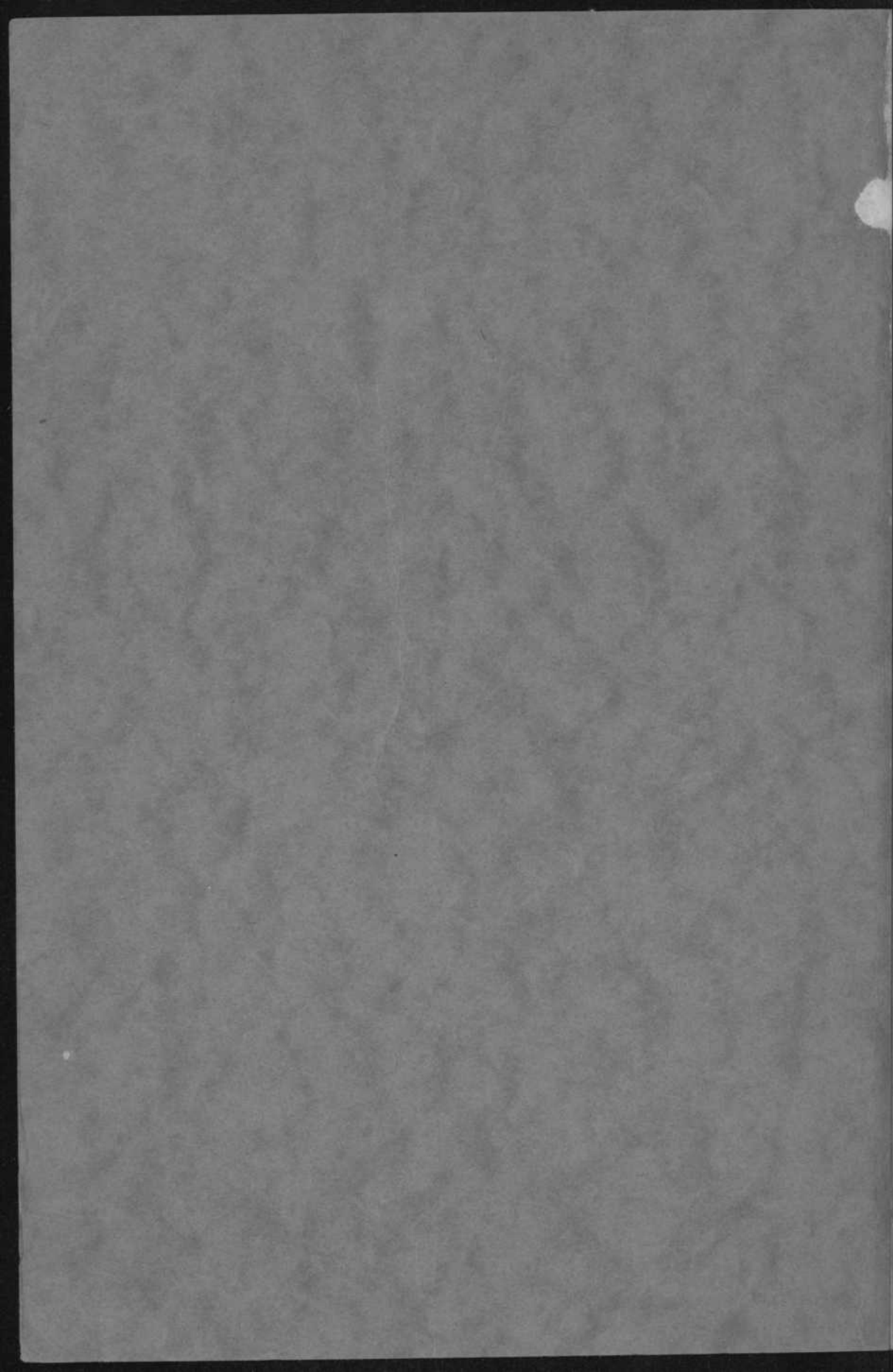


MG 2000

ONDERZOEKINGEN
OVER HISTAMINEACHTIGE STOF
IN ROGGEPOLLEN

J. M. H. STRUIKEN



ONDERZOEKINGEN
OVER HISTAMINEACHTIGE STOF IN
ROGGEPOLLEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN
DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE
GRONINGEN, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR. H. J. BACKER, HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT
DER WIS- EN NATUURKUNDE, TEGEN DE BEDENKINGEN
VAN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE, TE VERDEDIGEN
OP ZATERDAG 4 JULI 1931, TE 4 UUR

DOOR

JOHAN MARIE HUBERT STRUIKEN,
ARTS

GEBOREN TE TETERINGEN



NEDERL. MAATSCHAPPIJ
TER BEVORDERING DER
GENEESKUNST

De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.
De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.
De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.
De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.
De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.

De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.
De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.

De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.
De voorstelling van de werkelijkheid is niet alleen
een kwestie van de manier waarop we de wereld zien,
maar ook van de manier waarop we de wereld voelen.

AAN MIJN OUDERS

THE HISTORY OF THE CITY OF BOSTON

FROM THE FIRST SETTLEMENT
TO THE PRESENT TIME

BY
JOHN H. COLEMAN

VOLUME I
FROM THE FIRST SETTLEMENT
TO THE YEAR 1700

BOSTON
PUBLISHED BY
J. B. LEECH, 15 NASSAU ST.

NEW YORK
1880

Het verschijnen van dit proefschrift biedt mij de gelegenheid U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren en Docenten der Medische en Philosophische Faculteiten van de Utrechtsche Hoogeschool te danken voor het onderwijs, dat ik van U mocht genieten.

Hooggeleerde Benjamins, hooggeachte Promotor. U ben ik dank verschuldigd niet alleen voor de groote vrijheid, die gij mij liet bij de bewerking van dit proefschrift, maar vooral voor de wijze, waarop gij mij, ondanks Uwe drukke bezigheden van velerlei aard, steeds met raad en daad hebt bijgestaan. Zonder Uw enthousiasme en Uw opwekkend woord ware het mij ongetwijfeld zwaar gevallen, de moeilijkheden, die zich bij mijn werk voordeden, te overwinnen. Bijzondere dank ben ik U ook verschuldigd voor het voorrecht, dat ik gehad heb om bij U assistent te wezen en voor de uitstekende vorming en leiding, welke ik als zoodanig van U mocht ontvangen.

Zeer Geleerde Huizinga, Uw hulp en raadgeving tijdens mijn assistentschap hebben mij zeer aan U verplicht.

U, Mejuffrouw Benjamins, mijn bijzonderen dank voor de buitengewone hulpvaardigheid, waarmede gij mij steeds van dienst waart.

Ook Gij, waarde Volckmann, waart bij mijn proefnemingen onmisbaar.

Tenslotte mijn hartelijken dank aan allen, die mij bij de bewerking van dit proefschrift behulpzaam zijn geweest.

INLEIDING.

Reeds Walzer en Grove uitten als hun meening, dat Roggepollens een actieve stof zouden bevatten, die niet in de andere pollens aanwezig is en willen daarmee ook verklaren, waarom het zoo weinig moeilijkheden opleverde aan Dunbar en Alexander om caviae overgevoelig te maken voor Roggepollens.

Verder is er eigenlijk geen aandacht aan dit onderwerp besteed, totdat het Benjamins en Vermeulen bij hun onderzoekingen over de werkzame stoffen van de verschillende gramineeën opviel, dat de uteri van dieren, die overgevoelig gemaakt waren voor Holcus molle, ook een positieve reactie vertoonden met het roggepollenextract.

Dit deed hen het eerst denken aan een alimentaire overgevoeligheid, daar de eerste reeksen proefdieren op hooi gezeten hadden en gevoerd waren met haver en brood, vooral daar de verschillende grassoorten in het hooi voorkomen.

Vanaf dien tijd werd gezocht naar een gramineeënvrij voedsel, waarmede de dieren voldoende langen tijd konden leven. Maar ook nu bleek, dat bijna alle dieren nog reactie vertoonden op roggepollenextract. Er was echter nog een ander feit wat hun aandacht getrokken had, nl. het meningsverschil, dat er bestond aan welke stof de werkzame stof gebonden was.

Walzer en Grove en Coca en Grove gaven als hun meening te kennen, dat de werkzame stof niet aan de eiwitten gebonden is, terwijl Farmer en Loeb de tegenovergestelde meening uitten.

Daar gebleken was, dat bijna alle uteri reactie vertoonden op Roggepollenextract, hebben zij deze stof genomen, om daarmede te trachten het meningsverschil op te lossen.

Daartoe werden de Roggepollenextracten door een ultrafilter geperst van cellophaan en daarna de filterrest weer opgelost. Hierdoor werd een scheiding verkregen tusschen de eiwitten, globulinen, albuminen en hoogere albumosen, die niet door het filter werden doorgelaten en de andere stoffen.

Nu bleek, dat de uteri van caviae alle reacties gaven met het

filtraat en niet met de filterrest, behalve dan de dieren, die voor Rogge overgevoelig gemaakt waren. De actieve stof was dus zeker geen hoogmoleculaire.

Nu was het reeds opgevallen, dat histaminereactie groote gelijkenis vertoonde met Roggepollenextract, wat betreft de uterusreacties.

Thans werden de latente periodes bepaald van Histamine, Roggepollen en andere pollen en hierbij bleek, dat de gemiddelde latente periode van de twee eerste stoffen resp. 5.1 en 4.5 sec. was, terwijl bij de specifieke reacties de gemiddelden veel hooger lagen, resp. 20 en 35 seconden.

Dit laatste brengt het vermoeden mee, dat het bijzondere bestanddeel van het Roggepollenextract een histamineachtige stof was, zoodat naar meerdere punten van overeenkomst gezocht werd.

Vooreerst de lichte uitwaschbaarheid van histamine, uit weefsel, waarmede het in aanraking geweest is, zooals uterusshoorns, waar reeds Bishop en Rendal op gewezen hebben, hetgeen ook door Benjamins en Vermeulen bij de Roggepollenextracten gevonden werd.

Oehme had gezien, dat, wanneer men bij een uteruspraeparaat zonder ververschen, steeds een nieuwe hoeveelheid histamine toevoegt, men eerst sterke reactie krijgt, terwijl later de reacties steeds kleiner worden. Hetzelfde werd ook door Roggepollenextract aangetoond. Ook kon aangetoond worden, dat de stof in rogge, gelijk histamine een potentieele werking heeft.

Daarenboven werden nog enkele huidreacties gedaan bij niet lijdende aan hooikoorts met histamine 1 % en Roggepollenextract 3 % en ook hierbij bleken gelijke reacties op te treden, dewelke echter niet optraden met extracten van gramineeën.

Door bijzonder ingerichte proeven gelukte het aan genoemde onderzoekers om naast de histamine-achtige stof een gewone voor gramineeën specifieke stof aan te toonen.

De behoefte deed zich nu gevoelen om de bijzondere stof in de Roggepollens nader te onderzoeken of er meerdere punten van overeenkomst te vinden zijn met histamine en tevens te bepalen in welke concentratie de stof dan in oplossing aanwezig was. Zooals in het volgende hoofdstuk besproken zal worden, bestaan er zeer vele physiologische proeven met histamine, maar een gedeelte

bleek onbruikbaar, daar bleek dat de concentratie, waarin de histamine, in de Roggenpollens aanwezig, zeer gering is. Bovendien deden zich door het niet zuiver in oplossing zijn van de histaminachtige stof nog allerlei moeilijkheden voor, die in de volgende hoofdstukken besproken zullen worden.

HOOFDSTUK I.

Litteratuur Overzicht.

Histamine behoort tot de groote groep der biogene aminen; het is nl. β Imidazolaethylamine. Deze aminen zijn stikstofproducten van de intermediaire stofwisseling.

De meeste biogene aminen ontstaan door decarboxyleering van aminoseering. Bij deze afsplitsing ontstaan dikwijls uit pharmacologisch onwerkzame bestanddeelen pharmacologisch zeer werkzame stoffen.

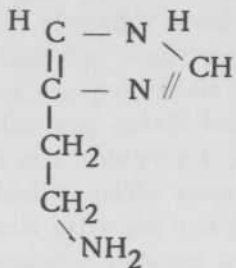
De chemische omzetting heeft als volgt plaats:



Op deze wijze ontstaat b.v. tyramine uit tyrosine en evenzoo histamine uit histidine.

Deze decarboxileering vindt in de natuur plaats door bacterieele werking.

Histamine zelf heeft de volgende formule:



Het kristalliseert in kleurloze platte kristalletjes met een smelt-punt van 84° C., is gemakkelijk oplosbaar in water en alcohol, warme chloroform en onoplosbaar in aether. De waterige oplossing van histamine reageert licht alkalisch. Histamine-oplossingen worden, wanneer ze niet steriel bewaard worden, bij kamertemperatuur door bacteriële omzetting snel onwerkzaam. Daarentegen kan histamine ook door rotting ontstaan uit histidine.

Ook door verhitten op 280° wordt histamine snel onwerkzaam.

Lagere temperaturen dan deze veranderen echter niet zoo snel de werkzaamheid van histamine.

Urenlang schudden met serum, maagsap en speeksel veranderen de werkzaamheid van histamine niet noemenswaardig.

Best, Dale, Dudley en Thorpe hebben er reeds op gewezen, dat het gedrag van histamine in orgaanextracten tegenover de verschillende physische en chemische inwerkingen een andere is als dat van een zuivere histamine-oplossing.

Histamine wordt het beste door bacterieele afbraak van histidine verkregen en is op deze wijze door Ackermann het eerst gemaakt.

Synthetisch is histamine 't eerst door Windaus en Vogt en later door Pijman bereid.

Voor proefnemingen wordt meestal het zoutzure of phosphorzout gebruikt.

Het chemisch aantoonen van histamine is om twee redenen moeilijk.

Ten eerste is er geen specifiek reagens op histamine en in de tweede plaats komt het histamine meestal in zeer kleine hoeveelheden gebonden aan grootere hoeveelheden andere stoffen of daarmede gemengd voor, zoodat 't hierdoor ook onmogelijk is om het aan te toonen.

Men heeft de reactie van Pauly om histamine aan te toonen, maar een bezwaar is dat deze reactie ook een zeer gelijke reactie geeft met andere stoffen o.a. histidine. Bovendien moet histamine dan zuiver aanwezig zijn, daar weer andere stoffen, die aanwezig zijn de reactie kunnen belemmeren.

Wil men het chemisch zuiver afzonderen, dan moet men uitgaan van groote hoeveelheden, alles nauwgezet steriel behandelen en bovendien, alles in vacuo uitvoeren, terwijl men nog daarbij de kans heeft, dat door de verschillende neerslagen het histamine geabsorbeerd wordt en niet meer in oplossing te brengen is.

Het chemisch aantoonen is daarom bij het Roggenpollen bijzonder moeilijk, wijl we hier met zulke minimale hoeveelheden te doen hebben. Immers krijgt men een positieve Pauly-reactie, dan is men er nog niet zeker van of er niet een andere imidazolgroep is die deze reactie gegeven heeft; is de uitslag negatief, dan kan histamine bij een van de vele zuiveringsprocessen zijn blijven hangen, zoodat men ook dan geen zekerheid heeft

Er zijn nog een aantal methoden bekend om histamine chemisch aan te toonen, waarvan de beste is die van Best, Dale, Dudley en Thorpe. Al deze methoden vereischen echter een groot aantal voorzorgen en zijn zeer tijdroovend. Het uitvoeren hiervan zou te ver afbrengen van het eigenlijke onderwerp van dit proefschrift, d.i. het nagaan van verschillende biologische reacties met Roggenpollenextracten in vergelijking met histamine. Hiervoor geven Feldberg en Schilf de volgende reacties aan:

1. Contractie v. d. uterus van de caviae.
2. De bloeddrukdalende werking van een kat, na atropiniseering of vagus doorsnijding.
3. De bloeddrukstijgende werking bij een door aether genarco-tiseerd konijn, na atropinetoediening of vagusdoorsnijding.
4. De concentratie van het perifere bloed na histamine-inspuiting.
5. Maagsapsecretie na subcutane-inspuiting.
6. Huidreactie.
7. Werking op de chromatophoren van de kikkerhuid.

Het beste was natuurlijk wanneer alle reacties met een positieve uitslag bekroond werden, maar ook dit is niet altijd mogelijk. Zoo zijn b.v. met Roggenpollenextract geen proeven over de maagsecretie te doen, daar de drempelwaarde hiervoor te hoog ligt en daardoor te groote hoeveelheden ingespoten zouden moeten worden. Ook de anderen leveren dikwijls groote moeilijkheden op, daar natuurlijk het extract, waarmede gewerkt moet worden, tal van andere stoffen bevat, die belemmerend op de reactie werken. Zoo werd b.v. carbol gebruikt ter conserveering van de Roggenpollenextracten, maar deze extracten zijn dan niet te gebruiken voor bloeddrukproeven, daar carbol in dergelijke concentratie reeds een bloeddrukverlagende werking heeft.

Het eerst zal nu de litteratuur betreffende de *uterusreacties* besproken worden.

Aan alle gladde spieren kan de histaminewerking, daar deze samentrekken bij aanraking met kleine hoeveelheden van deze stof, gemakkelijk aangetoond worden. Het gevoeligste bleek hierbij te zijn de uterus van de cavia, welke met zeer geringe hoeveelheden nog contracties geeft, zooals Dale en Laidlaw aangetoond hebben.

Abel en Macht toonden de prikkelbaarheid aan voor de uteri van muizen en konijnen, welke echter niet zoo gevoelig zijn.

Voegtlin en Dyer toonden aan, dat bij ratten tonusverslapping

optreedt. Ook in sterke concentratie reageert de rattenuterus slechts met verslapping.

Ook bij overlevende uterus van menschen kon Guggenheim aantonen, dat histamine een tonusverhoogende werking heeft.

Benjamins en Vermeulen hebben bij hunne proeven met de methode van Dale ruimschoots gebruik gemaakt van cavia — en katten-uteri om de reactie van Roggenpollenextract met die op histamine na te gaan.

Huidreacties .

Eppinger is de eerste geweest, die de veranderingen van de menschelijke huid bij histamine-inwerking opmerkte. Na voorzichtig een krabje op de huid gegeven te hebben, druppelde hij een histamine-oplossing 1 $\frac{0}{00}$ erop en zag na 4—5 minuten op deze plaats een jeukende verhevenheid van de huid, welke veel gelijkenis vertoonde met een echte urticariabult. Na subcutane injectie van 0.5 tot 1 c.M.³ van deze base nam hij aan het geheele lichaam een eigenaardige verkleuring waar.

Heubner bevestigde deze waarneming. Dezelfde werking verkregen Sollman en Pilcher wanneer zij de huid met fijne, van de zaadhulzen van een legeminozensoort verkregen haartjes wreven en op deze huidplek een histamine-oplossing brachten. Zelfs aan de intacte huid konden zij met een geconcentreerder oplossing duidelijke reacties zien rondom de uitvoergangen van de haarsmeerklieren.

Ebbecke vond de invoering van histamine in de huid door middel van de galvanische stroom en heeft daarmee een fijne, de huid niet verwondende methode aangegeven.

Ook Miss Carrier heeft de locale werking van de huid onderzocht. Aan de nagelwal van een vinger veroorzaakte histamine 1 $\frac{0}{00}$ door middel van een glascapillaire van enkele honderdste millimeter doorsnede in de huid gebracht verwijding van een capillaire en versnelling van den bloedstroom. Op dezelfde wijze in de huid van de handrug gebracht veroorzaakte het hier na een latente periode van enkele seconden een scherp pijnlijk jeuken, dat 1—5 minuten duurde en een duidelijke reflex erytheem over een 10 c.M.² te voorschijn riep.

Török en Rajka maakten een laesie van de opperhuid met de boor van Pirquet door een druppel histamine heen en zagen dan na eenige minuten een duidelijke quaddel met roode hof optreden. Zij

hebben later, om het probleem van de roode hof verder na te gaan, hun onderzoekingen voortgezet bij menschen, waarbij plexus anaesthaesie gegeven was en zagen dan toch nog optreding van de quaddel en roode hof.

Namen zij echter patiënten, die gedurende eenigen tijd een verlamming van de sensibele zenuwen hadden, dan zagen ze geen optreden van de roode hof.

Zeër uitvoerig behandelt Lewis de huidreacties op histamine en heeft hiervoor ook een eigen methode bedacht, n.l. het prikken met een naald door een druppel van de vloeistof, waarover later uitvoeriger gesproken zal worden. Ook nam hij vele proeven om na te gaan, wat de oorzaak was van het ontstaan van roode hof en quaddel. Hem bleek nu dat de roode hof veroorzaakt wordt door een verwijding in hoofdzaak van de huidarteriolen, terwijl de capillairen daarbij een ondergeschikte rol spelen. Voor het ontstaan van de quaddel, die er meestal bij komt, neemt hij aan het optreden van een verhoogde doorlaatbaarheid van de endotheliën van de capillairen, zoodat we een quaddel op moeten vatten als een plaatselijk oedeem.

Ook Krogh heeft zich beziggehouden met de werking van histamine op de capillairen en komt tot de conclusie dat voor het optreden van de roodheid de oorzaak gezocht moet worden in een verwijding der capillairen en kleine venen.

Werkung op de bloeddruk.

Wat de werking van de histamine op de bloeddruk betreft, hierover hebben vooral Dale en Laidlaw uitgebreide onderzoekingen uitgevoerd.

Hierbij bleek dat de bloeddrukdalende werking vnl. optrad bij vleeschetende zoogdieren zooals honden en katten. Hierbij bleek dat de bloeddrukdalende werking voor een groot deel is toe te schrijven aan de enorme verwijding van de capillairen, die daarbij tot barsten toe met bloed gevuld zijn, terwijl er tevens een stase en een grootere doorlaatbaarheid optreedt van de capillairwand, wat tot gevolg heeft een sterke indikking van het bloed. Door deze verzameling van bloed in de verschillende capillairen komt er natuurlijk minder bloed in het hart terug, waardoor bloeddrukdaling optreedt, terwijl het hart nog krachtige slagen uitvoert.

