormaal groote hoeveelheid toch niet opgeslagen wordt in de levercellen, maar dat dan de endotheelcellen het vitamine C opnemen, terwijl het teveel aan ascorbinezuur, wat dan niet meer geborgen kan worden, opgeslagen wordt in de Von Kupffer-cellen.

Is het glycogeengehalte van de lever daarentegen hoog, dan lukt het niet om door toediening van buitengewoon groote hoeveelheden ascorbinezuur een korreling van de cellen van Von Kupffer te verkrijgen. Wel wordt de endotheelcelkleuring algemeener en neemt de levercelkorreling toe.

HOOFDSTUK VII.

BESCHOUWING OVER HET VARIEEREND VITAMINE C-GEHALTE VAN VERSCHILLENDE GEDEELTEN VAN DE LEVER.

WAT IS „NORMALE VOEDING“?

In dit hoofdstuk worden eenige problemen besproken, welke zich in den loop van dit onderzoek voordeden. Het eerste probleem was: varieert het vitamine C-gehalte van verschillende levergedeelten, met name linker- en rechterkwab, merkbaar? Zijn er ook in één kwab duidelijke verschillen in vitamine C-gehalte waar te nemen? Dit onderzoek vond plaats, omdat in de literatuur de waarden, die de verschillende auteurs omtrent het vitamine C-gehalte van organen en wel in het bijzonder van de lever opgeven, zoozeer uiteenloopen. Dit kan twee oorzaken hebben; in de eerste plaats kan de „normale“ voeding van de proefdieren verschillen (hierop kom ik hieronder nog nader terug) en in de tweede plaats kunnen er verschillen in het vitamine C-gehalte in de lever zelf bestaan.

Naar deze laatste mogelijkheid besloot ik een onderzoek in te stellen. Eenige variatie in het vitamine C-gehalte verwachtte ik wel te vinden; immers Giroud (26) geeft ook op, dat met behulp van de histochemische vitamine C-bepaling een varieerend vitamine C-gehalte in verschillende levergedeelten is aan te toonen, hetgeen ik zelf herhaaldelijk heb kunnen constateeren. Met de zilvernitraatreactie is echter niet uit te maken, hoo groot het verschil in C-gehalte is; in het gunstigste geval is de reactie in het eene gedeelte van de lever positief, in een ander gedeelte van dezelfde lever negatief.

Een nauwkeurig onderzoek vond nu plaats bij het proefdiermateriaal waarover ik de beschikking had, n.l. caviae en muizen.

Macrochemisch was bij de caviae een zeer duidelijk verschil aan te toonen tusschen het vitamine C-gehalte van de kwabben van één lever onderling; het verschil bedroeg gemiddeld 15—20 % van het vitamine C-gehalte van de leverkwab, welke het minste vitamine C bevatte. In één geval bedroeg het

verschil echter meer dan 100 % al was hier het ascorbinezuur-gehalte ook zeer laag (3,89 mg tegenover 1,85 mg vitamine C per 100 gram lever).

Bij 7 muizen werden verschillen gevonden, waarbij een deel van een leverkwab gemiddeld 25—30 % meer vitamine C bevatte dan een ander gedeelte van gelijke grootte. De bepalingen bij de muizen werden echter niet macrochemisch verricht, maar hier vonden microchemische bepalingen plaats, waarbij uit verschillende leverkwabjes weefselcilindertjes geboord werden, terwijl de titratie van coupes uit zoo'n cilindertje geschiedde, zooals dat in hoofdstuk 8 uitvoerig beschreven is.

Niet alleen bleek hierbij een duidelijk verschil in vitamine C-gehalte te bestaan onderling tusschen de leverkwabjes van één muis; ook werden opmerkelijke verschillen gevonden in vitamine C-gehalte van coupes, die slechts 100 μ uit elkaar gelegen waren. Zoo vond ik bij de microtitratie van een weefselcilindertje van de lever van een muis de volgende serie uitkomsten, waarbij iedere gevonden waarde correspondeert met een coupe van 40 μ , slechts 100 μ verwijderd van de voorgaande en de volgende coupe.

1e coupe van 40 μ :	3,24 mm ³	dichloorphenolindophenoloplossing.
2e „ „ 40 μ :	3,66 „	„
3e „ „ 40 μ :	3,32 „	„
4e „ „ 40 μ :	4,02 „	„
5e „ „ 40 μ :	4,60 „	„
6e „ „ 40 μ :	4,36 „	„
7e „ „ 40 μ :	4,54 „	„
8e „ „ 40 μ :	4,72 „	„

Nemen we nu voor het gemak de eerste 4 coupes en de laatste 4 coupes bij elkaar, dan vinden we voor de coupes 1 tot en met 4 een gemiddelde van 3,56 mm³ indicator, wat na berekening overeenkomt met een vitamine C-gehalte van 39 mg per 100 gram lever en voor de coupes 5 tot en met 8 een gemiddelde van 4,56 mm³ indicator, overeenkomende met een vitamine C-gehalte van 55 mg per 100 gram weefsel.

Hiermede worden ook chemisch de histologische resultaten bevestigd, n.l. dat we zoo vaak niet een uniforme reactie in een leverstukje aantreffen. Veelal vond ik in één levercilindertje tusschen het laagste en hoogste vitamine C-gehalte per coupe

een verschil van ongeveer 40 % ten opzichte van het laagste gehalte.

Ten overvloedige wijs ik er nogmaals op, dat de varieerende chemische en histologische reactie in de lever *niet* gebonden is aan een bepaald gedeelte (dus het is niet zoo, dat b.v. de linkerkwab steeds minder vitamine C bevat dan de rechter), maar dat het vitamine C-gehalte, zonder dat daarvoor eenige regel is te geven, varieert door de geheele lever heen.

Uit deze waarnemingen blijkt, dat het noodzakelijk is niet te volstaan met het geven van één waarde, gevonden bij de vitamine C-bepaling van de lever, maar dat het zeker wenschelijk is verschillende bepalingen te verrichten en hieruit het gemiddelde te berekenen. Vooral is dit van belang voor publicaties, waarbij het ascorbinezuurgehalte van de lever van essentieel belang is, omdat verschillen van 15—20 % bij caviae en van 25—30 % bij muizen anders niet zullen nalaten, op de nauwkeurigheid van de onderzoekingen een ongunstigen invloed uit te oefenen.

Zooals reeds hierboven in het kort werd medegedeeld, is het ook mogelijk, dat er verschillen in de voeding van de proefdieren kunnen voorkomen, die aansprakelijk gesteld moeten worden voor de bij verschillende auteurs zoo sterk uiteenlopende opgaven van het vitamine C-gehalte van de lever. Vaak komt men in publicaties tegen, dat de proefdieren „normaal” gevoed werden. Voor de beoordeeling van de verschillen in het lever C-gehalte van de proefdieren moet hier allereerst onderscheid gemaakt worden tusschen de dieren, die het vitamine C kunnen synthetiseeren en de dieren, die wat hun vitamine C-voorziening betreft, geheel afhankelijk zijn van het ascorbinezuurgehalte van hun voedsel. Bij deze laatste groep van dieren kan een z.g. „normale” (dus niet vitamine C-vrije) voeding groote verschillen te zien geven.

Met een voorbeeld wil ik dit duidelijk maken: bij proeven op caviae, welke ten deele in den herfst, ten deele in de wintermaanden genomen werden, terwijl de caviae steeds „normaal” gevoed werden, vond ik de volgende verschillen:

	lever vitamine C-gehalte	bijnier vitamine C-gehalte
Oct.-Nov.	17,08 mg	139,0 mg
Nov.-April	2,83 mg	22,0 mg

De normale voeding, waarop deze caviae leefden, was tot half November: gras (ad lib.), hooi en soms wat brood. Na half November: mangelwortelen, hooi en eveneens soms wat brood.

Dit eenvoudige voorbeeld, waarbij de verschillen in vitamine C-gehalte van de weefsels van de cavia ten gevolge van het jaargetijde zoo bijzonder duidelijk zijn, spreekt voldoende voor zich zelf, om daarmede de noodzakelijkheid te bepleiten steeds wanneer de term „normale voeding” gebruikt wordt, aan te geven wanneer de proeven plaats vonden en hoe de proefdieren gevoed werden.

HOOFDSTUK VIII.

MICROCHEMISCHE VITAMINE C-TITRATIE

Inleiding.

De wensch de histochemische vitamine C-bepalingen te toetsen aan chemische onderzoekmethoden van het ascorbinezuur, bracht mij er toe de microchemische titratie van Glick te benutten, speciaal voor die organen, die door hun relatieve onhandelbaarheid bij de gewone macrochemische titratie tot tal van fouten aanleiding kunnen geven, zooals b.v. de macrochemische bepaling van het ascorbinezuur in de bijnier, waarbij geen rekening gehouden wordt met het bindweefselkapsel en de groote vaten.

Voor al echter het voordeel bij de microchemische vitamine C-bepaling dat men onderscheid in C-gehalte kan vinden tusschen de verschillende weefsels, waaruit het te onderzoeken orgaan is opgebouwd — bij de bijnier van zoo groot belang — bracht mij tot het gebruik van Glick's microtitratie.

