

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION HOORN.

Is fibrine een physiologisch melkbestanddeel?

DOOR

E. HEKMA.

(Ingezonden 8 December 1922).

I.

Door BABCOCK¹⁾ en vervolgens door DOANE²⁾ is de meening uitgesproken, dat fibrine niet alleen zou voorkomen in de melk van uierzieke koeien, maar ook in normale melk. DOANE kwam tot dit besluit op grond van de waarneming, dat in het centrifugaal sediment en den room van normale melk draadjes werden aangetroffen bij kleuring met gecarboliseerde haematoxyline van DELAFIELD en eosine, welke draadjes door hem blijkbaar als fibrinedraadjes zijn geduid. Dit mag ongetwijfeld eenigszins gewaagd genoemd worden, omdat het vinden van draadjes na de genoemde bewerking niet zonder meer het recht geeft tot de gevolgtrekking dat men daarbij met fibrine te doen moet hebben. Dat geldt vooral voor het centrifugaal sediment. Dit sediment bestaat immers (afgezien van fibrine en behoudens een aantal gevormde elementen, enkele vetbolletjes en verontreinigingen) in hoofdzaak uit vaste kaasstofdeeltjes, resp. melkplaatjes. Deze kunnen reeds enkel door het proces der centrifugeering rijen vormen, waardoor vormsels ontstaan die, na fixeering en kleuring, zich als draadjes kunnen voordoen en zoodoende tot verwisseling met fibrine draadjes aanleiding geven³⁾. Door toepassing van de fibrinekleuringsmethode volgens WEIGERT kan men zich voor verwisselingen in dezen behoeden, ofschoon ook dan nog achtzaamheid is geboden. Bij overblijvende twijfel kan het microscopisch onderzoek van het versche materiaal in het donkere veld, met behulp van den paraboloidcondensor van SIEDENTOPF, soms goede diensten bewijzen.

¹⁾ S. M. BABCOCK. Fibrin in milk. Report Americ. Exp. Stat. of Wisconsin 1889.

²⁾ C. F. DOANE. Leukocytes in milk and their significance. The Maryland agric. Exper. Station. 102, 205 (1905).

³⁾ Verslagen Landbouwkundige Onderzoekingen XXVII, 13; 75, (1922).

2082389

Dat in de melk van uierzieke koeien fibrine wordt aangetroffen is niet vreemd, omdat deze eiwitstof altijd aanwezig is in exudaten en trouwens ook in transudaten. De fibrine behoort blijkbaar tot die bloed- en lymfheeiwitstoffen, die de vaatwand en andere dierlijke membranen gemakkelijk vermogen te passeeren en steeds passeeren, wanneer bloed- of lymphevloeistof in andere lichaams-holten overtreedt, hetzij als bestanddeel van een exudaat of wel als transudaat. Daartegen pleit niet dat men punctievloeistoffen van transudaten meermalen fibrinevrij vindt, in dier voege dat zulke punctievloeistoffen feitelijk als bloed- of lympheserum (bloed-serum = bloedplasma minus fibrine; lympheserum = lympheplasma minus fibrine) kunnen worden beschouwd, afgezien van daarin eventueel aanwezige pathologische bestanddeelen. In zulke gevallen pleegt men wel eens van sereuse transudaten te spreken, evenwel, naar het mij toeschijnt, ten onrechte. Voor zoover mijne ervaring in deze reikt, is in die gevallen, waarin men een zuiver sereuse punctievloeistof ontledigt, de fibrine uit het getransudeerde bloed- of lympheplasma reeds in de betreffende lichaamsholte tot uitscheiding gekomen. Dit geldt, naar het mij voorkomt, niet alleen voor pleura-, peritoneaal-, pericardiaal- en hydrocèlevocht en dergelijke, maar dit geldt vooral ook van de subcutane stuwingshydrops: de hydrops anasarka of huidwaterzucht. Juist in het laatstgenoemde geval vindt men bij punctie meermalen een zuiver sereus vocht, zoodat men gemakkelijk tot de meening zou kunnen komen met een sereus transudaat te doen te hebben. Snijdt men echter de huid tot in het subcutane weefsel in, dan treft men aldaar veelal uitgebreide, geleijachtig uitzierende coagula aan, die bij microscopisch onderzoek blijken te bestaan uit een met serum doortrokken fibrinedradenweefsel, terwijl deze coagula dienovereenkomstig dan ook, na flink uitwasschen in water, in een witte vezelmasse overgaan. In dit subcutane transudaat is dus in zoo'n geval de fibrine totaal tot uitscheiding gekomen; het fibrinedradenweefsel houdt daarbij het serum geïmbibeerd, zoodat de daardoor gevormde coagula een eigenaardig soort oedem vormen, waaruit het serum door vingerdruk op de huid plaatselijk kan worden weggedrukt, waarbij zelfs eenigen tijd een kuiltje in de huid kan blijven staan; bij punctie vloeit het serum niet in een straal, maar druppelsgewijs weg, omdat het serum, zooals gezegd, door het fibrinedradenweefsel wordt geïmbibeerd gehouden. In die gevallen, waarin men in transudaten slechts weinig fibrine aantreft (minder dan in bloed- of lympheplasma) is in de betreffende lichaamsholte ongetwijfeld een deel van het plasmafibrine tot uitscheiding gekomen. Naar analogie van deze gegevens moest vooropgezet worden, dat, wanneer bloed- of lympheplasma in de melk zou overgaan, de fibrine in de melk in beginsel zoowel in den opgelosten als in den uitgescheiden toestand zou kunnen worden aangetroffen; tenzij de fibrine in de melk door bijzondere omstandigheden in totaal tot uitscheiding zou komen, evenals dit, zooals reeds werd opgemerkt, bij sommige

gevallen van den overgang van bloed- of lymphplasma in het onderhuidsche weefsel het geval is.

De vraag nu of fibrine onder normale omstandigheden in de melk overgaat, of derhalve deze eiwitstof als een physiologisch melkbestanddeel behoort te worden beschouwd, moet ongetwijfeld om verschillende redenen van beteekenis worden geacht.

Gesteld dat de fibrine normaal niet in de melk zou voorkomen, dan zouden wij over een diagnosticum te meer beschikken om abnormale melk van werkelijke normale te kunnen onderscheiden, althans voor zoover die abnormaliteit gepaard gaat met het optreden van fibrine in de melk. Wanneer anderzijds de fibrine als een physiologisch melkbestanddeel zou moeten worden beschouwd, dan zou dit om meer dan één reden van belang zijn. In de eerste plaats uit een zuiver physiologisch oogpunt, meer bepaald met het oog op den aard van het melksecretieproces. Want dan zou daaruit volgen dat de fibrine bij de melksecretie, zonder eerst in de alveolairecellen der melkklier tot een specifiek melkbestanddeel te worden verwerkt, onmiddellijk uit bloed of lymfhe in de melk zou kunnen overgaan, wat tot nu toe, voor zoover mij bekend, nog van geen enkel physiologisch, organisch bestanddeel van de melk is vastgesteld geworden. In de tweede plaats scheen de vraag omtrent het eventueel voorkomen van fibrine in normale melk belangwekkend met het oog op den aard van het lebstreamingsproces. In den loop van een onderzoek omtrent de ontwikkeling en microstructuur van melkstolsels, waren, zooals in een vorige mededeeling ¹⁾ is vermeld geworden, ervaringen opgedaan, die de vraag deden rijzen of de fibrine een rol zou kunnen spelen bij het melkstreamingsproces, en het waren trouwens de hier bedoelde ervaringen die aanleiding gaven tot een onderzoek omtrent de vraag of fibrine als een physiologisch melkbestanddeel zou moeten worden beschouwd, ja dan neen. Omtrent bedoelde waarnemingen zij hier het volgende opgemerkt.

In de melk komen, naar bekend is, behalve vetbolletjes, een onnoemelijk aantal uiterst fijne gesuspendeerde deeltjes voor, deels mikronen, deels submikronen ²⁾. Men pleegt deze deeltjes als kaasstofdeeltjes te beschouwen; KREIDL en NEUMANN ³⁾ hebben ze lactokonien genoemd; mij kwam de Nederlandsche naam „melkplaatjes” voor deze deeltjes niet onpassend voor.