Voerde men in dit stadium een groote hoeveelheid physiologische zoutsolutie in, dan herstelde het slagvolume zich wederom, terwijl

ook de bloeddruk steeg, waaruit blijkt dat noch het hart noch de arterieele weerstand beïnvloed waren.

De vraag deed zich nu voor of deze bloedaanzameling in de capillairen, welke vnl. in de buik gevonden werd, het gevolg was van een zenuwprikkeling of dat het toegeschreven moest worden aan een directe inwerking op de vaatwand. Ook hierbij waren het Dale en Richards die vaststelden, dat het een directe inwerking op de vaatwand was, want na doorsnijding van de verzorgende zenuwen en na voldoende langen tijd gewacht te hebben, zagen zij toch weer de vaatverwijdende werking optreden.

Bij de plantenetende zoogdieren staat de constrictorische werking op de longcirculatie op den voorgrond. Hierbij treedt dan ook inplaats van daling vaak een lichte bloeddrukstijging op. Geeft men grootere doses bij het konijn, dan komen de verschijnselen het meest overeen met die van de cavia. Bij deze dieren toch, welke uiterst gevoelig zijn voor histamine, treedt de dood op door contractie van de bronchiaalspiers en daardoor 't opblazen van de longen.

De inwerking op de chromatophoren van de kikkerhuid zal later in bijzonderheden besproken worden, terwijl nadere bijzonderheden over de opgesomde biologische reacties ook bij de betreffende hoofdstukken gegeven worden.

HOOFDSTUK II.

Uterusreacties ter bepaling van het gehalte aan histamine-achtige stof in Roggepollen.

§ 1. Inleiding.

Reeds Walzer en Grove hebben opgemerkt, dat roggepollen-extract actieve bestanddeelen bevat, welke niet in andere pollen-extracten aanwezig zijn en verklaarden hiermede de gemakkelijke wijze van overgevoelig maken, welke Dunbar en Alexander vonden voor de uteri van caviae.

Uit de proeven van Benjamins en Vermeulen bleek wederom, dat bijna alle uterus-hoorns der caviae op roggepollen-extract reageerden, of ze overgevoelig gemaakt waren voor deze stof of niet. Van de 98 onderzochte dieren bleken er 83 positief te reageeren. De proeven zijn daarna voortgezet en nu bleek de latente periode der reactie van het roggepollen-extract gelijk te zijn aan die van histamine. Bij 23 histamine-reacties was de latente periode gemiddeld 5.1 sec., bij 23 roggepollen-extract-reacties gemiddeld 4.5, terwijl het gemiddelde voor een specifieke reactie veel hoger ligt (20—40 sec.)

Ook werden de proeven met roggepollen-extract en histamine voortgezet op de uterus-hoorns van katten en ook deze bleken gelijk te verlopen.

Ook wat andere eigenschappen betreft, als gewenning, lichte uitwaschbaarheid en bij hooge dosis sterke contractie met rhythmische tonische samentrekkingen bleken deze gelijk te verlopen. Dat de reactie van het roggepollen-extract niet veroorzaakt werd door eiwitten of hoogere albumosen, blijkt hieruit, dat ook het ultrafiltreat de zelfde reacties vertoont als het vol-extract, terwijl de filterrest in het geheel geen reactie vertoonde.

Daar deze methode zeer gevoelig is (sommige uteri reageeren nog bij een verdunning van histamine 1 : 400.000.000), zijn hiermede proeven genomen om de sterkte van de histamine-achtige stof in

roggepollen-extract te bepalen, door vergelijking met histamine-oplossingen van verschillende sterkte.

§ 2. Methodiek.

Voor deze proeven werd dezelfde methodiek gebruikt, als beschreven is in de dissertatie van B. S. Vermeulen.

Ik kan dus volstaan met een korte beschrijving om voor bijzonderheden en voor de te nemen voorzorgen naar genoemd proef-schrift te verwijzen.

Er werd gebruik gemaakt van een elektrische thermostaat, geregeld op 37° C., waarin twee glazen cylinders A geplaatst zijn. Met twee klemmetjes wordt de hoorn P bevestigd en door een draadje verbonden met een hefboom, welke de contracties van de uterus registreert op een beroete trommel. Als vloeistof werd gebruikt die van Dale—Ringer, welke de volgende samenstelling heeft:

NaCl	9.0
K Cl	0.42
CaCl ₂	0.12
Dextrose	1.0
NaHCO ₃	0.5
Aq.dest.	1000.

De sterkte van de roggepollen-extracten wordt aangegeven in E(enheden), welke E(enheid) de werkzame stof van 0.001 mgr. pollen bevat. Een 3 % oplossing pollen-extract beteekent dus dat 1 c.M. 30.000 E. bevat. Als oplosmiddel wordt gebruikt de buffer-vloeistof van Coca, waarvan de samenstelling als volgt is:

NaCl pur.	2.50
NaHCO ₃ pur.	1.25
Phenol	2.0
Aq.dest.ster.	500.0

Enkele dieren waren voorbehandeld, andere niet met een of andere stof.

Er werd nu nagegaan, welke hoeveelheid van roggepollen-extract nog net een reactie gaf (in de tabel aangeduid met + of —) en hetzelfde ook bepaald voor een histamine-oplossing, die met het oog op de groote gevoeligheid der uterushoorns ter sterkte van 1 : 100.000 gekozen werd.

§ 3. Resultaten.

In de volgende tabellen is het beloop der proeven aangegeven en

wel in de eerste kolom de hoeveelheden histamine 1 : 100.000 in c.M.³, in de tweede de hoeveelheid volle roggepollen-extract, in de derde de reacties met het ultrafiltraat, dan in de vierde met de gebruikelijke teekens het al of niet reageeren der hoorns en de sterkte der reacties en in de vijfde de opmerkingen en het nummer der gebruikte extracten.

	Histamine 1 : 100.000	Roggepollen vol extra	Roggepollen ultr. filtr.	Reactie	Opmerkingen en nummer van pollen ext
Cavia 147.	0.2 0.05 0.2	0.3 0.4		+ + — + +	X X
Hoorn 1.				± +	
Hoorn 2.	0.2			+	
	0.05			—	
	0.05			+	niet ver- verscht.
	0.05			+ +	
	0.05			+ + +	
	0.02			in tonus	X
		0.2		±	
		0.2		+	
		0.2		+ +	niet ver- verscht.
		0.2		+ + +	
		0.8		in tonus	
Cavia 148.	0.2 0.3	0.2 0.4 0.3		— —	X X X
Hoorn 1.	0.4			+	
				—	
				+	
				—	
Cavia 149.		1.0 0.3	0.3	+ + + —	XI XI
Hoorn 2.		0.5		+	XI
				+	XI
	0.3			+	
Cavia 150.	0.3 0.2		0.4 0.5	+	XI XI
Hoorn				±	
1.				—	
				±	

	Histamine 1 : 100.000	Roggepollen vol extract	Roggepollen ultr. filtr.	Reactie	Opmerkingen en No. v. h. pollenextr.
Cavia 152	0.3			+ +	
Hoorn 1.	0.15 0.1	0.1		+ + +	XI
Hoorn 2.	0.2 0.15	0.1		+ ± +	XI
Cavia 153	0.3			+ + +	
Hoorn 1.	0.1 0.05 0.025			+ + + + +	
			0.1 0.05 0.075	+ + — +	
		0.075 0.1 0.15 0.2		— — — +	
			0.05	—	

	Histamine oplossing	Hoeveelh.	Roggepollen extract	Ultra- filtr.	Reactie	No. van het pollenextr.
Cavia 154	1:500.000	0.1			—	
	"	0.2			—	
	"	0.3			—	
Hoorn 1.	"	0.5			—	
	1:50.5000	0.1			— ?	
			0.2		— ?	X
			0.4		+ +	X
Hoorn 2.	1:50.000	0.1			+	
	1:50.000	0.1			+ +	
	1:500.000	0.1			—	
	"	0.2			—	
	"	0.3			—	
	"	0.5			—	
	"	0.7			—	
	"	1.0			—	
	"	2.0			+	
Cavia 156	1:100.000	0.1			+ + +	
Hoorn 1.	1:500.000	0.1			—	
	"	0.2			+	
			0.5		+ + +	XII
			0.1		+	XII
			0.05		—	XII
				0.1	+	XI
			0.1		+	XI
Hoorn 2.			0.1		+	XII
	1:100.000	0.1			+	
Cavia 157	1:100.000	0.1			+	
	(2 Jan.)					
Hoorn 1.	1:100.000	0.1			+ +	
	(5 Jan.)					
	1:100.000	0.1			+ + +	
	(6 Jan.)					
Hoorn 2.	1:100.000	0.1			+	
			0.1		+	XII
	1:100.000	0.1			+	

Zooals uit de tabellen te zien is blijkt deze methode door haar gevoeligheid zeer geschikt te zijn voor de beoogde waardebeoordeling. Ook blijkt de drempelwaarde voor het opwekken van contracties van de verschillende uteri zeer verschillend te zijn. De vergelijking tusschen de sterkte van roggepollen-extract en histamine kan men nu zoo stellen, dat men voor beide stoffen de drempelwaarde neemt. Men ziet dan uit de tabellen, dat met een oplossing van histamine 1 : 100.000 men iets kleinere hoeveelheden noodig heeft als met het roggepollen-extract; dus er zit in 1 c.c. roggepollen-extract iets minder dan $\frac{1}{100}$ mgr. histamine-achtige stof, terwijl bij de huidproeven iets meer dan $\frac{1}{75}$ mgr. per c.c. gevonden werd, zooals hieronder volgt.

In het volgende hoofdstuk zal men zien dat bij de proeven op de huid een gemiddelde sterkte van de histamine-achtige stof van roggepollen bepaald is op 1 : 75.000.

Dat de sterkte van het roggepollen-extract bij de proeven op de cavia-uterus lager ligt dan bij de huidproeven, is misschien te verklaren door de minder snelle en moeilijker diffusie van het roggepollen-extract in vergelijking met die van histamine-oplossingen. Tusschen de verschillende oplossingen van de roggepollens, die op verschillende tijdstippen vervaardigd zijn, bleek weinig verschil te bestaan, zoodat men hieruit kan afleiden, dat de sterkte van de histamine-achtige stof niet merkbaar achteruit gaat.

Duidelijk verschil in sterkte tusschen het vol-extract en het ultrafiltraat is hier niet aantoonbaar. In het betrekkelijk klein aantal proeven werd gevonden dat alle uteri reageerden op roggepollen-extract of het ultrafiltraat. Met de filterrest werd nooit een reactie gezien.

Bij een enkele opzettelijk daartoe genomen proef kon het door Vermeulen gevonden feit bevestigd worden, dat met het roggepollen-extract evenals met histamine de uterus van de cavia in steeds sterker contractie te brengen is, als men steeds extract toevoegt zonder te ververschen, terwijl ten slotte de spier in volledige tonus geraakt (zie cavia 147).

HOOFDSTUK III.

Huidreacties.

Inleiding.

Een van de kenmerkende eigenschappen van histamine en aanverwante stoffen is het geven van een bepaalde reactie op de huid. Deze bestaat in hoofdzaak uit het optreden, na een zekere tusschenpoos, van een zuchtig gezwollen omschreven plek (quaddel) op de plaats van inbrengen van de stof en van een roode hof er omheen. Th. Lewis heeft bovendien aangegeven, dat deze beide reacties voorafgegaan worden door een omschreven roodheid om de insteekplaats, die onmiddellijk optreedt en spreekt dan ook van een driedelige reactie.

Door Benjamins en Vermeulen is gevonden, dat het extract van roggepollen bij gezonde menschen, zoowel als bij hooikoortslidders een reactie geeft, die veel overeenkomst vertoont met die teweeggebracht door histamine. Het is dus mijn opgave om de huidreacties van histamine en roggepollen-extract op verschillende wijzen met elkaar te vergelijken.

Nadere bijzonderheden over het tot stand komen van deze reacties worden later in § 3 besproken.

§ 1. Methodiek.

Om de te onderzoeken stoffen in de huid in te voeren zijn verschillende methodes bekend, die achtereenvolgens besproken zullen worden.

a. *Schrapjesmethode.* Deze behoort tot de oudste methodes. Reeds in 1873 gaf de Engelsche arts Blackley aan, dat wanneer men bij lidders aan hooikoorts roggepollen op in de huid gemaakte schrapjes wreef, er quaddels optraden.

Later is deze methode door Schlosz en door Walker uitgebreid voor verschillende stoffen, om de eventuele overgevoeligheid tegen die stoffen na te gaan.

Men bezigt daarvoor een scherp pennetje, waarmede men de hoornlaag slijt, er echter zorg voor dragend, dat men niet zoo diep

komt, dat er bloeding optreedt. Daarna wrijft men er de verschillende stoffen met een spateltje in en wacht dan 10 minuten. Bij menschen, die een overgevoeligheid bezitten, ziet men dan een groote quaddel met daaromheen een roode hof optreden. In de grootte van de quaddel heeft men dan een zekere maat, wat betreft de overgevoeligheid van de proefpersoon.

Een aantal stoffen geven echter bij bijna iedereen een quaddel (zie hieronder), waarvan alleen histamine voor ons van belang is.

Voor het vaststellen van het al of niet reageeren van de huid op bepaalde stoffen is de methode om haar eenvoudig zeer geschikt. Een bezwaar echter is, dat men geen juist inzicht krijgt in de hoeveelheid stof, die in een bepaalden tijd opgenomen wordt, waardoor de methode slechts voor grovere quantitatieve metingen te gebruiken is.

b. Een andere methode om stoffen in de huid in te voeren is die welke is aangegeven door *Th. Lewis*.

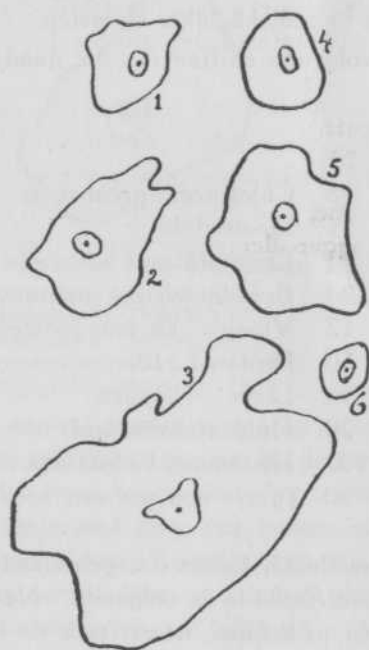


Fig. 1.

Methode van Lewis,

- 1 = histamine 1 : 100.000.
- 2 = histamine 1 : 50.000.
- 3 = histamine 1 : 1.000.
- 4 = roggepollen-extract no. 14, vol extract.
- 5 = roggepollen-extract no. 14, ultrafiltraat.
- 6 = physiol. NaCl.

Hierbij wordt een druppel van de te onderzoeken stof op de huid gebracht en daarna door de druppel heen een klein gaatje in de huid geprikt, ook weer niet zoover dat er bloeding optreedt. De druppel wordt dan voorzichtig weggeveegd na twee minuten. Men wacht dan tot zeven minuten na het prikken en ziet achtereenvolgens drie reacties optreden. (Fig. 1.)

1e. een roode hof, direct na het inprikken;

2e. treedt na eenige seconden een diffuse gevlekte roodheid, de zgn. „roode hof” op, een reflexerytheem;

3e. na 1 à 2 minuten begint zich een quaddel te ontwikkelen.

Deze methode geeft goede resultaten, vooral indien men als inprikplaats de huid van den rug neemt. Bovendien leent hij zich goed, doordat de mechanische beleediging niet zoo sterk is, voor onderzoeken met stoffen, die slechts geringe reacties teweeg brengen. Er treedt weliswaar slechts een matige reactie op, maar de verschillen zijn des te gemakkelijker te meten.

Lewis geeft de volgende stoffen op, die quaddelvorming op de huid geven:

	concentr.	
Zoutzuur	1 : 20	
Melkzuur	1 : 5	Chloroform geconcentr.
Mierenzuur	1 : 5	Mosterdolie „
Formaldehyd	1 : 10	Canthariden 1 : 20.
Na.hydroxyd	1 : 20	Brandnetelsteek natuur.
Ag.nitraat	1 : 12	Vlooiën- en muggensteek natuur.
Cu.sulfaat	1 : 10	Pepton 1 : 10.
Sublimaat	1 : 18	Lever — longen.
Jodium	1 : 20	Huidextr. verdund.
Morphine	1 : 100	Histamine 1 : 500.000.
Sulf.atropini	1 : 50	(geeft nog net een roode hof, geen quaddel).

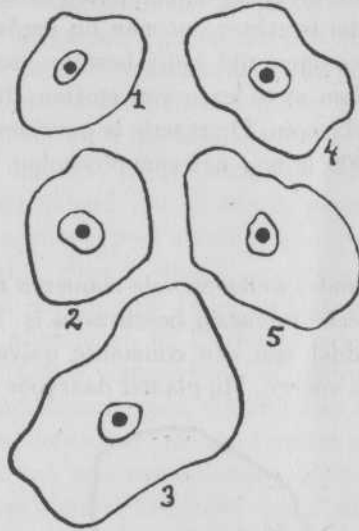
c. Een andere methode, zooals o.a. gebruikt is bij de onderzoeken van *Török* en *Rajka* is de volgende. Na eerst een druppel op de huid gebracht te hebben, neemt men de naald van Pirquet en draait deze b.v. 10 maal rond. Na twee minuten neemt men de vloeistof weg en na enkele minuten treedt een scherp begrensd quaddeltje op met een roode hof er omheen (fig. 2). Wij hebben dus feitelijk te doen met een gewijzigde methode van Lewis.

De quaddels, welke men met deze methode verkrijgt, varieren al

naar gelang van de sterkte der ingebrachte stof en de grootte der bultjes komt goed overeen met de verschillende concentraties die men gebruikt.

Maar ook bij deze methode heeft men het nadeel, dat men de hoeveelheid, welke men invoert, niet doseeren kan, terwijl de maten, bij het naderen van de drempelwaarde, te klein zijn ter nauwkeurige

Fig. 2.



Methode van Thörök en Rajka.

- 1 = histamine 1 : 100.000.
- 2 = histamine 1 : 75.000.
- 3 = histamine 1 : 50.000.
- 4 = roggepollen-extract no. 14, 3% vol extract.
- 5 = roggepollen-extract no. 14, 3% ultrafiltraat.

vergelijking. Een ander bezwaar is, dat de belediging van de huid door de boor van v. Pirquet grooter is, dan die met een gewone naald. Lewis heeft aangetoond, dat elke belediging van de huid een histamine-achtige stof doet vrij komen, die de hiervoor genoemde reacties geven kan. Gebruikt men nu het instrument van v. Pirquet zonder meer of door een druppel physiologische keukenzout heen, dan ontstaat reeds een behoorlijke quaddel en een lichte roode hof. Het is nu moeilijk dit louter mechanische effect in rekening te brengen bij de metingen.

d. Beter geschikt, doch wat lastiger in de uitvoering, is de door Cooke voor de kliniek uitgewerkte intracutane methode, waarvan de techniek als volgt is. Na de huid met aether afgewreven te heb-

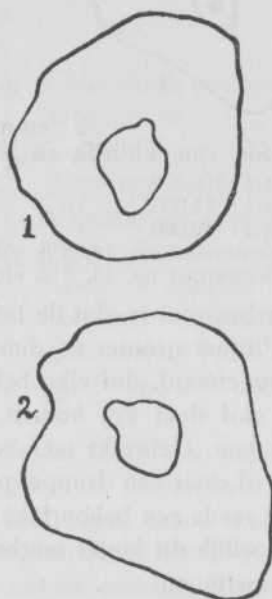
ben, neemt men in de eene hand een injectiespuitje met een dunne scherpe naald, die men nu in de huid prikt, terwijl men met de andere hand de huid spant. Ook hierbij moet men zorg dragen slechts in de oppervlakkige lagen van de huid te steken, zoodat er geen bloeding optreedt. Nu spuit men voorzichtig 0.1 cm^3 in de huid en ziet dan onmiddellijk een quaddeltje optreden. Ook hierbij wacht men weer 10 minuten, alvorens de resultaten af te lezen.

Een bezwaar hierbij is echter dat men nu reeds onmiddellijk een quaddel heeft, die eenigen tijd blijft bestaan, zoodat het moeilijk wordt om de resultaten af te lezen van stoffen, die zelf slechts een zeer geringe quaddel geven. De reactie is gevoeliger dan de andere, histamine 1 : 5.000.000 is nog net van physiolog. keukenzoutoplossing te herkennen.

e. *Iontophorese.*

Een elegante methode, welke op vele manieren regelbaar is, is die, welke door U. Ebbecke uitvoerig beschreven is. Het principe hiervan is om door middel van een constante galvanische stroom de stoffen in de huid te voeren. Hij plaatst daarvoor 2 vloeistofelectro-

Fig. 3.



Methode van Ebbecke.

- 1 = histamine 1 : 200.000. 5 min. 0.4 m.A. 20 V.
2 = roggepollen-extract 3 %. 5 min. 0.4 m.A. 20 V.

den op eenigen afstand van elkaar op de huid van den onderarm en voegt er histamine aan toe (1 : 2000). Na 10 minuten doorstrooming bij ± 0.6 m.A. krijgt men alleen aan de anode een typische huidreactie (quaddel en roode hof) (fig. 3).

