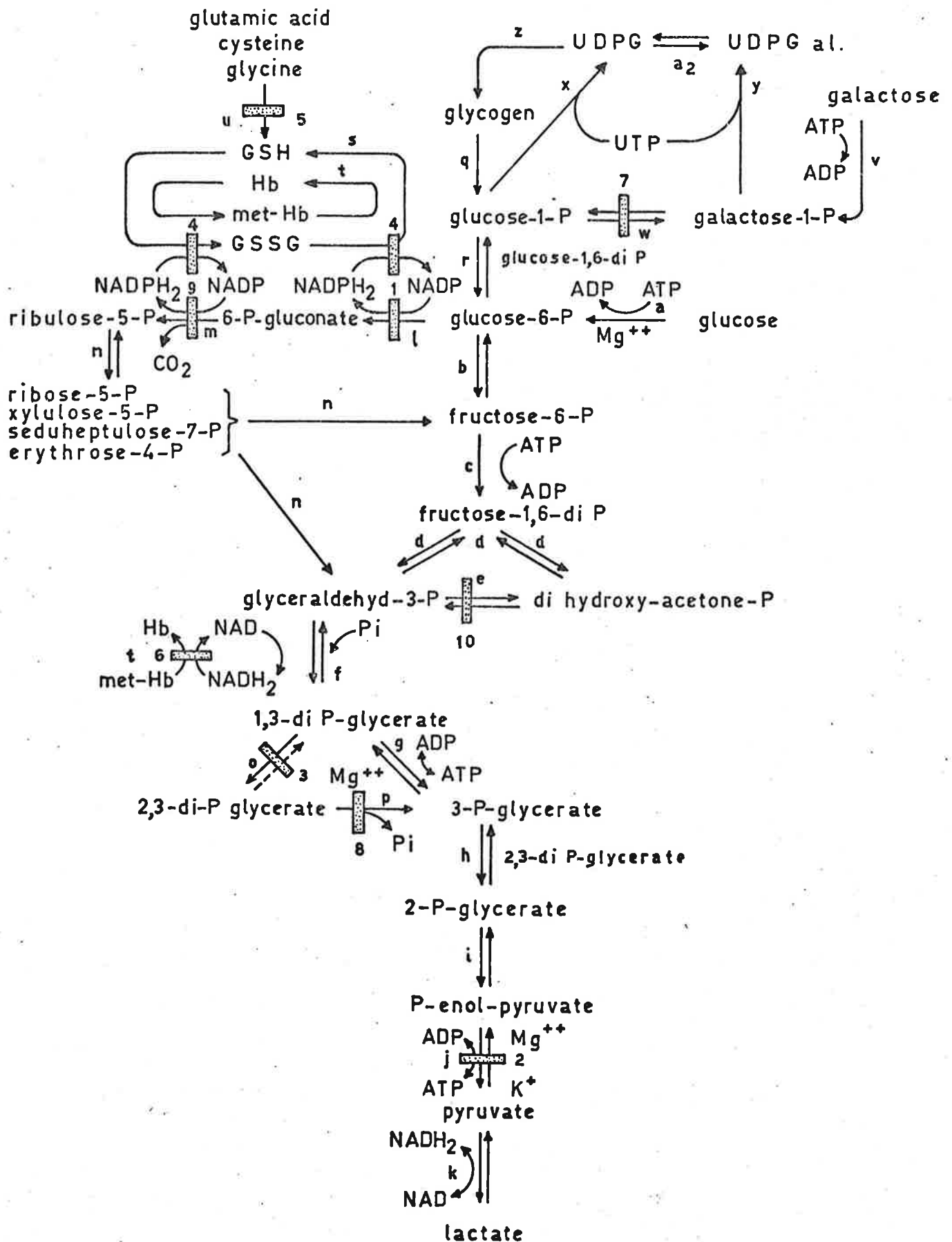


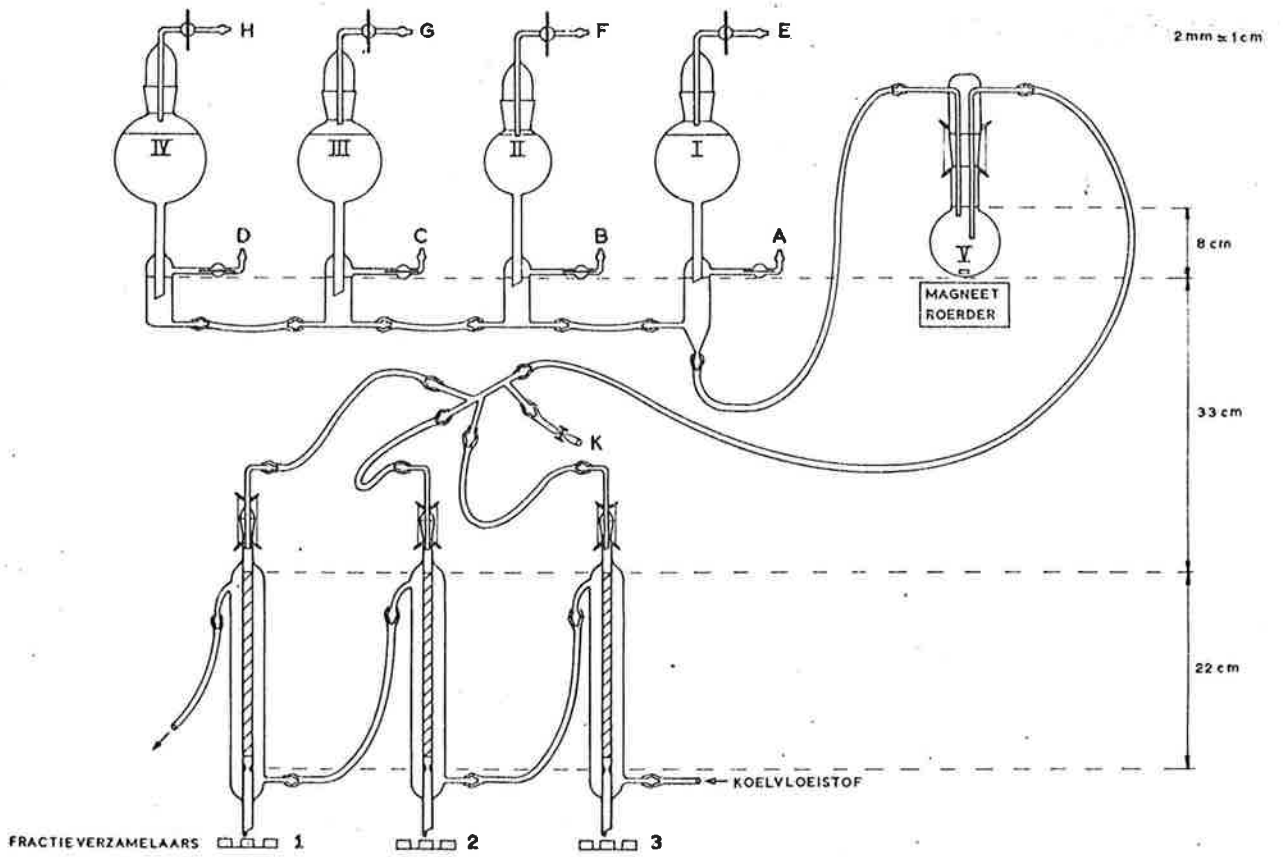
I N H O U D

1. De produktie van melkzuur uit 3-fosfoglyceraat door hemolysaat	
2. Enzymwaarden van pas geboren babies (apr.'64)	
3. Glycerol treated human red cells frozen with liquid nitrogen	3 pag.
4. De Chroom ⁵¹ methode	8 pag.
5. Haptoglobine bepaling	3 pag.
6. Haptoglobine-typering door middel van stijfsel-gel-electrophorese	3 pag.
7. Typering van glucose-6-fosfaat-dehydrogenase d.m.v. stijfsel-gel-electroforese	4 pag.
8. Electrophorese voor G6PD typering in polyacrylamidegel	5 pag.
9. De bepaling van haemoglobine in plasma	4 pag.
10. Bepaling van methaemoglobine in bloed	2 pag.
11. De bepaling van foetaal haemoglobine door middel van alkalische denaturatie	2 pag.
12. De electrophorese van haemoglobine op cellulose-acetaat-strips	2 pag.
13. De bepaling van Hb-A ₂ op kolommen van DEAE-Sephadex	3 pag.
14. Glutathion bepaling voor en na incubatie met acetyl phenylhydrazine	3 pag.
15. GSH-bepaling met 5,5' -dithiobis-(2-nitrobenzoëzuur)	4 pag.
16. De bepaling van glucose-6-fosfaatdehydrogenase-activiteit in menselijke erythrocyten	5 pag.
17. De bepaling van TPNH-afhankelijke glutathionreductase in menselijke erythrocyten	4 pag.
18. De bepaling van G6PD in thrombocyten en lymfocyten	2 pag.
19. De bepaling van 6-fosfogluconaat-dehydrogenase-activiteit in menselijke erythrocyten	3 pag.
20. De bepaling van pyruvaatkinase-activiteit in menselijke erythrocyten	3 pag.
21. De bepaling van glyoxalaseactiviteit in erythrocyten	5 pag.
22. De bepaling van fosfo-glyceraldehyde-dehydrogenase (PGADH) activiteit in menselijke erythrocyten	3 pag.
23. De bepaling van melkzuurdehydrogenase-activiteit in menselijke erythrocyten	3 pag.
24. De bepaling van het ATP-gehalte en de melkzuurproduktie tijdens de incubatie van menselijke erythrocyten in ringer-glucose en ringer-inosineoplossing	7 pag.