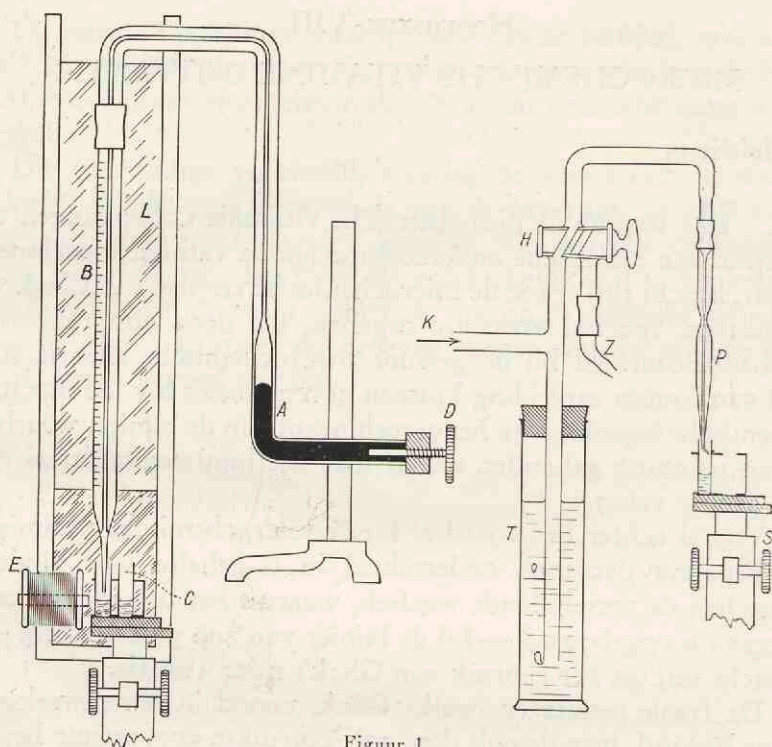
De fraaie resultaten, welke Glick, vooral in samenwerking met Biskind, met de ook door mij gebruikte apparatuur heeft weten te bereiken, worden in menige publicatie aangehaald (men zie o. a. de Protoplasma-Monographie, 16. Band, van Giroud over het ascorbinezuur), maar een verdere uitwerking van hun methodiek is nergens te vinden. Vermoedelijk belemmerden de moeilijkheden, die aan de methodiek vastzitten en die ook mij niet voorbij gingen, de verdere ontwikkeling van de microchemische vitamine C-bepalingen. Alvorens hier verder op in te gaan, volgt hier eerst de beschrijving van de methodiek, zooals Glick die geeft (63, 64).

Glick maakte gebruik van de apparatuur van Linderstrøm-Lang en Holter (65) en een verbeterde microchemische methode van Birch, Harris en Ray (66), gebaseerd op titratie van het ascorbinezuur met 2.6.dichloorphenolindophenol.

Apparatuur.

Reageerbuisjes van ongeveer 2 cm hoogte, met een inhoud van ongeveer 250 mm³.

„Huppelaars” of vlooien, bestaande uit een glazen bolletje



Figuur 1

Apparatuur voor de microvitamine C-bepaling volgens Glick.

met ijzeren kern. Ze dienen om de vloeistof te roeren, doordat ze intermitterend — door middel van een kwikinterruptor¹⁾, welke in de stroomketen geplaatst is — worden aangetrokken door een electro-magneet, die aan den buitenkant van het buisje is opgesteld ter hoogte van den vloeistofspiegel.

Handpipet, bestaande uit een capillair met een volume van ongeveer 50 mm³, waarvan de inhoud bepaald wordt door een vernauwing, die in het capillair gesmolten is. De pipet dient ervoor om steeds gelijke hoeveelheden extractiemiddel in de reageerbuisjes te brengen.

Micropipet (P) is geschikt voor het meten van kleine hoeveelheden ascorbinczuur, benodigd om de apparatuur te ijken. Ook deze pipet bestaat uit een capillair, dit is aan één zijde zeer fijn uitgetrokken, waarna deze uitgetrokken punt omgebogen is om bij het uitloopen een goed contact met den wand

¹⁾ Isenthal Automatic Controls, London: mercuri switch SK 10.

van het reageerbuisje te waarborgen. Ook hierbij wordt den inhoud weer bepaald door een ingesmolten vernauwing. Mijn micropipet had een inhoud van $12,85 \text{ mm}^3$. Om nu $12,85 \text{ mm}^3$ van een ascorbinezuuroplossing in een reageerbuisje te brengen, gaat men als volgt te werk: (zie figuur 1).

Via (Z) zuigt men de C-oplossing op in de pipet tot boven de vernauwing, waarna de pipet snel uit de vloeistof verwijderd wordt door het omlaag draaien van het beweegbare statiefje (S), waarop het bakje met de ascorbinezuur-oplossing geplaatst is. De kraan (H) wordt nu zóó gesteld dat er op de vloeistof in de pipet een constante druk kan worden uitgeoefend, die bepaald wordt door de hoogte van de waterkolom (T), welke in de leiding van een zuurstof- of koolzuurcylinder (K) en de kraan (H) is opgesteld. We stellen de waterkolom zóó, dat de pipet met de ascorbinezuur-oplossing langzaam uitloopt, terwijl toch de vloeistof blijft hangen op de vernauwing van het capillair. De pipet bevat dan precies $12,85 \text{ mm}^3$ ascorbinezuur-oplossing. Hierna wordt de omgebogen punt van de pipet in aanraking gebracht met den wand van een reageerbuisje, waarna de vloeistof door een lichte overdruk, die bereikt wordt door even in de gummislang tusschen (H) en de pipet te knippen, wordt uitgedreven.

Microburet. Deze is van het type 2, waarbij het kwik niet in aanraking komt met de standaardoplossing. De buret bestaat uit een capillair van ongeveer 60 cm lengte met een totale inhoud van 100 mm^3 . De verdeling is in $0,2 \text{ mm}^3$, terwijl schatting mogelijk is tot in $0,02 \text{ mm}^3$. De buret is aangesloten aan een gewoon capillair, dat eindigt in een kleine luchtkamer en een kwikreservoir (A), afgesloten door de schroef (D). Hiermede is de grootte van de luchtkamer te varieeren, waardoor de buret gevuld, dan wel leeg gemaakt kan worden. Heel veel hangt af van de punt van de buret; hoe fijner de opening, hoe nauwkeuriger de buret reageert, toch moet de punt weer niet al te fijn zijn, omdat anders de overdruk te groot wordt, die noodig is om de vloeistof uit de buret te drijven en het uitvloeien niet direct ophoudt bij het uithalen van de buret uit de vloeistof. Het beste resultaat werd verkregen door de punt zeer fijn uit te trekken, deze dicht te smelten en daarna weer open te slijpen. Hierdoor alleen is het mogelijk iedere gewenschte grootte van opening te verkrijgen. De wanden van

het capillair, dat de punt vormde, werden tevens conisch bijgeslepen, waardoor er practisch geen vloeistof bij het uithalen van de buret uit de vloeistof aan de punt blijft hangen.

Het bijvoegen van het reagens (i. c. de dichloorphenolindophenoloplossing, welke tevens als indicator dienst doet) geschiedt dus practisch alleen door het op en neer schroeven van het tafeltje, waarop de buisjes met extractiemiddel en te titreeren coupes of buisjes met een ascorbinezuur-oplossing van bekende sterkte staan opgesteld, waardoor de inhoud van deze buisjes in aanraking kan komen met de punt van de buret.

De voornaamste eisch, die we aan de buret moeten stellen is, dat het capillair overal even wijd is. Dit werd gecontroleerd door de lengte van een kwikdruppel te meten op verschillende plaatsen van het capillair, terwijl tevens het gewicht gecontroleerd werd van een bepaald aantal mm^3 kwik, dat we bij verschillende proeven uit de buret lieten loopen. Het bleek ons uit een serie proefnemingen, dat er geen duidelijk aantoonbare verschillen in capillairwijdte van de verschillende gedeelten van de buret bestonden.

Aan de apparatuur veranderde ik het volgende:

De buret werd geconstrueerd zonder open been, daar dit in de practijk geheel overbodig is gebleken. De buret zelf werd tevens door middel van een gummi verbinding aan het buret-capillair aangesloten.

Aanvankelijk gebruikte ik een microburet met losse punt, om deze bij beschadiging te kunnen vervangen; dit biedt geen voordeelen, echter is het vullen van de buret zonder dat er kleine luchtbelletjes tusschen de losse punt en de buret zelf blijven zitten, veel moeilijker.

Titratie.

Met de handpipet brengt men 50 mm^3 van een 5 % metafosforzuur-oplossing in een aantal reageerbuisjes; in elk van de buisjes wordt een huppelaar gedaan. Uit het te onderzoeken orgaan wordt nu een cilindertje geboord, terwijl het weefsel stijf bevroren is. Meestal gebruikte ik een oogtrepanatie-boor met een diameter van $4\frac{1}{2}$ mm, maar ook werden boringen verricht met boortjes van $2\frac{1}{2}$ mm diameter. Het bevroren weefsel-cylindertje — meestal op een schijfje gelatine — wordt

nu zoo snel mogelijk op de tafel van een vriesmicrotoom volgens Schulz Brauns gebracht en hier worden dan van het cylindertje coupes gesneden, hetzij van 40, of 20 of 10 μ dik. Met een fijn penseeltje worden de coupes (bij elkaar gevoegd tot 40 μ) in één reageerbuisje gebracht. Om de kans op oxydatie van het ascorbinezuur zooveel mogelijk te verminderen, worden de buisjes afgesloten met gummidopjes en wanneer ze niet onmiddellijk getitreerd kunnen worden, in de ijskast geplaatst. Bij een bepaling, die 3 uur na het boren geschiedde, vond Glick practisch dezelfde ascorbinezuur-waarden als bij de titratie, die direct plaats vond na het snijden, zelfs vermelden Glick en Biskind (14) dat zij geen vitamine C-verlies vonden wanneer zij bijnieren van het rund 1 tot 2 dagen bij -5° bewaarden, terwijl zelfs 4 dagen post mortem het C-gehalte volgens hen niet achteruit geloopen was.

Bij de titratie wordt nu het buisje in een rekje op het statiefje geplaatst, de electro-magneet wordt aangezet en men titreert nu tot een zwak roode kleur, die even sterk is als die van een rose Bengalen-oplossing van 1 : 1000000, welke kleurstof-oplossing zich bevindt in een contrôlebuisje (C), dat ook in het rekje geplaatst is.