Door regeling der stroomsterkte en tijd heeft men een maat om een bepaalde hoeveelheid stof in de huid in te voeren. Hierbij speelt natuurlijk de huidweerstand een groote rol. Deze is n.l. zeer variabel. Daar het alleen maar gelukt om aan één pool stoffen in te voeren, is het beter de electroden anders te kiezen. Zou men immers twee gelijksoortige electroden gebruiken, dan blijkt, dat men uit de weerstandsverandering maar bepaalde gevolgtrekkingen kan maken. De huidweerstand kan b.v. schijnbaar gelijk gebleven zijn; dan bestaat er nog de mogelijkheid, dat hij aan de positieve pool b.v. afgenomen, aan de negatieve pool daarentegen toegenomen is. Hetzelfde kan natuurlijk plaats vinden, wanneer de huidweerstand afneemt. Men weet dan niet of de huidweerstand aan de positieve of negatieve pool afgenomen is. Derhalve moet men zooals reeds door Martinus en Leduc aangegeven is, gebruik maken van een differente en een indifferente pool, waarbij men dan als indifferente pool gewoonlijk een zoutoplossing neemt. Immers steekt men de beide onderarmen in een bak met zoutoplossing, dan blijkt de weerstand van het lichaam niet meer te bedragen dan 3000 Ohm. Steekt men er slechts één hand in en plaatst men op den anderen onderarm een onpolariseerbare vloeistof-electrode, dan blijkt de weerstand van het lichaam toegenomen tot 100.000 Ohm, dat wil dus zeggen dat de weerstand aan de groote electrode, die 1500 Ohm bedraagt, verwaarloosd kan worden tegenover de weerstand aan de kleine electrode, waarvan men nu de veranderingen zuiver op de milliampèremeter kan aflezen.

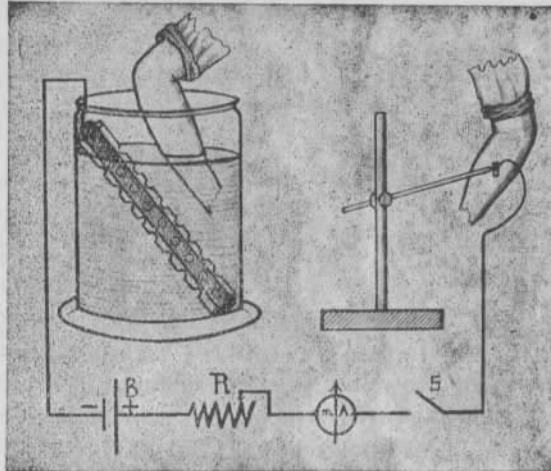
Het verschil in weerstand van de verschillende huidgedeelten kan hier buiten beschouwing blijven, daar bij afname van den weerstand, er in mijn proefopstelling steeds zooveel weerstand bij geschakeld wordt, als noodig is om de stroomsterkte op een bepaald niveau te houden.

Mijn proefopstelling was aldus: (zie fig. 4)

Als indifferente pool werd gebruikt een cylinder gevuld met zoutoplossing, waarin een zinken staaf, welke, om direct contact te voorkomen, geplaatst werd in een glazen buis, met een aantal zijdelingsche openingen, hierin werd de eene onderarm gehouden. Op

de binnenzijde van den anderen onderarm werd een onpolariseerbare electrode geplaatst van de volgende samenstelling (fig. 5). De electrode bestaat uit een glazen cylindertje en een koperen bovenstukje. Op de onderkant van de laatste is een laagje zilver aangebracht, waarvan de oppervlakte door electrolyse omgezet is in zilverchloride.

Fig. 4.



Proefopstelling voor de katadiontophorese volgens Ebbecke.

Op den linkerarm de onpolariseerbare electrode, de rechterarm in een pot met zoutsolutie, waarin een zinken staaf in een doorboorde glazen buis.

B = Batterij. R = Weerstand. S = Sleutel.

Fig. 5.



De onpolariseerbare Electrode.
(beschrijving in de text)

Om dit laagje zilverchloride te verkrijgen verbindt men deze electrode met de negatieve pool van een 10 Volt-batterij terwijl men als positieve pool een platina-draad gebruikt.

Beide elektroden plaatst men nu in een bad met physiologische zoutoplossing en laat gedurende 5—10 minuten de stroom doorgaan. Daarna ziet men dat aan de onderzijde zich een grijsachtig laagje van zilverchloride gevormd heeft. Om constante doorstroming te krijgen behoort men steeds na enkele huidproeven ermee gedaan te hebben de zilverchloridelag opnieuw aan te brengen.

Deze electrode wordt nu zoo vlak mogelijk op de onderarm geplaatst, waarbij men zorg moet dragen dat er geen vloeistof uitloopt, daar anders de toetredende lucht als een belletje naar boven opstijgt en veranderingen in den weerstand van het vloeistofzuiltje teweegbrengt, welke de doorstroming zouden kunnen storen.

Een andere moeilijkheid kan ook nog ontstaan wanneer men het glazen cylindertje te vast op de huid drukt. Na vijf minuten heeft zich dan onder de randen van het glazen cylindertje een indeuking gevormd, welke het beoordeelen van de grootte van den later gevormden quaddel bemoeilijkt.

Om dit te ondervangen werd, zooals op de figuur aangegeven is, de electrode bevestigd aan een ebonieten staafje, dat aan een statief werd bevestigd, maar zóó, dat draaiing om een horizontale as mogelijk bleef. Hierdoor bereikt men, dat de electrode als het ware door haar eigen gewicht op den onderarm blijft drukken steeds met een zachten gelijkmatigen druk, waardoor het vormen van indeukingen wordt vermeden.

Om de stroomsterkte te bepalen wordt in den stroomketen ingeschakeld een micro-ampèremeter, met een schaalverdeling over 2 m.A. Om de stroomsterkte op een bepaalde hoogte te houden wordt een regelbare weerstand van 1000—700.000 Ohm in den keten geplaatst. Als electriciteitsbron wordt gebruikt een accu van 20 V. spanning, terwijl voor opening en sluiting van den keten een sleutel S is ingeschakeld.

Daar de histamine-oplossing licht zuur reageert, moet men dus om de histamine in de huid te drijven, de onpolariseerbare electrode aan de negatieve pool van de batterij aanschakelen.

De binnenvlakte van den onderarm werd genomen, omdat daarop het duidelijkst de quaddels en de roode hof er omheen te onderscheiden zijn. Als doorstromingstijd werd genomen 5 minuten.

De stroomsterkten varieerden van 0.6—1 m.A. Er waren meestal enkele minuten noodig om den weerstand van de huid te overwin-

nen, waarna de stroom opliep. De proefpersoon nam dit waar aan het jeuken en bij het nog sterker worden van den stroom aan een licht brandend gevoel, beperkt tot de plaats van de electrode. Het duurde ± 3 minuten aler een stroomsterkte van 1 m.A. bereikt werd. Was echter als oplosmiddel aqua redistillata gebruikt dan liep de stroom niet hooger op dan tot 0.06 m.A.

Bij deze proeven speelt de individueele gevoeligheid voor de stoffen een groote rol. Daar echter de vergelijkende proeven steeds bij dezelfde proefpersoon gedaan werden, heeft dit niet gehinderd.

Verder werd ervoor gezorgd geen lijders aan hooikoorts of andere overgevoeligheidsziekten voor de proeven te gebruiken.

Ook de concentratie van de gebruikte vloeistof heeft invloed. Dit is gebleken gunstig te zijn voor de ijking van onze roggepollen-extracten. (Later volgen de resultaten, die dit duidelijk maken). Een bron van fouten kan ontstaan door de electriche prikkeling zelf, die ook bestaat in roodheid om een quaddel, maar deze treedt slechts op wanneer gedurende langeren tijd de electriche prikkel ingewerkt heeft.

Om eventuele fouten hierdoor ontstaan uit te sluiten werd steeds onder dezelfde voorwaarden een doorstrooming gedaan met het oplosmiddel. De eenige reactie, die hierbij optrad was slechts een lichte roodheid op de plaats van doorstrooming.

§ 2. Resultaten.

In de eerste plaats heb ik met al de verschillende methoden tot het opwekken van huidreacties kunnen bevestigen wat *Benjamins* en *Vermeulen* reeds gevonden hebben, dat *roggepollen-extract dezelfde huidreacties geeft als histamine* (trias van Lewis). Toen dit vastgesteld was heb ik de huidreacties gebruikt om te bepalen in welke concentratie de histamine-achtige stof in roggepollen-extract voorkomt. Verder om uit te maken of met het cellophaan-filtraat soms meer reactie te verkrijgen is dan met het volle extract. De filterrest toch bevat geen dergelijke stof meer (steeds negatieve huidreacties). Dus alle histamine-achtige stof gaat door de membraan heen.

Nu zou het kunnen gebeuren, dat in het volle extract de werking op de huid tegengehouden werd door de eiwitachtige lichamen, die in het ultrafiltraat ontbreken.

Quantitatieve vergelijking van roggepollen-extract en histamine.

Dit kan aldus gebeuren, dat men de huidreacties verricht met ver-

schillende verdunningen van histamine en dan nagaat met welke verdunning de roggepollen-extract-reactie het meest overeenkomt. (zie fig. 1, 2 en 3). Dit kan dan zoowel met vol extract als met het ultrafiltraat geschieden en op deze wijze ook het tweede vraagstuk benaderd worden.

Thans laat ik eenige protocollen volgen:

I. *Proeven volgens de methode van Ebbecke (Iontophorese).*

	gebruikt aantal Volts	m.A.	tijd van inwerking min.	
18.10.'30				
Rogge V	20	0.4—1.0	5	} quaddel met roode hof. } gelijke groote quaddel. } " " "
Histamine 1 : 20.000	20	0.4—1.0	5	
Histamine 1 : 200.000	20	0.4—1.0	5	
Histamine 1 : 200.000	20	0.4—1.0	2	} quaddel ter grootte v. d. } electrode. } quaddel als vorige.
Rogge V	20	0.4—1.0	2	
18.10.'30.				
Histamine alk. gemaakt met met Na ₂ HPO ₄ tot lakmoes duidelijk blauw	20	0.4	5	quaddel en roode hof.
Rogge V ook alkalisch	20	0.4	5	quaddel als boven.
4.11.'30.				
Rogge-extract VIII	20	0.8	5	} quaddels v. gelijke grootte.
Histamine 1 : 20.000	20	0.8	5	
Rogge VIII 1 : 10	20	0.8	5	} quaddels v. gelijke grootte, } kleiner dan de vorige.
Histamine 1 : 200.000	20	0.8	5	
5.11.'30.				
Rogge-extract IX	20	0.6	5	} quaddels van dezelfde } grootte.
Histamine 1 : 20.000	20	0.1	5	
" 1 : 200.000	20	0.1	5	} quaddels van dezelfde } grootte.
" 1 : 200.000	30	0.08	5	
" 1 : 200.000	20	0.06	5	} quaddels kleiner dan boven, } beide gelijk groot.
" 1 : 200.000	30	0.06	5	
Rogge V	20	0.08	5	oplosmiddel aq.redist.
10.11.'30.				
Filterrest Rogge IV	20	0.08	5	geen reactie.
Filterrest Rogge IV	20	0.6	5	geen reactie.
Dactylis cellophaanfiltraat	20	0.6	5	geen reactie.

	gebruikt aantal Volts	m.A.	tijd van inwerking min.	
Phleumextract	20	0.6	5	geen reactie.
Rogge IX	20	0.6	5	duidelijke quaddel.
11.11.'30.				
Roggefiltraat IV	20	0.4	5	kleine quaddel.
Histamine 1 : 20.000	20	0.4	5	grote quaddel.
" 1 : 200.000	20	0.4	5	quaddel als van Rogge boven.
Rogge VIII	20	0.4	5	iets grootere quaddel.
Histamine 1 : 100.000	20	0.4	5	kleine quaddel.
13.11.'30.				
Dactylis extract 3 %	20	0.8	5	lichte reactie.
Filterrest Dactylis	20	0.8	5	zeer geringe reactie.
Filtraat Dactylis	20	0.8	5	geen reactie.
Rogge-extr. VIII in phys. Na Cl	20	0.8	5	} ongeveer gelijke quaddels.
Ultrafiltraat Rogge VIII in phys. NaCl-opl.	20	0.8	5	
Histamine 1 : 20.000 in phys. NaCl-opl.	20	0.8	5	quaddels als. van Rogge.
Histamine 1 : 100.000 in phys. NaCl-opl.	20	0.8	5	kleinere quaddel.
Phys. Zoutsolutie	20	0.8	5	geen reactie.
14.11.'30.				
Dactylis cellophaanfiltraat	20	0.8	5	geen reactie.
" vol extract	20	0.8	5	geen reactie.
" filterrest	20	0.8	5	lichte reactie.
Rogge VIII filterrest	20	0.8	5	geen reactie.
" " ultrafiltraat	20	0.8	5	quaddel.
" " vol extract	20	0.8	5	zelfde quaddel.
17.11.'30.				
Rogge-extract IX	20	0.8	5	} dezelfde quaddel.
" " ultrafiltraat	20	0.8	5	
" " filterrest	20	0.8	5	geen reactie.
18.11.'30.				
Rogge-extract IX	20	0.3	5	} quaddels van dezelfde grootte.
" " ultrafiltraat	20	0.3	5	
" " filterrest	20	0.3	5	geen reactie.
Dactylis cellophaanfiltraat	20	0.6	5	geen reactie.

Choline 1 : 100	20	0.3	5	geen quaddel, lichte roodheid.
Histamine 1 : 40.000	20	0.6	5	quaddels als van Rogge.
19.11.'30.				
Acetylcholine 1 : 1000	20	0.8	5	lichte roodheid, geen quaddel.
„ 1 : 100	20	0.8	5	kleine quaddel.
Physiol. Zoutsol.	20	0.8	5	lichte roodheid, geen quaddel.
20.11.'30.				
Acetylcholine 1 : 1000	20	0.8	5	geen quaddel, lichte roodheid.
Physiol. zoutsolutie	20	0.8	5	lichte roodheid.
19.12.'30.				
Histamine 1 : 100.000	20	0.8	5	quaddels gelijke grootte.
Rogge XI ultrafiltraat	20	0.8	5	
„ „ vol extract	20	0.8	5	

II. Proeven volgens Török en Rajka.

(boor van v. Pirquet door vloeistofdruppel heen.)

In deze eerste reeks proeven werd de methode van Lewis nog niet gebruikt.

26.11.'30.

Histamine 1 : 100.000	}	quaddels slechts gemeten.
„ 1 : 75.000		De grootte v. d. Roggequaddel tusschen
„ 1 : 50.00		75.000 en 100.000 histamine.
Rogge-extract XI ultrafiltraat		

2.12.'30.

Histamine zonder phenol	}	quaddels slechts gemeten. Roggequaddel = histamine 1 : 75.000.
1 : 50.000		
1 : 75.000		
1 : 100.000		
Rogge XI ultrafiltraat		

6.12.'30.

Roggepollen ultrafiltraat XI	duidelijke quaddel.
Roggepollen vol extract XI	iets minder groote quaddel.

17.12.'30.

Histamine 1 : 100.000
 Roggepollen ultrafiltraat XI
 Roggepollen-extract XI
 Roggepollen ultrafiltraat
 verdund 1 : 1
 " " 1 : 2

} quaddels van Rogge grooter.

 quaddel overeenstemmend hist. 1 : 100.000.
 bijna geen quaddel.

19.12.'30.

Histamine 1 : 100.000
 Ultrafiltraat Rogge XI
 Vol extract Rogge XI

} quaddels van gelijke grootte.
 quaddel duidelijk kleiner.

III. *Proeven volgens intracutane methode.*

15.11.'30.

Histamine 0.1 c.c.
 1 : 150.000
 1 : 100.000
 1 : 50.000
 1 : 20.000
 Rogge ultrafiltraat
 Rogge vol extract 0.1 c.c.
 Histamine 1 : 20.000 0.1 c.c.

} grootte evenredig met concentratie behalve
 1 : 20.000 (te dicht bij de pols).

 quaddel ter grootte v. nist. 1 : 100.000.
 } ongeveer gelijke quaddels.

24.11.'30.

NaCl oplossing 0.9 %
 Rogge 3 % extract

 Acetylcholine 1 ‰

 Histamine 1 : 50.000

geen quaddel.
 doorsnede quaddel 10 m.M.,
 doorsn. roodh. 25 m.M.
 doorsnede quaddel 10 m.M.,
 doorsn. roodh. nauwelijks 25 m.M.
 doorsnede quaddel 13 m.M.,
 doorsnede roodh. 30 m.M.

Datum.	Rogge-extract.		Overeenkomende sterkte der histamineoplossingen.		
			Intracutaan	Török en Rajka.	Ebbecke.
16.10	V	vol extract	>1:100.000		
4.11	VIII	" "			1: 20.000
	VIII	" "			1:200.000
	1/10				
14.11	V	" "			1: 20.000
	V	" "			1:200.000
	IX	" "			1: 20.000
	IV	ultrafiltr.			1:200.000
13.11	VIII	vol extract			>1:200.000
	VIII	" "			1: 20.000
15.11	VIII	ultrafiltr.			1: 20.000
	IX	" "	1:100.000		
	IX	vol extract	1: 20.0000		
	IX	ultrafiltr.			1: 40.000
24.11	X	vol extract	<1: 50.000		
	XI	filtraat		1: 75.000	
				1:100.000	
2.12	XI	"		1: 75.000	
17.12	XI	"		>1:100.000	
	XI	"		1:100.000	
	1/2				
19.12	XI	vol extract		1:100.000	
	XI	filtraat		1:100.000	
5.1 '31	XII	vol extract		1: 75.000	
				1:100.000	
	X	" "		1: 75.000	
				1:100.000	
	XI	filtraat		1: 75.000	
				1:100.000	

Overzien wij de samenvattende tabel, dan leeren wij daaruit, dat met de methode volgens Ebbecke geen fijnere differentiatie te verkrijgen is. Het verschil in grootte van de verschillende quaddels is te gering, dan dat met eenige nauwkeurigheid de verschillende grootten vastgesteld kunnen worden tusschen de rogge-quaddels en de histamine-quaddels, om daaruit de sterkte van de histamine-achtige stof uit de roggepollen te bepalen.

De groote verschillen, met deze methode verkregen, moeten ook

voor een deel toe te schrijven zijn aan het verschil in sterkte van de verschillende histamine-oplossingen in den handel.

Daar op de vorige wijze geen betrouwbare uitkomsten te verkrijgen waren, is overgegaan tot de methode van Török en Rajka, welke een groote vereenvoudiging met zich mee bracht. Hierbij werden wat meer constante resultaten verkregen. Daar wij echter de tot nu toe gebruikte histamine-oplossingen uit den handel niet meer vertrouwden, is een geheel nieuwe proefreeks begonnen met zelf bereide oplossingen, die gemaakt werden van het cristallijne zoutzure zout van histamine. In deze nieuwe reeks proeven werden slechts de methode van Lewis en die van Török en Rajka gebruikt. Waar wij niet zeker waren van de houdbaarheid van onze zelfbereide oplossingen, hebben wij in de eerste plaats over eenigen tijd verschillende verdunningen van het zoutzure histamine opgelost in physiologische keukenzoutopl. of in de buffer-vloeistof van Coca op dezelfde proefpersoon beproefd en wel steeds op de rugheid. Uit de hieronder volgende tabel kan men zien, dat de huidreacties van de oplossingen 1 : 1000, 1 : 50.000 en 1 : 100.000 niet veranderen in sterkte. Terwijl wij in den beginne voor alle zekerheid elken dag een versche oplossing maakten, is dit na het vaststellen van de houdbaarheid van de oplossing verder achterwege gebleven.

De intensiteit van de huidreacties werd op de volgende wijze gemeten. Eerst werd 7 minuten na het aanbrengen van de prik bij de proef volgens Lewis, of van de boorlaesie bij die volgens Török, op een stuk film de omtrek nagetrokken van de quaddel en van den rooden hof. Later werd dan van beide de oppervlakte gemeten met een planimeter en de gevonden waarden opgeschreven. Deze methode van grootte-bepaling is door *Storm van Leeuwen* aangegeven, doch door hem worden de huidreacties op de huid zelf met inkt omrand en dan met de planimeter gemeten. Een bezwaar is, dat voor kleine oppervlakten de metingen onnauwkeurig worden. Een tweede bezwaar is, dat bij het omgrenzen van den rooden hof een subjectieve factor meespreekt. Immers zal de een de grenzen verder localiseeren dan de ander.

Histamine.

Methode volgens Török en Rajka.

Datum	Bereiding	1:100.000		1:50.000		1:1000	
		roode hof	quaddel	roode hof	quaddel	roode hof	quaddel
31.1.'31	27.1	3.33	0.25	6.53	0.33	16.67	0.63
T.B. 2.2.'31	27.1	4.91	0.32	7.50	0.45	15.10	0.45
30.1.'31	27.1	3.92					
	28.1	3.50					
S.N.	29.1	3.96					
	30.1	3.95					

Methode volgens Lewis (slechts roode hof gemeten)

2.2.'31 T.B.	27.1	0.83		2.10		7.45	
5.2.'31 T.B.	27.1	1.03		2.08		10.10	
6.2.'31 T.B.	27.1	1.4		1.7		12.7	
12.2.'31 T.B.	27.1	0.95		3.12		12.23	
18.3.'31 T.B.	27.1	1.—		2.80		8.90	
30.1.'31	27.1	0.43					
	28.1	0.39					
S.N.	29.1	0.46					
	30.1	0.51					
3.2.'31 A.T.	27.1	2.29		4.9		22.6	
6.2.'31	27.1	1.75		3.3		12.6	
10.2.'31	27.1	2.1		5.1		16.5	

Zooals uit vorenstaande tabel te zien is, zijn de getallen zeer goed met elkaar te vergelijken. Wel zijn er groote verschillen waar te nemen bij de personen onderling, maar vergelijkt men de getallen van den rooden hof bij dezelfde persoon, op verschillende data genomen, dan is uit die waarnemingen niet tot een achteruitgang te besluiten, vooral wanneer men de subjectieve factor bij de bepaling van de grootte van den rooden hof mederekent. Daarenboven komt nog, dat het optreden van de roode hof niet een langzaam voortschrijdende is, maar vleksgewijze.