Deze kaasstofdeeltjes, lactokonien, melkplaatjes, of hoe men ze wil noemen, nemen, zooals in een vorige mededeeling is uit-

¹⁾ Verslagen landbouwkundige onderzoekingen l.c.

²⁾ Dit geldt van de koemelk; in vrouwenmelk zijn deze deeltjes, naar mij is gebleken, in veel geringer aantal aanwezig, en zijn zij bovendien fijner; wij hebben hier blijkbaar met een der essentieele verschillen tusschen vrouwen- en koemelk te doen.

³⁾ Ultramikroskopische Beobachtungen über das Verhalten der Kaseinsuspension in der frischen Milch und bei der Gerinnung *Pflügers Archiv* 123, 593 (1908).

Gekorrelde draadjes uit ondermelk, die verdund is met een $1\frac{9}{100}$ CaI_2 oplossing, en waarop vervolgens stremsel ($1\frac{1}{10}$) heeft ingewerkt bij 37°C .

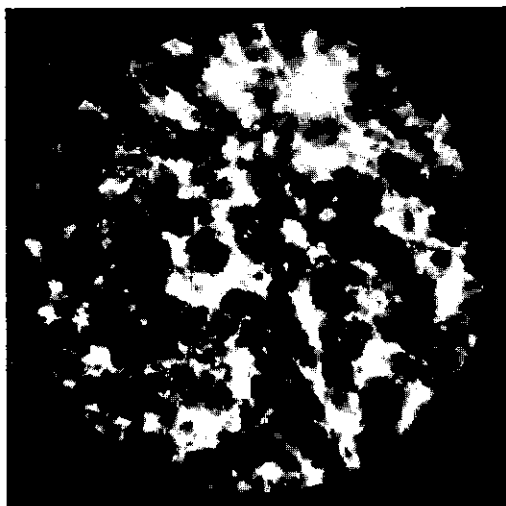


Fig. 1a.

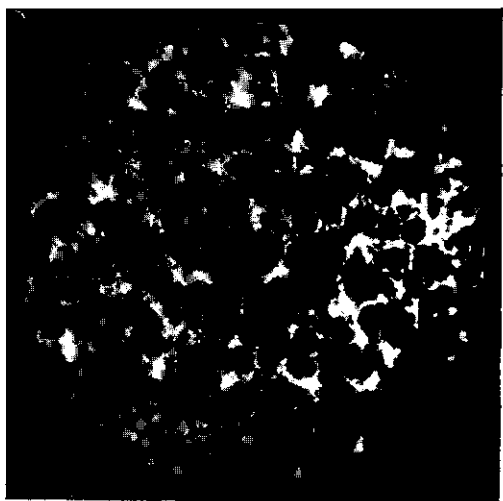


Fig. 1b.

Gekorrelde draadjes verkregen door azijnzuur toe te voegen aan met water verdunde ondermelk.

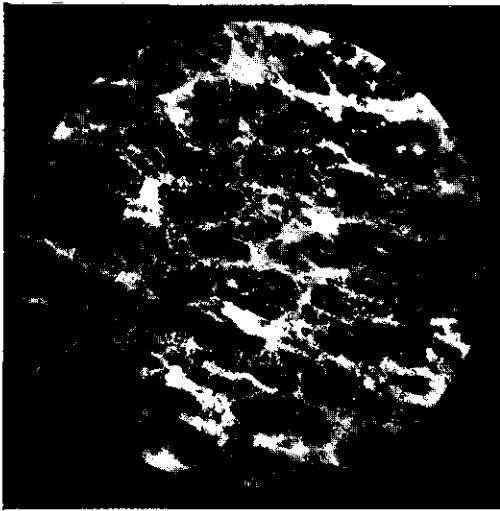


Fig. IIa.



Fig. IIb.

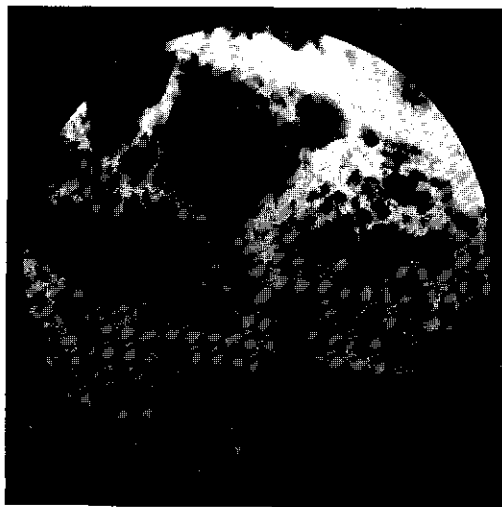


Fig. IIc.

WEIGERT positief uitviel, op zich zelf ook vóór een fibrinenatuur der draadjes te pleiten. Als men hier nu inderdaad met fibrinedraadjes te doen zou hebben, dan zou het melkstrommingsproces in een geheel nieuw licht verschijnen; men zou dan moeten aannemen dat in de melk fibrine in belangrijke hoeveelheid aanwezig moest zijn en wel in den opgelosten, den optisch leegen soletostand, uit welken toestand het dan onder den invloed van leb en zuur in den dradentostand zou worden uitgescheiden, tenzij de fibrine onder leb- en zuurinvloed uit het een of andere melkbestanddeel zou kunnen ontstaan om vervolgens in draden-vorm tot uitscheiding te komen. De mogelijkheid dat eventueel in melk in den opgelosten, resp. optisch leegen soletostand aanwezige fibrine, onder den invloed van zuur en leb tot uitscheiding zou kunnen worden gebracht, scheen niet zoo geheel en al onaannemelijk. Want, wat zuur betreft, is bekend, dat de fibrine ook uit bloedplasma door zwak zuur, bijv. azijnzuur, tot uitscheiding kan worden gebracht en dat hetzelfde het geval is met kunstmatige fibrinealkalihydrosolen, niet echter met fibrinezuurhydrosolen. Dan echter zou de fibrine in de melk moeten voorkomen in den alkalihydrosoletostand, derhalve in een onder den invloed van alkali opgelosten toestand. Daarbij, zoo werd gedacht, zouden de citroenzure zouten van de melk wellicht een begunstigende werking op de solvatie kunnen uitoefenen, terwijl zelfs mogelijk-kerwijze de fibrine enkel onder den invloed van citraten als dispersiemiddel in den opgelosten toestand in de melk aanwezig zou kunnen zijn. Aan het laatste werd vooral daarom gedacht, omdat het zeer de vraag scheen, of in de melk OH-ionen zouden beschikbaar zijn om de fibrine in den alkalihydrosoletostand te houden. En wat de leb aangaat, ook van een eventuele fibrine-uitscheidende werking van dit agens zou men zich met eenigen goeden wil wel een voorstelling kunnen vormen. Want naar bekend is, wordt aan extracten van velerlei organen het vermogen toegeschreven om de fibrinestolling te kunnen bewerkstelligen en waarom zou dan een extract van den maagwand, wat het stremsel immers is, of een daaruit bereid zuiverder preparaat, dit vermogen niet bezitten. Er was overigens te meer reden om juist in dit verband aan de mogelijkheid van de uitscheiding van fibrine uit de melk onder lebinvloed resp. weefselextracten te denken, omdat niet alleen ook aan extracten van de pancreasklier lebwering wordt toegeschreven, maar tevens aan extracten van verschillende andere organen ¹⁾.

Met deze en dergelijke gegevens voor oogen scheen het derhalve nog niet zoo vreemd, dat het melkstrommingsproces tot een fibrinestollingsproces zou kunnen teruggebracht, in dier voege dat aan de vorming van het melkleb- en zuurstolsel een onder den invloed van leb- resp. zwak zuur, uit den opgelosten toestand tot uitscheiding komend fibrinedradenweefsel ten grondslag zou

1) HAMMARSTEN—HEDIN Lehrbuch der Physiologischen Chemie 1922.

Draden weefsel, verkregen bij de bewerking volgens de fibrine kleuringsmethode van WEGERT, van microscopische preparaten die waren vervaardigd van met een $1 \frac{0}{100}$ CaI_2 oplossing verdunde ondermelk, waarop men stremsel liet inwerken.