De titratie verloopt het eenvoudigst bij beoordeeling van de kleurverschillen tegen een egaal verlichte achtergrond. Hiertoe dient de lichtbak (L) van melkglas, die tevens de heele microburet verlicht. Het onderste gedeelte van den lichtbak is bovendien overdekt door een plaat blauw glas, omdat het kleurverschil tegen dezen achtergrond het best waargenomen kan worden.

Moelijkheden, die zich voordeden in den loop van het onderzoek.

Aanvankelijk had ik bij de titratie veel last van een onverklaarbaar sterke reductie van de indicator-oplossing. Deze reductie was van dien aard, dat er van een physiologisch proces geen sprake kon zijn. In de biologie kennen we alleen de SH-verbindingen, die een reduceerend vermogen hebben ten opzichte van den indicator, dat van dezelfde orde is als dat van het ascorbinezuur. Alleen glutathion reduceert iets sterker, maar komt in veel geringere concentraties voor dan het ascor-

binezuur, dat bij de micro-methode getitreerd wordt. Andere verbindingen, zooals cysteïne en ergothioneïne, werken alle zwakker reduceerend. Na lang experimenteren bleken de „puces” de schuldigen te zijn, terwijl ook éénmaal de penseel, waarmee de coupes in de buisjes gebracht werden, aansprakelijk kon worden gesteld voor een abnormale reductie van de indicator-oplossing. Sedertdien gebruik ik dan ook alleen schachtpenseeltjes vor het overbrengen van de coupes; penseeltjes, die dus geen metalen kraag hebben. De controle van de huppelaars, die ik altijd vóór de titratie deed, op dichtheid van den glaswand met behulp van een neutrale broomthymolblauw-oplossing (wordt geel wanneer de glaswand niet volkomen intact is), bleek dus niet voldoende te zijn. Het was nu noodzakelijk, nieuwe puces steeds van te voren te controleeren door het uitvoeren van blanco-titraties; blijken hierbij de buisjes met 50 mm^3 metafosforzuur en de huppelaar niet meer dan de normale hoeveelheid indicator te verbruiken om de standaardkleur te verkrijgen, dan worden ze weggezet en 24 uur later, na een tweede contrôle, voor de gewone titratie gebruikt. In theorie zal de nu reeds toegevoegde kleine hoeveelheid indicator bij de nu volgende eigenlijke titratie eenigen invloed moeten uitoefenen, maar in korten tijd wordt de dichloorphenolindophenol-oplossing aan de lucht ontkleurd, waarna we alleen de vloeistofvermeerdering in rekening hebben te brengen, want het aantal mm^3 vloeistof wordt door één blanco bepaling gebracht van 50 op ongeveer 51. In de practijk is van een merkbare toename van de benoodigde hoeveelheid indicator bij de eigenlijke titratie, nu de hoeveelheid vloeistof vermeerderd is, echter geen sprake. Zelfs bij een vloeistofvermeerdering van ongeveer 25 % zijn de uitkomsten nog dezelfde; bij een blanco-titratie van 11 buisjes, welke $62,85 \text{ mm}^3$ metafosforzuur bevatten, werd gevonden gemiddeld $1,01 \text{ mm}^3$ indicator, noodig voor de colorimetrische titratie, terwijl ik bij een blanco-bepaling in 21 buisjes, welke 50 mm^3 metafosforzuur bevatten, eveneens gemiddeld $1,01 \text{ mm}^3$ indicator gebruikte (beide blanco bepalingen werden enkele dagen na elkaar uitgevoerd, waardoor geen verandering van indicator-sterkte te duchten was).

In de literatuur vond ik niet vermeld, dat het noodzakelijk is steeds van de gevonden ascorbinezuur-waarden af te trekken

die kleine hoeveelheid indicator, die bij het begin van de titratie noodig is om de metafosforzuur-oplossing de roode kleur te geven, die overeenkomt met de kleur van het contrôlebuisje met de rose Bengalen-oplossing 1 : 1000000. Vooral in oplossingen, die weinig vitamine C bevatten, wordt de fout, die aldus gemaakt zou worden, buitengewoon groot. Als illustratie hiervan dient het volgende voorbeeld: bij een titratie van een zuivere ascorbinezuur-oplossing werd gevonden per buisje: 0,27 γ vitamine C. Uit de sterkte van de oplossing kon ik berekenen, dat per buisje echter gevonden moest worden: 0,14 γ vitamine C. Het verschil levert juist de waarde van de blanco-titratie, n.l. 0,13 γ vitamine C. Deze moeilijkheid doet zich niet voor bij de macro-titratie, vandaar dat ik er hier speciaal de aandacht op vestig.

Wordt deze blanco-bepaling niet afgetrokken, dan vinden we als minimum per buisje 0,13 γ vitamine C bij een normale titratie. Toch is er dan geen vitamine C in de oplossing aanwezig.

Bij een coupedikte van 40 μ en een boor-diameter van $4\frac{1}{2}$ mm beteekent dit voor een orgaan een vitamine C-gehalte van ongeveer 20 mg vitamine C per 100 gram!

Resultaten van Glick en Biskind.

Glick en Biskind hebben tal van organen met deze methodiek onderzocht (bijnier, duodenum, hypofyse (77), thymus (78), epiphyse (79), ooglens (80)). In de bijnier van het rund vonden zij, dat het gehalte van de verschillende schorslagen niet gelijk is; de glomerulosa bevat slechts weinig vitamine C, terwijl het gehalte van fasciculata en reticularis veel hooger is. Vooral de zona fasciculata bevat heel veel ascorbinezuur, speciaal de laag vlak onder de glomerulosa is aansprakelijk voor dit hooge gehalte. Zoowel het aantal cellen als het vitamine C-gehalte per cel is hier grooter dan van de dieper gelegen fasciculata-lagen, hun titratie-curve toonde dan ook ter hoogte van deze laag een belangrijke top. Naast de titratie van deze runder-bijnieren — die in histologische structuur weinig afwijken van die van den mensch — (14), titreerden zij ook bijnieren van embryonen op de bovenvermelde wijze met de boor van $4\frac{1}{2}$ mm diameter (67).

In den loop van dit onderzoek heb ik getracht hun titratie-methode ook uit te breiden tot de bijnieren van caviae en katten.

Ook bij deze dieren werd de titratie uitgevoerd zooals Glick en Biskind die beschrijven, alleen de histologische contrôle van de getitreerde coupes geschiedde anders. Glick en Biskind vullen na afloop van de titratie de reageerbuisjes, welke de getitreerde coupes bevatten, onmiddellijk met 96 % alcohol, brengen de coupes daarna in 10 % formol, kleuren de coupes en sluiten ze ten slotte in. Ik benutte niet de getitreerde coupes, maar de onmiddellijk hieraan voorafgaande voor histologische contrôle. Wel geven deze niet volkomen hetzelfde beeld weer, als de getitreerde coupe, wat bij het meten van de oppervlakte — waarover later gesproken zal worden — van invloed zou kunnen zijn, maar de voordeelen verbonden aan het snijden van dunnere coupes, wegen daar ruim tegen op.

Glick en Biskind snijden coupes van 40 of van 20 μ ; dank zij de methode van Schulz Brauns (68) kon ik 10 μ dikke coupes snijden, waardoor een maximale extractie van het ascorbinezuur door de metafosforzuur-oplossing gewaarborgd wordt. Deze snijtechniek, waarbij het ongefixeerde weefsel — in dit geval dus het geboorde cilindertje — zonder eenige voorbehandeling gesneden en gekleurd kan worden, levert bijzonder fraaie preparaten, die ook voor fijn microscopisch-anatomisch onderzoek zeer geschikt zijn.

Alvorens de verkregen resultaten bij de boringen van caviae- en kattenbijnieren nu hier weer te geven, wil ik eerst mijn gewone wijze van werken meedeelen: van de bevroren bijnier werd een cilindertje geboord van 4½ mm doorsnede. Dit boren moet zooveel mogelijk loodrecht op de oppervlakte van het orgaan geschieden. Hierna wordt het cilindertje — op een gelatine-schijfje — op het vriesmicrotoom volgens Schulz Brauns gesneden. Op den stand van het weefselcilindertje ten opzichte van de vriestafel, moet zeer goed gelet worden; bij het maken van de coupes moet zooveel mogelijk uniform weefsel getroffen worden. Bij de bijnieren van kleinere dieren treffen we echter in de coupes steeds verschillende lagen aan, doordat deze lagen niet fraai evenwijdig aan het oppervlak verlopen, maar veelmeer sterk in elkaar grijpen. Bovendien neemt het merg bij de cavia een dermate gering deel in van de

totale bijnier, dat een coupe van het weefsel-cylindertje nooit alleen merg zal bevatten; volgens Elliott en Tuckett verhouden zich de gewichten van medulla en schors bij een cavia van 3 weken als 1 staat tot 6,8; deze verhouding wordt bij het volwassen dier 1 : 81 (Handbuch der vergleichenden Anatomie, Band II/1, 1934, p. 798). Het gevolg nu hiervan is, dat de toppen in de verkregen curves veel minder uitgesproken zijn dan die in de curves, die Glick en Biskind uit hun boringen van de runderbijnieren kunnen construeeren.

Om nu toch een indruk te kunnen krijgen van de verdeling van het ascorbinezuur over de verschillende lagen, waaruit de bijnier is opgebouwd, werd het oppervlak, dat de verschillende lagen innemen, opgemeten. Dit geschiedde aan de coupes, die bestemd waren voor histologische contrôle met behulp van een compensatie-poolplanimeter, mij welwillend ter beschikking gesteld door het Geografisch Instituut van deze Universiteit. Hierdoor slechts is het mogelijk rekening te houden met de niet tot het parenchym behorende elementen, zooals kapsel, groote vaten en bindweefselschotten. Uit mijn planimetrisch verkregen oppervlakte kon ik bij bekende coupedikte, den inhoud van elk onderdeel van de bijnier in een coupe aanwezig, berekenen. Deze waarden gaven mij den grondslag voor de berekening van het vitamine C-gehalte per $4000000 \mu^3$, waaruit de figuren 2, 3 en 4 zijn geconstrueerd.