25. Trioseisomerase in hemolysaat	3 pag.
26. De bepaling van de ATP-ase activiteit van menselijke erythrocyten	5 pag.
27. De bepaling van het fosphaatgehalte in kolommenchromatografisch verkregen fracties, na destructie van de organische verbindingen met zwavelzuur	3 pag.

=====

28 = Isoleren van zuivere vitale lymfocyten uit perifeer mens.bloed	7 pag.
29 = Bepalen van de verdunningsfactor van een autodiluter	3 pag.
30 = Gemechaniseerde bepaling van stofwisselingsprodukten	12 pag.
31 = Uitvoering van de enzymatische bepalingen	6 pag.
32 = Aanzetten van de apparatuur	10 pag.
33 = De enzymatische bepaling van ATP + ADP	7 pag.
34 = Enzymatische bepaling van pyruvaat	2 pag.
35 = Enzymatische bepaling van 2,3-difosfo-glyceraat	3 pag.
36 = Enzymatische bepaling van 3-fosfoglyceraat	3 pag.
37 = Enzymatische bepaling van melkzuur	8 pag.
38 = Enzymatische bepaling van glycerol+glycerol-1-fosfaat	4 pag.
39 = Enzymatische bepaling van glucose-1,6-difosfaat	3 pag.
40 = Enzymatische bepaling van glucose	2 pag.
41 = Enzymatische bepaling van glucose-1-fosfaat (G-1-P)	
42 = Zuivering van glucose-1-fosfaat	2 pag.
43 = Zuivering van 3-fosfoglyceraat (3-PG)	4 pag.
44 = Het meten van de fosfaatincorporatie in nucleotiden v. lymfoc.	12 pag.
45 = Berekening van de gehalten van stofwisselingsprodukten aan de hand van recordertracks	4 pag.
46 = Glucose-fosfaat-isomerase in erythrocyten	2 pag.
47 = Kalium meting met behulp van een specifieke elektrode	5 pag.
48 = Electrofact pH/mV meter type 36200	3 pag.
49 = Acetylcholine esterase in erythrocyten	2 pag.
50 = Bepaling van haptoglobine in plasma of serum m.b.v. de autoanalyzer	7 pag.
51 = Bepaling van methaemoglobine-reductase in rode cellen	3 pag.
52 = Bepaling van het haptoglobinetype door middel van elektroforese in polyacrylamide	3 pag.
53 = Voorschrift voor het werken met de Oxygraaf	8 pag.