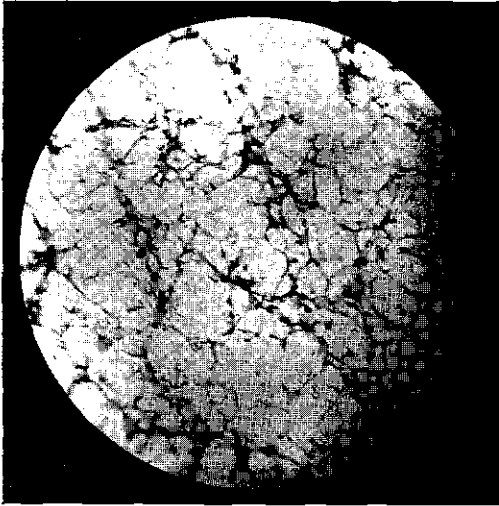


Fig. IIIa.

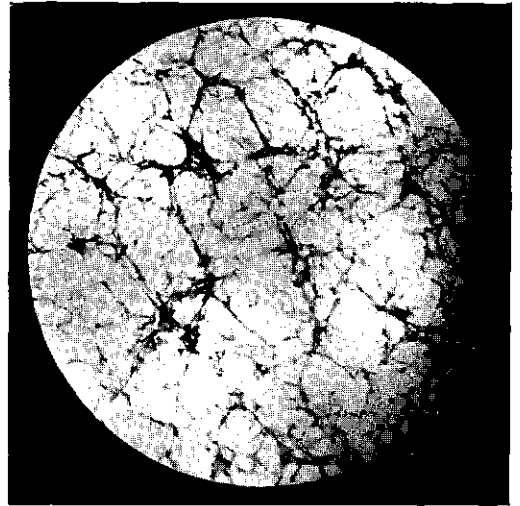


Fig. IIIb.

Draden weefsel dat als volgt werd verkregen. Van een 14 dagen oude kaas werd een gedeelte opgelost in kalkwater, terwijl aan deze oplossing zuur werd toegevoegd.



Fig. IVa.

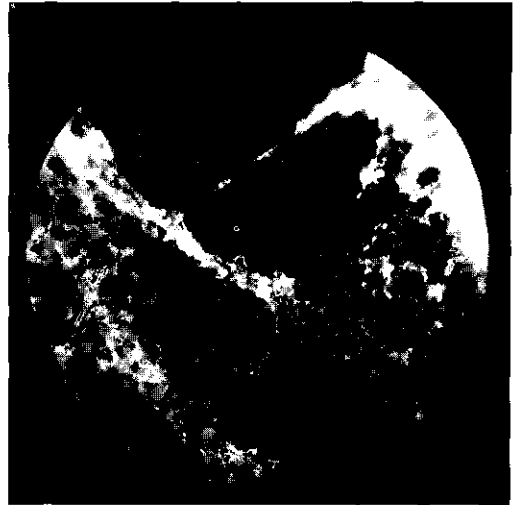


Fig. IVb.

Draden weefsel dat als volgt werd verkregen. Van een één jaar oude kaas werd een gedeelte opgelost in kalkwater, terwijl aan deze oplossing zuur werd toegevoegd.



Fig. Va.



Fig. Vb.

Draden weefsel dat als volgt werd verkregen. Van een twee jaar oude kaas werd een gedeelte in kalkwater opgelost, terwijl aan deze oplossing zuur werd toegevoegd.

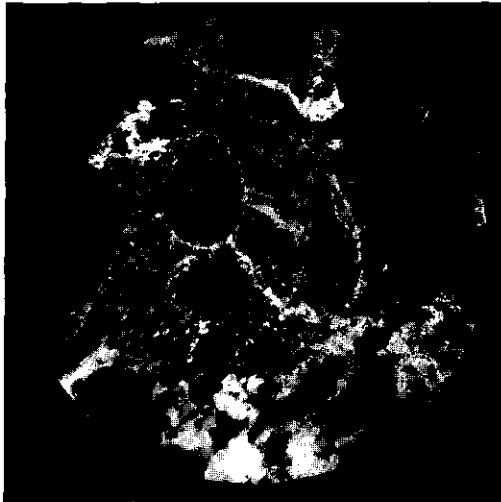


Fig. VI

werk aangaat, en dat dit zelfs dan het geval was wanneer het proces van sole-engeïlvorming in zulke oplossingen meermalen werd herhaald. Daar bij deze proefnemingen feitelijk een schrede werd werd gedaan op den weg die door HAMMARSTEN is aangewezen, en die ook aan de scheikundige afdeling van het Rijkslandbouwproefstation te Hoorn pleegt gevolgd te worden, ter bereiding van zuivere caseïne, lag het uitteraard voor de hand om te onderzoeken hoe zuivere caseïne zich in dit opzicht zou gedragen. Als materiaal voor dat onderzoek werd zoowel van KAHLBAUM betrokken caseïne volgens HAMMARSTEN gebruikt, als caseïne die door de chemische afdeling voornoemd, welwillend ter mijner beschikking was gesteld. Wanneer zuivere caseïne in zwak loog werd opgelost, terwijl vervolgens zuur werd toegevoegd dan werden volkomen analoge verschijnselen als bovengenoemd waargenomen: de vorming van met amorphedeeltjes bezette uiterst teere draadjes (fig. VIIa en b). En wanneer zuivere caseïne in kalkwater werd opgelost, vervolgens zooveel eenen 1^o/₁₀₀ orthophosphorzuuroplossing werd toegevoegd dat de reactie, met lakmoes als indicator, om en bij neutraal was geworden, terwijl daarna deze vloeistof bij 37° C. aan de inwerking van stremsel werd onderworpen, dan verschenen weer eerst amorphedeeltjes (hetgeen reeds een aanvang nam trouwens tegen het eind der zuurtoevoeging) en, in aansluiting daaraan, met amorphedeeltjes bezette uiterst teere draadjes (fig. VIII), terwijl bij de makroskopische controleproef een samenhangende lebstolsel werd gevormd.

Nu waren er drie mogelijkheden: 1. of, volgens HAMMARSTEN bereide zuivere caseïne moest in niet geringe mate verontreinigd zijn met fibrine; 2. of uit melkkaastof en zuivere caseïne moest fibrine kunnen ontstaan onder leb- en zuurinvloed en vervolgens in dradenvorm tot uitscheiding komen; 3. of er was bij dit alles slechts schijn in het spel, in dier voege dat men met een dradenvormende stof te doen moest hebben die in verschillende opzichten met fibrine groote overeenkomst vertoonde, maar niettemin geen fibrine was.

ad. 1. Dit zou slechts dan mogelijk kunnen zijn, wanneer in de melk fibrine in belangrijke hoeveelheid zou voorkomen, terwijl de oplosbaarheids- en precipitatieverhoudingen van de caseïne en fibrine alsdan vergaande overeenkomst moesten vertoonen. Als de sub 1. vermelde mogelijkheid inderdaad aan de werkelijkheid zou beantwoorden, dan moest verwacht worden dat in een zwak alkalische oplossing der met fibrine verontreinigde caseïne niet alleen door zwak zuur, maar ook door verschillende andere agentia, bijv. door bloedserum, door uitzouting met een verzadigde NaCl- of NaF-oplossing enz. uitscheiding der fibrine in dradenvorm, met als gevolg vlok- resp. stolsel- resp. gelvorming, moest kunnen worden te voorschijn geropen. En wel daarom, omdat dit ook het geval is met een alkalische oplossing, resp. alkalihydrosol van een uit bloedplasma verkregen fibrinedradenweefsel, resp. stolsel, indien

Draden weefsel dat als volgt werd verkregen. Zuivere caseïne werd opgelost in een zwakke loogoplossing, waaraan vervolgens zuur werd toegevoegd.