Het bijniercylindertje werd in serie opgesneden en wel zoo, dat er 2 of 3 coupes van 10μ op een objectglas geplakt werden, die voor histologische contrôle en oppervlakte-meting dienden terwijl de hier onmiddellijk op volgende 4 coupes tezamen in een reageerbuisje werden gebracht. 1 of 2 coupes liet ik hierna uitvallen, waarna van de nieuwe groep weer eerst de op te plakken coupes aan de beurt kwamen, enz. Steeds was een serie coupes totaal 80—90 μ dik. Ieder punt in de curve correspondeert dus met de getitreerde coupes van elke serie. Gewoonlijk werden bij de cavia een 30-tal bepalingen gedaan. Ik benutte steeds de rechter bijnier, omdat deze plat is in tegenstelling met de op doorsnede meer driehoekige linker bijnier.

De direct opgeplakte coupes, die voor de histologische contrôle bestemd waren, werden volgens voorschrift van Schulz Brauns onmiddellijk gefixeerd in 60 % alcohol, daarna werd het objectglas overgebracht in absolute alcohol, weer terugge-

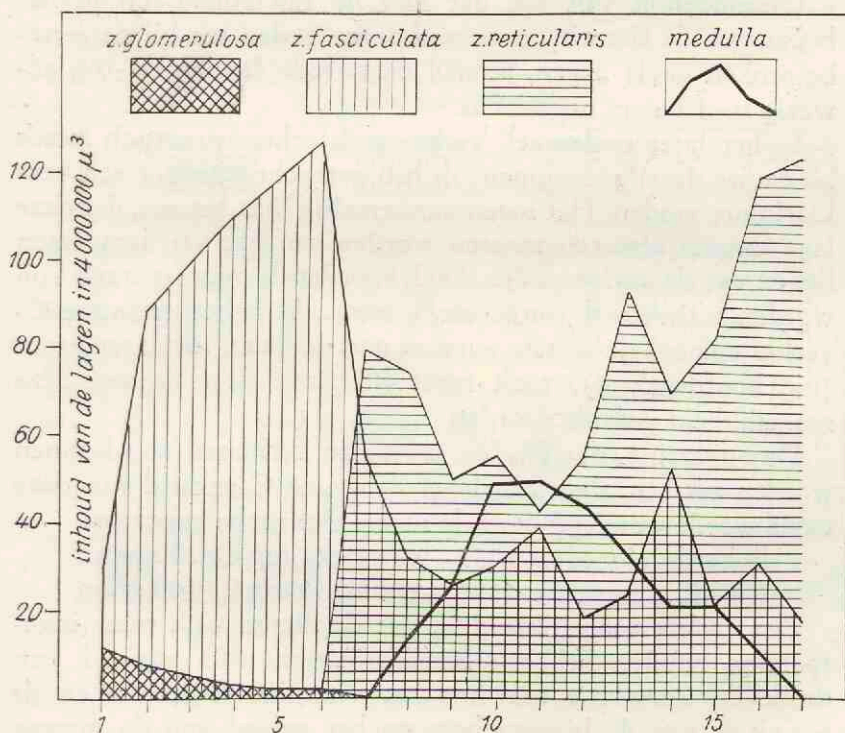
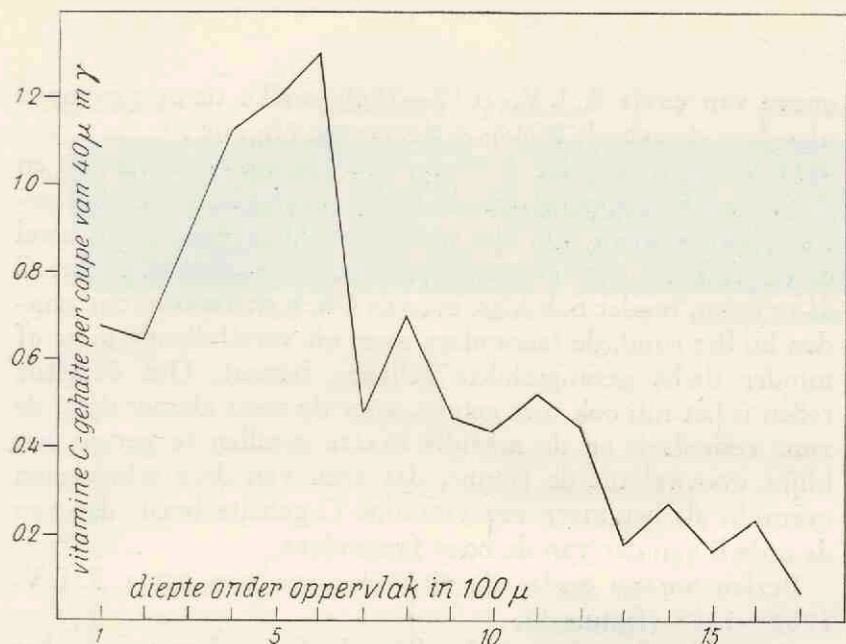
voerd via de 60 % alcohol naar aq. dest., waarna de coupes gekleurd werden met haematoxyline-eosine. Van een vóórfixatie in osmiumtetroxyde-damp zag ik geen betere resultaten.

Het zal de aandacht trekken, dat in de curves de tweede top, die we verwachten wanneer we voor de tweede maal de zona fasciculata aansnijden, niet verschijnt of althans veel minder duidelijk is. Dit komt daardoor, dat de bijnier niet volkomen plat is en de cylinder geboord wordt, uitgaande van dien kant van de rechter bijnier, die het vlakste is, dit is de kant, waarmee hij tegen de rechter nier aanligt. Bij het opsnijden van het cylindertje is de kans, dat aan de tegenovergestelde zijde uniform weefsel wordt aangesneden, zeer gering en daardoor wordt de fasciculata-top over een groot aantal coupes verdeeld.

Om nu aan het bezwaar van verschillende lagen in één coupe zooveel mogelijk alle grond te ontnemen, gebruikte ik eenerzijds een fijnere boor (van $2\frac{1}{2}$ mm doorsnede) en anderzijds heb ik de bijnier ook in zijn geheel gesneden. De aldus verkregen coupes zijn groot genoeg, dat reeds één enkele een titreerbare hoeveelheid vitamine C oplevert, zoodat ik voor elk te onderzoeken niveau met één coupe volstaan kon. Beide methoden bleken echter ook groote bezwaren met zich mee te brengen. De $2\frac{1}{2}$ mm boor gaf evenmin uniform weefsel, terwijl de titratie moeilijker was, omdat de kleinere coupes minder ascorbinezuur bevatten. Als voordeel van deze kleinere maat boor geldt evenwel, dat de toppen van de curves wat meer uitgesproken zijn en dat het tevens mogelijk is 2 cylindertjes uit één bijnier te boren. Wordt de bijnier in zijn geheel gesneden, dan is het oppervlak van de verkregen coupes dermate groot, dat één coupe voldoende voor de titratie is, waardoor het aantal bepalingen per bijnier nog belangrijk grooter kan worden. Een groot bezwaar blijft echter, dat elke coupe een eigen onbekende oppervlakte heeft, hetgeen bij de grafische reconstructie en uitmeten van het vergrootte beeld soms onzekerheid met zich brengen kan.

Thans volgt hier de bespreking van de resultaten, welke ik bij de boringen van cavia-bijnieren verkreeg.

Aanvankelijk verkreeg ik bij verschillende caviae toppen in de ascorbinezuur-curve, die volkomen klopten met de zona fasciculata, die daar ter plaatse het grootste gedeelte van de coupe in beslag nam. Een voorbeeld geeft hiervan de titratie-



Figuur 2

Microtitratie van de rechter bijnier van cavia R.I.V. 1039—1040 volgens Glick en Biskind. Hooge top in de curve, welke het ascorbinezuur-gehalte aangeeft, corresponderend met de zona fasciculata van de schors.

curve van cavia R. I. V. 1039—1040, welke titratie evenwel niet door de geheele bijnier is doorgezet (figuur 2).

Duidelijk is het, dat de hoge top, die we tusschen 200 en 600 μ onder de oppervlakte aantreffen, geheel op rekening gesteld kan worden van de zona fasciculata; het is evenwel onmogelijk uit deze curve het exacte gehalte aan vitamine C af te lezen, omdat ook hier, evenals Glick en Biskind dat vonden bij het rund, de fasciculata weer uit verschillende meer of minder dicht gerangschikte cellagen bestaat. Om dezelfde reden is het mij ook niet gelukt, voor de zona glomerulosa, de zona reticularis en de medulla exacte getallen te geven; het blijkt evenwel uit de figuur, dat geen van deze schorslagen evenmin als het merg een vitamine C-gehalte bezit, dat van de orde is van dat van de zona fasciculata.

Bezien we nu nader de titratie-curve van cavia R. I. V. 1386—1387 (figuur 3).

Onmiddellijk valt op, dat hier de fasciculata-top in het begin van de titratie-curve veel lager is dan we bij de eerst-besproken cavia zagen, terwijl de tweede fasciculata-top afwezig is of beter: negatief is.