DE PRODUKTIE VAN MELKZUUR UIT 3-FOSFOGLYCERAAT DOOR HEMOLYSAAT

=====

Benodigde reagentia

1. los op in 8 ml 0,1 M Tris-HCl-buffer pH - 7,4; 8,1 mg Natriumzout van 3-fosfoglycerinezuur, 23 mg NADH₂, 16 mg Natriumzout van ADP, 19 mg MgSO₄.7 aq, 398 mg KCl.
2. 6% perchloorzuur en alle andere reagentia voor de bepaling van melkzuur.
3. bloed onstolbaar gemaakt met ACD wordt drie maal gewassen met fys. zoutopl. en de gewassen packed cells worden als zodanig ingevroren.

Uitvoering

Men pipetteert in een ijsgekoelde centrifugebuis 2 ml van het mengsel beschreven onder 1. en daarna 1 ml van de ontdooide cellen; onmiddellijk na het mengen wordt 0,5 ml van het mengsel bij 0,5 ml 6% perchloorzuur gepipetteerd en op de gebruikelijke manier tot extract verwerkt. De rest van het mengsel wordt in een waterbad bij 37°C geïnkubeerd en na 2, 4, 6 en 8 min. inkubatie wordt telkens 0,5 ml tot perchloorzuur extract verwerkt. In de extracten wordt op de gebruikelijke manier het melkzuur-gehalte bepaald en het ATP-gehalte. (voor de melkzuurbepaling werd 0,2 ml extract gebruikt en voor de ATP-bepaling 0,1 ml extract).

Resultaat

Op de beschreven manier werden 9 verschillende bloedmonsters afkomstig uit de plasmacampagne gebruikt voor de bepaling van de gemiddelde normale waarde van de melkzuurproductie uit 3-fosfoglyceraat

Monster	<u>tijdstip</u>				<u>tijdstip</u>				
	2	5	6	8	0	2	4	6	8
	<u>melkzuurproductie</u>				<u>ATP-gehalte</u>				
1	1.7	3.2	4.9	5.3	2.95	4.32	4.75	5.18	5.93
2	1.1	2.8	4.3	5.2	3.22	3.74	4.64	5.35	5.29
3	0.5	2.0	3.4	4.5	2.76	3.19	4.56	4.92	5.43
4	0.1	2.3	3.2	3.6	3.19	3.25	4.56	4.86	5.27
5	1.8	3.8	4.9	5.2	3.06	3.82	5.05	5.46	5.73
6	1.1	3.3	4.5	5.5	2.86	3.57	4.88	5.27	5.59
7			4.6	5.7	3.03			5.37	
8	0.7	3.2	4.5	5.3	2.89	3.87	5.13	5.75	6.67
9	0.4	3.0	3.7	4.8	2.84	3.71	4.77	5.67	5.51
10	0.3	1.9	3.4	4.8	3.71	4.28	5.23	6.68	7.00

gemiddelde melkzuurprod. = 0.99 ± 0.2 μmol/ml cellen/min.
 gemiddelde ATPstijging = 0.43 ± 0.1 " " "

ENZYMWAARDEN VAN PAS GEBOREN BABIES

Rome april 1964

	<u>G6PD</u>	<u>6PGD</u>	<u>GSH-Red.</u>	<u>GSH</u>	<u>PK.</u>
	37.7	17.0	29.0	72.5	38.9
2.	35.3	17.6	28.3	84.9	-
3.	-	-	-	73.9	-
4.	49.4	15.1	23.5	72.6	42.0
5.	48.4	14.7	19.2	72.0	46.7
6.	27.5	12.8	23.4	76.1	64.4
7.	-	-	-	89.6	-
8.	45.7	-	26.1	122.0	61.5
9.	49.6	-	20.9	106.0	37.0
10.	43.9	14.4	24.7	100.0	40.7
11.	42.9	-	19.2	81.9	42.3
12.	39.1	15.2	25.6	109.0	41.0
13.	-	12.4	-	75.9	-
14.	29.2	12.2	26.1	103.0	82.9
15.	34.2	13.5	23.2	109.0	85.0
16.	44.3	21.5	14.8	104.5	88.4
17.	42.0	11.6	26.6	114.0	54.0
18.	41.6	13.7	31.1	83.6	46.0
19.	39.0	14.4	28.5	59.6	48.7
20.	43.0	16.3	25.8	78.6	53.5
21.	30.2	13.6	13.7	112.1	53.0
22.	43.3	16.0	15.0	76.0	78.6
23.	52.6	11.9	26.7	86.4	55.3
24.	53.9	14.4	25.5	101.0	53.5
25.	51.4	13.8	25.7	79.9	45.6
26.	51.0	16.0	26.0	80.0	132.0
27.	91.0	15.8	32.7	58.6	133.3
28.	50.5	16.6	26.0	105.0	44.9
29.	49.8	14.6	24.7	112.0	57.2
30.	47.0	9.4	21.9	116.0	51.1
31.	45.3	13.8	25.7	110.0	54.6

GLYCEROL TREATED HUMAN RED CELLS FROZEN WITH LIQUID NITROGEN
=====

H.W. Krijnen, J.J.Fr.M. de Wit, A.C.J. Kuivenhoven, J.A. Loos
and H.K. Prins.

The Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Trans-
fusion Service, Amsterdam (Director: Prof. Dr J.J. van Loghem).
P.O. Box 200.

In the past the concept of preserving blood in the frozen state for
clinical use has been approached in two different ways with the
application of :

1. intracellular protective additives and slow freezing methods,
2. extracellular protective additives combined with rapid freezing
and thawing procedures.

In our research program to evaluate both methods we also studied the
possibility of the combination of these procedures by the use of
intracellular protective additives with rapid freezing and thawing
techniques.

The present study confirmed that by rapid freezing in liquid nitrogen,
it is possible to obtain very high recoveries of red cells with a low
concentration of an intracellular protective additive as glycerol.
In a final concentration of 17.5 % (w/v), glycerol gives a sufficient
protection of the red cells. After thawing the glycerol can be
removed without special equipment by washing with a 16% sorbitol
solution for maintaining an osmotic gradient.