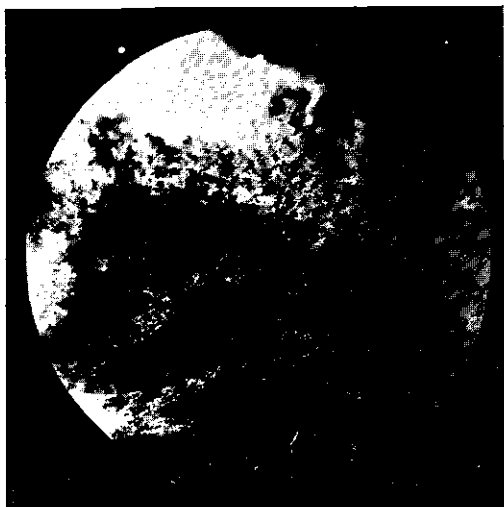


Fig. VIIc.

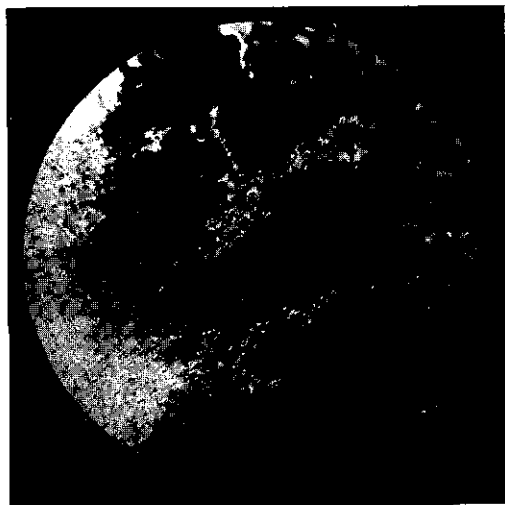


Fig. VIIb.

Draden weefsel, als volgt verkregen. Aan een oplossing van zuivere caseïne in kalkwater werd 1‰ CaCl_2 oplossing toegevoegd, terwijl men op de vloeistof vervolgens stroomsel liet inwerken.

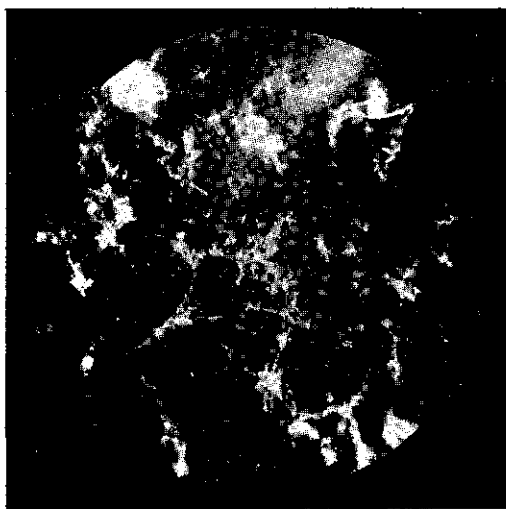


Fig. VIII.

bloedcellen aangetroffen en voorts vormsels die nu eens aan roode bloedcellen of resten daarvan, dan weer aan resten van leukocyten of niereellen of wel aan plaatepitheelcellen deden denken. Opmerkelijk was dat deze vormsels ook rijkelijk bleken aanwezig te zijn in het zoo even genoemde, boven het eigenlijke sediment in de TROMMSDORFFSCHE buisjes zich bevindend wit zuiltje, terwijl zij eveneens werden aangetroffen in willekeurige preparaten vervaardigd van met behulp van een Lavalcentrifuge verkregen ondermelk. Intusschen leidde toen ter tijd het herhaaldelijk aantreffen van roode bloedcellen in de sedimenten en van de zoo juist genoemde vormsels tot het vermoeden dat de voor de proefnemingen gebruikte melk abnormaal moest zijn. Met het oog hierop werd een inspectie op den stal ingesteld, waarbij bleek, dat twee der betreffende koeien verdacht werden aan lichte mastitis te lijden, dat bij enkele andere versche wondjes aan de tepels voorkwamen, terwijl aan de handen van de melkers geen wondjes werden aangetroffen. De melk der bedoelde koeien werd uitgeschakeld, terwijl nu vervolgens de melk der overige koeien stuk voor stuk werd onderzocht. In de sedimenten van sommige melk werden nog sporadisch fibrinedraadjes aangetroffen; *in de sedimenten en de room van een aantal andere kon geen enkel fibrinedraadje worden aangetoond*, nòch in de versche preparaten, nòch bij WEIGERT kleuring en nòch in de eerste nòch in de tweede sedimenten. Maar opmerkelijk was dat de straks bedoelde vormsels als te voren aanwezig bleven, zoodat deze blijkbaar niet wezen op een abnormalen toestand van de melk. Daar deze vormsels nog altijd niet thuis konden worden gebracht, werd besloten omtrent hunnen aard en afkomst een afzonderlijk onderzoek in te stellen, van welker eenigszins verrassende uitkomsten in het volgend artikel verslag wordt gegeven.

Opgeloste toestand.

Ter opsporing van eventueel in den opgelosten, resp. amicroscopischen toestand in de melk aanwezige fibrine, vonden bloedserum en een verzadigde NaCl-oplossing toepassing, in de aanname dat in den opgelosten toestand in de melk aanwezige fibrine door deze reagentia in dradenvorm tot uitscheiding zou worden gebracht. Als materiaal van onderzoek werd uit den aard der zaak eerst van ondermelk gebruik gemaakt. De proeven met bloedserum werden een tijdlang bij 37 à 40° C. geplaatst, die met verzadigde NaCl-oplossing bij kamertemperatuur. Macroscopische stollingsverschijnselen werden niet waargenomen, nòch in het eene, nòch in het andere geval. Het microscopisch onderzoek der melkbloedserum en melkzoutmengsels leverde evenmin positief resultaat op wat fibrinedraadjes betreft. Vervolgens werden de mengsels na een behoorlijken tijd van inwerking gecentrifugeerd, terwijl de sedimenten op fibrinedraadjes werden onderzocht. Het resultaat daarvan was eveneens negatief. Derhalve kwam óf in

Bevordering van de opzuiging in nit zich zelf slecht opzuigende melk door blootserum. Proeven op 40° C. gebracht, daarna afgekoeld op 12° C. en rustig aan zichzelf overgelaten. Oproemtijd: 2 uur.

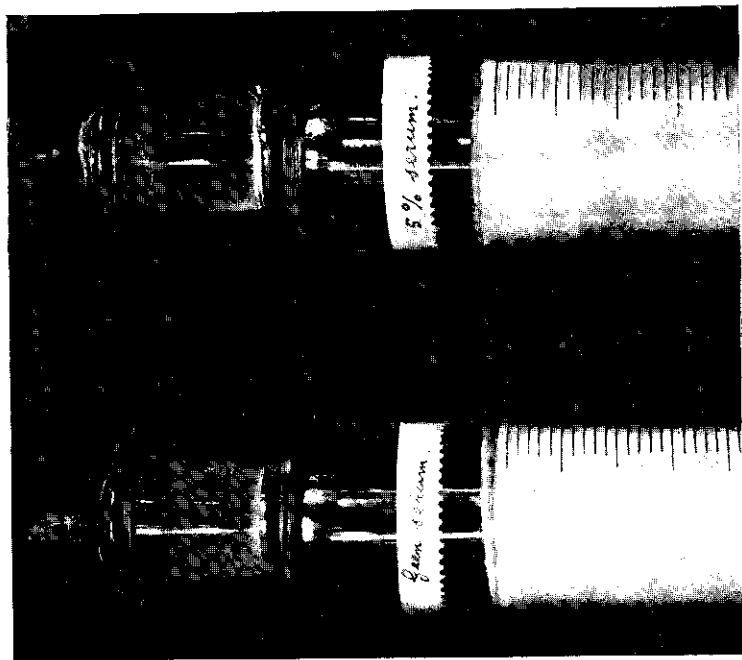


Fig. IXa. Van links naar rechts.