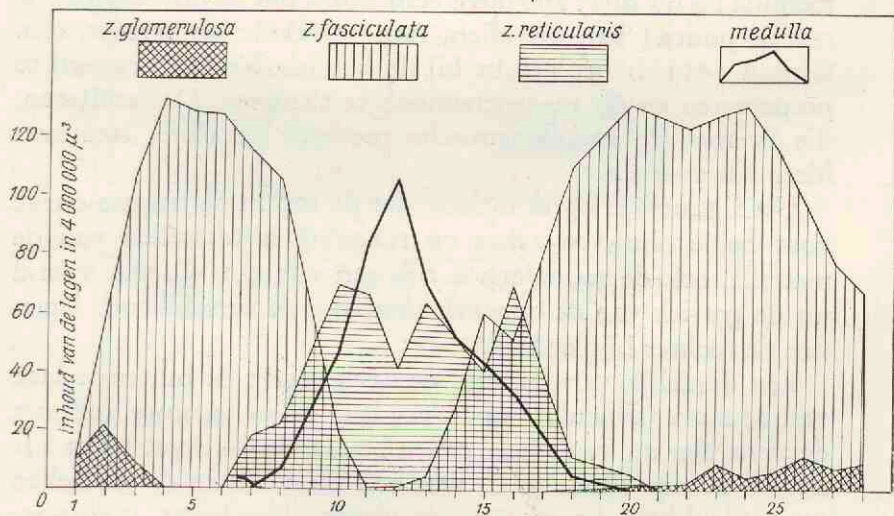
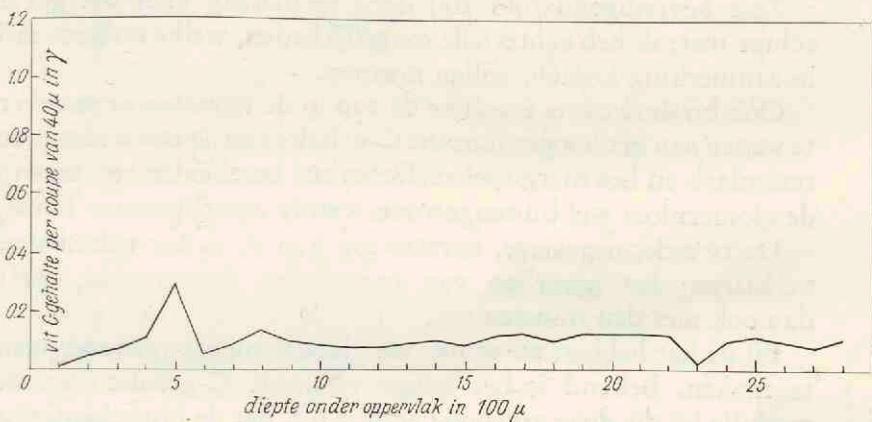
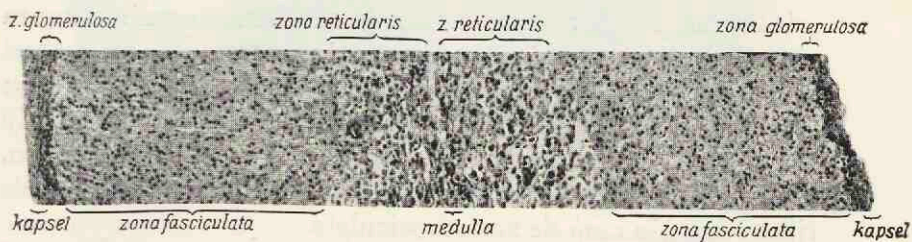
In het later onderzoek verkreeg ik echter practisch steeds bij caviae deze lage toppen; ik heb getracht hiervoor een verklaring te vinden. Het meest aannemelijk lijkt het me, dat deze lage toppen geweten moeten worden aan het vrij lang laten liggen van de caviae na den dood, vóórdat de micro-titratie kon worden uitgevoerd (ongeveer 3 uur). Al is het vitamine C-verlies volgens de meeste auteurs post mortem niet zeer groot (zie hoofdstuk 2), toch moet hier wel degelijk aan deze mogelijkheid gedacht worden.

De opvatting, dat dit feit misschien verklaard zou kunnen worden uit een algemeen lager vitamine C-gehalte van deze cavia wordt weerlegd door de macrochemische gegevens:

linker bijnier cavia 1039—40: 23,41 mg C/100 gram

„ „ „ 1386—87: 36,30 mg C/100 gram

Een andere mogelijkheid is, dat de dieren zich meer inspannen zouden hebben; Ratsimamanga (20) zag n.l. een duidelijke correlatie tusschen het vitamine C-gehalte en de activiteit van de bijnierschors op het gebied van de interne secretie. Hij vond een duidelijk verschil tusschen het C-gehalte van de bijnier van de rat in rust en na het verrichten van



Figuur 3

Microtitratie volgens Glick en Biskind van de rechter bijnier van cavia R. I. V. 1386—1387. Weinig uitgesproken eerste top overeenkomende met de zona fasciculata.

arbeid; ook bij de cavia is dit het geval. Deze vermindering in vitamine C-gehalte komt volgens zijn onderzoekingen geheel op rekening van de schors te staan en bedraagt ongeveer 35 %; hiervan zou echter slechts 10 % werkelijk verloren zijn, terwijl 25 % van het ascorbinezuur reversibel geoxydeerd zou zijn.

Het sterkst vermindert weer het vitamine C-gehalte van de rijkste laag, in casu de zona fasciculata.

Zeër bevredigend lijkt mij deze verklaring voor dit geval echter niet; ik heb echter alle mogelijkheden, welke volgens mij in aanmerking komen, willen noemen.

Ook bij deze cavia is echter de top in de titratie-curve zeker te wijten aan het hoge vitamine C-gehalte van de fasciculata; de reticularis en het merg spelen slechts een bescheiden rol, terwijl de glomerulosa wel buitengewoon weinig ascorbinezuur bevat.

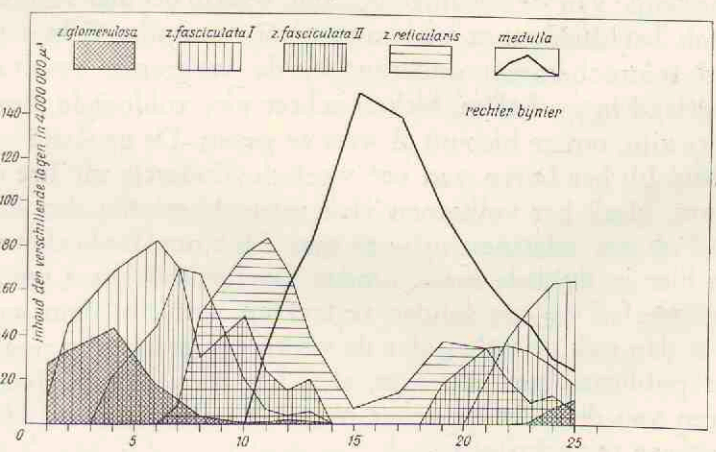
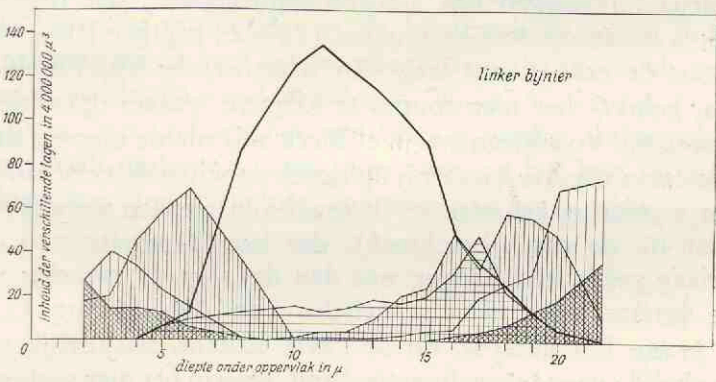
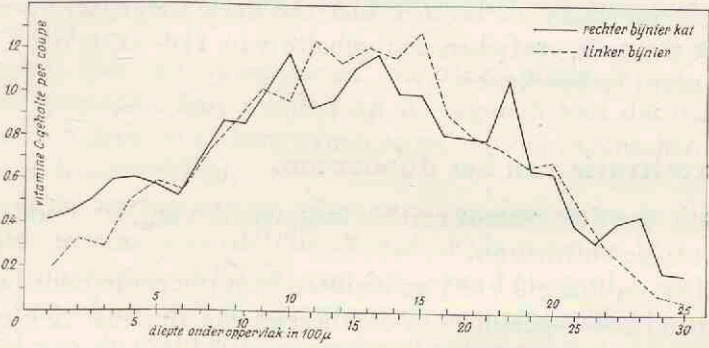
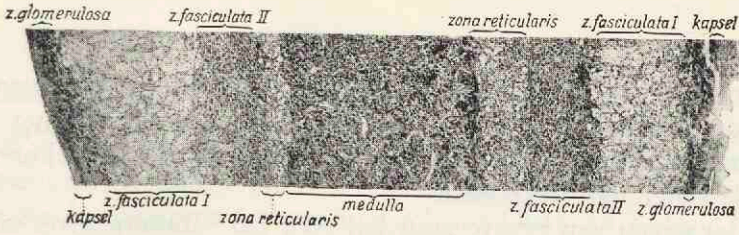
De tweede, negatieve, titratie-top kan ik in het geheel niet verklaren; het opstellen van hypothesen hieromtrent heeft dan ook niet den minsten zin.

Bij de kat hebben we echter met geheel andere verhoudingen te maken. Bekend is het hoge vitamine C-gehalte van de medulla bij dit dier; zóó hoog zelfs is dit, dat de histochemische reactie positief kan uitvallen. Aan verschillende auteurs, o. a. Giroud (41), is het gelukt bij de kat het bijniermerg vrij te prepareren en dit macrochemisch te titreeren. De resultaten, die ik met de microchemische methode bereikte, stemmen hiermede overeen.

Uit figuur 4 is op te maken, dat de top in de titratie-curve voor beide bijnieren zeker op rekening is te stellen van de medulla, ook de reticularis is rijk aan vitamine C, wat vooral uit de grafiek van de oppervlakken van de verschillende lagen van de rechter bijnier blijkt.

Een duidelijk verschil met de cavia levert de buitenste laag van de zona fasciculata op. Deze laag — in tegenstelling met de cavia hier uit vacuolaire cellen bestaande — bevat bij de kat slechts weinig vitamine C, wat ook duidelijk in de grafieken tot uitdrukking komt. Ook de glomerulosa bevat, zooals we dat gewend zijn, slechts weinig ascorbinezuur.