The condition of frozen-thawed red cells, after washing reconstituted
in their own plasma, was first tested in vitro by studying the
metabolism and the osmotic fragility during 3 weeks storage at +4°C.
Then the viability in vivo of frozen, thawed and reconstituted
red cells was investigated by the Cr⁵¹ double tag procedure.
With both, in vitro and in vivo tests, very satisfactory results
were obtained.

Final procedure and direct red cell recovery

1. Centrifugation of 500 ml ACD-blood.
2. 250 ml of the supernatant plasma removed and stored at -30°C .
3. Addition to the remaining 250 ml red cells of 250 ml of a solution containing per liter: 350 g glycerol, 29 g sorbitol and 6,3 g NaCl.
4. Filling of a stainless steel container (dimensions 255x255x9 mm) with 500 ml of the glycerolized red cell suspension.
5. Static freezing of the completely filled container in vertical position. Freezing time 2,5 minutes in liquid nitrogen (temp. -196°C).
6. Storage in liquid nitrogen.
7. Thawing in a waterbath at $+40^{\circ}\text{C}$ by manual shaking in vertical position (+ 1 shaking/sec.). Thawing time 2,5 minutes.
8. Filling of a 500 ml glass bottle or plastic bag with the thawed cell suspension.
9. Centrifugation and removal of supernatant, followed by a washing with a solution containing per liter 160 g sorbitol and 8 g NaCl and two washing with physiological saline.
In all washing steps the bottle is filled with the washing fluid to the 500 ml mark.
10. Final addition of the thawed original plasma. The overall recovery of erythrocytes was 92% (range: 84 - 98%).

Good clinical results were obtained with the transfusion of 500 ml units of frozen-thawed red cells that, after deglycerolization were resuspended in autologous plasma. From the measurement of red cell survival, serum haptoglobin, as well as urobilin excretion, no evidence of increased red cell destruction was obtained. Also the creatinine clearance did not change.

References

1. H.W. Krijnen, J.J.Fr.M. de Wit, A.C.J. Kuivenhoven, J.A. Loos and H.K. Prins: Glycerol Treated Human Red Cells Frozen with Liquid Nitrogen; Vox Sang. 9: 559-572 (1964)
2. H.W. Krijnen, J.J.Fr.M. de Wit, A.C.J. Kuivenhoven and G. v.d.Reyden: Freezing of Red Cells with Liquid Nitrogen: I. Results with Glycerol as an Intracellular Substance; Proc. 10th Congr.Int.Soc. Blood Transf., Stockholm 1964; pp.683-686 (1965).
3. H.K. Prins, J.A. Loos, C. Zürcher and A.E.G.Kr. von dem Borne; Freezing of Red Cells with Liquid Nitrogen: II In vitro and vivo Studies on the Viability of the Red Cells after Freezing and Thawing; Proc. 10th Congr.Int.Soc.Blood Transf., Stockholm 1964; pp 687-691 (1965).
4. H.W. Krijnen, J.J.Fr.M. de Wit, A.C.J. Kuivenhoven: Intermediate Rate Freezing of Human Red Cells; Transfusion T. IX.No 1. (1966).
5. A.C.J. Kuivenhoven: Microscopic Observation of the Freezing and Thawing of Suspensions of Erythrocytes; Transfusion T. IX.No 1.(1966).
6. H.W. Krijnen, R. Goudsmit, J.J.Fr.M. de Wit, A.C.J. Kuivenhoven and H.K. Prins: Some Experiences with the Preservation of Frozen Glycerolized Red Cells; XIth Congress of the International Society of Blood Transfusion, Sydney, August 1966.

DE CHROOM⁵¹ METHODE

=====

Principe

In tegenstelling tot driewaardig Cr, kan zeswaardig Cr in de vorm van Na_2CrO_4 in de rode cel binnen dringen. In de cel wordt het dan gereduceerd tot driewaardig Cr en vervolgens gebonden, grotendeels aan haemoglobine. Uit deze binding kan het slechts zeer langzaam weer vrijkomen.

Op dit principe berust de methode van het merken van erythrocyten met $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$. Wanneer men met zure citraatglucose onstolbaar gemaakt bloed bij kamertemperatuur incubeert met tracer hoeveelheden $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$, dan is de binding van deze stof aan de erythrocyten binnen ongeveer 60 min. max. en bedraagt 90%.

De bij het merken gebruikte hoeveelheden chromaat zijn niet toxisch voor de rode cel. Toxiciteit treedt pas op bij gebruik van meer dan 30 μgr Cr per ml cellen. De binding van Cr^{51} aan de erythrocyt is niet geheel stabiel, per dag elueert 1-2 procent. Spuit men met Cr^{51} gemerkte erythrocyten in de bloedbaan in, dan zal de verdwijning van radioactiviteit uit de bloedbaan weliswaar een maat zijn voor de levensduur van deze erythrocyten, doch geen absolute waarden opleveren. Worden de gemerkte cellen ontijdig binnen de bloedbaan afgebroken dan is het vrijkomende driewaardige Cr^{51} niet meer in staat opnieuw erythrocyten te merken. Het wordt zeer snel, binnen minuten - uren door het R.E.S. (lever, milt enz.) en de nieren geelimineerd. Het Cr^{51} wordt dan gedeeltelijk in het R.E.S. gestapeld, gedeeltelijk verdwijnt het met de urine. Vindt de celafbraak in het R.E.S. plaats (waarbij de milt meestal een belangrijke rol speelt), dan zal het vrijkomende Cr^{51} tendele direct ter plaatse gestapeld worden, tendele ook weer met de urine verdwijnen. Daar Cr^{51} een gammastraler is, zal men door lichaamsmetingen de plaats of plaatsen van Cr^{51} stapeling kunnen localiseren en zo een indruk kunnen krijgen omtrent de wijze van bloedafbraak.

BenodigdhedenReagentia e.d.

1. Steriele, isotone $\text{Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ oplossing pH 7-8 met op t_0 2 mC in 10 ml, specifieke activiteit >20 mC/mg Cr (Philips Duphar) (halfwaardetijd Cr = 27.8 dagen)
2. Steriele fysiologische zoutoplossing (0.9% NaCl) (CLB) (flessen van 500 ml)
3. Steriele zure citraatglucose (2.3% dinatriumcitraat, 3.3% glucose) (CLB)
4. Saponinepoeder (Brocades)
5. Heparinepoeder (Vitrum)

Instrumentarium e.d.