1. Melk + 5 % water.
2. Melk + 5 % blootserum.

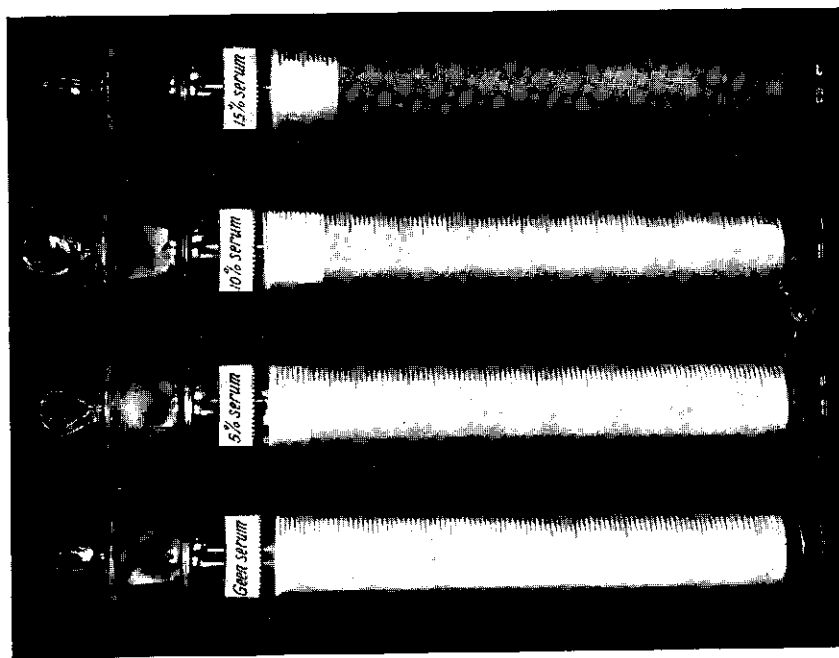


Fig. IXz. Van links naar rechts.

4. Melk + 5 % water.
2. Melk + 5 % blootserum.
3. Melk + 10 % blootserum.
4. Melk + 15 % blootserum.

vorderende werking van het bloedserum op de oprooming aanging, scheen in deze richting het tweede bovenbedoeld verschijnsel te wijzen.

Het tweede der vorenbedoelde verschijnselen was n.l. dit, dat in de naar WEIGERT bewerkte preparaten van room, die zich had gevormd op een melk-bloedserummengsel, wel is waar geen eigenlijke fibrinedraadjes werden aangetroffen, maar wel gekleurde ringetjes, die deels schenen te beantwoorden aan de omtrekken van melkvetbolletjes (waarvan het vet tijdens de bewerking was opgelost) en deels aan de omtrekken van samengevloede melkvetbolletjes (fig. *Xa* en *b*). Waar deze ringetjes, zooals gezegd, te voorschijn traden nadat de room aan de bewerking van de methode volgens WEIGERT was onderworpen geworden, scheen het alsof men bij die ringetjes met fibrine in ring-dradenvorm te doen zou hebben. Terwijl derhalve geen eigenlijke fibrinedraadjes zooals men die gewoonlijk ziet, in den room werden aangetroffen, ook niet in den room van melk-bloedserummengsels (zoodat van een samenballing van melkvetbolletjes tengevolge van een eventueele insluiting in een fibrinedradenweefsel geen sprake kon zijn, ofschoon een dergelijke gang van zaken aanvankelijk voor mogelijk was gehouden), scheen het geenszins onmogelijk dat de aan den dag getreden ringvormige draadjes bij de complexvorming der melkvetbolletjes een rol zou kunnen spelen. En als dit fibrine was, dan moest, ondanks de tot nu toe verkregen negatieve resultaten, tóch fibrine in den opgelosten toestand in de melk aanwezig zijn; of mogelijkerwijze in den secundairen suspensoid toestand, terwijl in beide gevallen de fibrine aanwezig gedacht kon worden in den toestand van een, op de melkvetbolletjes geadsorbeerd laagje. Dat dit geadsorbeerd laagje na inwerking van bloedserum in een georganiseerden (draden-)toestand zou overgaan, scheen zeer aannemelijk; zou men te doen hebben met een op de vetbolletjes geadsorbeerd laagje van zich in optisch leegen soletoeestand bevindende fibrine, dan zou de serumwerking, overeenkomstig de daaromtrent elders ontwikkelde gezichtspunten, kunnen worden teruggebracht tot een dehydratie (precipitatie) met opvolgende, resp. gelijktijdige, agglutinatie der fibrine-moleculen of micellen en met het eindresultaat: dradenvorming, in casu in ringvorm. Zou de fibrine in den secundairen suspensoidtoestand op de melkvetbolletjes geadsorbeerd zijn, dan zou de serumwerking enkel tot de werking van een agglutinine, tot een agglutinatie der fibrinedeeltjes derhalve, kunnen worden teruggebracht. En aangezien het serumagglutinine zich naar mijne voorstellingswijze afzet op de fibrinedeeltjes resp. op de onder seruminvloed gevormde fibrinedraadjes, zoo zou het wel begrijpelijk zijn, dat dit agglutinine aan een, zich op de melkvetbolletjes bevindend laagje agglutineerende, resp. klevrige, eigenschappen zou kunnen verleenen, waardoor dan de bevorderende werking van het bloedserum op de oprooming

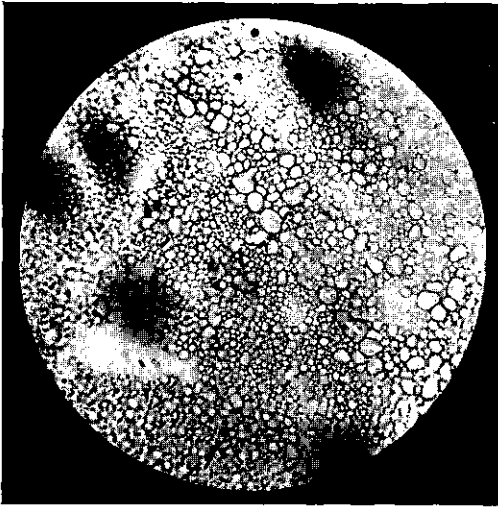


Fig. Xa.

Aan melk werd 10 % bloedserum toegevoegd. Na de tot standkoming der oprooming, werden van de room microscopische preparaten vervaardigd, die naar de methode van WIEGERT werden gekleurd. De figuur doet gekleurde ringetjes zien.

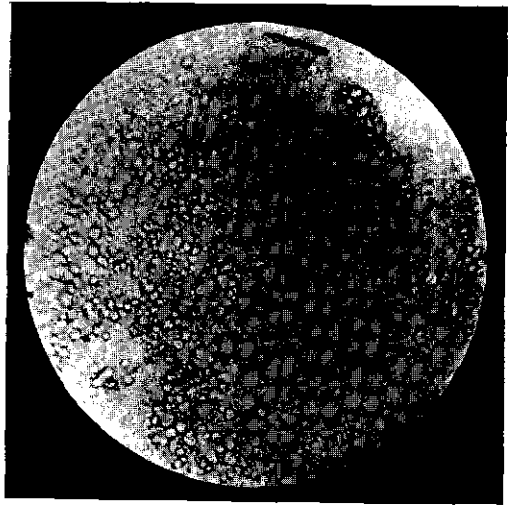


Fig. Xb.

Aan melk werd 10 % bloedserum toegevoegd, terwijl preparaten van het mengsel in draaiende beweging werden gehouden op een verticale draaischijf. Vervolgens werden van het mengsel microscopische preparaten vervaardigd en gekleurd als voren. Ook hier treden de gekleurde ringetjes duidelijk aan den dag.

de oprooming, óók in slecht oproomende melk bevorderen, hetgeen eveneens uitkwam.

3. Dan moest het bloedserum zijn vermogen om het pseudo-cristallisatieproces der fibrine te kunnen te voorschijn roepen en tevens zijn vermogen om de oprooming te bevorderen inboeten bij verhitting op een temperatuur van 65—69° C., en wel omdat door PEKELHARING, die het „thrombine” (= „fibrineferment”), beschouwde als een nucleoproteïd, is gevonden, dat dit agens bij de genoemde temperatuur gecoaguleerd wordt, dus vermoedelijk tevens onwerkzaam zou worden. De proefneming wees uit, dat bloedserum gedurende 10 à 15 minuten verhit op 65 à 66°, zoolwel zijn vermogen om de fibrine in optisch leege solen tot uitscheiding te brengen verliest, als hare eigenschap om de oprooming te kunnen bevorderen (fig. XI).