Maar steeds ziet men bij de verschillende histamine-oplossingen een grooter worden van de quaddel en roode hof evenredig aan de sterkte van de oplossing.

De verschillen bij de verschillende personen berusten op meerdere of mindere gevoeligheid van de huid.

In het begin werden de quaddels ook gemeten, doch daar deze oppervlakten te klein zijn om daarop vergelijkingsproeven te baseeren, werd later alleen maar de grootte van den rooden hof na 7 à 8 minuten als maatstaf genomen.

*Bepaling sterkte roggepollen-extract, vergeleken met
histamine-oplossingen.*

I. Volgens Török en Rajka.

Datum.	1:100000	HISTAMINE.			ROGGEPOLLEN.		
		1:75.000	1:50 000	1:1000	Voextr.	Ultrai	No. v. h. Pollenextr.
8.1.'31 P.	1.8	4.8	6.7		0.8	1.4	XII
13.1.'31 B.R.	0.4	1.4	1.7		1.1	1.4	XIII
14.1. G.B.	1.1	2.2	3.6		1.4	3.0	XIII
16.1. v.d. W.	1.5	2.5	5.5		2.8	4.6	XIV
19.1. L.S.	2.	3.4	6.7		1.7	1.2	XIV
23.1. J.R.	3.75	4.9	5.6		3.1	5.9	XIV
24.1. J.L.	1.2	5.1	6.8		2.1	2.6	XIV

II. Volgens Lewis.

3.2 A.T.	2.29		4.9	22.6	0.5	1.95	XV
6.2 A.T.	1.75		3.3	12.6	2.0	2.7	XV
10.2 A.T.	2.1		5.1	16.5	1.4	3.1	XV
14.2. H.W.	0.24		1.0	6.85	0.4	0.5	XV
16.2. T.B.	1.4		1.7	12.7	0.9	1.9	XV
18.3 T.B.	1.—		2.8	8.9	op $\frac{1}{3}$ ingedampt ultrafiltraat 2.8		XVI

Uit vorenstaande tabel blijkt, dat het verschil tusschen vol extract en ultrafiltraat van de roggepollens, bijna altijd ten gunste van de ultrafiltraten uitvalt.

Waarop de enkele gevallen van het sterker zijn van de volle extracten berusten, is moeilijk op te geven, waarschijnlijk berusten zij op een fout in de techniek. Vergelijken wij nu de verschillende histamine-oplossingen met de roggepollen-extracten, dan blijkt, dat de grootten der laatsten bijna altijd ligt tusschen histamine 1 : 100.000 en histamine 1 : 75.000. Enkele malen zijn de quaddels iets grooter dan die van histamine 1 : 75.000, doch kleiner dan histamine 1 : 50.000. Een duidelijk verschil in afname van sterkte van de pollenextracten is ook niet te vinden, evenmin van groote verschillen van de verschillende extracten.

Met de filterrest zijn ook huidreacties verricht, doch hierbij was de reactie niet veel grooter dan bij een physiologische zoutsolutie.

Conclusies van § 2.

Uit deze cijfers leeren wij:

10. dat de huidreacties met de verschillende roggepollen-extracten nog al goed met elkaar in sterkte overeenkomen;

20. dat de roggepollen-extracten, wat de stof aangaat, die deze reacties teweegbrengt, niet in sterkte achteruit gaan;

30. dat de huidreactie met het cellophaanfiltraat van roggepollenextract in den regel een sterkere reactie geeft dan die met het volle extract;

40. dat de filterrest van roggepollenextract geen reactie geeft;

50. dat de sterkte van de huidreacties van roggepollen-extract overeenkomt met die van histamine-chloride-oplossing in een verdunning tusschen 1 : 50.000 en 1 : 100.000, dus ongeveer met een oplossing van 1 : 75.000.

§ 3. Proeven over de vorming van quaddel en rooden hof.

Van belang leek het om het ontstaan van de huidreacties nader te bestudeeren en daarbij na te gaan of de reacties van rogge-extract aan dezelfde wetten gebonden zijn als die van de histamine.

Van de drieledige reactie volgens Lewis zullen wij de eerste, als zijnde de minst beteekenende buiten beschouwing laten en alleen behandelen de quaddel en den rooden hof.

Wat de histamine *quaddel* betreft, daarover is men het vrijwel

eens, dat deze berust op directe inwerking van histamine op den vaatwand, die doorlaatbaar wordt. De quaddel is dus een plaatselijk oedeem en groeit naarmate histamine door de lymphebanen van de huid verder gevoerd wordt.

Over het ontstaan van den *rooden hof* is men het niet zoo eens. Langen tijd heeft men gemeend, dat de roode hof gebonden was aan een intacten reflexboog via het ruggemerg. Later is gebleken dat dit niet juist is, daar de reactie o.a. ook optreedt bij versch doorsneden sensibele zenuw. *Bruce* (vermeld door *Lewis*) toonde dit aan voor de reactie van mosterdolie op het oogbindvlies. Bestaat echter de zenuwdoorsnijding langen tijd, dan treedt de plaatselijke reactie niet meer op. Hij meende daaruit te mogen besluiten, dat voor het optreden der reactie de perifere sensibele zenuwtakjes noodig zijn en dat de reactie dus a.h.w. een „axonreflex” voorstelt.

Later heeft men deze proeven op allerlei wijzen gevarieerd en ook op histamine toegepast. Men heeft bij versche en oude verwondingen van gevoelszenuwen de reactie nagegaan, ook hebben *Lewis*, *Grant* en *Harris* opzettelijke doorsnijdingen uitgevoerd en op verschillende tijdstippen nagegaan hoe de reactie verliep. In het algemeen zijn de resultaten van *Bruce*, ook voor histamine en op de huid, bevestigd, d.w.z. de reactie blijft eenigen tijd na de doorsnijding van een sensibele zenuw in het verzorgde gebied bestaan, doch bij het degenereren van de zenuw houdt de secundaire histamine-roodheid op te verschijnen.

Bij een patiënte, die ons op verzoek door de chirurgische afdeling werd toegezonden en bij wie voor twee weken de nervus medianus was doorgesneden, is de huidreactie met histamine volgens *Lewis* en *Török* en *Rajka* verricht. Daarbij bleek, dat op de gevoelloze plekken geen en op de nog sensibele plekken wel reactie was op te wekken.

Het is vooral *Lewis*, die deze gang van zaken op dezelfde wijze als *Bruce* verklaart, n.l. door aan te nemen, dat histamine geen directe werking op den vaatwand heeft, doch een indirecte, via de sensibele zenuwtakjes in de huid, een echte axonreflex dus.

Volgens *Lewis* wordt de roode hof veroorzaakt door verwijding van de kleinste arteriolae. De reflex zou nu zóó verlopen, dat histamine de sensibele vezels prikkelt, de prikkel wordt geleid naar andere sensibele takken, die in fijnste vezeltjes om de bloedvaten heen liggen (volgens *Woollard*, naar *Lewis* meldt), zoodat deze

vaten daardoor beïnvloed worden. Dit is dan de sensorische axon-reflex-theorie (zie fig. 13).

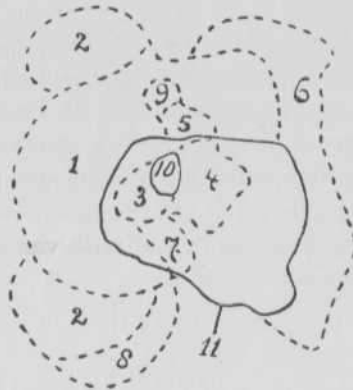
De sensibele zenuwen, die de reflex geven, zouden zoowel in de diepe als in de oppervlakkige lagen van de huid liggen.

Krogh neemt ook wel een reflectorische werking aan, doch stelt zich het mechanisme anders voor. Vooreerst neemt hij aan, dat ook de capillairen en kleinste venen aan de actieve hyperaemie deelnemen en verder zou alleen het in de cutis verloopende zenuwnet voor de reflex dienen.

Dit komt overeen met hetgeen *Török* en *Rajka* vonden, n.l. dat diepe subcutane injectie van novocaïne het optreden van den rooden hof niet verhindert.

Men heeft in het algemeen bij deze proeven weinig gebruik ge-

Fig. 13.



- | | |
|----------------------------|------------|
| 1 = roodheid opgetreden | na 1½ min. |
| 2 = " " " | na 2 min. |
| 3 = uitlooper v. quaddel | na 2½ min. |
| 4 = " " " | na 3 min. |
| 5 = " " " | na 3½ min. |
| 6 = roodheid opgetreden | na 4 min. |
| 7 = uitlooper quaddel | na 4½ min. |
| 8 = roodheid opgetreden | na 5 min. |
| 9 = uitlooper v. quaddel | na 6 min. |
| 10 = intracutaan histamine | 1 0/100. |
| 11 = novocaïne quaddel. | |

maakt van anaesthetica. *Lewis* verwerpt ze geheel, hoofdzakelijk om de locale reactie die ze zelf reeds zouden geven.

Toch zal men hieronder zien, dat het toepassen van allerlei combinaties van proeven het mogelijk maken, gegevens te verschaffen,

die niet met de sensorische axonreflex-theorie in overeenstemming te brengen zijn en een andere verklaring verlangen, waarover hieronder meer. Eerst zal ik de genomen proeven beschrijven.

Hierbij werd de volgende gedachtengang gevolgd: indien het ontstaan van den rooden hof op een sensorische axon-reflex berust, moet deze uitblijven indien men op en om de plaats van aanwending van histamine een uitgebreide anaesthetische huid-zone maakt. Het anaestheticum mag zelf geen reactie geven en moet in alle lagen van de huid ingespoten worden om alle tegenkantingen van te voren uit te schakelen.

Er werden beproefd tutocaïne (0.2 %), percaïne (0.01 %) en novocaïne (1 %).

Hierbij bleek dat percaïne en tutocaïne een vaatverwijdenden invloed op de huid veroorzaakten. Om de quaddels van deze stoffen trad een groote roode hof, welke na $\pm$ 20 minuten nog niet verdwenen was.

Slechts novocaïne bleek bruikbaar. Weliswaar treedt na de inspuiting een roode of rose verkleuring op, maar na 10—15 minuten verdwijnt deze of is zóó gering, dat men er geen last van heeft bij de beoordeeling, terwijl de anaesthetische werking nog volkomen is. (Natuurlijk moet elke bijmenging van adrenaline angstvallig worden vermeden).

De proeven werden genomen op de huid van de buigzijde van den onderarm of op die van den rug.

Eerste proef.

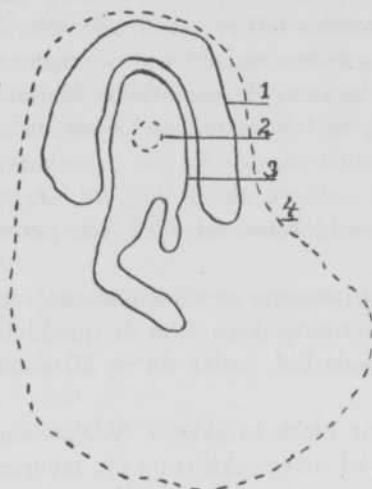
I. 13.10.'30. Er wordt in den onderarm met novocaïne een wal opgespoten in den vorm van een niet geheel gesloten cirkel, daarna wordt in het midden in de niet voorbehandelde huid 0.1 c.c. histamine 1 ‰ ingespoten. Er ontstaat een quaddel met roode hof, zich in den beginne alleen uitbreidend aan den kant van de opengelaten sector, doch na 10—20 minuten ook over den wal van de novocaïne heen. (Zie fig. 6).

II. Gelijke deelen van novocaïne en histamine 1 ‰ (0.1 c.c. van elk) worden intracutaan ingespoten tegelijkertijd. Er treedt een quaddel op met rooden hof van dezelfde grootte als verkregen is met inspuiting van histamine alleen.

III. Er wordt, gelijk hierboven onder I, een cirkel opgespoten met physiologische zoutoplossing. Er treedt onmiddellijk roodheid op, die weer verdwijnt. Daarna wordt histamine 1 ‰ 0.1 c.c. intracu-

taan in het midden ingespoten. In het begin optreden van een quaddel, zich uitbreidend door de open sector, na enkele minuten ook door den wal van de physiol. zoutsolutie.

Fig 6.



- 1 = novocaïnequaddel.
- 2 = injectiequaddel v. histamine 1 $\frac{0}{100}$.
- 3 = quaddel v. histamine 1 $\frac{0}{100}$.
- 4 = roode hof v. histamine 1 $\frac{0}{100}$.

IV. Eerst wordt novocaïne ingespoten. 5 minuten later in de anaesthetische plek histamine 1 $\frac{0}{100}$ 0.1 c.c. Toch onmiddellijk optreden van quaddel met roode hof. De quaddel breidt zich met lange uitloopers naar boven en beneden uit tot *ver buiten de grenzen van de anaesthesie en eveneens de roode hof*.

V. $\frac{3}{4}$ cirkel omspoten met novocaïne, daarna 0.1 c.c. roggepollen-extract 3 % in het centrum. Er treedt een kleine quaddel op, met roodheid, zich uitbreidend door de open sector, niet over den wal.

VI. Gelijke deelen novocaïne en roggepollen-extract 3 % ingespoten. Optreden van quaddel met roode hof, gelijk met roggepollen alleen.

Tweede proef.

11.11.'30. Rechter onderarm. Intracutane injectie.

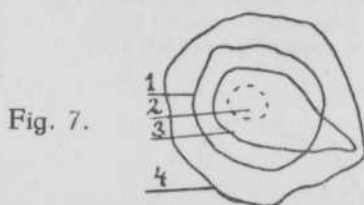
I. Drie zijden van een vierhoek worden opgespoten met novocaïne 1 %. In het midden van den vierhoek wordt 0.1 c.c. histamine

1 ‰ ingespoten. De quaddel verbreidt zich niet over den wal, doch slechts door het open gedeelte, zoo ook de roodheid.

II. Intracutane injectie van novocaïne 1 %. Na vijftien minuten wordt in de quaddel 0.1 c.c. histamine 1 ‰ ingespoten.

Op de oorspronkelijke quaddel komt een tweede quaddel, die zich uitbreidt met twee uitloopers buiten de novocaïne quaddel, later is de geheele quaddel ingenomen door de steeds grooter wordende histamine-quaddel. De roode hof heeft zich ver buiten de anaesthetische huidplek uitgebreid.

III. Quaddels van novocaïne 1 %. Na 15 minuten wordt in de quaddel 0.1 c.c. roggepollen-extract 3 % ingespoten, de quaddel verdubbelt zich met een enkele uitlooper. Een roode hof breidt zich buiten de anaesthetische plek uit. (Zie fig 7).



- 1 = novocaïnequaddel.
- 2 = injectiequaddeltje van roggepollen-extract.
- 3 = quaddel van roggepollen-extract.
- 4 = roode hof van roggepollen-extract.

IV. Opspuiten van een niet geheel gesloten ring, als hierboven vermeld, met 1 % novocaïne. In het centrum 3 % roggepollen-extract. Eerst vorming van een quaddel en roodheid, die naar buiten treedt, door de open plek, doch na 10 à 15 minuten gaat de roode hof over den wal heen. (Zie fig. 8).

16.11.'30. Rechter onderarm. Intracutane injecties.

I. Novocaïne 1 % ingespoten volgens bijgaande teekening. Na 10 minuten wordt er middenin 0.1 c.c. histamine 1 ‰ ingespoten, dewelke na 12 minuten geteekend wordt. De quaddel breidt zich

Derde proef.

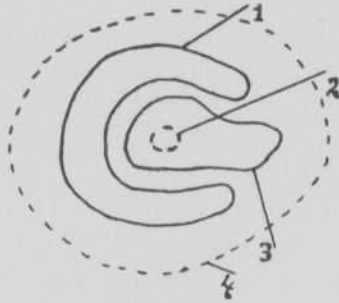
hierbij uit tusschen de openingen, terwijl de roode hof zich niet aan de novocaïne-grenzen stoort. (Zie fig. 9).

II. Er wordt een quaddel van novocaïne in de huid gemaakt, welke wordt weggemasseed, na eerst de omtrek aangegeven te

hebben met blauw potlood. Na 15 minuten wordt op dezelfde plaats 0.1 c.c. histamine 1 ‰ ingespoten.

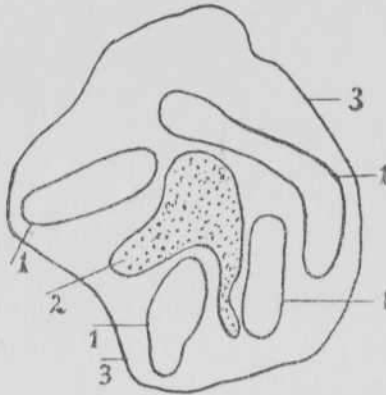
Hierbij blijkt dat de reactie van de histamine even groot is als

Fig. 8.



- 1 = novocaïnequaddel.
- 2 = injectiequaddel v. roggepollen-extract 3 ‰ .
- 3 = quaddel v. roggepollen-extract 3 ‰ .
- 4 = roode hof v. roggepollen-extract 3 ‰ .

Fig. 9.



- 1 = novocaïnequaddels.
- 2 = injectiequaddel v. histamine 1 ‰ .
- 3 = roode hof v. histamine 1 ‰ .

op de niet verdoofde huid. Er vormen zich twee uitloopers naar rechts en naar links, terwijl de roode hof even groot is. (Zie fig. 10)

Vierde proef.

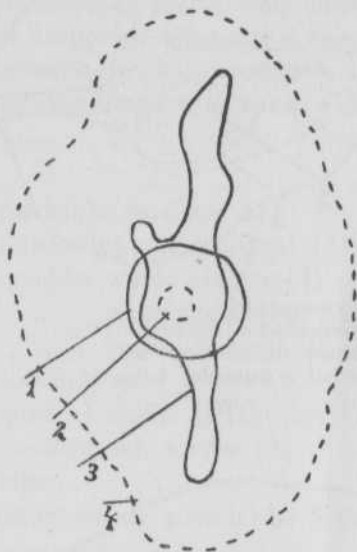
10.1.'31. Rechter onderarm.

Injectie van novocaïne 1 ‰ in de bovenste en in de diepere huidlagen. Daarna ook injectie van het subcutane weefsel. Er wordt nu

gewacht, tot ook het drukgevoel opgeheven is. Er is geen roodheid om de quaddel opgetreden.

Nu wordt intracutaan, in het midden van de ongevoelige plek

Fig. 10.



- 1 = novocaïnequaddel.
- 2 = injectiequaddel v. histamine 1 ‰.
- 3 = quaddel v. histamine 1 ‰.
- 4 = roode hof v. histamine 1 ‰.

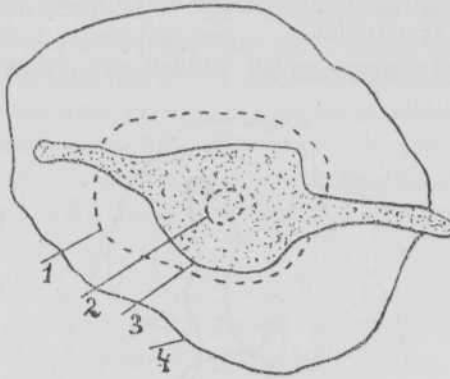
0.03 c.c. histamine 1 ‰ ingespoten. Na 7 minuten treedt een groote roode hof op met een groote quaddel, die zich uitbreidt naar links en naar rechts. (Zie fig. 11).

Vijfde proef.

12.1.'31. Huid van den rug.

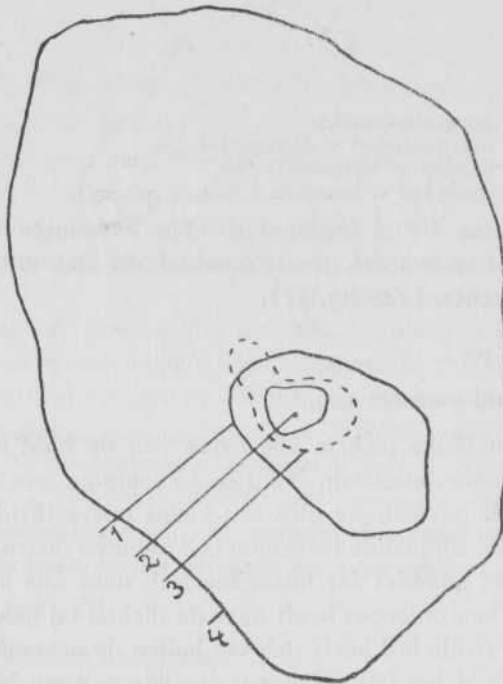
Er wordt een flinke plek in alle lagen van de huid opgespoten met 1 % novocaïne-oplossing. Na 10—15 minuten wachten wordt *excentrisch* in de gevoellooze plek een kleine hoeveelheid histamine 1 ‰ ingespoten. Bijgaande teekening is 8 minuten daarna gemaakt. Men ziet dat de quaddel der histamine zich naar alle kanten vergroot heeft, en een uitlooper heeft naar de dichtst bij gelegen novocaïne-grens. De roode hof heeft zich ver buiten de novocaïne-grenzen uitgebreid, doch in het bijzonder aan de zijde gelegen bij de meest nabijgelegen grens der gevoelloosmaking. (Zie fig. 12).

Fig. 11.



- 1 = novocaïnequaddel.
 2 = injectiequaddel v. histamine 1 ‰.
 3 = quaddel v. histamine 1 ‰.
 4 = roode hof v. histamine 1 ‰.