Dit alles komt geheel overeen met de resultaten, welke de zilvernitraat-methode van Giroud oplevert: ook daar een zéér intensieve, maar uiterst fijne korreling van de medulla van de bijnier; een grove, echter ook intensieve korreling van de zona



Figuur 4

Microtitratie van bijnieren van een kat. (Pharmacol. Lab.) volgens Glick en Biskind. Toppen in het vitamine C-gehalte komen overeen met het merg; ook de zona reticularis is rijk aan stof C; de vacuolaire buitenste fasciculata-laag is arm aan vitamine C, evenals de zona glomerulosa.

reticularis en de binnenste fasciculata-laag en een zeer weinig gekorrelde buitenste fasciculata-laag, welke in reactie met de glomerulosa overeenkomt. Ook daar zijn enkele zilverkorrels in de cellen aan te toonen.

Het geven van exacte waarden voor het vitamine C-gehalte van de verschillende lagen is hier ten deele mogelijk; voor het merg is uit de grafieken een gehalte van 150—170 mg C per 100 gram te berekenen.

Microtitratie van het duodenum.

Ook werden microtitraties uitgevoerd van het duodenum van caviae en muizen.

Glick en Biskind (69) gebruikten hun micromethode om bij het rund het C-gehalte van de kliertjes van Brunner te kunnen bepalen; zij vonden een ascorbinezuurgehalte, dat ongeveer gelijk was aan dat van de mucosa (20—24 mg per 100 gram).

Door de zeer dunne laag van Brunnersche kliertjes bij de cavia, gelukte het niet coupes te krijgen, waarin deze klieren overwegend voorkwamen. Wel bleek mij uit de curves, die ik bij de cavia maakte (waarbij op dezelfde wijze de verschillende lagen werden opgemeten en in grafieken werden verwerkt als ik dat bij de cavia beschreef), dat het C-gehalte van deze klierlaag zeker niet hoger was dan dat van de mucosa; voor deze laatste vond ik een gehalte van 20—25 mg C per 100 gram. Dit getal is, bij de cavia althans, natuurlijk sterk afhankelijk van de voedingstoestand, waarin het dier verkeerde.

Ook het duodenum van muizen op vitamine C-loos diët werd microchemisch onderzocht; de verkregen resultaten, vastgelegd in grafieken, bleken echter niet voldoende illustratief te zijn, om ze hier nu al weer te geven. De grootste moeilijkheid bij het boren van het weefselcilindertje uit het duodenum, bleek het volkomen vlak uitstrekken van den darmwand op het gelatineschijfje te zijn. Elke oneffenheid wreekt zich hier in dubbele mate, omdat daarmee de kans om uniform weefsel bij het snijden te treffen, miniem klein wordt. Dit is dan ook de reden, dat de verkregen resultaten nog niet voor publicatie geschikt zijn, al is het na verder perfectioneren van de techniek zeker mogelijk ook bij de muis fraaie resultaten te verkrijgen.

Samenvatting.

Wanneer we de verkregen resultaten uit dit hoofdstuk samenvatten, dan blijkt uit het onderzoek met de microchemische vitamine C-bepaling volgens Glick en Biskind, dat de mogelijkheden voor deze titratiemethode nog lang niet uitgeput zijn.

Ik heb hier willen aangeven, dat deze methode ook met vrucht toegepast kan worden op de organen van die dieren, welke zich door hun kleine afmetingen aan het macrochemisch onderzoek onttrekken.

De bestudeering van de vitamine C-verdeeling in de bijnier is mijns inziens voor de kliniek van de hormonale hypo- en hyperfunctie van de bijnier van zoo groot belang, dat een verdere bestudeering van deze ascorbinezuur-verdeeling door middel van de microtitratie aanbeveling verdient.

De hormoonproductie van de bijnierschors hangt immers ten nauwste samen met het ascorbinezuurgehalte, zooals vooral de onderzoekingen van Giroud (69, 70, 71, 72, 73, 74, 75) ons de laatste jaren geleerd hebben. Hier is verder onderzoek geboden, welk onderzoek naar mijn meening het best in samenwerking met den patholoog-anatoom kan geschieden.

SAMENVATTING

Na een inleiding in het eerste hoofdstuk over het vitamine C en zijn belangrijkste chemische en fysische eigenschappen, volgt in het volgende hoofdstuk het aantoonen van het ascorbinezuur, waarbij de chemische (dichloorphenol-indophenol-titratie) en de histochemische (AgNO_3) methoden uitgebreider worden behandeld.

Het derde hoofdstuk is gewijd aan de bestudeering van het verschijnsel, dat het eerst door Zilva en later door Jacobson beschreven is, n.l. het deponeren van het vitamine C in de epitheelcellen van het darmkanaal bij de cavia na subcutane injectie van ascorbinezuur. Getracht werd het vitamine C te localiseeren in den tijdsduur tusschen de injectie en het zichtbaar worden van het ascorbinezuur in de epitheelcellen, om zodoende een mogelijke gastro- of entero-enterale kringloop van het ascorbinezuur op het spoor te komen. De resultaten van dit onderzoek, dat voornamelijk bij muizen plaats vond, maken een zoodanigen kringloop onwaarschijnlijk. Deze proeven, waarbij de organen van de muizen op hun vitamine C-gehalte werden onderzocht tusschen $1\frac{1}{2}$ minuut en 3 uur na de injectie, leverde de volgende resultaten op:

- 1e. het subcutaan geïnjecteerde ascorbinezuur verschijnt bij de muis reeds na 20 minuten in het darmepitheel, terwijl de reactie na een half uur weer negatief is (bij de cavia valt het maximum van de reactie pas 1 uur na de injectie);
- 2e. ook lever en bijnieren van de muis ontvangen het ascorbinezuur eerder dan dit bij de cavia het geval is;
- 3e. de vitamine C-uitscheiding via de nier van het subcutaan geïnjecteerde ascorbinezuur is reeds na $1\frac{1}{2}$ minuut in vollen gang.

In de volgende hoofdstukken wordt het verband tusschen de koolhydraat-stofwisseling en het ascorbinezuur behandeld. Gewezen wordt op de tegenstrijdige mededeelingen in de literatuur aangaande een mogelijke vitamine C-synthese uit bepaalde suikers. De onderzoekingen van Hopkins, Slater en Millikan, die bij koolhydraat-loos dieet bij ratten een verlaging van het ascorbinezuurgehalte van de organen meenden te kunnen constateeren, kon ik bij de muis, zoowel chemisch als

histologisch door middel van de zilvernitraatmethode van Giroud bevestigden.

Steunend op deze gegevens en de resultaten, welke in hoofdstuk 6 gevonden werden, is het zeer waarschijnlijk gemaakt, dat het ascorbinezuur- en het glycogeengehalte van de lever van elkaar afhankelijk zijn: is de lever glycogeen-vrij, dan is geen korreling van het ascorbinezuur in de cellen te vinden; is daarentegen de levercel rijk aan glycogeen, dan treedt een duidelijke korreling in de cellen op, terwijl ook de kleuring van de endotheelcellen met het zilverreagens algemeen wordt.

In het vijfde hoofdstuk werd getracht ook bij de normaal gevoede cavia een dergelijk verband tusschen het ascorbinezuur- en het glycogeengehalte van de lever aan te toonen. De resultaten waren negatief; de inrichting van de proef was echter allerminst ideaal ten gevolge van de tijdsomstandigheden.

In hoofdstuk 6 werd de vraag gesteld: wordt het ascorbinezuur op dezelfde wijze in een glycogeen-rijke als in een glycogeen-arme lever opgeslagen? Het onderzoek werd verricht bij muizen, welke wederom koolhydraat-loos, en dieren, welke koolhydraat-rijk gevoed werden. Beide groepen kregen groote doses vitamine C toegediend, waarna de depôtfunctie van de lever nagegaan werd na 4 uur, 24 uur en 2 dagen. Met de reactie van Giroud werd ook hier een groot verschil gevonden tusschen de muizen uit de beide groepen, welke 4 uur na het inbrengen van het ascorbinezuur gedood werden:

„suikermuis”: veel glycogeen - sterke levercelkorreling;

„eiwitmuis”: weinig glycogeen - practisch geen levercelkorreling; sterke korreling van de Von Kupffercellen.

Door dit onderzoek is waarschijnlijk gemaakt, dat de depôtfunctie van de levercel afhankelijk is van het glycogeengehalte van die cel; het lijkt mij waarschijnlijk, dat het deponeren en het vastleggen van het ascorbinezuur slechts mogelijk is, wanneer het glycogeengehalte van de cel een bepaalde waarde heeft overschreden.

Tevens werd gevonden, dat, wanneer het glycogeengehalte laag is, zelfs een abnormaal groote dosis ascorbinezuur nog niet wordt opgeslagen in de levercellen, maar dat de cellen van Von Kupffer dan het overtollige ascorbinezuur opnemen, d. w. z. die hoeveelheid, die niet meer opgeslagen kan worden in de endotheelcellen van de lever.

Omgekeerd lukt het bij een glycogeen-rijke lever niet om door toediening van abnormaal groote hoeveelheden vitamine C een korreling (dus een opslag) van het vitamine C in de cellen van Von Kupffer te verkrijgen.

In hoofdstuk 7 wordt een beschouwing gegeven over het varieerend gehalte aan ascorbinezuur van verschillende levergedeelten bij hetzelfde dier. Bij caviae kwamen verschillen voor van 15—20 %; bij 7 muizen bleek het ascorbinezuurgehalte van een leverkwab 25—30 % boven dat van een ander deel van gelijke grootte te liggen. Ook was het mogelijk, dank zij de microtitratie, opmerkelijke verschillen in het vitamine C-gehalte van coupes aan te toonen, welke slechts enkele honderden μ uiteen lagen.

Ook werd de aandacht gevestigd op de noodzakelijkheid bij dierproeven over het vitamine C, speciaal op de cavia, steeds aan te geven in welke periode van het jaar de proeven gedaan werden en waaruit een eventueele „normale” voeding bestond.