1. Steriele gecalibreerde 100 ml flesjes (EFXZ) (CLB)
2. Steriele gecalibreerde 500 ml flessen (EFX) (CLB)
3. Afnamesystemen (CLB), afzuigsystemen (CLB), spuiten, naalden, puntbuizen e.d.
4. Glazen "tel" buizen met platte bodem (15x90 mm uitwendig) (eigen ontwerp)
5. Haematocrietcapillairen
6. Klinische centrifuge
7. Een gekoelde centrifuge voor 100 ml flesjes (b.v. Wilhelm Stock, Marburg)
8. Meetapparatuur voor gammastraling. Wij passen de Philips Gammaspectrometer toe, opgebouwd uit de eenheden PW 4042, 4032, 4062, 4082, 4072/01, 4073, 4025, 4029/01, 4071 met een scintillatiedetector met putkristal PW 4119/03, gevat in een loden collimator. Dit apparaat wordt ingesteld voor Cr^{51} door middel van de log.attenuator met de "high voltage supply" op ± 1200 V, kanaalhoogte van de discriminator 70-80 V Kanaalbreedte 32 V
9. Voor lichaamsmetingen: een rijdend statief waarmee de detector, geplaatst in een verticaal staande loden collimator (hoogte 25 cm inwendige diameter van de opening 6 cm) zowel in horizontale als verticale richting bewogen kan worden.

WerkwijzeHet merken der erythrocyten

Ongeveer 20 ml bloed wordt steriel afgenomen uit een armvene van de patient of donor en opgevangen in 4.5 ml zure citraatglucose in een 100 ml flesje. Hierbij wordt onder mengen 25-50 $\mu\text{C Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ gedruppeld ($\frac{1}{2}$ - 1 μC per Kg lichaamsgewicht). Vervolgens wordt 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd onder af en toe voorzichtig omschudden. Daarna wordt gewassen door het geheel met fysiologisch zout aan te vullen tot 100 ml en na mengen 5 tot 10 minuten af te draaien op 1000-2000 tpm. Het bovenstaande wordt steriel afgezogen. Daarna wordt nog één maal gewassen. Tenslotte worden de afgedraaide erythrocyten met fysiologisch zout op ongeveer 25 ml gebracht en geresuspendeerd.

Van het zo verkregen "infusiemengsel" wordt ongeveer 20 ml in een spuit gedaan en dit wordt snel intraveneus ingespoten bij de patient.

Door bepaling van het ingespoten gewicht (gewicht volle spuit - lege spuit) en het s.g. van het infusiemengsel kan men het ingespoten volume berekenen. Door eveneens de Cr^{51} activiteit (van een honderdvoudige verdunning) van het infusiemengsel te bepalen kan men de ingespoten hoeveelheid Cr^{51} activiteit berekenen (I)

N.B. Eventueel kan men het Cr^{51} bindingspercentage bepalen door de Cr^{51} activiteit van het totale ongewassen infusiemengsel, de haematocriet van het infusiemengsel en de Cr^{51} activiteit van het, na afdraaien verkregen bovenstaande van het infusiemengsel te meten. Het Cr^{51} bindingspercentage is dan:

$$\frac{(\text{Cr}^{51} \text{ activit. 1 ml inf. mengsel}) - (\text{Cr}^{51} \text{ activit. 1 ml bovenst. } \times \frac{100 - \text{haematocr.}}{100})}{\text{Cr}^{51} \text{ activit. 1 ml infusiemengsel}} \times 100$$

I De bloedvolume bepaling

Als de menging van de ingespoten gemerkte cellen in de bloedbaan compleet is, wat in het algemeen na 10 tot 15 minuten het geval is, neemt men 5 - 6 ml veneus bloed af, zonder te stuwen, in een buis met wat heparinepoeder erin. Men neemt het monster af uit de andere arm dan die waarin het infusiemengsel is ingespoten.

Men pipetteert van dit bloed 4 ml in een telbuis-haemolyseert met wat saponinepoeder en meet de Cr^{51} activiteit. Men telt hierbij meer dan 10.000 tikken. Uit de rest van het bloed bepaalt men de micro haematocriet in duplo.

Berekening

$$\text{Bloedvolume} = \frac{I}{A} \text{ ml}$$

I = de totale hoeveelheid ingespoten
 Cr^{51} activiteit in cpm

A = de Cr^{51} activiteit in het bloed
in cpm/ml

$$\text{Erythrocytenvolume} = \text{bloedvolume} \times \frac{\text{haematocriet}}{100}$$

Normale waarden: zie Mollison 1963

- N.B.
1. Nauwkeuriger is het een bloedmonster af te nemen na 10' 20' 30' en het bloedvolume te berekenen uit het gemiddelde van de Cr^{51} activiteit van deze drie monsters. Bij bloedafbraak, waarbij de Cr^{51} activiteit na 10' 20' en 30' al duidelijk dalende is, is dit beslist noodzakelijk. Door extrapolatie naar het tijdstip 0 komt men dan op de goede waarde.
 2. Eveneens is het nauwkeuriger de haematocriet te bepalen volgens Wintrobe en te corrigeren voor "trapped plasma" en lichaams haematocriet.

II Bepaling van de levensduur van de erythrocyten

Na 10' - 15', na 1 dag, 2 dagen, 3 dagen en vervolgens 1 tot 2 maal per week, neemt men een bloedmonster af van 5 tot 6 ml in wat heparinepoeder tot tenminste de helft van het Cr^{51} uit de circulatie verdwenen is. Is er duidelijk versterkte bloedafbraak dan neemt men iedere dag, of eventueel zelfs enkele malen per dag een bloedmonster af. In dit laatste geval kan men eventueel gebruik maken van een inblijvende heparinenaald of luer-loc naald. Van deze monsters pipetteert men 4 ml in een telbuis, haemolyseert met saponine en meet de Cr^{51} activiteit. Uit de rest kan men eventueel de haematocriet van ieder monster bepalen.