Fig. 12.



- 1 = novocaïnequaddel.
 2 = injectiequaddel v. histamine 1 ‰.
 3 = na 8 min. quaddel v. histamine 1 ‰.
 4 = roode hof v. histamine 1 ‰.

Zesde proef.

Op de huid van den rug van een man wordt door intracutane inspuiting van novocaïne 1 % een flinke verheven en gevoellooze plek gemaakt. Er wordt gewacht tot de oorspronkelijke reactie op de inspuiting voorbij is en de plek geheel ongevoelig is. Daarna wordt ongeveer één druppeltje histamine 1 $\frac{0}{00}$ versch bereid wat excentrisch in de gevoellooze plek ingespoten. Er wordt nu iedere halve minuut aangeteekend, wat er gebeurt. (Zie fig. 13.)

na 0.5 min.	niets.
" 1 "	"
" 1.5 "	duidelijke roodheid (1)
" 2 "	uitbreiding der roodheid (2)
" 2.5 "	quaddel wordt grooter (3)
" 3 "	" meer uitgelopen (4)
" 3.5 "	" buiten de eerste lijn gelopen (5)
" 4 "	roodheid gaat verder (6)
" 4.5 "	quaddel verder uitgelopen (7)
" 5 "	roodheid iets verder (8)
" 5.5 "	idem
" 6 "	groei van de quaddel bij 5 (9)

Daarna trad geen vergrooting der reacties meer op.

De uitkomsten van dit onderzoek zijn moeilijk te rijmen met de sensorische axon-reflex-theorie. Ware deze juist, dan zou een groei van de roodheid zoowel in- als buiten het gevoellooze gebied niet mogelijk zijn, daar de perifere gevoelszenuwen tijdelijk verlamd waren. Men moet een ander mechanisme aannemen en dan zijn er meer verklaringswijzen mogelijk.

a. In de achterwortels van het ruggemerg loopen de door Stricker aangetoonde postganglionaire vasodilatatorische vezels. In de sensibele zenuw zijn dus 2 soorten vezels, n.l. met centripetale en met centrifugale geleiding, die beiden in het ganglion intervertebrale hun perifere station hebben.

Slechts als men aanneemt dat de vasodilatatorische vezels niet door de novocaïne verlamd worden, is een axonreflex mogelijk. En dit is inderdaad wel waarschijnlijk, daar op de met novocaïne ingespoten huidplek nog hyperaemie of vaatdilatatie bestaat, terwijl reeds volkomen gevoelloosheid is ingetreden.

Een analogon van het onaangetast blijven van perifere zenuwvezels door novocaïne vinden wij bij de motorische zenuwen, waar-

van het volgende bekend is door de onderzoekingen van Liljestrand en Magnus. Spuit men bij katten tetanustoxine in de triceps, dan is het mogelijk door een kleine dosis novocaïne in de verstijfde spier te spuiten, de stijfheid geheel op te heffen, daar de proprioreceptieve spierzenuwen dan verlamd worden, terwijl de actieve bewegelijkheid onverminderd behouden blijft.

Het ontbreken van histaminereactie bij een lang te voren doorsneden sensibele zenuw is dan te verklaren door de mede-degeneratie van de vasodilatatorische vezels.

b. Het is ook mogelijk dat in de gevoelszenuwen sympathische vezels gemengd voorkomen in den zin zooals van Rijnberk voor de pilomotorische reflex aangegeven heeft, maar dan voor de bloedvaten bestemd, en dat deze vezels niet verlamd worden door de novocaïne. Van Rijnberk heeft het bestaan van autonome centrifugale vezels voor de pilomotoren aangetoond, welke langs de achterste wortels verlopen en tusschen twee analgetische zônes nog op te wekken zijn. Ook voor sommige secretorische en vasomotorische gebieden heeft men hetzelfde kunnen aantonen. (Leerboek der Physiologie van Zwaardemaker.) Deze verklaringswijze is overeen te brengen met het feit, dat de vaatreactie nog plaats heeft niettegenstaande het door het anaestheticum verlamd zijn van de gevoelszenuw. De roode hof kan zich dus bij dezen gang van zaken onafhankelijk van het al of niet functioneeren der gevoelszenuwen vergrooten.

Een sterke steun voor de meening, dat niet de sensibele huidzenuwen, doch de sympathische huidtakjes een rol spelen bij het optreden van den rooden hof bij de reactie op histamine en histamine-achtige stoffen, wordt gevonden in de uitkomsten van een onderzoek verricht door *Caldwell en Majo*. Om verschillende redenen werd door hen bij patiënten de sympathische grensstreng verwijderd hetzij in het thoracale of lumbale deel en nu vonden zij dat in alle gevallen op één na, de roode hof bij de huidreactie wegbleef in het deel van het lichaam, dat door de weggenomen sympathicus geïnnerveerd was. Dit in verband gebracht met het feit dat de huidreacties gewoon doorgaan, na uitschakeling der sensibele zenuwen door novocaïne, doet wel sterk vermoeden, dat het een sympathische en niet een sensibele invloed is, die de roode hof doet ontstaan.

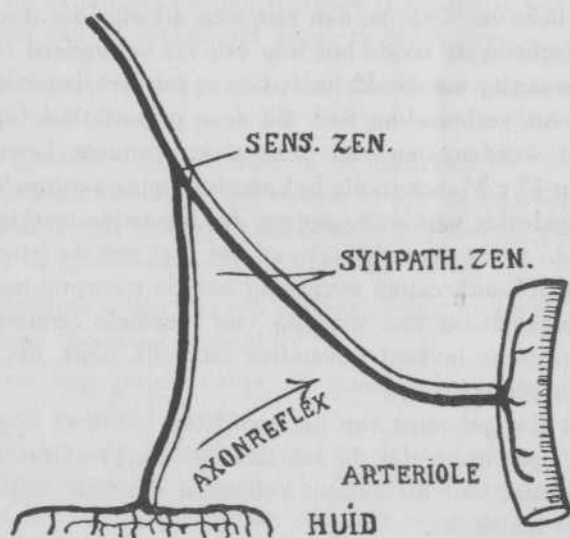
De gang van zaken moeten wij ons dan aldus voorstellen, dat op

de huidplek, waar histamine aangebracht is, een prikkel ontstaat, die langs de uiteinden van de begeleidende sympathische vezels voortgeleid wordt naar de bloedvaatspiertjes. We hebben dus te doen met een echte axonreflex in den zin van de verklaring van Lewis, doch loopende langs sympathische banen. (Zie fig. 14.)

c. Een derde verklaringsmogelijkheid zou kunnen zijn dat de histamine direct op de vaatverwijdende elementen der arteriolen, dus op de vaatspiertjes inwerkt. De hyperaemie houdt dan gelijken tred met de verspreiding van de histamine langs het lymphenet. Men moet dan aannemen dat de resorptie van histamine zeer snel plaats heeft.

Het niet meer reageeren der vaten lang na het doorsnijden der sensibele zenuwen zou men dan moeten verklaren door degeneratie van die vaatverwijdende elementen. Hiermede stemmen ook over-

Fig. 14.



een de proeven van Dale en Richards en Ranson, Faubion en Ross, die reeds vaststelden, dat bij intraveneuze injectie van histamine de vaatverwijding van de capillairen een directe is en niet afhankelijk van de zenuwelementen. Na verwoesting van de verzorgende elementen en na volkomen degeneratie dezer zenuwuiteinden na voldoende langen tijd was de intraveneuze histaminewerking nog on-

verzwakt aanwezig. Met het aannemen van een directe werking van histamine op de dilatatoren der arteriolen is niet uitgesloten, dat bovendien een werking op deze laatste plaats heeft langs reflectorischen weg, waarbij zelfs verte-werking kan optreden. Hiervoor heeft Lewis enkele gegevens bijgebracht.

De vorming van den rooden hof gaat vleksgewijze en berust op een verschil in tonus van de huidvaten. Bekijkt men b.v. een onderarm nauwkeurig, dan ziet men er steeds een zekere vlekvorming in, plekken, die rooder zijn grenzen aan witter plekken. De roode plekken zouden nu de plekken zijn met 'n lage tonus. Ziet men nu de roode hof der histamine-reactie zoo'n roode vlek naderen, dan ziet men ook plotseling deze laatste in zijn geheel veel rooder worden; soms daarentegen is in de witte plekken de tonus zoo hoog, dat de roode hof deze in zijn uitbreiding geheel overslaat en overspringt op de volgende roode vlek.

Heeft men de huidplekken waarvan de tonus door bestraling met ultraviolet licht verzwakt is, dan ziet men dikwijls dat deze helrood worden, ofschoon de roode hof nog vrij ver verwijderd is. Als een zeer merkwaardig voorbeeld haalt Lewis aan een persoon, die een oude „Lewisit” verbranding had. Bij deze persoon kon hij een duidelijk rood worden zien van deze plek, wanneer Lewis op een afstand van 17 c.M. een roode hof met histamine aanbracht. Van de drie medegedeelde verklaringswijzen der histamine-werking lijkt mij de laatste de meest aantrekkelijke en het best met de feiten overeen te brengen: n.l. uitbreiding evenredig aan de resorptie-mogelijkheid en onafhankelijkheid van werking van sensibele zenuwen; terwijl een reflectorische invloed bovendien mogelijk blijft, die de verte-werking tot stand brengt.

Aan het slot gekomen van dit hoofdstuk wil ik er nog eens uitdrukkelijk op wijzen, dat de reacties met rogge-extracten en met het ultrafiltraat van dit extract volkomen dezelfde wetten volgen als die met histamine.

HOOFDSTUK IV.

Over den invloed van roggepollen-extract en histamine op de chromatophoren van de kikkerhuid.

§ 1. Inleiding.

De pigmentcellen in de huid van de kikvorsch zijn wisselend in grootte, het zijn contractiele elementen. Vele onderzoekers hebben nu gebruik gemaakt van deze eigenschap van vormverandering dier cellen om den invloed van verschillende stoffen na te gaan. Alvorens nu in bijzonderheden hierover te treden is het gewenscht de anatomie van de kikkerhuid nader te beschrijven.

§ 2. Beschrijving van de chromatophoren der kikkerhuid.

Er zijn drieërlei pigmentcellen in de kikkerhuid:

a. zeer donkerbruine op het zwarte af d.z. de melanophoren, die in drie verschillende huidlagen voorkomen n.l. bovenin de epidermis, vlak onder de epidermis en in de diepe subcutis;

b. geelgetinte cellen, die een vetachtige stof bevatten en xantho- of lipophoren genoemd worden;

c. paarsachtig getinte cellen die guanine bevatten en leuco- of guanophoren genoemd worden.

De kleur van de kikkerhuid is van de onderlinge verhouding dezer 3 pigmentgroepen afhankelijk. Overheerschen de melanophoren, dan is de huid donker getint, zijn deze samengetrokken en dekken de beide anderen elkaar, dan is de resultante een groene kleur; overheerschen de lipophoren, dan ziet men een gele tint.

Men heeft langen tijd gemeend, dat de onder b. en c. genoemde pigmentcellen één geheel vormden en ze samen xantholeucophoren genoemd.

Een strijdvraag is er langen tijd geweest, of de xantholeucophoren een of twee celgroepen vertegenwoordigden, welke door de onderzoekingen van J. W. Schmidt tot een oplossing gebracht is. Hij toch toonde aan, dat er twee soorten van cellen bestaan, de lipo-

chroom bevattende cellen (lipophore, xanthophore) en de guanine bevattende cellen (guanophore, leucophore). De beide celvormen liggen steeds bij elkaar en voor de combinatie dier twee heeft Schmidt de naam xantholeucosomen of lipoguanosomen ingevoerd. Iets nieuws was dit echter niet, daar reeds Ficalbi in 1896 deze twee soorten cellen aangegeven heeft, welke publicatie door Van Rijnberk in de niet Italiaansch sprekende landen bekend werd.

J. W. Schmidt maakte bij zijn onderzoekingen gebruik zoowel van vlakke-preparaten als van dwarse doorsneden, zooals reeds door Ficalbi was aangegeven.

Zijn onderzoekingen werden verricht bij *hyla arborea*, die de grootste kleurveranderingen vertoonden.

Er werden verschillende methodes gebruikt om deze cellen aan het licht te brengen. De beste methode was de volgende:

De huidstukjes werden 12 uur lang in eenmaal verwisselde Flemmings fixeervloeistof gebracht, daarna werden paraffinecoupes gemaakt en gekleurd met thionin-eosin.

Bekijken wij nu zoo'n doorsnede, dan zien wij onder de epidermis van deze door een dunne grenslamel gescheiden, een laag dubbelcellen, bestaande uit een zacht-blauw, licht-groen gekleurde xanthophoor en een gele leucophoor. De xanthophoor heeft den vorm van een bi-convexen lens, waarvan de eene zijde in de epidermis uitpuilt, terwijl de andere zijde omvat wordt door de guanophoor. Hieronder bevinden zich de melanophoren, die hun uitloopers hebben tusschen deze dubbelcellen. De leucophoren zijn vooral gekenmerkt door hun guanine-inhoud.

Hoe komt nu de groene kleur tot stand? Deze komt tot stand door een menging van twee kleuren. De gele stralen worden gereflecteerd door de lipophoren, de blauwe stralen door de guaninekristallen, terwijl de melanophoren de roode stralen absorbeeren. Het meer of minder donker worden komt, doordat het pigment van de melanophoren zich schuift tusschen de dubbelcellen, eventueel deze geheel omhult, terwijl de vorm van de guanophoren in plaats van bekervormig, cilindervormig wordt.

Bekijkt men echter een geel gekleurd stukje huid, dan vindt men een andere verhouding van de pigmentcellen. Inplaats van twee boven elkaar gelegen cel-lagen, zijn hier de lipophoren tusschen de guanophoren gedrongen, zoodat ze nu meer naast elkaar liggen, terwijl toch nog het karakter van een dubbel-cel behouden blijft. De melanophoren zijn hier geheel samengeklonterd.

Is de kleur van de huid echter grijs, dan zijn de melanophoren steeds min of meer met uitloopers voorzien, die zich om de guanophoren leggen, niet om de lipophoren, zoodat de eerste er als het ware mee omhuld worden en een ronde vorm aannemen.

Ook hier toonen de lipophoren evenals bij de gele huid, de neiging om zich tusschen de guanophoren te dringen, zoo zelfs dat op verschillende plaatsen de lipophoren de plaats onder de huid vrij laten, zoodat de guanophoren direct onder de oppervlakte van de huid komen te liggen.

Physisch laat zich het tot stand komen der grijze kleur verklaren door de werking van de guanophoren en melanophoren en uitschakeling van het samengebalde lipochroom. Een grijze kleur komt tot stand, wanneer het witte licht geabsorbeerd wordt in iedere golflengte in gelijke hoeveelheid. Daar hier echter altijd nog eenige hoeveelheid lipochroom en guanine een rol speelt in de absorptie, komt daardoor een groene of blauwe tint in het grijs.

De vormverandering der verschillende cellen zijn mechanisch niet op dezelfde wijze te verklaren. Bij de melanophoren toch ziet men een samenballing of uitbreiding van het pigment in de uitloopers van deze cellen. De vormveranderingen van de guanophoren verklaart W. J. Schmidt door een passieve werking, terwijl de verplaatsing de lipophoren meer op een amoeboide bewegelijkheid zou duiden, echter beperkt door het bindweefselomhulsel van de dubbelcel, dewelke ervoor zorgt, dat bij de verandering van grijs in groen de dubbelcel weer optreedt.

De waarnemingen van Ficalbi en Schmidt konden door mij bevestigd worden, al werd met een geheel andere techniek gewerkt. Er is n.l. gebruik gemaakt van de inbedding in gelatine volgens de methode door Heringa beschreven. Het komt erop aan de praeparaten vrij te houden van aanraking met alcohol en aether, daar anders de lipophoren uit de praeparaten verdwijnen en zooals wij later zien zullen hebben deze juist voor ons onderzoek bijzondere beteekenis. De bedekking met het laevulose-preparaat zooals dat hierbij geschiedt is ook een groot voordeel, daar de weefseldeelen daarbij helder blijven. Voor het bekijken van huidoppervlakken kan men de stukjes, nadat men ze in de op hun werking te onderzoeken vloeistoffen gelegd heeft, zonder meer hieruit nemen en met de laevulose-oplossing overgieten en met een dekglas bedekken. Voor de dwarse doorsneden werden de praeparaten dan eerst in

gelatine ingesloten, met het ijsmicrotoom gesneden en met haematoxyline of andere kleurstoffen gekleurd. In andere reeksen praeparaten werd na de inwerking der te onderzoeken stoffen gefixeerd in formaline 10 % en dan pas in gelatine of laevulose ingesloten.

In de normale huid worden nu de door J. W. Schmidt aangegeven bijzonderheden aangetroffen op de lichtere plekken dus weinig melanophoren, op de donkere een aaneengesloten rij melanophoren vlak onder het epitheel.

Niet bij de vroegere schrijvers vermeld, is het vinden, wel is waar slechts hier en daar, van de xantho-leucophoren-combinatie vlak onder de oppervlakte n.l. bij de uitmonding der klierbuizen. Thans moge beschreven worden wat er in de kikkerhuid te zien is bij bekijken van boven op de oppervlakte, naar eigen waarneming. Men kan bij de kikker microscopisch drie duidelijk van elkaar verschillende huidgebieden onderscheiden n.l.:

1. de rughuid, die, behoudens op de sterk gepigmenteerde aanhechtingsplaatsen, een egale min of meer donkere tint heeft (van groen tot zwart);
2. de huid van de flanken en de rugvlakte der achterpooten, die sterk gevlekt is, waarbij donkere en lichtere deelen afwisselen met zwarte vlekken;
3. de huid van de buik, die egaal wit gekleurd is, soms met een geelachtige bijtint en verder steeds voorzien van min of meer vage donkere vlekjes.

Daar de kleur van de kikker afhankelijk is van den toestand der chromatophoren, zal thans een beschrijving volgen van de huid bij een licht en donker dier.

HET BEELD BIJ LOUPE-VERGROOTING.

Bij de donkere vorsch.

Bij de lichte vorsch.

Buikhuid.

Men ziet fraaie donkere ster-vormige cellen, de melanophoren, waarvan de uitloopers elkaar op verschillende plaatsen aanraken, de achtergrond is licht en bruingeel getint.

De donkere melanophoren zijn samen gebald met slechts korte dikke uitloopers, ook op een lichten, wat bruingelen achtergrond.

Huid van de flank en de dij

Op de donkere plekken een mozaiek gevormd door ronde en ovale vakjes elk met een klieropening in het centrum waaromheen eerst een vrij donkere breede ring ligt, welke weer omsloten wordt door zeer donkere randen, die de afscheiding tusschen de vakjes vormen.

In de lichtere plekken is met deze vergrooting veel minder donker pigment te zien n.l. meestal afzonderlijke stervormige cellen met uitloopers tegen een bruingelen achtergrond. Op verschillende plaatsen raken de uitloopers de cellen elkaar aan.

Huid van den rug.

Deze vertoont over het geheel een donkerbruine vlakke, waarin ronde en ovale vakjes een mozaiek vormen. Deze vakjes dragen hetzelfde kenmerk als die van de donkere plekken van de gevlekte huiddeelen doch zij zijn *duidelijk groter van omvang* en de zwarte omranding komt duidelijker uit. Slechts een enkel plekje is lichter van tint en vertoont stervormige cellen.

De diepere dermale melanophoren.

De melanophoren van de diepere laag zijn bij het bekijken van de bovenzijde van de huid moeilijk te zien. Om ze te bestudeeren moet men het praeparaat met de ondervlakte naar boven keeren. Men bemerkt dan, dat deze diepe dermale melanophoren hoofdzakelijk zitten in de gevlekte huiddeelen n.l. van flank en dij, veel minder in de buik en rughuid.

Een groot verschil is ook te zien tusschen de huid van de lichte

Op de donkere plekken hetzelfde als bij de donkere kikvorsch, doch is belangrijk zwarter van kleur, doordat het pigment zich om de klieropeningen samengetrokken heeft. De lichtere deelen, die een lichter, bruingelen ondergrond vertoonen, zijn als bezaaid met donkere sterren en punten. De uitloopers dezer melanophoren zijn slechts bij een enkele lang, meestal kort.

Het eenige verschil met de huid van de gevlekte deelen is, dat de ondergrond donkerder en meer bruin van tint is.

en de donkere kikvorsch. Terwijl zij bij de eerste in de gevlekte huid in grooter getale te zien zijn, moet men bij de laatste ernaar zoeken. Zijn ze in groot getal aanwezig, dan doen zij zich voor als fraaie sterk vertakte cellen, die hier en daar een stervormig netwerk vertoonen, slechts op enkele plaatsen raken de uitloopers elkaar aan.

In de huiddeelen waar ze schaarscher zijn is de vorm plomper, met veel minder fijne uitloopers, terwijl de cellen veelal geïsoleerd voorkomen. Het is net alsof zij niet alleen kunnen samentrekken, doch ook kunnen verdwijnen uit de subcutis (naar de cutis?).

HET BEELD BIJ GROOTERE VERGROOTING.

Normale kikkerhuid donker v. d. rug afkomstig. Vergrooting Winkel 5 Oc. 2 = 190 maal.

Het meest geschikt voor de latere beschrijving van de inwerking van de verschillende stoffen is 't nemen als uitgangspunt van een element uit de hierboven beschreven mozaiekteekening, welk element als middelpunt de uitvoermonding van een klierbuis heeft. Onmiddellijk om deze monding heen zien we een of meer melanophoren liggen, die meestal de omranding met hun hoofdmassa volgen. De buitenomtrek van het mozaiekelement wordt aangegeven door met hun lichamen concentrisch gerangschikte melanophoren.