Hoofdstuk 8 is geheel gewijd aan de microchemische vitamine C-bepaling volgens Glick en Biskind. Dank zij deze methode was het mogelijk curven te verkrijgen, welke de verdeling van het ascorbinezuur in de bijnieren van caviae en katten duidelijk illustreeren. Bij de cavia stemmen de gevonden resultaten overeen met de gegevens, welke Glick en Biskind bij de titratie van runderbijnieren verkregen (het meeste vitamine C komt voor in de zona fasciculata vlak onder de zona glomerulosa); bij de kat bleek het vitamine C geheel anders over de verschillende bijnierlagen verdeeld te zijn; hier vinden we het meeste vitamine C terug in het merg en de zona reticularis van de schors.

Verbeteringen in de techniek werden aangegeven, welke vooral betrekking hebben op het snijden van het ongefixeerde weefselcylindertje op het vriesmicrotoom van Schulz Brauns en de betere histologische contrôle van de getitreerde coupes.

Tenslotte wordt een verdere bestudeering van de vitamine C-verdeling in de bijnier van den mensch wenschelijk geacht met het oog op het groote belang voor de kliniek van de hormonale dysfunctie van dit orgaan. Dit verder onderzoek kan, volgens den schrijver, het best in samenwerking met den patholoog-anatoom geschieden.

RESUME

Après une introduction, au chapitre Ier, traitant de la vitamine C et de ses propriétés physiques et chimiques les plus importantes, l'auteur s'occupe, au chapitre suivant, des procédés utilisés pour démontrer la présence de l'acide ascorbique. Il discute, d'une façon plus détaillée, les méthodes chimiques (titrage au dichlorophénolindophénol) et histochimiques (méthode de Giroud).

La troisième chapitre est consacré à l'étude du phénomène décrit d'abord par Zilva, ensuite par Jacobson, c.-à.-d. le dépôt de la vitamine C dans les cellules épithéliales de l'intestin des cobayes après l'introduction parentérale de l'acide ascorbique. Il a essayé de localiser la vitamine C dans l'espace de temps s'écoulant entre l'injection et l'apparition de l'acide ascorbique dans les cellules épithéliales du tube digestif; et cela dans le but de démontrer éventuellement une circulation gastro-entérale ou entéro-entérale de l'acide ascorbique. Les résultats de ces recherches, faites surtout sur des souris, rendent peu probable un pareil mouvement circulaire. Ces expériences, dans les quelles les organes des souris étaient examinés sur leur teneur en vitamine C entre une minute et demie et quatre heures après l'injection ont abouti aux résultats suivants:

1. l'acide ascorbique introduit par injection sous-cutanée apparaît dans l'épithélium intestinal de la souris après 20 minutes déjà, la réaction redevient négative après une demi-heure. (Par contre, la réaction maxima ne se produit chez le cobaye qu'une heure après l'injection.)
2. chez la souris, la vitamine C apparaît également plus tôt dans le foie et les surrénales que chez le cobaye;
3. l'excrétion par le rein de l'acide ascorbique injecté sous la peau est déjà en pleine activité $1\frac{1}{2}$ minutes après l'injection.

Dans les chapitres suivants l'auteur étudie les rapports entre le métabolisme glucidique et l'acide ascorbique. Il appelle l'attention sur le fait qu'on trouve dans la littérature sur le sujet des communications contradictoires relativement à la question de savoir si la synthèse de la vitamine C peut provenir

de certains sucres. Les recherches de MM. Hopkins, Slater et Millikan qui, en éliminant de la nourriture les sucres, ont cru constater chez des rats une diminution de la teneur en acide ascorbique dans les organes, ont été confirmées tant chimiquement qu'histologiquement par celles de l'auteur faites, selon la méthode de M. Giroud au nitrate d'argent, sur des souris.

Se basant sur ces faits et les résultats trouvés au chapitre 6 l'auteur a rendu très probable que la teneur du foie en acide ascorbique et celle en glycogène sont solidaires l'une de l'autre, c.-à.-d. si le foie est dépourvu de glycogène la réaction au nitrate d'argent acide ne montre pas de granulation argentique dans les cellules hépatiques; si au contraire, le foie est riche en glycogène on constate une granulation argentique très nette dans les cellules; en outre on voit une coloration générale au niveau des cellules endothéliales du foie.

Au cinquième chapitre l'auteur a essayé d'établir, chez des cobayes nourris normalement, un pareil rapport entre la teneur du foie en acide ascorbique et en glycogène. Les résultats ont été négatifs, l'aménagement de l'expérimentation était pourtant loin d'être idéal par suite des circonstances actuelles.

Au chapitre 6 la question se pose de savoir si l'acide ascorbique est déposé de même façon dans un foie riche en glycogène que lorsqu'il est pauvre en glycogène. Les recherches ont été faites sur des souris soumises à un régime alimentaire dépourvu de glucides et sur des animaux nourris abondamment de glucides („souris à l'albumine”; „souris au glucide”). On a administré aux deux groupes de grandes quantités d'acide ascorbique, après quoi on a examiné les fonctions de dépôt du foie après 4 heures, après 24 heures et après 2 jours. Au moyen de la réaction de Giroud on a trouvé, ici encore, une différence nette entre les souris des deux groupes tuées 4 heures après l'administration de la vitamine C, savoir:

- „souris au glucide”: beaucoup de glycogène - forte granulation argentique dans les cellules hépatiques;
- „souris à l'albumine”: peu de glycogène - pas ou presque pas de granules d'argent dans les cellules du foie; forte granulation argentique dans les cellules de Von Kupffer.

Ces investigations ont rendu très probable que la fonction de dépôt de la cellule hépatique dépend de la teneur en glycogène de cette cellule; l'auteur est porté à croire que le foie ne peut déposer et retenir l'acide ascorbique, que lorsque la teneur en glycogène de la cellule hépatique a dépassé une certaine valeur.

L'auteur a trouvé également que, lorsque la teneur en glycogène est basse, même une dose anormalement grande d'acide ascorbique n'est pas déposée dans les cellules du foie, mais que dans ce cas les cellules de Von Kupffer s'assimilent l'acide ascorbique superflu, c.-à.-d. la quantité qui ne peut plus être déposée dans les cellules endothéliales du foie.

En revanche, s'il s'agit d'un foie riche en glycogène, on ne réussit pas, en administrant des quantités anormalement grandes de vitamine C, à obtenir une granulation (c.-à.-d. un dépôt) de la vitamine C dans les cellules de Von Kupffer.

Au chapitre 7 l'auteur examine les variations de la teneur en acide ascorbique des différentes parties du foie chez le même animal. Chez les cobayes se rencontrent des différences de 15—20 %; chez 7 souris la teneur en acide ascorbique d'un lobe du foie se trouvait être plus élevée de 25—30 % que celle d'une autre partie d'une grandeur égale. Il était aussi possible de démontrer, grâce à la méthode de microdosage, des différences notables dans la teneur en vitamine C de tranches qui n'était séparées les unes des autres que de quelques centaines de μ .

L'auteur appelle aussi l'attention sur la nécessité, dans les expériences faites sur la vitamine C chez des animaux, et plus spécialement chez des cobayes, d'indiquer toujours dans quelle période de l'année les expériences ont été faites et de quoi se composait la nourriture „normale”.

Le chapitre 8 est consacré entièrement à la méthode de microdosage de la vitamine C selon MM. Glick et Biskind. Grâce à cette méthode il a été possible d'obtenir des courbes de titrage illustrant clairement la répartition de l'acide ascorbique dans les surrénales de cobayes et de chats. Chez le cobaye, les résultats obtenus correspondent aux faits trouvés par MM. Glick et Biskind dans leurs travaux sur le dosage des surrénales chez le boeuf: la plus grande partie de la vitamine C se trouve dans la zone fasciculée immédiatement audessous de la zone glomérulée; chez le chat, la vitamine C se trouve répartie tout

autrement sur les différentes couches de la surrénale; nous trouvons ici la plus grande partie de la vitamine C dans le médullaire et la zone réticulaire du cortex.

Des perfectionnements dans la technique ont été indiqués, particulièrement en ce qui concerne la méthode de découper le cylindre de l'organe congelé non fixé sur le microtome de Schulz Brauns et le contrôle histologique des coupes titrées.

A la fin l'auteur juge désirable d'étudier de plus près la répartition de la vitamine C dans la surrénale humaine et cela en vue de l'intérêt capital, pour la clinique, de la dysfonction hormonale de cet organe. Selon l'auteur cette recherche ultérieure se fera le mieux en collaboration avec des recherches d'anatomie pathologique.