Indien men op verschillende dagen meet dient men te corrigeren voor radioactief verval met behulp van een Cr^{51} standaard die steeds meegemetten wordt. Men corrigeert dan meteen ook voor variaties in de gevoeligheid van de meetapparatuur.

De standaard wordt gemaakt door in een telbuis $\pm \frac{1}{2} \mu\text{C Na}_2\text{Cr}^{51}\text{O}_4$ te doen, hierop 4 ml warme, vloeibare agar 1.3% (Difco) te gieten en het geheel te laten stollen.

Berekening

De Cr^{51} activiteit in het eerste monster (10-15' na inspuiten afgenomen) van 4 ml vol bloed stelt men op 100%. De Cr^{51} activiteit van elk hierna afgenomen monster, gecorrigeerd voor radioactief verval, drukt men uit als het percentage van dit eerste monster.

Eventueel kan men alles omrekenen, uitgaande van de haematocriet en de Cr^{51} activiteit van 4 ml bloed op Cr^{51} activiteit per ml erythrocyten.

Men corrigeert dan voor de fout die men maakt tengevolge van de wisselende haematocriet van veneus bloed. De gevonden waarden worden uitgezet op millimeter-of semilogaritmisch papier tegen de tijd. Op het oog wordt de Cr^{51} verdwijningscurve getrokken en het tijdstip waarop de helft van het Cr^{51} uit de bloedbaan verdwenen is, bepaald.

Men noemt dit de schijnbare halfwaardetijd der erythrocyten.

Normale waarden

Cr^{51} T/2 29 ± 3.5 dagen

- N.B. 1. Bij snelle intravasale bloedaafbraak is ook in het plasma Cr^{51} activiteit aanwezig. Bij de bepaling van de Cr^{51} T/2 mag men dan niet van de Cr^{51} activiteit van vol bloed gebruik maken. Men kan dan of 4 ml vol bloed afdraaien, het plasma afzuigen, de cellen drie maal wassen met fysiologisch zout en de erythrocyten, teruggebracht met fysiologisch zout op een volume van 4 ml en gehaemolyseerd met saponine, meten, of de Cr^{51} activiteit in 4 ml plasma meten en uit deze waarde de haematocriet en de Cr^{51} activiteit van 4 ml vol bloed de Cr^{51} activiteit van de erythrocyten berekenen. De Cr^{51} activiteit van plasma geeft trouwens ook zelf informatie over de mate van intravasale afbraak.
2. Bij de bepaling van de levensduur der erythrocyten dient men rekening te houden met sterke veranderingen van het bloedvolume b.v. bloedtransfusies, groot bloedverlies enz.

III Bepaling van de plaats van maximale bloedaafbraak de z.g. lichaamsmetingen

Principe

Bij extravasale bloedaafbraak in het R.E.S. en wel speciaal in de milt, zal er Cr^{51} ter plaatse gestapeld worden. Deze stapeling zal men aan het lichaamsoppervlak boven de milt kunnen waarnemen en meten.

Bij intravasale bloedaafbraak zal vrijkomend Cr^{51} door het R.E.S. en wel speciaal de lever en de milt gestapeld worden. Daar de lever een veel groter volume heeft zal men deze stapeling vooral boven dit orgaan kunnen waarnemen en meten. Lichaamsmetingen kunnen dus informatie geven omtrent de wijze van bloedaafbraak. De boven het hart aan het lichaams-oppervlak gemeten Cr^{51} activiteit zal grotendeels bepaald worden door het doorstromende bloed.

Werkwijze

Nadat men het bloedmonster heeft afgenomen (20'-30' na injectie van het infusiemengsel, na 1,2,3 dagen en vervolgens 1-2 maal per week) meet men de Cr^{51} activiteit boven de punten van Hughes Jones en Szur 1957.

1. hart : 3e intercostaalruimte links, direct naast het sternum.
2. lever: in de medioclaviculairlijn 4 cm boven de ribbeboog.
3. milt : in de medioaxillairlijn op de 10e rib bij patient in rechter zijligging.

Soms is het voor de miltmeting nodig om het punt van de maximale activiteit te bepalen (vooral bij een kleine maar "actieve" milt).

De collimeter wordt verticaal boven het punt gebracht en vervolgens zover naar beneden gedraaid dat hij even contact maakt met de huid. Boven ieder orgaan worden twee series van ± 5000 tikken geteld (totaal dus ± 10.000 tikken per orgaan) en wel in een vaste volgorde b.v. hart-lever-milt-hart-lever-milt.

Berekening

De op de eerste dag na de injectie van het infusiemengsel boven het hart gemeten Cr^{51} activiteit, stelt men op 100%. De Cr^{51} activiteit gemeten boven lever en milt op de eerste dag boven hart, lever en milt op de daaropvolgende dagen drukt men, na correctie voor radioactief verval, uit als het percentage hiervan.

De gevonden waarden worden op millimeterpapier uitgezet tegen de tijd. Op het oog wordt de curve voor ieder orgaan getrokken. Uit deze curves berekent men 't quotient van de Cr^{51} activiteit gemeten boven milt en hart, en lever en hart op de eerste dag en op het moment waarop de schijnbare halfwaardetijd der erythrocyten bereikt is.

Uit deze getallen berekent men de sequestratieindices volgens Jandl e.a.1956.

Miltsequestratieindex =

$$= \frac{\text{Cr}^{51} \text{ act. boven milt op T/2}}{\text{Cr}^{51} \text{ act. boven hart op T/2}} - \frac{\text{Cr}^{51} \text{ act. boven milt op T/O}}{\text{Cr}^{51} \text{ act. boven hart op T/O}} \times 100$$

Leversequestratieindex is analoog hieraan

Normale waarden

Volgens Jandl is de normale miltsequestratieindex 30 - 60%

Literatuur

- E.E. Brongers: Academisch Proefschrift, Amsterdam 1961
 J.V. Dacie: Practical Haematology, third edition Churchill 1963
 N.C. Hughes Jones, L. Szur: Brit. J. Haemat. 1957, 3, 320
 J.H. Jandl, M.S. Grunberg, R.H. Yonemoto, W.B. Castle:
 J. Clin. Inv. 1956- 35^{II} -, 842
 L.G. Lajtha: The use of Isotopes in Haematology, first edition,
 Blackwell 1961
 P.L. Mollison: Blood Transfusion in Clinical Medicine, third edition
 Blackwell 1963
 R. Goudsmit: Academisch Proefschrift, Amsterdam 1958