4. Dan moest de melk eveneens het vermogen, om spontaan op te kunnen roomen, verliezen bij verhitting op 65 à 66° C., hetgeen bij de proefneming het geval bleek te zijn, in dier voege dat het spontaan oproomend vermogen der melk bij de genoemde temperatuur sterk werd verminderd (fig. XII), hetgeen achterna bleek reeds lang bekend te zijn.

5. Dan moest, wanneer de room met een groote overmaat van water werd uitgewasschen, het onderhavige agglutineerend, resp. kleverig agens, vollediger kunnen worden verwijderd, zoodat in een mengsel van uitgewasschen room en water geen of slechts een geringe spontane oprooming moest plaats hebben, terwijl deze oprooming weer te voorschijn moest kunnen worden geroepen door toevoeging van bloedserum, echter niet door toevoeging van op 65 à 66° C. verhit bloedserum. Ook dit bleek bewaarheid te worden bij de proefneming, waarbij als volgt werd te werk gegaan. 500—800 c.c. willekeurige room werden met een 20-voudige hoeveelheid gedestilleerd water gewasschen, terwijl vervolgens de room door centrifugeering in een Lavalcentrifuge weer zoo veel mogelijk werd verzameld. Deze room werd opnieuw met een 20-voudige volumen aq. dest. gewasschen, waarna weer werd gecentrifugeerd. Dit proces werd in het geheel 4 à 5-maal herhaald, terwijl de ten slotte overblijvende room (het proces ging met een belangrijk roomverlies gepaard) met een 20-voudige volume aq. dest. werd vermengd. Van dit mengsel werden 100 of 500 c.c. te roomen gezet en daarnaast dezelfde hoeveelheden van het mengsel, waaraan 5—10 pct. bloedserum en op 65 à 66° C. verhit bloedserum was toegevoegd geworden (fig. XIII).

De uitkomsten van het experiment schenen dus tot zoo ver volkomen aan de verwachting te beantwoorden.

6. Dan moesten echter ook in den door spontane oprooming gevormden room, en tevens in den met water uitgewasschen room, de vorengenoemde ringetjes aan den dag treden, bij bewerking van dit materiaal volgens de fibrinekleuringsmethode van WEIGERT.

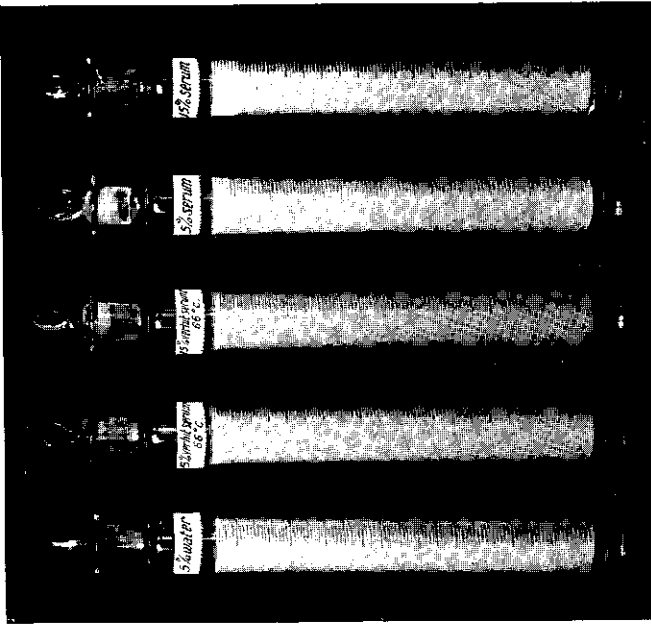


Fig. XI. Slecht oproomende melk. Van links naar rechts.

1. Melk + 5 % water,
2. Melk + 5 % op 66° C. verhit bloeds serum.
3. Melk + 5 % op 65° C. verhit bloeds serum.
4. Melk + 5 % bloeds serum.
5. Melk + 15 % bloeds serum.

Proeven op 40° C. gebracht; daarna bij $\pm 12^{\circ}$ C. geplaatst.
Oproomings tijd: 5 uur.

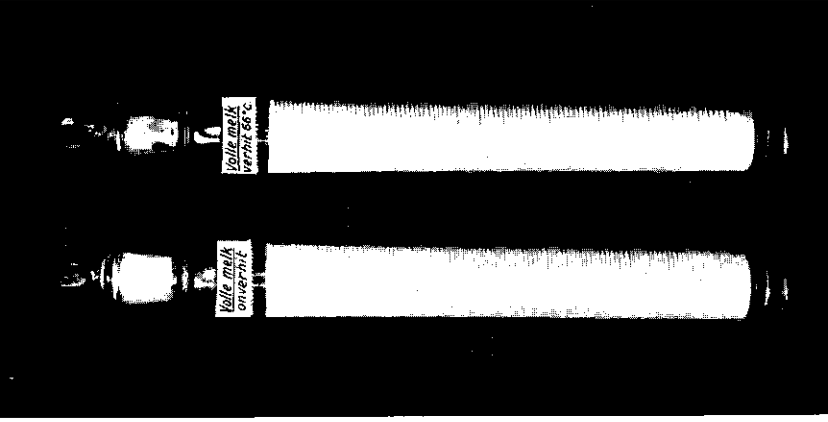


Fig. XII. Van links naar rechts:
Onverhitte, en op 65° C. gedurende 15 min.
verhitte, volle gemengde melk.

Gemengde melk. Spontane oprooming, dus zonder eenige toevoeging. Van de room zijn mikrosk. preparaten vervaardigd, die zijn gekleurd met Haematoxyline van HANSEN. In beide figuren treden ringetjes aan den dag; in beide komen tevens leukocyten voor. Eeukele daarvan zijn nog gaaf, men ziet daarin duidelijk de gelapte kern; hier en daar ziet men enkel kernmateriaal. Daar het hier uit willekeurige room, zonder voorzorgen, vervaardigde preparaten betreft, geven deze een duidelijk beeld van het feit, dat bij de oprooming een groot aantal leukocyten in de room overgaat.

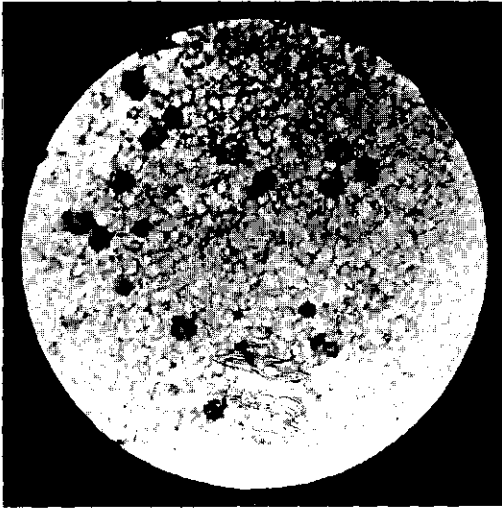


Fig. XIVa.

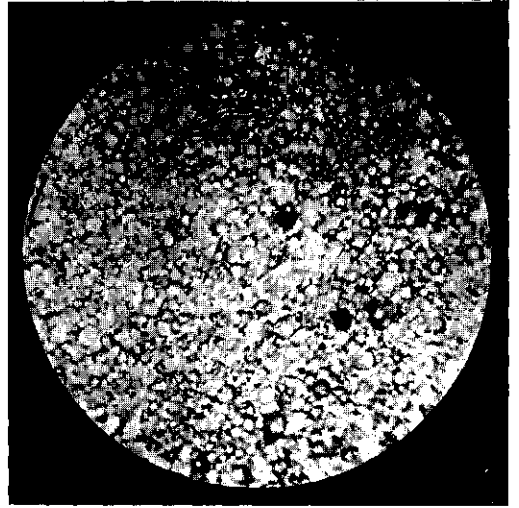


Fig. XIVb.

Naar WIEGERT gekleurde ringetjes, beantwoordende aan omtrekken van al of niet samen-gevoelde melkvetholletjes, uit een room-water-bloedsérum-mengsel. $4 \times$ uitgewassen room werd in een 20-voudige hoeveelheid water gesuspéneerd, hiearaan werd bloedsérum toegevoegd. Preparaten op verticale draaischijf; vervolgens bewerking naar WIEGERT.