LITERATUUR

1. FINK, W. Zeitschr. Mikr. Anat. Forsch. 50, 558 (1941).
2. MOLL, TH. Dtsch. med. Wschr. 1197 (1934).
3. SZENT-GYÖRGYI, A. Biochem. J. 22, 1387 (1928).
4. BOURNE, G. Austr. J. Exper. Biol. Med. Sc. 11, 261 (1933).
5. GIROUD, A. Protoplasma Monographien 16 B (1938).
6. TONUTTI, E. Protoplasma B. 31, 951 (1938).
7. HARRIS, L. J. en S. N. RAY. Biochem. J. 27, 2006 (1933).
8. BOURNE, G. Nature 131, 874 (1933).
9. HUSZAK, ST. Z. physiol. Chem. 222, 229 (1933).
10. GIROUD, A., R. RATSIMAMANGA, M. RABINOWICZ en E. HARTMANN. C. R. Soc. Biol. 121, 739 (1936).
11. MOURIQUAND, G. en P. VIENNOIS. C. R. Soc. Biol. 125, 289 (1937).
12. PETERS, G. en H. MARTIN. J. Biol. Chem. 124, 249 (1938).
13. YAVORSKY, M., PH. ALMADEN en C. G. KING. J. Biol. Chem. 106, 525 (1934).
14. GLICK, D. en G. R. BISKIND. J. Biol. Chem. 110, 1 (1935).
15. JÄRVI, O. Protoplasma 34, 362 (1940).
16. HIRSCH, G. C. Protoplasma 34, 377 (1940).
17. PFUHL, W. Zeitschr. Mikr. Anat. Forsch. 50, 299 (1941).
18. EEKELEN, M. VAN. Acad. Proefschr. Utrecht (1936).
19. BOURNE, G. Austr. J. Exper. Biol. Med. Sc. 13, 239 (1935).
20. RATSIMAMANGA, R. C. R. Soc. Biol. 131, 863 (1939).
21. HARDE, E. en J. WOLFF. C. R. Soc. Biol. 116, 288 (1934).
22. GIROUD, A., C. P. LEBLOND, R. RATSIMAMANGA en M. RABINOWICZ. Protoplasma 25, 115 (1936).
23. VAN DER WALLE, N. Acad. Proefschr. (1922).
24. SPRUYT, J. P. en W. F. DONATH. Gen. Tijdschr. Ned. Ind. 74 (1934).
25. GIROUD, A., C. P. LEBLOND en S. GALELOVITCH. C. R. Ass. Anat. 29, 277 (1934).
26. GIROUD, A. en C. P. LEBLOND. Bull. d'Histol. 11, 365 (1934).
27. MOURIQUAND, G., L. WEILL en F. SIMON. C. R. Soc. Biol. 116, 543 (1935).
28. MOURIQUAND, G. en A. COEUR. C. R. Soc. Biol. 118, 566 (1935).
29. MOURIQUAND, G. en A. COEUR. C. R. Soc. Biol. 120, 1007 (1935).
30. RANDOIN, L. en A. MICHAUX. C. R. Acad. Sc. 181, 1179 (1925).
31. WOLFF, L. K. Sweiz. Med. Wschr. 41, 979 (1936).
32. LOPEZ-LOMBA, M. en L. RANDOIN. C. R. Acad. Sc. 176, 1003 (1923).

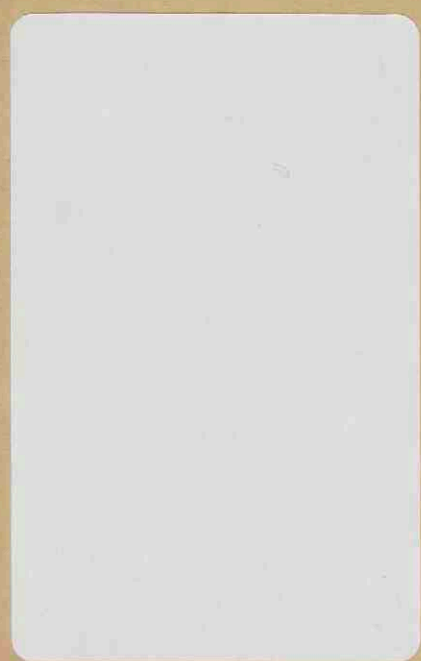
33. ZILVA, S. S. *Biochem. J.* 29, 100 (1935).
34. JACOBSON, E. *C. R. Soc. Biol.* 118, 924 (1935).
35. GIROUD, A., C. P. LEBLOND, M. DEMAY en M. GIROUD.
C. R. Ass. Anat. 29, 281 (1934).
36. GIROUD, A. en C. P. LEBLOND. *Anat. Rec.* 68, 113 (1937).
37. GIROUD, A., C. P. LEBLOND en J. MARQUEZ. *C. R. Ass. Anat.* 29,
291 (1934).
38. WESTERGAARD, W. *Biochem. J.* 28, 1212 (1934).
39. BOURNE, G. *Anat. Rec.* 66, 369 (1936).
40. DE LUDANY. *Pflügers Arch.* 241, 263 (1938).
41. GIROUD, A. en N. SANTA. *C. R. Soc. Biol.* 130, 1427 (1939).
42. LEBLOND, C. P. *C. R. Soc. Biol.* 127, 208 (1938).
43. VETTER, J. *Zeitschr. Mikr. Anat. Forsch.* 45, 255 (1939).
44. MOURIQUAND, G. *C. R. Soc. Biol.* 92, 271 (1925).
45. ALTENBURGER, E. *Klin. Wschr.* 15, 1129 (1936).
46. DUFFAU, R. *C. R. Soc. Biol.* 125, 436 (1937).
47. RATSIMAMANGA, R. *C. R. Soc. Biol.* 126, 1134 (1937).
48. ACERAD, E. *C. R. Soc. Biol.* 130, 528 (1939).
49. GUHA, B. C. en GHOSH. *Nature* 134, 739 (1934); 135, 234; 871
(1935); 138, 844 (1936).
50. VON EULER, H. *Biochem. Zeitschr.* 282, 399 (1935).
51. HAWTHORNE, J. R. en HARRISON. *Biochem. J.* 31, 1061 (1937).
52. HOPKINS, F. G., B. R. SLATER en G. A. MILLIKAN. *Biochem. J.*
29, 2803 (1935).
53. ZILVA, S. S. *Biochem. J.* 30, 857 (1936).
54. MENTZER, CH. en G. URBAIN. *C. R. Soc. Biol.* 128, 270 (1938).
55. RANDOIN, L., A. GIROUD en C. P. LEBLOND. *C. R. Soc. Biol.*
120, 1082 (1935).
56. MUSULIN, R. R. en R. H. TULLY. *J. Biol. Chem.* 129, 437 (1939).
57. LONGENECKER, H. E. en R. R. MUSULIN. *J. Biol. Chem.* 129,
445 (1939).
58. GOOD, KRAMER en SOMOGYI. *J. Biol. Chem.* 100, 485 (1933).
59. SCHOORL, N. *Chem. Weekbl.* 26, 130 (1930).
60. WHEELER, R. *J. Exp. Zool.* 15, 209 (1913).
61. BOURNE, G. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.* 13, 113 (1935).
62. WOLF-HEIDEGGER, G. *Zschr. Mikr. Anat. Forsch.* 50, 623 (1941).
63. GLICK, D. *J. Biol. Chem.* 109, 433 (1935).
64. GLICK, D. *J. Chem. Education*, p. 253 (1935).
65. LINDERSTRÖM-LANG, K. en H. HOLTER. *C. R. trav. lab. Carls-
berg* 19, No. 4 (1931).
66. BIRCH, T. W., L. J. HARRIS en S. N. RAY. *Biochem. J.* 27, 590
(1933).

67. GLICK, D. en G. R. BISKIND. J. Biol. Chem. 115, 551 (1936).
68. SCHULZ BRAUNS, O. Zentralbl. Pathol. 54, 225 (1932).
69. GIROUD, A. en N. SANTA. C. R. Soc. Biol. 131, 1176 (1939).
70. GIROUD, A. en N. SANTA. C. R. Soc. Biol. 133, 420 (1940).
71. GIROUD, A., N. SANTA en M. MARTINET. C. R. Soc. Biol. 134, 23 (1940).
72. GIROUD, A. en N. SANTA. C. R. Soc. Biol. 134, 100 (1940).
73. GIROUD, A., M. MARTINET en BELLON. C. R. Soc. Biol. 134, 441 (1940).
74. GIROUD, A., M. MARTINET en BELLON. C. R. Soc. Biol. 135, 514 (1941).
75. GIROUD, A., R. RATSIMAMANGA en H. CHAPOLIN. C. R. Soc. Biol. 135, 839 (1941).
76. GIROUD, A. en M. MARTINET. C. R. Soc. Biol. 135, 1344 (1941).
77. GLICK, D. en G. R. BISKIND. J. Biol. Chem. 110, 583 (1935).
78. GLICK, D. en G. R. BISKIND. J. Biol. Chem. 114, 1 (1936).
79. GLICK, D. en G. R. BISKIND. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 34, 866 (1936).
80. GLICK, D. en G. R. BISKIND. Arch. Ophthalm. 16, 990 (1936).
81. STÖGER, R. Wiener Klin. Wschr. 54, 271 (1941).

STELLINGEN

1. Het is van belang, in zoo fijn mogelijke localisatie het gehalte aan vitamine C en aan verschillende hormonen vast te stellen, ten einde aldus inzicht te krijgen in de rol, welke het vitamine C eventueel bij het ontstaan van deze hormonen speelt.
2. De opvatting van Leblond, dat synthese van het vitamine C *niet* in de hypophyse plaats vindt, is onvoldoende gefundeerd.
C. R. Soc. Biol. 133, 71 (1940)
3. De interpretatie van de sulfonamide-intoxicatie als een locale hypovitaminosis C is niet volledig.
C. R. Soc. Biol. 130, 846 (1939)
4. Het onderzoek der vitamine-stofwisseling van patienten met het syndroom van Sjögren kan met vrucht worden toegepast ter opheldering van de aetiologie van deze afwijking.
5. Het is onwaarschijnlijk, dat de bacil van Bergen het aetiologisch agens is van de colitis ulcerosa.
6. Onder normale anatomische omstandigheden bestaat de mogelijkheid van verlies van liquor cerebrospinalis langs het neusslijmvlies.
7. De modificatie van de methode van Marchi, aanbevolen door Swank en Davenport, biedt den patholoog-anatoom voordeelen.
Stain Technology 9, 11, 129 (1934)
10, 45, 87 (1935)
8. De voorstelling van Leiner, dat de koolzuuranhydrase in de retina de hydratatie van CO₂ zou bevorderen, is waarschijnlijk onjuist.
9. Het is gewenscht, dat in de leerboeken der ophthalmologie een plaats wordt ingeruimd voor de endogene factoren, van invloed op het ontstaan van het pterygium.
10. Het onderwijs aan den toekomstigen medicus worde van den aanvang af op de medische vorming ingesteld, volgens richtlijnen aan te geven door de *Medische* faculteit.

Praeadvies N. M. t. b. d. G. 1937



U
1