We hebben dus twee ringen te onderscheiden, een buitenste, gevormd door de randmelanophoren en een binnenste door de kliermondiging. Tusschen deze beide ringen zijn ook een aantal dwarsgeplaatste melanophoren met hun uitloopers.

Aan de melanophoren kan men onderscheiden een hoofdmassa met uitloopers.

De hoofdmassa is scherp te onderscheiden, onregelmatig van vorm, terwijl de uitloopers ver te vervolgen zijn bij instelling in een verschillend vlak.

De uitloopers vertoonen zich als donkere strepen, bij sommige is de lengte grooter dan het cellichaam waar zij uitstammen. Ook blijken de uitloopers van de verschillende cellen wel sterk dooreen geweven te zijn, doch nergens in eenig contact of continuïteit met elkander te staan.

De ruimte tusschen de boven beschreven ringen heeft in het algemeen een bruingele tint. Met deze vergrooting is geen fijnere structuur te zien, doch men kan wel een aantal bruinere gespikkelde bolletjes onderscheiden, die hier en daar verspreid liggen en verder

agglomeraten van meer geel gekleurde korrels (lipophoren). In de donkerste huidplekken overheerschen de melanophoren zoodanig dat men van het tusschengelegen gedeelte weinig kan onderscheiden.

Gevlekt stukje (van de dij afkomstig).

De donkere plekken vertoonen hetzelfde beeld als hierboven voor de rughuid beschreven is. In de lichtere plekken ziet men veel duidelijker begrensde klierbuizen. Spaarzaam zijn de melanophoren over het praeparaat verdeeld. De kleur der melanophoren is donkerder zwart, terwijl de uitloopers niet zoo groot zijn als bij de donkere huidplekken. Ook vindt men bijna nergens het dooreengevezen zijn van de uitloopers. De tusschenruimten binnen de ringen der melanophoren zijn hier effen, meer lichtgeel van kleur. De donkere balletjes zijn hier niet te vinden, terwijl de melanophoren in deze tusschenruimte zeldzaam zijn.

Beschrijving bij grootere vergrooting (Apochromaat 2 m.M. Oc. 2 = 450 maal

Brengen we een mozaiekelement in het midden van het gezichtsveld, dan herkennen we weer randmelanophoren, klieruitmonding en de ruimte, die daar tusschen ligt.

Van de verschillende melanophoren vermeld ik vooreerst die, welke aan den rand gelegen zijn, dan die liggen om de klieruitmonding en eindelijk de tusschen beiden in geplaatsten.

De randmelanophoren zijn in hun cellichaam donkerbruin, op het zwarte af gekleurd, de uitloopers echter maken een lichter bruinen indruk. Deze begeven zich een eind in de tusschenruimten en vormen daarin een fijn netwerk. Hun structuur is fijn korrelig. Gelijk hiervoor reeds opgemerkt is, gaan ze nergens in elkaar over. Het aantal randmelanophoren voor elk element wisselt van vier tot acht. Op verschillende hoeken vormen zij tevens de begrenzing van de omringende mozaiekelementen.

Om de kliermonding ziet men 1 tot 3 concave melanophoorlichamen, met hunne uitholling zich aanlegend tegen den omtrek van de kliermonding. Hun uitloopers begeven zich naar de tusschenruimten. De tusschenruimte zelf vormt een aaneengesloten geheel waarin behalve de donkere melanophoorelementen, tweeërlei te onderscheiden is n.l. grijsbruin of meer paarsachtig getinte staafjes of bolletjes of meer onregelmatig gevormde lichaampjes en daartusschen regelloos verspreid gele of oranje conglomeraten.

Van hiaten in deze tusschenruimten is niets te bespeuren in deze donkere partijen.

Het behoeft geen nader betoog, dat de beschreven deelen van het mozaiekelement in verschillende vlakken liggen, n.l. de kliermonding het hoogst en dat het beschreven beeld een reconstructie vormt van hetgeen bij diverse lensinstellingen gezien wordt.

In deze beschrijving is verder geen aandacht gewijd aan de epidermale en de zeer diep gelegen melanophoren.

Gevlekte gedeelte van de dij afkomstig.

In het gevlekte gedeelte vinden we ook donkere plekken, die hetzelfde beeld vertoonen zooals hierboven vermeld is. Overigens onderscheiden zich de lichtere elementen door een veel geringer aantal uitloopers der melanophoren, een lichtere ondergrond, waarin enkele kleine hiaten, zoodat het geheel een veel lichter indruk maakt. Daardoor komen de gele en de grijsbruine partijen scherper te voorschijn. Niet overal doch wel op verschillende plaatsen ziet men de gele en grijze elementen telkens als bij elkaar hoorend tusschen de anderen liggen.

§ 3. Vormveranderingen der pigmentcellen onder invloed van verschillende stoffen.

Onder allerlei invloeden veranderen de pigmentcellen van vorm en grootte. Het best bestudeerd zijn de het duidelijkst zichtbare melanophoren, terwijl aan de groep xantholeucosomen minder aandacht besteed is.

Men heeft langen tijd gemeend, dat de wisselingen in vorm en grootte der pigmentlichamen berusten zou op amoeboïde bewegingen. Latere onderzoekers hebben echter uitgemaakt, dat dit niet het geval is. Zoo vond H. R. Hewer, dat de vormverandering komt door een verschuiving van de fijnste pigmentkorreltjes in de melanophoren. Hij nam waar, dat de melanophoor bestaat uit een cellichaam met vele uitloopers. Heeft er nu expansie plaats, dan verspreiden de pigmentkorreltjes zich over die uitloopers, terwijl bij de z.g. contractietoestand de korreltjes samenklonteren, hoewel er nog steeds enkele korreltjes in de uitloopers te vinden zijn. Ook is er een beweging waar te nemen van de pigmentkorreltjes, als 't ware tegen den stroom op, meer stootsgewijze, niet een voortdurende strooming zooals bij de amoebe.

Tusschen de uitloopers was geen onderling verband te bekennen,

evenmin als tusschen de uitloopers van twee cellen onderling. De sterke wisselingen in vorm en grootte der melanophoren, die zoowel ma- als microscopisch gemakkelijk waar te nemen zijn, hebben aanleiding gegeven tot het doen van velerlei onderzoekingen over den invloed van verschillende stoffen op den vorm dezer lichamen. Om deze studie te kunnen volbrengen heeft men nu allerlei invloeden van de omgeving, zooals warmte of koude, droogte of vocht, licht en donker bestudeerd. H. Hewer en ook Hogben en Winton kwamen tot de volgende conclusies, die met oudere ervaring van anderen overeenkomen:

1. Vochtige omgeving veroorzaakt altijd grooter uitspreiding der melanophoren dan drooge omgeving.
2. Lichte achtergrond veroorzaakt concentratie door bleekheid, donkere daarentegen uitspreiding en donkere huid.
3. Het juiste resultaat van licht en warmte is niet zoo duidelijk, daar de achtergrond hierbij een groote rol speelt. 't Lijkt waarschijnlijk, dat licht concentratie veroorzaakt en duisternis dispersie.
4. Wat de temperatuur betreft kan over 't geheel aangenomen worden dat, wanneer de andere voorwaarden hetzelfde zijn, lage temperatuur (2°) uitspreiding, middelmatige (17°) concentratie en hoge temperatuur (28°) misschien een lichte uitspreiding geeft, wanneer de melanophoren te voren maximaal gecontraheerd waren.

Bij al deze werkingen werd gevonden, dat er een lange latentie kan zijn van $\frac{1}{2}$ uur tot enkele dagen. Ook het effect van verschillende gassen werd nagegaan zooals v. N_2 , H_2 , O_2 , CO_2 en Cl_2 , waarvan alleen O_2 eenige concentratie van de melanophoren teweeg bracht.

Het eigenaardige in het reageeren van al de melanophoren van 't geheele lichaam heeft de vraag opgeworpen of reactie plaats vindt vanuit het centraal zenuwstelsel of dat een of andere stof door de bloedbaan naar de cellen gevoerd wordt. Het is wel uitgemaakt, dat het spel van uitspreiding en samentrekking dezer pigmentcellen geheel onafhankelijk zoowel van het centrale als van het perifere zenuwstelsel kan geschieden.

Een groot aantal stoffen zijn op hun invloed op de melanophoren onderzocht, deels door inspuiting in de verschillende huidlymphesakken, door middel van doorstroming via het bloed-

vaatstelsel, door directe inwerking op uitgesneden huidstukjes en wat de hormonen betreft, ook door uitsnijden der endocrine-organen of door voeding met orgaanstukjes of hunne extracten.

Het meest bekend is wel de werking van het *extract van de hypophysis*, dat zeer sterke uitspreiding der melanophoren bewerkstelligt, zoowel bij inspuiting als op uitgesneden huidstukjes, dus zeker onafhankelijk van het zenuwstelsel.

Hogben en *Winton* hebben uitgemaakt, dat het de achterste lob van de hypophysis is, die het werkzame agens bevat. Wordt dit deel verwijderd, dan worden de kikvorschen bleek, door samenballing der melanophoren, terwijl de xantholeucophoren maximale uitzetting vertoonen.

Welk deel van de achterste lob werkzaam is, werd door latere onderzoeken uitgemaakt, door H. B. van Dijke. Hiervoor werd gebruik gemaakt van hypophysis van dieren. De hypophysis werd eerst ingesmolten, gesneden, gekleurd en bekeken, zoodat met zekerheid de verschillende extracten van de pars neuralis en intermedia gescheiden werden, waarna de extracten bereid werden. Daarna werd volgens de techniek van P. Trendelenburg de huid op de volgende wijze behandeld:

De kikkers worden op een witte onderlaag aan 't venster gehouden. Na het decapiteeren wordt de huid in de middenlinie gespleten en aan beide kanten worden stukjes van $\frac{3}{4}$ c.M.³ afgeknipt en in de vloeistof gelegd.

Als vloeistof werd gebruikt een extract van 1 : 10.000 van de pars intermedia en dezelfde van de pars neuralis.

Het bleek nu dat de pars neuralis een zwakker werking vertoonde als de pars intermedia na $\pm$ 1 uur. Ook bij grootere verdunningen werd hetzelfde resultaat verkregen.

Interessant is, dat van Dijke vond, dat de stof die de melanophoren doet uitzetten een andere is, dan die de uterus-contracties bewerkt en die stamt uit de pars intermedia plus de pars neuralis. Later zullen wij zien dat voor de werkzame stof van het roggepollen-extract andere verhoudingen gelden.

Uit het feit dat adrenaline samenballing der melanophoren geeft, is de veronderstelling ontstaan, dat de kleur van het dier afhankelijk is van het evenwicht wat heerscht tusschen de bijnier en de hypophysis. Dat de bijnier niet zoo'n grooten invloed zou hebben, steunt op de volgende waarnemingen:

1. Op het verschil in minimum v. d. hoeveelheid, dat noodig is om bij inspuiting van een normale bleke kikker en een kikker zonder hypophysis bij lage temperatuur uitbreiding van de melanophoren te krijgen, hetgeen niet zoo groot is bij hooge temperatuur.
2. Wanneer een bleke poot is afgeklemd, dan blijven de melanophoren gecontraheerd, maar niet door de necrotische verandering, want inspuiting met extract van de achterste lob van de hypophysis geeft nog uitbreiding. Maar daar de weefsels snel de adrenaline verwoesten, moet er verondersteld worden, dat er een onvoldoende secretie heeft plaats gehad in het bleke dier, daar deze anders wel uitbreiding aan de chromatophoren zou geven, zoodra de adrenaline voldoende was afgebroken.

Hogben en Winton komen nu tot de conclusie, dat de verschillende prikkels als licht, temperatuur en vocht werken op een zekere mate van afscheiding van de achterste lob van de hypophysis, zoodat de kleur een zekere maatstaf is voor de circuleerende hoeveelheid.

De werking van hypophysisextract op de melanophoren heeft *Trendelenburg* gebruikt om hiermede deze stof in het cerebrospinaalvocht aan te toonen. Hij geeft aan bij een verdunning van zuiver hypophysisextract van 1 : een milliard nog werking gezien te hebben, op geïsoleerde stukjes huid van de kikvorsch. Geen enkele andere stof gaf die uitspreidende werking.

Onderzocht werden de volgende stoffen: Papaverine; Histamine; Morphine; Cocaïne; Atropine; Scopolamine; Adrenaline, Ergotamintartraat en Physostigmine.

Een geringe donkere verkleuring trad slechts op bij Chinin HCl 0.01 % en Curarine 0.01 %.

Ook vermeerdering of vermindering van het Ca-, K- en NaCl-gehalte van de Ringersche vloeistof had geen invloed. Slechts bij zuur worden van de Ringersche vloeistof trad een lichte uitbreiding der melanophoren op.

Behalve de bij het onderzoek van *Trendelenburg* genoemde stoffen, die slechts een negatief resultaat gaven wat betreft de werking op het uitspreiden der melanophoren, zijn door Hogben en Winton nog de volgende onderzocht:

Atropine en *Pilocarpine* bleken indifferent te zijn.

Adrenaline, *Tyramine* en *Ergotoxion* veroorzaken een samen-

trekking, *Nicotine* en *Apocodeïne* een uitbreiding der melanophoren.

Histamine geeft in een hoeveelheid van 0.0036 gr. geen expansie der melanophoren.

Het meest interesseeren ons in verband met het onderwerp van dit proefschrift de werking van het histamine en adrenaline. Het eerste omdat de stof, die in roggepollen zit, ermede verwant is, het tweede, omdat de histaminewerking in verschillende gevallen berust op het vrij worden van adrenaline (b.v. op de gedenerveerde pupil bij de kat).

Van adrenaline weten wij thans, dat de proeven eensluidend wijzen op een samenballen der melanophoren. De histamine gaf aan de genoemde onderzoekers negatieve uitkomsten, wat betreft de uitzettende werking. Daartegenover staat een mededeeling van *Feldberg* en *Schilf*, dat in hun laboratorium door *Hofheinz* gevonden is, dat zoowel bij inspuiten in de dorsale lymfezak, als bij inbrengen van huidstukjes in histamine-oplossing, een samenballen der melanophoren optreedt, hoewel niet zoo sterk als bij adrenaline.

Dat men voorzichtig moet zijn bij de beoordeeling der resultaten blijkt uit de proeven van *Fenn*. Hij doorstroomde n.l. de achterpoot van een kikker met koudbloeder *Ringer* gedurende een half uur en nam daarbij waar, dat er samenballing der melanophoren optreedt en een lichter worden van de kleur van de poot.

§ 4. Eigen onderzoek.

Methodiek.

Om verschillen aan te toonen in de melanophoren, was natuurlijk 't zekerste wanneer men een zelfde stukje huid voor en na de inwerking microscopisch kon bestudeeren en fotografeeren. Er zijn ook inderdaad pogingen daartoe in het werk gesteld. Hiervoor werd een stukje kikkerhuid op een voorwerpglas gebracht, bekeken en gemicrophotografeerd. Daarna werd alles onaangeroerd gelaten, alleen werden enkele druppels van de histamine-oplossing op het huidstukje gebracht. Dit werd daarna eenigen tijd zoo gelaten, waarna weer een microphoto gemaakt. Daar de huidstukjes echter zeer dik zijn, moest de belichtingstijd lang zijn (3—7 min.) en gedurende dien tijd traden er ook kleine vormveranderingen door elastische nawerking op, zoodat het geheel een onscherp beeld gaf. Toch lukte het wel eens om een scherpe photo te maken van de melanophoren, daar deze vrij groot zijn, doch slechts met kleinere vergrooting, daar hun uitloopers verschillende vertakkingen hebben

die niet in een vlak liggen. Daar voor de beoordeeling sterkere vergrooting noodig is, werd later van deze methode afgezien. Daarna werd overgegaan tot de methode zooals Trendelenburg die beschreven heeft. Hij neemt een stukje huid van den rug, evengroot aan beide kanten van de mediaanlijn. Deze stukjes worden dan in gelijke deelen geknipt, welke dan met elkander vergeleken kunnen worden, nadat zij voor de eene helft in de te onderzoeken vloeistof gelegd waren en voor de rest in de koudbloeder Ringersche vloeistof. Hier moet ook nog vermeld worden, dat de te onderzoeken oplossingen gemaakt werden met koudbloeder Ringer.

Andere gevolgde methoden zijn deze: de praeparaten werden na de inwerking der stoffen opgevoerd in de alcoholen en in parafine ingebed. waarna er dwarscoupes van gemaakt werden, welke gekleurd werden met haematoxyline eosine. Van andere werden ijscoupes gemaakt, welke daarna met laevulose bedekt onder een dekglas ingesloten werden of wel de insluiting had plaats in gelatine volgens de methode Heringa. Deze laatste methode is een zeer fraaie om duurzame praeparaten te krijgen, terwijl eventueele veranderingen, welke zouden ontstaan door inwerking van alcohol, ondervangen worden. Ook voor geheele stukjes huid eigent deze methode zich uitnemend. Wil men de praeparaten echter onmiddellijk na de inwerking der stoffen bekijken, dan moet men ze onmiddellijk op een voorwerpglas brengen en er enkele druppels glycerine op laten vallen, waardoor ze ook zeer goed met de olie-immersie bekeken kunnen worden.

Op deze wijze werd de duur van inwerking nagegaan en de sterkte van concentratie van histamine.

Hiertoe werden verschillende huidstukjes in histamine-oplossingen van 1 : 1000, 1 : 2000 en 1 : 10.000 gelegd. Sommige daarvan werden na een half uur bekeken, anderen werden na drie of vier uur bekeken. Om den invloed van de onderlaag uit te schakelen werden de huidstukjes gelegd in horlogeglazen, welke geplaatst werden op zwart papier. De huidstukjes werden genomen van kikkers, die evenals de in dorsale lymphzak ingespoten kikkers, ongeveer twee weken met water in het terrarium in een donkere kamer waren opgesloten.

Hieronder volgt een tabel, waaruit een overzicht verkregen kan worden van de resultaten.

	$\frac{1}{2}$ uur	3 uur	4 uur
Histamine 1 ‰	Geen verandering	Weinig verandering	Weinig verandering
Histamine 2 ‰	Geen verandering	Matige verandering	Matige verandering
Histamine 1 : 10.000	Geen verandering	Verandering	Verandering
Rogge extr. ingedampt v. 21cc-4cc	Geen verandering	Verandering	Verandering
Adrenaline 1 ‰	Geen verandering	Sterke verandering	Sterke verandering
Ringer 0.6	Geen verandering	Geen verandering	Geen verandering

Thans volgt een nadere beschrijving van de resultaten, waarbij epidermale cellen buiten beschouwing worden gelaten.

1. *Rogge 16.* Ultrafiltraat. Ingedampt van 21 c.c. tot 4 c.c. Tijd van inwerking 4 uur. Donker stukje genomen van den rug.

Loupevergrooting.

Bij deze praeparaten is het mozaiek goed te zien. De eenige verandering, die bij deze vergrooting te zien is, is het als 't ware opgehelderd zijn van de praeparaten, waardoor de mozaiekteekening nog scherper te voorschijn komt. Ook de bruine achtergrond verschijnt iets lichter van tint.

Groote vergrooting.

Ook hierbij is de besproken mozaiekteekening scherper te onderscheiden. Er worden meer stervormige melanophoren waargenomen, terwijl de bruine tussenpartijen opgehelderd zijn. Door het sterke overheerschen van de melanophoren, waarvan de uitloopers meer

verdikt en niet zoo lang zijn, zijn de xantholeucosomen niet zoo nauwkeurig te onderscheiden.

Gevlekt stukje.

Loupevergrooting.

Ook bij deze stukjes valt de veel grootere helderheid op, vooral in de lichte gedeelten, waarvan enkele gedeelten geheel vrij lijken van hun gele ondergrond.

Groote vergrooting.

Hierbij ziet men vooral in de lichtere partijen een verandering in de uitloopers der melanophoren. Waar deze bij normale huidstukjes fijne lange draden gelijken, is hier een duidelijke verkorting waar te nemen, terwijl ze ook dikker zijn. Ook de melanophoorlichamen zijn donkerder van kleur, tot zwart toe. In de open ruimten tusschen het mozaïek zijn nu vooral de xantholeucosomen goed zichtbaar, scherp begrensd als ze zijn door de lichte geheel doorzichtige plekken. Op verschillende plaatsen kan men nu duidelijk waarnemen een compacte grijsachtige massa, waarin op enkele plaatsen sterk geelgekleurde korreltjes liggen. Op sommige plaatsen kan men de xantholeucosomen als een ring waarnemen, waarvan het eene gedeelte gevormd wordt door de grijze massa. Terwijl in het andere gedeelte de geel-oranje korreltjes bij elkaar liggen. Hierdoor krijgt men inplaats van een egaalgele achtergrond, meer een vlekkelig, hier en daar slechts gele achtergrond, *met groote hiaten er tusschen*, terwijl ook door het ontbreken van het dooreengeweven zijn van de uitloopers der melanophoren ook het mozaïek zich scherper aftekent. Hieruit ziet men dus duidelijk dat *de inwerking voornamelijk op de xantholeucosomen plaats vindt*, die reageeren met een samenklontering. (Zie fig. 15.)

II. *Histamine 1:10.000.* Bij deze praeparaten ziet men dat zoowel bij de kleine als bij de groote vergrooting dezelfde veranderingen opgetreden zijn als bij de praeparaten die in rogge gelegen hadden, misschien in iets sterker mate n.l. een matige samenklontering der melanophoren en een sterkere samenballing der xantholeucosomen.

III en IV. Bij de praeparaten, die in Ringersche vloeistof gelegen hadden, trad geen verandering van het normale beeld op, terwijl de *adrenalinepraeparaten* een sterke samenballing der melanophoren vertoonde, zooals reeds bekend was.