HAPTOGLOBINE BEPALING

=====

Literatuur: E.E. Brongers, diss., Amsterdam 1961
Haptoglobine en verhoogdebloedafbraak

UitvoeringApparatuur

Het gebruikte electrophorese-toestel (fig.1) is in hoofdzaak gelijk aan dat, beschreven door Kohn (1958). Evenals Kohn, verrichten wij de electrophorese op stroken van cellulose-acetaat in plaats van papier. (Cellulose-acetaat-strips merk: Oxoid, Oxo Ltd London, afm. 5 bij 20 cm). Aan de spanningsbron worden geen andere eisen gesteld, dan dat de klemspanning variabel is tussen 150 en 250 volt, en dat in dit spanningsgebied een stroomsterkte van ongeveer 20 mAmp bereikt kan worden.

Bufferoplossing

De bufferoplossing, waarmee de electrophoresebak wordt gevuld en waarin ook de cellulose-acetaatstroken minstens een nacht lang gedrenkt moeten worden, bevat 0.1 M Boorzuur (6.2 g) per liter en is met NaOH op pH 8.5 gebracht.

Haemoglobine-oplossing

Verse, tenminste driemaal in physiologische zoutoplossing gewassen, menselijk erythrocyten worden gehaemolyseerd door schudden met 1 volume gedestilleerd water en $\frac{1}{2}$ volume tolueen. Na 20 minuten centrifugeren bij ca 3000 g worden de tolueenlaag en het daaronder opgehoopte stroma eiwit afgepipetteerd. Het aldus bereide haemolysaat bevat ongeveer 15% haemoglobine ext. (1 cm) = 8,58.
540(1%)

Het wordt met water verdund tot de haemoglobine-concentratie 1.5 g/100 ml bedraagt en vervolgens verdeeld in porties van ca 1 ml. De op deze wijze verkregen haemoglobine-oplossingen zijn, indien bij -20°C bewaard, minstens een half jaar lang bruikbaar.

Uitvoering van de bepaling

Een deel van het te onderzoeken serum (minimaal 1 druppel) blijft onbehandeld; van de rest wordt in 4 reageerbuizen 0,25 ml gepipetteerd. Bij deze laatste vier porties voegt men resp. 0.005, 0.01, 0.02 en 0.04 ml van de 1.5% Hb oplossing. Op deze wijze verkrijgt men een reeks van 5 serumporties waaraan opklimmende hoeveelheden haemoglobine zijn toegevoegd, resp. 0, 30, 60, 120 en 240 mg Hb/100 ml serum.

De cellulose-acetaatstroken worden kort voor de bepaling uit de bufferoplossing genomen, met filtreerpapier afgevlod, in twee stukken van $5 \times 10 \text{ cm}^2$ geknipt en in het electrophorese-apparaat aangebracht. Gedurende 10 minuten wordt een stroom van ca 2 mAmp per strook doorgelaten. Vervolgens wordt, met een Pasteurpipet, op één strip naast elkaar omstreeks 5 μl van iedere portie serum aangebracht. Na een stroomdoorgang van 2 mAmp per strook gedurende $1\frac{1}{4}$ - $1\frac{1}{2}$ uur wordt de lectrophorese beëindigd; men bespuit de nog natte stroken met een mengsel van 10 ml azijnzuur, 0.5 g benzidine en drie druppels waterstof-peroxyde oplossing (30%), om de haemoglobine bevattende zones zichtbaar te maken.

Aan het electrophorese-diagram is nu duidelijk af te lezen bij welke hoeveelheid toegevoegde haemoglobine het haptoglobine in het serum werd verzadigd doordat aan de zijde van de kathode achter de lijn van het haptoglobine-haemoglobine complex een tweede lijn, overeenkomende met de vrije haemoglobine, zichtbaar wordt. In sommige gevallen is in het albumine-gebied nog een derde haemoglobine-bevattende zone zichtbaar, tengevolge van de aanwezigheid van methaemalbumine.

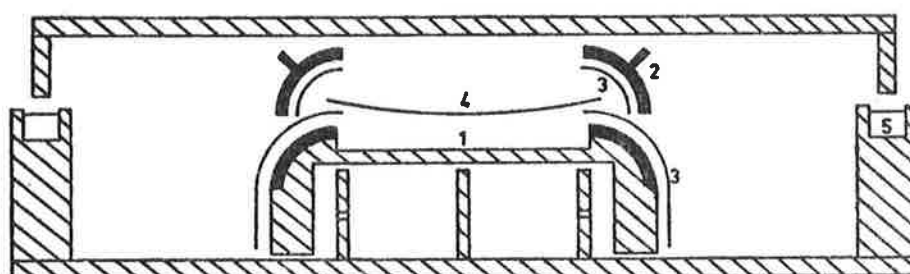
Indien in de onbehandelde serum-portie een haemoglobine-houdende zone te zien is, kan dit betekenen, dat bij de patient haemoglobinaemie bestond. Meestal echter is dit een aanwijzing, dat tijdens of na het afnemen van het bloed, haemolyse is opgetreden en dat de uitkomst van de bepaling niet de werkelijke haemoglobine-bindingscapaciteit van de patient weergeeft.

De uitkomst van de haptoglobine-bepaling wordt uitgedrukt als haemoglobine-bindingscapaciteit in mg haemoglobine per 100 ml serum tussen de door de bepaling gestelde grenzen.

De hoeveelheden toegevoegd haemoglobine zijn gekozen op grond van de door Nyman (1959) opgegeven uitkomsten voor de haemoglobine-bindingscapaciteit bij normale, gezonde personen: 28-192 mg Hb per 100 ml serum.

Eenvoudigheidshalve spreken wij in het vervolg van:

< 30 mg Hb/100 ml serum:	verlaagd haptoglobine gehalte		
30- 60 mg	"	laag normaal	" "
60-120 mg	"	normaal	" "
120-240 mg	"	hoog normaal	" "
< 240 mg	"	verhoogd	" "



Figuur 1

Doorsnede door het bij de haptoglobine-bepaling gebruikte electrophorese apparaat. (Overgenomen uit: „The Separation of Different Types of Human Haemoglobin”, H. K. Prins, 1959).