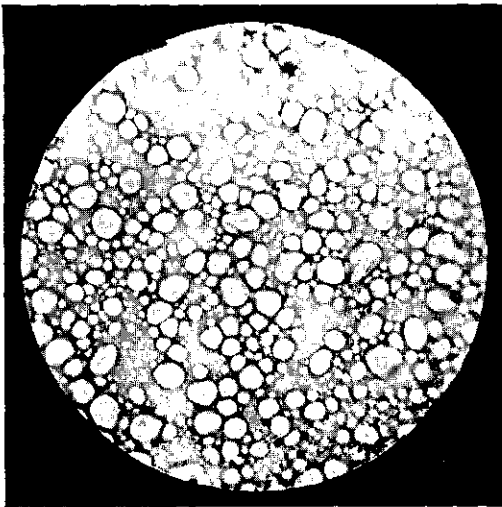


Fig. XVa.

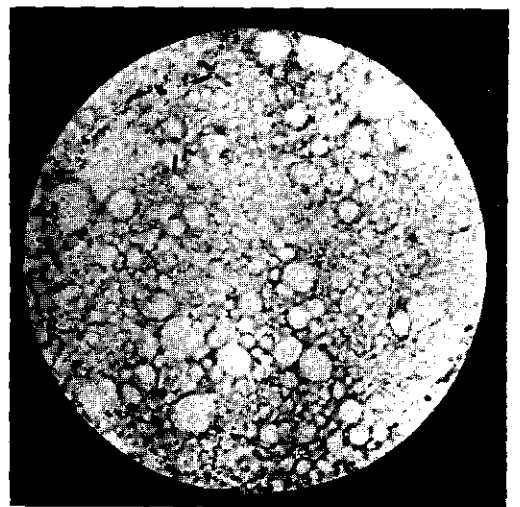


Fig. XVb.

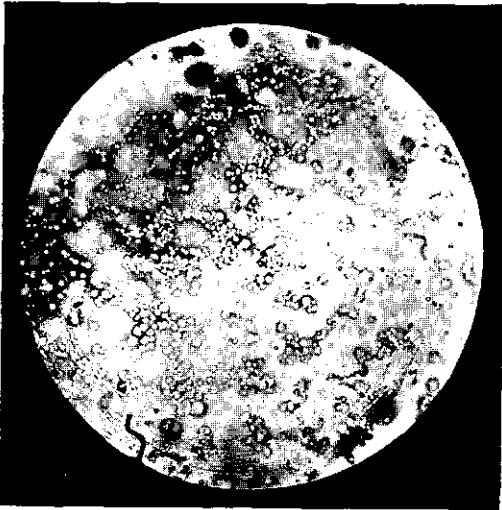


Fig. XVIa.

Preparaat van room verkregen van een roommelkmengsel met 5 % bloedserum, gekleurd met Haematoxyline van HANSEN.

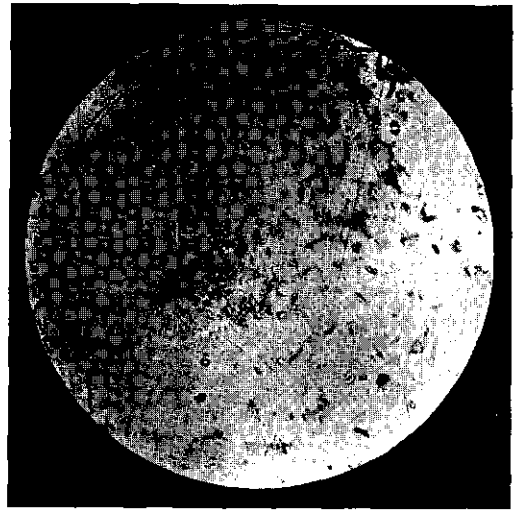


Fig. XVIb.

Idem, echter met op 66° C. gedurende 15 minuten verhit bloedserum.

agglutinine voor melkvetbolletjes, waarbij dan in de eerste plaats, aan een van leukocyten of bloedplaatjes afkomstige stof ware te denken. Intusschen bleef natuurlijk de mogelijkheid open dat het wezen in dezen niet aan den schijn zou beantwoorden.

De stand van het onderzoek der normale melk op fibrine was intusschen nu aldus, dat geen fibrinedraadjes waren aangetroffen geworden, dat evenmin fibrine in den opgelosten toestand in de melkvloeistof was aangetoond kunnen worden en dat het hoogst twijfelachtig was gebleken of in den opgelosten of suspensoidtoestand verkeerende fibrine geadsorbeerd op de melkvetbolletjes zou aanwezig zijn. Feitelijk was het ten slotte niet erg vreemd dat geen fibrine in den opgelosten of suspensoidtoestand in de melk werd aangetroffen, met het oog op de omstandigheid, dat in de melk talrijke leukocyten aanwezig zijn. In verband hiermee moest immers verwacht worden dat een door deze cellen geleverd agens („thrombine“ = „fibrineferment“ = „agglutinine“) in staat moest zijn om, als ooit fibrine in den opgelosten toestand in de melk zou overgaan bij de melksecretie, de fibrine tot uitscheiding te brengen, te doen stollen, zooals de geijkte term luidt, evenals dit het geval is wanneer het bloed buiten het lichaam treedt. Hierbij moest evenwel een restrictie worden gemaakt. En wel deze dat in de melk factoren aanwezig zouden kunnen zijn die de tot standkoming van de fibrine-uitscheiding zouden beletten. Als zoodanig zouden twee factoren in aanmerking kunnen komen. In de eerste plaats het melkvet, resp. de melkvetbolletjes. Want het is bekend, dat de fibrine-uitscheiding ook in bloed kan worden tegengehouden door het bloed onder olie op te vangen of wel, wat kleine hoeveelheden betreft, door het bloed in of op geparaffineerd glaswerk op te vangen en tevens tegen verdamping te beschutten. Een dergelijke werking zou nu in de melk door de melkvetbolletjes kunnen worden uitgeoefend, ten opzichte van eventueel in de melk in den opgelosten toestand zich bevindende fibrine. In de tweede plaats moest rekening worden gehouden met de aanwezigheid van citroenzure zouten in de melk. Volgens SÖLDNER ¹⁾ zou in de melk citroenzuur voorkomen tot een bedrag van 0,2 pct. En dat is nu ook juist de concentratie van natrium-citraat, die het buiten de vaten getreden bloed vermag vloeibaar te houden, dus m.a.w. de fibrine-uitscheiding in het bloed vermag tegen te gaan. Diensvolgens zou mogelijkerwijze ook in de melk door de aanwezigheid van citroenzuurzouten de uitscheiding der fibrine onder den invloed van melkleukocyten kunnen worden tegengewerkt. Wel zou het eenigszins vreemd zijn, dat dan ook niet door bloedserum fibrine-uitscheiding in de melk tot stand gebracht was kunnen worden; en wel omdat bloedserum in citraatbloedplasma wél het pseudocrystallisatieproces der fibrine vermag te voorschijn

¹⁾ SÖLDNER. Die Salze der Milch und ihre Beziehungen zu dem Verhalten des Kaseins. Landwirtschaftl. Versuchs Stationen 35, 351. (1888).

te roepen. En ook scheen het feit dat in abnormale melk fibrinedraadjes waren aangetroffen tegen de genoemde mogelijkheden te pleiten; niettemin moest met de genoemde factoren in de melk rekening worden gehouden, om voorbarige gevolgtrekkingen uit de tot nu toe verkregen negatieve uitkomsten te kunnen vermijden.

De vraag nu of inderdaad een der beide genoemde factoren, of beide tegelijk, de tot standkoming van fibrine-uitscheiding in de melk zouden kunnen beletten of althans tegenwerken, scheen voor toetsing aan het experiment vatbaar, uitgaande van de volgende overweging. Als dat inderdaad het geval zou zijn, dan moest verwacht worden dat in een opzettelijk aan de melk toegevoegde fibrinehoudende vloeistof evenmin fibrine-uitscheiding plaats zou vinden, zelfs niet na opvolgende toevoeging van bloedserum. Als fibrinehoudende vloeistoffen werden gebruikt zoo zuiver mogelijk citraatbloedplasma ¹⁾ en chloorcalciumbloedplasma ²⁾ terwijl de volgende proevenreeksen werden genomen:

- a. Vollemelk + resp. 1 pct., 5 pct. en 10 pct. citraatbloedplasma + vervolgens 5 pct. bloedserum.
Vollemelk + resp. 1 pct., 5 pct. en 10 pct. chloorcalciumbloedplasma + vervolgens 5 pct. bloedserum.
- b. Vollemelk + resp. 1 pct., 5 pct. en 10 pct. citraatbloedplasma.
Vollemelk + resp. 1 pct., 5 pct. en 10 pct. chloorcalciumbloedplasma.
- c. Vollemelk + 5 pct. bloedserum.
- d. Vollemelk + 0.