Ook werden enkele kikvorschen in de dorsale lymphzak ingespoten, hetgeen als volgt geschiedde:

De kikvorschen hebben ongeveer een week in 't donker geleefd (met vocht) in de donkere kamer. Een zeer donkere vorsch en een lichter getint dier worden eerst gefotografeerd op een zwarte onderlaag en daarna te 10.52 in de dorsale lymphzak ingespoten. De donkere met 1 c.M.³ filtraat (ingedampt van 21 c.c. tot 4 c.M.³) van roggepollen-extract 16 en de lichtere met 1 c.M.³ histamine 1 %₀₀. De inspuiting heeft bij geel licht plaats. Een half uur later worden de dieren bekeken en blijken beide duidelijk lichter geworden te zijn. Drie kwartier na de inspuiting worden de tweede photo's gemaakt. (Het donkere dier vertoont teekenen van zwakte. (Zie fig. 16 en 17.)

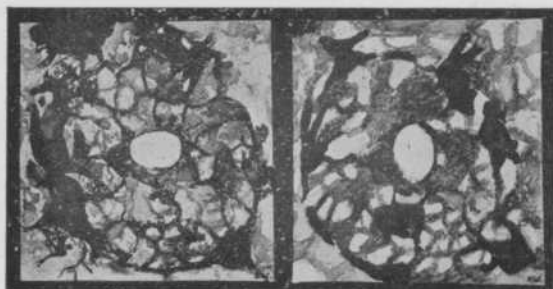
Te drie uur 's middags, d.i. $\pm$ 4 uur later, is de donkere vorsch nagenoeg hersteld, zoowel wat kleur als wat algemeene toestand betreft, doch de lichte heeft nog niet geheel de vorige tint verkregen.

Ter vergelijking werd den volgenden dag een donkere vorsch 1 c.M.³ ultrafiltraat phleum in de dorsale lymphzak ingespoten en een andere 1 c.M.³ buffervloeistof. Daarna werden de dieren 2 uur in 't donker gelaten. Er trad bij deze dieren geen verandering op.

Op grond van het boven beschrevene kan men dus besluiten, dat er door histamine een *samenballing optreedt in mindere mate van de melanophoren en vooral van de xantholeucosomen, terwijl deze veranderingen ook bij roggepollen-extracten optreden*, na $\pm$ 3 uur en waarvan het optimum bij een concentratie van histamine 1 : 10.000 ligt. Ook dat inspuiting in de dorsale lymphzak met beide stoffen het zelfde resultaat geeft. Daarentegen heeft inspuiting met pollen-extract van andere een gramineeënsoort geen verandering. Het moet dus wel een bijzondere stof zijn in het roggepollen, die de pigmentreactie teweeg brengt, een stof die ook in deze richting analogie met histamine vertoont.

A

B



Mozaïkelement uit kikkerhuidstukje:

A = 4 uur in koudbloeder Ringersche vloeistof.

B = 4 uur in 3 ‰ Roggepollen-extr. in Ringersche vloeistof

Fig. 15

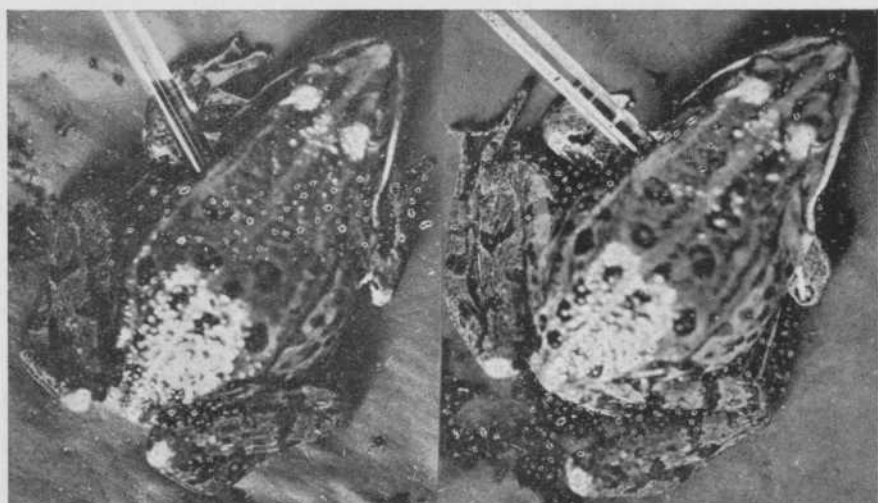


Fig. 16

Vóór

inj. 1 c.c.³ Histamine 1 ‰

Na

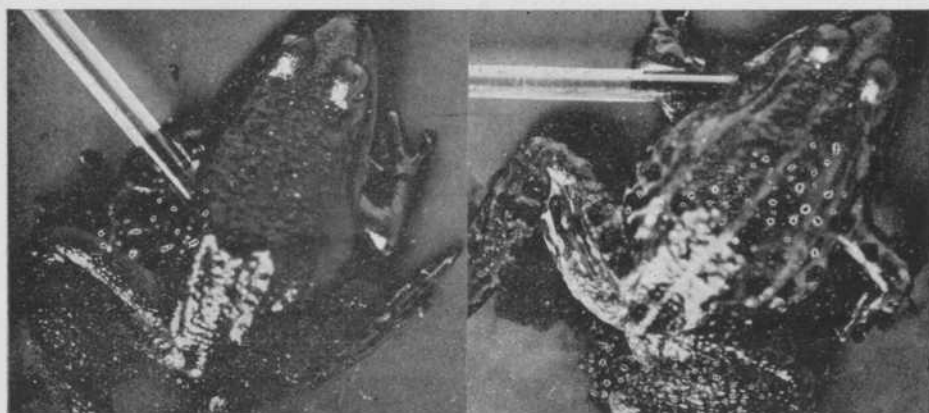
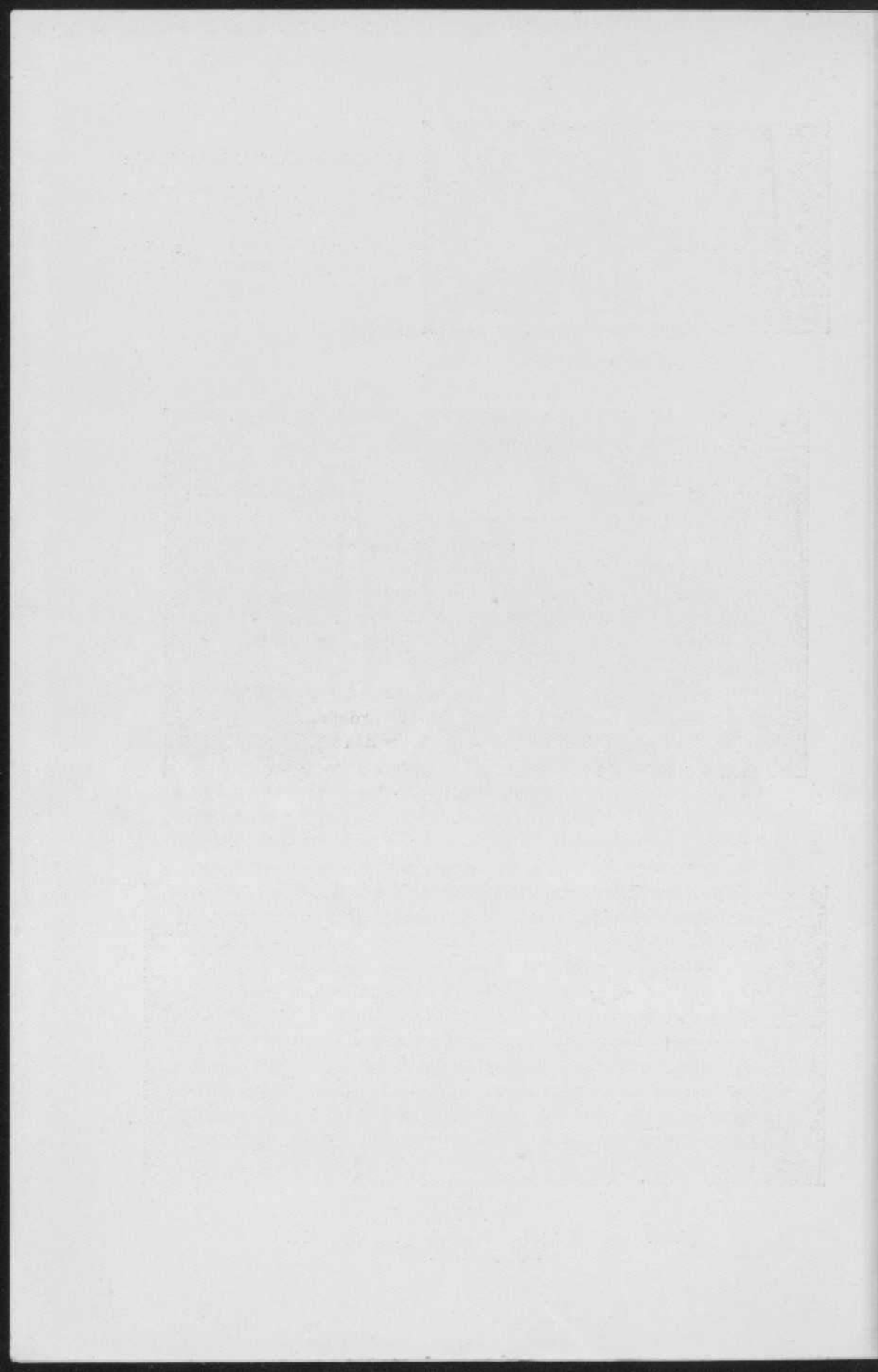


Fig. 17

Vóór

inj. 1 c.c.³ ingedampt
roggep.-filtraat.

Na



HOOFDSTUK V.

Proeven op den bloeddruk.

§ 1. Inleiding.

Zooals in 't litteratuuroverzicht reeds beschreven is, bestaat er een opvallend verschil in werking van histamine bij de verschillende dieren. Daarbij moet men de dieren verdeelen in twee groepen, de plantenetende en de vleeschetende dieren. Immers de werking bij deze twee groepen op 't bloedvatenstelsel is een geheel verschillende.

Zooals uit de onderzoekingen van Dale gebleken is, is histamine voor de laatste groep een capillairgift. Door de werking op de capillairen, die in een verlamming bestaat en dus verwijding van dit vaatgebied geeft, treedt dan ook bij deze dieren een bloeddrukdalende werking op. Echter treedt deze werking niet altijd op. De voorwaarden, waarvan 't optreden van de verwijding afhankelijk is, zijn nog niet bekend.

Van invloed hierbij is ook de werking van de verschillende narcotica. Bij aethernarcose b.v. is de bloeddrukdaling na inspuiting van dezelfde kleine dosis histamine, geringer dan bij een niet genarcotiseerde kat. Bij een grootere dosis daarentegen treedt een sterkere bloeddrukdaling op bij aethernarcose. Deze quaestie is vooral theoretisch van belang. Sommige schrijvers toch willen de werking van de bloeddrukdaling toeschrijven aan een contractie van de bronchiaalspiere. Zou dat het geval zijn, dan moest door diepe aethernarcose deze belemmering opgeheven worden en een niet zoo sterke bloeddrukdaling optreden, wat echter volgens Dale niet het geval is.

De invloed van aether op de werking van histamine op de capillairen verklaart Krogh zoo, dat aether zelf reeds verslappend op den vaatwand werkt, zonder echter op zichzelf een sterk effect te hebben; sommeeren zich echter deze invloeden, dan treedt wel een volledige verslappende werking op de capillairen op. Geheel anders is de bloeddrukwerking van histamine bij konijnen. Hierbij treedt na inspuiting van histamine vernauwing der bronchiolen en vernauwing der longvaten op en tevens verwijding van de vaten v. d.

groote circulatie. Deze laatsten kunnen echter ook met een vernauwing reageeren.

Heeft men nu een niet of slechts weinig genarcotiseerd konijn, dan treedt voornamelijk de werking op de bronchiaalspiere en de longvaten te voorschijn en treedt er een sterke bloeddrukdaling op, die door Dale en Laidlaw verklaard wordt door een belemmering van de inademing; daardoor een plotselinge vermindering van den intrathoracalen druk, wat weer tot een verwijding van 't rechter hart voert, dat tenslotte ophoudt met kloppen. Schakelt men de werking van histamine op de longvaten en musculatuur door diepe aethernarcose uit, dan hangt de werking van histamine alleen af van het reageeren van de vaten van de groote circulatie. Al naar zij zich zullen samentrekken of verwijden krijgen we een bloeddrukverhoogende of -verlagende werking. In diepe aethernarcose krijgt men nu meestal een vernauwing der vaten en dus een bloeddrukstijging. Echter niet altijd zooals de onderzoekers Dale en Laidlaw aantoonen. Waarom dat deze bloeddrukstijging dan niet optreedt, is nog niet verder opgehelderd.

Het verschil in werking van histamine bij de verschillende diersoorten wordt dus door den invloed, die ze ondergaan van de narcotica, duidelijk aangetoond.

Bij dieren, waarbij de histaminewerking zich kenbaar maakt vnl. door een contractie van de gladde spieren, zouden de narcotica een remmende werking uitoefenen, zooals bij konijnen en caviae.

Bij dieren, waarbij de histaminewerking veroorzaakt wordt door invloed op het capillairendotheel, zouden de narcotica sensibiliseerend werken.

§ 2. Eigen onderzoek.

Er is getracht het specifieke verschil in werking van histamine op den bloeddruk bij katten en konijnen, ook voor roggepollen-extract aan te toonen. Een groot bezwaar daarbij is, dat de drempelwaarde vrij hoog ligt. Meestal gebruikten de onderzoekers 0.03—0.05 m.gr. histamine, terwijl daarenboven hierbij het histamine als zuivere stof ingespoten werd, terwijl in het roggepollen-extract vele remmende stoffen aanwezig zijn, die vooral nadeelig werken, omdat groote hoeveelheden ingespoten moeten worden. Ook bleek het ter conserveering der extracten toegevoegde carbol (0.4 %) op zichzelf een bloeddrukverlagende werking te vertoonen. Derhalve werd als conserveeringsmiddel toluol gebruikt, dat op de

vloeistof drijft en niet in zoodanige hoeveelheid in de spuit opgezogen behoeft te worden, dat invloed op den bloeddruk wordt uitgeoefend. (Verder werden de extracten, om ze tegen bederf te bewaren, steeds in een ijskast bewaard, daar anders eventueel door rotting histamine zou kunnen optreden).

Om nu de mogelijke nevenwerking der groot moleculaire stoffen van het roggepollenextract uit te schakelen, werd slechts gebruik gemaakt van cellophaanfiltraten. Uit de hoofdstukken II en III hebben wij gezien dat de histamine-achtige stof in geringe concentratie aanwezig is, hetgeen een zeer groote hoeveelheid in te spuiten vloeistof zou vereischen. Daarom werden de ultrafiltraten dan ook ingedampt tot een vijf of zes maal kleinere hoeveelheid. Eerst werd in vacuo koud ingedampt, doch later uitsluitend in het waterbad bij 100°, na voorafgaand koken en affiltreren van het ontstane neerslag. In het eerste geval kristalliseerde een gedeelte van de in oplossing aanwezige Calciumzouten uit en in het laatste kwam er een lichte neerslag, waarschijnlijk van N— houdende lichamen. De sterkte was, waarschijnlijk door deze neerslagen, niet evenredig met de graad van indampen toegenomen, waardoor slechts een ongeveer driemaal zoo sterk reagerende vloeistof verkregen werd, zooals uit vergelijkende huidreacties bleek.

Er werden nu proeven bij konijnen en katten genomen, waarvan de resultaten aan 't eind van dit hoofdstuk besproken zullen worden.

De proefstelling.

Bij de konijnen wordt eerst de trachea vrij gelegd. Daarna wordt de n.vagus beiderzijds doorgesneden. Nu wordt aan den eenen kant de vena jugularis ext. vrij gepraepareerd en een metalen canule met stop er in gebracht en vastgebonden. Nu wordt aan den anderen kant de art.carotis opgezocht en vrij gepraepareerd en proximaal en distaal met twee kleine bulldogs afgeklemd, daarna geeft men er een kleine incisie in en er wordt een glazen canule ingebracht gevuld met verzadigde magnesiumsulfaatoplossing. Dit nu wordt verbonden met een open kwikmanometer, waarvan de kant, welke met de glazen canule in verbinding komt geheel gevuld is met de verzadigde magnesiumsulfaatoplossing. In de kwikmanometer heerscht een overdruk van 5 c.M. kwik. Men bereikt de rechtstreeksche registratie door op 't kwik van den manometer een lichten ivoren drijver te plaatsen, voorzien van een fijnen stang, waarvan dan een horizontale schrijfstift afgaat, die de op- en neergaande bewegingen

van 't kwik op een verticalen beroeten cylinder registreert. Een bijzondere zorg vereischt de narcose. Hiervoor wordt de trachea doorgesneden en een glazen canule erin vastgebonden, die door een rubberbuis verbonden is met 't bekende narcosetoestel van Ombredanne, 't welk voor dit doel slechts gevuld wordt met 30 c.M.³ aether, terwijl er een zijverbinding met een zuurstofcylinder gemaakt wordt, om bij eventueele ademhalingsstilstand de kunstmatige ademhaling hiermede te kunnen doen plaats hebben. De aethertoevoeraanwijzer wordt niet verder dan tot het cijfer 3 gebracht en in sommige gevallen tot cijfer 1, waarbij dus zeer weinig aether toestroomt. En toch werd meermalen de proef tot mislukking gebracht of ademstilstand en sterke bloeddruk daling verkregen. Het algemeen bekende feit dat konijnen zeer verschillend op aether reageeren, heeft ook bij deze proeven moeilijkheden gegeven. Doch men kan voor het aantoonen van histamine-werking geen ander narcoticum gebruiken.

Is alles nu in orde, dan wordt eerst bepaald of het dier na intraveneuse injectie van verwarmde histamine-oplossing met bloeddrukverhooging of -verlaging reageert en de dosis bepaald die nog net reactie geeft. Daarna volgt de injectie van het verwarmde ingedampde roggepollen-ultrafiltraat.

Bij de kat werd volkomen dezelfde techniek gevolgd, doch daarbij zorg gedragen de n.vagus zorgvuldig van de n.sympathicus te scheiden.

Alle proeven werden verschillende malen herhaald, bij hetzelfde of bij meerdere proefdieren.

Resultaten.

Bij de kat. Inspuiting van 1 c.M.³ zoutzure histamine 1 : 10.000, geheel in overeenstemming met hetgeen vroegere onderzoekers vonden bij toediening van een *kleine hoeveelheid histamine*, zien wij in fig. 18, dat reeds onder de inspuiting een steile daling van den bloeddruk begint, die geleidelijk weer tot den norm terugkeert.

Inspuiting van 1 c.M.³ ingedampt filtraat van roggepollen-extract. (De sterkte van dit ingedampte extract kwam wat de huidreactie betreft overeen met een histamine-opl. van 1 : 10.000).

De bloeddrukcurve (fig. 19) vertoont volkomen hetzelfde beeld als dat verkregen met de overeenkomende histamine-oplossingen.

Daar uit proeven bij het konijn gebleken was, dat niet alleen in

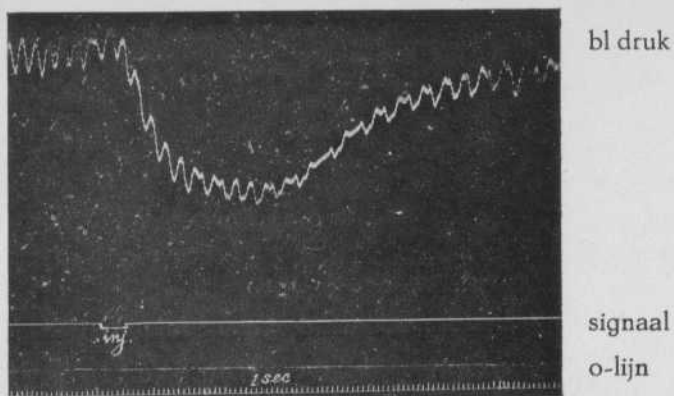


Fig. 18

Intraveneuse inspuiting van 1 c.M.³ zoutz.
histamine 1 : 10.000.

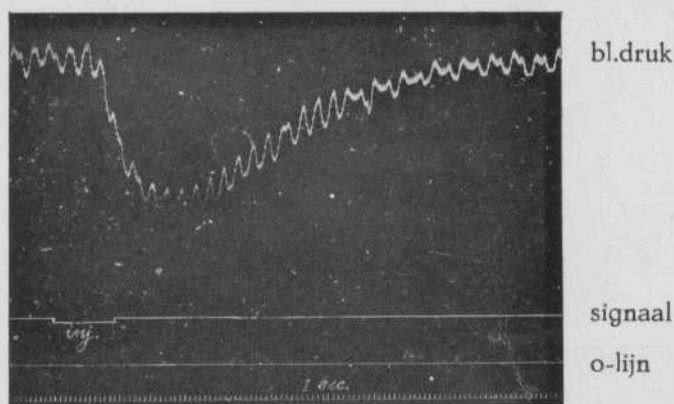


Fig. 19

Intraveneuse inspuiting van 1 c.M.³ ingedampt filtraat
van roggepollen-extract.