- 1 = brug.
- 2 = klemmetje, dat de cellulose-acetaatstrook aandrukt op het filtreerpapier.
- 3 = filtreerpapier.
- 4 = cellulose-acetaatstrook.
- 5 = water.

HAPTOGLOBINE-TYPERING DOOR MIDDEL VAN STIJFSEL-GEL-ELECTROPHORESE
=====Literatuur

O. Smithies, Bioch. J. 71 (1959) 585;
An improved procedure for starch gel electrophoresis;
further variations in the serum proteins of normal individuals

Bereiding bufferoplossing

Boraatbuffer pH 8,6 voor de electrodevaten (0,3 M H_3BO_3 , 0,06 M NaOH).
Per 2 liter buffer 37,08 g boorzuur en 8 g NaOH oplossen en pH contro-
leren.

Boraatbuffer pH 8,6 voor de stijfselgel (0,025 M H_3BO_3 , 0,0088 M NaOH).
Per 200 ml buffer 6,18 g boorzuur en 1,6 g NaOH oplossen. De verkregen
oplossing heeft een pH omstreeks 9. Vlak voor gebruik 25 ml verdunnen
met water tot 500 ml en pH controleren.

Bereiding stijfselgel

Zetmeel (Starch-hydrolysed for gel electrophoresis van Connaught medical
research laboratories, University of Toronto, Canada) wordt gesuspendeerd
in 500 ml 0,025 M boraatbuffer (de hoeveelheid zetmeel (ca 11 g per 100 ml
buffer) is voor iedere portie zetmeel door Connaught uitgezocht en op de
fles aangegeven), en in een 2 liters pyrex rondkolf op een grote open
gasvlam verhit onder voortdurend schudden. De massa wordt eerst viskeus,
maar bij verder verhitten wordt weer een dun vloeibaar mengsel verkregen;
om dit mengsel te ontluchten sluit men de kolf korte tijd aan op een
waterstraalpomp. De ontluchte vloeistof wordt nu in de trog gegoten
(voor de vorm van de trog zie Smithies 1959), waarna op de plaats waar
de te onderzoeken eiwitoplossingen in de gel zullen worden aangebracht
(ca 10 cm van één der uiteinden) een mal wordt aangebracht, welke van
te voren licht met paraffine-olie is ingevet en in de droogstoof op
temperatuur (ca 70°C) is gebracht. De zo bereide gel moet enige uren
afkoelen. Om excessieve verdamping te voorkomen, wordt de enigermate
afgekoelde gel afgedekt met cellofaan.

In afwijking met het voorschrift van Smithies (1959) is het door ons gebruikte apparaat niet in zijn geheel afgedekt met een perspex-plaat, omdat dan bij de afkoeling binnen-lekkende lucht te vaak scheuring of andere misvorming van de gel veroorzaakt.

Bereiding serummonsters

In het te onderzoeken serum wordt van te voren het haptoglobine-gehalte bepaald (zie haptoglobine-bepaling), waarna aan het serum een overmaat (doorgaans 240 mg %) haemoglobine wordt toegevoegd.

Gereed maken van de gel voor electrophorese

Na verwijdering van de mal en cellofaan vult men de openingen in de gel bijna tot boventóe met de te onderzoeken serummonsters (oppassen voor overlopen, filtreerpapier bij de hand houden). De gel wordt dan overgoten met een op 60°C gebracht mengsel van 55 g vaste paraffine en 250 g vaseline; allereerst wordt de serie opbrengsleufjes bedekt. Na het hard worden van de deklaag worden de zijschotten van de trog verwijderd, de gel wordt verticaal in het ene electrodevat geplaatst, met de opbrengplaatsen bovenin, terwijl de verbinding met het andere electrodevat tot stand wordt gebracht, door dit vat op een verhoging te plaatsen en een "brug" van filtreerpapier aan te brengen. Het bovenste uiteinde van de gel verbindt men met de negatieve pool van de spanningsbron, het onderste uiteinde met de positieve pool.

Duur van de stroomdoorgang

ca 16 uur;

Stroomsterkte

20 - 25 mA, bij ca 150 - 200 V.

De stroomsterkte loopt gedurende de proef iets terug, vooral in het begin; de spanning moet dan iets bijgesteld worden. De haptoglobine loopt naar de positieve pool, dus van boven naar beneden.

Ontwikkeling van het electrophorese-beeld

Na de stroomdoorgang wordt de paraffine-vaseline-laag verwijderd, de gel wordt overgebracht in een andere trog en met een speciaal hiervoor geconstrueerd apparaatje (waarvan het essentiële onderdeel een gitaarsnaar is) evenwijdig aan het grootste oppervlak doorgesneden. Een of beide helft(en) word(en) 15 minuten in een schaal met ontwikkelvloeistof gebracht. Samenstelling ontwikkelvloeistof: 0,3 g α -dianisidine (BDH), 210 ml aethanol, 30 ml 1,5 M acetaatbuffer pH 4,7 en 54 ml water; aan dit mengsel wordt vlak voor het gebruik 6 ml 2% waterstofperoxyde-oplossing toegevoegd. De ontwikkelvloeistof is niet houdbaar. Door deze ontwikkelvloeistof komen de haemoglobine-houdende zones te voorschijn als roodbruine lijntjes. Men kan op deze wijze in normale sera de typen 1-1, 2-2 en 2-1 onderscheiden.

Na de ontwikkeling wordt de gel gewassen met water. Het verkregen patroon is wekenlang houdbaar.

Frequenties van de verschillende haptoglobine-types in de Nederlandse bevolking

Van de verschillende vaderschapsonderzoekingen werden steeds de sera van de mannen en vrouwen onderzocht; de kinderen werden niet in de frequentie-bepaling betrokken.

Stand op 1 november 1969 :	Hp 1-1	Hp 2-1	Hp 2-2	totaal
	164=17,4%	462=49,0%	315=33,5%	941