De vloeistoffen bevonden zich in maatcylinders en werden soms eerst op 40° C. gebracht en daarna bij kamertemperatuur of in stroomend leidingwater geplaatst, terwijl de cylindereen ander maal direct bij kamertemperatuur rustig aan zich zelf werden overgelaten. Het resultaat was het volgende:

In de eerste reeks (a) bleek in de mengsels waarin 1 pct. citraat- of chloorcalciumbloedplasma aanwezig was, een roomlaag te worden gevormd, die ongewoon rul was. Bij het microscopische onderzoek van de van deze roomlagen vervaardigde preparaten traden talrijke fibrinedraadjes aan den dag. In de mengsels waarin zich 5 pct. en 10 pct. citraat- of chloorcalciumbloedplasma bevond, bleef oprooming soms uit; in deze gevallen bleken in de vloeistof gestolde klonters aanwezig te zijn. Bij microscopisch onderzoek

¹⁾ Het citraatbloedplasma werd verkregen door bloed in een gelijke hoeveelheid van een 0.4 pCt. oplossing van natriumcitraat op te vangen, waaruit het plasma door centrifugeering (bij sommige proeven werd het plasma bovendien nog door een Chamberlandkaars gefiltreerd) van de gevormde elementen werd bevrjld.

²⁾ Het chloorcalciumbloedplasma werd verkregen door bloed op te vangen in een gelijke hoeveelheid eener 5 pCt. CaCl₂ oplossing; de verdere bewerking was gelijk aan de in noot 1 genoemde.

lipase, nuclease, peroxydase, katalase ¹⁾). Men zou zich ook zeer wel kunnen voorstellen dat eiwitstoffen, als lactoalbumine en lactoglobuline, door de leukocyten in de melk geleverd zouden kunnen worden, en dat hetzelfde het geval zou kunnen zijn met fibrine. Te meer omdat door verschillende onderzoekers als bijv. MATHEWS, MÜLLER en anderen, is vermoed geworden dat de bloed- en lymphofibrine van leukocyten afkomstig zou kunnen zijn, zij het ook dat latere onderzoekers, als bijv. NOLF, de oorsprong der fibrine („fibrinogeen“) in de lever meenen te moeten zoeken. Vroeger zijn ook door mij reeds pogingen gedaan om fibrine uit bloed- en lymfheleukocyten te isoleeren, evenwel met negatief resultaat en tot nu toe is het mij evenmin mogen gelukken fibrine uit de in normale melk voorkomende leukocyten te verkrijgen. Met het oog op deze omstandigheid en tevens op de te voren vermelde overwegingen betreffende de onaannemelijkheid van de passage van fibrine door de alveolaircellen der melkklier, is, zooals reeds werd opgemerkt, de uitslag mijner tot nu toe verrichte onderzoekingen, daarheen gaande, dat fibrine geen physiologisch melkbestanddeel is, ten slotte wel begrijpelijk.

Genoemde uitslag brengt de volgende gevolgtrekkingen met zich mee. In de eerste plaats deze dat de fibrine geen deel kan nemen aan de melkstolling onder leb- en zuurinvloed en evenmin aan de, aan de oprooming ten grondslag liggende, melkvetbolletjes-agglutinatie. En voorts de practisch niet onbelangrijke consequentie dat, als fibrine in dradenvorm in eenigerlei melk wordt aangetroffen, deze melk niet als absoluut normaal mag worden beschouwd, maar dat in zulke melk op de een of andere wijze bloed- of lympheplasma moet zijn terecht gekomen. Abnormaal behoeft in dezen echter nog geenszins synoniem te zijn met ondeugdelijk: immers het bloed- of lympheplasma, dat de fibrine in de abnormale melk levert, kan bijv. wel afkomstig zijn van tepelwondjes of van wondjes aan de handen van de melkers. Ook schijnt het niet onmogelijk — of dit practisch voorkomt zij ter beoordeeling aan de dierenartsen overgelaten — dat op andere wijze bloed- of lympheplasma in de melk zou kunnen geraken, zonder dat dit ondeugdelijkheid van de melk met zich mee zou behoeven te brengen. Ik denk daarbij bijv. aan de mogelijkheid dat ten gevolge van stuwing bloed- of lympheplasma in de melk zou kunnen overgaan, zooals immers ook bloed- of lympheplasma in het subcutane weefsel kan optreden bij stuwing. Wel echter wijst uit den aard der zaak de overgang van bloed- of lympheplasma op een ziekelijke afwijking bij het dier waarvan zulke melk afkomstig is. Op ondeugdelijkheid wijst het voorkomen van fibrine in de melk, naar het mij toeschijnt, eerst dan, wanneer de overgang van bloed- of lympheplasma in de melk veroorzaakt

¹⁾ Voor literatuur omtrent leukocyten enzymen zie men o.a. JOCHMANN und LOCKEMANN *HOFMEISTER'S Beiträge* 11, 449 (1918).

wordt, of gepaard gaat met een pathogene bacterie- of toxinwerking. Overigens meen ik er nog op te mogen wijzen dat in het vinden van fibrine in eenigerlei melk een vingerwijzing zou kunnen worden gezien om zulke melk ook in ander opzicht aan een streng onderzoek te onderwerpen.

Zur Frage nach den Vorhandensein von Fibrin in der normalen Milch.

(Kurze Zusammenfassung obiger Ausführungen).

Im Laufe von Untersuchungen betreffs des Milchgerinnungsvorgangs stellte es sich heraus dass unter Lab- und Säureeinfluss zarte Fädchen in der Milch erscheinen, die sich an der microstructurellen Aufbau der Gerinnsel beteiligen und Fibrinfädchen sehr ähnlich sind. In Folge dieser Beobachtung wurde die Frage nach dem Vorkommen von Fibrin in der normalen Milch einer eingehenden Prüfung unterworfen. Es wurde dabei den verschiedenen Zuständen, in den das Fibrin im Allgemeinen erscheinen kann Rechnung getragen, vor Allem dem gelösten, optisch leeren, und dem Fädchenzustand. Dementsprechend kam zur Prüfung der Milch auf Fibrin einesteils Blutserum und gesättigte Kochsalzlösung zur Verwendung und anderenteils die Dunkelfelduntersuchung sowie das Fibrinfärbungsverfahren nach WEIGERT.

Fibrin wurde in der normalen Milch nicht aufgefunden, weder im gelösten, noch im Fädchenzustande. Demzufolge dürfen die vorerwähnte, bei der Milchgerinnung erscheinenden Fädchen, nicht als Fibrin betrachtet werden, und kann das Fibrin sich auch an dem Aufrahmungsvorgang der Milch nicht beteiligen, wenn auch im Laufe der Versuche sich die Tatsache ergeben hatte, dass der Milchaufrahmungsvorgang von Blutserum bedeutend begünstigt zu werden vermag, sowie, dass diese Eigenschaft des Blutserums bei der Erhitzung auf $\pm 65^{\circ}$ C. dieser Flüssigkeit verlustig geht. Uebrigens geht aus dem Ergebniss, dass das Fibrin nicht als ein physiologischer Milchbestandteil zu betrachten wäre, hervor, dass irgend eine Milch, in der Fibrin aufgefunden wird, als nicht normal zu bezeichnen wäre, sei es auch dass diese Abnormalität nicht notwendig synonym mit Untauglichkeit zu sein braucht.

Nichtsdestoweniger wäre eine solche Milch gegebenenfalls auch in anderen Hinsichten einer eingehenden Prüfung auf Tauglichkeit zu unterwerfen.