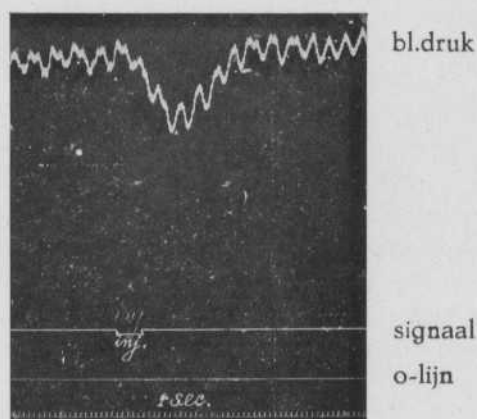


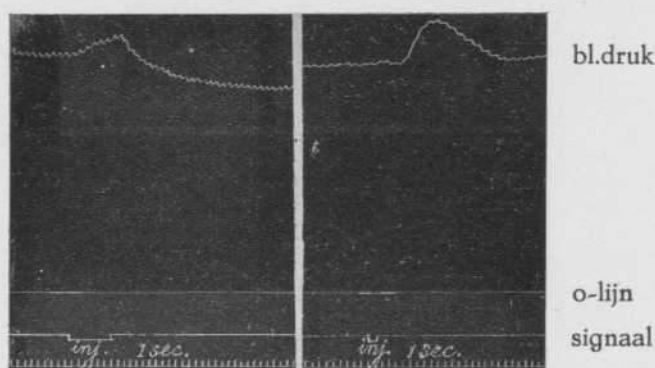
Fig. 20

Intraveneuse inspuiting van 1 c.M.³ ingedampt filtraat
van pollen-extract van Phleum pratense.

THE
LIBRARY OF THE
MUSEUM OF
COMPARATIVE ZOOLOGY
AT HARVARD UNIVERSITY
1280 DIVINITY AVENUE
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02138
U.S.A.

RECEIVED
JAN 10 1964
FROM
THE
LIBRARY OF THE
MUSEUM OF
COMPARATIVE ZOOLOGY
AT HARVARD UNIVERSITY
1280 DIVINITY AVENUE
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02138
U.S.A.

RECEIVED
JAN 10 1964
FROM
THE
LIBRARY OF THE
MUSEUM OF
COMPARATIVE ZOOLOGY
AT HARVARD UNIVERSITY
1280 DIVINITY AVENUE
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02138
U.S.A.



A Fig. 21 B

Intraveneuse inspuiting in curve A van 3 c.M.³
ultrafiltraat van roggepollen-extract (ingedampt).
Curve B van 0.25 c.M.³ zoutzure histamine 1 0/00.

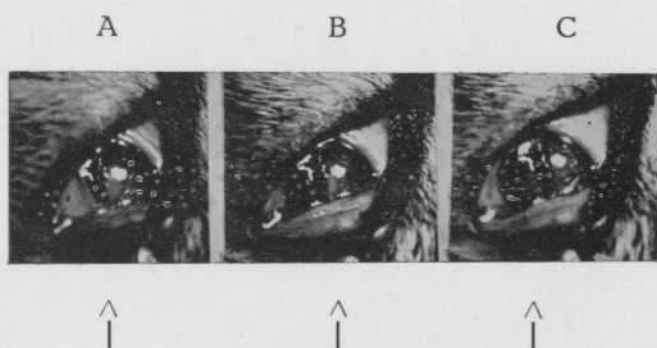
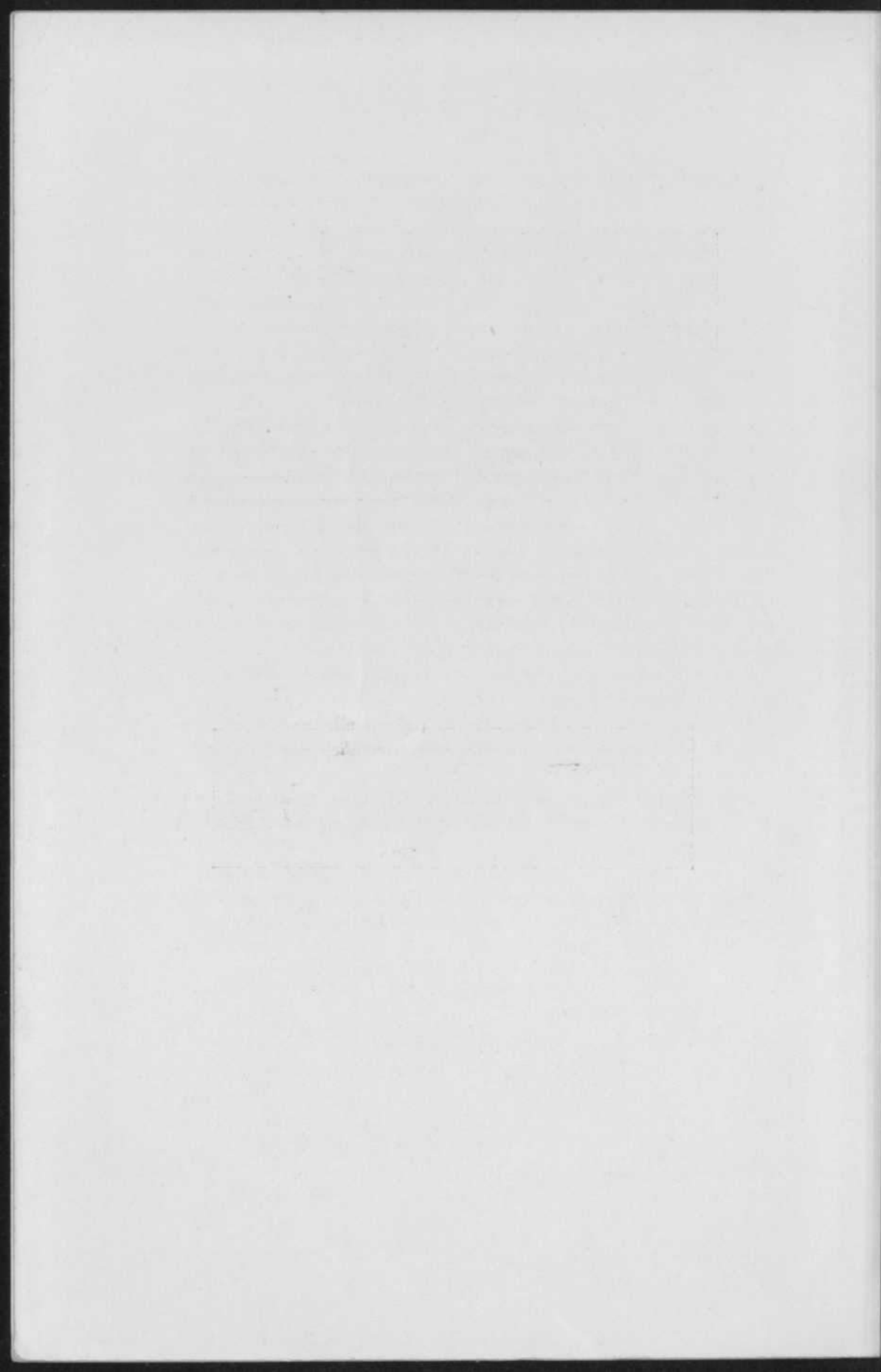


Fig. 22

Gedenerveerde linker pupil van de kat

- A. vóór inspuiting.
- B. 7 sec. na inspuiting 1 c.M.³ ingedampt filtraat van roggepollen-extract.
- C. 6 sec. na inspuiting 1 c.M.³ zoutz. histamine 1 : 10.000.



roggepollen-extract, doch ook in dat van andere pollens een of meer stoffen zitten, die overgaan in het cellophaanfiltraat, werd ook nog beproefd hoe 1 c.M.³ ingedampt filtraat van pollen-extract van *Phleum pratense* op den bloeddruk werkt. Uit fig. 20 ziet men, dat inderdaad een bloeddrukverlagende stof aanwezig is, doch in mindere mate, terwijl de bloeddruk daarna veel sneller weer stijgt.

Bij het konijn. Een der belangrijkste feiten voor de vaststelling van de te onderzoeken stof is de tegenstelling van werking op den bloeddruk bij kat en konijn. Daling bij de eerste, stijging bij de laatste door histamine (in diepe narcose).

In fig. 21 ziet men het verkregen resultaat der inspuitingen.

In curve A werd 3 c.M.³ gegeven van ingedampt ultrafiltraat van roggepollen-extract. Nog onder de inspuiting ziet men *een stijging optreden*, die gevolgd wordt door daling, beneden het oorspronkelijke niveau. Pas na eenigen tijd (niet meer op de curve te zien) wordt de oude drukhoogte bereikt. Hieruit volgt, dat er naast de drukstijging gevende stof een drukdaling veroorzakende aanwezig is. Nu hangt het voor het te verkrijgen effect er maar van af, welke van beide overweegt. Meestal ziet men eerst een korte stijging en daarna een langer durende daling.

Met pollens van andere gramineeën verkrijgt men een daling zonder voorafgaande stijging.

Men moet hieruit besluiten, dat de pollens alle een bloeddrukdalende stof bevatten, en de roggepollen bovendien een bloeddrukstijgende.

Ter vergelijking wordt curve B van fig. 21 gegeven, waaruit men de stijging van den bloeddruk ziet door inspuiting van 0.25 c.M.³ zoutzure histamine 1 0/00.

De slotsom van deze proeven op den bloeddruk is, dat roggepollen-extract dezelfde uitwerking vertoont als histamine en in het bijzonder de tegenstelling in werking bij de kat en het konijn.

HOOFDSTUK VI.

De werking van Histamine en Roggepollen-extract op de Iris.

Na intraveneuse inspuiting van histamine treden veranderingen van de pupil op, welke niet berusten op een directe inwerking van deze stof op de gladde spieren van de iris. Dale en later Kella en Cowell hebben aangetoond, dat de werking op de pupil een indirecte is en berust op een afgave van adrenaline door de bijnier, dewelke geprikkeld wordt door histamine, daar deze reactie niet meer optreedt na wegname van de bijniieren.

Het best is dit aan te toonen als men gebruik maakt van de methode van Meltzer en Auer om adrenaline in het bloed aan te toonen; wanneer men het bovenste sympathische halsganglion verwijderd, wordt de pupil overgevoelig voor de verschillende stoffen, die op de iris musculatuur in werken, waaronder vooral adrenaline.

Om nu na te gaan of histamine ook direct op de iris werkt, heeft Matsuda een methode aangegeven, waarvoor hij de indirecte inwerking als 't ware trachtte voor te zijn, door te zorgen dat histamine eerst de pupil bereikte alvorens in de groote bloedsomloop te komen. Daartoe spoot hij bij honden, katten en konijnen de histamine in de carotis of in de voorste oogkamer in. Bij enkele proefdieren was daarenboven nog eenige dagen van te voren het bovenste ganglion sympathicum verwijderd.

Daarbij kwam hij tot de volgende resultaten:

Bij konijnen bewerkte een dosis van histamine 0.1 mgr. een *pupilvernauwing*. De latente periode bedroeg tusschen de 20 tot 60 seconden en de vernauwing hield gedurende 3—5 minuten aan. In de voorste oogkamer gespoten werkt histamine ook vernauwend.

Bij katten geeft een dosis van 0.001 mgr. in de carotis ingespoten, verwijding van de pupil aan dezelfde zijde. De latente periode is 2 tot 4 seconden, terwijl de verwijding 10—30 seconden aanhoudt. Bij katten, waarbij eenige dagen te voren de halssympathicus verwijderd was, vertoonde de iris aan deze zijde een overgevoeligheid voor histamine, die varieerde van 10—1000 maal. Bij twee dezer katten trad geen verandering in gevoeligheid door de sympathicus-

operatie op. Ook bij inspuiting in de voorste oogkamer gaf histamine pupilverwijding. Bij honden verwijden de pupillen zich ook bij inspuiting in de carotis. Drempelwaarde 0.01—0.1 m.gr. Latentie 10—30 seconden, terwijl de duur van de reactie ongeveer twee minuten aanhield.

Eigen onderzoek.

Daar de drempelwaarden vrij laag liggen en dus deze reactie zich ook er voor leent om na te gaan, of de stof in de roggepollen identiek is met histamine, werden ook bij konijnen en katten deze proeven gedaan.

Hieronder volgt een protocol (sterk verkort, daar de inspuitingen meerdere malen herhaald werden).

8 Juni 1931. *Kat II*. Aethernarcose (Ombredanne) rustig.

Vena jug.ext.dextra vrij geprepareerd en venacannule ingebracht. Daarna trachea vrijgeprepareerd en hoog in den hals de linker N.sympathicus geïsoleerd van de N.vagus, op de electrode gelegd en met faradische stroom beproefd (hierop maximale pupilverwijding). Linker sympathicus doorgesneden, waarop spleetvormige pupilvernaauwing (zie fig. 22 A). Daarop intraveneuze inspuiting van de te onderzoeken stoffen (histamine 1 : 10.000 en rogge 23, 3 % pollenextract, gekookt, gefiltreerd, op $\frac{1}{4}$ ingedampt en wederom gefiltreerd).

I. 1 c.c. histamine 1 : 10.000. 6 seconden na de inspuiting verwijding van beide pupillen, doch vooral van de zijde van de sympathicusdoorsnijding (fig. 22 B). Na eenige seconden wordt de linker pupil weer nauwer, terwijl de rechter wijd blijft.

II. 1 c.c. ingedampt roggepollenfiltraat na 2 seconden begint reeds de verwijding beiderzijds (fig. 22 C), na 12 sec. begint aan de linkerzijde vernaauwing te komen, zoodat na 3 sec. de oorspronkelijke spleetvorm van de pupil bereikt is.

III. 1 c.c. Phleumextract ingedampt, nauwelijks reactie.

IV. Op 0.1 c.c. histamine 1 : 10.000 nauwelijks, op 0.2 c.c. duidelijke reactie.

Konijn IX lichte aethernarcose.

Canule in de linker oorvene.

I. 1 c.c. histamine 1 : 10.000 na 1 min. twijfelachtige reactie (nauwer worden der pupillen).

II. 0.8 c.c. histamine 1 : 1000. Na ruim 1 min. pupilvernaauwing,

die langzamerhand zeer sterk wordt, drie min. duurt en dan weer overgaat. Tijdens de maximale vernauwing is de pupilreactie op licht verdwenen. Dit duurt echter slechts kort.

III. 1 c.M.³ rogge-ultrafiltraat 17 ingedampt (met contrôle huidreactie iets sterker dan histamine 1 : 10.000).

Na 53 sec. lichte vernauwing van de pupillen, die slechts kort van duur is (duur niet opgenomen, naar schatting 15 tot 20 sec.), daarna reageert de pupil goed op licht.

IV. 2 c.c. van hetzelfde roggefiltraat. Na 1 min. duidelijke pupilvernauwing, niet zoo sterk als na hist. 1. Na bijna 3 min. heeft de pupil weer zijn oude breedte bereikt.

Zooals uit deze beide protocollen blijkt brengt het roggepollen-ultrafiltraat dezelfde reactie teweeg als histamine, n.l. *bij een kat verwijding en bij het konijn vernauwing van de pupil, terwijl er niet alleen wat de latente periode, maar ook wat den reactietijd betreft een duidelijke overeenkomst bestaat.*

We vinden in deze proeven wederom een krachtigen steun voor de aanwezigheid van histamine in de roggepollen-extracten.

Samenvatting.

Gaan we de resultaten na, die verkregen zijn met de verschillende proeven, dan moet de groote gelijkenis in werking van het Roggepollen-extract met histamine wel opvallen. Het mooiste te bereiken resultaat zou natuurlijk geweest zijn, wanneer het gelukt was het histamine chemisch zuiver af te zonderen, maar dat is, om redenen reeds vroeger vermeld, aan latere onderzoekers overgelaten. Beschouwen we echter de resultaten, die we met de physiologische proeven verkregen hebben.

1. De werking op de gladde muskulatuur van de uterus van cavia en felix domestica, zooals reeds door Benjamins en Vermeulen gevonden was. Bij deze zien we niet alleen een contractie optreden na toediening van beide stoffen, doch ook is er groote overeenkomst in werking, wat betreft de lichte uitwaschbaarheid en herhaalde mogelijkheid van reactie, dezelfde latente periode en in het potentieerende karakter. Met deze methode kon thans uitgemaakt worden het gehalte van de werkzame stof.

2. De huidreacties bij gezonde personen vertoonden dezelfde kenmerken als die met histamine, en ook door middel van deze

konden quantitatieve bepalingen uitgevoerd worden, dewelke tot resultaat hadden, dat de hoeveelheid van de werkzame stof vastgesteld kon worden als liggende tusschen 1 : 50000 en 1 : 75000 van een oplossing van histamine-chloride.

3. De werking op de contractiele elementen v. d. kikkerhuid was, wat betreft de samenballing van de melanophoren, als wel van de andere chromatophoren, weer dezelfde, waarbij, zooals vroeger reeds uitvoeriger vermeld is, het samenballen der guanolipophoren nog sterker op den voorgrond trad dan dat der melanophoren bij uitgesneden huidstukjes. Spoot men de stoffen in de dorsale lymfzak, dan zag men duidelijk lichter worden van de vorsch.

4. Wat betreft de werking op den bloeddruk van katten en konijnen, ook hierbij kon juist het typische verschil aangetoond worden dat tusschen deze beide dieren bestaat.

Immers bij konijnen treedt in diepe aethernarcose, waardoor de werking van histamine op de arteriolen en bronchiolen uitgeschakeld wordt, in de meeste gevallen bloeddrukstijging op door samentrekking der arteriolen van het periphere bloedvaatstelsel. Bij katten daarentegen staat de verwijdende werking op de capillairen op den voorgrond en door deze verwijding vindt er een bloeddrukdaling plaats. Dat typische verschil in werking, wat bij geen enkele andere stof optreedt en ook met Roggepollen-extract, dat door ultrafiltratie, koken en indampen zoo goed mogelijk bevrijd was van stoffen, die een andere werking op den bloeddruk konden teweegbrengen, optreedt, is weer een sterke aanwijzing in de richting, dat de veronderstelling, waarmede de onderzoekingen werden begonnen, juist geweest is.

5. Het tweede verschil in reactie bij deze beide dieren, nl. pupilvernauwing bij de kat na intraveneuze inspuiting en verwijding bij het konijn, kon eveneens aangetoond worden.

Op grond van bovengenoemde feiten mag men dus wel aannemen, dat de stof in roggepollen, die al deze verschijnselen geeft, identiek is met histamine.

LITTERATUUR.

- Abel en Kubota. H. of Pharmacol. Bd. 13. blz. 243. 1919.
 D. Ackerman. Zeitschrift Phisiol. Chem. 65. 504. 1910.
 Blackley. Expir. Researches on Causes and Nature of Hay fever 1873.
 Best. Dale. Dudley en Thorpe. J. of Physiology. 62.397.1927.
 Bishop en Kendall. Amer. Jl. Physiol. 85. 546. 1928.
 W. V. Buddenbrock. Grundrisz der Vergleichende Physiologie. blz. 390.
 Busson en Kirchbaum. Zbl. Bakt. Org. 65. 507. 1912.
 Dale. Brit. Jl. Ep. Med. Bd. 1. blz. 103. 1920.
 Dale and Dudley. J. of Physiol. 68. 97. 1929.
 Ellinger. Biochem Zeitschrift. Bd. 215. blz. 219. 1929.
 Ellinger. Archiv. f. exper. Path. 136. blz. 129. 1929.
 Ebbecke. Pflügers Archiv. 195. 300. 1922.
 W. Feldberg en E. Schilf. Histamin. 1930.
 Farmer Loeb. Klin. Wochenschrift. 8 Jahrg. 1929. 5. 926.
 Hogben en Winton. Biochemie Jl. Bd. 16. Blz. 619. 1922.
 „ „ Proc. Roy Soc. London (B) Vol. 95. blz. 15 1923.
 „ „ Proc. Royal Soc. London Vol. 43 blz. 325.
 Hanke en Koessler. J. of biol. Chem. 59. 879. 1924.
 Hewer. J. of Physiol. 68. 115. 1924.
 Kehrer. Archiv. f. exper. Path. 58. 366. 1908.
 A. Krogh. Anatomie und Physiologie der Capillaren.
 Anton Küpper. Ergebnisse der Physiologie. Bd. 30. blz. 153. 1930.
 St. Leduc. Die Ionen oder electrolytische Therapie. Leipzig 1905.
 Lewin en Schilf. (Matsuda) Archiv. f. Exp. Path. 142. blz. 70. 1929.
 Thomas Lewis. Die Blutgefäße der menschliche Haut. 1928.
 G. Liljestrand. und R. Magnus. Pflügers Archiv für die Gesamte Physiologie Bd. 176. 3 en 4. 1919.
 Martius. Archiv. für Psych. und Nerv. krht. 17. 1886.

- Oehme. Archiv. f. Exper. Pathol. Bd. 72. 76. 1913.
L. Popielski. Pflügers Archiv 178. 214. 1920.
G. v. Rijnberk. Ergebnisse der Physiologie. 5. 1, 2. 1960. blz. 347.
G. v. Rijnberk. in Zwaardemaker's Leerboek der Physiologie.
deel II, blz. 230.
W. J. Schmidt. Archiv. für microscopische Anatomie. 1920
Bd. 93. blz. 93. 414.
Stricker. in S. Wright. Applied Physiology. 1926. blz. 22.
Thorpe. Biochemic J. 22. 94. 1928.
Török en Rajka. Wien Med. Wochenschr. 1925.
Trendelenburg. Archiv. f. Exp. Path. Bd. 114. blz. 28. 1926.
Walzer en Grove. Journl. of Immun. 1925. X 484.
Windaus en Vogt. Ber.dtsch. chem. Gesch. 40. 369. 1907.
-

INHOUD.

	Bladz.
Inleiding	7
Hoofdstuk I. Litteratuur Overzicht	10
Hoofdstuk II. Uterusreacties ter bepaling van het gehalte aan histamine-achtige stof in roggepollen . .	16
Hoofdstuk III. Huidreacties	22
Hoofdstuk IV. Over den invloed van roggepollen-extract en histamine op de chromatophoren van de kikkerhuid	53
Hoofdstuk V. Proeven op den bloeddruk	69
Hoofdstuk VI. De werking van histamine en roggepollen- extract op de Iris	74
Litteratuur	78

